

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
( Direktor: Univ. Prof. Dr. med. U. Hadding )

***Staphylococcus aureus* in Europa -  
Epidemiologie, Resistenzverhalten und Typisierung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Martin Kitzrow

2000

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger  
Dekan

Referent: Priv.Doz. Dr. Schmitz  
Korreferent: Priv.-Doz. Dr.Schulze-Röbbcke

Tag der mündlichen Prüfung: 20.6. und 21.06.2001

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
1.1	GENETISCHER HINTERGRUND DER METHICILLIN-RESISTENZ BEI <i>S. AUREUS</i> -STÄMMEN	5
1.2	DETEKTION DER METHICILLIN-RESISTENZ BEI <i>S. AUREUS</i> -STÄMMEN	7
1.3	VORKOMMEN VON MRSA	9
1.4	VERBREITUNG VON MRSA	10
1.5	PROBLEMATIK VON MRSA-INFEKTIONEN	11
1.6	METHODEN ZUR TYPISIERUNG VON MRSA	12
1.7	ZIELE DER ARBEIT	16
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>17</b>
2.1	EUROPEAN NETWORK FOR ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND EPIDEMIOLOGY	17
2.2	IDENTIFIZIERUNG VON <i>S. AUREUS</i>	18
2.3	RESISTENZTESTUNG VON <i>S. AUREUS</i>	22
2.4	TESTUNG AUF EINE HERABGESETZTE VANCOMYCIN-EMPFINDLICHKEIT DER MRSA-ISOLATE	22
2.5	TYPISIERUNG VON MRSA-ISOLATEN	23
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>26</b>
3.1	EPIDEMIOLOGIE VON <i>S. AUREUS</i> IN EUROPA	26
3.2	RESISTENZVERHALTEN DER <i>S. AUREUS</i> ISOLATE	28
3.3	TESTUNG DER MRSA ISOLATE AUF EINE REDUZIERT EMPFINDLICHKEIT GEGENÜBER VANCOMYCIN	30
3.4	TYPISIERUNG DER MRSA-ISOLATE	31
3.5	RESISTENZMUSTER UND GEOGRAPHISCHE VERBREITUNG DER EINZELNEN MRSA-TYPEN	33
3.6	EPIDEMIOLOGIE, RESISTENZVERHALTEN UND TYPISIERUNG DER <i>S. AUREUS</i> ISOLATE MIT EINER RESISTENZ GEGENÜBER QUINUPRISTIN/DALFOPRISTIN	34
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>35</b>
4.1	EPIDEMIOLOGIE VON <i>S. AUREUS</i>	35
4.2	RESISTENZVERHALTEN VON <i>S. AUREUS</i>	37
4.3	TYPISIERUNG VON MRSA-ISOLATEN	46
4.4	HYGIENEMABNAHMEN BEI MRSA-INFEKTIONEN	50
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>70</b>

## 1. EINLEITUNG

Auf den schottischen Chirurgen Ogston gehen die ersten grundlegenden Arbeiten über Staphylokokken zurück (75). Am 09. April 1880 hielt er seinen berühmt gewordenen Vortrag "Über Abszesse" auf dem 9. Kongreß der Deutschen Chirurgischen Gesellschaft in Berlin. Ogston konnte traubenförmig angeordnete Kokken in verschiedenen Eiterungsprozessen nachweisen. Ogston gab diesen Mikroorganismen den Namen *STAPHYLOCOCCUS*. 1884 klassifizierte dann der Göttinger Chirurg Rosenbach die Staphylokokken aufgrund der Pigmentierung ihrer Kolonien auf Agarmedien in die gelbpigmentierte Art "*Staphylococcus pyogenes aureus*" und in die weißpigmentierte Art "*Staphylococcus pyogenes albus*" (87). Danach gelang es allerdings jahrzehntelang nicht sicher, zwischen pathogenen und "harmlosen" Staphylokokken zu unterscheiden. Erst 1926 erkannte v. Darányi klare Zusammenhänge zwischen der Plasmakoagulase-Aktivität von Staphylokokken und ihrer pathogenen Bedeutung, so daß *Staphylococcus aureus* als die pathogenere der beiden Staphylokokkenarten diagnostiziert werden konnte. Aus heutiger Sicht hat sich die Bedeutung der Plasmakoagulase-Aktivität zur Differenzierung zwischen *S. aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken allerdings vor allem durch den Wandel im Patientengut (z.B. Zunahme immunsupprimierter Patienten, Patienten mit implantierten Fremdkörpern etc. ) verändert (79).

In der 'prä-Antibiotika-Ära' galt *S. aureus* als lebensbedrohender Erreger. In einer retrospektiven Untersuchung konnten Smith und Vickers (104) zeigen, daß in der 'prä-Antibiotika-Ära' über 90% der durch *S. aureus* bedingten Septikämien ohne Antibiotikabehandlung letal verliefen. Mit der Entdeckung des Penicillins, einem Stoffwechselprodukt des Schimmelpilzes *Penicillium notatum*, durch Fleming im Jahre 1928 (23), stand nach Überwindung zahlreicher Probleme wie Anreicherung, Reinigung und Großproduktion seit 1944 erstmals ein wirkungsvolles Therapeutikum zur Verfügung. Die Jahre 1946-1950 wurden daher auch als das "goldene Zeitalter" in der Behandlung von Staphylokokken-Infektionen bezeichnet. Seit 1944 konnte bei einem wachsenden Anteil der *S. aureus*-Isolate eine Resistenz gegenüber Penicillin beobachtet werden, die durch die Bildung einer Penicillinase verursacht wurde. Bei dem Enzym Penicillinase handelt es sich um eine Betalaktamase, die den Laktamring des Antibiotikums enzymatisch zerstört und es so wirkungslos macht. Bereits 1950 waren 80% aller *S. aureus*-Isolate, die in Krankenhäusern zu Infektionen führten, Penicillinasebildner (3, 50). Mitte der 50-iger Jahre standen mit Tetrazyklinen und Makroliden neue wirksame Antibiotika zur Verfügung, doch schon bald zeigten sich die ersten "multiresistenten" *S. aureus*-Stämme (34). Die Multiresistenz führte zu einem deutlichen Selektionsvorteil, sodaß sich die Erreger in den betroffenen Krankenhäusern schnell ausbreiten konnten. Einen vorübergehenden Erfolg im Kampf gegen resistente *S. aureus*-Isolate stellte 1961

die Entdeckung des ersten semisynthetischen Penicillins ('Celebin' oder BRL 1241, *METHICILLIN*), einem penicillinasefesten Betalaktam-Antibiotikum dar (5, 51, 85). Methicillin war jedoch nur parenteral anwendbar, relativ toxisch und hatte eine vergleichsweise geringe in-vitro-Aktivität auf Penicillinase-bildende Staphylokokken. Daher wurde es durch die später entwickelten penicillinasefesten Isoxazolympenicilline Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin und Flucloxacillin abgelöst. Diese sind gut wasserlöslich und auch oral einsetzbar.

Innerhalb von zwei Jahren nach Einführung des Methicillins kam es wiederum zu einer Resistenzentwicklung bei *S. aureus*-Stämmen (44, 77). Die Methicillin-resistenten *S. aureus*-Stämme (MRSA) breiteten sich in den folgenden dreißig Jahren sogar weltweit aus - allerdings in unterschiedlicher Geschwindigkeit und mit großen regionalen Schwankungen. Die ersten MRSA-Epidemien wurden Anfang der 60-iger Jahre in Großbritannien und Ende der 60-iger Jahre in Australien beobachtet (89). In den USA gab es dagegen vor 1976 überraschenderweise nur *einen* größeren MRSA-Ausbruch (4). Anfänglich konnten die MRSA noch durch den Einsatz von Aminoglykosiden, insbesondere Gentamicin, erfolgreich therapiert werden (40). Doch schon Ende der 70-iger Jahre traten die ersten Gentamicin-resistenten MRSA-Isolate auf (103), und es folgte eine Welle von MRSA-Epidemien weltweit. MRSA scheinen die Fähigkeit zu besitzen, innerhalb kürzester Zeit eine Resistenz gegenüber neu entwickelten Antibiotika auszubilden. Bis vor kurzem standen mit den Glykopeptiden Vancomycin und Teicoplanin noch sicher wirksame Therapeutika zur Verfügung. Doch seit dem Auftreten der ersten Vancomycin-intermediär resistenten *S. aureus* Isolate 1997 in den USA und Japan (13, 36) droht wiederum eine weltweite und zur Zeit noch nicht kontrollierbare Ausbreitung multiresistenter MRSA-Stämme.

## 1.1 GENETISCHER HINTERGRUND DER METHICILLIN-RESISTENZ BEI *S. AUREUS*-STÄMMEN

Molekulargenetisch liegt dieser Resistenz der MRSA-Stämme gegenüber den Betalaktam-Antibiotika die Synthese eines neuen, zusätzlichen Penicillin-bindenden Proteins (sog. PBP 2a), zugrunde. Die PBP's werden bei *S. aureus* nach fallendem Molekulargewicht geordnet (PBP 1-4). Bei den PBP's handelt es sich um membrangebundene Enzyme mit Carboxypeptidase-, Transpeptidase- oder Endopeptidase-Aktivität, die für die Bildung des Peptidoglykans in der Zellwand verantwortlich sind (79). Üblicherweise binden alle Betalaktam-Antibiotika stabil an das aktive Zentrum der PBP's und unterbrechen auf diese Weise die Zellwandbiosynthese mit konsekutiver Hemmung des Bakterienwachstums - mit dem am Ende der Reaktionskette stehenden Synthesestop des Peptidoglykannetzes. Die Folge ist ein durch Autolyse bedingter Zelltod.

MRSA verfügen sowohl über die PBP's 1-4 als auch über das PBP 2a. Aufgrund seiner deutlich geringeren Affinität gegenüber den Betalaktam-Antibiotika kann das PBP 2a die physiologische Funktion der übrigen von den Betalaktamen inaktivierten PBP's bei der Zellwandbiosynthese übernehmen (79). Damit entsteht ein alternativer Stoffwechselweg zur Bildung einer intakten Bakterien-Zellwand, den die Betalaktam-Antibiotika nicht mehr blockieren können. Die Folge ist eine Resistenz der MRSA-Isolate gegenüber allen Antibiotika mit Betalaktam-Struktur. Um diese Art der Resistenz von dem Mechanismus, der durch Betalaktamasen verursacht wird (enzymatische Zerstörung des  $\beta$ -Laktamringes mit sich daraus ergebender Wirkungslosigkeit des Antibiotikums), begrifflich zu differenzieren, wird von "intrinsic Resistenz" gesprochen.

Das Protein PBP 2a (78-kDa) wird durch das *mec A*-Gen kodiert, dem damit eine zentrale Bedeutung für die Ausbildung der Methicillin-Resistenz zukommt (48). Zusätzlich sind allerdings noch weitere Gene (sog. "auxiliary genes") an unterschiedlichen Stellen des Staphylokokken-Chromosoms identifiziert worden, deren Inaktivierung zu einer Reduktion der Methicillin-Resistenz führt (15, 16). In diesem Zusammenhang sollten hier neben den sog. *mecR*- und *mecI*-Genen auch die *femA-D* Gene erwähnt werden, die als Regulator-Gene essentiell für die Expression der Methicillin-Resistenz sind (61). Darüberhinaus wurden noch weitere 10-12 genetische Elemente nachgewiesen, die für die Expression der Methicillin-Resistenz mitverantwortlich sind (15, 16). So hat z.B. das *mecI*-Gen eine ausgeprägte Repressor-Funktion in Bezug auf die *mecA*-Gen-Transkription. Eine Deletion oder Mutation im Bereich des *mecI*-Gens kann somit bei *mecA*-positiven Staphylokokken-Isolaten zu einer stärker ausgeprägten Methicillin-Resistenz führen.

MRSA-Isolate verfügen in der Regel über das *mecA*-Gen und sein Genprodukt PBP 2a. Dennoch kommt es zur unterschiedlichen Expression der Resistenz im selben Stamm bei variierenden Kulturbedingungen oder zwischen verschiedenen MRSA-Stämmen unter den selben

Kulturbedingungen. Dieses Phänomen wird "Heteroresistenz" genannt (33). Bei einem solchen Stamm sind 99,9% der Bakterien empfindlich gegen Betalaktam-Antibiotika oder zeigen nur eine gering ausgeprägte Resistenz, während ein geringer Teil der Bakterien eine hochresistente Subpopulation repräsentiert. Faktoren, die die Expression dieser heterogenen Resistenz beeinflussen, sind (60, 122):

- Inkubationstemperatur ( bei 30°C sind mehr resistente Bakterien zu finden als bei 37°C)
- Inkubationszeit (resistentere Subpopulationen wachsen langsamer als sensible)
- Inokulummenge (je größer das Inokulum, desto wahrscheinlicher ist es, die resistentere Subpopulation zu detektieren)
- Osmolarität (NaCl-Zugabe zum Medium fördert die Expression der Resistenz)
- pH-Wert (Unterdrückung der Resistenz um  $\text{pH} \leq 5,2$ )
- Passagen mit Betalaktam-Antibiotika-Zusatz (Selektion der resistenteren Keime)

Ohne Berücksichtigung dieser Faktoren für den Nachweis von MRSA können heterogene Stämme fälschlich leicht als Methicillin-sensibel eingestuft werden.

Die phänotypische Expression der Methicillin-Resistenz ist also abhängig von verschiedenen äußeren Bedingungen (s.o). Unter Berücksichtigung dieser Faktoren hat das National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) der USA Richtlinien zur Detektion der phänotypischen Expression einer Methicillin-Resistenz erstellt (71, 72). Man unterscheidet "low level-resistente" (MHK zwischen 2-8 µg/ml) bzw. "high-level-resistente" (MHK >8 µg/ml) MRSA. Die "low-level" resistenten MRSA sind nicht intrinsisch-resistent, d.h. sie besitzen nicht das *mecA*-Gen und exprimieren nicht das Genprodukt PBP 2a. Stattdessen kommen bei diesen MRSA alternative Resistenzmechanismen zur Geltung. Eine "low level-Resistenz" gegenüber Methicillin in *mecA*-negativen *S. aureus*-Stämmen kann durch eine gesteigerte Produktion von Betalaktamasen, die Bildung eines normalen Penicillin-Bindungsproteins mit herabgesetzter Bindungskapazität, die Bildung einer neu beschriebenen Methicillinase sowie durch andere, bisher nicht identifizierte Faktoren hervorgerufen werden (37, 38, 70). Die klinische Bedeutung dieser "low-level" resistenten MRSA ist bislang noch sehr gering, so daß die Problematik der "high-level" resistenten MRSA zur Zeit und sicherlich auch in der näheren Zukunft im Mittelpunkt des mikrobiologischen, klinischen und krankenhaushygienischen Interesses steht.

## 1.2 DETEKTION DER METHICILLIN-RESISTENZ BEI *S. AUREUS*-STÄMMEN

Für Resistenzbestimmungen im Labor wird, insbesondere in Europa, nicht das Methicillin, sondern das Oxacillin, ebenfalls ein penicillinasefestes Betalaktam-Antibiotikum, eingesetzt, da es eine höhere Stabilität aufweist und sich daher besser für diagnostische Verfahren eignet. Der international übliche Terminus ist aber "Methicillin-resistenter *S. aureus*", so daß auch im folgenden nur von MRSA gesprochen wird. Als herkömmliche Verfahren stehen zur Detektion der Methicillin-Resistenz mehrere Methoden zur Verfügung:

- Agar-Diffusionstest
- Oxacillin-supplementierte Agar-Platte als Screening Platte
- Mikrodilutionsverfahren.

Am weitesten verbreitet dürfte in Deutschland zur Detektion von MRSA die Agar-Diffusionsmethode nach Kirby-Bauer sein. Zur korrekten Durchführung sind allerdings einige Modifikationen im Vergleich zur üblichen Methode erforderlich. Die Inkubationstemperatur sollte bei 30°C liegen, die Inkubationszeit 48 h betragen, die Inokulummenge 100-fach höher als bei anderen Mikroorganismen liegen; 2% NaCl sollten zum Testmedium hinzugegeben werden, und schließlich sollte der pH-Wert des Mediums oberhalb von 5,2 liegen. Das Oxacillin-Testblättchen ist separat auf eine solche Agar-Platte aufzulegen, da durch das NaCl die Ergebnisse anderer Antibiotika-Testungen im Agar-Diffusionstest beeinflusst werden können. Üblicherweise werden unter den o.g. Bedingungen Oxacillin-Testblättchen mit einer Beschickung von 5 µg verwendet.

Die Oxacillin-Screening-Platte wird meistens mit 5% NaCl und 6 g Oxacillin/l supplementiert. Nach Ausstreichen des Materials auf der Platte wird auf ein mögliches Wachstum von Keimen geachtet, die dann per definitionem Methicillin-resistent sind.

Im Rahmen des Mikrodilutionsverfahrens wird durch Anlegen von Verdünnungsreihen die Minimale Hemmkonzentration bestimmt, bei der kein Bakterienwachstum mehr in Gegenwart von Methicillin zu beobachten ist.

Zwar werden nach wie vor die herkömmlichen Empfindlichkeitsuntersuchungen (Agardiffusion, Mikrodilution oder Einsatz von Screening-Platten) routinemäßig in den meisten mikrobiologischen Laboratorien eingesetzt, jedoch muß ein molekularbiologischer Nachweis von Resistenzgenen als in Zukunft alternative bzw. ergänzende Methode in Betracht gezogen werden (9, 26, 52, 112, 114) zumal in Grenzfällen die klassischen Verfahren nicht immer ausreichend zuverlässig sind. Die Schwierigkeiten in Hinblick auf eine korrekte Detektion der phänotypischen Expression einer Methicillin-Resistenz lassen sich durch den molekularbiologischen Nachweis von Resistenzgenen vermeiden.

Abgesehen von den zahlenmäßig geringen Sonderfällen der "low-level" Methicillin-Resistenz konnten Hybridisierungsuntersuchungen mit Gensonden zeigen, daß das *mecA*-Gen bei nahezu allen intrinsisch Methicillin-resistenten Staphylokokken nachweisbar ist (112, 114). Damit ist das Vorhandensein des *mecA*-Gens zur Detektion der Methicillin-Resistenz von herausragender Bedeutung. Der Nachweis von *mecA* mit Hilfe eines Hybridisierungs-Assays birgt allerdings einige Nachteile. Die DNA-Extraktion aus einer relativ großen Anzahl von Zellen ist erforderlich, der Testablauf ist zeitaufwendig, und oft ist der Einsatz radioaktiv markierter Gensonden nicht zu vermeiden. Der Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von *mecA* umgeht einige dieser grundsätzlichen Probleme von Hybridisierungstesten, indem die DNA-Preparation in der Regel kürzer und einfacher ist und der Ansatz nur einige Stunden erfordert.

### 1.3 VORKOMMEN VON MRSA

Hinsichtlich des *S. aureus*-Nachweises bei Patienten muß zwischen einer Kolonisation und einer Infektion unterschieden werden. Die Kolonisation ist zwar die Voraussetzung für eine Infektion, muß aber nicht zwangsläufig dazu führen. 10-40% der "gesunden Normalbevölkerung" sind Keimträger von *S. aureus*, während 45-65% des Krankenhauspersonals betroffen, d.h. kolonisiert sind (83). Man differenziert zwischen persistierenden, intermittierenden und sporadischen Keimträgern. Von einem persistierenden Keimträger wird gesprochen, wenn derselbe Staphylokokkenstamm über längere Zeit auf Haut und/oder Schleimhaut nachweisbar ist. Der intermittierende Keimträger ist zwar auch ständig mit *S. aureus* besiedelt, die angezüchteten Stämme sind jedoch verschieden. Als sporadischer Keimträger gilt eine Person, die zufällig und meist vorübergehend mit *S. aureus* besiedelt ist. Entsprechend der Ergebnisse von Pulverer (83) sind insgesamt 62% des Klinikpersonals *S. aureus*-Keimträger im Bereich des Vestibulum nasi und 56% im Handbereich - unabhängig davon, ob es sich hierbei um persistierende, intermittierende oder sporadische Besiedlungen handelt. 26% des untersuchten Klinikpersonals sind persistierende Keimträger im Bereich des Vestibulum nasi, aber nur 4% im Handbereich. Für die Weiterverbreitung von *S. aureus* ist sicherlich der persistierende *S. aureus*-Keimträger von größter Bedeutung. Epidemiologische Untersuchungen haben gezeigt, daß MRSA-Stämme bei 1-6% des Krankenhauspersonals vorkommen (121). Der Nasen-Rachenraum gilt auch bei den MRSA als bevorzugtes Keimreservoir. Die mittlere Halbwertszeit für MRSA im Nasen-Rachenraum wurde mit 40 Monaten angegeben (91), so daß Keimträger ohne eine erfolgreiche "Sanierung" (z.B. durch die nasale Applikation von Mupirocin) für lange Zeit als potentieller Streuherd auf Stationen gelten können (41).

Eine Übertragung von Mensch zu Mensch findet in der Regel über eine transiente Besiedlung der Hände statt. Das Krankenhauspersonal oder andere Patienten können hierbei den jeweiligen Stamm entweder nach direktem Kontakt mit einem kolonisierten/infizierten Patienten über die Hände erwerben, oder der MRSA kann durch die Berührung kontaminierter Gegenstände der Umgebung sowie aus dem eigenen Keimreservoir des Nasen-Rachenraumes an die Hände des Klinikpersonals bzw. anderer Patienten gelangen (83). Der intensive Antibiotikaeinsatz im Krankenhaus (insbes. mit Breitspektrum-Antibiotika) erhöht dabei das Risiko einer MRSA-Infektion, da künstlich ein Selektionsvorteil für resistenterer Keime geschaffen wird.

## 1.4 VERBREITUNG VON MRSA

Die Bedeutung und das Risiko des Auftretens von MRSA als Erreger nosokomialer Infektionen nehmen in vielen Ländern, u.a. auch in der Bundesrepublik Deutschland, zu. Über einen 17-jährigen Beobachtungszeitraum (1975-1991) konnte ein kontinuierlicher Anstieg des MRSA-Anteils an isolierten *S. aureus*-Stämmen in US-amerikanischen Kliniken von 2,4% auf 29% beobachtet werden (76). Dabei sind allerdings große Schwankungen zwischen den Krankenhäusern und unterschiedlichen Regionen zu berücksichtigen. Die Zunahme verlief in Krankenhäusern verschiedener Größe interessanterweise unterschiedlich schnell. In Häusern mit 500 oder mehr Betten wurde eine Häufigkeit von 5% schon im Jahre 1983 überschritten, in Kliniken mit 200-499 Patientenbetten im Jahre 1985 und in Hospitälern mit weniger als 200 Betten erst im Jahre 1987. Danach verliefen die Steigerungskurven fast parallel, so daß unabhängig von der Größe des Krankenhauses eine Zunahme des MRSA-Aufkommens zu beobachten war. Der prozentuale Anteil der MRSA an allen *S. aureus*-Isolaten betrug 1991 in Krankenhäusern mit weniger als 200 Betten 14,9%, in Häusern mit 200-499 Betten 20,3 % und in Kliniken mit 500 oder mehr Betten 38,3%. Die Daten des "Nationalen Referenzlabors für die Lysotypie von *S. aureus*" in Bonn verdeutlichen eine ähnliche Problematik auch für Deutschland. In den Jahreskollektiven stationär behandelter Patienten zeigte sich eine Zunahme des Anteils an MRSA-Stämmen von 4,8% im Jahre 1987 auf 16,3% im Jahre 1993. Diese Zahlen dürften die Realität nur z.T. widerspiegeln, da in der Regel nur ausgewählte Isolate zur Lysotypie eingesandt werden. Die Studie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft aus dem Jahre 1998 erbrachte einen Durchschnittswert von 15,2% MRSA in den 33 bundesweit beteiligten mikrobiologischen Laboratorien. Damit wächst auch in der Bundesrepublik Deutschland die MRSA-Problematik.

