

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und
Krankenhaushygiene der Heinrich Heine Universität Düsseldorf

Direktor: Univ. Prof. Dr. med. K. Pfeffer

„Einflussfaktoren auf das Resistenzverhalten von
nosokomialen, gramnegativen Nonfermentern in der
Intensivmedizin.“

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Julia Hamann

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: PD Dr. med. Schulze-Röbbcke

Korreferent: Prof. Dr. Schmitz

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS 3

1. EINLEITUNG 5

1.1 ALLGEMEINER TEIL 5

1.2 KLINISCH RELEVANTE NOSOKOMIALE NONFERMENTER IM BEREICH DER INTENSIVSTATIONEN 7

1.2.1 STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA 7

1.2.2 PSEUDOMONAS AERUGINOSA 10

1.2.3 ACINETOBACTER BAUMANNII 11

1.3 SPEKTRUM DER RESISTENZMECHANISMEN DER NONFERMENTATIVEN GRAMNEGATIVEN ERREGER 13

1.4 RISIKOFAKTOREN FÜR DIE VERBREITUNG DER RESISTENZEN GRAMNEGATIVER BAKTERIEN 16

1.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT 17

2. MATERIAL UND METHODEN 19
--

2.1 PATIENTEN 19

2.2 DATENERHEBUNG 19

2.2.1 APACHE II (ACUTE PHYSIOLOGY AND CHRONIC HEALTH EVALUATION) 19

2.2.2 CLINICAL PULMONARY INFECTION SCORE (CPIS) 23

2.2.3 SEPSIS-RELATED ORGAN FAILURE (SOFA) 24

2.2.4 ANTIMIKROBIELLE THERAPIE 25

2.2.5 ZUSÄTZLICHE PARAMETER / DATEN 25

2.3 PROBENENTNAHME DES UNTERSUCHUNGSMATERIALS 26

2.4 ANZÜCHTUNG VON BAKTERIENISOLATEN 26

2.5 SELEKTION DER GRAMNEGATIVEN BAKTERIEN 26

2.6 DIFFERENZIERUNG ENTEROBAKTERIAZEEN / NONFERMENTERN 27

2.7 BIOCHEMISCHE DIFFERENZIERUNG 27

2.7.1 DURCHFÜHRUNG DES API[®] 20E 28

2.7.2 DURCHFÜHRUNG DES API[®] 20NE 28

2.8 PHÄNOTYPISCHE RESISTENZBESTIMMUNG 29

2.8.1 EINLEITUNG 29

2.8.2 ARBEITSSCHRITTE 30

2.8.3 AUSWERTUNG 30

2.9 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR) ZUM NACHWEIS VON RESISTENZINTEGRONS 34

2.9.1 ALLGEMEINE VERFAHRENSBESCHREIBUNG 34

2.9.2 DURCHFÜHRUNG DER PCR 35

2.9.3	GELELEKTROPHORESE UND AUSWERTUNG	37
2.10	SEQUENZIERUNG.....	37
2.10.1	GELEXTRAKTION UND AUFREINIGUNG	38
2.10.2	SEQUENZIERUNGSTECHNIK	39
2.11	RAPID AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD)	43
2.11.1	ALLGEMEINE VERFAHRENSBESCHREIBUNG	43
2.11.2	DURCHFÜHRUNG DER RAPD	43
2.11.3	GELELEKTROPHORESE UND AUSWERTUNG	44
3. ERGEBNISSE		45
3.1	EINLEITUNG	45
3.2	ALTERSVERTEILUNG UND AUFENTHALTSDAUER.....	45
3.3	KLINISCHE DIAGNOSEN	47
3.4	DEVICES	49
3.5	INFEKTIOLOGISCHE PARAMETER.....	53
3.6	ANTIBIOTIKAVERBRAUCH.....	54
3.7	MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	56
3.8	DATENVERGLEICH VON NONFERMENTER-PATIENTEN MIT DER KONTROLLGRUPPE.....	67
4. DISKUSSION.....		69
4.1	ALLGEMEINER TEIL.....	69
4.2	RISIKOFAKTOREN FÜR DEN ERWERB NOSOKOMIALER INFEKTIONEN	70
4.3	AKTUELLE ÜBERLEGUNGEN ZUM ANTIBIOTIKAVERBRAUCH IM BEREICH DER INTENSIVMEDIZIN	71
4.4	RESISTENZVERHALTEN UND ÜBERTRAGUNGSWEGE DER NOSOKOMIALEN NONFERMENTERN	73
4.5	SCHLUSSFOLGERUNG	75
5. ZUSAMMENFASSUNG		76
LITERATURVERZEICHNIS.....		77
TABELLENVERZEICHNIS.....		84
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....		86
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....		87

1. Einleitung

1.1 Allgemeiner Teil

Die Zunahme der Resistenz von Bakterien gegenüber Antibiotika stellt ein globales Problem und eine Bedrohung der Wirksamkeit der zur Verfügung stehenden Therapieoptionen dar. Die regelmäßige Datenerhebung der Arbeitsgemeinschaft Empfindlichkeitsprüfung & Resistenz der Paul-Ehrlich-Gesellschaft (PEG), die sich hauptsächlich auf die typischen nosokomialen Erreger fokussiert, belegt seit Mitte der achtziger Jahre eine deutliche Zunahme multiresistenter Erreger in Deutschland und Mitteleuropa. Auch die seit Januar 2001 im Infektionsschutzgesetz (IFSG) vorgeschriebene Bestandsaufnahme (IFSG, §23), die auf Intensivstationen häufig mit Hilfe einer standardisierten, aktiven Surveillance durch das Krankenhaus Infektions Surveillance System (KISS) erfolgt, zeigt eine beunruhigende Tendenz der Verbreitung multiresistenter, gramnegativen Bakterien im Bereich vieler Intensivstationen.. Dabei spielen neben den klassischen multiresistenten Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa* zunehmend auch weitere mehrfach resistente Nonfermenter wie *Stenotrophomonas maltophilia* eine Rolle, die noch vor 15-20 Jahren nicht als Infektionserreger angesehen wurden (http://www.p-e-g.org/ag_resistenz/main.htm).

Intensivstationen gehören zu den Hochrisikobereichen, was Antibiotikaverbrauch und Resistenzsituation in einem Krankenhaus anbelangt. Aus diesem Grund förderte das BMBF (Bundesministerium für Bildung und Forschung) das Projekt SARI (Surveillance der Antibiotikaaanwendung und bakterieller Resistenzentwicklung auf Intensivstationen in Deutschland), das verlässliche Surveillance-Daten zum Auftreten und zur Verbreitung der Resistenz und zum Antibiotikaeinsatz speziell auf Intensivstationen generieren sollte, um sie allgemein zur Verfügung zu stellen⁶¹.

Im Jahr 2006 nahmen 41 Intensivstationen an der SARI-Untersuchung teil. Die Ergebnisse dieser Überwachung zeigen, dass neben Chinolonen Carbapeneme zu den am häufigsten eingesetzten Antibiotika gehören⁶⁰. Der Carbapenem-Verbrauch liegt demnach bei 10 % des gesamten Antibiotikagesamtverbrauchs und ist im Vergleich zu US-amerikanischen Intensivstationen etwa dreimal so hoch. Auch konnte festgestellt werden, dass auf Intensivstationen (ITS) von Universitätsklinika in der Summe nicht mehr antimikrobielle Substanzen verwendet wurden als auf ITS anderer Krankenhäuser⁶⁰.

Für die SARI-Daten des Jahres 2006 wurden ausgewählte Resistenzraten (RR) mit dem Antibiotikaverbrauch korreliert. Der höchste Korrelationskoeffizient von 0,6 ($p < 0,001$) ergab sich zwischen dem Carbapenem-Verbrauch und RR von Imipenem resistenten *P. aeruginosa*⁶⁰. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus anderen Studien⁴⁵. Nach Aussage der Autoren ist die

Imipenemresistenz auf deutschen SARI-Intensivstationen (ITS) häufiger nachweisbar als auf US-amerikanischen, aber seltener als auf schwedischen ITS, wobei auf schwedischen ITS mehr Carbapeneme eingesetzt werden und auf US-amerikanischen sehr viel weniger als auf deutschen ITS⁶⁰.

Daten des EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) aus den Jahren 2006-2007 liefern ähnliche Ergebnisse. Diese Resistenzraten wurden aus klinischen Isolaten (Blutkulturen, Liquor) in 32 europäischen Ländern erhoben und zeigen am Beispiel von *P. aeruginosa* einen kontinuierlichen Anstieg der Carbapenem Resistenz in Deutschland. (<http://www.rivm.nl/earss/database/>).

Antibiotika	Anzahl			Total	Prozentsatz		
	S	I	R	N	S	I	R
Carbapeneme*	118	17	27	162	72,8	10,5	16,7

* Carbapeneme= Imipenem oder Meropenem.

Abkürzungen: S= sensibel, I= intermediär, R= resistent, N= Summe

Tabelle 1: Empfindlichkeit der *Pseudomonas*-Isolate in Deutschland in 2006, Quelle: <http://www.rivm.nl/earss/database/>.

Antibiotika	Anzahl			Total	Prozentsatz		
	S	I	R	N	S	I	R
Carbapeneme*	135	19	43	197	68,5	9,6	21,8

* Carbapeneme= Imipenem oder Meropenem.

Abkürzungen: S= sensibel, I= intermediär, R= resistent, N= Summe

Tabelle 2: Empfindlichkeit der *Pseudomonas*-Isolate in Deutschland in 2007, Quelle: <http://www.rivm.nl/earss/database/>.

Aus den PEG-Resistenzberichten der vergangenen Jahre geht ebenfalls hervor, dass der Anteil Carbapenem resistenter *Pseudomonas*-Stämme weiter zunimmt.

Jahr	Imipenem	Meropenem
1998	2,7%	2,0%
2001	8,5%	2,4%
2004	-*	2,8%

* die Daten von Imipenem wurden nicht ausgewertet

Tabelle 3: Prozentsatz der Carbapenem resistenten *P. aeruginosa* Isolate.

Dabei wurden im Jahr 2001 *Pseudomonas* mit Resistenz gegenüber Carbapenemen zwei-dreimal häufiger aus dem Untersuchungsgut von Patienten aus dem Intensivpflegebereich als von Patienten auf Allgemeinstationen nachgewiesen (Bericht der PEG- Resistenzstudie 2001).

1.2 Klinisch relevante nosokomiale Nonfermenter im Bereich der Intensivstationen

Nonfermenter sind gramnegative, obligat aerobe Stäbchenbakterien, die Glukose zur Energieversorgung der Zelle nicht fermentativ, sondern nur oxidativ verwerten können. Zu den wichtigsten Vertretern gehören die bereits erwähnten Spezies *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii*, die hauptsächlich im letzten Jahrzehnt zunehmend als hochresistente Erreger der nosokomialen Infektionen im Bereich der Intensivmedizin an Bedeutung gewonnen haben ¹⁹.

1.2.1 *Stenotrophomonas maltophilia*

S. maltophilia wurde in der Vergangenheit mehrfach umbenannt (früher: *Pseudomonas maltophilia* oder *Xanthomonas maltophilia*) und zuletzt als einziges Mitglied der Gattung *Stenotrophomonas* klassifiziert.

Diese gramnegativen, mit Hilfe von mehreren Geißeln- freibeweglichen, stäbchenförmigen Bakterien sind ca. 0,5-1,5 µm lang und tolerieren als obligat aerob wachsende Erreger einen weiten Temperaturbereich von unter 5°C bis über 40°C. Die Kolonien sind glatt, glänzend und haben eine weiße bis blass-gelbe Farbe ¹⁸.

S. maltophilia wird vorwiegend in feuchter, seltener in trockener Umgebung gefunden. Außer aus Wasserquellen verschiedenen Ursprungs ist diese Spezies auch aus dem Erdreich, der Rhizosphäre und in Lebensmitteln zu isolieren. Im Krankenhaus konnte sie unmittelbar in Duschköpfen, Siphons, Wasserhähnen und Wassertherapiebecken, sowie in deionisiertem Wasser, Dialyse- und Eismaschinen nachgewiesen werden. *S. maltophilia* wurde ebenfalls im Zusammenhang mit der Beatmungstherapie aus Kreisteilen von Beatmungsgeräten, Wasservorratsbehältern von Befeuchtern und Verneblern sowie Sauerstoffmessgeräten isoliert. Auch in Geräten zur Messung des arteriellen und zentralvenösen Drucks, in ungenügend konzentrierten Desinfektionsmitteln und vor allem auf Händen des Pflegepersonals wurde der Erreger mehrfach nachgewiesen ¹⁸.

Obwohl vorwiegend als nosokomialer Erreger beschrieben, wird *S. maltophilia* durchaus sowohl im ambulanten Bereich als auch in der häuslichen Umgebung bei gesunden Trägern z.B. in Rachenabstrichen nachgewiesen. Diese Tatsache erschwert häufig eine klare Unterscheidung zwischen Infektion und Besiedlung bei seinem Nachweis und untermauert die bisherige Ansicht, *S. maltophilia* besitze eine sehr eingeschränkte Pathogenität. Ein wesentlicher Selektionsvorteil scheint jedoch die erhöhte Adhärenz zu verschiedenen Oberflächen (z.B. Glas und Teflon) zu sein ³⁸.

Zu den wichtigsten klinischen Manifestationen gehören nosokomiale Pneumonien, deren Häufigkeit in unterschiedlichen Studien mit bis zu 5% bei einer in den letzten Jahrzehnten steigenden Prävalenz, angegeben wird ¹⁸.

S. maltophilia wird am häufigsten aus den Atemwegen isoliert, wobei hier wiederum weitere diagnostische Kriterien notwendig sind, um eine Kolonisation von einer echten Infektion zu unterscheiden ²³.

Bei einer beatmungsassoziierten Late-onset-Pneumonie gilt *S. maltophilia* als wichtiger Risikofaktor für eine erhöhte Morbidität und in Verbindung mit einer inadäquaten Antibiotikatherapie auch für eine erhöhte Sterblichkeitsrate bei kritisch kranken Traumapatienten ³³. Auch Kollef et.al berichtete, dass bei einer beatmungsassoziierten Late-onset-Pneumonie die Isolierung von diesem Erreger ein unabhängiger Risikofaktor für einen letalen Ausgang sei ⁴³.

Weitere häufige Infektionen treten klinisch als Bakteriämien in Erscheinung, die oft in Verbindung mit intravaskulären Vorrichtungen, so genannten „Devices“ auftreten. Vor allem zentralvenöse Katheter (ZVK) in der Behandlung chronischer Patienten spielen dabei große pathogenetische Rolle. Eine retrospektive Studie untersuchte die klinische Signifikanz und Einfluss von *S. maltophilia*-Bakteriämie bei 49 hämatologischen und onkologischen Patienten. Bei 16 Patienten konnten mehrere Episoden der ZVK-assoziierten-Bakteriämie mit folgenden klinischen Eigenschaften nachgewiesen werden: nosokomialer Hintergrund, vorangehende antibiotische Therapie, Diagnose auf einer allgemeinen Station, immunsuppressive Behandlung, in-situ-ZVK und Neutropenie. Dabei hatten nur 4 Patienten sichtbare Entzündungszeichen am ZVK-Eingang. Bemerkenswert ist die

Tatsache, dass die Bakteriämie bei den meisten Patienten dieser Studie nach Beseitigung des ZVK auch ohne angemessene antibiotische Behandlung auskuriert war ⁴⁴.

Seltenere Manifestation sind Harnwegsinfektionen, die meist infolge von Dauerkatheterisierung auftreten. Auch Fälle von Endokarditis, Meningitis, ophtalmologischen, sowie Haut- und Wundinfektionen sind beschrieben worden ¹⁸.

Als Risikofaktor für das Auftreten von *S. maltophilia* ist eine vorherige Antibiotikatherapie mehrfach belegt ¹⁸. Die Gabe von Carbapenemen als Risikofaktor bei diesen von Natur aus Carbapenem-resistenten Nonfermentern wird derzeit kontrovers diskutiert. Während einige Untersuchungen keinen Zusammenhang zwischen Carbapenemgabe und Nachweis von *S. maltophilia* feststellen konnten ^{66,75}, wurde im SARI-Projekt kürzlich ebenfalls die eindeutig positive Korrelation von Carbapenemverbrauch und *S. maltophilia*-Dichte nachgewiesen ⁶². Auch andere Autoren konnten die Carbapenemgabe als unabhängigen Risikofaktor für *S. maltophilia*-assoziierte Infektionen identifizieren ⁵⁹.

Imipenem und Meropenem, sowie das neuere Ertapenem sind jedoch nicht die einzigen antimikrobiellen Substanzen, die eine Verbreitung dieses Erregers begünstigen kann; auch andere Breitspektrumantibiotika, wie Ceftazidim und Fluorochinolone, aber auch Aminoglykoside und Metronidazol, sind für eine mögliche Selektion von *S. maltophilia* verantwortlich ⁷⁵.

Die unangemessene antibiotische Breispektrum-Therapie ist sicherlich nicht alleinige Voraussetzung für eine nachfolgende gehäufte Isolierung dieses Bakteriums. Mit dem Nachweis ebenfalls assoziiert sind immunsuppressive Therapien, Neutropenie und Malignome sowie ein verlängerter Krankenhausaufenthalt, die Aufnahme auf eine Intensivstation, Beatmung und Tracheostomie. Generell geht das Risiko von in den Patienten eingebrachten Fremdmaterialien aus ¹⁸.

In einer Fall-Kontroll-Studie, wurde neben der Dauer der antibiotischen Behandlung auch eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) als unabhängiger Risikofaktor für eine auf der Intensivstation erworbene *S. maltophilia* ermittelt. Eine im Rahmen der intensivmedizinischen Behandlung erworbene *S. maltophilia*-Infektion ist dabei als Risikofaktor für Mortalität auf der Intensivstation anzusehen ⁶⁶.

Aus den genannten Studien geht daher hervor, dass es sich bei *S. maltophilia* um einen klinisch bedeutsamen, überwiegend nosokomial auftretenden, fakultativ pathogenen Erreger handelt, dessen Nachweishäufigkeit mit dem Einsatz antimikrobieller Chemotherapie korreliert werden kann.

1.2.2 Pseudomonas aeruginosa

Diese Bakterienspezies ist als klassischer nosokomialer Erreger nicht nur im Krankenhaus, sondern nahezu ubiquitär verbreitet.

Bekannte Umgebungsquellen im Krankenhaus sind nicht nur das Leitungs- und Badewasser, Abflusssiphons oder Desinfektionsmittellösungen, sondern vor allem Gegenstände und Geräte, die mit Pseudomonaden-haltigem Wasser in Kontakt kamen, z.B. Augenduschen, Endoskope, Schläuche von Dialyse-, Beatmungs-, Inhalationsgeräten. Ein weiterer wichtiger Übertragungsweg können auch die Hände des Personals sein ³⁷.

P. aeruginosa gehört zu den häufigsten Erregern der nosokomialen Infektionen und wird für 10% aller im Krankenhaus erworbenen Infektionen verantwortlich gemacht ².

Die durch *P. aeruginosa* verursachten Infektionen sind häufig schwerwiegend und lebensbedrohlich. Aufgrund ihrer begrenzten Empfänglichkeit für die meisten antimikrobiellen Substanzen und der hohen Frequenz des Auftretens neuer Resistenzen während der antipseudomonalen Therapie sind diese Erreger schwer zu behandeln ³⁶. Daraus resultieren besonders für schwer kranke Patienten, die auf eine Intensivbehandlung und multiple Antibiotikatherapien angewiesen sind, klinisch oft nicht zufriedenstellende oder fehlende Therapieerfolge ².

Eine Vielzahl von Antibiotika sind bei *P. aeruginosa* wegen ihrer schon von Natur aus umfangreichen Ausstattung an Resistenzmechanismen nicht wirksam. Neben einer verminderten Zellwandpermeabilität und Effluxpumpenmechanismen zählen dazu vor allem zahlreiche β -Laktamasen ³², Cephalosporinasen und Aminoglykosid-modifizierende Enzyme ³⁷. Hinzu kommt, dass Resistenzen gegenüber Breispektrumantibiotika wie Fluorchinolonen und Carbapenemen vergleichsweise schnell durch Punktmutationen entstehen können ³⁷.

Das Problem der Resistenzentwicklung in *P. aeruginosa* nimmt weiter zu und kann sowohl durch Neuauftreten der Resistenz im spezifischen Organismus nach Antibiotikagabe als auch durch eine Übertragung des bereits resistenten Erregers unter den Patienten bedingt sein ². Daraus resultierende Häufung von Resistenzen nach Gabe mehrerer Antibiotika und Kreuzresistenzen zwischen den einzelnen Substanzen tragen zur Entstehung von sogenannten multidrug-resistant (MDR) *P. aeruginosa* bei.

Bisher wurde von diesem Phänomen hauptsächlich im Zusammenhang mit zystischer Fibrose-Patienten berichtet, bei denen sich ständig wiederholte Infektionen zum sequenziellen Hervortreten von Resistenzen gegenüber mehreren Antibiotika führten. Dabei verursachten diese sog. MDR-*P. aeruginosa* durch Verbreitung unter den einzelnen Patienten (z.B. durch die gemeinsame

Versorgung dieser Patienten in CF-Ambulanzen) Ausbrüche mit klonaler Verbreitung dieser Isolate. Vereinzelt treten diese mehrfach resistenten Stämme von *P. aeruginosa* bei Patienten auch ohne Zystische Fibrose als Grunderkrankung auf. Dabei sind Aufenthalt auf der Intensivstation, Bettlägerigkeit, Gebrauch von zahlreichen invasiven Vorrichtungen und Behandlung mit mehreren Antibiotika als wichtige Risikofaktoren für den Erwerb von den oben erwähnten MDR-Erregern zu nennen².

Diese Faktoren sind in der Lage die Prognose dieser meist schwerst kranker Patienten weiter zu verschlechtern. Sie sind daher besonders auf eine rechtzeitige und effektive antimikrobielle Therapie angewiesen.

Obwohl solche beinahe vollständig resistenten Stämme von *P. aeruginosa* momentan noch selten isoliert werden, steigt ihre Inzidenz ständig.⁷¹

1.2.3 Acinetobacter baumannii

Acinetobacter ist eine in der unbelebten Umwelt weit verbreitete Spezies. Diese gramnegativen, unbeweglichen, kokkoiden Stäbchenbakterien sind vor allem in der vergangenen Dekade als bedeutender opportunistischer Krankheitserreger, besonders in der nosokomialen Umgebung, hervorgetreten^{7,22,23}. Wie die anderen Nonfermenter ist dieser Erreger häufig in der Umgebung von Waschbecken, besonders in Siphons oder Siebstrahlreglern zu finden. In der Nähe infizierter oder kolonisierter Patienten kann *Acinetobacter* sogar in der Luft nachweisbar sein³⁷. Nutritive anspruchslosigkeit und physikalische Widerstandsfähigkeit sind Charakteristika dieser Gattung, die ein Überleben an vielen verschiedenen Lokalisationen ermöglichen⁹. Bei bis zu 40 % der gesamten Normalbevölkerung lassen sich *Acinetobacter*-Spezies auf Haut und Schleimhäuten nachweisen⁸.

Im Krankenhaus wird bei solchen Patienten hauptsächlich *A. baumannii* isoliert. Einzelne europaweit verbreitete Stämme von *A. baumannii* sind beschrieben worden, die wiederholt auf verschiedenen Intensivstationen Ausbrüche verursacht haben^{6,67}. Eine ungewöhnlich lange Umweltpersistenz von *Acinetobacter*-Stämmen auf trockenen Oberflächen⁶⁷ ermöglicht deren Verbreitung von vielen verschiedenen Quellen im Krankenhaus⁷⁸. Dies kann für Übertragungen durch Hände des medizinischen Personals oder Gerätschaften zur Beatmungstherapie von Bedeutung sein³⁷.

