

2 Einleitung

2.1 Problemstellung

Wie die Daten des Statistischen Bundesamtes zeigen, schwankte die jährliche Geburtenzahl in Deutschland im Zeitraum von 1992 bis 1996 zwischen 765000 und 809000.¹⁰⁴ Die Änderung des Personenstandsgesetzes vom 24. März 1994 führte zur Verschiebung einiger perinatologischer Eckdaten. Wurden bis zu diesem Zeitpunkt Neugeborene mit einem Gewicht von mehr als 1000g in die Personenstandsbücher aufgenommen, so lag diese Grenze ab diesem Datum bei 500g.

Nachdem über den Zeitraum von mehr als 10 Jahren bis 1994 ein kontinuierlicher Rückgang der perinatalen Mortalität verzeichnet wurde, schlug sich diese Veränderung unter anderem im Anstieg der perinatalen Mortalität im Jahre 1994 nieder, insbesondere in der Gruppe der Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 2500g. Die gesamte perinatale Mortalität stieg von 0,58% (1992) auf 0,68% (1996). Die Rate der Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500g stieg von 0,85% (1992) auf 1% (1996).¹⁰⁴

Der Anteil von Infektionen an der Gesamtmortalität wird in der Literatur zwischen 10 bis 20% angegeben.^{29, 111, 117} Tariq et al. halten 50% der perinatalen Todesfälle für nicht vermeidbar aufgrund der Schwere des Krankheitsbildes.¹²⁶

Da Infektionen einen Grund für Morbidität und Mortalität von Neugeborenen darstellen, ist es wichtig, Erkenntnisse über Besiedlungsmerkmale und prädisponierende Faktoren für Infektionen zu gewinnen. In diesem Zusammenhang rücken nosokomiale Infektionen immer mehr in den Blickpunkt der Öffentlichkeit, da sie nach Heuck et al.⁶⁴ als die in Deutschland häufigsten Infektionen bezeichnet werden. Dieser Erkenntnis trägt der § 23 Abs.1 des Infektionsschutzgesetzes von 2001 Rechnung, der Krankenhäuser verpflichtet, bestimmte nosokomiale Infektionen gezielt zu erfassen und zu bewerten.²²

2.2 Nosokomiale Infektionen bei Neugeborenen

Als nosokomiale Infektion definiert das Center for Disease Control (CDC), Atlanta (USA), alle durch Mikroorganismen hervorgerufenen Infektionen, die in kausalem

Zusammenhang mit einem Krankenhausaufenthalt stehen. Bei unbekannter Inkubationszeit gilt jede Infektion als nosokomial, wenn sie 48 Stunden nach stationärer Aufnahme auftritt. Bei neonatalen Infektionen besteht das Problem der Abgrenzung nosokomialer von konnatalen Infektionen. Man muss sich bei Anwendung der Definition des CDC Atlanta bewusst sein, dass ein Teil konnataler Infektionen einbezogen und die nosokomiale Infektionsrate überrepräsentiert ist. So treten konnatale *E.coli*- und B-Streptokokken-Infektionen häufig bis zum 5. Lebenstag auf.⁵⁵

Das Nationale Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen stellt seit 1996 eine Referenzdatenbank, das Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS), für die wichtigsten nosokomialen Infektionen in Deutschland zur Verfügung. In Anbetracht der spezifischen physiologischen Situation des Neugeborenen wurde 2000 in Zusammenarbeit mit Neonatologen ein Modul für neonatologische Patienten entwickelt, das Neo-KISS.¹⁰⁶ Dafür wurde die CDC- Definition für Kinder unter 12 Monaten im Konsens mit Epidemiologen und Klinikern modifiziert. Die Infektionsdiagnose zum Zweck der Erfassung beruht auf der Kombination von klinischen Symptomen, Labordaten und unterstützenden Daten (z.B. Röntgenuntersuchungen) in unterschiedlicher Wertigkeit. Es dürfen keine Hinweise dafür vorliegen, dass die Infektion bereits bei der Aufnahme vorhanden oder in der Inkubationsphase war. So wird eine neonatale Infektion als nosokomial angesehen, wenn Infektionszeichen nicht früher als 72 Stunden nach Geburt auftreten.^{7, 43}

