

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer

Adaptation der Screening-PCR für Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) zur Detektion regionaler MRSA-Varianten
- Evaluation neuer Primer

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Miriam Herma

2019

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Birgit Henrich

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Stephan Meller

Für meine Großmutter Radmila Todorov

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Miriam Herma, Sabine Petersdorf, Birgit Henrich, (2017), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Screening PCR adapted to locally emerging variants - Evaluation of novel SCCmec primers. *International Journal of Medical Microbiology*, 307(4): 209–15

Sabine Petersdorf, Miriam Herma, Meike Rosenblatt, Franziska Layer, Birgit Henrich, (2015), A Novel Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type XI Primer for Detection of *mecC*-Harboring Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Screening Specimens. *J Clin Microbiol*, 53(12): 3938–41

Zusammenfassung

Der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) ist ein weltweit verbreiteter Problemkeim. Er verursacht grundsätzlich die gleichen Krankheitsbilder wie der Methicillin-sensible *S. aureus*, jedoch konnte gezeigt werden, dass sowohl Morbidität als auch Mortalität bei MRSA-Trägern und -Infizierten erhöht sind, wodurch zusätzlich höhere Behandlungskosten entstehen. Zur Senkung der MRSA-Prävalenz wurden in vielen Ländern nationale Überwachungsprogramme etabliert. Diese verwenden u.a. molekularbiologische Methoden, wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), zur Reihenuntersuchung von Risikopatienten bei Krankenhausaufnahme, um bei MRSA-Trägern frühzeitig Maßnahmen zur Prävention einer Transmission ergreifen zu können. Im Jahr 2004 beschrieben Huletsky et al. eine innovative MRSA-Screening-PCR, welche sich durch die Amplifikation der *SCCmec-orfX-junction* auszeichnete und erstmals für die Testung von polymikrobiellem Material geeignet war. Dieses PCR-Verfahren wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Jahr 2006 eingeführt. Im Laufe der Zeit verschlechterte sich die Sensitivität dieser PCR jedoch aufgrund einer zunehmenden Anzahl an neuen MRSA-Varianten.

Das Ziel dieser Arbeit lag darin, den Nutzen von 17 neuen MRSA-Primern, die von van der Zee et al. 2011 publiziert worden waren, für den Nachweis der neuen MRSA-Varianten aus dem Großraum Düsseldorf zu untersuchen und eine erweiterte MRSA-Screening-PCR mit verbesserter Sensitivität zu etablieren. Hierzu wurden 290 Proben mit falsch-negativem PCR-Ergebnis (aber MRSA-positiver Kultur) und 380 Proben der Routinediagnostik mithilfe der neuen Primer untersucht. Zusätzlich wurde ein MRSA-Primer entwickelt (Primer FC), welcher den *mecC*-tragenden, neu beschriebenen *SCCmec*-Typ XI detektieren sollte. Der Primer wurde anschließend in die Screening-PCR integriert und diese validiert.

Die Sequenzierung von 179 PCR-Produkten zeigte, dass neun der 17 Primer hiesige MRSA-Varianten detektieren konnten, wobei die vier Primer F13 (n = 76), F11 (n = 6), F14 (n = 15) und F25 (n = 8) bereits für 85,4% (105/123) der Ergebnisse verantwortlich waren und deshalb in die verbesserte MRSA-Screening-PCR integriert wurden. In der Validierung der verbesserten MRSA-Screening-PCR wurden 71 MRSA-Isolate vom *SCCmec*-Typ I-VI, 50 MSSA-Isolate und 100 Abstrichproben getestet. Die Sensitivität konnte von 93% auf 98,6% gesteigert werden, wobei die restlichen Gütekriterien des Tests unbeeinflusst blieben. Ebenso zeigte der neu entwickelte Primer FC innerhalb der Screening-PCR in der Validierung eine Sensitivität und Spezifität von jeweils 100%. BLAST-Analysen ließen vermuten, dass durch die erweiterte PCR die *SCCmec*-Typen I-XI, inklusive CA- und LA-MRSA detektiert werden können.

Diese Arbeit demonstriert ein experimentelles Vorgehen zur Anpassung der MRSA-Screening-PCR an MRSA-Varianten, die neu im Großraum Düsseldorf aufgetreten sind. Sie zeigt somit eine methodische Vorgehensweise auf, mit der die Diagnostik an jedwede Region mit darin vorkommenden MRSA-Varianten angepasst werden kann.

Abstract

Methicillin-resistant *S. aureus* is known to be a worldwide microbial problem. Eventhough it causes the same array of diseases as Methicillin-sensitive *S. aureus*, both morbidity and mortality are increased in MRSA-carriers and in patients with clinical manifestation of an MRSA-infection. As a result, MRSA is a significant contributor to the increase of health-care expenses. In order to keep the spread of MRSA under control, many countries have established national active surveillance programs. Among other actions, these programs use molecularbiological methods like polymerase-chain-reaction (PCR) to screen at-risk patients right when admitted to a hospital. Thus, by quickly identifying MRSA-carriers, preventive measures can be taken to avoid the transmission within the healthcare facility. In 2004, Huletsky et al. described an innovative MRSA-Screening-PCR which featured the amplification of the *SCCmec-orfX-junction* and could be used to test polymicrobial material. This PCR-method has also been implemented at the institute for medical microbiology and hospital hygiene at the Heinrich-Heine-University Düsseldorf in 2006. However, as the number of MRSA-variants increased over time, the sensitivity of the PCR decreased respectively.

The goal of this study was to examine 17 new forward primers, published by van der Zee et al. in 2011, and to evaluate their usefulness for the detection of novel MRSA-variants in the region of Düsseldorf in order to establish an extended Screening-PCR with an increased sensitivity. To achieve that goal, 290 screening-samples with false-negative PCR-results (proven to contain MRSA by microbial culture) and 380 samples out of routine diagnostics were tested using these new primers. Furthermore, a new forward primer has been developed, which was supposed to detect the recently described *mecC*-carrying *SCCmec*-type XI. This primer (FC) was then integrated into the Screening-PCR and validated.

The sequencing of 179 PCR-products showed that 9 out of 17 primers were able to detect local MRSA-variants. The four most frequently used primers were responsible for 85.4% (105/123) of the results (F13 (n = 76), F11 (n = 6), F14 (n = 15) and F25 (n = 8)) and were integrated into the Screening-PCR. For validation, 71 MRSA-isolates (*SCCmec*-Type I-VI), 50 MSSA-isolates und 100 swab samples were tested. We saw an increase in sensitivity from 93% to 98.6%, whereas the other criteria of test quality where unaffected. Besides, both sensitivity and specificity of the newly developed FC primer were at 100% within the Screening-PCR. BLAST-analysis suggested that *SCCmec*-types I-XI can be detected by the supplemented PCR, including CA-MRSA and LA-MRSA.

This work demonstrates an experimental approach of adjusting the MRSA-Screening-PCR to MRSA-variants which newly occurred in the greater area of Düsseldorf. Thereby, it shows a methodological procedure by which diagnostics can be modified according to any regional MRSA-variants.

Abkürzungsverzeichnis

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
CA-MRSA	<i>Community-acquired MRSA</i>
CC	<i>Clonal Complex</i>
ccr	<i>cassette-chromosome-recombinases</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
HA-MRSA	<i>Hospital-acquired MRSA</i>
HGT	Horizontaler Gentransfer
kb	Kilobase
KNS	koagulase-negative Staphylokokken
KRINKO	Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention
LA-MRSA	<i>Livestock-associated MRSA</i>
MGE	Mobiles genetisches Element
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSA_Sc-D	MRSA-Screening Düsseldorf
MRSA_Sc-I	MRSA-Screening I
MRSA_Sc-II	MRSA-Screening II
MRSA_Sc-III	MRSA-Screening III
MSSA	Methicillin-sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>
NPW	Negativ prädiktiver Wert
orfX	<i>open-reading-frame-X</i>
PBP	Penicillin-bindendes Protein
PBP2a oder PBP2'	Penicillin-bindendes Protein 2a oder 2'
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
PPW	Positiv prädiktiver Wert

PVL	Panton-Valentin-Leukozidin
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<i>S. saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
SCC	<i>Staphylococcal-Cassette-Chromosome</i>
SRE	<i>SCCmec right extremity</i>
SSSS	<i>Staphylococcal-Scaled-Skin Syndrome</i>
ST	Sequenztyp
TSS	<i>Toxic Shock Syndrome</i>
TSST-1	<i>Toxic Shock Syndrome Toxin 1</i>
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Vorkommen und Übertragungswege.....	1
1.2	<i>S. aureus</i> -Infektionen	2
1.3	Virulenzfaktoren.....	2
1.4	Therapie von <i>S. aureus</i> -Infektionen	3
1.5	Resistenzentwicklung.....	3
1.6	MRSA - Definition und Problematik	4
1.7	Molekularepidemiologische Untersuchungen.....	5
1.8	<i>Hospital-acquired</i> -, <i>Community-acquired</i> - und <i>Livestock-associated</i> -MRSA	6
1.9	MRSA-Prävalenz in Deutschland und Europa.....	7
1.10	Aktive Surveillance	8
1.11	Screening-Untersuchungen	9
1.12	Ziele der Arbeit	13
2	Methicillin-resistent <i>Staphylococcus aureus</i> Screening PCR adapted to locally emerging variants - Evaluation of novel SCC<i>mec</i> primers. Miriam Herma, Sabine Petersdorf, Birgit Henrich, International Journal of Medical Microbiology, 307(4): 209–15, (2017)	14
3	A Novel Staphylococcal Cassette Chromosome <i>mec</i> Type XI Primer for Detection of <i>mecC</i>-Harboring Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> Directly from Screening Specimens. Sabine Petersdorf, Miriam Herma, Meike Rosenblatt, Franziska Layer, Birgit Henrich, J Clin Microbiol, 53(12): 3938–41, (2015)	15
4	Diskussion	16
4.1	Falsch-positive Ergebnisse und Diskussion der Primerauswahl	18
4.2	Richtig-positive Ergebnisse und <i>mecC</i>	21
4.3	Rückschlüsse auf nachweisbare SCC <i>mec</i> -Typen.....	22
4.4	Diskrepante Ergebnisse zwischen Kultur und PCR	23
4.5	Falsch-negative Screening-Proben.....	24
4.6	Schlussfolgerungen	25
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	26

1 Einleitung

Bei *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) handelt es sich um ein fakultativ-pathogenes, unbewegliches, gram-positives Bakterium. Es bildet keine Sporen und wächst fakultativ anaerob. Es zählt zur Gattung der Staphylokokken (griechisch „Staphyle“ = Traube), welche aufgrund ihrer morphologischen Anlagerung auch als Haufenkokken bezeichnet werden. Erste Beschreibungen von *S. aureus* finden sich von Robert Koch aus dem Jahre 1878 (1). *S. aureus* unterscheidet sich diagnostisch durch die Bildung freier Koagulase von anderen Staphylokokkenspezies, den sogenannten koagulase-negativen Staphylokokken (KNS, z.B. *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*). Die freie Koagulase stellt einen wichtigen Virulenzfaktor dar, welcher an der für *S. aureus* charakteristischen Abszedierung mit Bildung einer Fibrinkapsel beteiligt ist (2). Die Einteilung in koagulase-positive und -negative Spezies ist somit auch von klinischem Interesse, da sich die *S. aureus*-Infektionen in Manifestationsformen und Therapie von Infektionen anderer Staphylokokkenspezies unterscheiden (2,3).

