

Praktische Einsatzmöglichkeiten verschiedener genotypischer Verfahren zur Charakterisierung Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*-Stämme

Utilizability of Different Genotypic Methods for the Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains

F.-J. Schmitz^{1,2}, Alexandra Steller¹, H.-V. Tichy³, Basia Hofmann¹, Helga Idel⁴, U. Hadding¹, H.-P. Heinz¹ und K. Köhrer⁵

Zusammenfassung: Nosokomiale Infektionen durch Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme (MRSA) stellen in Krankenhäusern und dort besonders auf Intensivstationen ein wachsendes Problem dar. Aus diesem Grund ist der Bedarf an Typisierungsverfahren, die schnell und zuverlässig Aussagen über den Verwandtschaftsgrad einzelner MRSA-Isolate zueinander ermöglichen, besonders hoch. Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene Verfahren zur genotypischen Charakterisierung von MRSA hinsichtlich ihrer Bedeutung zu bewerten und einzuordnen sowie durch die parallele Verwendung verschiedener Amplifikationsverfahren eine weitere Feintypisierung eines epidemisch auftretenden MRSA-Stammes zu erreichen. 183 MRSA aus 11 verschiedenen Akut-Krankenhäusern des Großraumes Düsseldorf wurden zur genotypischen Charakterisierung mit sechs verschiedenen Typisierungsverfahren getestet. Dabei handelte es sich um einzelnen um folgende Methoden: 1. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), 2. Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), 3. 16S-23S rDNA Spacer-Amplifikation, 4. Koagulasegen-PCR, 5. Protein A-Gen PCR, 6. PCR zur Charakterisierung der hypervariablen Region (HVR) in der Nähe des *mecA*-Gens. Das diskriminative Potential der evaluierten Verfahren zur Typisierung von MRSA ist wie folgt einzustufen: PFGE > Spacer-Amplifikation > RAPD > Protein A-Gen PCR > HVR-PCR > Koagulasegen-PCR. Die auf einer PCR

basierenden Verfahren haben den Vorteil, schnell und einfach durchführbar zu sein. Sie sind in ihrer Diskriminierungsfähigkeit der aufwendigeren PFGE aber unterlegen.

Schlüsselwörter: Methicillin-Resistenz; *Staphylococcus aureus*/Isolierung und Anreicherung; Bakterielle DNA/Genetik; Nosokomiale Infektionen.

Summary: Nosocomial infections caused by methicillin-resistant *S. aureus* strains (MRSA) are an increasing problem in hospitals and especially in intensive-care units. Therefore, quick and reliable typing methods which give information about the degree of relationship between single MRSA isolates are urgently needed. The aim of the study was to assess and classify different genotyping procedures for the characterization of MRSA with regard to their importance, and to obtain a more precise typing of epidemically occurring MRSA strains by a parallel use of different amplification methods. Six different genotyping methods for the characterization of 183 MRSA isolates from 11 different primary-care hospitals in the extended Düsseldorf area were tested. In particular, the following methods were used: (1), Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE); (2), Random amplification of polymorphic DNA (RAPD); (3), 16S-23S rDNA spacer-amplification; (4), *Coa* gene-PCR; (5), Protein A-gene PCR; (6), PCR for characterization of the hypervariable region (HVR) close to the *mecA* gene. The discriminatory potential of all typing techniques for MRSA evaluated in the present investigation is as follows: PFGE > Spacer-amplification > RAPD > Protein A-gene PCR > HVR-PCR > *Coa* gene-PCR. All procedures based on PCR do have the advantage of being quick and easy in handling. However, their discriminatory capacity is inferior compared to the labor-intensive PFGE.

Keywords: Methicillin-Resistance; *Staphylococcus aureus*/purification and isolation; Bacterial DNA/genetics; Cross Infection.

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

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

³TUV Südwest DLG, Abteilung Biologische Sicherheit, Mikrobiologisches und gentechnisches Labor, Freiburg

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

⁵Molekularbiologisches Zentrallabor im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (Leiter: Dr. rer. nat. Karl Köhrer)

Eingegangen: 9. Dezember 1996 / Angenommen: 23. März 1997

Aufgrund einer zunehmenden Gefahr nosokomialer Infektionen durch Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme (MRSA) in Krankenhäusern, besonders auf Intensivstationen oder Abteilungen mit immunsupprimierten Patienten, ist der Bedarf an Typisierungsverfahren, die schnell und zuverlässig Aussagen über den Verwandtschaftsgrad einzelner MRSA-Isolate zueinander ermöglichen, besonders hoch. So können rascher und effektiver geeignete krankenhaushygienische Maßnahmen zum Einsatz kommen [1].

Um die Frage nach dem „verwandtschaftlichen Grad“ von Bakterien-Isolaten zueinander beantworten zu können, ist eine zuverlässige Bakterien-Typisierung notwendig. Grundsätzlich können phänotypische und genotypische Typisierungsverfahren unterschieden werden [2]. Phänotypischen Techniken detektieren Eigenschaften, welche von den Mikroorganismen exprimiert werden. Demgegenüber werden mit den genotypischen Verfahren chromosomale oder extrachromosomale Elemente charakterisiert. Die Bedeutung eines einzelnen Typisierungsbefundes korreliert mit der Diskriminationsfähigkeit der eingesetzten Methode.

In publizierten Arbeiten zur Diskriminierungsfähigkeit verschiedener genotypischer Verfahren zur Verifizierung einer potentiell klonalen Identität bei MRSA wurden häufig Isolate aus unterschiedlichen Gebieten rekrutiert und untersucht [3-6], so daß schon aufgrund einer regionalen Vielfalt deutliche Unterschiede zwischen den Isolaten plausibel erscheinen. Die beobachteten Unterschiede bedingen indirekt wiederum eine gute Diskriminationsfähigkeit der eingesetzten Typisierungsmethode. In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen das gesamte Kollektiv von MRSA-Erstisolaten einer lokal enger umrissenen Region untersucht.

Die folgenden Themenkomplexe wurden näher betrachtet:

- Vergleich verschiedener genotypischer Verfahren zur Charakterisierung von MRSA sowie Einordnung ihres Stellenwertes und
- Versuch einer weiteren Feintypisierung eines epidemisch auftretenden MRSA-Stammes (sog. Norddeutscher Epidemiestamm [7]) durch die parallele Verwendung verschiedener Amplifikationsverfahren.

Material und Methoden

Klinisches Untersuchungsmaterial

Zwischen 1993 und 1995 wurden 7.814 *S. aureus*-Stämme aus dem Untersuchungsgut des Düsseldorfer Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Virologie isoliert. Insgesamt wurden 489 MRSA gefunden (6,3%) [8]; 183 Erstisolate standen für die genotypi-

sche Charakterisierung zur Verfügung. Die MRSA stammten aus 11 Akut-Krankenhäusern aus dem Großraum Düsseldorf.

