

4 Material und Methoden

4.1 Untersuchungsmaterialien

4.1.1 Bakterienstämme

Zur Untersuchung gelangten S.m.-Stämme, die im Zeitraum von November 1992 bis August 1996 von Neugeborenen der Abteilung Neonatologie , Säuglingen der Kardiologischen Intensivüberwachungsstation , Patienten einer weiteren Kinderstation und erwachsenen Patienten einer Intensivtherapiestation des gleichen Klinikums isoliert wurden. Außerdem ergänzten S.m.-Isolate aus neonatologischen Abteilungen des Krankenhauses Berlin-Friedrichshain und der Kliniken Cottbus und Potsdam die Stammsammlung. Dabei handelte es sich um Isolate aus unterschiedlichen Materialien: Rachenabstriche (n= 330), Trachealsekrete (n= 153), Stuhl (n= 120), Blutkulturen (n= 20), Urine (n= 33), intravenöse Katheter (n= 15), Wundabstriche (n= 13), Liquor (n= 8), Konjunktivalabstriche (n= 53), Abstriche von Nase (n= 21), Ohr (n= 6) und Vagina (n=3) sowie Magensaft (n=2), Pleurapunktat (n= 1), Fistelsekret (n=1), Leber (n=2), Lunge (n=1), Milz (n=2), Waschbecken (n=1), Muttermilch (n=5).

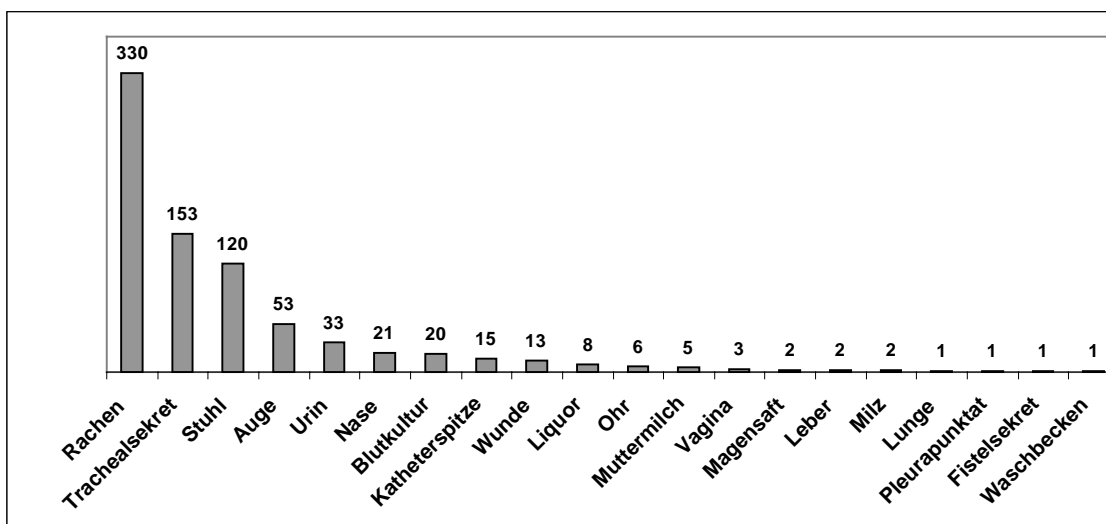


Abbildung 1 : Herkunftsort der Untersuchungsmaterialien

Mit der PFGE wurden insgesamt 486 Stämme von 232 Patienten untersucht. Pro Patient wurden mindestens zwei Stämme typisiert, wobei die Gesamtzahl in

Abhängigkeit von der Hospitalisationsdauer und der Anzahl der patientenspezifischen Isolate variierte.

