

Methizillin resistente Staphylococcus aureus - MRSA -

Stellenwert der molekularbiologischen
Direktnachweise

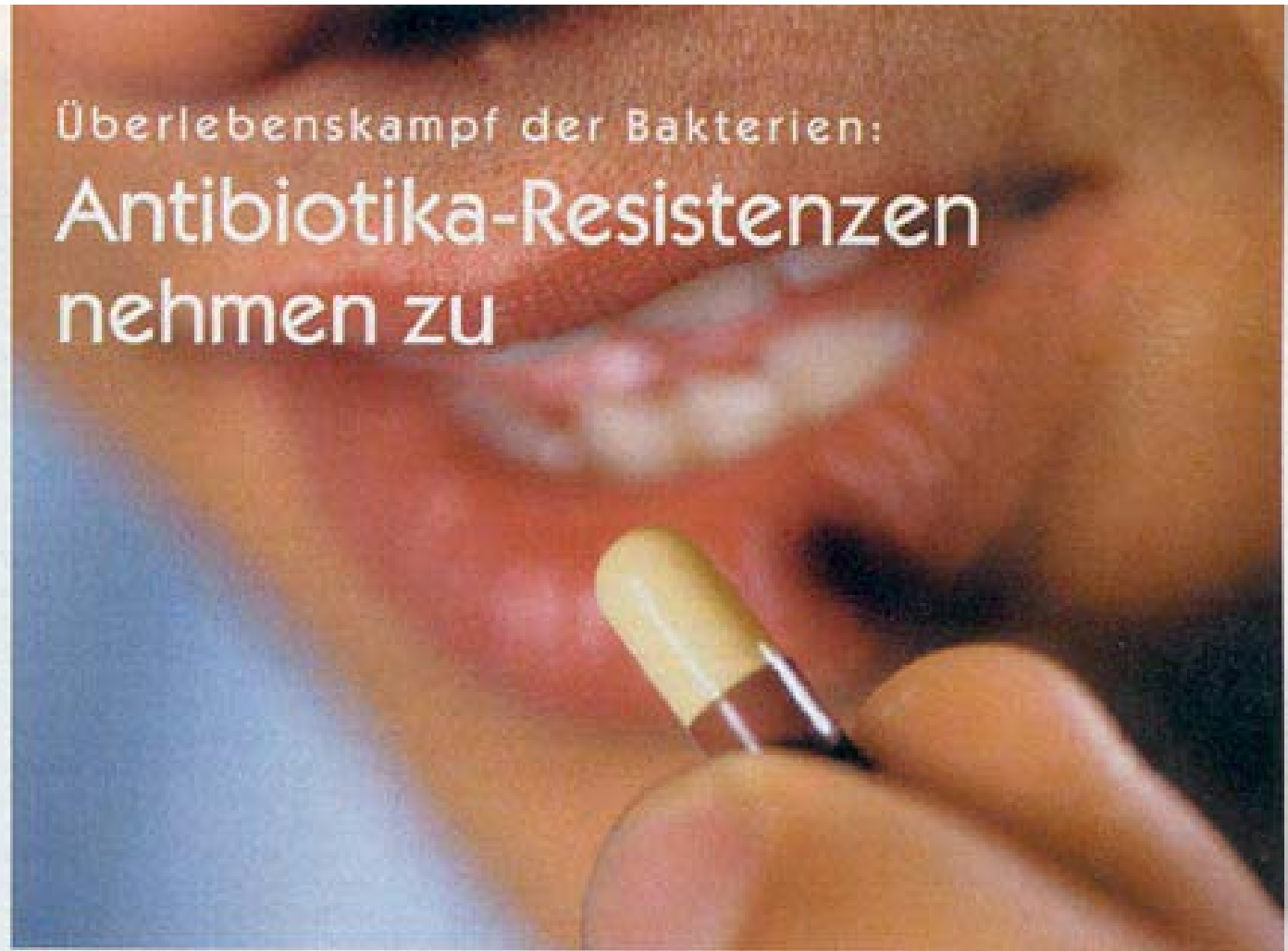
Dr. med. Olivier Dubuis  VIOLLIER

Antibiotika

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schlägt Alarm: Bei immer mehr Krankheitserregern verpuffen die Wirkungen von Antibiotika buchstäblich. Was macht Bakterien gegen die einst als „Wunderwaffe“ titulierten Antibiotika so resistent?

Eine brisante Entwicklung macht der WHO-Jahresbericht deutlich: Weltweit sind Infektionskrankheiten dank Erregerresistenzen gegen Antibiotika wieder auf dem Vormarsch. Beispiel Tuberkulose: Seit einiger Zeit mutieren die TBC-Erregerstämme und werden immer unempfindlicher gegenüber Antibiotika (mit TBC sind rund 1,7 Milliarden Men-

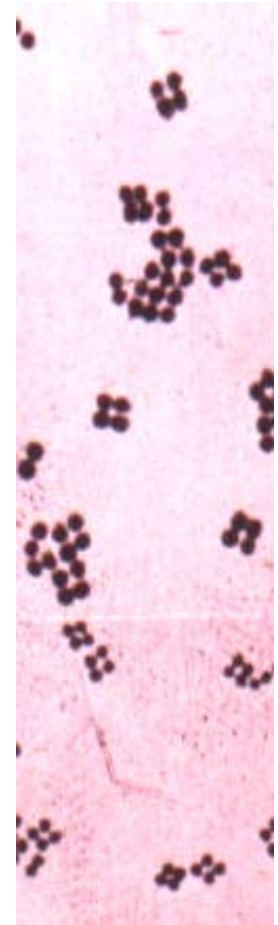
Überlebenskampf der Bakterien: Antibiotika-Resistenzen nehmen zu



Malaria-Mittel wirkungslos. die Lage bei den erworbenen Infektionen helfen (z. B. werden

Methizillin resistente *S. aureus* (MRSA)

- Resistenzgen *mecA* (Genprodukt: PBP2a)
- Chromosomale Kassetten SCCmec I-V
- Klonalität



Hospital acquired (HA)-MRSA

- Risikofaktoren (Polymorbidität, Heime, Spitalaufenthalte in endemischen Regionen)
- Klonalität
- Chromosomale Kasette SCCmec I-III
- Resistent gegen zahlreiche Antibiotikaklassen
- Selten Toxine wie PVL oder Enterotoxine
- Übertragung von Patient zu Patient häufig

Community acquired (CA)-MRSA

- Junge Patienten ohne bekannten Risikofaktoren
- Klone: Nicht identisch mit Spitalklone!
- Chromosomale Kasette SCCmec IV
- Häufig nur resistent auf Beta-Laktam Antibiotika
- Häufig Toxine (Panton-Valentine Leukocidin=PVL, Enterotoxine)
- Selektionsvorteil?

Resistenzstatistik Viollier AG 2005

	<i>Staphylococcus aureus</i> (alle) sensibel %	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) sensibel %
Penicillin	26.7	0.0
Oxacillin	94.4	0.0
Erythromycin	88.9	30.8
Clindamycin	96.7	61.0
Gentamicin	98.2	85.6
Tetracyclin	93.6	84.6
Co-trimoxazol	98.4	96.4
Ciprofloxacin	91.3	22.3
Levofloxacin	93.0	22.4
Moxifloxacin	95.1	33.6
Vancomycin	100.0	100.0
Teicoplanin	100.0	100.0
Rifampicin	99.3	93.5
Quinupristin / Dalfopri.	100.0	99.2
Fusidinsäure	95.3	86.5

Labordiagnostik

Referenzmethode: Kultur mit selektiver Anreicherung

z.B. Chromogene Platte +Chapman Bouillon

- Vorteil: Sensitivität ↑↑↑
- Nachteil: Ausschluss eines MRSA dauert 48 bis 72 Stunden

