

Aus dem Institut für Hygiene
Direktorin: Prof. Dr. med. H. Idel
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

**Analyse und Beendigung des gehäuften Auftretens von
Mycobacterium xenopi im Patientenmaterial eines
Krankenhauses**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Sabine I. K. Mewes

2003

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

gez.: Prof. Dr. Raab
Dekan

Referent: PD Dr. med. R. Schulze-Röbbcke
Koreferent: Prof. Dr. med. F.-J. Schmitz

Jens und Johanna gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	7
1.1 Allgemeines zu Mykobakterien und Mykobakteriosen	7
1.2 Allgemeines zur Bronchoskopie	11
1.3 Problemstellung	12
1.3.1 Desinfektionsverfahren	14
1.3.1.1 UV-Desinfektion	14
1.3.1.2 Thermische Desinfektion	16
1.4 Ziele der Arbeit	17
2. MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Charakterisierung des zeitlichen Verlaufs des gehäuften Nachweises von <i>M. xenopi</i>	19
2.2 Design und Ablauf der Studie	19
2.3 Beschreibung der neu installierten ERDAs	20
2.3.1 Technische Beschreibung	21
2.3.1.1 Technische Beschreibung des ERDA Olympus ETD 2 Plus	21
2.3.1.2 Technische Beschreibung des ERDA BHT Innova 2000	22
2.3.2 Ablauf der Bronchoskop-Aufbereitung in den ERDAs	23
2.3.2.1 Ablauf der Bronchoskop-Aufbereitung im Olympus ETD 2 Plus	24
2.4 Mikrobiologisch-diagnostische Erfolgskontrolle (Patienten-Monitoring)	28
2.4.1 Probenentnahme	28
2.4.2 Probenverarbeitung im Institut für Medizinische Mikrobiologie	28
2.4.3 Dokumentation	30
2.5 Mikrobiologisch-hygienische Erfolgskontrolle (Umwelt-Monitoring)	30
2.5.1 Probenentnahme	31
2.5.1.1 Wasserproben	31
2.5.1.2 Bronchoskop-Proben	32
2.5.2 Probenverarbeitung	32

2.5.2.1 Dekontamination	33
2.5.2.2 Anreicherung (Filtration)	34
2.5.2.3 Inkubation	34
2.5.2.4 Subkultur und Lagerung der Mykobakterien-Isolate	35
2.5.3 Dokumentation	35
2.6 Differenzierung der Mykobakterien-Isolate	36
2.6.1 Ziehl-Neelsen-Färbung	36
2.6.2 Differenzierung der Isolate mittels Dünnschichtchromatographie	37
2.6.3 Differenzierung der Isolate mittels PCR-Restriktionsanalyse (PRA) des <i>hsp65</i> -Gens und des 16S-23S-rDNA-Spacers	39
2.6.4 Genotypisierung der <i>M.-xenopi</i> -Isolate mittels <i>random amplification of polymorphic DNA</i> (RAPD)	41
2.7 Belastung eines ERDA mit definierten, hohen <i>M.-xenopi</i> -Konzentrationen	43
2.7.2 Versuchsaufbau	44
2.7.3 Versuchsablauf	45
2.7.3.1 Versuchsreihe A	46
2.7.3.2 Versuchsreihe B	48
3. ERGEBNISSE	49
3.1 Charakterisierung des zeitlichen Verlaufs der „Epidemie“ und Gegenmaßnahmen bis 1999	49
3.2 Mikrobiologisch-diagnostische Erfolgskontrolle (Patienten-Monitoring)	50
3.3 Mikrobiologisch-hygienische Erfolgskontrolle (Umwelt-Monitoring)	52
3.3.1 Wasserproben	53
3.3.2 Bronchoskop-Proben	53
3.3.3 Differenzierung der Mykobakterien-Isolate	54
3.3.3.1 Ziehl-Neelsen-Färbung	54
3.3.3.2 Differenzierung der Isolate mittels Dünnschichtchromatographie	54
3.3.3.3 Differenzierung der Isolate mittels PCR-Restriktionsanalyse des <i>hsp65</i> -Gens und des 16S-23S-rDNA-Spacers	56
3.3.3.4 Typisierung der Isolate mittels RAPD	57

3.4 Belastung eines ERDA mit definierten, hohen <i>M.-xenopi</i>-Konzentrationen	63
3.4.1 Vorversuche zur Herstellung definierter <i>M.-xenopi</i>-Konzentrationen	63
3.4.1.1 Versuchsreihe A	67
3.4.1.2 Versuchsreihe B	69
4. DISKUSSION	71
5. ZUSAMMENFASSUNG	78
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	80
7. LITERATURVERZEICHNIS	81
8. ANHANG	90
9. LEBENSLAUF	96

1. Einleitung

1.1 Allgemeines zu Mykobakterien und Mykobakteriosen

Der Name *Mycobacterium* geht zurück auf „μυκη“, das altgriechische Wort für Pilz, und charakterisiert das „pilz“-artigen Wachstum dieser Bakterien an der Oberfläche von Flüssigkeiten. Als die Erstbeschreibung eines Mykobakteriums gilt die Beschreibung des „Tuberkelbazillus“ durch Robert Koch (1882). Erst später bezeichneten Lehmann und Neumann den Tuberkuloseerreger als „*Mycobacterium tuberculosis*“ und fassten ihn mit anderen Bakterien wie *M. phlei* und *M. smegmatis*, die das gleiche Färbeverhalten aufweisen, zur Gattung *Mycobacterium* zusammen. Mykobakterien gehören zu der Familie der *Mycobacteriaceae*. Sie sind grampositive, säurefeste, aerobe, unbewegliche, morphologisch unterschiedliche Stäbchen. Die Länge beträgt zwischen 1 bis 4 μm und der Durchmesser 0,3 bis 0,6 μm , wobei sowohl nahezu kokkoide als auch filamentöse Zellformen zu finden sind [71].

Desweiteren sind Mykobakterien charakterisiert durch einen hohen Lipidgehalt der Zellwand, der bis zu 60% des Gesamtgewichtes der Zellhülle betragen kann [46, 53] und die Zelle wie eine Wachsschicht umgibt. Ein großer Teil der Lipide liegt als echte Wachse (Fettsäure-Ester langkettiger Alkohole) vor. Im Vergleich zum Lipidgehalt der Mykobakterien beträgt der Lipidanteil bei gramnegativen Bakterien ungefähr 20% und bei anderen grampositiven Bakterien nur ungefähr 4%. Dies erklärt sowohl die starke Hydrophobizität der Mykobakterien, als auch ihre Säure- und Alkoholfestigkeit, die ein charakteristisches Färbeverhalten zum Beispiel in der Gram- oder Ziehl-Neelsen- Färbungen bedingt (s. Kap. 2.6.1) [11].

Vom Grundschema entspricht der Zellwandaufbau der Mykobakterien dem anderer grampositiver Bakterien. Jedoch enthält die Zellwand Glycolipid-Seitenketten, die über Phosphodiester-Bindungen an die Polysaccharidketten des Murein-Sacculus gebunden sind. Diese Glykolipid-Seitenketten bestehen aus dem verzweigten Polysaccharid Arabinogalactan und aus daran kovalent gebundenen langkettigen, α -verzweigten, β -Hydroxy-Fettsäuren, den Mykolsäuren. Diese Art des Zellwandaufbaus findet man außer bei den Mykobakterien auch bei den Gattungen *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* und verwandten Taxa.

Die Länge der Mykolsäuren ist spezifisch für die unterschiedlichen Gattungen. So sind zum Beispiel die Mykolsäuren der Mykobakterien mit einer Länge von 60 bis 90 Kohlenstoffatomen länger als die der obengenannten Gattungen [28].

Zudem besteht die Möglichkeit, die Mykolsäuren mit Hilfe der Dünnschichtchromatografie in verschiedene Mykolsäuretypen aufzutrennen und die Mykobakterien anhand ihrer unterschiedlichen Mykolsäuremuster bestimmten Gruppen zuzuordnen.

Bedingt durch den hohen Mykolsäuregehalt in der extrazellulären Matrix sind Mykobakterien sehr resistent gegenüber wasserlöslichen Substanzen. Dies wird auch als Ursache für das ungewöhnlich langsame Wachstum der Mykobakterien vermutet, da durch die Mykolsäuren eine Permeabilitätsschranke für die Aufnahme von wasserlöslichen Nährstoffen besteht [5, 53].

Die Wachstumsgeschwindigkeit der Mykobakterien ist ein wichtiges taxonomisches Unterscheidungskriterium. Im Unterschied zu schnell wachsenden Mykobakterien benötigen langsam wachsende Spezies mehr als 10 Tage bis zur Ausbildung makroskopisch sichtbarer Kolonien bei optimaler Bebrütungstemperatur von hochverdünnten Subkultur-Inokkulat [71]. Die Wachstumsgeschwindigkeit korreliert mit den Ergebnissen der 16S-rDNA- Sequenzanalyse. Bei schnellwachsenden Mykobakterienarten ist eine Deletion von 12 Nukleotiden innerhalb der Helix 18 der 16S-rDNA (*E.-coli*-Position 451 bis 482) vorhanden, die in der Sekundärstruktur zur Ausbildung einer kurzen Helix 18 führt. Langsamwachsende Spezies weisen dagegen an dieser Stelle eine längere Sequenz mit einer charakteristischen Haarnadelstruktur auf. Somit geht man davon aus, dass die Wachstumsgeschwindigkeit ein phänotypisches Merkmal phylogenetisch verwandter Gruppen darstellt, und dass schnell- und langsamwachsende Mykobakterien zwei Hauptentwicklungslinien innerhalb der Gattung bilden. Ein gleiches Pigmentierungsverhalten korreliert dagegen nicht mit einer Verwandtschaft. [10, 56, 65]

Auf Grund ihrer unterschiedlichen Fähigkeit Karotinoidpigmente zum Schutz vor Photooxidation zu bilden werden die Mycobakterien in drei Pigmentierungsgruppen eingeteilt: Skotochromogene Mykobakterien bilden sowohl mit als auch ohne Lichteinwirkung Pigmente, photochromogene Mykobakterien bilden nur nach

Lichteinwirkung Pigmente und nonchromogene Mykobakterien bilden keine Pigmente [11].

In der Umwelt findet man Mykobakterien in Boden- und Wasserproben [62], sie besiedeln Warm- und Kaltblüter, wie Fische, Arthropoden, Haustiere [6, 67] und Menschen, in denen sie sowohl als Kommensalen als auch als Krankheitserreger vorkommen [52]. Eine Übertragung von Erkrankungen durch „atypische“ Mykobakterien von Mensch zu Mensch oder von Tieren zum Menschen ist – im Unterschied zu den obligat pathogenen Mykobakterienspezies – bisher nicht sicher nachgewiesen worden [49, 72]. Als Infektionsquelle muss daher die Umwelt angesehen werden. Auf welche Art und Weise jedoch die Mykobakterien aus der Umwelt in den menschlichen bzw. tierischen Organismus gelangen, ist weitgehend ungeklärt. Sowohl die Inhalation von bakterienhaltigen Aerosolen [30] als auch die orale Aufnahme von kontaminiertem Wasser oder Lebensmitteln werden als mögliche Infektionswege diskutiert [27]. Seit den 1970er Jahren wurden Mykobakterien trotz der relativen Nährstoffarmut auch in Trinkwasser nachgewiesen [15]. Dabei fanden sich nicht nur fakultativ pathogene Mykobakterienarten wie *M. avium* und *M. intracellulare*, sondern auch die (ebenfalls fakultativ pathogenen) Arten *M. kansasii* und *M. xenopi*, deren natürliche Habitate in der Umwelt bis heute weitgehend unbekannt sind [62]. Daneben können im Trinkwasser viele apathogene Mykobakterienspezies wie *M. gordonae*, *M. chelonae*, *M. flavescens* und *M. fortuitum* vorkommen [22, 23, 37].

Es gibt zwei unterschiedliche Lebensformen von Mikroorganismen im Wasser: Zum einen kommen sie dort als frei bewegliche, planktonische Zellen vor und zum anderen als sessile Zellen oder Zellverbände, die auf Oberflächen immobilisiert sind [24, 25]. Eine solche mikrobielle Oberflächenbesiedlung wird auch als „Biofilm“ bezeichnet. Biofilme bestehen in der Regel aus in mehreren übereinandergelagerten Schichten von Mikroorganismen. Diese produzieren zu einem großen Teil extrazelluläre polymere Substanzen, so dass die Einzelzellen meist in einer „Schleimmatrix“ eingebettet und vor zahlreichen Noxen geschützt sind. Jüngere Untersuchungen zeigten, dass auch Mykobakterien in großen Zahlen in Biofilmen vorkommen, und dass Biofilme vermutlich das eigentliche Habitat und der Vermehrungsort von Mykobakterien im aquatischen Milieu sind [61]. Diese Tatsache

könnte erklären, warum Mykobakterien in nährstoffarmen Umgebungen wie Trinkwasser vorkommen, obwohl sie bei der in-vitro-Anzucht hohe Nährstoffansprüche besitzen. Zwischen den unterschiedlichen Mikroorganismen der mikrobiellen Konsortien von Biofilmen spielen sich offenbar zahlreiche symbiotische Vorgänge ab [24, 25]. Biofilme bieten ebenso eine plausible Erklärung für die ausgeprägte Resistenz von Mykobakterien gegen die im Trinkwasser eingesetzten Desinfektionsmittel wie Chlor [54].

Es gibt mehr als 25 medizinisch relevante Spezies der Mykobakterien, wie zum Beispiel *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, die unter dem *M. tuberculosis*-Komplex zusammengefasst werden. Zusammen mit *M. leprae*, den Erregern der Lepra gehören sie zu der Gruppe der obligat pathogenen Bakterien. Ihr Nachweis beim Menschen ist in aller Regel mit einer Erkrankung verbunden. Davon abgegrenzt werden die Gruppe der atypischen, „nichttuberkulösen“ Mykobakterien, die zunächst als apathogene Saprophyten angesehen wurden.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist das zu den atypischen Mykobakterien gehörende *M. xenopi*. Es ist als nicht obligat humanpathogen anzusehen, setzt es doch für eine Infektion eine Schwächung des Immunsystems voraus. Dies gewinnt in der heutigen Zeit immer größere Bedeutung, da die Zahl immungeschwächter Menschen ansteigt, auch durch die immunsuppressive Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen (autoimmun, onkologisch) oder durch HIV-Infektionen. In diesem Zusammenhang wurde erkannt, dass es sich bei den in der Umwelt vorkommenden Mykobakterien nicht nur um harmlose Saprophyten (z.B. *M. gordonae*, *M. nonchromogenicum* und *M. flavescens*), sondern auch fakultativ pathogene Spezies (z.B. *M. avium*, *M. intracellulare* und *M. kansasii*) handelt, die durchaus bei immungeschwächten Menschen Infektionen auslösen können [22, 51, 59, 73].

Bei einem gehäuften Nachweis von *M. xenopi*-Isolaten aus Patientenmaterial ist es wichtig zwischen einer Epidemie und einer Pseudoepidemie zu unterscheiden.

Epidemiologisch ist eine Epidemie definiert als ein stark gehäuftes, örtlich und zeitlich begrenztes Vorkommen einer Krankheit. Es gibt beispielsweise Explosionsepidemien (z.B. Wasser- und Milchepidemien) mit einem starken Anstieg

und Abfall der Zahl der Erkrankten oder Tardivepidemien (Kontaktepidemien) mit einem langsamen Anstieg und Abfall der Zahl der Erkrankten.

Als Pseudoepidemie bezeichnet man die zeitliche und räumliche Häufung von Pseudoinfektionen. Eine Pseudoinfektion ist eine durch einen Diagnosefehler irrtümlicherweise festgestellte Infektion bei einem in Wirklichkeit nicht infizierten Patienten. Die Folgen für den Patienten sind unnötige Behandlungen, verlängerter Krankenhausaufenthalt, mögliche Behandlungskomplikationen, nicht notwendige Kosten und eine zusätzliche physische und psychische Belastung der Patienten. Die Ursache für Pseudoinfektionen ist oftmals die Kontamination des Untersuchungsmaterials, z.B bei der Probennahme, beim Transport, bei der Verarbeitung im Labor, oder auch die falsche Interpretation eines Befundes. Es gibt verschiedene Erreger, die Pseudoepidemien auslösen können, z.B die Gattungen *Mycobacterium*, *Bacillus* und *Legionella*. Diesen Mikroorganismen ist gemeinsam, dass sie teilweise in großer Anzahl in der Umwelt vorkommen und (insbesondere bei immunsupprimierten Menschen) Infektionskrankheiten verursachen können. Auffällig ist, dass in der Fachliteratur Mykobakterien am häufigsten als Ursache von Pseudoinfektionen beschrieben wurden [66].

1.2 Allgemeines zur Bronchoskopie

In der Endoskopie wird zwischen flexiblen und starren Endoskopen unterschieden. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit flexiblen Bronchoskopen (s. Abbildung 1). Diese haben den Nachteil, dass sie sich schlecht reinigen und nicht thermisch sterilisieren lassen. Voll flexible Endoskope wurden 1958 erstmals von Hirschowitz vorgestellt. Dabei kamen damals schon die heute noch üblichen parallel angeordneten Glasfaserbündel zur Lichtübertragung zum Einsatz. Heute kann über moderne Endoskope nicht nur der Innenraum von Organen betrachtet werden. Es können auch Biopsien entnommen oder Operationen durchgeführt werden (Minimal invasive Chirurgie).

Dazu besitzen Bronchoskope einen Biopsie- sowie einen Luft- und einen Wasserkanal (Saug-/Spülkanal). Meistens treten Luft- und Wasserkanal am Distalende durch eine gemeinsame Öffnung aus.

Aufgrund der Fragilität und der Anfälligkeit für Beschädigungen der Bronchoskope stellt sich das Problem der ausreichenden Säuberung und Desinfektion. Die Bronchoskope können nicht, wie die meisten bei invasiven medizinischen Interventionen verwendeten Instrumente, in einem Autoklaven oder Heißluft-Sterilisator sterilisiert werden. Die bisher verbreiteten Aufbereitungsmaßnahmen (s. Kapitel 1.3) scheinen bei näherer Betrachtung in Hinblick auf die Keimfreiheit oft nicht ausreichend zu sein.

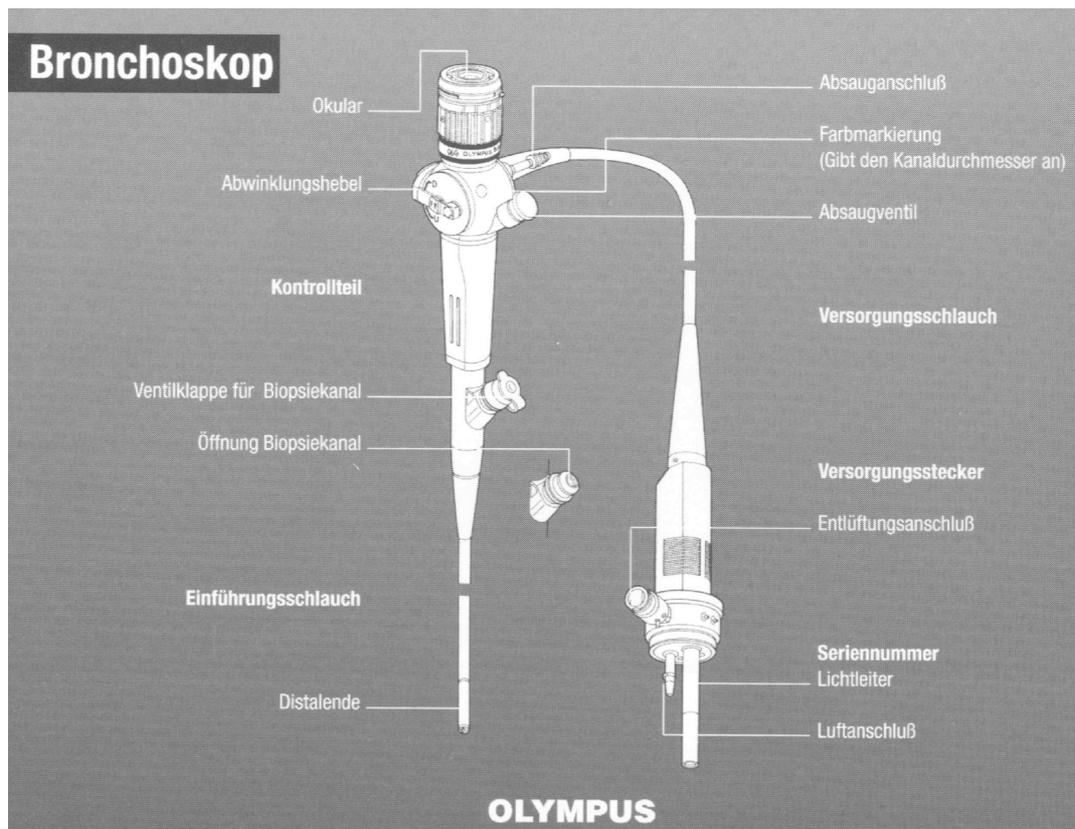


Abbildung 1 Darstellung eines Bronchoskops (Firma Olympus)

1.3 Problemstellung

Die Notwendigkeit angemessener Desinfektionsmethoden erscheint als besonders wichtig, wenn man die Gefahr von Infektionen bzw. Pseudoinfektionen betrachtet, die durch die unzureichende Desinfektion oder Sterilisation von Endoskopen ausgeht. Anlass für die vorliegende Arbeit war der zeitlich gehäufte Nachweis von *M. xenopi* im Untersuchungsmaterial von Patienten eines Krankenhauses. Auslöser war

vermutlich die Verwendung von Bronchoskopen und Probengefäßen, die zuvor durch Kontakt mit mykobakteriell kolonisiertem Leitungswasser kontaminiert worden waren. Es stellte sich die Frage, in welchen Belangen die bisher verwendeten Verfahren zur Aufbereitung von Bronchoskopen unzureichend gewesen waren.

Zu diesem Zeitpunkt wurden für die Reinigung und Aufbereitung der Bronchoskope **E**ndoskopreiniigungs- und **D**esinfektionsautomaten (ERDA) verwendet, die den letzten Spülgang mit unbehandeltem Leitungswasser durchführten. Dieses Verfahren wurde zusammen mit der manuellen Vorreinigung als ausreichende Dekontaminierung angesehen. Bis dahin verließ man sich jedoch auf die Keimfreiheit des Spülwassers der ERDAs, die durch die verwendeten Desinfektionsmittel gewährleistet werden sollte. Die alten ERDAs verwendeten jedoch für den letzten Spülgang unbehandeltes Leitungswasser ohne Zusatz von Desinfektionsmittel, das damit eine mögliche Kontaminationsquelle darstellte.

Im Rahmen meiner Untersuchungen konnte ich aus dem Wasserleitungssystem des betroffenen Krankenhauses *M. xenopi* isolieren, die möglicherweise im erwähnten letzten Spülgang der ERDAs zur Kontamination der Bronchoskope führen konnten. Seit 1994 kam es an dem Krankenhaus zu einer gehäuften Isolation von *M.-xenopi*, zumeist aus bronchoskopisch gewonnenem Patientenmaterial. Die Vermutung lag nahe, dass dies nicht mit einer tatsächlichen Infektion der Patienten, sondern mit einer Kontamination der Bronchoskope bzw. Probengefäße im Sinne einer Pseudoinfektion zusammen hing. Die falsche Interpretation des Befundes als manifeste Infektion der Patienten hatte oftmals eine langwierige, zum Teil mit Nebenwirkungen verbundene medikamentöse Therapie und eine unnötige psychische Belastung des Patienten zur Folge.

Bronchoskope sind, wie bereits in Kapitel 1.2 erwähnt, thermisch nicht sterilisierbar. So erscheint eine Modifizierung des Aufbereitungsprozesses durch Änderungen der Spültechnik als sinnvoll. Die Kontaminationsquelle war nach unserer Vermutung der letzte Spülgang der ERDAs, bei dem die Bronchoskope mit kontaminiertem Wasser in Kontakt kommen können. Diese Infektionsquelle galt es zu beseitigen.

1.3.1 Desinfektionsverfahren

Desinfektion ist ein Verfahren zur Keimreduktion. Ziel ist es, die Keimzahlen um mindestens 3-5 Logarithmenstufen (bei der Sterilisation 6 Logarithmenstufen) zu reduzieren.