Weitere 91 MRSA-Stämme einer internationalen Kollektion, die in 7 verschiedenen Ländern isoliert werden konnten, wurden freundlicherweise von der Fa. Hoffmann LaRoche (Basel) zur Verfügung gestellt. Diese internationalen Isolate stammten aus Japan (n=20), Brasilien (n=20), Schweiz (n=11), Sri Lanka (n=5), Spanien (n=13), England (n=14) und Ungarn (n=8). Diese Isolate wurden ebenfalls mit allen o.g. Methoden typisiert (mit Ausnahme der Koagulasegen-PCR), um die Vergleichbarkeit und weltweite Persistenz einiger MRSA-Typen beurteilen zu können.

Identifikationsreaktionen

Die Staphylokokken wurden zur Verifizierung der Spezieszuordnung diversen Identifikationsverfahren unterzogen. Im einzelnen handelte es sich um folgende Testverfahren: Katalase, Röhrchenkoagulase (Bacto Coagulase Plasma EDTA-Test®, Fa. Difco), Nuklease (Fa. Unipath), anaerobe Mannitspaltung und biochemische Identifikation (api Staph®, Fa. bioMerieux).

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.

Resistenztestung

Die separate Resistenztestung gegenüber Oxacillin wurde mittels Agar-Diffusionstest (nach DIN 58940) [9] auf Mueller-Hinton-Agar (Zusatz von 2% NaCl) unter Verwendung von Testblättchen (5µg 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.

Genotypische Verfahren

Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Mit der Makrorestriktionsanalyse in Form der PFGE können Bakterienstämme aufgrund ihres DNA-Bandenmusters typisiert werden. Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme sind selektionsneutrale Marker, die im Verlauf der Evolution des Bakterienchromosoms über Rearrangements oder Mutation an einer Stelle des Genoms verlorengehen und an anderer Stelle neu entstehen können. Nicht miteinander verwandte Klone einer Spezies zeigen demnach unterschiedliche Bandenmuster, während die Varianten eines Klons durch sehr ähnliche Muster charakterisiert sind [2, 3, 5, 10].

Zur PFGE wurde das GenePath Strain Typing System® (Fa. BioRad, München) eingesetzt. Der genaue Arbeitsablauf, die Inkubations- und Reaktionsbedin-

Nicht standardisierte Abkürzungen: HVR, hypervariable Region; MRSA, Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*; PCR, Polymerase chain reaction; PFGE, Pulsfeldgelelektrophorese; RAPD, Random Amplification of Polymorphic DNA; RS Repetitive Sequenzen.

ungen bei diesem System, die visuelle Auswertung der entstandenen Bandenmuster sowie die Klassifikationskriterien verschiedener MRSA-Typen sind in früheren Publikationen bereits dargestellt worden [8, 11].

Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)

Bei der RAPD-Analyse wird mit Hilfe eines einzelnen Primers, der im Prinzip von beliebiger Sequenz sein und sehr kurz gewählt werden kann, aus dem Genom eines Organismus durch PCR ein komplexes Fragmentspektrum amplifiziert, das in der Regel stammspezifisch ist. Primer mit arbiträrer Sequenz hybridisieren an verschiedenen DNA-Stellen und initiieren Amplifikationen an unterschiedlichen Stellen im Genom. Im Gegensatz zur klassischen PCR-Reaktion entstehen eine Vielzahl nicht vorhersagbarer, aber dennoch charakteristischer Amplifikationsprodukte [12].

Zur Probenvorbereitung wurden Zellen der Menge einer stecknadelkopfgroßen Bakterienkolonie in 0,02 M NaOH/0,1% SDS bei 90°C (15min) aufgeschlossen. Nach Verdünnung auf das zehnfache Volumen mit H₂O dest. wurden Zellbruchstücke abzentrifugiert und aus dem Überstand je 1 µl pro PCR-Ansatz als Template eingesetzt.

Als Primer wurden fluoreszenzmarkierte 10 Basen-Oligonukleotide eingesetzt. Mit dem RAPD-Primer AATCGGGCTG wurde durch PCR ein stammspezifisches Fragmentspektrum amplifiziert. Der Reaktionsansatz hatte folgende Zusammensetzung: 4mM MgCl₂, 10 mM Tris/HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 200 µM jedes dNTPs sowie 50 pmol eines jeden Primers, 0,01% BSA, 1 U Taq-Polymerase (Pharmacia) sowie Template DNA. Target-Sequenzen wurden in 25 µl-Reaktionen nach einer ersten Denaturierung (94°C für 120s) in 45 Zyklen (94°C, 40s; 35°C, 40s), gefolgt von einer abschließenden Extension (72°C, 180s), amplifiziert. Die Auftrennung der Amplifikationsprodukte erfolgte auf dem A.L.F.-System (Fa. Pharmacia), die Gruppierung der Muster mittels PC-gesteuerter Software (WinCam® 2.2., Fa. Cybertech) unter Verwendung des Pearson-Algorithmus.

16S-23S-rDNA-Spacer-Amplifikation

Im Rahmen der Spacer-Amplifikation wird mit Hilfe von Primern, die die intergenische Spacer-Region zwischen 16S und 23S rRNA Genen flankieren, dieser hypervariable Bereich mittels PCR amplifiziert [13]. Die intergenischen Spacer-Regionen variieren sehr stark in Hinblick auf Sequenz und Länge. Liegen mehrere ribosomale Operons in einer Bakterienspezies vor, werden entsprechend auch mehrere Fragmente amplifiziert. Basierend auf diesem Polymorphismus können je nach Bakteriengruppe Unterschiede auf dem Genus-, Spezies- und Subspezies-Level nachgewiesen werden [14]. Das Fragmentmuster ist bei manchen Species (z.B. *S. aureus*) nicht konstant, sondern es ist bei verschiedenen Stämmen unterschiedlich.

Die Probenvorbereitung verlief identisch wie bei der RAPD. Unter Verwendung des Primers L1 (5'-CAAGGCATCCACCGT-3') [13] und des fluoreszenz-

markierten Primers G1 (5'-GAAGTCGTAACAAGG-3') [13] wurde die Region zwischen dem Gen für die 16S rRNA und dem Gen für die 23S rRNA mittels PCR amplifiziert. Der Reaktionsansatz hatte folgende Zusammensetzung: 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris/HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 200 µM jedes dNTPs sowie 5 pmol eines jeden Primers, 0,01% BSA, 1 U Taq-Polymerase (Pharmacia) sowie Template DNA. Target-Sequenzen wurden in 25 µl-Reaktionen nach einer ersten Denaturierung (94°C für 120s) in 45 Zyklen (94°C, 40s; 55°C, 60s; 72°C, 60s), gefolgt von einer abschließenden Extension (72°C, 180s), amplifiziert. Die Fragmente wurden auf dem A.L.F.-System (Fa. Pharmacia Biotech) analysiert und anschließend via Bildanalyse-Software (WinCam® 2.2., Fa. Cybertech) unter Verwendung des Dice-Algorithmus ausgewertet.

