

**Mechanismen, durch die *Klebsiella pneumoniae*
zum Erreger nicht beherrschbarer
nosokomialer Infektionen werden kann**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Sonja Burak

aus

Wipperfürth

Bonn 2007

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Bernd Wiedemann

2. Referent: Prof. Dr. Hans-Georg Sahl

Tag der Promotion: 24.05.2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2008

C'est les microbes qui auront le dernier mot.

Louis Pasteur

meinem Bruder Roman

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
1.2	Bedeutung von <i>K. pneumoniae</i> als Erreger nosokomialer Infektionen.....	3
1.3	Antibiotika-Resistenz bei <i>K. pneumoniae</i>	5
1.3.1	Natürliche Resistenz.....	5
1.3.2	Durch Mutationen erworbene Resistenz.....	6
1.3.2.1	Verlust von Porinen der äußeren Membran.....	6
1.3.2.2	Überexpression von Effluxpumpen.....	8
1.3.2.3	Modifikationen der Typ-II-Topoisomerasen.....	9
1.3.2.4	Mutationen der chromosomalen β -Laktamase.....	9
1.3.3	Resistenz durch erworbene Resistenzgene.....	10
1.3.3.1	Erworbene β -Laktamasen.....	10
1.3.3.2	Aminoglykosid-modifizierende Enzyme.....	13
1.3.3.3	Tetracyclin-Resistenzgene.....	13
1.3.3.4	Sonstige Resistenzdeterminanten.....	14
1.3.3.5	Lokalisation und Verbreitung erworbener Resistenzgene bei <i>K. pneumoniae</i>	15
1.4	Aktuelle Resistenzsituation bei <i>K. pneumoniae</i>	17
1.4.1	Multiresistenz.....	17
1.4.2	Panresistenz.....	20
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	20
2	Material und Methoden	22
2.1	Material.....	22
2.1.1	Bakterienstämme.....	22
2.1.1.1	Klinische <i>K. pneumoniae</i> -Stämme.....	22
2.1.1.2	Labor-, Referenz- und Donorstämme.....	24
2.1.1.3	Transkonjuganten.....	26
2.1.2	Patienten.....	27
2.1.3	Antibiotika.....	28
2.1.4	Enzyme.....	28
2.1.5	Chemikalien und sonstige Materialien.....	29
2.1.6	Lösungen und Puffer.....	30
2.1.7	Nährmedien.....	32
2.1.8	Oligonukleotide.....	33
2.1.9	Geräte.....	36
2.2	Epidemiologische Methoden.....	37
2.2.1	Datenerhebung.....	37
2.2.2	Stuhlproben.....	38
2.3	Mikrobiologische Methoden.....	39
2.3.1	Identifizierung mit Micronaut E.....	39
2.3.2	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration.....	39
2.3.3	Keimzahlbestimmung.....	40
2.3.4	Wachstumskinetiken zur Bestimmung der Generationszeit.....	40
2.3.5	Bestimmung der Mutationsfrequenz.....	41
2.3.6	Effluxpumpen-Inhibitionstest.....	42
2.3.7	Untersuchung von Stuhlproben.....	42

2.3.7.1	Probenentnahme	42
2.3.7.2	Aufbereitung und Untersuchung der Stuhlproben	42
2.3.7.2.1	Bestimmung der Gesamtkeimzahl der <i>Enterobacteriaceae</i> in den Stuhlproben	42
2.3.7.2.2	Bestimmung der Keimzahl resistenter <i>K. pneumoniae</i> in den Stuhlproben	43
2.3.7.2.3	Anreicherungskulturen	43
2.3.7.2.4	Isolierung der Stämme	43
2.4	Proteinbiochemische Methoden	43
2.4.1	Präparation von Membranproteinen der äußeren Membran	43
2.4.2	Präparation von β -Laktamase-Rohextrakten	44
2.4.3	Photometrische Bestimmung der spezifischen β -Laktamase-Aktivität	45
2.4.4	Proteinbestimmung nach LOWRY	46
2.4.5	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	46
2.4.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
2.4.5.2	Analytische isoelektrische Fokussierung (IEF)	48
2.4.5.3	Coomassie-Färbung von Proteingelen	49
2.4.5.4	Nitrocefin-Färbung von β -Laktamase-Gelen	49
2.5	Molekularbiologische Methoden	50
2.5.1	Präparation von Plasmid-DNA	50
2.5.1.1	Plasmid-Präparation nach MANIATIS	50
2.5.1.2	Kalium-Acetat-Plasmidpräparation nach TIETZE	50
2.5.2	Extraktion von genomischer DNA (DNeasy Tissue Kit TM)	51
2.5.3	Aufkoch-Präparation von Gesamt-DNA	52
2.5.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	52
2.5.4.1	Screening nach erworbenen Resistenzmechanismen	55
2.5.4.2	Nachweis von Klasse-1- und Klasse-2-Integrans	55
2.5.4.3	Nachweis von durch Mutation erworbenen Resistenzmechanismen	55
2.5.4.3.1	Modifikationen der TypII-Topoisomerasen	55
2.5.4.3.2	Modifikationen der Porine	56
2.5.4.3.3	Überexpression von Effluxpumpen	56
2.5.5	Agarose-Gelelektrophorese	56
2.5.6	Aufreinigung von PCR-Fragmenten (MinElute PCR Purification Kit TM)	57
2.5.7	Sequenzierung von DNA-Fragmenten	57
2.5.8	Restriktionsverdau von DNA	57
2.5.9	Übertragung von Resistenzgenen mittels Konjugation	57
2.5.10	Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	58
3	Ergebnisse	62
3.1	Patientendaten	62
3.1.1	Auswertung der erfassten Datensätze	62
3.1.2	Korrelation von Liegezeiten und <i>K. pneumoniae</i> -Kolonisation	63
3.1.3	Auswertung der Patientendaten des zweiten Ausbruchs	66
3.1.3.1	Patienten, Beatmung, Erkrankungen	66
3.1.3.2	Kolonisation mit <i>K. pneumoniae</i>	66
3.1.3.3	Therapie, Eradikation der Klebsiellen	66
3.2	Untersuchung von Stuhlproben	73
3.2.1	Stuhlproben der Patienten	73
3.2.2	Stuhlproben des Personals	74
3.3	Epidemiologie der <i>K. pneumoniae</i> -Stämme	75