Die Abteilung Neonatologie sandte zum Monitoring der Früh- und Neugeborenen , die intensivmedizinisch betreut wurden, nach folgendem Schema Untersuchungsmaterialien zur mikrobiologischen Diagnostik ein:

- 1. Lebens- bzw. Aufnahmetag :

Nasen-, Ohren-, Augen-, Nabelschnur-, Rachenabstriche bzw. bei Intubation Trachealsekret, Spontanurin, Mekonium bzw. Stuhl

- Bei fehlenden klinischen Zeichen einer Infektion :

Einmal pro Woche Material aus Stuhl, Urin und Tracheal- bzw. Rachensekret

- Mit Beginn einer Infektionssymptomatik :

tägliche Kulturen aus Stuhl, Urin, Blut, Rachen- bzw. Trachealsekret und zusätzlich je nach Lokalisation Liquor, Magensekret sowie Abstriche von Auge, Nase, Ohr, Wunde.

- Bei entsprechender Therapie wurden Nabelkatheterspitzen und Katheterspitzen zentralvenöser Zugänge untersucht.

Außerdem erfolgten im Rahmen der Infektionskontrollmaßnahmen umfangreiche Umgebungsuntersuchungen sowie Hand- und Nasenabstriche vom Personal.

4.1.2 Geräte und Zubehör

Controlled Environment Incubator Shaker, Certomat HK, Braun, Melsungen,

Ultrospec III, Pharmacia LKB Biochrom, Cambridge

Pulsfeldkammer CHEF-DRII, Bio-Rad, Munich

Kühlgerät Multicool 2209, LKB, Bromma

Pherostab 300, Biotec Fischer

Biofuge 28 RS, Heraeus Sepatech

Refrigerated Superspeed Centrifuge, Sigma, Deisenhofen

Eppendorf Centrifuge 5415 C, Hamburg

Eagle Eye II ,Stratagene

4.1.3 Nährmedien

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)(pH 7,2):

Zusammensetzung auf 1000 ml Aqua dest

10 g Bacto-Trypton ; 5 g Hefe-Extrakt ; 10 g NaCl

4.1.4 Feinchemikalien

4.1.4.1 Reagentien

Boric Acid, analytical grade, Serva , Heidelberg

Brij 58 (Polyethylenglykolmonostearylether), Serva, Heidelberg

Bromphenolblau-Na-Salz, reinst, Serva, Heidelberg

Cholsäure-Natriumsalz, Merck, Darmstadt

Ethanol absolut, Merck-Schuchardt, Hohenbrunn bei München

Ethidiumbromid reinst, Serva, Heidelberg

Ficoll Type 400, Sigma, St. Louis, U.S.A.

Lambda-DNA, aus Lamda cl 857 Sam 7, 0,25 mg/ml, Boehringer, Mannheim

Lambda-DNA-PFGE Markers, Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala Sweden

Lauryl-Sulfate Sodium Salt (SDS), Sigma, St. Louis, U.S.A.

Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), Sigma, Deisenhofen

Sodium lauroyl sarcosine, Serva, Heidelberg

Titriplex III (EDTA), Merck, Darmstadt

Tris, Boehringer, Mannheim

Trizma Base, Sigma, St. Louis, U.S.A.

Trizma-Hydrochloride, Sigma, St. Louis, U.S.A.

4.1.4.2 Agarosen

Agarose Typ 2: Low EEO, Sigma, St. Louis, U.S.A.

SeaPlaque GTG Agarose, FMC BioProducts, Rockland, U.S.A.

SeaPlaque HGT Agarose, FMC BioProducts, Rockland, U.S.A.

