

Etablierung einer Multiplex-PCR mit Aussagen zur Taxonomie, Pathogenität und Methicillin-Resistenz bei Staphylokokken

Multiplex-PCR for Specific Information Concerning Taxonomy, Pathogenicity and Methicillin Resistance of Staphylococci

F.-J. Schmitz^{1,2}, Basia Hofmann¹, Marion Finken-Eigen³, Helga Idel⁴, U. Hadding¹, H.-P. Heinz¹ und K. Köhrer³

Zusammenfassung: Amplifikationstechniken wie die PCR ermöglichen in der diagnostischen Mikrobiologie nicht nur den sensitiven und spezifischen Nachweis verschiedener Mikroorganismen, sondern sie erlauben darüber hinaus auch die Detektion spezifischer Resistenzgene. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird eine Multiplex-PCR vorgestellt, die den Einsatz einzelner Kolonien direkt von der Agarplatte ohne vorherige Aufarbeitung in den PCR-Assay möglich macht. Mit Hilfe dieses Verfahrens können in einem einzigen Ansatz innerhalb von 4 Stunden Aussagen zur Taxonomie, Pathogenität sowie zum Resistenzverhalten von Staphylokokken gemacht werden. Die Verwendung geeigneter Primer ermöglicht den Nachweis spezifischer PCR-Produkte zur Erfassung von Eubakterien im phylogenetischen Sinne, zur Detektion von Staphylokokken sowie den Nachweis des Koagulase-*[coa]* und des Methicillin-Resistenz-Gens *[mecA]*. Zur Überprüfung der Sensitivität, Spezifität und praktischen Handhabbarkeit des Verfahrens wurden insgesamt 736 Eubakterien und 20 *Candida albicans*-Stämme zunächst mit Hilfe einzelner Primer-Paare und danach in einer kombinierten Multiplex-PCR untersucht. Das *mecA*-Gen konnte bei 98% der Methicillin-resistenten Staphylokokken und das *coa*-Gen ausschließlich in den *S. aureus*-Isolaten nachgewiesen werden. Ebenso wurde das für Eubakterien sowie für Staphylokokken-spezifische 16S rRNA PCR-Produkt in 100% der Fälle richtig detektiert. Die vorgestellte Multiplex-PCR gibt so sehr schnell und zuverlässig Informationen nicht nur hinsichtlich der

Identität des Keims, sondern auch Anhaltspunkte für das therapeutische Management.

Schlüsselwörter: Gene, Bakterielle; Methicillinresistenz/Genetik; Polymerase chain reaction/Methodik; RNA, Ribosomale, 16S; Staphylococcus.

Summary: The use of amplification techniques such as the PCR in modern diagnostic microbiology not only allows for a sensitive and specific identification of various microorganisms but also for the detection of specific resistance genes. In the present study a multiplex-PCR will be introduced allowing the use of single bacterial colonies directly from agar plates into the PCR assay without preceding preparation. This procedure generates information concerning taxonomy, pathogenicity and pattern of resistance of staphylococci within 4 hours in one single approach. Eubacteria and staphylococci were identified by 16S rRNA specific PCR products. Specific primers were used for the detection of the *coa* and the *mecA* gene. The multiplex-PCR is able to offer reliable information very quickly with regard to the identity of the germ and can also give essential clues in respect to the therapeutical management. To analyse sensitivity and specificity of the amplification products, 736 eubacteria and 20 *Candida albicans* strains were tested. The specific 16S rRNA PCR product for eubacteria and staphylococci, respectively, was found in 100%. With a sensitivity and specificity of 100% the *coa*-gene could be identified in all *S. aureus* strains having been tested. Concerning the *mecA*-gene in methicillin-resistant staphylococci, sensitivity and specificity were 98%. The presented multiplex procedure is therefore a sufficient complementary method in microbiological laboratories.

Keywords: Genes, Bacterial; Methicillin Resistance/genetics; Polymerase Chain Reaction/methods; RNA, Ribosomal, 16S; Staphylococcus.

¹ Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. med. U. Hadding)

² Korrespondenzadresse: Dr. med. Franz-Josef Schmitz, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsstraße 1, Geb. 22.21, 40225 Düsseldorf. Fax: +49-211-811-5323

³ Molekularbiologisches Zentrallabor im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (Leiter: Dr. rer. nat. Karl Köhrer)

⁴ Institut für Hygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Direktorin: Prof. Dr. med. H. Idel)

Eingegangen: 18. Apr. 1996 / Angenommen: 1. Aug. 1996

Genamplifikationstechniken werden in der Medizinischen Mikrobiologie immer häufiger diagnostisch genutzt. Mit ihrer Hilfe gelingt nicht nur der

sensitive und spezifische Nachweis verschiedener Mikroorganismen in Patientenmaterial, sondern sie ermöglichen darüber hinaus auch die Detektion spezifischer Resistenzgene [1].

In diesem Zusammenhang kommt aufgrund der wachsenden Bedeutung Methicillin-resistenter Staphylokokken [2], insbesondere im Rahmen nosokomialer Infektionen, dem schnellen und zuverlässigen Nachweis dieser Keime eine zunehmende Relevanz zu, um geeignete therapeutische und präventive krankenhaushygienische Maßnahmen rasch und gezielt einleiten zu können.