3.3.1	Identifizierung	75
3.3.2	Typisierung mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese	75
3.3.3	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK).....	80
3.3.4	Korrelation von PFGE- und Resistenzmuster	80
3.4	Untersuchung der Resistenzmechanismen ausgewählter Stämme	83
3.4.1	Stammauswahl	83
3.4.2	Analyse der durch Mutationen vermittelten Resistenz.....	85
3.4.2.1	Expression der Porine der äußeren Membran.....	85
3.4.2.1.1	SDS-PAGE der Porin-Präparationen.....	85
3.4.2.1.2	Amplifikation und Sequenzierung der Porin-Gene	87
3.4.2.2	Überexpression von Effluxpumpen	90
3.4.2.2.1	Effluxpumpen-Inhibitionstest.....	90
3.4.2.2.2	Analyse von Mutationen im Repressor AcrR.....	92
3.4.2.3	Modifikationen der Typ-II-Topoisomerasen	92
3.4.3	Analyse der durch erworbene Resistenzgene vermittelten Resistenz.....	93
3.4.3.1	β -Laktam-Resistenz.....	93
3.4.3.2	PCR-Screening nach erworbenen Resistenzgenen	97
3.4.4	Lokalisation der erworbenen Resistenzgene	98
3.4.4.1	Plasmide	98
3.4.4.2	Integrone.....	99
3.4.4.3	Konjugation.....	100
3.4.5	Bestimmung der Mutationsfrequenzen.....	104
3.4.6	Bestimmung der Generationszeit	105
3.5	Entstehung eines panresistenten Stammes aus Klon I	106
3.5.1	Konjugationen mit CTX-M-tragenden Donorstämmen	106
3.5.2	Konjugationen mit AmpC-tragenden Donorstämmen.....	106
3.5.3	Charakterisierung ausgewählter Transkonjuganten.....	107
3.5.3.1	MHK-Werte und erworbene Resistenzgene	107
3.5.3.2	β -Laktamase-Expression	108
3.5.3.3	Porin-Expression	109
3.5.3.4	Generationszeit.....	111
4	Diskussion	113
4.1	Multiresistenz: Zusammenwirken von Resistenzmechanismen.....	113
4.2	Erwerb von Panresistenz: Eine zukünftige Bedrohung.....	123
4.3	Übertragungswege: Kolonisation von Patienten und Umgebung	125
4.4	Antibiotika-Therapie: Eradikation oder Selektion?	129
4.5	Schlussfolgerungen.....	135
5	Zusammenfassung.....	139
6	Literaturverzeichnis.....	140
7	Anhang	153
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	153
7.2	Verzeichnis der Kurzzeichen für Antibiotika	156
7.3	Aminosäure-Sequenz-Alignment des Porins OmpK36	157
7.4	Aminosäure-Sequenz-Alignment des Porins OmpK35	158
7.5	Aminosäure-Sequenz-Alignment des Repressors AcrR	159
7.6	PFGE-Fragmentmuster der untersuchten <i>K.-pneumoniae</i> -Isolate	160
7.7	Datentabellen ausgewählter Patienten des zweiten Ausbruchs.....	164

1 Einleitung

Nosokomiale Infektionen stellen eine Bedrohung dar, seit Patienten in Krankenhäusern behandelt werden. Im Jahre 1847 erkannte der Gynäkologe Ignaz Semmelweis erstmals einen Zusammenhang zwischen mangelnder Hygiene und dem Auftreten von Kindbettfieber. Durch Einführung der Händedesinfektion konnte er die Sterblichkeitsrate in einer Geburtshilfeklinik erheblich senken. Mit der Entwicklung der modernen Medizin haben nosokomiale Infektionen in den letzten Jahrzehnten jedoch neue Bedeutung erlangen können. Grund ist die häufige Anwendung invasiver diagnostischer und therapeutischer Behandlungen sowie die zunehmende Zahl älterer und immunsupprimierter Patienten.