Acinetobacter ist ein eigentlich wenig virulenter Erreger, der am häufigsten aus Atemwegs- und Harnwegsmaterialien gewonnen wird, wobei auch hier Infektion von Kolonisation soweit möglich unterschieden werden sollte. Klinisch signifikant ist *Acinetobacter* am häufigsten als Erreger nosokomialer Pneumonien nachweisbar und ist wie *P. aeruginosa* und *S. maltophilia* ein typischer Erreger der beatmungsassoziierten "Late-onset"-Pneumonie³⁷. In mehreren breiten

Überwachungsstudien in den USA konnte *A. baumannii* für ca. 5-10 % der auf Intensivstation-erworbenen Pneumonien verantwortlich gemacht werden⁶⁷. Bei nosokomialen Pneumonien in Latein-Amerika steht *Acinetobacter* als zweithäufigster gramnegativer Erreger mit einem Anteil von insgesamt 9,6 % mittlerweile an vierter Stelle²⁴. Die Letalität einer solchen Pneumonie liegt mit bis zu 75% höher als bei den meisten anderen grampositiven oder enterobakteriellen Pneumonien. Unabhängig von Begleitumständen wird einer nosokomialen Pneumonie durch Nonfermenter ein 2,5-fach höheres Sterblichkeitsrisiko zugemessen. Risikofaktoren für eine *Acinetobacter*-Pneumonie sind ein höheres Alter, chronische Lungenerkrankungen, Immunsuppression, Antibiotikagabe und medizinische Geräte im Zusammenhang mit einer Beatmungstherapie^{25,28,37,85}. Die Länge des Aufenthalts auf der Intensivstation sowie der Beatmung und die vorherige Antibiotikatherapie spielen dabei eine Schlüsselrolle^{64,68}.

Eine weitere bedeutsame Infektionsart ist die Bakteriämie, die häufig sekundär im Zusammenhang mit Pneumonien, Wundinfektionen oder katheterassoziiert auftritt und mit hoher Mortalität einhergehen kann³⁷.

Acinetobacter hat eine variable Antibiotikaresistenz und kann gegenüber vielen β -Laktam-, Cephalosporin, Fluorchinolon- und Aminoglykosidantibiotika resistent sein^{15,51,53}. Auch carbapenemresistente Stämme sind beschrieben worden^{53,54,67}.

Die globale Entstehung der *Acinetobacter*-Stämme, die gegen alle β -Lactamantibiotika einschließlich Carbapeneme Resistenzen aufweisen⁸⁴, zeigt das enorme Potenzial dieser Bakterienspezies sich schnell an die Selektionsdruckveränderungen in der Umwelt anzupassen. Das Unterdrücken der vorhandenen Resistenzmechanismen und Erwerbsfähigkeit fremder Resistenzdeterminanten sind die besonderen Fähigkeiten, die *A. baumannii* in der Klinik zu einem gefürchteten Erreger werden ließen. Der enzymatische Abbau des β -Laktamringes durch β -Laktamasen ist der bedeutsamste Resistenzmechanismus bei *A. baumannii*³⁷. Hinzu kommen nichtenzymatische Resistenzmechanismen, wie der Verlust der äußeren Membranproteine, Pumpmechanismen, die zum Efflux des Antibiotikums führen, eine Verminderung der Penetration in die Bakterienzelle oder veränderte Produktion der Penicillin-Bindungsproteine.⁶⁷

Eine Besonderheit stellt der β -Laktamase-Inhibitor Sulbactam dar, der im Gegensatz zu anderen nosokomialen Bakterienspezies auf *Acinetobacter* auch einen antibakteriellen Effekt hat³⁷.

1.3 Spektrum der Resistenzmechanismen der nonfermentativen gramnegativen Erreger

Antibiotikaresistenz ist zwar ein natürliches Phänomen, welches bei der Konkurrenz von Mikroorganismen um einen gemeinsamen Lebensraum oder Wirt auftritt, sie wird jedoch durch den zunehmenden Einsatz von Antibiotika in der Human- und Tiermedizin beschleunigt und verstärkt. Auf molekularer Ebene bedeutet Antibiotikaresistenz, dass ein Mikroorganismus die Fähigkeit erlangt, sich der wachstumshemmenden oder bakteriziden Wirkung einer antimikrobiellen Substanz zu widersetzen³⁴. Bisher sind 3 verschiedene Arten der Resistenzen bei Nonfermentern beschrieben worden: natürliche ("intrinsic"), erworbene ("acquired") und genetisch bedingte Resistenzen³¹. Während natürliche Resistenzen solche Mechanismen beinhalten, die in einer bestimmten Spezies unabhängig von Antibiotikaexposition vorhanden sind, entstehen die erworbenen Resistenzmechanismen durch die Einwirkung von gewissen Auslösefaktoren z. B. durch Antibiotikagabe. Im Gegensatz zu genetischen Resistenzen, unter denen man einen stabilen Erwerb neuer genetischer Informationen entweder durch Mutationen oder Aufnahme von Plasmiden in das Genom versteht, können die erworbenen Resistenzen bei Beseitigung der auslösenden Faktoren wieder reversibel werden.³¹

Neben *Stenotrophomonas* haben v.a. *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* und andere gramnegative Bakterien eine Vielzahl von natürlich entstandenen Resistenzen, die die Behandlung mit häufig verwendeten Antibiotikaklassen erschweren oder unmöglich machen⁵⁸. So entfalten z.B. Carbapeneme (Imipenem, Meropenem) natürlicherweise keine Wirkung gegen *Stenotrophomonas maltophilia*¹. Bei *Pseudomonas aeruginosa* können natürlich und häufig vorkommende Resistenzen gegen Cephalosporinen der ersten/ zweiten/ dritten Generation bei schweren Infektionen zum Therapieversagen führen.³⁴

Oft besitzt eine Bakterienspezies mehrere Mechanismen, um gegen eine spezifische Antibiotikaklasse resistent zu werden:

- Veränderung der Zielstruktur für Antiinfektiva (z.B. Veränderung der Penicillin-Bindungsproteine durch *A. baumannii*⁶⁷).
- Verminderte Penetration in die Bakterienzelle durch Veränderungen in der Zellmembran der Erreger (Verlust von Porinen bei *P. aeruginosa* durch Imipenemgabe³¹).
- Pumpmechanismen, die zum Efflux des Antibiotikums aus der Zelle führen (*P. aeruginosa* und Carbapeneme³⁴).
- Biochemische Stoffwechselwege, durch die das Antibiotikum seine Wirkung nicht entfalten kann³⁴.

- Inaktivierende Enzyme, die das Antibiotikum unwirksam machen (betalaktamaseproduzierende *S. maltophilia* und Betalaktam-Antibiotika⁶²).

Die **Beta-Laktame** gehören zu den am häufigsten eingesetzten Antibiotika⁸⁴. Deren Inaktivierung stellt einen der klinisch bedeutsamsten sowohl natürlichen als auch erworbenen Resistenzmechanismen dar⁵⁰.

Der wichtigste Resistenzmechanismus bei *S. maltophilia* ist die induzierbare Produktion der zwei β -Laktamasen, L1 und L2. Dabei hydrolysiert L1 als Breitspektrum Metallo- β -Laktamase Carbapeneme⁷³, während L2 ein Serin-Enzym ist und seine Aktivität hauptsächlich gegen Cephalosporine zeigt³. So erfolgt bei L2 die Hydrolyse der β -Laktame über einen katalytischen Serinrest im aktiven Zentrum, während der L1-Typ die Hydrolyse mit Hilfe eines Cofaktors in Form von bivalenten Kationen (Zn^{2+}) katalysiert⁸⁴.

Darüber hinaus können Mikroorganismen durch die Übernahme der Resistenzgene, die so genannte horizontale Resistenzweitergabe, ebenfalls resistent gegenüber Antibiotika werden.

Die Aufnahme von DNA geschieht in Form von Plasmiden, Transposons und anderen mobilen genetischen Elementen⁴⁷. Dies verschafft den Bakterien in der Krankenhausumgebung einen Selektionsvorteil, da zusätzliche Antibiotikaresistenzgene aufgenommen werden können, die bei häufiger Antibiotikagabe einen Fitnessvorteil für die Erreger bedeuten.

Diese Übertragung kann durch Aufnahme von DNA ohne Zellkontakt, entweder in freier Form (Transformation) oder als Teil eines Bakteriophagengenoms (Transduktion) bzw. im Anschluss an Zellkontakt (Konjugation) erfolgen⁵. Auf diese Weise können Bakterien Antibiotikaresistenzen auf vielfältige Weise von anderen Erregern erwerben, z. B. durch chromosomale Mutationen oder Transfer extrachromosomaler DNS-Elemente mittels Plasmiden und Integrons⁴⁷.

Plasmide stellen den wichtigsten Mechanismus zur Verbreitung erworbener Resistenzgene dar. Es handelt sich um autonome zirkuläre DNA-Doppelstränge mit einer Größe von 3×10^3 bis $4,5 \times 10^5$ bp, die im Zytoplasma lokalisiert sind und unabhängig vom Chromosom repliziert werden. Sie sind für die Bakterienzelle nicht essentiell, können jedoch sowohl Resistenzdeterminanten als auch andere wichtige Gene wie Virulenzfaktoren beherbergen. Große Plasmide liegen in der Regel in ein bis zwei, kleine Plasmide dagegen in bis zu 100 Kopien in einer Zelle vor⁴⁰.

Die Mehrzahl von Studien zur Resistenzentwicklung geht von der Hypothese aus, dass zwischen der Verwendung von Antibiotika und der konsekutiven Resistenzentwicklung ein kausaler Zusammenhang besteht. Es erscheint daher logisch, dass bereits kurzzeitige Reduktion des Antibiotikaselektionsdruckes, wie z.B. im Konzept der „Cycling Antibiotics“ im Rahmen von Studien belegen konnte^{16,17}, zu einer Durchsetzung sensibler Bakterienpopulationen führen kann. Dennoch

lässt sich beobachten, dass bestimmte Resistenzphänotypen trotz nachlassender Verwendungshäufigkeit der entsprechenden antimikrobiellen Substanzen persistieren⁴⁶.

Integrone bieten an dieser Stelle eine Erweiterung des Denkmodells: Setzt man einen präexistenten Resistenzgen-Pool voraus, der das Ergebnis einer seit Jahrtausenden andauernden Exposition der Bakterien gegenüber natürlich vorkommenden Antibiotika darstellt, sind mobile genetische Elemente²¹ wie Integrone imstande, diese Resistenz zu vermitteln. Mobile genetische Elemente stellen das Bindeglied zwischen chromosomal kodierter und plasmidkodierter Resistenz dar, da sie Resistenzgene vom bakteriellen Chromosom auf Plasmide transferieren können.

Integrone nehmen eine herausragende Rolle in der Verbreitung von Resistenzgenen ein. Diese genetischen Elemente besitzen ein Rekombinationssystem, das sie dazu befähigt, als Genkassetten vorliegende Gene zu akquirieren und zu mobilisieren¹⁴. Da Integrone über einen Promotor zur Expression dieser Genkassetten verfügen, dienen sie als natürliche bakterielle Klonierungs- und Expressionssysteme⁵⁷.

Der Begriff „Integron“ wurde Anfang der 80er Jahre von Stokes and Hall eingeführt⁷⁹. Jedes Integron besitzt eine spezifische Proteinstruktur, die zur Einteilung in verschiedene Integronklassen herangezogen wird. Diese so genannte Integrase katalysiert die ortsspezifische Rekombination von Resistenzgenkassetten^{55,56}. Genkassetten können mit Hilfe dieser Enzyme in ein Integron eingefügt oder daraus entfernt werden¹⁰⁻¹³. Daher wurde als grundlegende Voraussetzung für die Verwendung der Bezeichnung Integron festgelegt, dass der entsprechende Genomabschnitt eine spezifische Rekombinationsschnittstelle einschließlich der Integrase für den Einbau von Insertionskassetten aufweist und somit über die Enzymsausstattung verfügt, verschiedene Resistenzgene zu binden bzw. wieder aus dem Verbund auszuschleusen²¹.

Basierend auf Homologievergleichen der verschiedenen Integrase-Gene, werden heute vier unterschiedliche Klassen von Resistenz-Integrone definiert⁷⁴.

Klasse 1 Integrone werden am häufigsten in klinischen- und Umweltisolaten aus der Familie der *Enterobacteriaceae* und anderen gramnegativen Bakterien nachgewiesen²⁷. Auch bei multiresistenten Bakterien lassen sich überwiegend Klasse-1-Integrone nachweisen, daher wird ihnen auch die größte klinische Bedeutung zuerkannt.

Klasse 2 Integrone wurden in klinischen Isolaten von *Acinetobacter* beschrieben²⁹, wobei Integrone der Klasse 3 bisher selten in klinischen Isolaten von *P.aeruginosa* nachgewiesen werden konnten. Klasse 4 Integrone werden aufgrund der hohen Anzahl der Genkassetten als Superintegron bezeichnet²¹.

Die bisher beschriebenen Integron-assoziierten Genkassetten zeigen unter anderem Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Antibiotikaklassen^{20,21} wie z.B. Aminoglykosiden, Betalaktamen, Chloramphenicol, Erythromycin und Sulfonamiden sowie gegenüber Desinfektionsmitteln, wie quarternären Ammoniumverbindungen⁷².

Eine Studie aus Chile untersuchte 100 *Acinetobacter baumannii* und fand unter den 59 Isolaten, die dem Biotyp 9 zuzuordnen waren, 81,4% integronhaltige Stämme. Der Integronanteil der Isolate mit anderen Biotypen schwankte zwischen 0 und 16,7%.

In den Krankenhäusern dieser Region hat der Biotyp 9 die höchste Prävalenz und erwies Resistenzen gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika. Dieser Biotyp war damit resistenter als alle anderen Gruppen von *Acinetobacter baumannii*²⁹.

In vorausgegangenen Untersuchung einer anderen Arbeitsgruppe des Instituts für medizinische Mikrobiologie wurden im Jahr 2001 in Isolaten aus Blutkulturen Integrons der Klasse 1 entdeckt⁷⁶. Die 278 konsekutiv untersuchten Erreger gehörten zu insgesamt elf unterschiedlichen gramnegativen Spezies. Bei dreizehn Prozent der untersuchten Isolate konnten 1- 3 Integrons der Klasse 1 nachgewiesen werden. Die Integrons traten bei sechs unterschiedlichen Bakterienspezies auf.

Während der Beitrag von Integrons zu einer Resistenzentwicklung somit aus evolutionsgenetischer und epidemiologischer Sicht gut untersucht ist, ist bisher wenig darüber bekannt, unter welchen Bedingungen Integrons in der Krankenhausumgebung die Resistenzentwicklung beeinflussen. Die oben bereits erwähnten Vorarbeiten zu diesem Thema (Schmitz et al, Hygiene&Medizin) konnten anhand von Blutkultur-Isolaten gramnegativer Bakterien der Universitätsklinik Düsseldorf zeigen, dass Multiresistenzintegrons vor allem im Bereich der Intensivstationen gehäuft auftraten und dass sich innerhalb eines Zeitraumes von 4 Jahren ihr Anteil nahezu vervierfacht hat.

1.4 Risikofaktoren für die Verbreitung der Resistenzen gramnegativer Bakterien

Die Ursachen für die Zunahme der Resistenzen und Verbreitung der multiresistenten, gramnegativen, nosokomialen Erreger auf den Intensivstationen sind vielfältig und noch nicht hinreichend untersucht. In den Industrieländern scheint der antibiotische Selektionsdruck ein wichtiger Grund für diese Veränderungen zu sein. Aus der ständigen Zunahme multimorbider Patienten mit Abwehrschwäche, die überwiegend intensivmedizinisch behandelt werden, resultiert der vermehrte Einsatz von Antibiotika auf den Intensivstationen. Dadurch wird ein sehr hoher Selektionsdruck ausgeübt, der sowohl Entstehung als auch Ausbreitung resistenter Bakterien stark begünstigt (http://www.p-e-g.org/ag_resistenz/main.htm).

Darüber hinaus kann auch ein ungezielter Antibiotikaeinsatz zur Selektion bereits bestehender, resistenter Bakterien führen. Das geschieht dadurch, dass die natürliche bakterielle Standortflora eines Patienten durch die resistenten Erreger verdrängt wird und es zur Verschiebung des ökologischen Gleichgewichts kommt³⁴. Nach Aussage Levys sind viele Resistenzen nur langsam oder gar nicht mehr reversibel, auch wenn der Selektionsdruck durch Änderung der Verschreibungspraktiken nachlässt. Dabei hängt die Wahrscheinlichkeit, dass diese bereits resistenten Erreger bei Verzicht auf Antibiotika ihre Sensibilität wiedererlangen von der Art des Bakterium ab und davon, wie sehr der erworbene Resistenzmechanismus dessen biologische „Fitness“ beeinträchtigt hat³⁴.

Desweiteren kann es bei der Aufnahme von Patienten, die Träger multiresistenter Bakterien sind, oder durch das medizinische Personal, das mit multiresistenten Erregern besiedelt sind, zu einer Übertragung kommen³⁴. V.a. bei umweltresistenten Bakterien wie *Acinetobacter* spp., die auch auf trockenen Oberflächen lange persistieren können³⁷, ist dieses Phänomen nicht selten anzutreffen.

Zuletzt können Mängel in der Infektionsprävention und nicht sorgfältig genug durchgeführte Isolation der Träger zu weiteren Verbreitung von multiresistenten Erregern auf andere Patienten führen. In einer 2005 publizierten deutschen Studie³⁰ liegt die Rate an exogenen bakteriellen Infektionen bei nachgewiesener Übertragung zwischen Patienten innerhalb von 10 Tagen bei ca. 15 %. Wahrscheinlich liegt die tatsächliche Übertragungsrate höher (zwischen 20-30 %), wenn man einen möglichen Beitrag der Umgebungskontamination durch diese Erreger auf patientennahen Flächen und Gegenständen (z.B. *P. aeruginosa*) berücksichtigt³⁴.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Als Ziel dieser Arbeit sollte die Häufigkeit der gramnegativen Nonfermentern (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. m altophilia*) im Bereich der chirurgischen Intensivstation des Universitätsklinikums Düsseldorf in einem Beobachtungszeitraum von sechs Wochen untersucht werden.

Nach einer biochemischen Differenzierung der isolierten Bakterien sollte der Resistenzphänotyp gegenüber den wichtigsten Betalaktamantibiotika ermittelt werden. Alle erfassten Bakterienisolate sollten mit Hilfe der PCR auf das Vorliegen von Integrons der Klassen 1 und 2 untersucht werden. Anschließend sollte im Rahmen der Sequenzierung eine Charakterisierung der vorliegenden Resistenzintegrons erfolgen.

Darüber hinaus sollte mittels RAPD die klonale Identität der isolierten Nonfermentern überprüft werden, um ein mögliches Übertragungsgeschehen der NF-Bakterien auf der Intensivstation und die Verbreitungswege der Resistenzen nachzuweisen.

Gleichzeitig sollte eine detaillierte Erfassung mehrerer klinischer Parameter erfolgen, um herauszufinden, ob diese mögliche Risikofaktoren für den Nachweis von Nonfermentern darstellen. Parameter wie der klinische Aufnahmegrund, infektiologische Parameter, vorhandene Devices, Antibiotikatherapie, genaue Lokalisation des Patienten auf der ITS, angefallene Pflage tage sollten fortlaufend und vollständig dokumentiert werden.

Um den mutmaßlich wichtigsten Einflussfaktor auf das Antibiotikaresistenzverhalten der Intensivpatienten zu untersuchen, sollte neben dem individuellen Antibiotikaverbrauch jedes einzelnen Patienten auch der Gesamtselektionsdruck aller Substanzen einer Antibiotikaklasse innerhalb der Station dokumentiert werden.

Um den Zusammenhang zwischen dem NF-Nachweis und den oben erwähnten Risikofaktoren, dem Auftreten von nosokomialen Infektionen und der Sterblichkeit der Patienten zu analysieren, sollten die Daten mit der Kontrollgruppe (nicht-NF) verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten

Unsere Daten wurden im Zeitraum vom 01.04.2003 und dem 15.05.2003 auf der chirurgischen Intensivstation der Universitätsklinik Düsseldorf erhoben. Dabei wurden nur die Patienten in die Studie aufgenommen, die voraussichtlich über einen längeren Zeitraum als 24 Stunden stationär waren. Insgesamt konnten 59 Patienten in die Studie eingeschlossen werden.

Das erste Ziel unserer Datenerhebung war die Erfassung des klinischen Zustandes der Patienten. So mussten sowohl die immunologischen als auch infektiologische Parameter erfasst werden. Hierbei wurden neben den infektiologischen Laborparametern (Leukozytenzahl, CRP) der Patienten unter anderem 3 Scores erhoben. Um den patientenbezogenen Selektionsdruck, dem die Bakterien ausgesetzt waren, zu quantifizieren wurde die täglich verabreichte Antibiotikadosis dokumentiert und anschließend in „Daily Defined Dosis“ (DDD) umgerechnet.

2.2 Datenerhebung

2.2.1 APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation)

Der erste verwendete Score war der APACHE II ⁴¹. Hierbei handelt es sich um einen Score, der eine Aussage über die Sterbewahrscheinlichkeit eines Patienten macht. Die folgenden Parameter wurden verwendet und den angegebenen Punktwerten zugeordnet (Tab. 4):

Alter des Patienten [Jahre]

Punkte	0	2	3	5	6
Alter	≤ 44	45 - 54	55 - 64	65 - 74	≥ 75

Temperatur [Grad Celsius]

Punkte	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Körperkerntemperatur [°C]	≥ 41,0	39,0 - 40,9		38,5 - 38,9	36,0 - 38,4	34,0 - 35,9	32,0 - 33,9	30,0 - 31,9	≤ 29,9

Herzfrequenz [Schläge pro Minute]

Punkte	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Herzfrequenz [1/min]	≥ 180	140 - 179	110 - 139		70 - 109		55 - 69	40 - 54	≤ 39

Mittlerer arterieller Druck (MAP)[mmHg]

Punkte	4	3	2	1	0	1	2	3	4
MAP [mm Hg]	≥ 160	130 - 159	110 - 129		70 - 109		50 - 69		≤ 49

Atemfrequenz [Atemzüge pro Minute]

Punkte	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Atemfrequenz (spontan/maschinell)	≥ 50	35 - 49		25 - 34	10- 24	10-11	6-9		≤ 5

Sauerstoffsättigung [%]

Punkte	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Oxygenierung									
a) FIO ₂ ≥ 0,5: AaDO ₂	≥ 500	350 - 499	200 - 349		< 200				
b) FIO ₂ < 0,5: PaO ₂					> 70	61 - 70		55 - 60	< 55

Blut-pH

Punkte	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Arterieller pH	≥ 7,70	7,60 - 7,69		7,50 - 7,59	7,33 - 7,49		7,25 - 7,32	7,15 - 7,24	< 7,15

Leukozytenzahl [l/mm^3]

Punkte	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Leukozyten [l/mm^3] (* 1 000)	≥ 40		20,0 - 39,9	15,0 - 19,9	3,0 - 14,9		1,0 - 2,9		$< 1,0$

Natrium [im Serum; mmol/l]

Punkte	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Serum Natrium [mmol/L]	≥ 180	160 - 179	155 - 159	150 - 154	130 - 149		120 - 129	111 - 119	≤ 110

Kalium [im Serum; mmol/l]

Punkte	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Serum Kalium [mmol/l]	$\geq 7,0$	6,6 - 6,9		5,5 - 5,9	3,5 - 5,4	3,0 - 3,4	2,5 - 2,9		$< 2,5$

Kreatinin [im Serum; mg/dl]

Punkte	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Krea _{Serum} [mg/dl]	$\geq 3,5$	2 - 3,4	1,5 - 1,9		0,6 - 1,4		$< 0,6$		

Hämatokrit [%]

Punkte	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Hämatokrit [%]	≥ 60		50,0 - 59,9	46,0 - 46,9	30,0 - 45,9		20,0 - 29,9		< 20

Glasgow-Coma-Scale (GCS)

Punkte	1	2	3	4	5	6
Augenöffnen	gar nicht	auf Schmerzreiz	auf Aufforderung	spontan		
Motorik	keine	Streck-mechanismen	Beuge-mechanismen	ungezielt auf Schmerz	gezielt nach Schmerz	gezielt nach Aufforderung
Verbal	keine	unverständliche Laute	inadäquate Reaktion	Patient desorientiert, beantwortet Fragen	Patient orientiert	

Score = 15- GCS-Wert

Tabelle 4: Sterbewahrscheinlichkeit. Übersicht der Zuordnung von Parametern zu den Punktwerten.