1.1 Vorkommen und Übertragungswege

S. aureus ist ubiquitär und verfügt allgemein über eine hohe Tenazität, welche ein monatelanges Überleben außerhalb des optimalen Wachstumsmilieus ermöglicht. Von klinischer Relevanz sind die Habitate auf Oberflächen (z.B. Tischen und anderen Arbeitsflächen) sowie physiologisch auch auf der Haut und Schleimhaut des Menschen (4). Primäres Reservoir beim Menschen ist der Nasenvorhof, sekundär sind auch der Rachen, die Leiste, die Achseln und das Perineum als häufige Besiedelungsorte zu nennen. Etwa 20% der Bevölkerung sind als sogenannte Träger dauerhaft im Nasenvorhof und/oder Rachen mit *S. aureus* besiedelt, weitere 30% intermittierend (4–6). Diese Kolonisation mit *S. aureus* als Teil der transienten Hautflora ist symptomlos und von einer Infektion abzugrenzen.

Die Transmission von *S. aureus* findet in der Regel über Schmierinfektionen statt. Eine Übertragung über Tröpfchen oder Staub ist möglich, allerdings weitaus seltener. In medizinischen Einrichtungen findet die Übertragung vor allem über die Hände des medizinischen Personals statt, was bei der Wundhygiene schnell zu Infektionen führen kann (3,4).

1.2 *S. aureus*-Infektionen

S. aureus-Infektionen können sowohl ambulant erworben werden als auch nosokomial auftreten und sind vielfältig in ihrer klinischen Erscheinung. *S. aureus*-Infektionen sind opportunistisch: Prädisponierend sind Verletzungen der Hautbarriere oder das Vorliegen einer Immunschwäche, sei es krankheitsbedingt, wie bspw. bei Diabetikern oder iatrogen, wie z.B. bei Patienten unter Chemotherapie. Charakteristisch für *S. aureus*-Infektionen sind (pyogene) Lokalinfectionen. Darunter fallen eine Vielzahl verschiedener Krankheitsbilder wie z.B. Furunkel, Karbunkel, Wundinfektionen, Abszesse, Impetigo contagiosa, Empyeme, Otitis media, Sinusitis, oder auch die Mastitis puerperalis (3).

S. aureus kann jedoch auch systemische Infektionen auslösen wie Pneumonien, Osteomyelitiden, Meningitiden, fremdkörperassoziierte Infektionen, Endokarditiden, sowie allgemein Bakteriämien (3,4).

1.3 Virulenzfaktoren

Die Pathogenität von *S. aureus* ergibt sich aus den wirtsspezifischen Abwehrmechanismen sowie stammspezifischen Virulenzfaktoren. Nicht alle *S. aureus*-Stämme verfügen über die gleiche genetische Ausstattung und haben damit durchaus unterschiedlich pathogenes Potenzial.

Die Virulenzfaktoren von *S. aureus* betreffen im Allgemeinen Adhärenz (z.B. Clumping Factor, Fibronectin), Invasion (u.a. DNase, Hämolyse, Hyaluronidase), Etablierung (Ausbildung einer Fibrinkapsel, u.a. durch Koagulase) und Schädigung im Gewebe (4,7). Die Virulenzfaktoren sind teilweise speziell an das Immunsystem des Menschen angepasst, sodass sie der humanen Immunabwehr entweichen können (Evasion). So bindet z.B. das Protein A an den Fc-Teil von IgG-Antikörpern, was die Opsonisierung des Bakteriums für phagozytierende Zellen verhindert (4). Des Weiteren führt die Fähigkeit zur Ausbildung einer Fibrinkapsel zum Schutz vor weiterer Immunabwehr. Das Panton-Valentin-Leukozidin (PVL) formt eine Pore in menschliche neutrophile Granulozyten und findet sich in *S. aureus*-Stämmen von meist schwer verlaufenden invasiven Infektionen (nekrotisierende Faszitis, nekrotisierende Pneumonie) (2,3,8).

Eine Besonderheit stellen *S. aureus*-Stämme dar, welche die Fähigkeit besitzen, humanpathogene Toxine zu bilden (z.B. Enterotoxine, TSST-1, Exfoliatine) und damit

toxinvermittelte Syndrome auszulösen. Beispielsweise ist eine Vielzahl verschiedener hitzestabiler Enterotoxine bekannt, die beim Menschen bei Aufnahme mit der Nahrung (selbstlimitierende) Lebensmittelvergiftungen auslösen können. Das *Toxic-Shock-Syndrome* (TSS) oder auch das *Staphylococcal-Scaled-Skin Syndrome* (SSSS) sind ebenfalls ausgelöst durch die Fähigkeit einiger Stämme, entsprechende Toxine zu bilden und stellen akut lebensbedrohliche systemische Krankheitsbilder dar (3,7,9,10).

1.4 Therapie von *S. aureus*-Infektionen

Die Therapie von *S. aureus*-Infektionen richtet sich nach Lokalisation sowie nach Schwere der Erkrankung. *S. aureus*-Infektionen sollten primär mit β -Laktamase-festen Penicillinen (Isoxazolyl-Penicillinen, z.B. Oxacillin) behandelt werden. Außerdem ist *S. aureus* in der Regel empfindlich gegenüber weiteren β -Laktam-Antibiotika (Cephalosporine, Carbapeneme) sowie anderen Antibiotikaklassen (Makrolide, Lincosamide, Fosfomycin, Linezolid, Rifampicin, Glykopeptide) (3,11).

Penicilline wirken über das Penicillin-bindende Protein (PBP) der Staphylokokken. Das PBP ist eine Transpeptidase, welche maßgeblich am Aufbau der Zellwand von *S. aureus* beteiligt ist. Das Penicillin bindet irreversibel an das PBP, sodass der Bau der Zellwand unvollendet bleibt und die Zelle abstirbt (bakterizide Wirkung). Hieraus wird deutlich, dass Penicilline ausschließlich auf sich in Teilung befindende Zellen wirken.

1.5 Resistenzentwicklung

Nach Einführung des Penicillins in den 1940er-Jahren entwickelte die Mehrzahl der *S. aureus*-Stämme bereits nach wenigen Jahren Resistenzen gegen die ersten (β -Lactamase-empfindlichen) Penicilline, was sich bis heute kaum verändert hat: ca. 70-80% der *S. aureus*-Stämme sind Penicillin-resistent (3,11,12). Die Resistenz ist durch die erworbene Fähigkeit der β -Lactamase-Bildung bedingt: Die β -Lactamase spaltet den β -Laktam-Ring der Penicilline und macht diese somit unwirksam (3). Die folgende Generation der β -Lactamase-festen Penicilline (z.B. Methicillin, Flucloxacillin) ist gegen diesen Resistenzmechanismus geschützt. *S. aureus* ist in der Regel empfindlich und wird dann auch als Methicillin-sensibler *Staphylococcus aureus* (MSSA) bezeichnet.

Wenige Jahre nach Einführung von Celbenin (frühere Bezeichnung von Methicillin) wurden 1961 erstmals auch Celbenin-resistente *S. aureus*-Isolate beschrieben (13). Dieser später sogenannte „Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*“ (MRSA) hat sich fortan zu einem weltweiten Problemkeim des Gesundheitssystems entwickelt.

1.6 MRSA - Definition und Problematik

Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stämme sind über die Methicillinresistenz definiert, welche über das *mecA*-Gen vermittelt wird. Das *mecA*-Gen kodiert für ein verändertes Penicillin-bindendes Protein, das sogenannte PBP2a oder PBP2', zu welchem nahezu alle β -Lactam-Antibiotika keine Bindungsaffinität mehr besitzen, sodass deren Wirkmechanismus entsprechend aufgehoben ist (3,14,15). Man bezeichnet die Tatsache, dass durch dieses veränderte Penicillin-bindende Protein nicht nur eine Resistenz gegenüber einer einzelnen Substanz entsteht, sondern gegenüber fast allen β -Lactam-Antibiotika, als sogenannte Parallelresistenz (11).

Durch diesen Resistenzmechanismus ergeben sich erhebliche therapeutische und gesundheitsökonomische Nachteile. MRSA-Infektionen zeigen prinzipiell die gleichen klinischen Krankheitsbilder wie MSSA Infektionen, da die Methicillinresistenz die Virulenz von MRSA-Stämmen primär nicht beeinflusst (16,17). Dennoch weisen zahlreichen Studien darauf hin, dass sowohl die Morbidität durch MRSA-Kolonisation als auch die Mortalität durch MRSA-Infektionen im Vergleich zu MSSA-Infektionen erhöht sind (16,18–22). Die Gründe für diesen Sachverhalt sind nicht ausreichend untersucht und können derzeit nur diskutiert werden: Es wird zum Einen angenommen, dass Patienten mit einer MRSA-Infektion häufig nur verzögert durch ein MRSA-wirksames Antibiotikum therapiert werden (16,23). Zum anderen mangelt es den MRSA-wirksamen Antibiotika im Vergleich zu den Beta-Laktamen an gewissen pharmakologischen Eigenschaften (z.B. Gewebegängigkeit), wodurch eine adäquate Therapie von komplexen Infekten erschwert wird (3,16,24). Des Weiteren wird zunehmend auch ein Anstieg der minimalen Hemmkonzentration für das MRSA-wirksame Antibiotikum Vancomycin beobachtet („MIC-creep“) (11) und es gibt mittlerweile zahlreiche MRSA-Stämme, die gegen weitere Antibiotikaklassen resistent sind (Multiresistenz) (4,11). Die therapeutischen Optionen sind daher in vielen Fällen zunehmend eingeschränkt.

Bezüglich der erhöhten Morbidität bei MRSA-Trägern wird angenommen, dass es sich bei dem Großteil der Patienten um ein Kollektiv handelt, welches durch vorhandene Komorbiditäten für *S. aureus*-Infektionen eher prädisponiert ist (18,23) und aufgrund der Komorbiditäten eher invasive Maßnahmen erhält, welche wiederum eine MRSA-Infektion begünstigen (19).

Auch der gesundheitsökonomische Aspekt ist bei der Gegenüberstellung von MRSA und MSSA relevant, denn durch MRSA entstehen deutlich höhere Kosten. Diese ergeben sich unter anderem durch verlängerte Hospitalisierung, welche sowohl MRSA-Träger wie auch MRSA-Infizierte betrifft (17,20,25). Zudem entstehen Kosten durch die Kontaktisolation von MRSA-Patienten. Dies beinhaltet vor allem die Einzelbelegung von Mehrbettzimmern neben den Kosten für entsprechende Schutzmaßnahmen (Schutzkleidung für Personal oder Besucher, deren Entsorgung, etc.) (11,26,27).

