

Nutzen der molekularen Erregerdiagnostik zur Aufklärung schwerer Infektionen/Ausbrüche am Beispiel MRSA

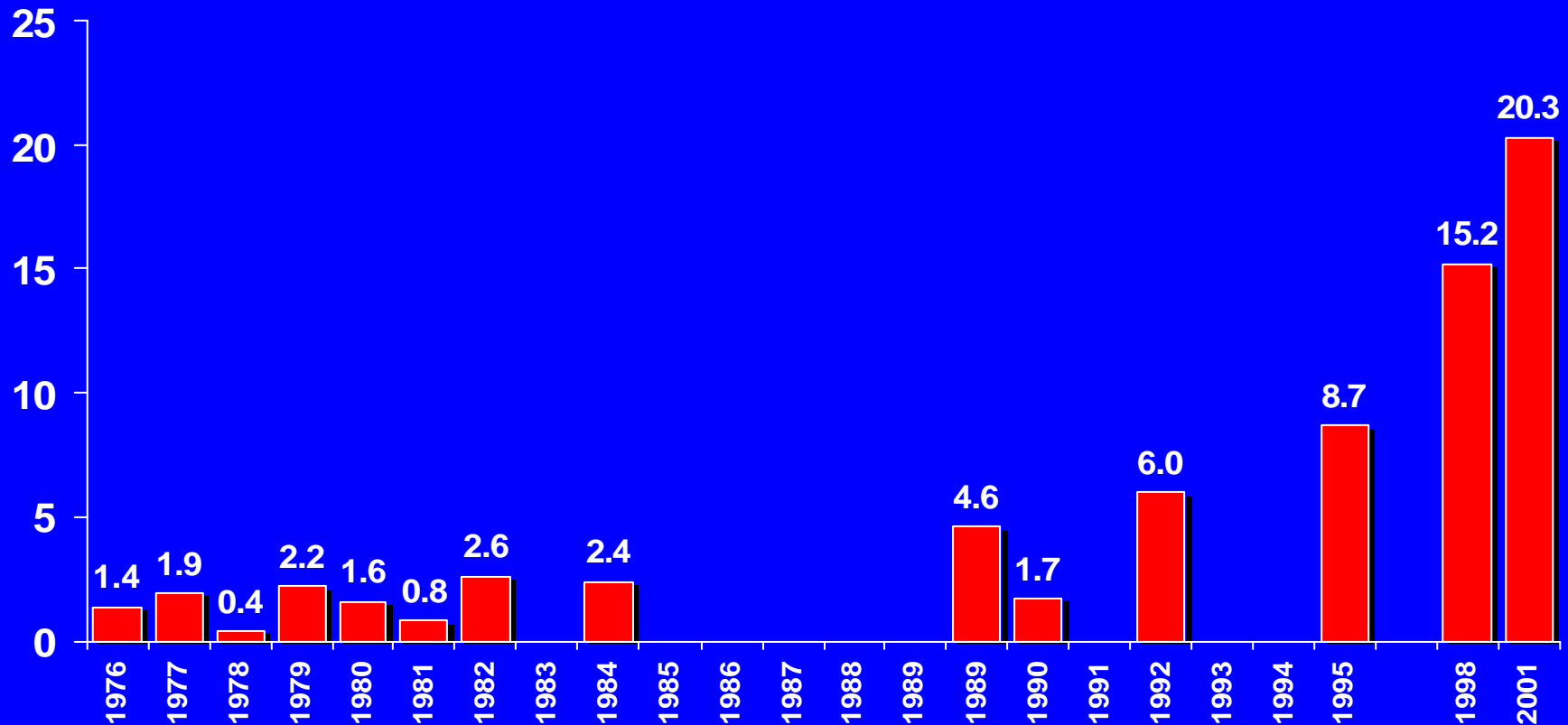
Birgit Strommenger, PhD
Robert Koch Institut,
Bereich Wernigerode

Incidence of MRSA in German hospitals

(results from multicentric studies of Paul Ehrlich Society; Knote et al. 1996;

Kresken and Hafner 1996, 1998, 2002; Voss et al. 1994)

% of strains



Epidemic MRSA in Central Europe

the "classical" strains (clonal group III of *S. aureus*)

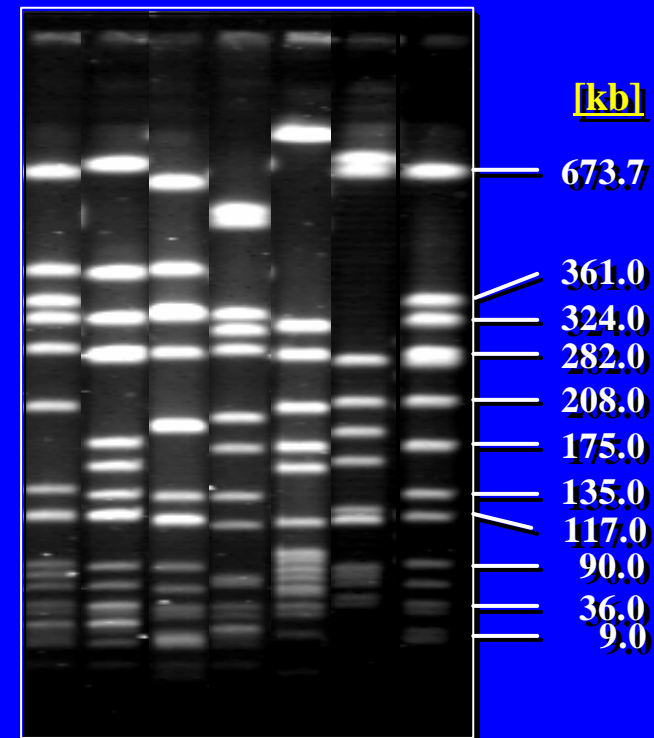
(*mecI*⁻, *mecRC*⁻, *mecRB*⁺, *mecA*⁺)

- **northern German Epidemic MRSA**
PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, OTE, SXT, CIP, RAM, (FUS)
- O **Hannover area epidemic MRSA**
PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, OTE, SXT, CIP
- Æ **south-western German-western Austrian epidemic MRSA**
PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, OTE, SXT, CIP
- * **Southern German Epidemic MRSA**
(*mecI*⁻, *mecRC*⁻, *mecRB*⁺, *mecA*⁺)
PEN, OXA, (GEN), ERY, CLI, (OTE), CIP, SXT

the new emerging strains

(*mecI*⁻, *mecRC*⁺, *mecRB*⁺, *mecA*⁺)

- ◆ **Berlin epidemic MRSA (clonal group V)**
PEN, OXA, CIP, (ERY, CLI, GEN)
- Å **Barnim epidemic MRSA (clonal group II)**
PEN, OXA, CIP, ERY, CLI