• Referenzmethoden: Resistenz

Screening: Cefoxitin, Oxacillin

Chromogene
Medien



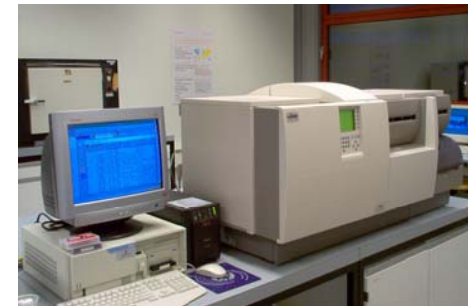
Disk-Diffusion



Oxacillin
Screening Agar

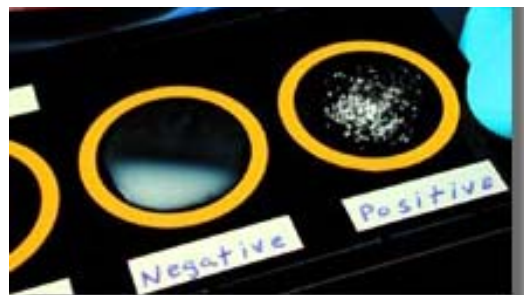


Automaten

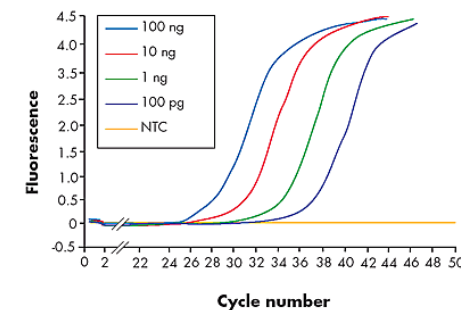


+ Bestätigungstest

PBP 2a' Agglutination



mecA PCR



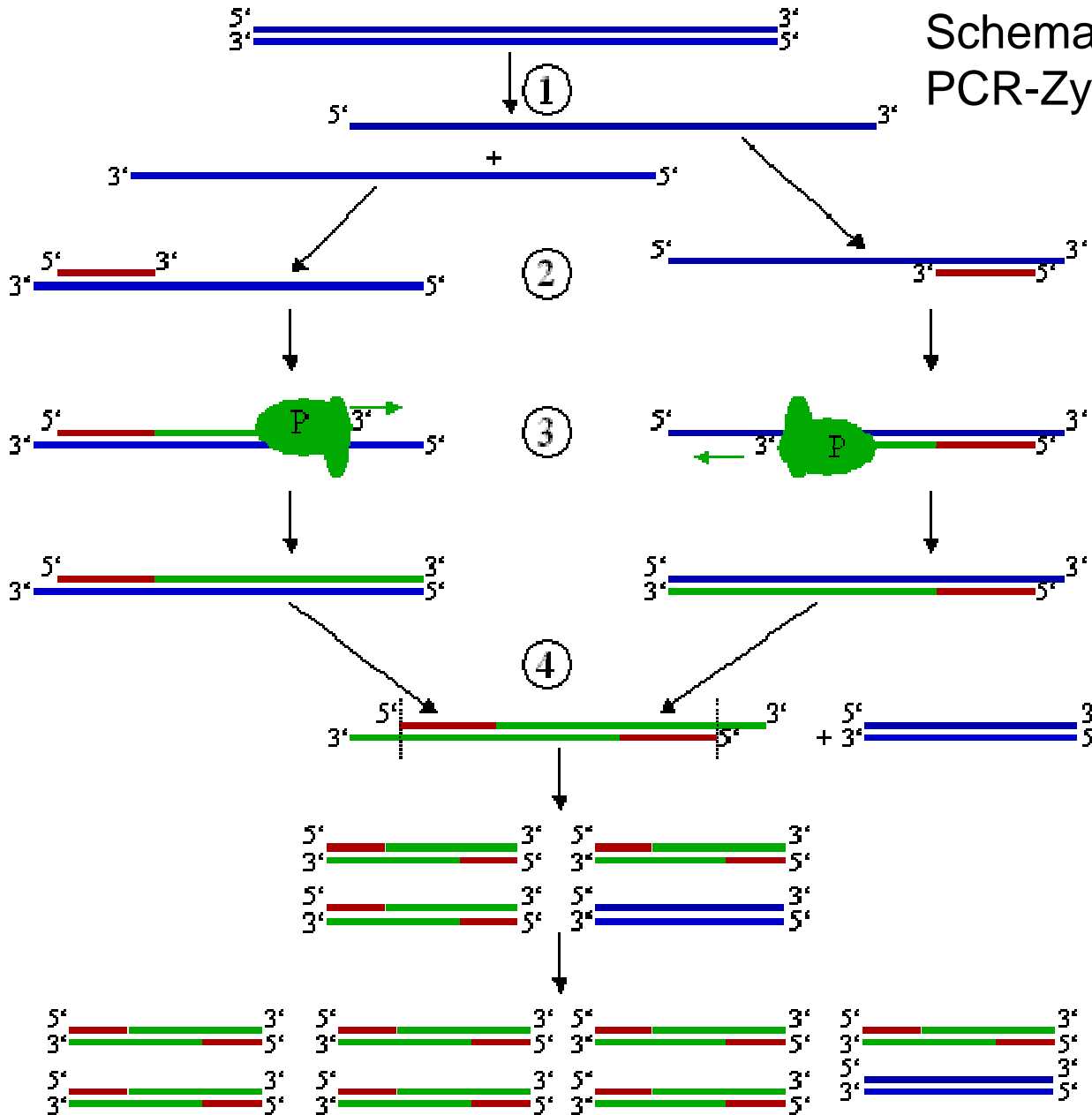
Screening mit PCR direkt ab Abstrich \Rightarrow Ausschluss von Trägertum in Stunden

- Schnelles erfassen von Trägern und somit Reduktion des Übertragungsrisiko
- Verkürzung der Isolationsdauer
(Kosten >1500.- SFr./Tag)

PCR Systeme auf dem Markt

- GenoType MRSA direct[®] (Hain Lifescience)
PCR basierter Hybridisierungs Assay
- IDI MRSA[®] (BD-GeneOhm)
Real time PCR auf SmarCycler II Gerät
- GeneXpert[®] MRSA (Cepheid)
Real time PCR auf GeneXpert DX Gerät

Schematische Darstellung des PCR-Zyklus



(1) Schmelzen
(*Denaturierung*) bei ca.
96 °C

(2) Anlagerung
(*Primerhybridisierung*)
bei ca. 68 °C

(3) Verlängerung
(*Elongation*) bei ca.
72 °C (P=Polymerase)

