

GenoType® MRSA

Kombiniertes molekularbiologisches Testsystem zur schnellen Identifizierung multiresistenter Staphylokokken

GenoType® MRSA

Combined molecular biological test system for the rapid identification of multiresistant staphylococci

Performed by DNA-STRIP® Technology

Einleitung

Staphylococcus aureus ist einer der meist isolierten Krankheitserreger aus klinischem Untersuchungsmaterial. Der Keim zählt zu den wichtigsten Auslösern eitriger Infektionen, kann durch die Produktion verschiedener Toxine jedoch auch Enteritiden, das Toxic-Shock-Syndrom oder den Formenkreis des Scaled-Skin-Syndroms hervorrufen. Für die Therapie von *S. aureus*-Infektionen waren lange Zeit β -Lactam-Antibiotika das Mittel der Wahl. In den sechziger Jahren wurde erstmals über das Auftreten Methicillin-resistenter *S. aureus*-Stämme (MRSA) berichtet, seit etwa 15 Jahren wird ihr gehäuftes Vorkommen weltweit beobachtet. In jüngster Zeit nehmen MRSA-

Infektionen dramatisch zu und stellen - besonders in Bezug auf nosokomiale Infektionen - ein schwerwiegendes Problem dar, da sie häufig Parallel-Resistenzen zu weiteren Antibiotikagruppen aufweisen. Auch Koagulase-negative Staphylokokken (KNS), die in Zusammenhang mit invasiven Behandlungstechniken (Herzklappenersatz, Dauerkatheter, Shunts, etc.) von großer Bedeutung sind, zeigen zunehmende Resistenzen gegenüber Methicillin. Die rasche Erkennung von MRSA und MR-KNS, sowie die Abgrenzung von *S. aureus* gegen Koagulase-negative Staphylokokken ist daher essenziell für eine frühzeitige Therapie und ein erfolgreiches Hygienemanagement.

Staphylokokken - ein Steckbrief

Der Genus *Staphylococcus* umfasst Gram-positive Haufenkokken, die physiologisch auf Haut und Schleimhäuten vorkommen. Vertreter dieser Gruppe zeichnen sich durch hohe Widerstandskraft gegen Umwelteinflüsse (Trockenheit, pH-Wert, Desinfektionsmittel) aus, weshalb sie leicht durch Kontakt mit Händen, Instrumenten, etc. übertragen werden können. Innerhalb des Genus lassen sich zwei Gruppen voneinander abgrenzen: der humanpathogene *Staphylococcus aureus* und die Gruppe der normalerweise zur physiologischen Hautflora gehörigen Koagulase-negativen Staphylokokken.

1. *Staphylococcus aureus*

besitzt die stärkste Pathopotenzen der Gattung und gilt als Auslöser eitriger Infektionen sowie Toxin-vermittelter Erkrankungen. Er gehört bei gesunden Personen zur normalen Hautflora und ist vorwiegend in der vorderen Nasennebenhöhle, im Rachen, den Ausgängen der Brustdrüse und auf der Haut (Achselhöhle, Perinealregion, Nacken) anzutreffen. Bei geschwächtem Allgemeinzustand des Patienten (1), nach Verletzung des Gewebes, chirurgischen Eingriffen o.ä. kann er jedoch schwere Infektionen hervorrufen (s. Tab. 1 & 2).

Pyogene und invasive Infektionen

Furunkel, Karbunkel, Abszesse, Pyodermien, Wundinfektionen, Otitis media, Sinusitis, eitrige Parotitis, Mastitis, Pneumonie, Osteomyelitis, Endokarditis, Sepsis

Toxin-vermittelte Erkrankungen

Toxic-Shock-Syndrom (TSS-Toxin-1)
Exfoliative Dermatitis (Exfoliatine A+B)
Lebensmittelintoxikation (Enterotoxine A - E)

Tab. 1 Durch *S. aureus* verursachte Krankheitsbilder

In der sog. SENTRY-Studie (2) wurde *S. aureus* als die weltweit häufigste Ursache von Sepsis, Haut- und Weichteilinfektionen sowie Pneumonien beschrieben. Wachsende Resistenz gegen Methicillin (MRSA) waren dabei vor allem in den USA, Asien und Südeuropa zu

Prädisponierende Faktoren für den Erwerb einer *S. aureus*-Infektion

- Diabetes mellitus
- ekzematöse Hauterkrankungen
- Störung des Phagozytose-Systems (z.B. septische Granulomatose)
- Störung der humoralen Abwehr
- Verbrennungen
- arterielle Verschlusskrankheit mit Ulcus cruris
- Virusinfektionen
- Hormonelle Antikonzeption
- Implantierte Fremdkörper

Tab. 2 Prädisponierende Faktoren für *S. aureus*-Infektionen

verzeichnen. Eine Verbreitung des Organismus ist aufgrund seiner ausgeprägten Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen durch Kontakt relativ leicht möglich.

2. Koagulase-negative Staphylokokken (KNS)

gehören zur physiologischen Flora von Haut- und Schleimhäuten bei Mensch und Tier. *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. saprophyticus* und *S. haemolyticus* sind dabei die üblicherweise beim Menschen am häufigsten vorkommenden Spezies. Während die KNS in früheren Jahren als generell apathogen galten, haben klinische Erfahrungen jüngerer Zeit gezeigt, dass diese Organismen durchaus schwere Infektionsprozesse hervorrufen können (s. Tab. 3). Besonders bei abwehrgeschwächten Patienten sowie bei Früh- und

Introduction

Staphylococcus aureus is one of the most commonly isolated pathogens from clinical specimens. The bacterium is a major cause of suppurative infections and also produces various toxins which cause enteritis, toxic-shock syndrome and the scaled skin syndrome. β -Lactam antibiotics were for a long time the preferred drugs for the treatment of *S. aureus* infections. Methicillin-resistant *S. aureus* strains (MRSA) were firstly reported in the 1960s and have become more prevalent worldwide over the last 15 years. MRSA have recently increased dramatically and are a

serious problem particularly with regard to nosocomial infections since they often have parallel resistances to other groups of antibiotics. Coagulase-negative staphylococci (CNS) which are of major importance in connection with invasive treatments (cardiac valve replacement, indwelling catheters, shunts etc.), are also becoming increasingly resistant to methicillin. Hence a rapid detection of MRSA and MR-CNS and the ability to differentiate *S. aureus* from coagulase-negative staphylococci are essential for an early treatment and successful hygiene management.