Unter nosokomialen Infektionen versteht man heute alle Infektionen, die im Zusammenhang mit einer stationären oder ambulanten medizinischen Maßnahme stehen und bei Aufnahme in die Klinik weder vorhanden noch in der Inkubationsphase waren (GEFFERS et al., 2002). Man unterscheidet exogene und endogene Krankenhausinfektionen. Die Erreger exogener Infektionen werden aus der Umwelt des Patienten aufgenommen, beispielsweise über die Hände des Pflegepersonals oder über kontaminierte Gegenstände. Häufiger sind endogene Infektionen, welche durch die patienteneigene Flora verursacht werden und deren Erreger entweder zur normalen Flora des Patienten gehören (primär endogen) oder aus der klinikeigenen Flora stammen und den Patienten im Laufe seines Aufenthaltes besiedeln (sekundär endogen).

Auf Intensivpflegestationen treten nosokomiale Infektionen mit einer Prävalenz von 15,3% bis 20,6% erheblich häufiger auf als auf Allgemeinstationen (1,5% - 3,8%) (GEFFERS et al., 2002; VINCENT et al, 1995). Grund sind die schweren, oftmals immunschwächenden Erkrankungen der Intensivpatienten, sowie die Anwendung invasiver Maßnahmen wie maschinelle Beatmung, Katheterisierung und chirurgische Interventionen. Durch den höheren Pflegeaufwand entsteht zudem ein intensiver Kontakt zwischen Patient und Personal, was die Übertragung von Infektionserregern begünstigt.

Die häufigsten nosokomialen Infektionen auf Intensivstationen sind Pneumonien (46,9%), Harnwegsinfektionen (17,6%) und Sepsen (12%) (PANKNIN et al., 2001), wobei die meisten dieser Infektionen mit der Verwendung sogenannter Devices (maschinelle Beatmung, Gefäßkatheter, Harnwegskatheter) assoziiert sind (STEINBRECHER et al., 2000). Die Letalität nosokomialer Infektionen beträgt bei Intensivpatienten 14,9% (VINCENT et al., 1995).

Durch das Auftreten resistenter und multiresistenter Erreger wird die Bekämpfung solcher Infektionen zunehmend erschwert, da dem behandelnden Arzt oft nur wenige Therapie-

optionen verbleiben. Der hohe Verbrauch von Breitspektrum-Antibiotika auf Intensivstationen begünstigt wiederum die Selektion resistenter Stämme (CRISTINO, 1999).

Neben den unmittelbaren Folgen für die Betroffenen sind nosokomiale Infektionen aufgrund der längeren Verweildauer der Patienten in der Klinik sowie der erschwerten Therapie mit erheblichen Kosten für das Gesundheitssystem verbunden. Ziel muss daher die Vermeidung von Infektionen durch Prävention und Überwachung (Surveillance) sein. Endogene Infektionen lassen sich nur teilweise vermeiden. Nach einer Studie von BÄRWOLFF et al. (2005) waren jedoch bis zu 21,6% der nosokomialen Infektionen auf deutschen Intensivstationen transmissionsassoziiert, entstanden also durch Übertragung der Erreger zwischen Patienten oder aus deren Umgebung und stellen somit den vermeidbaren Anteil dar.

Das Auftreten sogenannter Ausbrüche stellt im Kampf gegen nosokomiale Infektionen ein zusätzliches Hygieneproblem dar. Im Verlauf eines solchen Ausbruches können viele Patienten einer Station oder auch mehrerer Stationen einer Klinik mit einem bestimmten Bakterienstamm infiziert werden. Nosokomiale Ausbrüche können sowohl durch die Verbreitung eines oder mehrerer epidemischer Stämme als auch durch die Ausbreitung von Resistenzplasmiden auf verschiedene Stämme und Spezies entstehen (PRODINGER et al., 1996).

Auch wenn nur etwa 2% bis 10% aller nosokomialen Infektionen durch Ausbrüche hervorgerufen werden (GEFFERS et al., 2002), so steigt die Zahl der Berichte über solche "Outbreaks" doch ständig an. In den Jahren 1966 bis 2006 wurden insgesamt 53 Ausbrüche mit bakteriellen Erregern aus Deutschland publiziert, der überwiegende Teil in den letzten zehn Jahren (www.outbreak-database.com). Ein typischer Erreger nosokomialer Ausbrüche ist *Klebsiella pneumoniae*, einer der Hauptverursacher der beatmungsassoziierten Pneumonie, welche die häufigste nosokomiale Infektion auf Intensivstationen darstellt (STEINBRECHER et al., 2000).