In Studien konnte zudem festgestellt werden, dass in den letzten Jahrzehnten die absolute Anzahl an *S. aureus*-Infektionen gestiegen ist. Bedingt ist dies sowohl durch einen Anstieg der MRSA-Infektionen, als auch einen Anstieg der MSSA-Infektionen. Dies widerspricht der Annahme, dass MSSA-Infektionen durch MRSA verdrängt werden (3,20) und zeigt zudem einen weiteren Kostenpunkt auf.

1.7 Molekularepidemiologische Untersuchungen

Zur epidemiologischen Charakterisierung von *S. aureus*-Stämmen wurden verschiedene Methoden entwickelt. Diese dienen unter anderem dazu, die Populationsstruktur genauer zu erschließen sowie anhand der Charakterisierung Rückschlüsse auf Ausbreitungswege und deren Ursachen zu ziehen. Folglich kann mittels geeigneten Ausbruchsmanagements weitere Verbreitung verhindert werden.

In den 1980er-Jahren wurde die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) etabliert, welche sich allerdings als zeit- und arbeitsintensiv erwiesen hat und zwischen verschiedenen Laboratorien eine schlechte Vergleichbarkeit aufwies (12). Als weitere Methode kam das „*Multilocus Sequence Typing*“ (MLST) hinzu. Hierbei werden Teilsequenzen aus sieben verschiedenen *housekeeping*-Genen bestimmt. In der Zusammenschau ergibt sich für jeden Stamm eine einzigartige stammspezifische Kombination, anhand welcher ein

Sequenztyp (ST) festgelegt werden kann (12). Klone, welche in fünf der sieben Gene identisch sind, lassen sich zu sogenannten klonalen Komplexen zusammenfassen (CC).

Eine andere Klassifikation von *S. aureus* lässt sich anhand der *spa*-Typisierung vornehmen, bei der repetitive Sequenzen des *spa*-Gens (kodiert Protein A) typisiert und anschließend mittels Software bestimmten *spa*-Typen zugeordnet werden können (12). In neuerer Zeit kam das „*whole genome sequencing*“ (WGS) als Typisierungsmethode hinzu, durch welche die Populationsstruktur der MRSA-Stämme weltweit Nukleotidgenau erschlossen werden konnte (7). Bisher hat sich gezeigt, dass die Populationsstruktur klonal aufgebaut ist. In den verschiedenen Teilen der Welt haben sich jeweils einzelne Klone durch kompetitive evolutionäre Vorteile durchgesetzt. Diese wenigen dominierenden Klone sind unabhängig voneinander entstanden und genetisch sehr verschieden. Dennoch wird vermutet, dass sie sich jeweils aus einem gemeinsamen MSSA-Vorfahren entwickelten (28).

1.8 Hospital-acquired-, Community-acquired- und Livestock-associated-MRSA

Lange Zeit wurde MRSA hauptsächlich in medizinischen Einrichtungen vorgefunden. Neben diesen „*Hospital-acquired*“ MRSA (HA-MRSA) wurden in den 1990er-Jahren auch sogenannte „*Community-acquired*“ MRSA (CA-MRSA) in der Normalbevölkerung beschrieben. Hierbei handelt es sich epidemiologisch um eine neue MRSA-Variante, welche sich unabhängig von HA-MRSA entwickelt hat (8).

Betroffen von CA-MRSA-Infektionen sind im Gegensatz zu HA-MRSA häufig jüngere, immunkompetente Menschen. Oft kommt es zu invasiven, eitrigen Infektionen, welche dann nicht selten einer Hospitalisierung bedürfen. Diesen invasiven Infektionen liegt oft das Vorhandensein des PVL-Gens zugrunde, welches in CA-MRSA gehäuft vorkommt (8). Ein CA-MRSA wird über den zeitlichen Kontext des Erwerbes definiert (ambulant erworben oder < 48 – 72 Stunden nach Hospitalisierung detektiert) (29).

Etwa 2003 wurden erstmals sogenannte „*Livestock-associated*“ MRSA beschrieben (LA-MRSA; engl. „mit Nutztieren assoziiert“). LA-MRSA kolonisieren im Allgemeinen landwirtschaftliche Nutztiere (insbesondere Schweine) und wurden anfänglich in den Niederlanden, Dänemark, Belgien und in Deutschland detektiert, sind aber mittlerweile

auch in anderen Teilen der Welt zu finden. Im Rahmen einer Studie der European Food Safety Authority zur MRSA-Prävalenz in Betrieben mit Zuchtschweinen (2008) war der MRSA-Klon ST398 mit 92.5% unter den MRSA-Isolaten am weitesten verbreitet. Insgesamt wurde die MRSA-Prävalenz in Schweinezuchtbetrieben für die EU mit 14% angegeben, wobei international deutliche Unterschiede zu verzeichnen waren (30). Insbesondere in Gebieten mit viel Landwirtschaft ist LA-MRSA auch vermehrt in medizinischen Einrichtungen zu finden (31). Relevanz haben diese Stämme für kolonisierte Personen. Dies sind mehrheitlich Personen mit direktem Kontakt zu kolonisierten Tieren (bis zu 86% nasal besiedelt (32)) oder auch zu kontaminierten Bereichen des Betriebes. Die Übertragung auf Familienmitglieder findet Studien zufolge nur zu einem geringen Prozentsatz statt (4,3%) (32). Neben kolonisierten Nutztieren konnte MRSA auch in Fleischproben des Einzelhandels nachgewiesen werden (in Deutschland im Jahr 2014 z.B. in 8,3% der Schweinefleischproben und in 25% der Geflügelfleischproben) (33). Laut der European Food Safety Authority findet sich allerdings keine Evidenz für ein erhöhtes Kolonisations- oder Infektionsrisiko über kontaminiertes Fleisch (34).

Bestimmte klonale Linien (definiert über den Sequenztyp mittels MLST) sind stark mit HA-, CA- und LA-MRSA assoziiert, zum Beispiel ST398 mit LA-MRSA. Jedoch ist eine Kategorisierung der Stämme in HA-, CA- und LA-MRSA anhand des Sequenztypes (mittlerweile) wenig sinnvoll. Dies rührt daher, dass bestimmte Sequenztypen, welche beispielsweise bislang mit CA-MRSA assoziiert waren, durchaus auch nosokomiale Infektionen verursachen und im Krankenhaus etablierte Sequenztypen verdrängen können. Über die Akquisition von Genen sind zudem Wirtswechsel möglich mit relevantem epidemiologischem Einfluss (35). Die Einteilung in HA-, CA- und LA-MRSA ist also eine rein klinisch-epidemiologische Beschreibung, welche für die Diagnostik und die Umsetzung von krankenhaushygienischen Maßnahmen von geringem Interesse ist.

1.9 MRSA-Prävalenz in Deutschland und Europa

Zur MRSA-Prävalenz in der deutschen Normalbevölkerung gibt es bisher keine repräsentativen Zahlen. Eine Studie, in der freiwillige nicht-hospitalisierte Teilnehmer untersucht wurden (n=1878), ergab eine MRSA-Prävalenz von 0,7% 2011/2012 (36).

Einige Punktprävalenzuntersuchungen, die in verschiedenen Krankenhäusern in Deutschland durchgeführt wurden, zeigen einen MRSA-Nachweis in 1,5 - 5,3% der untersuchten Fälle (11). Bei diesen Zahlen ist zu berücksichtigen, dass im Vergleich zur Normalbevölkerung überdurchschnittliche viele MRSA-Risikopatienten im untersuchten Kollektiv eingeschlossen sein dürften.

Zur nationalen und internationalen Vergleichbarkeit wird MRSA in der Regel als prozentualer Anteil von der Gesamtheit der diagnostisch isolierten invasiven *S. aureus* Isolate angegeben. Während der MRSA-Anteil in Deutschland regional variieren kann, wurde er im Jahre 2000 mit durchschnittlich 12,5% angegeben und erreichte 2005 mit 21,4% einen Höhepunkt (37). Seitdem ist tendenziell jährlich ein Rückgang festzustellen: Im Jahr 2016 war der MRSA-Anteil erfreulicherweise bei 11,8% (38). In anderen europäischen Ländern differierte die MRSA-Prävalenz 2016 von 1,2% bis 50,5%, was unter anderem den unterschiedlichen nationalen Präventionsprogrammen zuzuschreiben ist. Insbesondere die Niederlande und die skandinavischen Länder weisen stetig besonders niedrige Zahlen auf (38).

1.10 Aktive Surveillance

Über die letzten Jahrzehnte wurden weltweit verschiedene „aktive Surveillance“-Programme entwickelt und umgesetzt. Diese haben zum Ziel, die Übertragung von MRSA zu verhindern, um die sich aus Kolonisation bzw. Infektion ergebende erhöhte Morbidität und Mortalität einzudämmen. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Mehraufwand, der durch Surveillance-Maßnahmen anfällt, ökonomisch betrachtet langfristig finanzielle Einsparungen birgt, was sich insbesondere durch Verminderung der MRSA-Prävalenz ergibt (39,40). In verschiedenen Studien wurden diese Programme überwiegend als effektiv bewertet (41–45).

In Deutschland wurde dieses Programm als „Empfehlungen zur Prävention und Kontrolle von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen (MRSA) in medizinischen und pflegerischen Einrichtungen“ von der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (zuletzt 2014 aktualisiert) veröffentlicht (11). Diese Empfehlungen beinhalten folgende wesentliche Punkte:

Zum einen wird an Basishygienemaßnahmen appelliert, welche konsequent durchzuführen sind und prinzipiell im Umgang mit allen Patienten gelten (Hände- und Flächendesinfektion, persönliche Schutzausrüstung, Abfallentsorgung, etc.). Der zweite wichtige Aspekt ist die ärztliche Risikoanalyse: Sie bewertet das Transmissions-, Kolonisations- und Infektionsrisiko im Kontext des jeweiligen Patientenguts, der medizinischen Einrichtung bzw. Abteilung, der durchzuführenden Maßnahmen und der Resistenzsituation. Konkret fällt unter diesen Aspekt die Reihenuntersuchung (sogenanntes Screening) von asymptomatischen MRSA-Risikopatienten bei Krankenhausaufnahme. Das Screening hat zum Ziel, den MRSA-Trägerstatus frühzeitig zu ermitteln und dadurch die Transmission im Krankenhaus bei positivem Nachweis durch erweiterte Barrieremaßnahmen und ggf. Dekolonisation des Patienten zu verhindern. Die Barrieremaßnahmen umfassen eine Kontaktisolation der MRSA-Patienten in Einzelzimmern oder eine Kohortierung der MRSA-Patienten in Mehrbettzimmern. Das Betreten dieser Zimmers durch Personal und Besucher sollte darüber hinaus nur mit spezieller Schutzkleidung erfolgen, die anschließend entsorgt wird (11). Die KRINKO empfiehlt weiterhin einen sachgemäßen Einsatz von Antibiotika (11).

1.11 Screening-Untersuchungen

Bei den oben genannten Screening-Untersuchungen wird primär ein Abstrich aus dem Nasen-Rachen-Raum analysiert, welcher gegebenenfalls um einen Abstrich der Leiste und des Perineums erweitert werden kann. In jedem Fall sollten bei Vorliegen von Wunden diese ebenfalls mittels Abstrich untersucht werden (11).