4.1.4.3 Enzyme

Proteinase K, Boehringer, Mannheim

Proteinase K, Merck, Darmstadt

Restriktionsendonuklease Xba 1, Boehringer, Mannheim

4.1.4.4 Puffer und Lösungen

(Pufferzusammensetzung jeweils auf 1000 ml Aqua dest)

SE-Puffer (pH 7,4): 75 mM NaCl ; 25 mM Na₂EDTA

LMP-Puffer: 10 mM Tris-HCl ; 10 mM MgCl₂ ; 0,1mM Na₂ EDTA

NDS-Puffer (pH 7,4) für 10 Stämme:

50 ml 0,5M Na₂EDTA ; 100 mg Proteinase K ; 0,5 g N-Laurylsarcosin 35%

TE-Puffer (pH 7,4): 10 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 1 mM Na₂ EDTA

TBE-Puffer (10fach) (pH 8,0): 1 M Tris ; 1 M Borsäure ; 20 mM Na₂ EDTA

Bromphenolblaufarbstofflösung:

2,0 µg/ml Bromphenolblau ; 40% Saccharose ; 0,1 M Na₂ EDTA

Stopplösung:

0,25% Xylenxyanol ; 0,25% Bromphenolblau ; 25% Ficoll 400

4.2 Methoden

4.2.1 Stammhaltung

Die klinischen Isolate wurden mittels ID 32 E (Bio Mérieux) einem System zur Identifizierung von *Enterobacteriaceae* und anderer gramnegativer, nicht anspruchsvoller Stäbchen anhand von 32 standartisierten und miniaturisierten, biochemischen Tests sowie einer Datenbasis, als S.m. identifiziert.

Anschließend erfolgte die weitere Stammhaltung auf Microbank. (Microbank TM, Pw-Lab Diagnostica)

4.2.2 Resistenztestung

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) erfolgte im Mikrobouillonverdünnungstest nach DIN 58940. Die Isolate wurden gegen Ampicillin, Ampicillin/ Sulbactam, Mezlocillin, Piperacillin, Piperacillin/ Tazobactam, Azlocillin,

Cefotiam, Cefotaxim, Ceftazidim, Imipenem, Meropenem, Gentamicin, Tobramycin, Amikacin, Ciprofloxacin, Trimethoprim/ Sulfonamid und Doxycyclin getestet.

4.2.3 Pulsfeldgelelektrophorese

Die Präparation der chromosomalen DNA wurde als Mikromethode nach Allardet-Servent et al.² mit wenigen Modifikationen durchgeführt.

Größere DNA-Fragmente sind außerhalb intakter Zellen instabil. Zur Vermeidung von Spontanbrüchen der Chromosomen während der Präparation erfolgte die Einbettung der Bakterienzelle in Agarose. Alle weiteren Schritte der Chromosomenpräparation mittels degradierender Enzyme erfolgten im Agar. Der Verdau der Chromosomen mit Restriktionsendonukleasen sowie die Auftrennung der Schnittstücke mittels der PFGE wird im Anschluss an die Darstellung der Präparationstechnik beschrieben. Entsprechend den Empfehlungen in der Literatur^{89, 101, 133} wählten wir XbaI als Restriktionsenzym aus, welches als Schnittstelle die seltene Tetranukleotidsequenz CTAG sucht und damit weniger DNA-Fragmente entstehen lässt. Die dementsprechend geringere Bandenanzahl in der Elektrophorese macht die Resultate leichter vergleichbar.

a) Vorbereitung der Stämme

Die zu präparierenden Stämme wurden einen Tag vor der Präparation von der Microbank in LB-Medium überimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. 2 ml dieser Schüttelkultur wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, bei 7000 Upm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Sediment wurde zweimal mit SE-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Vor der Weiterverarbeitung wurde am Spekol bei 600 nm mit SE-Puffer eine optische Dichte von 700 eingestellt, die $0,7 \times 10^9$ Koloniebildnern pro ml entspricht.

b) Herstellung des Inserts

Von der Zellsuspension wurden 160µl mit 2% LowMeltingPoint Agarose im Verhältnis 1:1 vermischt und in Insert-Moulds (2 x 5 x 10 mm) gegossen.

c) Lyse der Zellen

Die Inserts wurden in 2,5 ml NDS-Puffer gegeben und über Nacht bei 50°C im Schüttler inkubiert. Nach Kühlung auf Eis wurden die Inserts drei- bis viermal in TE-Puffer gewaschen.