1.1 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae ist ein gramnegatives, stäbchenförmiges, unbewegliches, fakultativ anaerobes Bakterium aus der Familie der *Enterobacteriaceae*, welche zu den γ -Proteobakterien gehört. Erstmals wurde diese Art im Jahre 1882 von FRIEDLÄNDER aus der Lunge eines an Pneumonie verstorbenen Patienten isoliert. TREVISAN (1885) bezeichnete die Gattung zu Ehren des deutschen Mikrobiologen Edwin Klebs als "Klebsiella".



Abb. 1.1: *Klebsiella pneumoniae*

Im Gegensatz zu den meisten anderen Darmbakterien ist *K. pneumoniae* in der Lage, molekularen Stickstoff zu fixieren. Man findet diese ubiquitäre Spezies zum einen in der Umwelt, wo sie Böden, Oberflächengewässer, Abwässer und Pflanzenoberflächen besiedelt, zum anderen als Saprophyt auf den Schleimhäuten verschiedener Säugetiere. Eine transiente Besiedelung der menschlichen Schleimhäute und des Gastrointestinaltraktes ist nicht ungewöhnlich. Während die Trägerraten bei gesunden Menschen je nach Studie 5% bis 38% im Stuhl sowie 1% bis 6% im Nasopharynx betragen, werden in Krankenhäusern durchschnittliche Kolonisationsraten von 77% im Stuhl, 19% im Rachen und 42% auf den Händen der Patienten ermittelt. Die Kolonisationsrate steigt mit der Länge des Klinikaufenthaltes. Auch bei Klinikpersonal wurden erhöhte Trägerraten festgestellt (als Übersicht in PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

Als einziges Mitglied der *Enterobacteriaceae* produziert *K. pneumoniae* große Mengen von Kapselpolysacchariden. Diese Kapsel stellt den wichtigsten Pathogenitätsfaktor der Spezies dar, denn sie schützt die Zellen vor Phagozytose (KABHA et al., 1995), vor dem Komplementsystem der menschlichen Immunabwehr (ALVAREZ et al., 2000) und vor antimikrobiellen Peptiden der angeborenen Immunantwort (CAMPOS et al., 2004).

1.2 Bedeutung von *K. pneumoniae* als Erreger nosokomialer Infektionen

K. pneumoniae gehört zu den wichtigsten Erregern nosokomialer Infektionen und verursacht in erster Linie Pneumonien und Harnwegsinfektionen, seltener Sepsen und Wundinfektionen. Prinzipiell besitzen Stämme aus Umwelt-Habitaten die gleiche Virulenz und das gleiche Potential zur Adhäsion an menschliche Epithelzellen wie klinische Isolate (PODSCHUN et al., 2001; STRUVE & KROGFELT, 2004). Im ambulanten Bereich tritt *K. pneumoniae* als häufigster gramnegativer Pneumonie-Erreger bei abwehrgeschwächten Personen wie beispielsweise Alkoholikern auf (CARPENTER, 1990). Da es sich jedoch um einen opportunistischen Krankheitserreger handelt, der nur bei verminderter Immunabwehr Infektionen hervorruft, sind in erster Linie immunsupprimierte und neutropenische Klinikpatienten der Intensivmedizin gefährdet. Nach den Daten des Krankenhaus-Infektions-Surveillance-Systems (KISS; GEFFERS et al., 2004) ruft *K. pneumoniae* auf deutschen Intensivstationen als sechsthäufigster Erreger 9,1% aller nosokomialen Infektionen hervor und steht bei der beatmungsassoziierten Pneumonie mit 12,4% der Infektionen nach *S. aureus* und *P. aeruginosa* an dritter Stelle.

Die Fähigkeit von *Klebsiella* spp. zur schnellen Ausbreitung (KÜHN et al., 1993) führt häufig zu nosokomialen Ausbrüchen. Das wichtigste Reservoir für Ausbruchsstämme ist der Gastrointestinaltrakt hospitalisierter Patienten (DE CHAMPS et al., 1989), wo die Selektion multi-

resistenter Erreger durch intensive Antibiotika-Therapie stattfinden kann. Durch ihre Adhäsionsfähigkeit an intestinale Epithelzellen sind *K.-pneumoniae*-Stämme zudem in der Lage, den menschlichen Darm auch nach Beendigung des Antibiotika-Selektionsdruckes für längere Zeit zu kolonisieren (DI MARTINO et al., 1997). Auf diese Weise können sie in der Mikrobenflora der Klinik persistieren und nosokomiale Ausbrüche verursachen. Die Übertragung der Erreger von Patient zu Patient kann durch Kontakt mit Ausscheidungen (Stuhl, Urin, Atemwegssekrete) kolonisierter Patienten erfolgen, beispielsweise über nicht oder nicht ausreichend desinfizierte Hände des Pflegepersonals (EISEN et al., 1995; SOULIER et al., 1995) sowie über kontaminierte medizinische Geräte. Multiresistente *K. pneumoniae* wurden im Rahmen von Ausbrüchen unter anderem in Bronchoskopen (CETRE et al., 2005), Ultraschallgelen (GAILLOT et al., 1998), Patientenakten (PANHOTRA et al., 2005), Infusionslösungen (MOODLEY et al., 2005) und Spülbecken (SU et al., 2000) gefunden.