## 1.5 PROBLEMATIK VON MRSA-INFEKTIONEN

Infektionen mit MRSA sind aufgrund therapeutischer Probleme und aus krankenhaushygienischer Sicht von besonderer Bedeutung (12, 18, 20, 30, 54, 62).

Bei den MRSA-Isolaten treten nicht nur Resistenzen gegenüber allen Antibiotika mit Betalaktam-Struktur (Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme, Monobactame), sondern auch gegen viele Nicht-Betalaktam-Antibiotika (z.B. Aminoglykoside, Gyrasehemmer, Makrolide) auf. Dadurch wird der therapeutische Spielraum des behandelnden Arztes erheblich eingeengt, so daß häufig nur noch die Glykopeptide Vancomycin und Teicoplanin als intravenös zu applizierende Antibiotika zur Verfügung stehen. Nachdem in den USA und Europa die ersten Vancomycin-intermediär resistenten *S. aureus*-Isolate gefunden wurden, droht die Gefahr, daß sich bei MRSA-Isolaten weltweit auch eine Resistenz gegenüber Glykopeptiden ausbildet und somit kein zugelassenes Antibiotikum mit gesicherter Wirkung mehr zur Verfügung steht.

Neben der therapeutischen Problematik sind MRSA bedeutsame Erreger nosokomialer Infektionen, d.h. im Krankenhaus übertragener Infektionen. Aufgrund epidemiologischer und mikrobiologischer Untersuchungen ist das Risiko einer MRSA-Infektion während des stationären Aufenthaltes besonders hoch für Patienten auf Verbrennungs- und Intensivstationen, Patienten chirurgischer Abteilungen sowie bei Personen mit länger liegenden venösen bzw. arteriellen Kathetern. Ausbrüche nosokomialer MRSA-Infektionen wurden in Deutschland bisher vor allem an Großkliniken beobachtet, wo sie eine wesentliche Ursache für Morbidität und Mortalität darstellen. Die Zahl der während eines stationären Aufenthaltes erworbenen nosokomialen Infektionen dürfte sich in der Bundesrepublik Deutschland in einer Größenordnung von 500.000 bis zu 1.000.000 pro Jahr bewegen (65). Dabei zählt *S. aureus* als Erreger von Wundinfektionen, Pneumonien und Septikämien zu den Hauptverursachern nosokomialer Infektionen. Sowohl MRSA als auch MSSA können bei hospitalisierten Patienten schwere Infektionen, z.T. auch mit Todesfolge, verursachen. Aufgrund ihrer Multiresistenz ist allerdings bei den MRSA der therapeutische Spielraum stark eingeschränkt.

## 1.6 METHODEN ZUR TYPISIERUNG VON MRSA

Im Laufe der vergangenen Jahre wurden für die Bakterientypisierung klassische Methoden aus der Immunologie, Biochemie und Genetik übernommen (2, 20, 27, 28, 42, 43, 49, 57-59, 86, 92, 101, 107, 108, 115-117) und für Untersuchungen im Rahmen epidemiologischer Fragestellungen mit dem Terminus "Molekulare Epidemiologie" bedacht (63).

Dabei können die erhobenen Daten dem Krankenhaushygieniker und dem klinisch tätigen Kollegen zusätzliche Informationen liefern, mit deren Hilfe es möglich sein kann, die Ausbreitung von MRSA-Krankenhausinfektionen zu begrenzen oder sie primär sogar zu verhindern.

Theoretisch wird für jedes Typisierungssystem vorausgesetzt, daß epidemiologisch verwandte Bakterien-Isolate, die im Rahmen der klonalen Expansion aus einem einzigen Vorläuferstamm hervorgegangen sind, charakteristische Eigenschaften teilen, die sich von anderen, epidemiologisch nicht verwandten, Isolaten unterscheiden. Die Nutzung spezieller charakteristischer Eigenschaften für die Typisierung hängt dabei von der Stabilität dieser Eigenschaft innerhalb des Stammes und der Diversivität innerhalb der Spezies ab. Diese Vielfalt reflektiert die evolutionären genetischen Unterschiede, die durch zufällige, nicht letale und im Laufe der Zeit akkumulierende Mutationen entstehen. Solche Mutationen sind nachweisbar, wenn sie an Stellen auftreten, für die mit den heutigen Methoden Detektionsmöglichkeiten bestehen. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß pathogene Isolate häufig untereinander geringere genetische Divergenzen zeigen als die sonstigen klinischen Isolate und Umweltisolate der betreffenden Spezies. Pathogene Isolate verfügen häufiger über genetisch verwandte Gruppen, die über Virulenzfaktoren für Kolonisation, Persistenz und Invasion entscheiden. Auch die Antibiotika-Resistenz ist ein Selektionsfaktor, der geringe Unterschiede innerhalb der Spezies bedingen kann. In diesem Zusammenhang soll auf die MRSA verwiesen werden, die aus einem einzigen bzw. sehr wenigen Vorläuferstämmen entstanden sein sollen. Damit sind die Unterschiede zwischen den MRSA-Isolaten naturgemäß geringer als zwischen den übrigen Methicillin-sensiblen *S. aureus*-Stämmen. Dieses Beispiel erklärt auch, daß die Qualität der Diskriminationsfähigkeit einer Methode unter Umständen speziesspezifisch ist und strenggenommen für jede Bakterienspezies empirisch evaluiert werden müßte.

Grundsätzlich können die Typisierungsverfahren in phänotypische und genotypische Methoden gegliedert werden. Die phänotypischen Techniken detektieren Eigenschaften, welche von den Mikroorganismen exprimiert werden. Demgegenüber werden mit den genotypischen Verfahren chromosomale oder extrachromosomale Elemente untersucht.

Zu den klassischen phänotypischen Techniken zählen:

- Typisierung aufgrund biochemischer Eigenschaften
- Serotypisierung
- Lysotypie
- Antibiotika-Resistenztestung
- Elektrophoretische Protein-Typisierung und Immunoblotting
- Multilocus Enzym Elektrophorese

Hierbei ist allerdings zu bedenken, daß der Nutzen und die Einsatzmöglichkeiten aller o.g. phänotypischen Verfahren limitiert sind durch die bekannte Fähigkeit der Bakterien, unvorhersehbar die phänotypische Expression der zu untersuchenden Eigenschaft zu variieren. Deshalb können phänotypische Unterschiede bei Isolaten desselben Stammes auftreten. Desweiteren ist mit einigen Verfahren ein relativ hoher Anteil der untersuchten Stämme nicht typisierbar, da die zu testenden Merkmale nicht nachgewiesen werden können.

Im Laufe der vergangenen Jahre wurden daher zunehmend genotypische Methoden zur Erregertypisierung eingesetzt, da die phänotypische Charakterisierung häufig nicht mehr ausreicht, um präzise und eindeutige epidemiologische Untersuchungen durchzuführen.

Im Rahmen der Genotypisierung stehen gegenwärtig die folgenden Methoden zur Verfügung:

- Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)
- Plasmid Profil Analyse (Analyse der extrachromosomalen DNA)
- Restriktionsendonukleasen-Analyse (Analyse der chromosomalen DNA)
- Ribotypisierung
- Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen die Möglichkeiten der Pulsfeld-Gelelektrophorese sowie der Ribotypisierung zur Erregertypisierung evaluiert werden.

### Pulsfeld-Gelelektrophorese

Von mehreren Autoren wurde die hohe Diskriminationsfähigkeit der PFGE bei unterschiedlichen Infektionserregern hervorgehoben und als "Golden Standard" der molekularen Epidemiologie bezeichnet.

Bei der PFGE als einer Form der Makrorestriktionsanalyse werden Bakterienzellen in Agarose-Blöckchen eingebettet und mit Detergenzien und Proteinasen aufgeschlossen. Das intakte

Bakterienchromosom ist durch die Gelmatrix gegen Scherbruch geschützt und kann mit selten schneidenden Restriktionsenzymen in 15-20 Fragmente definierter Länge (50-1000 Kilobasen) gespalten werden. Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme sind selektionsneutrale Marker, die im Verlauf der Evolution des Bakterienchromosoms über Rearrangements oder Mutation an einer Stelle des Genoms verlorengehen und an anderer Stelle neu entstehen.

Bei gram-positiven Bakterien, wie z.B. den Staphylokokken, die viele Adenin- und Thymin-Basen in ihrer DNA enthalten, wird z.B. die Restriktionsendonuklease *SmaI* eingesetzt, die folgende DNA-Sequenz erkennt: ●●●CCC↓GGG●●●. Analog enthält das Chromosom der gram-negativen Bakterien viele Guanin- und Cytosin-Basen, so daß z.B für *Enterobacter* spp. und *Klebsiella* spp. die Restriktions-endonuklease *SpeI* eingesetzt werden kann. *SpeI* erkennt die Sequenz ●●●A↓CTAGT●●●. Aus den Schnittstücken der Restriktionsenzyme resultieren in der Regel 10-20 unterschiedliche Fragmente.

Anschließend erfolgt eine Elektrophorese im Agarose-Gel. In der Elektrophoresekammer sind 24 Elektroden horizontal auf einem hexagonalen Rahmen angeordnet. Die separate Ansteuerung der Elektroden ermöglicht graduell abfallende Potentiale, durch die ein homogenes elektrisches Feld in der Kammer aufgebaut wird. Bei jedem Wechsel des elektrischen Feldes reorientieren sich die Moleküle.

Bei der konventionellen Gel-Elektrophorese wandern die negativ-geladenen DNA-Moleküle in einer Richtung zur Anode. Unter diesen Bedingungen wandern DNA-Moleküle <40-50 Kilobasen (KB) größenabhängig durch das Agarosegel. Bei DNA-Molekülen >40-50 KB kommt das Phänomen der sog. "reptation" hinzu, worunter eine longitudinale Ausrichtung dieser großen Moleküle verstanden wird, da die Porengröße im Agarosegel für eine rein horizontale Wanderung hin zur Anode zu klein ist. Bei der PFGE wird ein multidirektionelles elektrisches Feld mit wechselnden Polen und elektrischen Pulsen unterschiedlicher Dauer eingesetzt. Daher müssen die DNA-Moleküle ihre Ausrichtung und Konformation ständig ändern, um sich in Feldrichtung neu zu orientieren. Hierfür benötigen große Moleküle mehr Zeit für die durch das Wechselfeld induzierte Konformationsänderung als kleinere Moleküle. Demnach verbleibt für größere Moleküle weniger Zeit für die Wanderung in Feldrichtung als für kleinere Moleküle. Daraus folgt die bei der PFGE zu beobachtende Auftrennung nach dem Molekulargewicht, wobei auch DNA-Fragmente >1000 KB mit Hilfe dieses Verfahrens aufgesplittet werden können.

Die Restriktionsfragmente werden im Agarosegel aufgetrennt und können nach Ethidiumbromid-Zusatz mit Hilfe eines UV-Transluminators sichtbar gemacht werden. Das resultierende Bandenmuster der DNA-Fragmente ("DNA-Fingerprints") wird für die genetische Identifikation der Erreger herangezogen.

Die hohe Diskriminationsfähigkeit sowie die gute Reproduzierbarkeit ließen die PFGE zum "Gold-Standard" in der Typisierung vieler Infektionserreger werden. Eine fehlende Standardisierung schmälerte jedoch bisher den Wert, weil die Resultate verschiedener Laboratorien nur schwer vergleichbar waren. Eine Lösungsmöglichkeit für dieses Problem liegt in der Standardisierung der experimentellen Durchführung. Des Weiteren stehen neu entwickelte Systeme zur Verfügung. Während bei den bisherigen Systemen die Reagenzien und Versuchsbedingungen vom Untersucher z.T. selbst hergestellt bzw. ausgearbeitet werden mußten, liegen nun konfektionierte Reagenziensätze vor. Die zu verwendenden optimalen und spezifischen PFGE-Programme sind für die einzelnen Bakterienspezies in neuen Geräten fest eingespeichert.

### Ribotypisierung

Das Prinzip der Ribotypisierung beruht auf der Hybridisierung markierter DNA-Sonden an Bakterien-DNA, welche auf Nitrozellulose- oder Nylonmembran fixiert ist. Die ausgewählten DNA-Sonden kodieren für ribosomale RNA. Je nach Verteilung der Gene für ribosomale RNA werden unterschiedliche Fragmente durch die DNA-Sonden markiert und damit unterschiedliche Muster erzeugt. Die besten Typisierungsergebnisse erzielt man, indem die zu analysierende Bakterien-DNA vor der Hybridisierung mittels PFGE aufgetrennt wird. Die Ribotypisierung nutzt damit das Prinzip der *Southern Blot*-Analyse, um Polymorphismen im Bereich der ribosomalen Operone nachzuweisen. Da alle Bakterien Operone enthalten und die ribosomalen Sequenzen innerhalb der Operone hochgradig konserviert sind, ist stets eine Typisierung möglich. Bei Organismen, die 5-7 Operone enthalten (z.B. *E. coli*, *Klebsiella* spp, *Haemophilus* spp und *Staphylococcus* spp.), gelingt mit Hilfe der Ribotypisierung die Darstellung von typischerweise 10-15 Banden, so daß eine vergleichsweise gute Diskriminationsfähigkeit gewährleistet wird. Demgegenüber ist dieses Verfahren bei Bakterien, die nur ein ribosomales Operon enthalten (z.B. Mykobakterien), für die Typisierung lediglich von begrenztem Nutzen.

## 1.7 ZIELE DER ARBEIT

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung sollen mehrere Themenkomplexe analysiert und die folgenden Fragestellungen beantwortet werden:

### 1. Wie stellt sich die *S. aureus*-Situation in Europa dar?

Im Rahmen des EUROPEAN NETWORK FOR ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND EPIDEMIOLOGY (ENARE) haben sich 24 Universitätskliniken aus Europa zusammengeschlossen, um im Rahmen einer longitudinalen Analyse die Häufigkeit und das Resistenzverhalten von wichtigen Krankheitserregern in Europa zu charakterisieren. Die Untersuchungen zu *S. aureus* erfolgten in Düsseldorf. Im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen wurde zunächst die Häufigkeit von *S. aureus* in verschiedenen klinischen Abteilungen und Altersstufen für alle isolierten Stämme analysiert.

### 2. Welche Therapiemöglichkeiten sind bei *S. aureus* - Infektionen gegeben vor dem Hintergrund einer bereits aufgetretenen intermediären Vancomycin-Resistenz bei *S. aureus*?

Nachdem in den USA und Europa die ersten Vancomycin-intermediären resistenten *S. aureus*-Isolate aufgetreten sind, droht die Gefahr, daß sich insbes. bei MRSA-Isolaten weltweit auch eine Resistenz gegenüber Glykopeptiden ausbildet. Daher ist es wichtig, Analysen der in-vitro-Aktivitäten verschiedener neuer Antibiotika durchzuführen sowie herauszufinden, welche herkömmlichen Antibiotika zur wirkungsvollen Therapie von *S. aureus*, insbesondere von MRSA noch zur Verfügung stehen.

### 3. Welche Typisierungsverfahren sind am geeignetsten zur Analyse nosokomialer Infektionen durch europäische MRSA-Isolate und wie sieht die epidemiologische Verbreitung verschiedener MRSA-Typen in Europa aus?

Aufgrund einer zunehmenden Gefahr nosokomialer Infektionen durch MRSA in Krankenhäusern ist der Bedarf an Typisierungsverfahren, die schnell und zuverlässig Aussagen über den Verwandtschaftsgrad einzelner MRSA-Isolate zueinander ermöglichen, besonders hoch. In der vorliegenden Arbeit werden zwei moderne genotypische Verfahren (Pulsfeld-Gelelektrophorese und Ribotypisierung) verglichen, um den Stellenwert der einzelnen Verfahren zur MRSA-Typisierung beurteilen zu können. Darüberhinaus soll die überregionale Verbreitung von MRSA-Typen in Europa charakterisiert werden.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 EUROPEAN NETWORK FOR ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND EPIDEMIOLOGY

Im Rahmen des EUROPEAN NETWORK FOR ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND EPIDEMIOLOGY (ENARE) haben sich 24 Universitätskliniken aus Europa zusammengeschlossen, um im Rahmen einer longitudinalen Analyse die Häufigkeit und das Resistenzverhalten von wichtigen Krankheitserregern in Europa zu untersuchen.

Jeden Monat, beginnend mit April 1997, werden die ersten 20 Isolate aus positiven Blutkulturen sowie insgesamt je 50 Isolate von im Krankenhaus erworbenen Pneumonien und von Wundinfektionen gesammelt und zur Spezifizierung und Resistenztestung an die Universitätsklinik Utrecht übersandt. Die Analysen zu *S. aureus* wurden in Düsseldorf durchgeführt.

Zwischen April 1997 und Februar 1999 wurden 3052 *S. aureus* Isolate gesammelt. Der MRSA-Anteil lag bei 25% (n=763). Die Isolate hatten folgende Herkunft:

54% stammten aus Blutkulturen, 20% aus Trachealsekreten von Patienten mit einer im Krankenhaus erworbenen Pneumonie und 26% konnten aus Wundinfektionen isoliert werden. Die ENARE Isolate stellen ein zufälliges, aber sicherlich recht repräsentatives Bild der *S. aureus*-Population, zumindest an größeren Kliniken, dar. Nur ein Isolat pro Patient durfte von den beteiligten Universitätskliniken eingeschickt werden.

Die Isolate stammten im einzelnen aus 24 unterschiedlichen Kliniken der 14 teilnehmenden Länder (Österreich, Linz: Krankenhaus der Elisabethinen; Belgien, Brüssel: Hôpital Erasme, Frankreich, Paris: Hôpital St. Joseph, Paris: Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Lyon: Hôpital Eduard Herriot; Lille: A. Calmette Hôpital; Deutschland, Freiburg: Universitätsklinikum, Düsseldorf: Universitätsklinikum; Griechenland, Athen: National University of Athens; Italien, Genua: University Hospital of Genoa, Rom: University Hospital of Rome; Niederlande, Utrecht: University Hospital Utrecht; Polen, Krakau: Jagiellonian University Hospital; Portugal, Coimbra: University Hospital of Coimbra; Spanien, Sevilla: University Hospital of Sevilla, Madrid: Hospital Ramon y Cajal, Barcelona: Hospital de Bellvitge; Schweiz, Lausanne: CHUV; Großbritannien, London: St. Thomas's Hospital Medical School; Türkei, Ankara: 2x University Hospital, Istanbul: University Hospital; Israel: Tel Aviv: University Hospital)

## 2.2 IDENTIFIZIERUNG VON *S. AUREUS*

Die Staphylokokken wurden zur Verifizierung der Spezieszuordnung diversen Identifikationsverfahren unterzogen. Im einzelnen handelte es sich um folgende Testverfahren:

1. Katalase
2. Röhrenkoagulase
3. Nuklease (DNase)
4. anaerobe Mannitspaltung
5. biochemische Identifikation (api Staph®, Fa. bioMerieux, Nürtingen).

Staphylokokken besitzen das Atmungsketten-Enzym Katalase. Die Katalase-Aktivität einer blutfreien Kultur läßt sich überprüfen, indem man sie direkt oder nach Übertragung einer kleinen Kolonie-Menge auf einen Objektträger mit 3%-iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung übergießt. Aufsteigende Gasblasen (O<sub>2</sub>) zeigen die Anwesenheit des Enzyms an.

Mit Hilfe des Röhren-Koagulase-Tests (Bacto Coagulase Plasma EDTA-Test®, Fa. Difco) ist der Nachweis sowohl der freien als auch der an der Zellwandoberfläche gebundenen Koagulase (Clumpingfaktor) möglich. Zur exakten Beurteilung wurde eine Übernacht-Bouillonkultur (Herz-Hirn-Bouillon) von Staphylokokken-Stämmen mit rehydriertem EDTA-Kaninchenplasma bei 37°C inkubiert. Die Bewertung des Testergebnisses erfolgte nach 4 bzw. 24 h. Der Röhren-Koagulase-Test wurde als positiv beurteilt, wenn mehr als Dreiviertel des Röhreninhaltes als zusammenhängendes Koagel vorlag. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz aus nicht-beimpfter Herz-Hirn-Bouillon mitgeführt, in der keine Anzeichen von Koagelbildung vorhanden waren.

Das mikrobielle Enzym Desoxyribonuklease von *S. aureus* hydrolysiert die im Nährmedium enthaltenen Desoxyribonukleinsäuren zu einem Gemisch aus Mono- und kurzkettigen Polynukleotiden. Nach Bebrütung bei 37°C wird der Nährboden am nächsten Tag mit 1 n HCl überschwemmt, so daß ungespaltene DNA durch Präzipitation als Trübung des Mediums sichtbar wird. Bei den DNase-positiven *S. aureus*-Stämmen bleibt diese Trübung aus. Daher bilden sich klare Agarzonen um die einzelnen Bakterienkolonien aus.

*S. aureus*-Stämme sind darüber hinaus in der Lage, Mannit unter anaeroben Bedingungen zu spalten. Die dafür erforderlichen Reagenzien wurden entsprechend den bekannten Vorschriften selbst hergestellt.

Beim api Staph® handelt es sich um ein kommerzielles Identifizierungssystem für Staphylokokken. Es stellt ein miniaturisiertes Verfahren zum Nachweis mikrobieller Enzymprofile dar, mit dessen Hilfe Wahrscheinlichkeitsangaben zur Speziesidentifizierung gemacht werden können.

Ansätze mit bekannten Koagulase-positiven, Methicillin-sensiblen bzw. -resistenten *S. aureus*-ATCC-Stämmen (Nr. 12600, 13565, 19095, 25923, 29213, 33591, 33592 und 33593) sowie der Koagulase-negative, Methicillin-resistente *S. epidermidis*-ATCC-Stamm (Nr. 27626) wurden als Kontrollen mitgeführt.

### Multiplex-PCR

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird eine Multiplex-PCR für Staphylokokken eingesetzt, die den Einsatz einzelner Kolonien ohne Vorbehandlung direkt von der Agarplatte in den PCR-Assay ermöglicht. Mit Hilfe dieses Verfahrens kann innerhalb von vier Stunden ein molekulargenetisches "Dendrogramm" erstellt werden, das Auskunft über die Zugehörigkeit des Isolates zu den Eubakterien und seiner Spezieszuordnung, über Pathogenitätsmerkmale (Koagulase-Bildung) sowie das Resistenzverhalten (Methicillin-Resistenz) gibt (97).

Um im Rahmen der hier eingesetzten Multiplex-PCR die Anzahl falsch negativer Ergebnisse so gering wie möglich zu halten, war der Einsatz einer Positivkontrolle erforderlich. Diesem Zweck der internen Kontrolle diente die Amplifikation von 16S rRNA-Sequenzen aus konservierten Genregionen, die in allen Eubakterien zu finden sind. Entsprechende Amplifikationsprodukte konnten Greisen et al. (29) in einem Panel 176 phylogenetisch unterschiedlicher Bakterienisolate nachweisen. So deutet das Nicht-Vorhandensein dieses 16S rRNA-Amplifikationsproduktes beim Einsatz von Bakterien auf eine fehlerhafte Amplifikation von Zielsequenzen hin, die wiederum durch einen "unkorrekten" PCR-Ansatz (falsche Konzentrationen, zu wenig oder zu viel Template-DNA, Fehler im PCR-Programm, Pipettierfehler) bedingt sein könnten. Ist es nicht möglich, die 16S-rRNA-Gensequenz zu amplifizieren, muß der Ansatz komplett wiederholt werden. Die in der beschriebenen Multiplex-PCR eingesetzten Primer zum Nachweis eines 16S rRNA-PCR-Produktes von Eubakterien zeigten eine Sensitivität und Spezifität von 100%.

Die Amplifikation eines Staphylokokken-spezifischen Gens als interne Kontrolle ist zudem äußerst wichtig für die Feststellung, ob genügend DNA-Material von Staphylokokken im PCR-Ansatz enthalten ist. Auf diese Weise ist eine indirekte Kontrolle der Zell-Lyse möglich, da insbesondere Koagulase-negative Staphylokokken z.T. nur sehr schwer lysierbar sind.

