

W. Witte · D. Heuck · C. Bräulke
Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode, Berlin

Tätigkeitsbericht des Nationalen Referenzzentrums für Staphylokokken im Jahr 1999

Weiterentwicklung der Diagnostik, Qualitätssicherung

Nach wie vor war die Abgrenzung von *S. aureus* mit "borderline resistance" gegen Oxacillin (BORSA, MHK für Oxacillin 0,5–1,0 mg/l) von MRSA (MHK ≥ 2 mg/l) problematisch. Deshalb wurden screening tests als Bouillonkultur und als Plattenkultur (nach NCCLS) mit Zusatz des β -Laktamasehemmers Sulbactam

(8 mg/l) erprobt. Für den Bouillontest im Röhrchen ergibt sich eine Sensibilität von 100%, eine Spezifität von 100%; für den Plattentest eine Sensibilität von 96,4%, eine Spezifität von 98% (Referenzmethode ist der PCR-Nachweis von *mecA*; nähere Angaben bei Cuny et al. [1]). Parallel dazu erfolgt die Erprobung des MRSA-screen tests auf Basis monoklonaler Antikörper gegen PBP2a. Sensibilität und Spezifität lagen bei 100%!

Weiterentwicklung der molekularen Typisierung

Typisierung der *mecA*-assoziierten DNS

Für molekularepidemiologische Untersuchungen zur Verbreitung von Resistenzgenen (bzw. Resistenzgenclustern) ist eine Typisierung der Resistenzgene bzw. der sie tragenden Elemente erforderlich [2]. Für die *mecA*-Gen assoziierte DNS wurde dazu bisher die PCR-Analyse des *mec*-Regulons eingesetzt [3, 4]. Im Berichtszeitraum wurde zusätzlich der PCR-Nachweis der repetitiven *dru*-Sequenzen eingeführt, die Bestandteil der *mecA*-assoziierten DNS sind ([5], Beispiel in Abb. 6).

Weitere Typisierung von Subklonen innerhalb der klonalen Gruppen bekannter Epidemiestämme

Als weiteres Makrorestriktionsverfahren wurden I-CeuI-Muster eingeführt. Die Intron-spezifische Restriktionsendonuklease hat ihr Erkennungssite im r-RNA-Genspacer [7]. I-CeuI-Muster ermöglichen damit die Ableitung verwandtschaftlicher Beziehungen aufgrund von

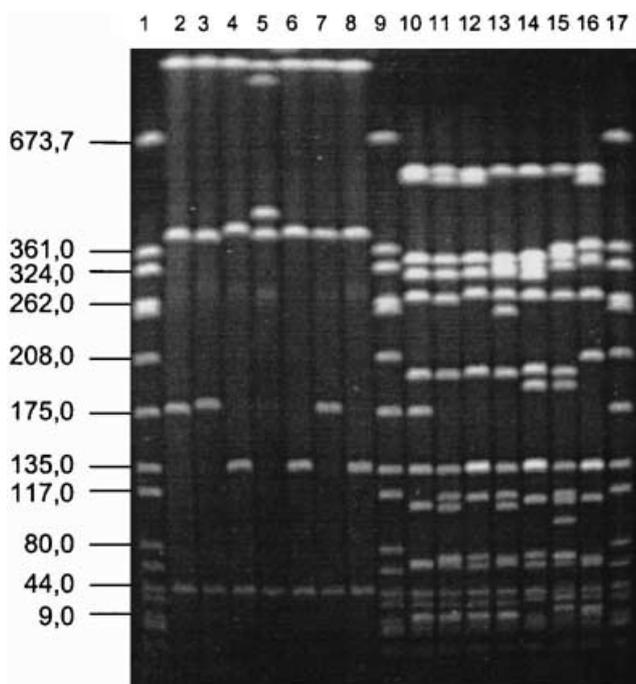


Abb. 1 ◀
I-CeuI und *Sma*-I-Makrorestriktionsmuster von Subklonen der Gruppe "süddeutscher Epidemiestamm": 1, 9, 17: *S. aureus* 8325 als Standard, 2–8: I-CeuI-Muster, 10–16: *Sma*-I-Muster der gleichen Stämme

Prof. Dr. W. Witte
Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode,
Burgstraße 37, 38855 Wernigerode,
E-Mail: wittew@rki.de