Zwar werden nach wie vor die standardisierten Empfindlichkeitsuntersuchungen (Agardiffusion, Mikrodilution oder Einsatz von Screening-Platten) als die Methoden der Wahl betrachtet, jedoch sollte ein molekularbiologischer Nachweis von Resistenzgenen als alternative bzw. ergänzende Methode in Betracht gezogen werden, zumal in Grenzfällen die klassischen Verfahren nicht immer zuverlässig sind. So ist u.a. die phänotypische Expression der Methicillin-Resistenz zum Teil von verschiedenen Testbedingungen, wie Inkubationstemperatur, pH und Salzkonzentration des Mediums, abhängig [3, 4].

In Hybridisierungsuntersuchungen mit Gensonden konnte gezeigt werden, daß das *mecA*-Gen in nahezu allen Methicillin-resistenten Staphylokokken nachweisbar ist [5]. Neben dem *mecA*-Gen sind aber noch andere chromosomal determinierte Faktoren notwendig, um eine phänotypische Methicillin-Resistenz zu exprimieren. Erwähnt seien in diesem Zusammenhang neben dem *mecR*-Gen die *femA-femB*-Operone, die als Regulator-Gene essentiell für die Expression der Methicillin-Resistenz sind [6, 7].

In verschiedenen Studien konnte der Nutzen der PCR-Technik mit Nachweis des *mecA*-Gens zur Detektion einer Methicillin-Resistenz in Staphylokokken gezeigt werden [8-10]. Nahezu alle Autoren führten vor Beginn des Assays eine DNA-Extraktion und eine Vorinkubation mit Enzymen durch. Im Gegensatz dazu setzten nur Hedin und Löfdahl [11] *S. epidermidis*-Kolonien direkt von der Agarplatte in den PCR-Ansatz ein, ein Vorteil, der sich im Rahmen des Routineablaufs im Labor als günstig erweist.

Die Feststellung der Methicillin-Resistenz ist natürlich nur im Zusammenhang mit der kompletten Spezies-Differenzierung und dem Nachweis weiterer Pathogenitätskriterien, wie z.B. der Koagulase, interessant. So dient in den mikrobiologischen Laboratorien das klassische Verfahren der Koagulase-Bildung (kodiert durch das *coa*-Gen) zur Differenzierung zwischen pathogenen *S. aureus*- und anderen Staphylokokken-Isolaten.

In den Arbeiten von Vannuffel et al. [12] und Geha et al. [13] wurden mit Hilfe einer Multiplex-PCR zum

einen parallel das *mecA*-, das *femA*-Gen bzw. eine Staphylokokken-spezifische Sequenz sowie zum anderen das *mecA*-Gen und 16S rRNA-Gene amplifiziert. Doch auch in diesen Ansätzen ist eine Vorinkubation und eine DNA-Extraktion aus den zu untersuchenden Staphylokokken-Kolonien notwendig. Legt man diese Arbeiten zugrunde, so bietet sich eine kombinierte Multiplex-PCR aus Kolonien direkt von der Agarplatte als alternatives bzw. ergänzendes molekularbiologisches Verfahren zur Keimidentifikation und Resistenzbestimmung an.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wird eine Multiplex-PCR vorgestellt und evaluiert, die den Einsatz einzelner Kolonien direkt von der Agarplatte in den PCR-Assay ermöglicht.

Die Verwendung geeigneter Primer ermöglicht den Nachweis spezifischer PCR-Produkte für 1) Eubakterien im phylogenetischen Sinne („universelle“ 16S rRNA-Primer), 2) Staphylokokken („Staphylokokken-spezifische“ 16S rRNA-Primer), 3) das *coa*-Gen (*coa*-Gen-Primer) und 4) das *mecA*-Gen (*mecA*-Gen-Primer).

Mit Hilfe dieses Verfahrens kann innerhalb von 4 Stunden ein molekulargenetisches „Dendrogramm“ erstellt werden, das ergänzend zu den ursprünglichen phänomenologischen Taxonomie-, Pathogenitäts- und Differenzierungsbegriffen eingesetzt werden kann.

Material und Methoden

Klinisches Untersuchungsmaterial

Für die Etablierung und Überprüfung der PCR-Ansätze hinsichtlich Sensitivität und Spezifität wurden 686 Staphylokokken-Stämme, isoliert aus Blutkulturen, Punktionen, Tracheal- und Bronchialsekreten sowie Wundabstrichen, getestet. Pro Patient wurde nur ein Isolat eingesetzt, um eine möglichst große Vielfalt zu gewährleisten. 586 untersuchte Isolate stammten von Patienten der Uniklinik Düsseldorf bzw. aus peripheren Krankenhäusern, die Untersuchungsmaterial in das hiesige Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie einsenden. Weitere 100 Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme einer internationalen Kollektion, die in 7 verschiedenen Ländern isoliert werden konnten, wurden freundlicherweise von der Fa. Hoffmann LaRoche (Basel) zur Verfügung gestellt. Die untersuchten Staphylokokken sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Identifikationsreaktionen

Die Staphylokokken wurden zur Verifizierung der Spezieszuordnung diversen Verfahren unterzogen (s. Tabelle 2). Ansätze mit bekannten Koagulase-positiven, Methicillin-sensiblen bzw. -resistenten *S. aureus*-ATCC-Stämmen (Nr. 12600, 13565, 19095, 25923, 29213, 33591, 33592 und 33593) sowie der Koagulase-negative, Methicillin-resistente *S. epidermidis*-ATCC-Stamm (Nr. 27626) wurden als Kontrollen verwendet.