Nosokomiale Infektionen bei Neugeborenen, insbesondere auf neonatologischen Intensivstationen, stehen schon lange im Mittelpunkt des Interesses und wurden aus unterschiedlichsten Gesichtspunkten untersucht.^{1, 7, 11, 32, 38, 64, 66} Die Angaben zur Häufigkeit nosokomialer Infektionen bei Neugeborenen schwanken zwischen 5,1% und 12%.^{11, 26, 29, 65, 113, 119}

Bakterielle Infektionen stellen den größten Anteil der Krankenhausinfektionen dar. Hinsichtlich der Häufigkeitsverteilungen gibt es unterschiedliche Angaben in der Literatur. Während Singh-Naz et al. 53% gramnegative und 27% grampositive Spezies als Erreger nosokomialer Infektionen beobachten¹¹⁶, beschreiben Drews et al. 51,5% grampositive und 22,7% gramnegative Bakterien als verursachendes Agens.³² Ähnliche Relationen finden Stein et al. in ihren Untersuchungen mit 42% grampositiver und 35% gramnegativer Isolate.¹¹⁹ Dagegen nehmen virale und Pilzinfektionen im Rahmen der neonatalen Intensivmedizin einen weitaus geringeren Stellenwert ein.

Der Infektionsmodus bei nosokomialen Infektionen in der Neonatalperiode umfasst einen endogenen Infektionsweg durch Bakterienstämme aus der körpereigenen Flora des Patienten und eine exogene Infektionsart durch Bakterienstämme aus der Umgebung des Patienten.⁵⁵

2.3 Prädisposition des Neu-und Frühgeborenen für Entwicklung von Infektionen

Die Abwehrschwäche des Neugeborenen wird als ein wichtiger disponierender Faktor für neonatale Infektionen angesehen.

Im Vergleich zu älteren Kindern oder Erwachsenen befindet sich das Neugeborene in einer Immunmangelsituation.¹⁵ Physiologisch verfügt das termgeborene Kind über eine normale unspezifische und spezifische Abwehr. Einige Komponenten sind aber nicht völlig ausgereift, so dass von einem funktionellen Defizit auszugehen ist.⁵⁵

Das Neugeborene ist bis zur Geburt bakteriologisch „steril“ und erlangt während der ersten Lebenswochen eine normale bakterielle Flora.^{61,127} Während dieser Zeit ist es einer Vielzahl von Bakterienspezies ausgesetzt, die in einen weitestgehend ungeschützten Organismus eindringen können.

In den ersten Lebenswochen erfolgt beim gesunden Neugeborenen die Entwicklung der zellulären und humoralen Immunität. Am ersten und fünften Lebenstag ist die Prozentzahl der T-Zellen signifikant niedriger als bei Erwachsenen, deren Spiegel sie erst am 20. Lebenstag erreicht.^{55, 62} Neonatale Lymphozyten produzieren deutlich weniger Lymphotoxin und Monozyten-Migrationshemmfaktor.

Das Neugeborene ist unfähig, eine adäquate Menge Antikörper zu produzieren. Ihm stehen diaplazentar von der Mutter übertragene Antikörper zur Verfügung. Sein Antikörperstatus reflektiert weitestgehend die Immunsituation der Mutter. Erst zwischen der 34. und 36. Schwangerschaftswoche lässt sich ein Anstieg der IgG-Konzentration nachweisen. Ein termgeborenes Kind produziert nur 18% des IgM- und 5% des IgG-Spiegels eines Erwachsenen.⁶¹

Phagozytierende Zellen von Neugeborenen haben keine normale Chemotaxis. So wurden auch bei der wichtigsten Form der unspezifischen Abwehr, der Phagozytose, Defekte bei term und präterm geborenen Kindern gefunden.⁵⁵

Weiterhin zeigten sich zu geringe Konzentrationen von spezifischen Antikörper, Komplement sowie von nichtspezifischen Opsoninen wie Fibronectin. Termgeborene Kinder erreichen nur 50-80% der Serumkomplementspiegel von Erwachsenen.