Staphylococci - Basic Facts

The genus *Staphylococcus* comprises Gram-positive cluster-forming cocci which occur physiologically on the skin and mucous membranes. Members of this group are characterized by a high resistance to environmental influences (dryness, pH, disinfectants) which is why they can be readily transmitted by hand contact, instruments etc. The genus can be divided into two groups: *Staphylococcus aureus* which is a pathogen of humans and the group of coagulase-negative staphylococci which are usually part of the physiological skin flora.

1. *Staphylococcus aureus*

is the most potent pathogen of the genus and causes suppurative infections as well as toxin-mediated diseases. It is part of the normal skin flora in healthy persons and is mainly found in the anterior nasal sinus, in the throat, the openings of the mammary glands and on the skin (armpit, perineal region, neck). However, it can cause severe infections when the general condition of the patient is weakened (1) and after tissue injury, surgical interventions etc. (see Tab. 1 & 2). In the SENTRY study (2) *S. aureus* is described as worldwide the most frequent cause of sepsis, skin and soft-tissue infections, and pneumonia. An increasing resistance to methicillin

Pyrogenic and invasive infections

furuncles, carbuncles, abscesses, pyodermias, wound infections, otitis media, sinusitis, suppurative parotitis, mastitis, pneumonia, osteomyelitis, endocarditis, sepsis

Toxin-mediated diseases

toxic shock syndrome (TSS-toxin-I)
exfoliative dermatitis (exfoliatins A+B)
food poisoning (enterotoxins A - E)

Tab. 1 Diseases caused by *S. aureus*

(MRSA) was found especially in the USA, Asia and Southern Europe. The organism can be readily disseminated by contact due to its pronounced resistance to environmental influences.

Predisposing factors for acquiring an *S. aureus* infection

- diabetes mellitus
- eczematous skin diseases
- disorders of the phagocytic system (e.g. septic granulomatosis)
- impairment of humoral defence
- burns
- occlusive arterial disease including varicose ulcer
- viral infections
- hormonal contraception
- implanted foreign bodies

Tab. 2 Predisposing factors for *S. aureus* infections

2. Coagulase-negative staphylococci (CNS)

are part of the physiological flora of the skin and mucous membranes of humans and animals. *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. saprophyticus* and *S. haemolyticus* are usually the predominant species in humans. Whereas CNS were previously generally considered to be non-pathogenic, recent clinical experience has shown that these organisms can indeed trigger serious infectious processes (see Tab. 3). They are among the most frequent sepsis pathogens particularly in immunodeficient patients as well as in premature infants and neonates. *S. epidermidis* dominates in infections associated with implanted foreign bodies and intravascular catheters due to its ability to adhere irreversibly to plastic surfaces. Nevertheless a positive test for CNS in clinical specimens must be judged critically since in most

Neugeborenen zählen sie zu den häufigsten Sepsiserregern. Aufgrund seiner Fähigkeit, irreversibel an Plastikoberflächen anzuhafte, dominiert *S. epidermidis* bei den mit implantierten Fremdkörpern und intravasalen Kathetern assoziierten Infektionen. Der Nachweis von KNS in klinischem Untersuchungsmaterial muss dennoch kritisch beurteilt werden, da es sich in der Mehrzahl der Fälle um eine exogene oder endogene Kontamination handelt. Eine diagnostische Abgrenzung von *S. aureus* ist daher unbedingt notwendig. Das Auftreten von Methicillin- oder sogar Multiresistenzen ist bei KNS sogar noch deutlich stärker ausgeprägt als bei *S. aureus*.

Durch KNS ausgelöste Krankheitsbilder

Endokarditis
Osteomyelitis
Bakteriämie, Sepsis
Harnwegsinfekte
Endophthalmitis
Postoperative Wundinfektionen
Otitis media
Toxic-Shock-Syndrom
Beatmungspneumonien
Fremdkörper-assoziierte Infektionen

Tab. 3 KNS-bedingte Krankheitsbilder

MRSA

Staphylococcus aureus-Stämme, die resistent gegen Methicillin bzw. Oxacillin sind (MRSA), nahmen während der letzten 15 Jahre kontinuierlich zu. Die Häufigkeit von MRSA stieg in Deutschland bis Ende 1998 auf 15,2 % an, die SENTRY-Studie (2) wies 25% aller *S.aureus*-Isolate und fast 63% der *S. epidermidis*-Isolate als Methicillinresistent aus.

Methicillin-Resistenz ist auf die Bildung eines zusätzlichen Penicillinbindeproteins (PBP2a) zurückzuführen, welches durch das chromosomale *mecA*-Gen codiert wird (s. Abb.1). Das Resistenzspektrum erstreckt sich in der Regel über alle β -Lactam-Antibiotika und geht oft mit Parallel-Resistenzen gegen andere Antibiotikagruppen einher. Das induzierbare PBP2a liegt zusätzlich zu den vier Haupt-PBPs 1-4 vor und zeichnet sich im Gegensatz zu diesen durch eine geringe Affinität zu β -Lactamen aus. Bei Anwesenheit dieser Antibiotika kann daher das PBP2a die essentielle Funktion der Zellwandsynthese übernehmen und ermöglicht *mecA*-tragenden Zellen das Wachstum unter Methicillin (3, 4).

Der überwiegende Teil der MRSA prägt die Resistenz phänotypisch heterogen aus, d.h. nur eine von 10^4 - 10^8 Zellen zeigt im Sensibilitätstest verminderte Empfind-

lichkeit gegenüber Methicillin, obwohl das genetische Potenzial, also das *mecA*-Gen, vorhanden ist. Der Resistenzlevel hängt dabei von den Wachstumsbedingungen sowie dem eingesetzten β -Lactam ab. Heteroresistenz stellt ein großes Problem für die Diagnostik dar, da Zellen, welche die Resistenz exprimieren, oft nur langsam wachsen und daher mittels herkömmlicher Analysemethoden leicht übersehen werden. Nur ein geringer Teil der *S. aureus*-Isolate zeigt eine homogene Resistenz (3, 4).