Gesundheitspunkte:

- a. Anamnestisch schwere Organinsuffizienz eruierbar oder Patient immunkompromittiert, z. B. Leberzirrhose, portale Hypertonie, obere GI-Blutung, Encephalopathie, New York Heart Association (NYHA) -Klasse IV, schwere Ateminsuffizienz, schwere pulmonale Hypertonie (> 40 mm Hg), sekundäre Polyzytämie, Dialysepflichtigkeit, immunsuppressive Therapie, Chemotherapie, Bestrahlung, hohe Steroiddosen, Leukämie, AIDS.

5 Punkte

- b. Elektive postoperative Patienten.

2 Punkte

2.2.2 Clinical Pulmonary Infection Score (CPIS)

Der zweite verwendete Score ist der Clinical Pulmonary Infection Score (CPIS)⁷⁰. Hierbei wurden die folgenden Parameter erhoben:

Temperatur [Grad Celsius]

≥ 36.1 und ≤ 38.4 (0 Punkte)

≥ 38.5 und ≤ 38.9 (1 Punkt)

≥ 39.0 und ≤ 36.0 (2 Punkte)

Leukozytenzahlen [l/mm^3]

≥ 4000 und ≤ 11000 (0 Punkte)

< 4000 oder > 11000 (1 Punkt)

tracheale Sekretionsmenge

wenig (0 Punkte)

mittel (1 Punkt)

viel (2 Punkte)

tracheale Sekretkonsistenz

normal (0 Punkte)

purulent (1 Punkt)

Quotient aus Sauerstoffpartialdruck (PaO_2) und Sauerstoffsättigung (FiO_2) [mmHg]

≥ 240 oder Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) (0 Punkte)

≤ 240 und kein ARDS (2 Punkte)

Röntgenbild

kein Infiltrat (0 Punkte)

fleckiges oder diffuses Infiltrat (1 Punkt)

lokalisiertes Infiltrat (2 Punkte)

Hierbei konnten Punktwerte von 0 bis 10 erreicht werden. Der resultierende Wert korreliert mit der Schwere der Atemwegsinfektion.

2.2.3 Sepsis-related Organ Failure (SOFA)

Hierbei wurden folgende Parameter erhoben ⁸²:

Quotient aus PaO₂/FiO₂ [mmHg] (Atmung)

>= 400	(0 Punkte)
< 400	(1 Punkt)
< 300	(2 Punkte)
< 200	(3 Punkte)
< 100	(4 Punkte)

Thrombozytenzahl [1000/mm³] (Koagulation)

>= 150	(0 Punkte)
< 150	(1 Punkt)
< 100	(2 Punkte)
< 50	(3 Punkte)
< 20	(4 Punkte)

Bilirubin [mg/dl] (Leber)

< 1.2	(0 Punkte)
1.2 - 1.9	(1 Punkt)
2.0 - 5.9	(2 Punkte)
6.0 - 11.9	(3 Punkte)
> 12.0	(4 Punkte)

Blutdruck (Kardiovaskuläres System)

MAP > 70 mmHg	(0 Punkte)
MAP < 70 mmHg	(1 Punkt)
Dopamine <= 5 or Dobutamin (dosisunabhängig)	(2 Punkte)
Dopamin 5-15 or Nor-/Epinephrin <= 0.1	(3 Punkte)
Dopamin > 15 or Nor-/Epinephrin > 0.1	(4 Punkte)

Glasgow-Coma-Scale (ZNS)

15	(0 Punkte)
13-14	(1 Punkt)
10-12	(2 Punkte)
6-9	(3 Punkte)
<6	(4 Punkte)

Kreatinin [mg/dl] (Niere)

< 1.2	(0 Punkte)
1.2 - 1.9	(1 Punkt)
2.0 - 3.4	(2 Punkte)
3.5 - 4.9	(3 Punkte)
>5.0	(4 Punkte)

Der maximal erreichbare Wert des Scores beträgt 24 und korreliert mit dem Krankheitsgrad des Patienten.

2.2.4 Antimikrobielle Therapie

Um den patientenbezogenen, antimikrobiellen Selektionsdruck, dem die isolierten Bakterien ausgesetzt waren, zu erfassen und zu quantifizieren wurde für jedes Antibiotikum die täglich verabreichte Antibiotikadosis dokumentiert und anschließend in „Daily Defined Dosis“ (DDD) umgerechnet (<http://www.who.cc.no/atcddd/>). Eine DDD beschreibt dabei die angenommene mittlere tägliche Erhaltungsdosis für die Hauptindikation eines Wirkstoffes bei Erwachsenen⁶⁰. Unter Bezugnahme auf die Liegezeit der Patienten wurde darüber hinaus der auf der Gesamtstation vorherrschende überindividuelle Selektionsdruck für jedes dokumentierte Antibiotikum in Form von DDDs pro 1000 Patiententage ermittelt. Die Antibiotikaaanwendungsdichte (AD) ist somit ein Maß zur Beurteilung des Antibiotikaverbrauches einer Station, welches den Verbrauch bezüglich verschiedener Antibiotikaklassen und der unterschiedlichen Anzahl Behandlungstage vergleichbar macht⁶⁰.

2.2.5 Zusätzliche Parameter / Daten

Unter anderem wurde dokumentiert, ob eine Sepsis oder Pneumonie in der ärztlichen Dokumentation erfasst war. Neben den schon bei den Scores erfassten Leukozytenzahlen und der Temperatur wurde das C-reaktive Protein (CRP) [mg/dl] als weiterer infektiologischer Parameter erfasst, um eine noch bessere Information über den infektiologischen Zustand des Patienten zu bekommen. Darüber hinaus wurden alle invasiven Maßnahmen in die Datenbank aufgenommen (Harnwegskatheter, Dialyse, Endotrachealtubus, arterielle Kanülen, zentralvenöse Zugänge, periphervenöse Zugänge, Drainagen inklusive der jeweiligen Lokalisation) um möglichen Eintrittspforten nosokomialer Infektionen zu erfassen.

2.3 Probenentnahme des Untersuchungsmaterials

Die Materialentnahme erfolgte im Zeitraum von 6 Wochen im Rahmen eines auf der Station etablierten Screeningprogrammes und wurde vom medizinischen Personal vorgenommen. Folgende Materialien wurden untersucht: Sputum, Wundabstriche, Blutkulturen, Stuhlproben, Urinproben, Drainageflüssigkeit. Zusätzlich wurden einmal wöchentlich Proben aus der Umgebung der Patienten genommen (Abstriche von Waschbecken, Respirator, Katheterspitzen). Nach Ausstrich der Materialien auf Müller-Hinton Agar ohne Blutzusatz, standen die Kulturproben zur Selektion und Differenzierung gramnegative Bakterienspezies zur Verfügung.

2.4 Anzuchtung von Bakterienisolaten

Aus den auf Blutplatten ausgestrichenen Mischkulturen des Probenmaterials wurden alle gramnegativen Bakterien isoliert und in Form von 3-Ösenausstrichen Reinkulturen auf Blutagar hergestellt. (**Typische Zusammensetzung [g/Liter]**: Nährsubstrat (Hefeextrakt, Peptone, Leberhydrolysat) 23,0; Natriumchlorid 5,0; Agar-Agar 12,0 / **Zubereitung**: 40 g in 1 Liter Wasser lösen und autoklavieren (15 Min. bei 121°C). Nach dem Abkühlen auf 45-50°C 5-8% steriles defibriniertes Blut ohne Blasenbildung einmischen, Platten gießen (pH: 7,4 ± 0,2 bei 25 °C). Die Nährböden wurden anschließend für 24 Stunden bei 36°C bebrütet. Anschließend wurden die jeweiligen Reinkulturen in Mikrobänken bei -70° C aufbewahrt.

2.5 Selektion der gramnegativen Bakterien

Um von den Kulturplatten der 24 bis 48 Stunden bebrüteten Abstrichmaterialien die gramnegativen Bakterien zu isolieren, wurde die Gram-Färbung mit anschließender mikroskopischer Begutachtung verwendet.

Die Originalmethode der Gram-Färbung wurde von dem dänischen Arzt Hans Christian Gram im Jahr 1884 entwickelt und erlaubt eine Differenzierung grampositiver und gramnegativer Mikroorganismen. Für die Anfärbbarkeit der Mikroorganismen ist der Aufbau der Zellwand verantwortlich. Der im Zytoplasma eingelagerte lila Farbstoffkomplex kann in gramnegativen Erregern sehr leicht ausgewaschen werden, während die Zellwand grampositiver Mikroorganismen gefärbt bleibt. Um die farblosen, gramnegativen Bakterien sichtbar zu machen, wird eine Gegenfärbung durchgeführt.

Vor der Färbung werden die Bakterienausstriche zunächst auf dem Objektträger Hitze- fixiert. Anschließend wird der Ausstrich mit Gentiana-Violettlösung, durch Auftropfen der Farblösung

überschichtet und 2-3 Minuten angefärbt. Nach kurzem Abspülen mit Wasser wird der Ausstrich für 3 Minuten in Jodlösung eingestellt. Anschließend wird der Ausstrich in 96%igem Ethanol 20-30 Sekunden entfärbt und gründlich unter fließendem Leitungswasser ausgewaschen. Als nächstes wird Karbolfuchsinlösung (1:10 mit Aqua dest. verdünnt) auf den Ausstrich aufgetropft und für 30 Sekunden stehen gelassen. Dann wird die Farblösung abgegossen und mit fließendem Leitungswasser abgespült. Nachdem der Objektträger getrocknet ist, wird der Ausstrich unter dem Mikroskop (Zugabe von Immersionsöl, Betrachtung bei 100-facher Vergrößerung) beurteilt.

2.6 Differenzierung Enterobakteriazen / Nonfermentern

Mit dem Oxidase-Test weist man Cytochrom P450 bei Spezies nach, die Sauerstoff als endgültigen Elektronenakzeptor im Energiestoffwechsel verwenden. Cytochrom ist ein Farbstoff, der in der Bakterienzelle in reduzierter Form vorliegt. In diesem Zustand ist er farblos. Besitzt ein Mikroorganismus das Enzym Cytochrom- Oxidase, so wird ein auf dem Teststreifen befindlicher Indikator oxidiert und schlägt nach blau -violett um (oxidasepositiv = Hinweis auf das Vorliegen eines Nonfermenters). Dazu wurden die Teststreifen der Firma Boehringer Ingelheim verwendet. Es wurden nach den Angaben des Herstellers 2-3 Kolonien mit einer sterilen Impföse vom Nährboden auf den Teststreifen aufgetragen und anhand der Farbreaktion, die sich innerhalb einer Minute einstellen muss, eine Einteilung in Oxidase- positive und negative Isolate vorgenommen.

Im Anschluss an diese Vordifferenzierung erfolgte die biochemische Charakterisierung mit Hilfe von Schnelltestverfahren wobei die Oxidase-positiven, gramnegativen Isolate mittels Api® 20NE für Nonfermenter, die Oxidase-negativen Isolate mit dem Api® 20 E(enterobakteriazen) differenziert wurden.

2.7 Biochemische Differenzierung

Für die Identifizierung der Stämme wurden standardisierte, kommerzielle Testsysteme Api® 20E und Api® 20NE (Firma bioMerieux, Nürtingen) verwendet. Diese miniaturisierten Verfahren beruhen auf dem Nachweis der physiologischen Merkmale der Bakterien mit Hilfe von Indikatormedien.

2.7.1 Durchführung des Api® 20E

Api® 20E ist ein standardisiertes System und dient der Identifizierung von Enterobacteriaceae und anderen gramnegativen, nicht anspruchsvollen Stäbchen. Der Api® 20E Streifen besteht aus 20 Mikroröhrchen, die dehydrierte Medien zum Nachweis von Enzymaktivitäten und Zuckerfermentation bzw. Zuckeroxidation. Vor der Beimpfung wurden ca. 5 ml destilliertes Wasser in die Inkubationswanne gegeben, um eine feuchte Kammer herzustellen. Die Labornummer des Isolates wurde auf dem seitlichen Teil der Wanne notiert und der Streifen dort platziert. Nach der Bereitstellung eines sterilen Röhrchens mit 5 ml NaCl 0,9 % oder 5 ml sterilem Aqua destillata ohne Zusätze wurde eine Einzelkolonie der zuvor hergestellten Reinkultur im Suspensionsmedium homogenisiert. Bei diesem Verfahren wurden vorzugsweise Über-Nacht-Kulturen (nach 18-24 Stunden Bebrütungszeit) verwendet. Anschließend wurde der Api® 20E Streifen mit der vorbereiteten Suspension, deren Trübung dem McFarland- Standard 0,5 entsprach, nach Angaben des Herstellers beimpft. Dabei wurden einige der Streifenbecher mit Paraffinöl überschichtet, um anaerobe Bedingungen herzustellen. Abschließend wurde die Inkubationswanne abgedeckt und für 18-24 Stunden bei $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach der vorgegebenen Zeit erfolgte die Ablesung der Teststreifen mit Hilfe der vom Hersteller mitgelieferten Tabelle. Zuerst wurden alle Spontanreaktionen auf dem Ergebnisblatt notiert und anschließend die Tests, die eine Reagenzzugabe erforderten, geprüft. Für die Interpretation der Testergebnisse benötigt man ein numerisches Profil, das anhand der einzelnen biochemischen Reaktionen auf dem Ergebnisblatt erstellt wurde. Die Identifizierung erfolgte anhand der Datenbasis mit der aktuellen Identifizierungssoftware APILAB Plus Version 33.3.

2.7.2 Durchführung des Api® 20NE

Api® 20NE ist ein standardisiertes Testsystem zur Identifizierung nicht anspruchsvoller, gramnegativer Stäbchen, die nicht zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören. Dieses Verfahren wird bei der Differenzierung von Bakterien der Gattungen *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas* und anderer Nonfermenter eingesetzt. Der Api® 20NE Streifen enthält 20 Mikroröhrchen mit dehydrierten Substraten. In 8 Röhrchen kommt es nach Beimpfung mit der Keimsuspension zu konventionellen Reaktionen, d.h. die während der Inkubation entstandenen Stoffwechselprodukte bewirken direkt oder nach Zugabe von Reagenzien Farbumschläge. Die restlichen 12 Mikroröhrchen wurden mit einem Minimalmedium beimpft und zeigten Assimilationsreaktionen an. Dabei wuchsen die Bakterien nur dann, wenn sie das entsprechende Substrat verwerten konnten.

Nach der Vorbereitung des Teststreifens wurden 1-4 morphologisch gleiche Kolonien (18 – 24 Stunden alt) vom Agar abgenommen und im API NaCl 0,85% Medium (2 ml) gut homogenisiert. Diese Suspension entsprach dem Trübungsstandard McFarland 0,5. Die Keimsuspension wurde in die Röhrrchen NO₃ bis PNPG pipettiert. Dabei wurden nur die Röhrrchen, nicht die Becher gefüllt. Anschließend wurden ca. 200 µl der restlichen Keimsuspension in die Ampulle API AUX Medium überfüllt und gut homogenisiert. Im Folgenden wurden die Röhrrchen und die Becher der Tests GLU bis PAC mit der Suspension beimpft und die Becher GLU, ADH und URE mit Paraffinöl überschichtet. Zuletzt wurde die Inkubationswanne abgedeckt und für 24 Stunden (± 2 Stunden) bei 29 °C (± 2 °) inkubiert. Nach der vorgegebenen Zeit erfolgte die Ablesung der Teststreifen mit Hilfe der vom Hersteller mitgelieferten Tabelle. Zuerst wurden alle Spontanreaktionen auf dem Ergebnisblatt notiert und anschließend die Tests, die eine Reagenzzugabe erforderten, geprüft. Für die Interpretation der Testergebnisse benötigte man ein numerisches Profil, das anhand der einzelnen biochemischen Reaktionen auf dem Ergebnisblatt erstellt wurde. Die Identifizierung erfolgte anhand der Datenbasis mit der aktuellen Identifizierungssoftware APILAB Plus V. 33.3.

2.8 Phänotypische Resistenzbestimmung

2.8.1 Einleitung

Die Resistenzbestimmung stellt ein *in vitro* Testsystem dar, mit dem ein Bakterienisolat nach Einwirkung eines Antibiotikums dosisabhängig als Folge des antibakteriellen Effektes aus seine Vermehrungs- oder Überlebensfähigkeit als sensibel, intermediär sensibel oder resistent gegenüber dem Antibiotikum charakterisiert wird.. Maßgeblich dafür ist die niedrigste vermehrungshemmende (bakteriostatische) Konzentration (minimale Hemmkonzentration, MHK) bzw. die niedrigste bakterizide Konzentration (minimale bakterizide Konzentration, MBK) eines Antibiotikums. Die phänotypische Resistenzbestimmung der Bakterienisolate wurde mit Hilfe von Mikrotitrationsplatten der Firma Merlin durchgeführt. Diese Empfindlichkeitsprüfung beruht auf der Rehydrierung von Antibiotika durch Zugabe einer standardisierten Bakteriensuspension. Dieses Verfahren erfasst phänotypische Resistenzen gegenüber den folgenden Antibiotika bzw. Substanzkombinationen:

- Ampicillin (AMP)
- Amoxicillin/ Clavulansäure (AMOX/ CLAV)
- Cefepim (CEFP)
- Cefepim/ Clavulansäure (CEFP/CLAV)
- Ceftazidim (CEZI)
- Ceftazidim/ Clavulansäure (CEZI/ CLAV)

- Cefotaxim (CETA)
- Cefotaxim/ Clavulansäure (CETA/ CLAV)
- Aztreonam (AZT)
- Cefpodoxim-Proxetil (CEPO)
- Cefpodoxim/ Clavulansäure (CEPO/ CLAV)
- Piperacillin (PIP)
- Piperacillin/ Tazobactam (PIP/ TAZ)
- Meropenem (MER)
- Cefoxitin (CEXI)

2.8.2 Arbeitsschritte

Mehrere einzeln liegende Kolonien einer 18-24 Stunden alten Reinkultur vom Blutagar (ohne Zusatz) wurden mit einer Impföse abgenommen und in 5 ml NaCl 0,9 % gut homogenisiert, bis die Suspension bei der photometrischen Messung dem Trübungsstandard McFarlane 0,5 (ca. 10^7 bis 10^8 KBE/ml) entsprach. Zur Reinheitskontrolle wurde die Bakteriensuspension auf eine Blutagarplatte überimpft. Danach wurden 50 µl der Bakteriensuspension in 11 ml Müller-Hinton II Bouillon pipettiert und gut homogenisiert. Es wurde Müller-Hinton Bouillon ohne Blutzusatz und mit angepasster Kationenkonzentration verwendet. Nach der Beschriftung der Testplatte erfolgte die Beimpfung der MICRONAUT-Platte nach Angaben des Herstellers mit 100 µl in jede Vertiefung des Tests. Anschließend wurde die Testplatte mit einer unperforierten Abklebefolie verschlossen und im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.8.3 Auswertung

Nach 18-24 Stunden wurde die Testplatte visuell ausgewertet und die Ergebnisse auf einem Plattenbelegungsplan protokolliert. Dabei galten die Kriterien trüb/ nicht trüb bzw. Wachstum/ kein Wachstum für jede Vertiefung der Platte. Die Ablesung erfolgte durch den direkten Vergleich mit der Wachstumskontrolle (ohne Antibiotikumzusatz) in der ersten Vertiefung der Mikrotitrationsplatte, die stets bewachsen (trüb) sein musste.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GC	AMP										
	0	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
B	AMOX/ CLAV	CEFP	CEFP	CEFP	CEFP							
	1/2	2/2	4/2	8/2	16/2	32/2	64/2	128/2	2	4	8	16
C	CEZI	CEFP/ CLAV	CEFP/ CLAV	CEFP/ CLAV	CEFP/ CLAV							
	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	0,5/4	1/4	2/4	4/4
D	CEZI/ CLAV	CETA/ CLAV	CETA/ CLAV	CETA/ CLAV	CETA/ CLAV	CETA/ CLAV						
	0,25/4	0,5/4	1/4	2/4	4/4	8/4	16/4	0,5/4	1/4	2/4	4/4	8/4
E	AZT	CETA	CETA	CETA	CETA	CETA						
	1	2	4	8	16	32	0,5	1	2	4	8	16
F	CEPO	PIP	PIP	PIP	PIP							
	0,25	0,5	1	2	4	8	16	4	8	16	32	64
G	CEPO/ CLAV	PIP/ TAZ	PIP/ TAZ	PIP/ TAZ	PIP/ TAZ							
	0,25/4	0,5/4	1/4	2/4	4/4	8/4	16/4	4/4	8/4	16/4	32/4	64/4
H	MER	CEXI	CEXI	CEXI	CEXI							
	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	4	8	16	32

Tabelle 5: Schematische Darstellung einer MICRONAUT-Platte; Abkürzungen im Text erläutert (s. Kap. 2.8.1).

Abschließend wurden die ermittelten Ergebnisse in der Datenbank dokumentiert und die Einteilung in „empfindlich“ (S), „intermediär“ (I) und „resistent“ (R) anhand der Tabellen aus der PEG-Resistenzstudie 2001 (<http://www.p-e-g.org>) vorgenommen.

Für die Bakterienspezies *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* gelten folgende MHK-Breakpoints:

Antibiotikum	Sensibel MHK [mg/l] ≤	Intermediär MHK [mg/l]	Resistent MHK [mg/l] ≥
Amikacin	4	32 < > 4	32
Amoxicillin/Clavulansäure	2	16 < > 2	16
Ampicillin	2	16 < > 2	16
Cefazolin	4	16 < > 4	16
Cefepim	4	32 < > 4	32
Cefotaxim	2	16 < > 2	16
Cefotaxim/ Clavulansäure	2	16 < > 2	16
Cefoxitin	4	16 < > 4	16
Ceftazidim	4	32 < > 4	32
Ceftazidim/ Clavulansäure	4	32 < > 4	32
Cefuroxim	4	16 < > 4	16
Ciprofloxacin	1	4 < > 1	4
Cotrimoxazol	16	128 < > 16	128
Doxycyclin	1	8 < > 1	8
Gentamicin	1	8 < > 1	8
Imipenem	2	8 < > 2	8
Levofloxacin	2	8 < > 2	8
Meropenem	2	16 < > 2	16
Moxifloxacin	1	4 < > 1	4
Nalidixinsäure	16	32 < > 16	32
Piperacillin	4	64 < > 4	64
Piperacillin/Tazobactam	4	64 < > 4	64
Tobramycin	1	8 < > 1	8
Trimethoprim	2	8 < > 2	8

Tabelle 6: MHK-Breakpoints für *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* (aus der PEG-Resistenzstudie; Paul Ehrlich Gesellschaft, 2001).

Für die Bakterienspezies *Stenotrophomonas maltophilia* gelten folgende MHK-Breakpoints:

Antibiotikum	Sensibel MHK [mg/l] <=	intermediär MHK [mg/l] 32 < > 4	resistent MHK [mg/l] >=
Amikacin	4	32 < > 4	32
Amoxicillin/Clavulansäure	2	16 < > 2	16
Ampicillin	2	16 < > 2	16
Cefazolin	4	16 < > 4	16
Cefepim	4	32 < > 4	32
Cefotaxim	2	16 < > 2	16
Cefotaxim/ Clavulansäure	2	16 < > 2	16
Cefoxitin	4	16 < > 4	16
Ceftazidim	4	32 < > 4	32
Ceftazidim/ Clavulansäure	4	32 < > 4	32
Cefuroxim	4	16 < > 4	16
Ciprofloxacin	1	4 < > 1	4
Cotrimoxazol	16	128 < > 16	128
Doxycyclin	1	8 < > 1	8
Gentamicin	1	8 < > 1	8
Imipenem	2	8 < > 2	8
Levofloxacin	2	8 < > 2	8
Meropenem	2	16 < > 2	16
Moxifloxacin	1	4 < > 1	4
Nalidixinsäure	16	32 < > 16	32
Piperacillin	4	64 < > 4	64
Piperacillin/Tazobactam	4	64 < > 4	64
Tobramycin	1	8 < > 1	8
Trimethoprim	2	8 < > 2	8

*MHK= minimale Hemmkonzentration

Tabelle 7: MHK-Breakpoints für *Stenotrophomonas maltophilia* (PEG-Resistenzstudie 2001).

