

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Direktor: Prof. Dr. R. Laufs

**Genotypische und phänotypische Nachweisverfahren der
Methicillinresistenz bei Koagulase-negativen Staphylokokken**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Matthias-Ansver Horstkotte

aus Hamburg

Hamburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 24.10.2003

Dekan: Prof. Dr. R. A. K. Stahl

Referent: Prof. Dr. D. Mack

1. Koreferent: Prof. Dr. R. Laufs

2. Koreferent: Prof. Dr. F. Nolte

INHALTSVERZEICHNIS

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	5
2. EINLEITUNG	6
2.1. Biologie der Koagulase-negativen Staphylokokken	6
2.2. Koagulase-negative Staphylokokken als Infektionserreger	7
2.3. Methicillinresistenz bei Staphylokokken	11
2.3.1. Molekulare Grundlagen der Methicillinresistenz	13
2.3.2. Phänotypische Nachweisverfahren einer Methicillinresistenz	27
2.4. Pathogenese Fremdkörper-assoziiertes Infektionen	31
3. MATERIAL UND METHODEN	35
3.1. Bakterienstämme	35
3.2. Zeitliche Abfolge der Untersuchungen	35
3.3. Anzucht der Bakterien	35
3.4. Speziesidentifizierung der Koagulase-negativen Staphylokokken	36
3.5. Polymerasekettenreaktion für den Nachweis des <i>mecA</i> Gens	36
3.6. Agarosegelelektrophorese	37
3.7. Nachweis des Penicillin-bindenden Protein 2a durch Latexagglutination	38
3.8. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration für Oxacillin	39
3.9. Screeningplatten mit abgestuften Oxacillin- und NaCl-Konzentrationen	39
3.10. Agardiffusionstest	40
3.11. VITEK [®] 2	41
3.12. BD Phoenix [™]	42
4. ERGEBNISSE	43
4.1. Speziesverteilung der untersuchten Koagulase-negativen Staphylokokken	43
4.2. Polymerasekettenreaktion für den Nachweis des <i>mecA</i> Gens	43
4.3. Nachweis des Penicillin-bindenden Protein 2a durch Latexagglutination	44
4.4. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration für Oxacillin	47
4.4.1. Inokulum von 5×10^4 KBE/ml	47
4.4.2. Inokulum von 5×10^5 KBE/ml	50

4.5. Screeningplatten mit abgestuften Oxacillin- und NaCl-Konzentrationen	53
4.6. Agardiffusionstest	60
4.7. VITEK [®] 2	91
4.8. BD Phoenix [™]	96
5. DISKUSSION	101
5.1. Nachweis des Penicillin-bindenden Protein 2a durch Latexagglutination	101
5.2. VITEK [®] 2	102
5.3. BD Phoenix [™]	105
5.4. Konventionelle phänotypische Nachweisverfahren	106
5.5. Empfehlungen aufgrund der vorgelegten Arbeit	120
6. ZUSAMMENFASSUNG	123
7. LITERATURVERZEICHNIS	124
8. DANKSAGUNG	156
9. LEBENSLAUF	157
10. ERKLÄRUNG	158
11. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	159

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Der sensitive und spezifische Nachweis der Methicillinresistenz ist unverzichtbar, um eine gezielte antibiotische Therapie von Infektionen durch Koagulase-negative Staphylokokken durchzuführen (Jorgensen et al., 1999). Staphylokokkenwirksame, penicillinasefeste Penicilline wie Flucloxacillin gelten als die Therapie der Wahl bei der Behandlung von Staphylokokkeninfektionen. Diese Substanzen zeigen eine unübertroffene spezifische Aktivität und sind aufgrund ihrer geringen Toxizität und Nebenwirkungsrate gut verträglich. Dies gilt insbesondere für den Vergleich mit Vancomycin, das als Antibiotikum der Wahl bei der Behandlung von Infektionen durch Methicillin-resistente Staphylokokken gilt (Chambers, 1997; Wilson et al., 1995; Small und Chambers, 1990). Außerdem ist der restriktive Umgang mit Glykopeptidantibiotika wünschenswert. Ein breiter Einsatz dieser Reservemittel erhöht die Gefahr von Infektionen mit Vancomycin-resistenten Enterokokken und leistet dem Entstehen einer Resistenz gegenüber Glycopeptideantibiotika wie Vancomycin oder Teicoplanin bei *Staphylococcus aureus* Vorschub (Smith et al., 1999; Murray, 2000). Erstmals kam es jetzt in den USA bei einer Patientin, bei gleichzeitiger enteraler Besiedlung mit Vancomycin-resistenten Enterokokken und einer Wundinfektion mit MRSA, unter Vancomycintherapie zum konjugativen Transfer des *vanA* Gens auf den MRSA mit konsekutiver „high-level“ Vancomycinresistenz (CDC, 2002). Die phänotypische Detektion der Methicillinresistenz bei KNS ist wegen der heterogenen *mecA*-Expression (Chambers, 1997; McDonald et al., 1995; Tenover et al., 1999; York et al., 1996) schwierig. Gebräuchliche phänotypische Testverfahren wie die Oxacillin-Agar-Platte, der Agardiffusionstest oder die MHK-Bestimmung mit der Mikrodilution oder mittels Agardilution beruhen auf modifizierten Kulturbedingungen, um die Expression der Methicillinresistenz zu erhöhen (McDonald et al., 1995; Tenover et al., 1999; York et al., 1996). An einem Kollektiv von klinischen Isolaten Koagulase-negativer Staphylokokken sollte daher die Empfindlichkeit und Verlässlichkeit konventioneller phänotypischer Nachweisverfahren mit modernen automatisierten Systemen zur antimikrobiellen Resistenztestung, wie sie zunehmend in die klinisch-mikrobiologische Diagnostik Einzug halten, und dem immunologischen Nachweis des Penicillin-bindenden Proteins 2a (PBP2a) als Marker für das Vorliegen einer Methicillinresistenz verglichen werden. Als Referenzmethode diene die genotypische Charakterisierung der Isolate mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) für das Vorliegen des die Methicillinresistenz kodierenden *mecA* Gens.

2. EINLEITUNG

2.1. Biologie der Koagulase-negativen Staphylokokken

Die Familie der *Micrococcaceae* besteht aus den Gattungen *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* und *Planococcus*. Von humanmedizinischer Bedeutung ist vor allem die Gattung *Staphylococcus*. Den Gattungen *Stomatococcus* und *Micrococcus* kommt zwar eine wichtige Rolle in der humanen und tierischen Haut- und Schleimhautflora zu. Als Infektionserreger sind sie von untergeordneter Bedeutung. Die Gattung *Planococcus* besteht im Wesentlichen aus marinen Spezies und kommt im menschlichen Untersuchungsmaterial nicht vor.

Im Gegensatz zu den anderen Gattungen der Familie der *Micrococcaceae* liegt der GC-Gehalt der Staphylokokken-DNA mit 30-39 Molprozent sehr niedrig (Wilkinson, 1997; Kloos, 1997). Außerdem enthält die Zellwand der Staphylokokken Teichonsäuren und das Peptidoglycan der Staphylokokken wird durch eine aus multiplen Glycinresten bestehende Interpeptidbrücke quervernetzt. Diese Interpeptidbrücke bedingt eine Empfindlichkeit der Staphylokokken gegenüber dem speziell an Glycin-Glycin-Bindungen angreifenden Enzym Lysostaphin.

Die Spezies der Gattung *Staphylococcus* verbindet, dass es sich in der Regel um fakultativ anaerob wachsende, unbewegliche, nicht sporenbildende Bakterien handelt, die zumeist positiv für den Nachweis des Enzym Katalase sind (Ausnahme *Staphylococcus aureus ssp. anaerobius*) (Kloos, 1997; Pfaller und Herwaldt, 1988; Rupp und Archer, 1994).

Staphylokokken haben ein Temperaturoptimum zwischen 30 °C und 37 °C. Sie wachsen aber auch bei ungünstigeren Inkubationstemperaturen und sind aufgrund einer erhöhten pH-Toleranz und Resistenz gegen Austrocknung und Desinfektionsmittel vergleichsweise unempfindlich.

Die Staphylokokken imponieren nach Durchführung einer Gramfärbung unter dem Mikroskop als grampositive Kokken, die als einzelne Zellen, in traubenartigen Haufen oder kurzen Ketten angeordnet liegen können. Die Gattung *Staphylococcus* wird heutzutage anhand biochemischer und molekularbiologischer Kriterien in 36 Spezies, wovon 9 verschiedene Subspezies aufweisen, unterteilt (Euzéby, 1997; Kloos und Bannermann, 1999; Drancourt und Raoult, 2002). Der Nachweis der Prothrombin-aktivierenden Koagulase erlaubt die Unterscheidung in Koagulase-positive und Koagulase-negative Staphylokokkenspezies (Sperber und Tantini, 1975). Die nahezu einzige human-pathogene, Koagulase-positive Art ist *Staphylococcus aureus*. Daneben findet sich eine

positive Koagulasereaktion auch bei den Spezies *S. intermedius*, *S. lutrae*, *S. delphini* und *S. schleiferi ssp. coagulans* sowie einzelnen Stämmen der Spezies *S. hyicus* (Kloos und Bannermann, 1999). Weitere wesentliche human-pathogene Spezies gehören in die Gruppe der Koagulase-negativen Staphylokokken (KNS) (Kloos und Bannermann, 1994; Rupp und Archer, 1994). Eine Vielzahl der bekannten KNS Spezies können auf der Haut, in den Hautanhangsdrüsen oder auf den Schleimhäuten des Menschen als residente oder temporär residente Flora gefunden werden. Je nach Körperregion und Feuchtegrad des Areal unterscheidet sich die Dichte der gefundenen KNS. Sie besiedeln bevorzugt Areale der Haut und Schleimhäute, die natürliche Körperöffnungen umgeben. Die höchsten Populationsdichten finden sich mit 10^3 - 10^6 Kolonie bildenden Einheiten (KBE) pro cm^2 an den Ausgängen von Schweißdrüsen, Haartalgdrüsen und den Nasenschleimhäuten. Geringere Populationsdichten von bis zu 10^3 KBE/ cm^2 können an trockeneren Habitaten wie beispielsweise den Außenseiten der Extremitäten nachgewiesen werden (Kloos und Bannermann, 1994; Kloos, 1997; Nobel und Naidoo, 1986; Nobel, 1997). Hinsichtlich der vorwiegend besiedelten Körperregion und des prozentualen Anteils in der jeweiligen ökologischen Nische unterscheiden sich die KNS Spezies zum Teil deutlich. So wird *S. capitis* typischerweise im Bereich der behaarten Kopfhaut, *S. auricularis* im äußeren Gehörgang und *S. haemolyticus* sowie *S. hominis* im Bereich apokriner Schweißdrüsen angetroffen. *S. epidermidis* wird beim Menschen am häufigsten gefunden und stellt mit etwa 60-95 % den größten Anteil der isolierten Staphylokokkenspezies. *S. epidermidis* zeigt keine ausgeprägte Prädilektion für einzelne Körperareale; seine maximale Koloniedichte wird jedoch mit 10^4 - 10^6 KBE/ cm^2 in der Axilla gefunden (Kloos und Bannermann, 1994; Kloos, 1997).

2.2. Koagulase-negative Staphylokokken als Infektionserreger

Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) gehören zur normalen Bakterienflora der Haut und Schleimhäute des Menschen und wurden daher in der Vergangenheit in der Regel als Kontamination von klinischen Untersuchungsmaterialien ohne wesentliche pathogene Bedeutung gewertet (Archer, 2000). Im Verlauf der letzten zwanzig Jahre hat sich aufgrund von epidemiologischen und klinischen Untersuchungen diese Einschätzung gewandelt. Nunmehr werden KNS als wichtige, vor allem nosokomiale Infektionserreger angesehen (Archer, 2000). So stieg von 1980 bis 1989 die Zahl durch Koagulase-negative Staphylokokken induzierter, nosokomialer Bakteriämien um das 1,5-8,5 fache (Baddour et al., 1990; Banerjee et al., 1991;

Schaberg et al., 1991). Daten des Centers for Disease Control und des National Nosocomial Infection Surveillance Systems zeigten, dass KNS in den Jahren 1990 bis 1995 die dritthäufigste Ursache nosokomialer Infektionen waren. Herauszuheben ist, dass KNS mit 33,5% die häufigste Ursache für eine nosokomiale Bakteriämie waren und andererseits als der zweithäufigste Erreger bei postoperativen Wundinfektionen isoliert wurden. Auch heute gehören KNS zu den fünf am häufigsten gefundenen Erregern nosokomialer Infektionen (U.S. Department of Health and Human Services, 1996; Rupp und Archer, 1994; Thylefors et al., 1998; U.S. Department of Health an Human Services, 2000; Diekema et al., 2001). KNS sind in der Regel opportunistische Erreger, die erst bei Vorliegen einer spezifischen oder unspezifischen Immunsuppression als Krankheitserreger Bedeutung erlangen. Diese Situation kann durch eine Chemotherapie, eine Knochenmarkstransplantation oder eine Leukopenie anderer Genese, bei einer symptomatischen HIV-Infektion oder bei Frühgeburtlichkeit, Krebserkrankungen, schweren Verbrennungen oder nach einem Polytrauma auftreten (Goldmann et al., 1993; Kotilainen et al., 1990). Etwa drei Viertel der nosokomialen Infektion durch KNS entstehen im Zusammenhang mit aus polymeren Kunststoffen gefertigten Fremdkörpern (Fidalgo et al., 1990; Dominguez de Villota et al., 1987; Kirchoff und Sheargren, 1985). Der breite Einsatz dieser Materialien in der modernen Medizin, insbesondere auf Intensivstationen, bedingt, daß trotz der niedrigen Virulenz der meisten KNS-Spezies, in den letzten Jahren ein dramatischer Anstieg der Inzidenz für nosokomiale Sepsis und Fremdkörper-assoziiierter Infektionen von zentralvenösen oder Peritonealdialysekathetern, Liquorshunts, künstlichen Herzklappen, Brustprothesen aus Silikon, Gelenk- und Gefäßprothesen, Herzschrittmachern und Intraokularlinsen durch KNS zu verzeichnen ist (Kloos, 1997; Rupp und Archer, 1994; Thylefors et al., 1998; U.S. Department of Health an Human Services, 2000; Heimberger und Duma, 1989; Calderwood et al., 1985; Karchmer et al., 1983; Bandyk et al., 1984; George et al., 1979; Kraus und Spector, 1983; Spanu et al., 1986; Renier et al., 1984; Inman et al., 1984; Brause, 1986; Weber et al., 1986; Heaven et al., 1992; Vas, 1994; Choo et al., 1981; Archer, 2000).

Fremdkörper-assoziierte Infektionen stellen ein großes klinisches Problem dar, da therapeutisch häufig nur die Entfernung des entsprechenden Fremdkörpers bleibt (Younger et al., 1987) und die Diagnose durch die Tatsache erschwert ist, dass trotz alledem 75-90 % der isolierten KNS als Kontamination zu betrachten sind und eine Unterscheidung von klinisch signifikanten Isolaten schwierig ist (Fidalgo et al., 1990; Kirchhoff et al., 1985; Weinstein et al., 1983; Ringberg et al., 1991; Kleemann et al., 1993; Herwaldt et al., 1996).

Eine Fremdkörper-assoziierte Infektion kann bereits bei der Implantation des Biomaterials beginnen, wobei eine geringe Anzahl von KNS aus der Hautflora des Patienten mit dem Material in den menschlichen Organismus gelangt (Rupp und Archer, 1994; Kloos und Bannermann, 1994; Boyce et al., 1997). Die Infektionsrate bei implantierten Biomaterialien liegt trotz einer regelhaft durchgeführten Wundinfektionsprophylaxe, zumeist mit β -Laktam-Antibiotika, bei 0,5 % bis 1 % (Rupp und Archer, 1994). Zum zweiten kann sich eine „late-onset“- Infektion erst Wochen, Monate oder Jahre später oder nach einer Bakteriämie manifestieren (Kloos und Bannermann, 1994).

Bei Fremdkörper-assoziierten Infektionen lässt sich in 74-92 % der Fälle die Spezies *S. epidermidis* isolieren. Die Pathogenese von Fremdkörper-assoziierten Infektionen durch *S. epidermidis* wird daher in einem separaten Abschnitt detaillierter beschrieben (siehe 2.4.). Seltener werden die Spezies *S. haemolyticus*, *S. warneri* oder *S. lugdunensis* gefunden (Kloos und Bannermann, 1994; Martin et al., 1989; Hamory und Parisi, 1985; Patrick, 1990; Jansen et al., 1989).

Die humanpathogene Bedeutung der in der Studienpopulation in größerer Zahl vertretenen Spezies Koagulase-negativer Staphylokokken wird im Folgenden kurz dargestellt.

Die Spezies *S. haemolyticus* als nosokomialer Krankheitserreger nimmt an Bedeutung zu, nicht zuletzt auch wegen der oft ausgeprägten Resistenz gegenüber Antibiotika. *S. haemolyticus* gehört zur Hautflora des Menschen. Die höchste Bakteriendichte findet sich zwar im Bereich der Axilla, dem Perineum und in den Leisten, aber auch trockenere Hautbereiche werden im Gegensatz zu vielen anderen Spezies der Koagulase-negativen Staphylokokken erfolgreich besiedelt. *S. haemolyticus* wurde als Auslöser von Harnwegs- und Wundinfektionen, von Osteomyelitis und Gelenkinfektionen, Peritonitis, Sepsis und Endokarditis - auch nativer Herzklappen – beschrieben (Lina et al., 2000). Die Empfindlichkeit gegen Penicillin, Methicillin, Tetrazyklin oder Makrolide ist variabel. Eine multiple Resistenz gegen Antibiotika ist kein seltenes Phänomen (Kazembe et al., 1993) und auch Stämme mit echter Resistenz gegenüber Glykopeptidantibiotika, vor allem gegenüber Teicoplanin wurden beschrieben (Schwalbe et al., 1990). Die Bakterienzellen solcher Teicoplanin-resistenter Stämme zeigen auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine auffällig aufgerauhte, irreguläre Oberfläche (Giovanetti et al., 1996). Dieses Erscheinungsbild ließ sich auf einen besonders hohen Grad der Quervernetzung des Peptidoglycans zurückführen, das zusätzlich Serin an Stelle von Glycin in den Quervernetzungen enthält. Diese strukturellen Veränderungen des Peptidoglykans verändern die Bindungsmöglichkeiten der Glykopeptidantibiotika (Billot-Klein et al., 1996).

S. hominis ist einer der wesentlichen Vertreter der Koagulase-negativen Staphylokokken in der menschlichen Hautflora, gilt aber nur als opportunistischer Krankheitserreger von geringer Pathogenität (Lina et al., 2000).

S. warneri wurde 1975 beschrieben und wird gewöhnlich in geringer Menge als Bestandteil der menschlichen Hautflora gefunden. In einem Fremdkörperinfektionsmodell der Maus zeigte *S. warneri* verglichen mit *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* oder *S. schleiferi*, eine geringere Fähigkeit zur Abszessbildung (Lambe et al., 1990), wurde aber als Auslöser von Osteomyelitis, Harnwegsinfektionen, Endokarditis, Bakteriämie, Infektionen von Liquorshunts und bei subduralem Empyem beschrieben (Buttery et al., 1997; Lina et al., 2000).

Bei der Spezies *S. capitis* kann anhand der Ureaseaktivität die Subspezies *S. capitis ureolyticus* (Urease positiv) von *S. capitis ssp. capitis* (Urease negativ) abgegrenzt werden (Kloos und Bannermann, 1994). Im Bereich der menschlichen Hautflora ist *S. capitis* vorwiegend im Bereich des behaarten Kopfes zu finden. *S. capitis* wurde als Erreger von Katheter-assoziiierter Sepsis, Harnwegsinfektionen, Haut- und Weichteilinfektionen, Endokarditis sowie Liquorshuntinfektionen beschrieben (Latorre et al., 1993; Kamalesh und Aslam, 2000; Sandoe et al., 1999; Breuer et al., 1998; Lina et al., 2000).

S. saprophyticus gehört nicht zur normalen menschlichen Haut- oder Schleimhautflora. *S. saprophyticus* ist als typischer und häufiger Erreger von akuten Harnwegsinfektionen bei jungen Frauen im ambulanten Bereich bekannt (Gatermann und Crossley, 1997; Marrie et al., 1982; Wallmark et al., 1978; Lina et al., 2000). *S. saprophyticus* gilt als der nach *Escherichia coli* am zweithäufigsten bei dieser Patientengruppe isolierte Keim und verursacht Zystitis, Urethritis und Pyelonephritis, die gelegentlich durch infizierte Nierensteine oder eine Bakteriämie kompliziert wird. *S. saprophyticus* wurde auch in Zusammenhang mit Prostatitis, Endophthalmitis, Septikämie und Endokarditis von nativen Herzklappen beschrieben (Lina et al., 2000). *S. saprophyticus* ist in der Regel empfindlich gegenüber Oxacillin, Chinolonen, Aminoglycosiden und Glykopeptidantibiotika, wobei die Empfindlichkeit für Penicillin, Erythromycin, Tetrazyklin oder Chloramphenicol stark variieren kann (Schleifer, 1986, Ramotar et al., 2001).

S. lugdunensis wurde erstmalig 1988 beschrieben (Freney et al., 1988; Hébert, 1990) und kann mit *S. aureus* verwechselt werden, da 58-79 % der *S. lugdunensis* Isolate Clumping-Faktor exprimieren und z. T. auch eine schwache thermostabile DNase aufweisen, was sonst als diagnostisch wegweisend für die Identifizierung von *S. aureus* gilt. *S. lugdunensis* verfügt über ein höheres pathogenes Potential als die meisten anderen Staphylokokkenspezies (Lambe et al., 1990; Ferguson et al., 1991). Primäre Haut- und

Weichteilinfektionen (Waghorn, 1994; Herchline und Ayers, 1991; Vandenesch et al., 1995a), aber auch schwere Infektionen, meist in Zusammenhang mit einer Bakteriämie, wie Peritonitis (Ludlam et al., 1989), Osteomyelitis (Murdoch et al., 1996; Kragbjerk et al., 2000), septische Arthritis (Kragbjerk et al., 2000; Palazzo et al., 1992), Infektionen bei Gelenkprothesen (Sampathkumar et al., 2000; Weightman et al., 2000) und an Liquordrainagen (Elliott et al., 2001) wurden beschrieben. *S. lugdunensis* gilt als ein wichtiger Erreger von schweren, destruierenden Endokarditiden (Vandenesch et al., 1993; Vandenesch et al., 1995b; Mylonakis et al., 2001; Lina 2000; Kragbjerk et al., 2000). *S. lugdunensis* Isolate sind in der Mehrzahl der Fälle empfindlich für Penicilline, nur 25 % der Isolate weisen einen β -Laktamase auf (Vandenesch et al., 1995 a; Herchline et al., 1990; Fleurette et al., 1989).

S. schleiferi wurde ebenfalls 1988 beschrieben (Freney et al., 1988; Hébert, 1990) und wird gelegentlich bei postoperativen Wundinfektionen, Bakteriämie, Harnwegsinfektionen, Hirnabszess und Fremdkörper-assoziierten Infektionen wie Kunstklappenendokarditis und Herzschrittmacherinfektionen gefunden (Hernandez et al., 2001; Latorre et al., 1993; Celard et al., 1997; Ozturkeri et al., 1994; Kluytmans et al., 1998; Leung et al., 1999; Jean-Pierre et al., 1989; Lina et al., 2000). Der Nachweis von *S. schleiferi* in der präaxillären Hautflora, dem Bereich der Implantation des Schrittmachers gilt als stark prädiktiv für eine nachfolgende Herzschrittmacherinfektion (Dacosta et al., 1998). *S. schleiferi* ist in der Regel auf β -Laktam-Antibiotika inklusive Penicillin empfindlich (Fleurette et al., 1989).

2.3. Die Methicillinresistenz bei Staphylokokken

Bei Infektionen mit Penicillin-empfindlichen Staphylokokken ist auch heutzutage Penicillin G aufgrund seiner hohen Aktivität das Mittel der Wahl. Die überwiegende Zahl der Staphylokokken besitzt jedoch eine meist Plasmid-kodierte β -Laktamase, die den β -Laktam-Ring der Penicilline spaltet (Kresken et al., 2000). In diesen Fällen stellen weniger aktive β -Laktamase-feste Penicilline wie z.B. Flucloxacillin oder Cephalosporine der 1. und 2. Generation die Therapie der Wahl dar.

Methicillin-resistente Staphylokokken wurden 1961, kurz nach der Einführung von Methicillin in das therapeutische Arsenal entdeckt (Barber, 1961; Jevons, 1961; Rolinson, 1961). Das Phänomen wurde als intrinsische Resistenz gewertet, da die Resistenz nicht auf einer enzymatischen Inaktivierung des β -Laktam-Antibiotikums beruhte (Seligman, 1966).

Die ersten Ausbrüche mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) wurden in Europa in den frühen 60iger Jahren beobachtet (Benner und Kayser, 1968; Stewart und Holt, 1963; Saravolatz et al., 1982). Seitdem haben sich MRSA weltweit ausgebreitet (Crossley et al., 1979; Doebbeling, 1995; Klimek et al., 1976). In den letzten Jahren ist ein stetiger Anstieg in der Prävalenz von MRSA in Europa sowie den USA zu beobachten. In Deutschland liegt die Prävalenz von MRSA derzeit bei mindestens 15,2% (Kresken et al., 2000) wobei die Prävalenz in verschiedenen Ländern Europas von <1 % in Skandinavischen Ländern bis zu 80% in Italien, Frankreich und Griechenland variiert (Witte, 1999).

Die Mehrzahl (60-70 %) der klinischen KNS-Isolate ist bereits Methicillin-resistent (MRSE) und auch Isolate mit multiplen Antibiotikaresistenzen werden vermehrt gefunden (Grosserode und Wenzel, 1991; Bailey et al., 1990; Archer und Climo, 1994a; Edmond et al., 1999; Archer, 2000). MRSA als auch MRSE können bereits auf der Epidermis der Patienten vorhanden sein und werden bei unkritischem Gebrauch von Antibiotika selektioniert oder sie werden durch das Krankenhauspersonal übertragen (Vishniavsky und Archer, 1984; Maki und Stevens, 1984; Huebner et al., 1994; Krediet et al., 2001). Für einzelne MRSE-Isolate konnte eine Persistenz auf Intensivstationen gezeigt werden (Huebner et al., 1994, Krediet et al., 2001).

Antibiotische Therapie bei Vorliegen einer Methicillinresistenz

Als Mittel der Wahl bei Infektionen durch Methicillin-resistente Staphylokokken oder aufgrund der epidemiologischen Situation schon bei Verdacht auf eine Infektion durch KNS werden Glykopeptid-Antibiotika (Vancomycin oder Teicoplanin) eventuell in Kombination mit Gentamicin oder Rifampicin empfohlen. Glykopeptid-Antibiotika besitzen jedoch im Vergleich zu β -Laktam-Antibiotika eine langsamere Bakterizidie und erreichen keine sehr hohen Gewebespiegel in der Lunge (Bodi et al., 2001). In einer Studie wurden hohe Mortalitätsraten bei Patienten mit MSSA-Pneumonien unter Vancomycin-Therapie (47%) im Vergleich zu Patienten unter Cloxacillin-Therapie (0 %) beschrieben (Gonzales et al., 1999). Ein weiterer Effekt subinhibitorischer Vancomycin-Konzentrationen ist die Entwicklung von Vancomycin-toleranten MRSA-Stämmen, sogenannte Glykopeptid-Intermediäre-*Staphylococcus aureus* (GISA) (Hiramatsu et al., 1997). GISA sind in Japan bereits weit verbreitet und wurden ebenfalls in den USA, in Frankreich und in Deutschland beschrieben (RKI, 1998; Bierbaum et al., 1999). Eine

vermehrte Produktion von nicht-amidierten Muropeptiden und eine verminderte Quervernetzung der Zellwand mit der Folge einer Bindung von Vancomycin an Zellwandbestandteile werden als Mechanismus angenommen (Hanaki et al., 1998). In den letzten Jahren sind neue Substanzen wie Quinupristin/Dalfopristin, Oxazolidinone oder Ketolide auf den Markt gekommen, die eine gute Wirksamkeit gegen MRSA- und GISA-Stämme versprechen (Dowzicky et al., 1998; Chien et al., 2000; Malathum et al., 1999).

2.3.1. Molekulare Grundlagen der Methicillinresistenz

Die Methicillinresistenz wird durch *mecA*, das strukturelle Gen für die Synthese des Penicillin-bindenden Proteins 2a vermittelt (Song et al., 1987). Das 2 kb große *mecA* Gen ist auf einem mobilen chromosomalen DNA-Element lokalisiert, das als staphylococcal cassette chromosome *mec* (*SSCmec*) bezeichnet wird (Hiramatsu et al., 2001) und in Methicillin-sensible Staphylokokken kein Äquivalent hat (Hiramatsu et al., 1996).

Staphylokokken synthetisieren normalerweise vier Penicillin-bindende Proteine, PBP 1, 2, 3 und 4 mit einem Molekulargewicht von 85, 81, 75 und 45 kDa (Georgopapadakou und Liu, 1980; Reynolds, 1988). Das Penicillin-bindende Protein 2a (PBP2a) stellt ein zusätzliches, induzierbares 76 kDa PBP dar. Methicillin-sensiblen Staphylokokken fehlt ein dem PBP2a homologes Protein. PBP leiten sich von Serinproteasen ab und ähneln ihnen biochemisch (Ghuysen, 1994; Waxman und Strominger, 1983). Die PBP sind in der zytoplasmatischen Zellmembran verankert und katalysieren als Transpeptidasen die Quervernetzung des Peptidoglycans der Bakterienzellwand. β -Laktam-Antibiotika stellen Substratanaloga dar, die kovalent an die Aminosäure Serin im aktiven Zentrum des PBP binden (Georgopapadakou et al., 1986), wobei es zur Inaktivierung der Enzyme bei Konzentrationen kommt, die ungefähr der MHK entsprechen. Penicilline vermindern den Grad der Quervernetzung des Peptidoglycans mit der Folge, daß die Bildung neuer Septen (Zellteilung) verhindert wird. Der Effekt der β -Laktam-Antibiotika ist dosisabhängig, wobei mit steigenden Konzentrationen Wachstumshemmung, gefolgt von Zelltod durch Lyse bis hin zum nichtlytischen Absterben der Bakterien zu beobachten sind (Chambers und Sachdeva, 1990; Georgopapadakou et al., 1986; Reynolds, 1988; Giesbrecht et al., 1998). Im PBP2a finden sich zwar dieselben Motive wie in den Penicillin-bindenden Domänen der PBP 1, 2 und 3 mit hoher Affinität zu β -Laktam-Antibiotika (Wu et al., 1994), aber PBP2a weist nur eine sehr niedrige Affinität für β -Laktam-Antibiotika auf (Brown und Reynolds, 1980; Hartman und Tomasz, 1984; Hayes et al., 1981; Utsui und

Yokota, 1985). Bei inhibitorischen Konzentrationen von β -Laktam-Antibiotika kann PBP2a die Funktionen der anderen PBP übernehmen und das Überleben der Bakterienzelle sichern. Die genaue strukturelle Basis für die niedrige Affinität des PBP2a ist jedoch nicht geklärt.

mecA

Das *mecA* Gen ist unter den verschiedenen Staphylokokkenspezies hoch konserviert (Archer et al., 1994c; Beck et al., 1986; Chambers, 1987; Reynolds und Fuller, 1986; Ubukata et al., 1990; Wu et al., 1992). In der Spezies *S. sciuri* findet sich ein *mecA* Homolog, das eine Ähnlichkeit auf Aminosäureebene von 88 % zum *mecA* von Methicillin-resistenten Staphylokokken aufweist (Wu et al., 1996; Couto et al., 1996). Dieses Homolog findet sich zwar bei allen *S. sciuri*, führt aber nicht zur phänotypischen Ausprägung einer Methicillinresistenz (Wu et al., 1998). Aufgrund dieser Tatsache wurde postuliert, das *mecA* von einer Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies stammt (Archer und Niemeyer, 1994b; Hiramatsu, 1995).

Das „Staphylococcal cassette chromosome *mec*“

Das SSC*mec* ist im Laufe der bakteriellen Evolution mehrfach in Staphylokokken mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund gelangt. Alle heutigen Methicillin-resistenten Staphylokokken lassen sich auf wenige Methicillin-resistente „Vorfahren“ zurückführen, die sich in der Folge als klonale Linien weltweit ausgebreitet haben (Kreiswirth et al., 1993; Musser und Kapur, 1992; Crossley et al., 1979; Doebbeling, 1995; Klimek et al., 1976). Bislang wurden drei zwischen 32 und 67 kb große Typen von SSC*mec* bei *S. aureus* beschrieben, die sich hinsichtlich der kodierten Resistenzeigenschaften unterscheiden (Hiramatsu et al., 1996; Ito et al., 2001; Katayama et al., 2000; Hiramatsu et al., 2001). Vor kurzem wurde anhand von zwei, vor allem im ambulanten Bereich gefundenen MRSA Stämmen, ein vierter Typ einer SSC*mec* beschrieben (Ma et al., 2002; Hiramatsu et al., 2001). Charakteristisch für den vierten SSC*mec* Typ ist, dass er mit 21 bis 24 kb deutlich kleiner als die Typen 1 bis 3 ist und das Fehlen von Resistenzgenen außer *mecA*, passend zu dem beobachteten Phänotyp mit Empfindlichkeit gegenüber Nicht- β -Laktam-Antibiotika (Hiramatsu et al., 2001).

Die SSC*mec* enthalten Gene, die für zwei Rekombinasen, die „cassette chromosome recombinase A und B“ kodieren. An den äußeren Grenzen von SSC*mec* finden sich

inverted repeats, was die These stützt, dass *mecA* und die *SSCmec* mobile genetische Elemente sind (Archer und Niemeyer, 1994b; Gillespie et al., 1987; Hiramatsu et al., 1996; Skinner et al., 1988; Stewart et al., 1994). Das β -Laktamase-Plasmid hätte hierbei eine vorübergehende Insertionsstelle sein können. In einer Veröffentlichung, die jedoch nie bestätigt werden konnte, wurde über ein *mecA* tragendes Transposon, das Tn4291 berichtet, das in einer Insertionsstelle des β -Laktamase-Plasmid pI524 lokalisiert war (Trees und Iandolo, 1988). Das β -Laktamase-Plasmid der Staphylokokken kann außerdem die spontane Elimination von *SSCmec* aus dem Staphylokokkengenom verhindern (Hiramatsu et al., 1990).

Die verschiedenen *SSCmec* können bis zu 100 offene Leserahmen sowie verschiedene Transposons und Insertionselemente enthalten (Beck et al., 1986; Hiramatsu et al., 1996; Matsushashi et al., 1986; Hiramatsu et al., 2001). Auf dem Transposon Tn554 in *SSCmec* liegt z.B. *ermA*, das für induzierbare Erythromycinresistenz kodiert. Das Insertionselement IS431 ist ein im Staphylokokkengenom weit verbreitetes Insertionselement, das in Plasmiden, aber auch in der chromosomalen DNA inseriert. Es trägt eine Vielzahl von Resistenzeigenschaften, wie z. B. Resistenz gegenüber den Schwermetallen Quecksilber und Cadmium oder den Antibiotika Tetrazyklin oder Tobramycin und liegt z. T. in mehrfacher Kopie in *SSCmec* vor (Gillespie et al., 1987; Matthews et al., 1987; Matthews und Stewart, 1988; Skinner et al., 1988; Dubin et al., 1991). Die Fähigkeit von IS431 durch homologe Rekombination Resistenzeigenschaften ähnlicher IS Elemente zu „fangen“ erklärt die Anhäufung von Resistenzdeterminanten in Methicillin-resistenten Staphylokokken (Stewart et al., 1994).

Der Einfluss von *mecI* und *mecRI* auf die Methicillinresistenz

Das *SSCmec* enthält die auf *mecA* regulatorisch wirkenden Gene *mecI* und *mecRI*. *MecI* und *mecRI* werden unabhängig von *mecA* transkribiert und liegen unmittelbar vor dem *mecA* Promotor (Hiramatsu et al., 1992a; Tesch et al., 1990). *MecRI* zeigt eine Sequenzhomologie zu *Bacillus licheniformis* und den regulatorischen Genen der β -Laktamase der Staphylokokken, *blaRI* (Dyke und Gregory, 1997; Hardt et al., 1997; Joris et al., 1994). *MecRI* stellt ein signalübertragendes Transmembranprotein dar, dass bei Anwesenheit von β -Laktam-Antibiotika die Transkription von *mecA* aktiviert (Hackbarth und Chambers, 1993). Interessanterweise ist hierbei die chemische Struktur des β -Laktam-Antibiotikums entscheidend. So reagiert *MecRI* nicht auf Methicillin oder Oxacillin, wohl

aber auf das Cephamycin Cefoxitin (Hiramatsu et al., 1994). MecI fungiert als Repressor von *mecA* (Sharma et al., 1998) und zeigt Homologie zum Repressor der β -Laktamase BlaI (Dyke und Gregory, 1997).

Wenn die regulatorischen Gene *mecI* und *mecRI* strukturell und funktionell intakt sind, führt dies zu einer starken Repression der PBP2a Produktion (Kuwahara-Arai et al., 1996, Ryffel et al., 1992), einer langsamen Induzierbarkeit von *mecA* und einem niedrig ausgeprägten Resistenzniveau der Methicillinresistenz. *MecA*-positive Stämme mit intaktem *mecRI-mecI* können sogar einen Methicillin-sensiblen Phänotyp aufweisen (Berger-Bächi, 1999).

Das Einschleusen eines Plasmides mit intakten *mecRI-mecI* Genen führte in einem MRSA Stamm mit einer konstitutiven *mecA* Transkription zu einer verminderten *mecA* Transkription und einer herabgesetzten Methicillinresistenz (Niemeyer et al., 1996).

Bei einem anderen Stamm mit reprimiertem *mecA* führte die Inaktivierung der regulatorischen Gene durch ein Insertionselement zu einer deutlichen Steigerung der PBP2a Synthese und einem homogen resistenten Phänotyp (Kuwahara-Arai et al., 1996; Niemeyer et al., 1996). Diese Effekte scheinen jedoch vom genetischen Hintergrund der verschiedenen Stämmen abzuhängen, da identische *mecI* und *mecRI* Konstrukte in anderen Stämmen keine Auswirkungen auf die *mecA* Transkription und den resultierenden Resistenzphänotyp zeigten (Niemeyer et al., 1996).

Vor 1970, d.h. in den ersten Jahren nach Auftreten der ersten Methicillin-resistenten Staphylokokken, wies die Mehrzahl der Methicillin-resistenten klinischen Isolate Deletionen der Penicillin-bindenden Domäne des *mecRI* Gens, sowie eine vollständige Deletion 3' des *mecI* Gens auf (Archer und Niemeyer, 1994b; Hürlimann-Dalel et al., 1972; Suzuki et al., 1993). Dies führte in der Regel zu einer konstitutiven Expression des PBP2a. Wenn allerdings eine induzierbare β -Laktamase vorlag, war aufgrund einer Koregulation der PBP2a-Expression und der β -Laktamase-Expression durch Plasmid-kodierte regulatorische Gene in diesem Fall auch die Expression des PBP2a induzierbar (Hackbarth und Chambers, 1993; Ubukata et al., 1989).

Seit den 80iger Jahren sind die beschriebenen Deletionen in *mecRI* und *mecI* selten geworden. Stattdessen werden Mutationen im *mecA* Promotor sowie ein *mecI* Polymorphismus gefunden (Kobayashi et al., 1996; Kobayashi et al., 1998; Hiramatsu et al., 1996; Suzuki et al., 1993).

Die Inaktivierung der regulatorischen Gene *mecI* und *mecR1* ist Ausdruck des Selektionsdruckes durch β -Laktam-Antibiotika, der die Entstehung von Mutanten begünstigt, bei denen eine starke Repression von *mecA* fehlt, so dass die Menge an produziertem PBP2a ausreicht, um das Überleben der Mutanten zu sichern. Es wird eine nicht genau bekannte Grenzkonzentration von PBP2a für die Expression der Methicillinresistenz benötigt. Andererseits wurde kein klarer Zusammenhang zwischen der produzierten Menge an PBP2a und der Induzierbarkeit oder einer konstitutiven Expression von PBP2a oder dem Auftreten eines homogenen oder aber heterogenen Phänotyps gefunden (Berger-Bächli et al., 1986; Chambers und Hackbarth, 1987; Murakami und Tomasz, 1989).

Tabelle 1: Genetische Faktoren mit Einfluss auf die Expression der Methicillinresistenz

SSC <i>mec</i>	plasmidkodierte Gene	chromosomale Gene	globale Regulatoroperons
<i>mecI</i>	<i>blaI</i>	<i>femA, femB</i>	<i>agr</i>
<i>mecR1</i>	<i>blaR1</i>	<i>glnRA</i>	<i>sar</i>
<i>mecA</i>		<i>glmM</i>	<i>sigB</i>
		<i>murE</i>	
		<i>llm</i>	
		<i>fnt</i>	
		<i>cta</i>	
		<i>atl</i>	
		<i>lytH</i>	
		<i>yabH, purR, yabJ, spoVG</i>	

Einfluss der Regulatoren der β -Lactamase *blaI* und *blaR1* auf die Methicillinresistenz

Der Repressor der β -Lactamase BlaI kann auch in der Operatorregion von *mecA* binden. Nach einer Induktion durch β -Laktam-Antibiotika wird BlaI proteolytisch gespalten und *mecA* kann transkribiert werden (Gregory et al., 1997). Das Transmembranprotein BlaR1 reagiert im Gegensatz zu MecR1 auf alle β -Laktam-Antibiotika (Hackbarth et al., 1994). Mutationen in den regulatorischen Genen der β -Lactamase, die mit einer verminderten Induzierbarkeit der β -Lactamase einhergehen, führen gleichzeitig zu einer Abschwächung der Methicillinresistenz und zu einem heterogenen resistenten Phänotyp (Cohen et al., 1972).

So kann die Inaktivierung von *blaR1* durch unbalancierte Wirkung des Repressors BlaI zu einem heterogenen Phänotyp führen (Hackbarth et al., 1994).

Durch Einschleusen des β -Laktamase-Plasmides in den *S. aureus* COL, der die Methicillinresistenz homogen und auf hohem MHK-Niveau ausprägt, resultiert ein heterogen resistenter Phänotyp. Die Expression von *mecA* wird hierbei von BlaR1 reprimiert (Boyce et al., 1990; Hackbarth et al., 1994).

Im Regulationsnetzwerk zwischen *mecA* und *bla* spielen vermutlich weitere Faktoren eine Rolle, die an der Signalweitergabe zwischen BlaR1 und MecR1 und dem entsprechenden Repressor beteiligt sind. Als Kandidat wird das chromosomal kodierte Protein BlaR2 diskutiert, dass für die Plasmid-kodierte Regulation der β -Laktamase benötigt wird.

Charakteristisch für KNS-Isolate mit einer Methicillinresistenz ist deren heterogene Expression (Hartman und Tomasz, 1986; Matthews und Stewart, 1984). In der Populationsanalyse fällt eine kleine Subpopulation (10^{-8} bis 10^{-4}) von Zellen auf, die in der Lage sind bei hohen Konzentrationen von Methicillin zu wachsen, während die überwiegende Mehrheit der Zellen ein basales Resistenzniveau aufweist, wobei die MHK für Methicillin je nach untersuchtem Isolat zwischen weniger als 4 $\mu\text{g/ml}$ bis zu über 1024 $\mu\text{g/ml}$ schwanken kann (Seligman, 1969). Auch die Größe der hoch resistenten Subpopulation ist reproduzierbar und kennzeichnend für den jeweils untersuchten Stamm. Anhand ihres Resistenzprofils in der Populationsanalyse wurden Methicillin-resistente Staphylokokken in eine homogen resistente und drei Gruppen mit jeweils unterschiedlich stark ausgeprägtem heterogen resistenten Phänotypen klassifiziert (Tomasz et al., 1991). Diese Einteilung ist jedoch ein eher didaktisches Konzept, dem bislang ein funktionelles oder genetisches Korrelat fehlt.

Unter den üblichen Kulturbedingungen weisen Staphylokokken einen heterogen resistenten Phänotyp auf. Durch Veränderung der Kulturbedingungen z.B. je nach verwendetem Mueller-Hinton-Medium, durch den Zusatz von NaCl oder Saccharose, um ein hypertonisches Medium zu erzielen, oder durch eine Inkubation der Zellen bei 30 °C können heterogen resistente Stämme in einen homogen resistenten Phänotyp überführt werden. Umgekehrt begünstigt der Zusatz von EDTA (pH 5,2) oder die Inkubation bei 37 bis 43 °C einen heterogen resistenten Phänotyp oder sogar Methicillin-sensiblen Phänotyp (Matthews und Stewart, 1984; Hindler und Warner, 1987). Diese Unterschiede in der Expression der Methicillinresistenz stellen nur ein vorübergehendes Bild dar. Nach der Passage eines heterogen resistenten Isolates in Flüssigkulturen mit Zusatz von β -Laktam-

Antibiotika verändert sich der Phänotyp der Methicillinresistenz durch die Selektionsbedingungen in Richtung hochresistenter Mutanten mit homogener Expression des Phänotyps (Sabath und Wallace, 1974; Chambers und Hackbarth, 1987). Bei sukzessiver Passage der erhaltenen Mutanten in Antibiotika-freien Medium verliert sich dieser Phänotyp schrittweise und der alte heterogene Phänotyp stellt sich erneut ein. Bei einigen Stämmen jedoch, wie z. B. dem COL Stamm von *S. aureus*, bleibt die Resistenz der Subpopulation gegen höhere Konzentrationen des Antibiotikums trotz Passage in Antibiotika-freiem Medium erhalten. Die Stabilität der Resistenz bei diesen Stämmen spricht für die Entstehung von Mutanten, während bei anderen Stämmen das höhere Resistenzniveau der Subpopulation wieder auf das basale Ausgangsniveau der übrigen Population zurückgeht. Bei den letztgenannten Stämmen geht man von einer reversiblen Induktion durch das Antibiotikum aus. Stämme mit einer stabilen Expression eines homogen resistenten Phänotyps unterscheiden sich in der Zusammensetzung der Bakterienzellwand nicht von Stämmen mit einem heterogen resistenten Phänotyp (de Jonge et al., 1992), weisen aber Mutationen in sogenannten *chr** Genen auf (Ryffel et al., 1994).