Einen weiteren Typ der Methicillin-Resistenz repräsentieren die sog. "borderline-resistenten Stämme" (BORSA). Sie sind durch Methicillin-MHKs (minimale Hemmkonzentration) um oder etwas über dem Breakpoint charakterisiert (MHK für Oxacillin: 4-8 mg/l) und besitzen kein *mecA*-Gen. Die phänotypisch auftretende Resistenz gegen Oxacillin basiert wahrscheinlich auf der Überproduktion einer β -Lactamase. Diese Stämme müssen diagnostisch eindeutig von MRSA abgegrenzt werden, da sie ein völlig anderes Resistenzmuster aufweisen. Die Differenzierung von BORSA gestaltet sich mittels herkömmlicher Methoden meist langwierig und schwierig - als Goldstandard wird der molekularbiologische Nachweis in Kombination mit der phänotypischen Resistenztestung gesehen.

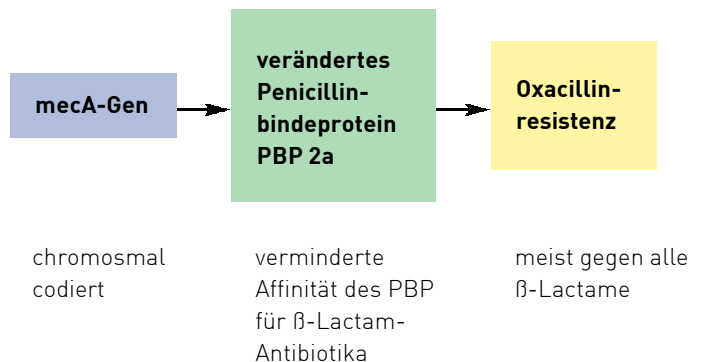


Abb. 1 Strukturelle Grundlage der Methicillin-Resistenz

Warum ist eine rasche und sichere Identifizierung von MRSA so wichtig?

MRSA sind zumeist mehrfachresistent gegen eine Reihe von Antibiotika mit Gram-positivem Wirkspektrum. Sie stellen besonders in Bezug auf nosokomiale Infektionen ein bedeutendes Problem dar, da sie oft nur noch gegen Glykopeptid-Antibiotika ausreichende Sensitivitäten aufweisen. Durch die Zunahme multimorbider Patienten, aufwändiger chirurgischer Eingriffe sowie dem Einsatz prothetischer Plastikmaterialien wird der Ausbreitung Methicillin-resistenter Staphylokokken aufgrund ihres hohen epidemischen Potenzials Vorschub geleistet. In Krankenhäusern stellen infizierte oder kolonisierte Patienten das Hauptreservoir für

cases it is due to exogenous or endogenous contamination. Hence a diagnostic differentiation of CNS from *S. aureus* is absolutely essential. The occurrence of methicillin resistance or even multi-resistances is much more pronounced in CNS compared to *S. aureus*.

Diseases caused by CNS

- endocarditis
- osteomyelitis
- bacteraemia, sepsis
- urinary tract infections
- endophthalmitis
- postoperative wound infections
- otitis media
- toxic-shock syndrome
- respiratory pneumonia
- infections associated with foreign bodies

Tab. 3 Diseases caused by CNS

MRSA

In the last 15 years there has been a continuous increase in *Staphylococcus aureus* strains that are resistant to methicillin and oxacillin (MRSA). The incidence of MRSA increased in Germany until the end of 1998 to 15.2 %; in the SENTRY study (2) 25 % of all *S. aureus* isolates and almost 63 % of the *S. epidermidis* isolates were resistant to methicillin.

Methicillin resistance is due to the formation of an additional penicillin binding protein (PBP2a) which is coded by the chromosomal *mecA* gene (see. Fig. 1). The resistance spectrum usually extends to all β -lactam antibiotics and is often associated with parallel resistances to other antibiotic groups. The inducible PBP2a is present in addition to the four main PBPs 1-4 and is characterized by a low affinity for β -lactams. Hence when these antibiotics are present, PBP2a can take over the essential function of cell wall synthesis and enables *mecA*-carrying cells to grow despite methicillin (3, 4).

In most of the MRSA the resistance is expressed as a heterogeneous phenotype i.e. only one in $10^4 - 10^8$ cells exhibits a reduced sensitivity to methicillin in sensitivity tests although the genetic potential, i.e. the *mecA* gene, is present. The resistance level depends on the growth conditions and on the β -lactam that is used. Heterogeneous resistance is a major problem for diagnosis since cells which express the resistance often only grow slowly and can therefore be easily overlooked by conventional analytical methods. Only a small proportion of the *S. aureus* isolates exhibits a homogenous resistance (3, 4).

Another type of methicillin resistance is that exhibited by the so-called borderline-resistant strains (BORSA). They are characterized by methicillin MICs (minimal inhibitory concentration) at or just above the breakpoint (MIC for oxacillin of 4 - 8 mg/l) and do not have a *mecA* gene. This phenotypic resistance to oxacillin is probably based on the overproduction of a β -lactamase. These strains have to be diagnostically unequivocally differentiated from MRSA since they have a different resistance pattern. Differentiation from BORSA by conventional methods is usually time-consuming and difficult; the molecular biological test combined with phenotypic resistance testing is regarded as the gold standard.

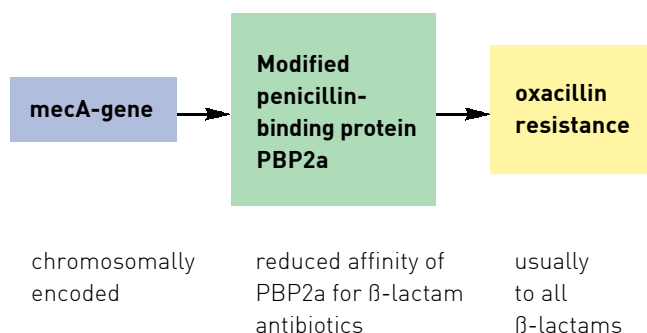


Fig. 1 Structural basis for methicillin resistance

Why is a rapid and reliable identification of MRSA so important?