Für die Bakterienspezies *Pseudomonas aeruginosa* gelten folgende MHK-Breakpoints:

Antibiotikum	Sensibel MHK* [mg/l] ≤	Intermediär MHK* [mg/l]	Resistent MHK* [mg/l] ≥
Amikacin	4	32 < I > 4	32
Cefepim	4	32 < I > 4	32
Ceftazidim	4	32 < I > 4	32
Ciprofloxacin	1	4 < I > 1	4
Gentamicin	1	8 < I > 1	8
Imipenem	2	8 < I > 2	8
Levofloxacin	2	8 < I > 2	8
Meropenem	2	16 < I > 2	16
Moxifloxacin	1	4 < I > 1	4
Piperacillin	4	64 < I > 4	64
Piperacillin/Tazobactam	4	64 < I > 4	64
Tobramycin	1	8 < I > 1	8

*MHK= minimale Hemmkonzentration

Tabelle 8: MHK-Breakpoints für *Pseudomonas aeruginosa* (PEG-Resistenzstudie 2001).

2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von Resistenzintegrans

Dieses Verfahren wurde bei allen gramnegativen Isolaten zum Nachweis von Resistenzintegrans der Klassen 1 und 2 verwendet.

2.9.1 Allgemeine Verfahrensbeschreibung

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction; PCR) ist eine 1984 vom kalifornischen Biochemiker Kary Mullis entwickelte Methode zur in vitro- Amplifizierung von Nukleinsäure- Fragmenten. Dieses Verfahren setzt eine Mischung aus einem Enzym und DNA Bausteinen ein, um eine Nukleinsäure oder DNA- Fragmente spezifisch zu vervielfältigen. Das

Prinzip dieser inzwischen als Standardverfahren etablierten Methode der Vervielfältigung eines bestimmten Gens oder Sequenzabschnittes *in vitro* beruht auf der zyklischen DNA- Neusynthese der Zielsequenzen mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase. Hierbei kommen in der Regel zwei synthetisch hergestellte Oligonukleotide zur Anwendung. Sie dienen als sequenzspezifische Startermoleküle (engl. Primer) und werden so ausgewählt, dass sie antiparallel zueinander an beide DNS-Stränge hybridisieren, so dass nur der gewünschte DNA-Abschnitt amplifiziert wird.

Zunächst wird der DNA- Doppelstrang durch Erhöhung der Temperatur auf etwa 94 °C in Einzelstränge aufgespaltet und damit für die Anbindung der beiden Primer zugänglich gemacht. Diese lagern sich bei einer Temperatur von 50 °C, der so genannten Annealintemperatur an, die komplementären Zielsequenzen auf den beiden Einzelstränge an. Durch die DNA-Polymerase werden die beiden Einzelstränge aus der zugesetzten Mischung von Basen nun zum jeweiligen Doppelstrang komplementiert. Anschließend wiederholt sich dieser Reaktionszyklus, welcher aus

- Denaturierung
- Anheften der Primer (Annealing) sowie
- Extension zu neuen Doppelsträngen besteht.

Werden diese Zyklen mehrfach wiederholt, so ergibt sich eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA- Moleküle. Ursprünglich war diese Methode sehr zeitaufwendig, weil nach jeder Denaturierung die damals verwendete bakterielle DNA-Polymerase inaktiviert wurde und erneut zugesetzt werden musste. Nach den Vorarbeiten von Mullis werden nun DNA-Polymerasen verwendet, die aus thermophilen Bakterien stammen und daher nicht mehr durch die hohe Temperatur am Zyklusbeginn denaturiert werden. In dieser Untersuchung wurde Taq-Polymerase verwendet, die aus *Thermophilus aquaticus* isoliert wurde und bei der Firma Qiagen kommerziell erhältlich ist. Die einzelnen Temperaturschritte wurden maschinell mittels Thermocycler umgesetzt.

2.9.2 Durchführung der PCR

Die Isolate wurden aus einer Mikrobank- Gefrierkultur auf Blutagarplatten ausgestrichen und über Nacht in einem Brutschrank bei 37 °C angezüchtet. Zur DNA- Extraktion wurden mehrere Kolonien dieser Reinkultur in 200 µl sterilem Wasser resuspendiert und 5 Minuten lang gekocht. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert und der Überstand in ein steriles Eppendorfgefäß pipettiert. Die einzelnen Gefäße wurden nummeriert und mit der entsprechenden Mikrobank-Nummer (MB-Nr.) versehen. Bei jeder DNA-Vorbereitung wurde ein Eppendorfgefäß mit der Negativkontrolle (Mastermix mit sterilem Wasser anstelle von DNA) hergestellt, um eine evtl. Kontamination während der einzelnen Arbeitsschritte zu erkennen und falsch positive Ergebnisse auszuschließen. Als nächstes wurde der Prämix hergestellt.

Bestandteil	Mengenverhältnis	Prämix für 2x50 PCR
H ₂ O	10,7 µl	535 µl
10x Puffer	2,5 µl	125 µl
dNTP	1,0 µl	50 µl
Primer 1 (5'-CS)*	1,0 µl	50 µl
Primer 2 (3'-CS)**	1,0 µl	50 µl
Taq Polymerase	0,3 µl	15 µl
Q50***	5,0 µl	250 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µl	125 µl

Tabelle 9: Zusammensetzung vom Prämix (25 µl Einfachansatz).

* Primer 1 (5'-CS): 5'- GGC ATC CAA GCA GCA AG -3'

** Primer 2 (3'-CS): 5'- AAG CAG ACT TGA CCT GA -3'

*** Q 50: Zusatzsubstanz zur Beschleunigung der Amplifikation

Die Belegung der PCR-Platten erfolgte mit 24 µl Prämix in jede Vertiefung der Platte unter Zugabe von 1 µl der zuvor extrahierten DNA. Die Position des PCR-Ansatzes für jede Probe und die entsprechende MB-Nr. wurden auf einem Belegzettel dokumentiert. Die belegte PCR- Platte enthielt 96 Vertiefungen mit jeweils 25 µl PCR-Ansatz. Sie wurde fest verschlossen und in einem Thermocycler platziert, wo ein vorprogrammierter PCR-Verlauf stattfand.

Folgende Temperaturen und Zyklen wurden verwendet:

- **Zyklus 1:**

95°C	8 Minuten
------	-----------

- **Zyklus 2 bis 35:**

94°C	1 Minute
55°C	1 Minute
72°C	2 Minuten

Abschließend wurde die Temperatur einmalig für 10 Minuten auf 72°C erhöht. Bis zur Darstellung des Amplifikationsergebnisses hielt das Programm die Temperatur der Proben bei 4 ° Celsius.

2.9.3 Gelelektrophorese und Auswertung

In einem Agarosegel werden die DNA-Fragmente durch Anlegen einer Spannung nach Größe und Ladung getrennt. Das Amplifikat im Gel wird mit Ethidiumbromid gefärbt. Indem es in die DNA-Moleküle interkaliert, kann die DNA damit unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

Zur Herstellung eines 2 % igen Agarosegels wurden 2 g des Agarosepulvers (Cambrex - SeaKem[®]LE Agarose) im Schott[©]-Flaschen abgewogen, mit 100 ml Laufpuffer (TAE (1×)) gelöst und kurz aufgekocht. Anschließend wurde das Gel in eine Gießform dekantiert. Nach 30 min war das Gel fest und konnte in die mit 1 × TAE-Puffer gefüllte Kammer der Elektrophoresekammer gegeben werden.

In die Reaktionsgefäße wurden 10 µl des PCR-Reaktionsgemisches mit 2 µl Bluemarker pipettiert und durch kurzzeitiges Zentrifugieren vermischt. Der Bluemarker diente dazu, die zurückgelegte Laufstrecke der Amplifikate während der Elektrophorese sichtbar zu machen.

Die Proben wurden in die Slots des Gels gefüllt, wobei die äußeren Slots dem mit dem Marker (9 µl) belegt wurden. Bei einer Spannung von 80 V erfolgte die elektrophoretische Auftrennung unter Beobachtung des Bluemarkers, bis das Amplifikat das untere Drittel des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde nach Entnahme aus der TAE-Pufferlösung für ca. 30 min in die Ethidiumbromidlösung gegeben. Nach der abgeschlossenen Färbung der Banden wurde das Gel unter UV-Licht mit Biometra TI 1 Polaroid fotografiert. Anschließend wurden die Gelfotos mit Hilfe eines Scanners digitalisiert und im Arbeitsprotokoll dargestellt, wobei alle Slots des Gels mit den entsprechenden Mikrobanknummern versehen wurden. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Gel Compar.

2.10 Sequenzierung

Dieses Verfahren erfolgte zur Charakterisierung von Resistenzintegrons aller Integron-positiver Isolate mit Hilfe eines Universal Primers.

2.10.1 Gelextraktion und Aufreinigung

Für die Extraktion der DNA aus den Agarosegelen wurde das QiAquick Gel Extraction Kit (Firma Qiagen, Hilden) verwendet. Zuerst wurden die Banden der mehrfach im Gel aufgetragenen Amplifikate (siehe Abb. 1) mit Hilfe eines Skalpellts ausgeschnitten.

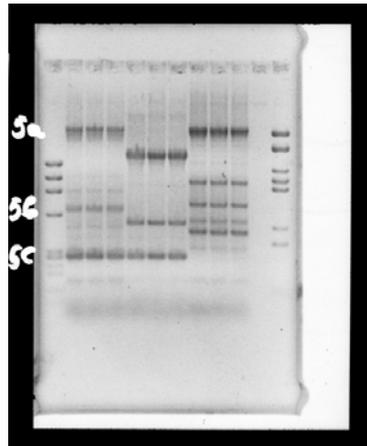


Abbildung 1: Gel mit mehrfach aufgetragenen Amplifikaten.

Gelreste wurden von dem gewonnenen Fragment möglichst vollständig entfernt. Anschließend wurde der Gelausschnitt gewogen und in Puffer QG aufgelöst. Dazu verwendet man 3 Teile Buffer QG zu jeweils einem Teil Gelausschnitt (100mg ~ 100µl). Das Gemisch wurde anschließend in sterile Eppendorf Cups überführt und im Wasserbad bei 50°C für 20 Minuten inkubiert. Nachdem sich die Gelstücke komplett gelöst hatten, musste darauf geachtet werden, dass die Farbe der Lösung gelb war, da dies den optimalen pH-Bereich (pH < 7,5) für die QiAquick Membran anzeigt. Anschließend wurde 1 Volumenteil Isopropanol zugeben und gemischt. Zur Aufnahme der DNA aus der Lösung wurde eine QiAquick spin column (Membran) in einem 2ml Eppendorfgefäß platziert, das Gemisch einpipettiert (max. 800ml) und für 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die QiAquick spin column wieder zurück in das Eppendorfgefäß platziert. Nach Fixieren der DNA an das Filter wurden 0,5ml von Puffer QG zugeführt und für 1 Minute zentrifugiert. Mit diesem Schritt werden alle Agarosereste entfernt. Im nachfolgenden Waschschrift wurden 0,75ml PE Puffer hinzugefügt und für 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die QiAquick column letztmalig für eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das QiAquick column wird nun in ein frisches 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Um die DNA von der Membran zu lösen wurde 50µl des Elutionspuffers (10mM Tris-Cl, pH 8,5) genau in das Zentrum des Membran pipettiert und für eine Minute mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die so gewonnene DNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei Kühlschranktemperatur (4 °C) aufbewahrt und stand für eine anschließende Sequenzierung bereit.

2.10.2 Sequenzierungstechnik

Zur Sequenzierung wurde nach dem ABI PRISM[®] Protokoll (AmpliTa[™] FS BigDyeTerminator) ein Reaktionsansatz aus 2,0µl Premix, DNA-Template (0,2-0,5µg dsDNA, 10-100ng PCR Produkt), sowie 5pmol Primer (Universal Primer -21M13: ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG) erstellt und mit sterilem Wasser auf 20µl aufgefüllt. Im Anschluss wurden 25 Thermocycler-Zyklen gefahren (1 Zyklus entspricht: 10sec bei 96°C, 5sec bei 50°C sowie 4min bei 60°C (TC 2400/9600/9700 Emulation Mode)).

Bei diesem Schritt wird der Primer durch die Polymerase verlängert. An einer zufälligen Stelle wird somit ein Dideoxyadenosintriphosphat (dDATP) angehängt, welches mit einem für die jede Base spezifischen fluoreszierenden Farbmolekül kodiert ist. An dieser Stelle wird die Reaktion gestoppt und wieder von vorne begonnen.

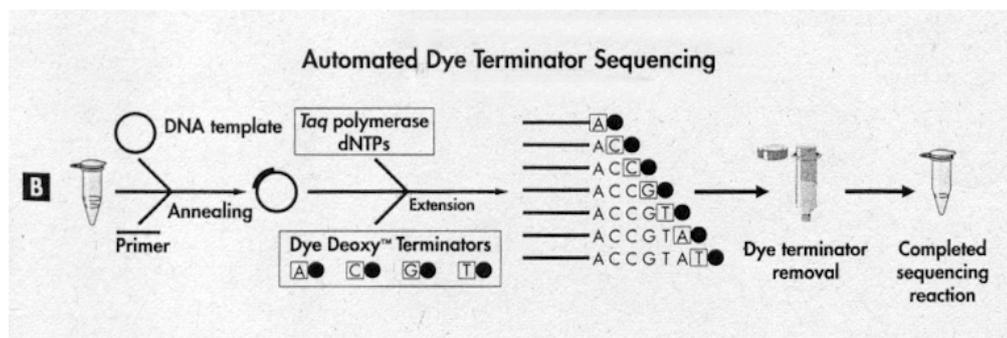


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Sequenzierungsvorganges (Quelle: QiAquick Gel Extraction Kit Handbuch).

Im folgenden Schritt wird der Reaktionsansatz mit Hilfe der Ethanol-Fällung aufgereinigt. Dieser Schritt dient der Inhibierung des Sequenzierungsenzyms. Zuerst wurden 90µl H₂O, 10µl 3 M Natrium-Acetat pH 4,6 (1Vol DNA Lösung + 1/10 Vol 3 NaAc + 2,5 Vol 100% EtOH) und 250 µl 100% EtBr (bei Raumtemperatur, RT) zugegeben. Das Gemisch wurde nun bei RT für 30min mit 13.000 rpm zentrifugiert. Das Ethidiumbromid (EtBr) wurde anschließend entfernt und das Gemisch mit 250µl 70% EtBr gewaschen. Nun wurde mit 13.000 rpm 5min lang zentrifugiert. Das EtBr wurde im Anschluss wieder entfernt und das Pellet für 5min im Speed-Vac getrocknet. Zur Probenvorlage wurden 4µl des getrockneten Ansatzes mit 16µl HPLC-Wasser versetzt.

Die Proben wurden im folgenden Schritt mit Hilfe des ABI 3100 ausgewertet. Dazu wurde eine 96-Well-Platte mit den Proben bestückt. Die einzelnen Proben wurden mit Hilfe der hauseigenen Software des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums (BMFZ) mit einer eindeutigen Kennzeichnung versehen und die Platte in dem Gerät platziert. Anschließend erfolgte die automatische Sequenzierung im Gerät. Die Primer-DNA-Stränge werden dabei mit Hilfe einer

Elektrophorese aufgetrennt. Die entstehenden Banden sind bereits mit dem jeweiligen basenspezifischen fluoreszierenden Farbstoff markiert. Das Gel wird elektrisch angeregt und dabei mit Hilfe einer optischen Einheit abgetastet. Die CCD Kamera konvertiert so die analogen Fluoreszenz-Informationen in digitale Signale und übermittelt diese an den Computer. Dieser erstellt aus den Daten ein Electropherogramm und die entsprechende Gensequenz.

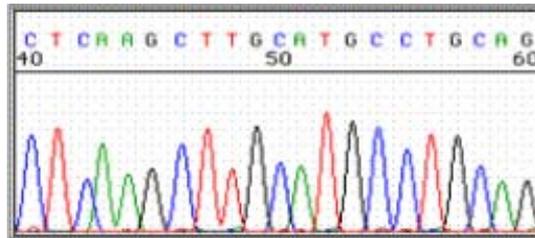


Abbildung 3: Beispiel für ein Electropherogramm.

Das Ergebnis wird als Textdatei gespeichert und kann mit einer Gendatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) auf Übereinstimmungen mit bereits bekannten Sequenzen überprüft werden. Dazu wird die Sequenz im sogenannten FASTA-Format in das vorhandene Eingabefenster kopiert. Es kommt zum automatischen Vergleich mit den wichtigsten Nukleotiddatenbanken, wie EMBL und anderen. Das Ergebnis erscheint als Dendogramm mit einer prozentualen Angabe der Sequenzhomologien mit den in der Datenbank vorhandenen Sequenzen (siehe Abb. 4).

```

TTGNNTGTGNNCAATTATGTGCTTAGTGATCTAACGCTTGAGTTAAGCCGCGCCGCGAAGCGGCGTCGGC
TTGAACGAATTGTTAGACATTATTTGCCGACTACCTTGGTGATCTCGCCTTTCACGTAGTGAACAAATTCCTC
CAACTGATCTGCGCGGAGGCCAAGCGATCTTCTTCTGTCCAAGATAAGCCTGTCTAGCTTCAAGTATGAC
GGGCTGATACTGGGCCGGCAGGCGCTCCATTGCCAGTCGGCAGCGACATCCTTCGGCGCGATTCTGCC
GGTACTGCGCTGTACCAAATGCGGGACAACGTAAGCACTACATTCGCTCATCGCCAGCCCAGTCGGGC
GGCGAGTTCCATAGCGTTAAGGTTTCATTTAGCGCCTCAAATAGATCCTGTTTCAGGAACCGGATCAAAGAGT
TCCTCCGCCGCTGGACCTACCAAGGCAACGCTATGTTCTCTTGTCTTTTGTGCAAGATAGCCAGATCAATG
TCGATCGTGGCTGGCTCGAAGATACCTGCAAGAATGTCATTGCGCTGCCATTCTCCAAATTGCAGTTCGCG
CTTAGCTGGATAACGCCACGGAATGATGTGCTGTCACAACAATGGTGAATCTACAGCGCGGAGAATC
TCGCTCTCTNCAGGGGAAGCCGAAGTTTCCAAAAGGTCGTTGATCAAAGCTCGCCNGTGTGTTTCATCAAG
CCTTACGGTCACCGTAACCAGCAAATCAATATCACTGTGTGGCTTCAGGCCGCTTCCCTGGGGANCCNTA
CAAATGTACGGNCAGNANNNNNGNTNNGANGGNGCTCGATNANNNACTACNTNTAAAGNTGANNNNAN
NCTTNGNNATNACGNTTCTNANGATNTTANNNCCGGNAANNGNANGNAANCTGGNNGGTTTTGGNNNAAN
GGGGNANGNTNGNAANCCNNNTNCCNTNNNANCNTTNNCNANTGGNANNNNNTNNNNNNNGNNANNTNG
GNAANGNNNAANNNGGGNNNNN
    
```

Abbildung 4: Sequenz von Amplifikaten

Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida class I integron
 aminoglycoside adenylyltransferase (aadA1) gene,
 complete cds
 Length = 1194

Score = 1499 bits (756), Expect = 0.0
 Identities = 779/787 (98%), Gaps = 1/787 (0%)
 Strand = Plus / Minus

```

Query: 12      caattatgtgcttagtgcatctaacgcttgagttaagccgcgccggaagcggcgctcggc 71
              |||
Sbjct: 898     caattatgtgcttagtgcatctaacgcttgagttaagccgcgccggaagcggcgctcggc 839

Query: 72      ttgaacgaattgtagacattatgtgccgactaccttggatctcgcctttcacgtagt 131
              |||
Sbjct: 838     ttgaacgaattgtagacattatgtgccgactaccttggatctcgcctttcacgtagt 779

Query: 132     gaacaaattctccaactgatctgcgcgcgaggccaagcgatcttcttctgtccaagat 191
              |||
Sbjct: 778     gaacaaattctccaactgatctgcgcgcgaggccaagcgatcttcttctgtccaagat 719

Query: 192     aagcctgtctagcttcaagatgacgggctgatactgggcccggcaggcgctccattgcc 251
              |||
Sbjct: 718     aagcctgtctagcttcaagatgacgggctgatactgggcccggcaggcgctccattgcc 659

Query: 252     agtcggcagcgacatccttcggcgcgattctgccggttactgcgctgtaccaaagcggg 311
              |||
Sbjct: 658     agtcggcagcgacatccttcggcgcgattctgccggttactgcgctgtaccaaagcggg 599

Query: 312     acaacgtaagcactacatttcgctcatcgccagcccagtcgggcccggcaggttccatagc 371
              |||
Sbjct: 598     acaacgtaagcactacatttcgctcatcgccagcccagtcgggcccggcaggttccatagc 539

Query: 372     ttaaggtttcatttagcgcctcaaatagatcctgttcaggaaccggatcaaagagttcct 431
              |||
Sbjct: 538     ttaaggtttcatttagcgcctcaaatagatcctgttcaggaaccggatcaaagagttcct 479

Query: 432     ccgccgctggacctaccaagcaacgctatgttctcttgctttgtcagcaagatagcca 491
              |||
Sbjct: 478     ccgccgctggacctaccaagcaacgctatgttctcttgctttgtcagcaagatagcca 419
  
```

```

Query: 492   gatcaatgtcgatcgtggctggctcgaagatacctgcaagaatgtcattgcgctgccatt 551
            |
Sbjct: 418   gatcaatgtcgatcgtggctggctcgaagatacctgcaagaatgtcattgcgctgccatt 359

Query: 552   ctccaaattgcagttcgcgcttagctggataacgccacggaatgatgtcgtcgtgcacaa 611
            |
Sbjct: 358   ctccaaattgcagttcgcgcttagctggataacgccacggaatgatgtcgtcgtgcacaa 299

Query: 612   caatggtgacttctacagcgcggagaatctcgtctctcncaggggaagccgaagtttcca 671
            |
Sbjct: 298   caatggtgacttctacagcgcggagaatctcgtctctcncaggggaagccgaagtttcca 239

Query: 672   aaaggtcgttgatcaaagctcgccgngttgtttcatcaagccttacggtcaccgtaacca 731
            |
Sbjct: 238   aaaggtcgttgatcaaagctcgccgngttgtttcatcaagccttacggtcaccgtaacca 179

Query: 732   gcaaatcaatatcactgtgtggcttcaggccgccttcc-ctgggganccntacaaatgta 790
            |
Sbjct: 178   gcaaatcaatatcactgtgtggcttcaggccgccatccactgcgagccgtacaaatgta 119

Query: 791   cggncag 797
            |
Sbjct: 118   cggccag 112
    
```

Abbildung 5: Ergebnis des Homologievergleichs einer Sequenzanalyse.

2.11 Rapid amplified polymorphic DNA (RAPD)

2.11.1 Allgemeine Verfahrensbeschreibung

Bei der RAPD handelt es sich um eine Genotypisierungsmethode, bei der unspezifische DNA-Fragmente einer unbekannt DNA amplifiziert werden. Dabei werden die vervielfältigten DNA-Fragmente zur Unterscheidung bzw. Vergleichbarkeit von einzelnen Stämmen einer Bakterienspezies genutzt. Im Prinzip ähnelt das Verfahren der Polymerasekettenreaktion, nur dass hierbei ein unspezifischer Primer verwendet wird. Auf diese Weise lassen sich individuell unterschiedliche RAPD-Muster erzeugen, mit deren Hilfe eine klonale Identität sicher ausgeschlossen oder belegt werden kann.

2.11.2 Durchführung der RAPD

Die Isolate wurden aus einer Mikrobank-Gefrierkultur auf Blutagarplatten ausgestrichen und über Nacht in einem Brutschrank bei 37 °C angezchtet. Zur DNA-Extraktion wurden mehrere Kolonien dieser Reinkultur in 200 µl sterilem Wasser resuspendiert und 5 Minuten lang gekocht. Anschließend wurde die Suspension 2 Minuten bei 14.000 UpM zentrifugiert und 100 µl Überstand in ein steriles Eppendorfgefäß pipettiert. Die einzelnen Gefäße wurden nummeriert und mit der entsprechenden Mikrobank-Nummer (MB-Nr.) versehen. Bei jeder DNA-Vorbereitung wurde ein Eppendorfgefäß mit der Negativkontrolle (steriles Wasser+Reaktionsansatz ohne DNA) hergestellt, um eine evtl. Kontamination während der einzelnen Arbeitsschritte zu erkennen und falsch positive Ergebnisse auszuschließen.