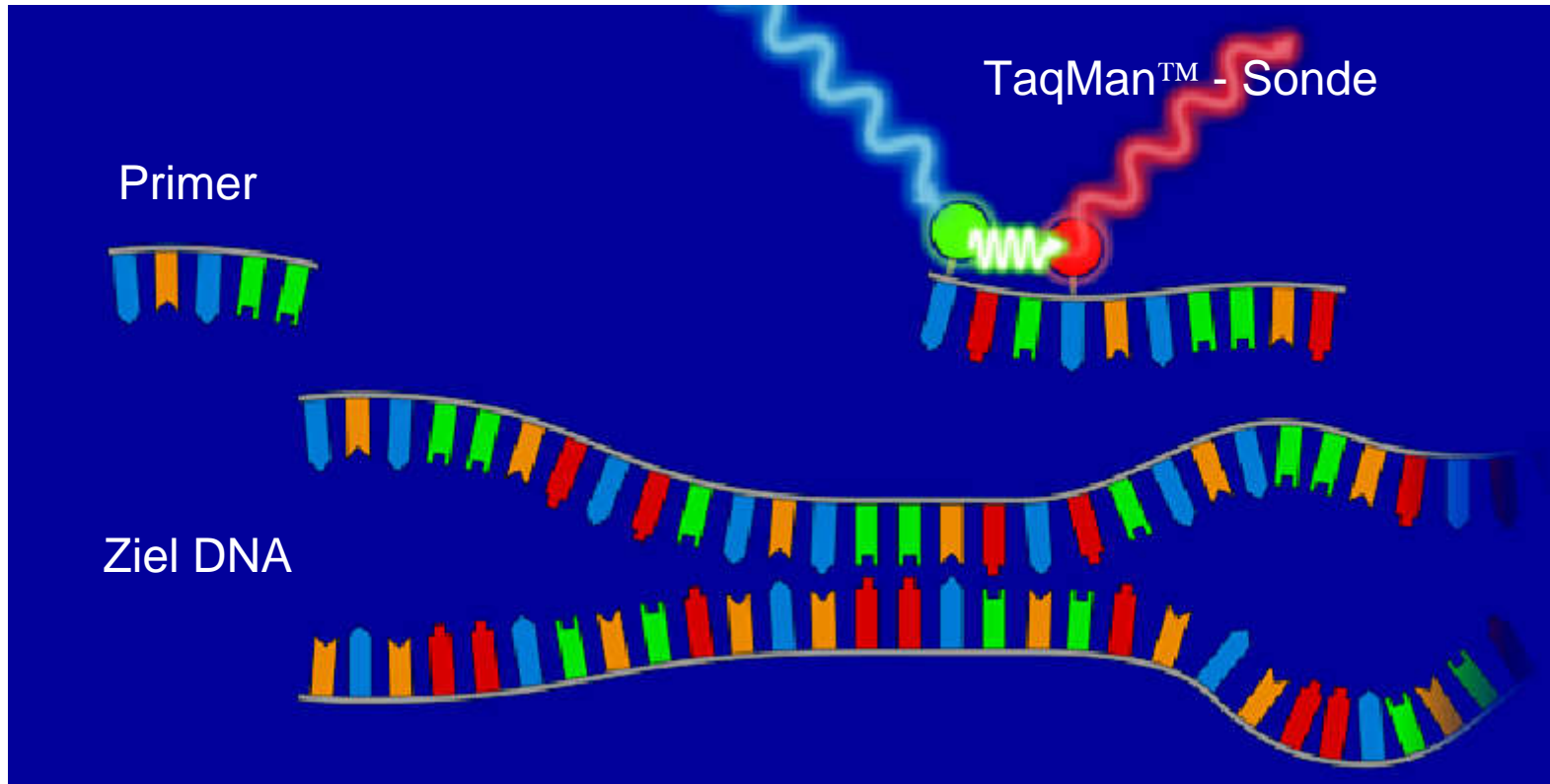
(4) Der erste Zyklus ist
beendet

Real Time PCR mit TaqMan™ Probes

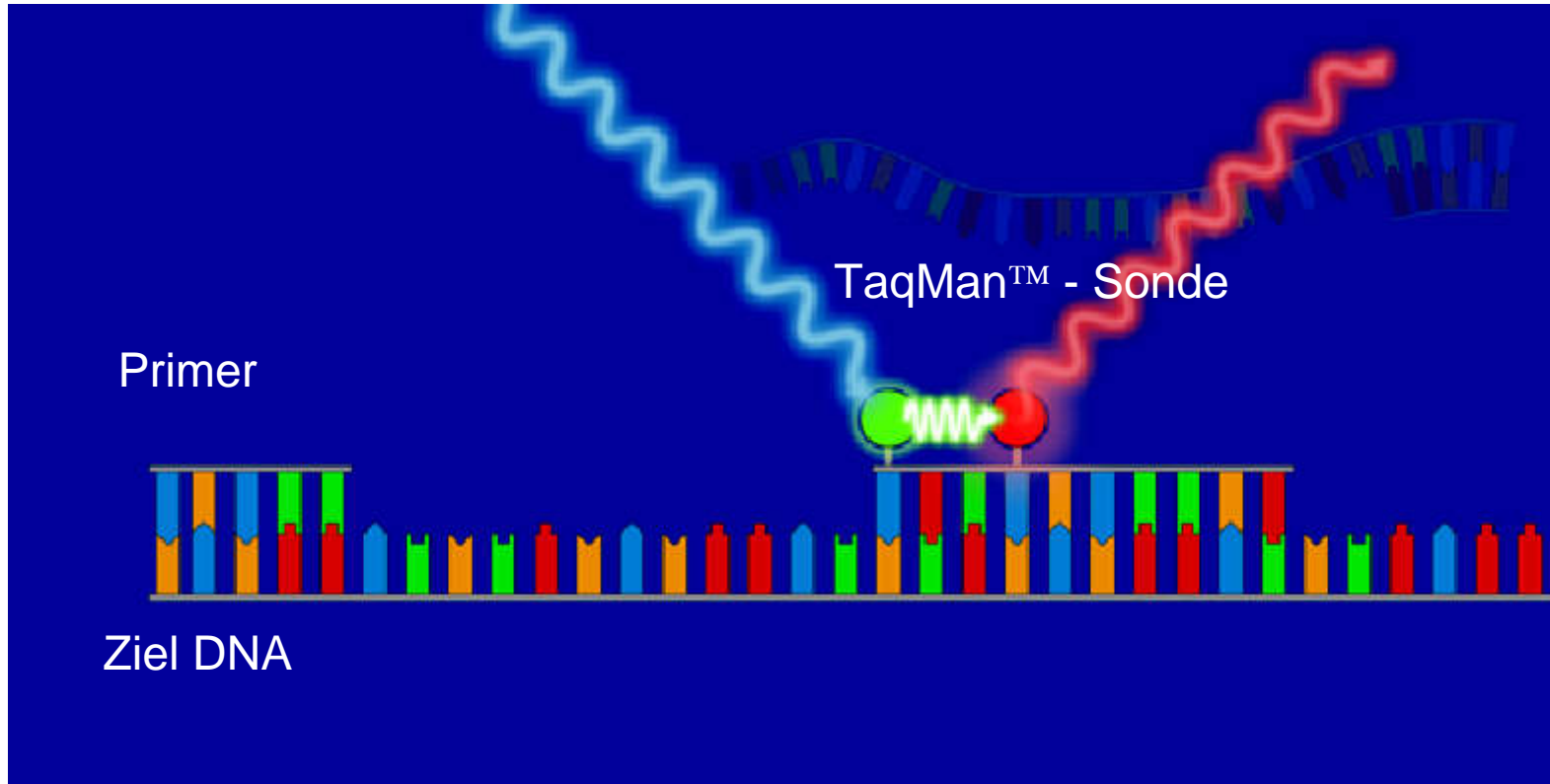
Eine TaqMan™ Probe ist ein sequenzspezifisches Oligonukleotid, welches mit einem Fluoreszenzfarbstoff und einem "Quenching-Molekül" markiert ist. Sind diese beiden Moleküle an das Oligonukleotid gebunden, erhält man keine Fluoreszenz, da diese durch das "Quenching-Molekül" unterdrückt wird.

Wie entsteht nun das Signal? Zum Zeitpunkt des Annealings der PCR-Primer bindet auch die TaqMan™ Probe an die Ziel-DNA. Die Polymerase synthetisiert nun den zweiten Strang und kommt zur gebundenen TaqMan™ Probe. Da die Polymerase eine 5' Exonucleaseaktivität besitzt, löst sie die TaqMan™ Probe nicht von der Ziel-DNA ab, sondern baut die Probe ab. Das "Quenching-Molekül" wird vom Fluoreszenzfarbstoff getrennt, dieser emittiert somit Fluoreszenz definierter Wellenlänge, deren Intensität in Summe direkt proportional der Zahl der neu gebildeten DNA-Stränge ist (Quantifizierung). Der Zeitpunkt der Messung im Zyklus ist nicht kritisch, da eine einmal abgebaute TaqMan™ Probe permanent fluoresziert.