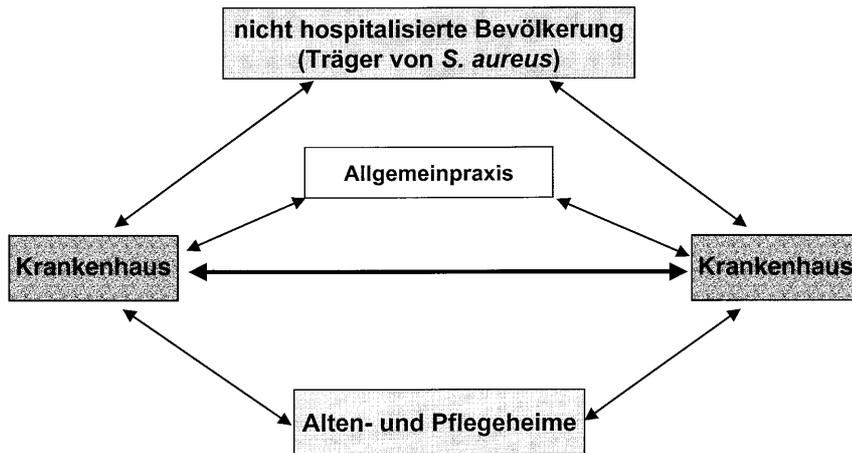


Abb. 2 ▲ Möglichkeiten der überregionalen Verbreitung von MRSA durch besiedelte oder infizierte Patienten

Ereignissen homologer Rekombination im Bereich der r-RNA-Genoperons. Ein Beispiel dafür zeigt Abb. 1.

Zur MRSA-Situation in Deutschland

Während der letzten zehn Jahre ist ein Anstieg der Prävalenz von MRSA in deutschen Krankenhäusern zu beobachten (1990: 1,7%; 1995: 8,7%; 1998: 15,2% (Studien der Paul-Ehrlich-Gesellschaft 1. Chemotherapie [6]). Parallel dazu wird eine überregionale Verbreitung epidemischer MRSA registriert [3, 8, 9]. Es besteht die Frage, ob diese Entwicklung mehr durch die Verbreitung zwischen den Krankenhäusern begründet

ist oder ob auch außerhalb der Krankenhäuser MRSA-Reservoir existieren, wie kürzlich aus den USA und aus Australien sowie von Altenheimen [10] berichtet wurde (s. Abb. 2).

Schon in den sechziger Jahren wurde von europäischen Ländern über Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotikaklassen wie β -Laktam-Antibiotika, Tetrazyklinen, Chloramphenicol und Makroliden (MLS) berichtet [11]. Später kam noch Gentamicinresistenz dazu. Die meisten MRSA weltweiten Ursprungs exprimierten Multiresistenzphänotypen, wie sie auch bei MRSA deutscher Krankenhäuser bis 1995 beobachtet wurden. Seit 1995 ist eine Veränderung der Resistenzphänotypen bei

MRSA von Infektionen in deutschen Krankenhäusern zu beobachten [12]. So ist eine Abnahme der Resistenzen gegen Gentamicin, Oxytetracyclin und Erythromycin zu verzeichnen ([1], (Tabelle 1). Es erhebt sich die Frage, ob es bei den bisher verbreiteten Stämmen zum Verlust von Resistenzdeterminanten kam oder ob "neuartige" MRSA eine weitere Verbreitung erfahren haben.

Im Folgenden wird ein Überblick zu Auftreten, Verbreitung und Veränderungen von epidemisch virulenten MRSA mit verschiedenen Resistenzphänotypen gegeben.

Methodischer Hintergrund

Bakterienisolate

MRSA von sporadischen Infektionen und Ausbrüchen in Krankenhäusern wurden zur Typisierung an das Nationale Referenzzentrum für Staphylokokken am Robert Koch-Institut gesandt. Dieses Referenzzentrum kooperiert mit 112 diagnostischen Laboratorien ganz Deutschlands. Stämme mit einem MHK-Wert von ≥ 2 mg/l für Oxacillin und mit Nachweis des *mecA*-Gens mit der PCR (Polymerasekettenreaktion) wurden als MRSA deklariert. Kam es in einem Krankenhaus zu mehreren MRSA-Isolaten in einem zeitlichen Zusammenhang, dann wurde von allen hinsichtlich Lysisbild und/oder Resistenzphänotyp unterschiedlichen Stämmen eine molekulare Typisierung durchgeführt. Die Empfindlichkeitstestung der dem Referenzzentrum zugesandten Isolate wurde mit der Mikrobouillon-MHK gemäß NCCLS durchgeführt.