Regulation der Methicillinresistenz durch chromosomal kodierte Gene

Eine Reihe chromosomaler, die Methicillinresistenz beeinflussender, Gene wurden mittels Transposonmutagenese identifiziert (Tabelle 1). Durch Insertion des Transposon Tn551 in Methicillin-resistenten Staphylokokken ließen sich Mutanten mit einer herabgesetzten Methicillinresistenz erzeugen (Berger-Bächi et al., 1992; Kornblum et al., 1986; de Lencastre und Tomasz, 1994; Wu und de Lencastre, 1999). Die ausgeschalteten chromosomalen Gene wurden als *fem* (factors essential for Methicillin resistance) oder *aux* (auxiliary) Faktoren bezeichnet (Berger-Bächi, 1983; Tomasz et al., 1990; Murakami und Tomasz, 1989). Die ausgeschalteten chromosomalen Gene sind unabhängig von *mec* und finden sich verstreut im Genom Methicillin-resistenter *mecA*-positiver, aber auch Methicillin-sensibler *mecA*-negativer Staphylokokken. Sie sind für die komplette Ausprägung der Methicillinresistenz notwendig und in unterschiedliche Schritte der Zellwandbiosynthese involviert. Außer bei *femE* (de Lencastre und Tomasz, 1994), dessen Funktion bislang nicht bekannt ist, weisen die Mutanten Veränderungen im Aufbau des Peptidoglycans auf.

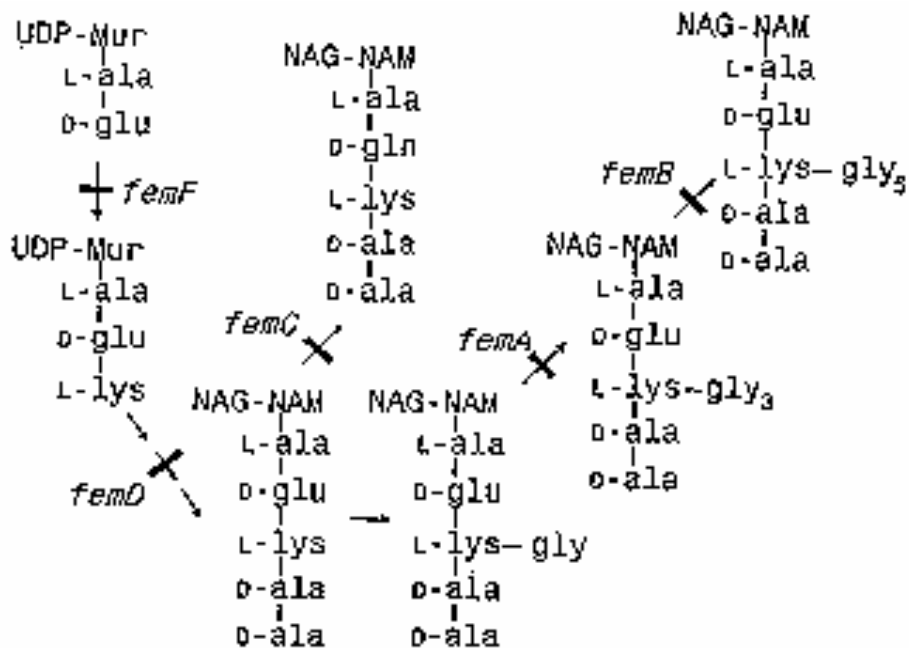


Bild 1: Schematische Übersicht über die Synthese der Vorstufen des Peptidoglycan und seiner Pentaglycinseitenkette. Als Balken sind die bei verschiedenen Mutanten unterbrochenen Syntheseschritte gekennzeichnet. UDP-Mur entspricht der Uridindiphosphomuramyl Peptidvorstufe; NAG-NAM entspricht dem N-Acetylglucosamin-N-Acetylmuraminsäure-Disaccharid; (nach Chambers H. F. 1997).

femA* und *femB

Das Entstehen einer Methicillinresistenz setzt den schrittweisen Aufbau der Pentaglycinseitenkette des Peptidoglycans aus Glycinresten von Glycyl-t-RNAs voraus (Bild 1). Das *femAB* Operon kodiert für zwei zytoplasmatische 49 kDa große Proteine, die an dieser Synthese beteiligt sind. *FemA* Mutanten fehlt das zweite und dritte Glycin, während bei *femB* Mutanten die Pentaglycinkette nur aus den ersten drei Glycinreste besteht (Bild 1) (Berger-Bächi et al., 1989; de Jonge et al., 1993; Henze et al., 1993; Maidhof et al., 1991; Stranden et al., 1997; de Lencastre und Tomasz, 1994). Durch Inaktivierung beider Gene wird eine Überempfindlichkeit der *femAB* Mutanten gegenüber β -Laktam-Antibiotika und anderen Antibiotikaklassen erzeugt, ohne dass die Produktion der PBP beeinflusst wird (Ling und Berger-Bächi, 1998). *FemAB* Mutanten zeigen ein schlechteres Wachstum, der Umsatz der Zellwand und die Autolyse ist vermindert, ohne dass quantitative Veränderungen der involvierten autolytischen Enzyme beobachtet werden. Aufgrund der Tatsache, dass die Zellwand weniger Quervernetzungen enthält und anstelle von Glycinresten Serin in das Peptidoglycanpentaglycin durch die FemAB-„like“ Faktoren Lif und Epr eingebaut wird, sind diese Mutanten weniger empfindlich für den Verdau mit

Lysostaphin und erscheinen auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen unnormal groß (Ehlert et al., 2000; Chambers, 1997). Durch Komplementierung der Mutanten mit intakten *femAB* Genen kann der Methicillin-resistente Phänotyp wieder hergestellt werden und eine vollständige Pentaglycinseitenkette wird synthetisiert. Ähnliche Effekte wie bei *femAB* Mutanten wurden nach der Ausschaltung von *fmhB* beschrieben (Tschierske et al., 1999; Rohrer et al., 1999), dass an der Bindung des ersten Glycinrestes beteiligt ist. Während *femAB* Mutanten nur durch kompensatorische Mutationen lebensfähig sind, ist eine intakte Funktion von *fmhB* essentiell (Tschierske et al., 1999; Rohrer et al., 1999).

***GlnRA* (synonym: *femC*)**

Bei *glnRA* Mutanten liegt die Transposoninsertion im Repressorgen *glnR* der Glutaminsynthetase *glnA*. Dies resultiert in einer verringerten Transkription der Glutaminsynthetase und führt zu einem Block in der Glutaminproduktion. Glutamin fungiert normalerweise als NH_4 -Donor für die Amidierung des dritten Aminosäurerestes des Peptidoglycanpentapeptides. Nicht-amidierte Vorstufen sind weniger reaktiv, was letztendlich in einer geringeren Quervernetzung der Zellwand resultiert (Bild 1).

GlnRA Mutanten zeigen einen heterogen resistenten Phänotyp, wobei im Gegensatz zu den *femAB* Mutanten das MHK-Niveau bei der Mehrzahl der resistenten Bakterienzellen nicht verändert ist (Gustafson et al., 1994).

Durch den Zusatz von Glutamin zum Zellkulturmedium ist dieser Effekt reversibel. Revertanten, die durch Passage in Antibiotika-haltigem Medium erzeugt wurden, wiesen wieder einen hoch resistenten, homogenen Phänotyp auf. Die herabgesetzte Glutaminsynthetaseaktivität als auch der geringere Grad der Zellwandvernetzung der *glnRA* Revertanten blieben jedoch bestehen. Dies weist auf alternative, kompensatorische Mechanismen hin, die den Resistenzphänotyp wiederherstellen können.

***glmM* (synonym: *femD*, *femR*)**

Einen der ersten Schritte der Peptidoglykansynthese stellt die Umwandlung von Glucosamin-6-Phosphat in Glucosamin-1-Phosphat durch die GlmM Phosphoglucosaminmutase dar (Jolly et al., 1997). Eine Ausschaltung des kodierenden Gens *glmM* führt in der Zellwand zu einem Verschwinden von nichtsubstituierten Disaccharidpentaglycinmonomer und zu einer herabgesetzten Methicillinresistenz, aber einer gesteigerten Empfindlichkeit für Teicoplanin (Bild 1) (de Jonge et al., 1992; Berger-

Bächi et al., 1992; Wu et al., 1996). *GlmM* wird von dem letzten Gen des *orf1-orf2-glmM* Operons kodiert. Homogen Methicillin-resistente Revertanten mit einer Mutation in einem Suppressorgen konnten nach Passage in Methicillin-haltigen Medium erzeugt werden. Der biochemische Defekt wurde nicht wiederhergestellt und die gesteigerte Empfindlichkeit für Teicoplanin blieb bestehen. Nur durch die Komplementierung mit dem kompletten *orf1-orf2-glmM* Operon konnte die ursprüngliche Ausprägung der Methicillinresistenz sowie der Teicoplaninempfindlichkeit wiederhergestellt werden, was für eine Beteiligung von *orf1* und *orf2* bei der Zellwandsynthese spricht (Glanzmann et al., 1999).

Vor kurzem wurde das Gen *mrp* beschrieben, das zusammen mit *glmM*, den oben beschriebenen offenen Leserahmen *orf1* und *orf2* und dem Gen für die Arginase *arg* einen gemeinsam transkribierten Gencluster bildet. Die Inaktivierung von *mrp* durch Insertion von *Tn551* führt zu einer massiven Absenkung der Oxacillin MHK von 1.600 µg/ml auf 1,5 µg/ml bei dem *S. aureus* Stamm COL (Wu und de Lencastre, 1999)

***murE* (synonym: *femF*)**

Eine Insertion in das *murE* Gen verhindert die Anlagerung des Lysins in der Synthese der Peptidoglycanvorstufen (Bild 1) und führt zu einem heterogenen resistenten Phänotyp (Ornelas-Soares et al., 1994). Es kommt zu einer Abnahme von UDP-verknüpften Muramylpentapeptiden und einer gleichzeitigen Akkumulation von UDP-verknüpften Muramyldipeptiden, die auch in geringer Menge in das Peptidoglycan eingebaut werden. Ob die Abnahme der Expression der Methicillinresistenz auf dem Einbau der verkürzten Vorstufen in das Peptidoglycan oder dem Ungleichgewicht zwischen den verschiedenen Muropeptiden beruht, ist offen (Ludovice et al., 1998).

llm

Das Gen *llm* kodiert für ein lipophiles 38 kDa Membranprotein, das den Grad der Methicillinresistenz, aber auch die Lyse der Bakterienzellwand beeinflusst. Die Inaktivierung von *llm* durch eine *Tn918* Transposoninsertion in den C-terminalen Teil, überführt einen homogen resistenten Phänotyp mit hoher Oxacillin MHK in einen heterogen resistenten Phänotyp mit niedriger Oxacillin MHK (Maki et al., 1994). Die *llm* Mutanten weisen eine erhöhte Autolyserate auf. Die Rolle von Insertionselementen in der Ausprägung der Methicillinresistenz wird durch die Tatsache unterstrichen, dass

Revertanten durch eine zweite Insertion von IS256 erzeugt werden konnten. Dies beruhte auf einem neu entstandenen Promotor, der zu einer gesteigerten *llm* Transkription führte.

fnt

Eine Mutation in einem als *fnt* bezeichneten Gen führte zu einer verminderten Methicillinresistenz bei Kultivierung der entsprechenden Mutanten in Medium mit Zusatz des Detergens Triton X-100. Dieser Effekt war jedoch nicht generell, sondern nur für ausgewählte MRSA Stämme zu beobachten (Komatsuzawa et al., 1997). Die genaue Funktion des Proteins Fmt ist unbekannt.

***ctaA* - homologes Gen**

Die Inaktivierung eines zu *ctaA* von *Bacillus subtilis* homologen Gens in *S. aureus* führte zu einer verminderten Methicillinresistenz. In *B. subtilis* kontrolliert *ctaA* die Expression des Cytochrom aa3 Komplexes. Dieser Befund spricht für eine Beteiligung der Enzyme der Atmungskette an der Ausprägung der Methicillinresistenz.

Autolyse und Methicillinresistenz

Mureinhydrolasen spielen eine entscheidende Rolle in der Entstehung und im Umsatz des Peptidoglycans der Staphylokokken (Giesbrecht et al., 1998). Es gibt aber bislang keinen klaren Zusammenhang zwischen dem Grad der Autolyse und dem Resistenzphänotyp. Eine erhöhte autolytische Aktivität als Ursache eines heterogen Methicillin-resistenten Phänotyps wurde beschrieben (Chambers und Hackbarth, 1987; Gustafson et al., 1992; Gustafson und Wilkinson, 1989; Qoronfleh und Wilkinson, 1986). Es wurde berichtet, dass homogen resistente Stämme einen geringeren Autolysegrad haben, als heterogen resistente Stämme, insbesondere wenn diese Stämme in Anwesenheit von β -Laktam-Antibiotika kultiviert werden (Gustafson und Wilkinson, 1989). Heterogen resistente *mec* Transduktanten von Methicillin-sensible Stämmen zeigten eine erhöhte Autolyse als homogen resistente Stämme. Wachstumsbedingungen, welche die Expression der Methicillinresistenz erhöhen, gehen auch mit einer erhöhten Autolyserate einher (Chambers und Hackbarth, 1987). Andererseits wiesen *femC* und *femD* Mutanten einen geringeren Autolysegrad auf. Bei einem weiteren homogen resistenten MRSA wurde eine erhöhte Autolyse beschrieben (de Jonge et al., 1991). Während die Inaktivierung des *atl* Operons, das für zwei autolytische Enzyme kodiert, nur eine geringe Verminderung der

Methicillinresistenz mit sich bringt (Oshida und Tomasz, 1992), weisen *lytH* Deletionsmutanten einen homogen resistenten Phänotyp bei deutlichem Anstieg der MHK im Vergleich zum heterogen resistenten Wildtyp mit niedriger MHK auf (Fujimura und Murakami, 1997).

Agr* und *sar

Die globalen regulatorischen Genorte *agr* (accessory gene regulator) und *sar* (staphylococcal accessory regulator) beeinflussten die Expression der Methicillinresistenz bei einem heterogen resistenten MRSA nur gering. Die Beteiligung weiterer PBP an der Wirkung von PBP2a wurde aus einem beobachteten Zusammenhang zwischen einem Rückgang der Methicillinresistenz und einer verringerten Synthese von PBP 1 und PBP 3 bei *agr/sar* Doppelmutanten geschlossen (Duran et al., 1996). Eine solche Interaktion konnte für PBP2 gezeigt werden (Pinho et al., 1998). Eine weitere potentielle Beeinflussung der Methicillinresistenz durch *agr* oder *sar* ergibt sich aus der Steuerung der Expression autolytischer Enzyme.

SigB* und *rsbU* sowie *yabH*, *purR*, *yabJ* und *spoVG

Über den P3 Promotor des *agr* Systems kann der Stress-induzierbare alternative Sigmafaktor SigB die Ausprägung der Methicillinresistenz beeinflussen (Manna et al., 1998; Kullik und Giachino, 1997). Bei dem homogen resistenten *S. aureus* Stamm COL wurde eine Abnahme der Methicillinresistenz beobachtet (Wu et al., 1996), während bei zwei weiteren *S. aureus* Stämmen keinerlei Effekt von SigB auf die Methicillinresistenz beschrieben wurde (Berger-Bächli, 1999).

Bei *S. epidermidis* wurde ebenfalls eine Beeinflussung der Methicillinresistenz durch SigB beobachtet. Tn917 Insertionen, die in dem Biofilm-positiven *S. epidermidis* 1457 einen Biofilm-negativen Phänotyp erzeugen, wurden in den *mecA*-positiven, Methicillin-resistenten *S. epidermidis* 1057 transduziert. So entstanden die Transduktanten der Klasse II, bei denen die Tn917 Insertion die zu *B. subtilis* homologen Gene *yabH*, *purR*, *yabJ* und *spoVG* beeinflusst und die Klasse III Transduktanten, bei denen die Tn917 Insertion das *rsbU* Gen des σ^B -Operons beeinflusst. Die Oxacillin MHK war bei beiden Transduktantenklassen nur geringfügig herabgesetzt. Transduktanten der Klasse II zeigten auf Oxacillin Gradienten Platten eine verminderte Resistenz. Transduktanten der Klasse III waren in der Populationsanalyse empfindlicher auf Oxacillin mit $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ bei jeweils

mehr als 90 % der Bakterienzellen. Die Transkription von *mecA* war aber bei den Transduktanten und dem Wildtypstamm 1057 vergleichbar (Mack et al., 2002; Bartscht, 2002; Knobloch et al., 2001).

Einfluss veränderter oder inaktivierter Penicillin-bindender Proteine auf die Methicillinresistenz

Das derzeitige Modell der Methicillinresistenz geht davon aus, dass PBP2a die Funktion der anderen PBP bei Anwesenheit von inhibitorischen Konzentrationen von β -Laktam-Antibiotika ersetzt. Jedoch führte bereits die Inaktivierung des normalen PBP2 durch *Tn551* Insertion im *pbp2* Operon des Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* Stammes COL zu einer deutlichen Herabsetzung der Methicillinresistenz (Pinho et al., 1997). Um den ursprünglichen Resistenzphänotyp zu rekonstituieren, war allerdings neben PBP2 ein weiteres Protein, das vom *pbp2* Operon kodiert wird und dessen Funktion nicht näher bekannt ist, notwendig (Pinho et al., 1998).

Die „Borderline“ Methicillinresistenz bei Staphylokokken

Von dem Phänomen einer Borderlinerresistenz bei *S. aureus* (BORSA) oder KNS (BORSE) wird gesprochen, wenn bei den entsprechenden Isolaten die MHK für Methicillin oder Oxacillin knapp oberhalb des MHK-Grenzwertes liegt. Der Nachweis von *mecA* dient der weiteren Diskriminierung dieses Phänomens. Bei *mecA*-positiven BORSA oder BORSE wird eine extrem heterogene Expression der Methicillinresistenz bei vorhandener PBP2a Expression postuliert (Gerberding et al., 1991). In der Populationsanalyse zeigen diese Stämme eine z. T. extrem kleine Subpopulation resistenter Zellen (Gerberding et al., 1991).

Bei *mecA*-negativen Borderline-resistenten Stämmen sind keine resistenten Subpopulationen nachweisbar. Ursächlich werden einerseits veränderte Penicillin bindende Proteine oder eine Überproduktion der β -Laktamase postuliert (McDougal und Thornsberry, 1986; Tomasz et al., 1989). Bei einem *mecA*-negativen, β -Laktamase-negativen, Borderline-resistenten Isolat fand sich ein verändertes Bindungsverhalten von PBP 1, 2 und 4 (Tomasz et al., 1989). Bei Mutanten, die nach Antibiotikaselektion gefunden wurden, ließen sich ebenfalls veränderte PBP 2 und 4 beobachten (Berger-Bächli et al., 1986).

Kinetische Untersuchungen zum Bindungsverhalten der veränderten PBP zeigten entweder eine verlangsamte Acylierung oder eine beschleunigte Deacylierung (Chambers et al., 1994), wobei die Modifikationen der PBP auf Punktmutationen in den Penicillin-bindenden Domänen der PBP beruhen (Hackbarth et al., 1995). Eine Überexpression der PBP, insbesondere PBP4, kann eine Methicillinresistenz auf niedrigem Niveau bedingen (Henze und Berger-Bächi, 1996), da auch β -Laktamase-stabile β -Laktam-Antibiotika einer langsamen enzymatischen Inaktivierung durch Hydrolyse unterliegen können (Kernodle et al., 1989). Im Verhältnis zur Penicillinkonzentration steht ein Überschuss von nicht durch das β -Laktam-Antibiotikum inaktiviertem PBP für die Zellwandsynthese zur Verfügung. Wachstumsbedingungen, die eine Steigerung der Expression der Methicillinresistenz erzeugen, begünstigen auch eine gesteigerte Produktion der β -Laktamase (Coles und Gross, 1967; Kim und Chipley, 1974). Kennzeichnend für Borderline-resistente Stämme mit einer Überproduktion der β -Laktamase ist, dass sie *mecA*-negativ sind und die produzierte β -Laktamase eine sehr hohe enzymatische Aktivität aufweist. Die Zugabe von β -Laktamase-Inhibitoren wie Sulbactam oder Clavulansäure inhibiert diese Typ A Staphylokokken- β -Laktamase. Ein sensibler Phänotyp wird auch durch Elimination der β -Laktamase kodierenden, 17,2 kb großen Plasmid erzielt. Die Stämme gehören fast ausnahmslos zur Phagengruppe 94/96 (McDougal und Thornsberry, 1986; McMurray et al., 1990). Der Befund, dass Transformanten mit dem Plasmid eines Borderline-resistenten Stammes mit einer Überproduktion der β -Laktamase Methicillin-sensibel bleiben können (Barg et al., 1991) spricht jedoch gegen eine ursächliche Beteiligung einer β -Laktamase-Überproduktion für das Auftreten einer Borderlinerresistenz. Eine Methicillinaseaktivität, zusätzlich zu der Plasmid-kodierten β -Laktamase, wurde bei Isolaten mit einer β -Laktamase-Überproduktion gefunden (Masssida et al., 1992). Das putative Gen der Methicillinase wurde jedoch noch nicht entdeckt (Masssida et al., 1994). Mutationen im PBP2 wurden als eine weitere Ursache einer Borderlinerresistenz bei *S. aureus* beschrieben. Die Mutationen waren bei β -Laktamase-negativen *S. aureus* Isolaten Als auch bei Isolaten mit einer Überproduktion der β -Laktamase identisch (Hackbarth et al., 1995; Chambers, 1997). Tierexperimentelle Daten zeigen jedoch, dass Penicillinase-resistente Penicilline bei der Therapie von Infektionen durch *mecA*-negative, Borderline-resistente *S. aureus* wirksam sind (Chambers et al., 1989; Thauvin-Eliopoulos et al., 1990). Auch gibt es derzeit keine klinischen Studien, die ein Therapieversagen bei *mecA*-negativen, niedrig resistenten Staphylokokken nahe legen.

2.3.2. Phänotypische Nachweisverfahren einer Methicillinresistenz

Die phänotypische Detektion der Methicillinresistenz bei KNS ist wegen der heterogenen *mecA*-Expression (Chambers, 1997; McDonald et al., 1995; Tenover et al., 1999; York et al., 1996) und dem Zuschnitt der Nachweisverfahren auf *Staphylococcus aureus* schwierig. Gebräuchliche phänotypische Testverfahren wie die Oxacillin-Agar-Platte, der Agardiffusionstest oder die MHK-Bestimmung mit der Mikrodilution oder mittels Agardilution beruhen auf modifizierten Kulturbedingungen, um die Expression der Methicillinresistenz zu erhöhen (McDonald et al., 1995; Tenover et al., 1999; York et al., 1996). Zur verbesserten Detektion der Methicillinresistenz, insbesondere bei KNS, wird Oxacillin anstelle von Methicillin verwendet, weil Methicillin eine geringere chemische Stabilität gegenüber Umwelteinflüssen besitzt. Die Inkubation der Testverfahren wird bei 30 °C oder 35 °C anstelle von 37 °C durchgeführt. Außerdem wird die Inkubationszeit auf 24 Stunden oder auch auf 48 Stunden, anstelle der üblichen Kulturbedingungen mit Bebrütung über Nacht; (in der Regel 16 bis 18 Stunden) verlängert. Die Nachteile der phänotypischen Verfahren sind die lange Dauer bis zum Vorliegen des Ergebnisses, mangelnde Sensitivität oder ein hoher personeller Aufwand. Der Agardiffusionstest mit Oxacillin gilt als die am wenigsten zuverlässige Methode beim Nachweis der Methicillinresistenz (Chambers, 1993; Ünal et al., 1994; York et al., 1996), der Nachteil dieser Methode liegt vor allem in einer unzureichenden Spezifität, die im Schnitt nur 80 % beträgt.

Agardiffusion

Die Empfehlungen der NCCLS (National Committee, 2002) und der DIN (DIN, 2000) sowie die an die DIN angelehnten, aber in Einzelheiten abweichenden Empfehlungen nach Wiedemann (Wiedemann, 1992) für die Testung von Oxacillin im Agardiffusionstest sind als Übersicht dargestellt (Tabelle 2). Die Verwendung anderer β -Laktam-Antibiotika für den Agardiffusionstest, wie z. B. von Cephalosporinen oder Carbapenemen, ist aufgrund einer weiteren Reduktion der Sensitivität ungeeignet. Modifikationen der Testbedingungen, wie die Supplementierung des Mediums mit NaCl oder eine verlängerte Inkubationszeit, können zu einer Reduktion der Spezifität führen (Chambers, 1997). Die verlängerte Inkubation erhöht andererseits die Sensitivität bei dem Nachweis einer Methicillinresistenz bei heterogen resistenten MRSE.

Tabelle 2: Empfehlungen zur Durchführung des Agardiffusionstest mit Oxacillin

	DIN	Wiedemann	NCCLS
Medium	MH-Agar	MH-Agar+2% NaCl	MH-Agar
Beschickung	5 µg	5 µg	1 µg
Inokulum	nicht-konfluierender Wachstumsrasen	nicht-konfluierender Wachstumsrasen	konfluierender Wachstumsrasen
Technik	nicht explizit vorgegeben (ausreichende Menge einer Erregersuspension auf der Oberfläche des Mediums verteilen	Überfluten vorgetrockneter Agarplatten mit 1:100 verdünnter Übernachtskultur Absaugen des Überschuss	direkt Bakteriensuspension (1-2 x 10 ⁸ KBE/ml in 0,9 % NaCl) in drei Ebenen ausstreichen
Schichtdicke des Agar	3-3,5 mm	3-3,5 mm	4 mm
Testdauer	18 ± 2 h	18 ± 2 h	24 h
Temperatur	36 ± 1 °C	30 °C	35 °C

Mikrodilution

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) für Oxacillin mittels der Mikrodilution erlaubt hingegen, bei der Wahl von günstigen Bedingungen mehr als 95 % der Methicillin-resistenten, *mecA*-positiven Staphylokokken zu detektieren (Thornsberry und McDougal, 1983).

Die NCCLS empfiehlt für die Mikrodilution ein Inokulum von 5×10^5 KBE/ml zu verwenden, wobei eine Abweichung im Bereich von 3×10^5 bis 7×10^5 KBE/ml zulässig ist (Tabelle 3) (National Committee, 2002). Die Empfehlungen der DIN sehen ein etwas geringeres Inokulum vor, dass im Bereich von 1×10^5 bis 5×10^5 KBE/ml liegen soll (Tabelle 3) (DIN, 2000). Hingegen empfiehlt Wiedemann ein niedrigeres Inokulum, dass 1×10^5 KBE nicht überschreiten sollte, da bei einem höheren Inokulum unscharfe Endpunkte resultieren (Tabelle 3) (Wiedemann, 1992). Als Testmedium wird jeweils Mueller-Hinton-Bouillon mit Zusatz von 2 % NaCl empfohlen (Tabelle 3). Unterschiede bestehen hinsichtlich der empfohlenen Inkubationszeit und optimalen Bebrütungstemperatur. So empfiehlt die NCCLS die Testung für 24 Stunden und bei 35 °C, die DIN eine Inkubation für 20 ± 2 Stunden bei 36 ± 1 °C, während Wiedemann 18 ± 2 Stunden bei 30 °C vorgibt (Tabelle 3) (National Committee, 2002; DIN, 2000; Wiedemann, 1992). Für eine maximale Sensitivität bei der Detektion einer Methicillinresistenz bei KNS wurde in einer Studie eine Inkubation für bis zu 48 Stunden vorgeschlagen (Woods et al., 1986).

Tabelle 3: Empfehlungen zur Bestimmung der Oxacillin MHK durch Mikrodilution

	DIN	Wiedemann	NCCLS
Inokulum	$1 - 5 \times 10^5$	maximal 1×10^5	5×10^5 ($3 - 7 \times 10^5$)
Medium	MH + 2 % NaCl	MH + 2 % NaCl	MH + 2 % NaCl
Testdauer	20 ± 2 h	18 ± 2 h	24 h
Temperatur	36 ± 1 °C	30 °C	35 °C

Agardilution

Vergleichbare Resultate zur Mikrodilution können mit der Methode der Agardilution erzielt werden, die ebenfalls mit 2 % NaCl supplementiertem Mueller-Hinton-Agar durchgeführt wird. Eine Inkubation für 24 Stunden bei 30-35°C wird hierfür empfohlen.

Oxacillin-Agar-Platte

Als Suchtest auf das Vorliegen einer Methicillinresistenz bei *Staphylococcus aureus* und KNS ist Mueller-Hinton-Agar, der 4 % NaCl und 6 µg/ml Oxacillin enthält (Tabelle 4), im klinisch-mikrobiologischen Labor unter dem Begriff Oxacillin-Agar-Platte weit verbreitet. Empfohlen wird die Inkubation bei 35°C für 24 Stunden (Chambers, 1997) oder bei 30 °C (Gatermann und Laufs, 1987). Die Sensitivität dieser Methode erreicht bei MRSA nahezu 100 %, während die Sensitivität bei MRSE je nach untersuchter KNS-Spezies und abhängig vom verwendeten Mueller-Hinton-Agar stark schwankt (Chambers, 1993; Tenover et al., 1999). Bei KNS wurde die Inkubation der Oxacillin-Agar-Platte für 48 Stunden empfohlen.

Tabelle 4: Empfehlungen der NCCLS zur Durchführung der Oxacillin-Agar-Platte*

Medium	Mueller-Hinton-Agar mit 4 % NaCl und 6 µg/ml Oxacillin
Inokulum	direkte Bakteriensuspension von 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ KBE/ml in 0,9 % NaCl)
Technik	auf kleiner Fläche der Agarplatte ausstreichen oder „spot“ Inokulation alternativ: 10^4 KBE auf die Agarplatte pipettieren
Testdauer	24 h
Temperatur	35 °C

* seit 1/1999 nicht mehr empfohlen für Koagulase-negative Staphylokokken (National Committee, 2002)

Automatisierte Systeme

Ein Teil der automatisierten Systeme bieten den potentiellen Vorteil einer raschen antimikrobiellen Resistenztestung und Befundmitteilung und die Möglichkeit einer verbesserten Erkennung ungewöhnlicher oder problematischer Resistenzphänotypen. Auch können automatisierte Systeme eine Verbesserung der mikrobiologischen Diagnostik aufgrund einer größeren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse darstellen (Ferraro und Jorgensen, 1999). Zur Detektion einer Methicillinresistenz bei MRSE gibt es zum Teil viel versprechende Befunde, aber auch noch eine Reihe von Schwierigkeiten (Louie et al., 2001; Hussain et al., 1998; Martinez et al., 2001; Yamazumi et al., 2001a; Horstkotte et al., 2002).

Genotypischer Nachweis von *mecA* durch Polymerasekettenreaktion

Die Detektion von *mecA* als genetischer Marker für das Vorliegen einer Methicillinresistenz durch PCR oder Hybridisierung ist sehr empfindlich und gilt als der Goldstandard (Hiramatsu et al., 1992b; Knapp et al., 1996; Suzuki et al., 1992; Tokue et al., 1992; Ünal et al., 1994; Chambers, 1997). Außerhalb von Referenzzentren ist dieses Verfahren aber sehr aufwändig und teuer und für die Laborroutine unpraktikabel.

PBP2a Nachweis

Als weitere neuere Option zur Detektion der Methicillinresistenz bietet sich ein immunologisches Verfahren an, bei dem mit monoklonalen Antikörpern gegen PBP2a beladene Latexpartikel in einem kommerziell erhältlichen Agglutinationstest angewendet werden. Der Nachweis von PBP2a als Marker für das Vorliegen einer Methicillinresistenz hat sowohl für *S. aureus* (van Griethuysen et al., 1999; van Leuwen et al., 1999; Mariott et al., 1999; Cavassini et al., 1999; Louie et al., 2000; Nakatomi und Sugiyama, 1998; Yamazumi et al., 2001b) als auch bei KNS (Hussain et al., 2000a; Horstkotte et al., 2001; Louie et al., 2001; Zbinden et al., 2001; Udo et al., 2000; Andrews et al., 2000; Yamazumi et al., 2001a) in verschiedenen Studien erfolgreich abgeschnitten und wird daher seit kurzem von der NCCLS empfohlen (National Committee, 2002).

2.4. Pathogenese Fremdkörper-assoziiertes Infektionen

Der Entstehungsprozess Fremdkörper-assoziiertes Infektionen und die daran beteiligten Faktoren wurden in den letzten Jahren für den wichtigsten Vertreter der Koagulase-negativen Staphylokokken, *S. epidermidis*, intensiv studiert. In einer ersten Phase adhären *S. epidermidis* Zellen an die Oberfläche verschiedener Biomaterialien und in der anschließenden Proliferationsphase entsteht ein vielschichtiger Biofilm. In diesem haben die wenigsten Bakterienzellen direkten Kontakt zur Oberfläche, sondern befinden sich in einer extrazellulären Matrix, die in elektronenmikroskopischen Bildern als mehrere µm mächtiger, optisch dichter Biofilm imponiert (Peters et al., 1982; Götz und Peters, 2000). Eine *conditio sine qua non* für den Aufbau dieses Biofilms sind Moleküle die eine interzelläre Adhäsion vermitteln und so die Bakterienzellen, die nicht an der Oberfläche des Biomaterials adhären, im Verbund halten.

Die primäre Adhäsion von *S. epidermidis* an nicht konditionierte Oberflächen wird von unspezifischen Faktoren der Bakterien und der Materialien wie Oberflächenbeschaffenheit,

Ladung oder Hydrophobizität beeinflusst (Ludwicka et al., 1984; Heilmann und Peters, 2000). *In vitro* adhären hydrophobe Stämme besser als hydrophile Stämme (Pascual et al., 1986; Christensen et al., 1994; Vacheethasanee et al., 1998).

Das Gen *atlE* mit Homologie zum Autolysin *atl* von *S. aureus* wurde als Adhäsionsfaktor an nativem Polystyrol beschrieben (Heilmann et al., 1996a; Heilmann et al., 1997). Eine Biofilm-negative, *atlE*-negative Transposonmutante von *S. epidermidis* O-47 ist adhäsionsdefizient an Polystyrol und weist eine stark verminderte Hydrophobizität auf.

Des Weiteren wurde das *staphylococcal surface protein* SSP-1 beschrieben (Timmermann et al., 1991; Veenstra et al., 1996). Spezifische, gegen dieses Protein gerichtete Antikörper inhibierten konzentrationsabhängig die primäre Adhäsion von *S. epidermidis* 354.

Als Adhäsionsfaktor an Silikonkathetern (Muller et al., 1993a), nicht aber an Polyethylen (Higashi et al., 1998) wurde ein kapsuläres Polysaccharid/Adhäsion (PS/A) bei *S. epidermidis* RP62A isoliert.

In vivo wird die Oberfläche des Biomaterials durch Serum oder Gewebeflüssigkeiten durch Fibrinogen, Fibronectin oder Kollagen konditioniert (Kloos und Bannermann, 1994). Das Fibrinogen-bindende Protein (Fbe) von *S. epidermidis* (Nilson et al., 1998) zeigt Ähnlichkeit mit dem zellwandgebundenen Fibrinogenrezeptor (ClfA) von *S. aureus*. Fbe als auch Fbe-spezifische Antikörper inhibieren die Adhäsion von *S. epidermidis* an immobilisiertes Fibrinogen was die funktionelle Bedeutung von Fbe zeigt (Pei et al., 1999). Andererseits zeigen viele *S. epidermidis* Isolate nur eine schwache Bindung an fibrinogenbeschichtete Polymere (Nilsson et al., 1998; Galdbart et al., 2000).

In der Proliferationsphase der Bakterien zum mehrschichtigen Biofilm wurde das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsion (PIA) als entscheidender Faktor beschrieben. PIA wurde ursprünglich durch seine spezifische Reaktion mit einem Antiserum gegen den Biofilm-positiven Stamm *S. epidermidis* 1457 isoliert (Mack et al., 1992). Durch Vergleich des Wildtypstammes 1457 mit den isogenen Biofilm-negativen und PIA-negativen Transposonmutanten 1457-M10 und 1457-M11 wurde die funktionelle Bedeutung von PIA für die interzelluläre Adhäsion gezeigt (Mack et al., 1994).

Aus *S. epidermidis* 1457 lassen sich die einander sehr ähnlichen Polysaccharidfraktionen I und II aufreinigen (Mack et al., 1996a). Polysaccharid I stellt mehr als 80 % des gereinigten Polysaccharides dar und ist ein lineares Homoglycan von durchschnittlich 130 β -(1,6)-verknüpften N-Acetylglucosamineinheiten. Etwa 15-20 % von Polysaccharid I sind nicht acetyliert und bedingen eine positive Ladung. Polysaccharid II ist strukturell nahe

verwandt, aber aufgrund von Phosphat und Succinat leicht negativ geladen. Die Glucosaminreste von Polysaccharid II sind in außerdem in einem höheren Maße N-acetyliert (Mack et al., 1996a).

In Infektionsmodellen der Maus und der Ratte konnte die Bedeutung von PIA in der Pathogenese von Fremdkörper-assoziierten Infektionen durch *S. epidermidis* untermauert werden (Rupp et al., 1999a; Rupp et al., 1999b; Rupp et al., 2001a; Rupp und Fey, 2001b). Untersuchungen an Biofilm-negativen Transposonmutanten des Biofilm-positiven *S. epidermidis* Stammes O-47 (Heilmann et al., 1996a; Heilmann et al., 1996b) führten zur Identifizierung des *ica*-(*intercellular adhesion*)-Operon, das aus den vier Genen *icaA*, *icaD*, *icaB* und *icaC* besteht (Gerke et al., 1998).

Das Protein IcaA weist vier Transmembrandomänen auf und besitzt *in vitro* eine geringe N-Acetylglucosaminyltransferaseaktivität, die in Anwesenheit von IcaD verstärkt wird (Gerke et al., 1998). IcaB ist ein sekretorisches Protein, dessen genaue Funktion noch unklar ist. IcaC ist ein Transmembranprotein, das für die PIA-Synthese unerlässlich ist.

PIA fungiert als interzelluläres Adhäsion und vermittelt die Agglutination von Erythrozyten, eine Fähigkeit, die viele *S. epidermidis* Isolate besitzen (Mack et al., 1999) und die mit der Biofilmbildung korreliert (Rupp und Archer, 1992). Über eine Korrelation zwischen der Menge an produziertem PIA und dem Hämagglutinationstiter wurde in der Folge berichtet (Fey et al., 1999). Schließlich wurde PIA als Hämagglutinin oder zumindest als ein notwendiges funktionelles Element desselben identifiziert (Mack et al., 1999).

Ursprünglich als Adhäsionsfaktor von *S. epidermidis* RP62A an Silikonkathetern wurde PS/A beschrieben. PS/A kann jedoch von einem rekombinanten, das *ica*-Operon tragenden *S. carnosus* Stamm gebildet werden (McKenney et al., 1998). Es liegt nahe PIA und PS/A als Derivate desselben Glucosaminpolymers, das stammspezifisch und/oder durch variierende externe Bedingungen unterschiedlich stark N-acetyliert oder N-succinyliert vorliegt, anzusehen. Für PIA konnte in Studien mit klinischen Isolaten eine Korrelation zwischen der Expression des Antigens und der Fähigkeit zur Biofilmbildung festgestellt werden (Mack et al., 1996b).

Bei RP62A wurde außerdem das Polysaccharid SAA (*slime associated antigen*) beschrieben (Christensen et al., 1990), das auch überwiegend aus N-Acetylglucosamin besteht (Baldassarri et al., 1996). SAA wurde bei allen untersuchten Biofilm-positiven *S. epidermidis* Isolate gefunden, so dass SAA vermutlich PIA oder einer Variante von PIA entspricht (Götz und Peters, 2000; Mack et al., 1999; Mack et al., 2000).

Eine phänotypische Variabilität der Biofilmproduktion von *S. epidermidis* kann sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beobachtet werden (Baddour et al., 1990; Ziebuhr et al., 1997). Spontane Biofilm-negative Phasenvarianten durch eine reversible Insertion von IS256 im *ica*-Operon wurden beschrieben (Ziebuhr et al., 1997). Nach Exzision des Insertionselements waren die Isolate erneut PIA- und Biofilm positiv (Ziebuhr et al., 1999). An einer Regulation der *ica*-Expression ist vermutlich der alternative Sigmafaktor σ^B beteiligt. Eine Transposoninsertion im positiven Regulator *rsbU* von σ^B rief in *S. epidermidis* 1457 einen PIA-negativen und Biofilm-negativen Phänotyp hervor (Knobloch et al., 2001). Auch ließ sich die PIA-Bildung des Wildtyps, aber nicht die der Mutante durch hohe Osmolarität steigern. Da im *ica*-Operon aber nur eine schwache Homologie mit einem σ^B -abhängigen Promotor gefunden werden konnte, erscheint eine direkte Regulation durch diesen Sigmafaktor eher unwahrscheinlich. Als externer, die Biofilmbildung steigernder Faktor dient außer hohen Konzentrationen an Natriumchlorid auch Ethanol im Medium (Knobloch et al., 2001). Diese Stimulation durch Ethanol erfolgt auch in der *rsbU*-Mutante, so dass möglicherweise ein alternativer Weg der σ^B -Stimulation existiert. Darüber hinaus fördern Eisenmangel (Deighton und Borland, 1993) und anaerobe Kulturbedingungen (Cramton et al., 2001) sowie erhöhte Temperaturen (Rachid et al., 2000b) die Biofilmbildung von *S. epidermidis*. Neben dem *sigB*-Operon sind zwei weitere unabhängige Genorte bekannt, deren Inaktivierung durch die Insertion von Tn917 in *S. epidermidis* 1457 zu einer regulativen Transkriptionshemmung des für die PIA-Synthese notwendigen *icaADBC*-Operons und damit zu einem Biofilm-negativen Phänotyp führen (Mack et al., 2000). Außer den Polysacchariden PIA, PS/A und SAA wurde ein 140 kDa Protein AAP (*accumulation associated protein*) für die akkumulative Phase der Biofilmbildung beschrieben (Schumacher-Perdreau et al., 1994; Hussain et al., 1997).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Bakterienstämme

Die klinischen Isolate der Koagulase-negativen Staphylokokken (KNS) wurden im Blutkultur-, Varia- und Urin- Labor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf in den Jahren 1997 und 1998 aus eingesandten klinischen Untersuchungsmaterialien isoliert. Die Stammsammlung umfasst 77 Isolate aus Blutkulturen, 90 Isolate von infizierten Kathetern, 15 Isolate von Wundabstrichen und 14 Isolate aus Urinproben bei dem klinischen Verdacht auf eine Harnwegsinfektion (Horstkotte et al., 2001). Die *Staphylococcus epidermidis* Isolate 1457, 1057, 9225 und RP62A wurden in die Stammsammlung als interne Referenzstämme aufgenommen (Mack et al., 1996b; Christensen et al., 1985). Zur Qualitätskontrolle wurden die *Staphylococcus aureus* Isolate ATCC 29213 und ATCC 25913 (*mecA*-negativ) sowie *S. aureus* ATCC 43300 (*mecA*-positiv) verwendet.

3.2. Zeitliche Abfolge der Untersuchungen

Die phänotypische Charakterisierung der isolierten KNS mittels Agardiffusion, Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration durch die Mikrodilutionsmethode und anhand von der Oxacillin-Agar-Platte sowie die genetische Charakterisierung der Isolate durch die PCR für *mecA* stand am Anfang der Untersuchungen: Die Charakterisierung bezüglich des Penicillin-bindenden Protein 2a schloss sich unmittelbar an.

In einem zweiten Abschnitt wurden die bei -80 °C in Microbank™ Röhren (Pro Lab Diagnostics, Ontario, Kanada) eingefrorenen Stämme für die Untersuchung der automatisierten Verfahren zur antimikrobiellen Resistenztestung VITEK®2 und BD Phoenix™ wieder aufgetaut. Nach der Evaluation des VITEK®2 und vor der Austestung des BD Phoenix™ wurde die PCR für *mecA* für alle Isolate wiederholt.

3.3. Anzucht der Bakterien

Vor jedem durchgeführten Test wurden die KNS-Isolate zweimal über Nacht für 24 Stunden auf Columbia-Blut-Agar (CBA) bei 37 °C ohne CO_2 subkultiviert. Die verwendeten CBA Platten wurden in der Nährbodenküche des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie unter Einsatz eines Tecnomat (Integra Biosciences, Wallisellen, Schweiz) gegossen.

Columbia-Blut-Agar (CBA), pH 7,4

Columbia™-Agar	(Difco, Becton Dickinson, Cockseyville, MD, USA)	42 g/l
Agar-Agar	(Difco)	1,1 g/l
Glucose	(Merck, Darmstadt)	2,2 g/l
steriles defibriniertes Schafsblut		72 ml/l

3.4. Speziesidentifizierung der Koagulase-negativen Staphylokokken

Die Speziesidentifizierung wurde anhand der Koloniemorphologie auf Columbia-Blut-Agar, mittels der Gramfärbung (Nachweis gram-positiver Haufenkokken) und durch den positiven Ausfall der Katalasereaktion, den fehlenden Nachweis von Clumping-Faktor bzw. den fehlenden Nachweis der Plasmakoagulase geführt. Bei allen Isolaten wurde eine biochemische Speziesidentifizierung anhand des kommerziellen Identifizierungssystems ID 32 Staph (bioMérieux, Marcy l' Etoile, Frankreich) entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt. Der erhaltene numerische Code wurde mit der zum ID 32 Staph gehörenden Datenbasis (Version 2.0) ausgewertet.

3.5. Polymerasekettenreaktion für den Nachweis des *mecA* Gen

Die *Polymerase chain reaction* (PCR) ist eine Standardmethode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Dabei dient doppelsträngige DNA als *template*. Zwei zu den Einzelsträngen komplementäre, gegenläufige Oligonukleotide, die sogenannten *primer*, dienen der DNA-Polymerase als Start. Durch abwechselnde Zyklen der DNA-Denaturierung, Anlagerung der Primer und Synthese des komplementären Stranges kommt es zur exponentiellen Vervielfältigung des ursprünglichen Fragments. Zum Nachweis des *mecA* Gens wurde mit der Spitze einer sterilen Pipette ein Teil einer Bakterienkolonie (Anzucht siehe 3.2) in das Reaktionsgefäß eingerieben. Eine vorangehende DNA-Präparation oder ein Zellaufschluss der Bakterien war nicht erforderlich. Die PCR wurde mit Hilfe des DyNAzyme™ DNA Polymerase Kit (Finnzymes Espoo, Finnland) unter Verwendung von Optimized-DyNAzyme™-Puffer durchgeführt. Die 50 µl Reaktionsansätze wurden in Aqua ad injectabile (Braun, Melsungen) mit den folgenden Endkonzentration hergestellt: 0,2 µmol der Primer *mecA*sense und *mecA*antisense, 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂ und 1 U der DNA Polymerase von *Thermus brockianus*. Zum Schutz vor Verdunstung wurden die wässrigen 50µl Aliquots mit je zwei Tropfen Mineralöl (Sigma, St. Louis, Pennsylvania, USA) überschichtet. Die Sequenzen der

gewählten Primer zum Nachweis des *mecA*-Gens in klinischen Isolaten Koagulase-negativer Staphylokokken, aber auch *S. aureus*, basieren auf dem Vergleich des *mecA* Gens in *S. epidermidis* und *S. aureus* (Ryffel et al., 1990):

*mecA*sense Primer: 181-[5']-GAA ATG ACT GAA CGT CCG AT-[3']-200

*mecA*antisense Primer: 330-[5']-GCG ATC AAT GTT ACC GTA GT-[3']-311

Die PCR wurde wie beschrieben (Schmitz et al., 1997; Mack et al., 2001) unter Verwendung eines programmierbaren DNA Thermal Cycler Cetus (Perkin Elmer, Norwalk, USA) durchgeführt. Im initialen Denaturierungsschritt wurden sowohl die Bakterien aufgeschlossen und die freigesetzte DNA für 5 Minuten bei 94 °C denaturiert, in den anschließenden 35 Zyklen nur für 30 Sekunden. Für die Anlagerung der Primer wurde die Temperatur für 30 Sekunden auf 55 °C abgesenkt. Der Zweitstrang wurde bei 72 °C für 45 Sekunden synthetisiert, gefolgt von einem abschließenden Elongationsschritt, um eine vollständige Komplementierung aller Einzelstränge zu gewährleisten, von 7 Minuten Dauer bei einer Temperatur von 72 °C. Anschließend wurden die Proben auf 4 °C heruntergekühlt und bei dieser Temperatur bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Kontrolle der PCR fand in einer anschließenden Agarosegelelektrophorese (siehe 3.5.) statt. Als negativer und positiver Kontrollstamm wurden in jedem Lauf der PCR *S. epidermidis* 1457 (*mecA*-negativ) und *S. epidermidis* RP62A (*mecA*-positiv) mitgeführt (Bild 2).