### Auswahl der Primer

Basierend auf publizierten Gensequenzanalysen für 16S rRNA-Genbereiche (9, 10), das *coa*- (80) sowie für das *mecA*-Gen (90), wurden die eingesetzten Primer ausgewählt und von der Fa. Pharmacia Biotech synthetisiert.

Folgende Primer-Paare wurden miteinander im Multiplex-PCR-Assay kombiniert eingesetzt.

#### 16S rRNA-Gen-PCR für Eubakterien:

5'-Primer: 1170-[5']-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-[3']-1189

3'-Primer: 1521-[5']-AGGAGGTGATCCAACCGCA-[3']-1539

Im Rahmen der Amplifikation entsteht ein Produkt mit einer Größe von 371 Nukleotiden.

#### 16S rRNA-Gen-PCR für Staphylokokken:

5'-Primer: 294-[5']-GCCGGTGGAGTAACCTTTTAGGAGC-[3']-318

3'-Primer: 1522-[5']-AGGAGGTGATCCAACCGCA-[3']-1540

(identisch mit dem o.g. 3'-Primer zur Amplifikation der 16S rRNA-Gensequenzen von Eubakterien)

Im Rahmen der Amplifikation entsteht ein Produkt mit einer Größe von 106 Nukleotiden.

#### *coa*-Gen-PCR:

5'-Primer: 1520-[5']-GCTTCTCAATATGGTCCGAG-[3']-1539

3'-Primer: 1631-[5']-CTTGTTGAATCTTGGTCTCGC-[3']-1651

Im Rahmen der Amplifikation entsteht ein Produkt mit einer Größe von 131 Nukleotiden.

#### *mecA*-Gen-PCR:

5'-Primer: 37-[5']-GTTGTAGTTGTCGGGTTTGG-[3']-66

3'-Primer: 178-[5']-CGGACGTTTCAGTCATTTCTAC-[3']-198

Im Rahmen der Amplifikation entsteht ein Produkt mit einer Größe von 161 Nukleotiden.

Per definitionem dienten die *S. aureus*-ATCC-Stämme (12600, 13565, 19095, 25923, 29213, 33591, 33592 und 33593) als positive Kontrolle für das *coa*-Gen und der *S. epidermidis*-ATCC-Stamm (Nr. 27626) als *coa*-negative Kontrolle.

Als *mecA*-positive Kontrolle wurde der *S. epidermidis*-ATCC-Stamm (Nr. 27626) und als *mecA*-negative Kontrolle der *S. aureus*-ATCC-Stamm (Nr. 25923) eingesetzt.

### Multiplex-PCR

Mit Hilfe einer Pipettenspitze wurden von singular wachsenden Bakterienkolonien möglichst geringe Mengen direkt von der Agarplatte abgenommen und im unten aufgeführten Reaktionsansatz durch Umrühren mittels dieser Pipettenspitze verteilt. Für die Versuche mit den PCR-Assays wurden 24 h alte Kulturen auf Mueller-Hinton-Agar mit Zusatz von 5% Schafsblut verwendet.

Der Reaktionsansatz für jede Multiplex-PCR hatte folgende Zusammensetzung:

10 mmol Tris HCl, 50 mmol KCl, 2,5 mmol MgCl<sub>2</sub>, 100 µmol dNTPs sowie je 0,4 µmol der einzelnen Primer.

5 Units Ampli*Taq*-DNA Polymerase® (Fa. Perkin Elmer) wurden nach der Hälfte der 10-minütigen Denaturierungszeit bei 94°C in jedes PCR-Reaktionsgefäß hinzupipettiert (hot start).

Die Multiplex-PCR wurde in einem GeneAmp PCR System 2400® (Fa. Perkin-Elmer) durchgeführt.

Im Anschluß an eine 10-minütige initiale Denaturierungszeit bei 94°C wurden 25 Amplifikationszyklen wie folgt durchgeführt: Denaturierung bei 94°C für 20 sec, "Annealing" bei 55°C für 20 sec und "Extension" bei 72°C für 50 sec. Im Anschluß an die 25 Zyklen erfolgte eine Inkubation bei 72°C für 5 min ("Final-Extension").

### Agarose-Gel-Elektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 4%-igen (w/v) Metaphor®-Agarose-Gel. 15µl des PCR-Ansatzes wurden zusammen mit 3µl Probenpuffer (30% Glycerin, 0,1% BPB) in die Gel-Taschen aufgetragen. Als Größenstandard wurden in jedem Gel 15µl einer 1Kb-Leiter (Fa. BRL) mitgeführt. Die amplifizierten DNA-Fragmente konnten durch Ethidiumbromid-Zusatz im Agarose-Gel mit Hilfe eines UV-Transluminators sichtbar gemacht werden.

### **2.3 RESISTENZTESTUNG VON *S. AUREUS***

Die Empfindlichkeitstestung erfolgte mit einem Mikrodilutionsverfahren entsprechend den standardisierten Kriterien des National Committee for Clinical Laboratory Standards (72). Gefriergetrocknete, Antibiotika-enthaltende Mikrotiterplatten (Dade International, Sacramento, CA and Sensititre, Westlake, Ohio) wurden mit Bakteriensuspensionen beimpft und für 24 Stunden inkubiert. Der *S. aureus* Stamm ATCC29213 wurde immer zur Qualitätskontrolle mitgeführt.

### **2.4 TESTUNG AUF EINE HERABGESETZTE VANCOMYCIN-EMPFINDLICHKEIT DER MRSA-ISOLATE**

Hierfür wird jedes MRSA-Isolat in Herz- Hirn Bouillon (BHI) überimpft, die 4 mg/l Vancomycin enthält und bei 37° C für 48 h bebrütet wird. Nach 24 und 48 h werden die Medien auf Wachstum kontrolliert. Dabei würde ein Vancomycin - resistenter Stamm ein konfluentes Wachstum nach 24 h zeigen, während bei Wachstum von 1 bis 30 Kolonien auf den Kontrollplatten der nach 48 Stunden getrüben BHI Brühen von einem VISA, bzw. hetero- VISA ausgegangen wird. Dieser Verdacht wird anschließend durch Anzucht in BHI- Medium, das eine Vancomycin Konzentration von 8 mg/l aufweist, überprüft werden. Als erwiesen kann der ( hetero)-VISA Phänotyp angesehen, wenn Isolate die erreichte MHK nach Subkultivierung in einem antibiotikafreien Medium für mindestens 9 Tage beibehalten. Dieser Test wird als Grenzwertkonzentrationstest bezeichnet.

## 2.5 TYPISIERUNG VON MRSA-ISOLATEN

### Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Zur PFGE wurde das neu entwickelte GenePath Strain Typing System® (Fa. BioRad, München) eingesetzt. Mit diesem Gerät ist eine standardisierte und gut reproduzierbare PFGE möglich (94). Während bei den bisherigen Systemen die Reagenzien und Versuchsbedingungen vom Benutzer z.T. selbst hergestellt bzw. ausgearbeitet werden mußten, liegen nun konfektionierte Reagenziensätze vor. Die jeweils zu verwendenden optimierten, spezifischen und standardisierten PFGE-Programme sind für die einzelnen Bakterienspezies im Gerät eingespeichert.

Die mit Hilfe des GenePath Strain Typing Systems® zu analysierenden Proben wurden über Nacht auf geeignetem Medium (z.B. Blutagar) kultiviert. Hieraus wurde eine einzelne Kolonie in ein Kulturröhrchen mit spezifischem Medium (z.B. Brain-Heart-Infusion bei Staphylokokken) überimpft und 16-20 h bei 37°C in einem Schüttelinkubator bebrütet. Das Zellwachstum konnte durch Bestimmung der optischen Dichte des Ansatzes photometrisch kontrolliert werden. Ca.  $5 \times 10^8$  Zellen/ml wurden in ein Agarose-Blöckchen eingebettet und in situ mit Detergenzien, Proteasen und Lysozym lysiert sowie entproteinisiert. Das intakte Bakterienchromosom war in der Agarosematrix vor Scherkräften geschützt, wodurch u.a. die Handhabung der Probe vereinfacht wurde. Damit konnten vor der Elektrophorese die DNA-Agaroseblöcke leicht in die vorgesehenen Probenvertiefungen im Gel eingelegt werden. Für das GenePath Strain Typing System® wurden 4 spezielle Reagenziensätze entwickelt, die für unterschiedliche Bakterien spezifische Restriktionsendonukleasen, optimierte Puffer und spezielle Proteinasen enthielten. Die im Test eingesetzten, selten schneidenden Restriktionsendonukleasen erzeugten 10-20 Fragmente je Bakterienchromosom. Bei gram-positiven Bakterien, wie z.B. den Staphylokokken, die viele Adenin- und Thymin-Basen in ihrer DNA enthalten, wurde die Restriktionsendonuklease *Sma*I eingesetzt, die eine charakteristische DNA-Sequenz erkennt (CCC↓GGG) und entsprechend relativ wenig (< 20) DNA-Fragmente durch Restriktion herstellt. Die aus den Schnittstücken der Restriktionsenzyme resultierenden 10-20 Fragmente wurden anschließend mittels PFGE aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Das resultierende Bandenmuster wurde für die genetische Identifikation der Erreger herangezogen.

Die Gesamtdauer des Ansatzes, beginnend mit der Kultur und endend mit dem Dokumentationsphoto, dauerte 58 h. Dies ist die Maximalzeit, welche zur besten Bandentrennung führt.

## Prinzip der Pulsfeld-Gelelektrophorese

Da die PFGE als Standard-Typisierungsverfahren für viele Fragestellungen in dieser Arbeit eingesetzt wurde, soll das Prinzip im folgenden kurz dargestellt werden.

Bei der konventionellen Gel-Elektrophorese wandern die negativ-geladenen DNA-Moleküle in einer Richtung zur Anode. Unter diesen Bedingungen wandern DNA-Moleküle <40-50 Kilobasen (kb) größenabhängig durch das Agarosegel. Bei DNA-Molekülen >40-50 kb kommt das Phänomen der sog. "reptation" hinzu, worunter eine longitudinale Ausrichtung der großen Moleküle verstanden wird, da die Porengröße im Agarosegel für eine rein horizontale Wanderung hin zur Anode zu klein ist. Bei der PFGE wird ein multidirektionelles elektrisches Feld mit wechselnden Polen und elektrischen Pulsen unterschiedlicher Dauer eingesetzt. Daher müssen die DNA-Moleküle ihre Ausrichtung und Konformation ständig ändern, um sich in Feldrichtung zu orientieren. Große Moleküle benötigen mehr Zeit für die durch das Wechselfeld induzierte Lageänderung als kleinere Moleküle. Demnach verbleibt für größere Moleküle eine kürzere Zeitspanne für die Wanderung in Feldrichtung als für kleinere Moleküle. Hieraus folgt die bei der PFGE zu beobachtende Auftrennung nach dem Molekulargewicht, wobei auch DNA-Fragmente >1000 kb mit Hilfe dieses Verfahrens voneinander getrennt werden können. Die Wanderung der Moleküle, je nach ihrer Größe, ist bei der PFGE noch von verschiedenen anderen Faktoren abhängig:

1. Stärke des elektrischen Feldes
2. Pulszeit
3. Konfiguration und Winkel des elektrischen Feldes
4. Temperatur und Ionenkonzentration des Gels und des verwendeten Puffers
5. Art der eingesetzten Agarose (Konzentration, Spezifikation).

Pulszeit und Stärke des elektrischen Feldes sind dabei die entscheidenden Parameter, welche den Molekulargewichtsbereich der auftrennbaren DNA-Fragmente festlegen. Es ist somit verständlich, daß bei einer Zunahme beider Parameter auch größere Moleküle getrennt werden können. Alle unter 1-5 genannten Faktoren sind beim GenePath Strain Typing System® und den dazugehörigen Reagenziensätzen vom Hersteller standardisiert vorgegeben. Das GenePath Strain Typing System® arbeitet mit der 'Countour Clamped Homogenous Electric Field' (CHEF)- Technik. 24 Elektroden sind horizontal an einem hexagonalen Rahmen in der Elektrophoresekammer angeordnet. Die separate Ansteuerung der Elektroden ermöglicht graduell abfallende Potentiale, durch die ein homogenes elektrisches Feld in der Kammer aufgebaut wird. Bei jedem Wechsel des elektrischen Feldes reorientieren sich die Moleküle.

### Ribotypisierung

Die automatisierte Ribotypisierung wurde mit dem RiboPrinter® Microbial Characterization System (Qualicon Europe Ltd., Warwick, United Kingdom) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt (11, 102). Einige *S. aureus* Kolonien wurden direkt von einer Agarplatte genommen, in vorgegebenen Puffer suspendiert und bei 80°C für 20 min erhitzt, um DNA abbauende Enzyme zu inhibieren. Im Gerät, dem RiboPrinter, wurde die bakterielle DNA mit Hilfe des Enzyms *SmaI* restringiert. Die entstandenen Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und direkt auf eine Nylon-Membran transferiert. Dort erfolgte die Hybridisierung mit Chemilumineszenz markierten Sonden, die das rRNA operon (*rrnB*) von *Escherichia coli* enthielten. Das entstehende Bandenmuster wurde mit Hilfe der im Gerät integrierten Software ausgewertet. Der sog. "similarity index" beschreibt dabei die relative Ähnlichkeit zweier Isolate zueinander, d.h. ein Wert von 1 charakterisiert zwei identische Isolate. Die Isolate mit einem Index von 0,93 oder mehr wurden zu einer Ribogruppe zusammengefaßt.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 EPIDEMIOLOGIE VON *S. AUREUS* IN EUROPA

##### Prävalenz von MRSA in den beteiligten europäischen Universitätskliniken

Insgesamt wurden 3052 *S. aureus* Isolate im Rahmen dieser Studie untersucht. Der durchschnittliche MRSA-Anteil lag bei 25%. Die MRSA-Prävalenz schwankte erheblich zwischen den teilnehmenden Universitätskliniken und entsprechend zwischen den beteiligten Ländern. Die Herkunft der *S. aureus* Isolate sowie die MRSA-Prävalenzen für die einzelnen Universitätskliniken sind in Tabelle 1 dargestellt. Die höchsten Raten konnten in Portugal (54%) und Italien (43-58%) beobachtet werden. Die niedrigsten Werte traten in den beteiligten Kliniken in der Schweiz sowie in den Niederlanden auf ( je 2%).

##### Prävalenz von MRSA in unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien

Die MRSA-Prävalenz war am höchsten in *S. aureus* Isolaten aus Trachealsekreten von Patienten mit einer nosokomialen Pneumonie (34,4%), gefolgt von Isolaten aus Blutkulturen (24,8%) und war am niedrigsten in Isolaten, die aus Wundabstrichen stammten (22,4%).

##### Herkunft der *S. aureus* Isolate bezogen auf die verschiedenen Fachrichtungen und das Alter der Patienten

Die meisten *S. aureus* Isolate kamen von Stationen der Inneren Medizin (36,8%), gefolgt von den Intensiv-Stationen (ICUs) (22,6%) sowie der Chirurgie (13,6%). Aus den anderen Abteilungen wurden insgesamt nur 27.0% der *S. aureus* Isolate eingeschickt.

##### Prävalenz der MRSA Isolate in den verschiedenen Fachrichtungen

Zwischen den einzelnen Abteilungen gab es große Unterschiede hinsichtlich der MRSA-Prävalenz. Während der MRSA-Anteil in der Inneren Medizin bei 33% lag, betrug dieser Anteil auf den Intensiv-Stationen 27% und in den chirurgischen Stationen nur 13%. Die niedrigsten Prävalenzen wurden in Isolaten aus der Notaufnahme (0%) und den Krankenhausambulanzen (1%), gefunden, wobei die relativ niedrige Anzahl der getesteten Isolate berücksichtigt werden muß (n=21 bzw. n=59).

### Verteilung der MSSA und MRSA Isolate in den verschiedenen Altersgruppen

Die relative Verteilung der MSSA und MRSA Anteile in den verschiedenen Altersgruppen war vergleichbar. *S. aureus* Infektionen traten mit zunehmendem Alter häufiger auf, und nahmen dann nach dem 75 Lebensjahr wieder ab. Es gab keine Altersgruppe in der besonders häufig MRSA-Isolate zu finden gewesen wären.

### 3.2 RESISTENZVERHALTEN DER *S. AUREUS* ISOLATE

#### Oxacillin-MHK-Werte

Die Verteilung der MHK-Werte für Oxacillin ist in Tabelle 2 dargestellt. Von den MRSA-Isolaten zeigten 89% eine sogenannte 'high-level' Oxacillin-Resistenz (MHK > 8 µg/ml). Die verbleibenden MRSA Isolate wiesen eine 'low-level' Oxacillin-Resistenz auf. Bei diesen letztgenannten Isolaten konnte das *mecA* Gen nicht mit Hilfe der Multiplex-PCR nachgewiesen werden.

#### MHK-Werte der restlichen Antibiotika

Die in vitro-Aktivitäten der restlichen 24 Antibiotika gegenüber MSSA and MRSA Isolaten sind in Tabelle 3 dargestellt. 84,6% der MSSA waren resistent gegenüber Penicillin. Alle MRSA Isolate sind per definitionem resistent gegenüber allen β-Laktam Antibiotika.

Basierend auf den Empfindlichkeits-Raten ist die in-vitro Aktivität der verschiedenen Betalaktam-Antibiotika gegenüber MSSA wie folgt einzuschätzen: Die beste in-vitro Aktivität besitzt Imipenem, gefolgt von Cefepime, Ceftriaxon, Cefazolin, Amoxicillin/Clavulansäure, Piperacillin/Tazobactam, und schließlich Penicillin.

Aus Tabelle 3 und Abbildung 1 geht eindeutig hervor, daß es einen Zusammenhang zwischen der Resistenz gegenüber Oxacillin bzw. den Minimalen Hemm Konzentrationen für Oxacillin und den prozentualen Resistenzprävalenzen für Makrolide, Lincosamide, Aminoglykoside, Tetrazykline, Fluorochinolone, Rifampicin und Chloramphenicol gibt.

Der Prozentsatz der Erythromycin-empfindlichen MSSA (77,5%) war um ca. das achtfache höher verglichen mit den Werten für die MRSA Isolate (9,8%). Während 93,7% der MSSA empfindlich gegenüber Clindamycin waren, lag dieser Anteil lediglich bei 23,3% bei den MRSA. 88% der Erythromycin-resistenten MRSA, aber lediglich 37% der MSSA wiesen einen konstitutiven MLS<sub>B</sub> Resistenz-Phänotyp auf, d.h. die Isolate sind konstitutiv resistent gegenüber Makroliden, Lincosamiden und Streptogramin B-Substanzen. Die restlichen Erythromycin-resistenten *S. aureus* Isolate waren induzierbar MLS<sub>B</sub> resistent.

Während nur 22,8% aller MRSA Isolate empfindlich gegenüber dem Aminoglykosid Gentamicin waren, lag dieser Anteil um mehr als das vierfache höher bei den MSSA-Isolaten (94,6%). Der Anteil der 'high-level' Gentamicin-resistenten Isolate (MHK > 500 mg/l) und der 'high-level' Streptomycin-resistenten MSSA Isolaten (MHK > 1000 mg/l) lag mit 0,2% bzw. 1,5% signifikant niedriger als in den MRSA Isolaten (1,6% bzw. 47,0%). Eine 'high-level' Resistenz schließt den

Einsatz von Aminoglykosiden im Rahmen einer auf Synergismus ausgerichteten Kombinationstherapie aus.

Die Empfindlichkeit gegenüber Tetrazyklinen fiel von 89,7% für MSSA auf 42,9% bei MRSA Isolaten, wobei dieser Abfall deutlich niedriger ausfiel bei Betrachtung der Werte für die strukturell nahe verwandten Substanzen Minozyklin und Doxyzyklin, gegenüber denen jeweils ca. 90% der MRSA in-vitro empfindlich waren.

Während 90,6% aller MSSA gegenüber Ciprofloxacin empfindlich waren, lag dieser Anteil bei den MRSA lediglich bei 9,2%. Gegenüber MSSA wiesen die Chinolone Gatifloxacin und Trovafloxacin eine vergleichbar gute in-vitro Aktivität auf und waren zwei- bis vierfach aktiver als Ciprofloxacin, Sparfloxacin und Grepafloxacin. Trovafloxacin war das aktivste Chinolon gegenüber MRSA, gefolgt von Gatifloxacin, Grepafloxacin, Sparfloxacin und Ciprofloxacin, welches die geringste in-vitro Aktivität zeigte. Die experimentelle Substanz SB265805/LB20304 (Gemifloxacin) wies die niedrigsten MHK<sub>50/90</sub>-Werte auf. Die jeweiligen Werte lagen bei  $\leq 0,03/\leq 0,03$  mg/l für MSSA sowie bei  $0,5/2$  mg/l für MRSA. Die vorraussichtlichen Grenzwerte für Empfindlichkeit bzw. Resistenz dürften bei 1 bzw 4 mg/l liegen.

Nur 46,1% der MRSA waren empfindlich gegenüber Rifampicin, einer Substanz, die häufiger im Rahmen von Kombinationstherapien eingesetzt wird.

Während 99,5% der MSSA empfindlich gegenüber der Streptograminkombination Quinupristin/Dalfopristin waren, sank dieser Wert auf 95,3% in MRSA. Insgesamt wiesen 27 der 3052 *S. aureus* Isolates (0,9%) einen MHK-Wert von  $\geq 4$  mg/l auf und waren damit resistent gegenüber Q-D.

Das experimentelle Oxazolodinon Linezolid wies jeweils MHK<sub>50/90</sub>-Werte von  $2/2$  mg/l für MSSA und MRSA auf.

Vancomycin, als ein Vertreter der Glykopeptide, war das einzige zugelassene Medikament, gegenüber dem keine Resistenzen beobachtet werden konnte. Ein MRSA-Isolat war resistent gegenüber Teicoplanin, ein weiteres wies eine intermediäre Empfindlichkeit auf.

### Multi-Resistenz bei *S. aureus* Isolaten

Isolate wurden als multiresistent bezeichnet, wenn sie gegenüber mindestens fünf oder mehr aufgeführten Antibiotika, die zu verschiedenen Klassen gehören, resistent waren. Bei den Antibiotika handelt es sich im Einzelnen um:

Penicillin, Oxacillin (Penicillinase-festes Penicillin), Erythromycin (Makrolid), Clindamycin (Lincosamid), Gentamicin (Aminoglykosid), Ciprofloxacin (Chinolon), Tetracyclin, Rifampicin, Chloramphenicol. MRSA sind per se schon resistent gegenüber Penicillin und Oxacillin..

Während nur 2% der MSSA multi-resistent waren, lag dieser Anteil bei den MRSA bei 87%. Nur 3% aller MRSA waren ausschließlich resistent gegenüber Betalaktam- Antibiotika.

### **3.3 TESTUNG DER MRSA ISOLATE AUF EINE REDUZIERT EMPFINDLICHKEIT GEGENÜBER VANCOMYCIN**

Im gesamten MRSA-Kollektiv, welches zwischen April 1997 und Februar 1999 isoliert werden konnte, ließen sich mit Hilfe des im Material und Methodenteil dargestellten Grenzwertkonzentrationstests für Vancomycin keine VISA, weder homogen noch heterogen exprimiert, nachweisen.

### 3.4 TYPISIERUNG DER MRSA-ISOLATE

#### Klonale Verwandtschaft der europäischen MRSA Isolate

Um die Struktur der europäischen MRSA Population näher zu untersuchen, wurden die ersten 370 MRSA Isolate, in denen das *mecA*-Gen mittels Multiplex-PCR nachweisbar war, mit Hilfe der PFGE untersucht. Die entstandenen Bandenmuster wurden mit dem GelCompar System ausgewertet. Es konnte keine klare Assoziation zwischen einem bestimmten PFGE-Typ und der Herkunft der Isolate gefunden werden. Basierend auf einem sog. "similarity level" von 65%, konnten 95% MRSA Isolate in vier PFGE Typen mit einer größeren Anzahl zugehöriger Isolate (n= 19 bis 255), sowie in eine größere Anzahl weniger Isolate umfassendere PFGE-Typen ("Miscellaneous Group") unterteilt werden.