Molekulare Typisierung

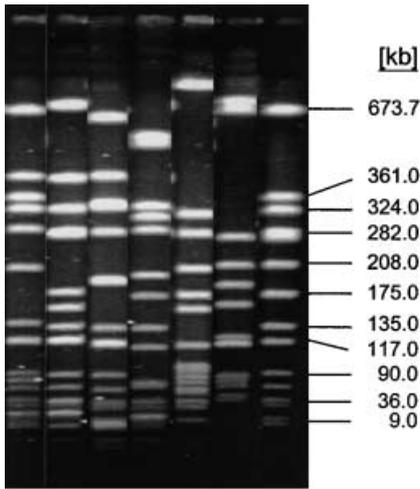
Jedes ausgewählte Isolat wurde durch ein *Sma*I-Makrorestriktionsmuster mittels Pulsfeldgelelektrophorese charakterisiert. Die erhaltenen Muster wurden in einem Datenbanksystem gesammelt und Cluster-Analysen auf Ähnlichkeit vorgenommen. Isolate mit von einem bekannten Epidemiestamm abweichendem Makrorestriktionsmuster wurden nachfolgend einer Typisier-PCR wie bei [4] beschrieben zugeführt.

Der PCR-Nachweis von Resistenzdeterminanten erfolgte wie bei [8] beschrieben.

Tabelle 1

Häufigkeit von phänotypischen Resistenzeigenschaften bei MRSA aus nosokomialen Infektionen in Deutschland (1997 bei 1970, 1998 bei 1639 und 1999 bei 2562 MRSA-Stämmen)

Substanz	1997		1998		1999	
	Anzahl	[%]	Anzahl	[%]	Anzahl	[%]
Oxacillin	1970	100,0	1693	100,0	2562	100,0
Ciprofloxacin	1851	94,0	1599	94,4	2481	96,8
Erythromycin	1314	66,7	1225	72,4	1835	71,6
Clindamycin	901	45,7	912	53,9	1564	61,0
Gentamicin	1088	55,2	935	55,2	1247	48,7
Oxytetracyclin	508	25,8	450	26,6	411	16,0
Trimethoprim/Sulfonamid	333	16,9	334	19,7	380	14,8
Mupirocin, intermediär	312	15,8	234	13,8	289	11,3
Mupirocin	7	0,4	9	0,5	56	2,2
Rifampicin	156	7,9	163	9,6	130	5,1
Quinupristin/Dalfopristin	0	0	3	0,2	0	0



● ○ ∅ Σ σ ⊕ S

Abb. 3 ▲ *Sma*I-Makrorestriktionsmuster von MRSA-Epidemiestämmen in Zentraleuropa.

Symbole: ● norddeutscher Epidemiestamm; ○ Hannoverscher Epidemiestamm; * süddeutscher Epidemiestamm; ⊕ Barnimer Epidemiestamm; ∅ südostdeutsch-westösterreichischer Epidemiestamm; S = *S. aureus* 8325

Überregionale Verbreitung von MRSA

Wie früher schon berichtet wurde, können sechs klonale Gruppen von MRSA-Epidemiestämmen durch die molekulare Typisierung identifiziert werden, die charakteristische *Sma*I-Makrorestriktionsmuster in Abb. 3 zeigen. Diese epidemischen MRSA zeigen unterschiedliche Resistenzphänotypen (Tabelle 2).

Die Abbildungen 4 und 5 geben einen Überblick über die geographische Verteilung der Krankenhäuser in Deutschland, in denen Infektionen mit MRSA-Stämmen in den Jahren 1997, 1998 und 1999 bekannt geworden sind.

Daten zur Verbreitung von MRSA bei ambulanten Patienten

Bei den Untersuchungen von *S. aureus*, die speziell von ambulanten Patienten Niedersachsens (Medizinisches Labor Hannover, Frau Dr. Sander) eingesandt wurden, wurde ersichtlich, dass Infektionen mit MRSA in diesem Bereich noch selten sind (1997: 0,26% von 3135; 1998: 0,25% von 3200). Genomische Typisierung dieser MRSA weist sie als "klassische" Epidemiestämme (klonale Gruppe III) aus.