Koagulasegen-PCR

Am C-terminalen Ende des Koagulasegens *coa* sind vier bis acht repetitive Sequenzen (RS) lokalisiert, die jeweils eine Länge von 81 Basenpaaren umfassen. Eine derartige RS kodiert für 27 Aminosäuren - ihre genaue Funktion und der Grund für bestehende Divergenzen innerhalb der RS sind allerdings bisher unbekannt. Man weiß jedoch, daß die RS weder für die Prothrombin-Bindung noch für die Plasmagerinnung notwendig sind [15]. Das Typisierungsverfahren der Koagulasegen-PCR beruht auf der Verwendung von zwei Primern, die den RS-Abschnitt innerhalb des Genß von beiden Seiten flankieren. Aufgrund der variierenden Zahl an RS entstehen auf diese Weise Amplifikate unterschiedlicher Größe. Da die Amplifikationslänge mit der Zahl der RS korreliert, kann aus ihr auf die Anzahl der RS im untersuchten *S. aureus*-Isolat geschlossen werden.

Die DNA wurde nach Lyse der Staphylokokken mit Lysostaphin und nachfolgender Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnen. In Abwandlung der von Goh et al. [4] beschriebenen „nested PCR“, bei der zunächst mit den beschriebenen Primern COAG 1 und COAG 4 [4] ein größerer Koagulase-Genbereich amplifiziert wurde, aus dem dann die eigentliche Zielregion der RS mit den innerhalb des Amplifikats ansetzenden Primern COAG 2 und 3 vermehrt wurde, setzten wir in der vorliegenden Untersuchung nur die Primer COAG 2 und 3 ein [4]. Der Primer COAG 2 (5'-CGAGACCAAGATTCAACAAG-3') setzt etwa 20 Basenpaare vor der ersten RS an, während COAG 3 (5'-AAA-GAAAACCACTCACATCA-3') in einer flankierenden Sequenz etwa 300 Basenpaare nach der letzten RS bindet. Die PCR wurde entsprechend den von Goh et al. [4] beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Zur weiteren Diskrimination erfolgte anschließend eine Restriktion der Amplifikate mit der Restriktionsendonuklease *Alu* I. Die Restriktionsfragmente wurden in einem 0,8-prozentigem Agarosegel aufgetrennt und konnten durch Ethidiumbromid-Zusatz mit Hilfe eines UV-Transluminators sichtbar gemacht werden. Anschließend erfolgte zur epidemiologischen Typisierung ein Vergleich der Restriktionsfragmentmuster [16].

Protein A-Gen PCR

Das für Protein A kodierende *spa*-Gen besteht aus ca. 2150 bp und enthält eine Vielzahl funktionell unterschiedlicher Regionen. Für die Etablierung der Protein A-Gen PCR sind die sog. Fc-Bindungsregion und die direkt daran angrenzende sog. X-Region interessant. Die Fc-Bindungsregion besteht aus zwei bis fünf 160 bp großen RS, während die X-Region bis zu 15 RS mit jeweils 24 bp umfaßt [17]. Frenay et al. [17] konnten zeigen, daß die X-Region hinsichtlich Anzahl und Sequenz der individuellen Repeats hochgradig polymorph ist. Die überwiegende Anzahl der Repeats besteht aus 24 Basen, allerdings war eines der von Frenay et al. untersuchten Repeats lediglich aus 21 Basen zusammengesetzt, während sich bei zwei Repeats 27 Basen fanden.

Zur Etablierung der von uns entwickelten Protein A-Gen PCR verwendeten wir drei Primer (SPA 1-3), wobei mit Hilfe der Primer SPA 1 und 2 der Gesamtbereich der RS (Fc-Region und X-Region) erfaßt wird. Mittels der Primer SPA 1 und SPA 3, der als degenierter Primer konfiguriert wurde, werden die einzelnen großen RS innerhalb der Fc-Region nachgewiesen. Basierend auf publizierten Gensequenzanalysen für das *spa*-Gen [18] wurden die im Rahmen dieser Untersuchung eingesetzten Primer ausgewählt:

SPA 1: 114-[5']-GATTTTAGTATTGCAATACATAAT
TCG-[3']-140 (27-mer)
SPA 2: 1702-[5']-CCACCAAATACAGTTGTACCG-
[3']-1682 (21-mer)
SPA 3: 1088-[5']-CTTTGGATGAA(G/A)CC(G/A)TT
(G/A)CGTTG-[3']-1066 (23-mer)

Mit Hilfe einer Pipettenspitze wurden von singular wachsenden Bakterienkolonien möglichst geringe Mengen der Kolonie direkt von der Agarplatte abgenommen und im unten aufgeführten Reaktionsansatz durch Umrühren mittels dieser Pipettenspitze verteilt. Es wurden 24 Stunden alte Kulturen auf Mueller-Hinton-Agar mit Zusatz von 5% Schafsblut verwendet. Der Reaktionsansatz für jede Protein A-Gen PCR, die als Multiplex-PCR durchgeführt wurde, hatte folgende Zusammensetzung: 2,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris/HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 100 µM dNTPs sowie 0,4 µmol eines jeden Primers und 3 U Taq-Polymerase (Pharmacia), wobei ein hot start gewählt wurde. Target-Sequenzen wurden in 50 µl-Reaktionen nach einer ersten Denaturierung (94°C für 60s) in 25 Zyklen (94°C, 20s; 55°C, 20s; 72°C, 50s) gefolgt von einer abschließenden Extension (72°C, 300s) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in einem 3-prozentigen (w/v) Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Testung der Reproduzierbarkeit der Amplifikationsergebnisse wurden in Intra- und Inter-Assay-Analysen je drei MRSA untersucht. In der Intra-Assay-Analyse wurden die o.g. drei MRSA zehnmal hintereinander in die PCR eingesetzt, bei der Inter-Assay-Analyse erfolgte die Testung der Isolate an zehn aufeinanderfolgenden Tagen.

PCR zur Charakterisierung der hypervariablen Region (HVR) in der Nähe des *mecA*-Gens

Das 2130 bp lange *mecA*-Gen kodiert für das Penicillin-bindende-Protein 2a, das für die Ausprägung der Methicillin-Resistenz in Staphylokokken essentiell ist. *mecA* und seine Promotorregion sind innerhalb der Koagulase-positiven und Koagulase-negativen Methicillin-resistenten Staphylokokken hochkonserviert. Zusätzlich zum *mecA*-Gen enthalten MRSA noch ca. 30 Kbp *mecA*-assoziiierter DNA (=mec-Determinante), die an das *mec*-Gen angrenzt und sich zwischen den Genen für die DNA-Gyrase (*nov*) und dem Protein A (*spa*) in das bakterielle Chromosom einfügt. 3' zu *mecA* befindet sich der sog. *dru*-Abschnitt (direct repeat units), der aus bis zu 10 repetitiven Sequenzen (RS) einer 40bp-Untereinheit besteht [19]. Darauf folgt der Teil eines offenen Leserasters (*open reading frame*) 145, der homolog zum Aminoterminus der Glycerophosphoryldiesterase aus *E. coli* ist. Weiter strangabwärts enthält das Genom die Insertionssequenz IS 431, die auch IS 257 genannt wird [19]. Der Bereich zwischen *mecA* und IS 431 wird als hypervariablen Region (HVR) bezeichnet, da sich verschiedene MRSA-Stämme in diesem Abschnitt je nach Verwandtschaftsgrad voneinander unterscheiden [19]. Mit Hilfe der Primer HVR 1 und HVR 2 wird der Gesamtbereich von *dru* und angrenzenden Abschnitten amplifiziert, während durch die Primer HVR 3 und 2 die einzelnen RS innerhalb der *dru*-Region dargestellt werden. Im Gegensatz zur Protein-A-Gen PCR wurde die HVR-PCR nicht als Multiplex-PCR durchgeführt, sondern es fanden zwei separate PCR-Reaktionen mit den Primern HVR 1 und 2 bzw. HVR 3 und 2 statt.