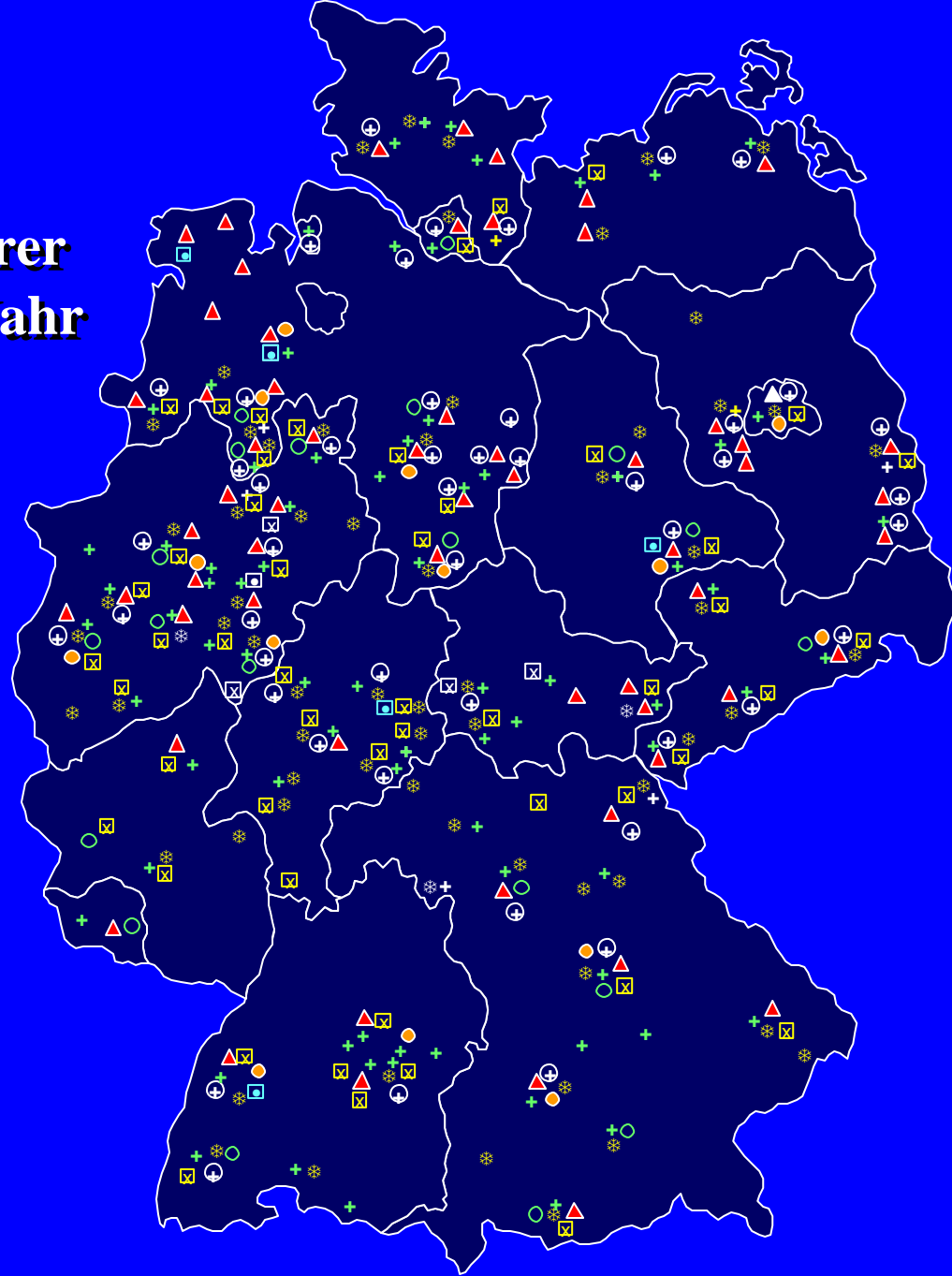


● O Æ ◆ Å S

S = *S. aureus* 8325

Regionale Verteilung bestimmter MRSA-Epidemiestämme und anderer MRSA in Deutschland im Jahr 2001

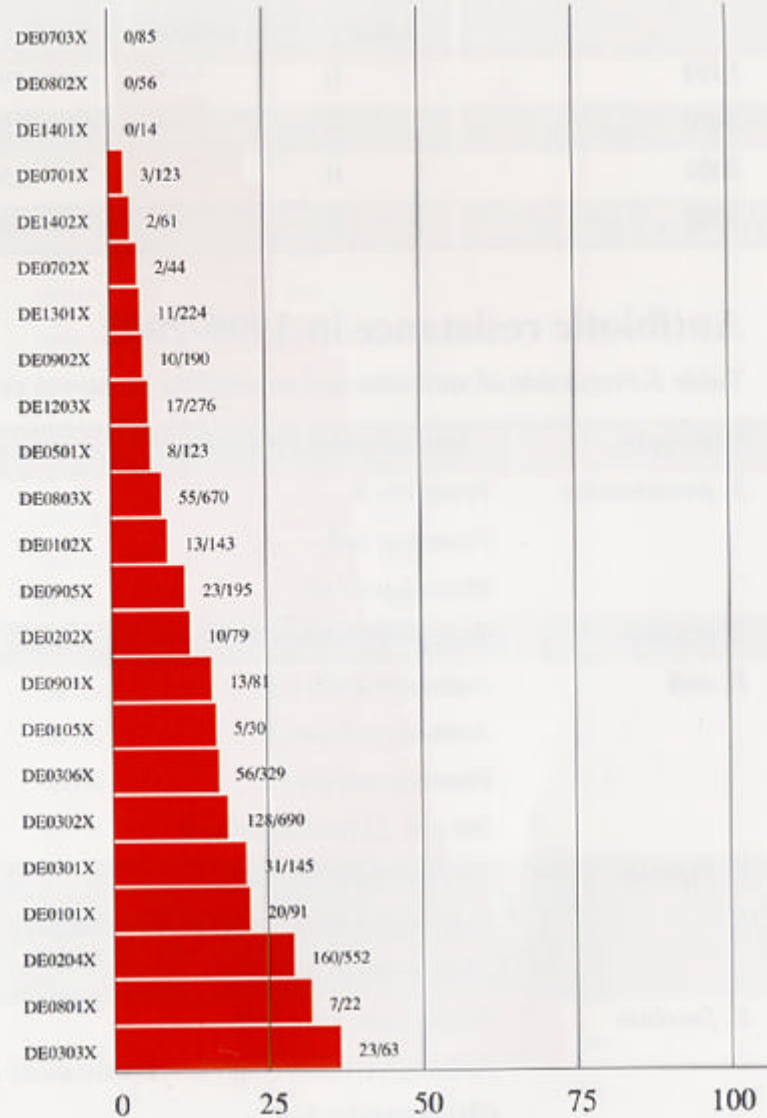
- norddeutscher Epidemiestamm
- süddeutscher Epidemiestamm
- ▲ Berliner Epidemiestamm
- Hannoverscher Epidemiestamm
- Wiener Epidemiestamm
- ⊕ Barnimer Epidemiestamm
- ⊠ Rhein-Hessen Epidemiestamm
- + andere MRSA