3.6. Agarosegelelektrophorese

Das Verfahren wurde zum Nachweis von Amplifikaten aus der PCR eingesetzt. Aus NuSieve® Agarose 3:1 (Biowhittaker Molecular Applications, Rockland, USA) wurden 2 % [w/v] Agarose in 150 ml 0,5 x TBE-Puffer aufgeköcht, abgekühlt, mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelträger mit Kamm gegossen. Die Proben wurden mit 3-4 µl DNA-Ladepuffer versetzt und nach Entfernung des Kamms in die Taschen des ausgehärteten Gels eingefüllt. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 60-80 Volt in 0,5x TBE als Laufpuffer durchgeführt. Als Größenmarker wurde ein Gemisch aus *Hind*III gespaltener λ-DNA und *Hae*III gespaltener φX174-DNA (Finnzymes, Espoo, Finnland) aufgetragen. Die resultierenden 149 bp Amplifikate wurden mittels UV-Licht (Wellenlänge 312 nm) auf einem Transilluminator mit einem angeschlossenen Bilddokumentationssystem (PHASE, Lübeck) fotografiert (Bild 2).

5x TBE

TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan	54 g/l	(Merck, Darmstadt)
Borsäure	27,5 g/l	(Merck, Darmstadt)
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	20 ml/l	(Roth, Karlsruhe)

Für den 0,5x TBE-Puffer erfolgte die Verdünnung der Stammlösung mit VE-Wasser 1:10.

DNA-Ladepuffer

Bromphenolblau	0,25 %	(Merck, Darmstadt)
Xylen Cyanol FF	0,25 %	(Merck, Darmstadt)
Ficoll 400	15 %	(Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Ethidiumbromid-Stammlösung

Ethidiumbromid	10 mg/ml	(Serva, Heidelberg)
----------------	----------	---------------------

3.7. Nachweis des Penicillin-bindenden Protein 2a durch Latexagglutination

Grundsätzlich ist die Steigerung der Expression der PBP2a Synthese durch Oxacillin oder Methicillin möglich. Eine solche Induktion wurde nicht durchgeführt. Der kommerziell erhältliche Latexagglutinationstest zum Nachweis von PBP2a (MRSA-Screen, Denka Seika, Niigata, Japan) wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt, jedoch mit dem Unterschied, daß ein höheres Inokulum eingesetzt wurde. Das PBP2a wird hierbei aus dem entsprechenden KNS-Isolat extrahiert, indem eine mit Bakterienkolonien (Anzucht siehe 3.2) gut gefüllte Einmalöse in 4 Tropfen des Extraktionpuffers 1 resuspendiert wurde. Die so erhaltene Suspension entsprach mindestens der Trübung eines McFarland 6 Standards. Die Bakteriensuspension wurde in einem Wasserbad bei 100 °C für exakt 3 Minuten aufgeköcht. Nach Abkühlen (5 bis 10 Minuten) auf Raumtemperatur wurde 1 Tropfen des Extraktionsreagenz 2 zur Bakteriensuspension hinzugefügt. Auf einem Vortex (Heidolph, Schwabach) wurde die Suspension vermischt und dann bei 1500 x g für 5 Minuten in einer Biofuge *pico* (Heraeus, Hanau) zentrifugiert. Für die eigentliche Latexagglutinationsreaktion wurde ein 50 µl Aliquot des erhaltenen Überstandes mit 1 Tropfen, der mit monoklonalen Antikörpern gegen PBP2a beschichteten Latexpartikel auf im Test enthaltenen Agglutinationskarten vermischt. Für die Negativkontrolle wurden ebenfalls 50 µl des Überstandes mit 1 Tropfen des mitgelieferten Negativkontrollreagenz vermischt. Die Agglutinationskarten wurden für drei Minuten

sacht geschwenkt, wobei eine auftretende, mit dem bloßen Auge sichtbare Agglutinationsreaktion als positiver Test gewertet wurde (Bild 3). Bei KNS-Isolaten, bei denen es zu einer verzögert auftretenden Agglutinationsreaktion nach dem Limit von 3 Minuten oder nur zu sehr dezent zu beobachteten Agglutinationsreaktionen kam, wurde der Latexagglutinationstest als schwach positiv bewertet und der Test nach dem gleichen Ablauf und ebenfalls ohne Induktion einer PBP2a-Synthese wiederholt (Horstkotte et al., 2001).

3.8. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration für Oxacillin

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) für Oxacillin wurde mit der Mikrodilutionsmethode in Mikrotiterplatten (Greiner, Kremsmünster, Österreich) bestimmt. Ausgewählte Kolonien (Anzucht siehe 3.2.) wurden direkt in 0,9 % NaCl suspendiert. Die Suspension wurde auf eine Trübung entsprechend einem 0,5 McFarland Standard (Abweichung bis maximal 0,6 McFarland) mit einem Densitometer (Densimat, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) eingestellt. Die Ausgangssuspension wurde entsprechend in Mueller-Hinton-Bouillon (Difco, Becton Dickinson Sparks, Maryland, USA) supplementiert mit 2 % NaCl (Merck, Darmstadt) weiter verdünnt, so dass letztlich eine Endkonzentration für das Inokulum von 5×10^5 CFU/ml für die Testung entsprechend den Empfehlungen der NCCLS und DIN (National Committee, 2002; DIN, 2000) sowie 5×10^4 CFU/ml für die Testung in Anlehnung an die Empfehlungen von Wiedemann (Wiedemann, 1992) resultierte (Tabelle 3). Für Oxacillin wurde eine geometrische abfallende Reihenverdünnung von 1024 $\mu\text{g/ml}$ bis 0,125 $\mu\text{g/ml}$ hergestellt (Wiedemann, 1992). Die Mikrotiterplatten wurden im Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 35 °C (National Committee, 2002; DIN, 2000) bzw. 30 °C (Wiedemann, 1992) inkubiert und nach 24 Stunden (National Committee, 2002) abgelesen (Tabelle 3).

3.9. Screeningplatten mit abgestuften Oxacillin- und NaCl-Konzentrationen

Die Testung erfolgte auf Mueller-Hinton-Agar mit standardisiertem Kationengehalt (Difco, Becton Dickinson, Sparks, Maryland, U.S.A.), der mit 0, 1, 2, 4 % NaCl (Merck, Darmstadt) sowie 1, 2, 4, 6 $\mu\text{g/ml}$ Oxacillin (Sigma, St. Louis, Montana, USA) supplementiert wurde. Dieses Vorgehen erlaubte die Testung von 16 graduell abgestuften Medien. Die Schichtdicke der Agarplatten betrug 4 mm. Eine Suspension des zu testenden KNS-Isolates wurde in 0,9 % NaCl entsprechend der Trübung eines 0,5 McFarland

Standards (Einstellung siehe 3.8.) hergestellt. Zwei verschiedene Methoden zum Aufbringen der Suspension wurden gewählt (Swenson et al., 1999):

1. Für alle 16 verschiedenen Medien wurde ein „Spot“ von ca. 2 cm Durchmesser mit einem in der Suspension getränkten Baumwolltupfern beimpft. Nach kurzem Antrocknen wurden die Platten ausschließlich bei 35°C für insgesamt 48 Stunden inkubiert.
2. Mit einem in der Suspension getränkten Baumwolltupfern wurde die Fläche einer halben Platte Mueller-Hinton-Agar supplementiert mit 4 % NaCl und 6 µg/ml Oxacillin bestrichen (Swenson et al., 1999): Nach kurzem Antrocknen wurden die Platten bei 30°C und 35°C für insgesamt 48 Stunden inkubiert.

Die Agarplatten wurden jeweils nach genau 18 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden abgelesen. Wenn sich Wachstum von mindestens 1 Kolonie auf den Agarplatten detektieren ließ, wurde der entsprechende Stamm als resistent bewertet.

3.10. Agardiffusionstest

Die Methodik der antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung mit dem Agardiffusionstest ist ein sekundäres Verfahren im Gegensatz zu den primären, direkten Verfahren der MHK-Bestimmung mit der Mikrodilution oder mittels der Agardilution. Beim Agardiffusionstest werden kommerziell erhältliche Filterpapierplättchen, die mit einem Antibiotikum imprägniert sind und dessen Gehalt im Testplättchen definiert ist, auf zuvor beimpfte Agarplatten aufgebracht. Das Antibiotikum diffundiert in den Agar, wobei ein kontinuierlicher Gradient des Antibiotikums im Agar rund um das Filterpapierplättchen entsteht. In einem Bereich, wo die Konzentration des Antibiotikums inhibierend wirkt, kommt es zu keinem sichtbaren bakteriellen Wachstum, so dass in Abhängigkeit von der Empfindlichkeit des untersuchten KNS-Isolates Hemmhöfe entstehen, deren Durchmesser in quantitativer Beziehung zur minimalen Hemmkonzentration für das Antibiotikum stehen. Zur Anwendung kamen mit folgenden Antibiotika beschickte Filterpapierplättchen: Oxacillin [1 µg und 5 µg], Ampicillin + Sulbactam [20 µg+10 µg], Cefotiam [30 µg] und Cefoxitin [30 µg] (Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA) sowie Filterpapierplättchen die Flucloxacillin [5 µg] enthielten (Smith Cline Beecham, Pittsburgh, Pennsylvania, USA). Die Testung erfolgte auf selbst gefertigten Agarplatten aus Mueller-Hinton-Agar (Difco, Becton Dickinson Sparks, Maryland, USA). Die Agarplatten wurden ohne NaCl Zusatz gegossen oder waren mit einer Konzentration von 2 oder 4 % NaCl (Merck,

Darmstadt) supplementiert. Die Schichtdicke der Agarplatten betrug 4 mm. Suspensionen der entsprechenden KNS-Isolate entsprechend einer Trübung eines 0,5 McFarland Standards wurden in 5 ml 0,9 % NaCl-Lösung hergestellt (Einstellung siehe 3.8.) und mit Hilfe von sterilen Baumwolltupfern gleichmäßig über die ganze Fläche der Agarplatten ausgestrichen (Tabelle 2). Die Agarplatten wurden für 48 Stunden sowohl bei 30 °C als auch bei 35 °C bebrütet. Sämtliche Hemmhofdurchmesser wurden nach genau 24 Stunden sowie erneut nach 48 Stunden ausgemessen.

3.11. VITEK[®]2

Bei dem VITEK[®]2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) handelt es sich um ein vollautomatisiertes Testsystem für die antimikrobielle Resistenztestung und Identifizierung schnell wachsender Mikroorganismen. Die hier getestete aktuelle Geräteversion stellt eine Weiterentwicklung des VITEK[®] dar, bei dem das Vorliegen einer Methicillinresistenz ausschließlich mittels einer MHK-Bestimmung für Oxacillin getestet wird. Beim VITEK[®]2 wird das Vorliegen einer Methicillinresistenz sowohl mit Hilfe des Oxacillin Resistenz (OR) Testes (Kategorien: sensibel [S] oder resistent [R]) als auch einer Bestimmung der MHK für Oxacillin untersucht. Beide Teste sind auf AST-P515 und AST-P523 Testkarten für die Bestimmung der antimikrobiellen Resistenz enthalten. In Hinblick auf die abgedeckten Oxacillin MHK Bereiche unterscheidet sich die neuere AST-P523 Karte ($\leq 0,25$ bis ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$) von der älteren AST-P515 Karte ($\leq 0,5$ bis ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$), nicht jedoch bezüglich der Zusammensetzung des verwendeten Testmediums oder bezüglich des OR Testes. Alle KNS-Isolate wurden mit der AST-P515 Karte untersucht. Um eine Einordnung der Isolate mit einer Oxacillin MHK von $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ (Testung mit AST-P515 Karten) hinsichtlich des Oxacillin MHK-Grenzwertes der NCCLS von $= 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ = resistent zu erlauben, wurden diese KNS-Isolate mit der neueren AST-P523 Karte nachgetestet. Alle KNS-Isolate mit Diskrepanzen zwischen dem Ergebnis der PCR für *mecA* und einem oder beiden VITEK[®]2 Testen wurden ebenfalls erneut getestet. Wenn initial eine Oxacillin MHK von $\leq 0,5$ oder 1 $\mu\text{g/ml}$ vorlag, wurden AST-P523 Karten, ansonsten für KNS-Isolate mit einer anfänglichen Oxacillin MHK von ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ AST-P515 Karten verwendet.

In 0,45 % NaCl-Lösung (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) wurde eine Suspension von dem jeweiligen KNS-Isolat (Anzucht siehe 3.2.) hergestellt, die einer Trübung eines 0,5 McFarland Standards entsprach (Einstellung siehe 3.8.). Die Befüllung, Verschließung

und weitere Prozessierung der Testkarten erfolgte vollautomatisch nach Einbringen des die Testkarten tragenden Carriers in die Ladestation des VITEK[®]2. Die Mikroküvetten der Testkarten wurden alle 15 Minuten durch die Leseinheit des VITEK[®]2 Systems gemessen. Die Ergebnisse des OR Testes und der Oxacillin MHK-Bestimmung wurden nach jedem Messdurchgang für bis zu 10 Stunden protokolliert, um eine zeitliche Auswertung, wann die Messergebnisse verfügbar sind, zu ermöglichen (Horstkotte et al., 2002).

3.12. BD Phoenix[™]

Das BD Phoenix[™] (Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA) ist ein neu entwickeltes, voll automatisiertes System zur Identifizierung und antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung. Das Vorliegen einer Methicillinresistenz wird mit Hilfe einer Oxacillin MHK-Bestimmung (Messbereich $\leq 0,25$ bis > 4 $\mu\text{g/ml}$), die auf den PMIC/ID6 Testkarten für gram-positive Bakterien enthalten ist, untersucht. Die PMIC/ID6 Testkarten erlauben eine gleichzeitige antimikrobielle Resistenzprüfung und die parallele Speziesidentifizierung der Bakterien aus demselben Inokulum. Die Bearbeitung der Proben wurde wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt. Manuell wurde eine Bakteriensuspension in der Lösung zur Identifizierung (ID-Lösung, Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA) von dem jeweiligen KNS-Isolat (Anzucht siehe 3.2) entsprechend der Trübung eines 0,5 McFarland Standards hergestellt (Einstellung siehe 3.8.). Ein Aliquot von 25 μl von dieser Suspension wurde anschließend in die Testboillon für die antimikrobielle Resistenzbestimmung (AST-Bouillon, Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA) pipettiert und jeweils genau ein Tropfen einer Resazurinlösung (Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA) als Redoxindikator hinzugefügt. Die beimpften Testlösungen wurden in die Öffnungen der sich anschließend selbst füllenden Testkarten gegeben, verschlossen und in das BD Phoenix[™] eingesetzt. Die weitere Prozessierung erfolgte automatisch. KNS-Isolate mit einer Oxacillin MHK von 0,5 bis 2 $\mu\text{g/ml}$ oder abweichenden Oxacillin MHK Ergebnissen im Vergleich zum Ergebnis der PCR für *mecA* wurden nachgetestet. Die Ergebnisse der Oxacillin MHK-Bestimmung wurden nach jeder Stunde für insgesamt neun Stunden für alle KNS-Isolate untersucht.

4. ERGEBNISSE

4.1 Speziesverteilung der untersuchten Koagulase-negativen Staphylokokken

Die Stammsammlung umfasste 13 verschiedene Spezies Koagulase-negativer Staphylokokken (KNS); im einzelnen 142 *S. epidermidis*, 15 *S. haemolyticus*, 10 *S. hominis*, 9 *S. saprophyticus*, 6 *S. capitis*, je 4 *S. lugdunensis*, 4 *S. warneri*, 4 *S. xylosum*, je 2 *S. schleiferi*, 2 *S. cohnii*, und je 1 *S. chromogenes*, 1 *S. simulans* und 1 *S. kloosii* Isolat.

4.2. Polymerasekettenreaktion für den Nachweis des *mecA* Gens

Das *mecA* Gen wurde mittels PCR bei 126 der 201 KNS-Isolate gefunden. Die *mecA*-positiven KNS-Isolate schlüsselten sich in 102 von 142 *mecA*-positiven *S. epidermidis* Isolate und 24 von 59 *mecA*-positiven Nicht-*S. epidermidis* Isolate auf. Die Gruppe der *mecA*-positiven Nicht-*S. epidermidis* Isolate umfassten 13 *S. haemolyticus*, 7 *S. hominis*, 2 *S. xylosum*, 1 *S. warneri* und 1 *S. saprophyticus* Isolate.

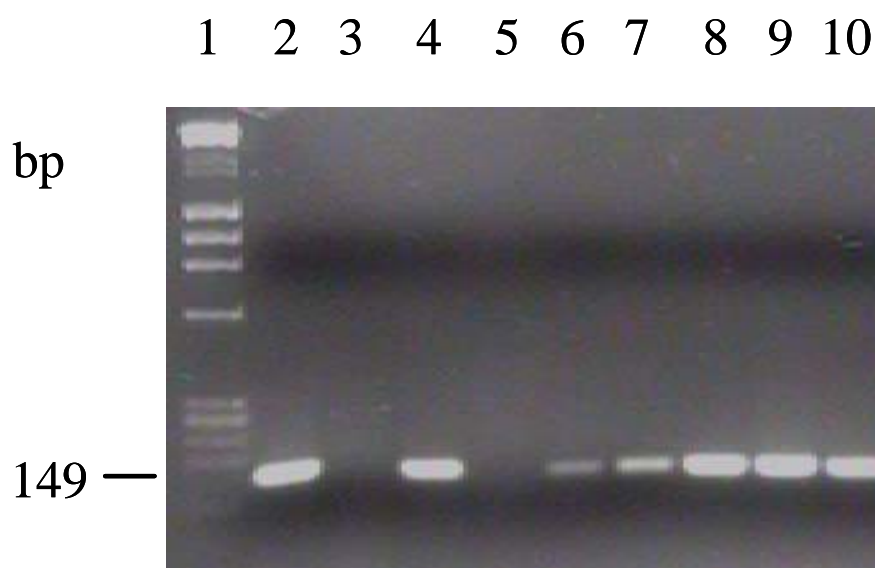


Bild 2: PCR für *mecA*

Analyse der PCR-Produkte im 2 % (w/v) Agarosegel (NuSieve 3:1, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) mit 0,5x TBE-Laufpuffer. Bei *mecA*-positiven Isolaten wird eine 149 bp große Bande detektiert. Von links nach rechts: Als Größenmarker wurde ein Gemisch aus *Hind*III gespaltener λ -DNA und *Hae*III gespaltener Φ X174 DNA (Finnzymes) aufgetragen (Spur 1). In den folgenden Spuren sind die Positivkontrolle *S. epidermidis* RP62A (Spur 2), die Negativkontrolle *S. epidermidis* 1457 (Spur 3), sowie klinische Isolate (Spur 4 bis 10) aufgetragen.

4.3. Nachweis des Penicillin-bindenden Proteins 2a durch Latexagglutination

Das Penicillin-bindende Protein 2a (PBP2a) wurde ohne vorherige Induktion der PBP2a Synthese durch β -Laktam-Antibiotika detektiert. 119 von 126 *mecA*-positiven KNS-Isolaten wiesen ein positives Ergebnis im Latexagglutinationstest (LA) auf (Bild 3).

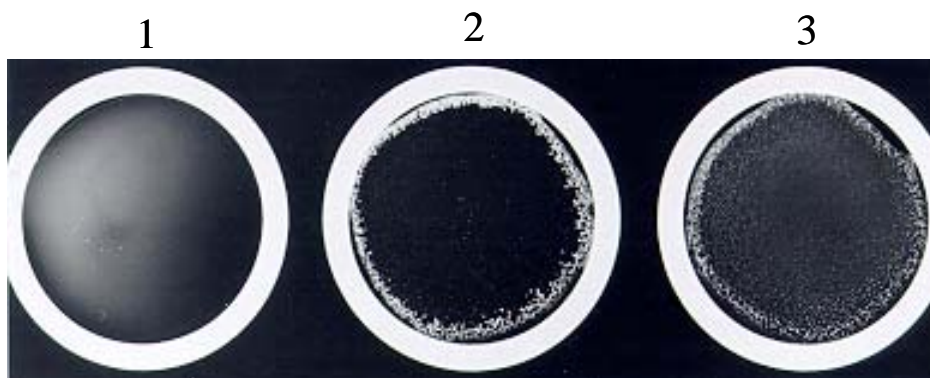


Bild 3: Latexagglutinationstest für das Penicillin-bindende Proteins 2a

Latexpartikel, die mit monoklonalen Antikörpern gegen das Penicillin-bindende Protein 2a (PBP2a) beschichtet sind, reagieren mit direkt aus Bakterien extrahiertem PBP2a. Bei *mecA*-positiven Isolaten, die PBP2a exprimieren, kommt zu einer Agglutinationsreaktion. Bei Fehlen von PBP2a bleibt die Suspension milchig. Von rechts nach links: 1. negative Agglutinationsreaktion bei dem *mecA*-negativen *S. epidermidis* 1457 (Negativkontrolle), 2. positive Agglutinationsreaktion für PBP2a bei einem klinischen, *mecA*-positiven *S. epidermidis* Isolat, 3. positive Agglutinationsreaktion für PBP2a bei dem *mecA*-positiven *S. epidermidis* RP62A (Positivkontrolle).

Bei der initialen Testung gab es 2 *mecA*-positive *S. epidermidis* Isolate, die im LA negativ waren und weitere 5 KNS-Isolate, die ein schwach positives LA Ergebnis aufwiesen (Tabelle 5 und 6). In der ersten Testung wiesen 67 von 75 *mecA*-negativen KNS-Isolaten ein negatives LA Ergebnis auf, jedoch fand sich bei 8 Nicht-*S. epidermidis* Isolaten ein positiver (n=1) oder schwach positiver (n=7) Latexagglutinationstest (Tabelle 5 und 6). Unter Bewertung auch der schwach positiven Testergebnisse als einen Nachweis für das Vorliegen von PBP2a ergab sich für die folgenden Kategorien: 1. alle KNS-Isolate, 2. *S. epidermidis* Isolate oder 3. Nicht-*S. epidermidis* Isolate eine Sensitivität von 98,4 %, 98 % und 100 % sowie eine Spezifität von 89,3 %, 100 % und 77,1 %. Der Latexagglutinationstest wurde bei allen KNS-Isolaten mit schwach-positivem Testergebnis oder bei Diskrepanzen zum *mecA* PCR Ergebnis wiederholt. In der Nachtestung wiesen alle 7 *mecA*-positiven Isolate ein positives LA Resultat auf und 6 von 8 *mecA*-negativen

Isolaten zeigten ein negatives LA Resultat. Hingegen fand sich bei 2 *mecA*-negativen *S. warneri* Isolaten weiterhin ein deutlich positiver oder ein schwach positiver LA Test (Tabelle 5 und 6). Bei den nachzutestenden *mecA*-positiven Isolaten handelte es sich ausschließlich um *S. epidermidis* Isolate, deren Oxacillin MHK zwischen 2 µg/ml bis zu 512 µg/ml variierte (Tabelle 6). Unter den nachzutestenden *mecA*-negativen Isolaten fanden sich interessanterweise nur Nicht-*S. epidermidis* Spezies, deren Oxacillin MHK im Bereich zwischen 0,5 µg/ml bis 2 µg/ml lag (Tabelle 6). Mit der Strategie, KNS-Isolate mit einem schwach-positiven LA Ergebnis nachzutesten und das zweite Resultat zu bewerten, zeigte sich eine Sensitivität von 98,4 %, bzw. 98 % und 100 % sowie eine Spezifität von 97,3 %, bzw. 100 % und 94,3 % bei den Kategorien: 1. alle KNS-Isolate , 2. *S. epidermidis* Isolate und 3. Nicht-*S. epidermidis* Isolate (Horstkotte et al., 2001).

Tabelle 5: Latexagglutinationstest (LA) für PBP2a im Vergleich zur *mecA* PCR

	LA positiv	LA schwach positiv	LA negativ
Alle KNS			
<i>mecA</i> -positiv	119 (124)*	5 (0)	2 (2)
<i>mecA</i> -negativ	1 (1)	7 (1)	67 (73)
<i>S. epidermidis</i>			
<i>mecA</i> -positiv	95 (100)	5 (0)	2 (2)
<i>mecA</i> -negativ	0 (0)	0 (0)	40 (40)
Andere KNS			
<i>mecA</i> -positiv	24 (24)	0 (0)	0 (0)
<i>mecA</i> -negativ	1 (1)	7 (1)	27 (33)

*: Anzahl der KNS-Isolate (nach Wiederholung von Isolaten mit schwach positivem LA)

Tabelle 6: Diskrepante Ergebnisse zwischen der *mecA* PCR und dem Latexagglutinationstest (LA) für das Penicillin-bindende Protein 2a (PBP2a)

Isolat	Identifizierung	<i>mecA</i> PCR	LA für PBP 2a	
			Initial	Retest
66	<i>S. epidermidis</i>	positiv	schwach positiv	positiv
73	<i>S. epidermidis</i>	positiv	negativ	positiv
76	<i>S. epidermidis</i>	positiv	schwach positiv	positiv
85	<i>S. epidermidis</i>	positiv	schwach positiv	positiv
101	<i>S. epidermidis</i>	positiv	schwach positiv	positiv
105	<i>S. epidermidis</i>	positiv	schwach positiv	positiv
193	<i>S. epidermidis</i>	positiv	negativ	positiv
4	<i>S. saprophyticus</i>	negativ	schwach positiv	negativ
45	<i>S. warneri</i>	negativ	schwach positiv	positiv*
65	<i>S. capitis</i>	negativ	schwach positiv	negativ
67	<i>S. xylosus</i>	negativ	schwach positiv	negativ
68	<i>S. warneri</i>	negativ	schwach positiv	schwach positiv
91	<i>S. haemolyticus</i>	negativ	schwach positiv	negativ
93	<i>S. capitis</i>	negativ	schwach positiv	negativ
180	<i>S. chromogenes</i>	negativ	positiv	negativ

*fett hervorgehoben sind die auch in der Nachtestung positiven Agglutinationsergebnisse für PBP2a bei zwei *mecA*-negativen *S. warneri* Isolaten. Die Ergebnisse wurden als falsch-positiv bewertet.

4.4. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) für Oxacillin

4.4.1. Inokulum von 5×10^4 KBE/ml

Eine Oxacillin MHK von $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ fand sich bei 119 der 126 *mecA*-positiven KNS-Isolate. Ein *mecA*-positiver *S. saprophyticus* hatte eine Oxacillin MHK von $1 \mu\text{g/ml}$, während 6 *mecA*-positive *S. epidermidis* Isolate eine Oxacillin MHK von $2 \mu\text{g/ml}$ aufwiesen (Tabelle 7).

Bei 26 von 75 *mecA*-negativen KNS-Isolaten, von denen 20 *mecA*-negative *S. epidermidis* und 6 *mecA*-negative Isolate anderer KNS-Spezies waren, fand sich eine Oxacillin MHK von $\leq 0,25 \mu\text{g/ml}$. Die Oxacillin MHK lag bei 49 KNS-Isolaten (20 *S. epidermidis* und 29 Isolate anderer KNS) in einem Bereich zwischen $0,5$ und $2 \mu\text{g/ml}$ (Tabelle 7).

Unter Zugrundelegen des geltenden Grenzwertes der DIN für resistent von $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ (Tabelle 42) (DIN, 2000) würde nur der genannte *mecA*-positive *S. saprophyticus* mit einer Oxacillin MHK von $1 \mu\text{g/ml}$ fälschlicherweise als empfindlich gegenüber Oxacillin bewertet werden. Falsch-positive Ergebnisse resultierten hingegen aus diesem Grenzwert bei 5 der 75 *mecA*-negativen KNS-Isolate. Hierbei handelte es sich um je 1 *mecA*-negativen *S. saprophyticus*, *S. cohnii* und *S. kloosii* sowie 2 *mecA*-negative *S. epidermidis* mit einer Oxacillin MHK von $2 \mu\text{g/ml}$ (Tabelle 7).

Alternative Grenzwerte von $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ oder $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$ (National Committee, 2002) ergaben eine geringe Verbesserung der Sensitivität auf 100 % gegenüber 99,2 %, wobei für die klinisch wichtigste Spezies *S. epidermidis* kein Unterschied erkennbar war. Nachteilig wirkten sich die veränderten Interpretationskriterien auf die Spezifität aus, die mit 80 % bzw. 34,7 % erheblich abnahm (Tabelle 7).

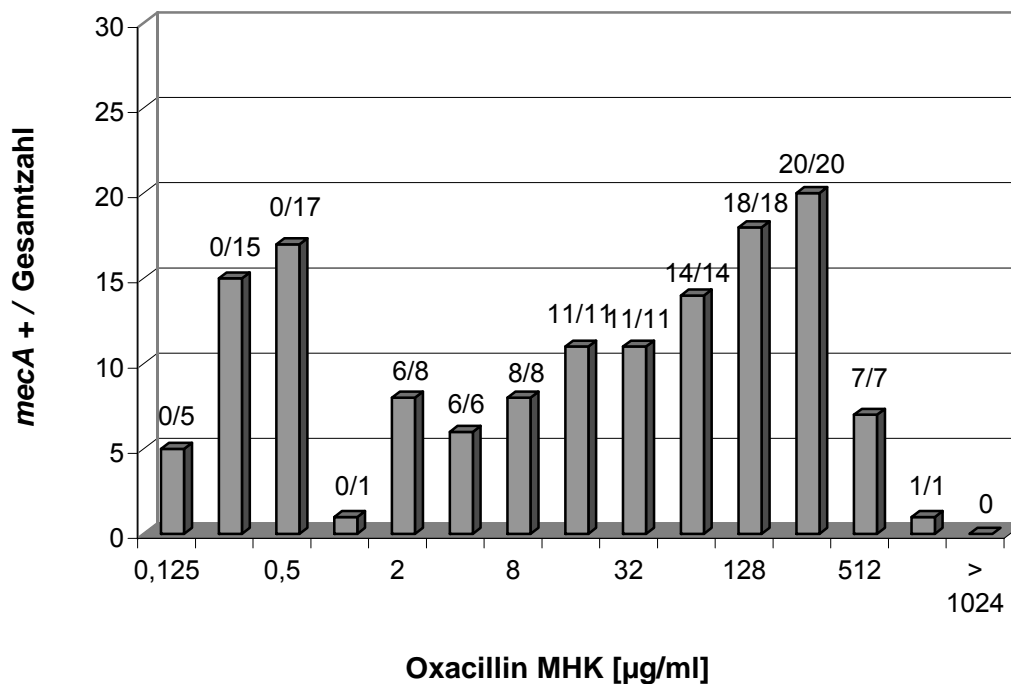
Ein Oxacillin MHK-Grenzwert von $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ (Tabelle 42) steigerte hingegen die Spezifität auf 100 %, senkte aber aufgrund von falsch-negativen Ergebnissen bei 6 *mecA*-positiven *S. epidermidis* Isolaten mit einer Oxacillin MHK von $2 \mu\text{g/ml}$ die Sensitivität um fast 6 % auf 94,1 % (Tabelle 7).

Tabelle 7: Ergebnisse der Mikrodilution mit einem Inokulum von 5×10^4 KBE/ml im Vergleich zur *mecA* PCR - Analyse von verschiedenen Oxacillin MHK-Grenzwerten

Grenzwert für Resistenz	Falsch-positive Resultate	Falsch-negative Resultate	Sensitivität	Spezifität
$\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$ (derzeit gültiger NCCLS Grenzwert)				
Alle KNS	49	0	100	34,7
<i>S. epidermidis</i>	20	0	100	50
Andere KNS	29	0	100	17,1
$\geq 1 \mu\text{g/ml}$				
Alle KNS	15	0	100	80
<i>S. epidermidis</i>	3	0	100	92,5
Andere KNS	12	0	100	65,7
$\geq 2 \mu\text{g/ml}$ (Grenzwert der DIN)				
Alle KNS	5	1	99,2	93,3
<i>S. epidermidis</i>	2	0	100	95
Andere KNS	3	1	95,8	91,4
$\geq 4 \mu\text{g/ml}$ (alter NCCLS Grenzwert)				
Alle KNS	0	7	94,4	100
<i>S. epidermidis</i>	0	6	94,1	100
Andere KNS	0	1	95,8	100

*¹ Sensitivität und Spezifität in %

Verteilung der Oxacillin MHK bei *S. epidermidis* Isolaten



Verteilung der Oxacillin MHK bei Nicht-*S. epidermidis* Isolaten

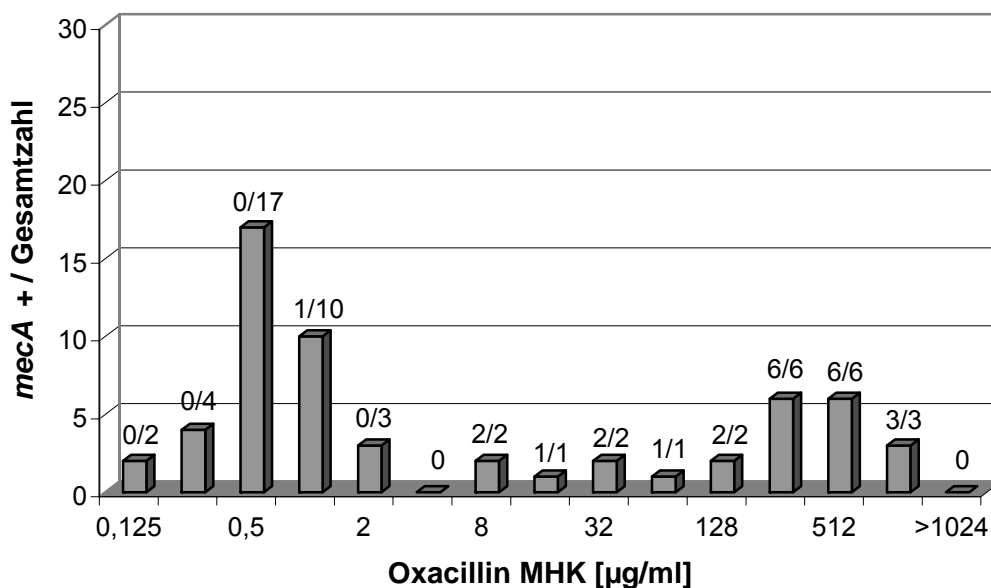


Bild 4 und 5: Verteilung der MHK-Werte für Oxacillin, ermittelt durch Mikrodilution mit einem Inokulum von 5×10^4 KBE/ml, für *S. epidermidis* Isolate (Bild 4) und für Nicht-*S. epidermidis* Isolate (Bild 5). Angegeben ist jeweils über der Gesamtzahl der Isolate mit dem entsprechenden MHK-Wert die Zahl der *mecA*-positiven Isolate dieser Gruppe.

4.4.2. Inokulum von 5×10^5 KBE/ml

Eine Oxacillin MHK von $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ ergab sich mit dem höheren Inokulum bei 125 der 126 *mecA*-positiven KNS-Isolate, lediglich ein *mecA*-positives *S. epidermidis* Isolate wies eine Oxacillin MHK von $2 \mu\text{g/ml}$ auf. Nur bei 9 der 75 *mecA*-negativen KNS-Isolate fand sich eine Oxacillin MHK von $\leq 0,25 \mu\text{g/ml}$, jedoch lag die Oxacillin MHK bei 66 KNS-Isolaten in einem Bereich zwischen $0,5$ und $2 \mu\text{g/ml}$ (Tabelle 8).

Alle *mecA*-positiven KNS-Isolate würden auf dem Boden des aktuell geltenden Grenzwertes der NCCLS (Tabelle 42) National Committee, 2002) als resistent bewertet. Andererseits müssten 66 der 75 *mecA*-negativen KNS-Isolate, die eine Oxacillin MHK von $0,5$ bis $2 \mu\text{g/ml}$ aufwiesen, fälschlich als resistent gegenüber Oxacillin bewertet werden (Tabelle 8). Hieraus ergibt sich eine ausgezeichnete Sensitivität von 100 %, aber eine katastrophale Spezifität von insgesamt 12 % (Tabelle 8) für den derzeitigen Oxacillin MHK-Grenzwert der NCCLS von $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$ (Tabelle 42). Ein geringfügig günstigeres Bild ergab sich für *S. epidermidis* Isolate mit einer Spezifität von 20 %, während die Spezifität bei Nicht-*S. epidermidis* Isolaten nur bei knapp 3 % lag (Tabelle 8).

Der vor 1999 geltende Oxacillin MHK-Grenzwert der NCCLS von $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ (Tabelle 42) hätte hingegen im untersuchten Kollektiv sowohl eine ausgezeichnete Sensitivität von 99,2 % als auch eine ausgezeichnete Spezifität von 99,3 % ergeben (Tabelle 8). Lediglich ein falsch-negatives Ergebnis fand sich bei einem *mecA*-positiven *S. epidermidis* mit einer Oxacillin MHK von $2 \mu\text{g/ml}$. Ein falsch-positives Ergebnis war bei dem *mecA*-negativen *S. kloosii* Isolat zu verzeichnen (Tabelle 8).

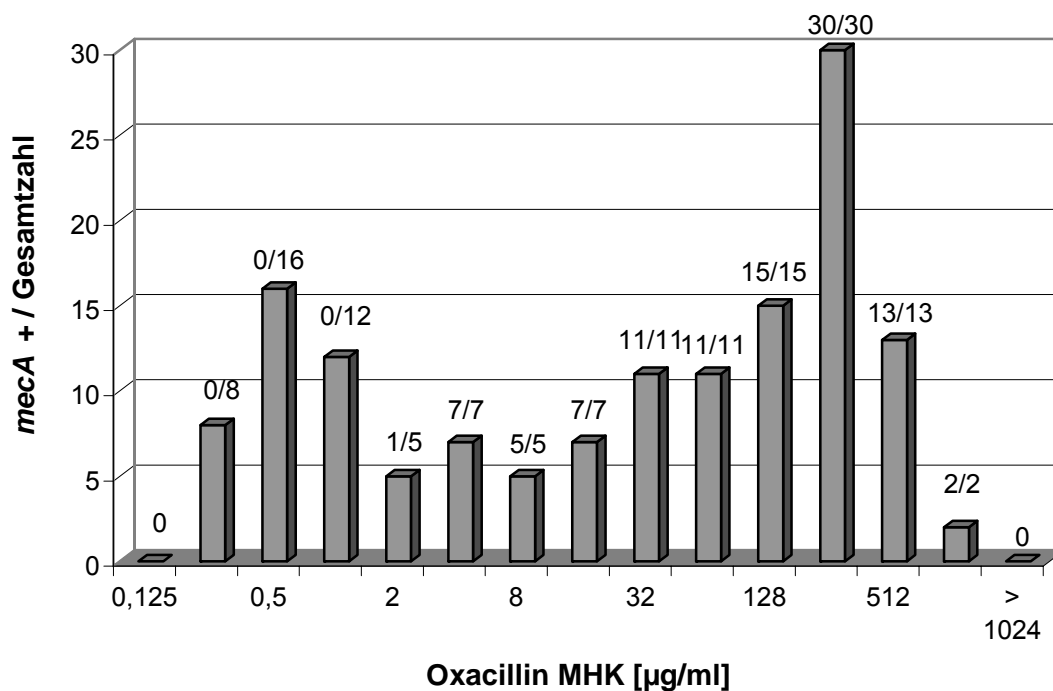
Die entsprechenden Befunde für alternative Oxacillin MHK-Grenzwerte von $1 \mu\text{g/ml}$ oder $2 \mu\text{g/ml}$ (DIN, 2000) sind tabellarisch dargestellt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Ergebnisse der Mikrodilution mit einem Inokulum von 5×10^5 KBE/ml im Vergleich zur *mecA* PCR - Analyse von verschiedenen Oxacillin MHK-Grenzwerten

Grenzwert für Resistenz	Falsch-positive Resultate	Falsch-negative Resultate	Sensitivität	Spezifität
$\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$ (derzeit gültiger NCCLS Grenzwert)				
Alle KNS	66	0	100	12
<i>S. epidermidis</i>	32	0	100	20
Andere KNS	34	0	100	2,9
$\geq 1 \mu\text{g/ml}$				
Alle KNS	39	0	100	48
<i>S. epidermidis</i>	16	0	100	60
Andere KNS	23	0	100	34,3
$\geq 2 \mu\text{g/ml}$ (Grenzwert der DIN)				
Alle KNS	14	0	100	81,3
<i>S. epidermidis</i>	4	0	100	90
Andere KNS	10	0	100	71,4
$\geq 4 \mu\text{g/ml}$ (alter NCCLS Grenzwert)				
Alle KNS	1	1	99,2	99,3
<i>S. epidermidis</i>	0	1	99	100
Andere KNS	1	0	100	97,1

*¹ Sensitivität und Spezifität in %

Verteilung der Oxacillin MHK bei *S.epidermidis* Isolaten



Verteilung der Oxacillin MHK bei Nicht-*S. epidermidis* Isolaten

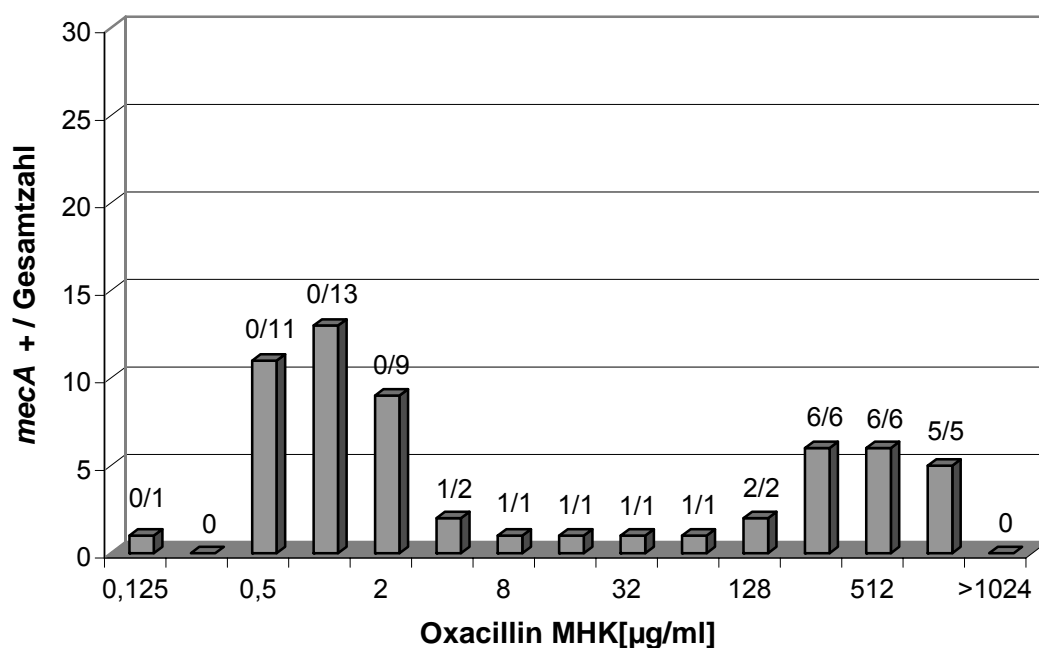


Bild 6 und 7: Verteilung der MHK-Werte für Oxacillin, ermittelt mittels Mikrodilution mit einem Inokulum von 5×10^5 KBE/ml, für *S. epidermidis* Isolate (Bild 6) und für Nicht-*S. epidermidis* Isolate (Bild 7). Angegeben ist jeweils über der Gesamtzahl der Isolate mit dem entsprechenden MHK-Wert die Zahl der *mecA*-positiven Isolate dieser Gruppe.

4.5. Screeningplatten mit abgestuften Oxacillin- und NaCl-Konzentrationen

Für die Beimpfung der Screeningplatten mit verschiedenen NaCl- und Oxacillinkonzentrationen durch „Spot“ Inokulation ergaben sich folgende Ergebnisse. Bei *S. epidermidis* Isolaten, aber auch bei anderen KNS-Spezies, führte eine stufenweise Erhöhung der Oxacillinkonzentration von 1 µg/ml auf 6 µg/ml zu einer schrittweise verschlechterten Erkennung *mecA*-positiver KNS-Isolate als resistent. Dieser Effekt galt für alle untersuchten Medien, wurde aber durch steigende Konzentrationen von NaCl im Medium aufgefangen. Die beobachtete Abnahme der Sensitivität war bei Nicht-*S. epidermidis*-Isolaten geringer ausgeprägt als bei *S. epidermidis*-Isolaten und wurde bei ersteren durch eine Verlängerung der Inkubation für bis zu 48 Stunden ausgeglichen.

Für *S. epidermidis* ist auf Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl eine maximale Differenz von 62, 52 und 23 nicht mehr als resistent detektierten Isolaten nach 18, 24 bzw. 48 Stunden zu verzeichnen, während diese Differenzen auf Mueller-Hinton-Agar mit Zusatz von 2 % NaCl nur 42, 31 bzw. 10 Isolate und 41, 29 und 1 Isolate auf Mueller-Hinton-Agar mit Zusatz von 4 % NaCl beträgt. Für Nicht-*S. epidermidis*-Isolate ist dagegen auf Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl eine maximale Differenz von lediglich 5, 3 und 1 nicht mehr als resistent detektierten Isolaten nach 18, 24 bzw. 48 Stunden zu verzeichnen, während diese Differenzen auf Mueller-Hinton-Agar mit Zusatz von 2 % NaCl nur 2, 1 bzw. 0 Isolate und 3, 2 und 0 Isolate auf Mueller-Hinton-Agar mit Zusatz von 4 % NaCl beträgt (Tabelle 9, 10 und 11).

Sowohl bei *S. epidermidis* als auch bei anderen KNS-Spezies kommt es zu einer Zunahme der Spezifität durch die Erhöhung der Oxacillinkonzentration von 1 µg/ml auf 6 µg/ml. Im Gegensatz zur Sensitivität spielte es für die erzielte Spezifität keine Rolle, ob nach 18 oder nach 24 Stunden abgelesen wurde. Hingegen kam es nach 48-stündiger Inkubation zu falsch-positiven Ergebnissen mit einem Absinken der Spezifität für die Mehrzahl der untersuchten Testkombinationen. Der Anstieg der Oxacillinkonzentration im Medium steuerte diesem Effekt entgegen. (Tabelle 9, 10 und 11).