Aufgrund der besonderen Problematik der Aufbereitung von flexiblen Bronchoskopen und der Notwendigkeit der Desinfektion des verwendeten Spülwassers bieten sich zwei Verfahren zur physikalischen Aufbereitung des verwendeten Spülwassers an:

1. UV-Desinfektion
2. Thermische Desinfektion

1.3.1.1 UV-Desinfektion

Bei der UV-Desinfektion wird das Wasser durch UV-Bestrahlung aufbereitet. Die für die Desinfektion verwendeten UV-Strahlen sind als unsichtbarer Bestandteil des Sonnenlichtes Teil unserer natürlichen Umgebungsstrahlung (s. Abbildung 2). Ihre Existenz wurde 1801 durch Versuche von Ritter bekannt [35]. Die emittierte UV-Strahlung, die im elektromagnetischen Wellenspektrum zwischen dem sichtbaren Licht und der hochenergetischen Röntgenstrahlung liegt, unterteilt sich in: UV-A Strahlung (315-400 nm, verursacht Hautpigmentierung), UV-B Strahlung (280-315 nm, verursacht Hauterytheme, regt die Vitamin D-Synthese an und baut Biotin ab) sowie der UV-C Strahlung (200-280 nm, wirkt mikrobizid) [36].

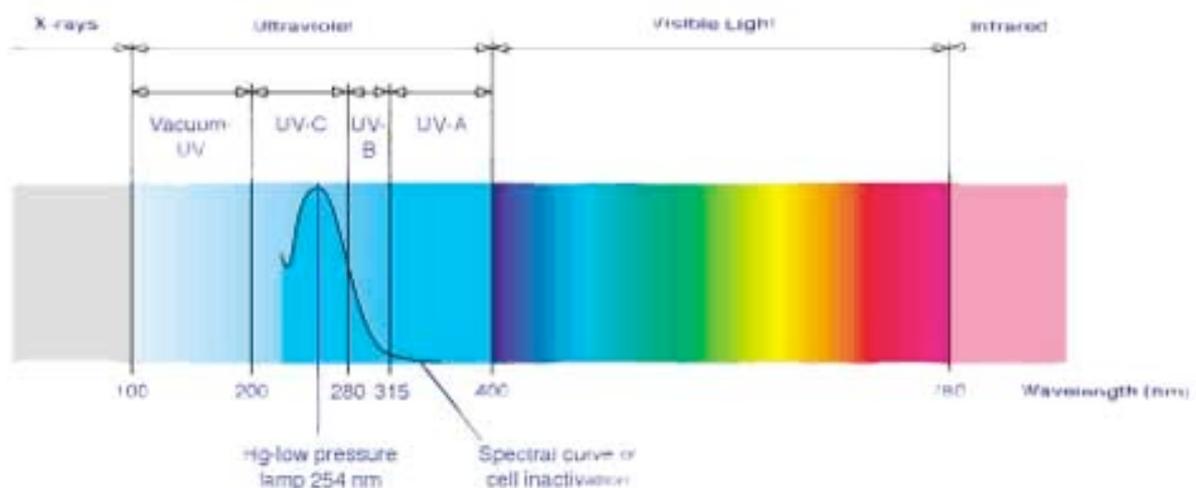


Abbildung 2 UV-Spektrum (Quelle Wedeco BV)

Die eingesetzte UV-Strahlung kann ihre desinfizierende Wirkung jedoch erst dann entfalten, wenn Verbindungen vorhanden sind, die diese Energie aufnehmen, d.h. absorbieren können. F.L. Gates hat bereits 1930 bei Strahlungsversuchen mit Streptomycceten entdeckt, dass eine maximale Wirkung (Abtötungseffekt) bei einer Wellenlänge von 254 nm (UV-C) zu erzielen ist und dass diese Wellenlänge nahezu identisch ist mit dem Absorptionsmaximum der DNA (256 nm) [26]. Im Rahmen der UV-Desinfektion stellt die DNA somit das Ziel der Bestrahlung dar. Diese Eigenschaft wird bei der UV-Desinfektion des Wassers gegenüber Mikroorganismen verwendet. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht entstehen an der DNA Fotoprodukte, wie z.B.: Dimere, Addukte oder Hydrate. Die fotoinduzierte Dimerisierung der Thyminnukleotide stellt die wichtigste Reaktion der DNA auf die UV-Bestrahlung dar. Sie führt zur Ausbildung von Thymin-Dimeren, wodurch das enzymatisch gesteuerte Ablesen des DNA-Stranges sterisch unterbunden wird (s. Abbildung 3). Diese Störung der räumlichen Struktur führt zu einem Replikations- bzw. Transkriptionsstop, damit zu einer Inaktivierung der Mikroorganismen und letztlich zum Zelltod.

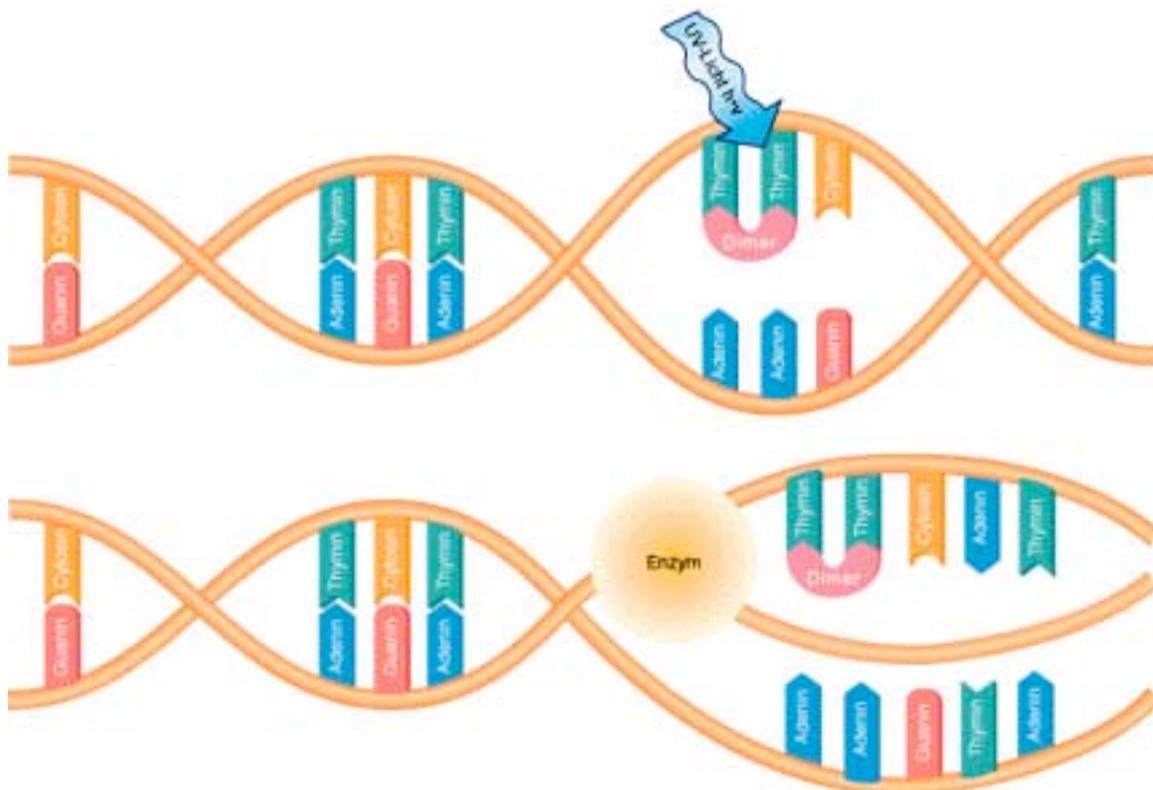


Abbildung 3 Vorgänge bei der UV-Behandlung von Bakterien (Quelle Wedeco BV)

Die zur Desinfektion erforderliche UV-Dosis kann nicht direkt gemessen, sondern nur berechnet werden. Hierfür wird das Produkt aus der Strahlungsintensität und der Einwirkzeit ermittelt [3]:

$$\text{UV-Bestrahlungsdosis } D \text{ (mJ/cm}^2\text{)} = \\ \text{Bestrahlungsstärke } E \text{ (mW/cm}^2\text{)} \times \text{Bestrahlungsdauer } t \text{ (s)}$$

Die Bestrahlungsintensität sollte groß genug sein um alle mit dem Wasser durch die UV-Bestrahlungskammer strömenden Mikroorganismen zumindest zu 99,99% abzutöten. Dieser Wert entspricht einer Reduzierung der Ausgangskonzentration um 4 Dekaden (Logarithmen-Stufen). Die notwendige Mindestbestrahlungsdosis muss garantiert werden, u.a. durch Messung und Registrierung der UV-Bestrahlungsstärke, Durchflussmengenbegrenzung, Trübungsmessung und Durchwirbelung des Wassers bei der Passage durch die UV-Bestrahlungskammer [58].

1.3.1.2 Thermische Desinfektion

Untersuchungen über die thermische Inaktivierung von *M. xenopi* haben folgende Ergebnisse erbracht: Für eine Reduktion um eine Logarithmen-Stufe sind unter Laborbedingungen mit in-vitro angezüchteten Teststämmen bei 55°C 5 Stunden 45 min, bei 60°C 33 min und bei 70°C 23 s notwendig [61].

Durch die thermische Energie werden Proteine denaturiert (Zerstörung der Tertiärstruktur der Peptidketten). Dies führt zum Verlust ihrer Konformation und damit zum Aktivitätsverlust der Proteine. In den meisten Fällen präzipitieren denaturierte Proteine, das heißt, die Moleküle verklumpen und werden unlöslich, weil nun zwischen hydrophoben Gruppen, die zuvor im Inneren der Moleküle verborgen waren, Anziehungskräfte wirksam werden [41]. Durch den Verlust seiner Gestalt wird ein denaturiertes Protein biologisch inaktiv, wodurch überlebenswichtige Stoffwechselforgänge, wie z.B. die Glykolyse nicht mehr ablaufen können, die Bakterien sterben ab [13].

Die thermische Aufbereitung des letzten Spülwassers erfolgt bei dem ERDA Innova „2000“ der Firma BHT durch Erhitzen des Wassers auf 93°C für 5 min. Danach muss das Wasser wieder abgekühlt werden um Beschädigungen an den Bronchoskopen während des letzten Spülgangs zu vermeiden. Flexible Endoskope, wie sie in der Bronchoskopie verwendet werden, sollten mit höchstens 60°C warmem Wasser in Kontakt kommen (Angaben der Firma Olympus).

1.4 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit sollte folgende Sachverhalt erläutern:

- Die deskriptive Charakterisierung des gehäuften Nachweises von *M. xenopi* sollte durch rückwirkende Auswertung der Befunde des Institutes für Medizinische Mikrobiologie des UKD (Universitätsklinikum Düsseldorf) im Zeitraum von 1990 bis 2000 erfolgen.
- Das gehäufte Vorkommen von Mykobakterien seit 1994 in bronchoskopisch gewonnenem Material in einem bestimmten Krankenhaus in Düsseldorf sollte als eine Epidemie oder als eine Pseudoepidemie charakterisiert werden. Dazu sollten Patientendaten aus den Archiven des Krankenhauses ausgewertet werden, um zurückzuverfolgen, um welches Patientengut es sich handelte, ob Zeichen einer manifesten Infektion vorlagen und ob eine Behandlung aufgrund des positiven Befundes durchgeführt wurde.
- Die Patientenisolate sollten auf ihre mögliche Herkunft aus dem Warmwasserleitungssystem des betroffenen Krankenhauses untersucht werden. Dazu wurden die Wasser- und Patientenisolate (zum Vergleich auch Patientenisolate eines anderen Krankenhauses) mit Hilfe eines geeigneten molekularbiologischen Typisierungsverfahren verglichen, um im Falle der klonalen Übereinstimmung den Verdacht auf das Vorliegen einer Pseudoepidemie zu erhärten.

- Die Vermutung, dass die Kontaminationsquelle der letzte Spülgang der ERDAs ist, bei dem die Bronchoskope mit kontaminiertem Wasser in Kontakt kommen können und somit das Probenmaterial kontaminieren, bzw., dass es zu einer Kontamination des Probenmaterials durch Leitungswasser kommt, sollte belegt oder abgelehnt werden. Im Falle der Bestätigung dieser Vermutung sollte ein Lösungsvorschlag zur Beendigung der Pseudoepidemie unternommen werden.
- Ein Versuch zur Beendigung der Epidemie/Pseudoepidemie war die Aufstellung neuer ERDAs, die das letzte Spülwasser mit unterschiedlichen Verfahren (thermisch bzw. UV-Desinfektion) aufbereiteten. Dazu sollte ab dem Zeitpunkt der Aufstellung der neuen ERDAs in der Endoskopieabteilung des Krankenhauses (Februar 2000) während der 6-monatigen Testphase jedes bronchoskopisch gewonnene Material vom Institut für Medizinische Mikrobiologie des UKD auf das Vorkommen von Mykobakterien untersucht werden. Gleichzeitig wurde die Dokumentation (s. Kapitel 2.4.3) durchgeführt, anhand derer wir sowohl die Seriennummer des benutzten Bronchoskops als auch die vorher durchgeführte Desinfektion in einem bestimmten ERDA zurückverfolgen konnten. Zusätzlich zur Überprüfung des Patientenmaterials sollte durch die wöchentlich entnommenen Wasserproben aus den beiden ERDAs und die wöchentliche Überprüfung der mit unterschiedlichen Verfahren aufbereiteten Bronchoskope die Effektivität der zwei verschiedenen Aufbereitungsverfahren hinsichtlich ihrer Keimreduktion, insbesondere für Mykobakterien überprüft und verglichen werden.
- Die Effektivität der thermischen Desinfektion im Innova 2000 der Firma BHT sollte durch Belastung mit definierten *M.-xenopi*-Suspensionen in sehr hohen Konzentrationen überprüft werden. Dies sollte in einem Laborversuch nach Abschluß der 6-monatigen klinischen Testphase untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Charakterisierung des zeitlichen Verlaufs des gehäuften Nachweises von *M. xenopi*

Seit 1994 war eine stark zunehmende Zahl an Mykobakterien-Isolaten aus Patientenmaterialien aufgefallen. Dabei handelte es sich größtenteils um Proben, die aus dem Respirationstrakt der Patienten gewonnen wurden (s. Kapitel 3.2). Bei Durchsicht der Patientenakten des Tbc-Labors des Institutes für Medizinische Mikrobiologie des UKD konnte ich im Zeitraum von 1991-1993 kaum positive *M.-xenopi*-Isolate (6 Isolate) finden, während es im Zeitraum von 1994-2000 zu einer deutlichen Zunahme mit insgesamt 220 positiven Proben kam. Der Verdacht auf das Vorliegen einer Pseudoepidemie wurde verstärkt durch die Tatsache, dass es sich meist um Einfach-Isolationen von Patienten ohne klinische Anzeichen einer Infektion handelte.

2.2 Design und Ablauf der Studie

Um die seit 1994 in dem untersuchten Krankenhaus zu beobachtende Zunahme der *M.-xenopi*-Isolate aus respiratorisch gewonnenen Proben im Zusammenhang mit Epidemien bzw. Pseudoepidemien zu charakterisieren, führten wir folgende Untersuchungen durch:

Ab dem Zeitpunkt der Aufstellung von zwei neuen ERDAs (ERDA ETD 2 Plus der Firma Olympus und ERDA Innova 2000 der Firma BHT) mit neuen Wasseraufbereitungsverfahren in der Endoskopieabteilung des Krankenhauses führten wir verschiedene Probeentnahmen durch. Während der sechs Monate dauernden Phase untersuchten wir in wöchentlichem Turnus die Wasserleitungssysteme des Krankenhauses. Insgesamt entnahmen wir 50 Wasserproben an Standorten der beiden neu installierten ERDAs. Zusätzlich wurden in wöchentlichem Abstand jeweils zwei verschiedene Bronchoskope (Saug-/Spülkanal sowie Biopsiekanal) in wöchentlichem Wechsel untersucht (s. Kapitel 2.5.1). Insgesamt wurden 100 Bronchoskop-Proben gewonnen. Zeitgleich wurden zusätzlich alle bronchoskopisch gewonnenen Patientenproben unabhängig von der

klinischen Fragestellung im Tbc-Labor des Institutes für Medizinische Mikrobiologie des UKD auf das Vorkommen von *M. xenopi* untersucht. Anhand der Dokumentation konnte genau zurückverfolgt werden, welches Bronchoskop zu welcher Untersuchung benutzt wurde und in welchem ERDA zuvor die Aufbereitung durchgeführt wurde.

Anschließend folgte die Identifizierung, Differenzierung und Typisierung der Umwelt- und Patientenproben (vor Aufstellung der neuen ERDAs gewonnene Patientenproben aus dem betroffenen Krankenhaus). Die Vermutung über die Herkunft der *M. xenopi*-Patientenisolate aus dem Warmwasserleitungssystem des betroffenen Krankenhauses sollte durch den genotypischen Vergleich der Umwelt- und Patientenisolate durch den Nachweis einer klonalen Verwandtschaft erhärtet werden.

Nach Abschluß der 6-monatigen Testphase sollte die Effektivität des thermischen Wasserdesinfektionsverfahrens zur Elimination sehr hoher Mykobakterienkonzentrationen im Laborversuch getestet werden. Dazu wurde ERDA Innova 2000 im Institut für Hygiene des UKD aufgestellt und entsprechend modifiziert (s. Kapitel 2.7).

2.3 Beschreibung der neu installierten ERDAs

Anfang Februar 2000 wurden in der Endoskopieabteilung des betroffenen Krankenhauses für eine Testphase von sechs Monaten zwei neue ERDAs installiert, der ERDA ETD 2 Plus der Firma Olympus und der ERDA Innova 2000 der Firma BHT. Im Unterschied zu den bisher benutzten Reinigungsautomaten, die mit nicht aufbereitetem Spülwasser arbeiteten, werden bei diesen neuen ERDAs die Bronchoskope im letzten Spülgang mit aufbereitetem (thermisch- oder UV-behandeltem) Wasser gespült.

2.3.1 Technische Beschreibung

Anlehnend an die bereits beschriebene Problematik der unzureichenden Desinfizierung bzw. der Kontaminierung der Bronchoskope durch Mykobakterien aus dem Leitungswasser, wird in diesen Spülautomaten das Leitungswasser für den letzten Spülgang aufbereitet.

In Automat 1 (Olympus) wird das Spülwasser durch UV-Strahlung aufbereitet, während in Automat 2 (BHT) das Spülwasser durch thermische Vorgänge aufbereitet wird.

Die Automaten standen in zwei verschiedenen Räumen und waren an zwei verschiedenen Wasseranschlüssen angeschlossen.

2.3.1.1 Technische Beschreibung des ERDA Olympus ETD 2 Plus

Der in dieser Testphase verwendete Endo-Thermo-Desinfektor ETD 2 Plus ist eine Endoskopaufbereitungsmaschine zur vollautomatischen Reinigung und Desinfektion von allen wasserdichten, flexiblen Endoskopen OES und EVIS (Firma Olympus), aber auch von starren Olympus-Endoskopen. Nach Aussagen der Firma Olympus ist die schadensfreie Reinigung nur für Geräte der Firma Olympus garantiert. Der ETD 2 Plus verfügt über einen vollautomatischen Dichtigkeitstester.

Die Aufbereitung des Spülwassers erfolgt durch Desinfektion mittels einer im Gerät eingebauten UV-Entkeimungsanlage der Fa. Katadyn Typ LR 8/2 (Produktbeschreibung Olympus). Als UV-Strahlungsquelle für technische Nutzung kommen fast ausschließlich Gasentladungsstrahler zur Anwendung. Die aus UV-durchlässigem Quarzglas gefertigten UV-Strahler enthalten ein Gas- bzw. Dampfgemisch, das im angeregten Zustand ein vorwiegend aus einzelnen Linien bestehendes Spektrum emittiert. Zur Erzeugung intensiver UV-C-Strahlung haben sich vor allem Quecksilberdampf (Hg)-Strahler bewährt. Man unterscheidet zwischen Niederdruck- und Hochdruckstrahlern, die beide im Bereich von 240-280nm emittieren, aber unterschiedliche relative Bestrahlungsstärken der verschiedenen UV-Linien haben. Welcher Art der UV-Strahler im untersuchten ERDA ist, ließ sich leider nicht ermitteln. Die durch die Wellenlänge 185 nm in Gegenwart von Sauerstoff hervorgerufene Ozonbildung ist in der Regel unerwünscht, deshalb werden die UV-

Strahler aus einem dotierten („ozonfreien“) Quarzglas gefertigt, das die Emission von Strahlung unter 200 nm verhindert. Die UV-Lampen im ERDA haben eine Lebensdauer von etwa 4000 Betriebsstunden. Nach Ablauf der Lebensdauer erscheint ein Warnhinweis im Display des Spülautomaten. Zur Gewährleistung der Hygiene gibt es an der Maschine ein Programm zur Hygieneuntersuchung. Das Programm HYG-Test liefert die Grundvoraussetzung, damit eine Untersuchung an Prüfkörpern und am Spülwasser durchgeführt werden kann. Es stellt keine selbstständige Hygieneprüfung dar.

2.3.1.2 Technische Beschreibung des ERDA BHT Innova 2000

Auch bei der BHT Innova 2000 handelt es sich um eine Maschine zur Aufbereitung (Reinigung und Desinfektion) von Endoskopen. Sie ist für alle Endoskope geeignet. Zu diesem Zweck werden entsprechende Adapter geliefert. Auch bei der BHT-Maschine wird eine automatische Dichtigkeitsprüfung mit 0,25 bar Überdruck durchgeführt. Die Dichtigkeitsprüfung erstreckt sich über die gesamte Spüldauer. Dadurch sind auch Undichtheiten nachweisbar, die erst während des Spülens entstehen. Vorhandene Undichtigkeiten, die zu einem Druckabfall in der Prüfluft führen, werden mittels einer hochsensiblen Drucksteuerung erkannt und auf dem Anzeigendisplay der Maschine angezeigt.

Die BHT ist mit einer Umwälzpumpe ausgerüstet, die zwei unabhängige Waschsyste me speist. Diese beiden Reinigungssysteme, die rotierende Breitstrahldüsen für die Außenreinigung sowie die speziellen Hohlleitereinsatzkörbe für die Innenreinigung der Endoskope ermöglichen in Kombination mit mehrfachem Austauschen des gesamten Tankinhaltes und der Pumpenentleerung bei Wasserwechsel die Grundlage für höchste Reinheit bei relativ niedrigem Wasserverbrauch (aus der Produktbeschreibung BHT).

Die Keimfreiheit des Spülwassers (vor allem für den letzten Spülgang) wird bei der BHT ebenfalls über eine physikalische Aufbereitung des Wassers gewährleistet. Die Aufbereitung des Wassers erfolgt hier jedoch rein thermisch durch Erhitzen des Wassers auf 93°C über eine Dauer von 5 Minuten. Das geschieht zu Beginn der gesamten Spülzeit, damit das Wasser noch genügend Zeit hat abzukühlen. Um

Schäden an den Bronchoskopen zu vermeiden, beträgt die Wassertemperatur bei Kontakt mit den Bronchoskopen in dem Spülautomaten nie mehr als 53°C.