Aus den entnommenen Abstrichen erfolgt die Anlage einer Kultur auf selektiven Bebrütungsmedien, die meist das Antibiotikum Cefoxitin enthalten (46). Dieses Kulturverfahren ist mit 24 - 48 Stunden Dauer bis zum Ergebnis sehr zeitaufwendig. Im Laufe der letzten zwei Jahrzehnte wurden daher verschiedene molekularbiologische Methoden entwickelt, die auf der Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) basieren. Bei dieser Methode wird jeweils ein spezifischer Teil des MRSA-Genoms amplifiziert und damit nachweisbar gemacht (47–52). Diese PCR-Verfahren dauern nur wenige Stunden und liefern somit frühzeitig ein Ergebnis über den MRSA-Trägerstatus. Oben genannte Barrieremaßnahmen können

somit bei positivem Ergebnis entsprechend früh eingeleitet werden. Die Screening-PCRs werden bis dato parallel zur Kultur durchgeführt und zielen im Allgemeinen auf den Nachweis des *mecA*-Gens ab, welches, wie bereits beschrieben, das resistenzvermittelnde Gen darstellt. Das *mecA*-Gen befindet sich auf der sogenannten SCC*mec*-Kassette („*Staphylococcal-Cassette-Chromosome-mec*“). Die SCC*mec*-Kassette stellt neben Plasmiden, Transposons, Bakteriophagen und *S. aureus*-Pathogenitätsinseln, die im *S. aureus*-Genom bisher identifiziert wurden, ein weiteres mobiles genetisches Element (MGE) dar. Mobile genetische Elemente sind unter anderem Träger von Genen für Virulenzfaktoren und Resistenzen und können zwischen einzelnen *S. aureus*-Stämmen über horizontalen Gentransfer (HGT) ausgetauscht und selten sogar auch von anderen Spezies erworben werden (7,53).

Die SCC*mec*-Kassette ist mit 20-60kb verglichen mit anderen MGE relativ groß und wenig von Austausch betroffen (53–55). Allerdings sind die SCC*mec*-Kassetten in ihrem Aufbau und den enthaltenden Genen teilweise sehr verschieden. Derzeit sind von SCC*mec* 11 Haupttypen und verschiedene Subtypen bekannt, welche anhand der Kombination des *mecA*-Gen-Komplexes und des *cassette-chromosome-recombinases* (*ccr*)-Gen-Komplexes sowie weiterer (nicht-obligater) Strukturen, wie z.B. J-Regionen (*joining-region*) klassifiziert werden können (www.sccmec.org) (56). Die verschiedenen SCC*mec*-Typen lassen sich häufig bestimmten Sequenztypen zuordnen, allerdings aufgrund der hohen Variabilität nicht darüber definieren. Beispielsweise korrelieren CA-MRSA häufig mit SCC*mec*-Typ IV oder V (8,12,53).

Einige der ersten MRSA-Screening-PCRs amplifizierten Regionen von zwei verschiedenen Genen: ein *S. aureus*-spezifisches Gen, wie z.B. *nuc* (kodiert für die thermostabile *S. aureus*-spezifische Nuklease) oder *femA* (regulatorisch fungierendes Gen der Expression von *mecA*), und einen Teil des *mecA*-Gens (47–51). Probleme aus diesem Screeningansatz ergaben sich durch den Umstand, dass koagulase-negative Staphylokokken (KNS) ebenfalls das *mecA*-Gen tragen können (57). So waren positive *nuc*-/*femA*- und *mecA*-Nachweise aus Abstrichen, die eine gemischte Flora enthielten (wie z.B. aus dem Nasen-Rachen-Raum), nicht valide: Das *S. aureus*-spezifische Gen konnte in einem Methicillin-sensiblen *S. aureus* vorliegen und das *mecA*-Gen in einem *mecA*-positiven KNS.

Im Jahr 2004 veröffentlichte die Forschungsgruppe unter Huletsky (58) eine *Realtime-PCR*, welche nicht mehr auf das *mecA*-Gen selbst fokussiert, sondern auf die sogenannte „*SCCmec-orfX-junction*“. Dies ist der genetische Bereich, welcher zwischen der *SCCmec*-Kassette (genauer gesagt der *SCCmec right extremity* (SRE)-Region) und dem *S. aureus*-spezifischen Gen *orfX* (*open-reading-frame-X*) liegt (58). Dieser Bereich bietet den Vorteil, dass er spezifisch für MRSA ist, da mit einem einzigen PCR-Produkt sowohl ein Teil der *mecA*-beinhaltenden *SCCmec*-Kassette, als auch ein Teil eines *S. aureus*-spezifischen Gens nachgewiesen werden. Die von Huletsky et al. publizierte PCR setzte sich zusammen aus fünf Forward Primern, die spezifisch für die zu dem Zeitpunkt bekannten unterschiedlichen SRE-Regionen waren, einem Reverse Primer sowie drei verschiedenen fluoreszierenden Sonden, die spezifisch für das *orfX*-Gen waren. Die bei der PCR entstehenden PCR-Produkte wurden mit 196 – 278 bp angegeben (58). Dieses PCR-Verfahren wird weltweit in verschiedenen *in-house* PCRs sowie auch in kommerziell erhältlichen Screening-Kits verwendet (59,60).

Im Jahr 2006 wurde diese MRSA-Screening-PCR mit leichten Abwandlungen am Institut für Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf als *MRSA_Sc-I* eingeführt. Diese PCR zeigte damals eine Sensitivität von 94%, eine Spezifität von 98%, einen positiv prädiktiven Wert (PPW) von 81% und einen negativ prädiktiven Wert (NPW) von 99%. Im Laufe der Jahre fielen durch den Vergleich mit der parallel angesetzten MRSA-Kultur vermehrt falsch-negative Ergebnisse auf: Die *MRSA_Sc-I* blieb negativ bei positivem kulturellen MRSA-Nachweis. Im Jahr 2015 war die Spezifität der *MRSA_Sc-I* mit 98,7% und der NPW mit 99,6% etwa gleich; wohingegen die Sensitivität und der PPW auf 88% bzw. 71% vermindert waren. Diese Feststellung passte zu den zunehmend in der Literatur beschriebenen Fällen, in denen die, teilweise kommerziell erhältlichen, Screening-PCRs vereinzelte MRSA nicht detektierten oder auch zu falsch-positiven Ergebnissen führten (59–63).

Neben vermuteter zunehmender Varianz im Bereich der *SCCmec-orfX-junction* wurde im Jahr 2011 zudem ein *mecA*-Homolog identifiziert, welches ebenfalls zur β -Laktam-Antibiotika-Resistenz führt: das *mecC*-Gen. Es wird ebenfalls auf einer *SCCmec*-Kassette getragen, welche aufgrund der Kombination der enthaltenden Gene als neuer *SCCmec*-Typ XI definiert wurde (64). Derzeit finden sich *mecC*-Gen enthaltende Stämme in Deutschland und anderen europäischen Ländern eher selten (<1% - 2.8%,

(65)), wobei die Prävalenz vermutlich aufgrund von Schwierigkeiten beim molekularbiologischen Nachweis bisher unterschätzt wurde. Dies ergibt sich aus der Tatsache der bis vor Kurzem fehlenden Primer in den gängigen MRSA-Screening-PCRs sowie der fehlenden Möglichkeit eines Nachweises über das *mecA*-Gen. Bisher wurde das *mecC*-Gen vermehrt im Zusammenhang mit Nutztieren und Menschen mit Kontakt zu solchen isoliert und somit gehäuft in Gebieten vorgefunden, in denen vermehrt Nutztierhaltung betrieben wird (64).

Eine weitere Schwierigkeit der MRSA-Screening-PCRs, welche einen Teil der *SCCmec-orfX*-Region amplifizieren, ergeben sich aus der Tatsache, dass es *S. aureus*-Stämme gibt, die zwar über eine SCC-Kassette verfügen, allerdings ohne das *mecA*-Gen oder ein Homolog (SCC, Pseudo-SCC (54)). Diese Stämme werden in der MRSA-Screening-PCR als falsch-positiv identifiziert. Sie sind per Definition als MSSA einzuordnen und werden als „*Drop-Outs*“ bezeichnet.

Im Jahr 2011 publizierten van der Zee et al. 17 neue Forward Primer (66) in Ergänzung zur etablierten MRSA-Screening-PCR von Huletsky et al. (58). Diese neuen Primer wurden anhand von MRSA-Stämmen entwickelt, welche zwar kulturell, jedoch nicht mittels MRSA-Screening-PCR nachweisbar waren. Diese Stämme entstammten Sammlungen verschiedener Laboratorien in den Niederlanden sowie teilweise aus wissenschaftlichen Datenbanken. Insgesamt verfolgte die Arbeitsgruppe von van der Zee das Ziel, die MRSA-Screening-PCR als Diagnostikverfahren mit möglichst hoher Sensitivität und hohem negativ prädiktivem Wert zu verbessern (66).

Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf hat die Durchführung der aufgeführten Arbeit von Herma et al. (67) genehmigt (Studiennummer: 3988).

1.12 Ziele der Arbeit

Die MRSA-Screening-PCR stellt im Rahmen der aktiven Surveillance ein wichtiges diagnostisches Instrument zur Identifizierung von MRSA-Trägern und -Infizierten dar. Folglich können krankenhaushygienische Maßnahmen zur Verhinderung weiterer Verbreitung bei positivem MRSA-Nachweis frühzeitig ergriffen werden.

Am Institut für Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurde die MRSA-Screening-PCR als MRSA_Sc-I im Jahre 2006 eingeführt. Die Sensitivität dieser PCR hat seit der Validierung (2006) im Laufe der Jahre von ca. 94% auf 88% (2015) abgenommen. Diese Beobachtung deckte sich mit wissenschaftlichen Beschreibungen von falsch-negativen Ergebnissen der etablierten Screening-PCRs. Zu Grunde lagen unter anderem genetische Varianten im Bereich der *SCCmec*-Kassette.

Das Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit lag in der Verbesserung der Sensitivität von MRSA_Sc-I. Hierbei wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- 1) Können die 17 neuen Forward Primer, die von van der Zee (66) publiziert wurden, die lokal aufgetretenen MRSA-Varianten im Großraum Düsseldorf detektieren?
- 2) Welche der Forward Primer erscheinen auch im Hinblick auf die anderen Gütekriterien der Screening-PCR (Spezifität, NPW, PPW) sinnvoll und sollten Einklang finden in die verbesserte Screening-PCR?
- 3) Welche Sensitivität lässt sich schlussendlich mit Hilfe der neuen Primerauswahl in der Validierung der verbesserten Screening-PCR erreichen?
- 4) MRSA-Stämme, welche das *mecA*-Homolog *mecC* besitzen kommen Studien zufolge zwar bisher selten vor, jedoch ist aufgrund der diagnostischen Lücke anzunehmen, dass die Dunkelziffer etwas höher liegt. Lässt sich zur Detektion von *mecC*-positiven MRSA-Stämme (*SCCmec*-Typ XI) ein Forward Primer entwickeln, welcher in die MRSA-Screening-PCR integriert werden kann ohne die Detektion der gängigen MRSA-Stämme negativ zu beeinflussen?