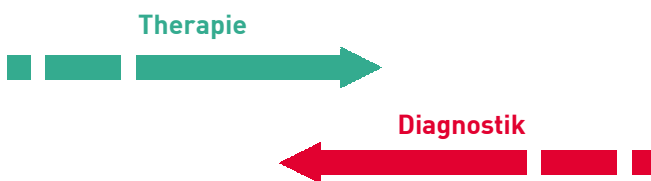
MRSA are usually multiresistant to a number of antibiotics with a grampositive activity spectrum. They are a major problem with regard to nosocomial infections since they are often only sufficiently sensitive to glycopeptide antibiotics. The increase in patients with multimorbidity, elaborate surgical interventions and the use of prosthetic plastic materials has assisted the spread of methicillin-resistant staphylococci due to their high epidemic potential. Infected or colonized patients are the main reservoir for MRSA in hospitals and hospital staff act as carriers. An MRSA infection can spread particularly effectively among patients in intensive care units because of their weakened state of health. MRSA epidemics have already been reported in old people's homes and nursing homes.

MRSA dar, wobei das Krankenhauspersonal als Überträger fungiert. Durch den vor allem bei Patienten auf Intensivstationen geschwächten Allgemeinzustand kann sich eine MRSA-Infektion dort besonders effektiv ausbreiten. Auch aus Alten- oder Pflegeheimen ist bereits von MRSA-Epidemien berichtet worden.

Von 750.000 nosokomialen Infektionen in Deutschland (pro Jahr) sind 14% auf eine Infektion mit MRSA zurückzuführen, auf Intensivstationen sind 30% aller Infektionen S. aureus-bedingt, hiervon sind wiederum 60% MRSA.

Vor allem aufgrund der limitierten Therapiemöglichkeiten und der raschen Übertragung der Keime sind schnelle, wirkungsvolle Therapie- und Hygienemaßnahmen bei MRSA-Infektionen unbedingt erforderlich. Dies sollte zum Wohle der Patienten praktizierte Selbstverständlichkeit in jeder Klinik sein, ist jedoch auch von ökonomischem Interesse. Bei Nachweis einer MRSA-Epidemie sind umfangreiche Hygienemaßnahmen, Personaluntersuchungen, oder -freistellungen zu ihrer Eindämmung nötig, welche einen hohen Kostenaufwand mit sich bringen.

Die Zeit der Diagnostik läuft also gegen die Zeit der Therapie!



Differenzierung von MRSA im Labor

Die Differenzierung von MRSA im diagnostischen Labor beruht auf einer Reihe spezifischer Eigenschaften von Staphylococcus aureus (s. Abb. 2), auf deren Grundlage eine Reihe von kommerziell erhältlichen Nachweis-systemen aufgebaut sind. Im folgenden sollen die gängigsten Methoden kurz dargestellt und verglichen werden:

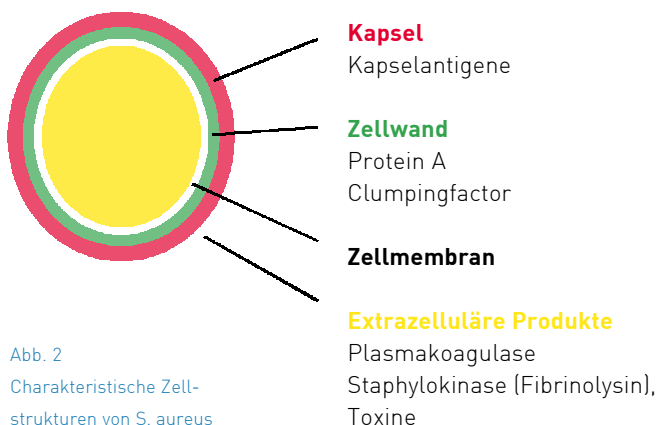


Abb. 2
Charakteristische Zellstrukturen von S. aureus

1. Spezies-Diagnostik

a) Biochemisch

Die biochemischen Tests beruhen auf der Überprüfung charakteristischer, phänotypischer Merkmale des Bakterienstammes wie Zell- und Koloniemorphologie, Hämolyseverhalten auf Blutagar, Wachstum auf Selektivmedien, Nachweis von DNase, Katalase etc. Diese Methoden sind in der Regel recht kostengünstig und einfach durchzuführen, entbehren aber oft der nötigen Spezifität und Sensitivität und sind z.T. recht zeitaufwändig. Eine schnellere Methode stellt die biochemische Differenzierung von Organismen mittels kommerziell erhältlicher sog. "bunter Reihen" dar.

b) Latex-Tests, Röhren-Koagulase

Zur schnellen Abgrenzung von S. aureus gegen KNS wurden Latex-Agglutinations-Tests entwickelt, die heute bereits in der dritten Generation erhältlich sind. Sie basieren auf an Latex-Partikel gebundenen Antikörpern gegen bestimmte Bestandteile der Zelloberfläche und zeigen deren Vorhandensein durch eine Verklumpungsreaktion an. Zunächst wurden Antikörper eingesetzt, welche gegen die zellgebundene Koagulase (Clumping-Faktor) sowie das oberflächenständige Protein A gerichtet waren. Durch die besonders bei KNS und MRSA beobachtete starke Schleimbildung werden Oberflächenantigene jedoch oft maskiert und führen zu falsch-negativen Ergebnissen. Seit kurzer Zeit ist daher eine neue Generation der Latex-Tests verfügbar, welche als weiteren Ansatzpunkt auf Kapselpolysaccharide bzw. gruppenspezifische Oberflächenantigene abzielt. Jüngste Untersuchungen zeigen aber auch für diese Testgeneration falsch-positive Reaktionen bei der Differenzierung von KNS [5, 6]. Die Latex-Tests lassen eine Grobdifferenzierung in S. aureus/KNS recht schnell zu und sind als Screeningmethode weit verbreitet. Als Bestätigungsmethode wird in der Regel ein Verfahren zum Nachweis der extrazellulären Koagulase verwendet, deren Nachteil jedoch in der langen Inkubationsdauer liegt und oft erst am nächsten Tag zu einem Ergebnis führt.