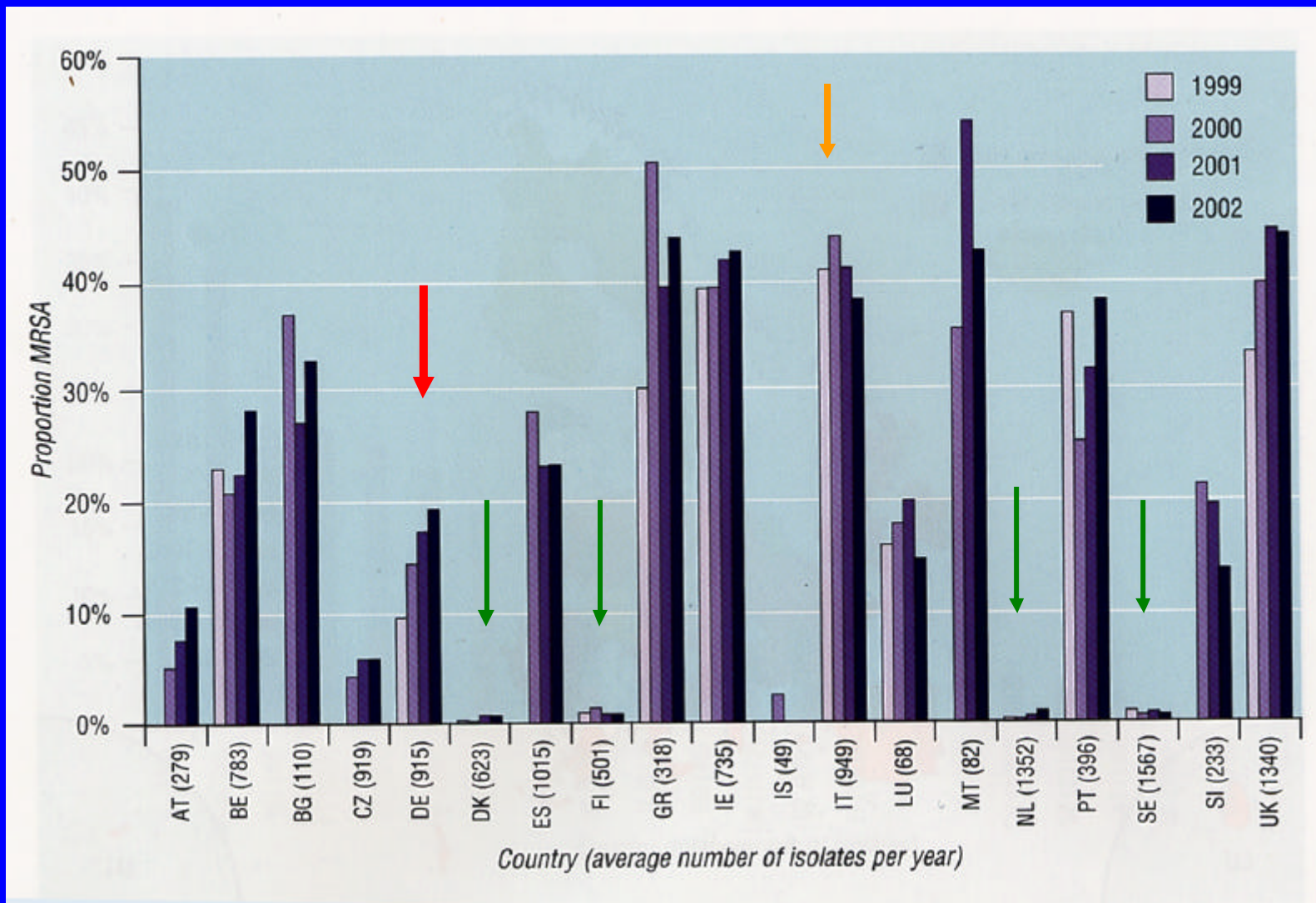
data from EARSS

MRSA at hospital level

Figure 4. Proportion (%) MRSA by hospital (1999-2002)



Frequencies of MRSA from systemic infections in Europe (EARSS)



Strategien zum Zurückdrängen von MRSA

- Ignorieren des Problems
- Maßnahmen einleiten, wenn Inzidenzdichte > 03. oder 0.75 percentile des Berichtszeitraumes überschritten

überwiegend in D

- aktive, wöchentliche surveillance-Kulturen bei allen Patienten einer Station/ Abteilung oder wenigstens bei Patienten mit Risiko für MRA
- Aufnahmescreening für MRSA bei allen Patienten, „Quaratäne“ bis erwiesen negativ oder saniert

Erfordert
Schnelle
Diagnostik
!!!

Pneumonie - Erregerwechsel über die Zeit

Pneumokokken

Mykoplasmen

Haemophilus influenzae

Staphylococcus aureus

Escherichia coli

Klebsiella pneumoniae

MRSA

multiresistente

Enterobacteriaceae

Pseudomonas aeruginosa

Stenotrophomonas maltophilia

Acinetobacter baumannii

Tag 5 / 6 / 7

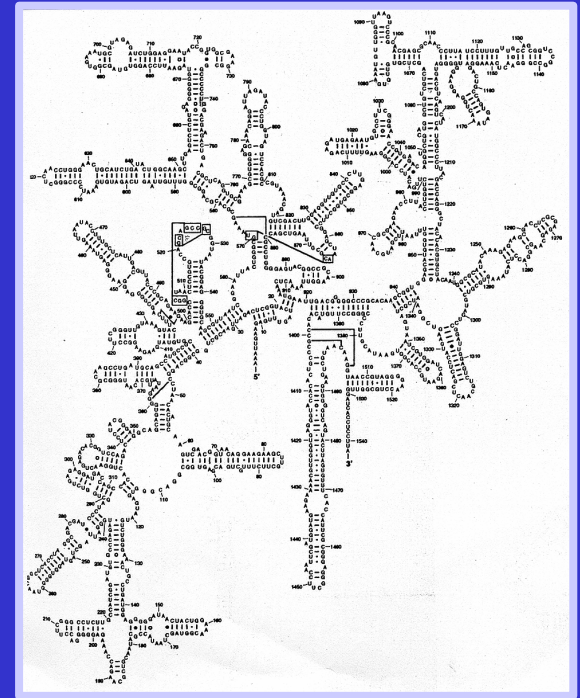
Zeit



Ein Wechsel des Antibiotikums bei der Behandlung der Pneumonie im Falle des Vorliegens resistenter Erreger ist mit erhöhter Mortalität verbunden , die schnelle Diagnostik ist wichtig für die Auswahl des richtigen Antibiotikums !

Speziesdiagnostik bei Staphylokokken

Bakterielle 16S rRNA



Spezies

Sequenz

S. aureus

CGAA C**GG** ACG AG**A** AGC TTG C**TT** CTC T GAT

S. epidermidis

CGAA CAG ACG AGG AGC TTG CTC CTC T GAC

S. capitis

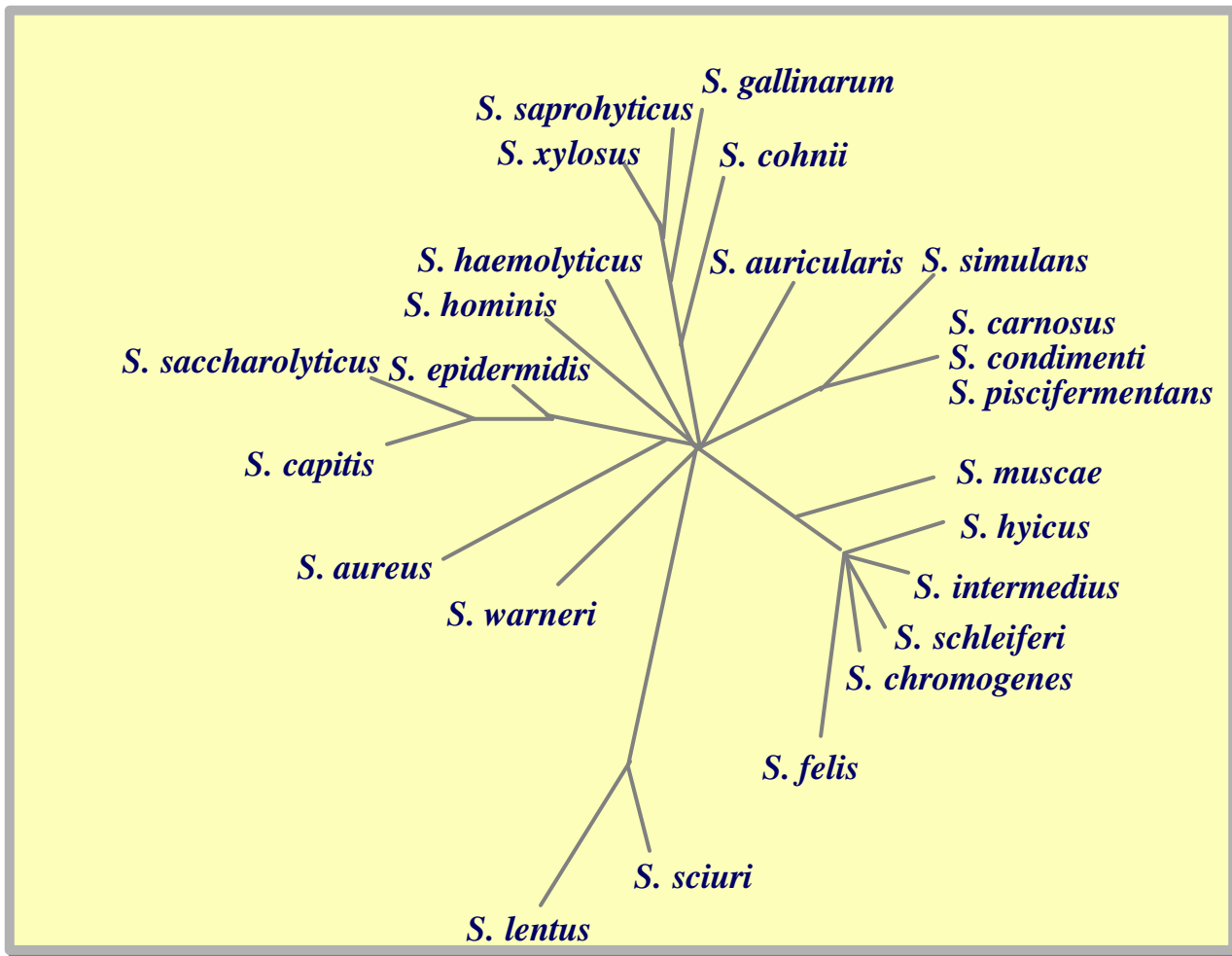
CGAA CAG ACG AGG AGC TTG CTC CTC T GAC

S. warneri

CGAA CAG ATA AGG AGC TTG CTC CTT T GAC

S. haemolyticus

CGAA CAG ATA AGG AGC TTG CTC CTT T GAC



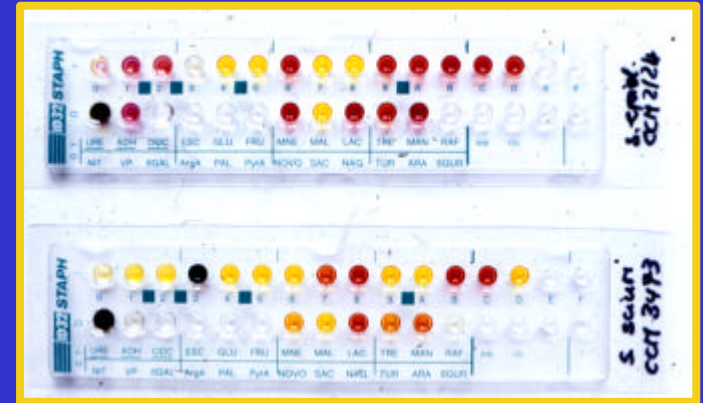
Phylogenetic relationship of staphylococci reflected by the 16 S rRNA based tree