- 2 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Screening PCR adapted to locally emerging variants - Evaluation of novel SCCmec primers. Miriam Herma, Sabine Petersdorf, Birgit Henrich, International Journal of Medical Microbiology, 307(4): 209–15, (2017)**

- 3 A Novel Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type XI Primer for Detection of *mecC*-Harboring Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Screening Specimens. Sabine Petersdorf, Miriam Herma, Meike Rosenblatt, Franziska Layer, Birgit Henrich, J Clin Microbiol, 53(12): 3938–41, (2015)**

4 Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Sensitivität der ursprünglichen MRSA-Screening-PCR durch die Analyse der von van der Zee et al. entwickelten Forward Primer und deren selektive Einspeisung deutlich verbessern ließ (67). Hierbei ist anzumerken, dass diese Verbesserungen auf die lokale epidemiologische Situation sowie das deutsche Surveillance-Programm ausgerichtet waren. Die Gründe und Überlegungen hinter dieser aufwändigen Selektion sind im Folgenden näher erläutert.

Die Existenz von Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA) ist heute als ein Resultat des breiten Antibiotikaeinsatzes seit Mitte des 20. Jahrhunderts anzusehen. Durch den fortwährenden Gebrauch wird der Selektionsdruck stetig hoch gehalten, was im Rahmen konstanter Evolution enorme Auswirkungen auf die genetische Diversität von MRSA hat (12,28). Besonderes Augenmerk lag im Rahmen dieser Arbeit auf den zahlreichen Variationen im Bereich der SCCmec-Kassette. Zur Verdeutlichung der Problematik ist zu erwähnen, dass es eine Arbeitsgruppe gibt, welche Leitlinien herausgegeben hat, um die Nomenklatur der vielen beschriebenen Typen, Subtypen und Varianten einzelner Elemente der SCCmec-Kassette zu vereinheitlichen ((56), www.sccmec.org). Die medizinische Diagnostik steht folglich vor der immerwährenden Herausforderung, die genetischen Veränderungen zu identifizieren und ihre molekulargenetischen Methoden entsprechend zu adaptieren, damit weiterhin valide Tests zur Verfügung gestellt werden können.

Im Rahmen der weltweit durchgeführten aktiven Surveillance-Programme konnte die PCR innerhalb der letzten Jahrzehnte als brauchbares Instrument etabliert und integriert werden. Nachdem die PCR-Verfahren anfangs mit Nachweis mehrerer PCR-Produkte zu Schwierigkeiten bei Testung von polymikrobiellem Material (Abstrichen) führten, veröffentlichte die Gruppe unter Huletsky et al. einen innovativen Ansatz mit Amplifizierung der SCCmec-*orfX-junction* und damit eines einzigen und MRSA-spezifischen PCR-Produktes (58). Damals waren fünf SCCmec-Typen bekannt, welche durch fünf (Forward) Primer abgedeckt werden konnten. Heute sind hingegen elf SCCmec-Typen bekannt. Ebenso ist bekannt, dass im Bereich der SCCmec-*orfX-junction* eine große Diversität vorliegt, welche nicht regelhaft mit bestimmten SCCmec-Typen korreliert werden kann (58).

Im Laufe der Zeit schien diese zunehmende Diversität auch mit einer zunehmenden Anzahl an falsch-negativen Ergebnissen in den etablierten *in-house*- und kommerziell erhältlichen Screening-PCRs zu korrelieren. Van der Zee et al. versuchten durch die Entwicklung neuer Primer (66), die PCR-Diagnostik an die neu aufgetretenen MRSA-Varianten anzupassen. Die Arbeitsgruppe wählte den Ansatz, falsch-negativ getestete MRSA-Stämme auf genetischer Ebene zu analysieren und anhand dieser Analyse neue Primer zu entwickeln. Entsprechend dem niederländischen Surveillance-Programm wurden bei van der Zee et al. alle der entwickelten Primer (n = 17) in die Screening-PCR integriert. Das Ergebnis war eine Sensitivität von nahezu 100%. Ein dazu korrelierend schlechterer positiv prädiktiver Wert wurde akzeptiert, da als zusätzliche Sicherheit die parallel angesetzte Kultur nach 24-48 Stunden ein Ergebnis lieferte (66).

Für die Umsetzung der niederländischen aktiven Surveillance (strikt risikoadaptiertes MRSA-Screening (68)) stellte dieses Vorgehen einen erfolgreichen Ansatz dar. Die Gütekriterien der Screening-PCR von van der Zee et al. sind somit in den Gesamtkontext mit der Struktur des niederländischen Gesundheitssystems als auch mit der hervorzuhebenden enorm niedrigen MRSA-Prävalenz von <1.5% (37) zu setzen. Unter gesundheitsökonomischen Aspekten wäre beispielsweise ein falsch-positives Ergebnis der Screening-PCR, welches eine kurze (formal nicht indizierte) Kontaktisolation des Patienten zur Folge hätte, aufgrund der niedrigen Prävalenz kaum relevant. Bei Durchführung des gleichen Vorgehens in einem Land mit einer höheren MRSA-Prävalenz, wie z.B. Deutschland, würden sich jedoch enorme Kosten ergeben, welche vor allem durch die Belegung von Mehrbettzimmern mit nur einem Patienten entstehen würden (27).

Für Deutschland hat die Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention am Robert Koch-Institut (KRINKO) in den „Empfehlungen zur Prävention und Kontrolle von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen (MRSA) in medizinischen und pflegerischen Einrichtungen“ die empfohlenen Maßnahmen formuliert (11). Hiernach sollen Patienten mit definierten Risikofaktoren bei Krankenhausaufnahme auf MRSA untersucht werden. Patienten mit positivem MRSA-Trägerstatus sollen kontaktisoliert werden. In diesem Fall ist der Erhalt eines schnellen Ergebnisses über den MRSA-Trägerstatus wichtig und wird mittels Screening-PCR ermöglicht. Aufgrund der im Vergleich zu den Niederlanden höheren MRSA-Prävalenz ist jedoch auch ein hoher

positiv prädiktiver Wert dieser Screening-PCR erforderlich, um die oben erläuterte, nicht indizierte Kontaktisolation unter gesundheitsökonomischen Aspekten zu vermeiden.

4.1 Falsch-positive Ergebnisse und Diskussion der Primerauswahl

Die oben angedeuteten Unterschiede zwischen den Gütekriterien der Screening-PCR von van der Zee et al. (entspricht MRSA-Screening-PCR MRSA_Sc-II (67)) und der konventionellen PCR nach Huletsky et al. (entspricht MRSA_Sc-I (67)) lassen sich anhand der Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen: Von 367 Screening-Proben (Routine-Diagnostik) wurden 51 Proben (13,9%) positiv in MRSA_Sc-II, hingegen nur 17 (4,6%) in MRSA_Sc-I. Von diesen konnten lediglich 13 Proben mittels kulturellen Nachweises bestätigt werden (67). Diese Diskrepanz zwischen der Anzahl an kulturell nachgewiesenen MRSA und in MRSA_Sc-II positiv getesteten Proben ließ den Verdacht auf eine hohe Anzahl falsch-positiver Ergebnisse aufkommen, wodurch weitere Analysen der PCR-Produkte und schließlich die selektive Auswahl der Primer folgten. Des Weiteren verdeutlicht dies, dass ein hoher negativ prädiktiver Wert (MRSA_Sc-II) deutlich zulasten des positiv prädiktiven Wertes beeinflusst wird.

Die (mutmaßlich falsch-positiven) PCR-Produkte aus MRSA_Sc-II wurden mittels Sequenzierung im Rahmen der Studie genauer analysiert: Hierbei konnte Forward Primer F15 besonders häufig als Ursache für falsch-positive PCR-Ergebnisse identifiziert werden. Dieser Primer führte bei Testung der Abstrichproben gehäuft zu einem positiven Ergebnis, ohne dass aus derselben Probe ein MRSA kulturell bestätigt werden konnte (67). Abseits dieser Analysen konnten drei MSSA-Isolate identifiziert werden, welche in der *mecA*-PCR negativ getestet wurden, aber positiv in MRSA_Sc-II waren. Die Untersuchung der PCR-Produkte ergab hier, dass F15 für diese falsch-positiven Ergebnisse verantwortlich war. Interessanterweise zeigten sich in der BLAST-Analyse dieser PCR-Produkte ausschließlich Homologien zu den Enden der Sequenz des Stammes, welcher von van der Zee et al. zum Primerdesign verwendet worden war (66). Wir vermuten, dass die falsch-positiv getesteten MSSA-Isolate eine Deletion bzw. ein *Drop-out* hatten.

Ein weiterer aus dieser Studie zu beleuchtender Primer ist Forward Primer F20. Dieser führte ebenfalls, ähnlich wie F15, zu einer erhöhten Zahl an falsch-positiven Ergebnissen (67). Interessanterweise zeigte sich dies erst bei der Validierung des erweiterten Screening-Assays (MRSA_Sc-III), wo zwei falsch-positive Ergebnisse bei Testung der MSSA-Isolate auftraten – vorher war lediglich eine Screening-Probe in MRSA_Sc-II positiv bei negativer MRSA-Kultur (67). Die übrigen neun der F20-positiven Proben aus MRSA_Sc-II wurden durch eine positive Kultur bestätigt.

Sichtet man diesbezüglich die wissenschaftliche Literatur, finden sich innerhalb der letzten Jahre vermehrt beschriebene Fälle falsch-positiver Screening-PCR-Ergebnisse bei Amplifikation der *SCCmec-orfX-junction*. Einige dieser *S. aureus*-Stämme wurden genauer untersucht (61–63): Wong et al. beispielsweise hatten in ihren Untersuchungen gezeigt, dass eine Exzision des *mecA*-Gens oder der gesamten *SCCmec*-Region vorliegen kann, jedoch eine residuale *SCC*-Integrationssequenz vorhanden ist, welche durch den verwendeten Forward Primer (in diesem Fall Primer F1) detektiert wurde (63).

Generell lassen sich diese atypischen *SCC(mec)*-Kassetten, jeweils in Abhängigkeit vom fehlenden Gen in *SCC*- (kein *mecA*-Gen), Pseudo-*SCC*- (kein *ccr*-Gen und kein *mecA*-Gen) und Pseudo-*SCCmec*-Elemente (kein *ccr*-Gen) einteilen (54). Erhalten bleibt diesen Elementen stets die Integration in *orfX*. Wie die oben zitierten Studien zeigen, kann dies in falsch-positiven PCR-Ergebnissen resultieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass sich der Forward Primer F15 in unseren Testungen ähnlich dem Forward Primer in den Beschreibungen von Wong et al. (63) verhielt und einen häufig vorkommenden MSSA-Stamm der hiesigen Region amplifizierte, welcher möglicherweise eine atypische *SCC*-Kassette enthält (67). Obwohl die Ergebnisse von van der Zee et al. nahe legen, dass F15 auch MRSA detektieren kann, ist dieser von uns für den Großraum Düsseldorf aufgrund der erhöhten Anzahl an falsch-positiven Ergebnissen zusammenfassend als ungeeignet bewertet worden (67). Die Entscheidung für oder gegen den Forward Primer F20 scheint für die regionale Situation schwieriger, zumal davon ausgegangen werden muss, dass auch korrekte Ergebnisse durch F20 erzielt werden können.