Nicht standardisierte Abkürzungen: kB, Kilobasen; KNS, Koagulase-negative Staphylokokken; MRSA, Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*; pb, base pair; PCR, polymerase chain reaction.

Tabelle 1 Übersicht über die getesteten Staphylokokken-Isolate

Keime	Methicillin-sensibel	Methicillin-resistent	Herkunft
<i>S. aureus</i>	n=195	n=193 n=26 n=23 n=11 n=5 n=13 n=14 n=8	Düsseldorf Japan Brasilien Schweiz Sri Lanka Spanien England Ungarn
<i>S. epidermidis</i>	n=50	n=54	Düsseldorf
<i>S. simulans</i>	n=11	n=10	Düsseldorf
<i>S. haemolyticus</i>	n=12	n=10	Düsseldorf
<i>S. warneri</i>	n=2		Düsseldorf
<i>S. auricularis</i>	n=6	n=7	Düsseldorf
<i>S. sciuri</i>	n=4	n=4	Düsseldorf
<i>S. hominis</i>	n=2	n=3	Düsseldorf
<i>S. capitis</i>	n=3	n=3	Düsseldorf
<i>S. saprophyticus</i>	n=2	n=3	Düsseldorf
<i>S. cohnii</i>	n=1	n=1	Düsseldorf
<i>S. lugdunensis</i>	n=4	n=4	Düsseldorf
<i>S. schleiferi</i>	n=1	n=1	Düsseldorf

Resistenztestung

Die separate Resistenztestung gegenüber Oxacillin wurde mittels Agar-Diffusionstest (nach DIN 58940) [14] auf Mueller-Hinton-Agar (Zusatz von 2% NaCl) unter Verwendung von Testblättchen (5 µg Oxacillin pro Testblättchen, Fa. Becton Dickinson) durchgeführt. Die beimpften Agar-Platten wurden für 48 Stunden bei 30 °C bebrütet.

Da der international gebräuchliche Terminus „Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*“ ist, wurde im Text MRSA verwendet, obgleich die eigentliche Resistenztestung gegenüber Oxacillin erfolgte.

Auswahl der Primer

Basierend auf publizierten Gensequenzanalysen für 16S rRNA-Genbereiche [15, 16], das *coa*- [17] sowie für das *mecA*-Gen [18] wurden die im Rahmen dieser Untersuchung eingesetzten Primer ausgewählt und von der Fa. Pharmacia Biotech synthetisiert.

Folgende Primer-Paare wurden zunächst in singulären PCR-Ansätzen ausgetestet und schließlich miteinander im Multiplex-PCR-Assay kombiniert eingesetzt.

16S rRNA-Gen-PCR für Eubakterien:

5'-Primer: 1170-[5']-AACTGGAGGAAGGTGGG-GAT-[3']-1189 (20-mer) [RW01, [15]]

3'-Primer: 1521-[5']-AGGAGGTGATCCAACCG-CA-[3']-1539 (19-mer) [DG74, [15]]

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

16S rRNA-Gen-PCR für Staphylokokken:

5'-Primer: 294-[5']-GCCGGTGGAGTAACCTTT-TAGGAGC-[3']-318 (25-mer) [RDR327, [15, 16]]

Tabelle 2 Übersicht über die eingesetzten Verfahren zur Verifizierung der Spezieszuordnung bzw. zur biochemischen Identifikation

1. Katalase
2. Röhrchenkoagulase (Bacto Coagulase Plasma EDTA-Test®, Fa. Difco, Augsburg)
3. Nuklease (DNase) (Fa. Unipath, Wesel)
4. anaerobé Mannitspaltung
5. biochemische Identifikation (api-System [api Staph®], Fa. bioMérieux, Nürtingen)

3'-Primer: 1522-[5']-AGGAGGTGATCCAACCG-CA-[3']-1540 (19-mer) [DG74, [15]] (identisch mit dem o.g. 3'-Primer zur Amplifikation der 16S rRNA-Gensequenzen von Eubakterien)

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

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

5'-Primer: 1520-[5']-GCTTCTCAATATGGTCC-GAG-[3']-1539 (20-mer) [17]

3'-Primer: 1631-[5']-CTTGTGAATCTTGGTCT-CGC-[3']-1651 (21-mer) [17]

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

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

5'-Primer: 37-[5']-GTTGTAGTTGTCGGGTTTGG-[3']-66 (20-mer) [18]

3'-Primer: 178-[5']-CGGACGTTTCAGTCATTTCTAC-[3']-198 (21-mer) [18]

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

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

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

Multiplex-PCR

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

Der Reaktionsansatz für jede Multiplex-PCR hatte folgende Zusammensetzung:

10 mmol/l Tris-HCl (pH 8,3), 50 mmol/l KCl, 2,5 mmol/l MgCl₂, 100 µmol/l dNTPs sowie je 0,4 µMol von jedem Primer.