Die verschiedenen NaCl-Konzentrationen zeigten bei Supplementierung des Agar mit 4 oder 6 µg/ml Oxacillin nahezu keine Auswirkung auf die Spezifität, während bei dem Zusatz von nur 2 µg/ml Oxacillin die Spezifität mit ansteigender Salzkonzentration abnahm. Für Agarplatten, die 1 µg/ml Oxacillin enthielten, war die Spezifität bei Zusatz von 2 % NaCl am günstigsten (Tabelle 9, 10 und 11).

Für das rasche Erkennen einer Methicillinresistenz (nach 18 bzw. 24 Stunden) waren für alle KNS sowie für *S. epidermidis* Isolate Screeningplatten die 4 % NaCl und 1 µg/ml Oxacillin enthalten optimal. Für Isolate anderer KNS-Spezies erwies sich 4 % NaCl aber 2 µg/ml Oxacillin in den Screeningplatten als günstigster (Tabelle 9, 10 und 11).

Tabelle 9: Ergebnisse der Screeningplatten bei 35° C für *S. epidermidis* (n=126, *mecA*-positiv: n=102) im Vergleich zur *mecA*-PCR

Oxacillin	1 µg/ml			2 µg/ml			4 µg/ml			6 µg/ml		
	18 h	24 h	48 h	18 h	24 h	48 h	18 h	24 h	48 h	18 h	24 h	48 h
1 % NaCl												
richtig positiv	83* ¹	88	99	46	57	93	31	37	81	31	36	76
falsch negativ	19	14	3	56	45	9	71	65	21	71	66	26
falsch positiv	1	1	3	0	0	1	0	0	1	0	0	0
richtig negativ	39	39	37	40	40	39	40	40	39	40	40	40
Sensitivität	81,4* ²	86,3	97,1	45,1	55,9	91,2	30,4	36,3	79,4	30,4	35,3	74,5
Spezifität	97,5	97,5	92,5	100	100	97,5	100	100	97,5	100	100	100
2 % NaCl												
richtig positiv	76	87	99	67	79	98	40	57	96	34	46	89
falsch negativ	26	15	3	35	23	4	62	45	6	68	56	13
falsch positiv	1	1	2	1	1	1	0	0	1	0	0	0
richtig negativ	39	39	38	39	39	39	40	40	39	40	40	40
Sensitivität	74,5	85,3	97,1	65,7	77,5	96,1	39,2	55,9	94,1	33,3	45,1	87,3
Spezifität	97,5	97,5	95	97,5	97,5	97,5	100	100	97,5	100	100	100
4 % NaCl												
richtig positiv	98	100	100	88	94	100	72	82	100	57	71	99
falsch negativ	4	2	2	14	8	2	30	20	2	45	31	3
falsch positiv	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1
richtig negativ	39	39	39	39	39	39	40	40	39	40	40	39
Sensitivität	96,1*³	98	98	86,3	92,2	98	70,6	80,4	98	55,9	69,6	97,1
Spezifität	97,5	97,5	97,5	97,5	97,5	97,5	100	100	97,5	100	100	97,5

*¹ Anzahl resistent bewerteter Isolate;

*² Sensitivität und Spezifität in %

*³ Für die Detektion einer Methicillinresistenz bei den *S. epidermidis* Isolaten ergab sich ein Optimum nach 18 bzw. 24 Stunden für die Testung mit 4 % NaCl und 1 µg/ml Oxacillin in den Screeningplatten

Tabelle 10: Ergebnis der Screeningplatten bei 35° C für andere KNS-Spezies (n=59, *mecA*-positiv: n=24) im Vergleich zur *mecA*-PCR

Oxacillin	1 µg/ml			2 µg/ml			4 µg/ml			6 µg/ml		
	18 h	24 h	48h	18 h	24 h	48h	18 h	24 h	48h	18 h	24 h	48h
1 % NaCl												
richtig positiv	23* ¹	24	24	20	23	24	18	21	24	18	21	23
falsch negativ	1	0	0	4	1	0	6	3	0	6	3	1
falsch positiv	4	4	9	0	0	2	0	0	0	0	0	0
richtig negativ	31	31	26	35	35	33	35	35	35	35	35	35
Sensitivität	95,8* ²	100	100	83,3	95,8	100	75	87,5	100	75	87,5	95,8
Spezifität	88,6	88,6	74,3	100	100	94,3	100	100	100	100	100	100
2 % NaCl												
richtig positiv	22	24	24	22	24	24	22	23	24	20	23	24
falsch negativ	2	0	0	2	0	0	2	1	0	4	1	0
falsch positiv	4	4	4	1	1	3	0	0	0	0	0	0
richtig negativ	31	31	31	34	34	32	35	35	35	35	35	35
Sensitivität	91,7	100	100	91,7	100	100	91,7	95,8	100	83,3	95,8	100
Spezifität	88,6	88,6	88,6	97,1	97,1	91,4	100	100	100	100	100	100
4 % NaCl												
richtig positiv	23	23	24	23	23	24	22	22	24	20	21	24
falsch negativ	1	1	0	1	1	0	2	2	0	4	3	0
falsch positiv	3	3	6	2	2	3	0	0	1	0	0	0
richtig negativ	32	32	29	33	33	32	35	35	34	35	35	35
Sensitivität	95,8	95,8	100	95,8*³	95,8	100	91,7	91,7	100	83,3	87,5	100
Spezifität	91,4	91,4	82,9	94,3	94,3	91,4	100	100	97,1	100	100	100

*¹ Anzahl als resistent bewerteter KNS-Isolate

*² Sensitivität und Spezifität in %

*³ Für die Detektion einer Methicillinresistenz bei Isolaten anderer KNS-Spezies ergab sich ein Optimum nach 18 bzw. 24 Stunden für die Testung mit 4 % NaCl und 2 µg/ml Oxacillin in den Screeningplatten

Tabelle 11: Ergebnisse der Screeningplatten bei 35° C für alle KNS-Isolate (n=201, *mecA*-positiv: n=126) im Vergleich zur *mecA*-PCR

Oxacillin	1 µg/ml			2 µg/ml			4 µg/ml			6 µg/ml		
	18 h	24 h	48h	18 h	24 h	48h	18 h	24 h	48h	18 h	24 h	48h
1 % NaCl												
richtig positiv	106* ¹	112	123	66	80	117	49	58	105	49	57	99
falsch negativ	20	14	3	60	46	9	77	68	21	77	69	27
falsch positiv	5	5	12	0	0	3	0	0	1	0	0	0
richtig negativ	70	70	63	75	75	72	75	75	74	75	75	75
Sensitivität	84,1* ²	88,9	97,6	52,4	63,5	92,9	38,9	46	83,3	38,9	45,2	78,6
Spezifität	93,3	93,3	84	100	100	96	100	100	98,7	100	100	100
2 % NaCl												
richtig positiv	98	111	123	89	103	122	62	80	120	54	69	113
falsch negativ	28	15	3	37	23	4	64	46	6	72	57	13
falsch positiv	5	5	6	2	2	4	0	0	1	0	0	0
richtig negativ	70	70	69	73	73	71	75	75	74	75	75	75
Sensitivität	77,8	88,1	97,6	70,6	81,7	96,8	49,2	63,5	95,2	42,9	54,8	89,7
Spezifität	93,3	93,3	92	97,3	97,3	94,7	100	100	98,7	100	100	100
4 % NaCl												
richtig positiv	121	123	124	111	117	124	94	104	124	86	92	123
falsch negativ	5	3	2	15	9	2	32	22	2	49	34	3
falsch positiv	4	4	7	3	3	4	0	0	2	0	0	1
richtig negativ	71	71	68	72	72	71	75	75	73	75	75	74
Sensitivität	96*³	97,6	98,4	88,1	92,9	98,4	74,6	82,5	98,4	68,3	73	97,6
Spezifität	94,7	94,7	90,7	96	96	94,7	100	100	97,3	100	100	98,7

*¹ Anzahl als resistent bewerteter KNS-Isolate

*² Sensitivität und Spezifität in %

*³ Für die Detektion einer Methicillinresistenz bei allen untersuchten KNS ergab sich ein Optimum nach 18 bzw. 24 Stunden für die Testung mit 4 % NaCl und 1 µg/ml Oxacillin in den Screeningplatten

Oxacillin-Agar-Platte (4 % NaCl und 6 µg/ml Oxacillin) mit hohem Inokulum

Die Auswertung der mit 4 % NaCl und 6 µg/ml Oxacillin supplementierten Mueller-Hinton-Agarplatten, die durch Ausstreichen der Bakteriensuspension auf einer halben Agarplatte beimpft wurden, zeigte mit zunehmender Testdauer einen Anstieg der detektierten *mecA*-positiven Isolate. Erst nach 48 Stunden wurden gute Ergebnisse mit einer Sensitivität von 99 % bei 35 °C und 93,7 % bei 30 °C erreicht (Tabelle 12). Auch bei kürzerer Testdauer führt die höhere Inkubationstemperatur zu einem sensitiveren Nachweis einer Methicillinresistenz bei KNS. So liegt die Sensitivität nach 18 Stunden erst bei 78,6 % für 30 °C, aber 86,5 % bei 35 °C und nach 24 Stunden bei 81 % für 30 °C und 86,5 % bei 35 °C (Tabelle 12).

Unabhängig von der Inkubationstemperatur liegt die Sensitivität der Oxacillin-Agar-Platte nach 18 bzw. 24 Stunden bei den *mecA*-positiven Nicht-*S. epidermidis* über der Rate mit der *mecA*-positive *S. epidermidis* Isolate als resistent detektiert werden. Dieser Unterschied gleicht sich nach 48 Stunden stark an (Tabelle 12).

Falsch-negative Ergebnisse fanden sich nach 18 Stunden und einer Inkubation bei 30 °C bei 24 *mecA*-positiven *S. epidermidis* sowie 2 *mecA*-positiven *S. hominis* und 1 *mecA*-positiven *S. haemolyticus*. Nach 24 Stunden wurden weitere 3 *mecA*-positive *S. epidermidis* als resistent detektiert und erst nach 48 Stunden wurde eines der beiden *mecA*-positiven *S. hominis* sowie das *mecA*-positive *S. haemolyticus* Isolat detektiert und die Zahl falsch-negativer Ergebnisse sank auch für *S. epidermidis* auf 7 Isolate.

Bei einer Inkubation bei 35 °C wurden sowohl nach 18 Stunden als auch nach 24 Stunden 16 *mecA*-positive *S. epidermidis* und das schon bei 30 °C nur verzögert detektierte *S. hominis* Isolat nicht als resistent erkannt. Nach 48 Stunden zeigte das *S. hominis* Isolat sowie ein *S. epidermidis* Isolat weiterhin kein Wachstum auf der Oxacillin-Agar-Platte (Tabelle 12).

Die Spezifität lag in der Gruppe der *S. epidermidis* Isolate, unabhängig von den Untersuchungsbedingungen, bei 97,5 %, lediglich ein *mecA*-negatives Isolat zeigte konstant Wachstum auf der Oxacillin-Agar-Platte und wurde entsprechend als resistent bewertet (Tabelle 12).

In der Gruppe der Nicht-*S. epidermidis* Isolate fanden sich sowohl nach 18 als auch nach 24 Stunden keine falsch-positiven Resultate, erst nach 48 Stunden zeigte ein (30 °C) oder zwei (35 °C) *mecA*-negative Isolate Wachstum auf der Oxacillin-Agar-Platte, was zu einer Spezifität von 97,1 % bzw. 94,3 % führte (Tabelle 12).

Tabelle 12: Oxacillin-Agar-Platte [4 % NaCl, 6 µg/ml Oxacillin] im Vergleich zur *mecA* PCR

Inkubationstemperatur	30 °C			35 °C		
Testdauer	18 h	24 h	48h	18 h	24 h	48h

S. epidermidis (n=142, *mecA*-positiv: n= 102)

richtig positiv	78* ¹	81	95	86	86	101
falsch negativ	24	21	7	16	16	1
falsch positiv	1	1	1	1	1	1
richtig negativ	39	39	39	39	39	39
Sensitivität	76,5* ²	79,4	93,1	84,3	84,3	99
Spezifität	97,5	97,5	97,5	97,5	97,5	97,5

Andere KNS (n=59, *mecA*-positiv: n= 24)

richtig positiv	21* ¹	21	23	23	23	24
falsch negativ	3	3	1	1	1	0
falsch positiv	0	0	1	0	0	2
richtig negativ	35	35	34	35	35	33
Sensitivität	87,5* ²	87,5	95,8	95,8	95,8	100
Spezifität	100	100	97,1	100	100	94,3

alle KNS-Isolate (n=201, *mecA*-positiv: n= 126)

richtig positiv	99* ¹	102	118	109	109	125
falsch negativ	27	24	8	17	17	1
falsch positiv	1	1	2	1	1	3
richtig negativ	74	74	73	74	74	72
Sensitivität	78,6* ²	81	93,7	86,5	86,5	99,2
Spezifität	98,7	98,7	97,3	98,7	98,7	96

*¹ Anzahl als resistent bewerteter KNS-Isolate

*² Sensitivität und Spezifität in %

4.6. Agardiffusionstest

Die Darstellung der Testergebnisse erfolgt tabellarisch als quantitative Angabe der korrekt als Methicillin-resistent detektierten *mecA*-positiven und als sensibel detektierten *mecA*-negativen KNS-Isolate, wobei diskrepante Ergebnisse auf der Grundlage der *mecA*-PCR als Goldstandard entsprechend als falsch-positiv oder falsch-negativ klassifiziert wurden, und der resultierenden Sensitivität und Spezifität der betrachteten Grenzwerte.

Agardiffusionstest für Oxacillin [1 µg]

Bei der Bewertung des Agardiffusionstest mit einem 1µg Oxacillin enthaltenden Testplättchen wurden als Grenzwerte ein Hemmhofdurchmesser von ≤ 19 mm = resistent und alternativ ein Hemmhofdurchmesser von ≤ 17 mm = resistent für alle getesteten Medien zugrunde gelegt. KNS-Isolate mit einem Hemmhofdurchmesser von ≥ 20 mm, respektive ≥ 18 mm wurden als sensibel beurteilt.

a) Grenzwert von ≤ 19 mm = resistent

Bei der Auswertung mit einem Grenzwert von ≤ 19 mm = resistent traten falsch-positive Ergebnisse vor allem in der Gruppe der Nicht-*S. epidermidis* Isolate auf. Falsch-negative Resultate fanden sich nahezu ausschließlich bei *S. epidermidis* Isolaten und hierbei überwiegend bei 30 °C. Lediglich ein *mecA*-positives Nicht-*S. epidermidis* Isolat zeigte bei 35 °C nach 24 Stunden ein falsch-negatives Ergebnis, wurde aber nach 48 Stunden als resistent detektiert. Dies führte zu einer sehr guten Sensitivität von 95,8 % bis zu 100 %, aber schlechten Spezifität um 60 % in der Nicht-*S. epidermidis* Gruppe, während die Spezifität für *S. epidermidis* zwischen 92,5 % und 97,5 % und die Sensitivität zwischen 89 % und 98 % lag.

Bezüglich der Sensitivität hatte die Anhebung der NaCl-Konzentration im Testmedium folgenden Effekt: Unabhängig von der Testdauer erhöhte sich mit Zunahme der NaCl-Konzentration die Detektion einer Methicillinresistenz bei *mecA*-positiven KNS, wobei dieser Effekt bei 30 °C ausgeprägter war als bei 35 °C. Bei letzterer Inkubationstemperatur war zudem zwischen einer NaCl-Konzentration im Medium von 2 oder 4 % kein Unterschied festzustellen. Bei der Testung auf Mueller-Hinton-Agar supplementiert mit 4 % NaCl war eine ausgezeichnete Sensitivität von 99,2 % unabhängig von der Testdauer oder der Temperatur zu verzeichnen (Tabelle 13). Als Inkubationstemperatur erwies sich 35 °C als günstiger als 30 °C, vor allem bei der Testung auf Mueller-Hinton-Agar ohne

NaCl, wobei sich dieser Effekt mit zunehmender NaCl-Konzentration des Mediums verlor (Tabelle 13, 14 und 15). Auch eine verlängerte Testdauer von 48 Stunden steigerte hauptsächlich bei Verwendung von nicht supplementiertem Medium die Sensitivität, während höhere NaCl-Konzentrationen den Effekt egalisierten (Tabelle 13, 14 und 15).

Für die Einschränkung in der Spezifität des gewählten Grenzwertes waren im Wesentlichen *mecA*-negative Nicht-*S. epidermidis* Isolate verantwortlich (Tabelle 15).

Andererseits war die Spezifität bei Nicht-*S. epidermidis* Isolaten bei 30 °C höher als bei 35 °C. Die verlängerte Inkubation für 48 Stunden führte in alle Gruppen zu einem Anstieg der Sensitivität, war aber mit einer Minderung der Spezifität erkauft.

Durch Zusatz von 2 % NaCl zum Testmedium konnte die Sensitivität in der gesamten KNS-Isolate Population, vor allem durch eine geringere Anzahl an falsch-negativen Resultaten bei *S. epidermidis* Isolaten, deutlich gesteigert werden und auch die Spezifität bei den Nicht-*S. epidermidis* stieg. Andererseits führte diese Maßnahme zu einer Minderung der Spezifität bei *S. epidermidis* Isolaten bei 30 °C und nach 48 Stunden auch bei 35 °C (Tabelle 14 und 15).

Tabelle 13: Oxacillin [1 µg] (Grenzwert: ≤ 19 mm = resistent) im Vergleich zur *mecA* PCR bei allen KNS-Isolaten (n=201, *mecA*-positiv n=126)

	30 °C		35 °C	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl				
richtig positiv	115* ¹	120	121	124
falsch negativ	11	6	5	2
falsch positiv	14	15	16	18
richtig negativ	61	60	59	57
Sensitivität	91,3* ²	95,2	96	98,4
Spezifität	81,3	80	78,7	76
Mueller-Hinton-Agar + 2 % NaCl				
richtig positiv	122	124	125	125
falsch negativ	4	2	1	1
falsch positiv	14	15	13	15
richtig negativ	61	60	62	60
Sensitivität	96,8	98,4	99,2	99,2
Spezifität	81,3	80	82,7	80
Mueller-Hinton-Agar + 4 % NaCl				
richtig positiv	125	125	125	125
falsch negativ	1	1	1	1
falsch positiv	9	10	11	13
richtig negativ	66	65	64	62
Sensitivität	99,2	99,2	99,2	99,2
Spezifität	88	86,7	85,3	82,7

*¹ Anzahl der Isolate

*² Sensitivität und Spezifität in %

Tabelle 14: Oxacillin [1 µg] (Grenzwert: ≤ 19 mm = resistent) im Vergleich zur *mecA* PCR bei *S. epidermidis* (n=142, *mecA*-positiv n=102)

	30 °C		35 °C	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl				
richtig positiv	91* ¹	96	98	100
falsch negativ	11	6	4	2
falsch positiv	1	1	2	3
richtig negativ	39	39	38	37
Sensitivität	89,2* ²	94,1	96,1	98
Spezifität	97,5	97,5	95	92,5
Mueller-Hinton-Agar + 2 % NaCl				
richtig positiv	98	100	101	101
falsch negativ	4	2	1	1
falsch positiv	3	3	1	1
richtig negativ	37	37	39	39
Sensitivität	96,1	98	99	99
Spezifität	92,5	92,5	97,5	97,5
Mueller-Hinton-Agar + 4 % NaCl				
richtig positiv	101	101	101	101
falsch negativ	1	1	1	1
falsch positiv	1	1	1	1
richtig negativ	39	39	39	39
Sensitivität	99	99	99	99
Spezifität	97,5	97,5	97,5	97,5

*¹ Anzahl der Isolate

*² Sensitivität und Spezifität in %

Tabelle 15: Oxacillin [1 µg] (Grenzwert: ≤ 19 mm = resistent) im Vergleich zur *mecA* PCR bei anderen KNS-Spezies (n=59, *mecA*-positiv n=24)

	30 °C		35 °C	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl				
richtig positiv	24* ¹	24	23	24
falsch negativ	0	0	1	0
falsch positiv	13	14	14	15
richtig negativ	22	21	21	20
Sensitivität	100* ²	100	95,8	100
Spezifität	62,9	60	60	57,1
Mueller-Hinton-Agar + 2 % NaCl				
richtig positiv	24	24	24	24
falsch negativ	0	0	0	0
falsch positiv	11	12	12	14
richtig negativ	24	23	23	21
Sensitivität	100	100	100	100
Spezifität	68,6	65,7	65,7	60
Mueller-Hinton-Agar + 4 % NaCl				
richtig positiv	24	24	24	24
falsch negativ	0	0	0	0
falsch positiv	8	9	10	12
richtig negativ	27	26	25	23
Sensitivität	100	100	100	100
Spezifität	77,1	74,3	71,4	65,7

*¹ Anzahl der Isolate

*² Sensitivität und Spezifität in %

b) Grenzwert von ≤ 17 mm = resistant

Bei Zugrundelegen eines von der NCCLS (National Committee, 2002) inaugurierten Grenzwertes von ≤ 17 mm = resistant, zeigte sich für die *S. epidermidis* Isolate eine sehr gute Spezifität von 97,5 %.

Die Inkubationstemperatur, Testdauer oder die NaCl-Konzentration des Testmediums zeigten keine nennenswerte Beeinflussung der Spezifität. Dasselbe *mecA*-negative *S. epidermidis* Isolat wurde jeweils als resistant detektiert und lediglich bei der Testung auf nicht-supplementiertem Mueller-Hinton-Agar wurde bei einer Inkubationstemperatur von 35 °C ein zweites *mecA*-negatives *S. epidermidis* Isolat nach 48 Stunden als resistant klassifiziert, was die Spezifität auf 95 % senkte (Tabelle 17).

Die Sensitivität wurde hingegen von den Testvariablen beeinflusst. Eine Inkubation bei 35 °C zeigte gegenüber der Testung bei 30 °C eine höhere Sensitivität (Tabelle 17). Dieser Effekt war auf nicht-supplementiertem Mueller-Hinton-Agar mit einer Differenz zwischen 4 % (48 Stunden) und 5 % (24 Stunden) recht stark ausgeprägt. Der Zusatz von NaCl steigerte die Sensitivität auf maximal 99 % und führte zu einer Angleichung des Temperaturunterschiedes. So lag diese Differenz bei der Testung auf Mueller-Hinton-Agar mit 2 % NaCl noch bei 3-4 %, war aber auf Mueller-Hinton-Agar mit 4 % NaCl nicht mehr nachweisbar (Tabelle 17).

Bei Nicht-*S.epidermidis* Isolaten war im Gegensatz dazu eine schlechte Spezifität zu bemerken. Eine Inkubation bei 30 °C mit einer Spezifität zwischen 65,7 % und 82,9 % war der Testung bei 35 °C mit einer Spezifität zwischen 60 % und 80 % überlegen. Dieser Effekt wurde wiederum von der Salzkonzentration im Mueller-Hinton-Agar beeinflusst. So betrug die Differenz auf Mueller-Hinton-Agar zu beiden Zeitpunkten 5,7 %, auf Mueller-Hinton-Agar mit 2 % NaCl hingegen 8,6 % nach 24 Stunden und sogar 11,4 % nach 48 Stunden, während auf Mueller-Hinton-Agar mit 4 % NaCl nur eine Differenz von jeweils 2,9 % zu verzeichnen war. Eine Verlängerung der Testdauer auf 48 Stunden führte generell zu einer Verminderung der Spezifität. Am günstigsten schnitt die Testung auf Mueller-Hinton-Agar mit 4 % NaCl bei 30 °C und einer Testdauer von 24 Stunden mit einer Spezifität von 82,9 % ab (Tabelle 18).

Falsch-negative Ergebnisse wurden auf Mueller-Hinton-Agar mit NaCl-Zusatz unabhängig von der Inkubationstemperatur oder Testdauer nicht beobachtet, was sich in einer exzellenten Sensitivität von 100 % bei Nicht-*S. epidermidis* Isolaten widerspiegelte. Auf Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl wurden hingegen vereinzelt falsch-negative Resultate bei

mecA-positiven Nicht-*S. epidermidis* beobachtet. Die Verlängerung der Testdauer und eine Inkubation bei 35 °C anstelle von 30 °C steigerten jeweils die Sensitivität (Tabelle 18).

Für alle KNS-Isolate zusammengenommen steigerte der Zusatz von NaCl zum Mueller-Hinton-Agar sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität des Grenzwertes von ≤ 17 mm = resistent, wobei 4 % NaCl gegenüber 2 % NaCl vorteilhaft waren. Während die Inkubation bei 35 °C eine sensitivere Detektion einer Methicillinresistenz erlaubt, geht sie aber mit einer schlechteren Spezifität im Vergleich zu der Inkubation bei 30 °C einher. Mit einer verlängerten Testdauer auf 48 Stunden konnten zwar mehr *mecA*-positive Isolate als resistent erkannt werden, jedoch war dies um den Preis vermehrter falsch-positiver Ergebnisse erkauft (Tabelle 16). Am günstigsten schnitt die Testung auf Mueller-Hinton-Agar mit 4 % NaCl bei 30 °C und einer Testdauer von 24 Stunden mit einer Sensitivität von 99,2 % und einer Spezifität von 90,7 % ab (Tabelle 16).

Tabelle 16: Oxacillin [1 µg] (Grenzwert: ≤ 17 mm = resistent) im Vergleich zur *mecA* PCR bei allen KNS-Isolaten (n=201, *mecA*-positiv n=126)

	30 °C		35 °C	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl				
richtig positiv	113* ¹	118	119	123
falsch negativ	13	8	7	3
falsch positiv	12	13	14	16
richtig negativ	63	62	61	59
Sensitivität	89,7* ²	93,7	94,4	97,6
Spezifität	84	82,7	81,3	78,7
Mueller-Hinton-Agar + 2 % NaCl				
richtig positiv	121	122	125	125
falsch negativ	5	4	1	1
falsch positiv	8	9	11	13
richtig negativ	67	66	64	62
Sensitivität	96	96,8	99,2	99,2
Spezifität	89,3	88	85,3	82,7
Mueller-Hinton-Agar + 4 % NaCl				
richtig positiv	125	125	125	125
falsch negativ	1	1	1	1
falsch positiv	7	8	8	9
richtig negativ	68	67	67	66
Sensitivität	99,2	99,2	99,2	99,2
Spezifität	90,7	89,3	89,3	88

*¹ Anzahl der Isolate

*² Sensitivität und Spezifität in %

Tabelle 17: Oxacillin [1 µg] (Grenzwert: ≤ 17 mm = resistent) im Vergleich zur *mecA* PCR bei *S. epidermidis* (n=142, *mecA*-positiv n=102)

	30 °C		35 °C	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl				
richtig positiv	91* ¹	95	96	99
falsch negativ	11	7	6	3
falsch positiv	1	1	1	2
richtig negativ	39	39	39	38
Sensitivität	89,2* ²	93,1	94,1	97,1
Spezifität	97,5	97,5	97,5	95
Mueller-Hinton-Agar + 2 % NaCl				
richtig positiv	97	98	101	101
falsch negativ	5	4	1	1
falsch positiv	1	1	1	1
richtig negativ	39	39	39	39
Sensitivität	95,1	96,1	99	99
Spezifität	97,5	97,5	97,5	97,5
Mueller-Hinton-Agar + 4 % NaCl				
richtig positiv	101	101	101	101
falsch negativ	1	1	1	1
falsch positiv	1	1	1	1
richtig negativ	39	39	39	39
Sensitivität	99	99	99	99
Spezifität	97,5	97,5	97,5	97,5

*¹ Anzahl der Isolate

*² Sensitivität und Spezifität in %

Tabelle 18: Oxacillin [1 µg] (Grenzwert: ≤ 17 mm = resistent) im Vergleich zur *mecA* PCR bei anderen KNS (n=59, *mecA*-positiv n=24)

	30 °C		35 °C	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl				
richtig positiv	22* ¹	23	23	24
falsch negativ	2	1	1	0
falsch positiv	11	12	13	14
richtig negativ	24	23	22	21
Sensitivität	91,7* ²	95,8	95,8	100
Spezifität	68,6	65,7	62,9	60
Mueller-Hinton-Agar + 2 % NaCl				
richtig positiv	24	24	24	24
falsch negativ	0	0	0	0
falsch positiv	7	8	10	12
richtig negativ	28	27	25	23
Sensitivität	100	100	100	100
Spezifität	80	77,1	71,4	65,7
Mueller-Hinton-Agar + 4 % NaCl				
richtig positiv	24	24	24	24
falsch negativ	0	0	0	0
falsch positiv	6	7	7	8
richtig negativ	29	28	28	27
Sensitivität	100	100	100	100
Spezifität	82,9	80	80	77,1

*² Anzahl der Isolate

*³ Sensitivität und Spezifität in %

Agardiffusionstest mit Oxacillin [5 µg]

Bei der Bewertung des Agardiffusionstest mit einem Testplättchen, dass 5 µg des β-Laktam-Antibiotikums Oxacillin enthielt, wurde ein Hemmhofdurchmesser von ≤ 15 mm = resistent für alle getesteten Medien zugrunde gelegt. Dieser Grenzwert wird von der in Dokument 58940-3/4 2000-01 empfohlen (DIN, 2000). KNS-Isolate mit einem Hemmhofdurchmesser von ≥ 16 mm wurden als sensibel beurteilt.

Bei der Testung wurden unabhängig von der Inkubationstemperatur und dem verwendeten Agar nach einer Testzeit von 24 Stunden alle 75 *mecA*-negativen Isolate korrekt als sensibel bewertet, was eine Spezifität der Methode von 100 % erbrachte (Tabelle 19, 20 und 21). Eine Verlängerung der Testdauer auf 48 Stunden resultierte in falsch-positiven Ergebnissen bei Nicht-*S. epidermidis* Isolaten (Tabelle 21). Der Effekt war bei Medium ohne NaCl-Zusatz bei beiden Inkubationstemperaturen bei maximal 2 Isolaten zu beobachten, was zu einer Spezifität von 97,3 bzw. 98,7 % führte (Tabelle 19). Eine Supplementierung des Medium mit NaCl erhöhte die Spezifität des Grenzwertes (Tabelle 19 und 21). Lediglich 1 falsch-positives Resultat fand sich nach 48 Stunden auf Mueller-Hinton-Agar plus 2 % NaCl bei einer Inkubation bei 35 °C woraus sich eine Spezifität von 98,7 % ergab, während auf Mueller-Hinton-Agar plus 4 % NaCl die Spezifität durchweg 100 % betrug (Tabelle 19 und 21).

Die Sensitivität des gewählten Grenzwertes war hingegen mit 59 % bis 76 % auf Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl oder 71 % bis 87,3 % auf Mueller-Hinton-Agar plus 2 % NaCl nicht zufrieden stellend. Besser schnitt der mit 4 % supplementierte Mueller-Hinton-Agar mit einer Sensitivität zwischen 80 % und 91 % ab (Tabelle 19, 20 und 21).

Bis zu 56 der 126 *mecA*-positiven Isolate, vor allem *mecA*-positive *S. epidermidis* wurden nicht als resistent detektiert (Tabelle 19 und 20). Eine deutliche Verbesserung der Sensitivität konnte einerseits durch die Supplementierung des Mediums mit NaCl mit einer maximalen Steigerung der Sensitivität um 30 % erreicht werden. Die zweite Strategie über eine verlängerte Inkubation für 48 Stunden die Sensitivität zu verbessern war unterlegen und verbesserte das Ergebnis um maximal 18 % (Tabelle 19). Diese Modifikationen wirkten sich vor allem auf die Detektion *mecA*-positiver *S. epidermidis* und nur geringfügig auf die Gruppe der Nicht- *S. epidermidis* Isolate aus (Tabelle 20 und 21).

Tabelle 19: Oxacillin [5 µg] (Grenzwert: ≤ 15 mm = resistent) im Vergleich zur *mecA* PCR bei allen KNS-Isolaten (n=201, *mecA*-positiv n=126)

	30 °C		35 °C	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl				
richtig positiv	74* ¹	97	70	96
falsch negativ	52	29	56	30
falsch positiv	0	2	0	1
richtig negativ	75	73	75	74
Sensitivität	58,7* ²	77	55,6	76,2
Spezifität	100	97,3	100	98,7
Mueller-Hinton-Agar + 2 % NaCl				
richtig positiv	100	113	90	110
falsch negativ	26	13	36	16
falsch positiv	0	0	0	1
richtig negativ	75	75	75	74
Sensitivität	79,4	89,7	71,4	87,3
Spezifität	100	100	100	98,7
Mueller-Hinton-Agar + 4 % NaCl				
richtig positiv	111	116	101	115
falsch negativ	15	10	25	11
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	75	75	75	75
Sensitivität	88,1	92,1	80,2	91,3
Spezifität	100	100	100	100

*¹ Anzahl der Isolate

*² Sensitivität und Spezifität in %

Tabelle 20: Oxacillin [5 µg] (Grenzwert: ≤ 15 mm = resistent) im Vergleich zur *mecA* PCR bei *S. epidermidis* (n=142, *mecA*-positiv n=102)

	30 °C		35 °C	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl				
richtig positiv	54* ¹	75	50	74
falsch negativ	48	27	52	28
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	40	40	40	40
Sensitivität	52,9* ²	73,5	49	72,5
Spezifität	100	100	100	100
Mueller-Hinton-Agar + 2 % NaCl				
richtig positiv	79	91	67	86
falsch negativ	23	11	35	16
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	40	40	40	40
Sensitivität	77,5	89,2	65,7	84,3
Spezifität	100	100	100	100
Mueller-Hinton-Agar + 4 % NaCl				
richtig positiv	89	93	77	91
falsch negativ	13	9	25	11
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	40	40	40	40
Sensitivität	87,3	91,2	75,5	89,2
Spezifität	100	100	100	100

*¹ Anzahl der Isolate

*² Sensitivität und Spezifität in %

Tabelle 21: Oxacillin [5 µg] (Grenzwert: ≤ 15 mm = resistent) im Vergleich zur *mecA* PCR bei anderen KNS-Spezies (n=59, *mecA*-positiv n=24)

	30 °C		35 °C	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl				
richtig positiv	20* ¹	22	20	22
falsch negativ	4	2	4	2
falsch positiv	0	2	0	1
richtig negativ	35	33	35	34
Sensitivität	83,3* ²	91,7	83,3	91,7
Spezifität	100	94,3	100	97,1
Mueller-Hinton-Agar + 2 % NaCl				
richtig positiv	21	22	23	24
falsch negativ	3	2	1	0
falsch positiv	0	0	0	1
richtig negativ	35	35	35	34
Sensitivität	87,5	91,7	95,8	100
Spezifität	100	100	100	97,1
Mueller-Hinton-Agar + 4 % NaCl				
richtig positiv	22	23	24	24
falsch negativ	2	1	0	0
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	35	35	35	35
Sensitivität	91,7	95,8	100	100
Spezifität	100	100	100	100

*¹ Anzahl der Isolate

*² Sensitivität und Spezifität in %

Agardiffusionstest für Flucloxacillin

Bei der Bewertung des Agardiffusionstest mit dem β -Laktam-Antibiotikum Flucloxacillin wurde ein Hemmhofdurchmesser von ≤ 15 mm = resistent für alle getesteten Medien zugrunde gelegt. Dieser Grenzwert wird von der DIN in Dokument 58940-3/4 2000-01 empfohlen (DIN, 2000). KNS-Isolate mit einem Hemmhofdurchmesser von ≥ 16 mm wurden als sensibel beurteilt.

Ebenso wie bei der Testung mit dem 5 μ g Oxacillin Testplättchen wurden bei der Testung des 5 μ g Flucloxacillin Testplättchens alle 75 *mecA*-negativen Isolate unabhängig von der Inkubationstemperatur und dem verwendeten Agar nach einer Testzeit von 24 Stunden korrekt als sensibel bewertet, was eine Spezifität der Methode von 100 % erbrachte (Tabelle 22, 23 und 24). Eine Verlängerung der Testdauer auf 48 Stunden hatte ebenfalls wenige falsch-positive Ergebnisse bei Nicht-*S. epidermidis* Isolaten zur Folge (Tabelle 22 und 24). Die Anhebung der NaCl-Konzentration im Testmedium erwies sich zur Verbesserung der Spezifität als günstig. Bei Medium ohne NaCl-Zusatz fanden sich maximal 2 Isolate, was zu einer Spezifität von 97,3 % (35 °C) bzw. 98,7 % (30 °C) führte (Tabelle 22 und 24). Eine Supplementierung des Mediums mit NaCl erhöhte die Spezifität des Grenzwertes (Tabelle 22 und 24). Lediglich 1 falsch-positives Resultat fand sich nach 48 Stunden auf Mueller-Hinton-Agar plus 2 % NaCl bei einer Inkubation bei 35 °C, woraus sich eine Spezifität von 98,7 % ergab, während auf Mueller-Hinton-Agar plus 4 % NaCl die Spezifität durchweg 100 % betrug (Tabelle 22 und 24). Bezüglich der Sensitivität schnitt Flucloxacillin [5 μ g] noch schlechter ab als Oxacillin [5 μ g]. Die Sensitivität lag für die Testung auf Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl zwischen 54 % bis 75 %. Zwar führte, wie auch bei der Testung mit Oxacillin [5 μ g], der Zusatz von 2 % NaCl zu einer Steigerung der Sensitivität auf 70 % bis 83 %, aber auch die Sensitivität auf Mueller-Hinton-Agar plus 4 % NaCl erreichte lediglich zwischen 80 % und 89 % (Tabelle 22, 23 und 24). Neben der Erhöhung der NaCl-Konzentration führte auch eine verlängerte Inkubation für 48 Stunden zu einer günstigeren Detektion *mecA*-positiver Isolate, die sich im Gegensatz zur Testung mit Oxacillin [5 μ g] in einem größeren Anteil auch in der Gruppe der Nicht-*S. epidermidis* fanden. Der Einfluss der Inkubationstemperatur auf Sensitivität und Spezifität war gering ausgeprägt. Für Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl war die Inkubation bei 35 °C geringfügig sensitiver (Tabelle 22, 23 und 24). Bei mit 2 % NaCl supplementiertem Mueller-Hinton-Agar war die Sensitivität für *S. epidermidis* bei 35 °C günstiger, im Gegensatz zu Nicht-*S. epidermidis*, die bei 30 °C besser als resistent zu

detektieren waren (Tabelle 22, 23 und 24). Die Testung auf mit 4 % NaCl supplementiertem Mueller-Hinton-Agar erwies sich hingegen bei 30 °C als günstiger (Tabelle 22, 23 und 24).

Tabelle 22: Flucloxacillin [5 µg] (Grenzwert: ≤ 15 mm = resistent) im Vergleich zur *mecA* PCR bei allen KNS-Isolaten (n= 201, *mecA*-positiv n=126)

	30 °C		35 °C	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl				
richtig positiv	68* ¹	94	71	94
falsch negativ	58	32	55	32
falsch positiv	0	1	0	2
richtig negativ	75	74	75	73
Sensitivität	54* ²	74,6	56,3	74,6
Spezifität	100	98,7	100	97,3
Mueller-Hinton-Agar + 2 % NaCl				
richtig positiv	88	105	89	105
falsch negativ	38	21	37	21
falsch positiv	0	0	0	1
richtig negativ	75	75	75	74
Sensitivität	69,8	83,3	70,6	83,3
Spezifität	100	100	100	98,7
Mueller-Hinton-Agar + 4 % NaCl				
richtig positiv	101	112	96	108
falsch negativ	25	14	30	18
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	75	75	75	75
Sensitivität	80,2	88,9	76,2	85,7
Spezifität	100	100	100	100

*¹ Anzahl der Isolate

*² Sensitivität und Spezifität in %

Tabelle 23: Flucloxacillin [5 µg] (Grenzwert: ≤ 15 mm = resistent) im Vergleich zur *mecA* PCR bei *S. epidermidis* (n=142, *mecA*-positiv n=102)

	30 °C		35 °C	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl				
richtig positiv	53* ¹	73	53	72
falsch negativ	49	29	49	30
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	40	40	40	40
Sensitivität	52* ²	71,6	52	70,6
Spezifität	100	100	100	100
Mueller-Hinton-Agar + 2 % NaCl				
richtig positiv	70	84	72	86
falsch negativ	32	18	30	16
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	40	40	40	40
Sensitivität	68,6	82,4	70,6	84,3
Spezifität	100	100	100	100
Mueller-Hinton-Agar + 4 % NaCl				
richtig positiv	83	92	79	90
falsch negativ	19	10	23	12
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	40	40	40	40
Sensitivität	81,4	90,2	77,5	88,2
Spezifität	100	100	100	100

*¹ Anzahl der Isolate

*² Sensitivität und Spezifität in %

Tabelle 24: Flucloxacillin [5 µg] (Grenzwert: ≤ 15 mm = resistent) im Vergleich zur *mecA* PCR bei anderen KNS-Spezies (n=59, *mecA*-positiv n=24)

	30 °C		35 °C	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl				
richtig positiv	15* ¹	21	18	22
falsch negativ	9	3	6	2
falsch positiv	0	1	0	2
richtig negativ	35	34	35	33
Sensitivität	62,5* ²	87,5	75	91,7
Spezifität	100	97,1	100	94,3
Mueller-Hinton-Agar + 2 % NaCl				
richtig positiv	18	21	17	19
falsch negativ	6	3	7	5
falsch positiv	0	0	0	1
richtig negativ	35	35	35	34
Sensitivität	75	87,5	70,8	79,2
Spezifität	100	100	100	97,1
Mueller-Hinton-Agar + 4 % NaCl				
richtig positiv	18	20	17	18
falsch negativ	6	4	7	6
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	35	35	35	35
Sensitivität	75	83,3	70,8	75
Spezifität	100	100	100	100

*¹ Anzahl der Isolate

*² Sensitivität und Spezifität in %

Agardiffusionstest für Ampicillin + Sulbactam

Bei der Bewertung des Agardiffusionstest mit der Kombination aus dem β -Laktam-Antibiotikum Ampicillin plus dem β -Laktamase-Inhibitor Sulbactam wurde ein Hemmhofdurchmesser von ≤ 15 mm = resistent für alle getesteten Medien zugrunde gelegt. Dieser Grenzwert wird von der DIN in Dokument 58940-3/4 2000-01 empfohlen (DIN 2000). KNS-Isolate mit einem Hemmhofdurchmesser von 16 mm bis 24 mm (intermediär) und einem Hemmhofdurchmesser von ≥ 25 mm (sensibel) wurden als "nicht-resistent" bewertet.

Das mit Ampicillin + Sulbactam beschickte Testplättchen wies eine sehr geringe Sensitivität bei der phänotypischen Erkennung einer Methicillinresistenz bei *mecA*-positiven Isolaten auf (Tabelle 25, 26 und 27).

Die Mehrzahl der *mecA*-positiven Isolate wurde nicht als resistent detektiert, woraus sich die sehr hohe Zahl von zwischen 105 und 118 falsch-negativen Ergebnissen ergibt. Eine etwas günstigere Sensitivität (maximal 16,7 %) war durch Inkubation bei 35 °C gegenüber 30 °C und eine verlängerte Inkubation für 48 Stunden zu erzielen. Die Anhebung der NaCl-Konzentration auf nur 2 % verbesserte die Sensitivität im Vergleich zu nicht supplementiertem Medium. Im Gegensatz zur Testung von Oxacillin [5 μ g] oder Flucloxacillin [5 μ g] führte eine weitere Anhebung der NaCl-Konzentration im Testmedium wieder zu einem Abfall der Sensitivität (Tabelle 25, 26 und 27).

Unabhängig von der Inkubationstemperatur, dem verwendeten Agar oder der Testdauer fanden sich keine falsch-positiven Resultate. Alle 75 *mecA*-negativen Isolate wurden korrekt als sensibel bewertet, was eine Spezifität von 100 % erbrachte (Tabelle 25, 26 und 27).

Tabelle 25: Ampicillin + Sulbactam [20 µg+10 µg] (Grenzwert: ≤ 15 mm = resistent) im Vergleich zur *mecA* PCR bei allen KNS-Isolaten (n=201, *mecA*-positiv n=126)

	30 °C		35 °C	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl				
richtig positiv	9* ¹	13	9	16
falsch negativ	117	113	117	110
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	75	75	75	75
Sensitivität	7,1* ²	10,3	7,1	12,7
Spezifität	100	100	100	100
Mueller-Hinton-Agar + 2 % NaCl				
richtig positiv	9	16	18	21
falsch negativ	117	110	108	105
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	75	75	75	75
Sensitivität	7,1	12,7	14,3	16,7
Spezifität	100	100	100	100
Mueller-Hinton-Agar + 4 % NaCl				
richtig positiv	8	11	13	17
falsch negativ	118	115	113	109
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	75	75	75	75
Sensitivität	6,3	8,7	10,3	13,5
Spezifität	100	100	100	100

*¹ Anzahl der Isolate

*² Sensitivität und Spezifität in %

Tabelle 26: Ampicillin + Sulbactam [20 µg+10 µg] (Grenzwert: ≤ 15 mm = resistent) im Vergleich zur *mecA* PCR bei *S. epidermidis* (n=142, *mecA*-positiv n=102)

	30 °C		35 °C	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl				
richtig positiv	3* ¹	5	5	8
falsch negativ	99	97	97	94
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	40	40	40	40
Sensitivität	2,9* ²	4,9	4,9	7,8
Spezifität	100	100	100	100
Mueller-Hinton-Agar + 2 % NaCl				
richtig positiv	3	8	6	9
falsch negativ	99	94	96	93
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	40	40	40	40
Sensitivität	2,9	7,8	5,9	8,8
Spezifität	100	100	100	100
Mueller-Hinton-Agar + 4 % NaCl				
richtig positiv	2	3	6	9
falsch negativ	100	99	96	93
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	40	40	40	40
Sensitivität	2	2,9	5,9	8,8
Spezifität	100	100	100	100

*¹ Anzahl der Isolate

*² Sensitivität und Spezifität in %

Tabelle 27: Ampicillin + Sulbactam [20 µg+10 µg] (Grenzwert: ≤ 15 mm = resistent) im Vergleich zur *mecA* PCR bei anderen KNS-Spezies (n=142, *mecA*-positiv n=102)

	30 °C		35 °C	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl				
richtig positiv	6* ¹	8	4	8
falsch negativ	18	16	20	16
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	35	35	35	35
Sensitivität	25* ²	33,3	16,7	33,3
Spezifität	100	100	100	100
Mueller-Hinton-Agar + 2 % NaCl				
richtig positiv	6	8	12	12
falsch negativ	18	16	12	12
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	35	35	35	35
Sensitivität	25	33,3	50	50
Spezifität	100	100	100	100
Mueller-Hinton-Agar + 4 % NaCl				
richtig positiv	6	8	7	8
falsch negativ	18	16	17	16
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	35	35	35	35
Sensitivität	25	33,3	29,2	33,3
Spezifität	100	100	100	100

*¹ Anzahl der Isolate

*² Sensitivität und Spezifität in %

Agardiffusionstest für Cefotiam

Bei der Bewertung des Agardiffusionstestes für das Cephalosporin der 2. Generation Cefotiam wurde ein Hemmhofdurchmesser von ≤ 16 mm = resistent für alle getesteten Medien zugrunde gelegt. Dieser Grenzwert wird von der DIN in Dokument 58940-3/4 2000-01 empfohlen (DIN, 2000). KNS-Isolate mit einem Hemmhofdurchmesser von 17 mm bis 19 mm (intermediär) und einem Hemmhofdurchmesser von ≥ 20 mm (sensibel) werden im Folgenden als „nicht-resistent“ beschrieben.