Als nächstes wurde der Prämix hergestellt:

Bestandteil	Mengenverhältnis
H ₂ O	15,75 µl
10x Puffer	2,50 µl
dNTP	2,50 µl
Primer	4,00 µl
Taq Polymerase	0,25 µl
DNA	2,00 µl

Tabelle 10: Zusammensetzung vom Prämix.

Bei der Durchführung wurden verschiedene Primer benutzt. Zum einen wurde der Primer **ERIC2** (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3')⁸¹ sowie der Primer **ST275** (5'-CCGGGCAAGC-3')⁵² verwendet.

Die Belegung der RAPD-Platten erfolgte mit 23 µl Prämix in jede Vertiefung der Platte unter Zugabe von 2 µl der zuvor extrahierten DNA. Die Position des PCR-Ansatzes für jede Probe und die entsprechende MB-Nr. wurden auf einem Belegzettel dokumentiert. Die belegte RAPD-Platte wurde fest verschlossen und in einem Thermocycler platziert, wo ein vorprogrammierter PCR-Verlauf stattfand.

Folgende Temperaturen und Zyklen wurden verwendet:

- **Zyklus 1 bis 4:**

94°C	5 Minuten
36°C	5 Minuten
72°C	5 Minuten

- **Zyklus 5 bis 35:**

94°C	1 Minute
36°C	1 Minute
72°C	2 Minute

Abschließend wurde die Temperatur einmalig für 10 Minuten auf 72°C erhöht. Bis zur Darstellung des Amplifikationsergebnisses hielt das Programm die Proben bei 4 ° Celsius.

2.11.3 Gelelektrophorese und Auswertung

Im Anschluss erfolgt die Auswertung mittels der Gelelektrophorese (siehe 2.8.3). Die Auswertung der Gele erfolgte durch den Vergleich der einzelnen Bandenmuster.

3. Ergebnisse

3.1 Einleitung

Diese Arbeit untersuchte innerhalb des Beobachtungszeitraums von 45 Tagen (01.04.2003-15.05.2003) insgesamt 59 Patienten der chirurgischen Intensivstation der Universitätsklinik Düsseldorf und erfasste alle wichtigen klinischen und infektiologischen Parameter des Patientenkollektivs. Parallel zur detaillierten Dokumentation der klinischen Aspekte erfolgte mikrobiologische Diagnostik des gesamten verfügbaren Untersuchungsmaterials.

3.2 Altersverteilung und Aufenthaltsdauer

Der Alterdurchschnitt der beobachteten Patienten lag bei 64 Jahren. Dabei war der jüngste Patient 18 Jahre, der Älteste 84 Jahre alt. Die Standardabweichung betrug 14,58 Jahre.

Alter	Anzahl
81 bis 85	8
76 bis 80	7
71 bis 75	8
66 bis 70	9
61 bis 65	8
56 bis 60	7
51 bis 55	3
46 bis 50	3
41 bis 45	3
36 bis 40	2
31 bis 35	0
31 bis 35	0
26 bis 30	0
21 bis 25	0
16 bis 20	1
Unter 15	0
Summe	59

Tabelle 11: Altersverteilung der Patienten.

Der Anteil der männlichen Patienten lag bei 62,7% (37 Patienten), der der weiblichen bei 37,3% (22 Patientinnen). Die Beobachtungsdauer des einzelnen Patienten entsprach durchschnittlich 8,8 Tagen, wobei das Maximum 45 Tage und das Minimum 1 Tag betrug.

Liegedauer [Tage]	Anzahl
1	7
2	11
3	8
4	2
5	5
6	5
7	1
8	3
11	2
12	3
15	3
24	1
25	1
30	1
49	1
52	1
56	1
58	1
> 58	6

Tabelle 12: Liegedauer auf der Intensivstation.

Das Patientenkollektiv hatte vor Beginn der Studie im Durchschnitt bereits 5,97 Tage auf einer Intensivstation verbracht, mit einem Maximum von 169 Tagen. Die Liegedauer auf einer peripheren Station vor Einschluss in die Studie lag durchschnittlich bei 7,42 Tagen, wobei ein Maximum von 41 Tagen erreicht wurde.

3.3 Klinische Diagnosen

Hauptsächlich handelte es sich bei dem in die Studie aufgenommenen Patientenkollektiv um chirurgische Patienten. Davon hatten die meisten Patienten mit 69,49% eine kardiovaskuläre Einweisungsd Diagnose, gefolgt von den onkologischen Patienten, deren Anteil bei 20,34% lag. Gastroenterologische und unfallchirurgische Patienten machten jeweils 8,47% des gesamten Patientenkollektivs aus. Der Patientenanteil mit einer endokrinologischen Einweisungsd Diagnose betrug 3,39%. 15,25% der beobachteten Patienten hatten einen nicht in die gebildeten Kategorien einzuordnenden Aufnahmegrund.

12 Patienten (20,34%) wurden während des Untersuchungszeitraums dialysiert. Ein Patient bekam im Durchschnitt eine Dialyse über einen Zeitraum von 15,5 Tagen. Dabei betrug das Maximum 44 Tage, das Minimum 2 Tage.

Die Anzahl der genannten Diagnosen und deren Einteilung in verschiedene Kategorien sind in der Tabelle 13 abgebildet.

KARDIOVASKULÄR		
Diagnose	Anzahl	%-Anteil
Koronare Herzkrankheit	17	28,81%
Aortenaneurysma	6	10,17%
Aortenklappenstenose	3	5,08%
Arteria Carotis Interna – Stenose	2	3,39%
Bradykardie	2	3,39%
Z.n. Reanimation	2	3,39%
Mitralinsuffizienz	2	3,39%
"Coral reef aorta"	1	1,69%
Akutes Coronarsyndrom	1	1,69%
Angina abdominalis	1	1,69%
Arterielle Verschlusskrankheit	1	1,69%
Ischäm. bedingte dilat. Kardiomyopathie	1	1,69%
Mitralvitium – Endokarditis	1	1,69%
Thrombendarteriektomie	1	1,69%
Summe	41	69,49%

RESPIRATORISCH		
Diagnose	Anzahl	%-Anteil
Respiratorische Insuffizienz	5	8,47%
Summe	5	8,47%

ONKOLOGISCH		
Diagnose	Anzahl	%-Anteil
Plattenepithelkarzinom Mundboden	3	5,08%
Pankreaskopf-Carcinom	2	3,39%
Anastomoseninsuffizienz nach Magen-OP	1	1,69%
Eingangsstenose Pharynxebene	1	1,69%
Lebermetastasen	1	1,69%
Plattenepithelkarzinom Zunge	1	1,69%
Polyposis coli	1	1,69%
Rectum-Carcinom	1	1,69%
Speicheldrüsenausgangs-Carcinom (vord. Mundboden)	1	1,69%
Summe	12	20,34%

GASTROENTEROLOGISCH		
Diagnose	Anzahl	%-Anteil
Akutes Abdomen	2	3,39%
Akute Cholezystolithiasis	1	1,69%
Akute Gastrointestinale Blutung (Ulcus duodeni)	1	1,69%
Ileus	1	1,69%
Summe	5	8,47%

ENDOKRINOLOGISCH		
Diagnose	Anzahl	%-Anteil
Dekompensierte Niereninsuffizienz	1	1,69%
Hyperglykämie	1	1,69%
Summe	2	3,39%

UNFALLCHIRURGISCH		
Diagnose	Anzahl	%-Anteil
Wirbelkörperbruch	2	3,39%
Polytrauma	2	3,39%
Multiple Frakturen	1	1,69%
Summe	5	8,47%

SONSTIGE		
Diagnose	Anzahl	%-Anteil
Dysgnathie	2	3,39%
Nahtinsuffizienz (nicht näher bezeichnet)	1	1,69%
Oesophagusruptur	1	1,69%
Mediastinitis	1	1,69%
Milzruptur	1	1,69%
Platzbauch, Dünndarmperforation	1	1,69%
Subarachnoidalblutung	1	1,69%
Sepsis	1	1,69%
Summe	9	15,25%

Tabelle 13: Häufigkeit und Verteilung der Einweisungsdiagnosen.

3.4 Devices

Aufgrund der Tatsache, dass viele der auf einer Intensivstation erworbenen Infektion ihren Ursprung von dauerhaft eingeführten Fremdmaterialien wie Harnwegskathetern, Zentralvenösen Kathetern (ZVKs), peripheren Venösen Zugängen und Endotrachealtuben nehmen, wurde während unserer Datenerhebung eine ausführliche Dokumentation solcher „Devices“, ihrer Liegedauer und bei Gefäßkathetern der Lokalisation, vorgenommen.

So konnte festgestellt werden, dass bei allen Patienten mindestens ein Harnwegskatheter gelegt worden ist, deren durchschnittliche Liegezeit 9,34 Tage betrug (siehe Tab.14).

Anzahl HWK	Liegedauer / Tage		
	Maximum	Minimum	Durchschnitt
68	38	2	9,34

Tabelle 14: Anzahl und Liegezeit von Harnwegskathetern.

58 Patienten (98,32%) hatten einen zentralvenösen Verweilkatheter mit einer durchschnittlichen Liegezeit von 6,14 Tagen (siehe Tab.15).

ZVK		Liegedauer / Tage		
Lage	Anzahl	Maximum	Minimum	Durchschnitt
V. subclavia	44	29	1	7,95
V. jugularis int.	44	19	1	8,34
V. femoralis	5	7	4	5,60
V. brachialis	3	5	2	3,00
Summe	96	29	1	6,14

Tabelle 15: Zentralvenöse Gefäßkatheter: Verweildauer und Insertionsstelle.

46 Patienten (78 %) wurden endotracheal intubiert und der Tubus wurde dort für durchschnittlich 5,1 Tage belassen. 17 Patienten (29 %) erhielten ein Tracheostoma was im Beobachtungszeitraum für durchschnittlich 10,39 Tage getragen wurde (siehe Tab. 16).

Device	Patienten	Liegedauer / Tage		
		Maximum	Minimum	Durchschnitt
Endotrachealtubus	46	20	1	5,10
Tracheostoma	17	24	1	10,39

Tabelle 16: Anzahl der intubierten Patienten mit Endotrachealtuben / Tracheostomata.

Ein periphervenöser Zugang wurde bei 41 Patienten (69,5 %) gelegt. Die Lageverteilung des Zugangs ist in der Tabelle 17 dargestellt.

Venöser peripherer Zugang		Liegedauer / Tage		
Lage	Anzahl	Maximum	Minimum	Durchschnitt
Handrücken	50	9	1	3,27
Ellenbeuge	5	6	3	5,00
Unterarm	4	9	3	4,75
V. jugularis ext.	2	6	5	5,50
Summe	61	9	1	4,16

Tabelle 17: Periphervenöse Zugänge mit Insertionsstelle und Dauer des Verbleibs.

Ein arterieller Zugang zur blutigen Blutdruckmessung war bei 94,92% der Patienten vorhanden. Im Durchschnitt betrug die Liegedauer 8,19 Tage (siehe Tab. 18).

Arterieller Zugang		Liegedauer / Tage		
Lage	Anzahl	Maximum	Minimum	Durchschnitt
A. radialis	49	38	1	7,45
A. femoralis	13	36	3	13,23
A. brachialis	12	38	4	10,92
A. axillaris	3	34	30	32,00
Summe	77	38	1	8,19

Tabelle 18: Aterielle Zugänge mit Insertionsstelle und Liegedauer.

Bei 89,83% der Patienten wurde eine Magensonde gelegt, die im Schnitt für 9,49 Tage liegen blieb (siehe Tab. 19).

Anzahl Magensonden	Liegedauer / Tage		
53	Maximum	Minimum	Durchschnitt
	44	1	9,49

Tabelle 19: Anzahl und Liegedauer der Magensonden.

Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Erfassung der postoperativen Drainagenversorgung gelegt. Eine Drainage hatten 83% der Patienten, die durchschnittliche Liegedauer betrug 5,5 Tage (siehe Tab. 20).

Drainagen		Liegedauer / Tage		
Lage	Anzahl	Maximum	Minimum	Durchschnitt
Thoraxdrainage	79	10	2	4,67
Easyflow Abdomen	16	26	2	8,63
Redon Abdomen	35	7	2	4,06
Vakuumdrenage Abdomen	4	14	3	7,00
Summe	134	26	2	5,5

Tabelle 20: Art und Anzahl der Drainagen mit Liegezeit.

Für die gesamte Intensivstation wurden die Anwendungsrate der einzelnen Devices berechnet (siehe Tab. 22). Hierbei lag die Anwendungsrate der Magensonde mit 100% an erster Stelle. Obwohl bei allen Patienten der Station ein Harnwegskatheter angelegt wurde, verblieb dieser in einigen Fällen nicht für die Gesamtdauer des Aufenthaltes. Die Anwendungsrate für Harnwegskatheter lag daher nur bei 96,56% (siehe Tab. 21). Die Anwendungsrate des Endotrachealtubus dagegen lag nur bei 45,94%.

Device	Anzahl Patiententage	Anzahl der Device-Tage	Device-Anwendungsrate [%] *
Magensonde	665	665	100
Zentralvenöser Katheter	677	675	99,70
Harnwegskatheter	697	673	96,56
Tracheostoma	572	310	54,20
Tubus	566	260	45,94

Tabelle 21: Übersicht über die Anwendungsrate der Devices nach Häufigkeit sortiert. *Device-Anwendungsrate = Anzahl Device-Tage / Anzahl der Patiententage x 100.

3.5 Infektiologische Parameter

Zur Erfassung des Krankheitsgrades wurden 3 verschiedene Scores erhoben, die jeweils unterschiedliche Aussagen über Prognose, bzw. Grad der Erkrankungen machen.

- Bei dem APACHE II Score handelt es sich um einen Score, der eine Aussage über die Sterbewahrscheinlichkeit eines Patienten macht ⁴¹ (siehe Material und Methoden). Der Durchschnittswert lag hier bei 21,03. Das Maximum lag bei 36 und das Minimum bei 4. Erwartungsgemäß konnte in der Studie gezeigt werden, dass der Durchschnittswert von später verstorbenen Patienten bei 27,28 lag und somit signifikant höher war, als bei dem Rest des Patientenkollektivs (17,30).
- Der aus dem Clinical Pulmonary Infection Score (CPIS) resultierende Wert korreliert mit der Schwere der Atemwegsinfektion ⁷⁰ (siehe Material und Methoden). Hierbei können Werte von 0 bis 10 erreicht werden. Der Durchschnittswert in unserem Patientenkollektiv lag bei 2,90 mit einem Maximum von 7.
- Zur allgemeinen Quantifizierung des Krankheitsgrades in Bezug auf Infektionserkrankungen wurde der Sepsis-related Organ Failure (SOFA) Score erhoben ⁸². Der bei einer fulminanten Sepsis maximal erreichbare Wert des Scores beträgt 24. In unserem Patientenkollektiv konnten Werte von 0 bis 20 bei einem Durchschnittswert von 8,8 erhoben werden.

Score	Maximum	Minimum	Durchschnitt
APACHE II	36	4	21,03
CPIS	7	0	2,99
SOFA	20	0	8,79

Tabelle 22: Statistik der Scores in der Übersicht.

Bei der Dokumentation der Patientendaten wurden die folgenden infektiologischen Parameter beobachtet, um den Zusammenhang zwischen dem Infektionszeichen des Patienten und einer Keimbeseidlung/Infektion mit integronhaltigen Bakterien zu untersuchen:

- Das „C-reaktive-Protein“ (CRP) gehört zu den Akutphaseproteinen und steigt bei einer bakteriell bedingten Infektion an. Es besitzt keine Organ- oder Krankheitsspezifität, ist aber bei akuten oder chronischen Entzündungen in den meisten Fällen erhöht und daher für die Infektionsdiagnostik von großer Bedeutung. Eine CRP-Erhöhung ohne Infektion wird allerdings auch postoperativ, bei Tumoren und nach Herzinfarkten beobachtet. Kommt eine Erhöhung der Leukozytenzahl und der Körpertemperatur hinzu, ist eine bakterielle Infektion sehr wahrscheinlich⁶⁹. Eine Schlussfolgerung über die Schwere der Infektion aufgrund der Höhe des CRP-Wertes allein ist nicht möglich. Der Normwert des CRP für Erwachsene liegt bei einer nephelometrischen Bestimmung bei <0,6mg/dl. Der Durchschnittswert des Patientenkollektivs lag bei 15,48 mg/dl (siehe Tab. 23).
- Die Höhe Leukozytenzahl korreliert mit der Schwere der Infektion. Da sich dieser Wert, dessen Normbereich bei 4,0-10,0/nl liegt, aus Granulozyten (überwiegend bakterienspezifisch) und Lymphozyten (überwiegend virenspezifisch) zusammensetzt, lässt sich aus einer Leukozytenerhöhung keine Aussage über den Erregertyp ableiten. Eine Leukozytose ist ebenfalls bei Stresssituationen, Traumata, Verbrennungen, akuten Blutungen und Infarkten zu beobachten. Der Durchschnittswert lag in unserem Patientenkollektiv bei 12,5/nl (siehe Tab. 23).

Laborwert	Maximum	Minimum	Durchschnitt
CRP [mg/dl]	278	0	15,48
Leukozyten [1/mm ³]	40.900	3.500	12.470

Tabelle 23: Statistik der Laborwerte in der Übersicht.

3.6 Antibiotikaverbrauch

Der Antibiotikaverbrauch in unserem Beobachtungszeitraum auf der Intensivstation wurde mit Hilfe der Umrechnung in defined daily doses (DDDs) vergleichbar gemacht (siehe Material und Methoden). Um den Antibiotikaverbrauch der Intensivstation beurteilen zu können, wurde zusätzlich die Anzahl DDD auf die Anzahl Antibiotikage (= Patiententage) der ITS normiert und somit die Antibiotikaanwendungsdichte (AD) berechnet⁶⁰.

Antibiotikum	Antibiotika-Tage	Gesamtdosis (g)	DDD-Wert*	eingesetzte DDD**	DDD pro 1000 Patienten-Tage***
Ampicillin + Sulbactam	36	294,00	2,00	147,00	4083,33
Sulbactam	45	96,00	1,00	96,00	2133,33
Flucloxacillin	12	40,50	2,00	20,25	1687,50
Cefepim	24	75,00	2,00	37,50	1562,50
Ampicillin	24	68,00	2,00	34,00	1416,67
Ciprofloxacin	95	65,40	0,50	130,80	1376,84
Vancomycin	16	41,00	2,00	20,50	1281,25
Gentamicin	5	1,50	0,24	6,25	1250,00
Moxifloxacin	27	13,40	0,40	33,50	1240,74
Cefazolin	104	351,00	3,00	117,00	1125,00
Ceftriaxon	5	11,00	2,00	5,50	1100,00
Fluconazol	12	2,40	0,20	12,00	1000,00
Levofloxacin	11	5,50	0,50	11,00	1000,00
Linezolid	13	15,60	1,20	13,00	1000,00
Metronidazol	67	100,50	1,50	67,00	1000,00
Cefotaxim	48	182,00	4,00	45,50	947,92
Clindamycin	10	16,80	1,80	9,33	933,33
Imipenem + Cilastatin	81	129,00	2,00	64,50	796,30
Tazobactam + Piperacillin	39	348,75	14,00	24,91	638,74
Piperacillin	42	366,00	14,00	26,14	622,45
Teicoplanin	64	15,80	0,40	39,50	617,19
Tobramycin	15	1,20	0,24	5,00	333,33

* DDD-Wert = siehe Referenz WHO.

** Verwendete DDD = Gesamtdosis (g) / DDD-Wert.

*** DDD pro 1000 Patienten-Tage = verwendete DDD / Antibiotika-Tage x 1000.

Tabelle 24: Übersicht über den Antibiotikaverbrauch. Sortiert nach DDD pro 1000 Patienten-Tage.

Somit gehörten zu den, während der Beobachtungszeit, am häufigsten eingesetzten Antibiotikaklassen Penicilline, Sulbactam, Fluorchinolone und Cephalosporine der 3. und 4. Generation. Die Antibiotikaanwendungsdichte von Imipenem lag bei 796 DDD pro 1000 Patiententage. Dabei erhielten insgesamt 11 Patienten im Verlauf der Intensivbehandlung eine

Carbapenemtherapie, bei 6 von denen wurden Nonfermenter isoliert. Die minimale Behandlungsdauer bei diesem Patientenkollektiv betrug 2 Tage, die maximale dagegen lag bei 16 Tagen.

3.7 Mikrobiologische Untersuchungen

Im Rahmen der mikrobiologischen Untersuchungen wurden nur gramnegative Bakterien berücksichtigt. So wurden insgesamt 238 Isolate gefunden, die in 22 verschiedene Spezies differenziert werden konnten. Die Proben wurden im Rahmen eines bei Erstaufnahme des Patienten auf die Station und anschließend alle 3 Tage durchgeführten Screenings gewonnen (siehe Tab. 25).

Material	Anzahl
Trachealsekret	89
Abstrich Leiste	57
Abstrich Nase	49
Abstrich Rachen	41
Wundabstrich	13
Spitze ZVK	12
Blutkultur aerob	5
Gewebe	5
Abstrich Abdomen	3
Drainagesekret	3
Abstrich Dekubitus	2
Bronchiallavage	2
Abstrich Abdomen Haut	1
Punktat	1

Tabelle 25: Entnahmeort der mikrobiologischen Untersuchungsmaterialien.

Von allen 238 gramnegativen Isolaten sind insgesamt 89 als Nonfermenter identifiziert worden. Davon war die Spezies *Pseudomonas* mit 49 Isolaten am häufigsten vertreten, der folgten 33 *Stenotrophomonas*-Erreger und 7 *Acinetobacter*-Isolate. Unter den *Pseudomonas*-Erregern konnten 2 verschiedene Spezies nachgewiesen werden: *Pseudomonas aeruginosa* (47 Bakterien) und *Pseudomonas putida* (2 Isolate).

Isolat	Anzahl	Anteil in Prozent
Pseudomonas aeruginosa	47	52,81%
Stenotrophomonas maltophilia	33	37,08%
Acinetobacter baumannii	7	7,87%
Pseudomonas putida	2	2,25%

Tabelle 26: Verteilung der einzelnen Nonfermenter nach Häufigkeit angeordnet.

Im Anschluss an die biochemische Differenzierung wurden Resistenztestungen aller gramnegativen Isolate mit Hilfe von MICRONAUT[®]-Platten durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass am häufigsten eine Resistenz gegenüber Cefoxitin auftrat. Insgesamt zeigten 52,65% aller Bakterien eine Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum. Das Antibiotikum mit der niedrigsten Resistenzrate war Meropenem mit 7,42% (siehe Tab. 27). Dabei erhielten im Rahmen der Beobachtungszeit insgesamt 11 Patienten eine Carbapenemtherapie, davon machte das Patientenkollektiv mit einer Nonfermenter- Besiedlung 55% aus. Es kam auf der beobachteten Intensivstation ausschließlich Imipenem mit Cilastatin als Vertreter für Carbapeneme zum Einsatz.

Antibiotikum	Anzahl resistent	Anteil in Prozent
Cefoxitin	149	52,65%
Cefpodoxim-Proxetil	146	51,59%
Amoxicillin / Clavulansäure	144	50,88%
Piperacillin	140	49,47%
Cefotaxim	129	45,58%
Cefpodoxim-Proxetil / Clavulansäure	123	43,46%
Aztreonam	104	36,75%
Cefotaxim / Clavulansäure	102	36,04%
Ampicillin	89	31,45%
Piperacillin / Tazobactam	85	30,04%
Cefepim	64	22,61%
Ceftazidim / Clavulansäure	61	21,55%
Ceftazidim	54	19,08%
Cefepim / Clavulansäure	49	17,31%
Meropenem	21	7,42%

Tabelle 27: Ergebnisse der Resistenzbestimmung.

Um eine Übersicht über die Infektionswege, sowie zur Erkennung von neu aufgetretenen Intergrons, wurde mit Hilfe einer Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) ein orientierender genotypischer Vergleich der einzelnen Isolate vorgenommen.