5 Units AmpliTaq-DNA Polymerase® wurden nach der Hälfte der 10-minütigen Denaturierungszeit bei

94 °C in jedes PCR-Reaktionsgefäß hinzupipettiert (hot start). Die Multiplex-PCR wurde in einem GeneAmp PCR System 2400® (Fa. Perkin-Elmer) durchgeführt.

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

Agarose-Gel-Elektrophorese

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

Sensitivitätsprüfung

Zur Überprüfung der Sensitivität der eingesetzten Primer-Paare wurden zunächst alle o.g. eindeutig definierten Staphylokokken-Isolate mit jedem PCR-System solitär untersucht, bevor anschließend die Kombination der Primer-Paare im Rahmen der Multiplex-PCR erfolgte. Es wurde geprüft, ob alle PCR-Produkte, die theoretisch amplifiziert und detektierbar sein sollten, auch tatsächlich entstanden – zunächst mit jedem Primer-Paar einzeln und schließlich als kombinierte Multiplex-PCR.

Spezifitätsprüfung

Zur Überprüfung der Spezifität der eingesetzten Pri-

Tabelle 3 Übersicht über die Isolate zur Spezifitätsprüfung des Multiplex-PCR-Assays

- Enterokokken spp. (n=10)
- *Streptococcus pneumoniae* (n=10)
- *Escherichia coli* (n=5)
- *Klebsiella* spp. (n=5)
- *Enterobacter* spp. (n=10)
- *Proteus* spp. (n=5)
- *Salmonella* spp. (n=5)
- *Candida albicans* (n=10)

mer-Paare wurden neben den 695 Staphylokokken zusätzlich 50 andere gram-positive und gram-negative Bakterien aus klinischem Probenmaterial des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Virologie zunächst mit jedem Primer-Paar einzeln und schließlich mit Hilfe der Multiplex-PCR analysiert. Zur weiteren Überprüfung der Spezifität der „universellen“ 16S rRNA-Primer wurden auch Kolonien von n=10 *Candida albicans*-Isolaten im PCR-Assay getestet. Die im Rahmen der Spezifitätsprüfung untersuchten Bakterien sowie *Candida albicans* sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Reproduzierbarkeit

Zur Testung der Reproduzierbarkeit wurden in Intra- und Inter-Assay-Analysen je drei Methicillin-resistente bzw. -sensible und Koagulase-positive bzw. -negative Staphylokokken mit jedem PCR-System zunächst solitär untersucht bevor anschließend die Kombination der Primer-Paare im Rahmen der Multiplex-PCR erfolgte. In der Intra-Assay-Analyse wurden die o.g. 12 Staphylokokken zehnmal hintereinander in die PCR-Systeme eingesetzt, bei der Inter-Assay-Analyse erfolgte die Testung der Isolate an zehn aufeinanderfolgenden Tagen.

Tabelle 4 Ergebnisse der Multiplex-PCR

Keime	Methicillin-Resistenz**	16S rRNA-*** positiv	16S rRNA- negativ	SSG****- positiv	SSG- negativ	coa- positiv	coa- negativ	mecA positiv	mecA negativ
<i>S. aureus</i>	Met S # (n=195)	195	0	195	0	195	0	3	192
	Met R # (n=293)	293	0	293	0	293	0	290	3
KNS*	Met S (n= 98)	98	0	98	0	0	98	2	96
	Met R (n=100)	100	0	100	0	0	100	98	2
verschiedene Eubakterien	(n= 50)	50	0	0	50	0	50	0	50
<i>Candida albicans</i>	(n=20)	0	20	0	20	0	20	0	20

* KNS = Koagulase-negative Staphylokokken

** Testung mit Hilfe der Agardiffusionsmethode nach DIN 58940

*** 16S rRNA = 16S rRNA-PCR-Produkt zum Nachweis von Eubakterien

**** SSG = 16S rRNA-PCR-Produkt zum Nachweis von Staphylokokken

Met = Methicillin-Resistenz (S = sensibel R = resistent)

Tabelle 5 Sensitivitäten und Spezifitäten der einzelnen Primerpaare im Multiplex-PCR-Assay

	16S rRNA-Primer*	SSG-Primer**	coa-Gen-Primer	mec-Gen-Primer
Sensitivität	100%	100%	100%	98%
Spezifität	100%	100%	100%	98%
* 16S rRNA = 16S rRNA-PCR-Produkt zum Nachweis von Eubakterien				
** SSG = 16S rRNA-PCR-Produkt zum Nachweis von Staphylokokken				

Ergebnisse

Die einzelnen Primerpaare zur Amplifikation von Gensequenzbereichen der 16S rRNA aus Eubakterien im phylogenetischen Sinne bzw. aus Staphylokokken sowie aus Bereichen des *coa*- und des *mecA*-Gens wurden zunächst einzeln hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität bei insgesamt 736 Eubakterien und 20 *Candida albicans*-Stämmen getestet.

Die Ergebnisse der Austestung der einzelnen, separat analysierten PCR-Systeme stimmten dabei mit den Resultaten der kombinierten Multiplex-PCR vollständig überein.

Die Resultate sind in Tabelle 4, die daraus errechneten Sensitivitäten und Spezifitäten in Tabelle 5 aufgeführt.

Das für Eubakterien spezifische PCR-Produkt konnte in allen untersuchten Eubakterien und nicht bei den *Candida albicans*-Stämmen nachgewiesen werden.