Das Frühgeborene ist noch weniger immunkompetent als das reife Neugeborene. Der Thymus ist kleiner und leichter als bei term geborenen Kindern. Die Anzahl der T-Zellen im peripheren Blut ist signifikant niedriger, ebenso der Komplement- und Gammaglobulinspiegel. Die Opsonierungsfähigkeit und die Chemotaxis sind bei den frühgeborenen und meist untergewichtigen Kindern noch deutlicher vermindert und stellen somit weitere infektionsbegünstigende Faktoren dar.

Prätermgeborene weisen oft Hypoxie, Azidose und Hyperbilirubinämie auf, die die physiologische Abwehr des Makroorganismus herabsetzen.⁵⁵

Im Rahmen der Intensivtherapie ist das Neu- bzw. Frühgeborene einer Vielzahl von invasiven Prozeduren ausgesetzt und häufig ist eine antibiotische Therapie indiziert. Eine Immunsuppression durch Anästhesie und chirurgische Intervention wird angenommen.^{75, 148} Natürliche Schutzmechanismen, wie die Ziliarfunktion der Atemwegsepithelien oder die Hautbarriere werden durch invasive Therapie- und Diagnostikverfahren (Intubation, Beatmung, parenterale Ernährung, intravasale Katheter usw.) gestört.^{55, 65}

Detailliertes Wissen über das Immunsystem des Früh- und Neugeborenen ist eine Voraussetzung für die Optimierung von Diagnostik, Überwachung und Therapie neonataler Infektionen.⁵⁵

In Kenntnis der erheblich reduzierten Infektabwehr des Früh- und Neugeborenen besteht die Prävention nosokomialer Infektionen dieser Altersgruppe vor allem in Maßnahmen zur Reduktion der Zahl und Ausbreitung von Bakterien.

2.4 *Serratia marcescens* als Erreger nosokomialer Infektionen

Auf Grund seiner roten Pigmentbildung, die besonders auf kohlenhydrathaltigen Substraten auftreten kann, ist *Serratia marcescens* seit dem Altertum bekannt und wurde mit abergläubischen Vorstellungen verbunden. Erstmals dokumentierte Pythagoras 600 v. u. Z. eine blutrote Verfärbung auf Brot.^{14, 124} 332 v. u. Z. erschienen während der Belagerung von Tyros, einer Stadt in Phönizien, blutrote Flecken auf der

Verpflegung der Soldaten Alexanders des Großen. Die Priester prophezeiten daraufhin den Sieg.^{50, 124} Im 12. Jahrhundert wurde in Dänemark eine blutrote Verfärbung von Hostien beschrieben, ebenso 1200 in Halle, 1247 in Beelitz, 1264 in Bolsena und 1330 in Güstrow.^{28, 124} 1819 wurde die Ursache dieses Phänomens von Batholomeo Bizio, einem Apotheker aus Padua, entdeckt. Zu Ehren des italienischen Physikers Serafino Serrati nannte er die Spezies *Serratia*, betrachtete sie aber als Pilz. 1848 beschrieb Christian Gottfried Ehrenberg, ein Theologe, Naturforscher und Mediziner die Ursache dieses Blutwunders und nannte den Mikroorganismus *Monas prodigiosa*.^{14, 28, 124} 1902 bezeichnete Kroft das rote Pigment, zu dessen Produktion nur einige Stämme in der Lage sind und welches für die typische Farbe der Kolonien verantwortlich ist, als Prodigiosin. 1920 wurde bei einer Taxonomierevision der Name *Serratia marcescens* (lat. marcesco: vergänglich, dahinschwindend) als verbindlich erklärt.¹²⁴

Serratia marcescens ist ein bewegliches, nicht sporenbildendes, gramnegatives Stäbchen aus der Gruppe der *Enterobacteriaceae*. *Serratia* spp. kommen ubiquitär vor und konnten in Wasser, Erde, Abwasser, Nahrungsmitteln und bei Tieren nachgewiesen werden.