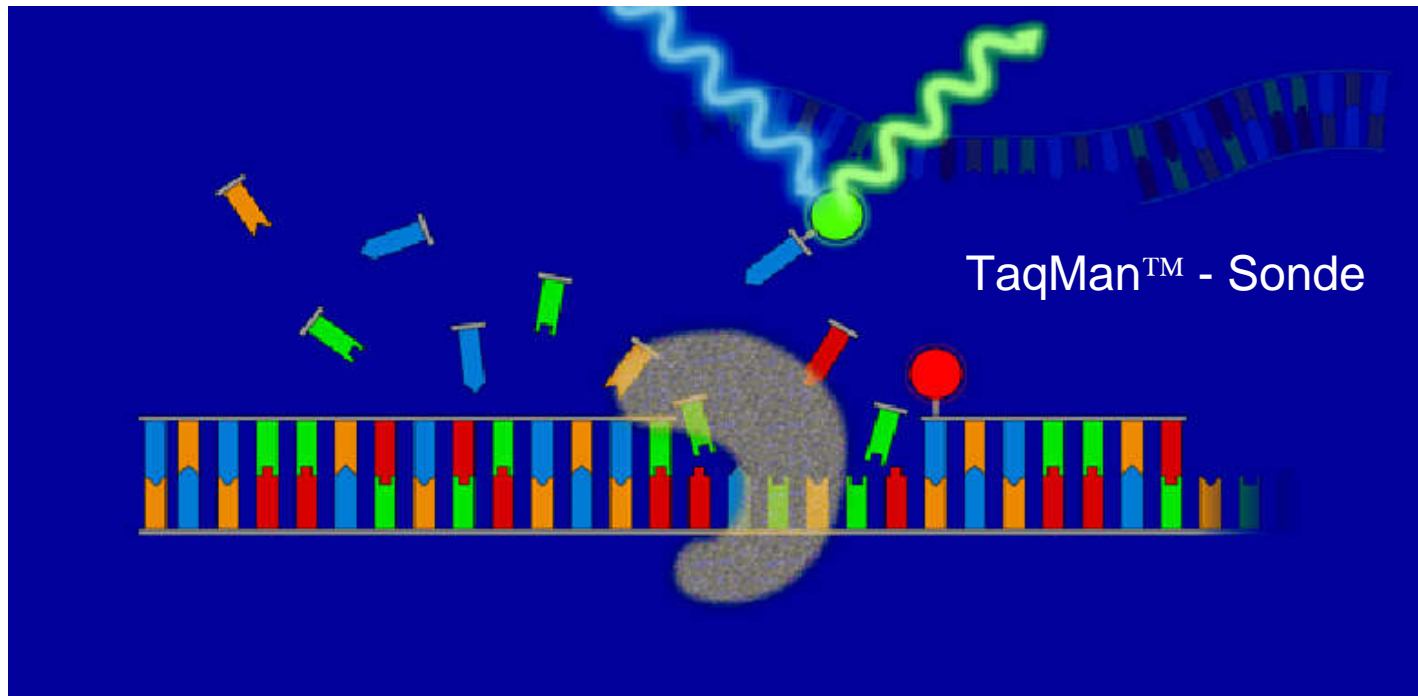
Denaturierung



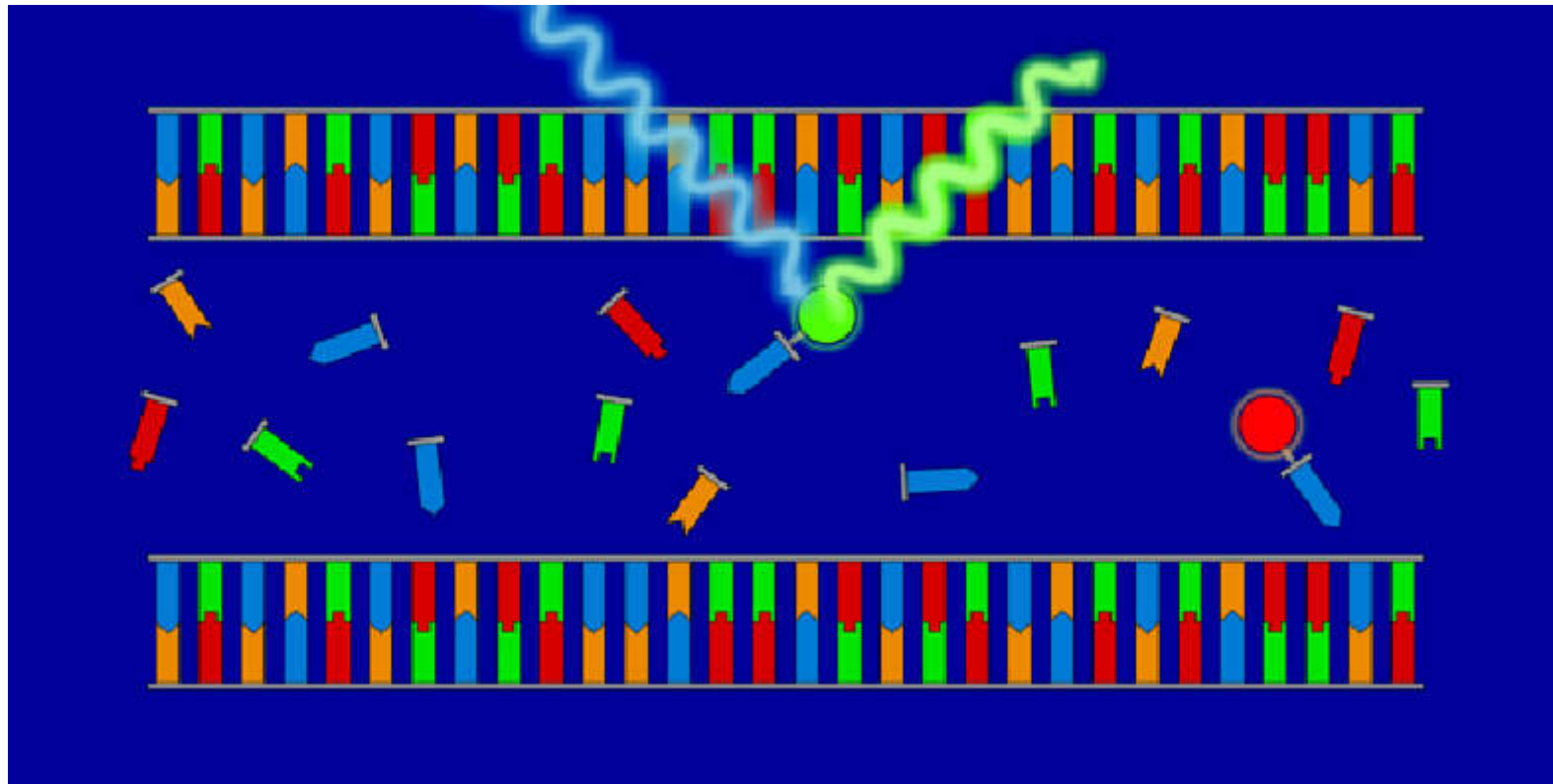
Primer Anlagerung

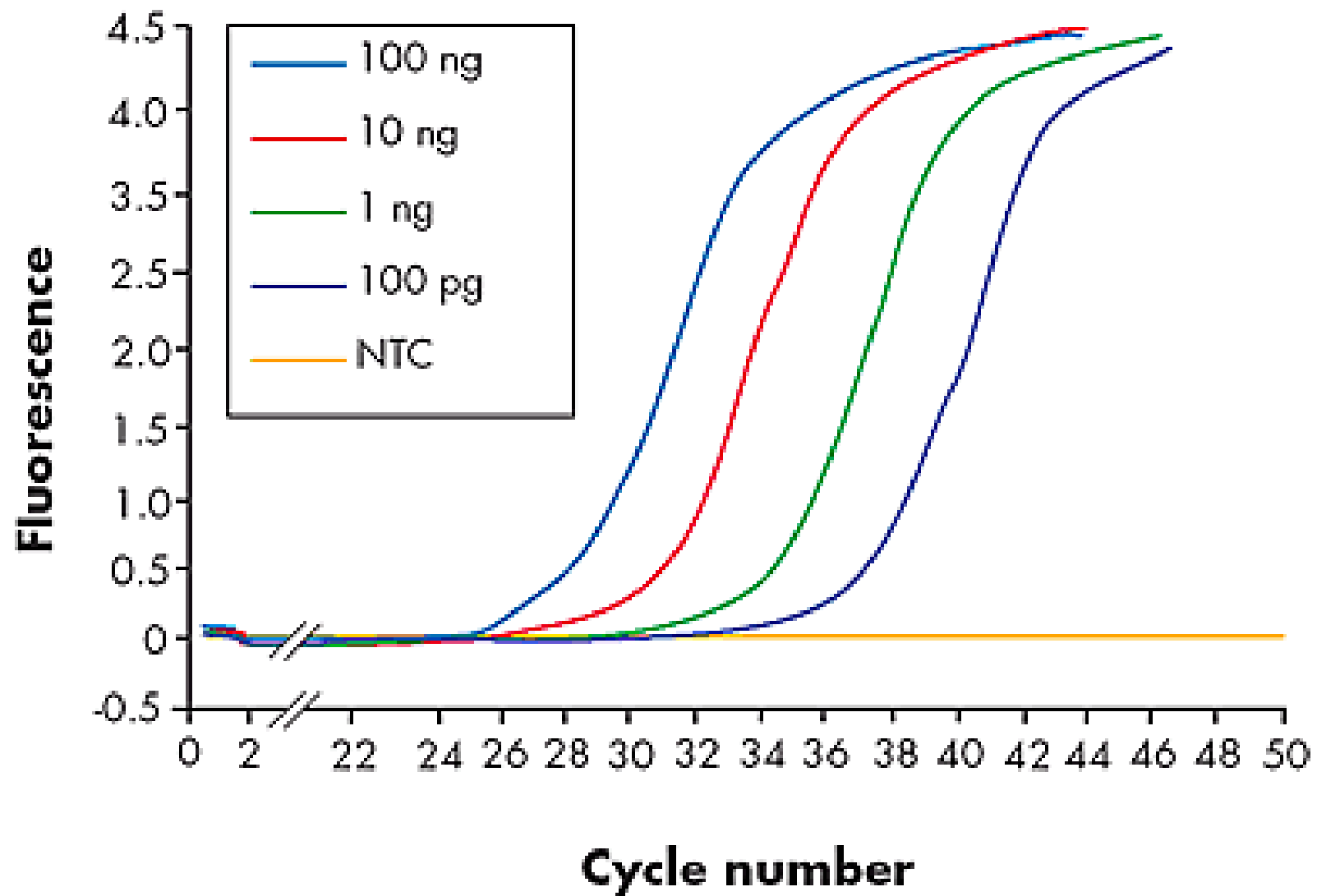


Kettenverlängerung



Ende vom Zyklus



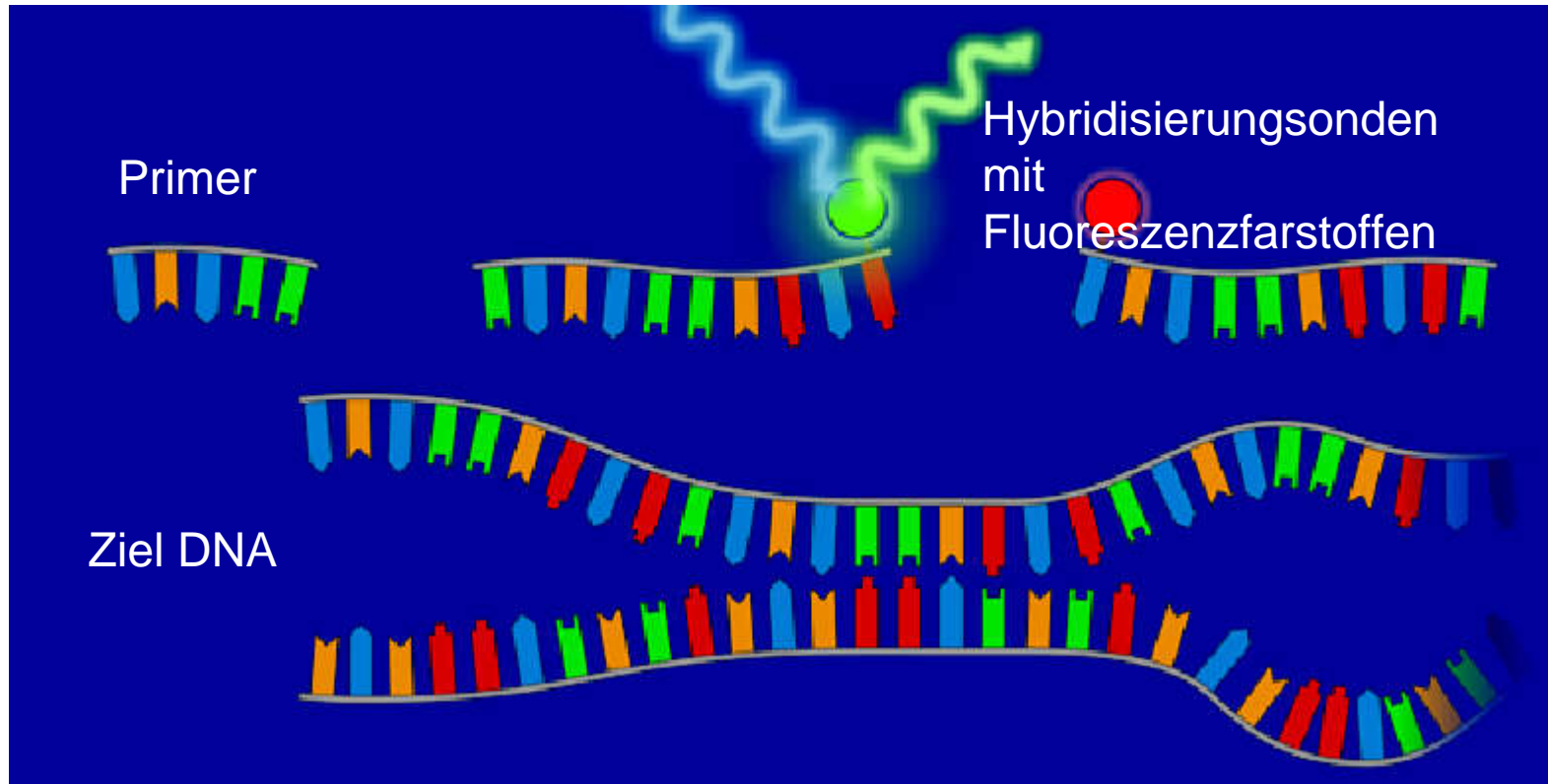


Schematischer Ablauf einer Real Time PCR mit Hybridisation Probes

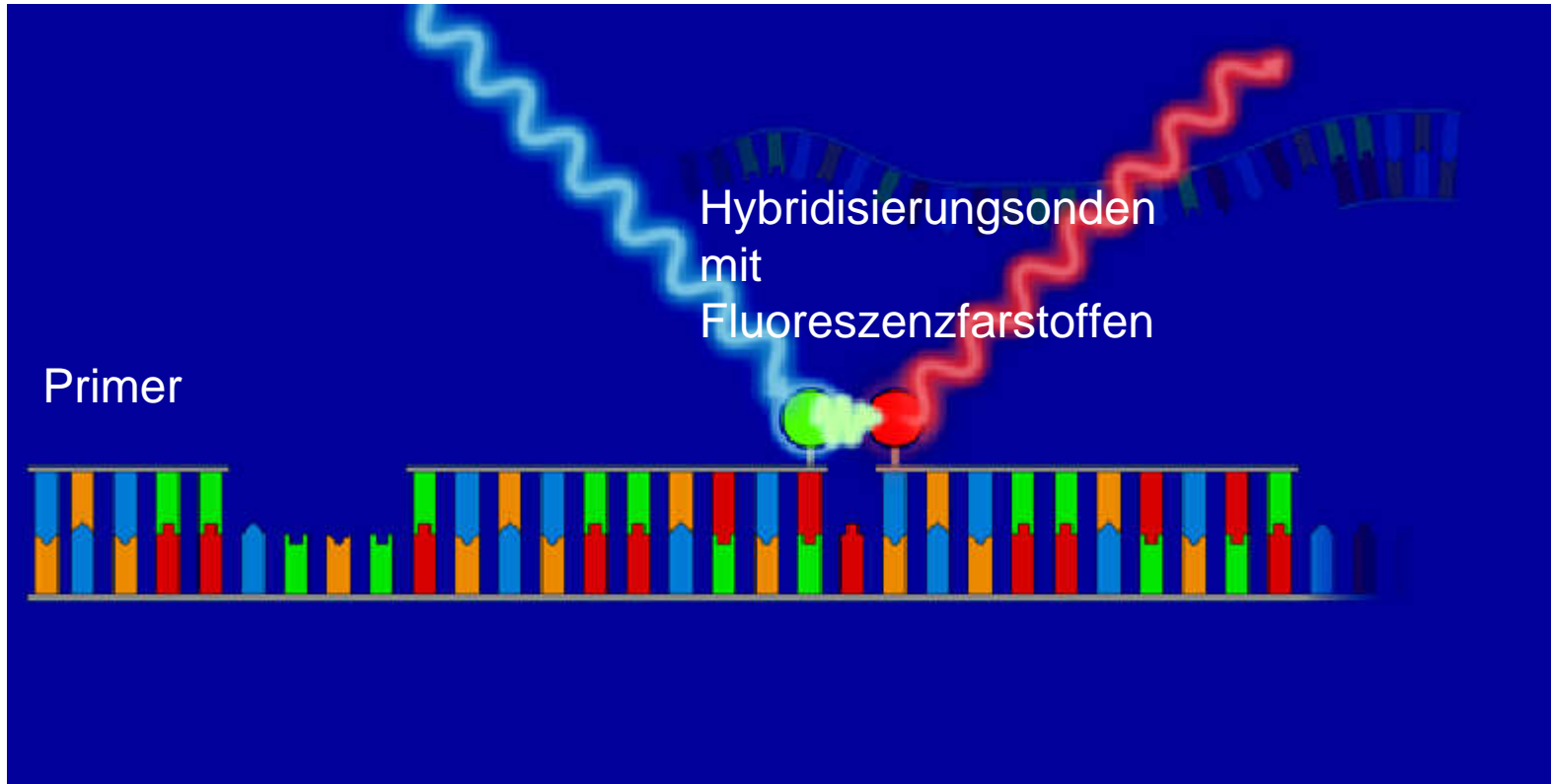
Zu einem Standard PCR-Ansatz werden zusätzlich zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (Hybridisation Probes) zugefügt, welche zwischen den beiden Primern in räumlicher Nähe zueinander (1-5 Nukleotide Abstand) an die Ziel-DNA binden. Diese Hybridisation Probes sind mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert (z. B. Fluorescein, LC Red 640).

Die Detektion basiert auf dem FRET-Prinzip ("fluorescence resonance energy transfer") Binden die beiden Hybridisation Probes an der gesuchten Ziel-DNA in räumlicher Nähe und regt man gleichzeitig das Fluorescein der ersten Hybridisation Probe an, emittiert dieses keine Fluoreszenz, sondern überträgt die Energie auf den benachbarten zweiten Fluoreszenzfarbstoff (LC Red 640). Dieser emittiert nun rote Fluoreszenz, deren Intensität in Summe direkt proportional der Menge an Ziel-DNA ist. Die Messung des Signals erfolgt einmal pro Zyklus nach dem Primer Annealing (zu diesem Zeitpunkt sind beide Hybridisation Probes an die Ziel-DNA gebunden und es erfolgt ein Energietransfer). Ungebundene Hybridisation Probes geben auf Grund der fehlenden räumlichen Nähe (diffundieren frei in der Lösung) kein Signal.