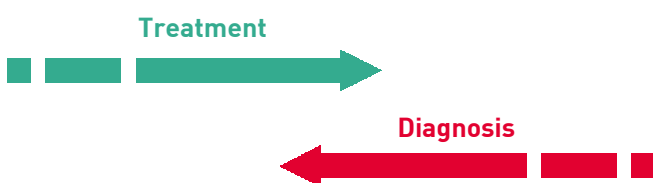
c) Molekularbiologische Tests

Als Goldstandard in der Speziesdiagnostik gilt die Analyse spezifischer DNA-Abschnitte mittels molekularbiologischer Methoden wie der Polymerasekettenreaktion. Solche Methoden bedurften vor der Entwicklung des **GenoType® MRSA** jedoch aufwändiger Gerätschaften sowie der Betreuung durch qualifiziertes Personal.

Of 750,000 nosocomial infections in Germany (per year), 14% are due to an infection with MRSA; in intensive care units 30% of all infections are due to *S. aureus* and 60% thereof are MRSA.

Rapid and effective treatments and sanitary measures are absolutely essential to combat MRSA infections especially in view of the limited number of treatments available and the rapid transmission of the germs. This should be standard practice in every hospital for the welfare of the patients, but is also of economic interest. Once an MRSA epidemic has been detected, extensive sanitary measures and examinations or temporary discharge of staff are necessary to keep it under control causing high economical costs.

Time required for diagnosis reduces the time left for treatment!



Differentiation of MRSA in the Laboratory

The differentiation of MRSA in the diagnostic laboratory is based on a number of specific characteristics of *Staphylococcus aureus* (see Tab. 2) which have been used to develop a series of commercially available test systems. The most common methods are briefly described and compared in the following:

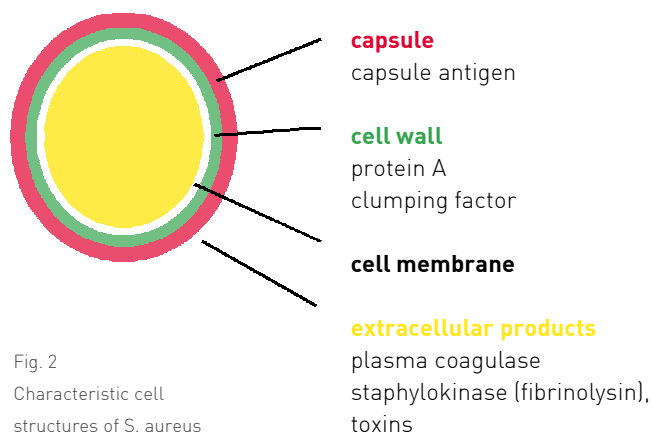


Fig. 2
Characteristic cell structures of *S. aureus*

1. Species Diagnostics

a) Biochemical

The biochemical methods are based on the examination of characteristic phenotypic features of the strain such as cell and colony morphology, haemolysis behaviour on blood agar, growth on selective media, detection of DNase, catalase etc. These methods are usually very cost-effective and simple to carry out, but often lack the required specificity and sensitivity, and some are very time-consuming. A more rapid method is to biochemically differentiate organisms by means of commercially available color tests.

b) Latex tests, tube coagulase test

Latex agglutination tests which are now available in a third generation, were developed in order to rapidly discriminate between *S. aureus* and CNS. They are based on antibodies bound to latex particles which are directed against specific components of the cell surface and indicate their presence by an agglutination reaction. First generation tests used antibodies which were directed against the cell-bound coagulase (clumping factor) and the surface protein A. However, surface antigens are often masked by the large amount of mucous formed particularly by CNS and MRSA which leads to false-negative results. Hence a new generation of latex tests has recently become available which target capsule polysaccharides and group-specific surface antigens as an additional approach. However, recent investigations have also shown false-positive reactions for this test generation when differentiating CNS [5, 6]. The latex tests allow a coarse differentiation between *S. aureus* and CNS which is quite rapid and these are widely used as a screening method. A method for detecting extracellular coagulase is usually used as a confirmation method but has the disadvantage of a long incubation period which means that the result is often only available the next day.

c) Molecular biological tests

The analysis of specific DNA regions by means of molecular biological methods such as the polymerase chain reaction is regarded as the gold standard in species diagnostics. However, until the development of the **GenoType® MRSA** such methods required complicated apparatus and skilled staff.

2. Resistenzbestimmung

a) Kulturelle Resistenzbestimmung

Die Bestimmung des für einen Keim charakteristischen Resistenzmusters erfolgt standardmäßig mittels Agardiffusionstests zur Bestimmung des Hemmhof-durchmessers oder der Mikrodilution zur Bestimmung der MHK (s. Abb 3).

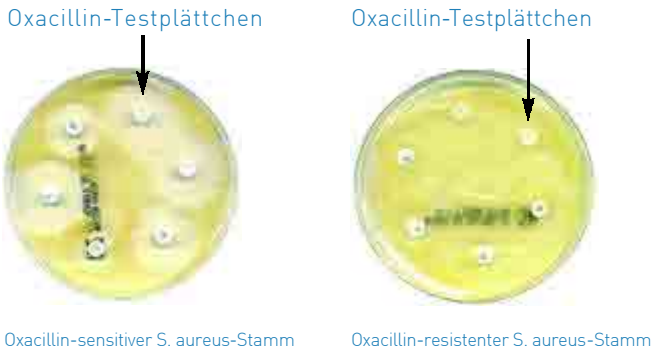


Abb. 3 Resistenzbestimmung mittels Agardiffusionstest

Die Resistenzanalyse nimmt mit herkömmlichen Methoden meist mindestens 12 Stunden in Anspruch und kann bei bestimmten Resistenzphänomenen an ihre Grenzen geraten. Heteroresistente MRSA können oft nur nach verlängerter Inkubationszeit oder dem Einsatz spezieller Techniken (z.B. E-Test) identifiziert werden. Zur Erkennung von BORSA muss dem Wachstumsmedium neben Oxacillin auch ein β -Lactamase-Hemmstoff zugefügt werden. Für die Bestimmung der Methicillin-Resistenz bei KNS änderte die NCCLS kürzlich den Oxacillin-Breakpoint von <4 mg/l auf $<0,5$ mg/l, da der alte Wert mangelnde Sensitivität zeigte und viele mecA-positive KNS nicht als resistent auswies. Der neue Schwellenwert identifiziert nun zwar alle mecA-positiven KNS korrekt, weist jedoch eine mangelnde Spezifität für einige KNS-Stämme ohne mecA auf, so dass eine molekulargenetische Analyse dringend indiziert ist [7].