Basierend auf einem 90%-igen "similarity index", konnten 77 unterschiedliche PFGE Typen nachgewiesen werden, welche die genetische Diversität innerhalb der MRSA Isolate eindrucksvoll verdeutlichen (Abb. 2).

Der "similarity level" gibt an, mit welcher prozentualen Wahrscheinlichkeit, die Bandenmuster zweier Isolate identisch sind. Die Übereinstimmung der Bandenmuster zweier Isolate legt - insbesondere im Krankenhausbereich - eine nosokomiale Transmission nahe.

Um die Verwandtschaft zwischen den einzelnen MRSA-Typen exakter zu analysieren, wurde neben der PFGE die Ribotypisierung eingesetzt. Verglichen mit den 77 unterschiedlichen PFGE-Typen konnten wir bei der Typisierung der 370 MRSA-Isolate nur 17 verschiedene Ribotypen nachweisen (Abb. 3). Die Ribotypisierung weist also ein deutlich schlechteres Diskriminationsvermögen auf. Parallel zu unseren PFGE-Typisierungsergebnissen ließen sich wiederum vier große Ribotypen unterscheiden. Innerhalb dieser vier einzelnen großen Ribotypen unterschieden sich die Stämme jeweils maximal nur durch eine einzelne verschobene Bande. Der "similarity index" innerhalb der vier einzelnen Ribotypen lag bei 0,93.

Zu diesen 4 großen Ribotypen gehörten 355 MRSA-Isolate. Die restlichen 15 nicht-epidemischen Isolate ließen sich noch 13 unterschiedlichen Ribotypen ("Miscellaneous Group") zuordnen.

Die vier großen Ribotypen passten exakt zu den vier großen PFGE-Typen. Somit ließen sich in der europäischen MRSA Kollektion vier epidemische MRSA-Typen charakterisieren, die disseminiert in Europa auftraten. Diese Typen werden im Weiteren mit Type I, II, III und IV bezeichnet. Type I, der die meisten zugehörigen Stämme enthielt (n=255), sollte in zwei Subtypen Ia und Ib unterschieden werden. Die Ribotypisierungsergebnisse von Ia und Ib unterschieden sich durch eine

Bandenverschiebung, die Typisierungsergebnisse in der PFGE sind allerdings identisch und auch das Resistenzmuster ist gleich. Type Ib prädominiert in Griechenland und der Türkei, während Type Ia disseminiert in Europa auftritt.

### 3.5 RESISTENZMUSTER UND GEOGRAPHISCHE VERBREITUNG DER EINZELNEN MRSA-TYPEN

Jeder der vier großen MRSA-Typen ist durch ein spezifisches Resistenzprofil charakterisiert. Die entsprechenden Resistenzprofile sind in Tabelle 4 dargestellt. Es zeigte sich eine hohe Korrelation zwischen einer gesteigerten Resistenz und einer weiten, epidemischen Ausbreitung. Während resistenterer Isolate disseminiert über Europa isoliert werden konnten, blieben empfindlichere Isolate beschränkt auf einige Patienten in einzelnen Krankenhäusern.

66% der typisierten MRSA-Isolate gehörten zum MRSA-Type I. Mit wenigen Ausnahmen wiesen diese multi-resistenten Isolate identische Resistenzprofile auf (Tabelle 4). Diese Isolate sind zumeist resistent gegenüber Erythromycin, Gentamicin, Clindamycin, Tetrazyklin, Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Minocycline und Rifampicin. Dieser paneuropäische epidemische MRSA-Typ trat hauptsächlich in Portugal, der Türkei, Griechenland und Frankreich auf, konnte aber auch in Spanien, England, Polen, Italien und den Niederlanden gefunden werden. Type II MRSA Isolate traten hauptsächlich in italienischen Krankenhäusern auf, konnten aber auch in Deutschland, Österreich, Spanien und den Niederlanden gefunden werden. Auch die Type II Isolate sind zumeist multi-resistent und weisen eine Resistenz gegenüber Clindamycin, Erythromycin, Ciprofloxacin und Gentamicin auf, bei einer Empfindlichkeit gegenüber Minocyclin und Rifampicin. 16% der untersuchten MRSA Isolate gehörten zu diesem Typ. Den MRSA-Typen III und IV ließen sich 5% bzw. 8% der Isolate zuordnen. Während Type III hauptsächlich in Spanien isoliert werden konnte, trat Type IV vor allem in England auf (Tabelle 5). Die meisten Isolate dieser beiden Typen waren empfindlich gegenüber Tetrazyklin, Gentamicin, Rifampicin und Minocycline. Die 15 Isolate, die zu den 13 selteneren Ribotypen gehörten, waren zumeist sensibler als die Isolate, welche den epidemisch auftretenden MRSA-Typen I bis IV zugeordnet werden konnten.

### 3.6 EPIDEMIOLOGIE, RESISTENZVERHALTEN UND TYPISIERUNG DER *S. AUREUS* ISOLATE MIT EINER RESISTENZ GEGENÜBER QUINUPRISTIN/DALFOPRISTIN

27 *S. aureus* Isolate wiesen eine Resistenz gegenüber Quinupristin/Dalfopristin auf, dabei handelte es sich um 11 MSSA und 16 MRSA mit einem MHK-Wert von  $> 4$  mg/l). Die meisten Isolate (16 von 27) stammten aus dem Universitätskrankenhaus in Lyon. Die restlichen Stämme wurden in Österreich (n=2), Spanien (n=6) und Großbritannien (n=3) isoliert.

Die meisten Isolate stammten von Patienten mit positiven Blutkulturen (22 von 27), gefolgt von Wundinfektionen (n=3) und nosokomialen Pneumonien. Wie schon im Material und Methoden-Teil ausgeführt, wurde jeweils nur ein Isolat pro Patient eingeschickt.

Alle 27 Quinupristin/Dalfopristin-resistenten *S. aureus* Isolate wiesen einen  $MLS_B$ -Resistenz Phänotyp auf, und waren auch resistent gegenüber Penicillin und Ciprofloxacin. Die 16 MRSA-Isolate wiesen zusätzlich noch eine Resistenz gegenüber Gentamicin (14 von 16 eine 'high-level' Gentamicin-Resistenz ) und 4 von 16 Isolaten hatten MHK-Werte von 4 mg/l für Vancomycin, eine Dilutionsstufe unterhalb des Cut-off Wertes für eine intermediäre Resistenz gegenüber diesem Glykopeptid.

Alle Q-D resistenten Isolate waren weiterhin empfindlich gegenüber Linezolid mit MHK-Werten zwischen 0.12 und 1 mg/l.

Die PFGE-Typisierung aller 27 *S. aureus* Isolate zeigte, daß 8 von 16 Isolaten aus Lyon und 3 von 6 Isolaten aus Barcelona klonal identisch waren. Dies läßt eine nosokomiale Transmission in den beiden Krankenhäusern zumindest möglich erscheinen. Die restlichen typisierten *S. aureus* Isolate sind nicht miteinander verwandt.

Insgesamt sollte noch einmal darauf hingewiesen werden, daß 99,5% der MSSA und 95,3% der MRSA empfindlich gegenüber der Streptograminkombination Quinupristin/ Dalfopristin waren. Damit ist die Resistenzsituation weiterhin als günstig zu beurteilen. Im Gegensatz zur Streptograminkombination Quinupristin/ Dalfopristin sind gegenüber dem Oxazolodinon Linezolid in der vorliegenden Studie keine resistenten Isolate aufgetreten.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 EPIDEMIOLOGIE VON *S. AUREUS*

Infektionen mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Isolaten (MRSA, synonym mit ORSA) sind aufgrund therapeutischer Probleme und aus krankenhaushygienischer Sicht von besonderer Relevanz. Durchschnittlich waren 25% der 3052 *S. aureus* Isolate, die von 25 europäischen Universitätskliniken stammten, MRSA. Die gefundene MRSA-Prävalenz deckt sich mit den Werten vergleichbarer US-amerikanischer Studien (76). Sie ist aber deutlich geringer als publizierte japanische Werte (35).

In 22,2% der 25% MRSA ist das *mecA* Gen nachweisbar, welches das Penicillin-bindende Protein (PBP) 2a kodiert und zur 'high-level' Methicillin Resistenz führt. Die restlichen 2,8% MRSA weisen eine 'low-level' Resistenz auf, welche durch nachweisbare PBP Alterationen mit konsekutiver Absenkung der Methicillin-Bindung an die PBPs oder durch eine starke Produktion von Betalaktamasen erklärt werden könnte.

In Analogie zu Studien aus den achtziger Jahren variierte die MRSA-Prävalenz sehr stark zwischen den teilnehmenden Krankenhäusern (120). Ähnliche Beobachtungen wurden in jüngeren US-amerikanischen Prävalenz Studien gemacht (76). Die Ursachen für niedrigere MRSA-Prävalenzen in Krankenhäusern in der Schweiz und den Niederlanden dürften u.a. in der sehr raschen Identifizierung von MRSA-Keimträgern oder -Infizierten mit der konsequenten und strikten Isolierung Betroffener sowie in einer gesteuerten und sehr zurückhaltenden Antibiotikagabe zu suchen sein.

Betrachtet man die geographische Verteilung der MRSA-Prävalenz, so ist ein deutliches Nord-Süd-Gefälle innerhalb Europas ersichtlich. Diese Beobachtung stimmt mit früheren Untersuchungen überein (120). Man muß allerdings auch kritisch anmerken, daß im Rahmen der ENARE-Studie nur relativ wenig Krankenhäuser pro Land partizipierten, und es auch innerhalb der einzelnen Länder zu größeren Schwankungen kam. So lag zum Beispiel der MRSA-Anteil in Sevilla bei 34%, während in Barcelona lediglich 9% beobachtet werden konnten.

*S. aureus* Isolate, die von Patienten mit einer nosokomialen Pneumonie stammten, wiesen einen signifikant höheren MRSA-Anteil auf als Isolate aus Blutkulturen oder von Wundinfektionen. Dieser Unterschied könnte in der längeren Antibiotika-Behandlung der schwer kranken Pneumonie-

Patienten, zumeist mit Breitspektrum-Präparaten, liegen. Diese Patienten-Population bleibt überdurchschnittlich lange im Krankenhaus und in Abhängigkeit von dem Behandlungsregime kommt es sicherlich zu einem erhöhten Antibiotika-Selektionsdruck. In jüngsten, vergleichbaren US-amerikanischen Studien konnte allerdings kein Unterschied in den Resistenzprofilen der Isolate aus unterschiedlichen Körperregionen und Systemkomplexen gefunden werden (76).

Die meisten MRSA-Isolate wurden auf Stationen der Inneren Medizin, der Intensivmedizin sowie der Chirurgie isoliert. Es ist bekannt, daß Intensivpatienten ein höheres Risiko für die Kolonisierung bzw. eine Infektion mit MRSA haben. Bei der Analyse dieser Daten ist allerdings zu bedenken, daß Patienten z.B. auf Intensiv- und Spezialstationen (z.B. Verbrennungsstationen) aufgrund langer Liegezeiten, dem engen und häufigen Kontakt zum Pflegepersonal, einem hohen Antibiotikaverbrauch und vieler möglicher Eintrittspforten für Bakterien (venöse u./o. arterielle Zugänge, Trachealkanülen, Blasenkatheter u.ä.) auch besonders anfällig für das Auftreten von MRSA-Stämmen sind. In größeren Krankenhäusern ist die absolute Anzahl der Intensivbetten höher, es werden dort häufiger immunsupprimierte Patienten behandelt und notwendigerweise z.T. auch invasivere Behandlungsmethoden eingesetzt, so daß die Gefahr einer MRSA-Infektion per se höher ist als in kleineren Kliniken mit geringerem Risikopatientenaufkommen.

Unsere Daten bezüglich der MRSA-Prävalenz auf verschiedenen Stationen stimmen weitestgehend mit US-amerikanischen Daten überein. Aber wir waren nicht in der Lage, die sehr hohen Prävalenzraten von über 60% für Intensivstationen innerhalb der EPIC-Studie zu bestätigen. Die sehr niedrigen MRSA-Prävalenzdaten für die Notfall- und Krankenhausambulanzen von 0% bzw. 1% deuten darauf hin, daß MRSA primär ein Problem der stationären Patientenversorgung darstellen und außerhalb der Krankenhäuser bisher kaum verbreitet sind.

Die Verteilung von MSSA und MRSA war vergleichbar in verschiedenen Altersstufen. Dies belegt, daß das Alter isoliert betrachtet kein Risikofaktor für eine MRSA-Kolonisierung oder -Infektion darstellt. Die Verteilung der *S. aureus* Isolate in Korrelation mit dem Alter der Patienten spiegelt wahrscheinlich nur die Altersverteilung im Krankenhaus wieder.

## 4.2 RESISTENZVERHALTEN VON *S. AUREUS*

MRSA sind bekanntlich häufig multi-resistent, während MSSA nicht nur gegenüber Oxacillin, sondern meist auch gegenüber einer Vielzahl von anderen Antibiotika sensibel sind. Die erhobenen aktuellen Resistenzraten stimmen mit den von Voss et al. (120) Anfang der neunziger Jahre erhobenen Daten sehr gut überein. Vergleicht man die europäische Resistenzlage von *S. aureus* mit der in den USA (SENTRY Antimicrobial Surveillance Program für Blutkultur-Isolate aus den USA, Kanada, and Latein Amerika [noch nicht publiziert]), so sind im Allgemeinen die US-Isolate empfindlicher, mit der Ausnahme einer größeren Resistenz gegenüber Erythromycin, Chloramphenicol und Rifampin. Ein ähnliches Ergebnis erhält man, wenn die europäischen Daten mit den US-amerikanischen Daten aus dem SCOPE Programm verglichen werden. In diesem Programm [aktuelle Daten noch nicht publiziert], wird die Empfindlichkeit von *S. aureus* Isolaten untersucht, welche mit nosokomialen Septikämien assoziiert sind.

87% der MRSA Isolate wiesen eine Resistenz gegenüber mindestens 5 verschiedenen Antibiotika auf, im Gegensatz dazu lag der vergleichbare Prozentwert für MSSA nur bei 2%. Dieser Multiresistenzphänotyp gilt als klassisch für Krankenhaus-assoziierte MRSA-Isolate. Nur 3% aller MRSA Isolate wiesen lediglich eine Resistenz gegenüber Betalaktam Antibiotika auf. Dieses Resistenzmuster gilt als typisch für *S. aureus* Isolate, die primär außerhalb des Krankenhauses zu finden sind. Diese Daten zur Multiresistenz unterstützen die erhobenen MRSA Prävalenz-Daten, woraus ableitbar ist, daß der MRSA-Anteil außerhalb der Krankenhäuser sehr gering sein dürfte. Vergleichbare Analysen zur Multi-Resistenz bei *S. aureus* sind bisher nicht publiziert worden.

Das Glykopeptid Vancomycin ist weiterhin das Mittel der ersten Wahl bei lebensbedrohlichen MRSA-Infektionen, die durch multi-resistente Isolate ausgelöst werden. Trotz intensiver Suche ist es uns nicht gelungen, europäische MRSA Isolate mit einer herabgesetzten Vancomycin-Empfindlichkeit zu finden. Nach dem Auftreten der ersten Vancomycin intermediär resistenten *S. aureus* Isolate (VISA, homogene oder heterogene Expression) stellten sich neue Aufgaben für das Routine-Labor. Mit VISA wird die Bedeutung der herkömmlichen Resistenztestung in Frage gestellt, und die Existenz von VISA erfordert eine modifizierte Resistenztestung, um zum einen keine VISA zu übersehen, und um zum anderen prädiktive Aussagen zum Nutzen einer Vancomycin Therapie machen zu können.

Nach der Erstbeschreibung eines VISA Isolates durch Hiramatsu (39) könnte sich nun eine neue Dimension des Problems ankündigen: Durch den langzeitigen Einsatz von Glycopeptiden in der

Therapie bei MRSA besteht die Gefahr einer Resistenzentwicklung gegenüber dieser Substanzgruppe. Bisher wurden insgesamt 5 HOMOGENE VISA beschrieben: Isolat Mu50 aus Japan (31), je ein Stamm in Michigan und New Jersey in den USA (1) sowie aus Limoges in Frankreich (81). Der fünfte Fall würde kürzlich aus Hongkong im Zusammenhang mit einem Todesfall bei einer Patientin mit einer neoplastischen Grunderkrankung berichtet. Bei diesen Stämmen liegt die minimale Hemmstoffkonzentration für Vancomycin (MIC) bei 8 bis 16 mg/L.

Davon abzugrenzen sind die sogenannten HETERO- VISA, die nach NCCLS Richtlinien mit MIC-Werten zwischen 1 und 4 mg/l noch als *sensibel* einzustufen sind. Bei diesen Isolaten sind mindestens  $10^{-6}$  Subkolonien in der Lage, eine intermediäre Resistenz (MIC zwischen 8 und 16 mg/l) gegenüber Vancomycin auszubilden. Sie könnten mögliche Vorläufer auf dem Weg zu homogen Vancomycin intermediär resistenten *S. aureus* Stämmen darstellen (106). Die Inzidenz solcher hetero- VISA liegt in Japan bereits bei 20% am Juntendo Hospital, 9,3% an sieben anderen Universitätskliniken und 1,3% in peripheren Krankenhäusern (35). In Deutschland sind bisher wenige Einzelfälle dieses neuen Resistenztyps bei *Staphylococcus aureus* bekannt geworden (21).

Allerdings ist zu berücksichtigen, daß bisher in der normalen Routinediagnostik, Testverfahren zur Detektion entsprechender Isolate nicht angewendet werden. In einer Untersuchung von MRSA Erstisolaten aus dem Großraum Düsseldorf aus den Jahren 1992 bis 1998 wurden insgesamt 85 zufällig ausgewählte Isolate auf das Vorhandensein des VISA Phänotyps untersucht. Es konnten keine Vancomycin resistenten Isolate ermittelt werden. Ebenfalls keines dieser Isolate wies eine homogene intermediäre Resistenz auf. Insgesamt 7 Isolate ( 8,2% ) aus drei unterschiedlichen Kliniken erwiesen sich als hetero- VISA's. Alle MRSA lagen mit ihren MHK- Werten zwischen 1 und 4 mg/l in einem Bereich, der nach NCCLS Richtlinien als *sensibel* zu bezeichnen ist (21).

Die PFGE- Auftrennung der mit *SmaI* restringierten Stämme zeigte für alle sieben hetero- VISA ein klonal identisches Bandenmuster. Es entsprach dem sogenannten Norddeutschen Epidemiestamm, dessen Verbreitung im Großraum Düsseldorf bereits beschrieben wurde (98).

Als Ursache der neu aufgetretenen Fähigkeit von MRSA Isolaten eine homogene oder heterogene Resistenz gegenüber Vancomycin auszubilden, wurden bisher verschiedene Hypothesen untersucht:

1. Als Resistenzmechanismus hat sich die häufig befürchtete, bisher allerdings nur in vitro gelungene Übertragung von *vanA*, *vanB* und *vanCI-3* von Vancomycin-resistenten *E. faecalis* (VRE) Resistenzgenen auf *S. aureus* nicht nachweisen lassen (74, 109). Auch die von Courvalin et al. (14) bei Vancomycin-resistenten Enterokokken beschriebene Änderung der Mureinmonomervorstufen von D- Ala D- Ala in D- Ala D- Lac ließ sich weder bei den Isolaten MU3 (hetero-VISA) noch bei Mu50 (homogener VISA) nachweisen (32).
2. Auch sogenannte "Small colony variants" (SCV's) (60) sind nicht die Ursache des neuen Resistenzphenotyps. SCV entstehen unter dem Selektionsdruck von Aminoglycosiden,

Betalaktam Antibiotika und Gyrasehemmern und können sowohl in vitro als auch in vivo eine herabgesetzte Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Substanzgruppen aufweisen.

3. Die Ausbildung des VISA Phänotyps war in allen bisher beschriebenen Fällen im Anschluß oder Verlauf einer vorausgegangenen Therapie mit Vancomycin aufgetreten (1, 31, 83) Die ersten VISA Isolate Mu50 und hetero- VISA MU3 unterschieden sich von Vancomycin sensiblen Kontrollisolaten durch eine verstärkte Bildung von Zellwandbestandteilen. Dabei verdoppelte sich die Dicke der Zellwand. Die beobachtbaren Veränderungen waren im einzelnen:
  - Beschleunigte Aufnahme von N- Acetylglucosamin in die Zelle
  - Beschleunigte Freisetzung von Zellwandbausteinen in die Umgebung
  - Vergrößerter Murein Monomer Precursor Pool
  - Eine verstärkte Produktion der Penicillin-Bindenden-Proteine (PBP) PBP2 und PBP2a
  - Eine verstärkte autolytische Aktivität
  - Eine Steigerung der Produktion autolytischer Enzyme
4. Alle bisher gefundenen VISA Isolate zeigten seither den sogenannten "trapping effect" Er beruht auf drei Änderungen der Zellwandbeschaffenheit von *S. aureus*:
  - I. Die Peptidoglycane der Zellwand weisen einen verringerten Quervernetzungsgrad auf, so daß die Zahl der Vancomycin bindenden D-Alanyl-D-Alanin Reste ansteigt.
  - II. Die so modifizierte Zellwand kann mehr Vancomycin an falsche Targets binden und
  - III. Die tatsächlich am Wirkort, der äußeren Zytoplasmamembran (Vorstufen der Lipid II Precursoren ), angelangende Menge Vancomycins wird dadurch verringert

Die Untersuchung des ersten Düsseldorfer hetero- VISA Isolates zeigte eine deutliche Erhöhung des Gehalts an nicht- amidgebundenen Precursoren. Der Spitzenwert der ersten High-Pressure-Liquid-Chromatography (HPLC) Messung überstieg dabei sogar den Wert, der beim ersten homogenen VISA (Mu 50) ermittelt wurde, fiel aber in den nachfolgenden Messungen ab. Das Düsseldorfer Isolat zeigte wie Mu50 einen deutlich herabgesetzten Grad an Quervernetzungen der Zellwandpeptidoglykane.

Damit konnten beide Annahmen bestätigt werden, wobei im Düsseldorfer Kollektiv der Zusammenhang zwischen einer Vancomycin- Therapie und dem nachfolgenden Auftreten von hetero-VISA nicht in allen Fällen belegt werden konnte. Da die Isolate mutmaßlich durch eine Infektkette miteinander verbunden waren (klonal identische PFGE Restriktionsmuster), kann eine direkte Übertragung von hetero- VISA von Keimträgern auf Patienten bei denen zuvor keine MRSA Besiedlung stattgefunden hatte, nicht ausgeschlossen werden. Da nur Erstisolate in die Untersuchung aufgenommen wurden, läßt sich zudem nicht sicher nachweisen, ob die Entstehung

von hetero- VISA bei den beiden Patienten, die eine Vancomycin- Therapie erhalten hatten, aus MRSA Isolaten entstanden sind, die diese Eigenschaft vorher nicht aufwiesen.

In einer Arbeit zur Evaluation der Resistenztestung für Glycopeptide bei *S. aureus* von Tenover et al. (110) wurden Sensitivität und Spezifität des herkömmlichen Agardiffusionstests nach NCCLS Richtlinien mit 5 kommerziell erhältlichen Mikrodilutionsverfahren verglichen. Dies waren im Einzelnen:

- bioMérieux Vitek ( Hazelwood, Mo.)
- GPS-101 cards ( Version R05.01)
- MicroScan conventional panels ( Combo 6; Dade Behring Inc., Microscan Division, West Sacramento, Calif.) die in einem MicroScan Walk/Away abgelesen werden ( DMS Version 20.3)
- Microscan Rapid Pos. Combo 1 panels, die in einem MicroScan Walk/Away abgelesen wurden ( AccuMed International, Inc. ( Westlake Ohio)
- Sensititre MD panels, die visuell beurteilt werden und
- Etest ( AB Biotest North America , Inc. Piscataway N.Y.)