Speziesdiagnostik

konventionell

anhand **biochemischer** Reaktionen
(Enzymnachweis, „Bunte Reihe“)

- Metabolisierung v. Kohlehydraten, Alkoholen und org. Säuren
- DNase, Koagulase (für *S. aureus*)



molekular

anhand **speziesspezifischer Sequenzen**

- 16s rRNA (Sequenzierung)
- andere spez. Sequenzen (PCR-Nachweis)
für *S. aureus* z. B. *femA*, *coa*, *Sau*-spezifische Sequenz
(Martineau et al.)

Unterscheidung

S. aureus -

Koagulase-negative
Staphylokokken

PCR für:

Sau-spez. Sequenz
(Martineau et al.)

+

-

DNase

++

-

(+ bei *S. intermedius*)

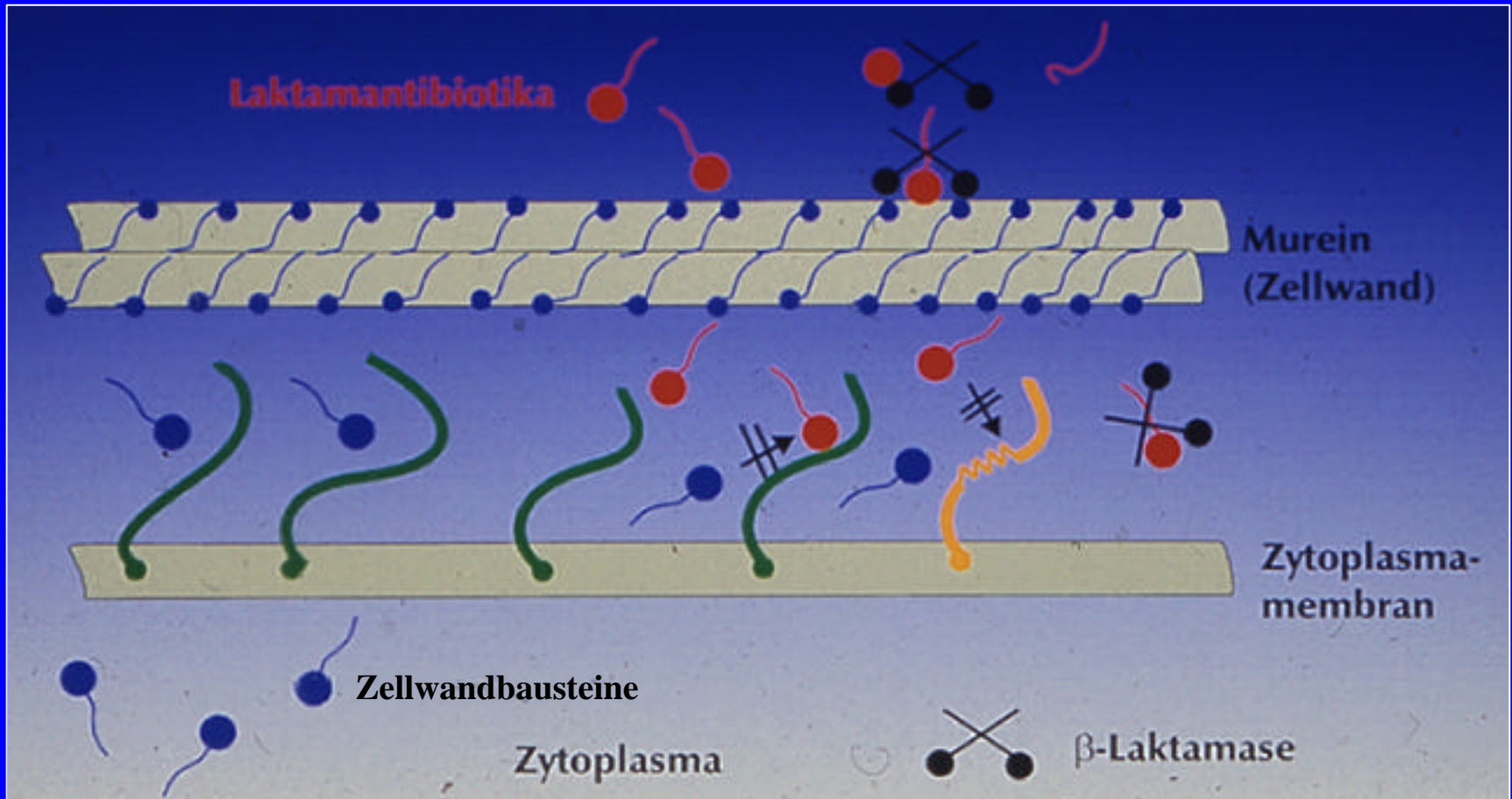
fem (A, B, C)

+

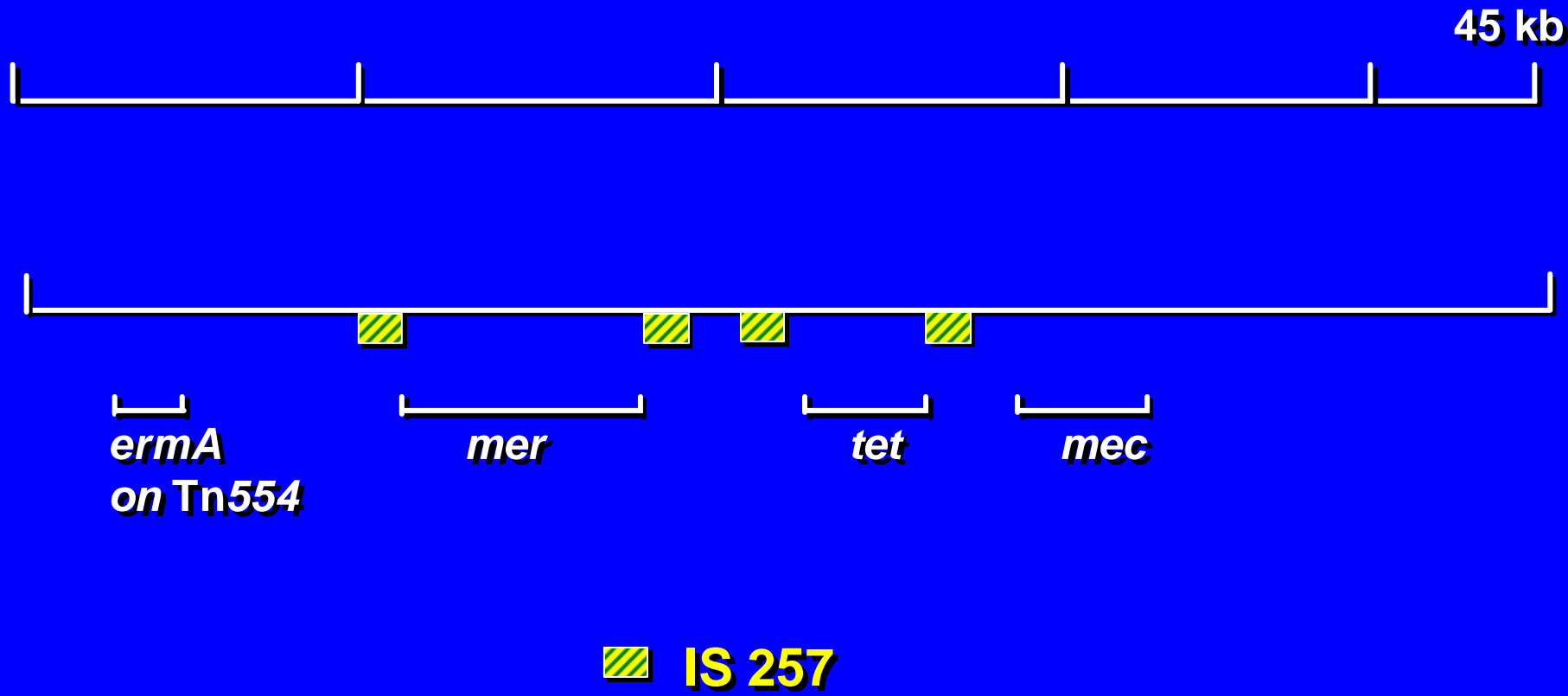
-

(??? bei anderen als
S. epidermidis)

