

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Medizinische Mikrobiologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Peters

Infektionen Frühgeborener und unreifer Neugeborener mit koagulasenegativen Staphylokokken

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Marion Steinacker geb. Sauerwein
aus Köln
Münster 2004

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Medizinische Mikrobiologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Peters

Infektionen Frühgeborener und unreifer Neugeborener mit koagulasenegativen Staphylokokken

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Marion Steinacker geb. Sauerwein
aus Köln
Münster 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan:

Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter:

Univ.-Prof. Dr. med. G. Peters

2. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. W. Mathys

Tag der mündlichen Prüfung:

16.02.2004

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Medizinische Mikrobiologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Peters
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. G. Peters
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. W. Mathys

ZUSAMMENFASSUNG

Infektionen Frühgeborener und unreifer Neugeborener mit koagulasenegativen Staphylokokken

Steinacker, Marion

In dieser Arbeit wurden bei 69 Neugeborenen mit klinischem Verdacht auf Sepsis von verschiedenen Körperstellen insgesamt 208 Abstriche entnommen und in 121 Proben (58,2%) CNS isoliert. Bei diesen Stämmen wurde jeweils eine Speziesdifferenzierung, ein Antibiotogramm und eine Schleimtestung durchgeführt.

Bei der Speziesdifferenzierung dominierte *S.epidermidis* mit 61,2% gefolgt von *S.haemolyticus* (23,2%), *S.hominis* (5,8%), nicht differenzierbaren *S.spezies* (4,1%) und *S.auricularis* (3,3%). *S.warneri*, *S.simulans* und *S.saprophyticus* wurden jeweils nur einmal isoliert (0,8%).

Bei der Antibiotikaresistenztestung reagierten alle Stämme sensibel auf Vancomycin. Ebenso wurden geringe Resistenzraten gegen Ciprofloxacin (3,3%) beobachtet. Dagegen waren 76% der Stämme resistent gegen Ampicillin und 39,7% gegen Oxacillin. Des Weiteren wiesen die gegen Oxacillin resistenten Stämme auch deutlich mehr Resistenzen gegen die übrigen getesteten Antibiotika auf. *S.epidermidis* war die Spezies, die im Durchschnitt die meisten Resistenzen lieferte.

Bei der Schleimtestung waren 60,3% der Stämme stark, 14,1% schwach und 25,6% nicht adhärent. *S.epidermidis* war die Spezies mit den höchsten Adhäsionsraten, indem 73% der Stämme eine starke Adhäsion aufwiesen, im Gegensatz zu *S.hominis* und *S.haemolyticus* mit jeweils 57,1% bzw. 35,7% stark adhärenen Stämmen.

Bei 17 der 69 Neugeborenen wurden von mindestens zwei verschiedenen Körperstellen jeweils CNS der gleichen Spezies isoliert. Um herauszufinden, ob die bei einem Kind isolierten Bakterien einem Klon angehörten, wurden zur weiteren Differenzierung eine Typisierung nach Antibiotogramm, eine Plasmidprofilanalyse und eine Proteinprofilanalyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gel Elektrophorese durchgeführt.

Bei Betrachtung aller fünf durchgeführten Untersuchungsverfahren zeigte sich, dass bei 6 Kindern die Ergebnisse bei mindestens zwei Stämmen nahezu identisch ausfielen. So konnte hier der Rückschluss auf eine klonale Identität dieser Stämme gezogen werden und die isolierten CNS als wahrscheinliche Sepsiserreger verantwortlich gemacht werden.

Die Spezies der 14 CNS-Stämme dieser 6 Neugeborenen umfassten in 7 Fällen *S.epidermidis*, in 4 Fällen *S.haemolyticus* und in 3 Fällen nicht differenzierbare *S.spezies*. 11 der 14 Stämme besaßen eine starke Adhäsionsfähigkeit, und nur die 3 nicht differenzierbaren *S.spezies* waren nicht adhärent. Die 7 *S.haemolyticus* und *S.spezies* Stämme lagen mit ihrer Resistenzhäufigkeit im Durchschnitt, nur die *S.epidermidis* Stämme lagen etwas darüber.

Bei den 6 Neugeborenen mit Nachweis von Keimen eines Klones handelte es sich jedes Mal um Frühgeborene. Alle Kinder überlebten die septischen Perioden unter entsprechender antibiotischer Therapie. Im Labor erwiesen sich eine Erhöhung der I/T-Proportion sowie eine Thrombopenie als verlässlichste Laborparameter. Fakultativ gefunden wurden eine CRP-Erhöhung, eine Leukozytose und eine Hypoglykämie.

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2004

Inhaltsverzeichnis

	Seite	
1.	Einleitung	1
2.	Allgemeines über CNS-Infektionen Frühgeborener und unreifer Neugeborener	3
2.1.	Klinik der CNS-Infektionen	3
2.2.	Virulenzfaktoren der CNS	4
2.3.	Kindliche Risikofaktoren	5
2.3.1.	Niedriges Geburtsgewicht	5
2.3.2.	Immundefizit	5
2.3.3.	Kolonisation mit CNS	6
2.3.4.	Gegenwart von verweilenden zentralen Kathetern oder anderen Fremdkörpern	7
2.3.5.	Antibiotikaexposition	7
2.3.6.	Verabreichung von totaler parenteraler Ernährung (TPN) und Lipiden	8
2.4.	Therapie von Infektionen mit CNS bei Neugeborenen	8
3.	Fragestellung	10
4.	Material und Methoden	11
4.1.	Herkunft der Isolate	11
4.2.	Klinische und laborchemische Daten	11
4.2.1.	Perinatale Risikofaktoren	11
4.2.2.	Eingangskriterien des Kindes	12
4.2.3.	Verlaufsbeobachtung	12
4.3.	Allgemeine Charakterisierung der Isolate	13
4.3.1.	Makroskopische Beurteilung der Kolonialmorphologie	13
4.3.2.	GRAM-Präparat	13
4.3.3.	Katalasereaktion	13
4.3.4.	Gebundene Koagulase - "Clumping factor"	14
4.3.5.	Staphyslide - Test	14

4.4.	Biotypisierung	14
4.4.1.	Zuckervergärung	14
4.4.2.	Phosphatsetest	15
4.4.3.	Nitratreduktion	15
4.4.4.	Novobiocin Sensibilitätstestung	16
4.4.5.	Ureaseaktivität	16
4.5.	Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit	16
4.6.	Schleimtest nach Christensen	17
4.7.	Untersuchung der Plasmid-DNA	18
4.7.1.	Extraktion der Plasmid-DNA	18
4.7.2.	Probenvorbereitung	19
4.7.3.	Agarose-Gel Elektrophorese	19
4.7.4.	Sichtbarmachung der Plasmid-DNA mit Ethidiumbromid	20
4.7.5.	Auswertung	20
4.8.	Untersuchung der extrazellulären Proteine	20
4.8.1.	Gewinnung von extrazellulären Produkten	20
4.8.2.	Materialien	21
4.8.3.	Probenvorbereitung	23
4.8.4.	Vorbereitung der Elektrophorese	23
4.8.5.	Laufbedingungen	23
4.8.6.	Fixierung, Färbung und Entfärbung der Gele	24
4.8.7.	Auswertung	24
4.9.	Konservierung der Bakterienstämme	24
5.	Ergebnisse	25
5.1.	Patientendaten	25
5.2.	Ergebnisse zur Speziesdifferenzierung und zur Charakterisierung der Isolate	29
5.2.1.	Bakterienisolierung	29
5.2.2.	Ergebnisse der allgemeinen Charakterisierung	29
5.2.3.	Ergebnisse der Biotypisierung	32
5.2.4.	Ergebnisse der Antibiotikaempfindlichkeitstestung	34
5.2.5.	Ergebnisse des Schleimtestes nach Christensen	42

5.3.	Ergebnisse zur Typisierung	44
5.3.1.	Einleitung	44
5.3.2.	Ergebnisse der Typisierung nach Antibiogramm	44
5.3.3.	Ergebnisse der Plasmidprofilanalyse	46
5.3.4.	Ergebnisse der Proteinprofilanalyse	50
5.3.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse der Typisierung	54
5.3.6.	Klinische Daten der sechs Kinder mit identischen Isolaten	57
5.3.7.	Gegenüberstellung von Spezies- und Resistenzverhalten in den Gruppen der Kinder mit ein- und mehrfachen Isolaten	59
5.3.8.	Gegenüberstellung von Spezies- und Resistenzverhalten innerhalb der Gruppe der Kinder mit mehrfachen Isolaten	60
6.	Diskussion	62
7.	Zusammenfassung	72
8.	Literaturverzeichnis	74

1. Einleitung

Koagulasenegative Staphylokokken (CNS) sind als Besiedler der Haut und der Schleimhäute des Menschen und aller bisher untersuchten Säugetiere sowie Vögel und Fische weit verbreitet (121). Von Natur aus haben sie eine symbiotische Bedeutung für den Menschen, indem sie an Haut und Schleimhäuten höchstwahrscheinlich in bedeutendem Maß an der primären lokalen Barrierefunktion gegen eindringende, potentiell pathogene Mikroorganismen beteiligt sind (82).

Bisher wurden 32 CNS-Spezies eindeutig voneinander abgegrenzt (112). Stämme der Novobiocin-sensiblen *S.epidermidis*-Gruppe - *S.epidermidis*, *S.hominis*, *S.haemolyticus*, *S.warneri* und *S.capitis* - dominieren in der menschlichen Mikroflora. Den Hauptanteil machen dabei Stämme der Spezies *S.epidermidis sensu stricto* aus, lediglich auf der Kopfhaut überwiegt *S.capitis*. *S.auricularis* ist speziell an den äußeren Gehörgang adaptiert und fast ausschließlich dort zu finden. CNS der Novobiocin-resistenten *S.saprophyticus*-Gruppe - *S.saprophyticus*, *S.cohnii* und bedingt auch *S.xylosus* - sind dagegen nur transient in der Flora des äußeren Urogenitalbereichs zu finden (55,56). Ihnen wird eine „normale“ pathogene Bedeutung als Erreger des Dysuriesyndroms der geschlechtsaktiven Frau und in der unspezifischen Urethritis des Mannes zugesprochen (66). Zugrunde liegt eine offensichtlich spezielle Affinität dieser Staphylokokkenstämme zum menschlichen Uroepithel (82,85,110).

Im Gegensatz zu *S.aureus*, mit seiner eindeutig fakultativ-pathogenen Bedeutung, wurden CNS lange Zeit als apathogen eingestuft. In den letzten Jahrzehnten jedoch konnte reichlich demonstriert werden, dass CNS, bei bestimmten Gruppen von Patienten, wahre ätiologische Verursacher von Infektionen sein können. In den letzten Jahren wurde sogar ein deutlicher Anstieg von Infektionen mit CNS festgestellt (116,117). Dieser Anstieg ist auf einen massiven Wandel im Patientengut bestimmter klinischer Disziplinen zurückzuführen. Gerade die Erfolge moderner medizinischer Methoden haben zu einer Änderung der Resistenzlage des menschlichen Wirtes geführt, die eine Pathogenität dieser Staphylokokken fast zwangsläufig zulässt. Zu den betroffenen Patientengruppen gehören einerseits Patienten mit

implantierten Fremdkörpern, wie künstliche Herzklappen (101), orthopädische Prothesen (52), Liquor- und AV-Shunts (63) und Patienten mit intravasalen Kathetern (63,80). Eine weitere gefährdete Gruppe stellen Patienten mit malignen Erkrankungen und immunsuppressiver Therapie, besonders in leukopenischen Phasen dar, sowie Patienten nach Knochenmarkstransplantation (43,82,100). Bei parenteral Drogenabhängigen kann es zur Rechtsherzendokarditis kommen (120). Die Gruppe, mit der sich diese Arbeit befassen soll, bilden die Neugeborenen und hier vor allem die unreifen und Frühgeborenen. Des weiteren sei noch erwähnt, dass CNS auch als Verursacher von Otitis media (34), Konjunktivitis (1) und Abdominalabszessen (31) identifiziert wurden.

Zur epidemiologischen Typisierung der CNS stehen mehrere Verfahren zur Verfügung. Relativ einfach durchzuführen und nicht sehr kostenintensiv sind dabei die Biotypisierung, AntibioGramme und die Schleimtestung (16,64). Der Nachteil dieser Methoden, vor allem der Biotypisierung und der Schleimtestung, liegt jedoch in der relativ geringen Diskriminierungsrate (5,47,83). Weitere epidemiologische Typisierungsverfahren sind die Phagentypisierung, die Proteinanalyse mittels SDS-PAGE Technik und die molekulare Typisierung wie z.B. die Plasmidprofilanalyse. Der Vorteil dieser Verfahren liegt in einer im Allgemeinen höheren Diskriminierungsrate, der Nachteil jedoch ist der größere Kostenaufwand und die aufwendigere Durchführung (4,5,32,77). Zur effektiven epidemiologischen Typisierung werden daher meist verschiedene Kombinationen der Untersuchungsverfahren angewandt, wie z.B. AntibioGramm plus Plasmidprofilanalyse (47), wobei meist höhere Diskriminierungsraten erreicht werden, als bei Anwendung eines Untersuchungsverfahrens allein (16,64).

2. Allgemeines über CNS-Infektionen Frühgeborener und unreifer Neugeborener

Koagulasenegative Staphylokokken, früher kollektiv unter dem Namen *S.epidermidis* bekannt, residieren normalerweise auf Haut und Schleimhäuten als harmlose Kommensalen (22,53). In den letzten drei Jahrzehnten konnte jedoch mehrfach demonstriert werden, dass, unter den entsprechenden Umständen, CNS zu wahren Infektionsverursachern werden können. Neu- und Frühgeborene gehören zunehmend zur Gruppe der Risikopatienten, eine CNS-Infektion zu erwerben (114, 119).

Zwischen 1940 und 1970 wurde immer wieder über Fälle von CNS-Infektionen bei Neugeborenen berichtet. Aber erst in den späten Siebzigern und frühen Achtzigern mehrten sich mit Goldman et al. (42) die Berichte über CNS und retrospektiv wurden CNS als die häufigsten nosokomialen Blutkultur-Isolate identifiziert (2,3,6,33,49,98), im Gegensatz zum Zeitraum zwischen 1965 und 1975, wo β -hämolyisierende Streptokokken die am meisten isolierten Erreger waren (6,38,102).

Einige Untersucher, u.a. Freeman et al. (40) fanden heraus, dass die Ursache dieses Anstieges der CNS-Infektionen in einem Trend zum niedrigeren Geburtsgewicht, insgesamt besseren Überlebenschancen der untergewichtigen Neugeborenen sowie in moderneren und invasiveren diagnostischen und therapeutischen Apparaturen liegt (36,60,97,103).

2.1. Klinik der CNS-Infektionen

Neonatale CNS-Infektionen bieten im Allgemeinen einen blandereren Verlauf als Infektionen mit Erregern wie z.B. Streptokokken der Gruppe B und E.coli (36). Die Symptome einer Infektion sind meist unspezifisch. Die klinischen Zeichen einer CNS-Sepsis beinhalten das plötzliche Eintreten oder die Zunahme der Anzahl von apnoeischen und bradycarden Episoden, Temperatur-Instabilität, Lethargie, geblähtes Abdomen, Ernährungsintoleranz, Cyanose und Kreislaufzentralisation (7,38,70).

An pathologisch veränderten Labordaten können gefunden werden eine CRP-Erhöhung, eine Erhöhung des I/T sowie eine Thrombopenie. Des Weiteren vorkommen können eine Leukozytose bzw. -penie sowie eine Hypo- oder Hyperglykämie (12,41,90).

2.2. Virulenzfaktoren der CNS

Es gibt mehr als 30 Spezies von CNS. Darunter ist *S.epidermidis* das Hauptisolat von Neugeborenen mit Bakteriämie oder anderen invasiven CNS-Infektionen, indem diese Spezies für 72-88% der infektiösen Perioden mit CNS verantwortlich ist (29,38,44). Hall et al. (44) fanden heraus, dass *S.haemolyticus*, *S.hominis*, *S.warneri* und *S.simulans* ebenfalls als Krankheitsverursacher vorkommen und gemeinsam etwa 28% der Sepsisepisoden innerhalb der CNS ausmachen. Es ist unklar, ob *S.epidermidis* virulenter ist aufgrund der höheren Proportion an schleimproduzierenden Stämmen (51), oder ob dieser Spezies andere spezifische Virulenzfaktoren innewohnen.

Der Hauptteil der invasiven CNS-Isolate von Neugeborenen produziert Schleim (44,51). Schleim ist ein extrazelluläres Glycocalix-Material, eine „amorphe Kapsel“, bestehend aus 40% Carbohydrat und 27% Protein (81). Dieser Schleim kann nun eine Adhärenz an innewohnenden Fremdkörpern vermitteln oder steigern, so z.B. an zentralen Venenkathetern (80,82). Des Weiteren haben Experimente gezeigt, dass schleim-positive Stämme von CNS viel größere Konzentrationen von Antibiotika überleben können, wenn sie in Gegenwart eines Fremdkörpers kultiviert werden (94). Weiterhin ist einigen Untersuchern nach anzunehmen, dass der von den CNS gebildete Schleim mit den Abwehrmechanismen des Wirtes interferiert (23).

Als weiterer Virulenzfaktor ist die hohe Anzahl an Antibiotikaresistenzen anzusehen (29,44). Multiple Antibiotikaresistenz ist häufiger unter krankheitsverursachenden als bei kontaminanten CNS-Stämmen zu finden (29). Neuere klinische Studien berichten, dass praktisch alle, von Patienten mit invasiven Erkrankungen isolierten Stämme, resistent gegen β -Laktam Antibiotika, wie Ampicillin und Cephalosporine sind. Für

Betalaktamase-stabile Penizilline wie Oxacillin gilt das gleiche, aufgrund der intrinsischen, chromosomal kodierten Resistenz. Auch gegenüber Gentamycin sind die meisten Stämme resistent (26,29,38,74). Dagegen sind gegenüber Vancomycin bisher kaum Resistenzen beobachtet worden. In jüngster Zeit fanden jedoch Schwalbe et al. (91) eine ansteigende Resistenz von *S.haemolyticus*-Isolaten gegen Vancomycin und Teicoplanin.

2.3. Kindliche Risikofaktoren

2.3.1. Niedriges Geburtsgewicht

Eine direkte Beziehung zwischen Geburtsgewicht und Anfälligkeit für eine neonatale nosokomiale Infektion im Allgemeinen wurde von vielen Untersuchern festgestellt (40). Goldman et al. identifizierten ein niedriges Geburtsgewicht als den Faktor, der am stärksten mit einem steigenden Infektionsrisiko bei Neugeborenen verbunden ist. Nach LaGamma et al. (62) war das Eintreten einer nosokomialen Infektion die Haupttodesursache bei Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht von weniger als 1000g. In den meisten Untersuchungen (3,38,70) hatten die mit CNS infizierten Kinder ein Geburtsgewicht von unter 1500g. CNS-Infektionen können auch bei reifen Neugeborenen vorkommen, das Risiko ist jedoch geringer (74).

2.3.2. Immundefizit

Die Assoziation zwischen niedrigem Geburtsgewicht und steigendem Infektionsrisiko ist primär ein Resultat des Immundefizits der unreifen Neugeborenen (45,59).

Die geringere Knochenmarksreserve der Neugeborenen für Neutrophile sowie ihre herabgesetzte Fähigkeit, die Freisetzung und nachfolgende Regeneration der Neutrophilen zu regulieren, macht die Neugeborenen anfällig dafür, eine periphere Neutropenie sowie, während einer Sepsis, eine Erschöpfung des Neutrophilen-Pools zu

entwickeln (45). Des Weiteren zeigen die Neutrophilen von Neugeborenen eine eingeschränkte Funktionsfähigkeit (58).

Die Phagozytose, einer der Hauptabwehrmechanismen gegen CNS, kann herabgesetzt sein (45).

Die Anforderungen zur Opsonierung von CNS variieren je nach Stamm, einige erfordern nur Komplement, einige nur Antikörper, andere sowohl Komplement als auch Antikörper. Die Menge all dieser Opsonine kann im Serum unreifer Neugeborener erniedrigt sein (35). Die Konzentration der Komplementkomponenten beträgt beim Neugeborenen annähernd nur die Hälfte wie beim Erwachsenen und ist besonders niedrig beim unreifen Neugeborenen. Neuere experimentelle Untersuchungen legen nahe, dass auch die funktionelle Aktivität des Komplementsystems beim Neugeborenen herabgesetzt ist (36,37,45).

Beinahe das komplette kindliche IgG bei Geburt stammt von der Mutter, über aktiven Transport von mütterlichem IgG über die Plazenta, der in etwa mit einem Gestationsalter von 20 Wochen beginnt. Die Konzentrationen beim unreifen Neugeborenen korrelieren gut mit dem Gestationsalter und dem Geburtsgewicht (37,108). Einige Untersucher demonstrierten, dass, obwohl Neugeborene messbare Konzentrationen von Antikörpern gegenüber CNS aufwiesen, diese eine deutlich herabgesetzte Funktionsaktivität aufwiesen, im Vergleich zu ähnlichen Konzentrationen von mütterlichem IgG (37). Das heißt also, dass Neugeborene, zusätzlich zu niedrigeren absoluten IgG-Werten, Antikörper mit unzureichender Funktion besitzen.

2.3.3. Kolonisation mit CNS

Die Kolonisation von Haut und Schleimhäuten bei Neugeborenen auf Intensivstationen vollzieht sich grundsätzlich und schnell, das Kolonisationsmuster variiert jedoch je nach Ort und Zeit (22). Bei mehreren Untersuchern, u.a. Hall et al. (46), waren CNS die häufigsten mukokutanen Isolate auf der Neugeborenen-Intensivstation. Hall z.B. berichtet, dass am ersten Tag 9% der Neugeborenen eine nasopharyngeale Kolonisation mit CNS

aufwiesen, in der zweiten Woche stieg der Anteil auf 78%. In der sechsten Woche sank der Anteil auf ca. 30% und blieb in etwa stabil bis zur zehnten Woche. Hall isolierte eine große Anzahl verschiedener Biotypen, wohingegen bei einer Studie von D'Angio et al. (22) ein prädominanter CNS-Biotyp vorgefunden wurde. Ob virulente CNS-Stämme bei Patienten auf Neugeborenen-Intensivstationen selektiert werden, sich entwickeln oder den Intensivstationen innewohnen, bleibt zu diskutieren.

2.3.4. Gegenwart von verweilenden zentralen Kathetern oder anderen Fremdkörpern

In zahlreichen Studien wurden verweilende zentrale Venenkatheter und andere Fremdkörper identifiziert als Faktoren, die mit der Entwicklung einer invasiven CNS-Infektion assoziiert sind (7,12,28,38,50,70). In einem experimentellen Modell von Christensen et al. (17), wo Mäuse mit schleimproduzierenden CNS geimpft wurden, erkrankten nur die Tiere mit implantierten Fremdkörpern. Die Assoziation zwischen Fremdkörpern und invasiver Infektion liegt wahrscheinlich an der Tendenz der CNS zur Adhärenz und Kolonisation an Fremdkörpern, wodurch eine Infektion eingeleitet werden kann oder eine Oberfläche zur Adhärenz bereitgestellt wird, die eine bakterielle Opsonisation erschwert, wodurch die Möglichkeit des Eintritts einer Infektion fortbesteht. Umgekehrt zerstören die invasiven Maßnahmen, die erforderlich sind um einen Fremdkörper einzusetzen, die Haut, die ja die erste Infektionsbarriere darstellt. Dadurch wird den die Haut besiedelnden Bakterien ermöglicht in tiefere Schichten und den Blutstrom einzudringen (45).

2.3.5. Antibiotikaexposition

Die Dauer einer früheren antibiotischen Therapie ist ein Risikofaktor für eine nosokomiale neonatale Sepsis im Allgemeinen (42). Dies gilt auch für CNS-Infektionen. Epidemiologische Daten erhärten die Entwicklung von ansteigenden Resistenzen innerhalb von CNS-

Stämmen gegenüber Methicillin, Aminoglykosiden und Rifampicin mit Anwendung dieser Antibiotika (3,26,38).

2.3.6. Verabreichung von totaler parenteraler Ernährung (TPN) und Lipiden

Einige Untersucher (3,8,28,38,42,70,101) stellten eine Beziehung fest zwischen TPN und dem Auftreten von CNS-Infektionen, und Fler et al. (38) konnten zeigen, dass kontaminierte TPN-Flüssigkeiten der verursachende Faktor für viele CNS-Infektionen im eigenen Krankengut war. In einer anderen Neugeborenen-Intensivstation wurden Lipidinfusionen als prädominanter Risikofaktor für CNS-Bakteriämien identifiziert (39). Eine mögliche Beziehung zwischen der Verwendung von TPN und Fetten und dem Auftreten einer CNS-Bakteriämie, neben der Kontamination des Infusionsmaterials, ist, dass TPN und Fette vor allem bei den kleinsten und krankesten Neugeborenen angewendet werden. Diese weisen zusätzlich alle oben angegebenen Risikofaktoren auf. Außerdem stellen hohe Konzentrationen von Dextrose und Fetten ein ideales Wachstumsmedium für CNS dar (15,39).

2.4. Therapie von Infektionen mit CNS bei Neugeborenen

Aufgrund der zunehmenden Resistenzhäufigkeit der CNS gegenüber u.a. Gentamycin, Betalaktam-Antibiotika wie Ampicillin und etlichen Cephalosporinen sowie Betalaktamase-stabilen Penizillinen wie Methicillin, war das Medikament der Wahl lange Zeit Vancomycin (45,54,95). Erst in jüngster Zeit wird auch über gegenüber Vancomycin resistente CNS-Stämme berichtet (91).

Vancomycin ist ein bakterizides Antibiotikum, das mit der Zellwand-Synthese interferiert. Die Dosierung beim Neugeborenen richtet sich nach dem Geburtsgewicht sowie dem postnatalen Alter.

Eine wichtige zusätzliche Maßnahme ist die Entfernung von vorhandenen Venenkathetern oder anderen Fremdkörpern, vor

allein, wenn es sich um einen schleimproduzierenden CNS-Stamm handelt (82).

3. Fragestellung

Die Bedeutung der koagulasenegativen Staphylokokken (CNS) in der perinatalen Medizin hat in den letzten Jahren erheblich zugenommen. Diese Keime zählen zu den häufigsten Sepsiserregern auf Neugeborenen-Intensivstationen. Das klinische Bild einer koagulasenegativen Staphylokokkenseptikämie beim Neu- und Frühgeborenen ist überwiegend durch einen nicht fulminanten Verlauf und eine meist gute Prognose gekennzeichnet, Todesfälle kommen aber vor. Der Kenntnisstand über die Besiedlung und Infektion von Neu- und Frühgeborenen mit CNS ist jedoch gering.