Die Besiedelung vieler Patienten durch einen Ausbruchsstamm stellt nicht nur ein großes hygienisches Problem dar. Sie bedeutet auch eine Bedrohung für jeden einzelnen Patienten, denn es wird angenommen, dass die intestinale Besiedelung mit *K. pneumoniae* einen wichtigen Schritt in der Ausprägung einer nosokomialen Klebsiellen-Infektion darstellt (DI MARTINO et al., 1997).

Zu ersten nosokomialen Ausbrüchen multiresistenter *K.-pneumoniae*-Stämme kam es bereits in den 1970er Jahren (CURIE et al., 1978; SADOWSKI et al., 1979; MARKOWITZ, 1980). Die Resistenz dieser Stämme gegen Aminoglykoside und Cephalosporine der Gruppen 1 und 2 stellte ein großes therapeutisches Problem dar, das erst durch die Einführung neuerer Cephalosporine der Gruppe 3 Anfang der 1980er Jahre erfolgreich bekämpft werden konnte. In den letzten zehn Jahren kommt es jedoch durch den Erwerb von Resistenzen gegen Cephalosporine der Gruppe 3, Fluorchinolone und weitere Antibiotika-Klassen zu neuen therapeutischen Problemen durch Ausbrüche multiresistenter *K.-pneumoniae*-Stämme (PRODINGER et al., 1996; PENA et al., 1998; QUALE et al., 2002; GRUTEKE et al., 2003). Innerhalb solcher Ausbrüche kann die Letalität bis zu 62% betragen (SILVA et al., 2001). Das häufige Auftreten sogenannter ESBLs (extended-spectrum β -lactamases, siehe 1.3.3.1) bei *K. pneumoniae* erschwert die Therapie nosokomialer Infektionen in besonderem Maße.

1.3 Antibiotika-Resistenz bei *K. pneumoniae*

Als klinisch resistent bezeichnet man Mikroorganismen, die sich bei therapeutisch relevanten Konzentrationen eines Antibiotikums vermehren können, so dass es mit hoher Wahrscheinlichkeit zum Therapieversagen kommt. Bei klinisch intermediären Stämmen ist der therapeutische Effekt des Antibiotikums nicht gesichert, während Infektionen durch empfindliche Stämme mit dem jeweiligen Antibiotikum in der üblichen Dosierung behandelt werden können. Die Empfindlichkeit eines Erregers wird durch die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) ermittelt, wobei die klinische Beurteilung als *resistent*, *intermediär* oder *sensibel* anhand festgelegter Grenzwerte erfolgt (beispielsweise nach DIN-Norm 58940). Grundsätzlich können drei verschiedene Resistenzmechanismen unterschieden werden:

1. Veränderung der für die Wirkung des Antibiotikums verantwortlichen Zielstruktur
2. Verhinderung des Zugangs der Substanz zur Zielstruktur
3. Enzymatische Inaktivierung des Antibiotikums

Weiterhin unterscheidet man bei einer Bakterienspezies zwischen natürlicher Resistenz, die eine artspezifische Eigenschaft darstellt, sowie erworbener Resistenz, welche entweder durch Mutation zelleigener Gene oder durch Aufnahme zusätzlicher Resistenzgene entstehen kann.

1.3.1 Natürliche Resistenz

K. pneumoniae besitzt eine natürliche Resistenz gegen einige β -Laktam-Antibiotika, welche die bakterielle Zellwandbiosynthese durch irreversible Hemmung der beteiligten Enzyme inhibieren. β -Laktamasen stellen den wichtigsten und häufigsten Resistenzmechanismus gegenüber β -Laktamen dar (LIVERMORE, 1995). Ihr Wirkmechanismus beruht auf der hydrolytischen Spaltung des β -Laktam-Ringes, so dass die β -Laktame inaktiviert werden, bevor sie ihre Zielstrukturen, die Penicillin-Binde-Proteine der Zellwand, erreichen können. Diese Hydrolyse erfolgt bei den meisten β -Laktamasen über einen Serin-Rest im aktiven Zentrum, während sie bei der Gruppe der Metallo- β -Laktamasen unter Beteiligung bivalenter Kationen (Zn^{2+}) katalysiert wird.