Zusätzlich wurden hauseigene Agarplatten mit Vancomycinkonzentrationen von 2,4 und 6 mg/l erprobt.

Zusammenfassend wurde der Agardiffusionstest als nicht geeignet zur Detektion von VISA oder hetero- VISA beurteilt. Unter den Mikrodilutionsverfahren zeigten die MicroScan conventional panels die beste Übereinstimmung mit der Mikrodilutionsreferenzmethode des NCCLS, während die MIC der Rapid Methode bei allen 12 Teststämmen falsch zu hoch waren. Für die Routinetestung stellte sich der Etest als hinreichend sensitive und einfache Screeningmethode heraus, die den Agardiffusionstest für Vancomycin und Teicoplanin ersetzen sollte.

Alle Isolate, die durch erhöhte MHK Breakpoints (MIC Wert für Vancomycin oder Teicoplanin =1 bis 4 mg/L) auffallen, sind als potentielle VISA anzusehen

Daraus ergibt sich die Forderung, in diesen Fällen einen sogenannten Grenzwertkonzentrationstest durchzuführen, der im Material und Methodenteil dargestellt wurde. Dieser Test wurde bei allen MRSA durchgeführt, es ließ sich aber im derzeitigen europäischen MRSA-Kollektiv kein VISA nachweisen.

Auf dem Hintergrund der Multi-Resistenz bei MRSA und einer möglichen Verbreitung von VISA in der näheren Zukunft wächst das Interesse an alternativen Substanzen wie der Streptogramin-Kombination Quinupristin/Dalfopristin (Synercid) oder dem Oxazolidinon Linezolid.

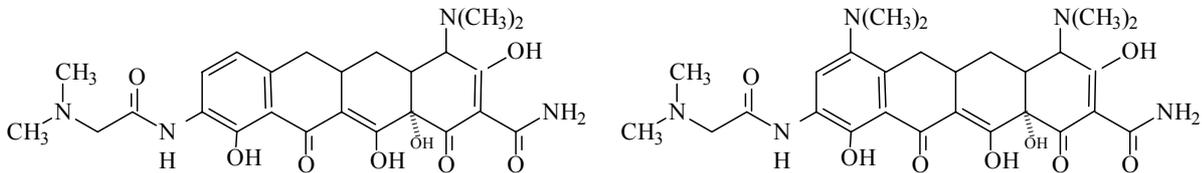


Abb.1. Quinupristin/Dalfopristin (Synercid)

Quinupristin-Dalfopristin (Q-D) ist das erste parenteral applizierbare Antibiotikum aus der Gruppe der Streptogramine, die als natürlich vorkommende Antibiotika aus verschiedenen *Streptomyces spp.* gewonnen werden. Natürliche Streptogramine zeichnen sich durch eine rasche bakterizide Wirkung, einen lang anhaltenden postantibiotischen Effekt, ihre intrazelluläre Aktivität sowie durch eine relative Unempfindlichkeit gegen erworbene bakterielle Resistenzmechanismen aus. Unter den bisher isolierten und in der Vergangenheit zum Teil auch klinisch angewendeten Streptograminen (z.B. Virginiamycin, Pristinamycin) hat Q-D neben dem Vorteil der Wasserlöslichkeit auch aufgrund seiner hohen Aktivität gegenüber multiresistenten grampositiven Kokken eine besondere Bedeutung (7, 68, 113, 118). Als klinisch wirksam erwies sich Q-D in Phase IIIa- Studien sowie in einem weltweiten Notfallprogramm bei der Behandlung von nosokomialen Pneumonien, Haut- und Weichteilinfektionen.

Q-D (früher als RP 59500) besteht in einem 30:70-Verhältnis aus dem Hexadepsipeptid Quinupristin und dem zyklischen Makrolacton Dalfopristin. Ort der Wirkung in der Bakterienzelle ist die 50S-Untereinheit des Ribosoms. Beide Einzelkomponenten beeinträchtigen durch Bindung an spezifische Proteine des Extrusionskanals die Proteinbiosynthese, ohne allerdings als Einzelsubstanzen eine nachhaltige Hemmung der Proteinsynthese mit der Folge eines bakteriziden Effektes auszulösen. Erst durch die Kombination der einzelnen Komponenten werden die Bindungsverhältnisse am Ribosom so nachhaltig verändert, daß eine bakterizide Wirkung resultiert. Das antimikrobielle Spektrum von Q-D umfaßt sowohl *Staphylococcus aureus* als auch die verschiedenen Spezies der koagulasenegativen Staphylokokken, einschließlich Methicillin- und/oder Makrolid- Lincosamid- Streptogramin B (MLS<sub>B</sub>)- resistenter Stämme (MHK<sub>90</sub> 0,25-2 mg/l). Darüber hinaus besitzt Q-D eine hohe Aktivität gegenüber Streptokokken, inkl. Penicillin-

und Makrolid- resistenter Pneumokokken (MHK<sub>90</sub> 1-2 mg/l). Während *Enterococcus faecalis* eine intrinsische Resistenz gegenüber Dalfopristin aufweist und damit nur bedingt im Wirkungsbereich der Streptograminkombination liegt, sind *Enterococcus faecium*- Stämme üblicherweise empfindlich gegenüber Q-D (MHK<sub>90</sub> 0,5- 16 mg/l). In einer noch andauernden multizentrischen, prospektiven Studie zur *in vitro*- Aktivität von Q-D gegen Staphylokokken und andere grampositive Erreger, die von Patienten mit einer Sepsis isoliert wurden, zeigte Q-D eine hohe Aktivität gegenüber den grampositiven Kokken (119). Die mit Hilfe der Mikrodilution durchgeführte Empfindlichkeitsbestimmung wies eine *in vitro*- Aktivität von Q-D gegenüber Staphylokokken nach, die sowohl unabhängig vom Methicillin- Phänotyp als auch unabhängig vom MLS<sub>B</sub>- Resistenz- Phänotyp der getesteten Stämme war (MHK<sub>90</sub> 0,5-1 mg/l).

Untersuchungen zur bakteriziden Aktivität von Q-D zeigen, daß die Minimalen Bakteriziden Konzentrations-Werte (MBK) meist im Bereich der MHK oder einer Verdünnungsstufe darüber liegen. Allerdings wurden für Staphylokokken mit konstitutivem MLS<sub>B</sub>- Phänotyp in Abhängigkeit von der Dauer der Wechselwirkung des Antibiotikums mit dem Inokulum zum Teil auch höhere MBK- Werte bestimmt (MBK 0,25-8 mg/l). Bei in der log-Wachstumsphase befindlichen *S. aureus*- Stämmen erfolgte in Gegenwart der zweifachen MHK der Streptograminkombination eine Reduktion der Keimzahl um drei bis vier Zehnerpotenzen innerhalb von nur vier Stunden. Bei entsprechend wachsenden Pneumokokken fand sich in Titrationskurven mit unterschiedlichen Konzentrationen von Q-D eine vergleichbar rasche Abtötung wie bei Vancomycin, jedoch war die Wirkung noch bei deutlich niedrigeren Konzentrationen von Q-D nachweisbar. Die Abtötungskinetik zeigte keinen wesentlichen Unterschied zwischen Penicillin- sensiblen, - intermediären und resistenten Pneumokokken- Stämmen.

Die erworbene Resistenz grampositiver Erreger kann durch unterschiedliche Mechanismen zustande kommen. Resistenz durch enzymatische Hydrolyse des Depsipeptidrings, kodiert durch das *vgb*- Gen, führt zur Inaktivierung von Quinupristin und kommt bei *S. aureus* und *E. faecium* vor. Dalfopristin kann durch Acetylierung inaktiviert werden (Bei *S. aureus*, KoNS, *E. faecium*: *sata* -, *vat*- und *vatB*- Gene, die jeweils auf Plasmiden lokalisiert sind). Der klinisch bedeutsamste Mechanismus besteht in der Methylierung des Adenin- Moleküls in der Position 2058 der 23S rRNA des Peptidyltransferasezentrums und führt zur Resistenz gegenüber Makroliden, Lincosamiden und Streptogramin- B- Substanzen (MLS<sub>B</sub>- Phänotyp). Dieser plasmidkodierte Resistenzmechanismus (*erm*- Determinanten: *ermA* bis *ermF*) führt zu einer reduzierten Bindung des Antibiotikums an das Ribosom und kann konstitutiv oder induzierbar exprimiert werden. Parallelresistenzen von Quinupristin/Dalfopristin mit anderen Antibiotika sind bisher nicht publiziert worden.

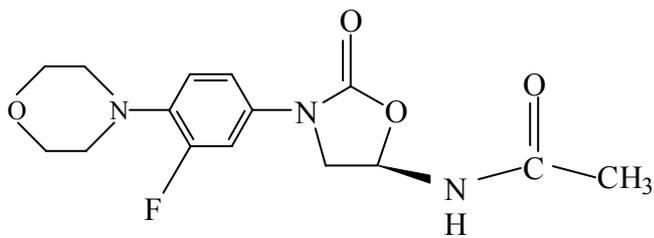
In der vorliegenden Untersuchung waren 99,5% der MSSA und 95,3% der MRSA empfindlich gegenüber der Streptograminkombination Quinupristin/Dalfopristin. Insgesamt wiesen 27 der 3052 *S. aureus* Isolate (0,9%) einen MHK-Wert von  $> 4$  mg/l auf und sind damit resistent. Darüberhinaus zeigten diese Isolate auch Kreuzresistenzen mit anderen Antibiotika-Klassen, den Aminoglykosiden, den Makroliden, den Lincosamiden, den Chinolonen und den Betalaktamen. Zweiundzwanzig dieser Isolate wurden im Jahre 1998 isoliert, so daß die weitere Resistenzentwicklung sehr engmaschig überwacht werden muß.

Unsere Ergebnisse stimmen weitestgehend mit US-amerikanischen Studien an 200 Krankenhäusern überein, in denen 99% der getesteten *S. aureus* Isolate Q-D empfindlich waren. In einer deutschen Studien konnte bei der Untersuchung von 1359 Staphylokokken aus Blutkulturen kein Q-D resistentes Isolat gefunden werden (119).

Die meisten Q-D resistenten *S. aureus* Isolate in der vorliegenden Studie stammten aus Frankreich. Darüberhinaus waren diese Isolate z.T. noch klonal identisch, so daß eine nosokomiale Übertragung nahe liegt. Streptogramin-Präparate werden in Frankreich seit mehr als 25 Jahren eingesetzt, so daß ein gewisses Resistenzniveau nicht überraschend wäre. Im Rahmen einer nationalen Studie zeigte sich jedoch, daß bei der Analyse von 895 MRSA aus 96 französischen Krankenhäusern der Anteil der Q-D resistenten Isolate lediglich bei 1,5% lag. Bei der retrospektiven Analyse von 37775 klinischen *S. aureus* Isolaten, die alle im Pariser Pitie-Salpetriere Krankenhaus zwischen 1973 und 1996 isoliert werden konnten, lag der Anteil Q-D resistenter Isolate bei  $< 1\%$  in der MSSA und bei  $< 5\%$  in der MRSA Population. Vergleichbare Werte werden in der vorliegenden Studie gefunden.

Alle Q-D resistenten Isolate in der vorliegenden Studie waren weiterhin empfindlich gegenüber Linezolid mit MHK-Werten zwischen 0,12 and 1 mg/l. Damit kommt dieser neuen Substanz möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von multi-resistenten MRSA zu.

Das Oxazolidinon Linezolid wies eine mit dem Vancomycin vergleichbare in-vitro Aktivität auf. Kein Isolat zeigte MHK-Werte  $> 4$  mg/l, dem vorraussichtlichen offiziellen Grenzwert, so daß alle Isolate als nicht resistent zu werten sind.



**Abb. 2: Linezolid**

Linezolid ist ein vollständig synthetischer antimikrobieller Wirkstoff, der nach derzeitigem Entwicklungsstand als erster Vertreter einer neuen Klasse von Antibiotika, den Oxazolidinonen, zur Verfügung stehen wird. Der Wirkmechanismus beruht auf einer Inhibierung der Proteinsynthese bakterieller Mikroorganismen zu einem sehr frühen Stadium. Hierbei binden sich die Oxazolidinone spezifisch an die ribosomale 50S Untereinheit, wodurch die Bildung eines funktionstüchtigen Initiationskomplexes verhindert wird. Aufgrund dieser Wirkungsweise ist eine Kreuzresistenz zu bereits auf dem Markt befindlichen Antibiotika (bzw. zu Antibiotika, die derzeit in Entwicklung sind) nicht bekannt, bzw. auch in nächster Zukunft nicht zu erwarten (124).

Die bisherigen Untersuchungen zur *in vitro*- Aktivität gegenüber grampositiven Kokken, wiesen eine hohe Wirksamkeit gegenüber Staphylokokken, Streptokokken, sowie gegenüber Enterokokken nach: So zeigte Linezolid - vergleichbar mit den Glykopeptiden Vancomycin und Teicoplanin - eine hohe Aktivität gegenüber allen *S. aureus*- Stämmen, unabhängig von der Methicillin-Resistenz der untersuchten Stämme. In verschiedenen Studien wurden bis auf wenige Stämme alle untersuchten *S. aureus*- Isolate *in vitro* durch eine Konzentration von (4 mg/l) Linezolid in ihrem Wachstum gehemmt. Auch gegenüber den koagulasenegativen Staphylokokken (KoNS) wies Linezolid eine beachtenswerte Aktivität auf und zeigte im Vergleich zu Teicoplanin eine höhere Wirksamkeit insbesondere gegenüber *S. haemolyticus*- Isolaten (45, 47, 68, 123). In Untersuchungen zur *in vitro*- Aktivität gegenüber Streptokokken zeigte sich, daß neben *S. pyogenes*, *S. agalactiae* u.a. *Streptococcus*- Spezies, vor allem auch Penicillin- sensible, intermediär- sensible und - resistente *S. pneumoniae*-Stämme (PRSP) im Wirkungsspektrum von Linezolid liegen (MHK<sub>90</sub> von Linezolid gegen Penicillin- resistente Pneumokokken: 1 mg/l) (64, 105). Schließlich erwies sich Linezolid in weiteren Studien zur *in vitro*- Aktivität auch gegenüber Enterokokken als wirksame Substanz, u.a. in einer Untersuchung von Eliopoulos et al. gegenüber 180 verschiedenen Enterokokken- Isolaten, die den Spezies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, u.a. zuzuordnen waren. Alle Isolate wurden in einem MHK- Bereich zwischen 1 und 4 g/ml Linezolid gehemmt, einschließlich vanA- und vanB- positiver Isolate (VRE) (19).

Obwohl Linezolid primär als bakteriostatisches Antibiotikum einzuordnen ist, zeigten Untersuchungen zur Abtötungskinetik sowie Bestimmungen zur MBK einen speziesspezifischen

bakteriziden Effekt dieses Antibiotikums. Der Einsatz von Linezolid führt zwar zu einer signifikanten Reduzierung von vermehrungsfähigen Bakterien, erreicht jedoch nicht - der klassischen Definition eines bakteriziden Effektes entsprechend - eine 99,9%ige Abtötung der Bakterien (123, 124). Während eine bakterizide Wirkung z.B. auf *S. pneumoniae* und *S. pyogenes* beobachtet wurde, konnte ein signifikanter, konzentrationsabhängiger bakterizider Effekt auf Staphylokokken und Enterokokken, die Konzentrationen zwischen dem 2- bis 16-fachen der MHK ausgesetzt waren, nicht gezeigt werden (45, 47, 68, 123). Untersuchungen zur *in vitro*- Entwicklung von Resistenzen liegen bislang nur vereinzelt vor und weisen z.T. widersprüchliche Ergebnisse auf. Während z.B. bei einer Testung von Methicillin- resistenten *S. aureus* und *S. epidermidis*- Stämmen bei den MRSA bei bis zu 2- 4fachen MHK- Werten und bei den MRSE bei bis zu 2- 8fachen MHK- Werten die Ausbildung einer spontanen Resistenz beobachtet werden konnte, wurden in anderen Untersuchungen keine Resistenzmutanten selektioniert (68, 123, 124).

Zusammenfassend bleibt hervorzuheben, daß multiresistente Staphylokokken, inkl. MRSA, Pneumokokken, inkl. PRSP und Enterokokken, inkl. VRE im Wirkungsspektrum von Linezolid liegen. Linezolid weist als erster Vertreter der Oxazolidinone einen neuen Wirkmechanismus auf und wird sowohl zur oralen als auch zur intravenösen Verabreichung zur Verfügung stehen.

Sowohl Quinupristin/Dalfopristin als auch Linezolid stellen sich aufgrund des bisherigen Datenmaterials und der initialen klinischen Erfahrung als erfolgversprechende Entwicklungen dar, die sich vor dem Hintergrund einer zunehmenden Resistenz bei grampositiven Kokken in Zukunft als Alternativen zu den Glycopeptid- Antibiotika anbieten dürften.

### 4.3 TYPISIERUNG VON MRSA-ISOLATEN

Zur Typisierung der 370 MRSA Isolate von 24 europäischen Universitätskliniken wurden zwei gentypische Verfahren eingesetzt, die Pulsfeld-Gelelektrophorese sowie die Ribotypisierung. Da es keinen großen evolutionären Druck gibt, die *SmaI* Restriktionsstellen konserviert zu halten, stellen sich im Laufe der Evolution hier relativ schnell genetische Veränderungen ein, die zu modifizierten PFGE-Typen führen. Mit Hilfe dieser Technik kann daher sehr gut zwischen klonal nicht verwandten Stämmen unterschieden werden. Ein solches Verfahren ist gut geeignet für nosokomiale Ausbruchsuntersuchungen im Krankenhaus. Geht es jedoch um epidemiologische Untersuchungen, so sollte ein zweites Verfahren zusätzlich eingesetzt werden, dessen Typisierungsmerkmale sich im Laufe der Evolution nicht so schnell verändern. Bei der Ribotypisierung wird die ribosomale DNA untersucht. Diese DNA ist konservierter als die chromosomale und unterliegt nicht einem so hohen evolutionären Druck. Die Ribotypisierung stellt somit einen relativ "langsamen" evolutionären Marker dar, die PFGE einen relativ "schnellen". Dieses unterschiedliche Konzept führt zu relativ wenigen Ribotypen (n=17) verglichen mit relativ vielen PFGE Typen (n=77). Durch die Kombination der beiden Methoden können vier große Gruppen von Isolaten, die Typen I bis IV, unterschieden werden. Die Stämme innerhalb dieser relativ großen Gruppen sind alle verwandt zu einander und teilen viele genetische Gemeinsamkeiten, da sie jeweils gemeinsame "Ursprünge" aufweisen.

#### Bedeutung und Interpretation von Typisierungsergebnissen

Die Bedeutung eines einzelnen Typisierungsbefundes korreliert mit der Diskriminationsfähigkeit der eingesetzten Methode. Sind auch bei offensichtlich nicht miteinander verwandten Stämmen gleiche Typisierungsergebnisse zu erzielen, so ist dieser Befund für epidemiologische Fragestellungen nur bedingt verwertbar. Darüberhinaus werden epidemiologische Untersuchungen um so komplexer, je länger der Ausbruch einer nosokomialen Infektion andauert bzw. je größer der Verbreitungsraum ist. Unter diesen Prämissen wächst die Wahrscheinlichkeit, daß sich die Isolate eines Stammes in ihren phänotypischen bzw. genotypischen Eigenschaften verändern. Dies kann z.B. durch den Austausch mobiler genetischer Elemente (z.B. Plasmide), Insertionen oder Deletionen in der chromosomalen DNA oder durch spontane DNA-Sequenz-Mutationen (mit sich daraus evt. ergebenden Änderungen der Restriktionsschnittstellen) erfolgen.

Die Interpretation der Ergebnisse ist besonders schwierig, wenn sich die untersuchten Isolate nur in ein bis zwei Eigenschaften voneinander unterscheiden (z.B. das Fehlen einer biochemischen Stoffwechselleistung oder die Verschiebung einer Bande auf dem Elektrophorese-Gel). Gehören

diese Isolate schon zu unterschiedlichen Stämmen? Durch suffizientere Methoden können immer kleinere genetische Unterschiede detektiert werden, die auch innerhalb des gleichen Stammes während eines Infektionsgeschehens im Organismus des Patienten, im kulturellen Wachstumsprozeß oder beim Ausbruch einer nosokomialen Infektion auftreten können. Aufgrund dieser Tatsachen muß der Begriff der klonalen Identität hinterfragt werden. Klonale Identität kann mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht hundertprozentig bewiesen werden, sondern der kritische Untersucher erhält durch die Anwendung gut diskriminierender Methoden lediglich eine hinreichende Gewißheit, daß die untersuchten Isolate sehr eng miteinander verwandt sind. Berücksichtigt man die normale genetische Drift in Bakterienstämmen, so ist das Konzept der Klonalität eher in einem relativen als in einem absoluten Sinne zu verstehen. Die Bestimmung der klonalen Identität bedingt daher Kenntnisse über die genetische Stabilität der Organismen, den bestehenden Selektionsdruck der Umgebung und die Diskriminationsfähigkeit des eingesetzten Typisierungsverfahrens.

In diesem Zusammenhang sollte darauf hingewiesen werden, daß der in der vorliegenden Arbeit ermittelte Stellenwert der zwei Verfahren zur Typisierung von MRSA nicht generalisiert werden kann, sondern nur für die hier gewählten methodischen Rahmenbedingungen gilt (z.B. Restriktionsenzym).

Für die epidemiologische Analyse von Endemien bzw. Epidemien ist die Typisierung einer großen Anzahl von Stämmen notwendig. In solchen Fällen reicht der visuelle Vergleich von Bandenmustern allein nicht aus. Stattdessen muß eine quantitative Auswertung der Fragmentlängenmuster vorgenommen werden. Auf dem Software-Markt gibt es inzwischen mehrere Firmen, die sich auf das Gebiet der Geldokumentation und -auswertung spezialisiert haben und fertige Programme (z.B. GelCompar®) zur Analyse der genetischen Distanz verschiedener Stämme anbieten.

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnten durch die Kombination zweier Typisierungsverfahren vier große Gruppen unterschiedlicher MRSA Typen differenziert werden. 95% aller typisierten MRSA Isolate befanden sich in diesen Gruppen. Innerhalb der Gruppen lag die Ähnlichkeit der PFGE-Bandenmuster bei z.T. nur 65%, jedoch wiesen die Isolate gleiche oder sehr ähnliche Ribotypen und Antibiogramme auf. Es gab eine sehr enge Korrelation zwischen der Multi-Resistenz der Isolate und ihrer disseminierten Ausbreitung. Die Isolate, die zum Typ I gehören, weisen das PFGE-Muster des sog. 'Norddeutschen Epidemiestammes' auf, der Ende der achtziger Jahre auch schon auf der iberischen Halbinsel auftrat. Isolate dieses Typs konnten nun in 12 der 24teilnehmenden Krankenhäuser beobachtet werden.

Die weitestgehende Stabilität der MHK-Werte innerhalb eines MRSA-Klons deutet daraufhin, daß einmal erworbene Resistenzen sehr häufig im Rahmen der klonalen Expansion erhalten bleiben. Diese Beobachtungen haben weitreichende Folgen für den therapeutischen Einsatz bestimmter Antibiotikaklassen, wie z.B. die Chinolone. Sind einmal Resistenzen aufgetreten, so können in den klonal identischen Folgeisolaten die betroffenen Antibiotika mit hoher Wahrscheinlichkeit nie mehr therapeutisch erfolgreich eingesetzt werden.