2.3.2 Ablauf der Bronchoskop-Aufbereitung in den ERDAs

Nach Beendigung einer bronchoskopischen Untersuchung wird das Bronchoskop mit einem Tuch von außen grob gereinigt (s. Abbildung 4). Das Luft- / Wasserventil wird entfernt. Das Luft- / Wasserreinigungsventil wird aufgesetzt und abwechselnd Luft und Wasser durch die Kanäle gespült. Die Reinigung der Absaugkanäle erfolgt durch abwechselndes Ansaugen von Luft und Wasser. Bei groben Verschmutzungen sollte von einer Kanalreinigungsbürste Gebrauch gemacht werden. Anschließend wird das Bronchoskop in den ERDA eingelegt (s. Abbildung 5). Zwischen dem Vorreinigen und dem Einlegen der Bronchoskope in die ERDAs sollten lange Antrocknungszeiten vermieden werden. Als Reinigungs- und Desinfektionsdetergenzien wurden für beide ERDAs die gleichen Produkte verwendet:

ETD-Cleaner, Art.-Nr. : 28853,

ETD-Disinfectant, Art.-Nr.: 28852,

jeweils als 5 L-Gebinde mit 4 L Inhalt. Beide Produkte der Fa. Olympus Optical Co. GmbH, Hersteller Fa. Henkel Ecolab

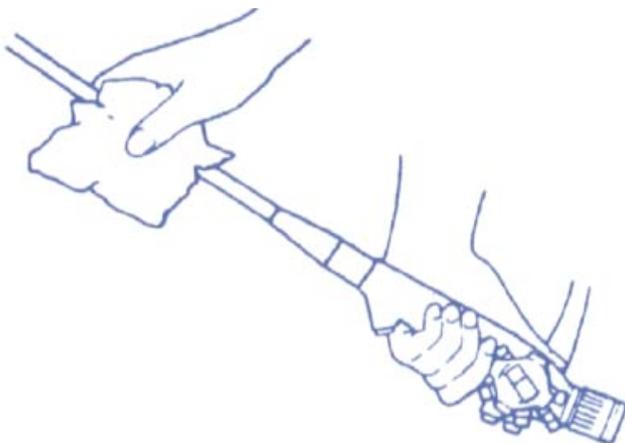


Abbildung 4 Halten des Endoskops bei der Außenreinigung (Firma Olympus)

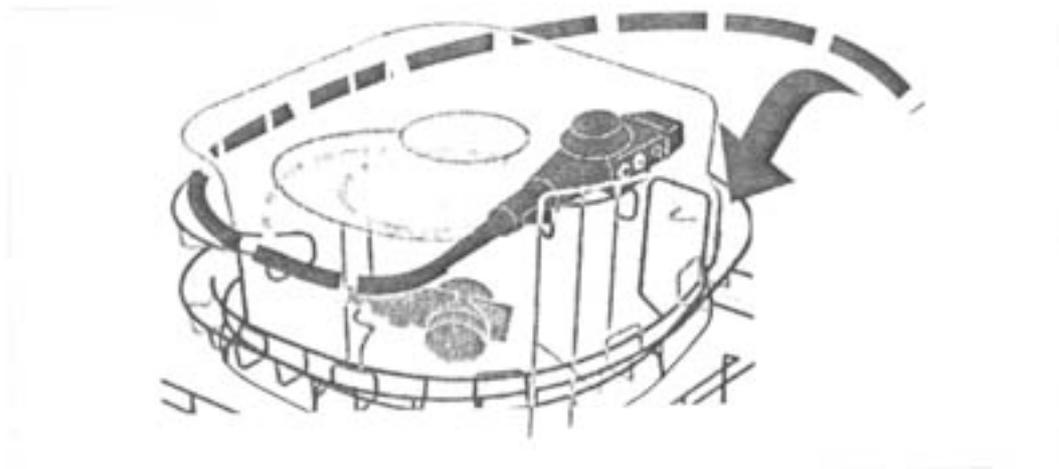


Abbildung 5 Einlegen eines Bronchoskops in den Spülkorb des ERDA (Firma Olympus)

2.3.2.1 Ablauf der Bronchoskop-Aufbereitung im Olympus ETD 2 Plus

Nach der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen manuellen Vorreinigung wird das Endoskop in dem dafür vorgesehenen Spülkorb gegeben. Kleinteile, wie Ventile werden in den Kleinteilekorb gelegt. Dann wird ein Schlauchset angeschlossen. An den Saug-/Spülkanal wird der Spülanschluss und an den Biopsiekanal der Verbindungsschlauch angebracht. Das Endoskop wird zusätzlich an die Dichtigkeitstester angeschlossen und das entsprechende Programm gestartet. Zunächst wird das eingelegte Endoskop auf Dichtigkeit geprüft. Anschließend werden in einem Vorreinigungsabschnitt (nur bei Programm Standard plus) und Reinigungsabschnitt alle Oberflächen und Kanäle gereinigt. Anschließend folgt der Desinfektionsabschnitt. Es folgen zwei Spülgänge und ein abschließender Trockengang, der wahlweise entweder ganz trocknet oder nur antrocknet.

Das Gerät kann zwei Endoskope gleichzeitig reinigen. Für diesen Zweck können zwei Spülkörbe jeweils für ein Endoskop in der Maschine übereinander in den ERDA eingebracht werden. Der gravierende Unterschied zwischen den beiden ERDAs besteht in der Aufbereitung des Spülwassers, dem keine Detergenzien mehr zugefügt werden, folglich die Keimarmut einen besonders hohen Stellenwert einnimmt. Dies wird im ETD 2 Plus durch die UV-Behandlung des Spülwassers erreicht (s. Abbildung 6).

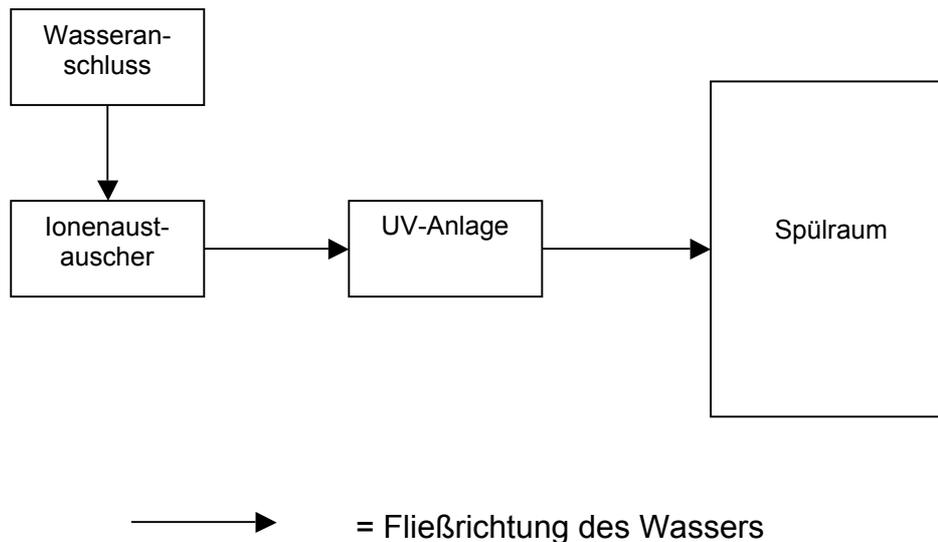


Abbildung 6 Fließschema der ETD 2 plus von Olympus (Firma Olympus)

2.3.2.2 Ablauf der Bronchoskop-Aufbereitung im BHT Innova 2000

Nach der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen manuellen Vorreinigung wird das Endoskop in den dafür vorgesehenen Spülkorb eingelegt, wie in Kapitel 2.3.2.1 beschrieben an die entsprechenden Spülschläuche angeschlossen und das gewünschte Programm gestartet. Auch im Innova 2000 erfolgt zunächst ein Dichtigkeitstest. Ist dieser abgeschlossen werden wie im ETD 2 Plus (s. Kapitel 2.3.2.1) Vor-/Reinigungs-Programmabschnitte, Desinfektions- und zweifacher Spülabschnitt mit abschließender Trocknung durchlaufen. Das Spülwasser wird im Innova 2000 durch eine thermische Behandlung aufbereitet (s. Abbildung 7).

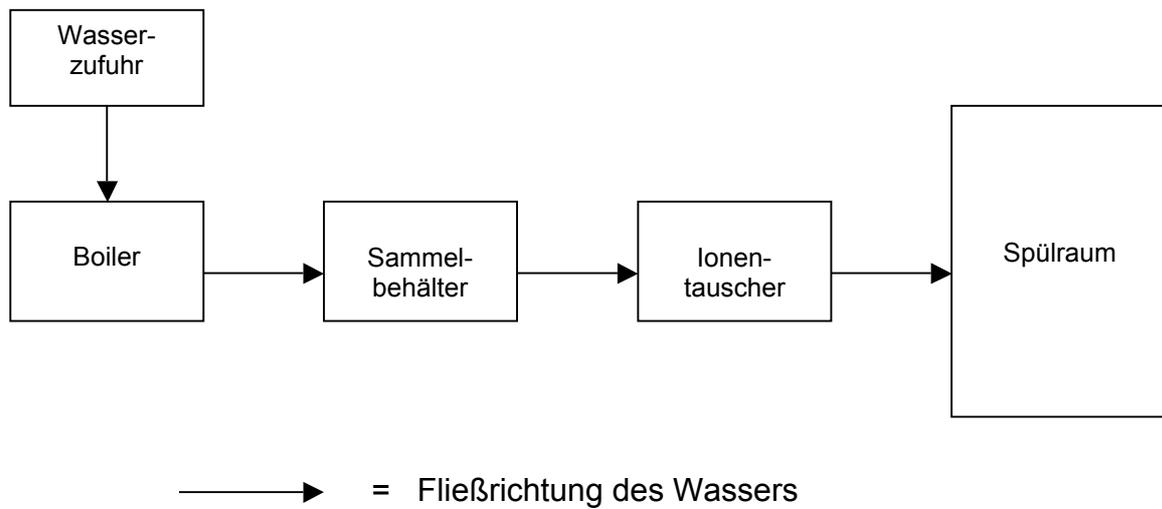


Abbildung 7 Fließschema der Innova 2000 von BHT (Firma BHT)

Tabelle 1 Programmablaufschemata des Innova 2000:

Zeit (min)	Programmphase	Erklärung
5-12	Dichtigkeitsprüfung (5min), Boilervorbereitung (3-12min), Entleeren	Einmalig bei Inbetriebnahme Aufheizen des Boilers auf 93°C
Vorwäsche	(Option)	
3	Vorwaschen	Wassereinlauf ca. 38°C; ca. 1min, Spülen ca. 2 min
1	Entleeren und Dichtigkeitstest	
Standard-Programm		
12	Reinigen	Wassereinlauf ca. 38°C, 1 min, Aufheizen auf 53°C, 6min; Reiniger 0,5%, 5 min
1	Entleeren und Dichtigkeitstest	
6	Desinfektion (chemisch)	Wassereinlauf aus Kühlwasserboiler, ca. 53°C, 1 min; Desinf.-Mittel 1%, 5 min
1	Entleeren und Dichtigkeitstest	
5	Schlußspülen	Wassereinlauf ca. 53°C, 1 min, VE-Wasser, Schlußspülung 4 min
1	Entleeren und Dichtigkeitstest	
Zusatztrocknen	(Option)	
10	Zusatztrocknen	Trocknen mit sterilgefilterter Luft, 53°C, 10 min
3	Abkühlen/Programmende	

Gesamtzeit Standardprogramm 34 min.

2.4 Mikrobiologisch-diagnostische Erfolgskontrolle (Patienten-Monitoring)

Während der 6-monatigen Testphase wurde das Patientenprobenmaterial (z.B. bronchoalveoläre Lavage, Trachealsekret) möglichst aller im Untersuchungszeitraum bronchoskopierten Patienten des untersuchten Krankenhauses in das Tbc-Labor (Institut für Medizinische Mikrobiologie des UKD) eingeschickt. Auf den Begleitschein für das Tbc-Labor wurden neben den üblichen Angaben auch die Seriennummern des Bronchoskops notiert, um gegebenenfalls das bei der Untersuchung verwendete Bronchoskop und die durchgeführte Aufbereitung in einem der ERDAs zu identifizieren.

2.4.1 Probenentnahme

Alle im 6-monatigen Untersuchungszeitraum in diesem Krankenhaus bronchoskopisch entnommenen Patientenmaterialien (BAL, Trachealsekret) wurden zusätzlich zu den klinisch indizierten Untersuchungen zur Analyse in das Tbc-Labor gesandt. Dort wurden die Proben auf das Vorkommen von Mykobakterien untersucht. Die Bronchoskopien wurden hauptsächlich in der Endoskopie-Abteilung des Krankenhauses und auf der im Hause befindlichen Intensivstation von den dort beschäftigten Ärzten durchgeführt. Alle in diesem Krankenhaus benutzten Bronchoskope wurden in der Endoskopie-Abteilung in einem der zwei ERDAs aufbereitet.

2.4.2 Probenverarbeitung im Institut für Medizinische Mikrobiologie

Alle Einsendungen von Patienten-Material (Sputum, Trachealsekret, Bronchealsekret, BAL, Magennüchternsekret etc.) zum Mykobakteriennachweis wurden nach Standardverfahren bearbeitet. Zunächst fand eine Probenvorbehandlung mit der N-Acetyl-L-Cystein-NaOH-Methode statt. Flüssige Proben mit einem Volumen von über 10 ml wurden durch Zentrifugation (20 min oder 60 min abhängig von der Menge) angereichert. Dann folgte die Homogenisierung

durch N-Acetyl-L-Cystein, das mukolytisch wirksam ist und die Dekontamination durch NaOH.

Von dem zentrifugierten Material wurden Ausstriche angefertigt, die nach Ziehl-Neelsen-Färbung mikroskopisch auf säurefeste Stäbchen überprüft werden. Die mikroskopischen Untersuchungen haben den Vorteil des geringen technischen und methodischen Aufwandes und der schnellen Verfügbarkeit des Ergebnisses. Allerdings ist die geringere Spezifität und Sensitivität ein Nachteil. Erst bei einer Zellkonzentration von mehr als 10^4 /ml kann mit einem positiven Ergebnis gerechnet werden. Deshalb werden diese Untersuchungen durch einen kulturellen und biochemischen Nachweis ergänzt.

Zum kulturellen Nachweis wurden MYCO/FLYTIC-Fläschchen (Flüssigmedium) mit dem vorbehandelten Patientenmaterial beimpft und in einem BACTEC 9050-Inkubationsschrank kultiviert. Dort wurden die Proben 42 Tage inkubiert, dabei alle 60 min automatisch auf Wachstum überprüft. Zusätzlich wurden mit den Proben drei verschiedene Nährböden beimpft. Nach Möglichkeit sollten zwei feste Kulturmedien (Löwenstein-Jensen, Stonebrink) und ein flüssiges Kulturmedium (MGIT-Röhrchen) verwendet werden. Diese Kombination von Nährmedien führt zu einer deutlichen Erhöhung der Positivrate und einer Verkürzung der Nachweiszeit. Die festen, sowie die flüssigen Kulturen wurden 56 Tage bei 37°C bebrütet (bei mikroskopisch positiven Proben und bis zu diesem Zeitpunkt kulturell fehlendem Wachstum wird die Bebrütungszeit verlängert). Die Festmedien wurden in wöchentlichen Abständen auf Wachstum kontrolliert, im BACTEC 9050 geschieht dies automatisch alle 60 min. Für Kulturen die nach 56 Tagen kein Wachstum zeigten, lautet der Befund: Kulturell keine Mykobakterien nachgewiesen.

Zusätzlich wird eine physiologische Differenzierung anhand der Wachstumsgeschwindigkeit (schnell oder langsam wachsend), der Wachstumstemperatur, Koloniemorphologie, Pigmentbildung (fotochromogen, skotochromogen, nicht fotochromogen) durchgeführt, die zusammen mit den Ergebnissen der biochemischen Differenzierung anhand einer Referenztabelle einen Hinweis auf die vorliegende Spezies gibt.

Bei der biochemischen Differenzierung werden die Fähigkeit zur Cordbildung, das Kletterphänomen (O_2 -Bedarf), die Fähigkeit zur Nitratreduktion, Niacinbildung

(Anwesenheit von Nicotinamidase), Katalase-Aktivität, Anwesenheit thermostabiler (68°C) Katalase, Tween-80-Hydrolyse, Anwesenheit von Arylsulfatase und saurer Phosphatase untersucht (Referenztablelle siehe Anhang 1).

2.4.3 Dokumentation

Um die Zuordnung der Bronchoskope zu den einzelnen Untersuchungen und den ERDAs, in dem die Desinfektion zuvor durchgeführt wurde zurückverfolgen zu können wurden von mir vorgefertigte Formulare in der Endoskopie-Abteilung benutzt, auf denen zusätzlich zu den Patientendaten und Untersuchungsdaten die Seriennummer des benutzten Bronchoskops eingetragen wurden. Dieses Formular wurde mit den üblicherweise benutzten Einsendescheinen in das Tbc-Labor gegeben, sodass die Zugehörigkeit zu der Studie für die Mitarbeiter des Tbc-Labors ersichtlich war (ein Beispielexemplar ist in Anhang 2 zu sehen).

Auf der Intensivstation wurden Dokumentationsbögen ausgelegt, auf denen Patientennamen, Untersuchungsdatum und Seriennummer des benutzten Bronchoskops vermerkt wurden. Diese Bögen sammelten wir wöchentlich ein (ein Beispielexemplar ist in Anhang 3 zu sehen).

2.5 Mikrobiologisch-hygienische Erfolgskontrolle (Umwelt-Monitoring)

Die Umweltprobenentnahmen fanden nach Absprache mit der ärztlichen und pflegerischen Leitung der Endoskopie-Abteilung des Krankenhauses in wöchentlichen Abständen am späten Nachmittag, nach Ablauf des Großteils der Patientenuntersuchungen, statt. Die Probeentnahmen wurden von einer der Hygiene-Fachkräfte zusammen mit mir vorgenommen.

2.5.1 Probenentnahme

Während der 6-monatigen Testphase von Februar bis August 2000 entnahmen wir in der Endoskopie-Abteilung des Krankenhauses im wöchentlichen Rhythmus folgende Proben:

1. Standort A: 200 ml Leitungswasser (Mischwasser aus Mischbatterie) unmittelbar vor Zulauf zu Automat BHT (Innova 2000 von BHT).
2. 200 ml Spülwasser aus letzten Spülgang Automat BHT.
3. Standort B: 200 ml Leitungswasser (Mischwasser aus Mischbatterie) unmittelbar vor Zulauf zu Automat ETD (ETD 2 plus von Olympus).
4. 200 ml Spülwasser aus dem letzten Spülgang des Automaten ETD 2 plus.
5. 20 ml steriles Wasser durch den Biopsiekanal gespritzt (zusätzlich mit Schwämmchen durchgeputzt) eines Bronchoskopes (wöchentlicher Wechsel).
6. 20 ml steriles Wasser durch den Biopsiekanal gespritzt (zusätzlich mit Schwämmchen durchgeputzt) eines Bronchoskopes (wöchentlicher Wechsel).
7. 20 ml aus Saug-/Spülkanal, eines Bronchoskopes (wöchentlicher Wechsel).
8. 20 ml aus Saug-/Spülkanal, eines Bronchoskopes (wöchentlicher Wechsel).

2.5.1.1 Wasserproben

Die Entnahme der Wasserproben aus dem Warmwasserleitungssystem des Krankenhauses erfolgte durch eine Unterbrechung des Wasserzulaufs kurz vor den Automaten, um die erforderliche Menge des Leitungswassers zu entnehmen.

Für die Entnahme der Wasserproben aus dem letzten Spülgang der Automaten war folgendes Vorgehen notwendig:

1. Der ETD 2 plus hat ein spezielles „Hygienetestprogramm“. In diesem Programm unterbricht der Automat während des letzten Spülganges und gibt die Türöffnung frei, so dass wir die erforderliche Wassermenge (200 ml) mit einer sterilen Spritze aus dem Pumpensumpf gewinnen und in ein steriles Glasgefäß überführen konnten.
2. Bei dem Innova 2000 konnten wir ohne besondere Programmvorwahl den letzten Spülgang unterbrechen und die erforderliche Wassermenge (200 ml)

mit einer sterilen Spritze aus dem Pumpensumpf gewinnen und in ein steriles Glasgefäß überführen.

2.5.1.2 Bronchoskop-Proben

Untersuchte Bronchoskope:

BF-1 T 30 (Serien Nr. 2401742)

BF-1 T 30 (Serien Nr. 2704054)

BF-1 T 30 (Serien Nr. 2301542)

BF-1 P 30 (Serien Nr. 2301334)

BF-1 T 20 (Serien Nr. 2820009)

BF-1 XT 20 (Serien Nr. 2900147)

Für die Gewinnung der Spülproben aus den Bronchoskopen wurden im Wechsel wöchentlich jeweils zwei Bronchoskope untersucht. Dazu wurde jeweils 20 ml steriles Wasser durch Saug-/Spülkanal und den Biopsiekanal gespritzt und in einem sterilen Gefäß aufgefangen. Der Biopsiekanal wurde zusätzlich mit Hilfe einer sterilen Biopsiezange mit einem sterilen Schwämmchen ausgeputzt, das Schwämmchen danach in das zuvor gefüllte Probengefäß (ein steriles, verschließbares Glasgefäß) gegeben.

2.5.2 Probenverarbeitung

Die wie oben beschrieben gewonnenen Wasser- und Bronchoskop-Proben wurden am gleichen Tag weiter verarbeitet. Zunächst wurden die Proben dekontaminiert, anschließend angereichert und in ein Kulturmedium eingebracht.

Da in der Literatur verschiedene Verfahren zur Dekontamination von Wasserproben beschrieben sind und es bislang keine vergleichenden Studien über den Einfluss des Dekontaminationsverfahrens auf den Nachweis von *M. xenopi* gibt, führte ich parallel zwei verschiedene Dekontaminationsverfahren durch.

2.5.2.1 Dekontamination

Wie bereits erwähnt, wachsen einige Mykobakterienspezies extrem langsam. Deswegen muss eine Mykobakterienkultur durch die Probendekontamination vor Überwucherung durch schneller wachsende Bakterien (vor allem grampositive Sporenbildner) und Schimmelpilzen geschützt werden. Von mir wurden die zwei folgenden Dekontaminationsverfahren parallel verwendet und verglichen:

Dekontamination mit Cetylpyridiniumchlorid (CPC):

CPC ist ein kationisches Tensid und gehört zu den quaternären Ammoniumverbindungen, welche in höheren Konzentrationen eine Denaturierung von Proteinen und Enzymen und in niedrigeren Konzentrationen eine Schädigung der Zellmembran mit nachfolgender Zellyse bewirken können [32]. Von Du Moulin und Stottmeyer, 1978 [21] sowie von Schulze-Röbbecke et al., 1991 [60] wird Cetylpyridiniumchlorid wegen seiner Effizienz und seiner geringen Toxizität für den Menschen zur Dekontamination von Wasserproben empfohlen.

Durchführung: Das Wasservolumen wurde in ein steriles Glasgefäß mit Schraubverschluss gegeben. (Bei Wasserproben betrug das Volumen je Ansatz stets 100 ml, bei den Bronchoskop-Proben wurden jeweils 10 ml (inklusive der durch den Biopsiekanal der Bronchoskope gezogenen Schwämmchen) mit sterilem Wasser auf 100 ml Endvolumen aufgefüllt. Anschließend wurde unter sterilen Bedingungen CPC-Stammlösung (CPC-Pulver Merck, Darmstadt, Kat. Nr. 59116) entsprechend der gewünschten Endkonzentration von 0,01% zugegeben. Das verschlossene Gefäß wurde dann 15 s lang geschüttelt, anschließend stehen gelassen und nach einer Einwirkzeit von 30 min membranfiltriert (s. Kapitel 2.5.2.2).

Dekontamination mit KCl/HCl-Puffer („Legionellenpuffer“):

Dieser Puffer wird häufig zur Inaktivierung der Begleitflora bei der Isolierung von Legionellen aus Wasserproben verwendet und wurde hier zum kulturellen Nachweis von Mykobakterien eingesetzt.

Herstellung des Puffers:

- 0,2 molare HCl.....1 Teil
- 0,2 molare KCl18 Teile

Durchführung bei Wasserproben: Wie bei der Dekontamination mit CPC beschrieben, wurde das jeweils zu untersuchende Probenvolumen auf 100 ml aufgefüllt, in ein steriles Glasgefäß mit Schraubverschluss gefüllt und membranfiltriert. Danach wurden 100 ml HCl/KCl-Puffer unter sterilen Bedingungen auf den Filter gegeben und nach einer Einwirkzeit von 5 min durch den Filter abgesaugt. Anschließend wurde der Filter mit 100 ml sterilem Wasser nachgespült, um dann mit einer sterilen Pinzette auf/in das entsprechende Medium gelegt zu werden.

2.5.2.2 Anreicherung (Filtration)

Für die Anreicherung der Wasserproben durch eine Filtration wurden die Proben zunächst dekontaminiert. Nach der Dekontamination wurden die Proben durch sterile Celluloseacetat-Membranfilter filtriert (Durchmesser 50 mm, Porengröße 0,45 µm Sartorius AG, Göttingen, Kat. Nr. 11306-50-ACN). Die Nachspülung erfolgte mit 100 ml sterilem Wasser um Dekontaminationsmittelreste zu entfernen.

2.5.2.3 Inkubation

Die Celluloseacetat-Membranfilter wurden nach der Anreicherung und Nachspülung mit einer sterilen Pinzette in ein Glasröhrchen mit Kirchner-Bouillon überführt, das Röhrchen mit einem Plastikdeckel leicht verschlossen und bei 42°C für 16 Wochen inkubiert.