Auch das für Staphylokokken spezifische 16S rRNA-PCR-Produkt ließ sich nur in allen untersuchten Staphylokokken, aber nicht in den anderen Eubakterien bzw. *Candida albicans*-Stämmen detektieren.

Das für das *coa*-Gen spezifische PCR-Produkt war nur in den *S. aureus*-Stämmen und nicht in anderen Eubakterien detektierbar.

Bei den Methicillin-resistenten *S. aureus*-Stämmen konnte in 290 von 293 und bei den Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokken in 98 von 100 Fällen das *mecA*-Gen nachgewiesen werden.

Wenn der molekularbiologische Nachweis des Resistenzgens nicht mit dem Ergebnis der Agardiffusionsmethode übereinstimmte, wurden beide Testverfahren mehrfach wiederholt. Die ursprünglich erzielten Ergebnisse konnten jedoch reproduzierbar bestätigt werden.

Die im Rahmen der Spezifitätsprüfung untersuchten Eubakterien und *Candida albicans* sind in Tabelle 3 aufgeführt. Hinsichtlich der dort genannten Eubakterien ließ sich ausschließlich das für sie spezifische PCR-Produkt nachweisen. Für die getesteten *Candida*-Stämme war kein PCR-Produkt detektierbar.

In Abb. 1 sind exemplarisch Ergebnisse der Multiplex-PCR für verschiedene Keime sowie eine H₂O-Kontrolle dargestellt. In den Spuren 1 und 8 wurde als Größenstandard eine 1Kb-Leiter aufgetragen.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Intra- und Inter-Assay-Analysen war sehr gut. Die spezifischen PCR-Produkte der 12 untersuchten Staphylokokken ließen sich immer sowohl bei Testung durch die einzelnen PCR-Systeme als auch in der kombinierten Multiplex-PCR im Rahmen der Intra- und Inter-Assay-Analysen nachweisen.

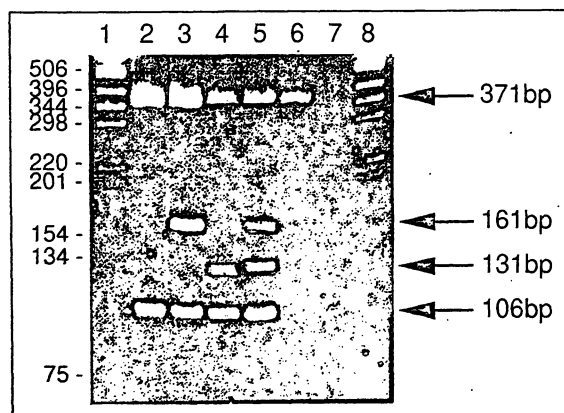


Abbildung 1 Ergebnisse der Multiplex-PCR für verschiedene Keime. Spur 1 und 8: 1 KB Leiter als Größenstandard; Spur 7: H₂O dest. als Kontrolle; 371 bp: für Eubakterien spezifisches PCR-Produkt; 161 bp: für das *mecA*-Gen spezifisches PCR-Produkt; 131 bp: für das *coa*-Gen spezifisches Genprodukt; 106 bp: für Staphylokokken spezifisches Genprodukt.

Diskussion

MRSA als Verursacher schwerer, z.T. sogar letal verlaufender Infektionen bei hospitalisierten und besonders bei immunsupprimierten Patienten gewinnen zunehmend an Bedeutung [2]. Da die Gefahr nosokomialer Infektionen durch MRSA, besonders auf Intensivstationen oder Abteilungen mit immunsupprimierten Patienten stetig zunimmt, ist der Bedarf an Detektionssystemen, die schnell und zuverlässig sowohl zwischen Koagulase-positiven- und -negativen als auch zwischen Methicillin-resistenten- und -sensiblen Staphylokokken-Isolaten differenzieren können, besonders hoch.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird eine Multiplex-PCR für Staphylokokken vorgestellt und evaluiert, die den Einsatz einzelner Kolonien ohne Vorbehandlung direkt von der Agarplatte in den PCR-Assay ermöglicht. Mit Hilfe dieses Verfahrens kann innerhalb von 4 Stunden ein molekulargenetisches

„Dendogramm“ erstellt werden, mit dem Auskunft über die Zugehörigkeit zu den Eubakterien, die Spezieszugehörigkeit, Pathogenitätsmerkmale (Koagulas-Bildung) und Auskunft über das Resistenzverhalten (Methicillin-Resistenz) gegeben werden kann.

In nahezu allen PCR-Untersuchungen, die im Rahmen der mikrobiologischen Diagnostik von Staphylokokken durchgeführt wurden, erfolgte vor Beginn des Assays eine DNA-Extraktion und eine Vorinkubation mit Enzymen wie Lysostaphin, Lysozym, Achromopeptidase und Proteinase K. Nur *Hedin* und *Löfbladh* [11] setzten zum Nachweis des *mecA*-Gens *S. epidermidis*-Kolonien direkt von der Agarplatte in den PCR-Ansatz ein. Ihre Resultate waren vergleichbar mit denjenigen, die zuvor eine DNA-Extraktion durchgeführt hatten. Dies deckt sich sehr gut mit den vorliegenden Ergebnissen. Auch in dem hier beschriebenen Multiplex-PCR-Ansatz wurden Kolonien direkt von der Agarplatte in den PCR-Assay eingesetzt. Dieses vereinfacht das ganze experimentelle Procedere erheblich.