b) Latex-Tests

Ein neu entwickelter Latex-Test ermöglicht die Erkennung von MRSA durch den Einsatz von an Latex gebundenen Antikörpern gegen das PBP2a. Das Vorhandensein des mecA-Genproduktes wird dabei durch eine Verklumpungsreaktion angezeigt. Dieser Test ist schnell und einfach durchführbar, ist jedoch für KNS nicht validiert und führt hier häufig zu falsch-negativen Ergebnissen [8]. Andere Untersuchungen weisen zudem darauf hin, dass eine vorherige Induktion der Keime durch Anzucht auf Oxacillin-haltigem Medium notwendig ist [9].

c) Molekularbiologische Tests

Referenzmethode für den Nachweis der Oxacillin-Resistenz in Staphylokokken ist die molekulargenetische Analyse des mecA-Gens mittels PCR. Der Agardiffusionstest als gängigste Nachweismethode ist hier aufgrund der heterogenen Resistenzprägung nur lückenhaft [1]. Auch eine Differenzierung von sog. "kryptischen MRSA" und BORSA ist durch den Einsatz von Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT) schneller und sicherer möglich. Die als "in-house-Tests" durchgeführten NAT sind dabei auf Fachlaboratorien mit entsprechender Ausstattung begrenzt.

3. Spezies-Diagnostik und Resistenzbestimmung mit Hilfe des GenoType® MRSA

Ausgehend von der Primärkultur erlaubt der **GenoType® MRSA** die gleichzeitige Abgrenzung von S. aureus gegen KNS durch eine Spezies-spezifische Sonde sowie die Bestimmung der Methicillin-Resistenz durch eine mecA-spezifische Sonde. Die auf der **DNA-STRIP®-Technologie** basierende Methode liefert qualitativ exzellente Ergebnisse innerhalb kürzester Zeit und ermöglicht so eine um rund 24 h verkürzte Befunderhebung gegenüber konventioneller Diagnostik. Der **GenoType® MRSA** kombiniert dabei alle Vorteile der NAT-Techniken mit maximaler Spezifität und Sensitivität [10]. Da der Test keiner aufwändigen Geräteausstattung bedarf und sich durch einfache Handhabung auszeichnet, ist er problemlos in die Routinediagnostik - auch kleiner Laboratorien - integrierbar. Die Möglichkeit der automatischen Abarbeitung macht den Test andererseits auch für große Proben-durchsätze ideal.

Testprinzip des GenoType® MRSA

1. DNA-Isolierung (s. Abb. 4)

Der **GenoType® MRSA** ist ein molekulargenetischer Nachweis und beruht auf der Identifizierung des mecA-Gens sowie eines S. aureus-spezifischen Genabschnittes. Hierzu ist es zunächst notwendig, die Bakterien-DNA nach Anzucht auf einer Blutagarplatte zu isolieren.

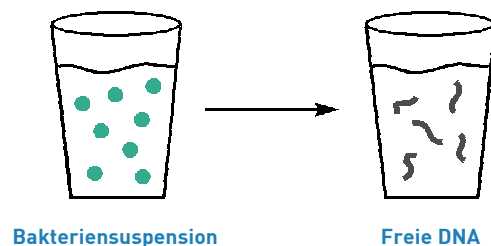


Abb. 4 Isolierung von bakterieller DNA

2. Resistance Determination

a) Resistance determination by culturing

The characteristic resistance pattern for a microorganism is routinely analyzed by agar diffusion tests in which the diameters of the inhibition zones are measured or by both microdilution methods to determine the MIC (see Fig. 3).



Fig. 3 Determination of resistance by an agar diffusion test

Conventional methods usually require at least 12 hours for resistance analysis and their limitations may be reached in the case of certain resistance phenomena. Heteroresistant MRSA can often only be identified after prolonged incubation periods or by using special techniques (e.g. E-test). In order to detect BORSA it is necessary to add a β -lactamase inhibitor to the growth medium in addition to oxacillin. The NCCLS recently changed the oxacillin breakpoint from <4 mg/l to <0.5 mg/l for the determination of methicillin resistance in CNS since the former value lacked sensitivity and identified many *mecA*-positive CNS as non-resistant. Although the new threshold now identifies all *mecA*-positive CNS correctly, it lacks specificity for some CNS strains without *mecA* and so a molecular genetic analysis is urgently indicated [7].

b) Latex tests

A newly developed latex test enables the detection of MRSA by using latex-bound antibodies to the PBP2a. In this method the presence of the *mecA* gene product is indicated by an agglutination reaction. This test is rapid and easy to carry out, but is not validated for CNS where it leads to false-negative results [8]. Moreover other investigations indicate that a prior induction of the microorganisms by culture on oxacillin-containing medium is necessary [9].

c) Molecular biological tests

The reference method for the detection of oxacillin resistance in staphylococci is the molecular genetic analysis of the *mecA* gene by PCR. In this case the agar diffusion test which is the most commonly used detection method, is inadequate due to the heterogeneity of the

resistance expression [1]. Differentiation between so-called cryptic MRSA and BORSA can also be carried out more rapidly and reliably by using nucleic acid amplification techniques (NAT). The NAT carried out as in-house tests are limited to special laboratories which have the required equipment.

3. Species Diagnosis and Resistance Determination with the Aid of the GenoType® MRSA

Starting from a primary culture the **GenoType® MRSA** allows a simultaneous differentiation of *S. aureus* from CNS by means of a species-specific probe and determination of methicillin resistance by means of a *mecA*-specific probe. The method which is based on the **DNA-STRIP® Technology** yields qualitatively excellent results within a very short time and thus enables the diagnosis to be made 24 hours earlier than with conventional methods. The **GenoType® MRSA** combines all advantages of the NAT techniques with maximum specificity and cost-efficiency [10]. Since the test does not require elaborate apparatus and is distinguished by its simple handling, it can be easily integrated into routine diagnostics even in small laboratories. Furthermore the ability to automate the process makes the test ideal for large sample throughputs.

Test principle of the GenoType® MRSA

1. DNA Isolation (see Fig. 4)

The **GenoType® MRSA** is a molecular biological test and is based on the identification of *mecA*- and *S. aureus*-specific gene segments. The first step is to isolate the bacterial DNA after culture on a blood agar plate.