d) Verdau der Chromosomen mit Restriktionsendonukleasen

Jeweils ein Insert wurde in 0,25 ml des vorgeschriebenen Restriktionspuffers gegeben. Nach Zugabe von 30 Units Restriktionsenzym Xba 1 und Inkubation für 24 Stunden bei 37°C wird die Spaltung durch Zugabe von 0,1 Volumen Stopplösung beendet. Die Agarosegelelektrophorese erfolgt sofort nach der Verdauung ohne weitere Reinigungsschritte.

e) Einsatz von Größenmarkern

Für Auftrennungen bis zu 500 kB wurde ein kommerziell erhältlicher PFGE-Marker (Lambda-DNA-Oligomere) eingesetzt, der vor Verwendung in TBE-Puffer inkubiert und an der entsprechenden Ladestelle des Elektrophoresegels eingebracht wurde

f) Agarosegelelektrophorese der chromosomalen DNA

Die Elektrophorese wurde in einem vertikalen Plattengel (190 mm x 170 mm x 3 mm) aus 1,3 % Agarose in TBE-Puffer durchgeführt. Die Gele wurden mit 13 Taschen (5 x 3 mm Grundfläche) hergestellt. Die zu untersuchenden Inserts wurden in die Ladestellen des Gels hineingebracht und mit 1 % Agarose fixiert

g) Laufparameter der PFGE

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte bei 200 Volt, 14°C und einer Laufzeit von 28 Stunden mit Pulszeiten zwischen 20 und 5 Sekunden.

h) Auswertung

Im Anschluss wurde das Gel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht photographiert. Die Auswertung des Bandenmusters erfolgte manuell.

4.3 Patienten

4.3.1 Erfassung der klinischen Daten

Um den Zusammenhang zwischen dem Nachweis von S.m. in unterschiedlichen Materialien und der Entwicklung von Infektionen näher zu untersuchen und mögliche Risikofaktoren zu erkennen, wurden die Krankenakten von 206 Kindern retrospektiv ausgewertet. Es handelte sich dabei um Neugeborene der Abteilung Neonatologie, Säuglinge der Kardiologischen Intensivüberwachungsstation und Patienten einer weiteren Kinderstation des gleichen Klinikums, die im Zeitraum von November 1992 bis August 1996 stationär behandelt wurden und aus deren mikrobiologischen

Untersuchungsmaterialien S.m. isoliert wurde. Die klinischen Daten der erwachsenen Patienten der ITS und der Patienten aus den Fremdkrankenhäusern wurden nicht erfasst.

Die folgenden Kriterien wurden in das Statistikprogramm SPSS (SPSS für Windows Version 6.1) eingegeben und hinsichtlich ihrer Relevanz analysiert :

- Geschlecht
- Alter
- stationärer Aufenthalt (Zeit, Ort)
- Geburtsgewicht
- postkonzeptionelle Reife
- Grunderkrankung
- Beatmungsstatus
- Antibiotikatherapie (Art, Dauer)
- invasive Prozeduren
- Art der Infektion

4.3.2 Auswertung der klinischen Daten und Statistik

Die klinischen Daten wurden aus den Krankenakten erfasst, in das Statistikprogramm SPSS eingegeben und entsprechend der gewählten Kriterien ausgewertet. Für die Darstellung der Ergebnisse wurde außerdem das Microsoft Programm Excel benutzt. Statistische Signifikanzberechnungen erfolgten mittels des Chi-Quadrat-Tests nach Fisher/ Pearson. Der Nachweis der Signifikanz der Beatmungsdauer erfolgte mittels Logistischer Regression. (1) Dabei wurden p-Werte von $<0,05$ als signifikant gewertet.

(1) Für die Auswertung mittels Logistischer Regression danke ich Herrn Dr. Joachim Listing vom Fachbereich Epidemiologie des Deutschen Rheumaforschungszentrums Berlin.