Basierend auf publizierten Gensequenzanalysen für den HVR-Genbereich [20] wurden die im Rahmen dieser Untersuchung eingesetzten Primer ausgewählt:
HVR 1: 338-[5']-ACTATCCCTCAGGCGTCC-[3']-358 (19-mer)
HVR 2: 892-[5']-GGAGTTAATCTACGTCTCATC-[3']-912 (21-mer)
HVR 3: 441-[5']-CTAAGTAAAATTGCAGATAAGA
GG-[3']-464 (24-mer)

Die experimentellen Bedingungen für die beiden HVR-PCR's waren identisch mit den für die Protein A-Gen PCR beschriebenen Versuchsbedingungen. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Amplifikationsprodukte wurden für die Intra- und Inter-Assay-Analysen der beiden HVR-PCR-Systeme je drei MRSA eingesetzt. Für die Intra-Assay-Analyse wurden die o.g. drei MRSA zehnmal hintereinander mittels PCR untersucht, bei der Inter-Assay-Analyse erfolgte die Testung der Isolate wiederum an zehn aufeinanderfolgenden Tagen.

Ergebnisse**Verbreitung von MRSA in 11 verschiedenen Akut-Krankenhäusern im Großraum Düsseldorf**

Die MRSA stammten aus 11 Akut-Krankenhäusern aus dem Großraum Düsseldorf, wobei der MRSA-Anteil

der einzelnen Hospitäler zwischen 0,5% und 7,8% (Aufstellung s. Tabelle 1) schwankte. MRSA konnten in allen einsendenden Krankenhäusern der untersuchten Region nachgewiesen werden. Insgesamt wurden MRSA auf 75 verschiedenen Stationen gefunden; gehäuft traten sie auf chirurgischen und internistischen Intensivstationen auf. Der prozentuale Anteil an MRSA-Stämmen war am höchsten unter den Staphylokokken-Isolaten aus Trachealsekret/ Bronchialsekret (17,6%) bzw. Rachensekret/Sputum (10,6%). An Katheterspitzen fanden sich 12,8% MRSA.

Das höchste MRSA-Aufkommen mit 7,8% trat in einem Krankenhaus mit ca. 1500 Betten auf, das niedrigste in einem Hospital mit ca. 200 Betten. Parallel zur Größenordnung der Bettenzahl nahm in der Regel auch der prozentuale MRSA-Anteil zu. In den Häusern mit hohen MRSA-Prozentsätzen waren sowohl die meisten MRSA-Erstisolate als auch relativ häufiger verschiedene MRSA-Typen mit divergenten PFGE-Bandenmustern zu finden.

Vergleich der verschiedenen genotypischen Verfahren und Einschätzung ihres Stellenwertes für die Typisierung von MRSA

Mit Hilfe der PFGE ließen sich 29 unterschiedliche MRSA-Typen diskriminieren, wobei es sich bei dem Typ 1 mit 75 zugehörigen Isolaten um den sog. norddeutschen Epidemiestamm handelte [7, 8].

Die Typisierungsergebnisse mit Hilfe der RAPD sind in Abb. 1 dargestellt. Es ließen sich 9 MRSA-Typen nachweisen, wobei den RAPD-Mustern 4-9 jeweils nur ein Isolat zuzuordnen war. In derselben Abbildung sind auch die Muster der ATCC-Stämme 12600, 33592 und 33593 dargestellt (die jeweiligen PFGE-Muster wurden bereits in einer früheren Publikation [11] aufgeführt).

Abbildung 2 zeigt die Spacer-Amplifikationsmuster mit der Zahl der zugehörigen Isolate. Mit Hilfe der Spacer-Amplifikation ließen sich 10 MRSA-Typen

voneinander diskriminieren. In Abbildung 2 sind zusätzlich die Typisierungsergebnisse der 91 internationalen Isolate aufgeführt. Hierbei zeigte sich, daß die Spacer-Muster von MRSA-Isolaten aus Deutschland und 7 anderen Ländern z.T. Übereinstimmungen aufwiesen. In derselben Abbildung sind auch die Muster der ATCC-Stämme 12600, 29213, 33591, 33592 und 33593 dargestellt.

Bei der Typisierung der 183 MRSA-Isolate durch die Koagulasegen-PCR zeigten sich vier unterschiedliche PCR-Amplifikate (A-D). Die PCR-Produkte A und B traten bei 54 bzw. 127 der untersuchten MRSA-Isolate auf, während die Amplifikate C und D jeweils nur in einem Fall nachgewiesen werden konnten. Der anschließende *Alu* I-Restriktionsverdau erbrachte keinen zusätzlichen Diskriminationsgewinn [16]. Die in der PFGE identischen Isolate zeigten aber auch gleiche Restriktionsfragmentmuster in der Koagulasegen-PCR. Darüberhinaus entsprachen die beiden Einzelisolate mit unterschiedlichen Koagulasegen-PCR-Mustern ebenfalls singulären, distinkten PFGE-Typisierungsergebnissen.

Mit Hilfe der Protein A-Gen PCR ließen sich im Kollektiv der 183 Düsseldorfer MRSA-Erstisolate 5 Typen voneinander unterscheiden, denen jeweils 92, 76, 12, 2, 1 Isolate zuzuordnen waren. Die Typisierung der 91 internationalen MRSA erbrachte 12 verschiedene Typen, wobei die o. g. 5 Typen in diesen 12 Typen erneut zu finden waren.

Durch Einsatz der HVR-PCR ließen sich im Kollektiv der 183 Düsseldorfer MRSA-Erstisolate 5 Typen voneinander abgrenzen, zu denen jeweils 95, 44, 20, 18 und 6 Isolate gehörten. Die korrespondierenden RS-Anzahlen in der *dru*-Region für die einzelnen HVR-PCR-Typen lagen zwischen 6 bis 10 RS. Auch im internationalen Kollektiv fanden wir nur Isolate mit 6 bis zu 10 RS.