Insgesamt 9 Stämme der Spezies *Stenotrophomonas maltophilia* wurden im Rahmen der RAPD nachgewiesen (siehe Abb. 6), wobei 3 Stämme bei 5 verschiedenen Patienten entdeckt werden konnten. Diese Ergebnisse weisen auf eine nosokomiale Übertragung der Stämme 1, 2 und 3 zwischen den Patienten hin (siehe Tab. 28). Dabei konnte in einem der 5 Fälle mit einem nosokomialen Hintergrund ein Übertragungsweg vom Stamm 3 zwischen Patient 4 und 5 belegt werden. Hier bestand räumliche Nähe zwischen den Boxen 10 und 11 (siehe Tab. 28), in denen die Patienten untergebracht waren, was auf eine mögliche Ursache für diese Transmission hindeutet.

Stenotrophomonas maltophilia

Stamm	Entnahmedatum	Entnahmeort	Patient	Box Nr.	Beginn Studie	Ende Studie	Interpretation
1	22.04.2003	TS	1	7	03.04.2003	15.05.2003	Erstisolat
	22.04.2003	TS	1	7	03.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	24.04.2003	TS	1	7	03.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	06.05.2003	ANA	1	7	03.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	08.05.2003	TS	2	20	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial

2	25.04.2003	KTSH	3	16	01.04.2003	15.05.2003	Erstisolat
	12.05.2003	ANA	2	20	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial

3	01.04.2003	TS	2	20	01.04.2003	15.05.2003	Erstisolat
	07.04.2003	TS	2	20	01.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	07.04.2003	TS	2	20	01.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	17.04.2003	ANA	2	20	01.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	28.04.2003	TS	2	20	01.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	14.04.2003	ANA	3	16	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial
	17.04.2003	ARA	3	16	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial / Copystrain
	22.04.2003	TS	3	16	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial / Copystrain
	22.04.2003	ANA	3	16	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial / Copystrain
	25.04.2003	KTZV	3	16	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial / Copystrain
	25.04.2003	KTZV	3	16	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial / Copystrain

	02.04.2003	TS	4	10	01.04.2003	06.04.2003	Nosokomial
	02.04.2003	TS	4	10*	01.04.2003	06.04.2003	Nosokomial / Copystrain
	12.04.2003	TS	5	11*	18.04.2003	24.04.2003	Nosokomial
4	08.05.2003	ALE	2	20	01.04.2003	15.05.2003	Erstisolat
	12.05.2003	TS	2	20	01.04.2003	15.05.2003	Copystrain
5	28.04.2003	TS	3	16	01.04.2003	15.05.2003	Erstisolat
6	28.04.2003	ARA	6	18	18.04.2003	28.04.2003	Erstisolat
7	05.05.2003	TS	3	16	01.04.2003	15.05.2003	Erstisolat
8	05.05.2003	TS	2	20	01.04.2003	15.05.2003	Erstisolat
9	07.04.2003	ANA	2	20	01.04.2003	15.05.2003	Erstisolat

Tabelle 28: RAPD-Genotypisierung von *Stenotrophomonas maltophilia* Isolaten; Abkürzungen der Entnahmeorte siehe Tabelle 32.

* Boxnähe als Risikofaktor für eine nosokomiale Übertragung zwischen den Patienten gegeben

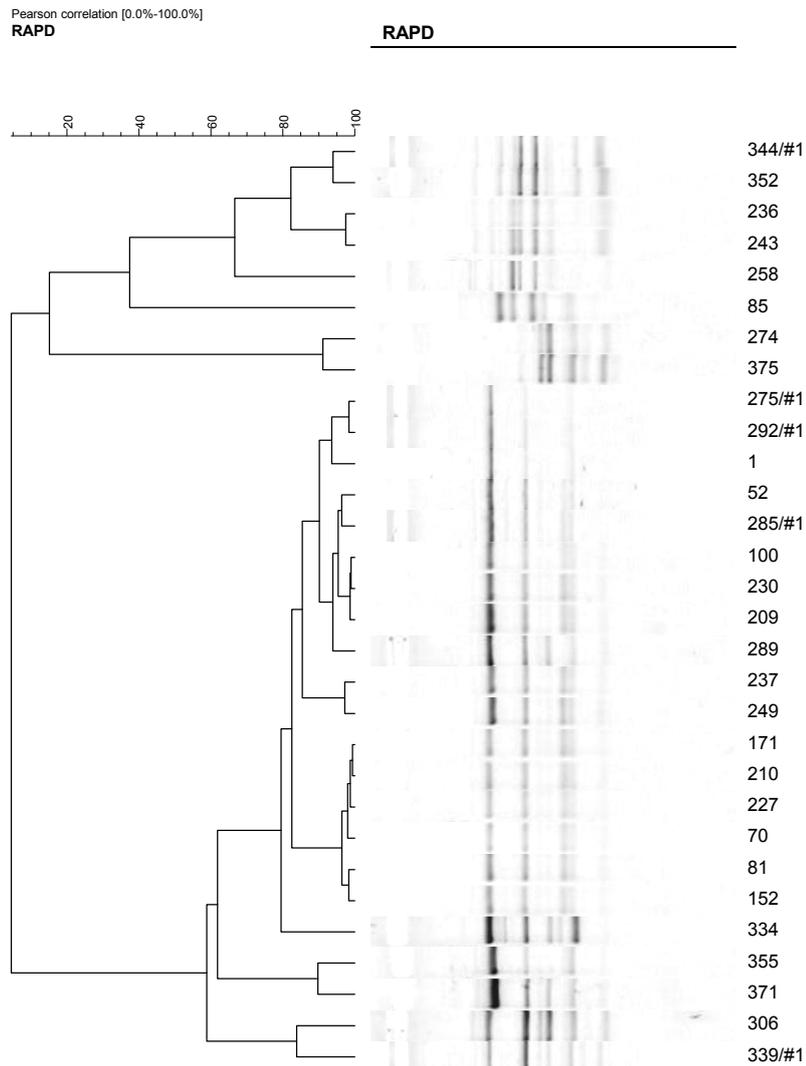


Abbildung 6: Beispiel der dendrografischen Unterscheidung verschiedener RAPD-Bandenmuster bei *Stenotrophomonas maltophilia*.

Die isolierten *Pseudomonas aeruginosa* wiesen im genotypischen Vergleich insgesamt 14 verschiedene Klone auf (siehe Abb. 7). Diese Stämme konnten bei zehn verschiedenen Patienten nachgewiesen werden. Unter dem mit *P. aeruginosa*-kolonisiertem Patientenkollektiv konnten insgesamt 3 nosokomiale Übertragungsfälle, die die Stämme 7,9 und 10 betrafen, dokumentiert werden. Bei zwei weiteren Stämmen, die aus dem Trachealsekret eines Patienten isoliert wurden, konnten im Verlauf Integrons der Klasse 1 und 2 nachgewiesen werden, die bei dem Erstisolat noch nicht vorhanden gewesen waren (siehe Tab. 29). In einem der Übertragungsfälle (Stamm 7) konnte die räumliche Nähe ebenfalls als ein Risikofaktor für die Transmission identifiziert werden.

Pseudomonas aeruginosa

Stamm	Entnahmedatum	Entnahmeort	Patient	Box Nr.	Beginn Studie	Ende Studie	Interpretation
1	01.05.2003	TS	1	5	01.04.2003	08.05.2003	Erstisolat
	02.05.2003	TS	1	5	01.04.2003	08.05.2003	Copystrain / integronpositiv
	05.05.2003	TS	1	5	01.04.2003	08.05.2003	Copystrain
	08.05.2003	ALE	1	5	01.04.2003	08.05.2003	Copystrain
	08.05.2003	ANA	1	5	01.04.2003	08.05.2003	Copystrain
2	28.04.2003	ANA	1	5	01.04.2003	08.05.2003	Erstisolat
	08.05.2003	TS	1	5	01.04.2003	08.05.2003	Copystrain
3	17.04.2003	ALE	1	5	01.04.2003	08.05.2003	Erstisolat
	17.04.2003	ARA	1	5	01.04.2003	08.05.2003	Copystrain
4	02.04.2003	KTCV	2	6	01.04.2003	11.04.2003	Erstisolat
	10.04.2003	TS	2	6	01.04.2003	11.04.2003	Copystrain
	10.04.2003	DS	2	6	01.04.2003	11.04.2003	Copystrain
	10.04.2003	TS	2	6	01.04.2003	11.04.2003	Copystrain
5	09.04.2003	TS	3	13	08.04.2003	10.04.2003	Erstisolat
	10.04.2003	ANA	3	13	08.04.2003	10.04.2003	Copystrain
6	17.04.2003	TS	1	5	01.04.2003	08.05.2003	Erstisolat
	17.04.2003	ANA	1	5	01.04.2003	08.05.2003	Copystrain / integronpositiv
7	17.04.2003	ALE	4	19	10.04.2003	25.04.2003	Erstisolat
	24.04.2003	TS	5	6*	20.04.2003	27.04.2003	Copystrain
	28.04.2003	ALE	6	7*	03.04.2003	15.05.2003	Nosokomial
8	13.05.2003	BAL	7	19	27.04.2003	15.05.2003	Erstisolat
	13.05.2003	BAL	7	19	27.04.2003	15.05.2003	Copystrain
9	02.04.2003	ALE	8	11	01.04.2003	08.04.2003	Erstisolat
	03.04.2003	TS	8	11	01.04.2003	08.04.2003	Copystrain
	03.04.2003	ANA	8	11	01.04.2003	08.04.2003	Copystrain
	03.04.2003	ALE	9	20	01.04.2003	15.05.2003	Nosokomial
	07.04.2003	ALE	8	11	01.04.2003	08.04.2003	Copystrain
10	27.04.2003	GEW	7	19	27.04.2003	15.05.2003	Erstisolat

	12.05.2003	WA	7	19	27.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	12.05.2003	TS	7	19	27.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	12.05.2003	WA	7	19	27.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	13.05.2003	ANA	7	19	27.04.2003	15.05.2003	Copystrain
	13.05.2003	ARA	10	9	22.04.2003	15.05.2003	Nosokomial

11	09.04.2003	ARA	3	13	08.04.2003	10.04.2003	Erstisolat
12	24.04.2003	TS	5	6	20.04.2003	27.04.2003	Erstisolat
13	06.05.2003	ALE	6	7	03.04.2003	15.05.2003	Erstisolat
14	08.05.2003	TS	1	5	01.04.2003	08.05.2003	Erstisolat

Tabelle 29: RAPD-Genotypisierung von *Pseudomonas aeruginosa* Isolaten; Abkürzungen der Entnahmeorte, siehe Tabelle 32.

* Boxnähe als Risikofaktor für eine Übertragung zwischen den Patienten gegeben

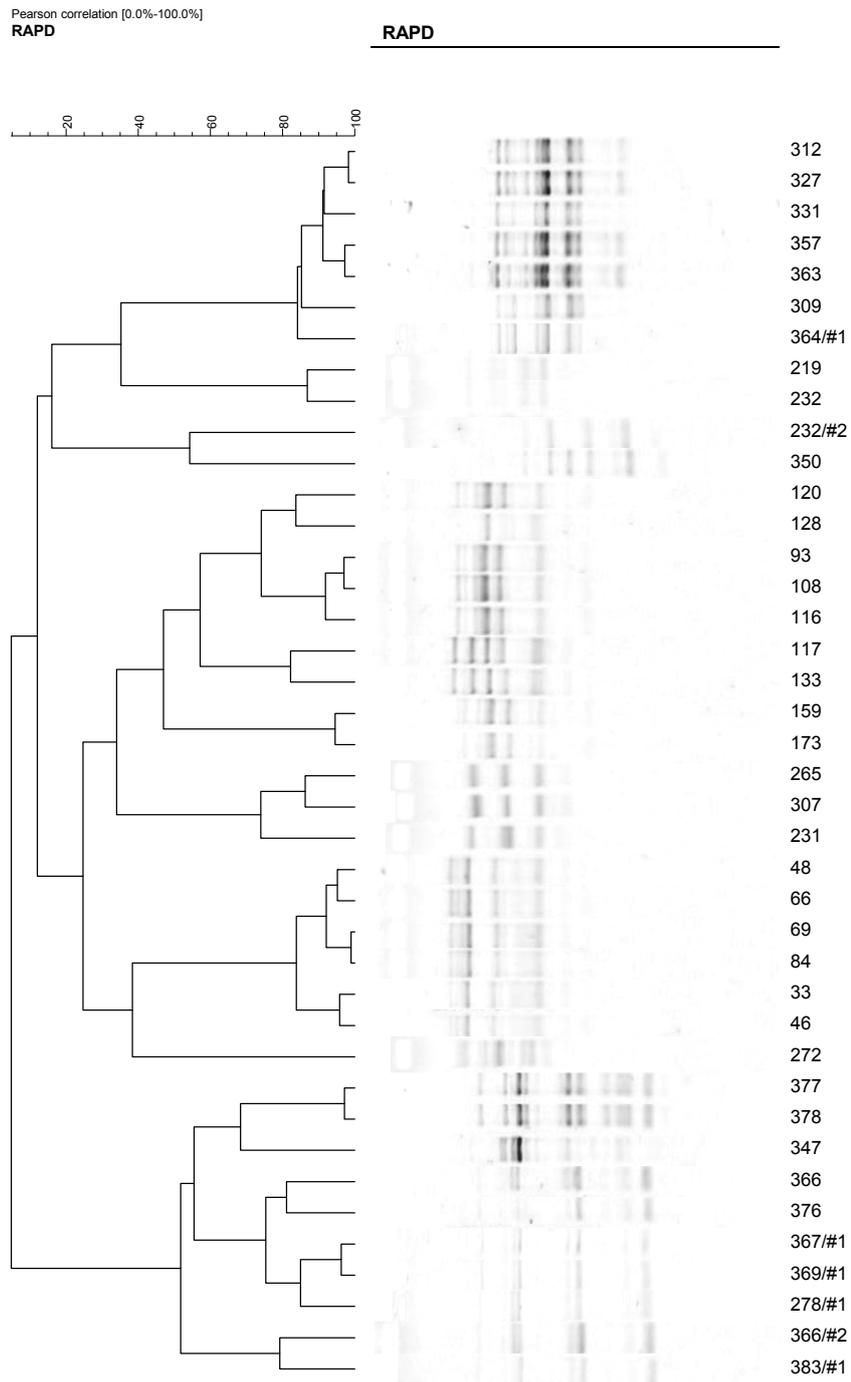


Abbildung 7: Beispiel der dendrografischen Unterscheidung verschiedener RAPD-Bandenmuster bei *Pseudomonas aeruginosa*.

Bei den *Acinetobacter baumannii*-Isolaten konnten 3 genotypisch verschiedene Stämme beschrieben werden (siehe Abb. 8), wobei ein Stamm im Beobachtungszeitraum bei zwei weiteren Patienten aus der Besiedlungsflora nachweisbar war. Diese Patienten wurden nicht in benachbarten Boxen versorgt, daher ist hier die räumliche Nähe als ein Risikofaktor für eine Übertragung zwischen den Patienten als weniger wahrscheinlich anzusehen, siehe Tabelle 30.

Acinetobacter baumannii

Stamm	Entnahmedatum	Entnahmeort	Patient	Box Nr.	Beginn Studie	Ende Studie	Interpretation
1	01.04.2003	TS	1	20	01.04.2003	15.05.2003	Erstisolat
	03.04.2003	TS	2	11	01.04.2003	08.04.2003	Nosokomial
	08.04.2003	Aabd	2	11	01.04.2003	08.04.2003	Nosokomial / Copystrain
	17.04.2003	ARA	3	1	05.04.2003	09.04.2003	Nosokomial
	17.04.2003	ALE	3	1	11.04.2003	15.04.2003	Nosokomial / Copystrain
2	01.04.2003	TS	4	18	01.04.2003	17.04.2003	Erstisolat
3	22.04.2003	ARA	5	11	18.04.2003	24.04.2003	Erstisolat

Tabelle 30: RAPD-Genotypisierung von *Acinetobacter baumannii* Isolaten; Abkürzungen der Entnahmeorte, siehe Tabelle 31.

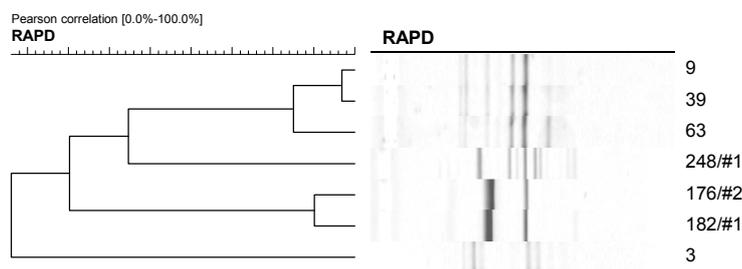


Abbildung 8: Beispiel der dendrografischen Unterscheidung verschiedener RAPD-Bandenmuster bei *Acinetobacter baumannii*.

TS	Trachelsekret
Aabd	Abstrich Abdomen
ARA	Abstrich Rachen
ALE	Abstrich Leiste
ANA	Abstrich Nase
WA	Wundabstrich
KTZV	Katheterspitze ZVK
ADK	Abstrich Daerkatheter
BLV	Bronchiallavage
ABAH	Abstrich Bauchhaut

Tabelle 31: Abkürzung der Entnahmeorte.

Bei der Integronsuche wurde ein PCR- Nachweisverfahren eingesetzt, bei dem alle gramnegativen Isolate auf das Vorhandensein von Integronklassen 1 und 2 untersucht worden sind.

Bei insgesamt 9 von 59 in die Studie aufgenommenen Patienten (15,25 % des Patientenkollektivs) ließen sich Integron-haltige Erreger nachweisen. Das durchschnittliche Alter dieser Patienten betrug 74 Jahre und lag somit 10 Jahre über dem Gesamtkollektiv. Bei der Materialherkunft war auffällig, dass in 68,18% aller Integron-haltigen Isolate aus dem Respirationstrakt stammte. Unter den 22 Integron-positiven Bakterienisolate, die 3 verschiedenen Spezies zugeordnet wurden, konnten 2 Nonfermenter identifiziert werden (siehe Tab. 32). Beide Isolate gehörten der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* an. Die beiden Erreger stammen von demselben Patienten, der im Rahmen des Aufenthalts auf der Intensivstation in einer Box versorgt worden ist (siehe Tab. 32).

Auffällig war die Tatsache, dass das erste Bakterium, das im Rahmen eines Nasenabstrichs isoliert wurde und ausschließlich Integron der Klasse 1 nachwies, gegen einzelne Antibiotikasubstanzen Resistenzen zeigte. Dagegen konnte das zweite *Pseudomonas*-Isolat, das im Trachealsekret desselben Patienten 2 Wochen später entdeckt wurde und für Integronklassen 1 und 2 positiv getestet wurde, bei der phänotypischen Resistenzprüfung als ein MDR- Erreger charakterisiert werden (siehe Tab. 32).

Integron-haltige Erreger

Bezeichnung	Isolat 1	Isolat 2
Integrase	Intl1	Intl1 + Intl2
Spezies	Pseudomonas aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
Wahrscheinlichkeit	99,9%	99,9%
Ampicillin	Resistent	Resistent
Amoxicillin / Clavulansäure	Resistent	Resistent
Cefepim	2	Resistent
Ceftazidim	1	Resistent
Cefepim / Clavulansäure	0,5/4	Resistent
Ceftazidim / Clavulansäure	0,5/4	Resistent
Cefotaxim / Clavulansäure	0,5/4	Resistent
Aztreonam	Resistent	Resistent
Cefotaxim	2	Resistent
Cefpodoxim-Proxetil	16	Resistent
Piperacillin	Resistent	Resistent
Cefpodoxim- Proxetil/Clavulansäure	1/4	Resistent
Piperacillin /Tazobactam	Resistent	Resistent
Meropenem	0,25	Resistent
Cefoxitin	4	Resistent

Tabelle 32: Phänotypische Resistenzbestimmung Integron-haltiger Nonfermenter; Alle Resistenztestungs- MHK-Werte in µg/ml.

3.8 Datenvergleich von Nonfermenter-Patienten mit der Kontrollgruppe

Folgende kasuistische Zusammenstellungen in Tabellenform dienen der Analyse des Zusammenhanges zwischen verschiedenen patientenseitigen und umgebungsbezogenen Einflussfaktoren der intensivmedizinischen Therapie und dem Nachweis von Nonfermentern.

Das Durchschnittsalter beider Patientengruppen lag bei 64 Jahren. Auch der Anteil der Nonfermenter-Patienten, deren Alter bei 60 Jahren oder älter lag, stimmte mit dem der Kontrollgruppe überein (siehe Tab. 33).

Kriterium	Nonfermenter	Nicht Nonfermenter
Durchschnittsalter	64,4 Jahre	63,9 Jahre
< 60 Jahre	6 Patienten = 37%	16 Patienten = 37%
> 60 Jahre	10 Patienten = 63%	27 Patienten = 63%

Tabelle 33: Durchschnittsalter und Altersverteilung der Patienten.

Beim Betrachten der Liegedauer der Patienten auf der chirurgischen Intensivstation stellte sich heraus, dass die Patienten ohne Nachweis einer Nonfermenter-Besiedlung im Durchschnitt 6 Tage lang intensivmedizinisch behandelt wurden.

Die durchschnittliche Aufenthaltsdauer der Nonfermenter-Patienten auf der ITS betrug dagegen 42 Tage und lag somit 7 mal höher als die der Kontrollgruppe (siehe Tab. 34).

Kriterium	Nonfermenter	Nicht Nonfermenter
Liegedauer / Tage	42	6

Tabelle 34: Durchschnittliche Liegedauer der Patienten auf der Intensivstation.

Beim Vergleich der Deviceshäufigkeit beider Kollektive wurde festgestellt, dass v.a. Tracheostoma (81 % versus 12 %), aber auch ZVK und Magensonde in der Nonfermenter-Gruppe häufiger dokumentiert wurden. Dagegen kamen in der Kontrollgruppe periphervenöser Zugang und Endotrachealtubus häufiger zum Einsatz (siehe Tab. 35).

Devices	Nonfermenter	Nicht Nonfermenter
Harnwegskateter	100%	100%
Zentralvenöser Kateter	100%	95%
Magensonde	100%	93%
Tracheostoma	81%	12%
Endotrachealtubus	56%	70%
Periphervenöser Zugang	44%	65%

Tabelle 35: Häufigkeitsvergleich von Devices der Nonfermenter- und der Kontrollgruppe.

Nosokomiale Infektionen (Pneumonie, Sepsis) traten während der Beobachtungszeit bei den Nonfermenter-Patienten wesentlich häufiger als in der Kontrollgruppe auf (siehe Tab. 36).

Kriterium	Nonfermenter	Nicht Nonfermenter
Nosokomiale Infektionen	88%	16%

Tabelle 36: Anteil der Patienten mit nosokomialer Infektion.

Die Carbapenemtherapie erfolgte bei 37% der Patienten mit Nonfermenter-Nachweis. Im Vergleich dazu wurden nur 11% der Patienten aus der Kontrollgruppe mit dieser Antibiotikaklasse behandelt. Darüber hinaus erhielten die NF-Patienten Carbapeneme im Durchschnitt 2,5 Tage länger als die Kontrollgruppe (siehe Tab. 37).

Kriterium	Nonfermenter	Nicht Nonfermenter
Carbapenemtherapie	37%	11%
Therapiedauer / Tage	8,5	6

Tabelle 37: Durchschnittliche Dauer und Anteil der Patienten mit Carbapenemtherapie.

Der höhere Anteil der Patienten mit einem letalen Ausgang wurde ebenfalls im Nonfermenter-Kollektiv retrospektiv ermittelt (siehe Tab. 38).

Kriterium	Nonfermenter	Nicht Nonfermenter
Mortalität	25%	14%

Tabelle 38: Vergleich der Sterblichkeitsraten beider Kollektive.