Tabelle 2

Resistenzphänotypen von MRSA mit überregionaler Verbreitung in Deutschland

Gruppierung gemäß molekularer Typisierung	Resistenzphänotyp
norddeutscher Epidemiestamm	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, OTE, SXT, RIF, CIP
süddeutscher Epidemiestamm	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, (GEN) ¹ , (OTE) ²
Hannoverscher Epidemiestamm	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, OTE, SXT, CIP
südostdeutsch-westösterreichischer Epidemiestamm	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, OTE, SXT, CIP
Wiener Epidemiestamm	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, SXT, CIP, OTE, (FUS)
Berliner Epidemiestamm	PEN, OXA, CIP, (GEN, ERY, ERY-CLI, SXT)
Barnimer Epidemiestamm	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP
Lysogruppe I MRSA	PEN, OXA, (ERY, CLI)
andere	variabel

¹Phänotypen in Klammern treten selten auf, ²Rückgang nach 1994

Abkürzungen: CIP = Ciprofloxacin, CLI = Clindamycin, ERY = Erythromycin, FUS = Fusidinsäure, GEN = Gentamicin, OXA = Oxacillin, OTE = Oxytetracyclin, PEN = Penicillin, RIF = Rifampicin, SXT = Trimethoprim/Sulfamethoxazol

Prävalenz von MRSA bei Bewohnern von Alten- und Pflegeheimen

1342 Bewohner von 31 Alten- und Pflegeheimen aus vier Bundesländern wurden mittels Nasen- und Rachenabstrichen auf eine MRSA-Besiedlung untersucht. Bei Nachweis von *S. aureus* erfolgte die Ermittlung des OXA-Phänotyps und -Genotyps. Nur 2,4% der Bewohner wurden mit MRSA besiedelt gefunden. Die MRSA-Klone, die in den untersuchten Heimen gefunden wurden, entsprachen denen angrenzender Krankenhäuser und der geographischen Lage dieser Einrichtungen (Tabelle 3; Einzelheiten bei 13]).

Veränderungen von MRSA-Epidemiestämmen und ihrer Resistenzphänotypen

Die traditionellen mehrfachresistenten Epidemiestämme – wie der "norddeutsche" und der "Hannoversche" Epidemiestamm – nahmen in ihrer Anzahl ab. Neuartige Epidemiestämme mit weniger Resistenzdeterminanten wie der "Berliner" und der "Barnimer" Epidemiestamm traten zunehmend häufiger auf.

Während die Oxytetracyclinresistenz in anderen mehrfachresistenten Stämmen stabil blieb, ging sie bei Isola-

Tabelle 3

Häufigkeit des Nachweises von MRSA bei untersuchten Bewohnern in 31 Alten- und Pflegeheimen in Deutschland

Ort/Bundesland	Anzahl untersuchter Bewohner (Heime)	Anzahl von Bewohnern mit MRSA-Trägertum	Prävalenz [%] Stämme	Epidemiestämme
Frankfurt/O./ Brandenburg	159 (1)	4	2,5%	1 Barnimer 3 Berliner
Berlin	579 (12)	17 (in 6 Heimen)	2,9%	13 Barnimer 3 Berliner 1 süddeutscher
Kreis Höxter/ Nordrhein-Westfalen	121 (9)	0	0%	–
Köln/Nordrhein-Westfalen	82 (1)	1	1,2%	1 Berliner
Frankfurt/M./Hessen	401 (8)	10 (in 4 Heimen)	2,4%	10 süddeutsche
Summe	1342	32	2,4%	