Ein erstes Ziel dieser Arbeit war es, das Spektrum der bakteriellen Kolonisation mit CNS von Neu- und Frühgeborenen mit klinischen Zeichen einer Sepsis zu ermitteln, d.h. welche CNS-Spezies aus welchem Untersuchungsmaterial bzw. welcher Lokalisation isoliert werden können. Hierzu wurden den Neu- und Frühgeborenen mit klinischem Sepsisverdacht von verschiedenen Körperstellen Abstriche oder Sekretproben entnommen. Weiterhin wurden die klinischen Daten der Neu- und Frühgeborenen erhoben. Zusätzlich sollten alle CNS-Isolate hinsichtlich allgemeiner phänotypischer Merkmale, wie Resistenzspektrum gegenüber 10 verschiedenen Antibiotika und Fähigkeit zur Schleimbildung (Adhärenztest), charakterisiert werden.

Ein zweites Ziel der Arbeit bestand darin, bei den CNS-Isolaten eines Patienten, die der gleichen Spezies angehörten, zu untersuchen, ob sie zu einem Stamm gehören, d.h. ob Isolate von verschiedenen Körperstellen als klonal identisch einzustufen sind. Als Grundlage hierzu wurden verschiedene Methoden der Phäno- und Genotypisierung auf ihre Anwendbarkeit zur Typisierung von CNS-Isolaten untersucht. Zum Einsatz kamen drei unterschiedliche epidemiologische Typisierungsverfahren, die miteinander verglichen wurden. Eingesetzt wurden neben der Antibiotikaempfindlichkeitstestung die Proteinbandenanalyse sowie die Plasmidprofilanalyse.

4. Material und Methoden

4.1. Herkunft der Isolate

Im Zeitraum von Oktober 1987 bis Oktober 1988 wurden in der Neugeborenen-Intensivstation der Kölner Universitäts Kinderklinik bei allen Neugeborenen mit Verdacht auf Sepsis Abstriche und/oder Blut-, Urin-, Punktions-, Magensaft- oder Stuhlproben entnommen und dem Hygiene-Institut der Universität zu Köln zur bakteriologischen Untersuchung zugesandt. Hier wurden bei 69 dieser Kinder koagulasenegative Staphylokokken (CNS) nachgewiesen und weiter untersucht. Bei diesen 69 Kindern wurden insgesamt 208 Proben entnommen und zwar (Anzahl in Klammern): Abstriche von Nase (24), Nabel (25), Ohr (24), Rachen (33), Trachea (9), Anus (23), Drainagespitze (2) und ZVK (3), Punktionsproben von Pleura (1) und Perikard (1) und um Proben von Blut (3), Stuhl (8), Urin (15) und Magensaft (37).

4.2. Klinische und laborchemische Daten

Bei den Neugeborenen, die mehrere positive Isolate an verschiedenen Körperstellen aufwiesen, wurde die Krankenakte retrospektiv auf folgende Daten untersucht:

4.2.1. Perinatale Risikofaktoren

An perinatalen Risikofaktoren wurden untersucht:

- Zeitpunkt des Blasensprunges
- Entbindungsmodus
- Beurteilung des Fruchtwassers
- mütterliches Fieber
- Antibiotikatherapie der Mutter
- pränatale Glukokortikoidbehandlung der Mutter.

4.2.2. Eingangskriterien des Kindes

Hier wurden zu einen folgende, allgemeine Kriterien bestimmt:

- Gestationsalter
- Geburtsgewicht
- APGAR-Wert
- Beatmung
- Art des Zuganges
- Nabelschnur-pH
- Körpertemperatur.

Des Weiteren wurden die folgenden laborchemischen Daten bei Geburt untersucht:

- Hämoglobin
- Hämatokrit
- Anzahl von Leukozyten und Neutrophilen
- I/T (Verhältnis von immaturren Neutrophilen zur totalen Neutrophilenzahl)
- Thrombozytenzahl
- Blutzucker
- Bilirubin
- CRP.

4.2.3. Verlaufsbeobachtung

An klinischen Verlaufsparemtern wurden untersucht:

- Beatmungsdauer und -komplikationen
- Antibiotikatherapie
- klinischer Gesamteindruck.

Außerdem wurden folgende laborchemische Daten zum Zeitpunkt der vermuteten septischen Episode bestimmt:

- Leukozytenzahl
- I/T
- Differentialblutbild
- CRP
- Bilirubin
- Thrombozytenzahl
- Blutzucker.

4.3. Allgemeine Charakterisierung der Isolate

Zur Identifizierung der CNS wurden zunächst Reinkulturen auf Müller-Hinton- (Oxoid) und Blood Agar Base-Platten (Oxoid) plus 5% defibriertes Blut angelegt und anschließend folgende Basiskriterien bestimmt:

4.3.1. Makroskopische Beurteilung der Kolonienmorphologie

Sie erfolgte mit bloßem Auge. Bewertet wurden Kolonienpigment und Koloniengröße.

4.3.2. GRAM-Präparat

Von jedem Bakterienstamm wurde in üblicher Weise ein nach GRAM gefärbtes Präparat angelegt und die Morphologie sowie das GRAM-Verhalten beschrieben.

4.3.3. Katalasereaktion (9)

Dieser Test diente der Abgrenzung gegenüber katalasenegativen Streptokokken.

Verwendet wurden auf Müller-Hinton-Platten gezüchtete Bakterien, da die Reaktion mit auf Blood Agar Base-Platten gezüchteten Bakterien, wegen der im Blut enthaltenen Peroxidase, falsch positiv ausgefallen wäre. Auf Objektträger wurde jeweils ein Tropfen 3%iges kaltes Wasserstoffperoxid gegeben. Vom Rand her wurde dann mit der sterilen Öse pro Tropfen eine Einzelkolonie eingerührt. Eine Entwicklung von Gasbläschen wurde als positive Reaktion bewertet.

4.3.4. Gebundene Koagulase - „Clumping factor“ (30)

Durchgeführt wurde dieser Test zur Unterscheidung von koagulasepositiven und -negativen Staphylokokken. Als Positivkontrolle wurde der *S.aureus*-Stamm SG511 verwendet.

Auf einen Objektträger wurde je ein Tropfen Kaninchencitratplasma und ein Tropfen NaCl (zur Negativkontrolle) gegeben. In die Tropfen wurden vom Rand her jeweils Bakterien eingerührt. Bei einem positiven Reaktionsausfall kam es zu einer sichtbaren Agglutination des Kaninchencitratplasmas. Blieb eine Agglutination aus, wurde die Reaktion als negativ bewertet.

4.3.5. Staphyslide-Test

Der Staphyslide-Test (bioMérieux, Frankreich) wurde zum Ausschluß von *S.aureus* durchgeführt. Dieser besitzt einen Proteinrezeptor für ein Fibrinogenfragment, der koagulase negativen Staphylokokken fehlt. So werden stabilisierte und durch Fibrinogen sensibilisierte Hammelerythrozyten in Gegenwart eines *S-aureus*-Stammes agglutiniert. Diese Agglutination bleibt bei koagulase negativen Staphylokokken aus.

4.4. Biotypisierung

Die Speziesidentifizierung erfolgte nach dem Schema von Kloos und Schleifer (57). Untersucht wurde das Vergärungsmuster für verschiedene Zucker, die Phosphataseaktivität, die Fähigkeit zur Nitratreduktion und die Sensibilität für Novobiocin. Zur genaueren Einteilung wurde weiterhin die Ureaseaktivität bestimmt (9).

4.4.1. Zuckervergärung (57)

Die beim Zuckerabbau entstehende Säure bewirkt eine pH-Veränderung, die durch einen Farbumschlag des Indikators sichtbar

wird. Hierzu wurden Glasröhrchen mit Purple Agar Base, 31g/l, pH 6,8 (Difco), plus 1% Zucker mit jedem Stamm beimpft und 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Bei den Zuckern handelte es sich um Fructose, Galactose, Mannose, Xylose, Ribose, Maltose, Lactose, Melzitose, Saccharose, Trehalose, Mannit und Xylit. Die Ablesung erfolgte jeweils nach einem, zwei und drei Tagen. Eine positive Reaktion wurde durch einen Farbumschlag von lila nach gelb angezeigt.

4.4.2. Phosphatsetest (79)

Koagulasenegative Staphylokokken, die das Enzym Phosphatase besitzen, vermögen Phenolphthaleinphosphat zu spalten, wobei Phenolphthalein frei wird. Dieses kann mittels Ammoniak nachgewiesen werden.

Zur Herstellung der Phosphataseröhrchen wurde 1l A.dest, 5g Peptone (Oxoid), 5g Lab Lemco (Oxoid), 5g NaCl und 10g Agar, pH 7,4, autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 55°C wurden 10ml einer 1%igen Phenolphthaleinphosphat-Ampulle (Oxoid SR 31) zugegeben. Nach der Beimpfung wurden die Röhrchen 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde in jedes Röhrchen ein Tropfen 25%iger Ammoniak gegeben. Eine Rosafärbung der Kolonien galt als positive, keine Veränderung der Kolonienfarbe als negative Reaktion.

4.4.3. Nitratreduktion (21)

In 5ml Bouillon (1000ml Aqua dest, 3g Lab Lemco, 5g Pepton, 1g Kaliumnitrat) wurden einige Bakterienkolonien eingerührt, und diese Suspension wurde 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurden jeweils einige Tropfen Sulfanilsäurereagenz (0,8g/100ml 5n Essigsäure) und Naphtyl-1-aminreagenz (0,5g/100ml 5n Essigsäure) zugegeben. Kam es zu einer Rotfärbung galt die Reaktion als positiv. Blieb die Rotfärbung aus, wurden einige Zinkspäne zugegeben. Kam es nun zu einer Rosafärbung, galt die Reaktion als negativ.

4.4.4. Novobiocin Sensibilitätstestung (72)

Hierzu wurde die Agar-Diffusions-Methode angewandt mit Novobiocin 5µg Testblättchen (siehe 4.5.).

4.4.5. Ureaseaktivität (19)

Harnstoffröhrchen (Rezeptur: 10g Neutralized Soya Peptone L44 (Oxoid), 0,8g Kaliumdihydrophosphat, 1,2g Dinatriumhydrophosphat, 5,0g NaCl, 3g Hefeextrakt, 11g Agar, 15g Harnstoff, 5,5g Glucose und 10ml Bromthymolblau 1,5%) wurden beimpft, 24 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend abgelesen. Eine Blaufärbung des zuvor grünen Mediums galt als positive, eine Gelbfärbung als negative Reaktion.

4.5. Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit

Diese wurde mit dem Agar-Diffusions-Blättchen-Test nach Kirby-Bauer, entsprechend dem National Committee for Laboratory Standards (72), durchgeführt.

Mit der sterilen Öse wurden jeweils einige Bakterienkolonien in 1ml 0,9%ige NaCl-Lösung eingerührt, und mit einem sterilen Wattetupfer wurde die Suspension auf Müller-Hinton-Platten verstrichen. Dann wurden die Antibiotika-Blättchen mit der sterilen Pinzette auf die Platten gelegt, und es folgte eine 24stündige Inkubation bei 37°C. Eine Ausnahme stellte Oxacillin dar, für dessen Testung den Müller-Hinton-Platten 2% NaCl zugesetzt wurde, und wo die Inkubationstemperatur 30°C betrug. Dies ist erforderlich, da Oxacillin-resistente CNS bei einer Bebrütungstemperatur von 37°C langsamer wachsen als Oxacillinsensible Keime. Niedrigere Bebrütungstemperaturen und Kochsalzsupplementierung sind die geeignetesten Methoden, um diesem Problem zu begegnen (104).

Anschließend erfolgte die Ablesung durch Ausmessung der Durchmesser der Hemmhöfe. Eingeteilt wurde in sensibel (++) , mäßig sensibel (+) und resistent (R).

Bei den verwendeten Antibiotika handelte es sich um Novobiocin 5µg (Oxoid), Ampicillin 10µg (Oxoid), Cephazolin 30µg (Oxoid), Gentamycin 10µg (Merck), Vancomycin 30µg (Oxoid), Erythromycin 15µg (Oxoid), Imipenem 10µg (Oxoid), Fosfomycin 50µg (Oxoid), Clindamycin 10µg (Oxoid), Ciprofloxacin 5µg (Oxoid), Fusidinsäure 10µg (Oxoid) und Oxacillin 5µg (Oxoid).

Die Stämme wurden als resistent angesehen bei einem Hofdurchmesser von Novobiocin <14mm, Ampicillin <29mm, Vancomycin <11mm, Ciprofloxacin <19mm und Oxacillin <16mm. Ab dem angegebenen Wert galten die Stämme als sensibel. Bei den anderen Antibiotika wurde noch unterschieden zwischen sensibel und mäßig sensibel (Wert unter der ersten Zahl = resistent, ab erster bis zur zweiten Zahl = mäßig sensibel, ab zweiter Zahl = sensibel): Cephazolin 19mm/24mm, Gentamycin 15mm/18mm, Erythromycin 17mm/21mm, Imipenem 13mm/16mm, Fosfomycin 14mm/20mm, Clindamycin 19mm/24mm und Fusidinsäure 14mm/19mm.

Jedes Isolat wurde an einem Tag gegen alle Antibiotika getestet.

4.6. Schleimtest nach Christensen

Dieser semiquantitative Test nach der Methode von Christensen et al. (14) diente dem Nachweis der Adhärenz der Bakterien an glatten Oberflächen. Als Positiv- und Negativkontrollen wurden die *S.epidermidis*-Stämme RP62A (G.Christensen (18); ATCC 35984) und M7 (mit Mitomycin-C behandelte Mutante von RP62A, Hygieneinstitut der Universität zu Köln) verwendet.

Kunststoff-Röhrchen (Greiner) mit 5ml TSB (Trypticase Soy Broth, Oxoid: 1000ml Aqua dest, 170g Caseinhydrolysat, 3,0g peptisch verdautes Soyamehl, 5,0g Natriumchlorid, 2,5g Dikaliumphosphat, 2,5g Dextrose, pH7,3) wurden mit jeweils einigen Bakterienkolonien beimpft und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden 1:100

Verdünnungen in TSB angefertigt, d.h. in neue Kunststoff-Röhrchen mit 5ml TSB wurden 50µl der Bakteriensuspensionen gegeben. 200µl dieser Verdünnungen wurden in Mikrotiterplatten mit Flachboden (Nunc) pipettiert, pro Stamm jeweils dreifach. Die Platten wurden abgedeckt und 24 Stunden bei 37°C bebrütet.

Im Anschluss daran wurden die Platten auf Zellstoff geleert, leicht ausgeklopft und gut trocknen gelassen. Es folgte eine 30sekündige Färbung mit Safranin (0,1% in Aqua dest., filtriert), jeweils 200µl/Loch. Die Platten wurden wiederum auf Zellstoff geleert und immer wieder ausgeklopft um Safraninreste zu entfernen.

Nachdem die Platten vollständig getrocknet waren erfolgte die photometrische Messung im Titertek-Multiskan (range 2,0, 492nm). Pro Stamm ergaben sich drei Werte. Es wurde jeweils der Mittelwert der sich ergebenden optischen Dichten (OD) errechnet. Waren die OD-Werte kleiner oder gleich 0,120, wurden die Organismen als nicht adhärent klassifiziert. Überschritten die Werte 0,240, wurden die Stämme als stark adhärent klassifiziert. Stämme, deren OD-Werte größer als 0,120 aber kleiner oder gleich 0,240 waren, wurden als schwach adhärent klassifiziert (16).

4.7. Untersuchung der Plasmid-DNA

Bei Patienten mit mehreren positiven Kulturen wurde von den Stämmen, die der selben Spezies angehörten, eine Untersuchung der Plasmid-DNA durchgeführt.

4.7.1. Extraktion von Plasmid-DNA

Diese wurde nach einer Modifikation der Methode von Wilson, Totten und Baldwin (106) durchgeführt.

Hierzu wurde eine Öse voll Bakterien von der frischen, 24 Stunden bebrüteten Blutplatte abgenommen und in Greiner-Röhrchen mit 1ml NaCl/EDTA/Saccharose (2,5 M NaCl, 0,05 M EDTA pH 7,5, 5% Saccharose) eingerieben. Dann wurden 150µg Lysostaphin (Sigma)

zugegeben und alles eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 4mg Lysozyme (Merck) zugegeben, und erneut erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C. Zur Lyse der Zellen wurden nun 1,5ml „Lysis mixture“ (Brij-58 1%, Na-desoxycholate 0,4%, EDTA 0,06 M, Tris 0,05 M, pH 8,0) zugegeben, und nach mehrmaligem vorsichtigem Umkippen der Röhrrchen wurden die Lysate in Zentrifugenröhrrchen umgefüllt und 45 Minuten bei 4°C und 16000 U/min zentrifugiert.

2ml des Überstandes, der die Plasmid-DNA enthielt, wurde in neue Greiner-Röhrrchen gefüllt, und das Sediment, mit Zelltrümmern und chromosomaler DNA, wurde verworfen. Dem Überstand wurden je 200µg RNase (Serva) und 200µg Proteinase K (Merck) zugegeben und alles 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von -20°C kaltem Isopropanol. Zur Präzipitation von DNA wurde die Mischung über Nacht bei -20°C stehen gelassen.

Am nächsten Tag wurde das Präzipitat 20 Minuten bei 4°C und 3000 U/min zentrifugiert und anschließend das Isopropanol abgesaugt. Der Bodensatz wurde in 50µl TES Puffer III (0,03 M Tris, 0,05 M NaCl, 0,005 M EDTA, pH 8,0) gelöst.

4.7.2. Probenvorbereitung

Zur Vorbereitung der Proben wurden 25µl gewonnene Plasmid-DNA plus 25µl Stop mix (0,035g Bromphenolblau, 16,5ml Glycerin, 3,5g SDS, mit TES aufgefüllt auf 50ml) in Eppendorfhütchen gefüllt. Als Kontrollprobe wurden 15µl DNA molecular weight marker II (Boehringer Mannheim) plus 5µl Stop mix verwendet.

4.7.3. Agarose-Gel Elektrophorese

Für die Elektrophorese wurden Tris-Borat-EDTA-Puffer (89mM Tris, 2,5mM EDTA, 88mM Borsäure, pH 8,5) und 0,8%iges ME Agarosegel in Tris-Borat-EDTA-Puffer (1,44g Agarose auf 180ml Puffer) angefertigt.

4.7.4. Sichtbarmachung der Plasmid-DNA mit Ethidiumbromid (69)

Nach dem Lauf wurde das Gel 30 Minuten mit Ethidiumbromid (5mg/ml) behandelt und anschließend 30 Minuten in Aqua dest. gelegt. Im Anschluss daran wurden die Plasmid-DNA-Banden unter der UV-Lampe sichtbar gemacht und fotografiert.

4.7.5. Auswertung

Die Plasmid-DNA-Bandenprofile der Stämme eines Kindes wurden miteinander verglichen.

4.8. Untersuchung der extrazellulären Proteine (20)

Dieses Verfahren diente der Auftrennung der extrazellulären Proteine der Isolate. Untersucht wurden wiederum die Stämme einer Spezies bei den Kindern mit mehreren positiven Isolaten.

Im dichten Trägermaterial Polyacrylamid wandern bei gleicher Ladung größere Proteinmoleküle langsamer als kleinere. Durch den Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS), welches die Ladungsunterschiede zwischen den Proteinmolekülen nivelliert, erreicht man eine optimale Auftrennung der Proteine nach der Molekülgröße.

4.8.1. Gewinnung von extrazellulären Produkten

Die Stämme wurden auf Blood Agar Base-Platten geimpft und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurde auf pro Stamm zwei BHI-Platten (Brain Heart Infusion Agar, Difco) je ein autoklavierter Dialyseschlauch (Durchmesser 67mm) gelegt. Anschließend wurde je eine Öse voll mit Bakterien der 24-Stunden Stämme in je ein Röhrchen mit 5ml NaCl eingerührt und nach sorgfältigem Mischen gleichmäßig auf die jeweils zwei BHI-Platten abpipettiert. So wurden die BHI-Platten nun 24 Stunden bei 37°C bebrütet.

Am nächsten Tag wurden die Dialyseschläuche mit sterilen Pinzetten auf den jeweiligen Plattendeckel gelegt. Für jeden Stamm wurde auf einen der beiden Schläuche 0,5ml 0,15 M PBS-Puffer (75ml von Lösung I: 0,03 M Dinatriumhydrophosphat 5,34g/l, 0,12 M NaCl 7,01g/l plus 25ml von Lösung II: 0,03 M Kaliumdihydrophosphat 4,08g/l, 0,12 M NaCl 7,01g/l; pH 7,2) gegeben. Dieser wurde mit einem sterilen Glasspatel verteilt, dann wurde die Flüssigkeit auf den entsprechenden zweiten Deckel abpipettiert, hier erneut verteilt und im Anschluss daran in Eppendorfhütchen pipettiert. Diese wurden nun 4 Minuten bei 12000 U/min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in neue Eppendorfhütchen abpipettiert, das Sediment verworfen.

4.8.2. Materialien (61)

- a) Trenngel Puffer:
18,17g 1,5 M Tris
2ml 0,4% SDS
pH 8,8
mit Wasser auf 100ml auffüllen

- b) Sammelgel Puffer:
6,06g 0,5 M Tris
2ml 0,4% SDS
pH 6,8
mit Wasser auf 100ml auffüllen

- c) Trenngel Acrylamid:
30g Acrylamid
0,8g Bisacrylamid
23,8g Glycerol
mit Wasser auf 100ml auffüllen

- d) Sammelgel Acrylamid:
wie Trenngel Acrylamid, jedoch ohne Glycerol

- e) 2xProbenpuffer:
 - 12,5ml Füllungsgel Puffer
 - 10,0ml Glycerol
 - 1,5ml 0,1% BPB
 - 15,0ml 20% SDS
 - 6ml Wasser

- f) 12%iges Trenngel:
 - 15ml Trenngel Puffer
 - 24ml Trenngel Acrylamid
 - 15µl Temed
 - 180µl Ammoniumpersulfat
 - 20,88ml Wasser

- g) 4,5%iges Sammelgel:
 - 5ml Sammelgel Puffer
 - 2,8ml Sammelgel Acrylamid
 - 20µl Temed
 - 120µl Ammoniumpersulfat
 - 12,2ml Wasser

- h) Elektrodenpuffer:
 - 72g Glycin
 - 15,5g Tris
 - 25ml 20% SDS
 - 4975ml Wasser
 - pH 8,3

- i) Coomassie Blau Färber (Pharmacia):
 - Lösung A: 0,2%iges Coomassie blue R250, in Methanol gelöst
 - Lösung B: 20%ige Essigsäure in Wasser
 - Kurz vor Gebrauch beide Lösungen im Verhältnis 1:1 mischen

- j) Entfärbungslösung:
 - 200ml Methanol
 - 100ml Essigsäure
 - 700ml Aqua dest.

4.8.3. Probenvorbereitung

Zur Probenvorbereitung wurden je 100µl der so gewonnenen Flüssigkeit plus 50µl 2xProbenpuffer in neue Eppendorfhütchen gefüllt und alles bei -20°C eingefroren. Als Referenzproben dienten 10µl Low Molecular Weight plus High Molecular Weight Calibration Kit (Pharmacia) plus 90µl Aqua dest. und 50µl 2xProbenpuffer.

4.8.4. Vorbereitung der Elektrophorese

Für die vertikale Elektrophorese wurde zunächst das 12%ige Trenngel vorbereitet. 27ml dieser Lösung wurden nun pro Gel in das entsprechende Elektrophoresegestell (Pharmacia) gefüllt. Darüber wurden je 1ml Aqua dest. gegeben. Nachdem das Gel erhärtet war, wurde das Wasser wieder entfernt.

Auf das erhärtete Gel wurde nun das 4,5%ige Sammelgel gegeben. Auf diese Schicht wurde eine Art Plastikkamm gesteckt, um später Taschen für die aufzutragenden Proben zu haben.

Nachdem auch das Sammelgel erhärtet war, wurde der Plastikkamm wieder entfernt. Die so entstandenen Taschen wurden erst halb voll mit Elektrodenpuffer gefüllt, dann wurden die inzwischen aufgetauten Proben vorsichtig ebenfalls eingefüllt. Die Vorrichtung wurde mit Elektrodenpuffer bis zum Rand voll gemacht, mit einem Deckel geschlossen und so in die Elektrophoresekammer gestellt, die dann zur Hälfte ebenfalls mit Elektrodenpuffer gefüllt wurde.

4.8.5. Laufbedingungen

Die Elektrophorese wurde bei 400 Volt und 11 Watt durchgeführt. Gestartet wurde mit 200mA. Die Laufzeit betrug ca. 3½ Stunden.

4.8.6. Fixierung, Färbung und Entfärbung der Gele

Nach der Elektrophorese wurden die Gele zur Fixierung ca. 30 Minuten in 20%ige Trichloressigsäure eingelegt und danach zweimal kurz mit Leitungswasser abgespült.

Im Anschluss daran erfolgte die einstündige Färbung mit Coomassie Blau bei 60°C im Wasserbad.

Danach wurden die Gele über Nacht bei Raumtemperatur in Entfärber eingelegt.

4.8.7. Auswertung

Zur Aufbewahrung wurden die Gele in 0,7%ige Essigsäure eingelegt, zu einem späteren Zeitpunkt wurden sie fotografiert. Die Bandenmuster der verschiedenen Isolate eines Kindes wurden miteinander verglichen.

4.9. Konservierung der Bakterienstämme

Zur Konservierung wurde eine Öse voll Bakterien in Eppendorfhütchen mit Tryptic Soy Broth plus 20% Glycerin eingerührt und alles bei -70°C aufbewahrt.

5. Ergebnisse

Zur Kennzeichnung der Kinder und des Herstammungsortes der Bakterien wurde jedem Kind eine Zahl gegeben, und für den Herstammungsort der Bakterien wurden Buchstaben zur Abkürzung hinzugesetzt: U=Urin, O=Ohr, A=Anus, N=Nase, R=Rachen, Nb=Nabel, M=Magen, T=Trachea, DS=Drainagespitze, S=Stuhl, B=Blut, ZVK=zentraler Venenkatheter, Pe=Perikardpunktat und Pl=Pleurapunktat.

5.1. Patientendaten

Bei den 69 Kindern handelte es sich um 34 Mädchen und 35 Jungen mit einem Alter von 1 bis 59 Tagen (Mittel 5,5 Tage) zum Zeitpunkt der Probeentnahmen (s. Tab. 1). 27 dieser Neugeborenen wiesen mehrere positive Isolate an verschiedenen Körperstellen auf, und hier wurde die Krankenakte retrospektiv auf weitere Daten untersucht.