Unabhängig von der Inkubationstemperatur, dem verwendeten Agar oder der Testdauer fanden sich keine falsch-positiven Resultate. Alle 75 *mecA*-negativen Isolate wurden korrekt als sensibel bewertet, was eine Spezifität von 100 % erbrachte. Andererseits ergab sich eine mangelhafte Sensitivität für die Detektion einer Methicillinresistenz. Die Zahl von zwischen 112 bis 119 falsch-negativen Ergebnissen bei Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl als Testmedium konnte durch den Zusatz von 2 % NaCl auf 92 bis 108 und durch eine weitere Steigerung der NaCl-Konzentration auf 4 % auf 81 bis 104 gedrückt werden (Tabelle 28, 29 und 30).

Die Expression der Methicillinresistenz und die sich hieraus ergebende verbesserte Detektion der *mecA*-positiven Isolate waren bei 30 °C stärker ausgeprägt. Auch die Verlängerung der Testdauer erwies sich im Gegensatz zum Agardiffusionstest mit Ampicillin + Sulbactam als vorteilhaft. Mit einer Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 4 % und einer verlängerten Inkubation für 48 Stunden konnte die Sensitivität maximal bei 30 °C auf 35,7 % und bei 35 °C auf 31 % angehoben werden (Tabelle 28, 29 und 30).

Tabelle 28: Cefotiam [30 µg] (Grenzwert: ≤ 16 mm = resistent) im Vergleich zur *mecA* PCR bei allen KNS-Isolaten (n=201, *mecA*-positiv n=126)

	30 °C		35 °C	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl				
richtig positiv	8* ¹	14	7	11
falsch negativ	118	112	119	115
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	75	75	75	75
Sensitivität	6,3* ²	11,1	5,6	8,7
Spezifität	100	100	100	100
Mueller-Hinton-Agar + 2 % NaCl				
richtig positiv	18	34	18	31
falsch negativ	108	92	108	95
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	75	75	75	75
Sensitivität	14,3	27	14,3	24,6
Spezifität	100	100	100	100
Mueller-Hinton-Agar + 4 % NaCl				
richtig positiv	24	45	22	39
falsch negativ	102	81	104	87
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	75	75	75	75
Sensitivität	19	35,7	17,5	31
Spezifität	100	100	100	100

*¹Anzahl der Isolate

*²Sensitivität und Spezifität in %

Tabelle 29: Cefotiam [30 µg] (Grenzwert: ≤ 16 mm = resistent) im Vergleich zur *mecA* PCR bei *S. epidermidis* (n=142, *mecA*-positiv n=102)

	30 °C		35 °C	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl				
richtig positiv	1* ¹	5	1	2
falsch negativ	101	97	101	100
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	40	40	40	40
Sensitivität	1* ²	4,9	1	2
Spezifität	100	100	100	100
Mueller-Hinton-Agar + 2 % NaCl				
richtig positiv	10	22	8	17
falsch negativ	92	80	94	85
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	40	40	40	40
Sensitivität	9,8	21,6	7,8	16,7
Spezifität	100	100	100	100
Mueller-Hinton-Agar + 4 % NaCl				
richtig positiv	14	30	11	24
falsch negativ	88	72	91	78
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	40	40	40	40
Sensitivität	13,7	29,4	10,8	23,5
Spezifität	100	100	100	100

*¹ Anzahl der Isolate

*² Sensitivität und Spezifität in %

Tabelle 30: Cefotiam [30 µg] (Grenzwert: ≤ 16 mm = resistent) im Vergleich zur *mecA* PCR bei anderen KNS-Spezies (n=59, *mecA*-positiv n=24)

	30 °C		35 °C	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl				
richtig positiv	7* ¹	9	6	9
falsch negativ	17	15	18	15
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	35	35	35	35
Sensitivität	29,2* ²	37,5	25	37,5
Spezifität	100	100	100	100
Mueller-Hinton-Agar + 2 % NaCl				
richtig positiv	8	12	10	14
falsch negativ	16	12	14	10
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	35	35	35	35
Sensitivität	33,3	50	41,7	58,3
Spezifität	100	100	100	100
Mueller-Hinton-Agar + 4 % NaCl				
richtig positiv	10	15	11	15
falsch negativ	14	9	13	9
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	35	35	35	35
Sensitivität	41,7	62,5	45,8	62,5
Spezifität	100	100	100	100

*¹ Anzahl der Isolate

*² Sensitivität und Spezifität in %

Agardiffusionstest für Cefoxitin

Bei der Bewertung des Agardiffusionstest mit Cefoxitin wurde ein Hemmhofdurchmesser von ≤ 20 mm = resistent für alle getesteten Medien zugrunde gelegt. KNS-Isolate mit einem Hemmhofdurchmesser von 21 mm bis 25 mm (intermediär) und einem Hemmhofdurchmesser von ≥ 26 mm (sensibel) werden als „nicht-resistent“ bewertet. Der Grenzwert für Cefoxitin ist aus dem Dokument 58940-3/4 2000-01 der DIN abgeleitet (DIN, 2000), obwohl er eigentlich für die Resistenztestung von *Enterobacteriaceae* zur Anwendung kommt.

Bei der Testung auf Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl wurden bei 30 °C und 35 °C alle 75 *mecA*-negativen Isolate sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden als nicht-resistent bewertet (Tabelle 31, 32 und 33). Falsch-negative Resultate fanden sich vorwiegend bei *mecA*-positiven *S. epidermidis* Isolaten. In der Gruppe der Nicht-*S. epidermidis* Isolate fanden sich lediglich 2 bzw. nur 1 falsch-negatives Resultat bei 30 °C nach 24 bzw. 48 Stunden. Bei einer Inkubationstemperatur von 35 °C lag die Rate nach 24 und 48 Stunden bei 3 bzw. 2 falsch-negativen Isolaten. Für dieselben Temperaturen und Ablesezeiten wurde hingegen bei 45, 33, 35 bzw. 21 der *mecA*-positiven *S. epidermidis* Isolate keine Resistenz detektiert (Tabelle 31, 32 und 33).

Bei der Testung auf mit 2 % NaCl supplementiertem Mueller-Hinton-Agar wurden bei 30 °C nach 24 sowie 48 Stunden alle *mecA*-negativen KNS-Isolate als nicht-resistent klassifiziert. Bei 35 °C fanden sich falsch-positive Ergebnisse bei 1 (24 Stunden) bzw. 2 (48 Stunden) der Nicht-*S. epidermidis* Isolate. Andererseits fanden sich falsch-negative Resultate ausschließlich bei der Spezies *S. epidermidis*. Nach 24 Stunden lag diese Konstellation bei 30 Isolaten (30 °C) bzw. 33 Isolaten (35 °C) vor. Eine verlängerte Inkubation für 48 Stunden reduzierte die Zahl der falsch-negativen Resultate deutlich auf 21 bzw. 15 *S. epidermidis* Isolate (Tabelle 31, 32 und 33).

Bei der Testung auf mit 4 % NaCl supplementiertem Mueller-Hinton-Agar wurden nahezu alle *mecA*-negativen Isolate als resistent erkannt. Lediglich aus der Gruppe der Nicht-*S. epidermidis* Stämme zeigte 1 Isolat bei 30 °C nach 48 Stunden ein falsch-positives Ergebnis. Bei einer Inkubationstemperatur von 35 °C wurden 1 bzw. 2 falsch-positive Resultate nach 24 bzw. 48 Stunden beobachtet. Falsch falsch-negative Resultate fanden sich nahezu ausschließlich bei der Spezies *S. epidermidis* wobei dieses Phänomen bei 35 °C geringer ausgeprägt war (18 bzw. 7 Isolate nach 24 bzw. 48 Stunden) als bei 30 °C (26 bzw. 17 Isolate nach 24 bzw. 48 Stunden) (Tabelle 31, 32 und 33). Der gewählte

Grenzwert zeigte wie tabellarisch dargestellt (Tabelle 31, 32 und 33) eine ausgezeichnete Spezifität. Für alle KNS fand sich ein Wert zwischen 97,3 % und 100 % je nach der gewählten Inkubationstemperatur sowie Inkubationsdauer (Tabelle 31). Die Kombination einer erhöhten Inkubationstemperatur von 35 °C mit dem Zusatz von 2 % bzw. 4 % NaCl zum Testmedium führte zu einer geringen Minderung der Spezifität. Dieser Effekt wurde durch eine verlängerte Inkubation für 48 Stunden noch weiter verstärkt (98,7 % bei 24 Stunden versus 97,3 % bei 48 Stunden) (Tabelle 31). Die sehr hohe Spezifität traf insbesondere für die Testung von *S. epidermidis* Isolaten zu, die unabhängig von Medium, Inkubationstemperatur oder Inkubationsdauer eine Spezifität von 100 % zeigten (Tabelle 32). In der Gruppe der Nicht-*S. epidermidis* Isolate lag die Spezifität zwischen 94,3 % und 100 %, wobei sowohl eine höhere Inkubation bei 35 °C, eine verlängerte Inkubationsdauer als auch der Zusatz von NaCl zum Testmedium die Spezifität minderten (Tabelle 33).

Die Sensitivität des gewählten Grenzwertes hing, insbesondere bei den *S. epidermidis* Isolaten, von den Untersuchungsbedingungen ab. Eine Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 2 % und schließlich auf 4 % steigerte vor allem die Detektion *mecA*-positiver *S. epidermidis* Isolate (Tabelle 32). Eine verlängerte Inkubation für 48 Stunden war sowohl für *S. epidermidis* wie auch Nicht-*S. epidermidis* Isolate günstig (Tabelle 31, 32 und 33). Eine höhere Inkubationstemperatur von 35 °C steigerte bei *S. epidermidis* Isolaten die Sensitivität (Tabelle 32). Eine gegenläufige Tendenz mit einer verschlechterten Sensitivität ergab sich aber bei Nicht-*S. epidermidis* Isolaten (Tabelle 33).

Das Optimum des gewählten Grenzwertes fand sich für alle KNS bei der Testung auf mit 4 % NaCl supplementiertem Mueller-Hinton-Agar nach 48 Stunden und Inkubation bei 35 °C mit einer Sensitivität von 94,4 % und einer Spezifität von 97,3 % (Tabelle 31).

Tabelle 31: Cefoxitin [30 µg] (Grenzwert: ≤ 20 mm = resistent) im Vergleich zur *mecA* PCR bei allen KNS-Isolaten (n=201, *mecA*-positiv n=126)

	30 °C		35 °C	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl				
richtig positiv	79* ¹	92	88	103
falsch negativ	47	24	38	23
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	75	75	75	75
Sensitivität	62,7* ²	73	69,8	81,7
Spezifität	100	100	100	100
Mueller-Hinton-Agar + 2 % NaCl				
richtig positiv	96	105	93	111
falsch negativ	30	21	33	15
falsch positiv	0	0	1	2
richtig negativ	75	75	74	73
Sensitivität	76,2	83,3	73,8	88,1
Spezifität	100	100	98,7	97,3
Mueller-Hinton-Agar + 4 % NaCl				
richtig positiv	99	108	108	119
falsch negativ	27	18	18	7
falsch positiv	0	1	1	2
richtig negativ	75	74	74	73
Sensitivität	78,6	85,7	85,7	94,4
Spezifität	100	98,7	98,7	97,3

*¹ Anzahl der Isolate

*² Sensitivität und Spezifität in %

Tabelle 32: Cefoxitin [30 µg] (Grenzwert: ≤ 20 mm = resistent) im Vergleich zur *mecA* PCR bei *S. epidermidis* (n=142, *mecA*-positiv n=102)

	30 °C		35 °C	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl				
richtig positiv	57* ¹	69	67	81
falsch negativ	45	33	35	21
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	40	40	40	40
Sensitivität	55,9* ²	67,6	65,7	79,4
Spezifität	100	100	100	100
Mueller-Hinton-Agar + 2 % NaCl				
richtig positiv	72	81	69	87
falsch negativ	30	21	33	15
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	40	40	40	40
Sensitivität	70,6	79,4	67,6	85,3
Spezifität	100	100	100	100
Mueller-Hinton-Agar + 4 % NaCl				
richtig positiv	76	85	84	95
falsch negativ	26	17	18	7
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	40	40	40	40
Sensitivität	74,5	83,3	82,4	93,1
Spezifität	100	100	100	100

*¹ Anzahl der Isolate

*² Sensitivität und Spezifität in %

Tabelle 33: Cefoxitin [30 µg] (Grenzwert: ≤ 20 mm = resistent) im Vergleich zur *mecA* PCR bei anderen KNS-Spezies (n=59, *mecA*-positiv n=24)

	30 °C		35 °C	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl				
richtig positiv	22* ¹	23	21	22
falsch negativ	2	1	3	2
falsch positiv	0	0	0	0
richtig negativ	35	35	35	35
Sensitivität	91,7* ²	95,8	87,5	91,7
Spezifität	100	100	100	100
Mueller-Hinton-Agar + 2 % NaCl				
richtig positiv	24	24	24	24
falsch negativ	0	0	0	0
falsch positiv	0	0	1	2
richtig negativ	35	35	34	33
Sensitivität	100	100	100	100
Spezifität	100	100	97,1	94,3
Mueller-Hinton-Agar + 4 % NaCl				
richtig positiv	23	23	24	24
falsch negativ	1	1	0	0
falsch positiv	0	1	1	2
richtig negativ	35	34	34	33
Sensitivität	95,8	95,8	100	100
Spezifität	100	97,1	97,1	94,3

*¹ Anzahl der Isolate

*² Sensitivität und Spezifität in %

4.7. VITEK[®]2

Die Oxacillin MHK-Bestimmung mit den VITEK[®]2 Testkarten wies in 119 der 124 *mecA*-positiven Isolate eine MHK von $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ aus (Tabelle 34). Niedrigere Werte der Oxacillin MHK im Bereich zwischen $\leq 0,25$ bis $2 \mu\text{g/ml}$ wurden bei drei *mecA*-positiven Isolaten (1 *S. epidermidis*, 1 *S. hominis*, 1 *S. haemolyticus*) bestimmt (Tabelle 34 und 35). Unter Verwendung von AST-P515 Testkarten wiesen 63 von 76 *mecA*-negativen Isolaten eine Oxacillin MHK von $\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$ auf (Tabelle 34), während der Wert bei 12 *mecA*-negativen Isolaten zwischen 1 bis $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ lag (Tabelle 34 und 35). Eine zusätzliche Testung mit AST-P523 Testkarten wurde zur genaueren Einordnung der 63 Isolate mit einer initialen Oxacillin MHK von $\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$ durchgeführt und ergab eine Oxacillin MHK von $\leq 0,25 \mu\text{g/ml}$ bei 60 Isolaten, jedoch wiesen drei *mecA*-negative Isolate (1 *S. saprophyticus* und 2 *S. lugdunensis* Isolate) eine Oxacillin MHK von genau $0,5 \mu\text{g/ml}$ auf (Tabelle 34 und 35).

Der Oxacillin Resistenz (OR) Test auf den AST-P515 Testkarten zeigte ebenfalls eine Resistenz bei 119 von 124 *mecA*-positiven Isolaten an (Tabelle 34), aber versagte beim Nachweis einer Methicillinresistenz in den selben drei *mecA*-positiven Isolaten (1 *S. epidermidis*, 1 *S. hominis* und 1 *S. haemolyticus*), die auch mittels der Oxacillin MHK-Bestimmung (Werte von $\leq 0,25$ bis $2 \mu\text{g/ml}$ (Tabelle 34 und 35) auffällig waren. Alle *mecA*-negativen Isolate, außer einem *S. kloosii* Isolat mit einer Oxacillin MHK von $\geq 8 \mu\text{g/ml}$, wurden durch den OR Test übereinstimmend zur PCR für *mecA* als empfindlich gegenüber Oxacillin bewertet (Tabelle 34 und 35). Diskrepanzen zwischen dem OR Test und dem Ergebnis der Oxacillin MHK-Bestimmung fanden sich bei insgesamt 14 *mecA*-negativen Isolaten. Die Gruppe mit einander widersprechenden Resultaten des VITEK[®]2 umfasste 6 *S. saprophyticus*, 4 *S. lugdunensis*, 2 *S. cohnii*, 1 *S. xylosus* und 1 *S. epidermidis* Isolat. Diese hatten eine Oxacillin MHK im Bereich zwischen $0,5$ bis $4 \mu\text{g/ml}$, wurden aber im OR Test als empfindlich gegenüber Oxacillin getestet (Tabelle 34 und 35). Die Ergebnisse dieser 14 Isolate wurden als indeterminiert eingeordnet (Tabelle 34 und 35). Zusätzlich wurden ein *mecA*-positives *S. epidermidis* und ein *mecA*-positives *S. hominis* Isolat mit einer Oxacillin MHK von 1 bzw. $0,5 \mu\text{g/ml}$ aber Empfindlichkeit im OR Test als indeterminiert klassifiziert (Tabelle 34 und 35). Nachtestungen der 16 Isolate, die als indeterminiert eingeordnet wurden, bestätigten das Ergebnis des initialen OR Testes bei allen Isolaten während das Ergebnis der Oxacillin MHK nicht signifikant von den Vorwerten abwich (Tabelle 35) (Horstkotte et al., 2002).

Tabelle 34: Vergleich der VITEK[®] 2 Testergebnisse zur *mecA* PCR.

Übereinstimmung der Ergebnisse	179*
bei <i>mecA</i> -positive KNS-Isolaten	119
bei <i>mecA</i> -negative KNS-Isolaten	60
Indeterminierte Ergebnisse	16
bei <i>mecA</i> -negativen KNS-Isolaten	
<i>S. saprophyticus</i> Gruppe	9
<i>S. lugdunensis</i>	4
<i>S. epidermidis</i>	1
bei <i>mecA</i> -positiven KNS-Isolaten	
<i>S. epidermidis</i>	1
<i>S. hominis</i>	1
Falsch-positives Ergebnis	1
Falsch-negatives Ergebnis	1
Kein Wachstum	3

* Anzahl der KNS-Isolate

Tabelle 35: KNS-Isolate mit diskrepanten und widersprüchlichen VITEK[®] 2 Testen im Vergleich zur *mecA* PCR

Identifizierung	<i>mecA</i> PCR	Oxacillin MHK		OR Test	
		Initial	Retest	Initial	Retest
<i>S. kloosii</i>	- * ¹	≥ 8* ²	≥ 8	R* ³	R
<i>S. saprophyticus</i>	-	4	4	S	S
<i>S. saprophyticus</i>	-	2	2	S	S
<i>S. saprophyticus</i>	-	2	1	S	S
<i>S. saprophyticus</i>	-	1	2	S	S
<i>S. saprophyticus</i>	-	1	0,5	S	S
<i>S. saprophyticus</i>	-	≤ 0,5	0,5	S	S
<i>S. cohnii</i>	-	2	2	S	S
<i>S. cohnii</i>	-	2	2	S	S
<i>S. xylosus</i>	-	1	0,5	S	S
<i>S. lugdunensis</i>	-	1	0,5	S	S
<i>S. lugdunensis</i>	-	1	1	S	S
<i>S. lugdunensis</i>	-	≤ 0,5	0,5	S	S
<i>S. lugdunensis</i>	-	≤ 0,5	0,5	S	S
<i>S. epidermidis</i>	-	2	2	S	S
<i>S. epidermidis</i>	+	1	2	S	S
<i>S. hominis</i>	+	≤ 0,5	0,5	S	S
<i>S. haemolyticus</i>	+	≤ 0,5	≤ 0,25	S	S

*¹ + : positiv; - : negativ; *² Oxacillin MHK Werte in µg/ml; *³ S : sensibel, R : resistent

Ungenügendes Wachstum in den AST-P515 Testkarten fand sich bei einem *mecA*-negativen *S. epidermidis* und zwei *mecA*-positiven *S. saprophyticus* Isolaten (Tabelle 36). Bei der erneuten Testung dieser drei Stämme mit AST-P515 Testkarten wuchs der *mecA*-positive *S. saprophyticus* erneut nicht, andererseits fand sich eine Empfindlichkeit gegenüber Oxacillin bei dem zweiten, *mecA*-positiven *S. saprophyticus* Isolat und dem *mecA*-negativen *S. epidermidis* Isolat (Tabelle 34 und 36). Unter Verwendung von AST-P523 Testkarten fand sich bei den beiden *S. saprophyticus* Isolaten kein Wachstum (Tabelle 36).

Tabelle 36: KNS-Isolate mit fehlendem Wachstum in den VITEK® 2 Testen.

Identifizierung	<i>mecA</i> PCR	Oxacillin MHK		OR Test	
		Initial	Retest	Initial	Retest
<i>S. epidermidis</i>	-* ¹	k. W.* ²	≤ 0,5* ³	k. W.	S
<i>S. saprophyticus</i>	+	k. W.	≥ 8	k. W.	R
<i>S. saprophyticus</i>	+	k. W.	k. W.	k. W.	k. W.

*¹ + : positiv; - : negativ; *² k. W. = kein Wachstum; *³ Oxacillin MHK in µg/ml; *³ S: sensibel, R: resistent

Mit dem OR Test wurde eine Resistenz gegenüber Oxacillin nach 7 Stunden bei 91,1 %, nach 8 Stunden bei 93,5 % und nach 9 Stunden bei 95,2 % der *mecA*-positiven Isolate angezeigt (Bild 8). Die Betrachtung der Oxacillin MHK-Bestimmung ergab, dass nach 7 Stunden 86,3 %, nach 8 Stunden 89,5 % sowie nach 9 Stunden 91,9 % der *mecA*-positiven Isolate als resistent detektiert wurden. (Bild 8). Andererseits wurde bei den *mecA*-negativen Isolaten das Vorliegen einer Empfindlichkeit gegenüber Oxacillin mit dem OR Test nach 7 Stunden in 59,2 %, nach 8 Stunden bei 78,9 % und schließlich nach 9 Stunden bei 86,8 % der Isolate festgestellt (Bild 9). Die Bestimmung der Oxacillin MHK zeigte erst deutlich später (nach 7 Stunden 0 %, nach 8 Stunden 1,3 % und nach 9 Stunden 59,2 %) das Vorliegen einer Empfindlichkeit gegenüber Oxacillin an (Bild 9) (Horstkotte et al., 2002).

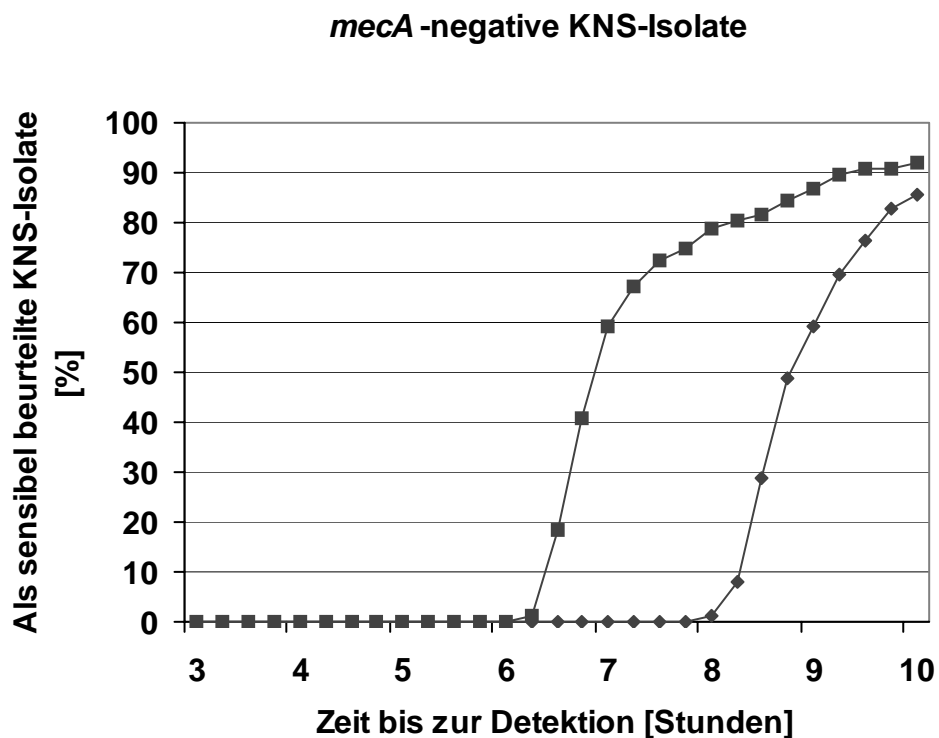
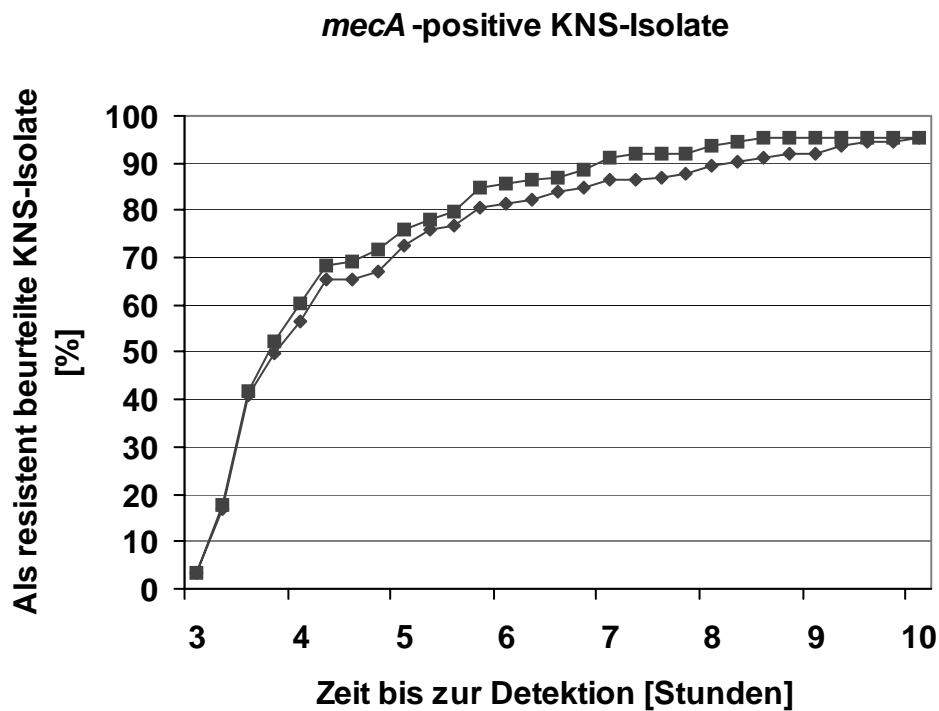


Bild 8 und 9: Zeitlicher Verlauf der Testergebnisse für die Oxacillin MHK-Bestimmung (♦) und den Oxacillin Resistenz Test (■) des VITEK 2 bei *mecA*-positiven KNS-Isolaten (Bild 8) und *mecA*-negativen KNS-Isolaten (Bild 9).

4.8. BD Phoenix™

Gemessen an dem aktuellen Oxacillin MHK-Grenzwert der NCCLS von 0,5 µg/ml zeigten 48 von 76 *mecA*-negativen KNS-Isolaten eine Empfindlichkeit für Oxacillin mit einer MHK von $\leq 0,25$ µg/ml (Tabelle 37 und 38). Eine höhere Oxacillin MHK fand sich bei 26 *mecA*-negativen KNS-Isolaten. Diese Gruppe von KNS-Isolaten umfasste 14, 8 sowie 4 Isolate mit einer Oxacillin MHK von 0,5; 1 und 2 µg/ml (Tabelle 37 und 38).

Eine Oxacillin MHK von ≥ 4 µg/ml wurde bei 119 der 124 *mecA*-positiven Isolate gemessen. Zwei *mecA*-positive *S. epidermidis* und ein *mecA*-positives *S. saprophyticus* Isolat zeigten eine Oxacillin MHK von 2 µg/ml und lediglich bei einem *mecA*-positiven *S. epidermidis* Isolat ergab sich eine Oxacillin MHK von $\leq 0,25$ µg/ml (Tabelle 37 und 39). Alle 29 KNS-Isolate mit einer Oxacillin MHK im Bereich von 0,5 bis 2 µg/ml sowie das 1 *mecA*-positive *S. epidermidis* Isolat mit einer Oxacillin MHK von $\leq 0,25$ µg/ml wurden erneut getestet (Tabelle 38 und 39). In der Mehrzahl der Isolate ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Oxacillin MHK Ergebnisse (Tabelle 38 und 39).

Ungenügendes Wachstum fand sich bei drei KNS-Isolaten. Bei diesen Isolaten handelte es sich um 1 *mecA*-negatives *S. epidermidis*, 1 *mecA*-negatives *S. cohnii* und 1 *mecA*-positives *S. epidermidis* Isolat. Auch für diese drei Stämme wurde die Testung wiederholt (Tabelle 40). In der Nachtestung zeigte sich ausreichendes Wachstum für beide *S. epidermidis* Isolate, jedoch das *mecA*-negative *S. cohnii* Isolat zeigte erneut kein ausreichendes Wachstum für eine valide Analyse. Vor dem Hintergrund des derzeit geltenden Oxacillin MHK-Grenzwert der NCCLS von 0,5 µg/ml (Tabelle 42) würde eine Methicillinresistenz in einem *mecA*-positiven *S. epidermidis* Isolat nachgewiesen, aber das Resultat des *mecA*-negativen *S. epidermidis* Isolates wäre als falsch-positiv zu bewerten (Tabelle 40).

Vor dem Hintergrund des Oxacillin MHK-Grenzwert der DIN von 2 µg/ml (Tabelle 42) (DIN, 2000) hätte Übereinstimmung zwischen dem detektierten Phänotyp und der *mecA*-PCR bei beiden *S. epidermidis* Isolaten bestanden.

Tabelle 37: Oxacillin MHK des BD Phoenix™ im Vergleich zur *mecA* PCR unter Berücksichtigung verschiedener Grenzwerte

Oxacillin Grenzwert	KNS-Isolate detektiert als		Sensitivität	Spezifität
	resistent	sensibel		
≥ 0,5 µg/ml (aktueller Grenzwert der NCCLS)				
<i>mecA</i> -positiv	122	1	99,2 %	64,9 %
<i>mecA</i> -negativ	26	48		
≥ 1 µg/ml				
<i>mecA</i> -positiv	122	1	99,2 %	83,8 %
<i>mecA</i> -negativ	12	62		
≥ 2 µg/ml (Grenzwert der DIN)				
<i>mecA</i> -positiv	122	1	99,2 %	94,6 %
<i>mecA</i> -negativ	4	70		
≥ 4 µg/ml (alter Grenzwert der NCCLS)				
<i>mecA</i> -positiv	119	4	96,7 %	100 %
<i>mecA</i> -negativ	0	74		

Tabelle 38: *MecA*-negative KNS mit BD Phoenix™ Oxacillin MHK > 0,25 µg/ml

Isolat	Identifizierung	Oxacillin MHK		<i>mecA</i> PCR
		Initial	Retest	
3	<i>S. saprophyticus</i>	1*	1	negativ
4	<i>S. saprophyticus</i>	1	1	negativ
7	<i>S. saprophyticus</i>	0,5	0,5	negativ
9	<i>S. saprophyticus</i>	0,5	0,5	negativ
48	<i>S. saprophyticus</i>	0,5	0,5	negativ
177	<i>S. saprophyticus</i>	0,5	0,5	negativ
60	<i>S. cohnii</i>	2	2	negativ
90	<i>S. kloosii</i>	1	1	negativ
95	<i>S. xylosum</i>	0,5	0,5	negativ
8	<i>S. lugdunensis</i>	0,5	0,5	negativ
16	<i>S. lugdunensis</i>	1	0,5	negativ
89	<i>S. lugdunensis</i>	0,5	≤ 0,25	negativ
175	<i>S. lugdunensis</i>	0,5	0,5	negativ
64	<i>S. capitis</i>	0,5	0,5	negativ
199	<i>S. haemolyticus</i>	0,5	0,5	negativ
1	<i>S. epidermidis</i>	1	1	negativ
2	<i>S. epidermidis</i>	0,5	≤ 0,25	negativ
12	<i>S. epidermidis</i>	0,5	≤ 0,25	negativ
15	<i>S. epidermidis</i>	0,5	Kein Wachstum	negativ
50	<i>S. epidermidis</i>	2	0,5	negativ
52	<i>S. epidermidis</i>	2	≤ 0,25	negativ
55	<i>S. epidermidis</i>	1	≤ 0,25	negativ
99	<i>S. epidermidis</i>	2	≤ 0,25	negativ
173	<i>S. epidermidis</i>	1	1	negativ
174	<i>S. epidermidis</i>	0,5	≤ 0,25	negativ
207	<i>S. epidermidis</i>	1	0,5	negativ

* Die Oxacillin MHK ist in µg/ml angegeben

Tabelle 39: *MecA*-positive KNS mit initialer BD Phoenix™ Oxacillin MHK < 4 µg/ml

Isolat	Identifizierung	Oxacillin MHK		<i>mecA</i> PCR
		Initial	Retest	
96	<i>S. saprophyticus</i>	2*	> 4	positiv
73	<i>S. epidermidis</i>	2	> 4	positiv
102	<i>S. epidermidis</i>	≤ 0,25	≤ 0,25	positiv
204	<i>S. epidermidis</i>	2	1	positiv

Tabelle 40: KNS-Isolate mit fehlendem Wachstum im BD Phoenix™

Isolat	Identifizierung	Oxacillin MHK		<i>mecA</i> PCR
		Initial	Retest	
56	<i>S. cohnii</i>	Kein Wachstum	Kein Wachstum	negativ
6	<i>S. epidermidis</i>	Kein Wachstum	1	negativ
164	<i>S. epidermidis</i>	Kein Wachstum	4	positiv

* Die Oxacillin MHK ist in µg/ml angegeben.

Eine zeitliche Auswertung zeigte, dass nach 9 Stunden das Ergebnis der Oxacillin MHK bei 41 % und nach 17 Stunden bei 98,5 % der KNS vorlag (Tabelle 41). Für wenige *mecA*-positive KNS war der Test bereits nach 6 oder 7 Stunden abgeschlossen. Interessanterweise war das Verhältnis zwischen *mecA*-positiven und *mecA*-negativen KNS, für die eine MHK-Bestimmung nach 8 Stunden vorlag, ausgeglichen und der Anteil *mecA*-negativer KNS überwog nach 9 Stunden mit 47,4 % sogar den Anteil *mecA*-positiver KNS von nur 36,3 % (Tabelle 41).

Tabelle 41: Zeitverlauf der Oxacillin MHK Ergebnisse des BD Phoenix™

		5 h	6 h	7 h	8 h	9 h	//	17 h
alle KNS	(n)	1*	8	21	37	81	//	197
	(%)	0,5	4	10,5	18,5	40,5	//	98,5
<i>mecA</i> -positive KNS	(n)	1	8	18	24	45	//	123
	(%)	0,8	6,5	14,5	19,4	36,3	//	99,2
<i>mecA</i> -negative KNS	(n)	0	0	3	13	36	//	74
	(%)	0	0	3,9	17,1	47,4	//	97,4

* Zahl der detektierten KNS-Isolate

5. DISKUSSION

5.1. Nachweis des Penicillin-bindenden Protein 2a durch Latexagglutination

Der Nachweis des PBP2a mit dem LA Test zeigte eine hohe Sensitivität und Spezifität. Bereits publizierte Studien an einer Stammsammlung von mehr als 60 verschiedenen KNS-Isolaten, die sich mit der LA Test für den Nachweis von PBP2a bei KNS als Marker einer Methicillinresistenz beschäftigten, ergaben verschiedene grundsätzliche Schwierigkeiten der Durchführung und der Bewertung des LA Testes (Andrews et al., 2000; Hussain et al., 2000a; Zbinden et al., 2001; Udo et al., 2000; Horstkotte et al., 2001).

Das Problem einer geringen Sensitivität - nur 41 (32,8 %) von 125 *mecA*-positiven Isolaten wiesen innerhalb von 3 Minuten positive Resultate auf - wurde beschrieben (Hussain et al., 2000a). Durch eine verlängerte Agglutinationszeit von 6 oder 15 Minuten konnten die Ergebnisse auf 58 von 125 (46,4 %) bzw. 72 von 125 (57,6 %) der *mecA*-positiven Isolate verbessert werden. Aber erst eine Induktion der PBP2a Synthese durch Auflegen von Testplättchen, die Oxacillin enthielten, führte zu einem befriedigenden Ergebnis (Hussain et al., 2000a).

In einer anderen Untersuchung fand sich im Gegensatz dazu bei allen 60 *mecA*-positiven KNS-Isolaten nach 3 Minuten ein positives LA Ergebnis ohne vorangehende Induktion der PBP2a Expression (Zbinden et al., 2001). In meinen Untersuchungen wurde ein vergleichsweise hohes Inokulum eingesetzt, das mindestens einem McFarland 6 Standard entsprach. Auf eine Induktion wurde verzichtet (Horstkotte et al., 2001).

Der Einsatz eines höheren Inokulum zur Steigerung der Sensitivität ist meines Erachtens einer zusätzlichen Verstärkung der PBP2a Expression durch eine Induktion mit Oxacillin vorzuziehen, da der Induktionsschritt in vielen Fällen die weitere Subkultivierung der KNS erfordert und damit das definitive Ergebnis um weitere 24 Stunden verzögern kann. Bei primär sterilen Materialien kann der Einsatz von Oxacillin mit der erfolgreichen Anzucht der Bakterien interferieren. Eine verlängerte Agglutinationszeit, zur Verbesserung der Sensitivität (Hussain et al., 2000a), kann hingegen zu falsch-positiven Ergebnissen führen (Zbinden et al., 2001).

Grundsätzlich ähnliche Schwierigkeiten ergaben sich auch bei der Anwendung des LA Testes auf *S. aureus*, wo der LA Test aber überzeugende Ergebnisse hinsichtlich der sensitiven und spezifischen Detektion von MRSA-Isolaten zeigte (Cavassini et al., 1999; Louie et al., 2000; Marriott et al., 1999; Nakatomi und Sugiyama, 1998; van Griethusen et al., 1999; van Leuwen et al., 1999). Es wurde berichtet, daß insbesondere im

Extraktionsprotokoll der Schritt des Erhitzens als kritisch zu sehen sei, um die Zahl der falsch-positiven LA Ergebnisse bei *S. aureus* zu reduzieren (Marriott et al., 1999). Probleme bezüglich der Sensitivität allein (Marriott et al., 1999) als auch bei Sensitivität und Spezifität (Cavassini et al., 1999; van Leuwen et al., 1999) wurden in drei Studien berichtet, die den LA Test an jeweils kleineren Zahlen von KNS-Isolaten untersuchten.

Wie in der vorliegenden Arbeit, kam es auch bei anderen Untersuchern vereinzelt bei KNS-Isolaten zu schwach positiven LA Ergebnissen (Hussain et al., 2000a; Zbinden et al., 2001; Horstkotte et al., 2001). In der vorliegenden Untersuchung wurde der Test bei allen KNS mit schwach-positivem LA Ergebnis wiederholt. Dies führte zu positiven LA Ergebnissen bei allen *mecA*-positiven Isolaten und zu negativen LA Ergebnissen bei nahezu allen *mecA*-negativen Isolaten. In meiner Untersuchung zeigten zwei *mecA*-negative *S. warneri* Isolate ein falsch positives LA Ergebnis (Horstkotte et al., 2001). Andere Untersucher fanden ebenfalls falsch-positive LA Ergebnisse bei *S. lugdunensis*, *S. simulans*, *S. hominis* und *S. warneri* (Andrews et al., 2000; Hussain et al., 2000a; Udo et al., 2000; Zbinden et al., 2001).

Wird der LA Test wiederholt und treten diskrepante Ergebnisse auf, kann die Speziesidentifizierung zu Rate gezogen werden, da alle falsch positiven Ergebnisse bei Nicht-*S. epidermidis* Isolaten beschrieben wurden. Alternativ kann eine unabhängige Referenzmethode durchgeführt werden, die aber weitere Zeit bis zum definitiven Ergebnis benötigt und die gezielte Antibiotikatherapie verzögert.

Der LA Test schnitt beim Nachweis einer Methicillinresistenz bei klinischen KNS-Isolaten, insbesondere bei der am häufigsten aus klinischem Material isolierten Spezies *S. epidermidis*, sehr erfolgreich ab. Falsch positive Ergebnisse traten vorwiegend bei anderen KNS Spezies auf. Aufgrund der raschen Durchführbarkeit des LA Testes, für den ca. 30 Minuten zu veranschlagen sind, eignet sich der LA Test besonders für den Nachweis oder Ausschluss der Methicillinresistenz bei Koagulase-negativen Staphylokokken im klinisch-mikrobiologischen Labor und hat das Potential andere phänotypische Nachweismethoden zu ersetzen.

5. 2. VITEK[®]2

In einer Reihe von Untersuchungen zeigte das VITEK[®]2 System seine Leistungsfähigkeit in der antimikrobiellen Resistenztestung und Speziesidentifizierung bei Enterokokken (Garcia-Garrote et al., 2000; van den Braak et al., 2001; Leclerq et al., 2001; Livermore et

al., 2002; Ligozzi et al., 2002), *Streptococcus pneumoniae* (Jorgensen et al., 2000; Livermore et al., 2002, Goessens et al., 2000; Ligozzi et al., 2002), *Enterobacteriaceae* (Funke et al., 1998; Jossart und Courcol, 1999; Sanders et al., 2000; Ling et al., 2001; Livermore et al., 2002; Perez-Vazquez et al., 2001; Canton et al., 2001; Leclerq et al., 2001), Nonfermentern (Jossart und Courcol, 1999; Sanders et al., 2000; Joyannes et al., 2001; Livermore et al., 2002) und Hefen (Graf et al., 2000).

Vor kurzem wurden Ergebnisse des VITEK[®]2 zum Nachweis einer Methicillinresistenz bei *S. aureus* publiziert, die zeigten, dass dieses System mit sehr hoher Sensitivität und Spezifität diesen Resistenzmechanismus bei Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) erkannte (Sakoulas et al., 2001; Ligozzi et al., 2002). Zum Nachweis der Methicillinresistenz bei KNS existieren bislang nur zwei Untersuchungen - mit jeweils nur einer kleinen Zahl von vorselektierten *mecA*-positiven *S. epidermidis*, *S. hominis* und *S. warneri* Isolaten - (Leclerq et al., 2001; Livermore et al., 2002) und eine Arbeit mit 100 KNS von 11 verschiedenen Spezies (Ligozzi et al., 2002) in denen jeweils eine sehr gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der PCR für *mecA* gefunden wurde. In der letztgenannten Untersuchung wurde aber weder detailliert auf die Isolate mit diskrepanten Ergebnissen, noch auf den OR Test eingegangen.

Der Nachweis einer Methicillinresistenz bei Staphylokokken beruhte bei der älteren Gerätegeneration Vitek[®] ausschließlich auf einer Bestimmung der Oxacillin MHK. In drei kürzlich erschienenen Studien wurde über eine hohe Sensitivität zwischen 95,7 % bis 100 %, aber nur eine eingeschränkte Spezifität zwischen 61% bis 85,5 % berichtet (Louie et al., 2001; Martinez et al., 2001; Yamazumi et al., 2001a). Eine weitere Untersuchung ergab eine ausgezeichnete Spezifität von 100 % und auch die Sensitivität lag bei 89,9 %. Andererseits war die Aussagekraft der letzteren Studie durch den Ausschluss von *S. saprophyticus* Isolaten eingeschränkt (Hussain et al., 1998). Falsch-positive Ergebnisse des Vitek[®] wurden vorwiegend bei *mecA*-negativen *S. saprophyticus* oder *S. lugdunensis* Isolaten mit einer Oxacillin MHK von 0,5 oder 1 µg/ml beobachtet (Louie et al., 2001; Hussain et al., 1998; Martinez et al., 2001; Yamazumi et al., 2001a). Diskrepanzen zwischen dem Ergebnis der PCR für *mecA* und der Oxacillin MHK des Vitek[®] wurden vereinzelt bei *S. cohnii*, *S. sciuri* und *S. capitis* Isolaten mitgeteilt (Martinez et al., 2001). Um die Spezifität des Vitek[®] anzuheben, wurde vorgeschlagen, von vornherein *S. saprophyticus* und *S. lugdunensis* Isolate von der Analyse des Oxacillin MHK Ergebnisses auszuschließen (Louie et al., 2001). Dieser Vorschlag steht in guter Übereinstimmung zu

den Ergebnissen einer Studie, die ausschließlich *S. saprophyticus* Isolate zur Frage der Oxacillin MHK untersuchte. Die untersuchte Stammsammlung umfasste 83 *mecA*-negative *S. saprophyticus* Isolate. Bei der Mehrzahl der Isolate (73 von 83) ergab sich eine Oxacillin MHK von 0,5 µg/ml (Ramotar et al., 2001). In dieser Studie kam es zu einer guten Übereinstimmung der Oxacillin MHK, die mit dem Vitek[®] oder der Mikrodilution bestimmt wurde. Unter Zugrundelegung des aktuellen Oxacillin MHK-Grenzwert der NCCLS hätten jedoch 81 von 83 bzw. 76 von 83 *mecA*-negativen Isolaten als resistent bewertet werden müssen (Ramotar et al., 2001).

Um eine Methicillinresistenz bei Staphylokokken besser zu erkennen, wurde in der neuen Gerätegeneration, dem VITEK[®]2, ein Oxacillin Resistenz (OR) Test eingeführt. Dieser Test ist der Oxacillin Agar Platte nachempfunden, weicht aber laut Angaben des Herstellers bezüglich der Zusammensetzung des Mediums - insbesondere den gewählten Konzentrationen für NaCl und Oxacillin - ab und wird außerdem bei 37 °C inkubiert.

Auf der Basis des aktuellen Oxacillin Grenzwertes der NCCLS (National Committee, 2002) von $\geq 0,5$ µg/ml klassifizierte das VITEK[®]2 119 von 124 *mecA*-positiven KNS-Isolaten korrekterweise als resistent und erkannte eine Empfindlichkeit für Oxacillin bei 60 der 76 *mecA*-negativen Isolate sowohl im OR Test und auch anhand der Oxacillin MHK-Bestimmung (Tabelle 34 und 35) (Horstkotte et al., 2002).

Betrachtet für den alten Oxacillin MHK-Grenzwert der NCCLS von ≥ 4 µg/ml (Tabelle 42) klassifizierte das VITEK[®]2 119 der 124 *mecA*-positiven KNS-Isolate als resistent und 73 der 76 *mecA*-negativen Isolate als empfindlich. Dies resultierte in einer ausgezeichneten Sensitivität von 97,5 % sowie einer Spezifität von 97,3 %. Berechnungen auf der Basis von MHK-Grenzwerten von ≥ 1 µg/ml oder ≥ 2 µg/ml (DIN, 2000) ergaben eine Sensitivität von 98,4 % bzw. 97,5 % sowie eine Spezifität von 84 % bzw. 90,7 % (Tabelle 35) (Horstkotte et al., 2002).