Bis in die 50er Jahre wurde *Serratia marcescens* als harmloser Saprophyt angesehen und als biologischer Marker eingesetzt.¹⁴⁷ Seither wurde in der Literatur zunehmend über Infektionen durch *Serratia marcescens* berichtet.^{5, 23, 62, 77, 84, 123, 140, 147}

Inzwischen ist bekannt, dass alle Arten von Infektionen wie Infektionen der Atem- und Harnwege, der Augen, der Haut ebenso wie Sepsis und Meningitis durch diesen Erreger ausgelöst werden können. Meist handelt es sich dabei um nosokomiale Infektionen. Besonderes klinisches Interesse verdient der Erreger vor allem wegen seines epidemischen Auftretens und seines Resistenzverhaltens. *Serratia marcescens* gehört nicht zur Normalflora des Menschen und hat eine relativ niedrige Virulenz.^{14, 50, 124} Unter Virulenz versteht man die potentielle Fähigkeit „Pathogenität“ zu realisieren. Virulenzmerkmale oder Virulenzfaktoren sind die spezifischen Eigenschaften, die dem Bakterium den qualitativen Sprung vom Anheften und der Vermehrung zur Penetration und Invasion ermöglichen.¹⁴ Dazu gehören beispielsweise Fimbrien zur Adhäsion an eukaryonten Zellen⁶, Bacteriocine und IgA-Proteasen für die Kolonisierung⁶² sowie Hämolytine für die Invasion der Wirtszelle.¹⁸ Durch Siderophore und Serumresistenz werden das Überleben und die Vermehrung im Wirtsorganismus ermöglicht.^{14, 124} Diese reichen aber häufig nicht aus, die normalen Wirtsabwehrmechanismen zu umgehen. Sie benötigen zum Auslösen von Erkrankungen eine erheblich reduzierte

Abwehrsituation. Oft liegen bei den Erkrankten gravierende disponierende Faktoren vor wie Unreife, konsumierende Grundkrankheit, immunsuppressive Medikation sowie invasive Diagnostik und Therapie.^{1, 33} Aus diesen Gründen ist *Serratia marcescens* ein typischer opportunistischer Erreger. Sekundär verfügt er über eine Multiresistenz gegenüber antibakteriellen Substanzen. In den meisten Fällen ist die Erkrankung das Ergebnis des Zusammenwirkens einer Vielzahl von Faktoren mit unterschiedlicher Wertigkeit auf Seiten des Erregers und des Wirtes.