Bei diesen 27 Kindern handelte es sich um 13 Jungen und 14 Mädchen. Die Entbindung dieser Kinder erfolgte in 15 Fällen spontan. Bei einem Kind musste eine Vakuumextraktion, bei 11 Kindern eine Sectio durchgeführt werden.

Die klinischen Charakteristika dieser Kinder sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Das mittlere Geburtsgewicht lag bei 2608g (zwischen 770g und 5040g), das mittlere Gestationsalter bei 36,7 Wochen (zwischen 29 und 41 Wochen). 11 Kinder hatten ein niedriges Geburtsgewicht (<2500g) und 2 dieser 11 Kinder hatten ein sehr niedriges Geburtsgewicht (<1500g) (77). Ein erniedrigter APGAR-Wert (nach 1 Min. <4, nach 5 Min. <6) wurde nur bei einem Kind festgestellt. Die Rektaltemperatur war bei 3 Kindern erhöht (>37,5°C), bei 2 Kindern erniedrigt (<36°C) und bei 16 Kindern im Normbereich. Bei den restlichen 6 Kindern wurde keine Messung vorgenommen. Der Nabelschnur-pH-Wert, der bei 17 der Kinder gemessen wurde, lag 14 mal im Normbereich und war in 3 Fällen im Sinne einer Azidose vermindert (<7,20). 14 der 27 Neugeborenen mussten kurz nach der Geburt beatmet werden. Die Beatmungsdauer lag zwischen 24 Stunden und 59 Tagen und

betrug im Mittel 15,2 Tage. Allen 27 Kindern wurde ein venöser Zugang gelegt. Dieser erfolgte in 20 Fällen peripher, in 6 Fällen wurde ein ZVK und in einem weiteren Fall ein Nabelvenenkatheter gelegt.

Seitens der Mutter lagen folgende perinatale Risikofaktoren vor: Bei 5 der 26 Mütter (bei den Kindern mit den Nummern 22 und 23 handelte es sich um Zwillinge) erfolgte der Blasensprung vorzeitig. Hierbei war in einem Fall das Fruchtwasser blutig, und die Mutter erhielt prophylaktisch Mezlozillin, und in einem weiteren Fall, wo die Mutter bis zur 28. Schwangerschaftswoche Ovulationshemmer eingenommen hatte, lag zu wenig Fruchtwasser vor. Von den übrigen Müttern wurde bei einer ein Hydramnion nachgewiesen, bei einer anderen war das Fruchtwasser grün und erbsbreiartig. Eine Mutter war Diabetikerin, eine weitere war querschnittsgelähmt. Letztere hatte unter der Geburt eine Temperatur von 39°C und wurde mit Cefotaxim therapiert. In einem Fall musste wegen schwersten Dezelerationen eine Notsectio durchgeführt werden. Eine Glukokortikoidprophylaxe wurde bei insgesamt 5 Frauen durchgeführt.

Das Alter der Kinder zum Zeitpunkt der Probeentnahmen, d.h. zum Zeitpunkt des Sepsisverdachtes, lag zwischen 24 Stunden und 59 Tagen und betrug im Mittel 6,1 Tage. 19 Kinder waren weniger als 48 Stunden alt und erfüllten somit die Kriterien für eine Frühsepsis, die übrigen Kinder waren älter als 48 Stunden, was einer Spätsepsis entsprach.

Die laborchemischen Daten der Kinder zum Zeitpunkt der Bakterienisolierung zeigt Tabelle 1. Das C-reaktive Protein (CRP) war bei 8 Kindern erhöht (>10mg/dl), bei den übrigen im Normbereich. Bei 15 Neugeborenen lag eine Thrombopenie (<150.000/ml) vor. Der Blutzucker lag bei einem Kind im Hypoglykämiebereich (<40mg/dl), die übrigen Kinder wiesen normoglykämische Werte auf, und es wurden keine hyperglykämischen Werte (>130mg/dl) gefunden. Der I zu T-Quotient (unreife durch Gesamt-Neutrophile) war in 17 Fällen erhöht (>0,16). Die Leukozytenzahlen lagen bei 20 Neugeborenen im Normbereich (zwischen >5.000/ml und <20.000/ml). Bei 7 Kindern war sie im Sinne einer Leukozytose erhöht.

Tabelle 1: Laborchemische Daten zum Zeitpunkt der Probenentnahme

	Alter (Tage)	CRP (mg/dl)	Thrombozyten (pro ml)	Blutzucker (mg/dl)	I/T	Leukozyten (pro ml)
1	13	<6	200.000	109	0,08	11.100
4	1	<6	136.000*	51	0,06	19.500
5	1	<6	152.000	104	0,07	8.000
6	1	<6	210.000	76	0,48*	14.300
10	1	<6	70.000*	129	0,24*	10.000
12	2	<6	136.000*	127	0,03	9.000
14	1	<6	150.000	53	0,48*	27.200*
15	3	<12<24*	100.000*	78	0,22*	19.000
16	1	<6	62.000*	76	0,40*	12.700
18	1	<6	220.000	68	0,15	22.600*
21	1	<6	70.000*	88	0,49*	8.700
22	1	<6	144.000*	64	0,49*	13.900
23	1	<6	148.000*	84	0,44*	20.100*
26	4	<6	142.000*	100	0,16	15.300
27	1	<12<24*	136.000*	41	0,26*	39.200*
28	2	<6	110.000*	88	0,16	10.900
30	1	<12<24*	108.000*	31*	0,25*	23.300*
31	1	<6	250.000	78	0,07	14.300
32	2	<24<48*	215.000	87	0,23*	15.000
35	1	<6	210.000	61	0,30*	32.900*
38	26	<24<48*	200.000	47	0,65*	11.000
40	2	<6	176.000	79	0,24*	25.000*
46	59	<96*	120.000*	64	0,25*	6.800
51	2	<6	64.000*	42	0,02	8.000
55	17	<96*	200.000	115	0,22*	17.000
58	17	<6	376.000	71	0,06	12.200
64	3	<48<96*	56.000*	58	0,24*	7.400

Zeichenerklärung: CRP=C-reaktives Protein; I/T=Unreife/Gesamt-Neutrophile; *=pathologisch veränderter Wert

Tabelle 2: Klinische Charakteristika

	G.A.	Geb. G.	m/w	APGAR	B	Z	pH	Temp.	perinatale Risikofaktoren
1	39	2260	m	7-8-8	+	P			
4	38	2290	m	9-10-10	-	P	7,28	37,0	
5	29	900	w	8-8-8	+	ZVK			vorzeitiger Blasensprung blutiges Fruchtwasser Antibiotikaprophylaxe
6	38	3650	m	9-10-10	-	P	7,30	36,5	
10	40	3360	w	10-10-10	-	NVK	7,42	36,5	
12	40	3250	m	9-10-10	+	P	7,31	38,1	
14	41	5040	m	6-8-10	-	P	7,00	36,9	
15	31	770	w	7-8-9	+	ZVK	7,22	34,5	vorzeitiger Blasensprung
16	35	1600	m	2-5-5	+	P			
18	39	3140	w	9-9-9	-	P	7,32		vorzeitiger Blasensprung
21	36	2590	m	8-9-9	+	P	7,28	36,0	
22	34	1580	w	5-8-9	+	P		36,9	1. Zwilling
23	34	1780	w	7-8-9	+	P	7,31	36,6	2. Zwilling
26	39	2720	w	10-10-10	-	P	7,42		
27	40	2750	w	4-8-9	-	P	7,23	36,8	vorzeitiger Blasensprung zu wenig Fruchtwasser OVH bis 28. SW
28	36	2260	w	3-7-8	+	ZVK		36,6	Dezeleration im CTG
30	35	3540	m	9-10-10	-	P	7,49	35,8	Diabetes mellitus
31	37	3220	m	3-7-8	+	P		36,4	
32	41	3750	m	7-8-9	-	P	7,16	37,6	Fruchtwasser grün, erbsbreiartig
35	41	3400	m	9-9-10	-	P	7,32		
38	37	2810	w	8-9-10	-	ZVK		36,8	
40	35	2600	w	8-9-9	-	P		36,6	
46	39	3250	m	9-10-10	+	ZVK		37,0	Antibiotikaprophylaxe Mutter querschnittsgelähmt
51	35	2000	m	6-8-9	+	P	6,97	37,0	vorzeitiger Blasensprung
55	36	2800	w	6-7-9	+	ZVK	7,29	36,8	Hydramnion
58	31	1600	w	4-7-8	+	P	7,37	36,5	2. Zwilling vorzeitige Wehentätigkeit
64	35	1500	w	8-9-10	-	P		37,8	

Zeichenerklärung: G.A.=Gestationsalter in Wochen; G.Gew.=Geburtsgewicht in Gramm; m=männlich; w=weiblich; B=Beatmung; Z=Zugang; pH=Nabelschnur-pH; Temp.=Temperatur in °C; OVH=Ovulationshemmer; P=peripherer Zugang; NVK=Nabelvenekatheter; ZVK=zentraler Venenkatheter

5.2. Ergebnisse zur Speziesdifferenzierung und zur Charakterisierung der Isolate

5.2.1. Bakterienisolierung

Bei den insgesamt 208 Proben, die den 69 Kindern entnommen wurden, konnten in 121 Fällen koagulasenegative Staphylokokken nachgewiesen werden (s. Tab. 3). Die anderen Proben waren entweder steril oder enthielten andere Keime und zwar 9M - gram neg. Stäbchen und *Enterobacter cloacae*, 18O - Proteus und Enterokokken, 21N - gram neg. Stäbchen, 27R - Streptokokken und 47O - *Candida albicans*. Bei den 121 für CNS positiven Isolaten handelte es sich um 19 Rachen-, 10 Nasen-, 15 Anal-, 16 Ohr-, 7 Nabel-, 3 ZVK- und 6 Trachealabstriche, 2 Abstriche von Drainspitzen, 1 Pleura- und 1 Perikardpunktat und 16 Magensaft- 15 Urin-, 8 Stuhl- und 2 Blutproben. Aus vier dieser Isolate wurden neben den CNS noch andere Keime isoliert und zwar Enterokokken aus 13Nb und 54U, *S.aureus* aus 40R und Streptokokken aus 12M.

5.2.2. Ergebnisse der allgemeinen Charakterisierung

Makroskopisch zeigten die Kolonien eine weißliche Färbung sowie einen Durchmesser von 1-6mm.

Im gramgefärbten Präparat erschienen die Isolate alle als dunkelblaue Kokken. Angeordnet waren die Bakterien meist in Haufen. Es fanden sich aber auch Diploformen, kurze Ketten oder einzeln liegende Bakterien.

Die Katalasereaktion fiel bei allen Reinkulturen positiv aus.

Sowohl der Staphyslide-Test als auch der „Clumping factor“ waren bei allen Stämmen negativ.

Tabelle 3: Angefertigte Abstriche mit oder ohne Nachweis von CNS

	A	N	Nb	O	R	T	M	U	ZVK	DS	S	Pe	PI	B
1	+	-	-			+	+							
2							+							
3				+	-									
4	+	+	-		-									
5		+				-	+							
6	-			+	+		-							
7	+	-	-	-	-		-							-
8						+	-							
9						+	G,E							
10		-	-	+	+		+	+						
11									+					
12			+				+,X							
13			+,K											
14		-	+	+										
15	-	-	-	+	-			+						
16	+				+									
17							+							
18	+			P,K				+						
19		-		+	-		-							
20	+	-			-		-							
21	+	G	-	+	+		-/+							
22		+						+						
23	+	+	-	+			-	+						
24								+						
25					+									
26	+	+	+	+	+		+							
27	+			+	X									
28		-	-		+	+								
29								+						
30		+	+	+	+		+							
31					+		+							
32	+	+			+			+						
33					+		-							
34							+							

Zeichenerklärung: A=Anus; N=Nase; Nb=Nabel; O=Ohr; R=Rachen; M=Magen; U=Urin; ZVK=Zentraler Venenkatheter; DS=Drainspitze; S=Stuhl; Pe=Perikarderguß; PI=Pleuraerguß; B=Blut; +=Isolation von CNS; -=Probe steril; G=Gram negative Stäbchen; E=Enterobacter cloacae; P=Proteus; K=Enterokokken; C=Candida albicans; a=S. aureus; X=Streptokokken; Zeichen durch Schrägstrich getrennt: zwei verschiedene Proben; Zeichen durch Komma getrennt: Isolation von verschiedenen Keimen aus einer Probe

Tabelle 3 (Fortsetzung): Angefertigte Abstriche mit oder ohne Nachweis von CNS

	A	N	Nb	O	R	T	M	U	ZVK	DS	S	Pe	PI	B
35					+			+						
36					+		-							
37					+		-							
38		+		-/+	+		-							
39								+						
40	+		+	+	+,a			+						
41											+			
42											+			
43											+			
44								+						
45	+	-	-		-		-							
46							+		+					+
47	+		-	C	-		-							
48						+	-							
49									+					
50												+		
51	+	+	-	+	+		+							
52	-	-	-	+	-		-							
53	-	-	-	-	+		-							
54								+,K						
55									+					+
56						+	-							
57			-	-	-		+							
58						-	+			+			+	
59								+						
60	-	-	-	+	-		-							
61	-		-	+	-		-							
62			-			-	+							
63	-	-	-	-	+									
64	-	+	-	-	-		-	+						
65											+			
66											+			
67											+			
68											+			
69											+			

Zeichenerklärung: A=Anus; N=Nase; Nb=Nabel; O=Ohr; R=Rachen; M=Magen; U=Urin; ZVK=Zentraler Venenkatheter; DS=Drainspitze; S=Stuhl; Pe=Perikarderguß; PI=Pleuraerguß; B=Blut; +=Isolation von CNS; -=Probe steril; G=Gram negative Stäbchen; E=Enterobacter cloacae; P=Proteus; K=Enterokokken; C= Candida albicans; a=S. aureus; X=Streptokokken; Zeichen durch Schrägstrich getrennt: zwei verschiedene Proben; Zeichen durch Komma getrennt: Isolation von verschiedenen Keimen aus einer Probe

5.2.3. Ergebnisse der Biotypisierung

Die Ergebnisse der Biotypisierung zeigt Abbildung 1. Den Hauptanteil der Isolate stellte die Spezies *S.epidermidis* mit 74 (61,2%) der 121 positiven Kulturen dar, gefolgt von *S.haemolyticus* mit 28 (23,2%) Isolaten. In 7 Fällen (5,8%) wurde *S.hominis* isoliert, in 4 Fällen (3,3%) *S.auricularis*, und je einmal (0,8%) wurden *S.warneri*, *S.saprophyticus* und *S.simulans* gefunden. 5 Stämme (4,1%) waren mit dem Differenzierungsschema keiner Spezies eindeutig zuzuordnen und wurden als nicht differenzierbare *S.spezies* bezeichnet.

Die Speziesverteilung unter Mitberücksichtigung des Herkunftsortes der Bakterien gibt Abbildung 2 wieder. Auch hier überwog *S.epidermidis* mit Prozentzahlen zwischen 42,8 (Nabel) und 100% (ZVK, nur 3 Isolate) außer bei dem Pleurapunktat (nur 1 Isolat) und bei den Stuhlproben, wo *S.epidermidis* kein mal nachgewiesen wurde. Bei diesen 8 Stuhlproben zeigte sich ein deutliches Überwiegen von *S.haemolyticus* mit 7 Isolaten (87,5%). Aus Nase, Trachea, ZVK, Blut, Perikard- und Pleurapunktat konnte *S.haemolyticus* nicht nachgewiesen werden. Bei den anderen Herkunftsorten lagen die Häufigkeiten zwischen 16% (Rachen) und 50% (Drainspitze). Die Isolation von *S.hominis* gelang nur aus Pleurapunktat, Nabel, Trachea, Anus, Ohr und Stuhl, mit einem Anteil zwischen 6,7% (Anus) und 100% (Pleurapunktat). *S.auricularis* wurde nur aus Ohr (12,5%), Urin (6,7%) und Blut (50%) isoliert. Die nicht differenzierbaren Stämme stammten aus Nase, Ohr und Anus mit einem Anteil von 10%, 12,5% bzw. 13,3%. *S.warneri* wurde aus einem Rachenabstrich isoliert und machte hier 5% aus, *S.simulans* stammte aus einer Urinprobe und bildete hier 6,7%, und *S.saprophyticus* stammte aus einem Nabelabstrich und machte hier 14,3% aus.

Abb.1: Spezieshäufigkeiten

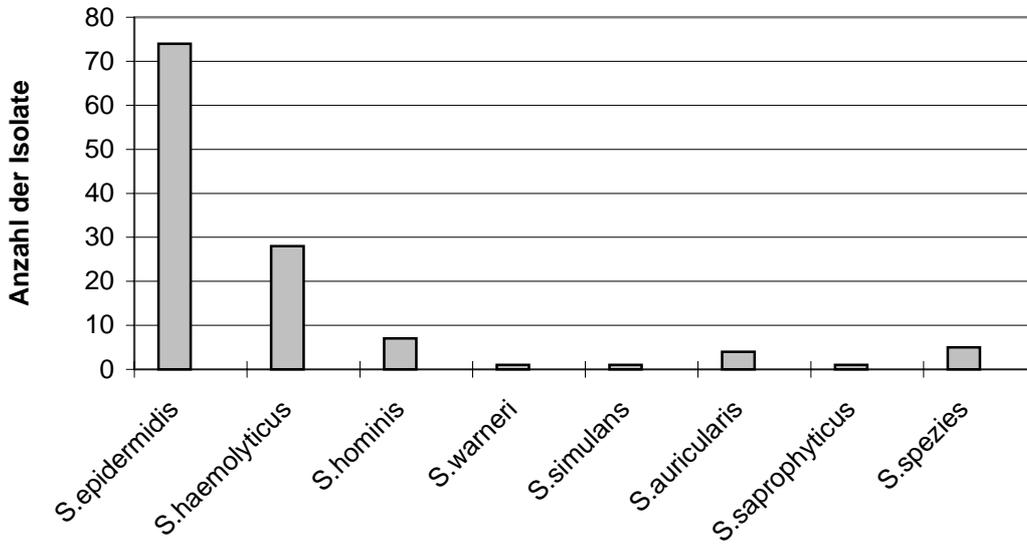
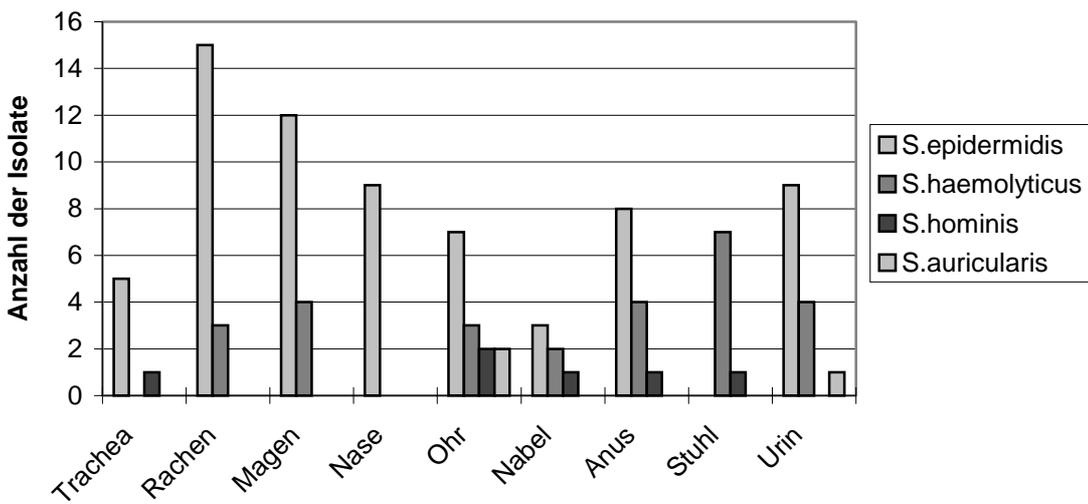


Abb.2 Speziesverteilung unter Berücksichtigung des Herkunftsortes



Zum Teil wurden bei einem Kind mehrere CNS von verschiedenen Körperstellen mit dem gleichen Differenzierungsmuster gefunden. Dies waren im einzelnen:

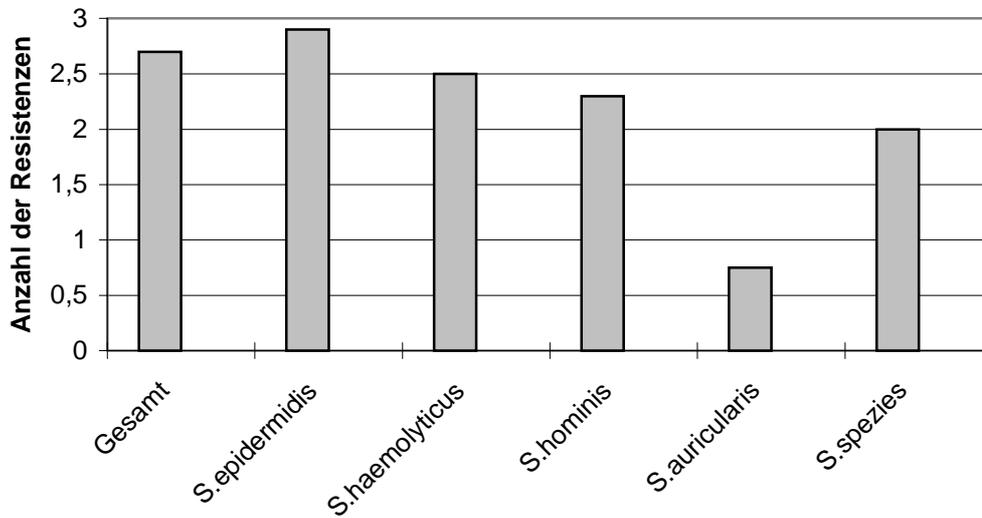
- 1A und 1M (*S.epidermidis*)
- 16R und 16A (*S.haemolyticus*)
- 21O und 21A (*S.haemolyticus*)
- 23U, 23O, 23A und 23N (*S.epidermidis*)
- 26N und 26R sowie 26O und 26A (*S.epidermidis*)
- 30O und 30N sowie 30M und 30R (*S.epidermidis*)
- 38R und 38N (*S.epidermidis*)
- 40R und 40A (*S.epidermidis*)
- 51M und 51R (*S.epidermidis*) sowie 51O, 51N und 51A (*S.spezies*)
- und zuletzt 55B und 55ZVK (*S.epidermidis*).

5.2.4. Ergebnisse der Antibiotikaempfindlichkeitstestung

In den Abbildungen 3-14 sind die Ergebnisse der Antibiotikatestung wiedergegeben.

Bei Betrachtung aller Stämme waren diese gegen im Mittel 2,7 (zwischen 0 und 8) der 12 getesteten Antibiotika resistent (s. Abb. 3). Unter Berücksichtigung der einzelnen Typen zeigte *S.epidermidis* mit im Mittel 2,9 Resistenzen (zwischen 0 und 8) die höchste Anzahl. Bei *S.haemolyticus* waren es im Mittel 2,5 (zwischen 0 und 6), bei *S.hominis* 2,3 (zwischen 0 und 5), bei den nicht differenzierbaren *S.spezies* jedes mal 2,0 und bei *S.auricularis* im Mittel 0,75 (1x0 und 3x2) Resistenzen. Bei den nur einfach isolierten Typen wiesen *S.warneri* und *S.simulans* je 2 Resistenzen auf, bei *S.saprophyticus* waren es 4 Resistenzen.

Abb.3: Mittlere Anzahl an Resistenzen pro Spezies



Alle 121 Isolate waren für Vancomycin empfindlich, ebenso für Novobiocin, mit Ausnahme des einen *S.saprophyticus*. Die höchsten Resistenzraten lagen für die Penizilline vor, und zwar waren 92 Stämme (76%) für Ampicillin und 48 Stämme (39,3%) für Oxacillin resistent. Ähnliche Zahlen wie bei Oxacillin ergaben sich für Gentamycin (44 Stämme [36,4%] resistent, 4 [3,3%] mäßig empfindlich und 73 [60,3%] empfindlich) und Fosfomycin (45 Isolate [37,2%] resistent, 4 [3,3%] mäßig empfindlich und 72 [59,5%] empfindlich). Für die übrigen Antibiotika ergaben sich folgende Werte: Erythromycin - 27 Stämme (22,4%) resistent, 1 Stamm (0,8%) mäßig empfindlich und 93 Stämme (76,8%) empfindlich, Fusidinsäure - 23 Stämme (19%) resistent, 3 (2,5%) mäßig empfindlich und 95 (78,5%) empfindlich, Imipenem - 21 Isolate (17,4%) resistent, 5 (4,1%) mäßig empfindlich und 95 (59,5%) empfindlich, Clindamycin - 15 Stämme (12,4%) resistent, 1 Stamm (0,8%) mäßig empfindlich und 105 Stämme (86,8%) empfindlich und zuletzt Ciprofloxacin - 4 Isolate (3,3%) resistent und 117 (96,7%) empfindlich.

Bei Betrachtung des Resistenzmusters der einzelnen Speziesgruppen fiel auf, dass nur 3 der 4 Stämme von *S.auricularis* jeweils 1 Resistenz zeigten, und die war in allen 3 Fällen gegen

Fosfomycin gerichtet. Sonst war *S.auricularis* gegen alle Antibiotika, mit Ausnahme einer mäßigen Empfindlichkeit für Clindamycin, voll empfindlich.

S.haemolyticus zeigte gegenüber dem Gesamtdurchschnitt deutlich weniger Resistenzen bei Oxacillin (17,9% gegenüber 39,7%), Imipenem (3,6% gegenüber 17,4%) und Gentamycin (10,7% gegenüber 36,4%), für Clindamycin und Fusidinsäure waren sogar alle Stämme empfindlich, gegenüber 12,4 bzw. 19% im Gesamtdurchschnitt. Erwartungsgemäß war *S.haemolyticus* überdurchschnittlich häufig resistent für Fosfomycin (89,3% gegenüber 37,2%) und Ciprofloxacin (14,3%), für letzteres waren alle anderen Spezies empfindlich.

Die nicht differenzierbaren Stämme zeigten nur Resistenzen für Ampicillin (60% gegenüber 76% im Gesamtdurchschnitt), Erythromycin (40% gegenüber 22,4%) und Fosfomycin (100% gegenüber 37,2%). Für alle anderen Antibiotika waren diese Stämme voll empfindlich.