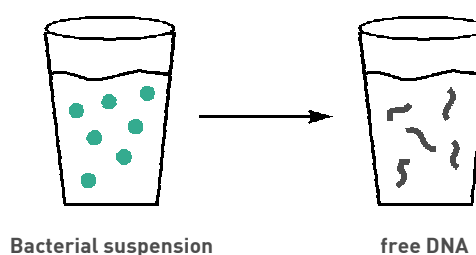


Fig. 4 Isolation of bacterial DNA

2. Polymerase-Kettenreaktion (s. Abb. 5)

Der nächste Schritt besteht in einer Multiplex-Amplifizierung eines *mecA*-, eines *S.aureus*-spezifischen sowie, als Kontrolle, eines universell bakteriellen DNA-Abschnitts mittels der Polymerase-Kettenreaktion (Patent der Fa. Hoffmann La-Roche). Die hierbei synthetisierten DNA-Fragmente stellen das Ausgangsmaterial für die Reverse Hybridisierung dar.

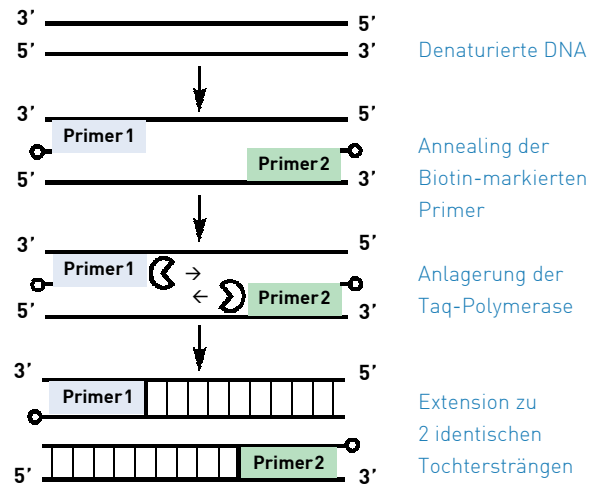


Abb. 5 Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte mittels der Polymerase-Kettenreaktion

3. DNA-Hybridisierung mittels der DNA-STRIP®-Technologie (s. Abb. 6)

Auf Membranstreifen immobilisiert liegen Gensonden verschiedener nachzuweisender DNA-Abschnitte vor. Denaturierte Amplifikat-DNA bindet während der Hybridisierung an diese Gensonden. Das Hybrid aus Gensonde und Biotin-markiertem Amplifikat kann dann über einen Komplex Biotin/Streptavidin-Alkalische Phosphatase mit NBT/BCIP angefärbt werden. Der Vergleich des Bandenmusters mit einer mitgelieferten Schablone erlaubt eine rasche und einfache Auswertung des Tests.

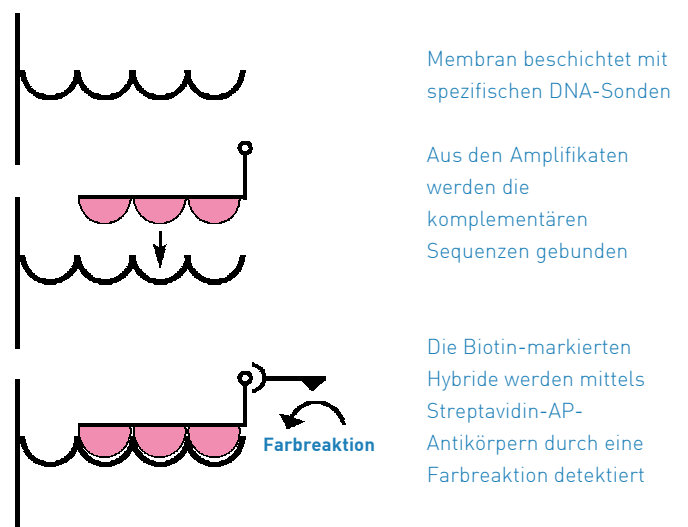
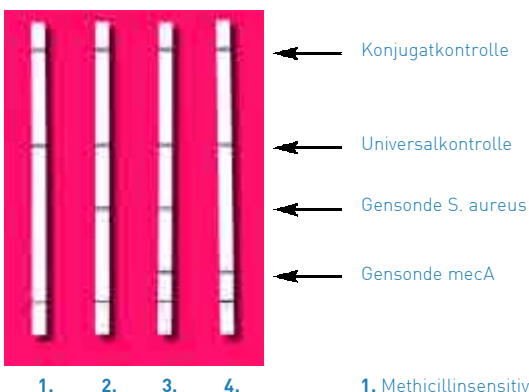


Abb. 6 Nachweis der amplifizierten DNA mittels DNA-STRIP®-Technologie

Testauswertung und Ergebnisinterpretation

Auf dem DNA-STRIP® sind insgesamt vier Reaktionszonen vorhanden.



1. Methicillinsensitiver KNS
2. Methicillinsensitiver *S. aureus*
3. MRSA
4. Methicillinresistenter KNS

Konjugatkontrolle

Diese Reaktionszone dokumentiert die Effizienz der Konjugatbindung sowie der Substratreaktion und muss immer entwickelt sein.

Universalkontrolle

Diese Sonde ist gegen einen hochkonservierten, in allen bisher untersuchten Bakterienarten vorkommenden DNA-Abschnitt gerichtet. Sie zeigt damit das Vorhandensein bakterieller DNA sowie die korrekte Durchführung der DNA-Isolierung und -Amplifikation an. Ist diese Reaktionszone negativ, muss der Test wiederholt werden.

S. aureus-Gensonde

Diese Reaktionszone dokumentiert das Vorhandensein von *Staphylococcus aureus*-DNA.

mecA-Gensonde

Diese Reaktionszone dokumentiert das Vorhandensein des *mecA*-Gens.

2. Polymerase Chain Reaction (see Fig. 5)

The next step is a multiplex amplification of *mecA*- and *S.aureus*-specific DNA segments and of a universal bacterial DNA segment as a control by polymerase chain reaction (patented by Hoffmann La-Roche). The DNA fragments synthesized in this process are the starting material for reverse hybridization.