Die PFGE hatte mit 29 unterschiedlichen Typen im Düsseldorfer MRSA-Kollektiv das beste diskriminatio-

Tabelle 1 Überblick über die prozentualen MRSA-Anteile in verschiedenen Krankenhäusern einschließlich der gefundenen MRSA-Erstisolate bzw. der Verbreitung verschiedener PFGE-Typen

Krankenhaus	Anzahl der MRSA-Erstisolate	% MRSA	PFGE Typen
1	132	7,8	1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 20, 21, 22, 23, 24, 27, 28, 29
2	10	5,8	2, 3, 4, 11, 25
3	4	0,8	4, 6
4	3	2,1	13, 26
5	2	0,6	17
6	13	6,9	1, 2, 4
7	2	1,8	4
8	2	0,5	3
9	8	0,8	1, 7, 18
10	2	1,1	1, 19
11	5	0,9	5

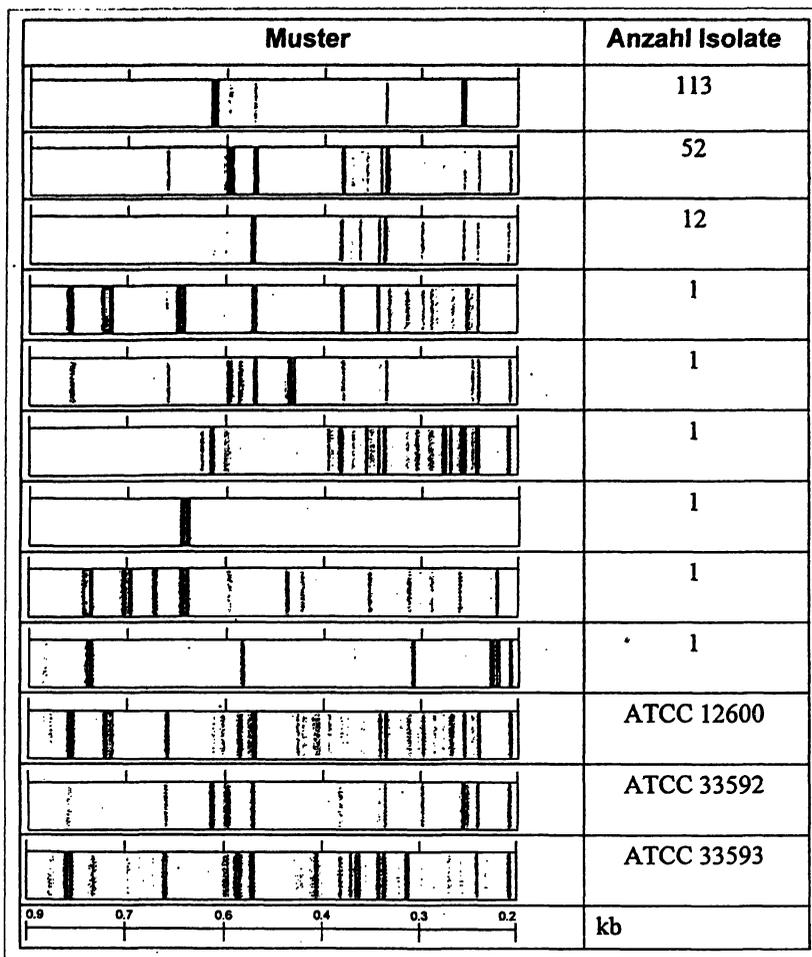


Abbildung 1 Übersicht der RAPD-Typisierungsergebnisse von 183 Düsseldorfer MRSA-Erstisolaten sowie 3 ATCC-Referenzstämmen

rische Potential, während die auf einer PCR basierenden Verfahren mit maximal 10 Typen (Spacer-Amplifikation) deutlich weniger unterschiedliche MRSA-Typen detektieren konnten. Allerdings ließen sich durch den Einsatz der Amplifikationsverfahren (mit Ausnahme der Koagulasegen-PCR) in der PFGE identische MRSA-Isolate voneinander unterscheiden.

Nach den von Maslow et al. [2] beschriebenen Anforderungen für Typisierungsverfahren ist festzuhalten, daß alle untersuchten MRSA mit Hilfe der PCR-Verfahren typisierbar waren. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hinsichtlich der PCR-Produkte bzw. auch der Restriktionsfragmentmuster war sowohl in Bezug auf Intra- als auch Inter-Assay-Präzision für alle PCR-Verfahren gut. Alle PCR-gestützten Methoden waren einfach und schnell zu erlernen. Ein besonders hervorzuhebender Vorteil der eingesetzten PCR-Typisierungsverfahren liegt in der zügigen Befunderstellung (innerhalb 24 h). Die Methoden können additiv zu anderen Typisierungsverfahren in Routinelaboratorien eingesetzt und ohne größeren Aufwand etabliert werden. Der entscheidende Nachteil der PCR-Typisie-

rungsmethoden besteht in der schlechteren Diskriminierungsfähigkeit (bezogen auf die PFGE) innerhalb der untersuchten MRSA-Isolate.

Typisierung des sog. norddeutschen Epidemiestammes mit Hilfe verschiedener Verfahren

Der dem PFGE-Typ 1 mit 75 zugehörigen Düsseldorfer MRSA-Erstisolaten entsprechende sog. norddeutsche Epidemiestamm trat in 4 Krankenhäusern des Großraums Düsseldorf auf und konnte durch den Einsatz der Amplifikationsverfahren weiter differenziert werden.

Isolate, die zum PFGE-Typ 1 gehörten, ließen sich 3 unterschiedlichen RAPD-Mustern, 3 unterschiedlichen Spacer-Mustern, 4 unterschiedlichen HVR-Mustern sowie 3 unterschiedlichen Protein A-Gen PCR-Mustern zuordnen.

Wird nun die Verteilung der „PFGE-Typ 1“-Subtypen betrachtet, so fällt z.B. auf, daß die MRSA-Isolate im Krankenhaus Nr. 6 (Tab. 1), die zum PFGE-Typ 1 gehörten (n=4, Isolierungszeitpunkte 7/93-4/94), ein distinktes, singular vorkommendes Muster bei der Be-

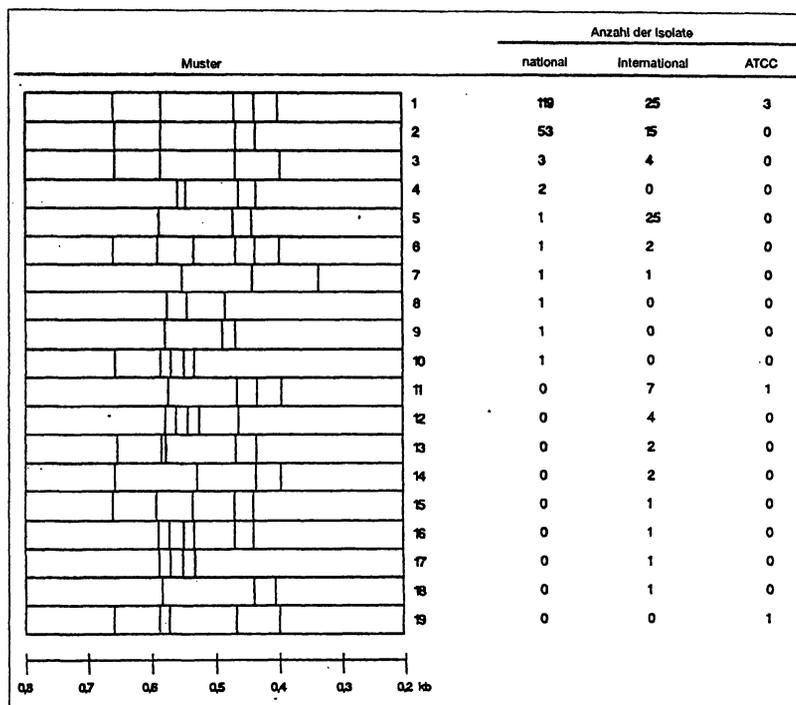


Abbildung 2 Übersicht der Spacer-Amplifikationsmuster von 183 Düsseldorf MRSA-Erstisolaten, 91 internationalen MRSA-Isolaten sowie von 5 ATCC-Referenzstämmen