S.hominis war überdurchschnittlich häufig resistent für Fusidinsäure (42,9% gegenüber 19%). Für folgende Antibiotika lag die Resistenzrate jedoch deutlich unter dem Durchschnitt: Ampicillin (42,9% gegenüber 76%), Oxacillin (28,6% gegenüber 39,7%), Gentamycin (28,6% gegenüber 36,4%) und Fosfomycin (28,6% gegenüber 37,2%).

S.epidermidis, mit der höchsten Anzahl an Gesamtresistenzen pro Stamm, lag bei den meisten Antibiotika über dem Gesamtdurchschnitt der Resistenzhäufigkeiten und zwar bei Ampicillin (82,4% gegenüber 76%), Oxacillin (54% gegenüber 39,7%), Fusidinsäure (27% gegenüber 19%), Gentamycin (48,6% gegenüber 36,4%), Imipenem (25,7% gegenüber 17,4%) und Clindamycin (18,9% gegenüber 12,4%). Nur bei Fosfomycin lag die Resistenzhäufigkeit mit 10,8% deutlich unter dem Durchschnitt von 37,2%.

Abbildung 14 zeigt das unterschiedliche Resistenzverhalten der Oxacillin-resistenten und Oxacillin-sensiblen Stämme. Dabei ist zu erkennen, dass die Oxacillin-resistenten Stämme auch gegenüber den übrigen Antibiotika deutlich höhere Resistenzzahlen aufweisen.

Nur gegenüber Fosfomycin überwiegt die Resistenzhäufigkeit bei den Oxacillin-sensiblen Stämmen. Erwartungsgemäß waren sämtliche Oxacillin-resistente Stämme auch gegen Ampicillin und Imipenem resistent.

Abb.4: Ampicillin

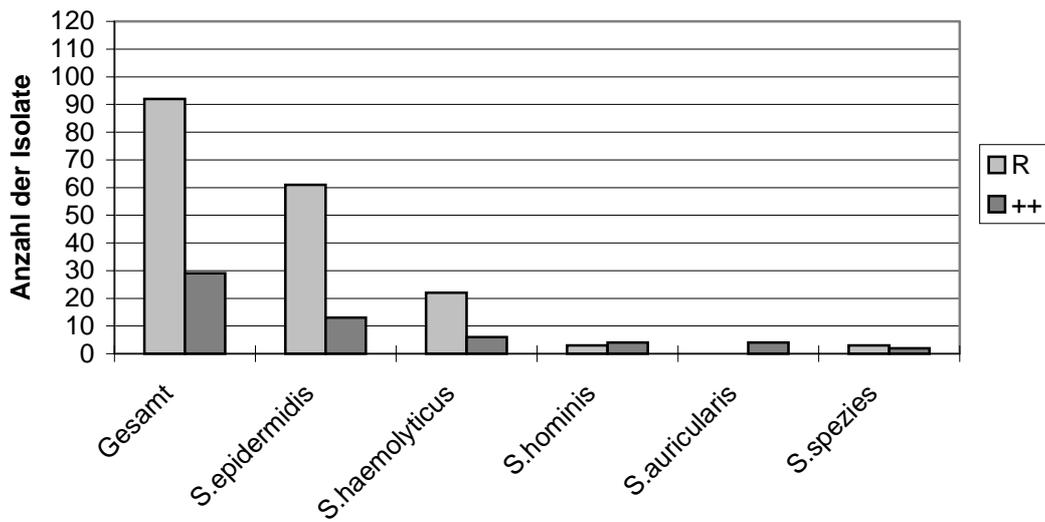


Abb.5: Oxacillin

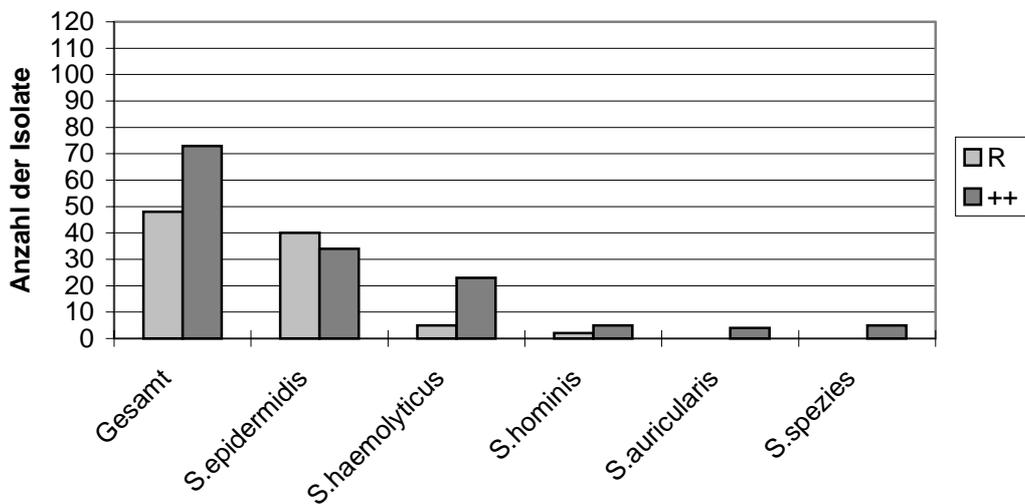


Abb.6: Gentamycin

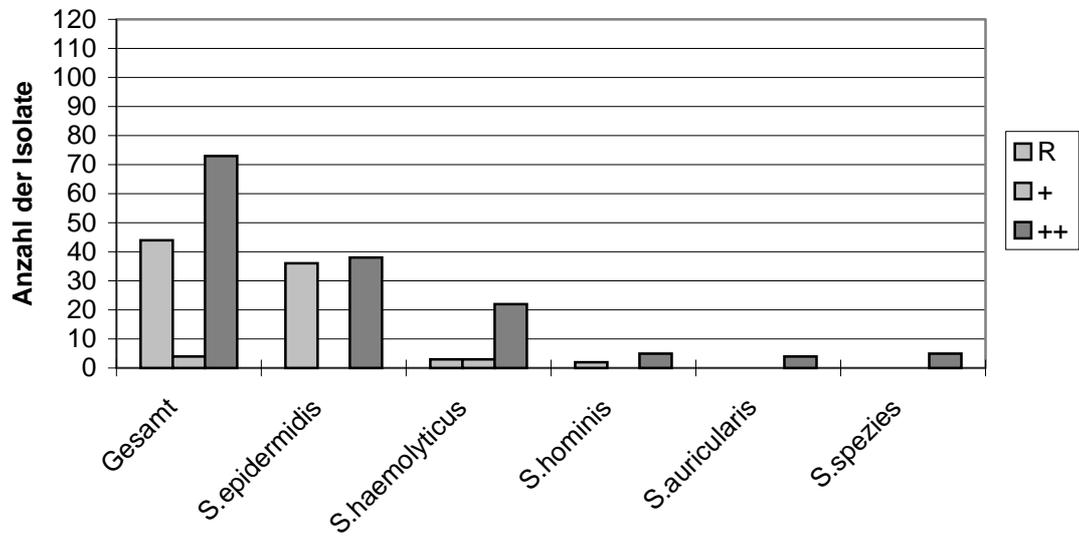


Abb.7: Clindamycin

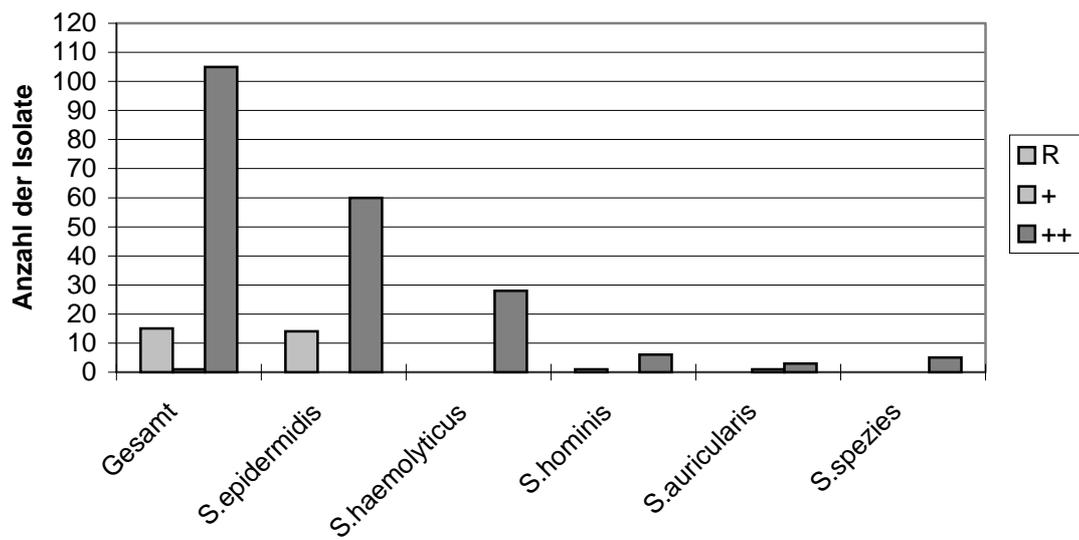


Abb.8: Fusidinsäure

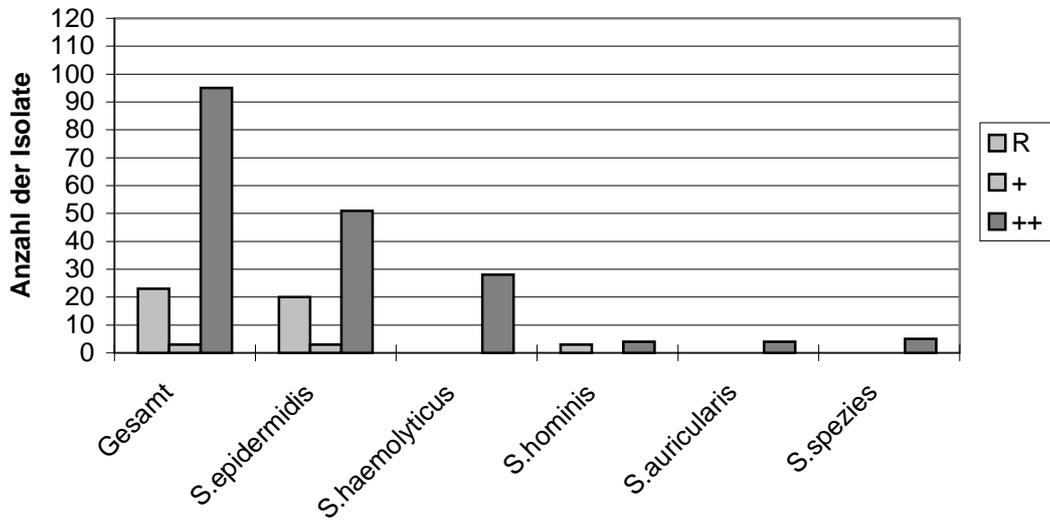


Abb.9: Ciprofloxacin

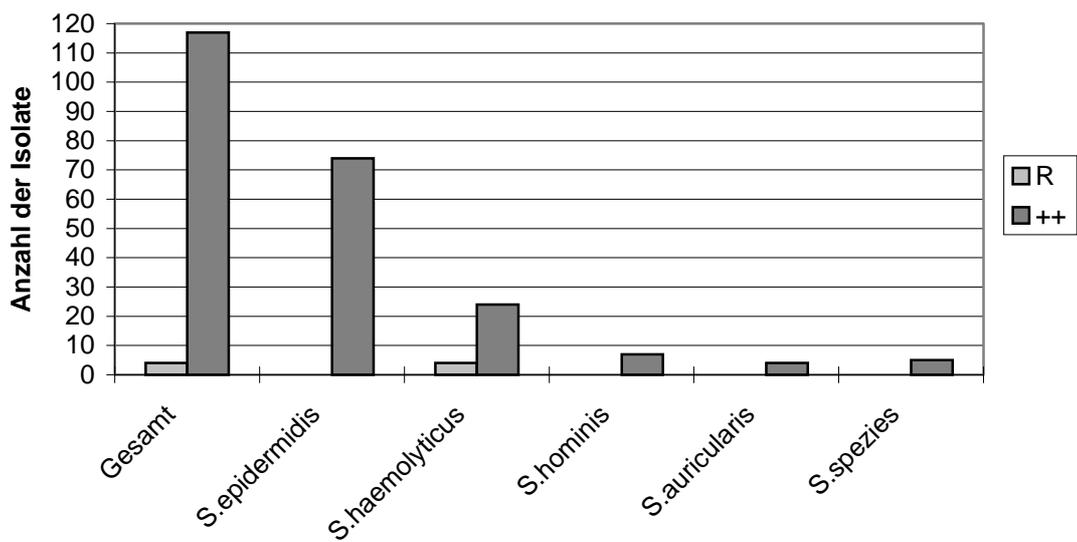


Abb.10: Erythromycin

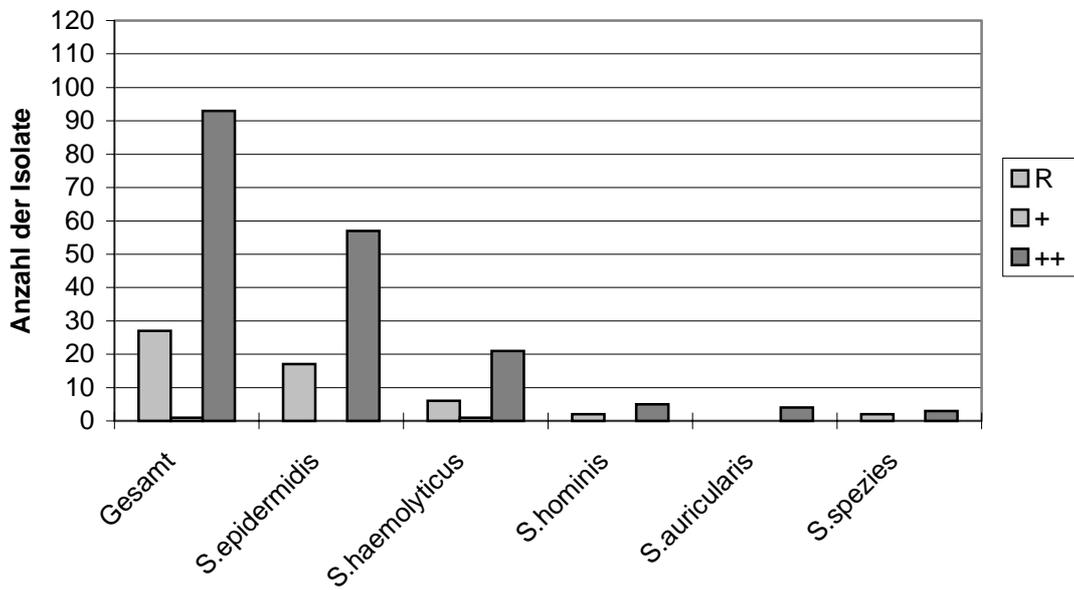


Abb.11: Fosfomycin

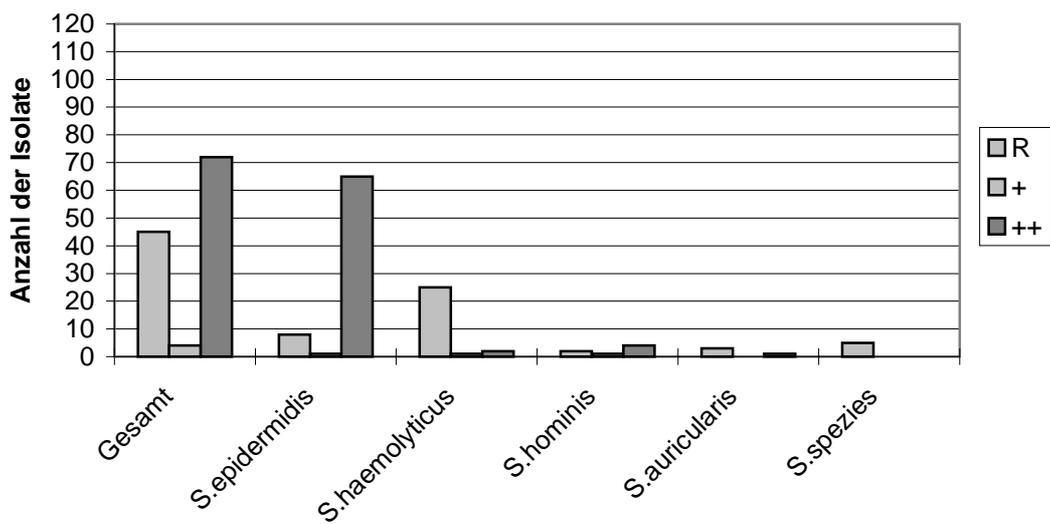


Abb.12: Cephazolin

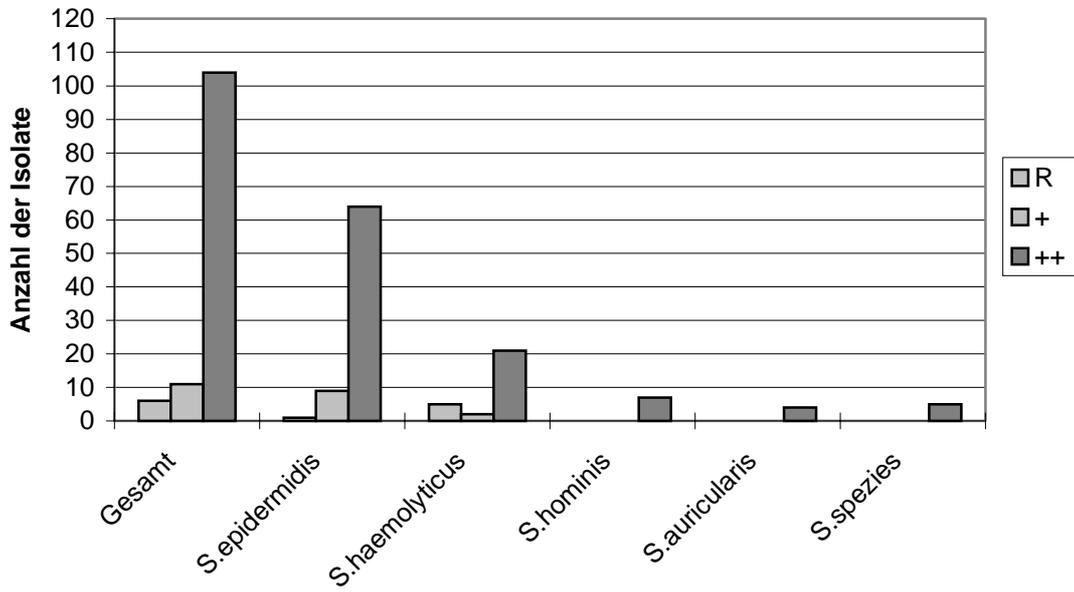


Abb.13: Imipenem

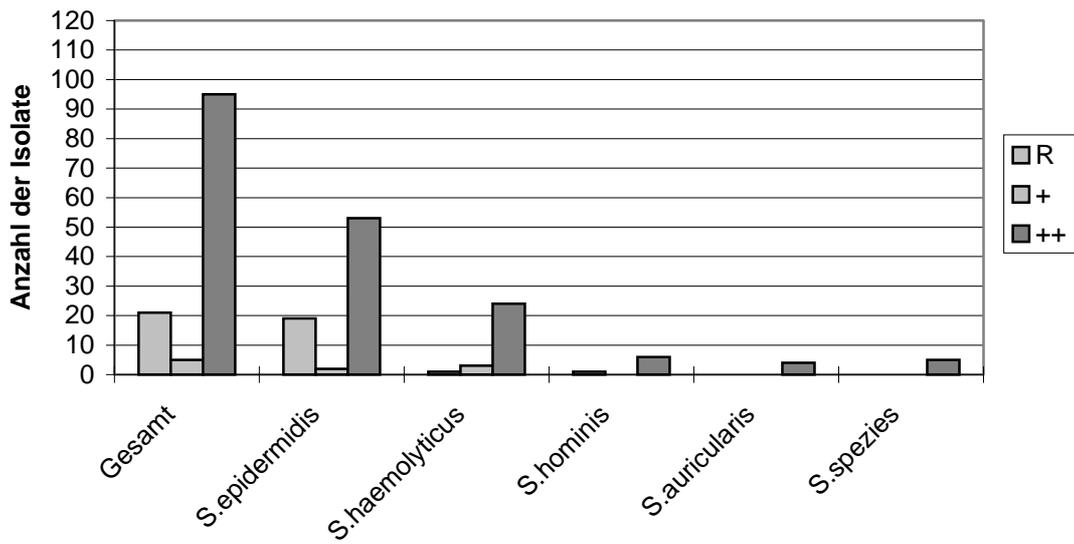
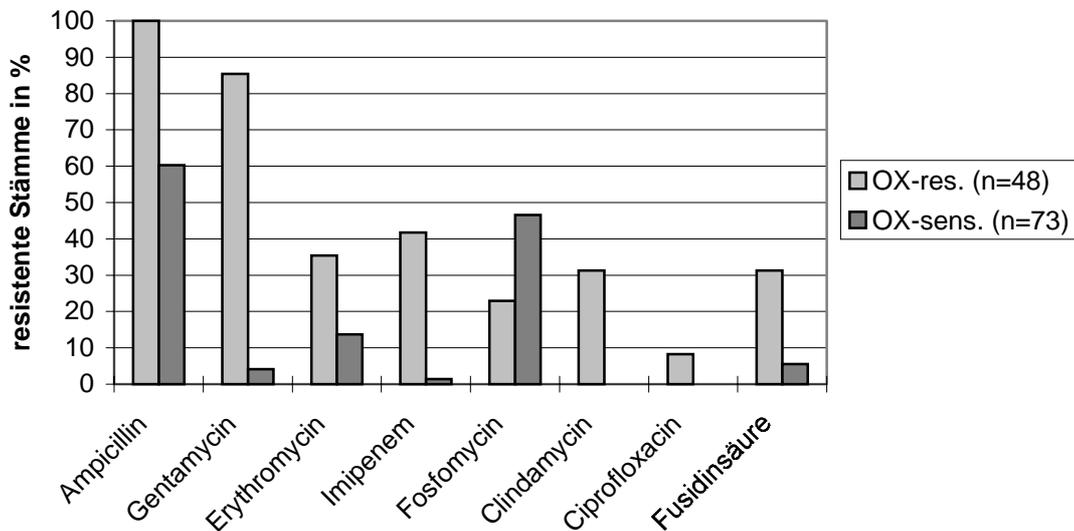


Abb.14: Vergleich der Resistenzhäufigkeiten zwischen OX-resistenten und OX-sensiblen Stämmen



5.2.5. Ergebnisse des Schleimtestes nach Christensen

Die Häufigkeiten von starker, schwacher oder nicht vorhandener Adhärenz aller Stämme sowie innerhalb der einzelnen Spezies zeigt Abbildung 15.

Der Stamm M7 als Negativkontrolle zeigte mit einem mittlerern OD-Wert von 0,107 wie erwartet keine Adhärenz, im Gegensatz zur Positivkontrolle (RP62A), die mit einem mittleren OD-Wert von 0,958 eine starke Adhärenz aufwies.

Den höchsten mittleren OD-Wert hatte mit 1,131 der *S.epidermidis*-Stamm 10U, den niedrigsten mittleren OD-Wert zeigte der *S.haemolyticus*-Stamm 6O mit 0,090.

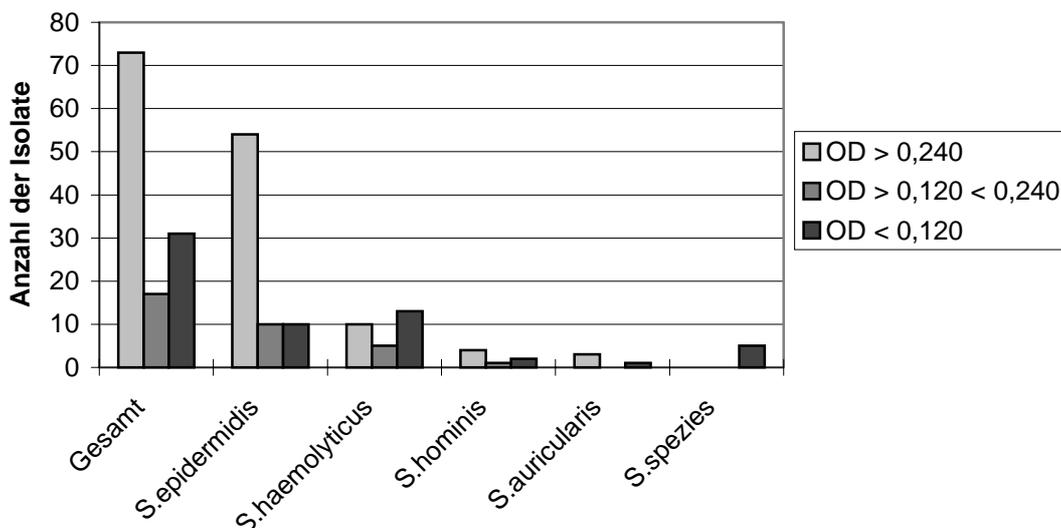
Insgesamt waren 73 Stämme (60,3%) stark, 17 Stämme (14,1%) schwach und 31 Stämme (25,6%) nicht adhären. Die höchsten Adhärenzraten zeigte *S.epidermidis*: 54 der 74 Stämme (73%) waren stark adhären, und nur je 10 Stämme (13,5%) waren schwach bzw. nicht adhären. Im Gegensatz dazu überwogen bei *S.haemolyticus* die nicht adhären Stämme: 13 der 28 Stämme (46,4%) besaßen keine Adhärenzfähigkeit, 5 Stämme (17,9%)

waren schwach und nur 10 Stämme (35,7%) waren stark adhärent. *S.hominis* lag mit seinen Werten in etwa zwischen den beiden erstgenannten Spezies. Hier waren 4 der 7 Stämme (57,1%) stark, 1 Stamm (14,3%) schwach und 2 Stämme (28,6%) nicht adhärent. *S.auricularis* war zu 75% (3 Stämme) stark und zu 25% (1 Stamm) nicht adhärent. Die 5 nicht differenzierbaren Stämme besaßen alle keine Adhärenzfähigkeit. Die nur einfach isolierten Spezies *S.warneri* und *S.saprophyticus* wiesen starke Adhärenz auf, der *S.simulans*-Stamm war schwach adhärent.

Der mittlere OD-Wert der stark adhärennten Stämme innerhalb einer Speziesgruppe war bei *S.epidermidis* deutlich am höchsten. Er betrug hier 0,825. Bei *S.haemolyticus* betrug er nur 0,717, bei *S.hominis* 0,732 und bei *S.auricularis* 0,709.