Zur Klärung der genauen Ursache der falsch-positiven PCR-Ergebnisse im Großraum Düsseldorf sind weitere Untersuchungen erforderlich. Beispielsweise ließen sich die

Kolonien auf den parallel angesetzten Agarplatten weitergehend charakterisieren. Wie van der Zee et al. gezeigt hatten, lagen in den analysierten Sequenzen der MRSA-Stämme, welche zum Primerdesign verwendet wurden, nämlich zum Teil auch Homologien zu anderen Staphylokokkenspezies vor (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*) (66). Möglicherweise können diese anderen Spezies innerhalb der untersuchten Proben gefunden und mit den falsch-positiven PCR-Ergebnissen korreliert werden.

Aus den obigen Ausführungen wird deutlich, dass epidemiologisch wenig über die MSSA-Stämme einzelner Regionen bekannt ist. Dies liegt zum einen an dem Umstand, dass sich die mikrobiologische Diagnostik im Rahmen der Screening-Untersuchungen auf den Nachweis von MRSA konzentriert, sei es mittels Kultur oder PCR. Die MSSA-Stämme werden meist kulturell nachgewiesen und molekulargenetisch nicht weiter untersucht. Die routinemäßig durchgeführten epidemiologischen Typisierungen (*spa*-Typisierung etc.) konzentrieren sich ebenfalls auf MRSA-Stämme (obwohl MSSA ebenfalls charakterisierbar wären). Die genetische Diversität von MSSA-Isolaten tritt somit in den Hintergrund, weshalb folglich auch wenig über MSSA-Stämme mit atypischen SCC(*mec*)-Kassetten oder deren Prävalenz bekannt ist. Zum anderen fallen diese Stämme in der Diagnostik nur auf, wenn sich eine Diskrepanz zwischen MRSA-Screening-PCR und Kultur ergibt. Hinzu kommt, dass *S. aureus* ein relativ hohes evolutionäres Potential hat und genetische Varianten durch Akquisition von Genen in relativ rascher Zeit auftreten können.

Ein genereller Aspekt bei der Zusammenstellung und Auswahl der Primer ist die Kosteneffizienz einer PCR. Durch Erhöhung der Primeranzahl steigt der mit der Testung verbundene Arbeitsaufwand. Somit sollte der Nutzen der einzelnen Primer bekannt sein und solche, die womöglich nur in Ausnahmefällen zum Nachweis eines MRSA beitragen, aus der Screening-PCR entfernt werden. Dadurch steigt zwar unter Umständen die Zahl falsch-negativer PCR-Ergebnisse, allerdings ermöglicht in so einem Fall der regelhaft parallele Kulturansatz, einen MRSA nicht zu verpassen - wenn auch zeitlich verzögert. Entsprechend wurden für das zu etablierende MRSA-Screening in Düsseldorf die Primer aus dem Kollektiv von van der Zee et al. entfernt (66), welche im Rahmen unserer Analysen nicht zu einer Amplifikation führten (F7, F8, F9, F12, F16, F21) (67).

4.2 Richtig-positive Ergebnisse und *mecC*

Ein Primer, welcher durch seine hohe Detektionsrate unter den PCR-Produkten auffiel, war Forward Primer F13: Von 88 Screening-Proben (kulturell MRSA bestätigt) wurden 77 (87,5%) durch F13 amplifiziert. Unter den getesteten MRSA-Isolaten waren es 17 von 53 Proben (32,1%) (67).

Vermutlich liegen diesem Umstand mehrere Ursachen zugrunde: Zum einen ergibt sich für F13 ein Vorteil während der Amplifikation, da die PCR-Produkte durch F13 mit 145nt die kleinsten Produktgrößen darstellten. Zum anderen wurde mittels BLAST Analyse festgestellt, dass die F13-Bindungsstelle in insgesamt fünf *SCCmec*-Typen anzutreffen ist (I, II, IV (a, c, q), VI und IX), sodass sich vermuten lässt, dass F13 im Vergleich zu den anderen Primern eine konserviertere Region der *SCCmec-orfX-junction* amplifiziert. Ein eher trivialer Grund für die häufige Benutzung des F13-Primers mag sein, dass F13 einen im Großraum Düsseldorf häufig vorkommenden MRSA-Stamm amplifiziert (67).

Obwohl in dieser Studie 11 von 38 Screening-Proben durch F13 positiv wurden und kulturell nicht bestätigt werden konnten, ergaben die Ergebnisse der *MSSA*-Isolate-Testung in der Validierung der erweiterten Screening-PCR keine Hinweise darauf, dass F13 zu falsch-positiven Ergebnissen führt (67).

Wie in der Einleitung erwähnt, sieht sich die molekularbiologische Diagnostik mittlerweile auch mit *mecA*-Homologen konfrontiert, welche bisher mittels PCR routinemäßig nicht erfasst werden. Hier soll genauer eingegangen werden auf den *SCCmec*-Typ XI, welcher statt des *mecA*-Gens das *mecC*-Gen als resistenzvermittelndes Gen beinhaltet (64). Zwar wurden die *mecC*-positiven Stämme (*SCCmec*-Typ XI) bisher als selten angenommen (65), allerdings ist die Dunkelziffer aufgrund der weitgehend fehlenden molekularbiologischen Methoden zu deren Nachweis vermutlich größer.

In der zweiten hier aufgeführten Arbeit von Petersdorf et al. wurde ein neuer Forward Primer zur Identifikation der *SCCmec-orfX-junction* des *mecC*-tragenden *SCCmec*-Typs XI publiziert (69). Der Primer (FC) konnte erfolgreich in die etablierte *in-house* MRSA-Screening-PCR integriert werden. In den Validierungen ergaben sich keinerlei Hinweise auf die Beeinflussung der Gütekriterien der bestehenden Screening-PCR durch die Addition des Primers (69). Das Vorgehen stellt ein weiteres Beispiel für die effiziente

Anpassung der Diagnostik an die evolutionär bedingten Veränderungen dar. Beschriebene alternative Verfahren zur Detektion *mecC*-positiver Stämme benötigen meist eine vorangehende Isolierung oder kulturelle Anreicherung des Keims, um später eine Sequenz des *mecC*-Gens simultan zu anderen *S. aureus*-spezifischen Genen nachzuweisen (70). Wie bereits erwähnt, kann dies, beispielsweise aufgrund von *mecA*-tragenden koagulase-negativen Staphylokokken zu falschen Rückschlüssen auf das Vorhandensein eines MRSA führen.

4.3 Rückschlüsse auf nachweisbare SCC*mec*-Typen

Die im Rahmen der Studie gewonnenen PCR-Produkte wurden zum Teil mittels Datenbankabgleich genauer analysiert (NCBI Genbank Database). Die Ergebnisse gaben uns Hinweise auf die SCC*mec*-Typen, welche durch das Primerkollektiv erfasst werden könnten. Hervorzuheben ist diesbezüglich Primer F11, welcher neben Homologien zu SCC*mec*-Typ I und II auch Homologien zu SCC*mec*-Typ X aufwies (67). In der Literatur ist SCC*mec*-Typ X häufig mit *livestock-associated* MRSA assoziiert (71), sodass wir davon ausgehen, dass dieser Typ durch F11 mit erfasst werden kann. Ebenso konnte ein durch F25 amplifiziertes MRSA-Isolat identifiziert werden, welches das PVL-Gen trug und Homologien zu SCC*mec*-Typ V zeigte (67). Diese Gen-Kombination ist hinweisend auf das Vorliegen eines CA-MRSA (72).

Analysiert man die Ergebnisse der retrospektiven Untersuchungen dieser Studie (erneute Testung falsch-negativer Proben mit MRSA_Sc-II), lässt sich interessanterweise feststellen, dass vermutlich der Großteil der initial falsch-negativen Proben bereits durch eine kleine Primerauswahl hätte richtig-positiv getestet werden können: Durch die Primeridentifikation innerhalb der PCR-Produkte fiel nämlich auf, dass allein durch die Primer F11, F13, F14 und F25 insgesamt 85,4% der neu richtig-positiven Proben (vorher in MRSA_Sc-I falsch-negativen) als solche getestet werden konnten (67).

Im Zusammenhang mit dem Datenbankabgleich der amplifizierten Sequenzen kann zusammenfassend davon ausgegangen werden, dass durch die abschließende Forward-Primerauswahl (MRSA_Sc-D: F1-5, F11, F13, F14, F25) aufgrund der nachweisbaren Homologien die SCC*mec*-Typen I-X inklusive CA- und LA-MRSA detektiert werden können (67). Durch die Hinzugabe des SCC*mec*-XI- Primers (FC) wird das Spektrum

zusätzlich in Richtung der LA-MRSA verbreitert, da der SCC*mec*-Typ XI vor allem in Zusammenhang mit Nutztieren isoliert wurde (69).

Abschließend ist nochmals zu betonen, dass die Auswahl der Primer sowohl vom jeweiligen Präventionsprogramm und den erforderlichen Gütekriterien der Screening-PCR, als auch von den regionalen Verteilungsmustern der MSSA- beziehungsweise MRSA-Stämme abhängig sein sollte.

4.4 Diskrepante Ergebnisse zwischen Kultur und PCR

Die diskrepanten Ergebnisse zwischen Kultur und PCR gaben Anlass zu dieser Studie. Der Fokus lag insbesondere auf der Verbesserung der Sensitivität durch Verwendung neuer Primer. Dies geschah in der Annahme, dass die neuen Primer die genetischen Varianten unserer Region nachweisen würden.

Zusammenfassend wurde die Mehrzahl (59,8%) der vorselektierten Screening-Proben (in MRSA_Sc-I falsch-negativ getestet aber kulturell nachweisbarer MRSA) durch die neuen Primer positiv (67). Die MRSA-Isolate der weiterhin PCR-negativen Screening-Proben wurden zusätzlich untersucht. In 55/56 Fällen konnte das MRSA-Isolat der ursprünglich falsch-negativen Screening-PCR nachträglich mittels MRSA_Sc-I und/oder MRSA_Sc-II positiv getestet werden (67). Dies lässt vermuten, dass die Primer von MRSA_Sc-I und MRSA_Sc-II die vorliegende genetische Diversität ausreichend abdecken. Eine Erklärung für die falsch-negativen Ergebnisse der initialen Screening-PCR ist möglicherweise eine zu geringe Konzentration von MRSA-DNA im jeweiligen PCR-Ansatz. Dies könnte durch technische Umstände im Rahmen der Probenaufbereitung bedingt sein, welche zwar die PCR beeinflussen, jedoch weniger die kulturelle Identifikation des Erregers (67).