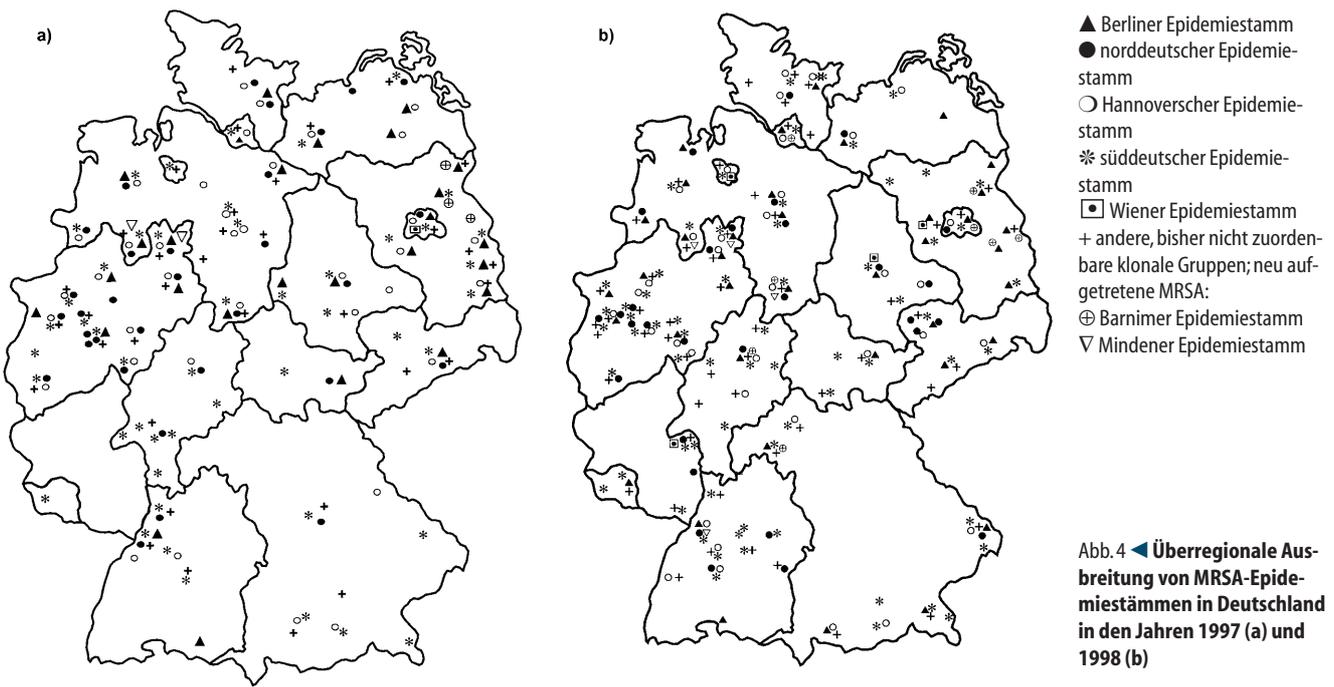


Abb. 4 ◀ Überregionale Ausbreitung von MRSA-Epidemiestämmen in Deutschland in den Jahren 1997 (a) und 1998 (b)

ten des “süddeutschen” Epidemiestammes 1997 und 1998 zu 87% verloren. Bei den Oxacillin-resistenten Stämmen dieser klonalen Gruppe konnte das *tetM*-Gen auf dem Transposon Tn916 mittels PCR nachgewiesen werden.

MRSA mit schmalen Resistenzphänotyp sind nicht auf eine bestimmte geographische Region beschränkt. Ausgehend von der Region von Berlin und nördlich von Berlin haben sich der “Berliner” und der “Barnimer” Epidemiestamm in der nördlichen Hälfte

Deutschlands verbreitet und nun auch Krankenhäuser im Süden des Landes erreicht (Abb. 4 u. 5). MRSA der klonalen Gruppe I blieben auf einige wenige Krankenhäuser 1998 beschränkt [14].

Prävalenz von Glycopeptidintermediär empfindlichen *S. aureus* (GISA) in deutschen Krankenhäusern

In den letzten drei Jahren wurden insgesamt 6500 MRSA-Isolate aus 219 deutschen Krankenhäusern, die dem Natio-

nen Referenzzentrum für Staphylokokken zur Typisierung eingesandt worden waren, auf das Vorhandensein des GISA-Phänotyps untersucht. Es wurden bisher nur fünf GISA – vier von Krankenhäusern der Düsseldorfer Region [15] und ein sporadisches Isolat von einem Berliner Krankenhaus – bekannt. Alle Stämme sind Abkömmlinge des “norddeutschen” Epidemiestammes.

Neu auftretende MRSA-Epidemiestämme

Im Südwesten Deutschlands wurde in fünf Krankenhäusern die Verbreitung eines MRSA (Resistenzphänotyp: PEN, OXA) nachgewiesen, dessen molekulare Charakterisierung ihn der klonalen Gruppe III von *S. aureus* zuordnet. Aufgrund des vollständigen Besitzes von *mecR* kann ausgeschlossen werden, dass dieser Stamm aus den “klassischen MRSA” der klonalen Gruppe III durch Verlust von Resistenzgenen hervorgegangen ist.