Schema der Wirkungsweise von β -Laktamantibiotika auf grampositive Bakterien und der Resistenz gegen β -Laktamaseantibiotika



mec associated DNA in ANS 46

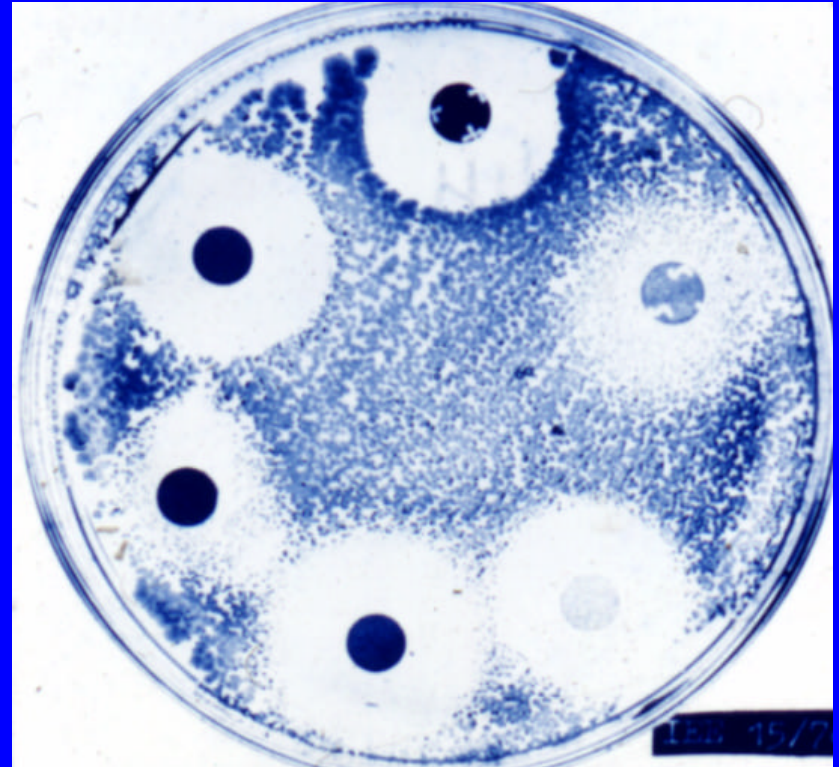


Bestimmung der Chemotherapeutikasensibilität

Methode:

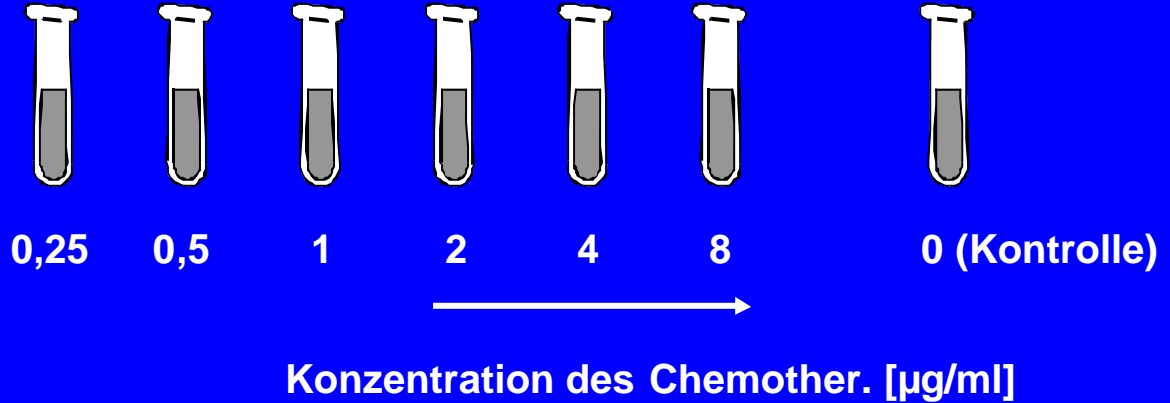
Bestimmung der
Empfindlichkeit des
Stammes gegenüber
Chemotherapeutika