trachtung aller 5 zusammengehörenden Typisierungsergebnisse zeigten und sich damit von den restlichen PFGE-Typ1-Isolaten unterschieden. Damit handelte es sich sehr wahrscheinlich um ein isoliertes Infektionsgeschehen im Krankenhaus 6 und nicht um einen Austausch von MRSA-Isolaten zwischen den Krankenhäusern. Auch die PFGE-Typ1-Isolate der gastroenterologischen Stationen (n=5) aus Krankenhaus 1 zeigen ein anderes Muster als die anderen PFGE-Typ 1-Isolate aus Krankenhaus 1, so daß auch hier ein separat vorliegendes Infektionsgeschehen postuliert werden muß.

In analoger Weise lassen sich auch die den anderen PFGE-Typen zuzuordnenden MRSA-Isolate durch den Einsatz der Amplifikationsverfahren z.T. weiter aufgliedern.

Diskussion

Verbreitung der MRSA in 11 verschiedenen Akut-Krankenhäusern im Großraum Düsseldorf

Der höchste MRSA-Anteil mit 7,8% trat in einem Krankenhaus mit ca. 1500 Betten auf, der niedrigste in einem Hospital mit ca. 200 Betten. Parallel zum Anstieg der Bettenzahl nahm zumeist auch der prozentuale MRSA-Anteil zu. Diese Beobachtung entspricht den Daten von *Panlilo et al.* [21], der über einen 17-jährigen Beobachtungszeitraum (1975-1991) einen kontinuierlichen Anstieg des MRSA-Anteils unter allen isolierten *S. aureus*-Stämmen in Kliniken der

USA von 2,4% auf 29% beschrieb. Die Zunahme verlief in Krankenhäusern verschiedener Größe unterschiedlich schnell. Der prozentuale Anteil der MRSA an allen *S. aureus*-Isolaten betrug 1991 in Krankenhäusern mit weniger als 200 Betten 14,9%, in Häusern mit 200-499 Betten 20,3% und in Kliniken mit 500 oder mehr Betten 38,3% [21]. In den Häusern mit hohen MRSA-Prozentsätzen sind sowohl die meisten MRSA-Erstisolate als auch häufiger unterschiedliche MRSA-Typen mit divergenten PFGE-Bandenmustern zu finden (Tab. 1).

Bei der Analyse dieser Daten ist allerdings zu bedenken, daß Patienten z.B. auf Intensiv- und Spezialstationen (z.B. Verbrennungsstationen) aufgrund langer Liegezeiten, dem engen und häufigen Kontakt zum Pflegepersonal, einem hohen Antibiotikaverbrauch und vieler möglicher Eintrittspforten für Bakterien (venöse u./o. arterielle Zugänge, Trachealkanülen, Blasenkatheter u.ä.) auch besonders anfällig für das Auftreten von MRSA-Stämmen sind [1, 22]. In größeren Krankenhäusern sind nun bekanntlich mehr Intensivbetten, es werden dort häufiger immunsupprimierte Patienten behandelt und notwendigerweise z.T. auch invasivere Behandlungsmethoden eingesetzt, so daß die Gefahr einer MRSA-Besiedlung per se höher ist als in kleineren Kliniken mit geringerem Risikopatientenaufkommen. Potentielle nosokomiale MRSA-Ausbrüche müssen daher, insbesondere auch in Großkliniken, durch die strikte Einhaltung empfohlener Hygienemaßnahmen [23] vermieden bzw. minimiert werden.

Vergleich der verschiedenen genotypischen Verfahren und Einschätzung des Stellenwertes für die Typisierung von MRSA

PFGE

In der vorliegenden Untersuchung zeigte die PFGE das größte diskriminatorische Potential, war gleichzeitig allerdings auch die zeitintensivste Methode mit der größten Personalbindung.

Aus verschiedenen Publikationen geht der hohe Stellenwert der PFGE für die Typisierung von *S. aureus* hervor [2, 3, 5]. Aufgrund der guten Vergleichbarkeit der Fragmentmuster, der hohen Diskriminationsfähigkeit und Reproduzierbarkeit wird die PFGE für diverse Mikroorganismen als „Goldener Standard“ der molekularen Epidemiologie bezeichnet [2]. Eine fehlende Standardisierung schmälerte jedoch bislang den Wert der PFGE, weil die Resultate verschiedener Laboratorien schwer vergleichbar waren. Die Lösung könnte im Einsatz standardisierter Systeme (vorgefertigte Reagenzien, standardisierte Stromapplikations-schemata, etc.) und dem einheitlichen Gebrauch bestimmter Kontrollstämme mit bekanntem Fragmentmuster sowie der Verwendung eines einheitlichen Markers für Molekülmassen liegen [24].

Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)

In der vorliegenden Untersuchung zeigte die RAPD das drittbeste diskriminatorische Potential, und mit Hilfe dieses Verfahrens ließen sich Isolate mit identischem PFGE-Muster weiter voneinander unterscheiden.

Dies bestätigen Untersuchungen von *Saulnier* et al. [25], die ebenfalls für die RAPD eine geringere diskriminatorische Fähigkeit als für die PFGE beschrieben. Entsprechend den Ergebnissen von *van Belkum* et al. [26] ist die RAPD sehr gut geeignet für die Durchführung genetischer Analysen sowie zum Monitoring nosokomial bedingter Ausbreitungen von Staphylokokken. Stämme mit identischem PFGE-Muster konnten durch die Anwendung der RAPD weiter differenziert werden, aber umgekehrt ließen sich auch Stämme mit gleichem RAPD-Muster mit Hilfe der PFGE weiter voneinander unterscheiden. Die Multi-center-Evaluation von *Van Belkum* et al. [26] machte allerdings auch deutlich, daß es z.T. gravierende Unterschiede zwischen den Ergebnissen mehrerer Laboratorien gibt. Diese Diskrepanzen waren wahrscheinlich am ehesten auf verschiedene Elektrophoresebedingungen und divergierende PCR-Protokollvorschriften zurückzuführen. Die gute Reproduzierbarkeit der RAPD-Methode innerhalb eines Labors wurde von verschiedenen Untersuchern demonstriert, wobei auf die besondere Bedeutung geeigneter Primer und optimierter PCR-Thermoprofile hingewiesen wurde [12, 27]. Die Typisierung von MRSA mit Hilfe der RAPD-Technik ist daher bisher auf Laboratorien beschränkt, die über die erforderliche technische Ausstattung sowie entsprechende experimentelle Erfahrungen verfügen.