Folgende Stämme, die von je einem Kind isoliert wurden und der gleichen Spezies angehörten, wiesen jeweils eine starke Adhärenzfähigkeit auf: 1A/T, 10M/U, 4N/A, 16R/A, 21O/A, 23U/O/A/N, 26O/M/A, 28R/T, 30R/O/M/Nb, 38R/N, 40R/A/U, 51M/R und 55B/ZVK. Die beiden *S.epidermidis*-Stämme 26N und 26R sowie die drei nicht differenzierbaren Stämme 51O, 51N und 51A zeigten keine Adhärenz.

Abb.15: Schleimtest nach Christensen



5.3. Ergebnisse zur Typisierung

5.3.1. Einleitung

Das Patientengut dieser Arbeit umfasst 69 Neugeborene, bei denen CNS isoliert wurden. Bei 42 dieser Kinder gelang jeweils nur von einer Körperstelle die Isolation von CNS, bei den übrigen 27 Kindern wurden an mehreren Körperstellen CNS gefunden. Bei 10 dieser 27 Kinder gehörten die bei einem Kind gefundenen Staphylokokken unterschiedlichen Spezies an. Bei den verbleibenden 17 Neugeborenen stellten sich mindestens zwei bei einem Kind isolierte CNS-Stämme, durch die oben angegebenen Typisierungsverfahren, als zu einer Spezies gehörend heraus.

Mit den Isolaten dieser 17 Kinder wurde zur weiteren Differenzierung eine Typisierung nach Antibigramm sowie eine molekularepidemiologische Typisierung mittels einer Plasmidprofilanalyse sowie einer SDS-Elektrophorese zur Proteinprofilanalyse durchgeführt.

5.3.2. Ergebnisse der Typisierung nach Antibigramm

Das Aussehen und die Anzahl der gefundenen Resistogrammtypen zeigt Tabelle 4.

Dabei ergaben sich für die 41 Stämme der Spezies *S.epidermidis* 17 verschiedene Resistogrammtypen. 11 Typen waren nur einfach vertreten. Der häufigste Typ war Resistogrammtyp Nr. 9. Er wurde bei 10 Stämmen gefunden und zeigte lediglich eine Resistenz gegenüber Ampicillin.

Für die 5 Stämme der Spezies *S.haemolyticus* ergaben sich 3 Resistogrammtypen, die 4 Stämme der nicht differenzierbaren *S.spezies* lieferten 2 verschiedene Resistogrammtypen.

Tabelle 4: Aussehen und Häufigkeit der Resistogrammtypen

Spezies	Resistogrammtyp	NV	AMP	KZ	CN	VA	E	IPM	FOS	DA	CIP	FD	OX	Anzahl	
S.epidermidis (n=41)	01	++	R	+	R	++	++	R	R	++	++	R	R	1	
	02	++	++	++	++	++	R	++	++	++	++	++	++	1	
	03	++	R	++	R	++	R	R	++	R	++	R	R	1	
	04	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	8	
	05	++	R	++	R	++	R	R	++	R	++	++	R	1	
	06	++	R	++	R	++	++	++	++	++	++	++	R	4	
	07	++	R	++	R	++	R	+	++	R	++	++	R	3	
	08	++	R	++	++	++	++	++	++	++	++	++	R	R	1
	09	++	R	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	10
	10	++	R	++	R	++	++	R	++	++	++	++	R	2	
	11	++	R	++	++	++	++	R	++	++	++	++	R	1	
	12	++	R	++	++	++	++	R	++	++	++	R	R	1	
	13	++	R	++	R	++	++	R	++	++	++	R	R	3	
	14	++	++	++	++	++	++	++	R	++	++	++	++	++	1
	15	++	R	++	++	++	++	++	++	++	++	++	R	++	1
	16	++	R	++	R	++	R	++	++	++	++	++	R	R	1
	17	++	R	+	R	++	++	++	R	R	++	++	R	1	
S.haemolyticus (n=5)	18	++	R	++	++	++	++	++	R	++	++	++	++	2	
	19	++	++	++	++	++	++	++	R	++	++	++	++	1	
	20	++	R	++	++	++	++	++	R	++	++	++	++	2	
S.spezies (n=4)	21	++	R	++	++	++	++	++	R	++	++	++	++	3	
	22	++	++	++	++	++	++	++	R	++	++	++	++	1	

Zeichenerklärung: NV=Novobiocin; AMP=Ampicillin; KZ=Cephazolin; CN=Gentamycin; VA=Vancomycin; E=Erythromycin; IPM=Imipenem; FOS=Fosfomycin; DA=Clindamycin; CIP=Ciprofloxacin; FD=Fusidinsäure; OX=Oxacillin; ++=sensibel; +=mäßig sensibel; R=resistent

Bei Betrachtung der Resistogramme der verschiedenen, von jeweils einem Kind isolierten Stämme, zeigten die folgenden Stämme ein identisches Muster:

- 16R und 16A,
- 21O und 21A,
- 23O und 23A,
- 26N und 26R sowie 26M und 26A,
- 30N und 30Nb sowie 30M und 30R,
- 35R und 35U,
- 38R und 38N,
- 51M und 51R sowie 51O, 51N und 51A

5.3.3. Ergebnisse der Plamidprofilanalyse

Diese sind in den Abbildungen 16-18 dargestellt. Die letzte Reihe am rechten Bildrand zeigt die, hinsichtlich des Molekulargewichtes bekannten, Referenzbanden des Lambda-DNA Molecular Weight Markers II, verdaut mit Restriktionsendonuklease Hind III (Boehringer Mannheim), die entsprechend gekennzeichnet sind. Die jeweilige Zahl entspricht der Anzahl der Basenpaare (1 Basenpaar = 660 Dalton) der einzelnen Fragmente.

Die 52 untersuchten Isolate wiesen im Mittel 2,83 Plasmidbanden pro Stamm auf. Die Anzahl pro Stamm rangierte zwischen 0 und 8 Banden. Die 41 *S.epidermidis*-Stämme lagen mit einer mittleren Bandenzahl von 3,0 über der mittleren Bandenzahl der 5 *S.haemolyticus*-Stämme (Mittel von 2,4 Banden pro Stamm) und der 4 *S.spezies* (Mittel von 2,5 Banden pro Stamm).

Es wurden sowohl Plasmide mit hohem, mit mittelhohem und mit niedrigem Molekulargewicht, in ähnlicher Häufigkeit, gefunden. Plasmide mit besonders niedrigem Molekulargewicht wurden bei allen 5 Stämmen des Kindes mit der Nummer 51 gefunden, das heißt bei 2 *S.epidermidis*-Stämmen und bei 3 nicht differenzierbaren *S.spezies*.

Mehrere Isolate eines Kindes boten ein identisches Plasmidbanden-Muster, und zwar handelte es sich um folgende Stämme: 16A/R, 21A/O, 30M/R, 40A/R/U, 51R/M und 51A/N/O. Die Stämme 38N und R sowie 26A und O besaßen keine Plasmide. Zwei der Stammpärchen zeigten ein nur in einer Bande abweichendes Muster, wobei einem der Partner jeweils eine Bande fehlte. Dabei handelte es sich um die Pärchen 5M/N und 55B/ZVK.

Abb. 16:

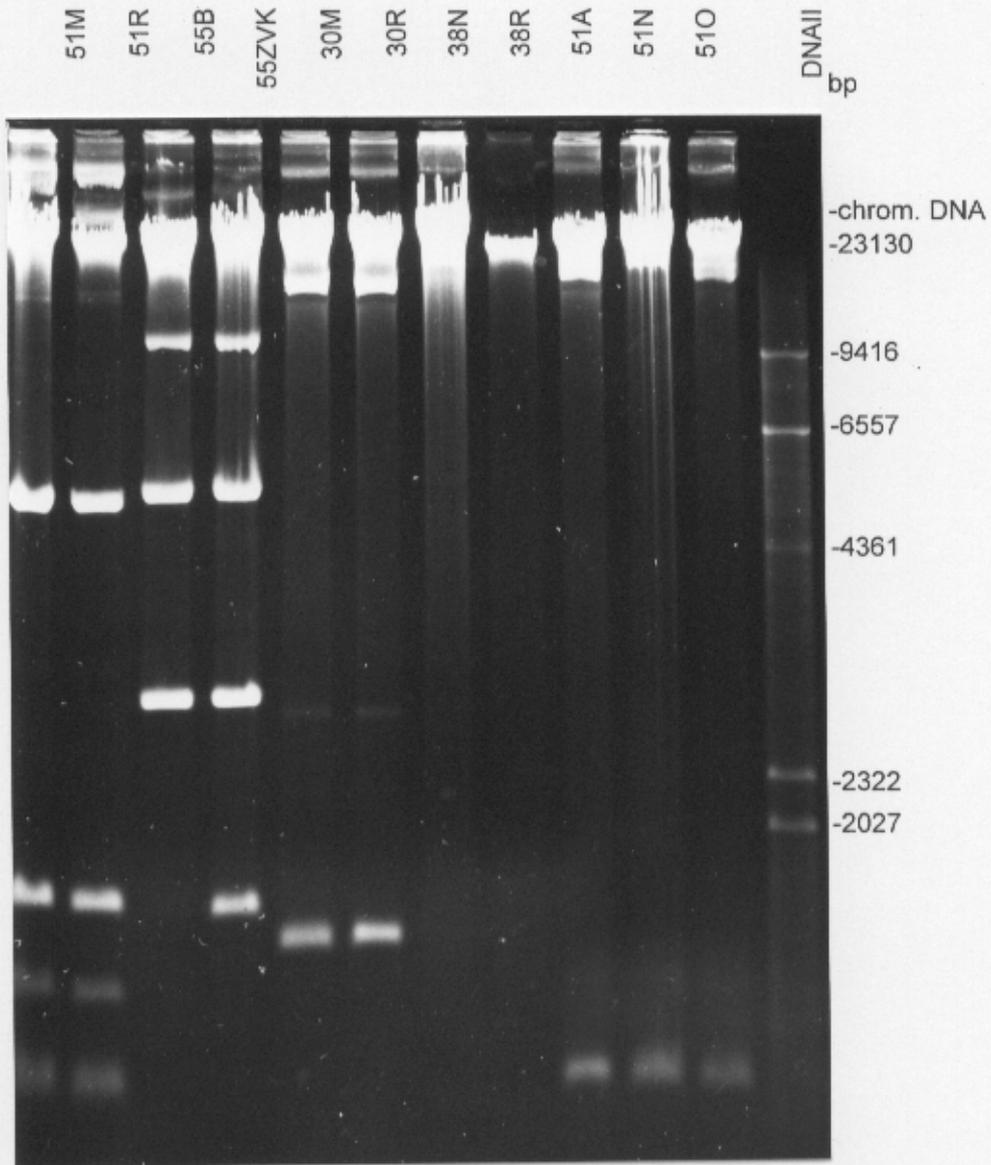


Abb. 17:

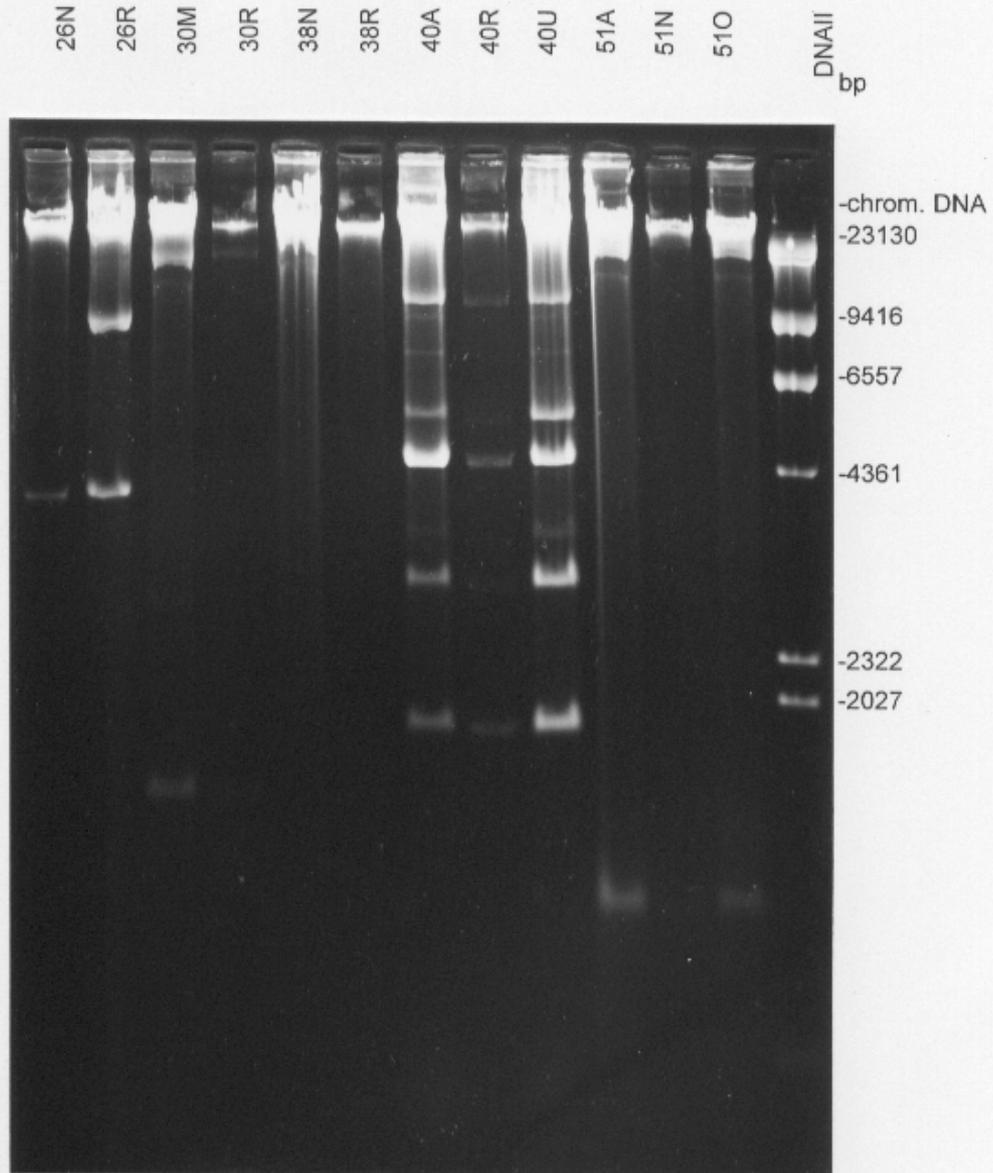
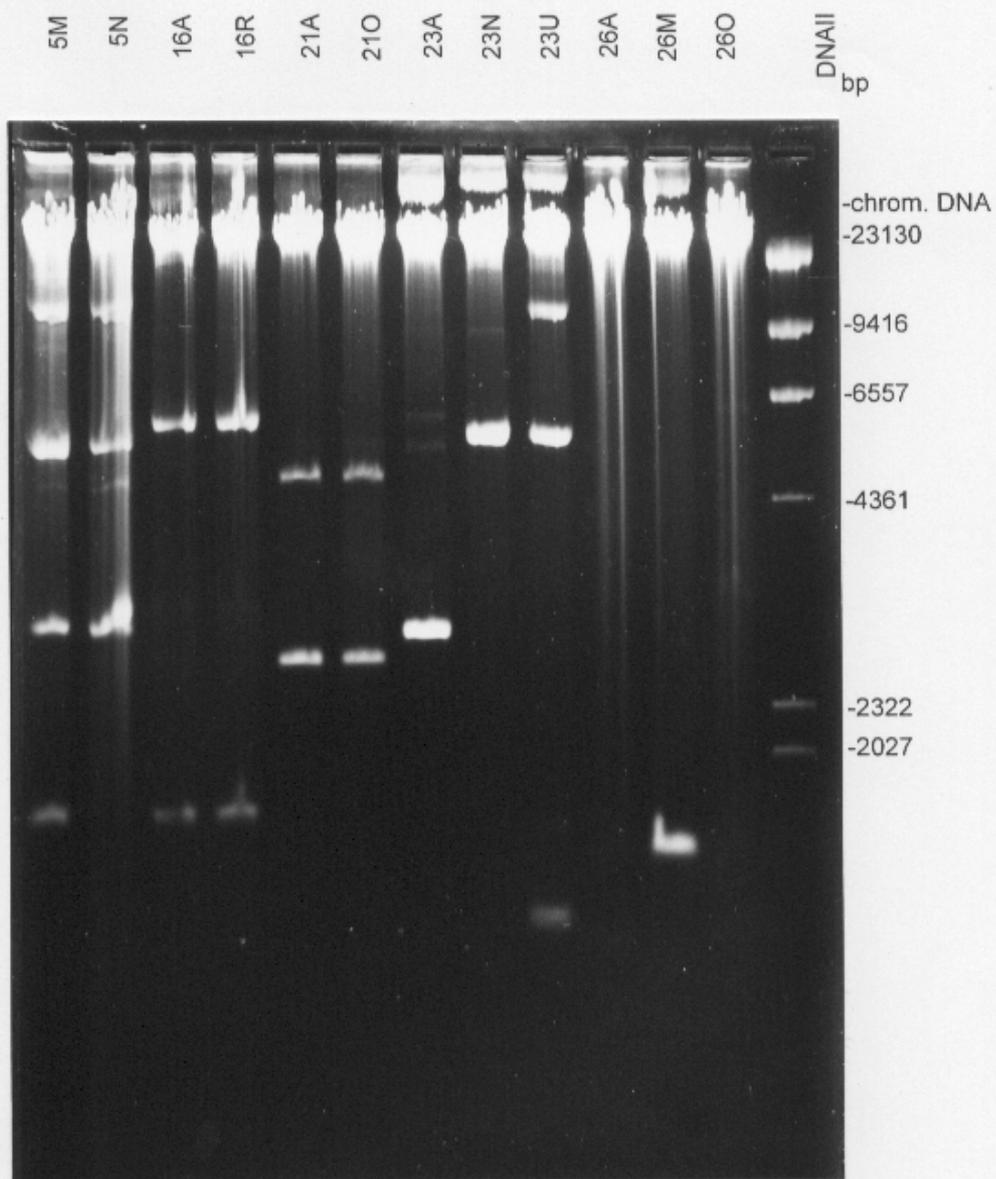


Abb. 18:



5.3.4. Ergebnisse der Proteinprofilanalyse

Die Ergebnisse dieser Elektrophorese zeigen die Abbildungen 19-21. Die zehnte Reihe am rechten Bildrand bildet jeweils das Proteinstandardgemisch aus Low Molecular Weight Marker (LMW) und High Molecular Weight Marker (HMW). Die bekannten Proteine mit dem jeweiligen Molekulargewicht sind rechts der Abbildungen entsprechend gekennzeichnet.

Folgende Stämme eines Kindes zeigten hierbei ein identisches Protein-Bandenmuster und erlauben somit den Rückschluss auf einen gemeinsamen Klon: 16R/A, 21O/A, 23N/U, 30R/M, 40R/U, 51O/N/A und 55B/ZVK. Die Stämme 5N und 5M wichen nur in einer Proteinbande voneinander ab, wobei der Stamm 5M ein zusätzliches Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 90.000 besaß.

Die übrigen untersuchten Isolate zeigten zu große Bandenabweichungen, als dass ein gemeinsamer Ursprung angenommen werden könnte.

Abb. 19

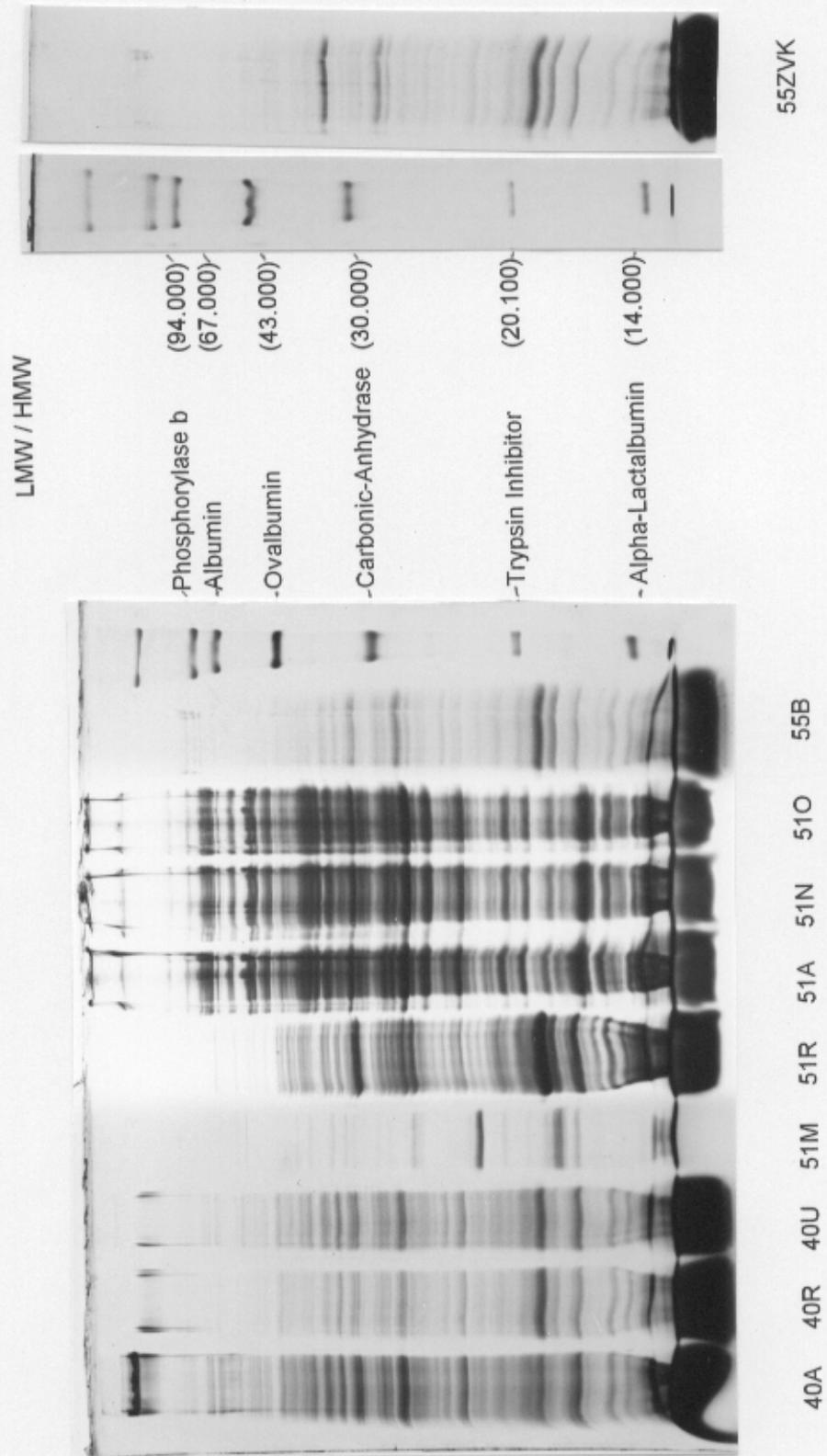


Abb.20

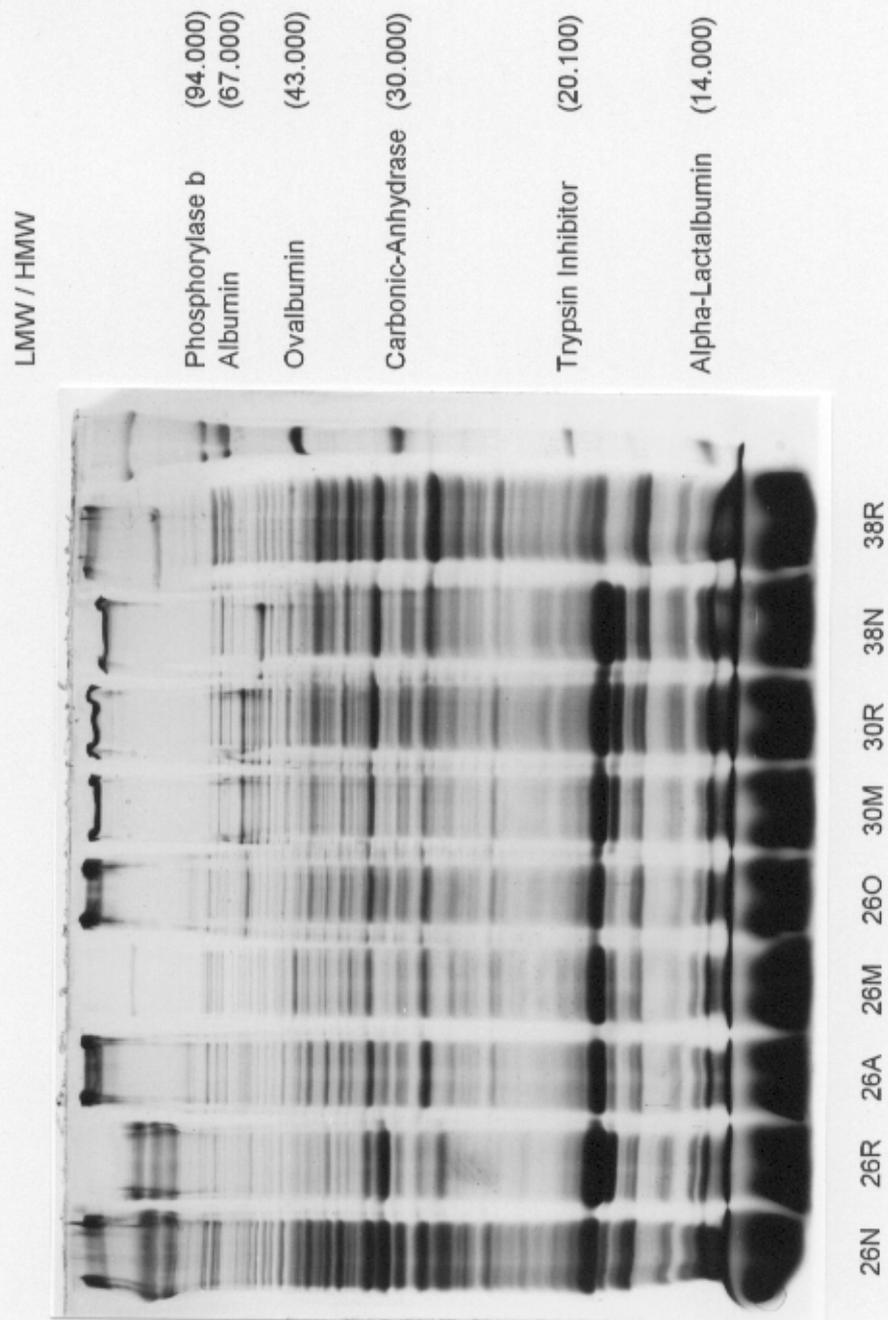
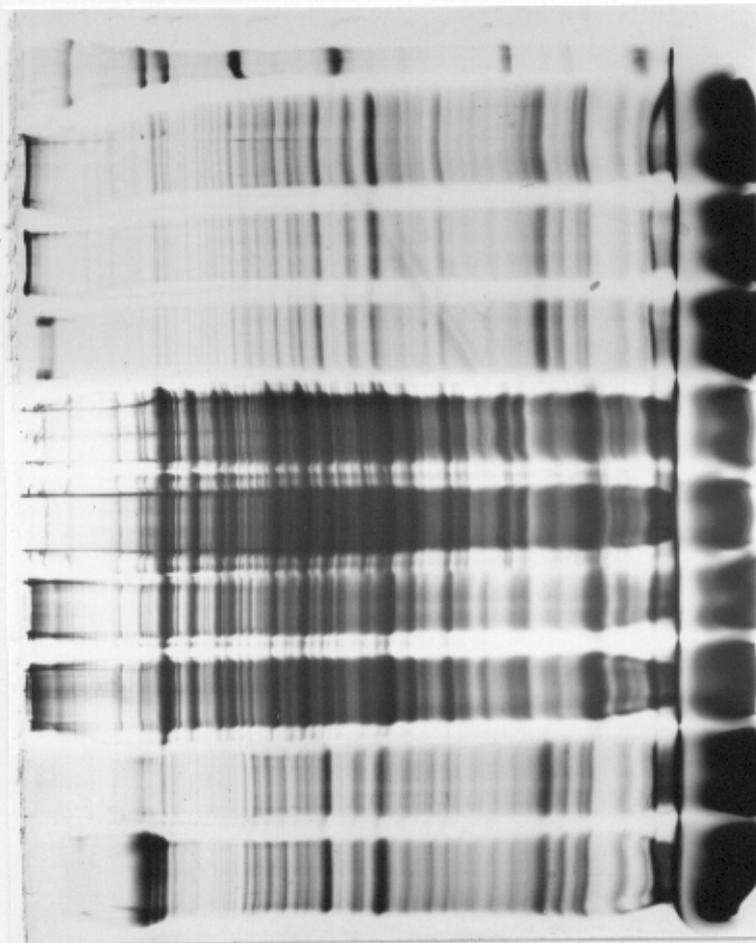


Abb.21

LMW / HMW



Phosphorylase b
Albumin (94.000)
(67.000)

Ovalbumin (43.000)

Carbonic-Anhydrase (30.000)

Trypsin Inhibitor (20.100)

Alpha-Lactalbumin (14.000)

5.3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse zur Typisierung

Die durchgeführten Untersuchungsverfahren zeigten, dass einige Stämme der 17 Kinder mit mehreren positiven Isolaten der selben Spezies in einem oder mehreren dieser Verfahren eine identische Reaktion lieferten. Eine Übersicht darüber gibt Tabelle 5.