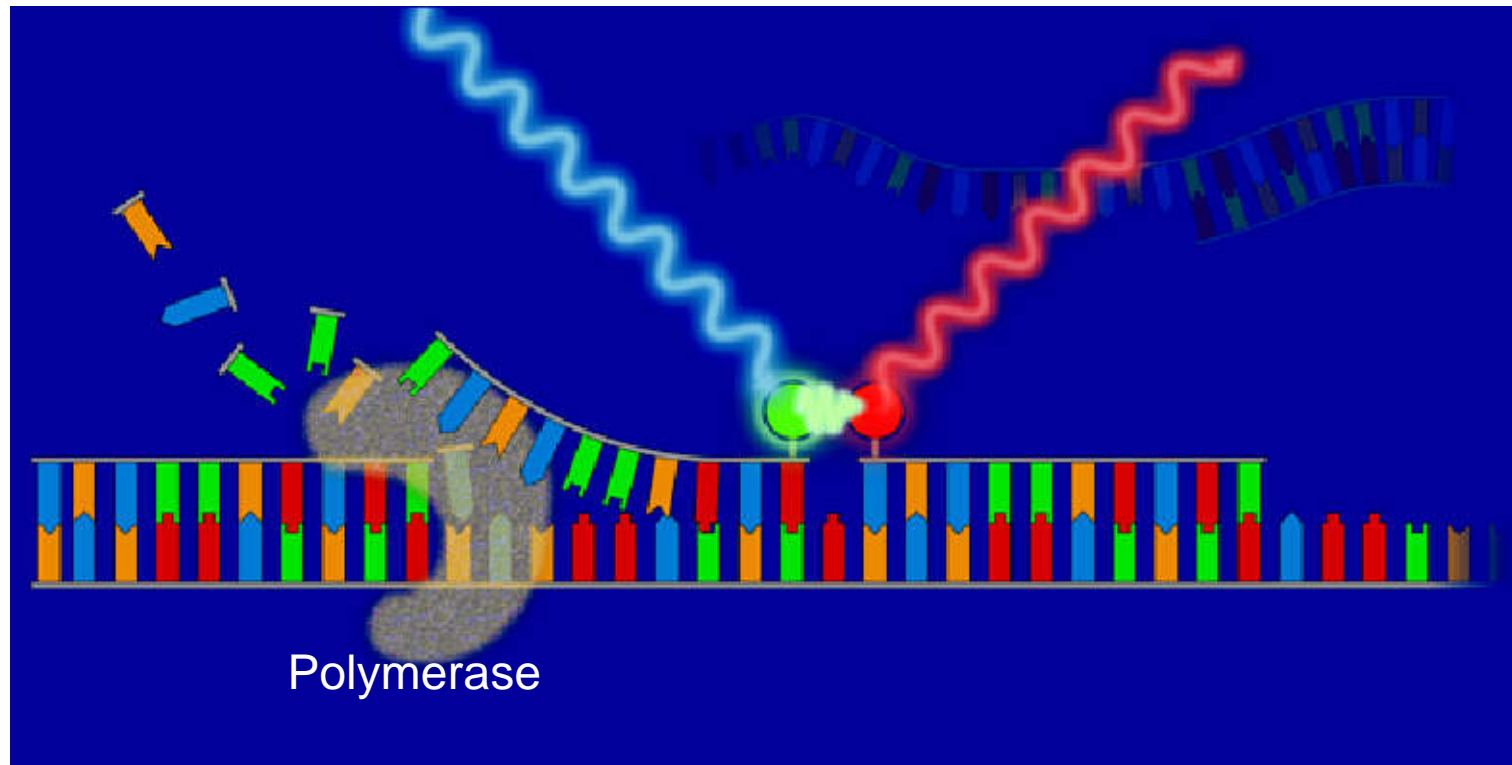
Denaturierung



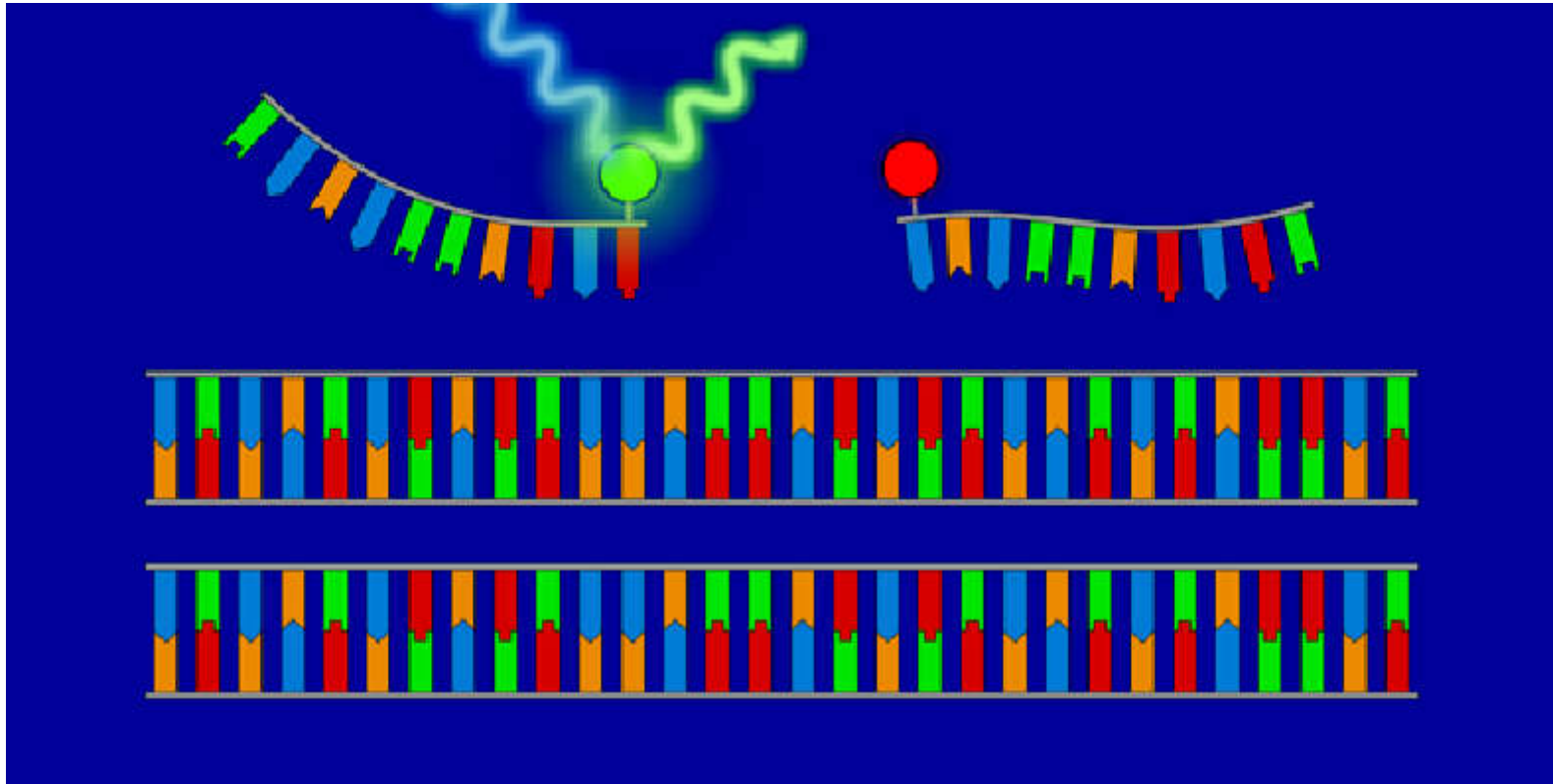
Primer Anlagerung - Messung der Fluoreszenz