16S-23S-rDNA-Spacer-Amplifikation

In der vorliegenden Untersuchung zeigte die Spacer-Amplifikation das zweibeste diskriminatorische Potential, und mit Hilfe dieses Verfahrens ließen sich Isolate mit identischem PFGE-Muster weiter voneinander unterscheiden. Dieses gute Resultat läßt sich möglicherweise noch verbessern, indem die 16S-23S-rDNA-Spacer-Amplifikation kombiniert wird mit einer anschließenden Spaltung der Amplifikationsprodukte durch Restriktionsendonukleasen.

Auch die Ergebnisse der intergenischen Spacer-Amplifikation zeichnen sich durch eine gute Reproduzierbarkeit aus und sind über einen langen Zeitraum stabil [13, 14]. Ein grundsätzliches Problem der Spacer-Amplifikation liegt allerdings in der Cross-Hybridisierung verschiedener PCR-Amplicone mit homologen Termini aber variablen internen Sequenzen, die zu einer Heteroduplex-DNA führen, welche mit geringerer Geschwindigkeit im elektrischen Feld wandert als die kompletten homologen Sequenzen [28]. Dieses Problem tritt allerdings nur bei nicht-denaturierenden Gel-systemen auf. Bei der Verwendung denaturierender Gelsysteme, wie dem von uns eingesetzten System unter Einsatz des A.L.F.-Sequencers, werden nur Einzelstrang-Moleküle analysiert. Die Heteroduplexbildung wird unter den verwendeten Elektrophoresebedingungen (Anwesenheit von 7 M Harnstoff, hohe Temperaturen) verhindert.

Koagulasegen-PCR

Die Koagulasegen-PCR ermöglichte lediglich die Unterscheidung von 4 Typen und wies demnach nur eine begrenzte Diskriminationsfähigkeit auf. Mit Hilfe der Koagulasegen-PCR konnten MRSA-Isolate, die einem bestimmten PFGE-Typ zuzuordnen waren, nicht weiter voneinander unterschieden werden.

Die Koagulasegen-PCR ist schnell und einfach durchführbar. Sie ist jedoch in ihrer Diskriminierungsfähigkeit der aufwendigeren PFGE und den anderen Amplifikationsverfahren deutlich unterlegen und daher gegenwärtig nur für eine grobe und vorläufige epidemiologische Analyse geeignet [3, 16].

Protein A-Gen PCR

In der vorliegenden Untersuchung wies die Protein A-Gen PCR das viertbeste diskriminatorische Potential auf, und es ließen sich auch Isolate mit gleichem PFGE-Muster voneinander unterscheiden.

Auch *Frenay* et al. [17] konnten zeigen, daß mit Hilfe einer PCR zur Bestimmung der RS-Anzahl innerhalb der sog. X-Region eine Diskrimination von MRSA möglich ist. *Van Belkum* et al. berichteten [29], daß bei dänischen *S. aureus*-Stämmen innerhalb derselben Lysogruppen bzw. Genotypen unterschiedlich viele RS innerhalb der *spa*-Region auftraten. Daraus folgerten sie aber, daß sich die X-Region in einer hypervariablen Weise verhalte und damit die *spa*-Region relativ unabhängig von der Gesamtevolution des *S. aureus*-Genoms sei. Bezüglich dieser Befunde von *van Belkum* [29] bleibt anzumerken, daß das zeitliche Ele-

ment bei der Bestimmung genetischer Verwandtschaftsgrade zwischen Bakterienstämmen die variable Größe ist. Betrachtet man repetitive DNA-Abschnitte oder Insertionssequenzelemente, so verändern sich diese sicherlich schneller als das Gesamtgenom. Auch wir fanden bei MRSA, die zu einem PFGE-Typ gehörten, Isolate mit einer unterschiedlich aufgebauten *spa*-Region (s.o.). Dies ist unserer Ansicht nach aber eher ein Ansatz, Stämme präziser voneinander differenzieren zu können, um den Verdacht auf nosokomiale Infektionen zu erhärten bzw. zu entkräften. Zur Stabilität der RS innerhalb der X-Region fanden *Frenay* et al. [17] sowohl in *in-vitro* als auch in *in-vivo*-Untersuchungen eine hohe Stabilität des entsprechenden Genlocus. Auch wir kamen nach Subkultivierung über 3 Monate bzw. durch Untersuchung von MRSA-Folgeisolaten eines Patienten über 3 Jahre zu dem Ergebnis, daß sich die Anzahl der RS nicht verändert hatte.

Mit der von uns vorgestellten Protein A-Gen PCR erhält der Untersucher sowohl Hinweise auf die Anzahl der großen RS innerhalb der Fc-bindenden Region als auch einen Überblick über die Gesamtzahl der RS (in der Fc-bindenden und der X-Region). Damit wird das diskriminatorische Potential gegenüber einer PCR, die nur die RS innerhalb der X-Region betrachtet, verbessert.

Frenay et al. [30] postulierten darüberhinaus, daß epidemisch auftretende MRSA-Isolate im Mittel über mehr RS im Bereich der X-Region verfügen als endemisch vorkommende. Wir fanden weder im Düsseldorfer MRSA-Kollektiv noch in der internationalen MRSA-Sammlung einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Anzahl der RS innerhalb der X-Region und dem Ausbreitungsmodus der Klone. Vielmehr war die Anzahl der RS rein zufällig verteilt.

HVR-PCR

In der vorliegenden Untersuchung konnten mit Hilfe der HVR-PCR fünf MRSA-Typen unterschieden werden, und in der PFGE identische Isolate zeigten z.T. unterschiedliche Muster in der HVR-PCR.

Eine HVR-PCR Methode wurde ebenfalls von *Nishi* et al. [31] zur Typisierung japanischer MRSA eingesetzt. Die HVR-PCR ist wie die Koagulasegen-PCR gegenwärtig nur für eine sehr grobe und vorläufige epidemiologische Analyse sowie evt. zur weiteren Differenzierung von Isolaten mit gleichem PFGE-Muster geeignet.

Typisierung des norddeutschen Epidemiestammes mit Hilfe verschiedener Verfahren

Während der Nachweis nicht identischer Stämme mit Hilfe eines Typisierungsverfahrens die klare Aussage zuläßt, daß diese zu verschiedenen Infektketten gehören, müssen identische Stämme aber nicht unbedingt auf ein einheitliches Infektionsgeschehen hindeuten. Dieses Problem ist insbesondere bei MRSA-Stämmen mit epidemischer, überregionaler Ausbreitung von Bedeutung, da diese Stämme gehäuft auftreten, ohne daß ein einheitlicher Infektionsweg vorlie-

gen muß. Der alleinige Nachweis eines solchen Stammes bei verschiedenen Patienten genügt daher nicht zur Postulierung eines bestimmten nosokomialen Infektionsweges oder gar einer Infektionsquelle.