Durch den Einsatz moderner molekularbiologischer Techniken für die Identifizierung und Differenzierung von Bakterien-Isolaten stehen neue Verfahren für epidemiologische Untersuchungen zur Verfügung. Die gewonnenen Ergebnisse sollten dabei stets mit dem klinisch tätigen Kollegen, dem Krankenhaushygieniker und dem Pflegepersonal diskutiert und analysiert werden, denn nur durch das erfolgreiche Zusammenwirken gelingt es, Infektionswege und -quellen aufzudecken und damit nosokomiale Infektionen einzudämmen bzw. schon im Ansatz zu unterbinden.

Eine Übertragung von Mensch zu Mensch findet in der Regel über eine transiente Besiedlung der Hände statt. Das Krankenhauspersonal kann hierbei den jeweiligen Stamm entweder nach direktem Kontakt mit einem kolonisierten/infizierten Patienten über die Hände aquirieren, oder der MRSA kann durch die Berührung kontaminierter Gegenstände der Umgebung sowie aus dem eigenen Keimreservoir des Nasen-Rachenraumes an die Hände des Klinikpersonals bzw. anderer Patienten gelangen. Einfache Erklärungen für eine räumliche MRSA-Ausbreitung sind die Verlegung eines betroffenen Patienten innerhalb einer Klinik oder zwischen verschiedenen Krankenhäusern bzw. ein Arbeitsplatzwechsel besiedelter MRSA-Träger (Pflegepersonal, Ärzte, etc.).

Bei der Analyse der MRSA-Häufigkeitsverteilungen zwischen verschiedenen Krankenhäusern und Stationen stellt sich zusätzlich immer wieder die Frage, wieviele Patienten einen MRSA-Stamm aus der Umgebung, also von außen, mit auf die Station bringen bzw. wie oft eine nosokomiale Infektion vorliegt. Untersuchungen der Yale-University über einen Zeitraum von 14 Monaten verdeutlichen, daß 41% der Isolate von den Patienten aus der Umgebung mit ins Krankenhaus gebracht wurden, während die restlichen 59% auf eine nosokomiale Ausbreitung zurückgeführt werden konnten. Die Verhältnisse können natürlich zwischen verschiedenen Krankenhäusern sehr unterschiedlich sein, doch es gilt als gesichert, daß auch außerhalb der Krankenhäuser eine zunehmende MRSA-Ausbreitung zu beobachten ist (91). Dennoch sind MRSA-Infektionen in der Regel nosokomiale Infektionen.

Potentielle nosokomiale MRSA-Ausbrüche müssen daher, insbesondere auch in Großkliniken, durch die strikte Einhaltung empfohlener Hygienemaßnahmen vermieden bzw. minimiert werden.

#### 4.4 HYGIENEMABNAHMEN BEI MRSA-INFEKTIONEN

Detaillierte Hygieneempfehlungen können dem Anhang 1 (HYGIENEPLAN), der auf einem Vorschlag der Hygienefachkräfte des Instituts für Hygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf beruht, entnommen werden.

Darüberhinaus soll noch auf die Wichtigkeit einiger grundsätzlicher Maßnahmen hingewiesen werden:

- Gebrauch von Einmal-Handschuhen bei pflegerischen oder ärztlichen Tätigkeiten mit der zwingenden Maßgabe, die Handschuhe nach Beendigung der Tätigkeiten am betreuten Patienten zu wechseln, um eine Keimübertragung via Handschuh auszuschließen
- Händedesinfektion zusätzlich zum Gebrauch von Einmal-Handschuhen sowie nach jeder Tätigkeit im Zimmer von Patienten mit MRSA-Kolonisierung bzw. MRSA-Infektion (diese Grundregel ist allerdings nicht nur bei MRSA-Kontaminationen zu berücksichtigen)
- strikte Einhaltung eines regelmäßigen Kittelwechsels beim Klinikpersonal
- Separation der MRSA-Keimträger in isolierten Zimmern. Inwieweit eine "Kohortenpflege", d.h. die Zusammenführung von Keimträgern in bestimmten Arealen einer Station, sinnvoll ist, muß abhängig von der Situation vor Ort entschieden werden. Bei einer "Kohortenpflege" sollte spezielles Pflegepersonal nur für die dort betreuten Patienten zuständig sein. Der erfolgreiche Einsatz dieser Pflegeform wurde sowohl bei Infektionen vom Endemie- als auch bei Infektionen vom Epidemie-Typ gezeigt.
- intensive, ausführliche und wiederholte Schulung bzw. Information des Klinikpersonals über die Grundlagen und das Ausmaß des Problems einer nosokomialen MRSA-Epidemie bzw. -Endemie, mögliche Übertragungswege, Kontakt-Isolierungsmöglichkeiten, allgemeine Hygienemaßnahmen und Reinigungs- bzw. Desinfektionsverfahren
- nach Abschluß der notwendigen Behandlung sollten MRSA-Keimträger - sofern medizinisch vertretbar - möglichst schnell entlassen werden, um eine mögliche nosokomiale Keimübertragung zu verhindern. Bei Verlegung innerhalb der Klinik bzw. in ein anderes Krankenhaus sind die aufnehmenden Stationen frühzeitig über das Eintreffen von MRSA-Keimträgern zu informieren, um geeignete Maßnahmen (Isolierung, etc.) vorbereiten und einleiten zu können.

Mit diesen genannten Maßnahmen konnte das Auftreten von MRSA in Düsseldorf deutlich reduziert werden, eine vollständige Elimination war allerdings bisher nicht möglich (94, 98, 100).

Durch die ständige stationäre Aufnahme von neuen MRSA-Keimträgern (Verlegung aus anderen Krankenhäusern, Einschleppung aus dem Keimreservoir außerhalb der Klinik), der Beschäftigung von persistierenden MRSA-Trägern beim Klinikpersonal und der potentiellen Kontamination von Gegenständen auf der Station, ist die Forderung nach einer kompletten MRSA-Elimination aber auch nur sehr schwer zu erreichen. Das primäre Ziel muß daher darin gesehen werden, die intra- und inter-institutionelle Verbreitung von MRSA zu verhindern bzw. zu reduzieren. Da die Bedeutung und das Vorkommen multi-resistenter MRSA als Erreger nosokomialer Infektionen weltweit wächst, kommt der Durchführung solcher intensiver krankenhaushygienischer Maßnahmen eine wachsende Bedeutung zu.

Zusammenfassend ist mit Hilfe genotypischer Verfahren eine Charakterisierung der MRSA-Isolate möglich, um die Infektketten bei nosokomialen Infektionen zu untersuchen und geeignete therapeutische sowie krankenhaushygienische Maßnahmen einleiten zu können. Neben einer adäquaten Antibiotikatherapie ist die Isolierung betroffener Patienten, das strikte Einhalten von Hygienevorschriften und die Eliminierung von Staphylokokken aus dem Nasen-Rachen-Raum von Patienten und Personal von Bedeutung. Ein koordiniertes Vorgehen von Klinikern, Krankenhaushygienikern und Mikrobiologen ist dabei eine unabdingbare Voraussetzung für die erfolgreiche Beseitigung bzw. Verhütung nosokomialer Infektionen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen des EUROPEAN NETWORK FOR ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND EPIDEMIOLOGY (ENARE) haben sich 24 Universitätskliniken aus Europa zusammengeschlossen, um im Rahmen einer longitudinalen Analyse die Häufigkeit und das Resistenzverhalten von wichtigen Krankheitserregern in Europa zu charakterisieren. Die Untersuchungen zu *S. aureus* erfolgten in Düsseldorf. Im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen wurde zunächst die Häufigkeit von *S. aureus* in verschiedenen klinischen Abteilungen und Altersstufen für alle isolierten Stämme analysiert.

Insgesamt wurden 3052 *S. aureus* Isolate im Rahmen dieser Studie untersucht. Der durchschnittliche MRSA-Anteil lag bei 25%. Die MRSA-Prävalenz schwankte erheblich zwischen den teilnehmenden Universitätskliniken und entsprechend zwischen den beteiligten Ländern. Die höchsten Raten konnten in Portugal (54%) und Italien (43-58%) beobachtet werden. Die niedrigsten Werte traten in den beteiligten Kliniken in der Schweiz sowie in den Niederlanden auf ( je 2%).

Die MRSA-Prävalenz war am höchsten in *S. aureus* Isolaten aus Trachealsekreten von Patienten mit einer nosokomialen Pneumonie (34,4%), gefolgt von Isolaten aus Blutkulturen (24,8%) und war am niedrigsten in Isolaten, die aus Wundabstrichen stammten (22,4%).

Die meisten *S. aureus* Isolate kamen von Stationen der Inneren Medizin (36,8%), gefolgt von den Intensiv-Stationen (ICUs) (22,6%) sowie der Chirurgie (13,6%). Aus allen anderen Abteilungen wurden insgesamt nur 27,0% der *S. aureus* Isolate eingeschickt.

Zwischen den einzelnen Abteilungen gab es große Unterschiede hinsichtlich der MRSA-Prävalenz. Während der MRSA-Anteil in der Inneren Medizin bei 33% lag, betrug dieser Anteil auf den Intensiv-Stationen 27% und in den chirurgischen Stationen nur 13%. Die niedrigsten Prävalenzen wurden in Isolaten aus der Notaufnahme (0%) und den Krankenhausambulanzen (1%), gefunden, wobei die relativ niedrige Anzahl der getesteten Isolate berücksichtigt werden muß (n=21 bzw. n=59).

Die relative Verteilung der MSSA und MRSA Anteile in den verschiedenen Altersgruppen war vergleichbar. *S. aureus* Infektionen traten mit zunehmendem Alter häufiger auf, und nahmen dann

nach dem 75 Lebensjahr wieder ab. Es gab keine Altersgruppe in der besonders häufig MRSA-Isolate zu finden gewesen wären

Nachdem in den USA und Europa die ersten Vancomycin-intermediären resistenten *S. aureus*-Isolate aufgetreten sind, droht die Gefahr, daß sich insbes. bei MRSA-Isolaten weltweit auch eine Resistenz gegenüber Glykopeptiden ausbildet. Daher ist es wichtig, Analysen der in-vitro-Aktivitäten verschiedener neuer Antibiotika durchzuführen sowie herauszufinden, welche herkömmlichen Antibiotika zur wirkungsvollen Therapie von *S. aureus*, insbesondere von MRSA noch zur Verfügung stehen.

Basierend auf den Empfindlichkeits-Raten ist die in-vitro Aktivität der verschiedenen Betalaktam-Antibiotika gegenüber MSSA wie folgt einzuschätzen: Die beste in-vitro Aktivität besitzt Imipenem, gefolgt von Cefepime, Ceftriaxon, Cefazolin, Amoxicillin/Clavulansäure, Piperacillin/Tazobactam, und schließlich Penicillin.

Alle MRSA-Isolate sind per definitionem resistent gegenüber Betalaktam -Antibiotika.

Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Resistenz gegenüber Oxacillin und den Resistenzen gegenüber Makroliden, Lincosamiden, Aminoglykosiden, Tetrazyklinen, Fluorochinolonen, Rifampicin und Chloramphenicol.

Der Prozentsatz der Erythromycin-empfindlichen MSSA (77,5%) war um ca. das achtfache höher verglichen mit den Werten für die MRSA Isolate (9,8%). Während 93,7% der MSSA empfindlich gegenüber Clindamycin waren, lag dieser Anteil lediglich bei 23,3% bei den MRSA. 88% der Erythromycin-resistenten MRSA, aber lediglich 37% der MSSA wiesen einen konstitutiven MLS<sub>B</sub> Resistenz-Phänotyp auf, d.h. die Isolate sind konstitutiv resistent gegenüber Makroliden, Lincosamiden und Streptogramin B-Substanzen. Die restlichen Erythromycin-resistenten *S. aureus* Isolate waren induzierbar MLS<sub>B</sub> resistent.

Während nur 22,8% aller MRSA Isolate empfindlich gegenüber dem Aminoglykosid Gentamicin waren, lag dieser Anteil um mehr als das vierfache höher bei den MSSA-Isolaten (94,6%). Der Anteil der 'high-level' Gentamicin-resistenten Isolate (MHK > 500 mg/l) und der 'high-level' Streptomycin-resistenten MSSA Isolaten (MHK > 1000 mg/l) lag mit 0,2% bzw. 1,5% signifikant niedriger als in den MRSA Isolaten (1,6% bzw. 47,0%). Eine 'high-level' Resistenz schließt den Einsatz von Aminoglykosiden im Rahmen einer auf Synergismus ausgerichteten Kombinationstherapie aus.

Die Empfindlichkeit gegenüber Tetrazyklinen fiel von 89,7% für MSSA auf 42,9% bei MRSA Isolaten , wobei dieser Abfall deutlich niedriger ausfiel bei Betrachtung der Werte für die strukturell nahe verwandten Substanzen Minozyklin und Doxyzyklin, gegenüber denen jeweils ca. 90% der MRSA in-vitro empfindlich waren.

Während 90,6% aller MSSA gegenüber Ciprofloxacin empfindlich waren, lag dieser Anteil bei den MRSA lediglich bei 9,2%. Gegenüber MSSA wiesen die Chinolone Gatifloxacin und Trovafloxacin eine vergleichbar gute in-vitro Aktivität auf und waren zwei- bis vierfach aktiver als Ciprofloxacin, Sparfloxacin und Grepafloxacin. Trovafloxacin war das aktivste Chinolon gegenüber MRSA, gefolgt von Gatifloxacin, Grepafloxacin, Sparfloxacin und Ciprofloxacin, welches die schlechteste in-vitro Aktivität zeigte. Die experimentelle Substanz SB265805/LB20304 (Gemifloxacin) wies die niedrigsten MHK<sub>50/90</sub>-Werte auf. Die jeweiligen Werte lagen bei  $\leq 0,03/\leq 0,03$  mg/l für MSSA sowie bei  $0,5/2$  mg/l für MRSA. Die vorraussichtlichen Grenzwerte für Empfindlichkeit bzw. Resistenz dürften bei 1 bzw 4 mg/l liegen.

Nur 46,1% der MRSA waren empfindlich gegenüber Rifampicin, einer Substanz, die häufiger im Rahmen von Kombinationstherapien eingesetzt wird.

Während 99,5% der MSSA empfindlich gegenüber der Streptograminkombination Quinupristin/Dalfopristin waren, sank dieser Wert auf 95,3% in MRSA. Insgesamt wiesen 27 der 3052 *S. aureus* Isolates (0,9%) einen MHK-Wert von  $\geq 4$  mg/l auf und waren damit resistent gegenüber Q-D.

Das experimentelle Oxazolodinon Linezolid wies jeweils MHK<sub>50/90</sub>-Werte von  $2/2$  mg/l für MSSA und MRSA auf.

Vancomycin, als ein Vertreter der Glykopeptide, war das einzige zugelassene Medikament, gegenüber dem keine Resistenzen beobachtet werden konnte. Ein MRSA-Isolat war resistent gegenüber Teicoplanin, ein weiteres wies eine intermediäre Empfindlichkeit auf.

Im gesamten MRSA-Kollektiv, welches zwischen April 1997 und Februar 1999 isoliert werden konnte, ließen sich mit Hilfe Grenzwertkonzentrationstests für Vancomycin keine VISA, weder homogen noch heterogen exprimiert, nachweisen.

*S. aureus*-Isolate wurden als multiresistent bezeichnet, wenn sie gegenüber mindestens fünf oder mehr aufgeführten Antibiotika, die zu verschiedenen Klassen gehören, resistent waren. Bei den Antibiotika handelt es sich im Einzelnen um:

Penicillin, Oxacillin (Penicillinase-festes Penicillin), Erythromycin (Makrolid), Clindamycin (Lincosamid), Gentamicin (Aminoglykosid), Ciprofloxacin (Chinolon), Tetracyclin, Rifampicin, Chloramphenicol. MRSA sind per se schon resistent gegenüber Penicillin und Oxacillin..

Während nur 2% der MSSA multi-resistent waren, lag dieser Anteil bei den MRSA bei 87%. Nur 3% aller MRSA waren ausschließlich resistent gegenüber Betalaktam- Antibiotika.

Aufgrund einer zunehmenden Gefahr nosokomialer Infektionen durch MRSA in Krankenhäusern ist der Bedarf an Typisierungsverfahren, die schnell und zuverlässig Aussagen über den Verwandtschaftsgrad einzelner MRSA-Isolate zueinander ermöglichen, besonders hoch. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei moderne genotypische Verfahren (Pulsfeld-Gelelektrophorese und Ribotypisierung) verglichen, um den Stellenwert der einzelnen Verfahren zur MRSA-Typisierung beurteilen zu können. Darüberhinaus sollte die überregionale Verbreitung von MRSA-Typen in Europa charakterisiert werden

Um die Struktur der europäischen MRSA Population näher zu untersuchen, wurden die ersten 370 MRSA Isolate, in denen das *mecA*-Gen mittels Multiplex-PCR nachweisbar war, mit Hilfe der PFGE untersucht. Basierend auf einem sog. "similarity level" von 65%, konnten 95% MRSA Isolate in vier PFGE Typen mit einer größeren Anzahl zugehöriger Isolate (n= 19 bis 255) , sowie in eine größere Anzahl weniger Isolate umfassendere PFGE-Typen unterteilt werden.

Basierend auf einem 90% "similarity index", konnten 77 unterschiedliche PFGE Typen nachgewiesen werden, welche die genetische Diversität innerhalb der MRSA Isolate eindrucksvoll verdeutlichen .

Um die Verwandtschaft zwischen den einzelnen MRSA-Typen exakter zu analysieren, wurde neben der PFGE die Ribotypisierung eingesetzt. Verglichen mit den 77 unterschiedlichen PFGE-Typen konnten wir bei der Typisierung der 370 MRSA-Isolate nur 17 verschiedene Ribotypen nachweisen. Die Ribotypisierung weist also ein deutlich schlechteres Diskriminationsvermögen auf. Parallel zu unseren PFGE-Typisierungsergebnissen ließen sich wiederum vier große Ribotypen unterscheiden. Innerhalb dieser vier einzelnen großen Ribotypen unterschieden sich die Stämme jeweils maximal nur durch eine einzelne verschobene Bande. Der "similarity index" innerhalb der vier einzelnen Ribotypen lag bei 0.93. Zu diesen 4 großen Ribotypen gehörten 355 MRSA-Isolate. Die restlichen 15 nicht-epidemischen Isolate ließen sich noch 13 unterschiedlichen Ribotypen zuordnen.

Die vier großen Ribotypen passten exakt zu den vier großen PFGE-Typen. Somit ließen sich in der europäischen MRSA Kollektion vier epidemische MRSA-Typen charakterisieren, die disseminiert in Europa auftraten. Diese Typen werden im Weiteren mit Typ I, II, III und IV bezeichnet. Typ I, der die meisten zugehörigen Stämme enthielt (n=255), sollte in zwei Subtypen Ia und Ib unterschieden werden. Die Ribotypisierungsergebnisse von Ia und Ib unterschieden sich durch eine Bandenverschiebung, die Typisierungsergebnisse in der PFGE sind allerdings identisch und auch das Resistenzmuster ist gleich. Typ Ib prädominiert in Griechenland und der Türkei, während Typ Ia disseminiert in Europa auftritt. Jeder der vier großen MRSA-Typen ist durch ein spezifisches Resistenzprofil charakterisiert. Es zeigte sich eine hohe Korrelation zwischen einer gesteigerten Resistenz und einer weiten, epidemischen Ausbreitung. Während resistenterer Isolate disseminiert über Europa isoliert werden konnten, blieben empfindlichere Isolate beschränkt auf einige Patienten in einzelnen Krankenhäusern.

Tabelle 1: Herkunft der *Staphylococcus aureus* Isolate und MRSA-Prävalenz

Universitätsklinik	Anzahl der eingeschickten Isolate	MRSA-Prävalenz
London	131	20
Utrecht	148	2
Brüssel	82	32
Düsseldorf	215	4
Freiburg	132	5
Lausanne	114	2
Linz	117	10
Paris I	219	21
Paris II	119	15
Lille	188	25
Lyon	192	34
Warschau	58	32
Krakau	101	22
Coimbra	318	54
Madrid	113	27
Seville	132	34
Barcelona	107	9
Rom	145	43
Genua	152	58
Tirana	23	27
Athen	128	24
Ankara I	24	34
Ankara II	77	19
Istanbul	4	25
Tel Aviv	13	15
Gesamt	3052	25

Tabelle 2: Verteilung Minimalen Hemm-Konzentrationen (MHK) für Oxacillin bei 3052 *Staphylococcus aureus* Isolaten

MHK-Wert	Anzahl der Isolate	Prozentsatz bezogen auf die Gesamtzahl
≤0.06	565	18.5
0.12	645	21.1
0.25	388	12.7
0.5	501	16.4
1	137	4.5
2	51	1.7
4	35	1.1
8	51	1.7
>8	678	22.2

Tabelle 3: In-vitro Empfindlichkeit (% sensible Isolate) und Minimale Hemm-Konzentrationen (MHK<sub>50/90</sub> in mg/l) für verschiedene Antibiotika bei MSSA und MRSA

	MRSA (n=764)		MSSA (n=2288)	
	MIC <sub>50/90</sub>	%S	MIC <sub>50/90</sub>	%S
Penicillin	>32/>32	0.0	16/>32	15.4
Amoxicillin/Clavulanat	>16/>16	0.0	1/2	94.8
Piperacillin/Tazobactam	>64/>64	0.0	1/4	91.9
Cefazolin	>16/>16	0.0	≤2/≤2	95.2
Ceftriaxone	>32/>32	0.0	2/4	95.6
Cefepime	>16/>16	0.0	2/4	96.5
Imipenem	>8/>8	0.0	0.12/0.25	97.2
Erythromycin	>8/>8	9.8	0.5/>8	77.5
Clindamycin	>8/>8	23.3	0.12/0.25	93.7
Gentamicin	>16/>16	22.8	0.5/1	94.6
Tetracyclin	>8/>8	42.9	≤4/8	89.7
Doxycyclin	4/8	85.2	≤0.5/1	97.7
Minocyclin	2/4	92.3	≤0.25/0.5	98.1
Ciprofloxacin	>2/>2	9.2	0.25/1	90.6
Sparfloxacin	>2/>2	8.2	≤0.25/>2	87.8
Grepafoxacin	>2/>2	11.4	≤0.25/≤0.25	96.3
Gatifloxacin	2/4	-	0.06/0.25	-
Trovafloxacin	1/>4	-	≤0.03/0.12	-
Gemifloxacin	0.5/2	-	≤0.03/≤0.03	-
Rifampin	2/>2	46.1	0.03/0.25	97.4
Quinupristin/Dalfopristin	0.5/1	95.3	0.25/0.5	99.5
Linezolid	2/2	-	2/2	-
Teicoplanin	1/2	99.7	0.5/1	100
Vancomycin	1/2	100	1/1	100

Für die mit - in der Spalte %S gekennzeichneten Substanzen ist noch kein offizieller Grenzwert für die Berechnung der Empfindlichkeit erhältlich