Bei 4 dieser 17 Kinder, und zwar bei den Nummern 16, 21, 30 und 51, wurden jeweils mindestens 2 Isolate gefunden, die bei dem Schleimtest nach Christensen sowie den 3 Typisierungsverfahren, d.h. bei der Antibiotikatestung, der Plasmidprofilanalyse und der SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese identische Reaktionen zeigten. Dies waren im einzelnen die Stämme 16A/R, 21A/O, 30M/R und 51A/N/O.

Die Isolate der Kinder mit den Nummern 15 und 32 wiesen keinerlei Gemeinsamkeiten auf, die der Patienten mit den Nummern 4, 10 und 28 reagierten lediglich im Schleimtest nach Christensen gleich, d.h. positiv. Die Stämme 1A und 1M zeigten das gleiche Zuckervergärungsmuster bei der Speziesdifferenzierung, die Stämme 1A und 1T beide eine positive Adhärenz. Die Stämme des Patienten Nummer 35 zeigten bei der Antibiotikatestung beide keine Resistenzen, reagierten bei den anderen Verfahren jedoch unterschiedlich.

38N und R zeigten unterschiedliche Proteinprofile und besaßen beide keine Plasmide, was einen Vergleich erschwert.

Bei den Stämmen 5N und M besaß der Stamm 5N eine zusätzliche Plasmidbande und 5M drei deutlich stärker ausgeprägte Proteinbanden. Auch die übrigen Verfahren fielen unterschiedlich aus.

Alle Isolate des Kindes mit der Nummer 23 (N/U/A/O) gehörten der Spezies *S.epidermidis* an und waren Schleimbilder, identische Proteine besaßen jedoch nur die Stämme 23N und U. Bei der Plasmidprofilanalyse fehlte 23N eine bei 23U vorhandene Bande. Der Stamm 23U war im Vergleich zu 23N zusätzlich resistent gegenüber Fusidinsäure.

Tabelle 5: Übersicht über alle Verfahrensergebnisse bei den 17 Kindern mit Isolaten einer Spezies

		Biotyp	Antibiot.	Plasmide	SDS-El.	Safranin	Klinik
1 A	ep	A/M	-	-	-	A/T	
1 M	ep						
1 T	ep						
4 A	ep	-	-	-	-	A/N	T
4 N	ep						
5 M	ep	-	-	-	-	-	
5 N	ep						
10 M	ep	-	-	-	-	M/U	T
10 R	ep						I/T
10 U	ep						
15 O	ep	-	-	-	-	-	T,CRP
15 U	ep						I/T
16 A	haem	A/R	A/R	A/R	A/R	A/R	T
16 R	haem						I/T
21 A	haem	A/O	A/O	A/O	A/O	A/O	T
21 O	haem						I/T
21 R	haem						
23 N	ep	N/U/A/O	O/A	-	N/U	N/U/A/O	T
23 U	ep						I/T
23 A	ep						L
23 O	ep						
26 N	ep	N/R	N/R	-	-	N/R	T
26 R	ep						
26 A	ep	A/O	M/A	A/O	-	M/O	
26 M	ep						
26 O	ep						
28 R	ep	-	-	-	-	R/T	T
28 T	ep						
30 M	ep	M/R	M/R	M/R	M/R	M/R	T
30 R	ep						I/T
30 N	ep	O/N	N/Nb	-	-	O/Nb	BZ
30 Nb	ep						CRP
30 O	ep						L
32 N	ep	-	-	-	-	-	
32 R	ep						
35 R	ep	-	R/U	-	-	-	I/T
35 U	ep						L
38 N	ep	N/R	N/R	-	-	N/R	I/T
38 R	ep						CRP
38 O	hom						

Legende: ep=S.epidermidis; haem=S.haemolyticus; hom=S.hominis; sap=S.saprophyticus; spp=S.spezies; T=Thrombopenie; L=Leukozytose; I/T=Erhöhung des I/T Wertes; BZ=Hypoglykämie; CRP= Erhöhung des C-reaktiven Proteins; -=keine Übereinstimmung

Tabelle 5 (Fortsetzung): Übersicht über alle Verfahrensergebnisse bei den 17 Kindern mit Isolaten einer Spezies

		Biotyp	Antibiot.	Plasmide	SDS-EI.	Safranin	Klinik
40 A	ep	A/R	-	A/R/U	R/U	A/R/U	I/T
40 R	ep						L
40 U	ep						
40 Nb	sap						
40 O	spp						
51 M	ep	M/R	M/R	M/R	-	M/R	T
51 R	ep						I/T
51 A	spp	A/N/O	A/N/O	A/N/O	A/N/O	A/N/O	
51 N	spp						
51 O	spp						
55 B	ep	B/ZVK	-	-	B/ZVK	B/ZVK	I/T
55 ZVK	ep						CRP

Legende: ep=*S.epidermidis*; haem=*S.haemolyticus*; hom=*S.hominis*; sap=*S.saprophyticus*; spp=*S.spezies*; T=Thrombopenie; L=Leukozytose; I/T=Erhöhung des I/T Wertes; BZ=Hypoglykämie; CRP= Erhöhung des C-reaktiven Proteins; -=keine Übereinstimmung

Die Stämme des Patienten mit der Nummer 26 besaßen zwar Gemeinsamkeiten bei Speziesdifferenzierungsmuster, Antibiotikaresistenz und Schleimtest nach Christensen, zeigten jedoch unterschiedliche Plasmid- und Proteinprofile, bis auf 26A und O, denen beiden jegliche Plasmidbanden fehlten.

Die 3 *S.epidermidis*-Stämme des Kindes mit der Zahl 40 reagierten bei der Plasmid- und Proteinprofilanalyse sowie dem Schleimtest nach Christensen in der selben Art und Weise, bei der Speziesdifferenzierung jedoch nur 40A und R. Die Antibiotikatestung lieferte für alle drei Stämme unterschiedliche Ergebnisse.

Die Isolate 55B und 55ZVK reagierten bis auf die Antibiotikatestung und die Plasmidprofilanalyse identisch, wobei die Abweichung bei den Plasmiden nur in einer zusätzlichen Bande des Stammes 55ZVK bestand, die bei der Antibiotikatestung in zwei zusätzlichen

Resistenzen von 55ZVK und zwar für Erythromycin und Clindamycin.

Aufgrund von identischen Typisierungsergebnissen ist für die Stämme 16A/R, 21A/O, 30M/R bzw. 51A/N/O jeweils ein klonaler Ursprung anzunehmen. Wegen der Übereinstimmung in der Plasmid- und Proteinanalyse ist ein klonaler Ursprung auch bei den Stämmen 40A/R/U wahrscheinlich. Wegen des großen Übereinstimmungsgrades ist ein gemeinsamer Klon auch bei den Stämmen 55B und 55ZVK vorauszusetzen.

Zusammenfassend ist also davon auszugehen, dass bei insgesamt sechs Kindern von mindestens zwei verschiedenen Körperstellen jeweils koagulasenegative Staphylokokken mit identischen Typisierungsmustern mit einem höchstwahrscheinlich gemeinsamen klonalen Ursprung isoliert werden konnten.

5.3.6. Klinische Daten der sechs Kinder mit identischen Isolaten

Definitionsgemäß handelte es sich bei allen Kindern um Frühgeborene (Geburt vor der vollendeten 37. SSW).

Bei den Kindern 16, 21 und 30 traten die ersten Krankheitserscheinungen am ersten Lebenstag auf, bei den Kindern 40 und 51 jeweils am zweiten Lebenstag, womit es sich in allen fünf Fällen um eine Frühsepsis handelte (Krankheitsbeginn innerhalb der ersten 48 Stunden). Bei dem Kind mit der Nummer 55 zeigten sich die Krankheitssymptome erst am 17. Lebenstag, was somit definitionsgemäß einer Spätsepsis entspricht.

Das Gestationsalter des Kindes mit der Nummer 16 betrug 35 SSW, das Geburtsgewicht 1600g. Aufgrund einer peripartalen Asphyxie musste eine sofortige Intubation erfolgen sowie eine anschließende Beatmung für 20 Tage. An Auffälligkeiten im Labor zeigte sich eine Thrombopenie von 62.000/ml sowie ein erhöhtes I/T von 0,4. Antibiotisch therapiert wurde zunächst für 11 Tage mit Mezlocillin und Gentamycin, danach erfolgte eine Umstellung auf Cefotaxim, Amikacin und Flucloxacillin für weitere 18 Tage.

Kind Nummer 21 kam in der 36. SSW mit einem Geburtsgewicht von 2590g zur Welt. Wegen respiratorischen Anpassungsstörungen erfolgte auch hier eine Beatmung und zwar über 14 Tage. Im Labor fand sich eine Thrombopenie von 70.000/ml und eine I/T-Erhöhung auf 0,49. Hier bestand die antibiotische Therapie aus einer 13tägigen Gabe von Mezlocillin plus Gentamycin.

Bei der Mutter des Kindes mit der Nummer 30 handelte es sich um eine Diabetikerin, so dass ihr Kind, trotz eines Gestationsalters von nur 35 SSW, ein relativ hohes Geburtsgewicht von 3540g aufwies. Die Rektaltemperatur lag bei Geburt mit 35,8°C im hypothermen Bereich. Im Labor fand sich eine CRP-Erhöhung auf >12<24mg/dl, eine Thrombopenie von 108.000/ml, eine Hypoglykämie von 31mg/dl, ein erhöhtes I/T von 0,25 sowie eine Leukozytose von 23.300/ml. Therapiert wurde 12 Tage lang mit Mezlocillin und Gentamycin.

Bei Kind Nummer 40 lag das Geburtsgewicht, bei einem Gestationsalter von 35 SSW, bei 2600g. Zur Prophylaxe eines Atemnotsyndromes wurde von der Mutter pränatal Bethametason eingenommen. Laborchemisch fand sich eine I/T-Erhöhung auf 0,24 und eine Leukozytose von 25.000/ml. Als Antibiose erhielt das Kind 13 Tage eine Kombination aus Mezlocillin und Gentamycin.

Bei vorzeitigem Blasensprung der Mutter wurde das Kind mit der Nummer 51 drei Tage später, in der 35. SSW, mit einem Gewicht von 2000g geboren. Unmittelbar postpartal war eine kurzfristige Intubation und Beatmung notwendig. Der Nabelschnur pH-Wert lag mit 6,97 deutlich im azidotischen Bereich. Die Blutuntersuchung erbrachte eine Thrombopenie von 64.000/ml. Das mit 0,77 bei Geburt stark erhöhte I/T lag einen Tag später, zum Zeitpunkt der Probenentnahme, mit 0,02 wieder im Normbereich. Wie bei den anderen Kindern bestand auch hier die Therapie aus einer Kombination von Mezlocillin und Gentamycin und zwar über 10 Tage.

Die Geburt des Kindes mit der Nummer 55 erfolgte in der 36. SSW, und das Geburtsgewicht lag bei 2800g. Es lag ein Hydramnion vor, und die Geburt erfolgte per Sectio. Pränatal wurden von der Mutter orale Glucocorticoide eingenommen, und unter der Geburt hatte die Mutter Fieber. Aufgrund eines erniedrigten APGAR-Wertes war

nach der Geburt eine zweitägige Beatmung notwendig. Des Weiteren wurde kurz nach der Geburt ein ZVK gelegt, der 17 Tage belassen wurde und am 17. Lebenstag wegen Sepsiszeichen und dem Nachweis von *S.epidermidis* wieder gezogen wurde. An laborchemischen Sepsiszeichen wurden am 17. Lebenstag ein CRP von >96mg/dl sowie ein I/T-Wert von 0,22 gefunden. Bei diesem Kind war die antibiotische Therapie komplexer. Zunächst wurde 16 Tage lang Mezlozillin und Gentamycin gegeben. Im Anschluss daran wurde für 2 Tage Flucloxacillin gegeben sowie jeweils für 14 Tage Cefotaxim und Amikazin. Aber erst unter der zusätzlichen Gabe von Vancomycin kam es zur Befundbesserung.

An laborchemischen Kriterien erwiesen sich somit eine Thrombopenie und/oder I/T-Erhöhung als am verlässlichsten, wohingegen eine CRP-Erhöhung, eine Leukozytose sowie eine Hypoglykämie nur fakultativ zu sehen waren.

Unter entsprechender antibiotischer Therapie kam es in allen Fällen zu einer Besserung der klinischen Symptomatik, und keins der Kinder verstarb an den Folgen der Sepsis.

5.3.7. Gegenüberstellung von Spezies- und Resistenzverhalten in den Gruppen der Kinder mit ein- und mehrfachen Isolaten

Die insgesamt 69 Kinder lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Zum einen die 42 Kinder, bei denen nur von einer Körperstelle CNS isoliert werden konnten (A) und zum anderen die 27 Kinder, bei denen an mindestens zwei verschiedenen Körperstellen CNS gefunden wurden (B).

Die Speziesverteilung innerhalb der beiden Gruppen gibt Abbildung 22 wieder. Dabei zeigt sich, dass bei den insgesamt 70 Isolaten der Gruppe B *S.epidermidis* mit 65,8% deutlich überwiegt. Auch in Gruppe A wurde *S.epidermidis* als häufigste Spezies gefunden (52,3%), auffallend ist hier jedoch auch die hohe Anzahl von *S.haemolyticus*-Stämmen mit 30,9% im Vergleich zu nur 19,0% in Gruppe B.

Bei Betrachtung der durchschnittlichen Antibiotikaresistenzen pro Stamm zeigt sich, dass diese in Gruppe A mit durchschnittlich 3,17 Resistenzen pro Stamm deutlich höher liegen als in Gruppe B, wo die durchschnittliche Resistenzzahl pro Stamm nur bei 2,44 liegt.

Bezüglich der Methicillin-Resistenz erwiesen sich in Gruppe A 42,8% der Stämme als Methicillin-resistent, in Gruppe B waren es nur 35,4% der Stämme.

5.3.8. Gegenüberstellung von Spezies- und Resistenzverhalten innerhalb der Gruppe der Kinder mit mehrfachen Isolaten

Oben genannte Gruppe lässt sich in zwei Untergruppen einteilen: Erstens die 6 Kinder, bei denen von verschiedenen Körperstellen identische CNS isoliert wurden und zweitens die restlichen 21 Kinder mit Isolaten von unterschiedlichen CNS.

In der ersten Gruppe fanden sich insgesamt 14 Isolate, in der 2. Gruppe 65 Isolate. Die Häufigkeitsverteilungen innerhalb dieser beiden Gruppen ist in Abbildung 23 dargestellt. Auffallend ist hier das häufige Vorkommen von *S.haemolyticus* (28,6% versus 16,9%) und die relativ geringe Anzahl von *S.epidermidis* (50% versus 69,3%) in der ersten Gruppe im Vergleich zur zweiten Gruppe.

Die durchschnittlichen Antibiotikaresistenzen pro Stamm betragen in Gruppe eins 2,71 Resistenzen pro Stamm, in Gruppe zwei waren es 2,38 Resistenzen pro Stamm.

Die Anzahl von Methicillin-resistenten Stämmen war in beiden Gruppen annähernd gleich. Sie betrug in Gruppe eins 35,7% und in Gruppe zwei 35,4%.

Abb.22: Speziesverteilung in den Gruppen mit Ein- (A) und Mehrfachisolaten (B)

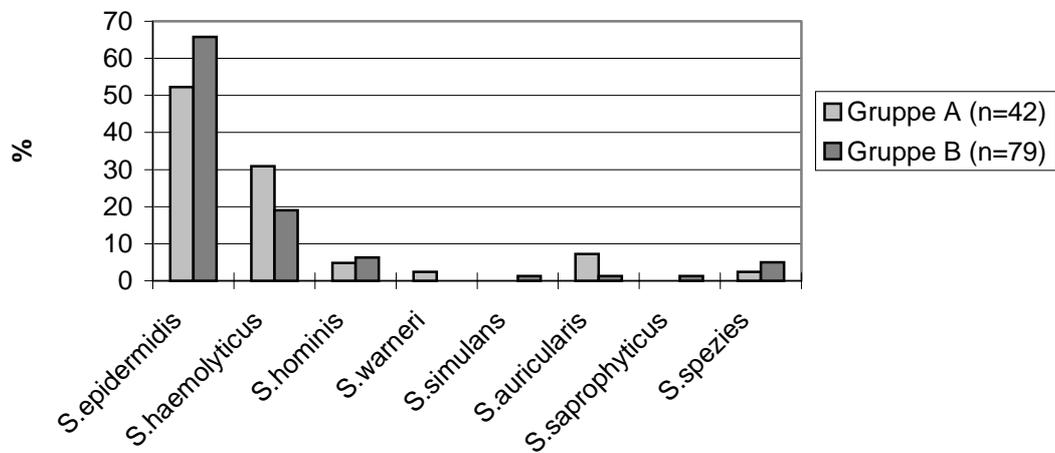
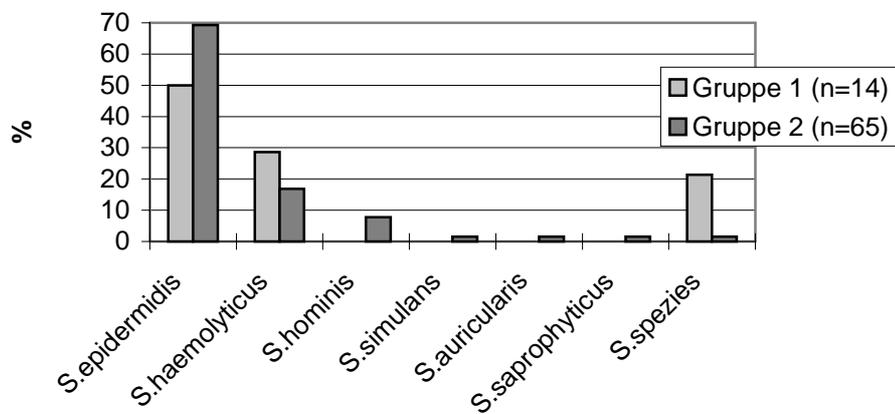


Abb.23: Speziesverteilung in den Gruppen mit identischen (1) und unterschiedlichen (2) Isolaten



6. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, das Besiedlungsspektrum mit CNS bei Frühgeborenen und unreifen Neugeborenen mit Verdacht auf Sepsis sowie das Resistenzverhalten der isolierten Bakterien zu ermitteln und des weiteren herauszufinden, ob bei den gefundenen Keimen klonale Identität vorlag.

Dafür wurden von 69 Neugeborenen auf der Intensivstation der Kölner Universitäts-Kinderklinik Abstriche von verschiedenen Körperstellen vorgenommen. Bei sämtlichen CNS, die isoliert wurden, erfolgte eine Speziesdifferenzierung, eine Resistenztestung auf 12 verschiedene Antibiotika und eine Untersuchung auf Fähigkeit zur Schleimbildung.

Bei 42 Kindern konnten nur von einer Körperstelle CNS isoliert werden. Bei 27 Kindern gelang jedoch die Anzüchtung von CNS aus mindestens 2 unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien.

Bei der Speziesdifferenzierung zeigte sich dann, dass bei 10 dieser 27 Neugeborenen die bei einem Kind gefundenen CNS verschiedenen Spezies angehörten und ebenfalls keine weiteren Rückschlüsse erlaubten. Bei den restlichen 17 Neugeborenen gelang jedoch eine Isolierung von mindestens zwei CNS-Stämmen der gleichen Spezies von verschiedenen Körperstellen. Diese Stämme dieser 17 Kinder wurden dann weiter hinsichtlich ihrer Antibiotikaresistenzmuster, ihrer Plasmidprofile sowie ihrer Eiweißzusammensetzung untersucht. Bei Übereinstimmung aller Untersuchungsergebnisse innerhalb der bei jeweils einem Kind isolierten Stämme konnte so ein klonaler Ursprung als sehr wahrscheinlich angesehen werden. Dies war der Fall bei 6 dieser 17 Neugeborenen.

Erst in jüngerer Zeit führten einige Untersucher (22,25,29,38,44,65,78,107) eine Biotypisierung der bei Neugeborenen isolierten CNS durch. In den meisten älteren Studien wurden die gefundenen CNS, ohne eine weitere Speziesdifferenzierung, unter *S.epidermidis* zusammengefasst. In den meisten Untersuchungen, wo eine Biotypisierung erfolgte, überwog *S.epidermidis* deutlich mit Prozentzahlen zwischen 36,9% (65) und 76% (44), gefolgt von *S.hominis* bzw. *S.haemolyticus*

(109). Andere CNS-Spezies wurden nur selten isoliert. Dies entspricht der von Peters et al. (82) gefundenen Speziesverteilung an Plastikisolaten. Auch die vorliegende Arbeit bestätigt diese Ergebnisse, wo *S.epidermidis* mit 61,2% deutlich überwog. Auffallend war jedoch das mit 23,2% häufige Vorkommen von *S.haemolyticus*, wohingegen *S.hominis* nur in 5,8% der Fälle isoliert wurde. In der Gruppe der 6 Kinder mit mindestens zwei identischen Isolaten von verschiedenen Körperstellen, bei denen der Verdacht bestand, der Sepsiserreger zu sein, fanden sich nur *S.epidermidis*, *S.haemolyticus* und nicht differenzierbare *S.spezies*. Dies entspricht den Ergebnissen von Dunne et al. (29), wo *S.hominis* nur in der Gruppe der nicht infizierten Kinder isoliert wurde. Bei der Untersuchung von Patrick (78) waren jedoch sowohl *S.haemolyticus* als auch *S.hominis* Keime mit niedrigem pathogenem Potential im Gegensatz zu *S.epidermidis* und *S.saprophyticus*. In einer neueren Studie von Mehta et al. (68) war, im Gegensatz zu den bisherigen Untersuchungen, *S.haemolyticus* die am häufigsten isolierte CNS-Spezies von Hautisolaten bei kranken Neugeborenen.

Bei Betrachtung der Speziesverteilung je nach Isolationsort fiel auf, dass in Magen und Rachen nur *S.epidermidis* und *S.haemolyticus* in einem nahezu identischen Verhältnis zueinander zu finden waren, wohingegen in der Trachea kein *S.haemolyticus*, dafür aber *S.hominis* gefunden wurde. Bei den Nasenabstrichen fand sich in 9 der 10 Fälle *S.epidermidis*. Im Stuhl fand sich kein einziges Mal *S.epidermidis*, sondern auffallender Weise fast nur *S.haemolyticus*. *S.auricularis* wurde insgesamt vier mal isoliert und fand sich davon erwartungsgemäß (78) zwei mal in Ohrabstrichen. Ganz ungewöhnlich war jedoch die einmalige Isolierung aus einer Urinprobe, sowie der einmalige Nachweis in einer Blutprobe, wo *S.auricularis* normalerweise nie zu finden ist. Leider gibt es in der Literatur bisher kaum Berichte über die Speziesverteilung von CNS an unterschiedlichen Körperstellen von Neugeborenen.

Bei der Antibiotikaresistenztestung wurde das Ergebnis vieler Untersucher, dass bisher kaum Resistenzen gegenüber Vancomycin beobachtet wurden (7,26,48,54,66,67,74,89,118), bestätigt, indem alle gefundenen CNS sensibel auf Vancomycin reagierten, und somit Vancomycin das Medikament der Wahl bei schweren Infektionen mit multiresistenten CNS ist (24,27,78,95). In

den letzten Jahren wird jedoch über eine zunehmende Resistenz der CNS auch gegenüber Vancomycin berichtet (91).