Für die Erkennung der Methicillinresistenz bei KNS mit dem VITEK[®]2 war der OR Test der Oxacillin MHK-Bestimmung überlegen. Der OR Test des Gerätes erzielte eine Sensitivität von 97,5 % und eine Spezifität von 98,7 %. Bemerkenswerterweise waren 14 der 16 Isolate, die eine Empfindlichkeit gegenüber Oxacillin im OR Test aufwiesen, aber eine Oxacillin MHK von $\geq 0,5$ µg/ml hatten, Nicht-*S. epidermidis* Isolate. Diese spezielle Untergruppe bestand aus 6 *S. saprophyticus*, 4 *S. lugdunensis*, 2 *S. cohnii*, 1 *S. xylosus* und 1 *S. hominis* Isolat, aber nur 2 *S. epidermidis* Isolaten. Auffällig war ein großer Anteil Novobiocin-resistenter KNS-Spezies (9 von 16 Isolaten). Nur zwei Isolate (1 *S.*

epidermidis und 1 *S. hominis*), die als indeterminiert klassifiziert wurden, waren tatsächlich *mecA*-positiv, doch 14 von 16 Isolaten waren *mecA*-negativ (Tabelle 34 und 35) (Horstkotte et al., 2002).

Wenn die Resistenztestung von KNS-Isolaten im VITEK[®]2 widersprüchliche Ergebnisse liefert, ist zu empfehlen, dem Resultat des OR Test wegen seiner überlegenen Spezifität zu vertrauen. Eine andere Strategie wäre es, bei KNS-Isolaten mit indeterminierten Ergebnissen die Empfindlichkeit gegenüber Oxacillin von der Speziesidentifizierung oder zumindest der groben Einordnung durch Bestimmung der Novobiocinresistenz abhängig zu machen, da sich die überwiegende Mehrzahl der widersprüchlichen Ergebnisse bei *mecA*-negativen Isolaten aus der *S. saprophyticus* Gruppe und bei *S. lugdunensis* fanden (Tabelle 34 und 35).

Das VITEK[®]2 zeigte in der Untersuchung, dass es sich bei dieser vollautomatisierten Methode mit der Detektion der Methicillinresistenz mittels OR Test und einer Oxacillin MHK-Bestimmung um ein hoch sensitives und spezifisches Verfahren handelt, das auch aufgrund seiner hohen Analysegeschwindigkeit in der Lage ist andere phänotypische Techniken zu ersetzen.

5. 3. BD Phoenix™

Der aktuelle Oxacillin MHK-Grenzwert der NCCLS von $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$ (Tabelle 42) ergab eine exzellente Sensitivität von 99,2 %, aber eine eher niedrige Spezifität von 64,9 %.

Die niedrige Spezifität wurde durch falsch-positive Ergebnisse bei 26 *mecA*-negativen KNS-Isolaten - bestehend aus 11 *S. epidermidis* aber auch 15 Nicht-*S. epidermidis* Isolaten - mit einer Oxacillin MHK im Bereich zwischen 0,5 bis 2 $\mu\text{g/ml}$ hervorgerufen (Tabelle 37 und 38).

Das Spektrum der 15 *mecA*-negativen Nicht-*S. epidermidis* Isolate umfasste 6 *S. saprophyticus*, 4 *S. lugdunensis*, 1 *S. xylosum*, 1 *S. capitis*, 1 *S. haemolyticus*, 1 *S. kloosii*, und 1 *S. cohnii* Isolat (Tabelle 38).

Im Gegensatz dazu zeigte der alte Oxacillin MHK-Grenzwert der NCCLS von $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ (Tabelle 42) eine Sensitivität von 96,7 % und eine ausgezeichnete Spezifität von 100 % (Tabelle 37).

Falsch-negative Ergebnisse fanden sich für den Grenzwert für Resistenz von $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ bei 4 *mecA*-positiven Isolaten, die zwei *S. epidermidis* und einem *S. saprophyticus* Isolat mit

jeweils einer Oxacillin MHK von 2 µg/ml und einem *S. epidermidis* Isolat mit einer Oxacillin MHK von $\leq 0,25$ µg/ml entsprachen (Tabelle 39).

Alternative Oxacillin MHK-Grenzwerte von ≥ 1 µg/ml oder ≥ 2 µg/ml (DIN) klassifizierten 62 der 76 bzw. 70 der 76 *mecA*-negativen Isolate als empfindlich, was zu einer Spezifität von 83,8 % bzw. 94,6 % führte (Tabelle 37, 38). 122 der 124 *mecA*-positiven Isolate wurden jeweils als resistent detektiert, was jeweils eine Sensitivität von 99,2 % ergab (Tabelle 37 und 39).

Keines der untersuchten KNS-Isolate mit einer Oxacillin MHK von 0,5 oder 1 µg/ml war *mecA* positiv oder bildete PBP2a, während 3 der 7 Isolate mit einer Oxacillin MHK von 2 µg/ml positiv für PBP2a und *mecA* waren.

Die Ergebnisse zeigen die hohe Verlässlichkeit des BD PhoenixTM als phänotypische Testverfahren in der Detektion von *mecA*-positiven KNS-Isolaten, die resistent gegen Oxacillin sind. Die Spezifität des BD PhoenixTM hängt vom gewählten Oxacillin MHK-Grenzwert ab. KNS-Isolate mit einer kritischen Oxacillin MHK von 2 µg/ml sollten bezüglich PBP2a oder dem *mecA* Gen nachuntersucht werden.

5.4. Konventionelle phänotypische Nachweisverfahren

Die Standardverfahren zum Nachweis einer Methicillinresistenz sind für KNS weniger präzise als bei MRSA (York et al., 1996). Die Oxacillin MHK liegt bei MRSE in der Regel niedriger als bei MRSA (Marshall et al., 1998; McDonald et al., 1995).

Zahlreiche Untersuchungen, beschrieben eine Diskrepanz zwischen dem Nachweis von *mecA* und den Ergebnissen der Oxacillin MHK-Bestimmung (Cormican et al., 1996; Huang et al., 1993; Marshall et al., 1998; McDonald et al., 1995; Wallet et al., 1996; Tenover et al., 1999).

Beides führte dazu, das die NCCLS 1999 den geltenden Oxacillin MHK-Grenzwert für KNS von ≥ 4 auf $\geq 0,5$ µg/ml senkte (Jorgensen et al., 1999), um eine verbesserte Sensitivität bei der Detektion einer Methicillinresistenz von KNS, insbesondere bei der Spezies *S. epidermidis*, zu erreichen.

In Deutschland gilt hingegen sowohl für KNS als auch für *S. aureus* unverändert der Grenzwert der DIN von ≥ 2 µg/ml (DIN, 2000). Dieser Grenzwert wurde unabhängig von der DIN auch in einer amerikanischen Studie als empfehlenswert vorgeschlagen (York et al., 1995).

Tabelle 42: Oxacillin MHK-Grenzwerte für Resistenz bestimmt durch Mikrodilution

µg/ml	Norm der	Vorgeschlagen in Studien
≥ 0,5	NCCLS, seit 1/1999	Tenover et al., 1999; Marshall et al., 1998
≥ 1		McDonald et al., 1995; Cormican et al., 1996
≥ 2	DIN	York et al., 1995
≥ 4	NCCLS, bis 12/1998	

Verschiedene Studien kamen zu zum Teil einander widersprechenden Befunden bezüglich der Empfindlichkeit und Verlässlichkeit der Oxacillin MHK-Bestimmung. Auch wurden Diskrepanzen bei KNS zwischen dem Agardiffusionstest für Oxacillin oder der Oxacillin-Agar-Platte einerseits und dem Nachweis von *mecA* andererseits beschrieben (Cormican et al., 1996; Huang et al., 1993; Marshall et al., 1998; McDonald et al., 1995; Wallet et al., 1996; Tenover et al., 1999, York et al., 1996).

In dieser Arbeit war der derzeit geltende Oxacillin MHK-Grenzwert der NCCLS von $\geq 0,5$ µg/ml - ermittelt durch Mikrodilution gemäß den Empfehlungen der NCCLS (Tabelle 3) für eigentlich alle KNS-Spezies von eingeschränkter Spezifität von nur 12 %, aber von einer maximalen Sensitivität von 100 % (Horstkotte et al., 2001). Ein großer Teil der verminderten Spezifität ist jedoch durch falsch-positive Ergebnisse bei *mecA*-negativen Staphylokokken verursacht, die nicht der Spezies *S. epidermidis* angehören.

Von dem aktuell geltenden Oxacillin MHK-Grenzwert der NCCLS ausgehend, führte die Oxacillin MHK-Bestimmung mit der Mikrodilution in der untersuchten Stammsammlung zu einer Fehleinschätzung von 66 aller 75 *mecA*-negativer KNS-Isolate als resistent gegenüber Oxacillin. Dies betraf 32 der 40 *mecA*-negativen *S. epidermidis* Isolate und 34 der 35 *mecA*-negativen Nicht-*S. epidermidis* Isolate. Unter Zugrundelegen des alten Oxacillin MHK-Grenzwertes der NCCLS von ≥ 4 µg/ml (Tabelle 42) würde nur ein *mecA*-positiver *S. epidermidis* als empfindlich interpretiert und ein *mecA*-negativer *S. kloosii* wäre fälschlich als resistent klassifiziert worden, was sowohl eine ausgezeichnete Sensitivität von 99,2 % als auch eine Spezifität von 99,3 % ergeben hätte.

Bei der Durchführung der Mikrodilution entsprechend den von Wiedemann (Wiedemann, 1992) empfohlenen Kautelen (Tabelle 3) und der Bewertung der Testergebnisse anhand des nach DIN empfohlenen Oxacillin MHK-Grenzwertes von ≥ 2 µg/ml (DIN, 2000) (Tabelle 42) wurde 1 *mecA*-positiver *S. saprophyticus* mit einer Oxacillin MHK von 1 µg/ml fälschlicherweise als empfindlich gegenüber Oxacillin bewertet, während falsch-

positive Ergebnisse bei 5 der 75 *mecA*-negativen KNS-Isolate beobachtet wurden. Hierbei handelte es sich um je 1 *mecA*-negativen *S. saprophyticus*, *S. cohnii* und *S. kloosii* sowie 2 *mecA*-negative *S. epidermidis* mit einer Oxacillin MHK von 2 µg/ml. Es ergab sich somit eine Sensitivität von 99,2 % und eine Spezifität von 93,3 %.

In den durchgeführten Untersuchungen bewährten sich die konventionellen phänotypischen Verfahren, wenngleich das Tempo bei der Detektion einer Methicillinresistenz keine schnelle Befundmitteilung erlaubt. Es fand sich ein Inokulumeffekt für die Screeningplatten, wobei die Standardplatte mit 4 % NaCl und 6 µg/ml Oxacillin bei 35° C und einem hohen Inokulum am besten abschnitt und nach 18 bzw. 24 Stunden eine Sensitivität von 86,5 % und nach 48 Stunden von 99,2 % aufwies, bei einer Spezifität von 98,7 % nach 18 bzw. 24 Stunden und von 96 % nach 48 Stunden.

In einigen anderen Untersuchungen bewährte sich der neue Grenzwert der NCCLS, wenn das Augenmerk auf *S. epidermidis* Isolate, als am häufigsten isolierten Infektionserreger, sowie *S. haemolyticus* und *S. hominis* gelegt wurde (National Committee, 2002; Tenover et al., 1999; Gradelski et al., 2001; Hussain et al., 1998), war aber wenig präzise bei seiner Bewertung von Isolaten der Spezies *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis*, *S. cohnii*, *S. warneri* und *S. xylosus* (Tenover et al., 1999; Hussain et al., 2000b; Gradelski et al., 2001; Louie et al., 2001).

Auch der Agardiffusionstest mit einem 1 µg Oxacillinplättchen schnitt sehr erfolgreich ab und wies unter NaCl-Supplementierung des Agar eine Sensitivität von bis zu 99 % auf und war auch mit 80 % bis fast 90 % auch bei üblicherweise kritischen Spezies wie *S. saprophyticus* oder *S. lugdunensis* vergleichsweise spezifisch. Modifikationen des getesteten Antibiotikums im Agardiffusionstest waren nicht zusätzlich hilfreich.

Tabelle 43: Grenzwerte für Resistenz gegenüber Oxacillin im Agardiffusionstest

		resistent	intermediär	sensibel
DIN	KNS und <i>S. aureus</i>	15 mm		16 mm
NCCLS	für KNS, aktuell	17 mm		18 mm
	für <i>S. aureus</i> (für KNS bis 12/1998)	10 mm	11-12 mm	13 mm

Baker et al., untersuchte den Effekt eines NaCl Zusatzes zum Testmedium für die Mikrodilution, die Agardilution und den E-Test an 133 KNS von 8 Spezies. Die beste Übereinstimmung mit dem Nachweis von *mecA* fand sich bei einem Zusatz von 2 % NaCl und wurde daher für die phänotypischen Methoden empfohlen. Ohne NaCl-Zusatz ergab sich eine schlechtere Sensitivität, während der Zusatz von 4 % oder 5 % NaCl zu Lasten einer schlechteren Spezifität ging (Baker et al., 1994).

Knapp et al., untersuchte 47 ausgesuchte *S. epidermidis*, die sowohl genetisch (in der Hybridisierung *mecA*-positiv) als auch phänotypisch (Wachstum auf der Oxacillin-Agar-Platte und Resistenz in der Mikrodilution) als Methicillin-resistent charakterisiert waren im Agardiffusionstest. Getestet wurde auf Mueller-Hinton-Agar bei 35° C für 24 Stunden und anschließend für weitere 24 Stunden bei 22° C mit einem Inokulum von 10⁷ KBE sowie einem erhöhten Inokulum von 10⁹ KBE. Die Sensitivität lag mit dem Inokulum von 10⁷ KBE nach 24 Stunden bei nur 87 % und erreichte nach 48 Stunden 89 %, während ein höheres Inokulum bereits nach 24 Stunden zu einer Sensitivität von 100 % führte (Knapp et al., 1994).

McDonald et al., berichtete über eine trimodale Verteilung der Oxacillin MHK bei *S. epidermidis* mit einem hohen Prozentsatz von 31 % der Isolate, die eine Oxacillin MHK zwischen 0,5 und 2 µg/ml aufwiesen. Im Gegensatz dazu fand er in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen eine distinkte Oxacillin MHK Verteilung bei *S. aureus*, eine Spezies die entweder sehr resistent (MHK ≥ 8 µg/ml) oder sehr sensibel (MHK ≤ 0,5 µg/ml) ist (Archer und Pennell, 1990; Ubukata et al., 1992; McDonald et al., 1995). An 37 ausgewählten *S. epidermidis* Isolaten wurde der *mecA*-Nachweis durch Hybridisierung mit der Oxacillin MHK-Bestimmung und dem Agardiffusionstest mit einem 1 µg Oxacillinplättchen verglichen. Ein Grenzwert von ≥ 1 µg/ml zeigte für die *S. epidermidis* Isolate eine Sensitivität von 85,7 % und eine Spezifität von 100 %, ein Grenzwert von 0,5 µg/ml hingegen eine Sensitivität von 100 % bei einer Spezifität von 87,5 %. Am besten zwischen *mecA*-positiven und *mecA*-negativen Isolaten trennte ein Hemmhofdurchmesser von ≥ 18 mm = sensibel (McDonald et al., 1995).

Wallet et al., verglich den Nachweis von *mecA* mittels PCR mit dem Agardiffusionstest bei 100 KNS von 7 verschiedenen Spezies, wobei *S. epidermidis* mit 81 von 100 Isolaten eindeutig überwog. Getestet wurde entsprechend der Empfehlungen der NCCLS (1 µg Oxacillin, 24 Stunden, 35° C, Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl), wobei der zugrunde gelegte, für *S. aureus* empfohlene Grenzwert von ≥ 13 mm = sensibel sowohl für alle KNS

und auch nur für *S. epidermidis* betrachtet eine Sensitivität von 91 % und eine Spezifität von 83 % erbrachte (Wallet et al., 1996).

York et al., testete 142 KNS von 11 verschiedenen Spezies, wobei 32 % der Isolate, verteilt auf 4 Spezies, *mecA*-positiv waren. Der Vergleich umfasste die *mecA*-PCR als Goldstandard, den Agardiffusionstest mit einem 1 µg Oxacillin Plättchen (Grenzwert ≥ 17 mm = sensibel), getestet auf Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl Zusatz, die Oxacillin MHK-Bestimmung in der Mikrodilution unter Zusatz von 2 % NaCl zur Mueller-Hinton-Bouillon und die Oxacillin-Agar-Platte. Alle phänotypischen Verfahren wurden bei 35° C für 24 und 48 Stunden inkubiert. Es ergab sich für den Agardiffusionstest nach 24 bzw. 48 Stunden eine Sensitivität von 84 % bzw. 82 % und eine Spezifität von 89 % bzw. 81 %. Die schlechte Spezifität war weitestgehend auf als intermediär oder resistent bewertete *mecA*-negative *S. saprophyticus* ohne Wachstum auf der Oxacillin-Agar-Platte zurückzuführen. Die Oxacillin-Agar-Platte schnitt bei der verlängerten Inkubation besser ab. Nach 24 ergab sich zwar nur eine Sensitivität von 70 %, lag aber nach 48 Stunden bei 100 %. Die Spezifität lag zu beiden Zeitpunkten bei 100 %. Hinsichtlich der Sensitivität war die Oxacillin MHK-Bestimmung sowohl für eine Grenzwert von ≥ 4 µg/ml (50 % bzw., 77 %) als auch ≥ 2 mg/ml (68 % bzw., 89 %) der Agardiffusion und der Oxacillin-Agar-Platte unterlegen. Jedoch betrug die Spezifität nach 24 Stunden jeweils 100 % und war nach 48 Stunden mit 97 % und 100 % nur geringfügig schlechter. Aufgrund des günstigeren Abschneidens des niedrigeren Grenzwertes von ≥ 2 mg/ml wurde dieser als geänderter Standard inauguriert. Auf alternative noch niedrigere Oxacillin MHK-Grenzwerte von ≥ 1 und $\geq 0,5$ µg/ml wurde nicht eingegangen. Nach 24 Stunden hätte sich jedoch eine Sensitivität von 88,9 % bzw. 91,1 % und eine Spezifität von 91,8 % und 80,4 % errechnet (York et al., 1996).

Jarløv et al., untersuchte verschiedene Varianten des Agardiffusionstest zum Nachweis einer Methicillinresistenz bei 359 KNS aus mindestens 7 Spezies, wobei für 58 Isolate keine abschließende Identifizierung erfolgte. Als Referenzmethode fungierte der *mecA*-Nachweis durch Southern Blot bei 164 der 359 Isolate sowie eine anhand des *mecA*-Nachweises abgeglichene Methode der MHK-Bestimmung von Methicillin in der Agardilution für die übrigen 155 Isolate. Für die Testung eines 1 µg Oxacillin Plättchen auf Mueller-Hinton-Agar (Grenzwert ≥ 18 mm = sensibel) bei 35° C fand sich für die *S. epidermidis* Isolate nach 18 Stunden eine Sensitivität für die 95,7 % und nach 44 Stunden von 96,8 %. Die Sensitivität bei Nicht-*S. epidermidis* Isolaten lag mit 84,1 % zu beiden

Zeitpunkten deutlich niedriger. Die Spezifität war nach 18 Stunden höher als nach 44 Stunden und lag bei *S. epidermidis* Isolaten bei 96,4 % bzw. 93,7 %. Auch hinsichtlich der Spezifität schnitten Nicht-*S. epidermidis* Isolate mit 91,9 % nach 18 Stunden und nur 85,6 % nach 44 Stunden schlechter ab (Jarløv et al., 1997).

Frebourg et al., verglich bei 76 *mecA*-positiven KNS (keine Speziesdifferenzierung) die *mecA*-PCR mit der Oxacillin-Agar-Platte (Inkubation bei 35° C für 48 Stunden) und dem Agardiffusionstest mit einem 5 µg Oxacillin Testplättchen (Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl, 30° C, 48 Stunden). Als Grenzwert für sensibel wurden ≥ 20 mm zugrunde gelegt. Mit der Oxacillin-Agar-Platte wurden 4 von 76 und mit dem Agardiffusionstest 7 von 76 Isolaten nicht detektiert, was eine Sensitivität von 94,7 % bzw. 90,8 % ergab (Frebourg et al., 1998).

Hussain et al., untersuchte in einer weiteren Arbeit den Nachweis der Methicillinresistenz an 181 KNS von 7 Spezies, wobei das Hauptaugenmerk wiederum auf *S. epidermidis* mit 132 Isolaten lag. Neben zwei älteren automatisierten Verfahren der antimikrobiellen Resistenztestung (Vitek 1 und MicroScan) wurde ein 1 µg Oxacillin Plättchen im Agardiffusionstest auf Mueller-Hinton-Agar (Grenzwert ≥ 18 mm = sensibel) und die Oxacillin-Agar-Platte mit dem Ergebnis einer *mecA*-PCR verglichen. Die beiden konventionellen Verfahren wurden bei 35° C für 24 und 48 Stunden inkubiert. Die Spezifität der beiden Verfahren lag zu beiden Untersuchungszeitpunkten bei 100 %, jedoch war die Oxacillin-Agar-Platte aufgrund ihrer besseren Sensitivität mit 66,7 % nach 24 Stunden und 89,9 % nach 48 Stunden dem Agardiffusionstest mit einer Sensitivität von nur 41,4 % bzw. 77,7 % überlegen. Als Strategie, um eine bessere Sensitivität bei der Detektion *mecA*-positiver Isolate zu erreichen wurde eine Kombination von verschiedenen phänotypischen Verfahren empfohlen (Hussain et al., 1998).

Kohner et al., berichtete von der Testung von 58 KNS-Isolaten ohne nähere Speziesidentifizierung, deren *mecA*-PCR Resultat mit den phänotypischen Verfahren Agardilution, Agardiffusion und der Oxacillin-Agar-Platte bei der Detektion einer Methicillinresistenz verglichen wurde (Kohner et al., 1999). Der Agardiffusionstest mit einem 1 µg Oxacillinplättchen wurde bei 35° C untersucht. Je nach untersuchtem Testmedium ergab sich nach 24 Stunden eine Sensitivität von 90 % bzw. 86,2 % und nach 48 Stunden von 93 %. Die Spezifität lag nach 24 Stunden bei jeweils 74 ,1 % und lag abhängig vom Hersteller des Mediums nach 48 Stunden bei 66,7 % bzw. 70,4 %. Der Oxacillin-Agar-Platte (4 % NaCl, 6 µg/ml Oxacillin) wies unter den 12 verschiedenen

Modifikationen nahezu immer eine Spezifität von 100 % auf, während die Sensitivität nach 24 Stunden zwischen 40 % bis 70 % und nach 48 Stunden zwischen 63,3 % und 96,3 % lag. Es fand sich kein klarer Vorteil zwischen der Inkubation bei 30° C oder 35° C. In der Agardilution zeigte sich ein klarer Vorteil bezüglich der Sensitivität, wenn der Mueller-Hinton-Agar mit 2 %, besser noch mit 4 % NaCl supplementiert wurde (Kohner et al., 1999).

In einer Multicenterstudie von 11 Laboratorien von **Tenover et al.**, wurden anhand von 50 ausgewählten KNS-Isolaten von 8 Spezies Modifikationen des Agardiffusionstest, die Oxacillin MHK-Bestimmung in der Mikrodilution und der Oxacillin-Agar-Platte mit der *mecA*-PCR verglichen (Tenover et al., 1999). Durch die Wahl eines Oxacillin MHK-Grenzwertes für resistent von $\geq 0,5\mu\text{g/ml}$ statt $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ stieg die Sensitivität *mecA*-positive Isolate zu detektieren von 26 % bis 62 % auf 84 % bis 94 % an, andererseits sank die Spezifität dieser Methode von 98 % bis 100 % auf 73 % bis 81 % (Tenover et al., 1999). Falsch klassifizierte Stämme waren bei *mecA*-positiven Isolaten selten, das Hauptproblem lag in einer Reihe von falsch-positiven Resultaten bei *mecA*-negativen *S. warneri*, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis* und *S. capitis* Isolaten (Tenover et al., 1999).

Mit der Intention, durch einen neuen Grenzwert *mecA*-positive *S. epidermidis* optimal aufzuspüren wurde eine Änderung des geltenden Grenzwertes vorgeschlagen (Tenover et al., 1999), der von der NCCLS auch übernommen wurde (Jorgensen et al., 1999; National Committee, 2002).

Ein wichtiger Aspekt, der eine Reihe von Unterschieden zwischen den Studien erklären könnte, war der bemerkte Einfluss des Mediums auf die Ergebnisse der Oxacillin MHK. Während dieser Effekt für *mecA*-negative *S. epidermidis* vernachlässigbar war, zeigte sich eine signifikante Varianz bei allen *mecA*-positiven Isolaten, sowie den *mecA*-negativen Isolaten von anderen KNS-Spezies außer *S. epidermidis*.

Als ein weiterer Faktor, der die Detektion der Methicillinresistenz bei KNS erschweren könnte, wurde beobachtet, dass viele teilnehmende Labore unabsichtlich ein niedrigeres Inokulum als empfohlen einsetzten. Vor dem Hintergrund der oftmals sehr heterogenen Expression der Methicillinresistenz bei KNS könnte dies eine Möglichkeit sein, die Sensitivität der Nachweisverfahren zu verbessern. Ein solcher Inokulumeffekt ließ sich auch in der vorliegenden Arbeit beim Vergleich der Oxacillin MHK-Bestimmung beobachten.

Anhand der Ergebnisse der *mecA*-PCR und der Oxacillin MHK-Bestimmung - unter

Zugrundelegen des neuen Grenzwerts - wurde nach dem am besten korrelierenden Grenzwert für den Agardiffusionstest gesucht. Am günstigsten schnitt ein Hemmhofdurchmesser für sensibel von ≥ 18 mm sensibel ab. Auch dieser Vorschlag wurde von der NCCLS übernommen (National Committee, 2002; Jorgensen et al., 1999), wobei auch im Agardiffusionstest dieselben Spezies-abhängigen Probleme, wie für die Oxacillin MHK-Bestimmung beschrieben, auftraten (Tenover et al., 1999).

Die Oxacillin-Agar-Platte - inkubiert bei 35°C - wies eine unbefriedigende Sensitivität nach 24 Stunden für *S. epidermidis* Isolate mit Werten zwischen 15,7 % und 62,6 % und für Nicht-*S. epidermidis* Isolate mit Werten zwischen 45 % und 59,2 % auf. Auch nach 48 Stunden ließen sich eine maximale Sensitivität von nur 81,3 % bzw. 73,3 % erreichen. Dies führte zu der Empfehlung generell keine Oxacillin-Agar-Platte bei KNS zu verwenden (Tenover et al., 1999). Im Gegensatz dazu schnitt die Oxacillin-Agar-Platte in einer Studie von York (York et al., 1996) und in meiner Untersuchung vorteilhaft ab.

Hussain et. al. beobachtete, dass bei 70 von 74 *mecA*-negativen Isolaten der fünf Spezies *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis*, *S. cohnii*, *S. warneri* und *S. xylosus* die mit dem Verfahren der Agardilution bestimmte Oxacillin MHK $\geq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ lag. Andererseits klassifizierte der neue NCCLS Grenzwert 147 *mecA*-negative sowie 233 *mecA*-positive Isolate der Spezies *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* und *S. hominis* zu 100 % richtig. Auch bei den Spezies *S. schleiferi*, *S. capitis* und *S. simulans* wurden keine falsch-positiven Ergebnisse beobachtet. Es wurden allerdings nur 29 *mecA*-negative Isolate dieser drei letztgenannten Spezies untersucht (Hussain et al., 2000b). Wäre in dieser Arbeit der alte Grenzwert der NCCLS von ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ (Tabelle 42) angelegt worden, hätte dieses Vorgehen insbesondere die Sensitivität in der Detektion *mecA*-positiver *S. epidermidis* (17 von 164) und *mecA*-positive *S. hominis* (8 von 44) beeinträchtigt. Auch 2 *mecA*-positive *S. saprophyticus* und 1 *mecA*-positiver *S. cohnii* wäre nicht erkannt worden. Die Spezifität hätte jedoch bei den 493 KNS von insgesamt 11 Spezies 100 % betragen. Wäre der in Deutschland geltende Grenzwert von ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ als Richtschnur dieser Untersuchung herangezogen worden, hätte sich eine Sensitivität 92,6 % und Spezifität von 96 % ergeben. Die beobachteten Fehler waren abhängig von der KNS-Spezies. Falsch-negative Ergebnisse hätten aus dem fehlenden Erkennen einer Methicillinresistenz bei 11 von 164 *mecA*-positiven *S. epidermidis* und bei 5 von 44 *mecA*-positiven *S. hominis* resultiert. Falsch-positive Beurteilungen wären bei 9 *mecA*-negativen *S. cohnii* mit einer Oxacillin MHK von 2 $\mu\text{g/ml}$, sowie 1 *mecA*-negativer *S. saprophyticus* mit einer Oxacillin MHK

von 0,5 µg/ml aufgetreten (Hussain et al., 2000b).

Graham et al., verglich die Detektion einer Methicillinresistenz durch den Agardiffusionstest sowie E-Test mit dem Nachweis des *mecA* Gens mittels PCR. 42 nicht näher identifizierte KNS (33 *mecA*-positive und 9 *mecA*-negative Isolate) wurden auf Columbia-Agar (ohne und mit 2 % NaCl) mit einem 1 µg Oxacillin Testplättchen, einem 5 µg Methicillinplättchen und Methicillin E-Test untersucht. Für das 1 µg Oxacillin Testplättchen ergab sich unabhängig von einer Supplementierung des Agar mit NaCl sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden eine Sensitivität von 97 %, wenn ein Grenzwert von ≤ 15 mm = resistent gewählt wurde. Mit einem Grenzwert von ≤ 14 mm = resistent wies auch das 5 µg Methicillin Testplättchen eine Sensitivität von 97 % in der Mehrzahl der gewählten Untersuchungsbedingungen auf, wobei ohne NaCl-Zusatz im Columbia-Agar nach 24 Stunden nur eine Sensitivität von 78,8 % bestand. Für die Detektion einer Methicillinresistenz war der Methicillin E-Test dem Agardiffusionstest unterlegen, wobei der Effekt einer Supplementierung des Agar mit NaCl nicht untersucht wurde. Die Spezifität der drei Verfahren war vergleichbar und bewegte sich zwischen 88,9 % nach 48 Stunden und ohne NaCl im Medium und 100 % nach 24 Stunden auf NaCl-supplementiertem Columbia-Agar (Graham et al., 2000).

Gradelski et al., verglich den Nachweis von *mecA* mittels PCR mit der Bestimmung der Oxacillin MHK in der Agardilution bei 287 KNS von 9 Spezies. Der aktuelle Grenzwert der NCCLS von $\geq 0,5$ µg/ml wies bei den 114 *mecA*-positiven Isolaten der Spezies *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. simulans* und *S. capitis* eine Sensitivität von 100 % auf. Die Spezifität bei den 91 Isolaten dieser Spezies war nur bei *S. epidermidis* und *S. haemolyticus* mit 100 % sehr gut, während er bei den übrigen 4 Spezies zwischen 64 % und 35 % lag. Deutlich schlechter lag die Spezifität mit Ergebnissen zwischen 0 % und 16 % bei den 82 *mecA*-negativen Isolaten aus der *S. saprophyticus*-Gruppe. Der ehemalige Grenzwert der NCCLS von ≥ 4 µg/ml (Tabelle 42) hätte eine deutlich gesteigerte Spezifität ergeben, wobei diese für *S. capitis* (50 %) und *S. cohnii* (70 %) noch nicht befriedigend gewesen wäre. Die übrigen Spezies wiesen eine Spezifität zwischen 94 % und 100 % auf. Als Nachteil dieses hohen Grenzwertes wären Abstriche in der Detektion *mecA*-positiver *S. epidermidis* und *S. hominis* mit einer Sensitivität von nur noch 87 % bzw. 61 % zu nennen. Bei Zugrundelegen des in Deutschland geltenden Grenzwertes von ≥ 2 µg/ml ließe sich die Sensitivität bei den aus klinischem Material häufig isolierten Spezies *S. epidermidis* und *S. hominis* auf 98,7 % bzw. 92,3 % anheben,

während die Spezifität im Vergleich zum Grenzwert von $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ unverändert hoch bliebe (Gradelski et al., 2001).

Louie et al. untersuchte 200 KNS aus 12 verschiedenen Spezies, wobei auch eine größere Zahl von kritischen Spezies wie *S. saprophyticus* (n=37), *S. capitis* (n=10), *S. warneri* (n=10) und *S. lugdunensis* (n=3) in der Studienpopulation vorlag. Bei einer Inkubationstemperatur von 35°C wurden der Agardiffusionstest mit einem $1 \mu\text{g}$ Oxacillin Plättchen auf Mueller-Hinton-Agar (Grenzwert $\geq 18 \text{ mm}$ = sensibel), die Oxacillin MHK-Bestimmung in der Mikrodilution mit 2 % NaCl Zusatz sowie die Oxacillin-Agar-Platte nach 24 Stunden im Vergleich zum Ergebnis der *mecA*-PCR ausgewertet. Die Oxacillin-Agar-Platte schnitt mit einer Sensitivität von 100 % und einer Spezifität von 99 % überlegen ab, während der Agardiffusionstest und die Oxacillin MHK mit einer Sensitivität von 98 % bzw. 100 %, aber einer Spezifität von 62 % und 60 % schlechtere Ergebnisse lieferte. Der Grenzwert der Oxacillin MHK-Bestimmung von $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$ zeitigte falsch-positive Ergebnisse bei allen *mecA*-negativen *S. saprophyticus* und *S. lugdunensis*, aber auch 2 *S. capitis*, 2 *S. warneri* und 1 *S. xylosus*. Als Ausweg wurde vorgeschlagen *S. saprophyticus* und *S. lugdunensis* Isolate bei der Bewertung von Oxacillin MHK Ergebnissen auszuklammern. Aus den Daten ließe sich jedoch noch ein weiterer Weg ableiten. Ein Grenzwert von $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ hätte eine Sensitivität von 90,5 % und eine Spezifität von 98,3 % ergeben. 7 *mecA*-positive *S. epidermidis* und 1 *mecA*-positiver *S. sciuri* wären nicht detektiert worden, wobei *mecA* bei allen *S. sciuri* zu detektieren, aber nie funktionell aktiv ist. Falsch-positive Resultate hätte der von der DIN empfohlene Grenzwert nur bei je einem *mecA*-negativen *S. epidermidis* und *S. capitis* erbracht (Louie et al., 2001).

Martinez et al., beobachtete für den Agardiffusionstest eine Sensitivität von 97,6 % und eine Spezifität von 88,2 % bei der Detektion der Methicillinresistenz im Vergleich zur *mecA*-PCR. Getestet wurden 202 KNS-Isolate von 11 Spezies, wobei die Mehrheit mit 155 Isolaten *S. epidermidis*, gefolgt von *S. hominis* (n=15) und *S. haemolyticus* (n=10) darstellte, mit einem $1 \mu\text{g}$ Oxacillin Plättchen auf Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl Zusatz bei 35°C für 24 Stunden. Zugrunde gelegt wurde entsprechend den Kriterien der NCCLS ein Grenzwert von $\geq 18 \text{ mm}$ = sensibel. Falsch-positive Resultate fanden sich bei 9 der 76 *mecA*-negativen Isolaten, nämlich Isolaten der Spezies *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis*, *S. cohnii*, *S. sciuri* und *S. capitis*, während die drei nicht detektierten *mecA*-positiven Isolate den Spezies *S. epidermidis* und *S. hominis* angehörten (Martinez et al., 2001).

Yamazumi et al., verglich an 123 ausgewählten KNS, die 8 verschiedene Spezies umfassten, den Nachweis einer Methicillinresistenz mittels *mecA*-PCR mit der Bestimmung der Oxacillin MHK in der Mikrodilution. Alle 95 *mecA*-positiven Isolate wurden aufgrund eines Oxacillin MHK-Grenzwertes von $\geq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ korrekt als Methicillin-resistent beurteilt, während 6 *mecA*-negative Stämme (jeweils 2 *S. saprophyticus*, 2 *S. lugdunensis* und 2 *S. warneri*) mit einer Oxacillin MHK zwischen 0,5 und 2 $\mu\text{g/ml}$ fälschlich als resistent klassifiziert wurden. Dies resultierte in einer Sensitivität für den gewählten Grenzwert von 100 %, aber einer Spezifität von nur 78,5 %. Die Verteilung der Oxacillin MHK Ergebnisse wurde nicht detailliert dargestellt, so dass alternative Grenzwerte sich nicht berechnen ließen, aber mindestens 2 *mecA*-positive Isolate wiesen nur eine Oxacillin MHK von 1 $\mu\text{g/ml}$ auf (Yamazumi et al., 2001a).

Tabelle 44: Untersuchungen zu phänotypischen Nachweisverfahren für die Methicillinresistenz bei Koagulase-negative Staphylokokken

Autor	Jahr	Isolate	untersuchte KNS	Goldstandard	verglichene Methode
Baker	1994	133	8 Spezies	<i>mecA</i> , Mikrodilution	Mikrodilution, Agardilution, E-Test
Knapp	1994	47	<i>S. epidermidis</i>	<i>mecA</i> , OAS* ¹ , Populations-Analyse, Mikrodilution	Vitek, Agardiffusion (Inokulum 10 ⁷ und 10 ⁹ CFU)
McDonald	1995	37	<i>S. epidermidis</i>	<i>mecA</i>	Mikrodilution
Wallet	1996	100	7 Spezies	<i>mecA</i>	Agardiffusion, Agardilution
York	1996	142	11 Spezies	<i>mecA</i>	Mikrodilution, Agardiffusion, OAS
Jarløv	1997	359	KNS	<i>mecA</i>	Agardilution, Agardiffusion
Frebourg	1998	76	KNS	<i>mecA</i>	OAS, E-Test, Agardiffusion, Vitek
Hussain	1998	181	7 Spezies	<i>mecA</i>	Agardiffusion, OAS, Vitek
Kohner	1999	58	KNS	<i>mecA</i>	Agardiffusion, Agardilution, OAS
Tenover	1999	50	8 Spezies	<i>mecA</i>	Agardiffusion, Mikrodilution, OAS
Hussain	2000b	454	11 Spezies	<i>mecA</i>	Agardilution
Graham	2000	42	KNS	<i>mecA</i>	Agardiffusion, E-Test
Gradelski	2001	287	9 Spezies	<i>mecA</i>	Agardilution
Louie	2001	200	12 Spezies	<i>mecA</i>	Agardiffusion, Mikrodilution, OAS, E-Test, PBP2a-Nachweis* ²
Martinez	2001	202	11 Spezies	<i>mecA</i>	Agardiffusion, Vitek
Yamazumi	2001a	123	8 Spezies	<i>mecA</i>	Mikrodilution, Vitek, PBP2a-Nachweis

*¹ OAS = Oxacillin-Agar-Platte, *² PBP2a-Nachweis mittels des Latexagglutinationstest

Möglicherweise ist ein differenzierter, von der gefundenen KNS-Spezies abhängiger Oxacillin MHK-Grenzwert geeigneter, der für *S. saprophyticus* und *S. lugdunensis* bei ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ (Hussain et al., 2000b; Tenover et al., 1999; York et al., 1996) und bei $\geq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ für *S. epidermidis* (National Committee, 2002; Marshall et al., 1998) liegen könnte.

Diese Idee findet ihr Korrelat in den Ergebnissen von einer Stammsammlung von 83 *S. saprophyticus* Isolaten. Mittels Mikrodilution, Agardilution und auch Oxacillin MHK-Bestimmung mit dem Vitek1[®] fand sich eine Oxacillin MHK von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ bei 73 von 83, 77 von 83 oder 81 von 83 *mecA*-negativen Isolaten (Ramotar et al., 2001). Zwar gab es eine gute Korrelation zwischen den genannten Methoden, doch unter Zugrundelegen des aktuellen Oxacillin MHK-Grenzwert hätte die Mehrheit dieser *mecA*-negativen Isolate (81 in der Agardilution oder dem Vitek1[®] und 76 in der Mikrodilution) als resistent eingestuft werden müssen (Ramotar et al., 2001). Ein Grenzwert von ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ hingegen, wie ihn die DIN (DIN, 2000) vorsieht, hätte für die drei Verfahren eine Spezifität von jeweils 100 % ergeben.

In der gleichen Untersuchung wurde auch das Abschneiden eines 1 μg Oxacillin Plättchens auf Mueller-Hinton-Agar ohne NaCl bei 35° C untersucht. Auch hier ergab sich eine sehr schlechte Spezifität. Ein Hemmhofdurchmesser von ≤ 17 mm = resistent bzw. von ≤ 12 mm = nicht sensibel hätte 83 von 83 bzw. 71 von 83 der *mecA*-negativen Stämme fälschlicherweise als Methicillin-resistent klassifiziert.

Dies deckt sich mit den Beobachtungen anderer Untersucher, die mit konventionellen als auch automatisierten Testverfahren wie dem Vitek1[®] - insbesondere mit den Spezies *S. saprophyticus* und *S. lugdunensis* - falsch-positive Resultate erhielten (Louie et al., 2001; Hussain et al., 1998; Martinez et al., 2001; Yamazumi et al., 2001a). Andererseits wurden beim Vitek1[®] auch abweichende Resultate zwischen der PCR für *mecA* und dem Vitek1[®] Ergebnis vereinzelt bei *S. cohnii*, *S. sciuri* und *S. capitis* Isolaten beobachtet (Martinez et al., 2001).

Die Richtlinien der NCCLS empfehlen seit 2001 die routinemäßige Empfindlichkeitsprüfung von *S. saprophyticus* Stämmen gegenüber Oxacillin nicht mehr, weil unkomplizierte Harnwegsinfektionen in der Regel auf eine Therapie mit Trimethoprim/Sulfamethoxazole oder Fluorchinolonen gut ansprechen (National Committee, 2002).

Aber weder der Ausschluss von *S. saprophyticus* und *S. lugdunensis* Isolaten von der Analyse, noch die vor kurzem publizierte Empfehlung der NCCLS alle KNS-Isolate, die

Nicht-*S. epidermidis* sind und schwere Infektionen verursachen, auf das Vorhandensein von PBP2a oder *mecA* zu testen, und alle diejenigen Isolate, denen diese Marker fehlen, als empfindlich für Oxacillin zu betrachten, beantworten die Frage nach dem optimalen Oxacillin MHK-Grenzwert.

So gehörten in dieser Untersuchung bei der Evaluation des BD Phoenix™ 11 der 26 *mecA*-negativen Isolate mit einer Oxacillin MHK von 0,5 bis 2 µg/ml zu der Spezies *S. epidermidis*, während der Latexagglutinationstest für PBP2a sowohl in der vorgelegten Untersuchung als auch in anderen Studien durch falsch-positive Resultate bei *mecA*-negativen *S. warneri*, *S. lugdunensis*, *S. simulans* und *S. hominis* Isolaten, nicht jedoch bei *S. epidermidis* Isolaten, auffiel (Andrews et al., 2000; Horstkotte et al., 2001; Udo et al., 2000; Zbinden et al., 2001; Hussain et al., 2000a).

Die molekularen Grundlagen einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Oxacillin bei *mecA*-negativen KNS Stämmen wie z. B. bei *S. lugdunensis* oder *S. saprophyticus* liegen noch weitgehend im Dunkeln und bedürfen weitergehender Untersuchungen. Als ein Erklärungsansatz wurde eine Veränderung von anderen Penicillin-bindenden Proteine als PBP2a, wie für einzelne KNS-Isolate der Spezies *S. haemolyticus* und *S. saprophyticus* gezeigt, postuliert (Suzuki et al., 1992; Tenover et al., 1999).

Es stellt sich daher erstens die Frage, ob bei dieser Konstellation eine Empfindlichkeit des entsprechenden Stammes für Oxacillin und andere Staphylokokken-wirksame Isooxazyloxylicilline wirklich besteht und zweitens ist die Frage offen, ob Penicillinase-feste Penicilline erfolgreich in der Therapie einer schweren Infektion, verursacht durch solche *mecA*-negativen KNS-Isolate mit einer Oxacillin MHK zwischen 0,5 bis 2 µg/ml, eingesetzt werden können (Tenover et al., 1999).

Klinische Studien zur Frage der optimalen Therapie von *S. lugdunensis* Infektionen sind erforderlich. *S. lugdunensis* gilt mittlerweile als wichtiger Erreger bei der Endokarditis an nativen, wie auch an künstlichen Herzklappen (Mylonakis und Calderwood, 2001). Wie optimal eine komplizierte Harnwegsinfektion, eine Pyelonephritis oder eine Sepsis durch *S. saprophyticus* zu therapieren ist, wäre ebenfalls in klinischen Studien zu prüfen.

5. 5. Empfehlungen aufgrund der vorgelegten Arbeit

Im **Agardiffusionstest** sollten Oxacillin [1 µg] und [5 µg] sowie Cefoxitin [30 µg] auf Mueller-Hinton-Agar mit Zusatz von 4 % NaCl bei 35 °C für 24 Stunden getestet werden. Als Grenzwerte für Resistenz sind ≤ 17 mm für Oxacillin 1 µg, ≤ 15 mm für Oxacillin 5 µg und ≤ 25 mm für Cefoxitin zu empfehlen.

Die Testung mit Oxacillin [1 µg] wies eine Sensitivität von 99,2 % bei allen untersuchten KNS auf; die Spezifität war speziesabhängig. Bei *S. epidermidis* lag sie bei sehr guten 97,5 %, aber bei anderen Spezies nur bei 80 %.

Um dies Problem zu kompensieren wird die Testung mit Oxacillin [5 µg] und Cefoxitin [30 µg] parallel durchgeführt. Die Spezifität war mit 100 % bzw. 98,7 % bei allen KNS ausgezeichnet, aber die Sensitivität war speziesabhängig. Schlechte Resultate ergaben sich mit 75,5 % bzw. 82,4 % für *S. epidermidis*, lag aber für andere Spezies bei jeweils 100 %.

Die **Oxacillin-Agar-Platte (4 % NaCl, 6 µg/ml Oxacillin)** sollte bei 35 °C statt 30 °C bebrütet werden. Zum Ausschluss einer Methicillinresistenz sollte bei der Spezies *S. epidermidis* für bis zu 48 Stunden bebrütet werden, da die Sensitivität nach 18 oder 24 Stunden mit jeweils 84,3 % unbefriedigend war und erst nach 48 Stunden 99 % erreichte. Die Spezifität lag andererseits bei 97,5 %. Bei anderen Spezies lag die Sensitivität bereits nach 18 Stunden bei 95,8 % bei einer Spezifität von 100 %.