K. pneumoniae besitzt eine chromosomal kodierte, artspezifische Klasse-A- β -Laktamase. Sie wird konstitutiv exprimiert und ist für die natürliche Resistenz dieser Spezies gegenüber Penicillinen und in geringerem Umfang auch gegenüber älteren Breitspektrum-Cephalosporinen der Gruppen 1 und 2 verantwortlich. Dieses Enzym wird als Vorläufer der plasmidkodierten SHV-1-Enzyme angesehen (HAEGGMAN et al., 1997). Man teilt die chromosomalen β -Laktamasen von *K. pneumoniae* heute in drei Familien ein, die mit der Einteilung der Spezies in die

drei phylogenetischen Gruppen KpI, KpII und KpIII korrelieren. Am häufigsten kommen Enzyme vom SHV-1-Typ vor, seltener die Varianten OKP oder LEN. Alle drei Gruppen besitzen ein ähnliches Substratspektrum (CHAVES et al., 2001; HAEGGMAN et al., 2004).

Des Weiteren besitzt *K. pneumoniae* wie die meisten gramnegativen Bakterien eine natürliche Resistenz gegenüber Glykopeptiden, Makroliden, Lincosamiden und Linezolid. Diese Substanzen werden dementsprechend nicht gegen Infektionen mit Klebsiellen eingesetzt (MUTSCHLER, 2001).

Neben den beschriebenen natürlichen Resistenzen treten bei klinischen *K.-pneumoniae*-Isolaten häufig erworbene Resistenzen oder Multiresistenzen gegenüber Breitspektrum-Cephalosporinen, Aminoglykosiden, Fluorchinolonen, Tetracyclinen, Antifolaten und Chloramphenicol auf. Sie werden durch Mutationen, durch erworbene Resistenzgene oder durch das Zusammenspiel beider Mechanismen hervorgerufen.

1.3.2 Durch Mutationen erworbene Resistenz

Zu den durch Mutation erworbenen Resistenzmechanismen gehören bei *K. pneumoniae* der Verlust von Porinen der äußeren Membran, die Überexpression chromosomaler Effluxsysteme und die Modifikation der Typ-II-Topoisomerasen. Während der letztgenannte Mechanismus nur Resistenz gegenüber Chinolonen vermittelt, führen Porinverlust und Effluxpumpen-Überexpression zu verminderter Empfindlichkeit oder Resistenz gegenüber einer Reihe verschiedener Antibiotika-Klassen.

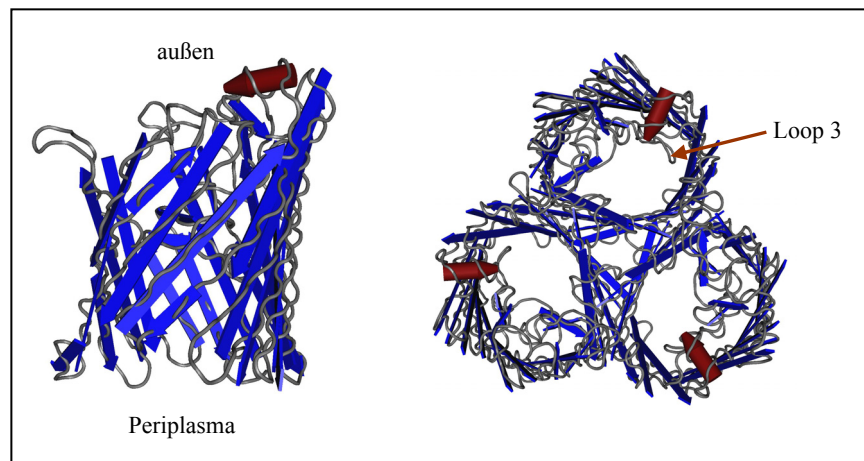
1.3.2.1 Verlust von Porinen der äußeren Membran

Porine sind wassergefüllte Kanäle in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, welche den unspezifischen, passiven Einstrom verschiedener Substanzen wie Nährstoffe oder Antibiotika ins Periplasma ermöglichen. Die beiden Hauptporine von *K. pneumoniae* sind OmpK35 und OmpK36 (ALBERTI et al., 1995; HERNANDEZ-ALLES et al., 1995). Ein drittes Porin, OmpK37, bildet eine engere Pore und wird unter normalen Bedingungen nicht exprimiert und daher als "quiescent porin" bezeichnet (DOMENECH-SANCHEZ et al., 1999).

Die Porine OmpK35 und OmpK36 bilden hydrophile Tunnel, welche die äußere Membran durchspannen. Ein solcher Tunnel besteht aus 16 antiparallelen β -Faltblättern, die durch kurze periplasmatische Windungen und längere extrazelluläre Schleifen (Loop 1 bis Loop 8) miteinander verbunden sind. Loop 3 ist in die Pore gefaltet und bildet etwa in der Mitte des Tunnels eine Einschnürung, die den Porendurchmesser bestimmt (DUTZLER et al., 1999). In der Membran lagern sich die Porinmoleküle als Homotrimer zusammen (Abbildung 1.2).