Kirchner-Bouillon, mod., in Glasröhrchen mit Plastikdeckel:

Charakteristische Bestandteile nach Angaben des Herstellers in ca. 1Liter:

Stammlösung	900,0 ml
Ribonukleinsäurelösung	2,5 ml
Pferdeserum	100,0 ml

Diese Medium wurde gebrauchsfertig von der Fa. BAG- Biologische Analysensystem GmbH, 35423 Lich (Best.-Nr.: 2011) bezogen.

2.5.2.4 Subkultur und Lagerung der Mykobakterien-Isolate

Zur Herstellung von Reinkulturen wurden nach der Primärisolation Ziehl-Neelsen-positive Kolonien auf Middlebrook 7H10-Agar vereinzelt. In aller Regel ließen sich auf diesem Medium bei 37°C Einzelkolonien subkultivieren. Von der Subkultur wurde anschließend eine Einzelkolonie auf LJ-Medium überimpft, subkultiviert und gekühlt aufbewahrt. Für diese Vereinzelnungs- und Subkultivierungsschritte waren meist 4 bis 8 Wochen erforderlich.

Nach 16 Wochen Inkubation bei 42°C legte ich Subkulturen der aus den Wasserproben gewonnenen Isolate auf Middlebrook-7H10-Agar und Löwenstein-Jensen Medium mit Glycerin (LJ) an. Diese inkubierte ich parallel bei 37°C und 42°C. Sobald Kolonien sichtbar waren, wurden die Isolate bei 8°C im Kühlraum gelagert.

Middlebrook-7H10-Agar:

Der vollsynthetische Middlebrook 7H10-Agar stellt eine von Middlebrook und Cohn (1958) [45] entwickelte Modifikation des Dubos-Mediums dar. Der Agar enthält verschiedene Wachstumsfaktoren (Vitamine, L-Glutaminsäure) und wird durch Zusatz des OADC-Wachstumssupplements (bestehend aus Oleinsäure, Albumin, Dextrose und Katalase) ergänzt. Der in Petrischalen gegossene 7H10-Agar wurde sowohl zur Primärisolierung als auch zur Vereinzelnung und Anzucht von Reinkulturen eingesetzt. Kommerziell erhältlich ist sowohl der 7H10-Agar (Kat. Nr. 0627-17-4), als auch das OADC-Supplement (Kat. Nr. 0722-72) von der Fa. Difco, Augsburg. Die Herstellung des gebrauchsfertigen Agars erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Löwenstein-Jensen-Medium mit Glycerin (LJ):

Dieses Vollei-Medium wurde gebrauchsfertig als Schrägmedium in Röhrchen von der Firma Biotest, Heidelberg, (Kat. Nr. 913013) bezogen.

2.5.3 Dokumentation

Während der 6-monatigen Testphase wurden an den ERDAs vorgefertigte Dokumentationsbögen angebracht, auf denen das Pflegepersonal der Endoskopie-Abteilung des Krankenhauses mit Datum und Uhrzeit die Seriennummer des

gespülten Bronchoskops dokumentierten (Beispiexemplar siehe Anhang 4). Im Falle eines Mykobakterien-Isolates aus den Patientenproben im Tbc-Labor war so eine Rückverfolgung zum benutzten ERDA möglich.

2.6 Differenzierung der Mykobakterien-Isolate

Zur Differenzierung der Mykobakterien-Isolate kultivierte ich *M. xenopi* auf Middlebrook 7H10-Agar (s. Kapitel 2.5.2.4). Mit diesen Kulturen wurden die im Folgenden beschriebenen Differenzierungsverfahren durchgeführt.

2.6.1 Ziehl-Neelsen-Färbung

Die meisten Bakterien lassen sich mit vielen Farbstofflösungen verhältnismäßig leicht anfärben. Arten der Gattung *Mycobacterium* nehmen die Farbe nur schlecht oder sehr langsam an. Das ist auf den hohen Anteil von Lipiden (Wachse und Mykolsäuren) in der äußere Zellwand zurückzuführen. Die unpolare Eigenschaft dieser Lipide erschwert ein Eindringen polarer Lösungen, wie einer wässrigen Farblösung. Sind die Mykobakterien jedoch einmal angefärbt, so geben sie die Farbe auch unter Verwendung starker Entfärbungsmittel nur schwer wieder ab.

Auch Schwefelsäure oder Alkohol-Salzsäuregemische vermögen bei Mykobakterien keine Entfärbung herbei zu führen. Man bezeichnet sie deshalb auch als säurefeste (oder säure- und alkoholfeste) Bakterien [12].

Durchführung nach Burkhardt, 1992:

1. Zunächst wird ein hitzefixierter Ausstrich der Bakterienkultur angefertigt.
2. Färben: Überschichten des Präparates mit Karbolfuchsinlösung, dreimaliges Erhitzen von unten bis zur Dampfbildung (nicht aufkochen), danach 5 min Einwirkzeit. Anschließend Abspülen mit Leitungswasser.
3. Entfärben: Überschichten des Präparates mit Salzsäurealkohol, nach etwa 1-2 min mit Leitungswasser abspülen, anschließend erneutes Auftragen von Salzsäurealkohol, solange bis keine Farbwolke mehr entsteht, dann gründlich mit Leitungswasser abspülen.

4. Gegenfärben: Überschichten des Präparates mit Malachitgrün-Lösung, nach ca. 1 min mit Leitungswasser abspülen.

Das luftgetrocknete Präparat wird dann mikroskopisch begutachtet. Liegen säurefeste Bakterien, also Mykobakterien vor, so zeigt sich ein rot angefärbtes Präparat, da sich die Mykobakterien aufgrund ihrer oben beschriebenen Zellwandeigenschaften nach Anfärbung mit Karbolfuchsinlösung nicht wieder entfärben lassen. Nicht säurefeste Bakterien lassen sich durch den Salzsäurealkohol entfärben und bei der Gegenfärbung mit Malachitgrün-Lösung anfärben, sodass sie bei der mikroskopischen Betrachtung grün erscheinen.

2.6.2 Differenzierung der Isolate mittels Dünnschichtchromatographie

Die Chromatographie ist eine Sammelbezeichnung für Trennverfahren, bei denen die Komponenten des Stoffgemischs zunächst an einer festen Matrix gebunden werden und anschließend durch einen Flüssigkeits- oder Gasstrom von der Matrix abgelöst und aufgetrennt werden. Die Trennung kann aufgrund der Ladung (Ionenauschromatographie), der Partikelgröße (Gelfiltration) oder der Fähigkeit zur spezifischen Bindung an andere Moleküle (Affinitätschromatographie) erfolgen [41].

Zur Differenzierung der Mykobakterien eignen sich besonders die Mykolsäuren. Bei den Mykolsäuren handelt es sich um langkettige, alpha-verzweigte, beta-hydroxy-Fettsäuren, die über das Arabinogalactan kovalent mit dem Peptidoglycangerüst der Zellwand verestert sind und durch pallisadenartige Aneinanderlagerung eine dicht gepackte, hydrophobe Schicht bilden [5, 28, 50].

Mykobakterielle Mykolsäuren unterscheiden sich von den Mykolsäuren verwandter Bakteriengattungen dadurch, dass sie aus 60 bis 90 Kohlenstoffatomen bestehen (z.B. weisen die Mykolsäuren der Gattung *Corynebacterium* nur 22 bis 38 Kohlenstoffatome auf) [28, 33].

Zusätzlich zu der stets vorhandenen Carboxyl- und Hydroxylgruppe können mykobakteriellen Mykolsäuren weitere sauerstoffhaltige, funktionelle Gruppen besitzen, die sich bei anderen Bakterien nicht finden [17]. Folglich werden bei

Mykobakterien neben α - und α' -Mykolsäuren, die keine zusätzliche, sauerstoffhaltige funktionelle Gruppe aufweisen, weitere Mykolsäuretypen nachgewiesen, die entsprechend ihren funktionellen Gruppen als Methoxy-, Keto-, Epoxy-, ω -Carboxy oder ω -Methoxy-Mykolsäuren bezeichnet werden [17, 42, 47].

Von den verschiedenen Verfahren der Mykolsäureanalyse soll hier nur auf die Dünnschichtchromatographie (DC) eingegangen werden:

Die Dünnschichtchromatographie (DC) erlaubt eine qualitative Unterscheidung der Mykolsäuretypen auf Grund ihrer sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen und somit auf Grund ihrer Polarität [40]. Bedingt durch die diskontinuierliche Verteilung der Mykolsäuretypen innerhalb der Gattung *Mycobacterium* liefert die DC charakteristische Mykolsäuremuster, mit deren Hilfe die Mykobakterien in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden können, die ihrerseits meist aus mehreren Mykobakterienspezies bestehen. Da die Zusammensetzung der in der Zellwand vorkommenden Mykolsäuretypen bei allen Stämmen einer Spezies konstant ist, ist jede Spezies einem bestimmten Mykolsäuremuster zuzuordnen [18].

Die alkalische Hydrolyse der Mykolsäuren aus der Mycolyl-Arabinogalactan-Wachsmatrix der Zellwand und anschließende katalytische Methylierung der Fettsäuren mit Hilfe von Jodmethan erfolgte nach [20]. Die darauf folgende dünnschichtchromatographische Auftrennung der Mykolsäure-Methylester wurde entsprechend den Angaben von [70] mit zwei Laufmittelsystemen (Petroleumether/Aceton und Dichlormethan) durchgeführt.

Die Dünnschichtchromatographie umfasst im Wesentlichen drei Schritte: Zuerst werden die Mykolsäuren durch alkalische Hydrolyse aus der Zellwand der Mykobakterien herausgelöst und mit Diethylether extrahiert. Die anschließende Methylierung dient der Mobilisierung der Fettsäuren. Die Auftrennung der Mykolsäuren wird auf Kieselgel-beschichteten Dünnschichtfolien (stationäre Phase) mit Hilfe von zwei verschiedenen Laufmitteln (Dichlormethan, bzw. Petroleumbenzin/Aceton als mobile Phase) durchgeführt. Die Auftrennung in zwei verschiedenen Laufmitteln ist notwendig, um in der eindimensionalen DC α' - und Methoxy-Mykolsäuren sowie Keto- und Epoxy-Mykolsäuren unterscheiden zu können. Durch visuellen Vergleich der spezifischen Laufmuster im Vergleich zu einem mitgeführten Standard kann man die Isolate mit Hilfe von Referenztabelle in verschiedene Speziesgruppen von Mykobakterien einordnen.

2.6.3 Differenzierung der Isolate mittels PCR-Restriktionsanalyse (PRA) des *hsp65*-Gens und des 16S-23S-rDNA-Spacers

Bei *hsp65* handelt es sich um ein so genanntes Hitzeschockprotein, welches eine Molekülgröße von 65 Kilodalton aufweist. Hitzeschockproteine dienen häufig als Chaperone bei der Faltung von Proteinen in ihre native Form unter Hitzestress. Normalerweise denaturieren Proteine unter Hitzeeinwirkung. Hitzeschockproteine werden unter Hitzestress vermehrt exprimiert und können diesen Prozess rückgängig machen oder verhindern [41].

Die Analyse des RFLP (**R**estriktions**f**ragment-**L**ängen-**P**olymorphismus) des zuvor durch PCR vermehrten *hsp65*-Gens wird auch als PRA (PCR-Restriktionsanalyse) bezeichnet [69].

Die PRA ermöglicht eine genotypische Identifizierung der Mykobakterien innerhalb von ein bis zwei Tagen. Die Identifizierung ist dabei mindestens bis zur Speziesebene möglich.

Im Wesentlichen wurde die PRA in folgenden Schritten durchgeführt:

Die Mykobakterien-DNA wurde aus dem Überstand zentrifugierter Zellsuspensionen entnommen. Mit Hilfe der PCR-Primer Tb11 (5` ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT 3`) und Tb12 (5` CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT 3`) wurde ein 439 bp Abschnitt des *hsp65*-Gens amplifiziert.

Folgendes Reaktionsprofil wurde verwendet: Prä-Denaturierung 5 min bei 94°C, 38 Amplifikationszyklen, bestehend aus Denaturierung (1 min bei 94°C), Anlagerung der Primer (1 min bei 56°C) und Extension (1 min bei 72°C); abschließende Extension 10 min bei 72°C. Danach wurde das PCR-Produkt mit Hilfe der Restriktions-Endonukleasen *Bst*Ell, *Hae*III und *Cfo*I (Boehringer, Mannheim, Kat. Nr. 567612, 693944 und 688541) sowie unter Zusatz von 25 mM Spermidin (Sigma, Steinheim, Kat. Nr. S 2626) verdaut. Die bei der Restriktion entstandenen DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese in einem 3%-igen NuSieve GTG Agarose-Gel (Biozym, Nr. 850084) aufgetrennt. Die DNA-Fragmentmuster wurden anschließend in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht auf Polaroid-Filmen (665 pos./neg.) dokumentiert. Die Längenbestimmung der Restriktionsfragmente erfolgte durch visuellen Vergleich mit einem Längenstandard (pUC 19 DNA/*Msp*I: Fermentas, St.Leon-Rot, Kat. Nr. SM0221). Fragmente, deren Länge weniger als 60

Basenpaare betrug, wurden nicht mit in die Auswertung einbezogen, da sie größtenteils Primer- bzw. Primer-Dimer-Banden darstellen. Die Spezieszuordnung der Isolate wurde mit Hilfe von Referenztabelle der Fragmentmuster bekannter Stämme vorgenommen.

Die bakteriellen 70S-Ribosomen bestehen aus zwei Untereinheiten, von denen die große als 50S und die kleine als 30S Einheit bezeichnet wird. Eine 50S Einheit besteht aus 23S- und 5S-rRNA und 31 Proteinen. 16S-rRNA und 21 Proteine bilden die kleine 30S Untereinheit. Die rRNA Gene (für die 5S-, 23S- und 16S-rRNA) liegen auf dem Bakterienchromosom nebeneinander angeordnet. Die Abfolge der entsprechenden Gene wird an einem Stück transkribiert. Zwischen den Genes werden einige Sequenzen ausgelassen, die als rDNA-Spacer bezeichnet werden.

Die daraus entstehende Prä-rRNA enthält neben den 16S-, 23S- und 5S-RNA-Einheiten weitere RNA, die zwischen den genannten Einheiten angeordnet ist. Diese Zwischenstücke werden rRNA-Spacer genannt. Zusätzlich binden in diesem Stadium die ribosomalen Proteine an das Transkript. Es entsteht ein Komplex aus RNA und Proteinen der als Prä-RNP (Ribonucleoproteinpartikel) bezeichnet wird. Ähnlich dem Spleißen der mRNA in der Proteinsynthese folgt nun eine Prozessierung der RNA. Dabei werden die nicht benötigten rRNA-Spacer aus dem RNA-Strang herausgetrennt. Übrig bleiben nur die rRNP Einheiten, die sich anschließend zu den Ribosomen zusammensetzen [41].

Während sich bei Bakterien die rRNA Einheiten nicht voneinander unterscheiden, sind die rRNA-Spacer und die rDNA-Spacer doch unterschiedlich und können durch Restriktionsanalyse als Differenzierungsmerkmal herangezogen werden.

Die 16S-23S-rDNA-Spacer Analyse von Mykobakterien mittels PCR-RFLP wurde von Roth et al. entwickelt [56, 57]. Im Unterschied zu dem in der PRA untersuchten *hsp65*-Gen wird in der 16S-23S-Spacer-RFLP ein Bereich des 16S-23S-Spacers der rDNA amplifiziert und untersucht. Da sich die Größe des PCR-Produkts verschiedener Mykobakterienspezies unterscheidet, lässt sich oft schon an Hand der PCR-Produktgröße eine grobe Differenzierung der untersuchten Mykobakterien-Isolate vornehmen. Die Fragmentmuster erlauben in der Regel eine klare Spezieszuordnung. Der Nachweis mehrerer Fragmentmuster bei verschiedenen Angehörigen einer Spezies ist bisher nicht beschrieben.

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) wird eine DNA-Sequenz, die sich zwischen zwei Primern befindet, durch wiederholte Verdopplung exponentiell vermehrt, wobei die Primer-Moleküle in hoher Konzentration vorliegen müssen. Auf diese Weise kann man theoretisch aus einem einzigen Matrizenmolekül große Mengen an DNA erhalten. Allerdings müssen die Sequenzen an den Enden der zu amplifizierenden DNA bekannt sein [41].

Die PCR der *M.-xenopi*-Isolate zum Zwecke der 16S-23S-Spacer-RFLP erfolgte mit Hilfe der beiden Mykobakterien-spezifischen Oligonukleotide (Primer) Sp1 (5`ACCTCCTTTCTAAGGAGCACCC3`) und SP2 (5`GATGCTCGCAACCACTATCCA3`). Folgendes Reaktionsprofil wurde verwendet: Prä-Denaturierung 5 min bei 94°C, 38 Amplifikationszyklen, bestehend aus Denaturierung (50 s bei 94°C), Anlagerung der Primer (50 s bei 58°C) und Extension (50 s bei 72°C); abschließende Extension 10 min bei 72°C. Der Nachweis des amplifizierten PCR-Produkts erfolgte elektrophoretisch durch ein 3%-iges NuSieve GTG Agarose-Gel (Biozym, Hameln, Kat. Nr. 850084). Die Restriktionsanalyse wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Hae*III und *Cfo*I (Boehringer, Mannheim, Kat. Nr. 693944 und 688541) durchgeführt, in einem 4%-igen NuSieve GTG Agarose-Gel (s.o.) aufgetrennt und auf Polaroid-Filmen dokumentiert. Die Längenbestimmung der Restriktionsfragmente erfolgte durch visuellen Vergleich mit einem Längenstandard (pUC 19 DNA/Mspl: Fermentas, St. Leon-Rot, Kat. Nr. SM0221) (s.o.).

2.6.4 Genotypisierung der *M.-xenopi*-Isolate mittels *random amplification of polymorphic DNA* (RAPD)

Folgende *M.-xenopi*-Isolate wurden der Genotypisierung unterzogen:

- 11 Wasserisolate des betroffenen Düsseldorfer Krankenhauses, die wie unter Kap. 2.5.1 beschrieben aus dem Warmwassersystem des betroffenen Krankenhauses isoliert worden waren.
- 30 Patientenisolate des betroffenen Düsseldorfer Krankenhauses, die vom Institut für Medizinische Mikrobiologie des UKD zur Verfügung gestellt wurden, welches das Krankenhaus betreut.

- 3 Patientenisolate aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg als externe Vergleichsstämme.

Die *random amplification of polymorphic DNA* (RAPD) ist eine Methode zur Genotypisierung von Organismen [31] und wurde im vorliegenden Fall auf die oben genannten *M.-xenopi*-Isolate angewandt. Das Prinzip der RAPD beruht auf der Amplifikation von DNA-Fragmenten aus dem Genom der Testorganismen mit Hilfe eines kurzen (ca. 10 bp), willkürlich (ohne Kenntnis der Zielsequenzen) ausgewählten Oligonukleotids (RAPD-Primers). Im vorliegenden Falle wurden die *M.-xenopi*-Isolate mit Hilfe der in Tabelle 2 aufgelisteten RAPD-Primer untersucht.

Tabelle 2 RAPD-Primer zur Typisierung der *M.-xenopi*-Isolate

Bezeichnung des Primers	Sequenz
ZA	5` CCGCAGACAC 3`
ZAP40	5` CCGCAGCCAA 3`
ZAP40m	5` CCGCAGCCAC 3`
Stenmal 270	5` TGCGCGCGGG 3`
Stenmal 272	5` AGCGGGCCAA 3`

Das PCR-Reaktionsprofil für die Primer ZA, ZAP40, ZAP40m sah wie folgt aus: Prä-Denaturierung 5 min bei 94°C, 40 Amplifikationszyklen bestehend aus Denaturierung (1 min bei 94°C), Anlagerung der Primer (1 min bei 36°C) und Extension (1 min bei 72°C), abschließende Extension 5 min bei 72°C. Der Nachweis der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte durch Gel-Elektrophorese in einem 2%-igen Agarose-Gel (Serva, Heidelberg, Kat.-Nr. 11404).

Der PCR-Zyklus für die Primer Stenmal 270 und 272 sah wie folgt aus: Nach einer Prä-Denaturierung (15 min bei 94°C) wurde der Temperaturzyklus [Denaturierung (5 min bei 94°C), Anlagerung der Primer (5 min bei 36°C) und Extension (5 min bei 72°C)] 4-mal wiederholt. Im Anschluss daran erfolgte ein erneuter Temperaturzyklus [Denaturierung (1 min bei 94°C), Anlagerung der Primer (1 min bei 36°C) und Extension (1 min bei 72°C)] 31-mal wiederholt. Im Anschluss daran erfolgte eine Extension von 10 min bei 72°C. Der Nachweis der amplifizierten DNA-Fragmente

erfolgte durch Gel-Elektrophorese in einem 2%-igen Agarose-Gel (Serva, Heidelberg, Kat.-Nr. 11404).

2.7 Belastung eines ERDA mit definierten, hohen *M.-xenopi*-Konzentrationen

Um die Belastbarkeit der ERDAs mit extrem hohen Mykobakterienkonzentrationen zu testen, sollten beide Automaten im Labor aufgestellt, entsprechend modifiziert und mit einer definierten *M. xenopi*-Suspensionen befüllt werden. Anschließend sollte an verschiedenen Entnahmestellen an der Maschine die Effektivität der Entkeimung überprüft werden. Leider war es der Firma Olympus nicht möglich dies zu verwirklichen, so dass der Laborbelastungstest nur mit dem Automaten Innova 2000 der Firma BHT durchgeführt werden konnte.

2.7.1 Vorversuche zur Herstellung definierter *M.-xenopi*-Konzentrationen

Die Vorversuche dienten der Herstellung von *M.-xenopi*-Suspensionen mit definierter KBE-Konzentration, um bei den nachfolgenden ERDA-Belastungsversuchen vorhersagen zu können, welche Verdünnungsstufen ausplattiert werden mussten.

Als Teststamm wurde der in der 6-monatigen Testphase aus dem Warmwasserleitungssystem des Krankenhauses isolierte *M.-xenopi*-Stamm „Isolat Nr. 2“ verwendet, den wir in keimarmem, deionisiertem Wasser standardisierter Härte in Suspension brachten.

Keimarmes Wasser wurde durch Erhitzen von deionisiertem Wasser auf 80°C für 15 min und anschließendes Abkühlen hergestellt.

Wasser standardisierter Härte (WSH) wurde durch Zugabe von 5,3 ml einer 10%igen CaCl₂-Stammlösung und 1,51 ml einer 10%igen MgSO₄-Stammlösung zu deionisiertem Wasser und Auffüllen auf 1000 ml hergestellt.

Um eine definierte *M.-xenopi*-Konzentrationen herstellen zu können stellten wir 3 Verdünnungsreihen in absteigenden 10-er Potenzen her. Dafür wurde 1 mg Biomasse des *M.-xenopi*-Isolates Nr. 2 abgewogen, in 1 ml WSH suspendiert (dazu wurden sterile Glasperlen zugegeben und 1 min gevortext). Danach stellten wir eine

Verdünnungsreihe der Tsetsuspension in WSH her, indem wir jeweils 0,5 ml der höher konzentrierten Suspension in ein mit 4,5 ml WSH gefülltes Glasröhrchen überführten, diese wiederum für 10 s vortexten. Diesen Vorgang wiederholten wir bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-10} . Die Verdünnungsstufe mit der gerade noch sichtbaren Trübung entsprach ungefähr 1×10^7 KBE/ml (koloniebildende Einheit pro Milliliter), dies war in unserem Fall die Verdünnungsstufe 1×10^{-3} . Zur Überprüfung strichen wir von den Verdünnungsstufen 1×10^{-6} bis 1×10^{-10} (entsprechend $1 \times 10^4 - 0$ KBE/ml) jeweils 0,1 ml im dreifachen Ansatz auf Middlebrook-7H10-Agar mit Zusatz von OADC aus und kultivierten die Platten für 6-8 Wochen bei 42°C . Die Verdünnungsreihen ließen wir bei Raumtemperatur 24 h ruhen und strichen erneut die gleichen Verdünnungsstufen aus, um eine möglicherweise stattfindende Inaktivierung des in WSH suspendierten Teststammes zu dokumentieren.

Um möglichst früh eine Vorstellung über die Konzentrationen der eingesetzten Teststamm-Konzentrationen zu erhalten, wurde das gleiche Prozedere mit dem schnellwachsenden *M. chelonae*, Stamm Nr. BN 3180 durchgeführt, der bei 37°C inkubiert wurde.