Der im Großraum Düsseldorf in den letzten Jahren aufgetretene sog. norddeutsche Epidemiestamm zeigt in der PFGE ein einheitliches Bandenmuster, doch mit Hilfe der RAPD, Spacer-Amplifikation, Protein A-Gen PCR und HVR-PCR lassen sich Subtypen charakterisieren (s.o.). Infektionswege und Infektionsquellen können bei eindeutig identifizierten Subtypen somit genauer nachvollzogen werden.

Zusammenfassend haben die auf einer PCR basierenden Verfahren den Vorteil, schnell und einfach durchführbar zu sein. Sie sind in ihrer Diskriminierungsfähigkeit der aufwendigeren PFGE aber unterlegen. Das diskriminatorische Potential der evaluierten Verfahren zur Typisierung von MRSA ist nach unseren Erfahrungen wie folgt einzustufen: PFGE > Spacer-Amplifikation > RAPD > Protein A-Gen PCR > HVR-PCR > Koagulasegen-PCR. Denkbar ist der Einsatz der Amplifikationsverfahren (insbesondere RAPD, Spacer-Amplifikation oder Protein A-Gen PCR) für eine gröbere und eher vorläufige epidemiologische Analyse, die innerhalb von 8 Stunden durchgeführt werden kann. Besteht dann weiterhin der Verdacht auf eine „klonale Identität“ der untersuchten Isolate, sollte eine PFGE angeschlossen werden. Durch den kombinierten Einsatz mehrerer Verfahren lassen sich die besten diskriminatorischen Resultate erzielen. Insbesondere die Typisierung epidemisch auftretender MRSA-Stämme, bei denen eine „Feintypisierung“ mit Hilfe verschiedener Verfahren notwendig sein kann, um den Verdacht auf nosokomiale Infektionen zu erhärten bzw. zu entkräften, sollte mit mehreren genotypischen Verfahren parallel erfolgen.

Literatur

1. Mulligan ME, Murray KA, Ripner BS, Standifort 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.
2. Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 153-64.
3. Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, Hancock G, Hill GA, Hollis R, Jarvis WR, Kreiswirth B, Eisner W, Maslow J, McDougal LK, Miller JM, Mulligan M, Pfaller MA. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 407-15.
4. Goh SH, Byrne SK, Zhang JL, Chow AW. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of Coagulase Gene Polymorphism. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1642-5.
5. Goering RV. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1993; 14: 595-600.
6. Van Belkum A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by PCR. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 174-84.
7. Witte W, Cuny C. Multiresistenz der Staphylokokken gegen Antibiotika. *Die gelben Hefte* 1996; 36: 136-45.
8. Schmitz FJ, Geisel R, Wagner S, Lenz W, Kamla V, Heinz HP. Nosokomiale Infektionen durch Methicillin-resistente *Staphylococ-*

aus aureus-Stämme im Großraum Düsseldorf. J Lab Med 1996; 20: 38-48.

9. Deutsches Institut für Normung: Empfindlichkeitsprüfung von Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika. In: DIN-Taschenbuch Medizinische Mikrobiologie und Immunologie. Beuth: Berlin 1992; 331-406.

10. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33: 2233-9.

11. Schmitz FJ, Geisel R, Wagner S, Heinz HP, Idel H, Hadding U. Standardisierte Pulsfeld-Gel-Elektrophorese mit dem GenePath Strain Typing System zum DNA-Fingerprinting bei nosokomialen Infektionen. Lab Med 1995; 19: 512-22.

12. Bassam BJ, Bentley S. DNA fingerprinting using arbitrary primer technology (APT): a tool or a torment. Australasian Biotechnology 1994; 4: 232-6.

13. Jensen MA, Webster JA, Straus N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. Appl Environ Microbiol 1993; 59: 945-52.

14. Kostman JR, Alden MB, Mair M, Edlind TD, Puma JLL, Stull TL. Universal approach to bacterial molecular epidemiology by polymerase chain reaction ribotyping. J Infect Dis 1995; 171: 204-8.

15. 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.

16. Schmitz FJ, Schwarzkopf A, Geisel R, Wagner S, Lenz W, Idel H, Heinz HP. Einsatzmöglichkeiten der Koagulasegen-PCR als epidemiologische Screening-Methode für Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme. Clin Lab 1996; 42: 395-402.

17. Frenay HME, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Verhoef J, Mooi FR. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996; 15: 60-4.

18. Uhlen M, Guss B, Nilsson B, Gatenbeck S, Philipson L, Lindberg M. Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. J Biol Chem 1984; 259: 1696-1702.

19. Ryffel C, Bucher R, Kayser FH, Berger-Bachi B. The *Staphylococcus aureus* mec determinant comprises an unusual cluster of direct repeats and codes for a gene product similar to the *Escherichia coli* sn-glycerophosphoryl diester phosphodiesterase. J Bacteriol 1991; 23: 7416-22.

20. EMBL Data library (accession numbers X52594)

21. Panlilio A, Culver DH, Gayns RP, Banerjee S, Henderson TS, Tolson JS, Martone WLJ. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991. Infect Control Hosp Epidemiol 1992; 13: 582-6.

22. Steinberg JP, Clark CC, Hackman BO. Nosocomial and Community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremias from 1980 to 1993: impact of intravascular devices and methicillin resistance. Clin Infect Dis 1996; 23: 255-9.

23. Schmitz FJ, 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.

24. Schwarzkopf A, Cuny C, Witte W. Bestimmung der Fragmentmuster der genomischen DNA mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese bei *Staphylococcus aureus* - Ein Vorschlag zur Standardisierung. Bundesgesundheitsbl 1995; 38: 215-220.

25. Saulnier P, Bourneix C, Prevost G, Andrement A. Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1993; 31: 982-5.

26. Van Belkum A., Kluytmans J, Van Leeuwen W, Bax R, Quint W, Peters E, Fluit A et al.. Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol 1995; 33: 1537-47.

27. Penner GA, Bush A, Wise R, Domir L, Kasha K, Loarche A, Scolis G, Molnar SJ, Fedak G. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. PCR Methods Applic 1993; 2: 341-5.

28. Jensen MA, Straus N. Effect of PCR conditions on the formation of heteroduplex and single-stranded DNA products in the amplification of bacterial ribosomal DNA spacer regions. PCR Methods Applic 1993; 3: 186-94.

29. Van Belkum A, Riewerts-Eriksen N, Sijmons M, van Leeuwen W, VandenBergh M, Kluytmans J, Espersen F, Verbrugh H. Are variable repeats in the *spa* gene suitable targets for epidemiological studies of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996; 15: 768-9.

30. Frenay HME, Theelen JPG, Schouls LM, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Verhoef J, van Leeuwen WJ, Mooi FR. Discrimination of epidemic and non epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. J Clin Microbiol 1994; 32: 846-7.

31. Nishi JI, Miyanohara H, Nakajima T, Kitajima I, Yoshinaga M, Maruyama I, Miyata K. Molecular typing of the methicillin resistance determinant (*mec*) of clinical strains of *Staphylococcus* based on *mec* hypervariable region length polymorphisms. J Lab Clin Med 1995; 125: 29-35.