OmpK35 und OmpK36 sind homolog zu den Hauptporinen OmpF und OmpC von *E. coli* (DOMENECH-SANCHEZ et al., 1999). Der Durchmesser beider Poren ist nahezu identisch. Da OmpK36 jedoch aufgrund einer veränderten Ladungsverteilung und einer elektronegativeren periplasmatischen Austrittsseite eine höhere Kationenselektivität besitzt, stellt dieses Porin die selektivere Pore mit einem langsameren Solvedurchfluss dar (DUTZLER et al., 1999).

Abb. 1.2: Dreidimensionale Struktur des Porins OmpK36 von *K. pneumoniae*. Links: Monomer; rechts: Zusammenlagerung zum Homotrimer mit Blick von der Außenseite der äußeren Membran (DUTZLER et al., 1999)



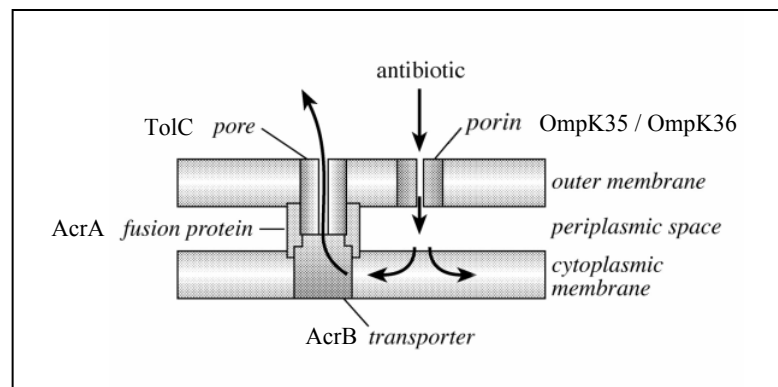
Klinische *K.-pneumoniae*-Isolate ohne ESBL exprimieren in der Regel die beiden Porine OmpK35 und OmpK36, während bei den meisten ESBL-produzierenden Stämmen die Expression von OmpK35 nicht nachweisbar oder stark reduziert ist (HERNANDEZ-ALLES et al., 1999b). Auch das Fehlen beider Porine wurde bei ESBL-Produzenten beschrieben (MARTINEZ-MARTINEZ et al., 2002).

Ein Verlust oder eine verminderte Expression eines oder beider Porine führt zu einem herabgesetzten Einstrom bestimmter Antibiotika in die Zelle. Dies betrifft vor allem Penicilline und Cephalosporine, in geringem Maße auch Fluorchinolone (MARTINEZ-MARTINEZ et al., 1996), Tetracycline und Chloramphenicol (DOMENECH-SANCHEZ et al., 2003). Während der Porinverlust allein lediglich eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber diesen Substanzen bewirkt, kommt es im Zusammenspiel mit weiteren erworbenen Resistenzmechanismen zu klinischen Resistenzen oder zu einer weiteren Erhöhung des vorhandenen Resistenzniveaus (HERNANDEZ-ALLES et al., 2000). Der Verlust eines Porins kann beispielsweise zusammen mit der Aktivität einer ESBL zu Cefoxitin-Resistenz führen (ARDANUY et al., 1998), während ESBLs allein nicht in der Lage sind, klinische Resistenz gegenüber Cefoxitin zu vermitteln (BRADFORD, 2001). Der Verlust beider Porine führt bereits ohne Expression einer β -Laktamase zu Cefoxitin-Resistenz (JACOBY et al., 2004).

1.3.2.2 Überexpression von Effluxpumpen

Die Überexpression chromosomal kodierter Breitspektrum-Effluxsysteme bewirkt bei *K. pneumoniae* eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen, strukturell nicht verwandten Antibiotika-Klassen und spielt daher eine wichtige Rolle in der Ausprägung eines multiresistenten Phänotyps. Das wichtigste Effluxsystem dieser Spezies, die Breitspektrum-Pumpe AcrAB-TolC, pumpt Fluorchinolone, Tetracycline, Chloramphenicol und weitere Substanzen unter Ausnutzung des Protonengradienten aktiv aus der Zelle (MAZZARIOL et al., 2002; HASDEMIR et al., 2004). Das AcrAB-TolC-System besteht aus drei Komponenten, die den Transport der Substrate durch das doppelte Membransystem gramnegativer Bakterien ermöglichen (als Übersicht in NIKAIDO, 1996). Die Effluxpumpe AcrB, die zur Resistance-Nodulation-Division (RND)-Familie gehört, ist in der Cytoplasmamembran lokalisiert. TolC bildet einen passiven Kanal durch die äußere Membran, während das Membranfusionsprotein AcrA beide Komponenten miteinander verbindet (Abbildung 1.3).