Ergebnis: Resistogramm
/Antibiogramm

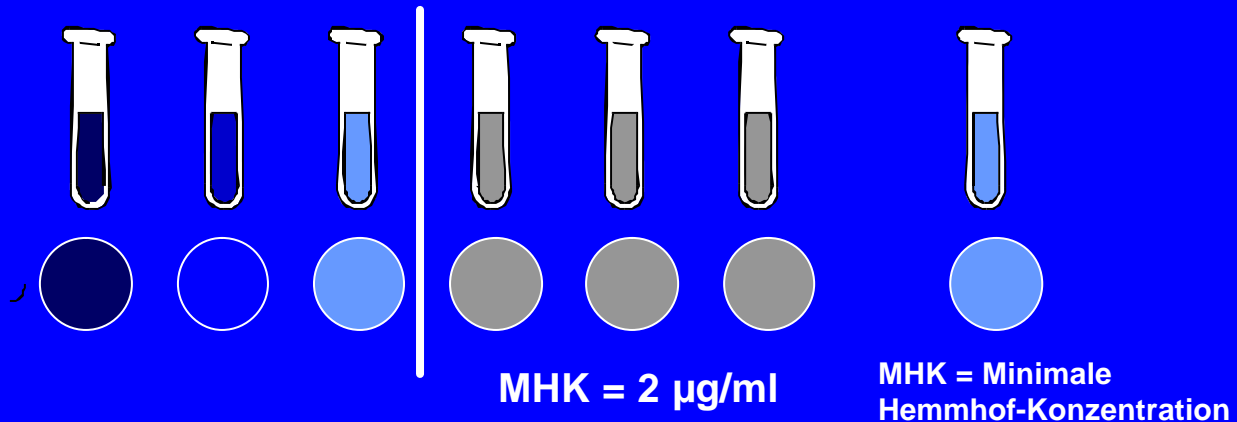


Durchführung der Resistenzbestimmung

1. Verdünnungsteste 1.1. Reihenverdünnungstest



Vorgang:
Beimpfen
-
Bebrüten
(16 h, 37 °C)
-
Ablesen



Phänotypische Methoden

Phoenix – Instrument



Phänotypische Methoden

Phoenix – Panels

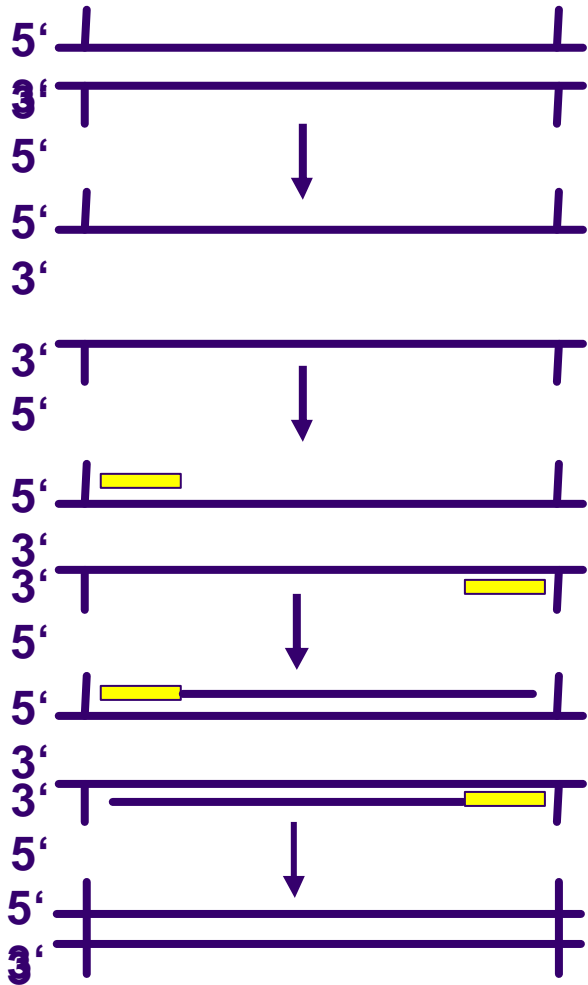


Phänotypische Methoden

Vorteile einer schnellen Bakteriologie

	Befund gl. Tag (%)	Nach- weiszeit (h)	Morta- lität (%)	Aufenthalts- dauer (d)	Kosten (\$)
MicroScan	Doern, G. et al. 1994 JCM 32: 1757-1762				
Gruppe I (über Nacht)	0	19.6	15.3	kein Unterschied	19.256
Gruppe II (gl. Tag)	keine Angaben (ca. 70%)	11.3 (p<0.0005)	8.8	kein Unterschied	15.062
VITEK 2	Barenfanger K. et al. 1999 JCM 37: 1415-1418				
Gruppe III (währ. Arb.zeit)	60	Turnaround Time 44.4	9.04	12.6	15.622
Gruppe IV (Val. bis 20:30)	95	38.5	9.16	11.1	13.429

PCR-Prinzip



Ausgangs-DNA (template)
Wärme-Denaturierung (72 °C)

Anlagern spezifischer primer
(annealing; 55 °C üblicherweise)

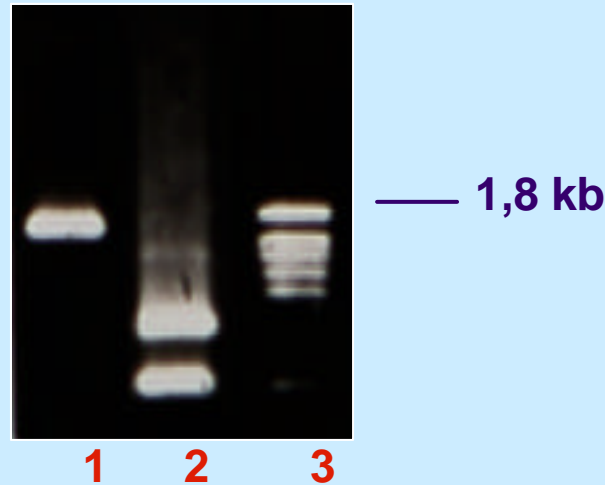
Synthese der komplementären DNA-Stränge
(72 °C)

weitere Zyklen mit Denaturierung, Annealing
und Synthese führen zu einer Amplifikation
des Genabschnitts in vielen Kopien
(üblicherweise 30 Zyklen)

„Klassische“ PCR zum Nachweis der Oxacillin-Resistenz (Zeitdauer ausgehend von der Primärkultur: 6 – 8 h)

mecA kodierte Oxacillin (Methicillin)-Resistenz bei *S. aureus*

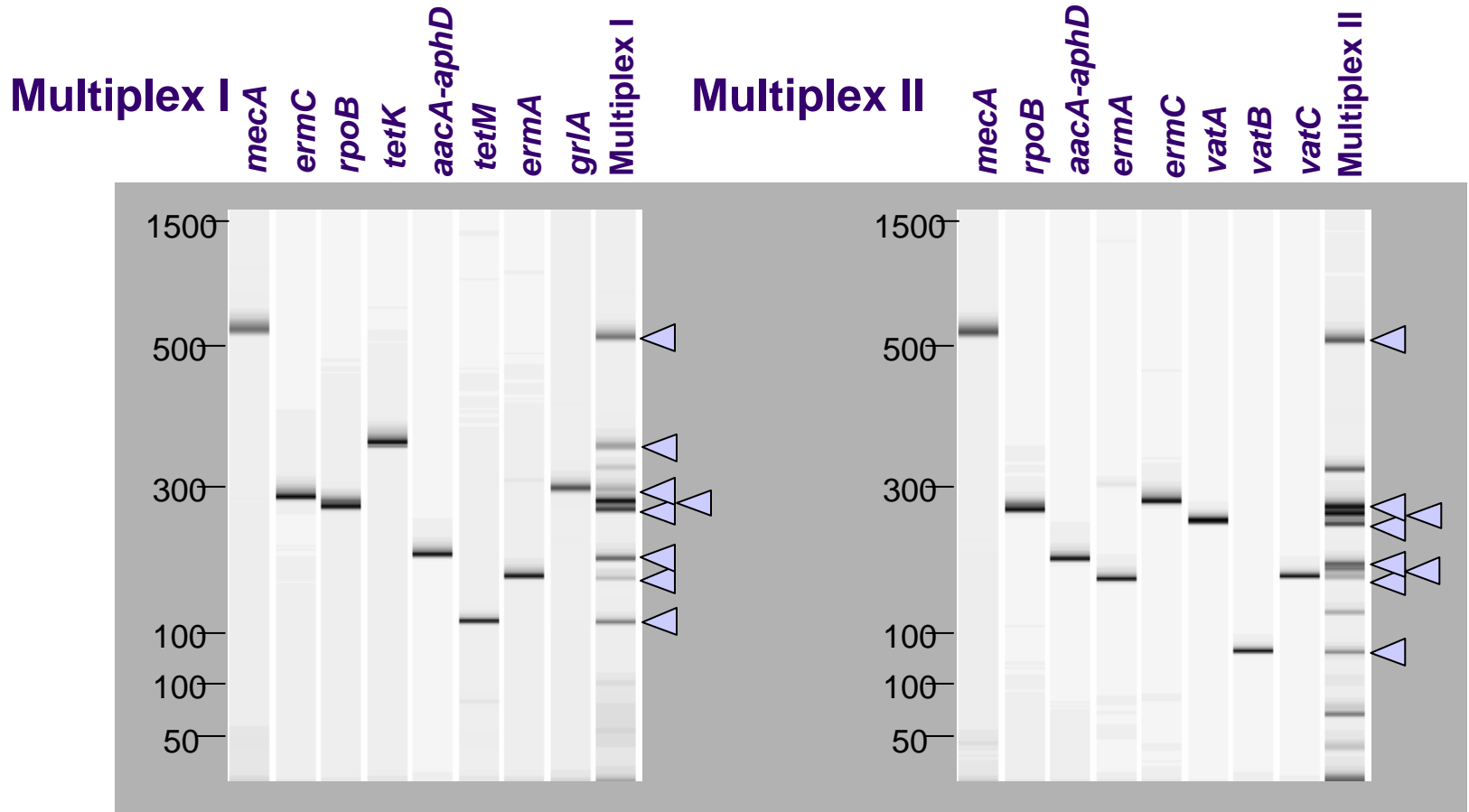
- Wachstum in TSB mit 2 mg/l Oxacillin und 2 % NaCl (Einsaat - 10^7 cfu)
- positive PCR für *mecA*



- 1 PCR Produkt
- 2 *AclI*-digest des PCR Produktes
- 3 Mol. Masse-Standard

Multiplex-PCR für Resistenzgene bei *Staphylococcus aureus*

Auftrennen der PCR-Produkte in 30 min mittels Kapillarelektrophorese
(Bioanalyzer 7500 von Agilent Techn., Gesamtzeitdauer von Primärkultur: ~ 3 h !)

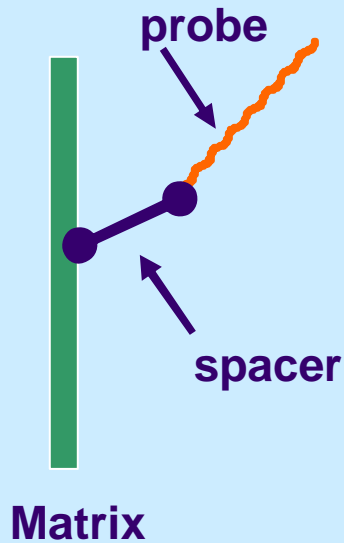


Pfeile kennzeichnen spezifische Banden (Nachweis im Southern Blot).