2.7.2 Versuchsaufbau

Der ERDA Innova 2000 wurde insofern verändert, als dass der Zulauf zum Boiler (thermische Aufbereitung des letzten Spülwassers) nicht aus der Warmwasserleitung erfolgte, sondern aus einem 60 L-Wasserbehälter. Somit war es möglich eine Suspension mit definierter *M.-xenopi*-Konzentration in den Boiler einzubringen. Zusätzlich zu Entnahmestelle III (Pumpensumpf der Endoskopspülkammer) wurden zwei neue Probenentnahmestellen eingerichtet

Entnahmestelle I: Am Wasserzulauf zwischen Wasserbehälter und Boiler. An dieser Entnahmestelle war es im späteren Versuchsablauf möglich die Bakterienkonzentration zu überprüfen, mit der wir den Automaten belasteten.

Entnahmestelle II: Am Wasserauslauf unmittelbar nach dem Boiler, vor Einlauf des thermisch aufbereiteten letzten Spülwassers in die Endoskop-Spülkammer. An dieser Stelle war es möglich die Effektivität der thermischen Aufbereitung und somit die Keimfreiheit des letzten Spülwassers zu beurteilen.

2.7.3 Versuchsablauf

Versuchsvorbereitungen des ERDA:

Tag –4 vor Versuchsbeginn: Reinigung und Desinfektion des Wasserbehälters mit 1% „Disinfectant“ der Fa. Olympus, Hersteller Fa. Henkel (dieses Präparat wurde auch während der 6-monatigen Testphase der Studie in beiden ERDAs zur Desinfektion der Endoskope verwendet).

Tag –3 vor Versuchsbeginn: Befüllung des Wasserbehälters, des Zulaufes vom Behälter zum Boiler (inklusive der Entnahmestelle I), des Boilers und des Ablaufes vom Boiler in die Endoskop-Spülkammer (inklusive Entnahmestelle II) mit 1% „Disinfectant“ der Fa. Olympus, Hersteller Fa. Henkel. Desinfektionsmittelexposition: zwei Tage.

Tag -1 vor Versuchsbeginn: Zweimalige Befüllung des Wasserbehälters mit keimarmem, deionisiertem Wasser (erhitzt auf 80°C für 15 min, anschließend Abkühlen) und zweimaliger Ablauf des regulären Reinigungs-/Desinfektions-/Nachspülprogramms mit den üblicherweise eingesetzten Detergenzienkonzentrationen.

Tag des Versuchs: Einmalige Wiederholung des Vorgangs von Tag –1 unmittelbar vor Versuchsbeginn.

Es wurden zwei Versuchsreihen (A, B) an zwei verschiedenen Tagen durchgeführt. Jede Versuchsreihe bestand aus sechs Programmdurchläufen (DL 1-6) mit verschiedenen Bakterienkonzentrationen. In Versuchsreihe A wurde die Belastung mit *M.-xenopi*-Konzentrationen von 10^{-2} , 1, 10^2 , 10^4 , 10^6 KBE/ml (Endkonzentration im Boiler) getestet, in Versuchsreihe B mit *M.-xenopi*-Konzentrationen von 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} KBE/ml (Endkonzentration im Boiler), beginnend mit den niedrigen Konzentrationen.

Wir führten sechs reguläre Programmdurchläufe durch, bei denen jeweils 30 Liter der folgenden *M.-xenopi*-Suspensionen in den 60 L-Wasserbehälter gegeben wurden (s. Tabelle 3). Die *M.-xenopi*-Suspensionen wurden in deionisiertem, keimarmem Wasser standardisierter Härte hergestellt. Für die Suspensionen wurde der während der 6-monatigen Testphase aus dem Leitungswasser des betroffenen Krankenhauses isolierte *M.-xenopi*-Stamm „Isolat Nr. 2“ verwendet.

2.7.3.1 Versuchsreihe A

In der Versuchsreihe A wurden in den sechs Durchläufen (DL 1-6) die in Tabelle 3 wiedergegebenen *M.-xenopi*-Suspensionskonzentrationen eingesetzt und unterschiedliche Probevolumina an Entnahmestelle I entnommen:

Tabelle 3 Durchführungsschema des Belastungstests des BHT Innova 2000 für die Versuchsreihe A

DL	Volumen d. eingesetzten Stammsuspension	Eingesetzte <i>M.-xenopi</i> -Menge	<i>M. xenopi</i> Endkonzentration im Boiler	Zu untersuchendes Probevolumen Entnahmestelle I
1	0 (Leerprobe)	-	-	1000 ml, 100ml, 10ml
2	10^{-6} ml	10^3 KBE/ml	$3,3 \times 10^{-2}$ KBE/ml	1000ml, 100ml, 10ml,
3	10^{-4} ml	10^5 KBE/ml	$3,3 \times 1$ KBE/ml	1000ml, 100ml, 10ml, 1ml, 10^{-1} ml, 10^{-2} ml
4	10^{-2} ml	10^7 KBE/ml	$3,3 \times 10^2$ KBE/ml	10ml, 1ml, 10^{-1} ml, 10^{-2} ml, 10^{-3} ml, 10^{-4} ml
5	1ml	10^9 KBE/ml	$3,3 \times 10^4$ KBE/ml	10^{-1} ml, 10^{-2} ml, 10^{-3} ml, 10^{-4} ml, 10^{-5} ml, 10^{-6} ml
6	100ml	10^{11} KBE/ml	$3,3 \times 10^6$ KBE/ml	10^{-3} ml, 10^{-4} ml, 10^{-5} ml, 10^{-6} ml, 10^{-7} ml, 10^{-8} ml

DL = Durchlauf, KBE = koloniebildende Einheiten

An Entnahmestelle II und III wurden pro Durchlauf als zu untersuchende Probenvolumina jeweils 100 ml und 1 ml entnommen. Die Nummerierung der Durchläufe entspricht der Reihenfolge ihrer Durchführung.

Nach jedem Durchlauf wurden der Wasserbehälter und der Boiler komplett entleert.

Während jedes Programmablaufes wurden Wasserproben an folgenden Stellen entnommen:

1. An Entnahmestelle I (ES I, am Wasserzulauf zwischen Wasserbehälter und Boiler) bei Einlauf der *M.-xenopi*-Suspension in den Boiler.

2. An Entnahmestelle II (ES II, am Wasserauslauf unmittelbar nach Boiler, vor Einlauf des thermisch aufbereiteten letzten Spülwassers in die Endoskop-Spülkammer) bei Auslauf aus dem Boiler.
3. An Entnahmestelle III (ES III, aus dem Pumpensumpf der Endoskop-Spülkammer) nach Abschluss des Programms.

Die Probenaufbereitung erfolgt angelehnt an die Vorgehensweise der Probenaufbereitung wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben.

Zunächst wurden die Probevolumina einschließlich der Verdünnungsstufen mit sterilem Wasser ad 100 ml aufgefüllt, dann erfolgte die Filtration der Proben über einen Cellulose-Acetat-Membranfilter. Nach der Dekontamination mit HCl-KCL-Puffer für 5 Minuten spülten wir den Filtrerrückstand mit 100 ml sterilem Aqua dest.. Anschließend legten wir die Filter auf Middlebrook-7H10-Agar-Platten mit OADC-Supplement auf (Proben der Entnahmestelle I und ihre Verdünnungsstufen) bzw. überführten die Filter in Kirchner-Bouillon-Röhrchen (jeweils 100 ml und 1 ml der Entnahmestellen II und III). Danach wurden die Medien für 12 Wochen bei 42°C bebrütet.

2.7.3.2 Versuchreihe B

In der Versuchsreihe B wurden in den sechs Durchläufen (DL 1-6) die in Tabelle 4 wiedergegebenen *M.-xenopi*-Suspensionskonzentrationen eingesetzt und unterschiedliche Probevolumina an Entnahmestelle I entnommen:

Tabelle 4 Durchführungsschema des Belastungstests des BHT Innova 2000 für die Versuchsreihe B

DL	Volumen d. eingesetzten Stammsuspension	Eingesetzte <i>M.-xenopi</i> -Menge	<i>M. xenopi</i> Endkonzentration im Boiler	Zu untersuchendes Probevolumen ES 1
1	0 (Leerprobe)	-	-	100ml
2	10^{-2} ml	10^6 KBE/ml	$3,3 \times 10^1$ KBE/ml	10ml, 1ml, 10^{-1} ml, 10^{-2} ml, 10^{-3} ml
3	10^{-1} ml	10^7 KBE/ml	$3,3 \times 10^2$ KBE/ml	1ml, 10^{-1} ml, 10^{-2} ml, 10^{-3} ml, 10^{-4} ml
4	1ml	10^8 KBE/ml	$3,3 \times 10^3$ KBE/ml	10^{-1} ml, 10^{-2} ml, 10^{-3} ml, 10^{-4} ml, 10^{-5} ml
5	10ml	10^8 KBE/ml	$3,3 \times 10^4$ KBE/ml	10^{-1} ml, 10^{-2} ml, 10^{-3} ml, 10^{-4} ml, 10^{-5} ml, 10^{-6} ml
6	100ml	10^{10} KBE/ml	$3,3 \times 10^5$ KBE/ml	10^{-2} ml, 10^{-3} ml, 10^{-4} ml, 10^{-5} ml, 10^{-6} ml, 10^{-7} ml

DL = Durchlauf, KBE = koloniebildende Einheiten, ES = Entnahmestelle

An Entnahmestelle II und III wurden pro Durchlauf jeweils 100 ml als zu untersuchende Probenvolumina entnommen.

Nach jedem Durchlauf wurden der Wasserbehälter und der Boiler komplett entleert.

Die Probenaufarbeitung erfolgt wie in Versuchsreihe A (s. Kapitel 2.7.3.1)

Abweichend vom Prozedere in Versuchsreihe A erfolgt die Auswertung rein qualitativ (positiv / negativ Befund).

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des zeitlichen Verlaufs der „Epidemie“ und Gegenmaßnahmen bis 1999

Bei Durchsicht der Patientenakten des Tbc-Labors des Institutes für Medizinische Mikrobiologie konnte ich im Zeitraum von 1991-1993 kaum positive *M.-xenopi*-Isolate (6 Isolate) finden, während es im Zeitraum von 1994-2000 zu einer deutlichen Zunahme mit insgesamt 220 positiven Proben kam. Der Verdacht auf das Vorliegen einer Pseudoepidemie wurde verstärkt durch die Tatsache, dass es sich meist um Einfach-Isolationen von Patienten ohne klinische Anzeichen einer Infektion handelte.

Folgende Interventionsmaßnahmen wurden seit 1994 zur Reduktion der nachgewiesenen *M. xenopi* im Wasserleitungssystem des Krankenhauses durchgeführt:

- 1997: Intervention 1: Sanierung des Warmwassersystems: Entfernung von Sedimenten in den Warmwasserspeichern und Anhebung der Warmwasser-Temperatur.
- 1999: Intervention 2: Ethanol-Spülung der Endoskope nach Aufbereitung in den ERDAs.
- 2000: Intervention 3: a) Information des medizinischen Personals, dass Spuren von Leitungswasser in klinischen Proben zu Kontaminationsproblemen führen kann.
b) Austausch der Endoskop-Reinigungs-/Desinfektions-automaten (ERDA) durch neue Geräte mit Leitungswasseraufbereitung,
ERDA A: thermische Behandlung (94°C)
ERDA B: UV-Behandlung (254 nm)

Auf die Interventionen 1997 folgte ein Absinken der *M. xenopi*-Isolationen. Ab 1999 kam es aber wieder zu einem Anstieg. Die Intervention durch Ethanolspülung der Bronchoskope nach Aufbereitung in den ERDAs führte nur zu einem kurzzeitigen Absinken der Anzahl der *M. xenopi*-Isolate (s. Abbildung 8). Die Effektivität der 2000

durchgeführten Intervention mit der Inbetriebnahme der neuen ERDAs untersuchte ich in der 6-monatigen, klinischen Testphase der vorliegenden Arbeit.

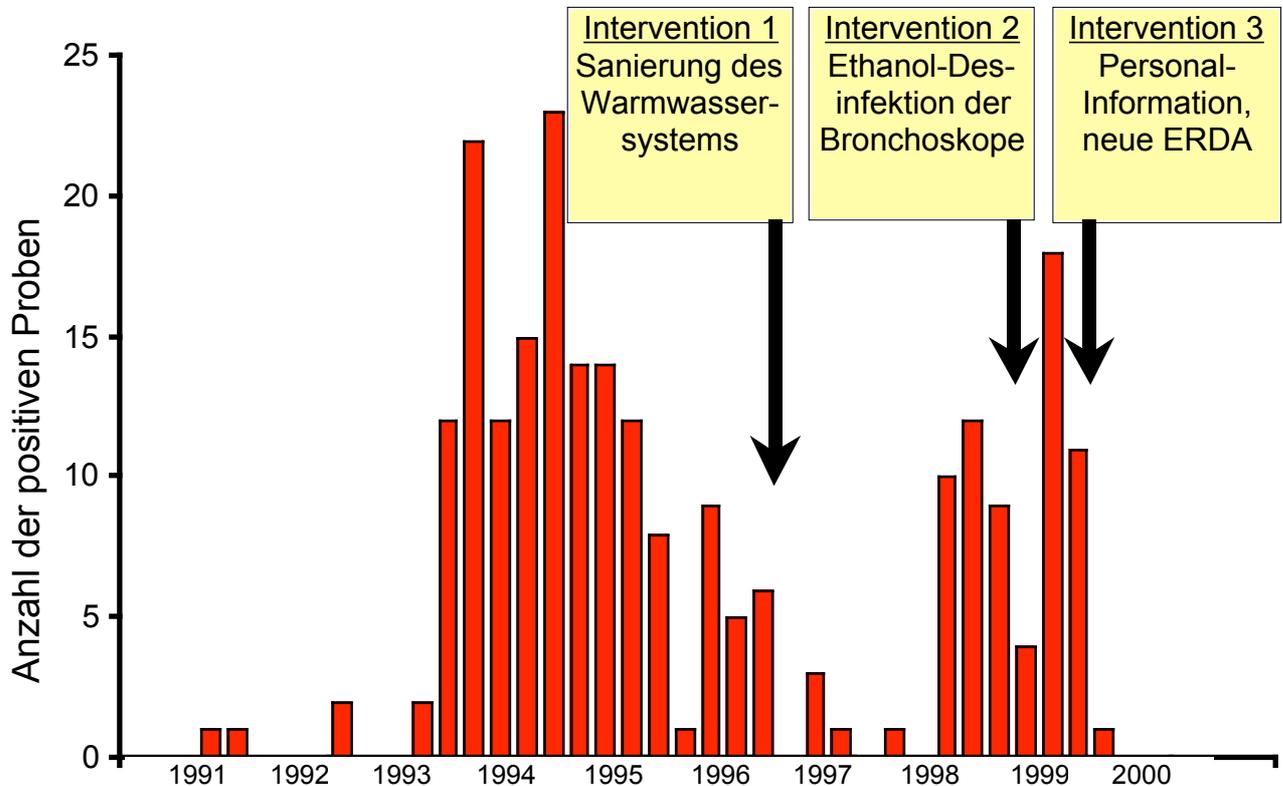


Abbildung 8 Darstellung des Verlaufes des gehäuften Auftretens von *M. xenopi* und der Interventionen

3.2 Mikrobiologisch-diagnostische Erfolgskontrolle (Patienten-Monitoring)

Während der 6-monatigen Testphase wurden nach Angaben der Endoskopie-Abteilung des betroffenen Krankenhauses 182 Bronchoskopien durchgeführt. Die eingesendeten bronchoskopisch gewonnenen Patientenproben, die in das Tbc-Labor eingesendet wurden, waren ohne Ausnahme frei von Mykobakterien. Nach Inbetriebnahme der neuen ERDAs im Februar 2000 bis Juli 2003 konnten, bis auf einem Fall im zweiten Quartal 2000 (Nachweis von *M. xenopi* in extrapulmonalem Gewebe), bei keinem weiteren Patienten des Krankenhauses *M. xenopi*

nachgewiesen werden. Somit entfiel die Rückverfolgung positiver Befunde auf das angewandte Bronchoskop bzw. die vorher stattgefundene Desinfektion in einem der ERDAs.

Bei Durchsicht der Daten des Tbc-Labors des Institutes für Medizinische Mikrobiologie des UKD konnte ich im Zeitraum von 1991-1993 kaum positive *M.-xenopi*-Isolate finden (6 Isolate), während es im Zeitraum von 1994-2000 zu einer deutlichen Zunahme mit insgesamt 220 positiven Befunden kam. Im Mittel betrug die Anzahl der positiven *M.-xenopi*-Isolate in diesem Zeitraum 35 Isolate/Jahr, mit Höhepunkt 1995 mit 63 Isolaten (s. auch Abbildung 8). Davon waren 195 (entspricht 89%) respiratorische Proben und aus dieser Gruppe 115 (entspricht 53%) bronchoskopisch gewonnene Proben. Die übrigen positiven Befunde wurden aus Urin, Blut, Knochenmark oder Abstrichen gewonnen. Die positiven nicht respiratorischen Proben sind am ehesten auf mit Leitungswasser kontaminierte Probengefäße zurückzuführen, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Aufklärung über die Möglichkeit der Kontamination der Proben mit *M. xenopi* durch Leitungswasser stattgefunden hatte. Es war durchaus vorgekommen, dass Probengefäße zuvor mit Leitungswasser gespült wurden.

Der Verdacht auf das Vorliegen einer Pseudoepidemie wurde bekräftigt durch die Tatsache, dass es sich meist um Einfach-Isolationen von Patienten ohne klinische Anzeichen einer Infektion handelte. In 20 Fällen kamen Patienten mit mehr als zwei Isolationen vor.

Davon konnte ich in 16 Fällen anhand der Patientenakten aus dem Archiv des Krankenhauses feststellen, dass es sich um immunsupprimierte Patienten (HIV, onkologische Erkrankungen) handelte. Die meisten dieser Patienten erhielten aufgrund dieses Befundes zusätzlich zu ihrer umfangreichen und nebenwirkungsreichen Therapie der Grunderkrankung eine langwierige tuberkulostatische Therapie (meist Dreifach-Kombinationen).

3.3 Mikrobiologisch-hygienische Erfolgskontrolle (Umwelt-Monitoring)

Insgesamt wurde während der Testphase von Februar bis August 2000 in wöchentlichem Abstand 50 Wasserproben an zwei verschiedenen Standorten aus dem Warmwasserleitungssystem des Krankenhauses entnommen:

- Standort A: aus Mischbatterie unmittelbar vor Zulauf zu Automat 1 (ETD 2 plus, Olympus)
- Standort B: aus Mischbatterie unmittelbar vor Zulauf zu Automat 2 (Innova 2000, BHT).

Gleichzeitig wurden zwischen Februar und August 2000 100 Proben aus 50 verschiedenen Bronchoskopen wie in Kap. 2.5.1.2 beschrieben entnommen (jeweils eine Proben aus dem Saug-/Spülkanal und eine aus dem Biopsiekanal).

3.3.1 Wasserproben

Die 50 Wasser-Proben wurden wie in Kap. 2.5.2 beschrieben aufgearbeitet und über 16 Wochen bei 42°C kultiviert.

Daraus ergaben sich 10 positive Isolate (s. Tabelle 5).

Tabelle 5 positive *M.-xenopi*-Isolate

Isolat	Datum der Probeentnahme	Standort	Dekontaminationsverfahren
1	07.04.00	A	KCl/HCl-Puffer
2	07.04.00	B	KCl/HCl-Puffer
3	25.05.00	B	KCl/HCl-Puffer
4	02.06.00	A	KCl/HCl-Puffer
5	02.06.00	B	KCl/HCl-Puffer
6	15.06.00	B	KCl/HCl-Puffer
7	14.07.00	B	KCl/HCl-Puffer
8	21.07.00	A	KCl/HCl-Puffer
9	21.07.00	B	KCl/HCl-Puffer
10	07.08.00	A	KCl/HCl-Puffer

Standort A = aus Mischbatterie unmittelbar vor Zulauf zu Automat 1 (ETD 2 plus, Olympus)

Standort B = aus Mischbatterie unmittelbar vor Zulauf zu Automat 2 (Innova 2000, BHT).

Fraglich positive Isolate habe ich auf Middlebrook 7H10-Agar ausgestrichen, bei 37°C und 42°C inkubiert. Es fand sich kein weiteres *M.-xenopi*-Isolat.

3.3.2 Bronchoskop-Proben

Diese 100 Bronchoskop-Proben wurden entsprechend der Beschreibung in Kapitel 2.5.2 aufgearbeitet und die Medien über 16 Wochen bei 42°C inkubiert, jedoch war in keiner der Proben *M. xenopi* nachweisbar.

3.3.3 Differenzierung der Mykobakterien-Isolate

Die Differenzierung der 10 gefundenen Wasserisolate erfolgte durch verschiedene Verfahren.

Zunächst erfolgte die Identifizierung von *M. xenopi* durch verschiedene Selektionsverfahren:

1. Selektion durch die verwendeten Medien: Die zur Anzucht verwendete Kirchner-Bouillon ist ein Mykobakterien-selektives Medium.
2. Kultivierungstemperatur bei 42°C statt 37°C: Selektion thermophiler Bakterien.
3. Dunkelgelbe Pigmentierung: Skotochromogene statt foto- bzw. nonchromogene Pigmentierung.
4. positive Ziehl-Neelsen-Färbung: Säurefeste Stäbchen hinweisend auf Mykobakterien (s. Kapitel 3.3.3.1).
5. Dünnschichtchromatografie: Anhand der Mykolsäuren Differenzierung der Mykobakterien (s. Kapitel 3.3.3.2).

Als nächster Schritt erfolgte die genotypische Differenzierung von *M. xenopi* mittels Restriktionsfragmentlängen-Analyse des DNA-Amplifikats verschiedener Genabschnitte (s. Kapitel 3.3.3.3 und Kapitel 3.3.3.4)

3.3.3.1 Ziehl-Neelsen-Färbung

Alle 10 Wasserisolate stellten sich bei der mikroskopischen Betrachtung der wie in Kapitel 2.6.1 gefärbten Präparate als säurefeste Stäbchen dar.

3.3.3.2 Differenzierung der Isolate mittels Dünnschichtchromatographie

Durch die charakteristische Mykolsäuremuster können die Mykobakterien in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden, die ihrerseits meist aus mehreren Mykobakterienspezies bestehen. Da die Zusammensetzung der in der Zellwand vorkommenden Mykolsäuretypen bei allen Angehörigen einer Spezies konstant ist,

ist jede Spezies durch das spezifische Mykolsäuremuster einem bestimmten Typ zuzuordnen. Diese Zuordnung erfolgt mit Hilfe von Referenztabellen.

Die dünnschichtchromatographische Analyse der Wasserisolate Nr. 1-10 ergab das für *M. xenopi* und viele andere Mykobakterienspezies bekannte Mykolsäuremuster H. In Abbildung 9 sind beispielhaft die Dünnschichtchromatographien mit den Laufmitteln Petroleumbenzin / Aceton und Dichlormethan der Wasserisolate 1-4 zu sehen.

(Gruppe H: α -, Keto-, ω -Carboxy-Mykolsäuren, Eikosanol). Zu dieser Gruppe H gehören auch andere Mykobakterien wie z.B. *M. avium*, *M. avium ssp. paratuberculosis*, *M. branderi*, *M. celatum*, *M. conspicuum*, *M. hiberniae*, *M. intracellulare*, *M. lepraemurium*, *M. nonchromogenicum*, *M. scrofulaceum*, *M. terrae*) [34].