Bei der parallelen Testung der MRSA-Isolate in MRSA_Sc-I und MRSA_Sc-II zeigte sich interessanterweise, dass alle Proben, welche in beiden Screening-PCRs positiv waren, in MRSA_Sc-II in früheren PCR-Zyklen positiv gewesen waren (67). Durch die neuen Primer kann daher von einer besseren Passgenauigkeit ausgegangen werden.

Es ist anzunehmen, dass neben der Optimierung der genetischen Präzision eines Assays gewisse technische Aspekte zur Steigerung der Sensitivität einer PCR beitragen können.

Präanalytische Vorgänge wie Gewinnung, Transport und Aufbereitung des Probenmaterials sollten nicht außer Acht gelassen werden. Bezüglich der Probengewinnung und Handhabung könnte möglicherweise in Zukunft die Verwendung von mSwabs (m = molecular) hilfreich sein, welche eine direkte DNA Extraktion zur Verwendung in der PCR ermöglichen soll (<http://www.copanusa.com/products/collection-transport/mwab/>) (67). Ob dies zur Steigerung der Sensitivität führt, oder dies Einfluss auf den kulturellen MRSA-Nachweis hat, werden weitere Untersuchungen zeigen müssen.

4.5 Falsch-negative Screening-Proben

In dieser Studie konnten insgesamt acht MRSA-Isolate identifiziert werden, welche weder mittels etablierter noch neu entwickelter Primer bei ausreichend hoher DNA-Konzentration positiv getestet werden konnten. Zwei Isolate wurden einer erweiterten Genotypisierung zugeführt. Der eine Stamm (isoliert von einem Kind dessen Herkunftsland im Nahen Osten liegt) konnte als ST834-MRSA-IV identifiziert werden. In der wissenschaftlichen Literatur wurde dieser Sequenztyp in Zusammenhang mit CA-MRSA aus dem Großraum Asien beschrieben (72–74). Der zweite Stamm wurde in der Genotypisierung als CC398-MRSA-V identifiziert, welcher einem LA-MRSA entspricht (30,75). Zusammenfassend ergab die Genotypisierung, dass es sich bei den falsch-negativ getesteten Isolaten vermutlich um atypische und voraussichtlich in Düsseldorf äußert selten vorkommende Stämme handelt, welche genetisch von den hier Üblichen abweichen. Der fehlende Nachweis mittels Screening-PCR unterstreicht hier noch einmal klar die Relevanz der geografischen Unterschiede für die Epidemiologie und Genetik und damit auch für die molekularbiologischen Verfahren.

4.6 Schlussfolgerungen

Die etablierte MRSA-Screening-PCR von Huletsky et al. hatte in der Vergangenheit aufgrund von evolutionär bedingten Veränderungen im Bereich der *SCCmec-orfX-junction* an Sensitivität einbüßen müssen. Das Ziel dieser Arbeit lag in der erneuten Steigerung der Sensitivität der MRSA-Screening-PCR unter Berücksichtigung des deutschen Surveillance-Programmes und dem Aufbau des deutschen Gesundheitssystems. Hierzu wurden die von van der Zee et al. publizierten Primer (66) zunächst auf ihren potentiellen Nutzen im Großraum Düsseldorf untersucht und die sinnvoll erscheinenden Primer anschließend in ein verbessertes Assay integriert (67).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Primer aus der Publikation von van der Zee et al. klar geeignet sind, um variante MRSA-Stämme aus unserer Region zu detektieren. Eine Ergänzung der ursprünglichen MRSA_Sc-I mit den Primern F11, F13, F14 und F25 sowie dem *SCCmec-XI*-Primer FC führte zu einer deutlichen Steigerung der Sensitivität (93% in MRSA_Sc-I vs. 99% in MRSA_Sc-D) ohne die restlichen Gütekriterien der MRSA-Screening-PCR negativ zu beeinflussen (67). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die *SCCmec*-Typen I-XI, inklusive CA- und LA-MRSA detektiert werden können (67).

Diese Arbeit unterstreicht, dass die Primerauswahl zur Verbesserung der Screening-PCR entsprechend dem von der KRINKO empfohlenen Surveillance-Programm und der regionalen genetischen Diversität bzw. der gehäuft vorkommenden Varianten getroffen werden muss. Nur so kann die MRSA-Screening-PCR als sinnvolle diagnostische Maßnahme beibehalten werden.

In den Ausführungen wurde ein mögliches experimentelles Vorgehen aufgezeigt, welches stetig Anpassungen der MRSA-Screening-PCR ermöglicht (67). Dadurch kann mit der andauernden Evolution von *S. aureus* und der daraus resultierenden Zunahme an Varianten Schritt gehalten werden. Außerdem stellt diese Anpassung der MRSA-Screening-PCR ein Instrument dar, mit welchem die Diagnostik weltweit an die jeweiligen lokoregionalen MRSA-Varianten angepasst werden kann.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Kaufmann SHE, Schaible UE. 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. *Trends Microbiol.* 1. Januar 2005;13(10): 469–75.
2. Peetermans M, Verhamme P, Vanassche T. Coagulase Activity by *Staphylococcus aureus*: A Potential Target for Therapy? *Semin Thromb Hemost.* Juni 2015;41(04): 433–44.
3. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* Infections. *N Engl J Med.* 20. August 1998;339(8): 520–32.
4. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, Leeuwen W van, Belkum A van, Verbrugh HA, u. a. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis.* 1. Dezember 2005;5(12): 751–62.
5. Becker K, Schaumburg F, Fegeler C, Friedrich AW, Köck R, Prevalence of Multiresistant Microorganisms PMM Study. *Staphylococcus aureus* from the German general population is highly diverse. *Int J Med Microbiol IJMM.* Januar 2017;307(1): 21–7.
6. van Belkum A, Verkaik NJ, de Vogel CP, Boelens HA, Verveer J, Nouwen JL, u. a. Reclassification of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Types. *J Infect Dis.* 15. Juni 2009;199(12): 1820–6.
7. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, u. a. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet.* 21. April 2001;357(9264): 1225–40.
8. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, u. a. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying Panton-Valentine Leukocidin Genes: Worldwide Emergence. *Emerg Infect Dis.* August 2003;9(8): 978–84.
9. Silversides JA, Lappin E, Ferguson AJ. Staphylococcal Toxic Shock Syndrome: Mechanisms and Management. *Curr Infect Dis Rep.* 1. September 2010;12(5): 392–400.
10. Handler MZ, Schwartz RA. Staphylococcal scalded skin syndrome: diagnosis and management in children and adults. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 1. November 2014;28(11): 1418–23.
11. Commission of Hospital Hygiene and Infection prevention. Empfehlungen zur Prävention und Kontrolle von Methicillinresistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen (MRSA) in medizinischen und pflegerischen Einrichtungen [Internet]. *Bundesgesundheitsblatt* 6/2014; 2014. Verfügbar unter:
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Krankenhaushygiene/Kommission/Downloads/MRSA_Rili.pdf
12. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 1. März 2007;13(3): 222–35.
13. Jevons MP. „Celbenin“ - resistant *Staphylococci*. *Br Med J.* 14. Januar 1961;1(5219): 124–5.

14. Utsui Y, Yokota T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 9. Januar 1985;28(3): 397–403.
15. Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* Mai 1984;158(2): 513–6.
16. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of Mortality Associated with Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 1. Januar 2003;36(1): 53–9.
17. Hershov RC, Khayr WF, Smith NL. A Comparison of Clinical Virulence of Nosocomially Acquired Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Infections in a University Hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.* Oktober 1992;13(10): 587–93.
18. Safdar N, Bradley EA. The Risk of Infection after Nasal Colonization with *Staphylococcus Aureus*. *Am J Med.* April 2008;121(4): 310–5.
19. Huang SS, Hinrichsen VL, Datta R, Spurchise L, Miroshnik I, Nelson K, u. a. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection and Hospitalization in High-Risk Patients in the Year following Detection. *PLoS ONE.* 16. September 2011;6(9): e24340.
20. Köck R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, u. a. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 14. Oktober 2010;15(41): 19688.
21. Datta R, Huang SS. Risk of Infection and Death due to Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* in Long-Term Carriers. *Clin Infect Dis.* 15. Juli 2008;47(2): 176–81.
22. Gastmeier P, Sohr D, Geffers C, Behnke M, Daschner F, Rüden H. Mortality Risk Factors with Nosocomial *Staphylococcus aureus* Infections in Intensive Care Units: Results from the German Nosocomial Infection Surveillance System (KISS). *Infection.* 1. April 2005;33(2): 50–5.
23. Roghmann M-C. Predicting Methicillin Resistance and the Effect of Inadequate Empiric Therapy on Survival in Patients With *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Arch Intern Med.* 10. April 2000;160(7): 1001–4.
24. RKI - Infektionsepidemiologisches Jahrbuch - 2016 [Internet]. [zitiert 23. Mai 2018]. Verfügbar unter:
<https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuecher/2016.html?nn=2374622>
25. Macedo-Viñas M, De Angelis G, Rohner P, Safran E, Stewardson A, Fankhauser C, u. a. Burden of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections at a Swiss University hospital: excess length of stay and costs. *J Hosp Infect.* Juni 2013;84(2): 132–7.
26. Claus F, Sachse A, Ried W. [On the economic burden of MRSA in Germany]. *Gesundheitswesen Bundesverb Ärzte Öffentlichen Gesundheitsdienstes Ger.* Dezember 2014;76(12): 800–6.

27. Herr CEW MD, Heckrodt TH AIP, Hofmann FA AIP, Schnettler R MD, DVM, Eikmann TF MD. Additional Costs for Preventing the Spread of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and a Strategy for Reducing These Costs on a Surgical Ward •. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1. September 2003;24(9): 673–8.
28. Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis*. 1. März 2002;2(3): 180–9.
29. Köck R, Mellmann A, Schaumburg F, Friedrich AW, Kipp F, Becker K. The Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Germany. *Dtsch Ärztebl Int*. November 2011;108(45): 761–7.
30. Analysis of the baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008 - Part A: MRSA prevalence estimates. *EFSA J*. 1. November 2009;7(11): 1376.
31. Köck R, Schaumburg F, Mellmann A, Köksal M, Jurke A, Becker K, u. a. Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as Causes of Human Infection and Colonization in Germany. *PLOS ONE*. 13. Februar 2013;8(2): e55040.
32. Cuny C, Nathaus R, Layer F, Strommenger B, Altmann D, Witte W. Nasal Colonization of Humans with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 with and without Exposure to Pigs. *PLOS ONE*. 27. August 2009;4(8): e6800.
33. M. Hartung, K. Alt, A. Käsbohrer, B.-A. Tenhagen, Bundesinstitut für Risikobewertung. Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2014 [Internet]. [zitiert 28. Mai 2018]. Verfügbar unter: <http://mobil.bfr.bund.de/cm/350/erreger-von-zoonosen-in-deutschland-im-jahr-2014.pdf>
34. Assessment of the Public Health significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. *EFSA J*. 7(3): 993.
35. Bal AM, Coombs GW, Holden MTG, Lindsay JA, Nimmo GR, Tattevin P, u. a. Genomic insights into the emergence and spread of international clones of healthcare-, community- and livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Blurring of the traditional definitions. *J Glob Antimicrob Resist*. 1. September 2016;6: 95–101.
36. Köck R, Werner P, Friedrich AW, Fegeler C, Becker K, Bindewald O, u. a. Persistence of nasal colonization with human pathogenic bacteria and associated antimicrobial resistance in the German general population. *New Microbes New Infect*. 1. Januar 2016;9: 24–34.
37. Data from the ECDC Surveillance Atlas - Antimicrobial resistance [Internet]. European Centre for Disease Prevention and Control. [zitiert 28. Mai 2018]. Verfügbar unter: <http://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/data-ecdc>
38. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2016. 2017.