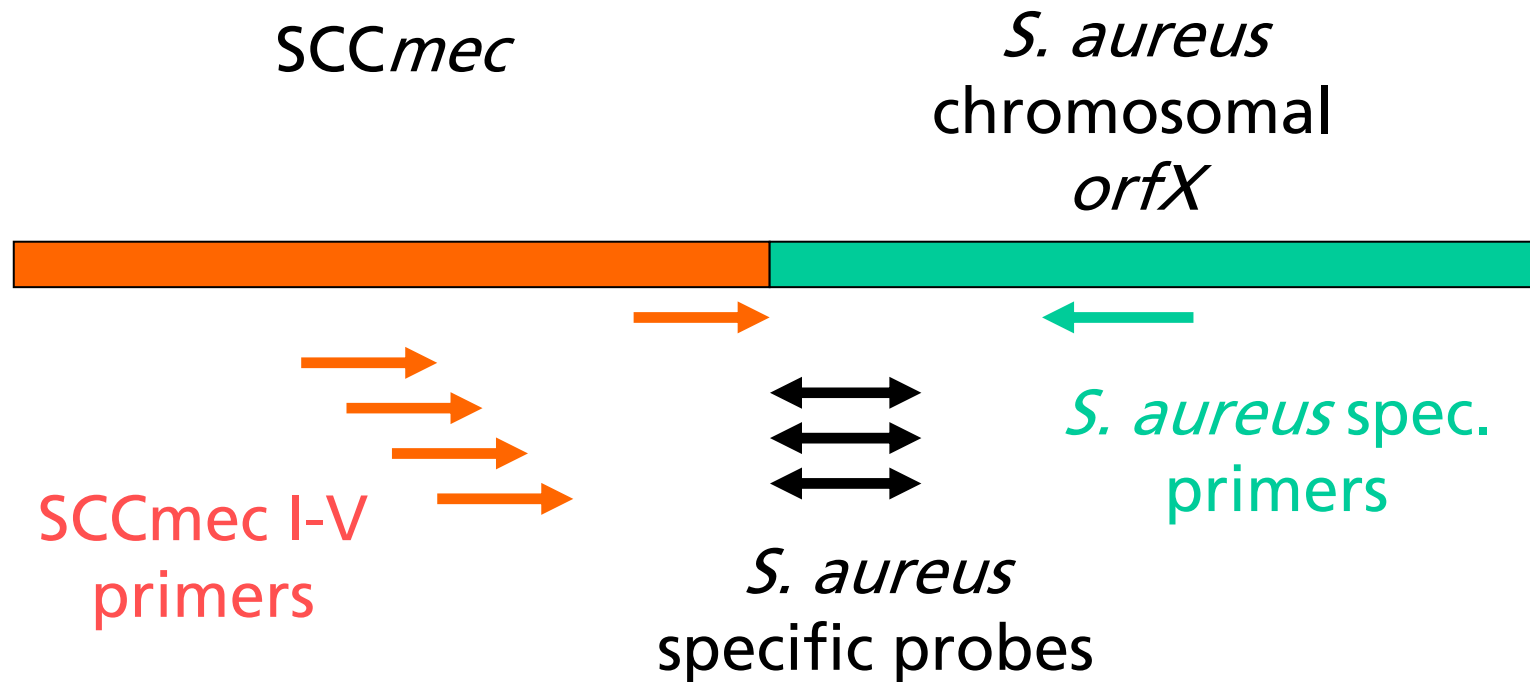
Kettenverlängerung



Ende vom Zyklus



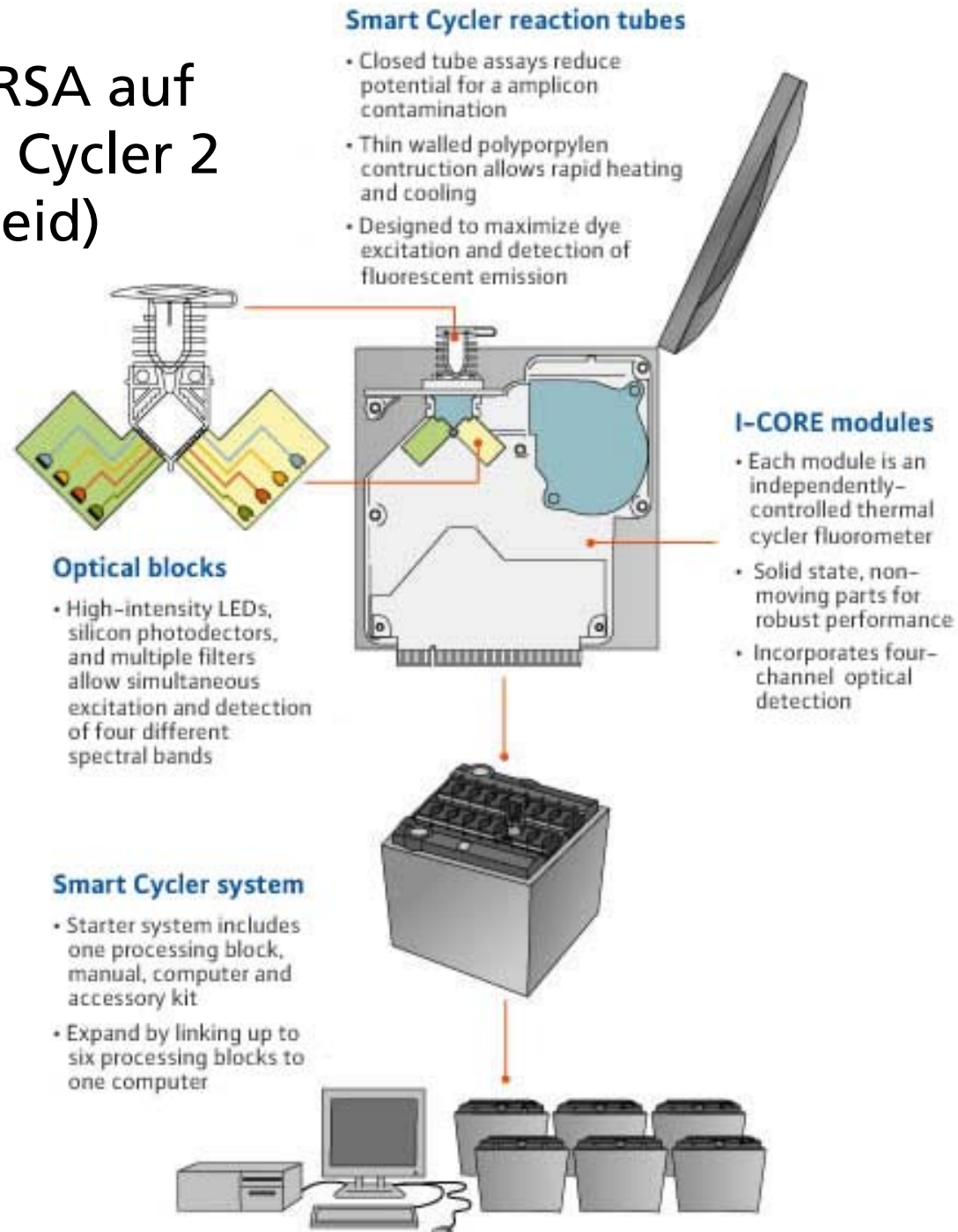
Prinzip MRSA PCR



IDI MRSA[®]

- DNA Extraktion manuell (Bestandteil des Kits)
- 16 Positionen Random Access
- Separate Positionen für positive und negative Kontrollen, d.h. Kosten abhängig von Serienlänge
- real time Amplifikation und Detektion inkl. Amplifikationskontrolle
- automatisierte Nukleinsäure-Analyse

IDI MRSA auf Smart Cycler 2 (Cepheid)



MRSA-PCR direkt

		N Total	N MRSA	Sens %	Spez %	PPV %	NPV %
Huletsky A. et. al	JCM 2004; 42:1875-84	2226	1657	98.7	95.4		
Waren D.K et. al	JCM 2004; 42:5578-81	288	66	91.7	93.5	82.5	97.1
Huletsky A. et. al	CID 2005; 40:976-81	331	81	100	98.4	95.3	100

IDI MRSA-PCR direkt

Viollier AG SGIM 2006

- Swab specimens: M40 Transsystem with amies medium (COPAN, Brescia, I)
- Retrospective testing: 95 MRSA culture positive (32 different patients) and 176 culture negative samples
- Prospective testing: 162 consecutive routine specimens with the request MRSA PCR (Nov. 2005 – Mar. 2006)

Site	Retrospective	Prospective
Nose	87	48
Inguina	43	24
Throat	31	26
Axilla	18	12
Miscellaneous	92	52

IDI MRSA-PCR direkt

Viollier AG SGIM 2006

		IDI MRSA PCR	
		Pos	Neg
Culture	Pos	105	5
	Neg	27	293
		All	Retrosp.
Agreement		93 %	89 %
Sensitivity		95.5 %	96.8 %
Specifcity		91.6 %	84.5 %
Likelihood ratio +		11.4	6.2
Likelihood ratio -		0.05	0.04

Entnahmeset COPAN M40, Amies semisolid

IDI MRSA[®]