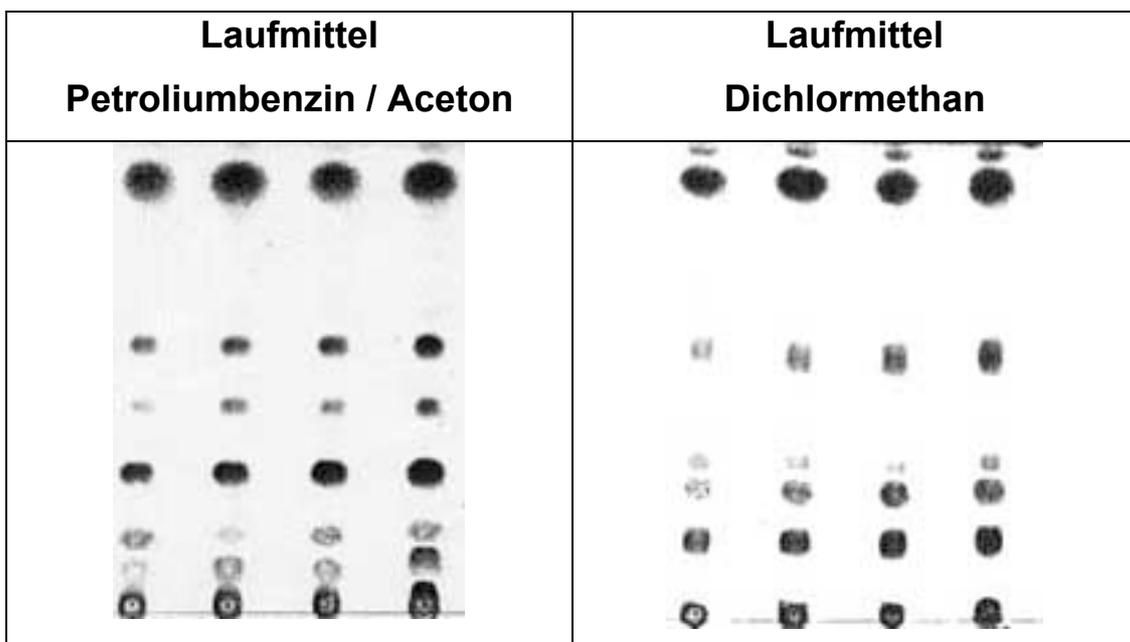


Abbildung 9 Dünnschichtchromatographie-Kieselgelplatten der Isolate 1-4

3.3.3.3 Differenzierung der Isolate mittels PCR-Restriktionsanalyse des *hsp65*-Gens und des 16S-23S-rDNA-Spacers

Die Längenbestimmung der Restriktionsfragmente erfolgte durch visuellen Vergleich mit einem Längenstandard (pUC 19 DNA/*Msp*I: Fermentas, St.Leon-Rot, Kat. Nr. SM0221). Die Spezieszuordnung der Isolate wurde mit Hilfe von Referenztabelle der Fragmentmuster bekannter Stämme vorgenommen.

In der *hsp65*-RFLP (PRA) zeigten alle Isolate das für *M. xenopi* typische Muster (Restriktionsfragmente in Basenpaaren nach Verdau mit *Hae*III: 175/105/55 bp, *Bst*E II 245/125/80 bp) [34].

Mit Hilfe der 16S-23S-Spacer RFLP-Analyse ließen sich die Isolate eindeutig als *M. xenopi* identifizieren (Restriktionsfragmente in Basenpaaren nach Verdau mit *Hae*III 130/70 bp, *Cfo*I keine Restriktion, PCR-Produkt 205 bp) [34].

In Abbildung 10a und 10b sind beispielhaft die Ergebnisse der 16S-23S-Spacer RFLP-Analyse bei Verdau mit *Hae*III und *Cfo*I der Wasserisolate 1-8 zu sehen.

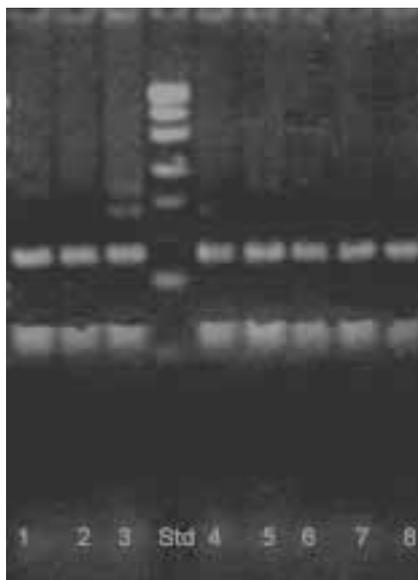


Abbildung 10 a Gel der 16S-23S-Spacer RFLP-Analyse der Wasserisolate 1-8 bei Verdau mit *Hae*III. Beim visuellen Vergleich mit dem Längenstandard zeigten sich zwei Banden der Größe 70 und 130 bp.

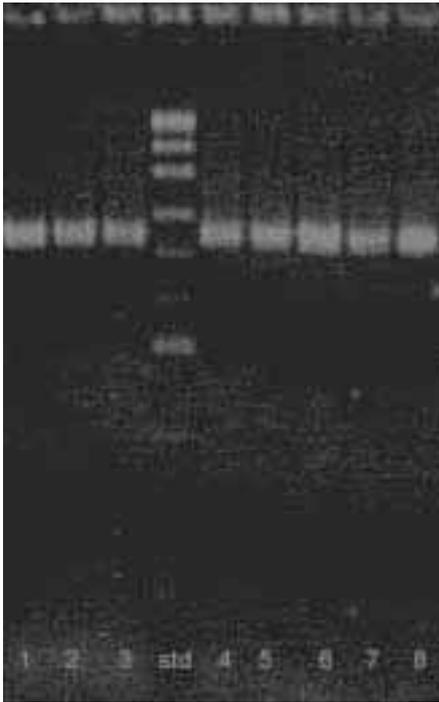


Abbildung 10b Gel der 16S-23S-Spacer RFLP-Analyse der Wasserisolate 1-8 bei Vedau mit Cfol. Beim visuellen Vergleich mit dem Längenstandard zeigte sich, dass keine Restriktion stattgefunden hat, die sichtbare Bande entspricht dem PCR-Produkt mit einer Größe von 205 bp.

3.3.3.4 Typisierung der Isolate mittels RAPD

Wie in Kapitel 2.6.4 beschrieben, wurden 44 *M.-xenopi*-Isolate mittels RAPD genotypisiert. Alle Isolate wurden jeweils mit den in Kapitel 2.6.4 beschriebenen fünf Primern untersucht. Hierbei zeigte sich, dass alle Isolate der Gruppen "Düsseldorfer Wasserisolate" und "Düsseldorfer Patientenisolat" klonal eng miteinander verwandt waren. Die drei Regensburger Patientenisolat unterschieden sich dagegen sowohl von den Düsseldorfer Wasser- und Patientenisolaten als auch untereinander.

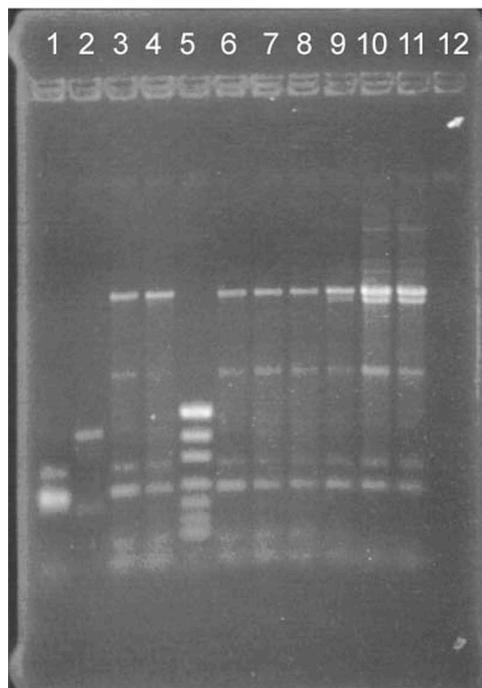
Repräsentative Ergebnisse der mit den Primern ZA, ZAP40, ZAP40m, Stenmal 270 und Stenmal 272 erzielten RAPD-Bandenmuster sind in den Abbildungen 11a-11e dargestellt. Aufgetragen sind in den abgebildeten Agarose-Gelen die Bandenmuster jeweils derselben Isolate, untersucht mit den unterschiedlichen Primern. Tabelle 6 zeigt das Beladeschema der in den Abbildungen 11a-e abgebildeten Gele

Tabelle 6 Probenbeladungsschema für die jeweiligen Agarosegele der RAPD.

Gelspur	Herkunft der <i>M. xenopi</i> Isolate	Bezeichnung der <i>M.-xenopi</i> -Isolate
1	Patientenisolat Regensburg	219
2	Patientenisolat Regensburg	185
3	Patientenisolat Regensburg	192
4	Referenzstamm	NCTC 10042 ^t
5	Längenstandard	pUC19
6	Wasserisolat Düsseldorf	BN 3131
7	Wasserisolat Düsseldorf	BN 3132
8	Wasserisolat Düsseldorf	BN 3579
9	Patientenisolat Düsseldorf	BN 3409
10	Patientenisolat Düsseldorf	BN 3412
11	Patientenisolat Düsseldorf	BN 3415
12	Negativ-Kontrolle	Negativ-Kontrolle

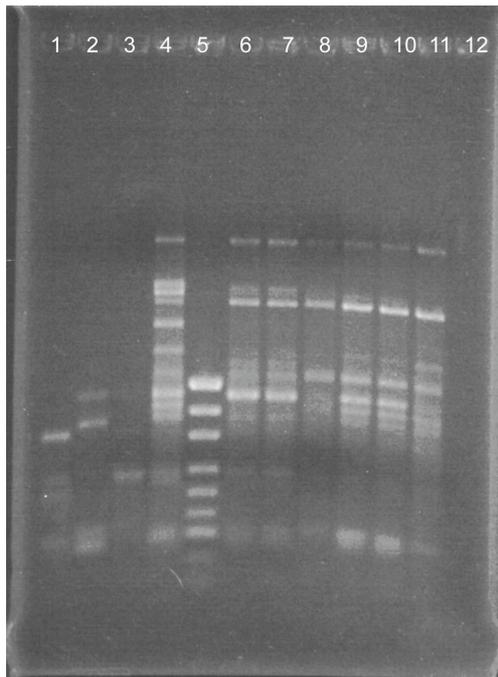
NCTC = National Collection of Type Cultures, London

Abbildung 11a Gel mit RAPD-Bandenmustern der in Tabelle 6 aufgelisteten *M. xenopi*-Isolate, bei Verwendung von Primer ZA



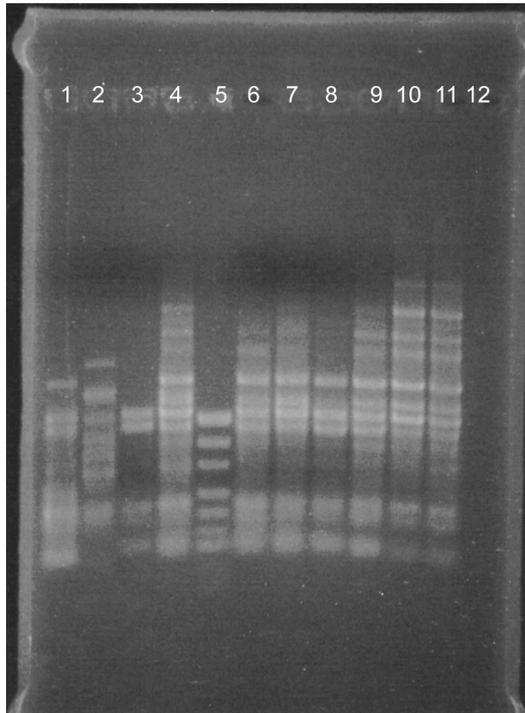
Die RAPD-Bandenmuster von zwei der Regensburger Patientenisolate (Gelspur 1 und 2) unterscheiden sich deutlich von den anderen Mustern. Das Regensburger-Isolat 192 (Gelspur 3) und die Düsseldorfer Isolate (Gelspuren 6-11) zeigen dagegen keine wesentlichen Unterschiede zum Referenzstamm (Gelspur 4).

Abbildung 11b Gel mit RAPD-Bandenmustern der in Tabelle 6 aufgelisteten *M. xenopi*-Isolate, bei Verwendung von Primer ZAP40



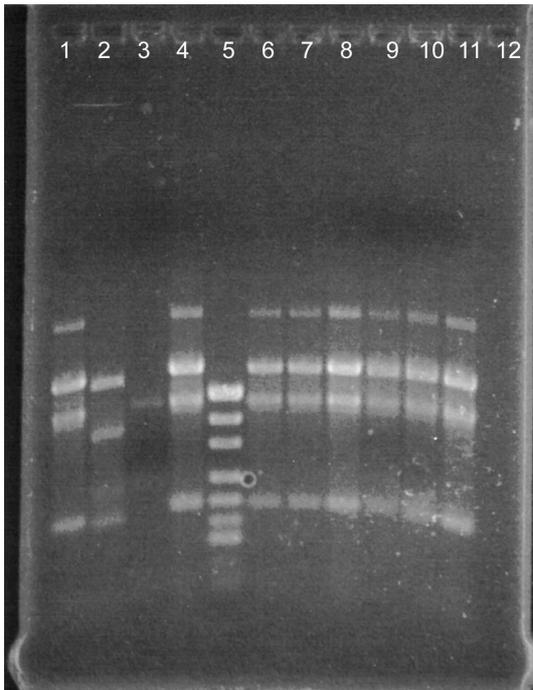
Die RAPD-Bandenmuster der drei Regensburger Patientenisolate (Gelspur 1, 2 und 3) unterscheiden sich deutlich von den anderen Mustern. Gleiches betrifft auch den Referenzstamm (Gelspur 4), der sich ebenfalls durch zusätzliche Banden von den anderen Mustern abhebt. Die Düsseldorfer Isolate (Gelspuren 6-11) weisen keine wesentlichen Unterschiede untereinander auf, zeigen aber deutliche Unterschiede zu den anderen Mustern (Gelspuren 1, 2, 3 und 4).

Abbildung 11c Gel mit RAPD-Bandenmustern der in Tabelle 6 aufgelisteten *M. xenopi*-Isolate, bei Verwendung von Primer ZAP40m



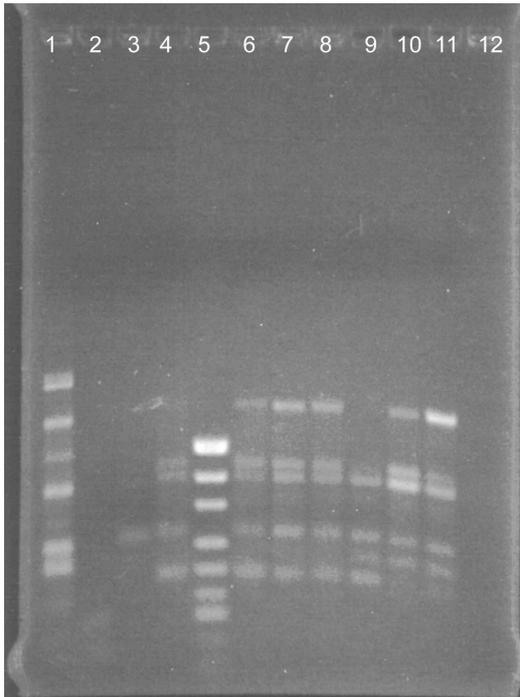
Die RAPD-Bandenmuster der drei Regensburger Patientenisolat (Gelspur 1, 2 und 3) unterscheiden sich deutlich von den anderen Mustern. Die Düsseldorfer Isolate (Gelspuren 6-11) zeigen dagegen keine wesentlichen Unterschiede untereinander und zum Referenzstamm (Gelspur 4).

Abbildung 11d Gel mit RAPD-Bandenmustern der in Tabelle 6 aufgelisteten *M. xenopi*-Isolate, bei Verwendung von Primer Stenmal 270



Die RAPD-Bandenmuster von dem Regensburger-Isolat 192 (Gelspur 3) unterscheiden sich deutlich von den anderen Mustern. Die zwei weiteren Regensburger Patientenisolate (Gelspur 1 und 2) unterscheiden sich nur geringfügig von den anderen Mustern. Die Düsseldorfer Isolate (Gelspuren 6-11) zeigen keine Unterschiede untereinander und zum Referenzstamm (Gelspur 4).

Abbildung 11e Gel mit RAPD-Bandenmustern der in Tabelle 6 aufgelisteten *M. xenopi*-Isolate, bei Verwendung von Primer Stenmal 272



Die RAPD-Bandenmuster der drei Regensburger Patientenisolate (Gelspur 1, 2 und 3) zeigen deutliche Unterschiede zu den anderen Mustern. Die Düsseldorfer Isolate (Gelspuren 6-11) zeigen dagegen keine wesentlichen Unterschiede untereinander zum Referenzstamm (Gelspur 4).

3.4 Belastung eines ERDA mit definierten, hohen *M.-xenopi*-Konzentrationen

3.4.1 Vorversuche zur Herstellung definierter *M.-xenopi*-Konzentrationen

Aus der Testsuspension wurden drei Verdünnungsreihen (1, 2, 3) hergestellt und aus den einzelnen Verdünnungsstufen jeweils 0,1 ml dreifach ausplattiert (A, B, C).

Nach 24h Stunden bei Raumtemperatur wurden diese Verdünnungsstufen erneut dreifach ausplattiert.

Dieses Procedere wurde auf gleiche Weise mit *M. chelonae* durchgeführt.

Genauere Hintergründe dieses Verfahrens siehe Kapitel 2.7.1.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der *M.-xenopi*-Verdünnungsreihen aufgeführt (s. Tabelle 7):

Tabelle 7 Quantitative Ergebnisse der *M.-xenopi*-Testsuspension, Verdünnungsreihen 1, 2, 3 jeweils Ansatz A, B, C. Für die einzelnen Verdünnungsstufen wird die jeweils ermittelte Zahl der koloniebildenden Einheiten je 0,1 ml wiedergegeben:

Ansatz	Verd.-st. 10^{-4}	Verd.-st. 10^{-5}	Verd.-st. 10^{-6}	Verd.-st. 10^{-7}	Verd.-st. 10^{-8}
1A	+++	484	42	4	1
1B	+++	520	44	3	1
1C	+++	364	42	5	-
2A	+++	468	44	2	-
2B	+++	440	37	4	1
2C	+++	420	41	4	-
3A	+++	424	42	6	-
3B	+++	480	37	2	1
3C	+++	312	34	-	-

Verd.-st. = Verdünnungsstufe, +++ = dichter Bakterienrasen, - = kein Wachstum

Aus den in der obenstehenden Tabelle 7 angegebenen Koloniezahlen errechnet sich ein gewichtetes Mittel von $4,08 \times 10^8$ KBE/ml in der Ausgangssuspension.

Es folgen die Ergebnisse des erneuten Ausplattierens nach 24 h Ruhephase bei Raumtemperatur (s. Tabelle 8):

Tabelle 8 Quantitative Ergebnisse der *M.-xenopi*-Testsuspension nach 24 h Ruhephase: Verdünnungsreihen 1, 2, 3 jeweils Ansatz A, B, C. Für die einzelnen Verdünnungsstufen wird die jeweils ermittelte Zahl der koloniebildenden Einheiten je 0,1 ml wiedergegeben:

Ansatz	Verd.-st. 10^{-4}	Verd.-st. 10^{-5}	Verd.-st. 10^{-6}	Verd.-st. 10^{-7}	Verd.-st. 10^{-8}
1A	+++	376	38	6	-
1B	+++	380	51	6	1
1C	+++	392	66	9	-
2A	+++	244	22	5	-
2B	+++	280	26	3	-
2C	+++	328	16	4	-
3A	+++	264	31	1	-
3B	+++	228	34	2	-
3C	+++	248	39	4	-

Verd.-st. = Verdünnungsstufe, +++ = dichter Bakterienrasen, - = kein Wachstum

Aus den in der obenstehenden Tabelle 8 angegebenen Koloniezahlen errechnet sich nach der 24-stündigen Ruhephase ein gewichtetes Mittel von $3,69 \times 10^8$ KBE/ml in der Ausgangssuspension.

Nachfolgend werden die Ergebnisse der *M. chelonae*-Verdünnungsreihen dargestellt (s. Tabelle 9):

Tabelle 9 Quantitative Ergebnisse der *M.-chelonae*-Testsuspension: Verdünnungsreihen 1, 2, 3 jeweils Ansatz A, B, C. Für die einzelnen Verdünnungsstufen wird die jeweils ermittelte Zahl der koloniebildenden Einheiten je 0,1 ml wiedergegeben:

Ansatz	Verd.-st. 10^{-4}	Verd.-st. 10^{-5}	Verd.-st. 10^{-6}	Verd.-st. 10^{-7}	Verd.-st. 10^{-8}
1A	+++	440	35	3	-
1B	+++	524	34	4	-
1C	+++	540	20	3	-
2A	+++	544	57	3	-
2B	+++	440	51	5	-
2C	+++	520	52	4	-
3A	+++	376	35	2	-
3B	+++	356	37	3	-
3C	+++	360	34	2	-

Verd.-st. = Verdünnungsstufe, +++ = dichter Bakterienrasen, - = kein Wachstum

Aus den in der obenstehenden Tabelle 9 angegebenen Koloniezahlen errechnet sich ein gewichtetes Mittel von $3,91 \times 10^8$ KBE/ml in der Ausgangssuspension.

Es folgen die Ergebnisse des erneuten Ausplattierens nach 24 h Ruhephase bei Raumtemperatur (s. Tabelle 10):

Tabelle 10 Quantitative Ergebnisse der *M.chelonae*-Testsuspension nach 24 h Ruhephase: Verdünnungsreihen 1, 2, 3 jeweils Ansatz A, B, C. Für die einzelnen Verdünnungsstufen wird die jeweils ermittelte Zahl der koloniebildenden Einheiten je 0,1 ml wiedergegeben:

Ansatz	Verd.-st. 10^{-4}	Verd.-st. 10^{-5}	Verd.-st. 10^{-6}	Verd.-st. 10^{-7}	Verd.-st. 10^{-8}
1A	+++	252	52	4	-
1B	+++	204	51	4	-
1C	+++	208	32	3	-
2A	+++	270	40	4	-
2B	+++	224	64	3	-
2C	+++	250	42	4	-
3A	+++	216	24	2	-
3B	+++	220	20	1	-
3C	+++	240	21	2	-

Verd.-st. = Verdünnungsstufe, +++ = dichter Bakterienrasen, - = kein Wachstum

Aus den in der obenstehenden Tabelle 10 angegebenen Koloniezahlen errechnet sich nach der 24-stündigen Ruhephase ein gewichtetes Mittel von $2,88 \times 10^8$ KBE/ml in der Ausgangssuspension.

3.4.1.1 Versuchsreihe A

Die an Entnahmestelle I gewonnenen Proben dienten zur Überprüfung der in den 60 L-Behälter eingesetzten *M.-xenopi*-Suspensionen. In der nachfolgenden Tabelle werden die Ergebnisse der in Versuchsreihe A an der Entnahmestelle I erhaltenen Kolonieanzahl auf den Agarplatten dargestellt.

Tabelle 11 *M.-xenopi*-Koloniezahlen der in Versuchsreihe A an Entnahmestelle I entnommenen Probevolumina:

DL KBE/ml PV (ml)	1 0	2 $3,3 \times 10^{-2}$	3 $3,3 \times 1$	4 $3,3 \times 10^2$	5 $3,3 \times 10^4$	6 $3,3 \times 10^6$
1000	n.e.	+	+++	n.e.	n.e.	n.e.
100	-	1	260	n.e.	n.e.	n.e.
10	n.e.	-	23	+++	n.e.	n.e.
1	-	n.e.	2	360	n.e.	n.e.
10^{-1}	n.e.	n.e.	-	40	+++	n.e.
10^{-2}	n.e.	n.e.	-	3	260	n.e.
10^{-3}	n.e.	n.e.	n.e.	-	22	+++
10^{-4}	n.e.	n.e.	n.e.	-	1	+++
10^{-5}	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	-	89
10^{-6}	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	-	9
10^{-7}	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	-
10^{-8}	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	-
Berechnete <i>M.-xenopi</i> -Konzentration (KBE/ml)	-	-	$2,6 \times 1$	$3,6 \times 10^2$	$2,6 \times 10^4$	$8,9 \times 10^6$

ES = Entnahmestellen, DL = Durchlauf mit erwarteter *M.-xenopi*-Konzentration, KBE/ml = *M.-xenopi*-Konzentration im Boiler, PV = Probevolumen, n.e. = nicht entnommen, +++ = dichter Bakterienrasen, + = wenig dichter Bakterienrasen, - = kein Wachstum

Wie bereits oben erwähnt, dienten die an Entnahmestelle I gewonnenen Proben zur Überprüfung der in den 60 L-Behälter eingesetzten *M. xenopi*-Suspensionen. Das

Kolonienwachstum auf den ausplattierten Platten entsprach ungefähr den erwarteten *M. xenopi*-Konzentrationen. Abweichungen ergeben sich aus den eingesetzten Verfahren (z.B. Probeentnahmeverfahren, bei dem die Sedimentierung der Bakterien eine wichtige Rolle spielt). Durch das Sedimentieren entsteht vermutlich ein Konzentrationsgefälle im Boiler.