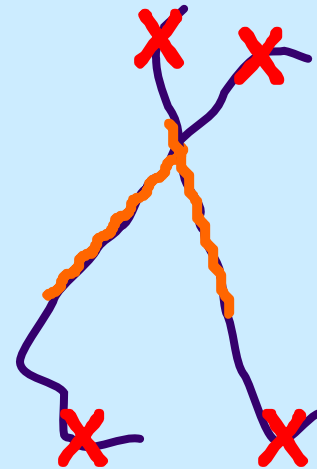
PCR-Produkte: *mecA*: 532 bp, *erm C*: 295 bp, *rpoB*: 271 bp, *tetK*: 360 bp, *gen*: 227 bp, *tetM*: 158 bp, *ermA*: 215 bp, *grlA*: 289 bp, *vatA*: 268 bp, *vatB*: 136 bp, *vatC*: 212 bp

Array-Technologie - reverser Blot

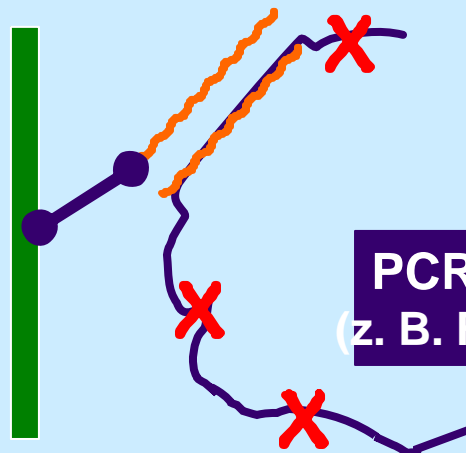
kurze capture probes
(20 - 24 Nukleotide)



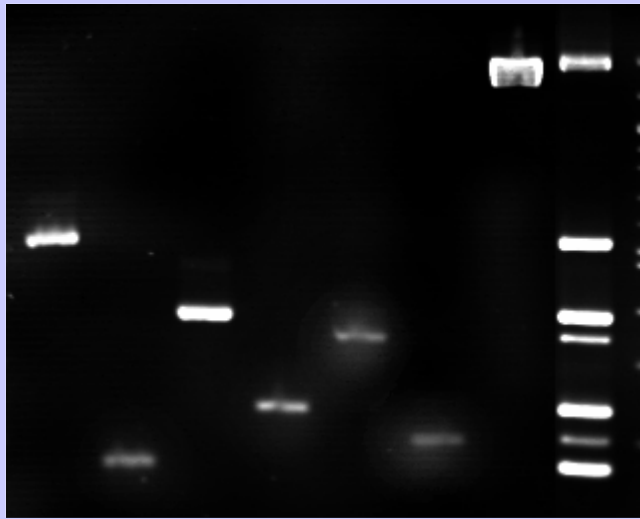
PCR-Produkte
(100-200 Basenpaare)



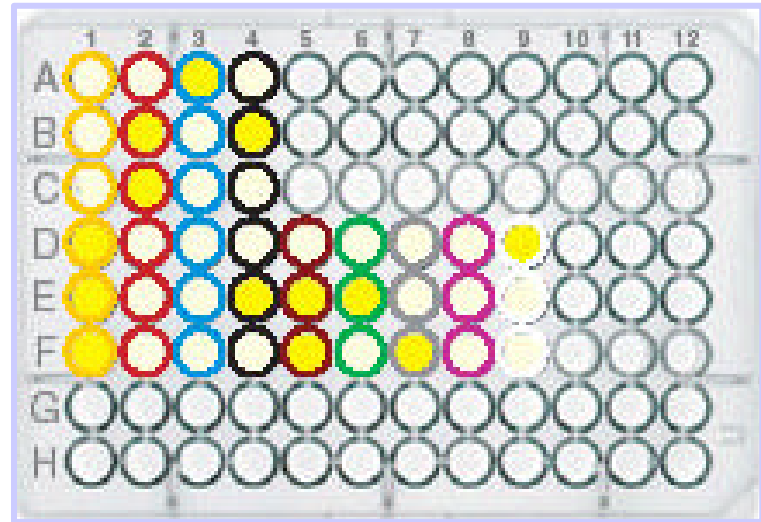
PCR-Produkte, x markiert
(z. B. Fluoreszenz, Digoxigenin)



PCR von Resistenzgenen und reverser blot, Makromaßstab
Zeitdauer: von der Primärkultur ausgehend ~ 3h, Nachweis direkt aus
Originalmaterial befindet sich gegenwärtig in Erprobung



PCR



PCR + reverser Blot

- GenoType® MRSA (HAYN)
- amplex Staphyloresist Testkit (BAG)

HINWEIS :

Bisher erhältliche Makro- und Mikroarrays detizieren *mecA* und die Species-spezifischen DNS-Sequenzen getrennt voneinander.

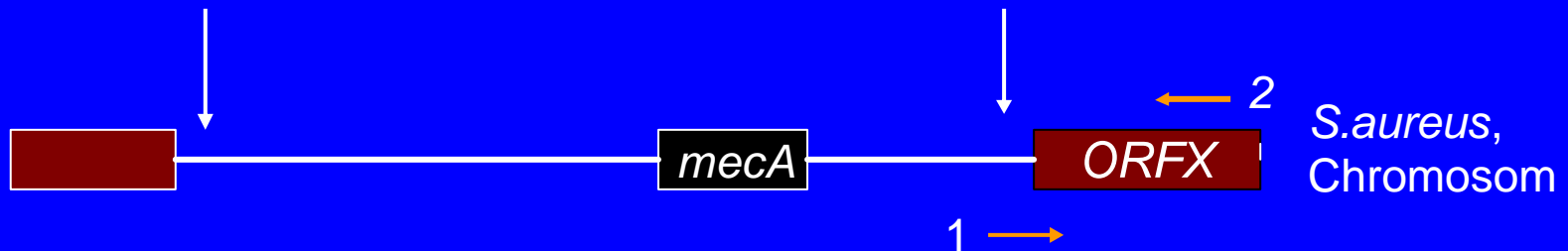
Deshalb besteht bei Mischkulturen von *S.aureus* ohne *mecA* und von oxacilinresistenten KNS (auch hier *mecA*) die Möglichkeit des falsch positiven MRSA Nachweises, wenn direkt vom klinischen Original-Material ausgegangen wird (Nachtstellung aus in vitro Kultur !)

Gemeinsamer Nachweis von *S.aureus* und von *mecA*

(C.Cuny et al. ,Europäisches Patent angemeldet)

linkes inverted repeat
ausgeprägter Polymorphismus
bei verschiedenen *SCCmec*

rechtes inverted repeat
begrenzter Polymorphismus
bei verschiedenen *SCCmec*



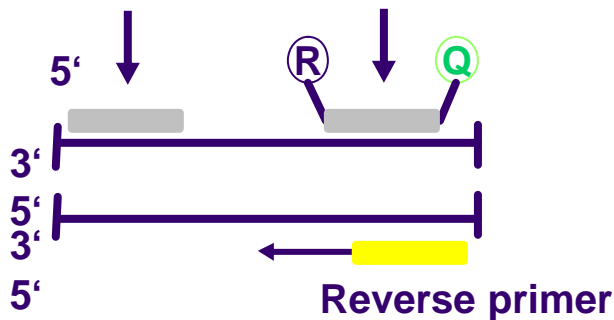
staphylococcal cassette chromosom *mec*
(*SCCmec*), mindestens 4 verschiedene Typen

PCR mit primern → 1 und 2, primer 1 erfährt sowohl *SCCmec* in einer weitgehend homologen Sequenz als auch *ORFX*

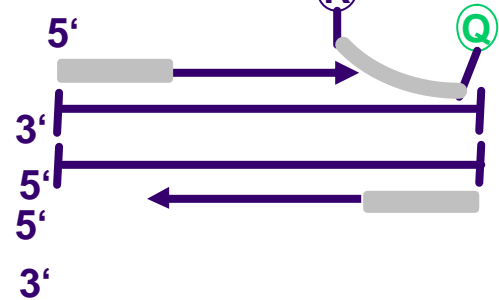
Prinzip der real time PCR (mit TacMan Polymerase)