39. Lee BY, Tsui BY, Bailey RR, Smith KJ, Muder RR, Lewis GJ, u. a. Should Vascular Surgery Patients Be Screened Preoperatively for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*? *Infect Control Hosp Epidemiol.* Dezember 2009;30(12): 1158–65.
40. Rijen MML van, Kluytmans J a. JW. Costs and benefits of the MRSA Search and Destroy policy in a Dutch hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1. Oktober 2009;28(10): 1245–52.
41. Eveillard M, Lancien E, Barnaud G, Hidri N, Gaba S, Benlolo JA, u. a. Impact of screening for MRSA carriers at hospital admission on risk-adjusted indicators according to the imported MRSA colonization pressure. *J Hosp Infect.* März 2005;59(3): 254–8.
42. Lucet J-C, Paoletti X, Lolom I, Paugam-Burtz C, Trouillet J-L, Timsit J-F, u. a. Successful long-term program for controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units. *Intensive Care Med.* 1. August 2005;31(8): 1051–7.
43. Katherine Ellingson P, Robert R. Muder M, Rajiv Jain M FACP, David Kleinbaum P, Pei-Jean I. Feng M, Candace Cunningham R, u. a. Sustained Reduction in the Clinical Incidence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization or Infection Associated with a Multifaceted Infection Control Intervention •. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1. Januar 2011;32(1): 1–8.
44. Reilly JS, Stewart S, Christie P, Allardice GM, Stari T, Matheson A, u. a. Universal screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in acute care: risk factors and outcome from a multicentre study. *J Hosp Infect.* Januar 2012;80(1): 31–5.
45. Huang SS, Yokoe DS, Hinrichsen VL, Spurchise LS, Datta R, Miroshnik I, u. a. Impact of Routine Intensive Care Unit Surveillance Cultures and Resultant Barrier Precautions on Hospital-Wide Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clin Infect Dis.* 15. Oktober 2006;43(8): 971–8.
46. Becker K, Berner R, Eckmann C, Eiff C, Hartinger A, Kempf VAJ, u. a. MIQ 06a: Infektionen der Haut und der subkutanen Weichteile: Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik. 2. Aufl. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2013.
47. Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, Vandercam B, Delmee M, Wauters G, u. a. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 11. Januar 1995;33(11): 2864–7.
48. Fang H, Hedin G. Rapid Screening and Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Clinical Samples by Selective-Broth and Real-Time PCR Assay. *J Clin Microbiol.* 7. Januar 2003;41(7): 2894–9.
49. Jonas D, Speck M, Daschner FD, Grundmann H. Rapid PCR-Based Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Screening Swabs. *J Clin Microbiol.* 5. Januar 2002;40(5): 1821–3.
50. Reischl U, Linde H-J, Metz M, Leppmeier B, Lehn N. Rapid Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Simultaneous Species Confirmation Using Real-Time Fluorescence PCR. *J Clin Microbiol.* 6. Januar 2000;38(6): 2429–33.

51. Francois P, Pittet D, Bento M, Pepey B, Vaudaux P, Lew D, u. a. Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Sterile or Nonsterile Clinical Samples by a New Molecular Assay. *J Clin Microbiol.* 1. Januar 2003;41(1): 254–60.
52. Rossney AS, Herra CM, Brennan GI, Morgan PM, O'Connell B. Evaluation of the Xpert Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Assay Using the GeneXpert Real-Time PCR Platform for Rapid Detection of MRSA from Screening Specimens. *J Clin Microbiol.* 10. Januar 2008;46(10): 3285–90.
53. Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci.* 1. September 2010;67(18): 3057–71.
54. Shore AC, Coleman DC. Staphylococcal cassette chromosome mec: Recent advances and new insights. *Int J Med Microbiol.* 1. August 2013;303(6): 350–9.
55. Lindsay JA. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol.* 1. Februar 2010;300(2): 98–103.
56. Elements (IWG-SCC) IWG on the C of SCC. Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec): Guidelines for Reporting Novel SCCmec Elements. *Antimicrob Agents Chemother.* 12. Januar 2009;53(12): 4961–7.
57. Suzuki E, Hiramatsu K, Yokota T. Survey of methicillin-resistant clinical strains of coagulase-negative staphylococci for mecA gene distribution. *Antimicrob Agents Chemother.* Februar 1992;36(2): 429–34.
58. Huletsky A, Giroux R, Rossbach V, Gagnon M, Vaillancourt M, Bernier M, u. a. New Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Specimens Containing a Mixture of Staphylococci. *J Clin Microbiol.* Mai 2004;42(5): 1875–84.
59. Bartels MD, Boye K, Rohde SM, Larsen AR, Torfs H, Bouchy P, u. a. A Common Variant of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Type IVa in Isolates from Copenhagen, Denmark, Is Not Detected by the BD GeneOhm Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Assay. *J Clin Microbiol.* 5. Januar 2009;47(5): 1524–7.
60. Laurent C, Bogaerts P, Schoevaerds D, Denis O, Deplano A, Swine C, u. a. Evaluation of the Xpert MRSA assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from nares swabs of geriatric hospitalized patients and failure to detect a specific SCCmec type IV variant. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1. August 2010;29(8): 995–1002.
61. Kolman S, Arielly H, Paitan Y. Evaluation of single and double-locus real-time PCR assays for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) surveillance. *BMC Res Notes.* 21. April 2010;3(1): 110.
62. Lindqvist M, Isaksson B, Grub C, Jonassen TØ, Hällgren A. Detection and characterisation of SCCmec remnants in multiresistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* causing a clonal outbreak in a Swedish county. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* Februar 2012;31(2): 141–7.

63. Wong H, Louie L, Lo RYC, Simor AE. Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates with a Partial or Complete Absence of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements. *J Clin Microbiol.* 10. Januar 2010;48(10): 3525–31.
64. García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, u. a. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 1. August 2011;11(8): 595–603.
65. Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 1. Januar 2014;22(1): 42–7.
66. van der Zee A, Roorda L, Hendriks WD, Ossewaarde JM, Buitenwerf J. Detection of novel chromosome-SCCmec variants in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* and their inclusion in PCR based screening. *BMC Res Notes.* 26. Mai 2011;4: 150.
67. Herma M, Petersdorf S, Henrich B. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Screening PCR adapted to locally emerging variants—Evaluation of novel SCCmec primers. *Int J Med Microbiol.* 1. Juni 2017;307(4): 209–15.
68. Werkgroep Infectiepreventie, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu. WIP-Richtlijn MRSA - Ziekenhuizen - RIVM [Internet]. 2012 [zitiert 13. August 2018]. Verfügbar unter: https://www.rivm.nl/Documenten_en_publicaties/Professioneel_Praktisch/Richtlijnen/Infectieziekten/WIP_Richtlijnen/WIP_Richtlijnen/Ziekenhuizen/WIP_richtlijn_MRSA_ZKH/Download/WIP_Richtlijn_MRSA_Ziekenhuizen
69. Petersdorf S, Herma M, Rosenblatt M, Layer F, Henrich B. A Novel Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type XI Primer for Detection of *mecC*-Harboring Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Screening Specimens. *J Clin Microbiol.* 12. Januar 2015;53(12): 3938–41.
70. Nijhuis RHT, Maarseveen NM van, Hannen EJ van, Zwet AA van, Mascini EM. A Rapid and High-Throughput Screening Approach for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Based on the Combination of Two Different Real-Time PCR Assays. *J Clin Microbiol.* 8. Januar 2014;52(8): 2861–7.
71. Li S, Skov RL, Han X, Larsen AR, Larsen J, Sørum M, u. a. Novel Types of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Elements Identified in Clonal Complex 398 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 6. Januar 2011;55(6): 3046–50.
72. Monecke S, Aamot HV, Stieber B, Ruppelt A, Ehrlich R. Characterization of PVL-positive MRSA from Norway. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* Juli 2014;122(7): 580–4.
73. Monecke S, Skakni L, Hasan R, Ruppelt A, Ghazal SS, Hakawi A, u. a. Characterisation of MRSA strains isolated from patients in a hospital in Riyadh, Kingdom of Saudi Arabia. *BMC Microbiol.* 23. Juli 2012;12(1): 146.
74. Nickerson EK, Wuthiekanun V, Kumar V, Amornchai P, Wongdeethai N, Chheng K, u. a. Emergence of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carriage in Children in Cambodia. *Am J Trop Med Hyg.* 2. April 2011;84(2): 313–7.

75. Reischl U, Frick J, Hoermansdorfer S, Melzl H, Bollwein M, Linde HJ, u. a. Single-nucleotide polymorphism in the SCCmec-orfX junction distinguishes between livestock-associated MRSA CC398 and human epidemic MRSA strains. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2009;14(49).

Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Birgit Henrich für die Bereitstellung des spannenden und relevanten Forschungsthemas danken. Durch ihre einfache Erreichbarkeit, rasche Rückmeldung zu jeglichen Problemen und Fragestellungen und die wohlwollende Betreuung meiner Arbeit war ein Fortschritt stets in nützlicher Frist möglich.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. med. Sabine Petersdorf bedanken, welche bei Verfassung des Manuskriptes einen wichtigen Beitrag durch ihre konstruktiven Korrekturen leistete und als Co- und Erstautorin einer Verwendung unserer Publikationen im Rahmen meiner Dissertation zustimmte.

Mein Dank gilt weiterhin Dana Belick sowie Meike Rosenblatt in Stellvertretung für die anderen Mitarbeiterinnen des SP-Labors. Nach der Einführung in die Methodik standen sie im Alltag bei Fragen stets hilfsbereit und motiviert zur Verfügung. Ebenso leisteten sie einen wichtigen Beitrag durch die jahrelange Sammlung der für diese Arbeit so relevanten Proben. Das gleiche gilt für die Mitarbeiterinnen der Krankenhaushygiene.

Bedanken möchte ich mich auch bei Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer, welcher als Institutsleiter die Finanzierung der Forschungsarbeit sowie der Publikation ermöglichte.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Großeltern, welche mir für meinen Bildungsweg die besten erdenklichen Voraussetzungen geschaffen haben und mich auf meinem Weg stets unterstützten. Ich danke auch meinem Bruder Dario, welcher zweifelsfrei immer an mich und meine Erfolge geglaubt hat und damit einer der wichtigsten Motivatoren war.

Zum Schluss möchte ich meinem langjährigen Partner Gian-Luzi danken, welcher mit mir fast von Beginn der Arbeit an durch sämtliche Höhen und Tiefen gegangen ist und mich stets auf vielfältige Weise unterstützt hat.