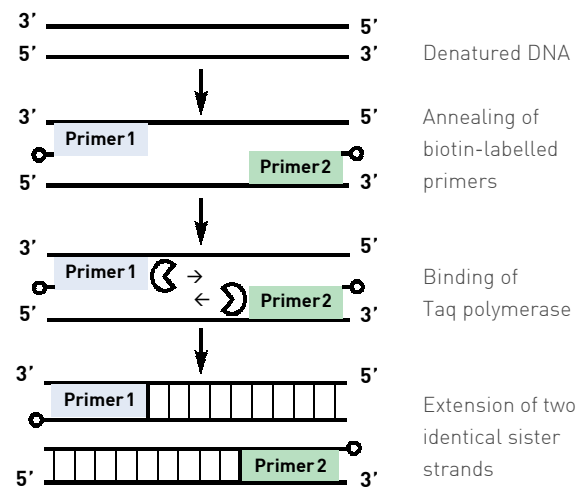


Fig. 5 Amplification of specific DNA segments by polymerase chain reaction

3. DNA Hybridization by means of the DNA-STRIP® Technology (see Fig. 6)

Gene probes for the DNA segments to be detected are present immobilized on membrane strips. Denatured amplicon DNA binds to these gene probes during hybridization. The hybrid of gene probe and biotin-labelled amplicon is stained with NBT/BCIP after forming a biotin/streptavidin-alkaline phosphatase complex. Comparison of the banding pattern with the template provided allows a rapid and simple interpretation of the test.

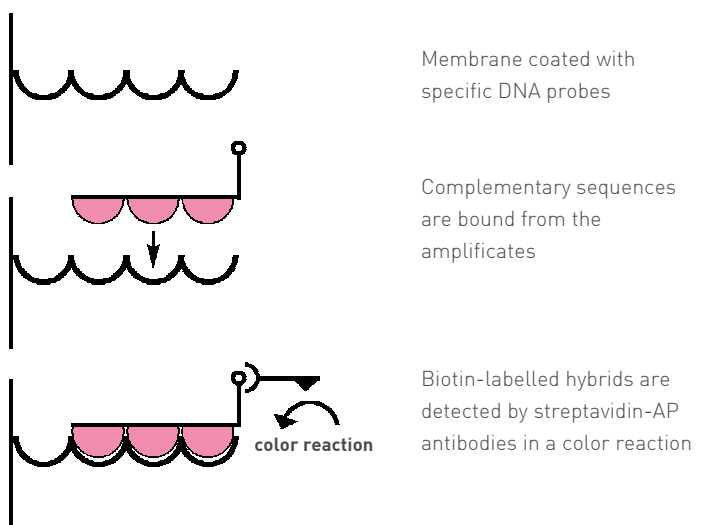
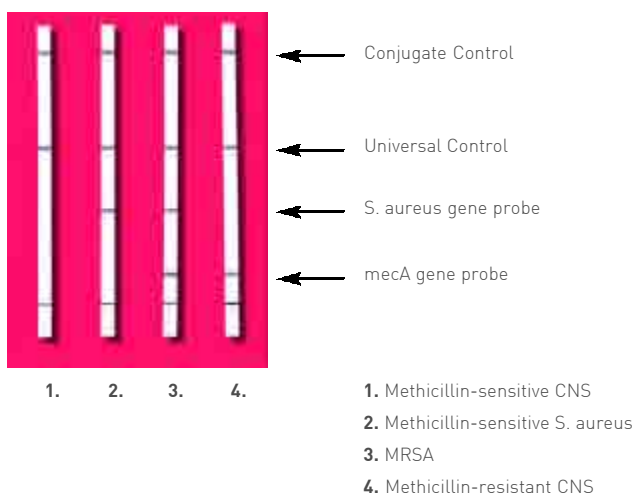


Fig. 6 Detection of amplified DNA by DNA-STRIP® technology

Test Evaluation and Interpretation of the Results

The DNA-STRIP® contains a total of four reaction zones.



Conjugate Control

A line must develop in this zone documenting the efficiency of conjugate binding and substrate reaction.

Universal Control

This probe is directed against a highly conserved DNA region appearing in all bacterial species tested so far. It indicates the presence of bacterial DNA and hence indicates that DNA release and amplification have been carried out correctly. If this reaction zone is negative the test has to be repeated.

S. aureus Gene Probe

This reaction zone documents the presence of *Staphylococcus aureus* DNA.

mecA Gene Probe

This reaction zone documents the presence of the *mecA* gene.

Literatur/ Literature

1. Ratgeber Infektionskrankheiten

12. Folge: Erkrankungen durch Staphylococcus aureus unter besonderer Berücksichtigung der MRSA. Epid Bull 8/2000.

2. Diekema D. J. et al., 2001

Survey of infections due to Staphylococcus species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1999. CID 32, Supl 2: 114 - 132.

3. Chambers H. F., 1997

Methicillin resistant staphylococci. Clin Microbiol Rev 1: 173 - 186.

4. Chambers H. F., 1988

Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev 10: 781 - 791.

5. Blake J. E. & Metcalfe M. A., 2001

A shared noncapsular antigen is responsible for false-positive reactions by Staphylococcus epidermidis in commercial agglutination tests for Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol 39: 544 - 550.

6. Griethuysen A. et al., 2001

International multicenter evaluation of latex agglutination tests for identification of Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol 39: 86 - 89.

7. Hussain Z. et al., 2000

Correlation of oxacillin MIC with mecA gene carriage in coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 38: 752 - 754.

8. Mariott D. et al., 1999

Further evaluation of the MRSA-screen Kit for rapid detection of methicillin resistance. J Clin Microbiol 37: 3783 - 3784.

9. Hussain Z. et al., 2000

Rapid detection of mecA-positive and mecA-negative coagulase-negative staphylococci by an anti-penicillin binding protein 2a slide latex agglutination test. J Clin Microbiol 38: 2051 - 2054.

10. Cuny C. et al., 2001

Evaluation of GenoType MRSA, a reverse hybridization blot test for detection of oxacillin resistant Staphylococcus aureus. Accepted.

**Herstellung und Vertrieb:
manufactured and marketed by:**

HAIN Lifescience GmbH

D- 72147 Nehren

Tel.: +49 - (0) 74 73 / 94 51 - 0

Fax: +49 - (0) 74 73 / 94 51 - 99

<http://www.hain-lifescience.de>

info@hain-lifescience.de