## Tabelle 4: Geographische Verbreitung der 4 unterschiedlichen MRSA Typen in Europa

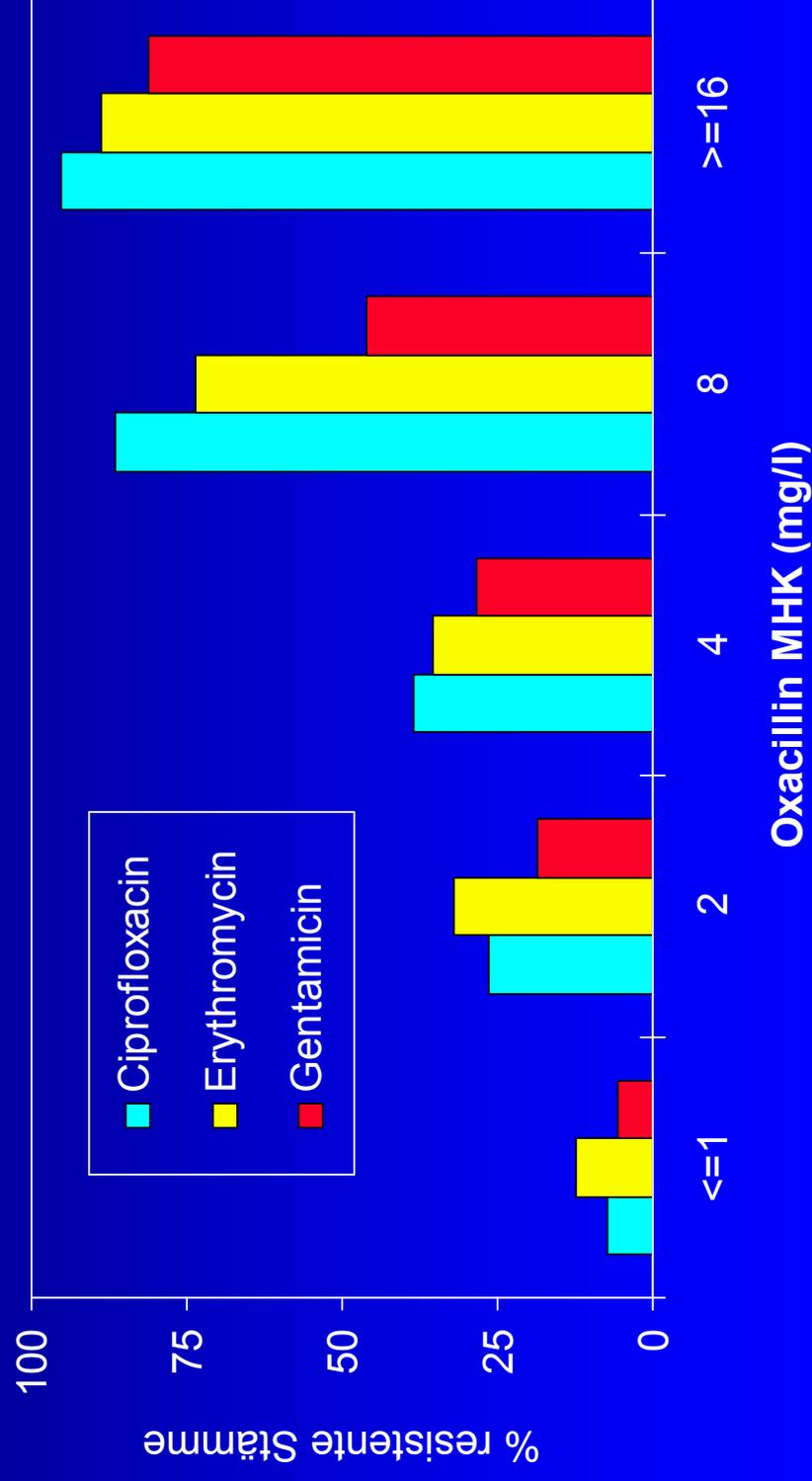
---

Typ I (n=255)	Belgien, Deutschland, England, Frankreich, Griechenland, Italien, Niederlande, Polen, Portugal, Spanien, Türkei
Typ II (n=59)	Deutschland, Italien, Niederlande, Österreich, Polen, Spanien
Typ III (n=19)	Niederlande, Polen, Spanien
Typ IV (n=26)	England

**Tabelle 5: Resistenzverhalten der 4 unterschiedlichen MRSA Typen in Europa (in %)**

	Typ I (n=255)	Typ II (n=59)	Typ III (n=19)	Typ IV (n=26)	Rest (n=11)
Erythromycin	97	98	75	100	18
Ciprofloxacin	98	98	90	100	45
Gentamicin	98	100	0	15	27
Tetrazyklin	98	2	0	0	27
Rifampicin	98	0	0	0	27

Abbildung 3: Multiresistenz bei *Staphylococcus aureus* in Abhängigkeit von der Oxacillin MHK



**Abbildung 4: Übersicht über die Pulsfeld-Gelelektrophorese-Typisierungsergebnisse von 370 MRSA-Isolaten**

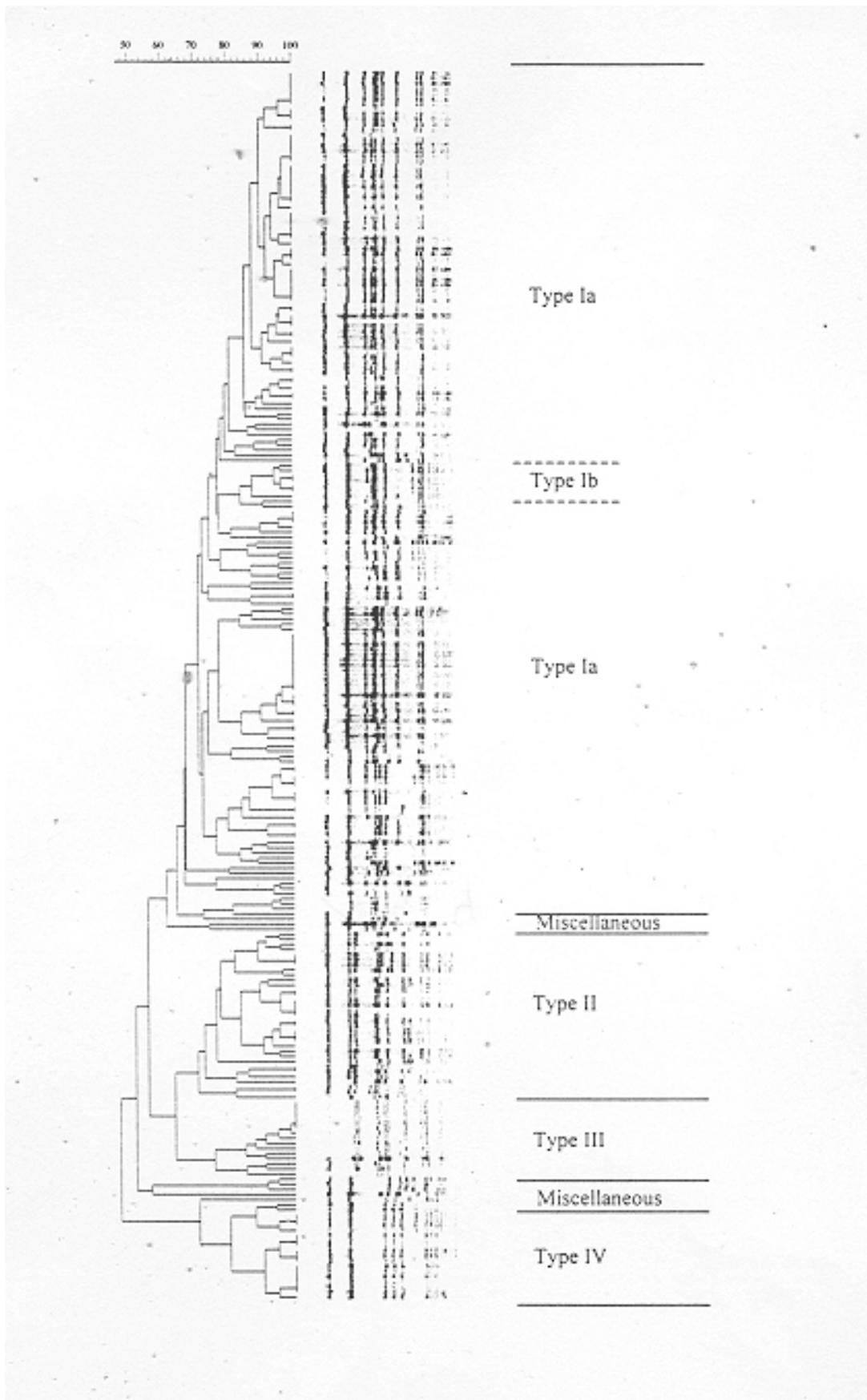
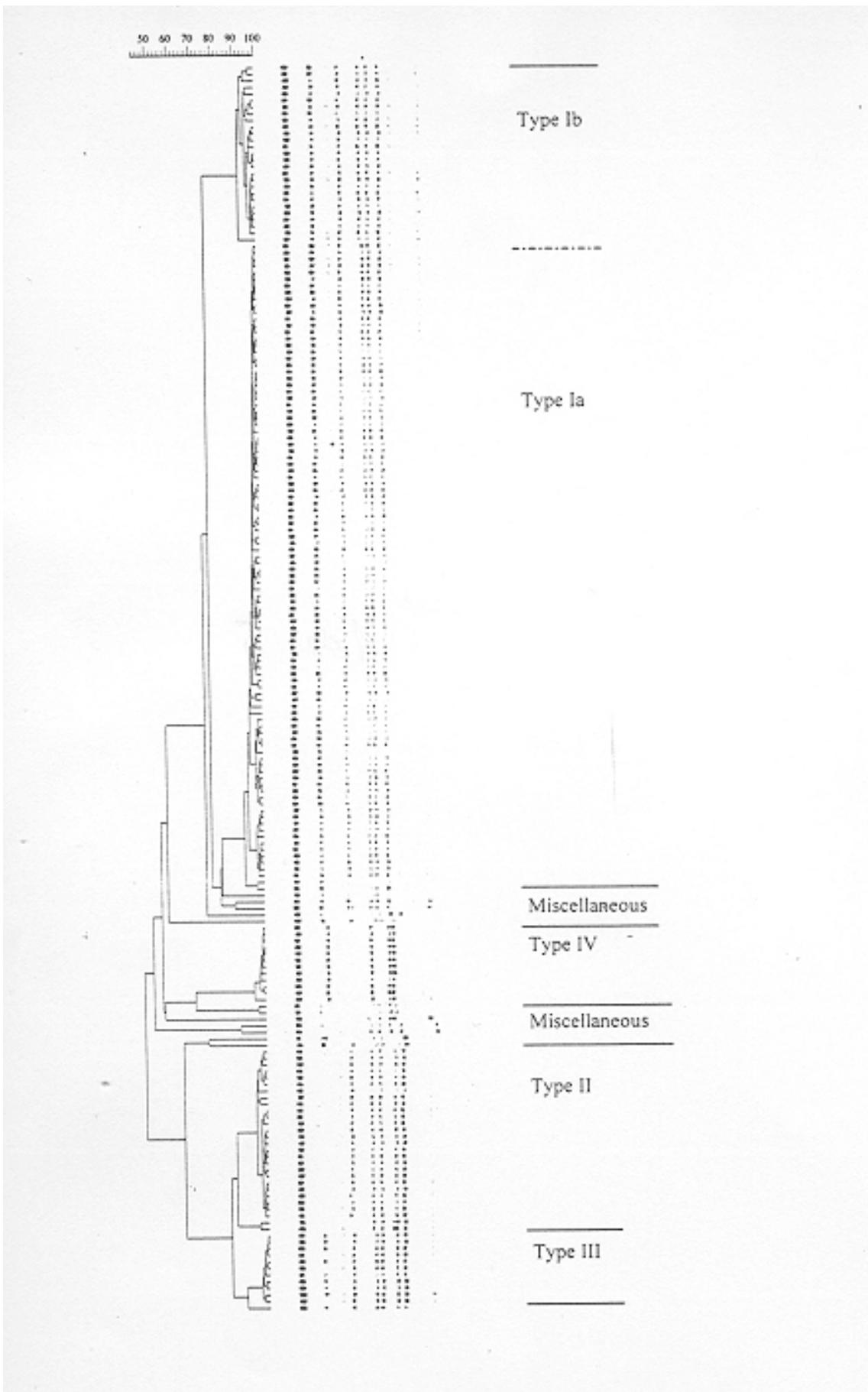


Abbildung 5: Übersicht über die Ribotypisierungsergebnisse von 370 MRSA-Isolaten



Anhang 1: Hygieneplan auf Vorschlag der Hygienefachkräfte aus  
dem Institut für Hygiene der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf (Direktorin: Prof. Dr. med. Helga Idel):

## HYGIENEPLAN

### Für die Stationäre Pflege

bei *Staphylococcus aureus*-infizierten und kolonisierten Patienten

**Erreger:** *Staphylococcus aureus*  
(Oxacillin-resistent oder multiresistent)

**Infektiöses Material:** Wundsekrete, Eiter, evt. Nasen-Rachen-  
Sekrete, etc.

**Infektionswege:** Erregerreservoir ist die Haut und Schleimhaut  
des Patienten und evtl. des Personals;  
Übertragung hauptsächlich über die Hände

### Hygienemaßnahmen bei Infektionen

#### 1. Isolierung

##### Standard

- ◆ Einzelzimmer für infizierte u. kolonisierte Patienten
- ◆ Kennzeichnung des Zimmers
- ◆ Besucher müssen sich vor Betreten des Zimmers melden
- ◆ Zimmertür stets geschlossen halten
- ◆ Patient sollte das Zimmer nur in dringenden Ausnahmefällen verlassen

## 2. Händedesinfektion

- ◆ vor und nach Patientenkontakt
- ◆ auch nach Gebrauch von Einmalhandschuhen
- ◆ "Händeschütteln" unbedingt vermeiden

## 3. Einmalhandschuhe

- ◆ bei Kontakt mit Körperflüssigkeiten, Ausscheidungen, Sekreten
- ◆ bei Kontakt mit infektiösen Körperarealen
- ◆ bei der Mundpflege und beim Absaugen

## 4. Schutzkleidung

- ◆ systematische und konsequente Kittelpflege bei allen Untersuchungen, pflegerischen Tätigkeiten,
- ◆ Konsiliaruntersuchungen, Visiten, etc.
- ◆ Schutzkittel soll im Zimmer verbleiben
- ◆ Wechsel des Kittels pro Schicht bei Verschmutzung und Durchfeuchtung mehrmals täglich

## 5. Nasen - Mundschutz

- ◆ bei nasopharyngeal kolonisierten Patienten
- ◆ bei Erregernachweis im Trachealsekret (bei Tracheostoma)
- ◆ bei großflächigen Wundinfektionen

## 6. Sichtbare Verunreinigungen

- ◆ z.B. mit Körperflüssigkeiten, Ausscheidungen, Sekreten müssen desinfizierend beseitigt u. gereinigt werden

## 7. Pflege-, Behandlungs- und Untersuchungsmaterialien

- ◆ Instrumente werden trocken entsorgt
- ◆ Thermometer, Nagelscheren, Haarbürsten müssen desinfizierend gereinigt werden
- ◆ Desinfektion mit geeigneten Flächen- und Instrumenten-Desinfektionsmitteln
- ◆ Blutdruckmanschetten und Stethoskope im Zimmer belassen und nach Gebrauch desinfizierend abwischen
- ◆ Urinflaschen, Steckbecken, thermische Desinfektion im Steckbecken-Spülautomat

**MATERIALIEN AUF EIN MINDESTMASS = TAGESBEDARF BESCHRÄNKEN!!!**

## 8. Flächen und Gegenstände

- ◆ laufende reinigende Desinfektion der Fußböden, Möbel, Leisten, Geräte, Nachtschränke, Bettgestelle, Infusionsständer arbeitstäglich:
- ◆ z.B. mit Kombinationspräparaten zur Flächen- und Instrumentendesinfektion, z.B. bestehend aus Glutaral, Glyoxal, Ethanol etc.

## 9. Wäscheentsorgung

- ◆ Wäschesammler (weiße Wäschesäcke) mit geschlossenem Deckel (Fußbedienung) im Zimmer belassen
- ◆ gefüllte Wäschesäcke im Zimmer verschließen und im Container entsorgen
- ◆ nicht stauchen!!

## 10. Abfallentsorgung

- ◆ Müllsammler immer sofort schließen (Fußbedienung)
- ◆ gefüllte Abfallsäcke im Zimmer verschließen und im Container entsorgen
- ◆ nicht stauchen!!

## 11. Transporte

- ◆ nasopharyngeal-kolonisierte und infizierte Patienten müssen einen Nasen - Mundschutz tragen
- ◆ Patient auf eine Trage umlagern, sofern möglich (Bett ist potentiell kontaminiert)
- ◆ nicht mit dem Bett durch die Klinik schieben
- ◆ bei Verlegung innerhalb der Klinik oder zum OP, Bettenwechsel durchführen
- ◆ Trage und Bett nach Gebrauch desinfizierend abwischen

## 12. Abschlußdesinfektion des Zimmers bei Verlegung/ Entlassung

- ◆ Scheuer-Wischdesinfektion aller Flächen und Gegenstände
- ◆ Durchführung obliegt gemeinsam den Desinfektoren und dem Reinigungsdienst
- ◆ angebrochene Verbandmaterialien/Pflegeartikel (lose Kompressen, angebrochene Salbentuben, etc.) und nicht benötigte Gegenstände (z.B. Zeitungen) entsorgen
- ◆ Matratzen, Kopfkissen, Decken und Lagerungshilsmittel in die Desinfektion geben

## 13. Wichtige allgemeine Hinweise

- ◆ Personenkreis, der die Patienten betreut, auf ein Minimum beschränken
  - ◆ Visiten evt. vor dem Zimmer abhalten, nur wirklich notwendige Personen dürfen in das Zimmer
  - ◆ unbedingt beachten, daß alle Personen:
    - Ärzte
    - Konsiliarärzte
    - Pflegepersonal
    - Krankengymnasten
    - Röntgenpersonal
    - Laborpersonal
    - Versorgungspersonal
    - technisches Personal
    - Reinigungspersonal
- die **hygienischen Maßnahmen** wie das Tragen von:
- ◆ Schutzkitteln
  - ◆ Nasen - Mundschutz sowie die
  - ◆ hygienische Händedesinfektion einhalten!

## 6. LITERATUR

1. Anonymous Update: *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin--United States (1997). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **46**, 813-815.
2. Bannerman TL, Hancock GA, Tenover FC, Miller JM (1995). Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **33**, 551-5.
3. Barber M, Rozwadowska-Dowzenko M (1948). Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet* **ii**: 641-4.
4. Barrett FF, McGhee RF, Finland M (1968). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City Hospital. Bacteriologic and epidemiologic observations. *N Engl J Med* **279**: 441-8.
5. Batchelor FR, Doyle FP, Nayler JHC, Rolinson GN (1959). Synthesis of penicillin: 6-aminopenicillanic acid in penicillin fermentations. *Nature* **183**: 157-8.
6. Bohach GA, Schlievert PM (1987). Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene relatedness to other pyrogenic toxins. *Mol Gen Genet* **209**, 15-20.
7. Bouanchaud DH (1997). In-vitro and in-vivo antibacterial activity of quinupristin/dalfopristin. *J Antimicrob Chemother* **39** Suppl A: 15-21.
8. Boyum A (1986). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **97**, 77-89.
9. Brakstad OG, Tveten Y, Nato F, Fournier JM (1993). Comparison of various methods and relations for specific identification of *Staphylococcus aureus* positive or negative for the *mecA* gene. *APMIS* **8**, 651-4.
10. Brockbank SMV, Barth PT (1993). Cloning, sequencing, and expression of the DNA gyrase genes from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **175**, 3269-77.
11. Bruce JL (1996). Automated system rapidly identifies and characterizes microorganisms in food. *Food Technology* **50**, 77-81.
12. Brumfitt W, Hamilton-Miller J (1989). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* **320**, 1188-96.
13. Centers for Disease Control (1997). *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin - United States, 1997. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **46**: 765-6.
14. Courvalin P (1997). Resistance of enterococci to glycopeptides. *Antimicrob Agents Chemother* **34**, 2291-6.
15. De Lencastre HM, Sá Figueiredo AM, Urban C, Rahal J, Tomasz A (1991). Multiple mechanisms of methicillin-resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **35**: 632-9.

16. De Lencastre HM, Tomasz A (1994). Reassessment of the number of auxiliary genes essential for expression of high level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **38**, 2590-8.
17. Deutsches Institut für Normung (1992). Empfindlichkeitsprüfung von Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika. In: *DIN-Taschenbuch Medizinische Mikrobiologie und Immunologie*. Beuth, Berlin, 331-406.
18. Eadon HJ, Pinney RJ (1991). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*- an overview. *J Clin Pharm Ther* **16**, 453-2.
19. Eliopoulos GM, Wennersten CB, Gold HS, Moellering RC Jr (1996). *In vitro* activities in new oxazolidinone antimicrobial agents against enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 1745-7.
20. Emori TG, Gaynes RP (1993). An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* **6**, 428-42.
21. Erstes Auftreten von MRSA mit verminderter Glycopeptidresistenz in Deutschland nachgewiesen (1998). *Epid. Bulletin* **17**, 123.
22. Faville RJ, Zaska DE, Kaplan EL, Crossley K, Sabath LD, Quie PG (1984). *Staphylococcus aureus* endocarditis; combined therapy with vancomycin and rifampicin. *JAMA* **240**, 1963-5.
23. Fleming A (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit J Exp Path* **10**: 226-36.
24. Frenay HME, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Verhoef J, Mooi FR (1996). Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **15**, 60-4.
25. Frenay HME, Theelen JPG, Schouls LM, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Verhoef J, van Leeuwen WJ, Mooi FR (1994). Discrimination of epidemic and non epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. *J Clin Microbiol* **32**, 846-7.
26. Geha DJ, Uhl JR, Gustaferrero CA, Persing DH (1994). Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* **32**, 1768-72.
27. Goering RV (1993). Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. *Infect Control Hosp Epidemiol* **14**, 595-600.
28. Goh SH, Byrne SK, Zhang JL, Chow AW (1992). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of Coagulase Gene Polymorphism. *J Clin Microbiol* **30**, 1642-5.
29. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D (1994). PCR-primers and probes for the 16S

- rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* **32**, 335-51.
30. Hackbarth CJ, Chambers HF (1989). Methicillin-resistant staphylococci: Detection methods and treatment of infections. *Antimicrob Agents Chemother* **33**, 995-9.
  31. Hanaki H, Kuwahara-Arai K, Boyle-Vavra S, Daum RS, Labischinski H, Hiramatsu K (1998). Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *J Antimicrob Chemother* **42**, 199-209.
  32. Hanaki H, Labischinski H, Inaba Y, Kondo M., Murakami H., Hiramatsu K (1998). Increase in glutamine-non-amidated muropeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50. *Antimicrob Chemother* **39**, 315-320.
  33. Hartmann BJ, Tomasz A (1986). Expression of Methicillin resistance in heterogenous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **29**, 85-92.
  34. Hassall JE, Rountree PM (1959). Staphylococcal septicaemia. *Lancet* **i**: 213-7.
  35. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, et al. (1997). Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* **350**, 1670-3.
  36. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC (1997). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* **40**, 135-6.
  37. Hiramatsu K, Kihara H, Yokota T (1992). Analysis of borderline-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* **36**, 445-53.
  38. Hiramatsu K, Suzuki E, Takayama Y, Katayama Y, Yokota T (1990). Role of penicillinase plasmids in the stability of the *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **34**, 600-4.
  39. Hiramatsu K (1996). Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **46**: 624-6.
  40. Hoeprich PD (1969). Gentamicin against *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* **119**: 391-2.
  41. Hudson IR (1994). The efficacy intranasal mupirocin in the prevention of staphylococcal infections: A review of recent experience. *J Hosp Infect* **27**, 81-98.
  42. Jensen MA, Straus N (1993). Effect of PCR conditions on the formation of heteroduplex and single-stranded DNA products in the amplification of bacterial ribosomal DNA spacer regions. *PCR Methods Applic* **3**, 186-94.
  43. Jensen MA, Webster JA, Straus N (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl Environ*

- Microbiol* **59**, 945-52.
44. Jevons MP (1961). "Celebin"-resistant staphylococci. *Brit Med J* **1**: 124-5.
45. Jones RN, Johnson DM, Erwin ME (1996). *In vitro* antimicrobial activities and spectra of U-100592 and U-100766, two novel fluorinated oxazolidinones. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 720-6.
46. Jorgensen JH, McElmeel ML, Trippy CW (1997). *In vitro* activities of the oxazolidinone antibiotics U-100592 and U-100766 against *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* species. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 465-7.
47. Kaatz GW, Seo SM (1996). *In vitro* activities of oxazolidinone compounds U100592 and U100766 against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 799-801.
48. Kayser FH (1986). Grundlagen der Methicillinresistenz von Staphylokokken. *Fortschr antimikrob antineoplast Chemother* **29**, 1269-73.
49. Khambaty FM, Bennett RW, Shaw DB (1994). Application of pulsed field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. *Epidemiol Infect* **113**, 75-81.
50. Kirby WMM (1944). Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin-resistant staphylococci. *Science* **99**: 452-3.
51. Knox R (1960). A new penicillin (BRL 1241) active against penicillin-resistant staphylococci. *Brit Med J* **2**: 690-3.
52. Kolbert CP, Connolly JE, Lee MJ, Persing DH (1995). Detection of the staphylococcal *mecA* gene by chemiluminescent DNA hybridization. *J Clin Microbiol* **33**, 2179-82.
53. Kostman JR, Alden MB, Mair M, Edlind TD, Puma JLL, Stull TL (1995). Universal approach to bacterial molecular epidemiology by polymerase chain reaction ribotyping. *J Infect Dis* **171**, 204-8.
54. Krankenhaushygiene - Europaweite Standards noch Zukunftsmusik? (1996). *Dt Ärztebl* **21**, B1089-91.
55. Kresken M, Hafner D, Witte W, Reinert RR (1999). Resistenzentwicklung bei Staphylokokken und anderen grampositiven Erregern gegenüber Chemotherapeutika im mitteleuropäischen Raum. *Chemother J* **4**, 136-49.
56. Lacey RW (1987). Multi-resistant *Staphylococcus aureus* - a suitable case for inactivity?. *J Hosp Infect* **9**, 103-5.