In der folgenden Tabelle 12 sind die Ergebnisse der in Versuchsreihe A erhaltenen Koloniezahlen an den Entnahmestellen II und III auf den Agarplatten dargestellt.

Tabelle 12 *M. xenopi*-Wachstum in den an Entnahmestellen II und III in Versuchsreihe A entnommenen Proben (Probevolumina jeweils 1ml und 100ml)

DL KBE/ml ES (PV in ml)	1 0	2 $3,3 \times 10^{-2}$	3 $3,3 \times 1$	4 $3,3 \times 10^2$	5 $3,3 \times 10^4$	6 $3,3 \times 10^6$
II (1ml)	-	-	-	-	-	+
II (100ml)	-	-	-	-	-	+
III (1ml)	-	-	-	-	-	-
III (100ml)	-	-	-	-	-	-

ES = Entnahmestellen, PV = Probevolumen, KBE/ml = koloniebildende Einheiten je ml, DL = Durchlauf und erwartete KBE-Konzentration der jeweils eingesetzten *M. xenopi*-Suspension, + = wenig Bakterienwachstum, - = kein Wachstum

Aus Entnahmestelle II wurden in Durchlauf 6 (im Boiler eingesetzte *M. xenopi*-Konzentration $3,3 \times 10^6$ KBE/ml) und auch in Durchlauf 5 (im Boiler eingesetzte *M. xenopi*-Konzentration $3,3 \times 10^4$ KBE/ml) *M. xenopi* nachweisen. In den Proben der Entnahmestelle III wurden keine Bakterien nachgewiesen.

3.4.1.2 Versuchsreihe B

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Versuchsreihe B dargestellt, der methodisch wie Versuchsreihe A durchgeführt wurde, mit höheren Bakterienkonzentrationen der eingesetzten *M.-xenopi*-Suspension. Die Auswertung der sechs Durchläufe der Versuchsreihe B erfolgte rein qualitativ (s. Tabelle 13):

Tabelle 13 *M.-xenopi*-Koloniezahlen der in Versuchsreihe B an Entnahmestelle I entnommenen Probevolumina:

DL KBE/ml PV (ml)	1 0	2 $3,3 \times 10^1$	3 $3,3 \times 10^2$	4 $3,3 \times 10^3$	5 $3,3 \times 10^4$	6 $3,3 \times 10^5$
100	-	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
10	n.e.	+++	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
1	n.e.	+	+	n.e.	n.e.	n.e.
10^{-1}	n.e.	+	+	+	+	n.e.
10^{-2}	n.e.	+	+	+	+	+
10^{-3}	n.e.	-	+	+	+	+
10^{-4}	n.e.	n.e.	-	+	+	+
10^{-5}	n.e.	n.e.	n.e.	+	+	+
10^{-6}	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	-	+
10^{-7}	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	+

ES = Entnahmestellen, PV = Probevolumen, KBE/ml = koloniebildende Einheiten je ml, DL = Durchlauf und erwartete KBE-Konzentration der jeweils eingesetzten *M.-xenopi*-Suspension, n.e. = nicht entnommen, +++ = dichter Bakterienrasen, + = wenig dichter Bakterienrasen, - = kein Wachstum

Die an Entnahmestelle I entnommenen Proben dienten, wie in Versuchsreihe A, zur Überprüfung der in den 60 L-Behälter eingesetzten *M.-xenopi*-Suspensionen. Durch die ausschließlich qualitative Auswertung erhielten wir Information über das Vorkommen lebender Bakterien in der Suspension, das wir mit den Angaben +, ++, +++ näher quantifizierten.

Nachfolgend sind die Ergebnisse der an Entnahmestelle II und III entnommenen Proben dargestellt (s. Tabelle 14).

Tabelle 14 *M. xenopi*-Wachstum in den an Entnahmestellen II und III in Versuchsreihe B entnommenen Proben (Probepolumina jeweils 1ml und 100ml)

ES \ DL KBE/ml	1	2	3	4	5	6
	0	$3,3 \times 10^1$	$3,3 \times 10^2$	$3,3 \times 10^3$	$3,3 \times 10^4$	$3,3 \times 10^5$
II	-	-	-	-	-	+
III	-	-	-	-	-	-

ES = Entnahmestellen, PV = Probepolumen, KBE/ml = koloniebildende Einheiten je ml, DL = Durchlauf und erwartete KBE-Konzentration der jeweils eingesetzten *M. xenopi*-Suspension, + = wenig Bakterienwachstum, - = kein Wachstum

Wie auch schon in Versuchsreihe A konnten wir an Entnahmestelle II bei der höchsten Bakterien-Konzentration in Durchlauf 6 (im Boiler eingesetzte *M. xenopi*-Konzentration $3,3 \times 10^5$ KBE/ml) *M. xenopi* nachweisen. Auch in Versuchsreihe B wurden in den Proben der Entnahmestelle III keine Bakterien nachgewiesen.

4. Diskussion

Ziel meiner Arbeit war es die seit 1994 ungewöhnliche Häufung des Nachweises von *M. xenopi* im Patientenmaterial eines Krankenhauses zu erklären. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich im Wesentlichen um eine Pseudoepidemie durch Probenkontamination mit Leitungswasser handelte, das im betroffenen Krankenhaus nachweislich mit *M. xenopi* kolonisiert war. Diese Hypothese wurde durch die Tatsache unterstützt, dass sich bei den meisten Patienten nur Einzelisolate nachweisen ließen und dass sich bei den retrospektiv überprüften Akten von Patienten mit mehr als einem *M.-xenopi*-Isolat keine klaren Anzeichen für eine tatsächliche *M.-xenopi*-Infektion fanden. Weiterhin waren zum größten Teil bronchoskopisch gewonnene Proben betroffen, so dass der Verdacht aufkam, dass die Proben durch unzureichend aufbereitete Bronchoskope kontaminiert worden waren. Im Vordergrund der vorliegenden Arbeit stand daher die Frage nach effektiven Aufbereitungsmaßnahmen für Bronchoskope, bzw. andere Endoskope.

Vor diese Situation sahen sich bereits auch andere Krankenhäuser gestellt. Im Juni 1991 kam es in einem Krankenhaus in Michigan, USA zu einer Zunahme von *M.-xenopi*-Isolaten aus Patientenmaterial. Diese wurde basierend auf molekularbiologischen Typisierungsverfahren als Pseudoepidemie eingestuft [8]. Auch dort wurde zur Beendigung dieses Phänomens eine Verbesserung der Desinfektion gefordert.

Im untersuchten Krankenhaus ergab sich aus der Tatsache des mit *M. xenopi* kolonisierten Warmwassersystems der Verdacht auf das Vorliegen einer Pseudoepidemie. Auffällig ist, dass das natürliche Habitat von *M. xenopi* nach wie vor unbekannt ist [62]. Hingegen ist das Vorkommen von *M. xenopi* in künstlichen aquatischen Habitaten und hier besonders in erwärmten Trink- und Leitungswasser hinlänglich bekannt [4, 16, 29, 38, 39, 74].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit entnahm ich insgesamt 50 Wasserproben und 100 Bronchoskopproben. Aus zehn dieser Wasserproben isolierte ich Bakterien. Diese charakterisierte ich mit verschiedenen chemotaxonomischen und

molekularbiologischen Differenzierungsmethoden als *M. xenopi*. Entsprechende Positivkontrollen (Wasserproben aus dem betroffenen Krankenhaus und *M.-xenopi*-Referenzstamm) und Negativkontrollen (nicht mit *M. xenopi* versehene WSH-Proben und andere Mykobakterienspezies) lieferten die erwarteten positiven bzw. negativen Ergebnisse. Damit ist die angewandte Methodik als valide für den kulturellen Nachweis und die Differenzierung von *M. xenopi* anzusehen.

Einen weiteren Verdacht auf das Vorliegen einer Pseudoepidemie lieferte der bisherige Verlauf der „Epidemie“ (s. Abbildung 8):

Die 1997 durchgeführte Sanierung des Warmwassersystems, bei der Sedimente in den Warmwasserspeichern entfernt wurden und die Warmwasser-Temperatur angehoben wurde, führte zu einer deutlich verminderten Anzahl positiver *M.-xenopi*-Befunde. Der Zusammenhang zwischen der Sanierung des Warmwassersystems und dem Rückgang der Anzahl der *M.-xenopi*-Isolate aus Patientenmaterial nach der Sanierung wurde nicht anhand einer systematischen Wasserprobenanalyse bewiesen. Der Verlauf der Anzahl der *M.-xenopi*-Isolate aus Patientenmaterial (s. Abbildung 8) legt diese Vermutung allerdings nahe.

Die 1999 durchgeführte Intervention, die alkoholische Desinfektion der Bronchoskope nach der Aufbereitung in den ERDAs, hatte kaum Auswirkung auf die Anzahl der positiven *M.-xenopi*-Befunde. Dies ist wahrscheinlich auf die aus Zeitgründen nicht immer regelrechte Durchführung der alkoholischen Desinfektion zurückzuführen. Fraglich ist, ob diese Desinfektionsmaßnahmen tatsächlich nach jeder Aufbereitung erfolgten, ob alle kritischen Bereiche der Bronchoskope behandelt wurden und ob die Einwirkzeit ausreichte. Bekannt ist auch, dass Alkohol nur in bestimmten Konzentrationen (zwischen 50 und 70 %) in wässriger Lösung effektiv bakterizid wirkt [21]. Außerdem erschwert der besondere Aufbau der Zellwand der Mykobakterien die keimtötende Wirkung des Alkohols [43]. Zusätzlich schränkt die komplexe Konstruktion des Bronchoskops, mit ihren vielen schwer zugänglichen Stellen, die Wirksamkeit der Desinfektion ein.

Anfang 2000 erfolgte eine erneute Intervention mit einer Aufklärung des Personals über die Kontaminationsmöglichkeit der klinischen Proben mit *M. xenopi* durch Leitungswasser und der Aufstellung zweier neuer ERDAs mit neuen,

unterschiedlichen Spülwasseraufbereitungsmethoden (UV-Behandlung mit 254nm, bzw. thermische Behandlung mit 94°C, s. Kapitel 2.2). Diese Maßnahme erfolgte aufgrund der Vermutung, dass in den vorher verwendeten ERDAs eine Kontamination der Bronchoskope durch das im letzten Spülgang verwendete unbehandelte Leitungswasser aus dem mit *M. xenopi* besiedelten Warmwassersystem des betroffenen Krankenhauses stattfinden konnte. Seit diesem Zeitpunkt sind bis Juli 2003 mit Ausnahme einer Isolation zu Beginn der Testphase keine weiteren *M. xenopi* nachgewiesen worden. Die Beendigung des gehäuften Nachweises von *M. xenopi* durch das Einsetzen dieser neuen ERDAs spricht für die Effektivität der thermischen bzw. UV-Desinfektion der ERDAs.

Mit Ausnahme elf weiterer Fälle im ersten Quartal und eines weiteren extrapulmonalen Falles im zweiten Quartal 2000 wurden bis Juli 2003 bei keinem weiteren Patienten des Krankenhauses *M. xenopi* nachgewiesen. Die elf Fälle im ersten Quartal 2000 sind durch Probenentnahmen vor Inbetriebnahme der neuen ERDAs Ende Februar 2000 zu erklären. Den einzelnen Fall im zweiten Quartal 2000 würde ich am ehesten auf eine nicht sachgemäße Säuberung des benutzten Bronchoskopes bzw. Probengefäßes zurückführen.

Die im diagnostischen Tbc-Labor gewonnenen Daten waren eine weitere Bestätigung für das Vorliegen einer Pseudoepidemie. Die meisten *M.-xenopi*-Isolationen waren Einfach-Isolationen, ohne klinische Infektionszeichen der Patienten. Bei 20 Patienten waren es jedoch mehr als zwei Isolationen. Anhand der Krankengeschichte dieser Patienten aus dem Archiv des Krankenhauses stellte ich fest, dass bei diesen Patienten wegen ihrer Grunderkrankungen sehr häufig bronchoskopische Interventionen durchgeführt wurden. Damit war die Wahrscheinlichkeit einer Positivprobe erhöht.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wasserisolate und die Patientenisolate mit Hilfe eines geeigneten Genotypisierungsverfahren miteinander verglichen. Zusätzlich wurden einzelne Patientenisolate des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg zum Vergleich herangezogen.

Zwischen den Wasserisolaten und den Patientenisolaten der Universität Düsseldorf bestanden keine Hinweise auf klonale Diversität (hsp65- RFLP und 16S-23S-Spacer-RFLP, RAPD). Die genotypischen Unterschiede zu den Regensburger Patientenisolaten erklären sich aus der Tatsache, dass das Tuberkulose-Labor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg seine Einsendungen aus einem großen Einzugsgebiet bezieht und *M.-xenopi*-Isolationen aus Patientenmaterial normalerweise eine solche Rarität sind, dass ein epidemiologischer Zusammenhang unwahrscheinlich ist. Die eng verwandten RAPD-Muster aller Düsseldorfer Isolate (Patienten- und Umweltisolate) sprechen dagegen für einen solchen epidemiologischen Zusammenhang.

Retrospektiv war es nur schwer möglich, die Krankenakten der Patienten mit positiven *M.-xenopi*-Isolaten in Hinblick auf eine tatsächliche Infektion auszuwerten. Somit ist das Vorliegen einer Epidemie nicht sicher auszuschließen. Jedoch erscheint in Zusammenschau aller vorliegenden Fakten eine Pseudoepidemie in hohem Maße wahrscheinlich.

Bei einem Nachweis von *M. xenopi*-Isolaten aus Patientenmaterial sollte man aber auch immer eine mögliche Infektion in Betracht ziehen. Wie in der Literatur beschrieben, sind selbst Fälle von *M.-xenopi*-Epidemien nicht unbekannt. So wird beispielsweise das Vorkommen von großen Mengen *M. xenopi* im Klärschlamm einer ungarischen Kläranlage beschrieben, durch denn es offenbar (durch das Ausbringen dieses Klärschlammes auf Felder in der Landwirtschaft) auf aerogenem Weg bei 21 Personen zu manifesten und bei 52 Personen zu asymptomatischen pulmonalen *M.-xenopi*-Infektionen kam [62].

Ausgehend von einer Epidemie bzw. Pseudoepidemie in dem untersuchten Krankenhaus mit *M. xenopi* durch verunreinigtes Leitungswasser stellt sich die Frage nach Maßnahmen zur Beendigung dieser Epidemie bzw. Pseudoepidemie.

Die Effektivität der UV-Desinfektion von Trinkwasser war zwar bislang mit verschiedenen Bakterien getestet worden [44], nicht aber mit *M. xenopi*. In Erwägung gezogen werden musste eine UV-Resistenz von *M. xenopi* aufgrund seiner Pigmentierung. *M. xenopi* ist auch aufgrund seiner bekannten

Thermoresistenz in diesem Zusammenhang von Interesse [61, 74]. Die Elimination von *M. xenopi* in ERDAs wurde bislang jedoch noch nicht untersucht.

In einem Laborversuch konnte ich die Effektivität des Aufbereitungsverfahrens durch thermische Behandlung in dem Innova 2000 der Firma BHT durch die Belastung mit ungewöhnlich hohen Konzentrationen von *M. xenopi* testen. Leider war ein solcher Belastungstest der UV-Behandlung in dem ERDA ETD 2 plus der Firma Olympus nicht möglich.

Nach einer Reihe von Vorversuchen war es mir gelungen eine definierte Konzentration von *M.-xenopi*-Suspensionen herzustellen, mit denen wir den ERDA befüllten. Die *M.-xenopi*-Konzentrationen reichten bis zu einer Konzentration von 10^6 KBE/ml im Boiler des ERDAs, in dem die thermische Aufbereitung erfolgt.

Selbst diese hochkonzentrierten Bakteriensuspensionen, die in dieser Höhe sehr wahrscheinlich nie im Leitungswasser zu finden sein werden, wurden durch die thermische Aufbereitung bis zu einer *M.-xenopi*-Konzentration von 10^4 KBE/ml erfolgreich abgetötet.

Für die an Entnahmestelle II bei den beiden Durchläufen mit den höchsten Bakterienkonzentrationen isolierten wenigen *M. xenopi* gibt es zwei mögliche Erklärungen.

Eine Ursache könnte eine Kontamination der Entnahmestelle, bzw. der Strecke zwischen Auslauf aus dem Boiler und Entnahmestelle II sein.

Eine andere Erklärung könnte die bei der hohen Bakterienkonzentration nicht mit ausreichender Sicherheit funktionierende thermische Desinfektion sein.

Der fehlende Nachweis von *M. xenopi* an Entnahmestelle III (die im räumlichen und zeitlichen Ablauf hinter der Entnahmestelle II liegt) ist nicht eindeutig zu erklären. Ausgehend von der Hypothese der bei hohen *M.-xenopi*-Konzentrationen nicht mit ausreichender Sicherheit funktionierende thermische Desinfektion, die den Nachweis von *M. xenopi* an Entnahmestelle II erklären würde, müsste an Entnahmestelle III auch *M. xenopi* nachzuweisen sein. Im letzten Spülgang der ERDAs wurden keine chemischen Desinfektionsmittel verwendet, die den fehlenden Nachweis von *M. xenopi* an Entnahmestelle III durch zusätzliche Einwirkung von chemischer Desinfektion auf die Bakterien erklären könnte.

Eine andere mögliche Erklärung des fehlenden Nachweises von *M. xenopi* an entnahmestelle III wäre eine Verdünnung des mit *M. xenopi* kontaminierten Wassers in der Spülkammer des ERDA durch in der Pumpe bzw. Wasserleitungen verbliebenes Wasser des vorhergehenden Durchlaufes.

Die Effektivität der beiden Wasseraufbereitungsverfahren der ERDAs wurde im klinischen Ablauf durch das Ausbleiben neuer *M.-xenopi*-Isolationen sowohl in Patienten- als auch Bronchskop- und ERDA-Proben seit Inbetriebnahme dieser Geräte eindrucksvoll bewiesen. Damit stellte sich auch das nicht im Laborversuch getestete System der UV-Aufbereitung in der ETD 2 plus, zumindest im klinischen Alltag, als ausreichend effektiv dar. Bei Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse wäre der Austausch aller ERDAs ohne thermische oder UV-Wasseraufbereitungsanlage für alle Bronchoskopien durchführende Krankenhäuser und Arztpraxen empfehlenswert. Die mögliche Kontamination der Patientenproben bzw. die mögliche Infizierung von Patienten und die damit verbundenen Konsequenzen wären dadurch mit hoher Wahrscheinlich zu vermeiden.

Der Vergleich der zwei parallel angewandten Verfahren zur Dekontamination der Proben (Cetylpyridiniumchlorid und KCl/HCl-Puffer, s. Kapitel 2.5.2.1) zeigt eine Überlegenheit des KCl/HCl-Puffers, da ich aus keiner der mit CPC dekontaminierten Proben *M. xenopi* isolieren konnte. Der Ansatz für beide Verfahren erfolgte mit Leitungswasserproben aus dem gleichen Probengefäß. Die zehn positiven *M.-xenopi*-Isolate stammten alle aus Proben, die mit KCl/HCl-Puffer dekontaminiert worden waren.

Deswegen ist davon auszugehen, dass die Dekontamination mit 0,01%iger-CPC-Lösung *M. xenopi* irreversibel schädigt, so dass es zu keinem Wachstum mehr kommt. Diese Vermutung wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass die Probenansätze bei Dekontamination mit HCl/KCl-Puffer häufiger mit nicht-mykobakterieller Begleitflora kontaminiert wurden als bei Verwendung von CPC. Daraus folgt, dass die Verwendung von HCl/KCl-Puffer ein milderes Inaktivierungsverfahren darstellt.

Bei der kulturellen Anzucht hängt die Mykobakterienausbeute von der Bebrütungstemperatur, dem Dekontaminationsverfahren und dem Kulturmedium ab.

Dieser Zusammenhang wurde in der Dissertationsschrift von B. Ilg [34] bereits beschrieben.

Aufgrund der größeren Kontaminationsgefahr ist bei niedrigeren Temperaturen die Verwendung von CPC empfehlenswert. Dagegen ist HCl/KCl-Puffer als milderes Dekontaminationsmittel in Verbindung mit höheren Inkubationstemperaturen ($> 37^{\circ}\text{C}$) das geeignetere Mittel.

5. Zusammenfassung

Ziel meiner Arbeit war es die seit 1994 ungewöhnliche Zunahme des Nachweises von *M. xenopi* in Patientenmaterial eines Krankenhauses zu erklären und zu beenden. Dafür kam ursächlich das Vorliegen einer Pseudoepidemie oder Epidemie in Frage. Als Hauptursache wurde die Kontamination von Bronchoskopen bei der maschinellen Aufbereitung vermutet, bei der die Geräte abschließend mit Leitungswasser gespült wurden, das mit *M. xenopi* besiedelt war. Im Vordergrund stand daher die Frage nach Maßnahmen zur Aufbereitung von Bronchoskopen, die eine Elimination dieses fakultativ humanpathogenen, atypischen Mykobakteriums garantieren.

Anhand von Daten aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie des UKD stellte ich den zeitlichen Verlauf des gehäuften Nachweises von *M. xenopi* in Patientenmaterial dar.

Die Auswertung der dazugehörigen Patientenakten in Hinblick auf manifeste Infektion bzw. Behandlungsmaßnahmen sollten den Verlauf als Epidemie oder Pseudoepidemie charakterisieren. Eine eindeutige Charakterisierung war nicht möglich.

Die Patientenisolate wurden auf ihre mögliche Herkunft aus dem Warmwasserleitungssystem des betroffenen Krankenhauses untersucht. Dazu wurden die Wasser- und Patientenisolate (zum Vergleich auch Patientenisolate eines anderen Krankenhauses) mit Hilfe eines geeigneten molekularbiologischen Typisierungsverfahren verglichen. Die Untersuchung ergab eine klonale Übereinstimmung der Wasser- und Patientenisolate bzw. einen Unterschied zu den Isolaten des anderen Krankenhauses .

Der Versuch der Beendigung des gehäuften Auftretens von *M. xenopi* in Patientenmaterial durch die Aufstellung zweier Endoskopreinigungs- und Desinfektionsautomaten (ERDAs) im Jahre 2000 mit neuen Wasserdesinfektionsverfahren war erfolgreich. Dabei war sowohl das thermische als auch das UV-Desinfektionsverfahren effektiv. Bis Juli 2003 wurde in dem betroffenen

Krankenhaus *M. xenopi* nicht mehr aus respiratorischem Untersuchungsmaterial isoliert.

Auch in einem Labor-Belastungsversuch mit definierten, erhöhten *M.-xenopi*-Konzentrationen erwies sich das thermische Desinfektionsverfahren einer der ERDA bis zu einer Konzentration von 10^4 KBE/ml (koloniebildende Einheiten pro Milliliter) im Spülwasser als effektiv zur Elimination von Mykobakterien aus Wasser für die Endoskop-Aufbereitung.