In Nordrhein-Westfalen traten in drei Krankenhäusern Infektionen mit MRSA auf, die zwar wie der “Berliner Epidemiestamm” zur klonalen Gruppe V von *S. aureus* gehören, aber ein unterschiedliches Makrorestriktionsmuster zeigen. Der PCR-Nachweis des *dru*-Längenpolymorphismus weist darauf hin, dass ein vom “Berliner Epidemiestamm” verschiedener *S. aureus* ein ebenfalls un-

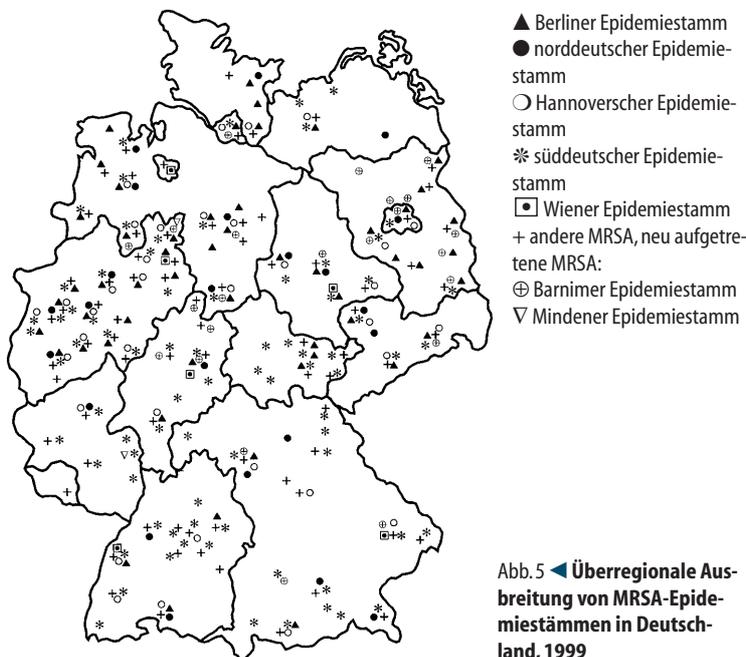


Abb. 5 ◀ Überregionale Ausbreitung von MRSA-Epidemiestämmen in Deutschland, 1999

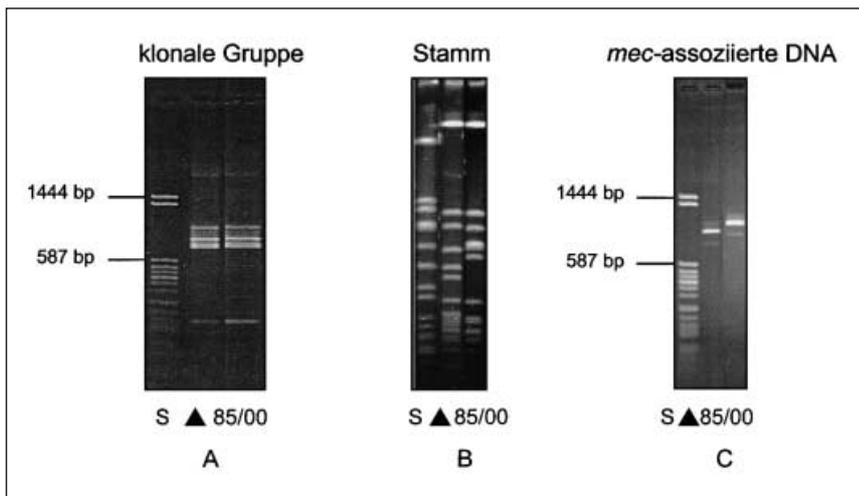


Abb. 6 ▲ Vorkommen von einem MRSA der klonalen Gruppe V mit einem neuen *Sma*-I-Makrorestriktionsmuster. A: r-RNA-Genspacer, ▲ Berliner Epidemiestamm, B: *Sma*-I-Makrorestriktionsmuster 85/00 neuer MRSA, C: PCR der *dru*-Region

Tabelle 4

Minimale Hemmkonzentration von Moxifloxacin bei MRSA-Epidemiestämmen (breakpoint ≥ 4 mg/l)

Klonale Gruppe	MHK [mg/l]									
	0,016	0,032	0,063	0,125	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	
süddeutscher Epidemiestamm MRSA (n = 15)							3	5	6	
klassische MRSA (n = 7)						2	2	2	1	
"Berlin" MRSA (n = 16)		1	1			2	8	4		
"Barnim" MRSA (n = 10)			1	1		7			1	
Gruppe I MRSA (n = 15)						2		5	8	