Screeningplatten mit verschiedenen NaCl- und Oxacillinkonzentrationen, die durch „Spot“ **Inokulation** beimpft und bei 35 °C bebrütet wurden, sind eine interessante Ergänzung zum Erkennen einer Methicillinresistenz bei Koagulase-negativen Staphylokokken. Am günstigsten schnitt Mueller-Hinton-Agar ab, der mit 4 % NaCl, aber nur 1 µg/ml Oxacillin supplementiert wurde. Zwar liegt das Inokulum niedriger als bei der Oxacillin-Agar-Platte mit 4 % NaCl und 6 µg/ml Oxacillin, aber bereits nach 18 Stunden wurden ca. 96 % der *mecA*-positiven Isolate erkannt bei einer Spezifität für *S. epidermidis* von 97,5 % und für andere Spezies von 91,4 %.

Die Aussagekraft der **minimalen Hemmkonzentration (MHK)** für das Vorliegen einer Methicillinresistenz bei KNS hängt entscheidend von dem zugrunde gelegten, international divergierenden Grenzwert ab.

Für die Bewertung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) sollte als Kriterium für Resistenz sollte ein Grenzwert von $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ (Tabelle 42) gewählt werden.

Unter diesen Bedingungen wies die MHK eine Sensitivität für 1. alle KNS-Isolate, 2. *S. epidermidis* Isolate oder 3. Nicht-*S. epidermidis* Isolate von 99,2 %, 99 % und 100 % auf, während die Spezifität bei 99,3 %, 100 % und 97,1 % lag.

Bei der Testdurchführung mit einem geringeren Inokulum (Wiedemann, 1992) wies der von der DIN empfohlene Oxacillin MHK-Grenzwert für Resistenz von $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ (DIN, 2000) bei guter Spezifität die höchste Sensitivität auf, aber ein Grenzwert von $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ schnitt insgesamt besser ab, wobei dieser eine ausgezeichnete Spezifität von 100 %, aber eine etwas schlechtere Sensitivität aufwies.

VITEK[®]2 und BD Phoenix[™]

Ein Grenzwert von $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ schnitt auch bei der Oxacillin MHK-Bestimmung des VITEK[®]2 mit einer Sensitivität von 97,5 % und einer Spezifität von 97,3 % am besten ab. Auch für das BD Phoenix[™] lagen für diesen Grenzwert die Sensitivität und Spezifität mit 96,7 % und 100 % hervorragend. Eine etwas bessere Sensitivität von 99,2 % bei einer verschlechterten Spezifität von 94,6 % ergab sich mit einem Grenzwert von $\geq 2 \mu\text{g/ml}$.

Die viel versprechenden Ergebnissen der beiden automatisierten Verfahren machen sie - insbesondere bei hohem Probenaufkommen - zu einer interessanten, aber im Vergleich zu den konventionellen phänotypischen Verfahren, teuren Option. Sie bieten jedoch den Vorteil einer sehr umfangreichen antimikrobiellen Resistenzbestimmung. Diese Geräte können darüber hinaus im Vergleich mit konventionellen phänotypischen Verfahren, die bis zu 48 Stunden benötigten, die mikrobiologische Diagnostik beschleunigen.

Bezüglich der Analysegeschwindigkeit war das VITEK[®]2 dem BD Phoenix[™] in der durchgeführten Untersuchung überlegen. Ersteres ermöglichte einige Stunden früher und in einem größeren Prozentsatz eine verlässliche Aussage, ob eine Methicillinresistenz vorliegt. So lieferte das VITEK[®]2 die Ergebnisse des OR Testes, aber auch der Oxacillin MHK-Bestimmung, sehr rasch, was eine Beurteilung nach nur 8 Stunden von ungefähr 80% der Isolate bezüglich des Vorhandenseins einer Methicillinresistenz erlaubte.

Mit den PMIC/ID6 Testkarten des BD Phoenix[™] ist andererseits eine parallele Speziesidentifizierung möglich.

Der **Nachweis des Penicillin-bindenden Proteins 2a** durch den kommerziellen Latexagglutinationstest (MRSA-Screen, Denka Seiken, Niigata, Japan) sollte im klinisch-mikrobiologisches Labor etabliert werden.

Unter Einschluss auch schwach positiver Latexagglutinationsergebnisse wies der Test eine Sensitivität für 1. alle KNS-Isolate, 2. *S. epidermidis* Isolate oder 3. Nicht-*S. epidermidis* Isolate von 98,4 %, 98 % und 100 % und eine Spezifität von 89,3 %, 100 % und 77,1 % auf.

Eine Induktion der KNS mit Oxacillin zur Steigerung der PBP2a Expression wird nicht empfohlen, hingegen die Verwendung eines hohen Inokulum (gut gefüllte Einmalöse, die Trübung der Suspension in Extraktionspuffer 1 entsprach mindestens McFarland 6).

Im Vergleich ist die Information über das Vorliegen einer Methicillinresistenz am schnellsten, bei sehr hoher Verlässlichkeit, mit dem Latexagglutinationstest mit Nachweis von PBP2a zu erzielen. Nach spätestens 30 Minuten ist eine Aussage möglich.

Eine **Speziesidentifizierung** von Koagulase-negativen Staphylokokken ist für die Einschätzung, ob eine Methicillinresistenz vorliegt sehr hilfreich. Insbesondere *mecA*-negative Isolate der Spezies *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. warneri* und *S. xylosus* weisen eine kritische Oxacillin MHK von 0,5 bis 2 µg/ml auf oder zeigen falsch-positive Resultate beim Nachweis von PBP2a. Die Speziesidentifizierung ist auch wegen der unterschiedlichen Pathogenität der verschiedenen KNS-Spezies empfehlenswert.

Als Goldstandard muss weiterhin der **Nachweis von *mecA*** gelten. Alle konventionellen phänotypischen Verfahren, automatisierten Systeme und auch der Nachweis von PBP2a weisen Limitationen auf. Anzustreben ist daher die Etablierung einer PCR für *mecA* im klinisch-mikrobiologischen Labor, wobei die Verwendung eines LightCyclers den Untersuchungsablauf deutlich beschleunigen würde.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Der Einsatz von aus polymeren Kunststoffen gefertigten Fremdkörpern in der modernen Medizin führte trotz der niedrigen Virulenz der meisten KNS-Spezies in den letzten Jahren zu einem massiven Anstieg der Inzidenz von nosokomialer Sepsis und Fremdkörper-assoziierten Infektionen. Heute gehören KNS zu den fünf am häufigsten gefundenen Erregern nosokomialer Infektionen.

Der wichtigste Resistenzmechanismus der KNS ist die Methicillinresistenz, die bei der Mehrzahl (60-70 %) der klinischen KNS-Isolate vorliegt. Die Methicillinresistenz wird durch *mecA*, das strukturelle Gen für die Synthese des Penicillin-bindenden Proteins 2a vermittelt und führt zu einer Resistenz gegenüber allen β -Laktam-Antibiotika. Der sensitive und spezifische Nachweis einer Methicillinresistenz ist daher unverzichtbar, um eine gezielte antibiotische Therapie von Infektionen durch Koagulase-negative Staphylokokken durchzuführen.

Die phänotypische Detektion der Methicillinresistenz bei KNS ist wegen der heterogenen Expression von *mecA* schwierig und beruht auf modifizierten Kulturbedingungen, wie dem Zusatz von NaCl, um die Expression der Methicillinresistenz zu erhöhen. An einem Kollektiv von klinischen Isolaten Koagulase-negativer Staphylokokken wurde die Empfindlichkeit und Verlässlichkeit der konventionellen phänotypischen Nachweisverfahren Oxacillin-Agar-Platte, der Agardiffusionstest und die MHK-Bestimmung durch Mikrodilution, mit modernen automatisierten Systemen zur antimikrobiellen Resistenztestung, wie sie zunehmend in die klinisch-mikrobiologische Diagnostik Einzug halten, und dem immunologischen Nachweis des Penicillin-bindenden Proteins 2a (PBP2a) als Marker für das Vorliegen einer Methicillinresistenz verglichen. Als Referenzmethode diente die genotypische Charakterisierung der Isolate mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) für das Vorliegen des die Methicillinresistenz kodierenden *mecA* Gens.

Aus der vergleichenden Untersuchung der verschiedenen Nachweismethoden sowie ihren möglichen Modifikationen ergaben sich optimale Testbedingungen für den Nachweis einer Methicillinresistenz bei Koagulase-negativen Staphylokokken. Die Empfehlungen (siehe 5.5.) für das klinisch-mikrobiologischen Labor sind im Rahmen der Diskussion dargestellt. Ebenso wurden Schwachpunkte der Nachweisverfahren sowie der für die Bewertung zugrunde gelegten Kriterien wie MHK-Grenzwerte und Hemmhofdurchmesser aufgezeigt.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Andrews J. M., Boswell F. J., and R. Wise.** 2000. Establishing MIC breakpoints for coagulase-negative staphylococci to oxacillin. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**:259-261.
- Archer G. L.** 2000. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci, p. 2092-2100. In Mandell G. L., J. E. Bennett, and R. Dolin (eds), Principles and practice of infectious disease, 5th edition, Churchill Livingstone, Philadelphia, USA.
- Archer G. L., and M. W. Climo.** 1994a. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:2231-2237.
- Archer G. L., and D. M. Niemeyer.** 1994b. Origin and evolution of DNA associated with resistance to Methicillin in staphylococci. *Trends Microbiol.* **2**:343-347.
- Archer G. L., and E. Pennell.** 1990. Detection of Methicillin resistance in staphylococci by using a DNA probe. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:1720-1724.
- Archer G. L., Niemeyer D. M., Thanassi J. A., and M. J. Pucci.** 1994c. Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with Methicillin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:447-454.
- Baddour L. M., Barker L. P., Christensen G. D., Parisi J. T., and W. A. Simpson.** 1990. Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* in infection of transvenous endocardial pacemaker electrodes. *J. Clin. Microbiol.* **28**:676-679.
- Bailey E. M., Constance T. D., Albrecht L. M., and M. J. Rybak.** 1990. Coagulase-negative staphylococci. incidence, pathogenicity, and treatment in the 1990s. *DICP Ann. Pharmacother.* **24**:714-720.
- Baker C. N., Huang M. B., and F. C. Tenover.** 1994. Optimizing testing of Methicillin-resistant *Staphylococcus* species. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **19**:167-170.
- Baldassarri L., Donnelly G., Gelosia A., Voglino M. C., Simpson A. W., and G. D. Christensen.** 1996. Purification and characterization of the staphylococcal slime-associated antigen and its occurrence among *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *Infect. Immun.* **64**:3410-3415.
- Bandyk D. F., Berni G. A., Thiele B. L., and J. B. Towne.** 1984. Aorto-femoral graft infection due to *S. epidermidis*. *Arch. Surg.* **119**:102-108.
- Banerjee S. N., Emori T.G., and D.H. Culver.** 1991. Secular trends in nosocomial primary blood-stream infections in the United States, 1980-1989. *Am. J. Med.* **91 (Suppl. 3B)**:86-89.

- Barber M.** 1961. Methicillin-resistant staphylococci. *J. Clin. Pathol.* **14**:385–393.
- Barg N., Chambers H. F., and D. Kernodle.** 1991. Borderline susceptibility to antistaphylococcal penicillins is not conferred exclusively by the hyperproduction of β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:1975-1979.
- Bartscht K.** 2002. Adhäsion von *Staphylococcus epidermidis* an Oberflächen: Charakterisierung einer Biofilm-negativen Transposonmutante. Dissertation, Fachbereich Biologie, Universität Hamburg.
- Beck W. D., Berger-Bächli B., and F. H. Kayser.** 1986. Additional DNA in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and molecular cloning of *mec* specific DNA. *J. Bacteriol.* **165**:373–378.
- Benner E. J., and F. H. Kayser.** 1968. Growing clinical significance of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **ii**:741–744.
- Berger-Bächli B.** 1983. Insertional inactivation of staphylococcal Methicillin resistance by Tn551. *J. Bacteriol.* **154**:479–487.
- Berger-Bächli B.** 1999. Genetic basis of Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Life Sciences* **56**:764-770.
- Berger-Bächli B., Strässle A., and F. H. Kayser.** 1986. Characterization of an isogenic set of Methicillin-resistant and susceptible mutants of *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **5**:697–701.
- Berger-Bächli B., Barberis-Maino L., Strässle A., and F. H. Kayser.** 1989. FemA, a host-mediated factor essential for Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: molecular cloning and characterization. *Mol. Gen. Genet.* **219**:263–269.
- Berger-Bächli B., Strässle A., Gustafson J. E., and F. Kayser.** 1992. Mapping and characterization of multiple chromosomal factors involved in Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemotherap.* **36**:1367-1373.
- Bierbaum G., Fuchs K., Lenz W., Szekat C., and H.-G. Sahl.** 1999. Presence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Germany. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**:691-696.
- Billot-Klein D., Gutmann L., Bryant D., Bell D., Van Heijenoort J., Grewal J., and D. M. Shlaes.** 1996. Peptidoglycan synthesis and structure in *Staphylococcus haemolyticus* expressing increased levels of resistance to glycopeptide antibiotics. *J. Bacteriol.* **178**:4696-4703.
- Bodi M., Ardanuy C., and J. Rello.** 2001. Impact of Gram-positive resistance on outcome

of nosocomial pneumonia. *Crit. Care Med.* **29**:N82-N86.

Boyce J. M., Medeiros A. A., Papa E. F., and C. J. O’Gara. 1990. Introduction of beta-lactamase and Methicillin resistance in unusual strains of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **25**:73–81.

Brause B. D. 1986. Infections associated with prosthetic joints. *Clin. Rheum. Dis.* **12**:523-536.

Breuer G. S., Yinnon A. M., and J. Halevy. 1998. Infective endocarditis associated with upper endoscopy: case report and review. *J. Infect.* **36**:342-344.

Brown D. F. J., and P. E. Reynolds. 1980. Intrinsic resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett.* **122**:275–278.

Buttery J. P., Easton M., Pearson S. R., and G. G. Hogg. 1997. Pediatric bacteremia due to *Staphylococcus warneri*: microbiological, epidemiological, and clinical features. *J. Clin. Microbiol.* **35**:2174-2177.

Calderwood S. B., Swinski L. A., and S. M. Waterneaux. 1985. Risk factors for the development of prosthetic valve endocarditis. *Circulation.* **72**:31-37.

Canton R., Perez-Vazquez M., Oliver A., Coque T. M., Loza E., Ponz F., and F. Baquero. 2001. Validation of the VITEK 2 and the advanced expert system with a collection of enterobacteriaceae harboring extended spectrum or inhibitor resistant beta-lactamases. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **41**:65-70.

Cavassini M., Wenger A., Jatton K., Blanc D. S., and J. Bille. 1999. Evaluation of MRSA-Screen, a simple anti-PBP 2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1591-1594.

CDC. 2002. From the Centers of Disease Control. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin – United States, 2002. *JAMA* **288**:824-825

Célard M., Vandenesch F., Darbas H., Grando J., Jean-Pierre J., Kirkorian G., and J. Etienne. 1997. Pacemaker infection caused by *Staphylococcus schleiferi*, a member of the human preaxillary flora: four case reports. *Clin. Infect. Dis.* **24**:1014–1015.

Chambers H. F. 1987. Coagulase-negative staphylococci resistant to β -lactam antibiotics *in vivo* produced penicillin-binding protein 2a. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**:919–924.

Chambers H. F. 1993. Detection of Methicillin resistant staphylococci. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **7**:425–433.

Chambers H. F. 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:781-791.

- Chambers H. F., and C. J. Hackbarth.** 1987. Effect of NaCl and nafcillin on penicillin-binding protein 2a and heterogeneous expression of Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**:1982–1988.
- Chambers H. F., and M. Sachdeva.** 1990. Binding of beta-lactam antibiotics to penicillin-binding proteins in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* **161**:1170–1176.
- Chambers H. F., Archer G. L., and M. Matsubashi.** 1989. Low-level Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:424–428.
- Chambers H. F., Sachdeva M. J., and C. J. Hackbarth.** 1994. Kinetics of penicillin binding to penicillin binding proteins of *Staphylococcus aureus*. *Biochem. J.* **301**:139–144.
- Chien J. W., Kucia K. L., and R. A. Salata.** 2000. Use of linezolid, an oxazolidinone, in the treatment of multidrug-resistant gram-positive bacterial infections. *Clin. Infect. Dis.* **30**:146-151
- Choo M. H., Holms D. R., Gersh B. J., Maloney J. D., Meredith J., Pluth J. R., and J. Trusty.** 1981. Permanent pacemaker infections: characterization and management. *Am. J. Cardiol.* **48**:559-564.
- Christensen G. D., Simpson W. A., Younger J. J., Baddour L. M., Barrett F. F., Melton D. M., and E. H. Beachey.** 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* **22**:996-1006.
- Christensen G. D., Barker L. P., Mawhinney T. P., Baddour L. M., and W. A. Simpson.** 1990. Identification of an antigenic marker of slime production for *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **58**:2906-2911.
- Christensen G. D., Baldassarri L., and W. A. Simpson.** 1994. Colonization of medical devices by coagulase-negative staphylococci, p 45-78. *In* Infections associated with indwelling medical devices. 2nd edition. Bisno, A. L., Waldvogel, F. A. (eds). Washington DC: American Society of Microbiology.
- Cohen S. C., Gibson J., and H. M. Sweeney.** 1972. Phenotypic suppression of Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by mutant noninducible penicillinase plasmids. *J. Bacteriol.* **112**:682–689.
- Coles N. W., and R. Gross.** 1967. Liberation of surface-located penicillinase from *Staphylococcus aureus*. *Biochem. J.* **102**:742–747.
- Cormican M. G., Wilke W. W., Barrett M. S., Pfaller M. A., and R. N. Jones.** 1996.

Phenotypic detection of *mecA*-positive staphylococcal blood stream isolates: high accuracy of simple disk diffusion tests. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **25**:107-112.

Couto I., de Lancastre H., Severina E., Kloos W., Webster J. A., Hübner R. J., Sanches I. S., and A. Tomasz. 1996. Ubiquitous presence of a *mecA* homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri*. *Microb. Drug Res.* **2**:377-391.

Cramton S. E., Ulrich M., Götz F., and G. Doring. 2001. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **69**:4079-4085.

Crossley K., D. Loesch, B. Landesman, K. Mead, M. Chern, and R. Strate. 1979. An outbreak of infections caused by strains of *Staphylococcus aureus* resistant to Methicillin and aminoglycosides. I. Clinical studies. *J. Infect. Dis.* **139**:273-279.

Da Costa A, Lelièvre H., Kirkorian G., Célarde M., Chevalier P., Vandenesch F., Etienne J., and P. Touboul. 1998. Role of the preaxillary flora in pacemaker infections. *Circulation* **97**:1791-1795.

de Jonge B. L., de Lancastre H., and A. Tomasz. 1991. Suppression of autolysis and cell wall turnover in heterogeneous Tn 551-autolysis mutants of a Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. *J. Bacteriol.* **173**:1105-1110.

de Jonge B. L., Chang Y.-S., Gage D., and A. Tomasz. 1992. Peptidoglycan composition in heterogeneous Tn551 mutants of a Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. *J. Biol. Chem.* **267**:11255-11259.

de Jonge B. L., Sidow T., Chang Y.-S., Labischinski H., Berger-Bächi B., Gage D. A., and A. Tomasz. 1993. Altered muropeptide composition in *Staphylococcus aureus* strains with an inactivated *femA* locus. *J. Bacteriol.* **175**:2779-2782.

de Lancastre H., and A. Tomasz. 1994. Reassessment of the number of auxiliary genes essential for expression of high-level resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **38**:2590-2598.

Deighton M., and R. Borland. 1993 Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. *Infect. Immun.* **61**:4473-4479.

Diekema D. J., Pfaller M. A., Schmitz F. J., Smayevsky J., Bell J., Jones R. N., Beach M., and the SENTRY participants group. 2001. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, latin america, europe, and the western pacific region for the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. *Clin. Inf. Dis.*

32(Suppl. 2):114-132.

DIN, Deutsches Institut für Normung e. V. 2000. Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, Diagnostische Verfahren. DIN-Taschenbuch 222, Beuth-Verlag, Berlin.

Doebbeling B. N. 1995. The epidemiology of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection and colonization. J. Chemother. **7**(Suppl. 3):99–103.

Dominguez de Villota E., Algorta-Weber A., and I. Millan. 1987. Early evaluation in blood samples of intensive care unit patients. a clinically uncertain judgement. Intensive Care Med. **13**:390-394.

Dowzicky M., Nadler H. L., Feger C., Talbot G., Bompert F., and M. Pease. 1998. Evaluation of *in vitro* activity of quinupristin/dalfopristin and comparator antimicrobial agents against worldwide clinical trial and other laboratory isolates. Am. J. Med. **104**:34S-42S.

Drancourt M., and D. Raoult. 2002. *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. J. Clin. Microbiol. **40**:1333-1338.

Dubin D. T., Matthews P. R., Chikramane S. G., and P. R. Stewart. 1991. Physical mapping of the *mec* region of an american Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **35**:1661-1665.

Duran S. P., Kayser F. H., and B. Berger-Bächi. 1996. Impact of *sar* and *agr* on Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett. **141**:255-260.

Dyke K., and P. Gregory. 1997. Resist to beta-lactam antibiotics: resistance mediated by beta-lactamases, p. 139-157. In K. B. Crossley and G. L. Archer (ed.), The staphylococci in human disease. Churchill Livingstone, Inc., New York, N.Y.

Ehlert K., Tschierske M., Mori C., Schröder W., and B. Berger-Bächi. 2000. Site-specific serine incorporation by Lif and Epr into positions 3 and 5 of the staphylococcal peptidoglycan interpeptide bridge. J. Bacteriol. **182**:2635-2638.

Elliott S. P., Yogev R., and S. T. Shulman. 2001. *Staphylococcus lugdunensis*: An emerging cause of ventriculoperitoneal shunt infections. Pediatr. Neurosurg. **35**:128-130.

Euzéby J.P. 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. Int. J. Syst. bacteriol. **47**:590-592.

Ferguson K. P., Lambe D. W., Keplinger J. L., and J. H. Kalbfleisch. 1991. Comparison of the pathogenicity of three species of coagulase-negative *Staphylococcus* in a mouse model with and without a foreign body. Can. J. Microbiol. **37**:722–724.

Ferraro M. J., and J. H. Jorgensen. 1999. Susceptibility testing instrumentation and

computerized expert systems for data analysis and interpretation, p. 1593-1600. *In* P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Tenover, and R. H. Tenover (eds.), *Manual of clinical microbiology*, 7th edition, American Society for Microbiology, Washington DC.

Fey, P. D., Ulphani J. S., Götz F., Heilmann C., Mack D., and M. E. Rupp. 1999. Characterization of the relationship between polysaccharide intercellular adhesin and hemagglutination in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* **179**:1561-1564.

Fidalgo S., Vasquez F., and M. C. Mendoza. 1990. Bacteremia due to *S. epidermidis*: Microbiologic, epidemiologic and prognostic features. *Rev. Infect. Dis.* **12**:520-528.

Fleurette J., M. Bes, Y. Brun, J. Freney, F. Forey, M. Coulet, M. E. Reverdy, and J. Etienne. 1989. Clinical isolates of *Staphylococcus lugdunensis* and *S. schleiferi*: bacteriological characteristics and susceptibility to antimicrobial agents. *Res. Microbiol.* **140**:107-118.

Frebourg N. B., Nouet D., Lemee L., Martin E., and J. F. Lemeland. 1998. Comparison of ATB staph, rapid ATB staph, Vitek, and E-test methods for detection of oxacillin heteroresistance in staphylococci possessing *mecA*. *J. Clin. Microbiol.* **36**:52-57.

Freney J., Brun Y., Bes M., Meugnier H., Grimont F., Grimont P. A. D., Nervi C., and J. Fleurette. 1988. *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**:168-172.

Fujimura T., and K. Murakami. 1997. Increase of Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* caused by deletion of a gene whose product is homologous to lytic enzymess. *J. Bacteriol.* **179**:6294-6301.

Funke G., D. Monnet, de Bernardis C., von Graevenitz A., and J. Freney. 1998. Evaluation of the VITEK 2 system for the rapid identification of medically relevant gram-negative rods. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1948-1952.

Galdbart J. O., Allignet J., Tung H. S., Ryden C., and N. El Solh. 2000. Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. *J. Infect. Dis.* **182**:351-355.

Garcia-Garrote F., Cercenado E., and E. Bouza. 2000. Evaluation of a new system, VITEK 2, for identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2108-2111.

Gatermann S. G., and K. B. Crossley. 1997. Urinary tract infections, p. 493-508. *In* Crossley K. B., and G. L. Archer (eds.), *The staphylococci in human disease*. Churchill Livingstone Inc., New York, N.Y. USA.

- Gatermann S. G., and R. Laufs.** 1987. Oxacillin-resistant staphylococci in routine diagnosis. *Immun. Infekt.* **15**:110-111.
- George R. V., L. Leibrock, and M. Epstein.** 1979. Long-term analysis of cerebrospinal fluid shunt infections: a 25-year experience. *J. Neurosurg.* **51**:804-811.
- Georgopapadakou N. H., and F. Y. Liu.** 1980. Binding of beta-lactam antibiotics to penicillin-binding proteins in a *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis*: relation to antibacterial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **18**:834-836.
- Georgopapadakou N. H., Dix B. A., and Y. R. Mauriz.** 1986. Possible physiological functions of penicillin-binding proteins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**:333-336.
- Gerberding J. L., Miick C., Liu H. H., and H. F. Chambers.** 1991. Comparison of conventional susceptibility tests with direct detection of penicillin-binding protein 2a in borderline oxacillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:2574-2579.
- Gerke C., A. Kraft, R. Süßmuth, O. Schweitzer, and F. Götz.** 1998. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J. Biol. Chem.* **273**:18586-18593.
- Ghuysen J.-M.** 1994. Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Trends Microbiol.* **2**:372-380.
- Giesbrecht P., Kersten T., Maidhof H., and J. Wecke.** 1998. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:1371-1414.
- Gillespie M. T., B. R. Lyon, L. S. Loo, P. R. Matthews, P. R. Stewart, and R. A. Skurray.** 1987. Homologous direct repeat sequences associated with mercury, Methicillin, tetracycline, and trimethoprim resistance determinants in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **43**:165-171.
- Giovanetti E., Biavasco F., Pugnaroni A., Lupidi R., Biagini G., and P. E. Varaldo.** 1996. An electron microscopic study of clinical and laboratory-derived strains of teicoplanin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Microb Drug Resist.* **2**:239-243.
- Glanzmann P., Gustafson J., Komatsuzawa H., Ohta K., and B. Berger-Bächi.** 1999. *glmM* operon and Methicillin-resistant *glmM* suppressor mutants in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:240-245.

- Goessens W.H.F., N. Lemmens-den Toom, J. Hageman, P.W.M. Hermans, M. Sluijter, R. de Groot, and H.A. Verbrugh.** 2000. Evaluation of the VITEK 2 System for susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**:618-622.
- Goldmann D. A., and G. B. Pier.** 1993. Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**:176-192.
- Gonzalez C., Rubio M., Romero-Vivas J., Gonzalez M., and J. J. Picazo.** 1999. Bacteremic pneumonia due to *Staphylococcus aureus*: A comparison of disease caused by Methicillin-resistant and Methicillin-susceptible organisms. *Clin. Infect. Dis.* **29**:1171-1177.
- Götz F., and Peters, G.** 2000. Colonization of Medical Devices by Coagulase-Negative Staphylococci, p.55-88. *In Infections Associated with Indwelling Medical Devices*, Bisno, A. L., Waldvogel, F. A. (eds), 2nd edition, Washington D.C., American Society of Microbiology.
- Gradelski E., L. Valera, L. Aleksunes, D. Bonner, and J. Fung-Tomc.** 2001. Correlation between genotype and phenotypic categorization of staphylococci based on Methicillin susceptibility and resistance. *J. Clin. Microbiol.* **39**:2961-2963.
- Graf B., T. Adam, E. Zill, and U.B. Göbel.** 2000. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of yeasts and yeast-like organisms. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1782-1785.
- Graham J. C., Murphy O. M., Stewart D., Kearns A. M., Galloway A., and R. Freeman.** 2000. Comparison of PCR detection of *mecA* with Methicillin and oxacillin disc susceptibility testing in coagulase-negative staphylococci. *J. Antimicrob Chemotherap.* **45**:111-113.
- Gregory P. D., Lewis R. A., Curnock S. P., and K. G. H. Dyke.** 1997. Studies of the repressor (BlaI) of beta-lactamase synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **24**:1025-1037.
- Grosserode M. H., and R. P. Wenzel.** 1991. The continuing importance of staphylococci as major hospital pathogens. *J. Hosp. Infect.* **19 (Suppl. B)**:3-17.
- Gustafson J. E., and B. J. Wilkinson.** 1989. Lower autolytic activity in a homogeneous Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain compared to a derived heterogeneous-resistant and susceptible strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **59**:107-112.
- Gustafson J. E., B. Berger-Bächli, A. Strässle, and B. J. Wilkinson.** 1992. Autolysis of Methicillin-resistant and Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.*

Agents Chemother. **36**:566-572.

Gustafson J., Strässle A., Hächler H., Kayser F. H., and B. Berger-Bächi. 1994. The *femC* locus of *Staphylococcus aureus* required for Methicillin resistance includes the glutamin synthetase operon. J. Bacteriol. **176**:1460-1467.

Hackbarth C. J., and H. F. Chambers. 1993. *BlaI* and *blaR1* regulate β -lactamase and PBP2a production in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **37**:1144-1149.

Hackbarth C. J., Miick C., and H. F. Chambers. 1994. Altered production of penicillin-binding protein 2a can affect phenotypic expression of Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **38**:2568-2571.

Hackbarth C. J., T. Kocagöz, S. Kocagöz, and H. F. Chambers. 1995. Point mutations in *Staphylococcus aureus* PBP 2 gene affect penicillin-binding kinetics and are associated with resistance. Antimicrob. Agents Chemother. **39**:103-106.

Hamory B. H., and J. T. Parisi. 1985. *S. epidermidis*: a significant nosocomial pathogen. Am. J. Infect. Control. **15**:59.

Hanaki H., Labischinski H., Inaba Y., Kondo N., and Murakami H., and K. Hiramatsu. 1998. Increase in glutamine-non-amidated mucopeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50. J. Antimicrob. Chemother. **42**:315-320.

Hardt K., Joris B., Lepage S., Brasseur R., Lampen J. O., Frere J. M., Fink A. L., and J. M. Ghuysen. 1997. The penicillin sensory transducer, BlaR, involved in the inducibility of beta-lactamase synthesis in *Bacillus licheniformis* is embedded in the plasma membrane via a four-alpha-helix bundle. Mol. Microbiol. **23**:935-944.

Hartman B. J., and A. Tomasz. 1984. Low-affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **158**:513-516.

Hartman B. J., and A. Tomasz. 1986. Expression of Methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **29**:85-92.

Hayes M. V., N. A. C. Curtiss, A. W. Wyke, and J. B. Ward. 1981. Decreased affinity of a penicillin-binding protein for beta-lactam antibiotics in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus* resistant to Methicillin. FEMS Microbiol. Lett. **10**:119-122.

Heaven C. J., P. J. Mann, and D. L. Boase. 1992. Endophthalmitis following extracapsular cataract surgery: A review of 32 cases. Br. J. Ophthalmol. **76**:419-423.

Hébert A. 1990. Hemolysins and other characteristics that help differentiate and biotype

Staphylococcus lugdunensis and *Staphylococcus schleiferi*. J. Clin. Microbiol. **28**:2425-2431.

Heilmann C., and G. Peters. 2000. Biology and Pathogenicity of *Staphylococcus epidermidis*, p. 442-449. In Gram-Positive Pathogens. Fischetti, V. A., Novick, R. P., Ferretti, J. J., Portnoy, D. A., and Rood, J. I. (eds). Washington D.C.: ASM Press; American Society for Microbiology.

Heilmann C., C. Gerke, F. Perdreau-Remington, and F. Götz. 1996a. Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. Infect Immun **64**:277-282.

Heilmann C., O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakom, D. Mack, and F. Götz. 1996b. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. Mol Microbiol **20**:1083-1091.

Heilmann C., M. Hussain, G. Peters, and F. Götz. 1997. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. Mol. Microbiol. **24**:1013-1024.

Heimberger T. S., and R. J. Duma. 1989. Infections of prosthetic heart valves and cardiac pacemakers. Infect. Dis. Clin. North Am. **3**:221-245.

Henze U. U., Sidow T., Wecke J., Labischinski H., and B. Berger-Bächi. 1993. Influence of *femB* on Methicillin resistance and peptidoglycan metabolism in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **175**:1612-1620.

Herchline T. E., and L. W. Ayers. 1991. Occurrence of *Staphylococcus lugdunensis* in consecutive clinical cultures and relationship of isolation to infection. J. Clin. Microbiol. **29**:419-421.

Herchline T. E., J. Barnishan, L. W. Ayers, and R. J. Fass. 1990. Penicillinase production and *in vitro* susceptibilities of *Staphylococcus lugdunensis*. Antimicrob. Agents Chemother. **34**:2434-2435.

Henze U. U., and B. Berger-Bächi. 1996. Penicillin-binding protein 4 overproduction increases β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **40**:2121-2125.

Hernández J. L., Calvo J., Sota R., Agüero J., García-Palomo J. D., and M. C. Fariñas. 2001. Clinical and microbiological characteristics of 28 patients with *Staphylococcus schleiferi* infection. Eur. J. Clin. Microbiol Infect. Dis. **20**:153-158.

Herwaldt L. A., Geiss M., and M. A. Pfaller. 1996. The positive predictive value of isolating coagulase-negative staphylococci from blood cultures. Clin. Infect. Dis. **22**:14-20.

- Higashi J. M., Wang I. W., Shlaes D. M., Anderson J. M., and R. E. Marchant.** 1998. Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and transposon mutant strains to hydrophobic polyethylene. *J Biomed Mater. Res.* **39**:341-350.
- Hindler J. A., and N. L. Warner.** 1987. Effect of source of Mueller-Hinton agar on detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* using a screening methodology. *J. Clin. Microbiol.* **25**:734-735.
- Hiramatsu K.** 1995. Molecular evolution of MRSA. *Microbiol. Immunol.* **39**:531-543.
- Hiramatsu K., Suzuki E., Takayama H., Katayama Y., and T. Yokota.** 1990. Role of penicillinase plasmids in the stability of the *mecA* gene in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:600-604.
- Hiramatsu K., Asada K., Suzuki E., Okonogi K., and T. Yokota.** 1992a. Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *FEBS Lett.* **298**:133-136.
- Hiramatsu K., Kihara H., and T. Yokota.** 1992b. Analysis of borderline resistant strains of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Immunol.* **36**:445-453.
- Hiramatsu K., Asada K., Suzuki E., and T. Yokota.** 1994. Methicillin resistance regulation of the prototype MRSA strain N315. *Zentralbl. Bakterio. Suppl.* **26**:191-193.
- Hiramatsu K., Konodo N., and T. Ito.** 1996. Genetic basis for molecular epidemiology of MRSA. *J. Infect. Chemother.* **2**:117-129.
- Hiramatsu K., Hanaki H., Ino T, Yabuta K., Oguri T., and F. C. Tenover.** 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**:135-136.
- Hiramatsu K., Cui L., Kuroda M., and T. Ito.** 2001. The emergence and evolution of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology* **9**:486-493.
- Horstkotte M. A., J. K.-M. Knobloch, H. Rohde, and D. Mack.** 2001. Rapid detection of Methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci by a penicillin binding protein 2a specific latex agglutination test. *J. Clin. Microbiol.* **39**:3700-3702.
- Horstkotte M. A., J. K.-M. Knobloch, H. Rohde, S. Dobinsky, and D. Mack.** 2002. Rapid detection of Methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci with the VITEK 2 system. *J. Clin. Microbiol.* **40**:3291-3295.
- Huang M. B., Gay T. E., Baker C. N., Banerjee S. N., and F. C. Tenover.** 1993. Two percent sodium chloride is required for susceptibility testing of staphylococci with oxacillin when using agar-based dilution methods. *J. Clin. Microbiol.* **31**:2683-2688.

- Huebner J., G. B. Pier, J. N. Maslow, E. Muller, H. Shiro, M. Parent, A. Kropec, R. D. Arbeit, and D. A. Goldmann.** 1994. Endemic nosocomial transmission of *S. epidermidis* bacteriemia isolates in a neonatal intensive care unite over 10 years. *J. Infect. Dis.* **169**:526-531.
- Hürlimann-Dalel R. L., C. Ryffel, F. H. Kayser, and B. Berger-Bächli.** 1992. Survey of the Methicillin resistance-associated genes *mecA*, *mecR1-mecI*, and *femA-femB* in clinical isolates of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:2617-2621.
- Hussain M., Herrmann M., von Eiff C., Perdreau-Remington F., and G. Peters.** 1997. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun* **65**:519-524.
- Hussain Z., L. Stoakes, R. Lannigan, S. Longo, and B. Nancekivell.** 1998. Evaluation of screening and commercial methods for detection of Methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **36**:273-274.
- Hussain Z., L. Stoakes, S. Garrow, S. Longo, V. Fitzgerald, and R. Lannigan.** 2000a. Rapid detection of *mecA*-positive and *mecA*-negative coagulase-negative staphylococci by an anti-penicillin binding protein 2a slide latex agglutination test. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2051-2054.
- Hussain Z., Stoakes L., Massey V., Diagre D., Fitzgerald V., El Sayed S., and R. Lannigan.** 2000b. Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **38**:752-754.
- Inman R. D., Gallegos K. V., Brause B. D., Redecha P. B., and C. L. Christian.** 1984. Clinical and microbiologic features of prosthetic joint infections. *Am. J. Med.* **77**:47-53.
- Ito T., Katayama Y., Kazumi A., Mori N., Tsutsumimoto K., Tiensasitorn C., and K. Hiramatsu.** 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1323-1336.
- Jansen B., Schumacher-Perdeau F., Peters G., and G. Pulverer.** 1989. New aspects in the pathogenesis and prevention of polymer-associated infections caused by coagulase-negative staphylococci. *J. Invest. Sur.* **2**:361-380.
- Jarløv J. O., Busch-Sørensen C., Espersen F., Mortensen I., Hougaard D. M., and V. T. Rosdahl.** 1997. Evaluation of different methods for the detection of Methicillin resistance in coagulae-negative staphylococci. *J. Antimicrob. Chemotherap.* **40**:241-249.

- Jean-Pierre J., Darbas H., Jean-Roussenq A., and G. Boyer.** 1989. Pathogenicity in two cases of *Staphylococcus schleiferi*, a recently described species. *Journal of Clinical Microbiology* **27**:2110-2111.
- Jevons M. P.** 1961. Letter. *Br. Med. J.* **1**:124-125.
- Jolly L., Wu S. W., Van Heijenoort J., de Lancastre H., Mengin Lecreulx D., and A. Tomasz.** 1997. The *femR315* gene from *Staphylococcus aureus*, the interruption of which results in reduced Methicillin resistance, encodes a phosphoglucosamine mutase. *J. Bacteriol.* **179**:5321-5325.
- Jorgensen J. H., Turnidge J. D., and J. A. Washington.** 1999. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods, p. 1526-1543. *In* P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 7th edition, American Society for Microbiology, Washington DC, USA.
- Jorgensen J. H., Barry A. L., Traczewski M. M., Sahn D. F., McElmeel M. L., and S.A. Crawford.** 2000. Rapid automated antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae* by use of the bioMérieux VITEK 2. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2814-2818.
- Joris B., Hardt K., and J.-M. Ghuysen.** 1994. Induction of β -lactamase and low affinity penicillin binding protein 2' synthesis in gram-positive bacteria, p. 505-515. *In* Ghuysen J.-M., and R. Hakenbeck (eds), *Bacterial cell wall*, Elsevier, Amsterdam.
- Jossart M.-F. and R. J. Courcol.** 1999. Evaluation of an automated system for identification of *Enterobacteriaceae* and Nonfermenting Bacilli. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**:902-907.
- Joyanes P., Ceinjo M. D. C., Martinez-Martinez L., and E.J. Perea.** 2001. Evaluation of VITEK 2 system for the identification and susceptibility testing of three species of nonfermenting gram-negative rods frequently isolated from clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* **39**:3247-3253.
- Kamalesh M., and S. Aslam.** 2000. Aortic valve endocarditis due to *Staphylococcus capitis*. *Echocardiography.* **17**:685-687.
- Karchmer A. W., Archer G. L., and W. E. Dismukes.** 1983. *S. epidermidis* causing prosthetic valve endocarditis: microbiologic and clinical observations as guides to therapy. *Ann. Intern. Med.* **98**:447-455.
- Katayama Y., Ito T., and K. Hiramatsu.** 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes Methicillin resistance in

Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemotherap. **44**:1549-1555.

Katayama Y., Ito T., and K. Hiramatsu. 2001. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: Role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level Methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. Antimicrob. Agents Chemother. **45**:1955-1963.

Kazembe P., Simor A. E., Swarney A. E., Yap L. G., Kreiswirth B., Ng J., and D. E. Low. 1993. A study of the epidemiology of an endemic strain of *Staphylococcus haemolyticus* (TOR-35) in a neonatal intensive care unit. Scand. J. Infect. Dis. **25**:507-513.

Kernodle D. S., Stratton C. W., McMurray L. W., Chipley J. R., P. A. McGraw. 1989. Differentiation of β -lactamase variants of *Staphylococcus aureus* by substrate hydrolysis profiles. J. Infect. Dis. **159**:103-108.

Kim T. K., and J. R. Chipley. 1974. Effect of salts on penicillinase release by *Staphylococcus aureus*. Microbios **10A**:55-63.

Kirchoff L. V., and J. N. Sheargren. 1985. Epidemiology and clinical significance of blood-cultures positive for coagulase-negative staphylococci. Infect. Control. **6**:479-486.

Kleemann K. T., T. L. Bannermann, and W. E. Kloos. 1993. Species distribution of coagulase-negative staphylococcal isolates at a community hospital and implications for selection of staphylococcal identification procedures. J. Clin. Microbiol. **31**:1318-1321.

Klimek J. J., F. J. Marsik, R. C. Bartlett, B. Weir, P. Shea, and R. Quintilliani. 1976. Clinical, epidemiologic and bacteriologic observations of an outbreak of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a large community hospital. Am. J. Med. **61**:340-345.

Kloos W. E. 1997. Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans, p. 113-137. In K. B. Crossley and G. L. Archer (eds.), The staphylococci in human disease. Churchill Livingstone, New York.

Kloos W. E., and T. L. Bannermann. 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. Clin. Microbiol. Rev. **7**:117-140.

Kloos W. E., and T. L. Bannermann. 1999. *Staphylococcus* and *Micrococcus*, p 264-282. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (eds.), Manual of Clinical Microbiology, 7th edition, American Society for Microbiology, Washington DC, USA.

Kluytmans J., Steegh P., Vandenesch F., Etienne J., and A. Van Belkum. 1998. Outbreak of *Staphylococcus schleiferi* wound infections: strain characterization by randomly amplified polymorphic DNA analysis, PCR ribotyping, conventional ribotyping,

and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2214-2219.

Knapp C.C., Ludwig M. D., and J.A. Washington. 1994. Evaluation of differential inoculum disc diffusion method and Vitek GPS-SA card for detection of Oxacillin-resistant staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **32**:433-436.

Knobloch J. K. M., Bartscht, K., Sabottke, A., Rohde, H., Feucht, H. H., and Mack, D. 2001. Biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* depends on RsbU, a functional activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *J. Bacteriol.* **183**: 2624-2633.

Kobayashi N., Taniguchi K., Kojimak K., Urasawa S., Uehara N., Omizu Y., Kishi Y., Yagihashi A., Kurokawa I., and N. Watanabe. 1996. Genomic diversity of *mec* regulator genes in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Epidemiol. Infect.* **117**:289-295.

Kobayashi N., Taniguchi K., and S. Urasawa. 1998. Analysis of diversity of mutations in the *mecI* gene and *mecA* promoter/operator region of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:717-720.

Kohner P., Uhl J., Kolbert C., Persing D., and F. Cockerill III. 1999. Comparison of susceptibility testing methods with *mecA* gene analysis for determining oxacillin (Methicillin) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* ssp. *J. Clin. Microbiol.* **37**:2952-2961.

Komatsuzawa H., Sugai M., Ohta K., Fujiwara T., Nakashima S., Suzuki J., Lee C. Y., and H. Suginaka. 1997. Cloning and characterization of the *fmt* gene which affects the Methicillin resistance level and autolysis in the presence of Triton X-100 in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2355-2361.

Kornblum J., Hartman B. J., Novick R. P., and A. Tomasz. 1986. Conversion of a homogeneously Methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* to heterogeneous resistance by Tn 551-mediated insertional inactivation. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **5**:714-718.

Kotilainen P., Nikoskilainen J., and P. Houvinen. 1990. Emergence of ciprofloxacin-resistant coagulase-negative staphylococcal skin flora in immunocompromised patients receiving ciprofloxacin. *J. Infect. Dis.* **161**:41-44.

Kragsbjerg P., Bomfim-Loogna J., Törnqvist E., And B. Söderquist. 2000. Development of antimicrobial resistance in *Staphylococcus lugdunensis* during treatment - report of a case of bacterial arthritis, vertebral osteomyelitis and infective endocarditis.

Clin. Microbiol. Infect. **6**:496-502.

Kraus E. S., and D. A. Spector. 1983. Characteristics and sequel of peritonitis of diabetics and nondiabetics receiving chronic intermittent peritoneal dialysis. *Medicine* **62**:52-57.

Krediet T. G., Jones M. E., Janssen K., Gerards L. J., and A. Fleer. 2001. Prevalence of molecular types and *mecA* gene carriage of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit. *J. Clin Microbiol.* **39**:3376-3378.

Kreiswirth B., Kornblum J., Arbeit R. D., Eisner W., Maslow J. N., McGeer A., Low D. E., and R. P. Novick. 1993. Evidence for a clonal origin of Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science* **259**:227-230.

Kresken M., Hafner D., und die Studiengruppe. 2000. Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Chemotherapeutika in Mitteleuropa. *Chemother. J.* **9**:51-86.

Kullik I., and Giachino P. 1997. The alternative sigma factor sigmaB in *Staphylococcus aureus* - regulation of the *sigB* operon in response to growth phase and heat shock. *Arch. Microbiol.* **167**:151-159.

Kuwahara-Arai K., Kondo N., Hori S., Tateda-Suzuki E., and K. Hiramatsu. 1996. Suppression of Methicillin resistance in a *mecA*-containing pre-Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain is caused by the *mecI*-mediated repression of PBP2' production. *Antimicrob. Agents Chemotherap.* **40**:2680-2685.

Lambe D. W., Ferguson K. P., Keplinger J. L., Gemmell C. G., and J. H. Kalbfleisch. 1990. Pathogenicity of *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus schleiferi*, and three other coagulase-negative staphylococci in a mouse model and possible virulence factors. *Can. J. Microbiol.* **36**:455-463.

Latorre M., Rojo P. M., Unzaga M. J., and R. Cisterna. 1993. *Staphylococcus schleiferi*: a new opportunistic pathogen. *Clin. Infect. Dis.* **16**:589-590.