Generell sind die Vorteile einer Multiplex-PCR darin zu sehen, daß parallel gleich mehrere PCR-Ansätze bearbeitet werden können. Dieses Procedere beschrieben *Geha* et al. [13] und *Vannuffel* et al. [12] für *S. aureus*. Die Autoren stellten Multiplex-PCR-Assays vor, in denen parallel das *mecA*-, das *femA*-Gen und eine Staphylokokken-spezifische Sequenz bzw. das *mecA*-Gen und 16S rRNA-Gene amplifiziert wurden. Doch auch in diesen Ansätzen war eine Vorinkubation und eine DNA-Extraktion aus den zu untersuchenden Staphylokokken-Kolonien notwendig.

Um im Rahmen der hier vorgestellten Multiplex-PCR die Anzahl falsch negativer Ergebnisse so gering wie möglich zu halten, ist der Einsatz einer Positivkontrolle erforderlich. In der vorliegenden Arbeit diente die Amplifikation von 16S rRNA-Sequenzen aus konservierten Genregionen, die in allen Eubakterien zu finden sind, als interne Kontrolle. Entsprechende Amplifikationsprodukte konnten *Greisen* et al. [15] in einem Panel 176 phylogenetisch unterschiedlicher Bakterienisolate nachweisen. Das Nicht-Vorhandensein dieses 16S rRNA-Amplifikationsproduktes deutet auf eine fehlerhafte Amplifikation von Zielsequenzen hin, die durch einen „unkorrekten“ PCR-Ansatz (falsche Konzentrationen, zu wenig oder zu viel Template-DNA, Fehler im PCR-Programm, Pipettierfehler) bedingt sein können. Kann die 16S-rRNA-Gensequenz nicht amplifiziert werden, ist der Ansatz komplett zu wiederholen. Die in der beschriebenen Multiplex-PCR eingesetzten Primer zum Nachweis eines 16S rRNA-PCR-Produktes von Eubakterien zeigten eine Sensitivität und Spezifität von 100%.

Überdies ist die Amplifikation eines Staphylokokken-spezifischen Gens als interne Kontrolle äußerst wichtig, um feststellen zu können, daß genügend DNA-Material von Staphylokokken im PCR-Ansatz enthalten ist. Auf diese Weise ist eine indirekte Kontrolle der Zell-Lyse möglich, da insbesondere Koagulase-negative Staphylokokken z.T. nur sehr schwer zu

lysisieren sind. Die im vorliegenden Multiplex-PCR-Assay eingesetzten Primer zum Nachweis eines 16S rRNA-PCR-Produktes von Staphylokokken zeigten eine Sensitivität und Spezifität von 100%, was die guten Einsatzmöglichkeiten zum Staphylokokken-Nachweis verdeutlicht.

Neben dem Staphylokokken-Nachweis muß dem behandelnden Arzt auch schnell und zuverlässig mitgeteilt werden, ob es sich um pathogene Koagulase-positive *S. aureus*-Isolate oder um weniger pathogene Koagulase-negative Staphylokokken handelt.

Die acht verschiedenen Serovarietäten des Enzyms Koagulase werden durch verschiedene Allele des Koagulasegens (*coa*) kodiert, das eine Gesamtgröße von ca. 2 Kilobasen aufweist [17]. DNA-Sequenzanalysen des klonierten Koagulasegens von verschiedenen *S. aureus*-Stämmen zeigten, daß drei wesentliche Abschnitte innerhalb des Gens voneinander differenziert werden können. Die Sequenz für die Prothrombin-bindende Domäne des Genproduktes ist am N-terminalen Ende lokalisiert. Der mittlere Gensequenzbereich ist hochkonserviert. Am C-terminalen Ende sind vier bis acht repetitive Sequenzen lokalisiert. Mit Hilfe der ausgewählten *coa*-Gen Primer wird eine 131 Nukleotide lange Gensequenz aus dem Bereich der o.g. mittleren hochkonservierten Region amplifiziert. Alle untersuchten *S. aureus*-Stämme wurden mit Hilfe dieser Primer richtig identifiziert. Von anderen Autoren wurden Primer zur Amplifikation des *nuc*- [19], des *femA*- [12] und des *gyr*-Gens [20] zur Speziesidentifizierung erfolgreich eingesetzt.

Für die Einleitung einer adäquaten Therapie bei Vorliegen einer *S. aureus*-Infektion ist der schnelle Nachweis einer potentiellen Methicillin-Resistenz von besonderer Bedeutung. MRSA-Isolate sind nicht nur immer resistent gegenüber allen Antibiotika mit β -Laktam-Struktur, sondern sie sind darüberhinaus noch häufig multi-resistent, d.h. es treten zusätzliche Resistenzen gegenüber Aminoglykosiden, Gyrasehemmern etc. auf [21].