4. Diskussion

4.1 Allgemeiner Teil

Die Tatsache, dass weder die klassische Mikrobiologie noch die klinische Infektiologie langfristig hinreichend genauen Aufschluss über die Resistenzproblematik bei gramnegativen Bakterien liefern kann, erfordert die Erforschung epidemiologischer Zusammenhänge auf molekularbiologischer Ebene. Diese Untersuchung, ergänzt durch die Erfassung der klinisch- infektiologischer Parameter, sollte dazu beitragen, die vor Ort bedeutsamen Resistenzmechanismen zu erkennen und ihre Verbreitung zu kontrollieren. Aufgrund der rasanten Verbreitung der Resistenzen im Bereich der Intensivmedizin kann diese Form der Grundlagenforschung der klinischen Entscheidung zur kalkulierten Antibiotikatherapie sinnvolle Entscheidungshilfen bieten, d.h. welche Substanzen adäquat einzusetzen sind und wie hoch das relative Risiko einer Resistenzentwicklung für die verwendete Substanzgruppe ist. Aus Kosten- Nutzen Perspektive ergibt sich daraus ein Potenzial zur Verbesserung des therapeutischen Outcomes mit den entsprechenden klinischen Konsequenzen, aber auch ökonomischen Folgen des reduzierten Einsatzes der teuren Breitspektrumantibiotika, der Vermeidung des oft notwendigen Wechsels der empirisch eingesetzten Antibiotika nach Fertigstellung des Antibiogramms und der verlängerten Liegezeiten der Patienten, die gerade im Bereich der Intensivpflege einen immensen Kostenfaktor darstellen.

Nosokomiale Infektionen können zu erheblichen therapeutischen und klinikhygienischen Problemen führen, die ein großes gesundheitliches Risiko für den einzelnen Patienten bergen und zudem erhöhte Kosten für das Gesundheitssystem bedeuten. Zwei Mechanismen lassen Nonfermenter zu Erregern schwer therapierbarer nosokomialer Infektionen werden.

Zum einen bewirkt der Selektionsdruck, der durch die unvermeidbare Anwendung von Antibiotika besonders auf Intensivstationen herrscht, die Selektion multiresistenter und möglicherweise auch panresistenter Erregerstämme. Zum anderen kann es durch klonale Ausbreitung dieser Stämme zu nosokomialen Ausbrüchen kommen, die oftmals mit den verfügbaren Antibiotika nur noch schwer bekämpft werden können.

4.2 Risikofaktoren für den Erwerb nosokomialer Infektionen

Auf Intensivpflegestationen treten nosokomiale Infektionen mit einer Prävalenz von 15,3% bis 20,6% erheblich häufiger auf als auf Allgemeinstationen (1,5% - 3,8%)²⁶.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die opportunistisch pathogenen Spezies wie *Acinetobacter*, *P. aeruginosa* und *S. m altophilia* durch das Zusammenwirken verschiedener Mechanismen in die Lage versetzt werden können, zu den Erregern schwer oder nicht beherrschbarer nosokomialer Infektionen zu werden. So konnte mit Hilfe einer ausführlichen Dokumentation der klinischen Patientendaten festgestellt werden, dass das Patientenkollektiv mit einer Nonfermenter-Besiedlung (insgesamt 16 Patienten) im Verlauf der Intensivbehandlung in 87,5% der Fälle nosokomiale Infektionen entwickelt hat, entweder in Form einer beatmungsassoziierten Pneumonie (87,5%), einer Sepsis (50%) oder sogar eine Kombination beider lebensbedrohlichen Infektionsarten (44%). Im Vergleich dazu sind beim restlichen Patientenkollektiv, bei dem keine der oben genannten Nonfermenter nachgewiesen werden konnten, in nur 16% der Fälle (insgesamt bei 7 von 43 Patienten) nosokomiale Infektionen aufgetreten.

Patienten auf Intensivstationen haben in der Regel ein erhöhtes Risiko, nosokomiale Infektionen zu erwerben, da bei ihnen häufig invasive Maßnahmen angewendet werden und oft schwere Grundkrankheiten vorliegen.

Seit Anfang 1997 werden im Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS) des Nationalen Referenzzentrums (NRZ) für Surveillance von nosokomialen Infektionen auf am KISS teilnehmenden Intensivstationen in ganz Deutschland nosokomiale Infektionen erfasst. Bei der Analyse wird vor allem die Anwendung sogenannter "devices" (=Geräte; z.B. Harnwegkatheter, zentraler Venenkatheter, Beatmung) als Risikofaktoren für die Entwicklung nosokomialer Infektionen berücksichtigt, denn das Risiko einer Infektion mit nosokomialen Erregern geht generell von in den Patienten eingebrachten Fremdmaterialien aus^{18,44}. Anschließend erfolgt für jede Intensivstation eine halbjährliche Auswertung der Device-Anwendungsraten und der device-assoziierten Infektionsraten. Außerdem werden die Daten aller Intensivstationen über den Gesamtzeitraum zusammengefasst und als Referenzdaten zum Vergleich zur Verfügung gestellt (<http://www.nrz-hygiene.de/surveillance/its.htm>).

Aus den Referenzdaten des KISS der Jahre 2003-2007 lässt sich ableiten, dass die durchschnittlichen Device-Anwendungsraten für Harnwegkatheter (92 % der Patienten), ZVK (84%) und invasive Beatmungsmaßnahmen (49 %) im Rahmen der chirurgischen Intensivversorgung ermittelt wurden. Vergleichsweise dazu gehen aus den Berechnungen der vorliegenden Arbeit höhere Werte für Device-Anwendungsraten hervor (siehe Tab. 21). Somit lag auf der von uns beobachteten ITS an erster Stelle die Device-Anwendungsrate der Magensonde mit 100 %, gefolgt vom ZVK (99 %), HWK (96 %) und Tracheostoma (54 %). Beim Vergleich der Häufigkeit von Devices

der NF-Patienten mit der Kontrollgruppe konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Tracheostoma und dem Nachweis von Nonfermentern erkannt werden (siehe Tab. 35).

Mit Sicherheit handelt es sich hier um ein multikausales Geschehen, wenn man die schlechte Prognose der Patienten mit dem Nachweis einer Kolonisation durch die Nonfermenter betrachtet, denn hauptsächlich waren es ältere Patienten mit multiplen Vorerkrankungen und schwerwiegenden Aufnahmediagnosen, die während unserer Beobachtungszeit intensivmedizinisch versorgt wurden (siehe Tabellen 11 und 13).

Abgesehen von den oben erwähnten zusätzlichen Risikofaktoren, die beim beobachteten Patientenkollektiv gegeben waren, konnten andere Studien eindeutig belegen, dass vor allem der Nachweis von *S. maltophilia* im Rahmen einer nosokomial erworbenen, beatmungsassoziierten Pneumonie mit einer erhöhten Morbidität und in Zusammenhang mit einer ungeeigneten Antibiotikatherapie auch mit einer erhöhten Sterblichkeitsrate assoziiert werden konnte^{33,43,66}. So konnte im Rahmen unserer Arbeit ebenso ermittelt werden, dass 100% der Patienten, bei denen ein *S. maltophilia*-Nachweis erfolgte, im Verlauf der Intensivbehandlung eine Pneumonie entwickelt haben, in 67% der Fälle lag zusätzlich eine Sepsis vor. Die klinischen Daten der Patienten mit *Acinetobacter*-Besiedlung lieferten ähnliche Ergebnisse: alle Patienten litten unter einer beatmungsassoziierten Pneumonie, 50 % davon wiesen zudem eine Sepsis auf. Patienten mit *Pseudomonas aeruginosa*-Isolaten zeigten in 70 % der Fälle Symptome einer nosokomialen Pneumonie, in 50 % der Fälle wurde eine Sepsis diagnostiziert. Bei den insgesamt 59 beobachteten Patienten wurde retrospektiv in 10 Fällen ein letaler Ausgang ermittelt. Dabei lag die Sterblichkeitsrate der Patienten mit dem Nachweis einer Nonfermenter-Besiedlung bei 25 %, bei den restlichen Patienten hingegen betrug sie nur 14 %.

4.3 Aktuelle Überlegungen zum Antibiotikaverbrauch im Bereich der Intensivmedizin

Als Hauptgrund für die hohen Resistenzraten der nosokomialen Erreger ist der steigende Antibiotikaverbrauch auf Intensivstationen vielfach in der Fachliteratur genannt worden⁶⁵. Interessanterweise zeigt die Beobachtung aus dem SARI-Projekt eine abfallende Tendenz beim Antibiotikaverbrauch in den dort erfassten Intensivstationen³⁹. Dabei muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass die mit SARI kooperierende Intensivstationen durch das Informationsfeedback im Laufe der Zeit mehr Sorgfalt bei den Indikationsstellungen entwickeln und sich dadurch eine Tendenz zum Minderverbrauch ergeben kann³⁹.

Im Beobachtungszeitraum wurden auf der untersuchten Intensivstation am häufigsten solche Antibiotikasubstanzen wie β -Laktame und Fluorchinolone verwendet (siehe Tab. 24). Aus den Ergebnissen anderer Untersuchungen der Jahre 2003 bis 2004 geht ebenfalls hervor, dass unabhängig von der Krankenhausgröße Betalactame mit 60% gefolgt von Fluochinolonen mit ca. 18 % zu den am meisten, in erster Linie in den Hochverbraucherbereichen Intensivstation und hämatologisch-onkologischen Station, eingesetzten Antibiotikaklassen gehören³⁹.

Aus den Ergebnissen unserer Arbeit konnte nachvollzogen werden, dass Carbapeneme als Reserveantibiotika in ca. 20 % der Fälle bei unserem gesamten Patientenkollektiv zum Einsatz kamen. Es wurde dabei erwartungsgemäß festgestellt, dass die Nonfermenter-Patienten im Vergleich zu dem restlichen Kollektiv viel häufiger und länger dieser Therapie unterzogen wurden (siehe Tab. 37).

Dabei betrug die Antibiotikaanwendungsdichte (AD) für Imipenem/ Cilastatin während unserer Beobachtung 796 DDDs pro 1000 Patiententage. Dieser Wert liegt zwar im Vergleich zu anderen im Rahmen dieser Untersuchung auf der Intensivstation verwendeten Antibiotikaklassen im unteren Bereich (siehe Tab. 24), beträgt aber mehr als das doppelte vom im SARI-Projekt maximal ermittelten AD-Wert für Carbapeneme⁶³ (300 DDDs pro 1000 Patiententage). Die SARI-Untersuchungen konnten zudem eine kontinuierliche Zunahme des Carbapenem-Verbrauchs auf den beobachteten Intensivstationen im Zeitraum von 2002 bis 2007 belegen⁶³.

Der hohe AD- Wert für Carbapeneme auf der untersuchten Intensivstation deutet auf einen hohen Selektionsdruck für multiresistente, nosokomiale Erreger hin. Diese Tatsache kann vor allem für die natürlich gegen diese Substanz resistenten Bakterienspezies wie *S. maltophilia* einen Selektionsvorteil bedeuten. So konnten einige Studien eine positive Korrelation zwischen Carbapenemverbrauch und *S. maltophilia*-Dichte im Intensivbereich belegen^{59,62}, während Ergebnisse weiterer Untersuchungen keine Beweise dafür liefern konnten, dass Carbapeneme ein Risikofaktor für *Stenotrophomonas*-Nachweis darstellen^{66,75}.

Im Rahmen unserer Untersuchung wurde ein Zusammenhang zwischen der Carbapenemgabe auf der ITS und dem Auftreten des *S. maltophilia* festgestellt. Von den beobachteten 16 Nonfermenter-Patienten erhielten insgesamt 6 Patienten im Verlauf der Intensivversorgung eine Imipenemtherapie. Dabei wurde bei 50 % dieser Patienten insgesamt 19 *S. maltophilia*-Isolaten nachgewiesen. Gleichzeitig konnte bei den restlichen 10 Patienten, die kein Imipenem während der Studie bekommen haben, in nur 30% der Fälle ein Nachweis von insgesamt 12 *S. maltophilia*-Isolaten erfolgen. Aufgrund der zeitlich limitierten Rahmenbedingungen dieser Arbeit, die lediglich eine orientierende Punktprevalenz ermöglichen, ist eine statistische Aussage leider nur eingeschränkt möglich.

Häufig ist der Hauptgrund für eine erfolglose initiale Therapie einer Infektion sind multiresistente Erreger, die durch eine zu eng gewählte Antibiotikatherapie nicht erreicht werden können⁸⁰.

In Deutschland kann von einer flächendeckenden ärztlichen Versorgung ausgegangen werden. Nach den Ergebnissen der Libra-Studie (<http://www.librainitiative.com/life/en/index.html>) werden ca. 80% aller Antibiotika vom Hausarzt/Niedergelassenen Facharzt verabreicht. Es ist daher a priori in unserem Studienkollektiv davon auszugehen, dass die Mehrzahl der untersuchten Patienten in der Anamnese bereits vor ihrem stationären Aufenthalt in der Beobachtungszeit Zugang zu Antibiotika hatten. In wiefern daher Antibiotika-Therapien in der Vorgeschichte der Patienten bereits Einfluss auf die Zusammensetzung der Besiedlungsflora hatte, ließ sich nicht näher ermitteln. Aus den Patientenakten konnte lediglich festgestellt werden, dass die untersuchten Patienten vor Aufnahme in die Studie im Durchschnitt bereits ca. 6 Tage auf einer Intensivstation bzw. ca. 7 Tage auf einer Pflegestation verbracht hatten und somit mit großer Wahrscheinlichkeit einem Antibiotikaselektionsdruck ausgesetzt waren.

Deshalb wird von der Expertenkommission der PEG empfohlen, zur Therapie schwerer nosokomialer Pneumonien ein Cephalosporin der Gruppe 3b/4, eine Kombination von Acylaminopenicillin und β -Laktamase-Inhibitor oder ein Carbapenem, jeweils kombiniert mit einem Fluorchinolon oder Aminoglykosid, einzusetzen⁸³. Aus der Übersicht von Kollef geht hervor, dass im Fall einer nosokomialen Pneumonie Carbapeneme aufgrund des zur Zeit breitesten Wirkspektrums gut zur Therapie vor allem bei schweren Verläufen geeignet sind. Dabei sollte Meropenem dem Imipenem wegen seiner besseren Wirksamkeit im gramnegativen Bereich (v.a. gegen *Pseudomonas*) vorgezogen werden⁴².

4.4 Resistenzverhalten und Übertragungswege der nosokomialen Nonfermentern

Nach Aussage einer Studie aus dem Jahr 2005 waren bis zu 21,6% der nosokomialen Infektionen auf deutschen Intensivstationen transmissionsassoziiert, entstanden also durch Übertragung der Erreger zwischen Patienten oder aus deren Umgebung und stellen somit den vermeidbaren Anteil dar⁴.

Aus den mikrobiologischen Untersuchungsergebnissen dieser Arbeit konnte abgeleitet werden, dass unter den Nonfermentern insgesamt 10 Fälle der nosokomialen Ausbreitung der 7 verschiedenen Bakterienstämme unter insgesamt 8 Patienten dokumentiert wurden (siehe Tab. 28 bis 30). Davon konnten 5 Übertragungen der 3 verschiedenen *S. maltophilia*-Stämme unter 5 Patienten erkannt werden. Bei *Pseudomonas* erfolgten 3 Transmissionen, bei denen 6 verschiedene Patienten betroffen waren. Außerdem konnte der 1. *Acinetobacter*-Stamm im Verlauf bei 2 weiteren Patienten nachgewiesen werden, bei denen es anfänglich noch nicht vorhanden war. In je einem Übertragungsfall von *Pseudomonas aeruginosa* und *S. maltophilia* wurde festgestellt, dass die

betroffenen Patienten in benachbarten Boxen versorgt wurden, so dass hier die räumliche Nähe als Risikofaktor und eine mögliche Erklärung für diese Transmissionen in Frage kommt.

Durch ihr Potential zur Ausprägung intrinsischer Resistenzmechanismen und durch die Verfügbarkeit eines großen Pools mobiler Resistenzgene können z. B. nosokomiale *Pseudomonas aeruginosa* - Stämme während ihrer langen Persistenz in der Klinikflora unter entsprechendem Selektionsdruck Resistenzdeterminanten akkumulieren und Panresistenz ausprägen. Als panresistent werden Stämme bezeichnet, die Resistenz gegenüber allen klinisch einsetzbaren Antibiotika aufweisen. So tritt die Panresistenz in erster Linie bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* auf, da diese Spezies bereits gegen viele Antibiotika natürlich resistent sind.

Während aus den Berichten der PEG-Studie und EARSS-Daten der letzten Jahre hervorgeht, dass der Anteil an *P. aeruginosa*- Stämmen, die Resistenzmechanismen gegen Carbapeneme aufweisen, weiter zunimmt (siehe Tab. 1 bis 3), stellte sich die Resistenzrate von Imipenem-resistenten *P. aeruginosa* auf SARI-ITS über den Fünf-Jahres-Zeitraum gleichbleibend, ohne eindeutigen Trend, dar⁶⁰. Im Vergleich zu den SARI-Ergebnissen, wonach fast jeder vierte *P. aeruginosa*-Erreger Carbapenem-resistent war (RR=23 %) ⁶³, konnte im Rahmen der Resistenztestung dieser Arbeit bei 38 % der *Pseudomonas*-Isolate eine Meropenemresistenz nachgewiesen werden.

Es ist ein Zusammenhang zwischen Carbapenemeinsatz auf allen SARI-Intensivstationen im Jahr 2006 und Imipenem-resistenten *P. aeruginosa*- Stämmen beschrieben worden⁶⁰.

So erhöht sich die Wahrscheinlichkeit der Resistenzentstehung im Rahmen einer Imipenemmonotherapie bei Nachweis einer *Pseudomonas*- Infektion durch das einfache Mechanismus (Verlust von Porinen³¹) fast um das sechsfache im Vergleich zu Patienten, die kein Imipenem erhalten haben³⁵.

Aufgrund ihrer Fähigkeit zur weitreichenden Verbreitung können diese resistenten Stämme große Ausbrüche schwer oder nicht mehr therapierbarer nosokomialer Infektionen verursachen, die eine Bedrohung für jeden Intensivpatienten darstellen. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit einer kontinuierlichen aktiven Surveillance, effektiver Hygienemaßnahmen und einer schnellen Elimination von Ausbruchsstämmen aus der Klinikflora ebenso wie den Bedarf an neuen Antibiotika mit alternativen Wirkmechanismen gegen gramnegative nosokomialen multiresistenten Erreger wie *Pseudomonas*.

Hierzu ist mehr Kenntnis über die Lokalisation und das Zusammenwirken bestehender Resistenzgene ebenso erforderlich wie Kenntnisse über die Verbreitung und mögliche Veränderung nosokomialer Stämme und deren Resistenzmechanismen während eines Ausbruchsgeschehens.

Anhand der Ergebnisse unserer Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei 2 *Pseudomonas*-Stämmen im Verlauf der Beobachtungszeit bisher nicht vorhandene Integrons der Klassen 1 und 2 nachweisbar waren (siehe Tab. 32). Der Erwerb neuer Resistenzmechanismen äußerte sich in einer

Veränderung der Resistenzmuster der Integron-haltigen Bakterien. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe vom Prof. Franz-Josef Schmitz hatten für ein ähnliches Patientengut der Universitätsklinik Düsseldorf in einem mehrjährigen Untersuchungszeitraum bereits belegt, dass Integrons der Klasse 1 eine bedeutende Rolle bei der gramnegativen Resistenzentwicklung gespielt hatten ⁷⁷.

4.5 Schlussfolgerung

Aus diesen Überlegungen lässt sich die Vermutung ableiten, dass der Erwerb von Resistenzintegrons als eine Art Vorlast anzusehen ist, die der Patient in seiner Besiedlungsflora bereits in das Risikoumfeld der Intensivstation mitbringt. Da es sich bei Integrons um mobile genetische Elemente handelt, die sich potenziell unabhängig von ihrem Ursprungsstamm nosokomial verbreiten können, stellen die Integrons einen zusätzlichen Kofaktor der Resistenzentwicklung bei der Antibiotikatherapie in der Klinik dar. Ihre Verbreitung unabhängig vom nosokomialen Ausgangsisolat ist somit in der Lage, das Auftreten multiresistenter Erreger auch bei geändertem Antibiotikaselektionsdruck als eine Art Nachhaltigkeitseffekt plausibel zu machen. Der auf einigen Intensivstationen verfolgte Ansatz, bei der empirischen Therapie turnusmäßig zwischen verschiedenen Antibiotikaklassen zu wechseln (cycling antibiotics) wurde daher auch aufgrund des unterschiedlichen Outcomes von vielen Klinikern kontrovers beurteilt.

Die Eigendynamik der Integronverbreitung würde ebenfalls einen Erklärungsansatz dafür bieten, dass sich unter dem Antibiotika-Selektionsdruck der Intensivstation das oben diskutierte uneinheitliche Verhältnis zwischen AD und dem Auftreten Multi- und Panresistenter Erreger zeigte.

Vor diesem Hintergrund ist es von äußerster Wichtigkeit, die verbleibenden Antibiotika gegen multiresistente Stämme rational einzusetzen und die Therapie auf den Erreger und dessen Resistenzphänotyp abzustimmen.

Ebenso relevant ist es, die gezielte Antibiotikatherapie mit effektiven Überwachungs- und Hygienemaßnahmen zu kombinieren, um eine weitere Verbreitung dieser Isolate und möglicher mobiler genetischer Elemente, die bei ihnen ihren Ursprung nehmen, erfolgreich zu verhindern.

5. Zusammenfassung

Fakultativ pathogene Spezies wie *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* gehören zu den wichtigsten Erregern nosokomialer Infektionen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden innerhalb von 6 Wochen die Einflussfaktoren auf das Resistenzverhalten von gramnegativen Nonfermentern im Bereich der Intensivmedizin untersucht.

Das Patientenkollektiv bestand aus Patienten, die im Durchschnitt 8,8 Tage lang auf der chirurgischen Intensivstation des Universitätsklinikums Düsseldorf beobachtet wurden. Das mittlere Alter der Patienten lag bei 64 Jahren. Von insgesamt 59 Patienten, die in dieser Arbeit mittels aktivem Screening untersucht worden sind, konnten bei 16 Patienten (27 %) Nonfermenter nachgewiesen werden. Dabei wurden bei 10 verschiedenen Patienten insgesamt 49 *Pseudomonas*-Stämme aus den Untersuchungsmaterialien isoliert, bei 6 Patienten wurden 33 *Stenotrophomonas-maltophilia*-Stämme und bei 5 Patienten 7 *Acinetobacter*-Stämme isoliert.

Im Rahmen der Integrondetektion wurden insgesamt 9 Patienten als Träger von Integron-haltigen gramnegativen Bakterienstämmen erkannt. Unter den 22 Integron-positiven Bakterienisolaten, die 3 verschiedenen Spezies zugeordnet wurden, konnten 2 Nonfermenter identifiziert werden. Beide Isolate gehörten der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* an, wobei sie aus dem Respirationstrakt eines Patienten stammen und im Abstand von 2 Wochen nachgewiesen wurden. Während beim ersten Isolat Integron Klasse 1 nachgewiesen wurde, besaß das zweite Isolat zudem ein Klasse 2-Integron. Das spiegelte sich auch im Resistenzmuster beider Isolate wieder. Denn im Gegensatz zum Erstisolat, das gegen einzelne Antibiotikasubstanzen als resistent getestet wurde, wurde beim Klasse 1- und 2-haltigen *Pseudomonas*-Isolat eine Multiresistenz gegen alle getesteten Antibiotika einschließlich Meropenem festgestellt. Unter den 8 NF-Patienten wurden insgesamt 10 nosokomiale Übertragungen dokumentiert, dabei konnte in 2 Fällen räumliche Nähe (benachbarte Boxen) als Risikofaktor für diese Transmissionen ermittelt werden.

Nach der Auswertung von klinischen Daten stellte sich heraus, dass der Nachweis von Nonfermentern mit einem erhöhten Risiko für nosokomiale Infektionen während der Intensivbehandlung der Patienten einherging. Denn von insgesamt 16 Patienten, die positiv auf das Vorhandensein von Nonfermentern getestet wurden, wiesen 14 Patienten (87,5%) eine nosokomiale Infektion auf. Im Vergleich dazu kam es bei nur 7 von 43 Patienten (16 %) ohne Nachweis von Nonfermentern zu einer nosokomialen Infektion. Beim Vergleich der Daten der NF-Patienten mit der Kontrollgruppe wurden außerdem Liegedauer auf der ITS, Carbapenemtherapie und Vorhandensein von Tracheostoma als Risikofaktoren für den Nachweis von Nonfermentern identifiziert. Darüber hinaus wurde retrospektiv festgestellt, dass der mikrobiologische Nachweis von Nonfermentern im Rahmen der Intensivbehandlung mit einer höheren Mortalität der Patienten (Nonfermenter-Patienten 25% versus Kontrollgruppe 14 %) verbunden war.