57. Lenz W (1991). Die Staphylokokken-Lysotypie als epidemiologisches Werkzeug. *Hyg Med* **16**, 197-14.
58. Lenz W, Brandis H (1985). Die Bedeutung der Lysotypie bei Krankenhausinfektionen durch *Staphylococcus aureus*. *Hyg Med* **10**, 227-38.
59. Lenz W, Eilers E, Lehmacher U (1988). Charakterisierung von 1974 bis 1983 in der Bundesrepublik Deutschland isolierten Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Lysotypie. *Zbl Bakt* **268**, 277-93.
60. Madiraju MVVS, Brunner DP, Wilkinson BJ (1987). Effects of temperature, NaCl, and methicillin on penicillin-binding proteins, growth, peptidoglycan synthesis, and autolysis in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **31**, 1727-33.
61. Maidhof H, Reinicke B, Blümel P, Berger-Bächi B, Labischinski H (1991). *femA*, which encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affects glycine content of peptidoglycan on methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J Bacteriol* **173**, 3507-13.
62. Martone WJ, Jarvis WR, Culver DH, Haley RW (1992). Incidence and nature of endemic and epidemic nosocomial infections. In: *Hospital infections*. Bennett JV, Brachman PS, eds. Little, Brown and Co., Boston, USA, 3rd ed., 577-96.
63. Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD (1993). Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis* **17**, 153-64.
64. Mason EO, Jr., Lamberth LB, Kaplan SL (1996). *In vitro* activities of oxazolidinones U-100592 and U-100766 against penicillin-resistant and cephalosporin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 1039-40.
65. Mauff G (1994). Epidemiologie übertragbarer Krankheiten. In: *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*. Brandis H, Eggers HJ, Köhler W, Pulverer G, Eds., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 7. Auflage, 48-63.
66. Mitsuyama J, Yamada H, Maehana J, Fukuda Y, Kurose S, Minami S, Todo Y, Wanatabe Y, Narita H (1997). Characteristics of quinolone-induced small colony variants in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **39**, 697-705.
67. Muder RR, Brennen C, Wagener M (1991). Methicillin-resistant staphylococcal colonization and infection in a long-term care facility. *Ann Intern Med* **114**, 107-12.
68. Mulazimoglu L, Drenning SD, Yu VL (1996). *In vitro* activities of two novel oxazolidinones (U100592 and U100766), a new fluoroquinolone (trovafloxacin), and dalfopristin-quinupristin

against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 2428-30.

69. Mulligan ME, Murray KA, Ripner BS, Standifort HC, John JF, Corvick JA, Kaufmann CA, Yu VL (1993). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: A consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. *Am J Med* **94**, 313-28.
70. Murakami K, Nomura K, Doi M, Yoshida T (1987). Production of low-affinity penicillin-binding protein by low- and high-resistance groups of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **31**, 1307-11.
71. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1990). *Antimicrobial disk susceptibility tests*. Approved Standard M2-A4. 4th ed. NCCLS, Villanova, PA.
72. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1993). *Methods for Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*. Approved Standard M7-A3. 3rd ed. NCCLS, Villanova, PA.
73. Nishi JI, Miyanojima H, Nakajima T, Kitajima I, Yoshinaga M, Maruyama I, Miyata K (1995). Molecular typing of the methicillin resistance determinant (mec) of clinical strains of *Staphylococcus aureus* based on mec hypervariable region length polymorphisms. *J Lab Clin Med* **125**, 29-35.
74. Noble WC, Virani Z, Cree R (1992). Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **93**, 195-8.
75. Ogston A (1881). Report upon microorganisms in surgical diseases. *Br Med J* **1**: 369-75.
76. Panlilio A, Culver DH, Gaynes RP, Banerjee S, Henderson TS, Tolson JS, Martone WLJ (1992). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991. *Infect Control Hosp Epidemiol* **13**, 582-6.
77. Parker MT, Hewitt JH (1970). Methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **i**: 800-4.
78. Penner GA, Bush A, Wise R, Domir L, Kasha K, Loarche A, Scolis G, Molnar SJ, Fedak G (1993). Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods Applic* **2**, 341-5.
79. Peters G, Pulverer G (1994). Die Familie der Micrococcaceae. In: *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*. Brandis H, Eggers HJ, Köhler W, Pulverer G, Eds. Gustav Fischer Verlag, 7. Auflage, 350-60.
80. Phonimdaeng P, O'Reilly M, Nowlan P, Bramley AJ, Foster TJ (1990). The coagulase of *Staphylococcus aureus* 8325-4. Sequence analysis and virulence of site-specific coagulase-deficient mutants. *Mol Microbiol* **4**, 393-404.

- 81.Ploy MC, Grqlaud C, Martin C, de Lumley L, Denis F (1998). First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital [letter; comment]. *Lancet* **351**, 1212.
- 82.Protier H (1990). A multicentre, open, clinical trial of a new intravenous formulation of fusidic acid in severe staphylococcal infection. *J Antimicrob Chemother* **25** Suppl B, 39-44.
- 83.Pulverer G (1993). Staphylokokken-Keimträger als Dauerausscheider. *Zbl Hyg* **194**, 144-51.
- 84.Ranelli DM, Jones CL, Johns MB, Mussey GJ, Khan SA (1985). Molecular cloning of staphylococcal enterotoxin B gene in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 5850-4.
- 85.Rolinson GN, Stevens S (1961). Microbiological studies on a new broad-spectrum penicillin "penbritin". *Brit Med J* **2**, 191-6.
- 86.Römling U, Fislage R, Tümmler B (1995). Theorie und Anwendung der Makrorestriktionsanalyse für die klonale Analyse von Erregern. *Immun Infekt* **23**, 4-8.
- 87.Rosenbach FJ (1884). Mikro-Organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. Wiesbaden. JF Bergmann`s Verlag.
- 88.Rossney AS, Coleman DC, Keane CT (1994). Antibigram-resistogram typing scheme for methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* **41**, 430-40.
- 89.Rountree PM, Vickery AM (1973). Further observations on methicillin-resistant staphylococci. *Med J Aust* **1**: 1030-4.
- 90.Ryffel C, Tesch W, Birch-Machin I, Reynolds E, Barberis-Maino L, Kayser FH, Berger-Bächi B (1990). Sequence comparison of *mecA* genes isolated from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, bases 1-2322. Eintrag in die Genbank.
- 91.Sanford MD, Widmar AF, Bale MJ, Jones RN, Wenzel RP (1994). Efficient detection and long-term persistence of the carriage of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* **19**, 1123-8.
- 92.Saulnier P, Bourneix C, Prevost G, Andremont A (1993). Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **31**, 982-5.
- 93.Schmitz FJ, Jones ME (1997). Antibiotics for treatment of infections caused by MRSA and elimination of MRSA carriage. What are the choices? *Int J Antimicrob Agents* **9**, 1-19.
- 94.Schmitz FJ, Geisel R, Wagner S, Heinz HP, Idel H, Hadding U (1995). Standardisierte Pulsfeld-Gel-Elektrophorese mit dem GenePath Strain Typing System zum DNA-Fingerprinting bei nosokomialen Infektionen. *Lab Med* **19**, 512-22.
- 95.Schmitz FJ, Geisel R, Wagner S, Lenz W, Kamla V, Heinz HP, Idel H, Hadding U (1996).

- Typisierung, Resistenzverhalten und Häufigkeit Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*-Stämme einer chirurgischen Intensivstation. *Zbl Hyg* **198**, 355-80.
- 96.Schmitz FJ, Hofmann B, Finken-Eigen M, Idel H, Hadding U, Heinz, HP, Köhrer K (1996). Etablierung einer Multiplex-PCR mit Aussagen zur Taxonomie, Pathogenität und Methicillin-Resistenz bei Staphylokokken. *J Lab Med* **20**, 543-50.
- 97.Schmitz FJ, MacKenzie C, Hofmann B, Finken-Eigen M, Verhoef J, Hadding U, Heinz HP, Köhrer K (1997). Specific information concerning taxonomy, pathogenicity and methicillin resistance of staphylococci obtained by a multiplex PCR. *J Med Microbiol* **46**, 773-8.
- 98.Schmitz FJ, MacKenzie CR, Geisel R, Wagner S, Idel H, Verhoef J, Hadding U., Heinz HP (1997). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains in the greater Düsseldorf area. *Eur J Epidemiol* **13**, 709-17.
- 99.Schmitz FJ, Steiert M, Tichy HV, Verhoef J, Heinz HP, Köhrer K, Jones ME (1998). Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Düsseldorf by six genotypic methods. *J Med Microbiol* **47**, 341-51.
- 100.Schmitz FJ, Verhoef J, Idel H, Hadding U, Heinz HP, Jones ME (1998). Impact of hygienic measures on the development of methicillin resistance among staphylococci between 1991 and 1996 in a university hospital. *J Hosp Infect* **3**: 237-40.
- 101.Schwarzkopf A, Cuny C, Witte W (1995). Bestimmung der Fragmentmuster der genomischen DNA mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese bei *Staphylococcus aureus* - Ein Vorschlag zur Standardisierung. *Bundesgesundheitsbl* **38**, 215-20.
- 102.Sethi MR (1997). Fully automated microbial characterization and identification for industrial microbiologists. *American laboratory* **5**, 31-35.
- 103.Shanson DC, Kensit JG, Duke R (1976). Outbreak of hospital infection with a strain of *Staphylococcus aureus* resistant to gentamicin and methicillin. *Lancet* **ii**: 1347-8.
- 104.Smith IM, Vickers AB (1960). Natural history of 338 treated and untreated patients with staphylococcal septicaemia (1936-1955). *Lancet* **i**: 1318-22.
- 105.Spangler SK, Jacobs MR, Appelbaum PC (1996). Activities of RPR 106972 (a new oral streptogramin), cefditoren (a new oral cephalosporin), two new oxazolidinones (U-100592 and U-100766), and other oral and parenteral agents against 203 penicillin-susceptible and -resistant pneumococci. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 481-4.
- 106.Tabaqchali S (1997). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: apocalypse now? **Lancet** **350**, 1644-5.
- 107.Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, Hancock G, Hill GA, Hollis R, Jarvis WR, Kreiswirth B, Eisner W, Maslow J, McDougal LK, Miller JM, Mulligan M,

- Pfaller MA (1994). Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **32**, 407-15.
- 108.Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**, 2233-9.
- 109.Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, et al. (1998). Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. *J Clin Microbiol* **36**, 1020-7.
- 110.Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, et al. (1998). Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides [published erratum appears in J Clin Microbiol 1998 Jul;36(7):2167]. *J Clin Microbiol* **36**, 1020-7.
- 111.Thal LA, Zervos MJ (1998). Occurrence and epidemiology of resistance to virginiamycin and streptogramins. *J Antimicrob Chemother* **43**, 171-6.
- 112.Tokue Y, Shoji S, Satoh K, Watanabe A, Motomiya M (1992). Comparison of a polymerase chain reaction assay and a conventional microbiologic method for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 6-9.
- 113.Trautmann M, Ruhnke M, Kresken M, Brauers J, Springsklee M, Marre R (1999). Quinupristin/Dalfopristin (RP 59500, Synercid) Mikrobiologisches und klinisches Profil der ersten parenteralen Substanzkombination aus der Gruppe der Streptogramine. *Chemother J* **1**, 31-42.
- 114.Ubukata K, Nakagami S, Nitta A, Yamane A, Kawakami S, Sugiura M, Konno M (1992). Rapid identification of the *mecA* gene in methicillin-resistant staphylococci by enzymatic detection of polymerase chain reaction products. *J Clin Microbiol* **30**, 1728-33.
- 115.Van Belkum A (1994). DNA fingerprinting of medically important microorganisms by PCR. *Clin Microbiol Rev* **7**, 174-84.
- 116.Van Belkum A, Kluytmans J, Van Leeuwen W, Bax R, Quint W, Peters E, Fluit A et al. (1995). Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* **33**, 1537-47.
- 117.Van Belkum A, Riewerts-Eriksen N, Sijmons M, van Leeuwen W, VandenBergh M, Kluytmans J, Espersen F, Verbrugh H (1996). Are variable repeats in the *spa* gene suitable targets for epidemiological studies of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **15**, 768-9.

- 118.von Eiff C, Peters G (1999). Comparative in-vitro activities of moxifloxacin, trovafloxacin, quinupristin/dalfopristin and linezolid against staphylococci. *J Antimicrob Chemother* **43**, 569-73.
- 119.von Eiff C, Reinert RR, Peters G (1999). Prevalence of antibiotic resistance in staphylococci from patients with bacteremia in German tertiary hospitals. 9th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Berlin, Germany Abstract P881.
- 120.Voss A, Machka K, Lenz W, Milatovic D (1992). Vorkommen, Häufigkeit und Resistenzverhalten von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen in Deutschland. *DMW* **117**, 1907-12.
- 121.Ward TT (1992). Comparison of in vitro adherence of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to human nasal epithelial cells. *J Infect Dis* **166**, 400-4.
- 122.Watanakunakorn C (1985). Effect of inoculum size on in-vitro susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to 18 antimicrobial agents. *Eur J Clin Microbiol* **4**, 68-70.
- 123.Zurenko GE, Ford CW, Hutchinson DK, Brickner SJ, Barbachyn MR (1997). Oxazolidinone antibacterial agents. *Exp Opin Invest Drugs* **3**, 151-8.
- 124.Zurenko GE, Yagi BH, Schaadt RD, Allison JW, Kilburn JO, Glickman SE et al.(1996). *In vitro* activities of U-100592 and U-100766, novel oxazolidinone antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 839-45.

## Abstract

### ***Staphylococcus aureus* in Europa - Epidemiologie, Resistenzverhalten und Typisierung von Martin Kitzrow**

Im Rahmen des EUROPEAN NETWORK FOR ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND EPIDEMIOLOGY (ENARE) haben sich 24 Universitätskliniken aus Europa seit 1997 zusammengeschlossen, um im Rahmen einer longitudinalen Analyse die Epidemiologie und das Resistenzverhalten von wichtigen Krankheitserregern in Europa zu charakterisieren. Die Untersuchungen zu *S. aureus* erfolgten in Düsseldorf. Insgesamt wurden 3052 *S. aureus* Isolate im Rahmen dieser Studie untersucht. Der durchschnittliche Anteil an Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) Isolaten lag bei 25%. Die MRSA-Prävalenz schwankte erheblich zwischen den teilnehmenden Universitätskliniken und entsprechend zwischen den beteiligten Ländern. Die höchsten Raten konnten in Portugal (54%) und Italien (43-58%) beobachtet werden. Die niedrigsten Werte traten in den beteiligten Kliniken in der Schweiz sowie in den Niederlanden auf ( je 2%).

Die MRSA-Prävalenz war am höchsten in *S. aureus* Isolaten aus Trachealsekreten von Patienten mit einer nosokomialen Pneumonie (34,4%), gefolgt von Isolaten aus Blutkulturen (24,8%) und war am niedrigsten in Isolaten, die aus Wundabstrichen stammten (22,4%). Zwischen den einzelnen Abteilungen gab es große Unterschiede hinsichtlich der MRSA-Prävalenz. Während der MRSA-Anteil in der Inneren Medizin bei 33% lag, betrug dieser Anteil auf den Intensiv-Stationen 27% und in den chirurgischen Stationen nur 13%. Die relative Verteilung der Methicillin-sensiblen *S. aureus* (MSSA) und MRSA Anteile in den verschiedenen Altersgruppen war vergleichbar.

Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Resistenz gegenüber Methicillin und den Resistenzen gegenüber Makroliden, Lincosamiden, Aminoglykosiden, Tetrazyklinen, Fluorochinolonen, Rifampicin und Chloramphenicol.

Der Prozentsatz der Erythromycin-empfindlichen MSSA (77,5%) war um ca. das achtfache höher verglichen mit den Werten für die MRSA Isolate (9,8%). 88% der Erythromycin-resistenten MRSA, aber lediglich 37% der MSSA wiesen einen konstitutiven MLS<sub>B</sub> Resistenz-Phänotyp auf, d.h. die Isolate sind konstitutiv resistent gegenüber Makroliden, Lincosamiden und Streptogramin B-Substanzen. Die restlichen Erythromycin-resistenten *S. aureus* Isolate waren induzierbar MLS<sub>B</sub> resistent. Während nur 22,8% aller MRSA Isolate empfindlich gegenüber dem Aminoglykosid Gentamicin waren, lag dieser Anteil um mehr als das vierfache höher bei den MSSA-Isolaten (94,6%). Der Anteil der 'high-level' Gentamicin-resistenten Isolate (Minimale Hemm-Konzentration (MHK) > 500 mg/l) und der 'high-level' Streptomycin-resistenten MSSA Isolaten (MHK > 1000 mg/l) lag mit 0,2% bzw. 1,5% signifikant niedriger als in den MRSA Isolaten (1,6% bzw. 47,0%). Die Empfindlichkeit gegenüber Tetrazyklinen fiel von 89,7% für MSSA auf 42,9% bei MRSA Isolaten, wobei dieser Abfall deutlich niedriger ausfiel bei Betrachtung der Werte für die strukturell nahe verwandten Substanzen Minozyklin und Doxzyzyklin, gegenüber denen jeweils ca. 90% der MRSA in-vitro empfindlich waren. Während 90,6% aller MSSA gegenüber Ciprofloxacin sensibel waren, lag dieser Anteil bei den MRSA lediglich bei 9,2%. Während 99,5% der MSSA empfindlich gegenüber der Streptograminkombination Quinupristin/Dalfopristin (Q-D) waren, sank dieser Wert auf 95,3% in MRSA. Insgesamt wiesen 27 der 3052 *S. aureus* Isolates (0,9%) einen MHK-Wert von  $\geq 4$  mg/l auf und waren damit resistent gegenüber Q-D. Das experimentelle Oxazolodionin Linezolid wies jeweils MHK<sub>50/90</sub>-Werte von 2/2 mg/l für MSSA und MRSA auf. Vancomycin, als ein Vertreter der Glykopeptide, war das einzige zugelassene Medikament, gegenüber dem keine Resistenzen beobachtet werden konnte. Ein MRSA-Isolat war resistent gegenüber Teicoplanin, ein weiteres wies eine intermediäre Empfindlichkeit auf. Während nur 2% der MSSA multi-resistent waren, d. h. sie zeigten Resistenzen gegenüber mindestens fünf oder mehr Antibiotikaklassen, lag dieser Anteil bei den MRSA bei 87%. Nur 3% aller MRSA waren ausschließlich resistent gegenüber Betalaktam- Antibiotika.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei moderne genotypische Verfahren, die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) und die Ribotypisierung, verglichen, um den Stellenwert der einzelnen Verfahren zur MRSA-Typisierung beurteilen zu können. Darüberhinaus sollte die überregionale Verbreitung von MRSA-Typen in Europa charakterisiert werden.

Um die Struktur der europäischen MRSA Population näher zu untersuchen, wurden die ersten 370 MRSA Isolate, in denen das *mecA*-Gen mittels Multiplex-PCR nachweisbar war, mit Hilfe der PFGE untersucht. Basierend auf einem 90% "similarity index", konnten 77 unterschiedliche PFGE Typen nachgewiesen werden, welche die genetische Diversität innerhalb der MRSA Isolate eindrucksvoll verdeutlichen. Um die Verwandtschaft zwischen den einzelnen MRSA-Typen exakter zu analysieren, wurde neben der PFGE die Ribotypisierung eingesetzt. Verglichen mit den 77 unterschiedlichen PFGE-Typen konnten wir bei der Typisierung der 370 MRSA-Isolate nur 17 verschiedene Ribotypen nachweisen. Die Ribotypisierung weist also ein deutlich schlechteres Diskriminationsvermögen auf. Parallel zu den PFGE-Typisierungsergebnissen ließen sich vier große Ribotypen unterscheiden. Zu diesen 4 großen Ribotypen gehörten 355 MRSA-Isolate. Die restlichen 15 nicht-epidemischen Isolate ließen sich noch 13 unterschiedlichen Ribotypen zuordnen. Die vier großen Ribotypen passten exakt zu vier großen PFGE-Typen. Somit ließen sich in der europäischen MRSA Kollektion vier epidemische MRSA-Typen charakterisieren, die disseminiert in Europa auftraten. Jeder der vier großen MRSA-Typen ist durch ein spezifisches Resistenzprofil charakterisiert. Es zeigte sich eine hohe Korrelation zwischen einer gesteigerten Resistenz und einer weiten, epidemischen Ausbreitung. Während resistentere Isolate disseminiert über Europa isoliert werden konnten, blieben empfindlichere Isolate beschränkt auf einige Patienten in einzelnen Krankenhäusern.

## Lebenslauf

Name: Martin Herbert Kitzrow

Geburtsdatum: 14.01.1970

Geburtsort: Velbert

Familienstand: ledig

Eltern: Agatha Kitzrow, geb. Schlotmann  
Hartmut Kitzrow, Diplom-Betriebswirt

Schulischer Werdegang:

1976 – 1980 Grundschule "Am Baum", Velbert

1980 – 1989 Geschwister-Scholl-Gymnasium, Velbert  
Abitur in den Leistungskursen Biologie und Erdkunde, Latinum

Grundwehrdienst:

1989 – 1990 Grundwehrdienst beim Instandsetzungsbataillon 120 in  
Dülmen

Studium:

Okt. 1990 – Okt. 1990 Studium der Humanmedizin

Okt. 1990 – Okt. 1992 Vorklinischer Studienabschnitt an der Heinrich-Heine-  
Universität, Düsseldorf

Okt. 1992 – Okt. 1997 Klinischer Studienabschnitt an der Heinrich-Heine-Universität ,  
Düsseldorf

Okt. 1997 – Feb. 1998 Praktisches Jahr, chirurgisches Tertial am Chris-Hani-  
Baragwanath-Hospital/Soweto, akademisches  
Lehrkrankenhaus der University of the Witwatersrand,  
Johannesburg, S.A.

Feb. 1998 – Sept. 1998 Praktisches Jahr am Klinikum Remscheid, Akademisches  
Lehrkrankenhaus der Universität Bochum, Wahlfach Neurologie

Sept. 1992 Ärztliche Vorprüfung

März 1994 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Sept. 1997 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Okt. 1998 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang:

Seit Jan. 1999 AIP im Fach Neurologie in den Rheinischen Kliniken Bonn

Bonn, den 10.05.2000