Hybridisierungsuntersuchungen mit Gensonden konnten zeigen, daß das *mecA*-Gen in nahezu allen Methicillin-resistenten Staphylokokken nachweisbar ist. Damit ist das Vorhandensein des *mecA*-Gens zur Detektion der Methicillin-Resistenz von herausragender Bedeutung. Zusätzlich sind aber noch weitere Gene an unterschiedlichen Stellen des Staphylokokken-Chromosoms identifiziert worden, deren Inaktivierung zu einer Reduktion der Methicillin-Resistenz und zu einer Verringerung der Peptidoglykan-Synthese führen [7, 22, 23]. In diesem Zusammenhang sollten neben dem *mecR*-Gen auch die *femA-D* Gene erwähnt werden, die als Regulator-Gene essentiell für die Expression der Methicillin-Resistenz sind [5, 6]. *De Lancastre* und *Tomasz* [23] wiesen darüberhinaus noch weitere 10-12 genetische Elemente nach, die für die Expression der Methicillin-Resistenz von Bedeutung sind.

Verschiedene Studien konnten den Nutzen der PCR-Technik für die Detektion einer Methicillin-Re-

sistenz in Staphylokokken zeigen [8-10]. Die überwiegende Zahl der Autoren verglich die PCR-Ergebnisse teils mit dem Gensonden-Nachweis (Hybridisierung) von *mecA* sowie teils mit klassischen Empfindlichkeitsprüfungen (Agardiffusion, Mikrodilution oder Einsatz von Screening-Platten). Die Ergebnisse zeigten eine Übereinstimmung von >95% bei *S. aureus*-Isolaten sowie etwas schlechtere Werte bei Koagulasenegativen Staphylokokken. In der vorliegenden Untersuchung stimmten die Ergebnisse der Agardiffusion mit dem molekulargenetischen Nachweis des *mecA*-Gens in über 98% überein. In 5 Fällen (n=3 bei *S. aureus* und n=2 bei KNS) konnte kein *mecA*-Gen nachgewiesen werden, obwohl die untersuchten Isolate mit Hilfe der Agardiffusion eine eindeutige Oxacillin-Resistenz aufwiesen. Bei diesen Isolaten konnte sowohl eine Überproduktion von β -Laktamasen als auch eine low-level Resistenz (MIC 1-8 $\mu\text{g/ml}$) ausgeschlossen werden, da die MIC-Werte für Oxacillin bei allen Isolaten >8 $\mu\text{g/ml}$ waren. Denkbar ist in diesen Fällen die Bildung eines normalen Penicillin-Bindungsproteins mit herabgesetzter Bindungskapazität [24] sowie das Auftreten anderer, bisher nicht identifizierter Faktoren [22, 23], die die Methicillin-Resistenz in Abwesenheit des *mecA*-Gens hervorrufen. Von Hiramatsu et al. [25] wurde in diesem Zusammenhang auch auf die instabile Natur der Methicillin-Resistenz hingewiesen [25]. Schließlich kann nicht ausgeschlossen werden, daß in den betreffenden Isolaten das *mecA*-Gen mit leicht modifizierter Gensequenz vorgelegen haben könnte, sodaß dieses von den spezifischen Primern nicht erkannt wurde und somit kein optimales Primerannealing möglich war.

In ebenfalls 5 Fällen (n=3 bei *S. aureus* und n=2 bei KNS) konnten molekulargenetisch Sequenzen aus dem Bereich des *mecA*-Gens amplifiziert werden, obwohl die untersuchten Isolate mit Hilfe der Agardiffusion eindeutig als Oxacillin-sensibel eingestuft wurden. Sehr wahrscheinlich ist hier, daß entweder das *mecA*-Gen inaktiv war (z.B. Punktmutation mit Einbau eines Stop-Codons) oder andere, genetische Faktoren, die für die Expression der Methicillin-Resistenz notwendig sind (s.o.), nicht vorhanden waren [6, 22, 23].

Aus klinisch-praktischen Erwägungen sollten *mecA*-positive Staphylokokken als intrinsisch Methicillin-resistent angesehen werden, selbst wenn diese phänotypisch eine low-level-Resistenz aufweisen oder sogar mit den herkömmlichen Verfahren in-vitro als Methicillin-empfindlich eingestuft werden, da diese Stämme das genetische Potential zur Methicillin-Resistenz tragen und damit jederzeit eine Resistenz gegenüber den β -Laktam-Antibiotika auftreten kann.

Der Vorteil der hier vorgestellten Multiplex-PCR besteht darin, daß vorher unbehandelte einzelne Kolonien direkt von der Agarplatte in den PCR-Assay eingesetzt werden können. Mit Hilfe dieses Multiplex-PCR-Ansatzes können innerhalb von 4 Stunden spezifische PCR-Produkte parallel sowohl für Eubakterien im allgemeinen als auch Staphylokokken im besonderen, für das *coa*- sowie das *mecA*-Gen nachgewiesen

werden. Somit gelingt neben der Detektion von Eubakterien und Staphylokokken die Identifizierung als *S. aureus*- und der Nachweis des wichtigen Methicillin-Resistenzgens. Die Sensitivität und Spezifität der eingesetzten Primer ist sehr gut und die Ergebnisse der Multiplex-PCR sind sehr gut reproduzierbar.