Zeitdauer für Nachweis von der Primärkultur ausgehend: ~ 2 h

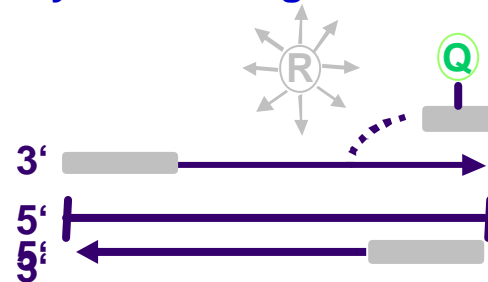
Annealing, Polymerisierung
Vorwärtsprimer TacMan probe



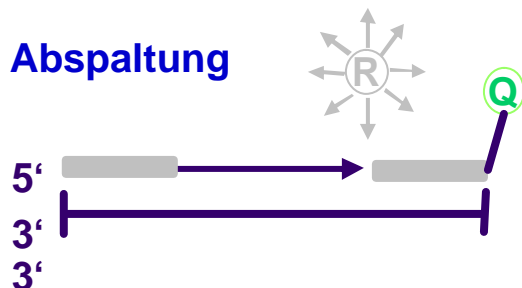
Strangverdrängung



Polymerisierung beendet



Abspaltung



R = Fluorogene Gruppe, deren Anregung durch **Q** unterdrückt wird, nach Abspaltung von **R** fluoresziert **Q** und zeigt damit eine DNA-Synthese in dem Sequenzbereich an, in dem die TacMan-Probe gebunden hatte.

real time PCR ist kostenintensiv: benötigt werden primer und TacMan-probe.

Chips sind in aller Munde!

Microarray

Expressionsanalysen

DNA-Chips

Drug Discovery

Oligonukleotidarray

Speziesidentifikation

miniaturisierte
Hybridisierungssassays

Sequenzierung

Hochdurchsatzmethode

Resistenzdetektion

SNP-Detektion

Virulenzdetektion



Microarray - Was ist das?

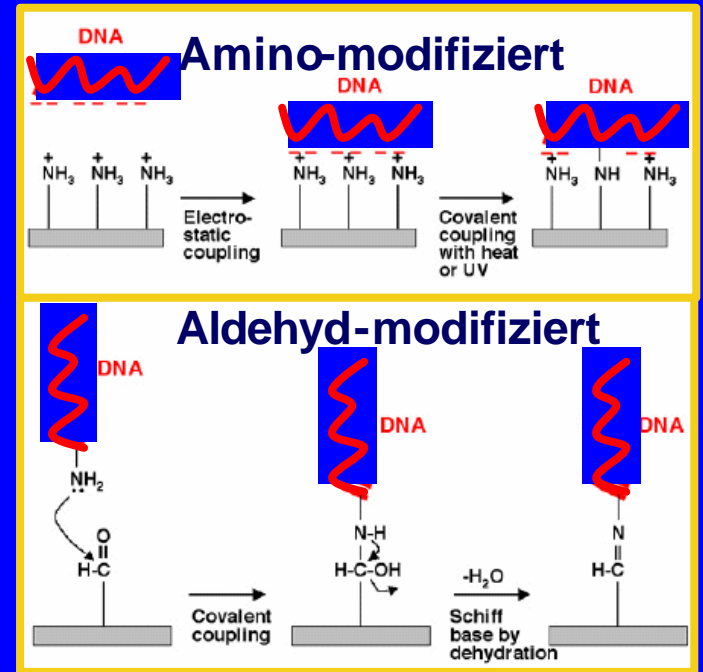
Glas-Slides

- Amino-modifiziert
- Aldehyd-modifiziert
- Epoxy-modifiziert
- Polylysin-beschichtet

DNA (Capture probes)

- PCR-Produkte
- Oligonukleotide (ggf. NH_2 -modifiziert)

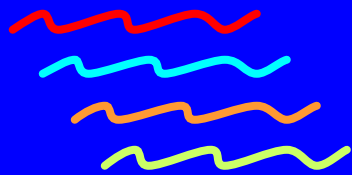
„Spotting“



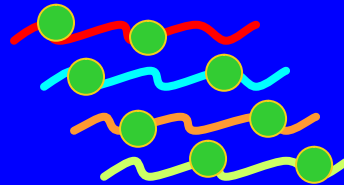
MicroGrid II, Biorobotics

Microarray - Wie geht das?

DNA/RNA

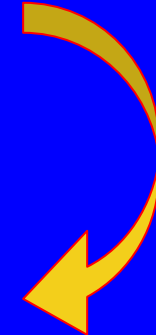


Fluoreszenz-
labelling

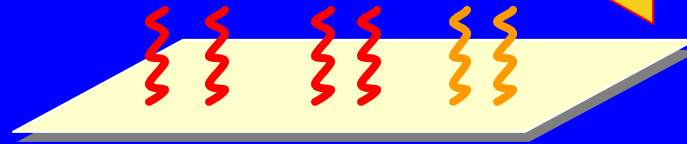


Target

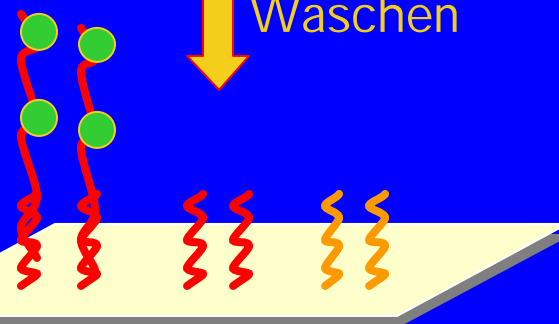
Hybridisierung



Microarray mit
Capture probes

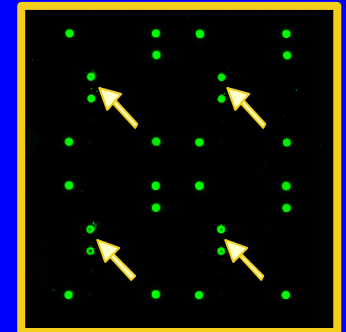


Waschen



Reader

ArrayWorx,
Applied Precision



Das grundsätzliche Problem bei molekularer Diagnostik direkt vom Untersuchungsmaterial: **Mischkulturen**

- bei ~ 30 % aller Proben aus Bronchialsekreten und Urinproben werden mehrere Erregerspecies isoliert, neben dem eigentlichen Erreger auch Besiedler, z.B. Koagulase-negative Staphylokokken und Enterokokken aus Bronchialsekret.
deshalb:
- Molekulares „Vorsortieren“ der Erreger durch Immuno-beads (begrenzte Anzahl an Species gleichzeitig separierbar) oder durch Polynukleotid-Sonden, die an r-RNA spezifisch binden

Die Realität:

Entwicklung von chips für klinisch wichtige Gruppen von Infektionen:

Beispiele:

- „Intensiv-Therapie chip“: Taxonomie der wichtigsten Erreger der nosokomialen Sepsis und der Beatmungspneumonie
 - Detektion von: MRSA (einschließl. Resistenzgenen, Gentamicin, Chinolone, Makrolide, Rifampicin)
ESBL bei Gram-negativen, Chinolonresistenz
Zink-Laktamasen (Carbapeneme)
- „Ambulant-erworbene Pneumonie chip“: Taxonomie für *St. pneumoniae*, *Haemophilus* spp., *Moraxella* *chattbarolis*
 - Detektion von TEM-Laktamasen, PBPX-Mosaikgenen, *mef*, *ermB*, *ere*.

Konsortium im cluster des BMBF-Projektes (Genomik) :

Robert Koch Institut
Bereich Wernigerode

*Christa Cuny, Christiane Kettlitz
Birgit Strommenger,
Guido Werner, **Wolfgang Witte***

Institut für Techn. Biochemie
Universität Stuttgart

*Till Bachmann, Beate Rössle-
Lorch, **Rolf Schmid***

Robert Bosch Krankenhaus
Stuttgart

***Cornelius Knabbe,**
Milorad Susa*

Institut f. Mikrobiologie
Universität München

*Kathrin Fichtl, **Wolfgang Ludwig***