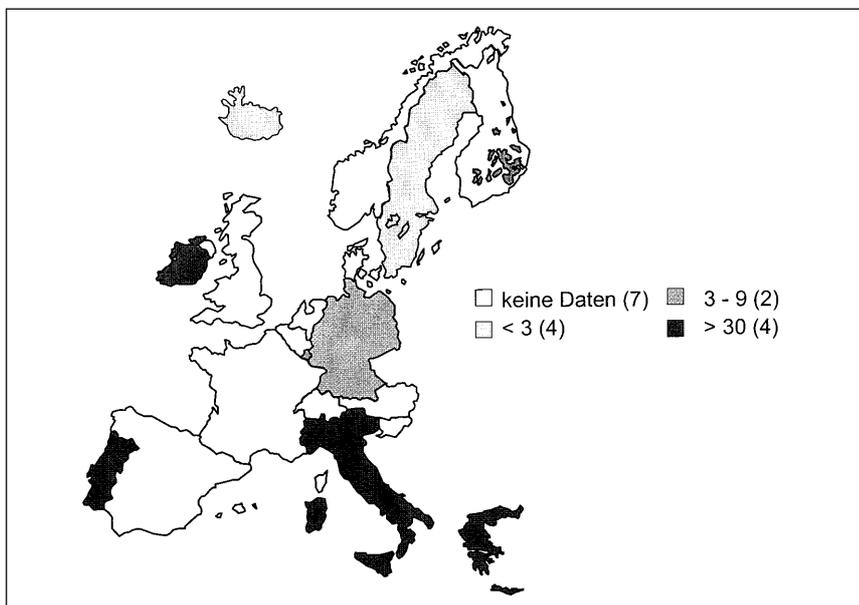


Abb. 7 ▲ MRSA aus Blutkulturen; EARSS-Studie in Europa

terscheidbares *mecA*-Gencluster erwarb (Abb. 6).

Empfindlichkeit von *S. aureus* (einschl. MRSA) gegen neu eingeführte Chemotherapeutika

Moxifloxacin als Chinolon der Gruppe IV

Dieses Chinolon wurde im September 1999 in die Chemotherapie eingeführt. Bei *S. aureus* mit Empfindlichkeit gegen Ciprofloxacin liegen die MHK im Bereich 0,016 bis 0,032 mg/l. Anders ist dies bei MRSA, die zu 94% gegen Ciprofloxacin resistent sind. Hier liegt auch bei den "neuen" MRSA zu einem erheblichen Teil bereits Resistenz vor (Tabelle 4).

Linezolid als Oxazolidinon

Unabhängig von bereits vorhandenen Resistenzen gegen andere Chemotherapeutika gibt es bisher bei Staphylokokken keine Resistenz gegen Linezolid (MHK ≤ 2 mg/l; 6320 Isolate untersucht). Linezolid hemmt die Bildung des Initiationskomplexes am Ribosom. Resistenz beruht auf Aminosäureaustauschen in ribosomalen Proteinen. Bei Wildstämmen von MRSA mit Mutatoreigenschaft wurden *in vitro* keine Linezolid-resistenten Mutanten gefunden (Einzelheiten bei [16]).

Zur Rolle der *S. aureus*-Besiedlung bei Patienten der Peritonealdialyse als einer für *S. aureus*-Infektionen prädisponierenden Kondition

In einer gemeinsam mit der Medizinischen Klinik an der Universität Lübeck durchgeführten Studie wurde anhand der Langzeit-Untersuchung (14 Monate) von 41 Dialysepatienten gezeigt, dass permanentes Trägertum von *S. aureus* nicht das Risiko für eine Exit-site-Infektion erhöht! Dabei wurde bei etwa der Hälfte der Patienten das Vorkommen von Isolaten mit gleichem Genotyp nachgewiesen, bei den anderen Patienten gab es Erregerwechsel. Kreuzinfektionen gab es bei lediglich drei Patienten [17].

Tabelle 5

Gemeinsame Merkmale der molekularen Typisierung des Barnim-Epidemiestammes und des EMRSA-15 aus England/Wales

Merkmal	Übereinstimmung
<i>Sma</i> I-Makrorestriktion	nur in 3 Fragmenten unterschiedlich
r-RNA-Genspacer	entspricht der klonalen Gruppe II
<i>Hae</i> III-Muster des PCR-Produktes für das C-terminale Ende der Koagulase	identisch
<i>dru</i> -Polymorphismus	identisch (1020 bp amplimer, gleiches <i>Ala</i> -I-Muster)
<i>mec</i> -Regulon	gleich (<i>mecI</i> , <i>mecRC</i> ⁺ , <i>mecRB</i> ⁺ , <i>mecA</i>)
Superantigen-Determinanten	<i>sec</i>
MLS-Resistenz	<i>ermC</i>