2.5 Epidemiologische Untersuchungen mittels Pulsfeldgelelektrophorese

Bis zu 50% der Krankenhausinfektionen sind vermeidbar.⁶⁴ Das setzt Kenntnisse über Infektionsquelle und Übertragungsweg voraus. Sinn und Zweck epidemiologischer Untersuchungen ist es, diese zu gewinnen und wirkungsvolle Mechanismen zur Vermeidung der Weiterverbreitung bzw. Unterbrechung der Infektketten zu erarbeiten. Unterschiedliche Typisierungsmethoden werden zur epidemiologischen Charakterisierung von Bakterienstämmen angewandt. Diese Methoden schließen die mehr traditionellen Verfahren anhand phänotypischer Charakteristika wie Resistenzphänotyp, Sero-, Bio- und Phagentypisierung als auch molekularbiologische Verfahren wie Plasmidmusterbestimmung, Restriktionsanalyse, Pulsfeldgelelektrophorese, Ribotypisierung und Multi Locus Sequence Typing ein.^{76, 100} Wichtige Kriterien solcher Methoden sind ihre Spezifität, die Reproduzierbarkeit ihrer Ergebnisse, der Kosten-, Zeit- und Apparatenaufwand und damit die Anwendbarkeit in Routinelaboren. Den meisten phänotypischen Typisierungsverfahren fehlt es in unterschiedlichem Grad an Differenzierbarkeit oder Reproduzierbarkeit und sie zeigen nur ungenügend die Unterschiede zwischen einzelnen Stämmen einer Spezies.^{101, 107} Dies führt trotz ihres technischen Aufwandes zur Bevorzugung molekularbiologischer Methoden, wobei auch hier Einschränkungen zu beachten sind. Die Typisierung anhand des Plasmidprofils ist beispielsweise nur für Isolate anwendbar, die Plasmide besitzen. Zur Typisierung von *Serratia marcescens* wurden in der Literatur die Bestimmung des Resistenzphänotyps^{16, 83, 136}, die Sero-^{3, 16, 83, 140, 141}, die Phagen-^{3, 78}, die Bio-^{34, 83} und die Bacteriocintypisierung⁷⁸, die Plasmidprofilbestimmung^{16, 115, 118}, die Restriktionsmusteranalyse der chromosomalen DNA⁸³, die Polymerasekettenreaktion

(PCR)^{20, 24, 78, 94, 98, 120}, die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)^{1, 34, 69, 88, 102, 120, 122, 138} und die Ribotypisierung^{12, 78} beschrieben.

Nach der heute allgemein akzeptierten Klonkonzeption in der Epidemiologie und klinischen Mikrobiologie sind alle Bakterienisolate einem Klon zuzuordnen, die sich unabhängig von ihrer Quelle und ihrer zeitlichen Isolierung durch den Besitz identischer phäno- und genotypischer Merkmale auszeichnen. Mitglieder eines Klons stammen von einer Zelle ab. Sie weisen Eigenschaften auf, die eine Unterscheidung von anderen Stämmen der gleichen Spezies möglich machen und für das Überleben im besonderen Milieu qualifizieren.¹⁰⁵ Diese Eigenschaften müssen sich in der genetischen Information der Spezies widerspiegeln. So erfolgt im Anschluss an die taxonomische Identifizierung eines isolierten Bakterienstamms die Analyse der genetischen Identität und damit die klonale Zuordnung. Die Pulsfeldgelelektrophorese ist eine der exaktesten und am besten diskriminierenden Methoden und somit für die klonale Analyse geeignet. Sie wurde bei einer Vielzahl von Spezies wie *Pseudomonas aeruginosa*²¹, *Enterokokken*^{30, 55}, *Acinetobacter* spp.⁴⁵, *Staphylococcus aureus*⁶⁸, *Enterobacter cloacae*¹², *Salmonella* spp.⁸⁹, *Stenotrophomonas maltophilia*¹²⁴, *Klebsiella pneumoniae*¹⁰¹ u.a. erfolgreich eingesetzt.

2.6 Methodendiskussion

Die vorliegende Arbeit umfasst eine retrospektive Untersuchung der bakteriologischen Proben von Patienten und deren Umgebung mit der Pulsfeldgelelektrophorese, um anhand ihrer molekularen Charakteristika Aussagen zur klonalen Ausbreitung treffen zu können. Wie bereits im vorherigen Abschnitt erörtert, ist sie eine exakte und gut diskriminierende Methode und wurde deshalb für die klonale Analyse gewählt.

Außerdem erfolgte eine retrospektive Aufarbeitung der klinischen und epidemiologischen Daten zur Beschreibung des klinischen Verlaufs. Hier zeigte sich in der teilweise unzureichenden und nicht standardisierten Dokumentation bestimmter Therapien und Diagnostikverfahren in der Patientenakte ein Nachteil der retrospektiven Analyse.