Leclerq R., Nicolas-Chanoine M.-H., Nordmann P., Philippon A., Marchais P., Buu-Ho A., Chardon H., Dabernat H., Doucet-Populaire F., Grasmick C., Legrand P., Muller-Serieys C., Nguyen J., Ploy M.-C., Reverdy M.-E., Weber M., and R. J. Courcol. 2001. Multicenter evaluation of an automated system using selected bacteria that harbor challenging and clinically relevant mechanisms of resistance to antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**:626-635.

Leung M. J., Nuttall N., Mazur M., Taddei T. L., McComish M., and J. W. Pearman. 1999. Case of *Staphylococcus schleiferi* endocarditis and a simple scheme to identify

clumping factor-positive staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3353-3356.

Ligozzi M., Bernini C., Bonora M. G., de Fatima M., Zuliani J., and R. Fontana. 2002. Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. *J. Clin Microbiol.* **40**:1681-1686.

Lina G., Etienne J., and F. Vandenesch. 2000. Biology and pathogenicity of staphylococci other than *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, p. 450-462. In Gram-positive pathogens. Fischetti, V. A., Novick, R. P., Ferretti, J. J., Portnoy, D. A., and Rood, J. I. (eds) American Society of Microbiology, Washington DC.

Ling B., and B. Berger-Bächi. 1998. Increased overall antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus femAB* Null Mutants. *Antimicrob. Agents Chemotherap.* **42**:936-938.

Ling T. K. W., Tam P. C., Liu Z. K., and A. F. B. Cheng. 2001. Evaluation of VITEK 2 rapid identification and susceptibility testing system against gram-negative clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* **39**:2964-2966.

Livermore D. M., Struelens M., Amorim J., Baquero F., Bille J., Canton R., Henning S., Gatermann S., Marchese A., Mittermayer H., Nonhoof C., Oakton K. J., Praplan F., Ramos H., Schito G. C., Van Eldere J., Verhaegen J., Verhoef J., and M.R. Visser. 2002. Multicentre evaluation of the VITEK 2 advanced expert system for the interpretative reading of antimicrobial resistance tests. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**:289-300.

Louie L., Matsumura S. O., Choi E., Louie M., and A. E. Simor. 2000. Evaluation of three rapid methods for detection of Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2170-2173.

Louie L., Majury A., Goodfellow J., Louie M., and A.E. Simor. 2001. Evaluation of a latex agglutination test (MRSA-Screen) for detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **39**:4149-4151.

Ludlam H., and I. Phillips. 1989. *Staphylococcus lugdunensis* peritonitis. *Lancet* **ii**:1394.

Murdoch D. R., Everts R. J., Chambers S. T., and I. A. Cowan. 1996. Vertebral osteomyelitis due to *Staphylococcus lugdunensis*. *J. Clin. Microbiol.* **34**:993-994.

Ludovice A. M., Wu S. W., and H. de Lencastre. 1998. Molecular cloning and DNA sequencing of the *Staphylococcus aureus* UDP-N-acetylmuramyl tripeptide synthetase (*murE*) gene, essential for the optimal expression of Methicillin resistance. *Microb. Drug Resist.* **4**:85-90.

Ludwicka A., Jansen B., Wadstrom T., and G. Pulverer. 1984. Attachment of

staphylococci to various synthetic polymers. Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiolog. Hyg. [A] **256**:479-489.

Ma X. X., Ito T., Tiensasitorn C., Jamklang M., Chongtrakool P., Boyle-Vavra S., Daum R. S., and K. Hiramatsu. 2002. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob. Agents Chemother. **46**:1147-1152.

Mack D., Siemssen N., and R. Laufs. 1992. Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. Infect. Immun. **60**:2048-2057.

Mack D., Siemssen N., and R. Laufs. 1994. Identification of a cell cluster associated antigen specific for plastic-adherent *S. epidermidis* which is functional related to intercellular adhesion. Zbl. Bakt. Suppl. **26**:411-413.

Mack D., Fischer W., Krokotsch A., Leopold K., Hartmann R., Egge H., and R. Laufs. 1996a. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. J. Bacteriol. **178**:175-183.

Mack D., Haeder M., Siemssen N., and R. Laufs. 1996b. Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. J Infect Dis **174**:881-884.

Mack D., Riedewald J., Rohde H., Magnus T., Feucht H. H., Elsner H.-A., Laufs R., and M. E. Rupp. 1999. Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. Infect. Immun. **67**:1004-1008.

Mack D., Rohde H., Dobinsky S., Riedewald J., Nedelmann M., Knobloch J K.-M., Elsner H.-A., and H. H. Feucht. 2000. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intracellular adhesin and biofilm formation. Inf. Immun. **68**:3799-3806.

Mack D., Bartscht K., Fischer C., Rohde H., de Grahl C., Dobinsky S., Horstkotte M. A., Kiel K., and J. K.-M. Knobloch. 2001. Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation. Meth. Enzymol. **336**:215-239.

Mack D., Sabottke A., Dobinsky S., Rohde H., Horstkotte M. A., and J K.-M . Knobloch. 2002. Differential expression of Methicillin resistance by different biofilm-negative *Staphylococcus epidermidis* transposon mutant classes. Antimicrob. Agents Chemother. **46**:178-183.

Maidhof H., Reinicke B., Blümel P., Berger-Bächi B., and H. Labischinski. 1991.

FemA, which encodes a factor essential for expression of Methicillin resistance, affects glycine content of peptidoglycan in Methicillin-resistant and Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. J. Bacteriol. **173**:3507-3513.

Maki D. G., and J. A. Stevens. 1984. Nosocomial colonization of cardiac and cardiology patients with Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. In: Program and abstracts of the 24th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington D.C., American Society for Microbiology. Abstract 472.8

Maki H., Yamaguchi T., and K. Murakami. 1994. Cloning and characterization of a gene affecting the Methicillin resistance level and the autolysis rate in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **176**:4993-5000.

Malathum K., Coque T. M., Singh K. V., and B. E. Murray. 1999. *In vitro* activities of two ketolides, HMR 3647 and HMR 3004, against gram-positive bacteria. Antimicrob. Agents Chemotherap. **43**:930-936.

Manna A. C., Bayer M. G., and A. L. Cheung. 1998. Transcriptional analysis of different promoters in the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **180**:3828-3836.

Marshall S. A., Wilke W. W., Pfaller M. A., and R. N. Jones. 1998. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (*mecA*) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **30**:205-214.

Marrie T. J., Kwan C., Noble M. A., West A., and L. Duffield. 1982. *Staphylococcus saprophyticus* as a cause of urinary tract infections. J. Clin. Microbiol. **16**:427-431.

Marriott D. J., Karagiannis T., Harkness J. L., and P. Kearney. 1999. Further evaluation of the MRSA-Screen kit for rapid detection of Methicillin resistance. J. Clin. Microbiol. **37**:3783-3784.

Martin M. A., Pfaller M. A., and R. P. Wenzel. 1989. Coagulase-negative staphylococci bacteremia. Ann. Int. Med. **110**:9-16.

Martinez F., Chandler L. J., Reisner B. S., and G. L. Woods. Evaluation of the Vitek card GPS105 and VTK-RO7.01 software for detection of oxacillin resistance in clinically relevant coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Microbiol. **39**:3733-3735.

Massida O., Montanari M. P., and P. E. Valrado. 1992. Evidence for a Methicillin-hydrolyzing beta-lactamase in *Staphylococcus aureus* strains with borderline susceptibility to this drug. FEMS Microbiol. Lett. **92**:223-227.

Massida O., Montanari M. P., Mingoia M., and P. E. Valrado. 1994. Cloning and

expression of the penicillinase from a borderline Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. **119**:263-270.

Matsubishi M., Song M. D., Ishimo F., Wachi M., Doi M., Inoue M., Ubukata K., Yamashita N., and M. Konno. 1986. Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to β -lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **167**:975-980.

Matthews P. R., and P. R. Stewart. 1984. Resistance heterogeneity in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett. **22**:161-166.

Matthews P. R., and P. R. Stewart. 1988. Amplification of a section of chromosomal DNA in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* following growth in high concentrations of Methicillin. J. Gen. Microbiol. **134**:1455-1464.

Matthews P. R., Reed K. C., and P. R. Stewart. 1987. The cloning of chromosomal DNA associated with Methicillin and other resistances in *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol. **133**:1919-1929.

McDonald C. L., Maher W. E., and R. J. Fass. 1995. Revised interpretation of oxacillin MICs for *Staphylococcus epidermidis* based on *mecA* detection. Antimicrob. Agents Chemother. **39**:982-984.

McDougal L. K., and C. Thornsberry. 1986. The role of β -lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. J. Clin. Microbiol. **23**:832-839.

McKenney D., Hubner J., Muller E., Wang Y., Goldmann D. A., and G. B. Pier. 1998. The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. Infect. Immun. **66**:4711-4720.

McMurray L. W., Kernodle D. S., and N. L. Barg. 1990. Characterization of a widespread strain of Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* associated with nosocomial infections. J. Infect. Dis. **162**:759-762.

Muller E., J. Hubner, N. Gutierrez, S. Takeda, D. A. Goldmann, and G. B. Pier. 1993a. Isolation and characterization of transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis* deficient in capsular polysaccharide/adhesin and slime. Infect. Immun. **61**:551-558.

Murakami K., and A. Tomasz. 1989. Involvement of multiple genetic determinants in high-level Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **171**:874-879.

Murdoch D. R., Everts R. J., Chambers S. T., and I. A. Cowan. 1996. Vertebral osteomyelitis due to *Staphylococcus lugdunensis*. J. Clin. Microbiol. **34**:993-994.

- Murray B. E.** 2000. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N. Engl. J. Med.* **342**:710-721.
- Musser J. M., and V. Kapur.** 1992. Clonal analysis of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources – association of the *mec* gene with divergent phylogenetic lineage implies dissemination by horizontal transfer and recombination. *J. Clin. Microbiol.* **30**:2058-2063.
- Mylonakis E., and S. B. Calderwood.** 2001. Infective endocarditis in adults. *N. Engl. J. Med.* **345**:1318-1330.
- Nakatomi Y., and J. Sugiyama.** 1998. A rapid latex agglutination assay for the detection of penicillin-binding protein 2'. *Microbiol. Immunol.* **42**:739-743.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twelfth informational supplement, M100-S12. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Niemeyer D. M., Pucci M. L., Thanassi J. A., Sharma V. K., and G. Archer.** 1996. Role of *mecA* transcriptional regulation in the phenotypic expression of Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **178**:5464-5471.
- Nilsson M., Frykberg L., Flock J. I., Pei L., Lindberg M., and B. Guss.** 1998. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **66**:2666-2673.
- Nobel W. C.** 1997. Staphylococci carriage and skin and soft tissue infection. p. 401-412. In: Crossley, K. B., and G. L. Archer. *The staphylococci in human disease*. New York: Churchill Livingstone.
- Nobel W. C., and J. Naidoo.** 1986. Coagulase-negative staphylococci as skin commensals. *J. Med. Microbiol.* **22**:287.
- Ornelas-Soares A., de Lancastre H., de Jonge B. L., and A. Tomasz.** 1994. Reduced Methicillin resistance in a new *Staphylococcus aureus* transposon mutant that incorporates muramyl dipeptides into the cell wall peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* **269**:27246-27250.
- Oshida T., and A. Tomasz.** 1992. Isolation and characterization of a Tn551-autolysis mutant of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **174**:4952-4959.
- Ozturkeri H., Kocabeyoglu O., Yergok Y. Z., Kosan E., Yenen O., and K. Keskin.** 1994. Distribution of coagulase-negative staphylococci, including the newly described species *Staphylococcus schleiferi*, in nosocomial and community-acquired urinary tract infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**:1076-1079.
- Palazzo E., Pierre J., and N. Besbes.** 1992. *Staphylococcus lugdunensis* arthritis: a

complication of arthroscopy. *J. Rheumatol.* **19**:327-328.

Pascual A., Fleer A., Westerdaal N. A., and J. Verhoef. 1986. Modulation of adherence of coagulase-negative staphylococci to teflon catheters *in vitro*. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **5**:518-522.

Patrick C. C. 1990. Coagulase-negative staphylococci: pathogens with increasing clinical significance. *J. Pediatr.* **116**:497-507.

Pei L., Palma M., Nilsson M., Guss B., and J. I. Flock. 1999. Functional studies of a fibrinogen binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **67**:4525-4530.

Perez-Vazquez M., Oliver A., Sanchez del Saz B., Loza E., Baquero F., and R. Canton. 2001. Performance of the VITEK 2 system for identification and susceptibility testing of routine *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **17**:371-376.

Peters G., Locci R., and G. Pulverer. 1982. Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J. Infect. Dis.* **146**: 479-482.

Pfaller M. A., and L.A. Herwaldt. 1988. Laboratory, clinical and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**:281-299.

Pinho M. G., Ludovice A. M., Wu S., and H. de Lancastre. 1997. Massive reduction in Methicillin resistance by transposon inactivation of the normal PBP2 in a Methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Microb. Drug Resist.* **3**:409-413.

Pinho M., de Lancastre H., and A. Tomasz. 1998. Transcriptional analysis of the *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2 gene. *J. Bacteriol.* **180**:6077-6081.

Qoronfleh M. W., and B. J. Wilkinson. 1986. Effects of growth of Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* in the presence of β -lactams on peptidoglycan structure and susceptibility to lytic enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**:250-257.

Rachid S., Ohlsen K., Witte W., Hacker J., and W. Ziebuhr. 2000. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:3357-3363.

Ramotar K., Woods W., and B. Toye. 2001. Oxacillin susceptibility testing of *Staphylococcus saprophyticus* using disc diffusion, agar dilution, broth microdilution, and the Vitek GPS-105 card. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **40**:203-205.

Renier D., Lacombe J., and A. Pierre-Kahn. 1984. Factors causing acute shunt infection. *J.*

Neurosurg. **61**:1071-1078.

Reynolds P. E. 1988. The essential nature of staphylococcal penicillin-binding proteins, p. 343–351. In P. Actor, L. Daneo-Moore, M. L. Higgins, M. R. Salton, and G. D. Shockman (ed.), Antibiotic inhibition of bacterial cell surface assembly and function. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Reynolds P. E., and C. Fuller. 1986. Methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*: presence of identical additional penicillin-binding protein in all strains examined. FEMS Microbiol. Lett. **33**:251-254.

Ringberg H., Thoren A., and A. Bredberg. 1991. Evaluation of coagulase-negative staphylococci in blood cultures: a prospective clinical and microbiological study. Scand. J. Infect. Dis. **23**:315-323.

Rohrer S., Ehlert K., Tschierske M., Labischinski H., and B. Berger-Bächi. 1999. The essential *Staphylococcus aureus* gene *fmhB* is involved in the first step of peptidoglycan pentaglycine interpeptide formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **96**:9351-9356.

Rolinson G. N. 1961. Letter. Br. Med. J. **1**:125-126.

Rupp M. E., and G. L. Archer. 1992. Hemagglutination and adherence to plastic by *Staphylococcus epidermidis*. Infect. Immun. **60**:4322-4327.

Rupp M. E., and G. L. Archer. 1994. Coagulase-negative staphylococci: Pathogens associated with medical progress. Clin. Infect. Dis. **19**:231-245.

Rupp M. E., and P. D. Fey. 2001b. *In vivo* models to evaluate adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. Methods Enzymol. **336**:206-215.

Rupp M. E., Ulphani J. S., Fey P. D., Bartscht K., and D. Mack. 1999a. Characterization of the importance polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial based infection in a mouse foreign body infection model. Infect. Immun. **67**:2627-2632.

Rupp M. E., Ulphani J. S., Fey P. D., and D. Mack. 1999b. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. Infect. Immun. **67**:2656-2659.

Rupp M. E., Fey P. D., Heilmann C., and F. Götz. 2001a. Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. J. Inf. Dis. **183**:1038-42.

Ryffel C., Tesch W., Birch-Machin I., Reynolds P. E., Barberis-Maino L., Kayser F. H., and B. Berger-Bächi. 1990. Sequence comparison of *mecA* genes isolated from

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Gene* **94**:137-138.

Ryffel C., Kayser F. H., and B. Berger-Bächli. 1992. Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of Methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:25-31.

Ryffel C., Strässle A., Kayser F. H., and B. Berger-Bächli. 1994. Mechanisms of heteroresistance in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:724-728.

Sabath L. D., and S. J. Wallace. 1974. Factors influencing Methicillin resistance in staphylococci. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **236**:258-266.

Sakoulas G., Gold H.S., Venkataraman L., Degirolami P. C., Eliopoulos G. M., and Q. Qian. 2001. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible isolates. *J. Clin. Microbiol.* **39**:3946-3951.

Sampathkumar P., Osmon D. R., and Cockerill F. R. III. 2000. Prosthetic joint infection due to *Staphylococcus lugdunensis*. *Mayo Clin. Proc.* **75**:511-512.

Sanders C.C., Peyret M., Moland E.S., Shubert C., Thomson K. S., Boeufgras J.-M., and W.E. Sanders jr. 2000. Ability of the VITEK 2 advanced expert system to identify β -lactam phenotypes in isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **38**:570-574.

Sandoe J. A., Kerr K. G., Reynolds G. W., and S. Jain. 1999. *Staphylococcus capitis* endocarditis: two cases and review of the literature. *Heart.* **82**:e1-e3.

Saravolatz L. D., Pohold D. J., and L. M. Arking. 1982. Community-acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a new source for nosocomial outbreaks. *Ann. Intern. Med.* **97**:325-329.

Schaberg D. R., Culver D. H., and R. P. Gayens. 1991. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am. J. Med.* **91(Suppl. 3B)**: 72S-75S.

Schleifer K. H. 1986. Gram-positive cocci, p. 999-1103. *In* Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E., and J. G. Holt (eds.), *Bergeys's Manual of Systematic Microbiology*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland, USA.

Schmitz F. J., Mackenzie C. R., Hofmann B., Verhoef J., Finken-Eigen M., Heinz H. P., and K. Kohrer. 1997. Specific information concerning taxonomy, pathogenicity and Methicillin resistance of staphylococci obtained by a multiplex PCR. *J. Med. Microbiol.*

46:773-778.

Schumacher-Perdreau F., Heilmann C., Peters G., Götz F., and G. Pulverer. 1994. Comparative analysis of a biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain and its adhesion-positive, accumulation-negative mutant M7. FEMS Microbiol. Lett. **117**:71-78.

Schwalbe R. S., Ritz W. J., Verma P. R., Barranco E. A., and P. H. Gilligan. 1990. Selection for vancomycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. J. Inf. Dis.. **161**:45-51.

Seligman S. J. 1966. Penicillinase-negative variants of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Nature **209**:994-996.

Seligman S. J. 1969. Phenotypic variability in penicillin resistance in a Methicillin resistant strain of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **9**:90-93.

Sharma V. K., Hackbarth C. J., Dickinson T. M., and G. L. Archer. 1998. Interaction of native and mutant MecI repressors with sequences that regulate *mecA*, the gene encoding penicillin-binding protein 2a in Methicillin-resistant staphylococci. J. Bacteriol. **180**:2160-2166.

Sievert D. M., Boulton M. L., Stoltman G., Johnson D., Stobierski M. G., Downes F. P., Somsel P. A., Rudrik J. T., Brown W., Hafeez W., Lundstrom T., Flanagan E., Johnson R., Mitchell J., and S. Chang. 2002. From the centers of disease control and prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin - United States, 2002. Morbidity and mortality weekly report 2002. **51**:565-567; in JAMA **288**:824-5.

Skinner S., Inglis B., Matthews P. R., and P. R. Stewart. 1988. Mercury and tetracycline resistance genes and flanking repeats associated with Methicillin resistance on the chromosome of *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. **2**:289-297.

Small P. M., and H. F. Chambers. 1990. Vancomycin for *Staphylococcus aureus* endocarditis in intravenous drug users. Antimicrob. Agents Chemother. **34**:1227-1231.

Smith T. L., Pearson M. L., Wilcox K. R., Cruz C., Lancaster M. V., Robinson-Dunn B., Tenover F. C., Zervos M. J., Band J. D., White E., and W. R. Jarvis. 1999. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group. N. Engl. J. Med. **340**:493-501.

Song M. D., Wachi M., Doi M., Ishino F., and M. Matsuhashi. 1987. Evolution of an inducible penicillin-target protein in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. FEBS Lett. **221**:167-171.

Spanu G., Karussos G., Adinolfi D., and N. Bonfanti. 1986. An analysis of cerebrospinal fluid

shunt infections in adults: a clinical experience of twelve years. *Acta Neurol.* **80**:79-82.

Sperber W. H., and S. R. Tantini. 1975. Interpretation of tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* **29**:502-505.

Stewart G. T., and R. J. Holt. 1963. Evolution of natural resistance to the newer penicillin. *Br. Med. J.* **1**:308-311.

Stewart P. R., Dubin D. T., Chikramane S. G., Inglis B., Matthews P. R., and S. M. Poston. 1994. IS257 and small plasmid insertions in the *mec* region of the chromosome of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **31**:12-20.

Strandén A. M., Ehlert K., Labischinski H., and B. Berger-Bächi. 1997. Cell wall monoglycine cross-bridges and Methicillin hypersusceptibility in a *femAB* null mutant of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **179**:9-16.

Suzuki E., Hiramatsu K., and T. Yokota. 1992. Survey of Methicillin-resistant clinical isolates of coagulase-negative staphylococci for *mecA* gene distribution. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:429-434.

Suzuki E., Kuwahara-Arai K., Richardson J. F., and K. Hiramatsu. 1993. Distribution of *mec* regulator genes in Methicillin-resistant clinical strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1219-1226.

Swenson J. M., Hindler J. A., and L. R. Peterson. 1999. Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance, p. 1563-1577. *In* P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Tenover, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (eds.), 7th edition, *Manual of clinical microbiology*. American Society for Microbiology, Washington DC.

Tenover F. C., Jeins R. N., Swenson J. M., Zimmer B., McAllister S., and J. H. Jorgensen. 1999. Methods for improved detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci: Results of a multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* **37**:4051-4058.

Tesch W., Ryffel C., Strässle A., Kayser F. H. and B. Berger-Bächi. 1990. Evidence of a novel saphylococcal *mec*-encoded element (*mecR*) controlling expression of penicillin-binding protein 2'. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:1703-1706.

Thauvin-Eliopoulos C., Rice L. B., Eliopoulos G. M., and J. R. Moellering. 1990. Efficacy of oxacillin and ampicillin-sulbactam combination in experimental endocarditis caused by β -lactamase hyperproducing *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:728-732.

Thornsberry C., and L. K. McDougal. 1983. Successful use of broth microdilution insusceptibility tests for Methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci. *J. Clin.*

Microbiol. **18**:1084-1091.

Thylefors J. D., Harbarth S., and D. Pittet. 1998. Increasing bacteremia due to coagulase-negative staphylococci: fiction or reality ? *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **19**:581-589.

Timmerman C. P., Fler A., Besnier J. M., de Graaf L., Cremers F., and J. Verhoef. 1991. Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. *Infect. Immun.* **59**:4187-4192.

Tokue Y., Shoji S. Satoh K., Watanabe A., and M. Motomiya. 1992. Comparison of a polymerase chain reaction assay and a conventional microbiologic method for detection of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:6-9.

Tomasz A., Drugeon H. B., de Lencastre H. M., Jabes D., McDougall L., and J. Bille. 1989. New mechanism for Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Clinical isolates that lack the PBP2a Gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1869-1874.

Tomasz A., Nachman S., and H. Laef. 1991. Stable classes of phenotypic expression in Methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:124-129.

Trees D. L., and J. J. Iandolo. 1988. Identification of a *Staphylococcus aureus* Transposon (Tn 4291) that carries the Methicillin resistance gene(s). *J. Bacteriol.* **170**:149-154.

Tschierske M., Mori C., Rohrer S., Ehlert K., Shaw K. J., and B. Berger-Bächi. 1999. Identification of three additional *femAB*-like open erading frames in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **171**:97-102.

U.S. Department of Health and Human Services. 1996. Public Health services. National nosocomial surveillance (NNIS) report, Data summary from October 1986-April 1996. *Am. J. Infect. Control.* **24**:380-388.

U.S. Department of Health and Human Services. 2000. Public health services. National nosocomial infections surveillance (NNIS) system report, Data summary from January 1992-April 2000, issued June 2000. *Am. J. Infect. Control* **28**:429-448.

Ubukata K., Nonoguchi R., Matsuhashi M., and M. Konno. 1989. Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a Methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. *J. Bacteriol.* **171**:2882-2885.

Ubukata K., Nonoguchi R., Song M. D., Matsuhashi M., and M. Konno. 1990

Homology of *mecA* gene in Methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus simulans* to that of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **34**:170-172.

Udo E. E., Mokadas E. M., Al Haddad A., Mathew B., Jacob L. E., and S. C. Sanyal. 2000. Rapid detection of Methicillin resistance in staphylococci using a slide latex agglutination kit. Int. J. Antimicrob. Agents **15**:19-24.

Ünal S., Werner, K., de Girolami, P., Barsanti, F., and G. Eliopoulos. 1994. Comparison of tests for detection of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a clinical microbiology laboratory. Antimicrob. Agents Chemother. **38**:345-347.

Utsui Y., and T. Yokota. 1985. Role of an altered penicillin-binding protein in Methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **28**:397-403.

Vacheethasanee K., Temenoff J. S., Higashi J. M., Gary A., Anderson J. M., Bayston R., and R. E. Marchant. 1998. Bacterial surface properties of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* strains determine adhesion on polyethylene. J. Biomed. Mater. Res. **42**:425-432.

van den Braak N., Goessens W., van Belkum A., Verbrugh H. A., and H.P. Endtz. 2001. Accuracy of the VITEK 2 system to detect glycopeptide resistance in enterococci. J. Clin. Microbiol. **39**:351-353.

van Griethuysen A., Pouw M., van Leeuwen N., Heck M., Willemsse P., Buiting A., and J. Kluytmans. 1999. Rapid slide latex agglutination test for detection of Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. **37**:2789-2792.

van Leeuwen W. B., van Pelt C., Luijendijk A., Verbrugh H. A., and W. H. Goessens. 1999. Rapid detection of Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates by the MRSA-screen latex agglutination test. J. Clin. Microbiol. **37**:3029-3030.

Vandenesch F., Etienne J., Reverdy M. E., and S. J. Eykyn. 1993. Endocarditis due to *Staphylococcus lugdunensis*: report of 11 cases and review. Clin. Infect. Dis. **17**:871-876.

Vandenesch F., Eykyn S. J., Etienne J., and J. Lemozy. 1995a. Skin and post-surgical wound infections due to *Staphylococcus lugdunensis*. Clin. Microbiol. Infect. **1**:73-74.

Vandenesch F., Eykyn S. J., and J. Etienne. 1995b. Infections caused by newly-described species of coagulase-negative staphylococci. Rev. Med. Microbiol. **6**:94-100.

Vas S. I. 1994. Infections associated with peritoneum and hemodialysis, p. 309-346. In Bisno, A. L., and F. A. Waldvogel (eds.), Infections associated with indwelling medical devices. 2nd edition,

Washington D. C., American Society for Microbiology.

Veenstra G. J., Cremers F. F., van Dijk H., and A. Fleer. 1996. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* **178**:537-541.

Vishniavsky N., and G. L. Archer. 1984. The epidemiology of antibiotic-resistant coagulase-negative staphylococci in a cardiac surgery unit. In: Program and abstracts of the 24th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington D.C., American Society for Microbiology. Abstract 465.

Waghorn D. J. 1994. *Staphylococcus lugdunensis* as a cause of breast abscess. *Clin. Infect. Dis.* **19**:814-815.

Wallet F., Roussel-Delvallez M., and R. J. Courcol. 1996. Choice of a routine method for detecting Methicillin-resistant staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.* **37**:901-909.

Wallmark G. I., Anemark I., and B. Telander. 1978. *Staphylococcus saprophyticus*: a frequent cause of urinary tract infections among female outpatients. *J. Infect. Dis.* **138**:791-797.

Waxman D. J., and J. L. Strominger. 1983. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.* **52**:825-869.

Weber D. J., Hoffmann K. L., Thoft R. A., and A. S. Baker. 1986. Endophthalmitis following intraocular lens implantation: report of 30 cases and review of the literature. *Rev. Infect. Dis.* **8**:12-20.

Weightman N. C., Allerton K. E., and J. France. 2000. Bone and prosthetic joint infection with *Staphylococcus lugdunensis*. *J. Infect.* **40**:98-99.

Weinstein M. P., Reller L. B., Murphy J. R., and K. A. Lichtenstein. 1983. The clinical significance of positive blood cultures: a comparative analysis of 500 episodes of bacteriemia and fungemia in adults. *Rev. Infect. Dis.* **5**:35-70.

Wiedemann B. 1992. Bestimmung der Wirksamkeit von Chemotherapeutika, Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien (Resistenzbestimmung, Antibiogramm), p. 714-737. In F. Burkhardt (ed.). *Mikrobiologische Diagnostik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Wilkinson. B. J. 1997. Biology, p. 1-38. In K. B. Crossley and G. L. Archer (eds.), *The staphylococci in human disease*. Churchill Livingstone, New York.

Wilson R. W., Karchmer A. W., Dajani A. S., Taubert K. A., Bayer A., Kaye D., Bisno A. L., Ferrieri P., Shulman S. T., and D. T. Durack. 1995. Antibiotic treatment of adults with infective endocarditis due to streptococci, enterococci, staphylococci and HACEK microorganisms. *JAMA* **274**:1706-1713.

- Witte, W.** 1999. Antibiotic resistance in gram-positive bacteria: epidemiological aspects. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**:Topic A, 1-9.
- Woods G. L., Hall G. S., Rutherford I., Pratt K. J., and C. C. Knapp.** 1986. Detection of Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.* **24**:349-352.
- Wu, C. Y., Hoskins J., Blaszcak L. C., Preston D. A., and P. L. Skatrud.** 1992. Construction of a water-soluble form of penicillin-binding protein 2a from a Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:533-539.
- Wu C. Y. E., Alborn jr. W. E., Flokowitsch J. E., Hoskins J., Ünal S., Blaszcak L. C., Peston, D. A., and P. L. Skatrud.** 1994. Site directed mutagenesis of the *mecA* gene from a Methicillin resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **176**:443-449.
- Wu, S.W., and H. de Lencastre.** 1999. Mrp-a new auxiliary gene essential for optimal expression of Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Microb. Drug Resistance.* **5**:9-18.
- Wu, S., Piscitelli C., de Lencastre H., and A. Tomasz.** 1996. Tracking the evolutionary origin of the Methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a Methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. *Microb. Drug Resistance* **2**:435-441.
- Wu S., de Lencastre H., and A. Tomasz.** 1998. Genetic organization of the *mecA* region in Methicillin-susceptible and Methicillin-resistant *Staphylococcus sciuri*. *J. Bacteriol.* **180**:236-242.
- Yamazumi T., Furuta I., Diekema D. J., Pfaller M. A., and R. N. Jones.** 2001a. Comparison of the Vitek gram-positive susceptibility 106 card, the MRSA-Screen latex agglutination test, and the *mecA* analysis for detecting oxacillin resistance in a geographically diverse collection of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **39**:3633-3636.
- Yamazumi T., Marshall S. A., Wilke W. W., Diekema D. J., Pfaller M. A., and R. N. Jones.** 2001b. Comparison of the Vitek gram-positive susceptibility 106 card and the MRSA-Screen latex agglutination test for determining oxacillin resistance in clinical bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **39**:53-56.
- York, M. K., Gibbs L., Chehab F., and G. F. Brooks.** 1996. Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine Methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **34**:249-253.
- Younger, J. J., Christensen G. D., Bartley D. L., and J. C. H. Simmons.** 1987. Coagulase-

negative staphylococci isolated from cerebrospinal fluid shunts: importance of slime production, species identification, and shunt removal for clinical outcome. *J. Infect. Dis.* **156**:548-554.

Zbinden, R., Ritzler M., Ritzler E., and B. Berger-Bächli. 2001. Detection of penicillin-binding protein 2a by rapid slide latex agglutination test in coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **39**:412.

Ziebuhr, W., Heilmann C., Götz F., Meyer P., Wilms K., Straube E., and J. Hacker. 1997. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect. Immun.* **65**:890-896.

Ziebuhr, W., Krimmer V., Rachid S., Löbner I., Götz F., and J. Hacker. 1999. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol. Microbiol.* **32**:345-356.

8. DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank richtet sich an meinen Betreuer, Herrn Prof. Dr. D. Mack, für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die engagierte Diskussion und seine Unterstützung bei der Publikation meiner Ergebnisse.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Laufs für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Geräte, die Förderung meiner Ausbildung zum Facharzt für Medizinische Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie und seiner Geduld sowie dem steten Ansporn zur Arbeit.

Bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Staphylokokken - Frau Dr. S. Dobinsky, Frau Dr. K. Bartscht, Frau Dr. K. Kiel, Herrn Dr. J. K.-M. Knobloch und Herrn Dr. H. Rohde - die mir Freunde und Weggefährten sind, möchte ich mich für die angenehmen Stunden im und außerhalb des Labors bedanken.

Bei meinen Eltern Verena und Dr. Walter Horstkotte, meinen Brüdern Joachim und Burkhard und bei meiner Familie, meiner geliebten Frau Katja Sellmann-Horstkotte und meinen Töchtern Marieke Hannah, Dortje Lena und Anneke Ida Horstkotte bedanke ich mich für die ausdauernde private und berufliche Unterstützung, stete Hilfsbereitschaft und Anteilnahme.

9. LEBENSLAUF

Persönliche Angaben

Name Matthias-Ansver Horstkotte
 Geburtsdatum 16.7.1966
 Geburtsort Hamburg
 Familienstand verheiratet mit Katja Sellmann-Horstkotte
 3 Töchter: Marieke Hannah, Dortje Lena und Anneke Ida
 Nationalität: Deutscher

Schulische Laufbahn

1973 Einschulung Flughafenschule, Hamburg-Fuhlsbüttel
 1974 Fritz-Schumacher-Schule, Hamburg-Langenhorn
 1977 - 1986 Gymnasiums Heidberg in Hamburg-Langenhorn
 1986 Abitur mit der Note: 1,3

Zivildienst

1986 - 1987 Alsterdorfer Anstalten, Hamburg
 1987 - 1988 Deutscher Bund für Vogelschutz, Leverkusen-Opladen

Studium

1988 - 1996 Humanmedizin, Medizinische Fakultät, Universität Hamburg
 4/1996 Abschluss des Medizinstudiums mit der Note: 1

Berufstätigkeit

1996 Diplomkursus für Tropenmedizin, Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg
 1996-1997 Arzt im Praktikum, Klinischen Abteilung des Bernhard-Nocht-Institut,
 Leiter: Prof. Dr. Manfred Dietrich, Hamburg
 1997 Approbation als Arzt
 Seit 11/1997 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Medizinische Mikrobiologie
 und Immunologie, Direktor Prof. Dr. Rainer Laufs, Universitätsklinikum
 Hamburg-Eppendorf

Hamburg, den 04.02.2003

Matthias Horstkotte

10. ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Matthias Horstkotte

11. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Originalarbeiten

1. **Horstkotte, M. A., I. Sobottka, C. K. Schewe, P. Schäfer, R. Laufs, S. Rüscherdes, und S. Niemann.** 2001. *Mycobacterium microti* llama-type infection in human immunodeficiency virus-positive patient presenting as pulmonary tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 406-407.
2. **Mack, D., K. Bartscht, C. Fischer, H. Rohde, C. de Grahl, S. Dobinsky, M. A. Horstkotte, K. Kiel, und J. K.-M. Knobloch.** 2001. Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation. *Methods in Enzymology* **336**: 215-239.
3. **Horstkotte, M. A., J. K.-M. Knobloch, H. Rohde, und D. Mack.** 2001. Rapid detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci by a penicillin binding protein 2a specific latex agglutination test. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 3700-3702.
4. **Rohde, H., J. K.-M. Knobloch, M. A. Horstkotte, und D. Mack.** 2001. Correlation of biofilm expression types of *Staphylococcus epidermidis* with polysaccharide intercellular adhesin synthesis: evidence for involvement of *icaADBC* genotype-independent factors. *Medical Microbiology and Immunology* **190**: 105-112.
5. **Rohde, H., D. Mack, I. Sobottka, A. Speicher, M. A. Horstkotte, J. K.-M. Knobloch., M. Protzen, und R. Laufs.** 2001. Arthritis nach Hüftendoprothesen-Implantation. *Hamburger Ärzteblatt* 12/01: 597-598.
6. **Mack, D., A. Sabottke, S. Dobinsky, H. Rohde, M. A. Horstkotte, und J. K.-M. Knobloch.** 2002. Differential Expression of Methicillin Resistance by Different Biofilm-Negative *Staphylococcus epidermidis* Transposon Mutant Classes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 178-183.
7. **Rohde, H., I. Sobottka, A. Speicher, M. A. Horstkotte, J. K.-M. Knobloch., M. Protzen, und D. Mack.** 2002. Schmerzen bei Hüftendoprothesen-Implantation. *Hygiene und Mikrobiologie* 2002: 29; 34-36.

8. **Knobloch, J. K.-M., M. A. Horstkotte, H. Rohde, P.-M. Kaulfers, und D. Mack.** 2002. Alcoholic ingredients in skin disinfectants increase biofilm expression of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**: 683-687.
9. **Rohde, H., M. A. Horstkotte, I. Sobottka, H. Klose, und D. Mack.** 2002. Spontaneous bacterial peritonitis due to *Listeria monocytogenes* in a patient with primary pulmonary hypertension. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **21**: 323-325.
10. **Knobloch, J. K.-M., M. A. Horstkotte, H. Rohde, und D. Mack.** 2002. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical Microbiology and Immunology (Berlin)* **191**: 101-106.
11. **Knobloch, J. K.-M., H. v. Osten, M. A. Horstkotte, H. Rohde, S. Dobinsky, und D. Mack.** 2002. The minimal attachment killing (MAK): a new method for susceptibility testing of attached biofilm-positive and -negative *S. epidermidis*. *Medical Microbiology and Immunology (Berlin)* **191**: 107-114.
12. **Horstkotte, M. A., J. K.-M. Knobloch, H. Rohde, S. Dobinsky, und D. Mack.** 2002. Rapid detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci with the VITEK 2 system. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 3291-3295.
13. **Knobloch, J. K.-M., H. v. Osten, M. A. Horstkotte, H. Rohde, und D. Mack.** 2002. Resistenztestung angehefteter und Biofilm-ständiger *Staphylococcus epidermidis* Isolate. *Hygiene und Mikrobiologie* **6**: 180-186.
14. **Dobinsky, S., K. Kiel, H. Rohde, J. K.-M. Knobloch, K. Bartscht, M. A. Horstkotte, und D. Mack.** 2002. Glucose related dissociation of *icaADBC* transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: requirement of an additional factor for polysaccharide intercellular adhesin synthesis. (angenommen bei *Journal of Bacteriology*)
15. **Horstkotte, M. A., J. K.-M. Knobloch, H. Rohde, S. Dobinsky, und D. Mack.** 2002. Evaluation of the BD PhoenixTM automated microbiology system in detecting methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. (eingereicht bei *Journal of Clinical Microbiology*)

Letter

1. **Rohde, H., J. K.-M. Knobloch, M. A. Horstkotte, und D. Mack.** 2001. Correlation of *Staphylococcus aureus icaADBC* genotype and biofilm expression phenotype. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 4595-4596.
2. **Degen O., J. van Lunzen, M. A. Horstkotte, I. Sobottka, und H.-J. Stellbrink.** 2002. *Pneumocystis carinii* pneumonia after the discontinuation of secondary prophylaxis. *AIDS* **16**: 1433-1434.

Buchbeiträge

1. **Mack, D., K. Bartscht, S. Dobinsky, M. A. Horstkotte, K. Kiel, J. K.-M. Knobloch, and P. Schäfer.** 2000. Staphylococcal factors involved in adhesion and biofilm formation on biomaterials, p. 307-330. In Y. H. An and R. J. Friedman, eds. *Handbook for studying bacterial adhesion: Principles, methods, and applications.* Humana Press, Totowa, N.J..
2. **Horstkotte M. A., J. Gbadamosi, H.-J. Stürenburg, G. Pfeiffer, R. Laufs, und D. Mack.** 2001. Reiseandenken aus dem Schwarzwald, In H. K. Geiss, E. Jacobs, und D. Mack, eds. *Der klinisch-infektiologische Fall.* Springer-Verlag, Heidelberg.
3. **Rohde H., J. K.-M. Knobloch, M. Carstensen, S. Dobinsky, M. A. Horstkotte, und D. Mack.** 2002. Wichtige Infektionserreger bei COPD und Asthma. p. 36-75. In Pforte A. (Ed.): *Atemwegsinfekte bei Asthma bronchiale und COPD.* Uni-Med Verlag, Bremen.
4. **Knobloch, J. K.-M., H. Rohde, M. A. Horstkotte, S. Dobinsky, und D. Mack.** 2003. Antibiotic resistance of attached and biofilm forming staphylococci. In Mohan, R. M. (Ed.): *Research Advances in Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* Global Research Network, Kerala, India. (im Druck)

Publizierte Vorträge und Poster

1. **Horstkotte, M. A., J. K.-M. Knobloch, und D. Mack.** 2000. Genotypes of the intercellular adhesion (*ica*) locus and biofilm formation in clinical and commensal *Staphylococcus aureus* isolates. *BIOSpektrum Suppl.*:171.

2. **Horstkotte, M. A., J. K.-M. Knobloch, H. Rohde, und D. Mack.** 2001. Detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci using the BD Phoenix™ system. *International Journal of Medical Microbiology*. **291**, Suppl. 32:P89.
3. **Horstkotte, M. A., J. K.-M. Knobloch, H. Rohde, und D. Mack.** 2001. Evaluation of the VITEK 2 system for the detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Medical Microbiology*. **291**, Suppl. 32:P21.
4. **Knobloch, J. K.-M., H. von Osten, M. A. Horstkotte, H. Rohde, und D. Mack.** 2001. Reduced quinolone-susceptibility of attached *Staphylococcus epidermidis* is independent of biofilm accumulation. *International Journal of Medical Microbiology*. **291**, Suppl. 32:V12.
5. **Knobloch, J. K.-M., H. von Osten, M. A. Horstkotte, H. Rohde, und D. Mack.** 2001. Verminderte Empfindlichkeit Oberflächen-gebundener *Staphylococcus epidermidis* Zellen unabhängig von PIA-vermittelter Biofilmbildung. *Klinik & Forschung* **8**:Suppl. 2:83-84.
6. **Horstkotte, M. A., J. K.-M. Knobloch, H. Rohde, S. Dobinsky, und D. Mack.** 2002. Identification of coagulase-negative staphylococci with the BD Phoenix™. *International Journal of Medical Microbiology*. **292**, Suppl. 34:221-222.
7. **Knobloch, J. K.-M., H. von Osten, M. A. Horstkotte, H. Rohde, und D. Mack.** 2002. Susceptibility testing of attached biofilm-positive and -negative *Staphylococcus epidermidis* by the minimal attachment killing (MAK) assay. *International Journal of Medical Microbiology*. **292**, Suppl. 34:222.
8. **Rohde H., J. K.-M. Knobloch, M. A. Horstkotte, S. Dobinsky, und D. Mack.** 2002. Characterization of a Polysaccharide Intercellular-Adhesin (PIA) independent mechanism of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation. *International Journal of Medical Microbiology*. **292**, Suppl. 34:91-92.
9. **Knobloch, J. K.-M., M. A. Horstkotte, S. Scherpe, H. Rohde, S. Dobinsky, und D. Mack.** 2002. Prevalence of GISA and Linezolid or Synercid resistant isolates in the MRSA population of the Hamburg area. *International Journal of Medical Microbiology*. **292**, Suppl. 34:161-162.

Weitere Kongressbeiträge und Vorträge

1. **Horstkotte M. A., R. Laufs, und D. Mack.** 1998. Untersuchung zur phänotypischen und genotypischen Charakterisierung der Oxacillinresistenz von *Staphylococcus epidermidis*. VAAM/DGHM Spätsommerschule „Pathogenitätsmechanismen“, Zinnowitz, 1. 10. -3.10.1998.
2. **Horstkotte M. A., S. Dobinsky, und D. Mack.** 1999. Vergleich phänotypischer und genotypischer Verfahren einschließlich Latexagglutination zum PBP2a-Nachweis zur Detektion der Methicillinresistenz bei Koagulase-negativen Staphylokokken. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Regensburg, 11. 10. - 14. 10. 1999.
3. **Knobloch, J. K.-M., M. A. Horstkotte, and D. Mack.** 1999. Alkoholische Bestandteile von Hautdesinfektionsmitteln steigern die Biofilmexpression bei *Staphylococcus epidermidis*. 51. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Regensburg, 11. 10. - 14. 10. 1999.
4. **Knobloch, J. K.-M., H. Rohde, M. A. Horstkotte, K. Bartscht, and D. Mack.** 2001. Inactivation von RsbU, an activator of the alternative sigma factor σ^B leads to a differential phenotype in *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. Gordon Research Conference „Staphylococcal Diseases“, 12.-17.08.2001, Bristol, Rhode Island, USA.
5. **Rohde, H., J. K.-M. Knobloch, M. A. Horstkotte, and D. Mack.** 2001. Correlation of biofilm expression types of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin synthesis: evidence for involvement of *icaADBC* genotype-independent factors. Gordon Research Conference „Staphylococcal Diseases“, 12.-17.08.2001, Bristol, Rhode Island, USA.
6. **M. A. Horstkotte.** 4. 11. 2002. Fallpräsentation: „Spondylodiszitis und Endokarditis“ zum Vortrag „Die bakterielle Endokarditis“, Dr. Laasch, Abteilung für Herzchirurgie, AK St. Georg. Arbeitskreis „Interdisziplinäre Infektiologie“ der Kassenärztlichen Vereinigung Hamburg.

7. **Horstkotte, M. A., J. K.-M. Knobloch, H. Rohde, and D. Mack.** 2001. Detektion der Methicillinresistenz mit BD Phoenix™ bei Koagulase-negativen Staphylokokken. Phoenix -Treffen, Heidelberg, 10.-11.09.2001.
8. **Knobloch, J. K.-M., H. Rohde, M. A. Horstkotte, K. Bartscht, and D. Mack.** 2002. Inactivation of *rsbU* leads to a differential phenotype in *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and reduces oxacillin resistance. Gordon Research Conference „Microbial Stress Response“, 14.-19.07.2002, Newport, Rhode Island, USA.
9. **Degen O., J. van Lunzen, M. A. Horstkotte, I. Sobottka, und H.-J. Stellbrink.** 2002. *Pneumocystis carinii* pneumonia after discontinuation of secondary prophylaxis. XIV. International AIDS Conference, Barcelona, Spain.
10. **Werner Y., M. A. Horstkotte, M. Bläker, M. Biermer, P. Buggisch, K. Wursthorn, K. Siemers, und A. de Weerth.** 2002. Ist mikrobiologische Diagnostik bei Spontan Bakterieller Peritonitis (SBP) wirklich notwendig ? Eine Single-Center Analyse von 1069 Ascites-Punktaten.
11. **M. A. Horstkotte und D. Mack.** 2002. Fall 3. Falldemonstrationen mit TED. Fachgruppe Klinische Mikrobiologie. 54. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Heidelberg, 06.10.-10.10.2002.