Internationale Zusammenarbeit

Mitarbeit im Rahmen von EARSS (European antibiotic resistance surveillance system) als EU-Initiative

Auf der Grundlage des bestehenden Netzwerkes des NRZ für Staphylokokken wurden Studienzentren zur Mitarbeit an dieser vom Rijks Instituut voor Volksgezondheid, Bilthoven, koordinierten Studie gewonnen. Für Deutschland erfolgte die statistische Analyse der Daten im Fachgebiet 21 des RKI. Diese Studie gibt zunächst einen Überblick über die Häufigkeit von MRSA und von penicillin-resistenten *S. pneumoniae* bei systemischen Infektionen. Das Ergebnis für MRSA zeigt Abb. 7.

Mitarbeit an der EU-Initiative HARMONY zur molekularen Typisierung von MRSA in Europa

Wichtiges Ergebnis dieser Mitwirkung ist, dass der in Deutschland inzwischen weit verbreitete "Barnimer Epidemiestamm" offenbar aus dem vorher bereits in England und Wales weit verbreiteten EMRSA-15 hervorging (Tabelle 5). Dies ist ein erneutes Beispiel für die über Ländergrenzen weit hinausgehende Verbreitung epidemischer MRSA.

Relevante Publikationen im Berichtszeitraum

- Cuny C, Pasemann B, Witte W (1999) Detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* by screening tests. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 18:834–836
- Witte W (1999) Diagnostics, typing & taxonomy, Chapter 31. In: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti J (eds) Gram-positive pathogens. ASM, p 309–316
- Hiramatsu K, Kondo N, Ito T (1996) Genetic basis for molecular epidemiology of MRSA. J Infect Chemother 2:117–129
- Witte W, Cuny C, Bräulke C, Heuck D, Klare I, Werner G (1999) Emergence and spread of multiresistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium*: consequence for prevention. Nova Acta Leopoldina NF 78 Nr. 307, 51–67
- Ryffel C, Bucher R, Kayser FH, Berger-Bächi B (1991) The *Staphylococcus aureus mec*-determinant comprises an unusual cluster of direct repeats and codes for a gene product similar to the *Escherichia coli* Sn-glycerophosphoryldiester phosphodiesterase. J Bacteriol 173:7416–7422
- Kresken M, Hafner D und Studiengruppe (2000) Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern in Mitteleuropa gegenüber Chemotherapeutika in Mitteleuropa. Chemother J 9:51–86
- Liu SL, Schryvers AB, Sanderson KE, Johnston RW (1999) Bacterial phylogenetic clusters revealed by genome structure. J Bacteriol 181:6747–6755
- Bräulke C, Heuck D, Witte W (1999) Ergebnisse der Tätigkeit des Nationalen Referenzentrums für Staphylokokken im Jahr 1998. Bundesgesundhbl 42:499–506
- Witte W (1999) Antibiotic resistance in gram-positive bacteria: epidemiologic aspects. J Antimicrob Chemother 44:Topic A, 1–9
- Heuck D, Nassauer A (1999) Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* in Alten- und Pflegeheimen. Hyg Med 24:72–80
- Lacey RW (1975) Antibiotic resistance plasmids of *Staphylococcus aureus* and their clinical importance. Bacteriol Rev 39:1–32
- Witte W, Bräulke C, Heuck D, Cuny C (2000) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in German hospitals develop narrower patterns of antimicrobial resistance. Eurosurveillance 5:31–34
- Heuck D, Fell G, Hamouda O, Claus H, Witte W (im Druck) Erste Ergebnisse einer überregionalen Studie zur MRSA-Besiedlung bei Bewohnern von Alten- und Pflegeheimen. Hyg Med 25, Heft 5
- Windmeier C, Bräulke C, Heuck D, Witte W (1999) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exhibiting genomic fingerprints in a hospital and in a nurse's family. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 18:156–158
- Geisel R, Schmitz FJ, Thomas L, Berns G, Zetsche O, Ulrich X, Fluit AC, Labischinsky H, Witte W (1999) Emergence of hetero-vancomycin-intermediate resistant *Staphylococcus aureus* isolates within the Düsseldorf area. J Antimicrob Chemother 43:846–848
- Cuny C, Witte W (in press) *In vitro* activity of linezolid against staphylococci. Clin Microbiol Infect
- Kreft B, Ilic S, Kahl A, Frei U, Witte W, Trautmann M (submitted for publication) Genetical and epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* nasal colonisation and exit-site infection in peritoneal dialysis patients. Kidney International