Routine Protokoll mit Copan M40 Abstrich

1. Beimpfen von chromogener Platte, keine Anreicherung

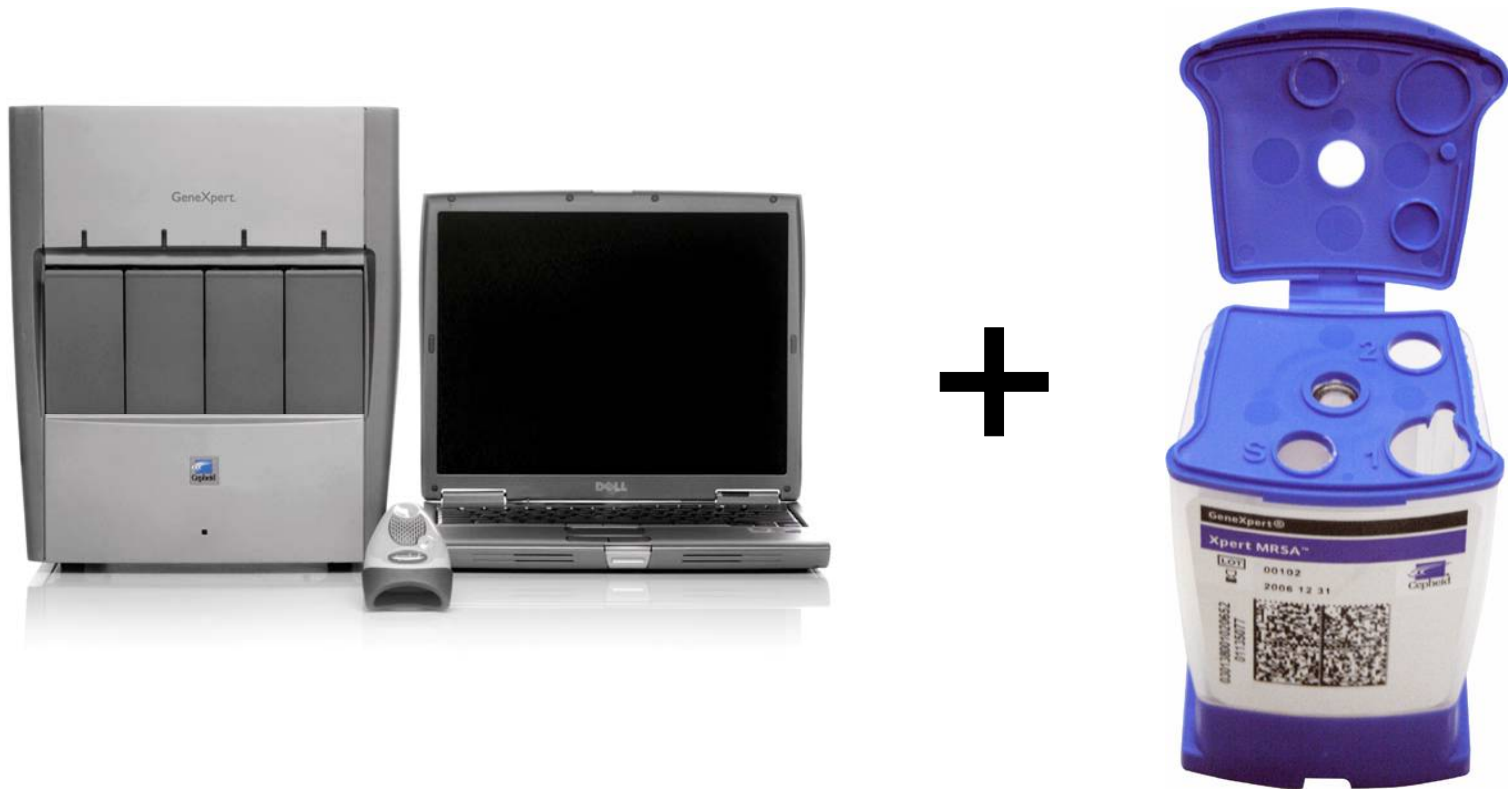
2. IDI MRSA je nach Serienlänge 1 bis 2 mal täglich, Wochenende 1 mal

GeneXpert® MRSA

Random Access, 2, 4 oder 16 Positionen.
Kombiniert voll integriert und automatisiert
pro Kassette:

- DNA Extraktion
- real time Amplifikation und Detektion
- Positive, negative und
Amplifikationskontrolle, d.h. Kosten
unabhängig von Serienlänge
- Nukleinsäure-Analyse

GeneXpert[®] System



Direkter Vergleich IDI MRSA ® und GeneXpert® MRSA

- Bisher wenig Daten verfügbar
- Unterschiedliches Primer Design kann zu abweichender Sensitivität für einzelne MRSA Klone führen:
Bsp. Zürcher « Drogenszene-Klon »

Präanalytik IDI MRSA ® und GeneXpert® MRSA

- Vom Hersteller validierte Proben:
 - Nasenabstriche
- Vom Hersteller validierte Entnahmesysteme:
 - flüssiges Stuart Medium

GeneXpert preliminäre Daten Viollier AG

Copan M40 modif. Amies, Semisolid

- n = 57
- Kultur pos. Proben: 26 (19 Patienten)
- Kultur neg Proben: 31
- Invalide PCR wegen Inhibition 8 (14 %)
- Kultur pos./PCR neg: 1 Probe
- PCR pos. / Kultur neg: 2 Proben (Für beide Pat. waren andere Proben Kultur pos.)

GeneXpert preliminäre Daten Viollier AG

Copan M40 modif. Amies, Semisolid
Conclusion

- Hohe Sensitivität und Spezifität
- Hohe Inhibitionsrate
- Wiederholungen nicht möglich

Fazit: M40 bedingt geeignet.

Flüssigtransportmedium ist vorzuziehen

Präanalytik IDI MRSA ® und GeneXpert® MRSA

Neues Entnahmeset der Firma COPAN:

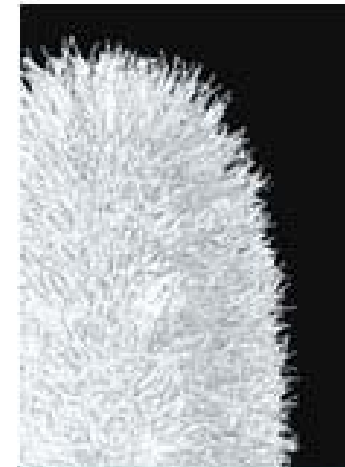
Flocked Swabs (eSwabs) in flüssig Amies
Transportmedium

Nylon Flocked Swab

Superior sample collection
and release

■ Collected sample

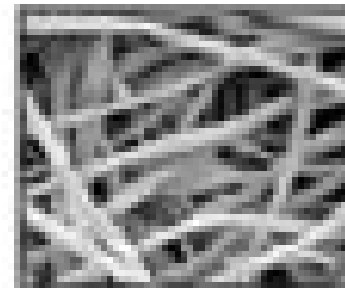
> 80% of the sample analyte released*



Regular Fiber Swab

Sample stays trapped
in fiber matrix

■ Trapped sample



Präanalytik IDI MRSA ® und GeneXpert® MRSA

eSwab COPAN

- Sensitivität Kultur und PCR ↑ dank Freisetzung von > 80 % der Probe in Medium
- Geringe Inhibitionsrate für PCR
- Zertifiziert RNA'se und DNA'se frei
- Identische Bedingungen für Kultur und PCR inkl. Wiederholungen dank Verfügbarkeit von 1 ml Medium
- Einfache Handhabung

GeneXpert preliminäre Daten Viollier AG

Copan eSWAB

- n = 30
- Kultur pos. Proben: 4 Patienten Proben und ATCC Stamm 33591 in 2 Verdünnungen
- Invalide PCR wegen Inhibition: 1 Probe (in der Wiederholung valide)

GeneXpert preliminäre Daten Viollier AG

Copan eSWAB

- 100 % Übereinstimmung in diesem kleinen Kollektiv
- Wiederholungen und weitere Tests (Kulturell, Antigen, PCR) unter standardisierten Bedingung möglich

PCR Limitationen

- Etwas geringere Sensitivität als Kultur
- Bestätigung durch Kultur erforderlich
- Veränderte oder neue SCCmec genetische Elemente werden nicht erfasst ⇒ rasche Reaktion der Hersteller auf neue MRSA Typen wünschenswert

Take home

- Indikation PCR: Ausschluss von MRSA Trägertum innerhalb von Stunden
- Für eine optimale Sensitivität mind. 2 Proben (Nasen, Rachen)
- Ausgezeichnete Sensitivität und Reproduzierbarkeit durch flüssig Amies Transportmedium und flocked Swabs
- Bestätigung von positiven PCR durch Kultur notwendig

Pssst! Hey kid! Wanna be a Superbug...?
Stick some of this into your genome...
Even penicillin won't be able to harm you...!