Zusammenfassend erhält der Kliniker mit Hilfe der hier vorgestellten Multiplex-PCR sehr schnell und zuverlässig Informationen hinsichtlich der Identität des Keims und zusätzlich auch Anhaltspunkte für das therapeutische Management. Die hier vorgestellte Multiplex-PCR dient somit als Ergänzung oder auch als Alternative zu den klassischen diagnostischen Schemata. Durch eine fortschreitende Automatisierung der Amplifikationsverfahren und eine Erweiterung diagnostisch genutzter Pathogenitäts- und Resistenzgene kann dieses Verfahren in der Zukunft noch an Bedeutung gewinnen, obgleich zur Zeit noch keine Hybridisierungstechnik für die klinische Routinediagnostik zur Verfügung steht. In der Zukunft sollten empfindlichere Detektionsverfahren für die Amplifikationsprodukte etabliert werden, mit denen ein Direktnachweis der Staphylokokken direkt aus Patientenmaterial möglich ist.

Literatur

1. Visser MR, Fluit AC. Amplification methods for the detection of bacterial resistance genes. *JMIMDQ* 1995;23:105-16.
2. Mulligan ME, Murray KA, Ripner BS, Standiford HC, John JF, Corvick JA, Kaufmann CA, Yu VL. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: A consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. *Am J Med* 1993;94:313-28.
3. Madiraju MVVS, Brunner DP, Wilkinson BJ. Effects of temperature, NaCl, and methicillin on penicillin-binding proteins, growth, peptidoglycan synthesis, and autolysis in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1987;31:1727-33.
4. Watanakunakorn C. Effect of inoculum size on in-vitro susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to 18 antimicrobial agents. *Eur J Clin Microbiol* 1985;4:68-70.
5. Suzuki E, Kuwahara-Arai K, Richardson JF, Hiramatsu K. Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1219-26.
6. Maidhof H, Reinicke B, Blümle P, Berger-Bächi B, Labischinski H. *femA*, which encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affects glycine content of peptidoglycan on methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J Bacteriol* 1991;173:3507-13.
7. Ryffel C, Kayser FH, Berger-Bächi B. Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:25-31.
8. Tokue Y, Shoji S, Satoh K, Watanabe A, Motomiya M. Comparison of a polymerase chain reaction assay and a conventional microbiologic method for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:6-9.
9. Ubukata K, Nakagami S, Nitta A, Yamane A, Kawakami S, Sugiyama M, Konno M. Rapid identification of the *mecA* gene in methicillin-resistant staphylococci by enzymatic detection of polymerase chain reaction products. *J Clin Microbiol* 1992;30:1728-33.
10. Hiramatsu K, Suzuki E, Takayama Y, Katayama Y, Yokota T. Role of penicillinase plasmids in the stability of the *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:600-4.

11. Hedin G, Löfdahl S. Detecting methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* - disc diffusion, broth breakpoint or polymerase chain reaction. APMIS 1993;101:311-18.
12. Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, Vandercam B, Delméc M, Wauters G, Gala J-L. Specific detection of Methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. J Clin Microbiol 1995;33:2864-7.
13. Geha DJ, Uhl JR, Gustaferró CA, Persing DH. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. J Clin Microbiol 1994;32:1768-72.
14. Deutsches Institut für Normung: Empfindlichkeitsprüfung von Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika. In: DIN-Taschenbuch Medizinische Mikrobiologie und Immunologie. Berlin/Deutschland)Beuth, 1992:331-406.
15. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. PCR-primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 1994;32:335-51.
16. Leong DU. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 16S rRNA gene, partial sequence, bases 1-366. Eintrag in die Genbank 1993.
17. Phonimdaeng P, O'Reilly M, Nowlan P, Bramley AJ, Foster TJ. The coagulase of *Staphylococcus aureus* 8325-4. Sequence analysis and virulence of site-specific coagulase-deficient mutants. Mol Microbiol 1990;4:393-404.
18. Ryffel C, Tesch W, Birch-Machin I, Reynolds E, Barberis-Maino L, Kayser FH, Berger-Bächi B. Sequence comparison of *mecA* genes isolated from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, bases 1-2322. Eintrag in die Genbank 1990.
19. Brakstad OG, Tveten Y, Nato F, Fournier JM. Comparison of various methods and relations for specific identification of *Staphylococcus aureus* positive or negative for the *mecA* gene. APMIS 1993;8:651-4.
20. Zambardi G, Reverdy ME, Bland S, Bes M, Freney J, Fleurette J. Laboratory diagnosis of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* by a multiplex polymerase chain reaction assay. Diagn Microbiol Infect Dis 1994;19:25-31.
21. Schmitz F-J, Geisel R, Wagner S, Lenz W, Kamla V, Heinz HP, Idel H, Hadding U. Typisierung, Resistenzverhalten und Häufigkeit Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*-Stämme einer chirurgischen Intensivstation. Zbl Hyg 1996;198:355-80.
22. DeLencastre HM, Sá Figueiredo AM, Urban C, Rahal J, Tomasz A. Multiple mechanisms of methicillin-resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:632-9.
23. DeLencastre HM, Tomasz A. Reassessment of the number of auxiliary genes essential for expression of high level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1994;38:2590-8.
24. Murakami K, Nomura K, Doi M, Yoshida T. Production of low-affinity penicillin-binding protein by low- and high-resistance groups of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1987;31:1307-11.
25. Hiramatsu K, Kihara H, Yokota T. Analysis of borderline-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using polymerase chain reaction. Microbiol Immunol 1992;36:445-53.