Auch eine, in der Literatur beschriebene, ausgeprägte Resistenz gegenüber der Gruppe der Penicilline (98,113), konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. So waren 76% der isolierten Stämme resistent gegenüber Ampicillin und 39,7% resistent gegenüber Oxacillin. In einigen Studien lagen die Prozentzahlen noch deutlich höher (3,25,29,49,98,101). In einer Untersuchung von Simpson et al. (93) waren 100% der Stämme resistent für Benzylpenicillin und 63% für Methizillin. Im Vergleich zu anderen Untersuchungen (3,74) war die Resistenzrate gegenüber dem Aminoglykosid Gentamycin mit 36,4% relativ gering. Das gleiche gilt für Ciprofloxacin, für das nur 3,3% der Stämme resistent waren und zwar nur *S.haemolyticus*, obwohl in letzter Zeit allgemein eine beängstigende Zunahme einer Resistenz der Staphylokokken gegen Chinolone beschrieben wird (104). Typischerweise waren mit 89,3% die meisten *S.haemolyticus* Stämme resistent gegenüber Fosfomycin, wohingegen die übrigen Spezies größtenteils sensibel reagierten. Nach den Richtlinien des amerikanischen National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) gilt, dass bei gegen Methicillin (Oxacillin) resistenten Stämmen auch alle Penicilline, Cephalosporine und Imipenem unwirksam sind (104). Auch hier zeigte sich, dass die Oxacillin-resistenten Stämme auch gegen fast alle anderen Antibiotika deutlich mehr Resistenzen aufwiesen (78). So waren alle gegen Oxacillin resistente Stämme auch gegen Ampicillin resistent. Dagegen waren in vitro jedoch nur 41,7% der gegen Oxacillin resistenten Stämme auch resistent gegen Imipenem.

Frühere Studien berichten, dass *S.epidermidis* der CNS-Biotyp mit den meisten Resistenzen ist (66), andere Studien wiederum konnten dies nicht bestätigen (26). Auch bei uns jedoch war *S.epidermidis* der Biotyp mit den meisten Resistenzen, und zwar mit im Mittel 2,9 Resistenzen pro Stamm, im Gegensatz zu *S.haemolyticus* und *S.hominis* mit im Mittel je 2,5 bzw. 2,3 Resistenzen pro Stamm. Bei den CNS, die bei den 6 oben angegebenen Kindern isoliert wurden und als wahrscheinliche Krankheitserreger identifiziert wurden, erwies sich *S.epidermidis* auch als die Spezies mit den meisten Resistenzen. 5 der 7 Stämme waren Oxacillin-resistent und hatten eine mittlere Resistenzzahl von 3,1. Die übrigen 7 Stämme (*S.haemolyticus* und *S.spezies*) waren

alle Oxacillin-sensibel und lagen mit ihren mittleren Resistenzen im Durchschnitt. Es ist einleuchtend, dass die bei *S.epidermidis* häufig vorkommenden Resistenzen gegen mehrere Antibiotika, als ein Virulenzfaktor dieser Spezies anzusehen ist. Dennoch zeigten sich auch *S.haemolyticus* und die nicht differenzierbaren *S.spezies*, für die dies im vorliegenden Fall nicht gilt, als wahrscheinliche Krankheitsverursacher.

Ein weiterer Virulenzfaktor der CNS ist die Fähigkeit zur Adhäsion an glatten Oberflächen und die Schleimbildung (22,44). So zeigte sich in einer Studie von Davenport et al. (23), dass die Behandlung einer Infektion mit schleimpositiven Organismen deutlich schwieriger war, als die einer Infektion mit schleimnegativen Bakterien. In einigen Untersuchungen (51,78) erwies sich auch hier *S.epidermidis* als die CNS-Spezies mit der höchsten Virulenz, das heißt mit der häufigsten irreversiblen Affinität zu polymeren Kunststoffoberflächen. Dies konnte von uns bestätigt werden, indem 73% der *S.epidermidis*-Isolate eine starke Adhäsionsfähigkeit aufwiesen, im Gegensatz zu *S.haemolyticus* und *S.hominis* mit jeweils nur 35,7 bzw. 57,1% stark adhärenen Stämmen. Auch die mittleren OD-Werte der Stämme mit starker Adhäsion waren bei *S.epidermidis* mit 0,8225 am höchsten (*S.haemolyticus*: 0,717, *S.hominis*:0,732). Bei den 6 wahrscheinlich mit CNS infizierten Kindern wiesen alle sieben *S.epidermidis* und alle vier *S.haemolyticus* Stämme eine starke Adhäsionsfähigkeit auf. Nur die drei nicht differenzierbaren *S.spezies* besaßen keine Adhäsionsfähigkeit. Das bestätigt die allgemeinen Ergebnisse, daß krankheitsverursachende CNS zu einem größeren Anteil Schleim produzieren, als apathogene CNS (15,29,44,51,68). Es zeigt aber auch, dass ebenfalls nicht schleimbildende CNS ein pathogenes Potential besitzen können.

Die bis hierhin durchgeführten Untersuchungen wurden zum einen zur allgemeinen Charakterisierung der isolierten Staphylokokken durchgeführt, zum anderen aber auch, um einen Anhaltspunkt zu erhalten, ob unter den bei einem Patienten gefundenen CNS Keime eines Klon zu finden sind, denn Keime, die unterschiedlichen Spezies angehörten, konnten auch nicht einem Klon entsprechen.

Bei 42 Patienten wurden nur von einer Körperstelle CNS isoliert, bei den verbleibenden 27 Kindern fanden sich jedoch mindestens zwei

CNS-Isolate von verschiedenen Körperstellen. Bei 17 dieser 27 Patienten fanden sich nun mindestens zwei CNS-Stämme, die einer Spezies angehörten. Zur Abklärung der Frage nach klonaler Identität wurde mit den CNS-Isolaten dieser 17 Kinder eine weitere Typisierung nach Antibiogramm, eine Plasmidprofilanalyse sowie eine Proteinprofilanalyse durchgeführt.

Das Antibiogramm bot mit 17 verschiedenen Resistogrammtypen bei 41 *S.epidermidis*-Stämmen (5 *S.haemolyticus*-Stämme: 3 Muster, 4 *S.spezies*-Stämme: 2 Muster) eine recht gute Diskriminierungsrate. Bei 9 Kindern zeigten die jeweiligen Stämme abweichende Muster. Bei den verbleibenden 8 Kindern dagegen fanden sich in 11 Fällen mindestens 2 Stämme mit identischem Resistogramm (s.Tab. 5). Im weiteren Verlauf stellte sich jedoch heraus, dass bei den 11 Fällen mit identischem Antibiogramm nur 4 Fälle von klonaler Identität vorlagen und dass bei den 9 Kindern mit unterschiedlichen Resistogrammen in 2 Fällen klonale Identität vorlag.

Zur weiteren Typisierung wurde eine Plasmidprofilanalyse und eine SDS-Elektrophorese zur Ermittlung der Zusammensetzung der extrazellulären Proteine durchgeführt. Dabei zeigte sich bei den Stämmen von 11 dieser 17 Kinder ein stark voneinander abweichendes Bild bei den beiden Elektrophoresen, so dass hier der angenommene klonale Ursprung widerlegt werden konnte. Bei den Stämmen der übrigen 6 Kinder fielen diese Untersuchungen jeweils fast identisch aus, was einen klonalen Ursprung, durch die Genauigkeit dieser Verfahren, so gut wie beweist. Lediglich bei 2 Kindern fanden sich leichte Abweichungen. Der Stamm 55ZVK besaß im Vergleich zu Stamm 55B eine Plasmidbande sowie zwei Antibiotikaresistenzen mehr. Plasmide sind lineare oder ringförmige, extrachromosomale DNS-Strukturen, die aktiv auf andere Bakterien übertragen werden können (4,5,71,77,104), aber auch verloren gehen können. In fast 90% der resistenten klinischen Isolate liegt die Resistenz plasmidkodiert vor. So scheint auch im vorliegenden Fall ein resistenzkodierendes Plasmid verlorengegangen zu sein. Bei den Isolaten mit der Nummer 40 liegt ebenfalls eine Differenz im Antibiotikaresistenzmuster vor. Da neue Resistenzen jedoch schnell erworben werden können, ist dieser Unterschied zu vernachlässigen. Ein weiterer Unterschied findet sich hier in einer diskreten Abweichung bei der Eiweißelektrophorese. Da jedoch die

Plasmidprofilanalyse so charakteristisch übereinstimmt, und die Abweichung bei der SDS-Elektrophorese so gering ist, ist auch hier ein klonaler Ursprung anzunehmen.

Die geläufigen Methoden für epidemiologische Studien über CNS sind die folgenden (78):

- Biotypisierung
- Antibiogramme
- Serologische Typisierung
- Polypeptidanalyse mittels SDS-PAGE Technik
- Schleimproduktion
- Phagentypisierung
- Molekulare Typisierung (einschließlich Plasmidprofilanalyse)

Insgesamt besitzen die üblichen epidemiologischen Typisierungsverfahren Vor- und Nachteile.

Wie von mehreren Untersuchern berichtet, besitzt die Phagentypisierung ein relativ geringes Unterscheidungsvermögen (4,64,77). Außerdem wird in der letzten Zeit über eine zunehmende Resistenz der CNS gegen Bakteriophagen berichtet (16,64). Dagegen ist eine Phagentypisierung relativ einfach und schnell durchführbar (77).

Für die Durchführung von Antibiogrammen spricht die preiswerte und einfache Handhabung (64). Außerdem erhält man recht gute Aussagen für Screening-Untersuchungen (16,47,64). Wie auch vorliegende Arbeit zeigte, reicht dieses Verfahren zur exakten Diskriminierung jedoch nicht aus (5), da die Ergebnisse in einigen Fällen bei wiederholter Testung nicht reproduzierbar sind, und gleiche Antibiogramme häufig vorkommen können(16,77).

Eine Biotypisierung ist einfach durchzuführen und auch relativ preiswert. Der Nachteil ist jedoch das nur geringe Diskriminierungsvermögen (5,16,47,64,76,83).

Die Testung auf Schleimproduktion ist leicht durchzuführen. Des weiteren handelt es sich um einen stabilen Parameter, der außerdem einen Einblick in die Pathogenese der Infektion gewährt. Allerdings ist die Diskriminierungsrate hier äußerst gering (16).

Mit der Proteinprofilanalyse mittels SDS-PAGE Elektrophorese steht eine sehr genaue und aussagekräftige Methode zur Verfügung (32,83). Der Nachteil besteht jedoch im hohen Kostenaufwand und in der aufwendigen Durchführung.

Ebenso die Plasmidprofilanalyse ist eine recht präzise Vergleichsmethode (4,5,77). So war dieses Verfahren bei Studien von Archer et al. (5) und Brown et al. (10) einer Biotypisierung, Antibioogrammen und einer Phagentypisierung deutlich überlegen. Jedoch auch diese Methode hat Nachteile. Besitzt ein Stamm keine Plasmide, ist ein Vergleich nicht möglich (4). Außerdem können Plasmide verloren gehen oder neu erworben werden (4,5,71,77). Des Weiteren beeinflussen die Extraktionsmethode sowie die Elektrophoresebedingungen das endgültige Plasmidprofil (4).

Wie auch vorliegende Arbeit zeigte, hat jede Methode, einzeln angewandt, einen begrenzten Aussagewert (78). Auch bestimmte Kombinationen, wie z.B. hier Biotypisierung, Antibioogramm und Schleimtest, führen nicht unbedingt zu einer genauen Diskriminierung. Durch eine richtige Kombination dieser Techniken kann man jedoch wichtige und genaue epidemiologische Informationen erhalten (13,16,78,111).

Christensen et al. (16) benutzten in einer Studie vier verschiedene Typisierungsverfahren, Etienne et al. (32) fünf verschiedene Methoden und Walcher-Salesse et al. (105) wandten sogar acht verschiedene Typisierungsverfahren an. Die Kombinationen erbrachten jeweils immer deutlich höhere Diskriminierungsraten als jede Untersuchung einzeln betrachtet.

Ludlum et al. (64) benutzten als Typisierungsverfahren eine Biotypisierung, Antibioogramme, eine Phagentypisierung sowie eine Plasmidprofilanalyse. Einzeln betrachtet war hier die Unterscheidungsrate bei der Phagentypisierung mit 14% am geringsten und bei der Antibiotikaresistenztestung mit 58% am höchsten. Alle vier Typisierungsverfahren gemeinsam erreichten jedoch eine Diskriminierung von 76%.

Insgesamt wurden bei 69 Kindern mit dem klinischen Verdacht auf Sepsis von verschiedenen Körperstellen CNS isoliert. Leider erfolgte die Probenentnahme bei den Kindern nicht standardisiert,

das heißt, dass bei jedem Neugeborenen von den gleichen Körperstellen Abstriche entnommen wurden. Dies lag in der Hand des Krankenhausarztes. So wurden von manchen Kindern bis zu sieben Abstriche angefertigt, von anderen wiederum nur einer. Nicht zuletzt deswegen konnten nur bei 27 Neugeborenen mehr als einmal CNS isoliert werden.

Eine Besiedlung von Haut und Schleimhäuten mit CNS bei Neugeborenen auf Intensivstationen vollzieht sich normalerweise häufig und schnell (22,87,88,90,93,99). Eine Isolierung von CNS ist daher ohne klinische Zeichen nicht mit einer Infektion gleichzusetzen. Aber auch bei klinischem Sepsisverdacht und nur einmaliger Isolierung eines CNS-Stammes von Haut oder Schleimhaut, kann daher auch hier nicht der Rückschluss gezogen werden, der verantwortliche Sepsiserreger zu sein. Daher waren die bei den 42 Kindern jeweils nur einfach isolierten CNS nur interessant in Bezug auf Speziesverteilung und allgemeine Charakteristika. Bei den Kindern mit mehreren CNS-Isolaten stand jedoch zusätzlich die Frage im Raum, ob hier die Sepsiserreger isoliert wurden oder nicht. Bei diesen 27 Neugeborenen wurden dann auch die klinisch relevanten Daten zusammengestellt.

Bei 6 der Neugeborenen konnten mindestens zwei identische CNS von verschiedenen Körperstellen isoliert werden. Bei allen 6 Kindern handelte es sich um Frühgeborene, indem sie in der 35. bzw. 36. Schwangerschaftswoche geboren wurden. Dies bestätigt die Ergebnisse einiger Untersucher (35,36,37,45), dass eine Assoziation zwischen dem Immundefizit von unreifen Neugeborenen und steigendem Infektionsrisiko besteht. In den meisten Untersuchungen hatten die mit CNS infizierten Kinder ein Geburtsgewicht von unter 1500g (3,28,38,62,70,101). Hier jedoch hatten alle sicher infizierten Kinder ein Geburtsgewicht von mehr als 1500g, was zeigt, dass auch diese Gruppe von Neugeborenen noch stark gefährdet ist, an einer CNS-Sepsis zu erkranken.

Das Kind mit der Nummer 55 war das einzige Kind, das erst am 17. Lebenstag Sepsiszeichen aufwies und damit den Kriterien einer Spätsepsis entsprach. Vom ersten bis zum 17. Lebenstag hatte es als venösen Zugang einen ZVK. Die Isolierung der beiden identischen *S.epidermidis*-Stämme erfolgte hier am 17. Lebenstag aus einer Blutkultur sowie von der ZVK-Spitze. Die isolierten CNS

waren starke Schleimbilder. Die Sepsiszeichen traten unter prophylaktischer antibiotischer Therapie mit Mezlocillin bzw. Flucloxacillin und Gentamycin auf. Erst nach Entfernung des ZVK und ca. zehntägiger Therapie mit Vancomycin, Cefotaxim und Amikacin kam es zu einer Befundnormalisierung. Hier handelte es sich also um eine, wie von mehreren Autoren beschriebene (7,12,28,38,50,70), typische katheterassoziierte Sepsis mit schleimbildenden CNS. Wie bei unseren Untersuchungen in vitro, zeigten die Penicilline sowie Gentamycin hier auch in vivo keine Wirksamkeit, was die in der Literatur beschriebene (3,25,29,35,44,74), zunehmende Resistenzhäufigkeit der CNS gegen diese Antibiotika bestätigt. Wie bei den meisten anderen Studien (7,26,48,54, 66,67,74,89) zeigte sich jedoch Vancomycin, gegen das bisher kaum Resistenzen beschrieben sind, auch hier als wirksam.

Bei den übrigen 5 Kindern traten die Sepsiszeichen innerhalb der ersten zwei Lebensstage auf, was einer Frühsepsis entspricht. Die Kinder mit den Nummern 16, 21, 51 und 55 mussten postpartal für einige Stunden bis einige Tage beatmet werden. In einer Studie von Davies et al. (25) war eine mechanische Beatmung einer der Hauptrisikofaktoren für Neugeborene, an einer CNS-Sepsis zu erkranken.

In verschiedenen Untersuchungen wurde berichtet, dass an pathologisch veränderten Laborwerten bei CNS-Infektionen Neugeborener folgende zu finden sein können (75,86,115): CRP-Erhöhung, Erhöhung des I/T, Thrombopenie, Leukozytose oder Leukopenie und Hypo- oder Hyperglykämie. Freeman et al. (41) fanden heraus, daß eine Erhöhung des I/T sowie eine Erniedrigung der Thrombozytenzahl die am häufigsten gefundenen Abnormitäten bei Neugeborenen mit CNS-Sepsis waren. In anderen Studien (3,90) war es die I/T-Proportion. Dies stimmt mit unseren Ergebnissen überein: 5 der 6 Frühgeborenen wiesen eine Erhöhung des I/T auf, und bei 4 Kindern lag eine Thrombopenie vor. Dagegen kamen eine CRP-Erhöhung und eine Leukozytose nur in 2 der 6 Fälle vor, eine Hypoglykämie wurde nur einmal gefunden. Unsere Untersuchung zeigt jedoch, dass diese hämatologischen Abweichungen, isoliert betrachtet, nur eine geringe Aussagekraft haben. Denn 23 der 27 klinisch nachuntersuchten Kinder zeigten laborchemische Abnormitäten und hier vor allem eine Erhöhung des

I/T und eine Thrombopenie. Das heißt, dass aufgrund von veränderten Blutwerten noch lange nicht die Diagnose einer Sepsis gestellt werden kann. Andererseits bestand bei allen 27 Kindern klinisch der Verdacht auf Sepsis, nur konnte der verantwortliche Erreger durch unsere Untersuchungen nicht sicher identifiziert werden. Von dieser Seite aus betrachtet waren auch bei uns eine Thrombopenie und eine Erhöhung des I/T die spezifischsten Laborparameter, indem bei 15 der 27 Neugeborenen eine Thrombozytopenie und bei 17 Kindern eine Erhöhung des I/T gefunden wurde.

Insgesamt wurde seit den 80er Jahren über eine beängstigende Zunahme von CNS-Infektionen bei Neugeborenen auf Intensivstationen berichtet (2,7,11,33,73). Allgemein sind diese Infektionen jedoch, im Vergleich zu z.B. Infektionen mit Streptokokken der Gruppe B oder *E.coli*, durch einen nicht fulminanten Verlauf und nur wenige Todesfälle gekennzeichnet (4,27,36,41,48,59,96,103). So wurden die septischen Perioden auch bei den 6 von uns gefundenen Krankheitsfällen überlebt. In den meisten früheren Untersuchungen wurde die Diagnose einer CNS-Sepsis bei Neugeborenen durch Blutkulturen gestellt (2,3,7,13,33,38,41,44,53). Zur Zeit der Untersuchung war es schwierig, beim Neugeborenen das für eine Blutkultur notwendige Blutvolumen zu erhalten, und für die sowieso schon geschwächten kleinen Patienten bedeutete der Blutverlust eine zusätzliche Belastung (40,6590,92). In vorliegender Arbeit wurde auf Blutkulturen fast vollständig verzichtet und stattdessen fast nur Abstriche vorgenommen. Auf diese Art und Weise gelang immerhin in 6 von 69 Fällen (8,7%) die wahrscheinliche Diagnose einer CNS-Sepsis. Im Verlaufe der Sepsis konnten sich Keime eines Klonen massiv vermehren und hier an verschiedenen Körperstellen nachgewiesen werden. Im Rahmen einer "physiologischen" Besiedlung der Neugeborenen mit CNS, wie sie ja oft schon am ersten Lebenstag beginnt (22,87,88,93,99), wäre eine klonale Identität von Keimen an verschiedenen Körperstellen sehr ungewöhnlich. So fanden sowohl D'Angio et al. (22) als auch Valvano et al. (99) in einer Untersuchung heraus, daß die aus dem Blut isolierten Stämme von Neugeborenen mit Bakteriämie, mit den von der Haut isolierten Stämmen identisch waren.

7. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden bei 69 Neugeborenen mit klinischem Verdacht auf Sepsis von verschiedenen Körperstellen insgesamt 208 Abstriche entnommen und in 121 Proben (58,2%) CNS isoliert. Bei diesen Stämmen wurde jeweils eine Speziesdifferenzierung, ein Antibioogramm und eine Schleimtestung durchgeführt.

Bei der Speziesdifferenzierung dominierte *S.epidermidis* mit 61,2% gefolgt von *S.haemolyticus* (23,2%), *S.hominis* (5,8%), nicht differenzierbaren *S.spezies* (4,1%) und *S.auricularis* (3,3%). *S.warneri*, *S.simulans* und *S.saprophyticus* wurden jeweils nur einmal isoliert (0,8%).

Bei der Antibiotikaresistenztestung reagierten alle Stämme sensibel auf Vancomycin. Ebenso wurden geringe Resistenzraten gegen Ciprofloxacin (3,3%) beobachtet. Dagegen waren 76% der Stämme resistent gegen Ampicillin und 39,7% gegen Oxacillin. Des Weiteren wiesen die gegen Oxacillin resistenten Stämme auch deutlich mehr Resistenzen gegen die übrigen getesteten Antibiotika auf. *S.epidermidis* war die Spezies, die im Durchschnitt die meisten Resistenzen lieferte.

Bei der Schleimtestung waren 60,3% der Stämme stark, 14,1% schwach und 25,6% nicht adhärent. *S.epidermidis* war die Spezies mit den höchsten Adhäsionsraten, indem 73% der Stämme eine starke Adhäsion aufwiesen, im Gegensatz zu *S.hominis* und *S.haemolyticus* mit jeweils 57,1% bzw. 35,7% stark adhärenen Stämmen.

Bei 17 der 69 Neugeborenen wurden von mindestens zwei verschiedenen Körperstellen jeweils CNS der gleichen Spezies isoliert. Um herauszufinden, ob die bei einem Kind isolierten Bakterien einem Klon angehörten, wurden zur weiteren Differenzierung eine Typisierung nach Antibioogramm, eine Plasmidprofilanalyse und eine Proteinprofilanalyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gel Elektrophorese durchgeführt.

Bei Betrachtung aller fünf durchgeführten Untersuchungsverfahren zeigte sich, dass bei 6 Kindern die Ergebnisse bei mindestens zwei Stämmen nahezu identisch ausfielen. So konnte hier der

Rückschluss auf eine klonale Identität dieser Stämme gezogen werden und die isolierten CNS als wahrscheinliche Sepsiserreger verantwortlich gemacht werden.

Die Spezies der 14 CNS-Stämme dieser 6 Neugeborenen umfassten in 7 Fällen *S.epidermidis*, in 4 Fällen *S.haemolyticus* und in 3 Fällen nicht differenzierbare *S.spezies*. 11 der 14 Stämme besaßen eine starke Adhäsionsfähigkeit, und nur die 3 nicht differenzierbaren *S.spezies* waren nicht adhärent. Die 7 *S.haemolyticus* und *S.spezies* Stämme lagen mit ihrer Resistenzhäufigkeit im Durchschnitt, nur die *S.epidermidis* Stämme lagen etwas darüber.

Bei den 6 Neugeborenen mit Nachweis von Keimen eines Klones handelte es sich jedes Mal um Frühgeborene. Alle Kinder überlebten die septischen Perioden unter entsprechender antibiotischer Therapie. Im Labor erwiesen sich eine Erhöhung der I/T-Proportion sowie eine Thrombopenie als verlässlichste Laborparameter. Fakultativ gefunden wurden eine CRP-Erhöhung, eine Leukozytose und eine Hypoglykämie.