6. Abkürzungsverzeichnis

BAL	Bronchoalveoläre Lavage
Bp	Basenpaare
CPC	Cetylpyridiniumchlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
ERDA	E ndoskop R einigungs- und D esinfektions A utomat
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
kDa	Kilodalton
Lsg.	Lösung
µl	Mikroliter
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OADC	Oleinsäure, Albumin, Dextrose und Katalase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PRA	PCR-Restrictionsanalyse
Prä-RNP	Prä-Ribonucleoproteinpartikel
PVC	Polyvinylchlorid
rDNA	ribosomale DNA
RFLP	R estriktions f ragment L ängen P olymorphismus
RNA	Ribonucleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
s	Sekunden
t	Zeit
TAE	Tris-Acetate-EDTA Puffer
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
UV	Ultraviolett
WSH	Wasser standardisierter Härte

7. Literaturverzeichnis

- [1] **Anonym 1 (1999)**
Bronchoscopy- Related Infections and Pseudoinfections [- New York, 1996 and 1998. In : Morb Mortal Wkly Rep. 48 (26): 557-560
- [2] **Anonym 2 (1991)**
Nosocomial Infection and Pseudoinfection from Contaminated Endoscopes and Bronchoscopes- Wisconsin and Missouri. In : Morb Mortal Wkly Rep. 40 (39): 675-678
- [3] **Anonym 3 (1982)**
DIN 5031 Teil 1: Strahlungsphysik im optischen Bereich und Lichttechnik;
Größen, Formelzeichen und Einheiten der Strahlungsphysik, Beuth Verlag Berlin
- [4] **Ausina V, Barrio J, Luquin M, et al (1988)**
Mycobacterium xenopi infections in the acquired immuno-deficiency syndrome.
Ann. Intern. Med. 109: 927-928
- [5] **Barksdale L, Kim KS (1977)**
Mycobacterium. Bacteriol Rev. 41: 217-372
- [6] **Beerwerth W, Eysing B, Kessel U (1979)**
Mykobakterien in Arthropoden verschiedener Biotope. Zbl Bakt Hyg. I Abt Orig A.
244: 50-57
- [7] **Belleguic C, Lena H, Desrues B, Delaval P (2001)**
Prevention of infection transmitted by bronchial fibroscopes. In: Rev Pneumol Clin. 57(2): 67-72
- [8] **Bennett SN, Peterson DE, Johnson DR, Hall WN, Robinson-Dunn B, Dietrich S (1994)**
Bronchoscopy-associated *Mycobacterium xenopi* Pseudoinfections. In: Am J Respire Crit Care Med. 150: 245-250

- [9] **Blanc DS, Parret T, Janin B, Raselli P, Francioli P (1997)**
Nosocomial infection and pseudoinfections from contaminated bronchoscopes: Two- year follow up using molecular markers. In: Infect-Control-Hosp-Epidemiol. 18(2): 134-6
- [10] **Böttger EC (1991)**
Systematik, Differenzierung und Nachweis von bakteriellen Infektionserregern - die Familie *Mycobacteriaceae*. Immun Infekt. 19: 143-152
- [11] **Brock TD, Madigan MT (1991)**
Biology of Mikroorganismen. Prentice Hall; Englewood Cliffs, New Jersey. 6: 785-786
- [12] **Burkhardt F (1992)**
Färbeverfahren. In: Burkhardt, F (Hrsg.): Mikrobiologische Diagnostik. Thieme; Stuttgart, New York
- [13] **Campbell NA (2000)**
Biologie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin 2. Aufl.
- [14] **Cetre JC, Salord H, Vanhems P (2003)**
Outbreaks of infection associated with bronchoscopes. In: N Engl J Med. 348(20): 2039-40
- [15] **Collins CH, Grange JM, Yates MD (1984)**
Mycobacteria in water. J Appl Bacteriol. 57: 193-211
- [16] **Costrini AM, Mahler DA, Gross WM, et al (1981)**
Clinical and roentgenologic features of nosokomial pulmonary disease due to *Mycobacterium xenopi*. Am. Rev. Respir. Dis. 123: 104-109
- [17] **Daffé M, Lanéle MA, Asselineau C, Lévy-Frébault V, David HL (1983)** Intéret taxonomique des acides gras des mycobactéries: proposition d'une méthode d'analyse. Ann Microbiol. (Inst. Pasteur) 134B: 241-256
- [18] **David HL, Lévy-Frébault V, Thorel MF (1989)**
Methodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique. Institut Pasteur, Paris

- [19] **Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS, Wood WB (1970)**
Microbiology. Hoeber Medical Division, New York, 6. Aufl.
- [20] **Dobson G, Minnikin DE, Minnikin SM, Parlett JH, Goodfellow M, Ridell M, Magnusson M (1985)**
Systematic Analysis of Complex Mycobacterial Lipids. In: Goodfellow M., Minnikin DE (eds.). Chemical methods in bacterial systematics. Academic Press, London 237-265
- [21] **Du Molin GC, Stottmeier KD (1978)**
Use of cetylpyridinium chloride in the decontamination of water for culture of mycobacteria. Appl Environ Microbiol. 36: 771-773
- [22] **Du Molin GC, Stottmeier KD (1986)**
Waterborne mycobacteria: an increasing threat to health. ASM News. 52: 525-529
- [23] **Fischer R, Schulze-Röbbecke R, Weber A (1991)**
Occurrence of mycobacteria in drinking water samples. Zbl Hyg. Umweltmed. 192: 154-158
- [24] **Flemming HC (1991)**
Biofilme und Wassertechnologie. I: Entstehung, Aufbau, Zusammensetzung und Eigenschaften von Biofilmen. gwf Wasser Abwasser. 132: 197-207
- [25] **Flemming HC (2003)**
Erfassung des Kontaminationspotenzials von Biofilmen in der Verteilung von Trinkwasser. In: Flemming HC (Hrsg). Erfassung des Wachstums und des Kontaminationspotenzials von Biofilmen in der Verteilung von Trinkwasser – Ergebnisse eines BMBF-Verbundprojektes. Berichte aus dem IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung gemeinnützige GmbH. 36: 1-26
- [26] **Gates FL (1930)**
Study of the Bactericidal Action of Light III, The Absorption of Ultraviolet Light by Bacteria. J. Gen. Phys. 14

-
- [27] **Good RC (1985)**
Opportunistic pathogens in the genus *Mycobacterium*. Ann Rev Microbiol. 39:
347-369
- [28] **Goodfellow M, Minnikin DE (1984)**
Circumscription of The Genus. In: Kubica GP and Wayne LG (eds.): The
Mycobacteria- a sourcebook. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel 1-24
- [29] **Graham L, Warren NG, Tsang AY, et al (1988)**
Mycobacterium avium complex pseudobacteriuria from a hospital water supply.
J. Clin. Mikrobiol. 26: 1034-1036
- [30] **Gruft H, Loder A, Osterhout M, Parker BC, Falkinham JO (1979)** Postulated
sources of *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium scrofulaceum*
infection: isolation of mycobacteria from estuaries and ocean water. Am Rev
Respir Dis. 120: 1385-1388
- [31] **Gürtler V, Mayall BC (2001)**
Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. In:
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51: 3-16
- [32] **Hamilton WA (1971)**
Membrane Active Antibacterial Compounds. In: Hugo W.B. (eds). Inhibition and
Destruction of The Microbial Cell. London, New York, Academic Press. 78-93
- [33] **Hinrikson HP, Pfyffer GE (1994)**
Mycobacterial mycolic acids. Med Microbiol Lett. 3: 49-57
- [34] **Ilg B (2003)**
Nachweis und Charakterisierung aquatischer Mykobakterien. Dissertationsarbeit,
math.-nat. Fakultät Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- [35] **Kiefer J (1997)**
Ultraviolette Strahlen. de Gruyter Verlag Berlin, S. V-VI
- [36] **Kolch A (1999)**
Abwasserdesinfektion mit UV-Strahlen. GIT-Verlag Darmstadt

- [37] **Kubalek I, Mysak J (1996)**
The prevalence of environmental mycobacteria in drinking water supply systems in a demarcated region in Czech Republic, in the period 1984-1989. Eur J Epidemiol. 12: 471-474
- [38] **Lavy A, Rusu R, Shaheen S (1990)**
Mycobacterium avium intracellulare in clinical specimens: ethiological factor or contaminant? Isr. J. Med. Sci. 26: 374-378
- [39] **Lévy-Frébault V, Goh KS, David HL (1983).**
Mycobacterium kansasii: contaminant du reseau d'eau potable d'un hopital. Rev. Epidémiol. Santé Publique 31: 11-20
- [40] **Lévy-Frébault V, Goh KS, David HL (1986).**
Mycolic acid analysis for clinical identification of *Mycobacterium avium* and related mycobacteria. J Clin Microbiol. 24: 835-839
- [41] **Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE (2001)**
Molekulare Zellbiologie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin 4. Aufl.
- [42] **Luquin M, Lanéelle MA, Ausina V, Garcia-Barcelo M, Belda F, Alonso C, Prats G (1991)**
Distribution of a novel mycolic acid in species of the genus *Mycobacterium*. Int J Syst Bacteriol. 41: 390-394
- [43] **Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2001)**
Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin 9. Aufl.
- [44] **Martiny H, Wlodavezyk K, Harms G, Rüden H (1988)**
Anwendung von UV-Strahlen zur Desinfektion von Wasser.
Zbl. Bakt. Hyg. B 185: 350-367
- [45] **Middlebrook G, Cohn ML (1958)**
Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. Am J Pub Heal. 48: 844-853

- [46] **Minnikin DE (1982)**
Lipids: complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. In: Ratledge C, Stanford J (eds.): The biology of the mycobacteria. Academic Press. London etc. 95-184
- [47] **Minnikin DE, Minnikin SM, Parlett JH, Goodfellow M, Magnusson M (1984)**
Mycolic acid patterns of some species of Mycobacterium. Arch Microbiol. 139: 225-231
- [48] **Neumann M, Schulze-Röbbecke R, Hagenau C, Behringer K (1997)**
Comparison of Methods for Isolation of Mycobacteria from Water. In: Applied and Environmental Microbiology. 63 (2): 547-552
- [49] **Petersen KF (1986)**
Atypische Mykobakterien - Konsequenzen für das Gesundheitsamt. Öff Gesundh-Wes. 48: 500-504
- [50] **Petit JF, Lederer E (1984)**
The Structure of The Mycobacterial Cell Wall. In: Kubica GP, Wayne LG (eds.): The Mycobacteria - a Sourcebook. Marcel Dekker, Inc, New York, Basel. 301-314
- [51] **Plaus WJ, Hermann G (1991)**
The surgical management of superficial infections caused by atypical mycobacteria. Surgery. 110: 99-103
- [52] **Portaels F, Larsson L, Smeets P (1988)**
Isolation of mycobacteria from healthy persons' stools. Int J Leprosy. 56: 468-471
- [53] **Ratledge C (1982)**
Lipids: cell compositions, fatty acid biosynthesis. In: Ratledge C, Stanford J (eds.): The biology of the Mycobacteria; vol. 1, Physiology, identification, classification. Academic Press, London 53-93
- [54] **Ridgway HF, Justice CA, Whittaker C, Argo DG, Olson BH (1984)** Biofilm fouling of RO membranes – its nature and effect on treatment of water for reuse. J Amer Water Works Assoc. 76: 94-102

- [55] **Rogall T, Wolters J, Flohr T, Böttger EC (1990)**
Towards a phylogeny and detection of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Int J Syst Bacteriol.* 40: 323-330
- [56] **Roth A, Fischer M, Hamid ME, Michalke S, Ludwig W, Mauch H (1998)**
Differentiation of Phylogenetically Related Slowly Growing *Mycobacteria* Based on 16S-23S rRNA Gene Internal Transcribed Spacer Sequences. In: *Journal of Clinical Microbiology.* 36 (1): 139-147
- [57] **Roth A, Reischl U, Streubel A, Naumann L, Kroppenstedt RM, Habicht M, Fischer M, Mauch H (2000)**
Novel Diagnostic Algorithm for Identification of *Mycobacteria* Using Genus-Specific Amplification of the 16S-23S rRNA Gene Spacer and Restriction Endonucleases. In: *Journal of Clinical Microbiology.* 38 (3): 1094-1104
- [58] **Rüden H, Kalnowski G, Martiny H, Weidner T, Ackermann W (1983)**
Zur Desinfektion von Wasser durch UV-Strahlen. In: *Anwendung von UV-Strahlen bei der Trinkwasseraufbereitung.* Stuttgart, S.35-55
- [59] **Saubolle MA, Kiehn TE, White MH, Rudinsky MF, Armstrong D (1996)**
Mycobacterium haemophilum: microbiology and expanding clinical and geographic spectra of disease in humans. *Clin Microbiol Rev.* 9: 435-447
- [60] **Schulze-Röbbbecke R, Weber A, Fischeder R (1991)**
Comparison of decontamination methods for the isolation of *mycobacteria* from drinking water samples. *J Microbiol Methods.* 14: 177-183
- [61] **Schulze-Röbbbecke R, Janning B, Fischeder R (1992)**
Occurrence of *mycobacteria* in biofilm samples. *Tubercle and Lung disease.* 73: 141-144
- [62] **Schulze-Röbbbecke R (1993)**
Mykobakterien in der Umwelt. *Immun Infekt.* 21: 126-131

- [63] **Silva CV, Magalhaes VD, Pereira CR, Kawagoe JY, Ikura C, Ganc AJ (2003)**
Pseudooutbreak of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* related to bronchoscopes. Infect Control Hosp Epidemiol. 24 (3): 195-7
- [64] **Srinivasan A, Wolfenden LL, Song X, Mackie K, Hartsell TL, Jones HD, Diette GB, Orens JB, Yung RC, Ross TL, Merz W, Scheel PJ, Haponik EF, Perl TM (2003)**
An Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections associated with flexible bronchoscopes. N Engl J Med. 348 (3): 221-7
- [65] **Stahl DA, Urbance JW (1990)**
The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. J Bacteriol. 172: 116-124
- [66] **Szábo I, Kiss KK, Várnai I (1982)**
Epidemic pulmonary infection associated with Mycobacterium xenopi indigenous in sewage-sludge. Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungariae. 29: 263-266
- [67] **Talaat AM, Reimschuessel R, Trucksis M (1997)**
Identification of mycobacteria infecting fish to the species level using polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. Vet Microbiol. 58: 229-237
- [68] **Taylor BT, Patterson C, Hale Y, Safranek WW (1997)**
Routine Use of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Identification of Mycobacteria Growing in Liquid Media. Journal of Clinical Microbiology. 35 (1): 79-85
- [69] **Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T (1993)**
Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaktion and restriktion enzyme analysis. J Clin Microbiol. 31: 175-178
- [70] **Valero-Guillén P, Martin-Luengo F, Jimenez J, Larsson L (1986)**
A thin-layer chromatographic method for separating methyl esters of mycobacterial mycolic acids. Acta Path Microbiol Immunol Scand B. 94: 373-376

- [71] **Wayne LG, Kubica GP (1986)**
Family *Mycobacteriaceae* Chester 1897, 63AL. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2. Williams & Wilkins, Baltimore. 1436-1457
- [72] **Wayne LG, Sramek HA (1992)**
Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin Microbiol Rev*. 5: 1-25
- [73] **Wolinsky E (1979)**
State of the art: nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am Rev Respir Dis*. 119: 107-159
- [74] **Wright EP, Collins CH, Yates MD (1985)**
Mycobacterium xenopi and *Mycobacterium kansasii* in a hospital water supply. *J Hosp Infect* 6: 175-178

8. Anhang

Anhang 1 Referenztablette Mykobakterien (aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie des UKD)

Gr.	Spezies	Wachstum										Cordh. ₁ (Lugol)	O ₂ Bedarf	Nitrat	Niacin	Kat. 45mm	Kat. 68° C	Tween. II ₁₀	Arylnit. ₁₀ (pH 7)	Phosph. oliv.	
		Langs.	Schnell	25° C	37° C	45° C	Form	Pbiotho	Scoto	Nonchr	Eugon										Dysgon
TB	H 37 Rv ATCC 25618	+		+		R			+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>M. tuberculosis</i>	+		+		R			+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>M. bovis</i>	+		+		G/R			+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	BCG - Stamm	+		+		R			+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>M. africanum</i>	+		+		R			+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>M. goodii</i>					R															
	<i>M. canettii</i>					R															
I	<i>M. kansasii</i>	+	+	+		G/R	+		+			+/+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>M. simiae</i>	+	+	+		G	(+*)		+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>M. marinum</i>	+	(+)	+	+	G/R	+		+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
II	<i>M. goodii</i>	+	+	+		G	+		+			+	+	+	+	+	+/+	+/+	+	+	
	<i>M. scrofulaceum</i>	+	+	+		G	+		+			+	+	+	+	+	+	+/+	+	+	
	<i>M. szulgai</i>	+	+	+		G/R	+		+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>M. xenopi</i>	+		+	+	G	+		+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>M. interjectum</i>	+	+	+		G	+		+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>M. paraffinicum</i>	+	+	+		G	+		+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Unbekannt	+	+	+		G	+		+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
III	<i>M. avium</i>	+		+/+	+	G			+			+	+	+	+	+	+/+	+	+	+	
	<i>M. intracellulare</i>	+	+	+	+/+	G/R			+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>M. celatum</i>	+	+	+	+	G/R			+			+	+	+	+	+	+/+	+	+	+	
	<i>M. malmoense</i>	+	+	+		G			+			+	+	+	+	+	+/+	+	+	+	
	<i>M. nonchromogenicum</i>	+	+	+		G/R			+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>M. terre</i>	+	+	+		G/R			+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>M. gastri</i>	+	+	+		G/R			+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>M. ulcerans</i>	+		+/+	+	R			+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>M. triviale</i>	+	(+)	+	+	R			+			+	+	+/+	+	+	+	+	+	+	
	<i>M. haemophilum</i>	+	+	+		R			+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
IV	<i>M. fortuitum</i>		+	+	+	G/R			+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>M. peregrinum</i>		+	+	+	G/R			+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>M. chelonae</i>		+	+	+	G			+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>M. abscessus</i>		+	+	+	G			+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>M. smegmatis</i>		+	+	+	G/R			+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>M. p - fortuitum</i>		+	+	+	G/R			+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>M. phlei</i>		+	+	+	R			+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>M. vaccae</i>		+	+	+	G	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>M. flavescens</i>		(+)	+	+	G/R			+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Anhang 2



MEDIZINISCHE EINRICHTUNGEN
INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE
UND VIROLOGIE
 Direktor: Professor Dr. med. U. Hadding

BEGLEITSCHIN FÜR UNTERSUCHUNGSMATERIAL BEI STUDIEN

Bitte verwenden Sie für Untersuchungen im Rahmen von Studien ausschließlich diesen Schein.
 Für patientenbezogene Anforderungen, benutzen Sie bitte nach wie vor die üblichen Anforderungsscheine.

Studienname: *Mycobacterium xenopi* in broncho-
 skopisch gewonnenem Material
 (Februar – Ende August 2000)

Auftraggeber: Institut für Hygiene
 der Uni Düsseldorf

Materialbezeichnung:

Bronchoskop-Nummer:

Bitte Patienten-Aufkleber benutzen!

Patientenname:

Fallnummer:

Geburtsdatum:

Geschlecht:

Gewünschte Untersuchungen: *Mycobacterium xenopi*

Anhang 3 Beispiel für einen der Dokumentationsbögen auf den Stationen

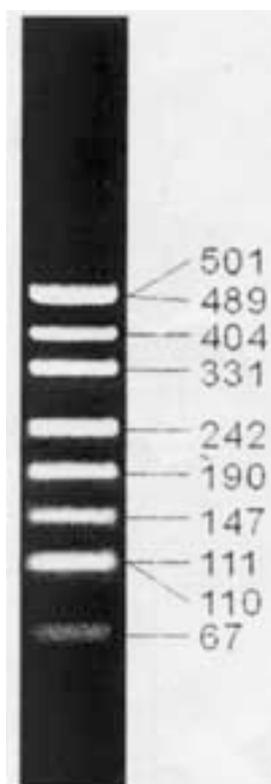
Datum der Untersuchung	Name des Patienten	Bronchoskop-Seriennummer	Untersucher/Station

Anhang 4 Beispiel für einen Dokumentationsbogen an den ERDAs

Bronchoskop Typ	Serien Nr	Montag	Dienstag	Mittwoch	Donnerstag	Freitag
BF-1 T 30	2401742					
BF-1 T 30	2704054					
BF-1 T 30	2301542					
BF-1 T 20	2820009					
BF-XT 20	2900147					
BF-1 P 30	2301334					

Unter den Wochentagen wurde von mir im voraus jeweils das aktuelle Datum eingetragen. Diese Dokumentationsbögen wurden wöchentlich ausgewechselt. Vom Bediener des jeweiligen ERDA wurde in der Zeile des zu reinigenden Bronchoskops die Uhrzeit eingetragen, da die selben Bronchoskope teilweise auch mehrfach am Tag aufbereitet wurden.

Anhang 5 der verwendete Längenstandard pUC 19 DNA/Mspl, Fermentas, St. Leon-Rot, Kat. Nr. SM0221. Die Fragmentgrößen sind in Basenpaaren angegeben.



Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eidesstatt, dass ich die vorliegende Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Düsseldorf, August 2003

Danksagung:

Danke PD Dr. med. R. Schulze-Röbbecke

Danke Prof. Dr. med. F.-J. Schmitz

Danke Dr. rer. nat. Brita Ilg

Danke Simone Dietl und Hygiene-Fachkräfte

Danke Fr. Müller und Hr. Zichon

Danke Uli Strenz

Danke Pflege- und Ärzte -Team der Endoskopieabteilung und Intensivstation

Danke Hr. Michels

Danke Jens

Danke meine Eltern

Danke Philip

Danke Sara

Danke Lea, Edeltraud, Norman und Odd

9. Lebenslauf

seit Jan. 2003 Sankt Josef, Zentrum für Orthopädie und Rheumatologie,
Inneren Medizin, Schwerpunkt Rheumatologie

Ärztin im Praktikum

Okt. 2001-Nov. 2002 Klinikum Wuppertal, Clara Spital Basel

Praktisches Jahr

1996 - 2002 Heinrich - Heine Universität Düsseldorf
Studium der Humanmedizin

Abschluss November 2002

seit Dez. 1999 Institut für Hygiene, Heinrich Heine Universität Düsseldorf
Doktorarbeit

Titel: Analyse und Beendigung des gehäuften Auftretens von
Mycobacterium xenopi im Patientenmaterial eines
Krankenhauses

1992 - 1996 Pharmaforschungszentrum Aprath der Bayer AG
Ausbildung zur Biologielaborantin und anschl. Berufstätigkeit

Inhalte: versch. Teilgebiete der Biologie, wie z. B. Mikrobiologie,
Molekularbiologie, Toxikologie, klinische Untersuchungen,
Parasitologie, Zellkultur.

1979-1988 Leibniz Gymnasium Düsseldorf
Abitur

1979-1983 Montessori-Grundschule Düsseldorf

„Analyse und Beendigung des gehäuften Auftretens von *Mycobacterium xenopi* in Patientenmaterial eines Krankenhauses“

Vorgelegt von Sabine I. K. Mewes

Referent PD Dr. med. R. Schulze-Röbbcke

Aus dem Institut für Hygiene, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktorin Prof. Dr. med. H. Idel

Ziel meiner Arbeit war es, die seit 1994 ungewöhnliche Zunahme des Nachweises von *Mycobacterium xenopi* (*M. xenopi*) in Patientenmaterial eines Krankenhauses zu erklären und zu beenden. Dafür kam ursächlich das Vorliegen einer Pseudoepidemie oder Epidemie in Frage. Als Hauptursache wurde die Kontamination von Bronchoskopen bei der maschinellen Aufbereitung vermutet, bei der die Geräte abschließend mit Leitungswasser gespült wurden, das mit *M. xenopi* besiedelt war. Im Vordergrund stand daher die Frage nach Maßnahmen zur Aufbereitung von Bronchoskopen, die eine Elimination dieses fakultativ humanpathogenen, atypischen Mykobakteriums garantieren.

Anhand von Daten aus dem Institut für Mikrobiologie des UKD (Universitätsklinikum Düsseldorf) stellte ich den zeitlichen Verlauf des gehäuften Nachweises von *M. xenopi* in Patientenmaterial dar.

Die Auswertung der dazugehörigen Patientenakten in Hinblick auf eine manifeste Infektion bzw. Behandlungsmaßnahmen sollten den Verlauf als Epidemie oder Pseudoepidemie charakterisieren. Eine eindeutige Charakterisierung war nicht möglich.

Die Patientenisolatate wurden auf ihre mögliche Herkunft aus dem Warmwasserleitungssystem des betroffenen Krankenhauses untersucht. Dazu wurden die Wasser- und Patientenisolatate (zum Vergleich auch Patientenisolatate eines anderen Krankenhauses) mit Hilfe eines geeigneten molekularbiologischen Typisierungsverfahren verglichen. Die Untersuchung ergab eine klonale Übereinstimmung der Wasser- und Patientenisolatate und einen Unterschied zu den Isolataten des anderen Krankenhauses.

Der Versuch der Beendigung des gehäuften Auftretens von *M. xenopi* in Patientenmaterial durch die Aufstellung zweier Endoskopreinigungs- und Desinfektionsautomaten (ERDAs) mit neuen Wasserdessinfektionsverfahren war erfolgreich. Dabei war sowohl das thermische als auch das UV-Desinfektionsverfahren effektiv. Bis Juli 2003 wurde in dem betroffenen Krankenhaus *M. xenopi* nicht mehr aus respiratorischem Untersuchungsmaterial isoliert.

Auch in einem Labor-Belastungsversuch mit definierten, erhöhten *M.-xenopi*-Konzentrationen erwies sich das thermische Desinfektionsverfahren einer der ERDA bis zu einer Konzentration von 10^4 KBE/ml (koloniebildende Einheiten pro Milliliter) im Spülwasser als effektiv zur Elimination von Mykobakterien aus Wasser für die Endoskop-Aufbereitung.