Literaturverzeichnis

1. **Alonso, A. and J. L. Martinez. 1997.** Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1140-1142.
2. **Aloush, V., S. Navon -Venezia, Y. Seigman-Igra, S. Cabili, and Y. Carmeli. 2006.** Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:43-48.
3. **Avison, M. B., C. J. von Heldreich, C. S. Higgins, P. M. Bennett, and T. R. Walsh. 2000.** A TEM-2beta-lactamase encoded on an active Tn1-like transposon in the genome of a clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:879-884.
4. **Bärwolff S, G. H. S. F. R. H. G. P. 2005.** Inzidenz der Übertragung von Infektionserregern von einem Intensivpatienten zum anderen. *Ergebnisse der SIR-3-Studie.*, p. 560-566. *Anaesthesist* 54.
5. **Bauernfeind A and Peters G. 1994.** *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie.* 304-344. Ref Type: Generic
6. **Bergogne-Berezin, E. 2001.** The Increasing Role of *Acinetobacter* Species As Nosocomial Pathogens. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 3:440-444.
7. **Bergogne-Berezin, E. and K. J. Towner. 1996.** *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* 9:148-165.
8. **Berlau, J., H. Aucken, H. Malnick, and T. Pitt. 1999.** Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18:179-183.
9. **Berlau, J., H. M. Aucken, E. Houang, and T. L. Pitt. 1999.** Isolation of *Acinetobacter* spp. including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. *J. Hosp. Infect.* 42:201-204.
10. **Bunny, K. L., R. M. Hall, and H. W. Stokes. 1995.** New mobile gene cassettes containing an aminoglycoside resistance gene, *aacA7*, and a chloramphenicol resistance gene, *catB3*, in an integron in pBWH301. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:686-693.
11. **Collis, C. M., G. Grammaticopoulos, J. Briton, H. W. Stokes, and R. M. Hall. 1993.** Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Mol. Microbiol.* 9:41-52.
12. **Collis, C. M. and R. M. Hall. 1992.** Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J. Bacteriol.* 174:1574-1585.
13. **Collis, C. M. and R. M. Hall. 1992.** Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol. Microbiol.* 6:2875-2885.

14. **Collis, C. M. and R. M. Hall. 1995.** Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:155-162.
15. **Corbella, X., A. M. Montero, M. Pujol, M. A. Dominguez, J. Ayats, M. J. Argerich, F. Garrigosa, J. Ariza, and F. Gudiol. 2000.** Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 38:4086-4095.
16. **Deja, M. 2007.** [An appendix on the strategies for the prescription of antibiotics in intensive care: standards for microbiological diagnostics]. *Anesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* 42:108-110.
17. **Deja, M., I. Nachtigall, E. Halle, M. Kastrup, M. M. Guill, and C. D. Spies. 2007.** [Strategies in the treatment of infections with antibiotics in intensive care medicine]. *Anesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* 42:108-115.
18. **Denton, M. and K. G. Kerr. 1998.** Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:57-80.
19. **Ferrara, A. M. 2006.** Potentially multidrug-resistant non-fermentative Gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. *Int. J. Antimicrob. Agents* 27:183-195.
20. **Fluit, A. C. and F. J. Schmitz. 1999.** Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18:761-770.
21. **Fluit, A. C. and F. J. Schmitz. 2004.** Resistance integrons and super-integrons. *Clin. Microbiol. Infect.* 10:272-288.
22. **Forster, D. H. and F. D. Daschner. 1998.** *Acinetobacter* species as nosocomial pathogens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17:73-77.
23. **Gales, A. C., R. N. Jones, K. R. Forward, J. Linares, H. S. Sader, and J. Verhoef. 2001.** Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999). *Clin. Infect. Dis.* 32 Suppl 2:S104-S113.
24. **Gales, A. C., H. H. Sader, and R. N. Jones. 2002.** Respiratory tract pathogens isolated from patients hospitalized with suspected pneumonia in Latin America: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 44:301-311.
25. **Garcia-Garmendia, J. L., C. Ortiz-Leyba, J. Garnacho-Montero, F. J. Jimenez-Jimenez, C. Perez-Paredes, A. E. Barrero-Almodovar, and M. Gili-Miner. 2001.** Risk factors for *Acinetobacter baumannii* nosocomial bacteremia in critically ill patients: a cohort study. *Clin. Infect. Dis.* 33:939-946.

26. **Geffers, C., P. Gastmeier, and H. Ruden.** 2002. Nosokomiale Infektionen. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 8.
27. **Goldstein, C., M. D. Lee, S. Sanchez, C. Hudson, B. Phillips, B. Register, M. Grady, C. Liebert, A. O. Summers, D. G. White, and J. J. Maurer.** 2001. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:723-726.
28. **Gomez, J., E. Simarro, V. Banos, L. Requena, J. Ruiz, F. Garcia, M. Canteras, and M. Valdes.** 1999. Six-year prospective study of risk and prognostic factors in patients with nosocomial sepsis caused by *Acinetobacter baumannii*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18:358-361.
29. **Gonzalez, G., K. Sossa, H. Bello, M. Dominguez, S. Mella, and R. Zemelman.** 1998. Presence of integrons in isolates of different biotypes of *Acinetobacter baumannii* from Chilean hospitals. *FEMS Microbiol. Lett.* 161:125-128.
30. **Grundmann, H., S. Barwolff, A. Tami, M. Behnke, F. Schwab, C. Geffers, E. Halle, U. B. Gobel, R. Schiller, D. Jonas, I. Klare, K. Weist, W. Witte, K. Beck-Beilecke, M. Schumacher, H. Ruden, and P. Gastmeier.** 2005. How many infections are caused by patient-to-patient transmission in intensive care units? *Crit Care Med.* 33:946-951.
31. **Hancock, R. E.** 1998. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin. Infect. Dis.* 27 Suppl 1:S93-S99.
32. **Hancock, R. E. and W. A. Woodruff.** 1988. Roles of porin and beta-lactamase in beta-lactam resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.* 10:770-775.
33. **Hanes, S. D., K. Demirkan, E. Tolley, B. A. Boucher, M. A. Croce, G. C. Wood, and T. C. Fabian.** 2002. Risk factors for late-onset nosocomial pneumonia caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in critically ill trauma patients. *Clin. Infect. Dis.* 35:228-235.
34. **Harbarth S.** 2007. Antibiotikaanwendung - Einfluss auf Resistenzbildung und -selektion. 357-364. *Krankenhaushygiene* up2date. Ref Type: Generic
35. **Harbarth, S., A. D. Harris, Y. Carmeli, and M. H. Samore.** 2001. Parallel analysis of individual and aggregated data on antibiotic exposure and resistance in gram-negative bacilli. *Clin. Infect. Dis.* 33:1462-1468.
36. **Harris, A., C. Torres-Viera, L. Venkataraman, P. DeGirolami, M. Samore, and Y. Carmeli.** 1999. Epidemiology and clinical outcomes of patients with multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect. Dis.* 28:1128-1133.
37. **Jonas, D.** 2006. Praktische Krankenhaushygiene und Umweltschutz, p. 108-114. In Dettenkofer M., Frank U., Scherrer M., and Daschner F. (eds.), Springer Verlag, Heidelberg.

38. **Jucker, B. A., H. Harms, and A. J. Zehnder. 1996.** Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *J. Bacteriol.* 178:5472-5479.
39. **Katja de With. 2007.** Antibiotikaverbrauch in Klinik und Praxis. Winfried V.Kern. 341-351. *Krankenhaushygiene* up2date.
Ref Type: Generic
40. **Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, and Zinkernagel RM. 2001.** *Medizinische Mikrobiologie* Thieme Verlag, Stuttgart.
41. **Knaus, W. A., E. A. Draper, D. P. Wagner, and J. E. Zimmerman. 1985.** APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med.* 13:818-829.
42. **Kollef, M. H. 2004.** Appropriate empiric antimicrobial therapy of nosocomial pneumonia: the role of the carbapenems. *Respir. Care* 49:1530-1541.
43. **Kollef, M. H., P. Silver, D. M. Murphy, and E. Trovillion. 1995.** The effect of late-onset ventilator-associated pneumonia in determining patient mortality. *Chest* 108:1655-1662.
44. **Lai, C. H., W. W. Wong, C. Chin, C. K. Huang, H. H. Lin, W. F. Chen, K. W. Yu, and C. Y. Liu. 2006.** Central venous catheter-related *Stenotrophomonas maltophilia* bacteraemia and associated relapsing bacteraemia in haematology and oncology patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 12:986-991.
45. **Lepper, P. M., E. Grusa, H. Reichl, J. Hogel, and M. Trautmann. 2002.** Consumption of imipenem correlates with beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:2920-2925.
46. **Levy, S. B. 2001.** Antibiotic resistance: consequences of inaction. *Clin. Infect. Dis.* 33 Suppl 3:S124-S129.
47. **Livermore, D. M. 2003.** Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin. Infect. Dis.* 36:S11-S23.
48. **Livermore, D. M. 1995.** beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8:557-584.
49. **Livermore, D. M. 1995.** beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8:557-584.
50. **Livermore, D. M. and D. F. Brown. 2001.** Detection of beta-lactamase-mediated resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 48 Suppl 1:59-64.
51. **Lopez-Hernandez, S., T. Alarcon, and M. Lopez-Brea. 2000.** [Evolution of antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates]. *Rev. Esp. Quimioter.* 13:394-400.

52. **Mahenthiralingam, E., M. E. Campbell, J. Foster, J. S. Lam, and D. P. Speert. 1996.** Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 34:1129-1135.
53. **Mahgoub, S., J. Ahmed, and A. E. Glatt. 2002.** Completely resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 23:477-479.
54. **Manikal, V. M., D. Landman, G. Saurina, E. Oydna, H. Lal, and J. Quale. 2000.** Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. *Clin. Infect. Dis.* 31:101-106.
55. **Martinez, E. and C. F. de la. 1988.** Transposon Tn21 encodes a RecA-independent site-specific integration system. *Mol. Gen. Genet.* 211:320-325.
56. **Martinez, E. and C. F. de la. 1990.** Genetic elements involved in Tn21 site-specific integration, a novel mechanism for the dissemination of antibiotic resistance genes. *EMBO J.* 9:1275-1281.
57. **Mazel, D. 2006.** Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:608-620.
58. **McGowan, J. E., Jr. 2006.** Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am. J. Infect. Control* 34:S29-S37.
59. **Metan, G., M. Hayran, G. Hascelik, and O. Uzun. 2006.** Which patient is a candidate for empirical therapy against *Stenotrophomonas maltophilia* bacteraemia? An analysis of associated risk factors in a tertiary care hospital. *Scand. J. Infect. Dis.* 38:527-531.
60. **Meyer, E. Das SARI-Projekt. Schwab, F. 61-71. 2008.** *Krankenhaushygiene up2date.* Ref Type: Generic
61. **Meyer, E., D. Jonas, F. Schwab, H. Rueden, P. Gastmeier, and F. D. Daschner. 2003.** Design of a surveillance system of antibiotic use and bacterial resistance in German intensive care units (SARI). *Infection* 31:208-215.
62. **Meyer, E., F. Schwab, P. Gastmeier, H. Rueden, F. D. Daschner, and D. Jonas. 2006.** *Stenotrophomonas maltophilia* and antibiotic use in German intensive care units: data from Project SARI (Surveillance of Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in German Intensive Care Units). *J. Hosp. Infect.* 64:238-243.
63. **Meyer, E., F. Schwab, B. Schroeren-Boersch, and P. Gastmeier. 2008.** [Surveillance of antibiotic use and bacterial resistance in intensive care units]. *Bundesgesundheitsblatt. Gesundheitsforschung. Gesundheitsschutz.* 51:926-935.
64. **Mulin, B., C. Rouget, C. Clement, P. Bailly, M. C. Julliot, J. F. Viel, M. Thouverez, I. Vieille, F. Barale, and D. Talon. 1997.** Association of private isolation rooms with ventilator-associated *Acinetobacter baumannii* pneumonia in a surgical intensive-care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 18:499-503.

65. **Neuhauser, M. M., R. A. Weinstein, R. Rydman, L. H. Danziger, G. Karam, and J. P. Quinn. 2003.** Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. *JAMA* 289:885-888.
66. **Nseir, S., P. C. Di, H. Brisson, F. Dewavrin, S. Tissier, M. Diarra, M. Boulo, and A. Durocher. 2006.** Intensive care unit-acquired *Stenotrophomonas maltophilia*: incidence, risk factors, and outcome. *Crit Care* 10:R143.
67. **Peleg, A. Y., H. Seifert, and D. L. Paterson. 2008.** *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 21:538-582.
68. **Poutanen, S. M., M. Louie, and A. E. Simor. 1997.** Risk factors, clinical features and outcome of *Acinetobacter* bacteremia in adults. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16:737-740.
69. **Povoa, P., L. Coelho, E. Almeida, A. Fernandes, R. Mealha, P. Moreira, and H. Sabino. 2005.** C-reactive protein as a marker of infection in critically ill patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 11:101-108.
70. **Pugin, J., R. Auckenthaler, N. Mili, J. P. Janssens, P. D. Lew, and P. M. Suter. 1991.** Diagnosis of ventilator-associated pneumonia by bacteriologic analysis of bronchoscopic and nonbronchoscopic "blind" bronchoalveolar lavage fluid. *Am. Rev. Respir. Dis.* 143:1121-1129.
71. **Rahal, J. J. 2006.** Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin. Infect. Dis.* 43 Suppl 2:S95-S99.
72. **Recchia, G. D. and R. M. Hall. 1995.** Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology* 141 (Pt 12):3015-3027.
73. **Rossolini, G. M. 2005.** Acquired metallo-beta-lactamases: an increasing clinical threat. *Clin. Infect. Dis.* 41:1557-1558.
74. **Rowe-Magnus, D. A. and D. Mazel. 2002.** The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int. J. Med. Microbiol.* 292:115-125.
75. **Schaumann, R., K. Stein, C. Eckhardt, G. Ackermann, and A. C. Rodloff. 2001.** Infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia*--a prospective study. *Infection* 29:205-208.
76. **Schmitz FJ, Martinez-Freijo P, Theis S, Fluit A, Verhoef J, and Heinz HP. 2000.** Prevalence of class I integrons and association with decreased antibiotic susceptibility in German gram negative blood culture isolates. 496-498. *Clin. Microbiol. Infect.*
Ref Type: Generic

77. **Schmitz, F. J., P. Martinez-Freijo, S. Theis, A. C. Fluit, J. Verhoef, H. P. Heinz, and M. E. Jones. 1999.** *Class I integrons: prevalence and impact on antibiotic susceptibility in 278 consecutive unrelated Gram-negative blood isolates.* *Clin. Microbiol. Infect.* 5:496-498.
78. **Simor, A. E., M. Lee, M. Vearncombe, L. Jones-Paul, C. Barry, M. Gomez, J. S. Fish, R. C. Cartotto, R. Palmer, and M. Louie. 2002.** *An outbreak due to multidrug-resistant Acinetobacter baumannii in a burn unit: risk factors for acquisition and management.* *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 23:261-267.
79. **Stokes, H. W. and R. M. Hall. 1989.** *A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons.* *Mol. Microbiol.* 3:1669-1683.
80. **Trouillet, J. L., J. Chastre, A. Vuagnat, M. L. Joly-Guillou, D. Combaux, M. C. Dombret, and C. Gibert. 1998.** *Ventilator-associated pneumonia caused by potentially drug-resistant bacteria.* *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 157:531-539.
81. **Versalovic, J., T. Koeuth, and J. R. Lupski. 1991.** *Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes.* *Nucleic Acids Res.* 19:6823-6831.
82. **Vincent, J. L., R. Moreno, J. Takala, S. Willatts, M. A. de, H. Bruining, C. K. Reinhart, P. M. Suter, and L. G. Thijs. 1996.** *The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine.* *Intensive Care Med.* 22:707-710.
83. **Vogel F, Boddmann KF, and Expertenkommission der PEG. 2004.** *Empfehlungen zur kalkulierten parenteralen Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen.* *Chemother. J.* 47-103.
84. **Wiegand I. 2003.** *Molekulare und biochemische Grundlagen der Beta-Laktam-Resistenz durch Beta-Laktamasen.* 151-164. *Chemotherapie Journal.*
Ref Type: Generic
85. **Wisplinghoff, H., W. P. Rupp, and H. Seifert. 1999.** *Risk factors for nosocomial bloodstream infections due to Acinetobacter baumannii: a case-control study of adult burn patients.* *Clin. Infect. Dis.* 28:59-66.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Empfindlichkeit der <i>Pseudomonas</i> -Isolate in Deutschland in 2006, Quelle: http://www.rivm.nl/earss/database/	6
Tabelle 2:	Empfindlichkeit der <i>Pseudomonas</i> -Isolate in Deutschland in 2007, Quelle: http://www.rivm.nl/earss/database/	6
Tabelle 3:	Prozentsatz der Carbapenem resistenten <i>P. aeruginosa</i> Isolate.....	7
Tabelle 4:	Sterbewahrscheinlichkeit. Übersicht der Zuordnung von Parametern zu den Punktwerten.	22
Tabelle 5:	Schematische Darstellung einer MICRONAUT-Platte; Abkürzungen im Text erläutert	31
Tabelle 6:	MHK-Breakpoints für <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> (aus der PEG-Resistenzstudie; Paul Ehrlich Gesellschaft, 2001).	32
Tabelle 7:	MHK-Breakpoints für <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (PEG- Resistenzstudie 2001).....	33
Tabelle 8:	MHK-Breakpoints für <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PEG-Resistenzstudie 2001).	34
Tabelle 9:	Zusammensetzung vom Prämix (25 µl Einfachansatz).....	36
Tabelle 10:	Zusammensetzung vom Prämix.....	43
Tabelle 11:	Altersverteilung der Patienten.	45
Tabelle 12:	Liegedauer auf der Intensivstation.	46
Tabelle 13:	Häufigkeit und Verteilung der Einweisungsdiagnosen.....	49
Tabelle 14:	Anzahl und Liegezeit von Harnwegskathetern.....	50
Tabelle 15:	Zentralvenöse Gefäßkatheter: Verweildauer und Insertionsstelle.	50
Tabelle 16:	Anzahl der intubierten Patienten mit Endotrachealtuben / Tracheostomata.....	50
Tabelle 17:	Periphervenöse Zugänge mit Insertionsstelle und Dauer des Verbleibs.	51
Tabelle 18:	Aterielle Zugänge mit Insertionsstelle und Liegedauer.	51

Tabelle 19:	Anzahl und Liegedauer der Magensonden.	51
Tabelle 20:	Art und Anzahl der Drainagen mit Liegezeit.	52
Tabelle 21:	Übersicht über die Anwendungsrate der Devices nach Häufigkeit sortiert. *Device-Anwendungsrate = Anzahl Device-Tage / Anzahl der Patiententage x 100.	52
Tabelle 22:	Statistik der Scores in der Übersicht.	53
Tabelle 23:	Statistik der Laborwerte in der Übersicht.	54
Tabelle 24:	Übersicht über den Antibiotikaverbrauch. Sortiert nach DDD pro 1000 Patienten-Tage.....	55
Tabelle 25:	Entnahmeort der mikrobiologischen Untersuchungsmaterialien.	56
Tabelle 26:	Veteilung der einzelnen Nonfermenter nach Häufigkeit angeordnet.	57
Tabelle 27:	Ergebnisse der Resistenzbestimmung.....	57
Tabelle 28:	RAPD-Genotypisierung von <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Isolaten; Abkürzungen der Entnahmeorte siehe Tabelle 32.....	59
Tabelle 29:	RAPD-Genotypisierung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Isolaten; Abkürzungen der Entnahmeorte, siehe Tabelle 32.....	62
Tabelle 30:	RAPD-Genotypisierung von <i>Acinetobacter baumannii</i> Isolaten; Abkürzungen der Entnahmeorte, siehe Tabelle 32.....	64
Tabelle 31:	Abkürzung der Entnahmeorte.	65
Tabelle 32:	Phänotypische Resistenzbestimmung Integron-haltiger Nonfermenter; Alle Resistenztestungs- MHK-Werte in µg/ml.	66
Tabelle 33:	Durchschnittsalter und Altersverteilung der Patienten.	67
Tabelle 34:	Durchschnittliche Liegedauer der Patienten auf der Intensivstation.....	67
Tabelle 35:	Häufigkeitsvergleich von Devices der Nonfermenter- und der Kontrollgruppe.	68
Tabelle 36:	Anteil der Patienten mit nosokomialer Infektion.	68
Tabelle 37:	Durchschnittliche Dauer und Anteil der Patienten mit Carbapenemtherapie.....	68
Tabelle 38:	Vergleich der Sterblichkeitsraten beider Kollektive.....	68

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Gel mit mehrfach aufgetragenen Amplifikaten.....	38
Abbildung 2:	Schematische Darstellung des Sequenzierungvorganges (Quelle: QiAquick Gel Extraction Kit Handbuch).....	39
Abbildung 3:	Beispiel für ein Electropherogramm.....	40
Abbildung 4:	Sequenz von Amplifikaten.....	40
Abbildung 5:	Ergebnis des Homologievergleichs einer Sequenzanalyse.....	42
Abbildung 6:	Beispiel der dendrografischen Unterscheidung verschiedener RAPD-Bandenmuster bei <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	60
Abbildung 7:	Beispiel der dendrografischen Unterscheidung verschiedener RAPD-Bandenmuster bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63
Abbildung 8:	Beispiel der dendrografischen Unterscheidung verschiedener RAPD-Bandenmuster bei <i>Acinetobacter baumannii</i>	64

Abkürzungsverzeichnis

- A.baumannii** - Acinetobacter baumannii
Abb. - Abbildung
AD - Antibiotikaawendungsdichte
AIDS - Acquired Immune Deficiency Syndrome
APACHE - Acute Physiology And Chronic Health Evaluation
Aqua dest. - Destilliertes Wasser
ARDS - Acute Respiratory Distress Syndrom
BMBF - Bundesministerium für Bildung und Forschung
BMFZ - Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum
bp - Basenpaare
bzw. - beziehungsweise
CF - zystische Fibrose
COPD - chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CPIS - Clinical Pulmonary Infection Score
CRP - Capsel-reaktives Protein
d.h. - das heisst
dDATP - Dideoxyadenosintriphosphat
DDD - Daily Defined Dosis
DNA - deoxyribonucleic acid
DNS - Desoxyribonukleinsäure
dNTP - Desoxyribonukleosidtriphosphate
EARSS - European Antimicrobial Resistance Surveillance System
et al. - und andere
EtBr - Ethidiumbromid
FiO₂ - Sauerstoffsättigung
GCS - Glasgow Coma Scale
HWK - Harnwegskatheter
I - intermediär
IFSG - Infektionsschutzgesetz
ITS - Intensivstation
KISS - Krankenhaus Infektions Surveillance System
Krea - Kreatinin
MAP - mittlerer arterieller Druck
max. - maximal
MBK - minimale bakterizide Konzentration
MB-Nr. - Mikrobank-Nummer

MDR - multidrug resistant
mg/dl - Milligram/Deziliter
MHK - minimale Hemmkonzentration
µl - Mikroliter
ml - Milliliter
mm Hg - Millimeter Quecksilbersäule
N - Summe
NF - Nonfermenter
NRZ - Nationales Referenzzentrum
NYHA - New York Heart Association
P.aeruginosa - Pseudomonas aeruginosa
PCR - Polymerase-Kettenreaktion
PEG - Paul Ehrlich Gesellschaft
pH-Wert - pondus Hydrogenii Wert
PO2 - Sauerstoffpartialdruck
Q 50 - Zusatzsubstanz zur Beschleunigung der Amplifikation
R - resistent
RAPD - Rapid amplified polymorphic DNA
RR - Resistenzrate
RT - Raumtemperatur
S - sensibel
S. maltophilia - Stenotrophomonas maltophilia
SOFA - Sepsis-related Organ Failure
spp. - Spezies
Tab. - Tabelle
TAE - Laufpuffer
Tris-CI - Elutionspuffer
V. jugularis ext. - Vena jugularis externa
v.a. - vor allem
z.B. - zum Beispiel
ZNS - zentrales Nervensystem
ZVK - Zentralvenöser Katheter