8. Literaturverzeichnis

1. AKATOV, A.K., M.L.Khatenever, L.A.Devriese: Identification of coagulase-negative Staphylococcus isolated from clinical sources.
Zentralbl. Bakteriolog. 10, 153-161 (1981)
2. ALVAREZ, J.S., F.Pardo, M.J.Garrido: Biotyping and phage typing of coagulase-negative staphylococci from blood cultures of neonates.
J. Hosp. Infect. 8(1), 64-71 (1986)
3. ANDAY, E.K., G.H.Talbot: Coagulase-Negative Staphylococcus Bacteremia - A Rising Threat In The Newborn Infant.
Ann. Clin. Lab. Sci. 15(3), 246-251 (1985)
4. ARCHER, G.L., C.G.Mayhall: Comparison of Epidemiological Markers Used in the Investigation of an Outbreak of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infections.
J. Clin. Microbiol. 18(2), 395-399 (1983)
5. ARCHER, G.L., A.W.Karchmer, N.Vishniavsky, J.L.Johnston: Plasmid-Pattern Analysis for the Differentiation of Infecting from Noninfecting Staphylococcus epidermidis.
J. Infect. Dis. 149(6), 913-920 (1984)
6. BATTISTI, O., R.Mitchison, P.A.Davies: Changing Blood culture isolates in a referral neonatal intensive care unit.
Arch. Dis. Child. 56, 775-778 (1981)
7. BAUMGART, S., S.E.Hall, J.M.Campos, R.A.Polin: Sepsis With Coagulase-Negative Staphylococci in Critically Ill Newborns.
Am. J. Dis. Child. 137(5), 461-463 (1983)
8. BEGANOVIC, N., S.P.Verloove-Vanhorick, R.Brand, J.H.Ruys: Total parenteral nutrition and sepsis.
Arch. Dis. Child. 63(1), 66-67 (1988)
9. BERGEY, D.H., R.E.Buchanan, N.E.Gibbons: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.
8th ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore (1974)

10. BROWN, E., R.P.Wenzel, J.O.Hendley: Exploration of the Microbial Anatomy of Normal Human Skin by Using Plasmid Profiles of Coagulase-Negative Staphylococci: Search for the Reservoir of Resident Skin Flora.
J. Infect. Dis. 160(4), 644-650 (1989)
11. CALNEN, G., P.Campognone, G.Peter: Coagulase-negative Staphylococcal Bacteremia in Newborns.
Clin. Pediatr. 23, 542-544 (1984)
12. CAREY, B.E.: Major Complications of Central Lines in Neonates.
Neonatal Network 7(6), 17-28 (1989)
13. CARLOS, C.C., S.Ringertz, M.Rylander, P.Huovinen and G.Faxelius: Nosocomial Staphylococcus epidermidis septicaemia among very low weight neonates in an intensive care unit.
J. Hosp. Infect. 19(3), 201-207 (1991)
14. CHRISTENSEN, G.D., W.A.Simpson, J.J.Younger, L.M.Baddour, F.F.Barrett, D.M.Melton, E.H.Beachey: Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices.
J. Clin. Microbiol. 22, 996-1006 (1985)
15. CHRISTENSEN, G.D., W.A.Simpson, A.L.Bisno, E.H.Beachey: Adherence of Slime-Producing Strains of Staphylococcus epidermidis to Smooth Surfaces.
Infection and Immunity, July 1982, 318-326
16. CHRISTENSEN, G.D., J.T.Parisi, A.L.Bisno, W.A.Simpson, E.H.Beachey: Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci.
J. Clin. Microbiol. 18, 258-269 (1983)
17. CHRISTENSEN, G.D., W.A.Simpson, A.L.Bisno: Experimental foreign body infections in mice challenged with slime-producing Staphylococcus epidermidis.
Infect. Immun. 40, 407-410 (1983)

18. CHRISTENSEN, G.D., L.M.Baddour, W.A.Simpson: The Role of Adherence in the Pathogenesis of Coagulase-Negative Staphylococcal Infections.
Zbl. Bakt. Suppl. 16, Gustav Fischer Verlag (1987)
19. CHRISTENSEN, W.B.: Urea decomposition as a mean of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types.
J. Bact. 52, 461-466 (1946)
20. CLINK, J., T.H.Pennington: Staphylococcal whole-cell polypeptide analysis: evaluation as a taxonomic and typing tool.
J. Med. Microbiol. 23, 41-44 (1987)
21. COWAN, S.T., K.J.Steel: Manual for the Identification of Medical Bacteria, Second Edition, University Press, Cambridge 1974
22. D'ANGIO, C.T., K.L.McGowan, S.Baumgart, J.St. Geme, M.C.Harris: Surface colonization with coagulase-negative staphylococci in premature neonates.
J. Pediatr. 114(6), 1029-1034 (1989)
23. DAVENPORT, D.S., R.M.Massanari, M.A.Pfaller, M.J.Bale, S.A.Streed, W.J.Hierholzer: Usefulness of a Test for Slime Production as a Marker for Clinically Significant Infections with Coagulase-Negative Staphylococci.
J. Infect. Dis. 153(2), 332-339 (1986)
24. DAVIES, A.J., J.W.Stone: Current Problems of Chemotherapy of Infections with Coagulase-Negative Staphylococci.
Eur. J. Clin. Microbiol. 5(3), 277-281 (1986)
25. DAVIES, A.J., M.Ward-Platt, R.Kirk, R.Marshall, B.D.Speidel, D.S.Reeves: Is Coagulase-Negative Staphylococcal Bacteremia in Neonates a Consequence of Mechanical Ventilation?
J. Hosp. Infect. 5(3), 260-269 (1984)

26. DAVIES, A.J., J.Clewett, A.Jones, R.Marshall: Sensitivity patterns of coagulase-negative staphylococci from neonates. *J. Antimicrob. Chemother.* 17(2), 155-160 (1986)
27. DE-LOUVOIS, J., D.Harvey: Antibiotic Therapy of the Newborn. *Clin. Perinatol.* 15(2), 365-388 (1988)
28. DONOWITZ, L.G., C.E.Haley, W.W.Gregory, R.P.Wenzel: Neonatal intensive care unit bacteremia: Emergence of gram-positive bacteria as major pathogens. *Am. J. Infect. Control.* 15(4), 141-147 (1987)
29. DUNNE, W.M., D.B.Nelson, M.J.Chusid: Epidemiologic markers of pediatric infections caused by coagulase-negative Staphylococci. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 6, 1031-1035 (1987)
30. DUTHIE, E.S.: Evidence of two forms of staphylococcal coagulase. *J. Gen. Microbiol.* 10, 427-436 (1954)
31. ELBRIGHT, J.R., M.W.Rytel: Intraabdominal abscess caused by Staphylococcus epidermidis. *Arch. Surg.* 115, 326 (1980)
32. ETIENNE, J., F.Renaud, M.Bes, Y.Brun, T.B.Greenland, J.Freney, J.Fleurette: Instability of characteristics amongst coagulase-negative staphylococci causing endocarditis. *J. Med. Microbiol.* 32(2), 115-122 (1990)
33. FAXELIUS, G., S.Ringertz: Neonatal Septicemia in Stockholm. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6(3), 262-265 (1987)
34. FEIGEIR, R.D., P.G.Shackelford, J.Campbell: Assessment of the role of Staphylococcus epidermidis as a cause of otitis media. *Pediatrics* 52, 567-576 (1973)

35. FLEER, A., J.Verhoef, A.Pascual Hernandez: Coagulase-Negative Staphylococci as Nosocomial Pathogens in Neonates. The Role of Host Defense, Artificial Devices and Bacterial Hydrophobicity.
Am. J. Med. 80(6B), 161-165 (1986)
36. FLEER, A., L.J.Gerards, A.Pascual, J.Verhoef: Coagulase-Negative Staphylococcal Septicemia in Premature Neonates. Epidemiological Features and the Role of Host Defence and Bacterial Factors.
Zbl. Bakt. Suppl. 16, Gustav Fischer Verlag
Stuttgart/New York, S.215-223 (1987)
37. FLEER, A., L.J.Gerards, P.Aerts, A.C.Westerdaal, R.C.Senders, H.van Dijk, J.Verhoef: Opsonic Defense to Staphylococcus epidermidis in the Premature Neonate.
J. Infect. Dis. 152(5), 930-937 (1985)
38. FLEER, A., R.C.Senders, M.R.Visser, R.P.Bijlmer, L.J.Gerards, C.A.Kraaijeveld, J.Verhoef: Septicemia due to Coagulase-Negative Staphylococci in a Neonatal Intensive Care Unit: Clinical and Bacteriological Features and Contaminated Parenteral Fluids as a Source of Sepsis.
Pediatr. Infect. Dis. 2(6), 426-431 (1983)
39. FREEMAN, J., D.A.Goldmann, N.E.Smith, D.G.Sidebottom, M.F.Epstein, R.Platt: Association of Intravenous Lipid Emulsion and Coagulase-Negative Staphylococcal Bacteremia In Neonatal Intensive Care Units.
N. Engl. J. Med. 323, 301-308 (1990)
40. FREEMAN, J., R.Platt, D.G.Sidebottom, J.M.Leclair, M.F.Epstein, D.A.Goldmann: Coagulase-Negative Staphylococcal Bacteremia in the Changing Neonatal Intensive Care Unit Population. Is there an Epidemic?
JAMA. 258(18), 2548-2552 (1987)

41. FREEMAN, J., M.F.Epstein, N.E.Smith, R.Platt, D.G.Sidebottom, D.A.Goldmann: Extra Hospital Stay and Antibiotic Usage with Nosocomial Coagulase-Negative Staphylococcal Bacteremia in Two Neonatal Intensive Care Unit Populations.
Am. J. Dis. Child. 144, 324-329 (1990)
42. GOLDMANN, D.A., W.A.Durbin, J.Freeman: Nosocomial infections in an neonatal intensive care unit.
J. Infect. Dis. 144, 449-459 (1981)
43. GÜNTHER, G., M.Björkholm, A.Björklind, P.Engervall, G.Stiernstedt: Septcemia in Patients with Hematological Disorders and Neutropenia.
Scand. J. Infect. Dis. 23(5), 589-598 (1991)
44. HALL, R.T., S.L.Hall, W.G.Barnes, J.Izuegbu, M.Rogolsky, I.Zorbas: Characteristics of coagulase-negative staphylococci from infants with bacteremia.
Pediatr. Infect. Dis. J. 6, 377-383 (1987)
45. HALL, S.L.: Coagulase-negative staphylococcal infections in neonates.
Pediatr. Infect. Dis. J. 10, 57-67 (1991)
46. HALL, S.L., S.W.Riddell, W.G.Barnes, L.Meng, R.T.Hall: Evaluation of coagulase-negative staphylococcal isolates from serial nasopharyngeal cultures of premature infants.
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 13(1), 17-23 (1990)
47. HARTSTEIN, A.I., M.A.Valvano, V.H.Morthland, P.C.Fuchs, S.A.Potter, J.H.Crosa: Antimicrobial Susceptibility and Plasmid Profile Analysis as Identity Tests for Multiple Blood Isolates of Coagulase-Negative Staphylococci.
J. Clin. Microbiol. 25(4), 589-593 (1987)
48. HENSEY, O.J., C.A.Hart, R.W.I.Cooke: Serious Infection in a Neonatal Intensive Care Unit: A Two-Year Survey.
J. Hyg. Lond. 95(2), 289-297 (1985)

49. HOHENHAUER, L., G.Eidenberger, F.Eitelberger, G.Tulzer:
Beobachtungen zur Sepsis neonatorum.
Pediatr. Padol. 23(3), 177-184 (1988)
50. HRUSZKEWYCZ, V., P.C.Holtrop, D.G.Batton, R.S.Morden,
P.Gibson, J.D.Band: Complications Associated with Central
Venous Catheters Inserted in Critically Ill Neonates.
Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 122(9), 544-548 (1991)
51. ISHAK, M.A., D.H.M.Gröschel, G.L.Mandell, R.P.Wenzel:
Association of Slime with Pathogenicity of Coagulase-
Negative Staphylococci Causing Nosocomial Septicemia.
J. Clin. Microbiol. Dec. 1985, 1025-1029
52. KAMME, C., L.Lindberg: Aerobic and anaerobic bacteria in
deep infections after total hip arthroplasty: differential
diagnosis.
Clin. Orthop. 154, 20-207 (1981)
53. KIRCHHOFF, L.V., J.N.Sheagren: Epidemiology and Clinical
Significance of Blood Cultures Positive for Coagulase-
Negative Staphylococcus.
Infect. Control. 6(12), 479-486 (1985)
54. KLEIN, J.O.: From Harmless Commensal to Invasive Pathogen.
Coagulase-Negative Staphylococci.
N. Engl. J. Med. 323(5), 339-340 (1990)
55. KLOOS, K.H., W.E.Schleifer: Isolation and Characterization of
Staphylococci from Human Skin: I. Amended Descriptions of
Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus
saprophyticus and Descriptions of Three New Species:
Staphylococcus cohnii, Staphylococcus haemolyticus and
Staphylococcus xylosus.
Int. J. Syst. Bacteriol. 25, 50-61 (1975)
56. KLOOS, W.E., K.H.Schleifer: Isolation and Characterization of
Staphylococci from Human Skin: II. Description of Four New
Species: Staphylococcus warneri, Staphylococcus capitis,
Staphylococcus hominis and Staphylococcus simulans.
Int. J. Syst. Bacteriol. 25, 62-79 (1975)

57. KLOOS, W.E., K.H.Schleifer: Simplified Scheme for Routine Identification of Human Staphylococcus Species.
J. Clin. Microbiol. 1, 82-88 (1975)
58. KRAUSE, P.J., V.C.Herson, J.Boutin-Lebowitz:
Polymorphonuclearleukocyte adherence and chemotaxis in stressed and healthy neonates.
Pediatr. Res. 20, 296-300 (1986)
59. KUMAR, M.L., H.B.Jenson, B.B.Dahms: Fatal Staphylococcal Epidermidis Infection in Very Low-Birth-Weight Infants with Cytomegalovirus Infection.
Pediatrics. 76(1), 110-112 (1985)
60. KUMAR, S.P., M.Delivoria-Papadopoulos: Infections in Newborn Infants in a Special Care Unit. A Changing Pattern of Infection.
Ann. Clin. Lab. Sci. 15(5), 351-356 (1985)
61. LAEMMLI, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685 (1970)
62. LA-GAMMA, E.F., L.M.Drusin, A.W.Mackles, S.Machalek, P.A.Auld: Neonatal Infections. An Important Determinant of Late NICU Mortality in Infants Less than 1.000g at Birth.
Am. J. Dis. Child. 137(9), 838-841 (1983)
63. LICHWEG, W.G., L.J.Greenfield: Vascular prosthetic infections: collected experience and results of treatment.
Surgery 81, 335-342 (1977)
64. LUDLAM, H.A., W.C.Noble, R.R.Marples, I.Phillips: The evaluation of a typing scheme for coagulase-negative staphylococci suitable for epidemiological studies.
J. Med. Microbiol. 30, 161-165 (1989)
65. MARSHALL, R.J., A.J.Davies, R.Kirk, D.S.Reeves: The Laboratory Interpretation of Coagulase-Negative Staphylococcal Bacteremia in Neonates.
J. Hosp. Infect. 12(4), 295-299 (1988)

66. MARSIK, F.J., S.Brake: Species Identification and Susceptibility to 17 Antibiotics of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Clinical Specimens.
J. Clin. Microbiol. 15(4), 640-645 (1982)
67. MCINTYRE, P., M.Tilse, B.Lewis, D.Tudehope: Late-onset neonatal sepsis due to multiply-resistant coagulase-negative staphylococci.
Med. J. Aust. 272-275 (1988)
68. MEHTA, G., S.Singh, S.Kumari: Observations on coagulase-negative staphylococci in a neonatal unit in India.
J. Hosp. Infect. 19(4), 273-281 (1991)
69. MEYERS, J.A., D.Sanchez, L.P.Ellwell, S.Falkow: Simple agarose gel electrophoresis method for the identification and characterization of plasmid desoxyribonucleic acid.
J. Bacteriol. 127, 1529-1537 (1976)
70. MUNSON, D.P., T.R.Thompson, D.E.Johnson, F.S.Rhame, N.Van Drunen, P.Ferrieri: Coagulase-negative staphylococcal septicemia: Experience in a newborn intensive care unit.
J. Pediatr. 101, 602-605 (1982)
71. NAIDOO, J., W.C.Noble Institute of Dermatology, London E9 6BX: Skin as a Source of Transferable Antibiotic Resistance in Coagulase-Negative Staphylococci.
Zbl. Bakt. Suppl. 16, 225-232 (1987)
72. NATIONAL COMMITTEE for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests.
3rd edition, Villanova, Pa.:Villanova University Press (1984)
73. NOEL, G.J., J.E.O'Loughlin, P.J.Edelson: Neonatal Staphylococcus epidermidis Right-Sided Endocarditis: Discription of Five Catheterized Infants.
Pediatrics. 82(2), 234-239 (1988)

74. NOEL, G.J., P.J.Edelson: Staphylococcus epidermidis Bacteremia in Neonates: Further Observations and the Occurrence of Focal Infection. Pediatrics. 74(5), 832-838 (1984)
75. OHLSSON, A., M.Vearncombe: Congenital and nosocomial sepsis in infants born in a regional perinatal unit: Cause, outcome, and white blood cell response. Am. J. Obstet. Gynecol. 156(2), 407-413 (1987)
76. PARISI, J.T., B.C.Lampson, D.L.Hoover, J.A.Khan: Comparison of epidemiological markers for Staphylococcus epidermidis. J. Clin. Microbiol. 24, 56-80 (1986)
77. PARISI, J.T., D.W.Hecht: Plasmid Profiles in Epidemiologic Studies of Infections by Staphylococcus epidermidis. J. Infect. Dis. 141(5), 637-643 (1980)
78. PATRICK, C.C.: Coagulase-negative staphylococci: Pathogens with increasing clinical significance. J. Pediatr. 116, 497-507 (1990)
79. PENNOCK, C.A., R.B.Huddy: Phosphatase reaction of coagulase-negative staphylococci and micrococci. J. Path. Bact. 93, 685-688 (1967)
80. PETERS, G., R.Locci, G.Pulverer: Adherence and Growth of Coagulase-Negative Staphylococci on Surfaces of Intravenous Catheters. J. Infect. Dis. 146(4), 479-482 (1982)
81. PETERS, G., F.Schumacher-Perdreau, B.Jansen: Biology of S.epidermidis extracellular slime. In: Pulverer, Quie, Peters: Pathogenicity and clinical significance of coagulase-negative staphylococci. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag 15-30 (1987)
82. PETERS, G., F.Schumacher-Perdreau, G.Pulverer: Infektionen durch koagulasenegative Staphylokokken bei abwehrgeschwächten Patienten. Immun. Infekt. 14(5), 165-169 (1986)

83. PIERRE, J., L.Gutmann, M.Bornet, E.Bergogne-Berezin, R.Williamson: Identification of Coagulase-Negative Staphylococci by Electrophoretic Profile of Total Proteins and Analysis of Penicillin-Binding Proteins.
J. Clin. Microbiol. 28(3), 443-446 (1990)
84. PLACZEK, M.M., A.Whitelaw: Early and Late Neonatal Septicemia.
Arch. Dis. Child. 58(9), 728-731 (1983)
85. PULVERER, G.: On the Pathogenicity of coagulase-negative staphylococci.
Zbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. (A) (Suppl. 14) 1 (1985)
86. RODWELL, R.L., A.L.Leslie, D.I.Tudehope: Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematologic scoring system.
J. Pediatr. 112, 761-767 (1988)
87. ROTIMI, V.O., S.A.Olowe, I.Ahmed: The development of bacterial flora of premature neonates.
J. Hyg. 94, 309-318 (1985)
88. SACKS, L.M., J.C.McKittrick, R.B.MacGregor: Surface Cultures and Isolation Procedures in Infants Born under Unsterile Conditions.
Am. J. Dis. Child. 137, 351-353 (1983)
89. SCHERER, L.R., K.W.West, T.R.Weber, M.Kleiman, J.L.Grosfeld: Staphylococcus epidermidis Sepsis in Pediatric Patients: Clinical and Therapeutic Considerations.
J. Pediatr. Surg. 19(4), 358-361 (1984)
90. SCHMIDT, B.K., H.M.Kirpalani, M.Corey, D.E.Low, A.G.S.Philip, E.L.Ford-Jones: Coagulase-negative staphylococci as true pathogens in newborn infants: a cohort study.
Pediatr. Infect. Dis. J. 6, 1026-1031 (1987)
91. SCHWALBE, R.S., W.J.Ritz, P.R.Verma, E.A.Barranco, P.H.Gilligan: Selection for vancomycin resistance in clinical isolates of Staphylococcus haemolyticus.
J. Infect. Dis. 161(1), 45-51 (1990)

92. SIDEBOTTOM, D.G., J.Freeman, R.Platt, M.F.Epstein, D.A.Goldmann: Fifteen-Year Experience with Bloodstream Isolates of Coagulase-Negative Staphylococci in Neonatal Intensive Care.
J. Clin. Microbiol. 26(4), 713-718 (1988)
93. SIMPSON, R.A., A.F.Spencer, D.C.E.Speller, R.R.Marples: Colonization by gentamicin-resistant Staphylococcus epidermidis in a special care baby unit.
J. Hosp. Infect. 7(2), 108-120 (1986)
94. SHETH, N.K., T.R.Franson, P.G.Sohnle: Influence of bacterial adherence to intravascular catheters on in vitro antibiotic susceptibility.
Lancet 2, 1266-1268 (1985)
95. STARR, S.E.: Antimicrobial therapy of bacterial sepsis in the newborn infant.
J. Pediatr. 106(6), 1043-1048 (1985)
96. SUJOV, P., S.Blazer, D.Bader, M.Zeltzer: Neonatal Septicemia Caused by Coagulase-Negative Staphylococci.
Isr. J. Med. Sci. 22(1), 29-33 (1986)
97. TRIMBLE, K.A., R.B.Clark: Coagulase-Negative Staphylococcal Bacteremia in Neonates.
Nebr. Med. J. 72(8), 277-279 (1987)
98. TULZER, G., L.Hohenhauer: Erreger der Neugeborenenensepsis und ihr Resistenzverhalten.
Wien. Med. Wochenschr. 138(9), 213-216 (1988)
99. VALVANO, M.A., A.I.Hartstein, V.H.Morthland, M.E.Dragoon, S.A.Potter, J.W.Reynolds, J.H.Crosa: Plasmid DNA analysis Of Staphylococcus epidermidis isolated from blood and colonization cultures in very low birth weight neonates.
Pediatr. Infect. Dis. J. 7(2), 116-120 (1988)

100. VERHOEF, J.: Infections Caused by Coagulase-Negative Staphylococci in the Immunocompromised Host.
Zbl. Bakt. Suppl. 16, Gustav Fischer Verlag
Stuttgart/New York, S.209-214 (1987)

101. VERHOEF, J., A.Fleer: Staphylococcus epidermidis Endocarditis and Staphylococcus epidermidis Infection in an Intensive Care Unit.
Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 41, 56-64 (1983)

102. VESIKARI, T., E.Isolauri, N.Tuppurainen, M.Renlund, M.Koivisto, M.Janas, R.S.Ikonen, P.Kero, K.Heinonen, R.Nyman, M.Kunnas: Neonatal Septicemia in Finland 1981-85. Predominance of Group B Streptococcal Infections with Very Early Onset.
Acta. Paediatr. Scand. 78, 44-50 (1989)

103. VOGEL, M., R.Roos: Infektionen durch koagulasenegative Staphylokokken bei Frühgeborenen.
Päd. Prax. 35, 585-588 (1987)

104. VOSS, A.: Staphylokokken - Eine Keimgattung kehrt zurück.
Physis: Spezial, Nr.60 (1991)

105. WALCHER-SALESSE, S., C.Monzon-Moreno, S.Aubert, N.El Solh: An epidemiological assessment of coagulase-negative staphylococci from an intensive care unit.
J. Med. Microbiol. 36, 321-331 (1992)

106. WILSON, C.R., P.A.Totten, J.N.Baldwin: Rapid Procedure for the Detection of Plasmids in Staphylococcus epidermidis.
Appl. Environ. Microbiol. 36, 368-374 (1978)

107. XIAO, W.S., S.Li, T.Jun: Neonatal Septicemia Caused by Coagulse-Negative Staphylococcus with Plasmid Analysis.
Acta. Paediatr. Scand. 77(2), 308-309 (1988)

108. YEUNG, C.Y., J.R.Hobbs: Serum-gamma G-globulin levels in normal, premature, post-mature and „small-for-dates“ newborn babies.
Lancet 1, 1167-1170 (1968)

Aktualisierte Literatur:

109. BJORKQVIST, M., B.Soderquist,.E.Tornqvist, L.Sjoberg, H.Fredlund, I.Kuhn, P.Colque-Navarro, J.Schollin: Phenotypic and genotypic characterisation of blood isolates of coagulase-negative staphylococci in the newborn.
APMIS 110(4), 332-339 (2002)
110. GATERMANN, S., B.Kreft, R.Marre, G.Wanner: Identification and characterization of a surface-associated protein (Ssp) of *Staphylococcus saprophyticus*.
Infect. Immun.60, 1055-1060 (1992)
111. MARTIN DE NICOLAS, M.M., A.Vindel, J.A.offez-Nieto: Epidemiological typing of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci.
J. Hosp. Infect. 29(1), 35-43 (1995)
112. MURRAY, P.R., E.J.Baron, M.A.Pfaller, F.C.Tenover, R.H.Yolken: Manual of Clinical Microbiology, Seventh Edition, American Society for Microbiology, Washington, DC (1999)
113. RAIMUNDO, O., H.Heussler, J.B.Bruhn, S.Suntrarachun, N.Kelly, M.A.Deighton, S.M.Garland: Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia in a newborn intensive care unit.
J. Hosp. Infect. 51(1), 33-42 (2002)
114. RODRIGUEZ CERVILLA, J., J.M.Fraga, C.Garcia Riestra, J.R.Fernandez Lorenzo, I.Martinez Soto: Neonatal sepsis: epidemiologic indicators and relation to birth weight and length of hospitalization time.
An. Esp. Pediatr. 48(4) 401-408 (1998)
115. RONNESTAD, A., T.G.Abrahamsen, P.Gaustad, P.H.Finne: C-reactive protein (CRP) response patterns in neonatal septicaemia
APMIS 107(6), 593-600 (1999)

116. SCHABERG, D.R., D.H.Culver, R.P.Gaynes: Major trends in the microbial etiology of nosocomial infections.
Am. J. Med. 91(suppl. 3B) 72-75 (1991)
117. SPENCER, R.C.: Predominant pathogens found in the european prevalence of infection in intensive care study.
Eur. J. Microbiol. Infect. Dis. 15, 281-285 (1996)
118. SZEWCZYK, E.M., A.Piotrowski, M.Rozalska: Predominant staphylococci in the intensive care unit of a paediatric hospital.
J. Hosp. Infect. 45(2), 145-154 (2000)
119. VILLARI, P., C.Sarnataro, L.Iacuzio: Molecular epidemiology of Staphylococcus epidermidis in a neonatal intensive care unit over a three-year period.
J. Clin. Microbiol. 38(5), 1740-1746 (2000)
120. VON EIFF, C., G.Peters: Zunehmende Bedeutung von koagulasen negativen Staphylokokken als Infektionserreger bei prädisponierten Patientengruppen.
Hygiene und Mikrobiologie 2, 23-26 (1997)
121. WITTE, W.: Koagulasenegative Staphylokokken. Klinische Bedeutung und Besonderheiten bei der Sensibilitätstestung.
Chemotherapie Journal 5 (Suppl. 11) 7-12 (1996)

Lebenslauf

Name, Vorname: Steinacker, Marion, geb. Sauerwein

Geburtsdatum, -ort: 31. Januar 1964 in Köln

Familienstand: verheiratet, 3 Kinder

Staatsangehörigkeit: deutsch

Eltern: Dr. med. Erich Sauerwein
Facharzt für Innere Krankheiten

Ruth Sauerwein, geb. Blossche
Lehrerin

Schulbildung: 1970-1974 Katholische Grundschule Freiligrathstr.,
Köln-Lindenthal
1974-1983 Elisabeth-von-Thüringen-Gymnasium,
Köln-Sülz
1983 Allgemeine Hochschulreife

Studium: 1984-1990 Studium der Humanmedizin an der
Universität zu Köln
03/1986 Ärztliche Vorprüfung
03/1997 Erster Abschnitt der Ärztlichen
Prüfung
03/1989 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen
Prüfung
04/1989-03/1990 Praktisches Jahr an der
Universitätsklinik Köln mit dem
Wahlfach Dermatologie
05/1990 Dritter Abschnitt der Ärztlichen
Prüfung

Berufstätigkeit: 10/1990 Ärztin im Praktikum im
Gesundheitsamt der Stadt Köln
11/1990-05/1992 Ärztin im Praktikum in der Inneren
Abteilung des Klinikums Leverkusen
08/1992-09/1999 Ärztin in der Leitstelle des
Onkolog. Schwerpunktes Köln e.V.
seit 10/1999 Dozentin für Anatomie und
Physiologie in der Abteilung für Aus-,
Fort- und Weiterbildung des Klinikums
Leverkusen

Leverkusen, 04.05.2003