Abb. 1.3: Schema der Effluxpumpe AcrAB-TolC. Passiv durch die Porine eingeströmte Antibiotika werden aktiv aus der Zelle gepumpt (nach VAN BAMBEKE et al., 2003)



Die Regulation dieses Effluxsystems erfolgt sowohl durch den lokalen Repressor AcrR als auch durch globale Regulatoren (als Übersicht in GRKOVIC et al., 2002). AcrR bildet mit den Strukturgenen AcrA und AcrB ein Operon, welches unter der Kontrolle einer gemeinsamen Operatorregion liegt. An diese Region bindet AcrR über ein Helix-Turn-Helix-Motiv als Homodimer und inhibiert dadurch sowohl die eigene Expression als auch die Synthese von AcrAB. Mutationen in *acrR* können zu einem inaktiven Repressorprotein und somit zur Überexpression des Effluxsystems führen (SCHNEIDERS et al., 2003). Des Weiteren können auch die globalen Regulatoren SoxS, RobA, MarA und RamA eine Überexpression von AcrAB bewirken (GRKOVIC et al., 2002; RUZIN et al., 2005), welche ihrerseits durch Mutation oder als Reaktion auf bestimmte toxische Substanzen überexprimiert werden.

Die Überexpression von Effluxpumpen vermittelt meist nur eine geringe oder moderate Erhöhung der MHK verschiedener Antibiotika, so dass sie als alleiniger Mechanismus keine klini-

sche Relevanz besitzt. Ihre Bedeutung liegt jedoch in der Erhöhung eines bestehenden Resistenzniveaus im Zusammenspiel mit weiteren Resistenzdeterminanten sowie in der Verminderung der Empfindlichkeit gegenüber einem bestimmten Antibiotikum und damit der Erleichterung des Erwerbs weiterer Resistenzmechanismen.

1.3.2.3 Modifikationen der Typ-II-Topoisomerasen

Zielstrukturen der Chinolone sind zwei verschiedene bakterielle Typ-II-Topoisomerasen. Die DNA-Gyrase führt negative Überspiralisierungen in die DNA ein, während die Topoisomerase IV die Dekatenierung replizierter Tochterchromosomen katalysiert. Chinolone binden an den Komplex aus Enzym und gebundener DNA und bilden mit diesen Molekülen einen stabilen ternären Komplex, so dass keine weitere Transkription oder Replikation der DNA stattfinden kann.

Der wichtigste Resistenzmechanismus von *K. pneumoniae* gegenüber Chinolonen sind Veränderungen in deren Zielstrukturen. Wie bei anderen gramnegativen Bakterien ist auch bei *K. pneumoniae* die DNA-Gyrase das primäre Target der Chinolone, während die Topoisomerase IV ein sekundäres Ziel darstellt (DEGUCHI et al., 1997). Die Gene *gyrA* und *gyrB* kodieren für die beiden Gyrase-Untereinheiten, die Gene *parC* und *parE* für die Untereinheiten der Topoisomerase IV. Relevante Mutationen, die durch einzelne Aminosäure-Austausche zu Chinolon-Resistenz führen, sind meist in der sogenannten QRDR (quinolone resistance determining region) von *gyrA* und *parC* lokalisiert und resultieren in einer reduzierten Affinität der Chinolone zu ihrem Target (HEISIG, 1996). Mutationen in *gyrA* betreffen bei *K. pneumoniae* die Codons Ser83 und Asp87, Mutationen in *parC* die Codons Ser80 und Glu84. Die Chinolon-Resistenz erhöht sich schrittweise mit der Anzahl der erworbenen Punktmutationen. Für das Erreichen hoher Fluorchinolon-Resistenz sind bei *K. pneumoniae* sowohl zwei Mutationen in *gyrA* als auch mindestens eine zusätzliche Mutation in *parC* erforderlich (DEGUCHI et al., 1997).

1.3.2.4 Mutationen der chromosomalen β -Laktamase

Resistenz gegenüber Breitspektrum- β -Laktamen wird bei *K. pneumoniae* in der Regel durch erworbene, plasmidkodierte β -Laktamasen vermittelt. Vereinzelt wird jedoch auch über Mutationen in der chromosomalen β -Laktamase berichtet, welche das Substratspektrum dieses Enzyms erweitern. RICE et al (2000) konnten zeigen, dass es durch eine Promotormutation im chromosomalen *bla_{SHV-1}*-Gen zu einer 200-fachen Überexpression dieser β -Laktamase kom-

men kann, was zusammen mit einer verminderten Porinexpression zu Resistenz gegenüber Ceftazidim und Piperacillin-Tazobactam führt.

Des Weiteren kann es auch bei der chromosomalen SHV-1 zu ESBL-Mutationen kommen, welche das Substratspektrum erweitern (siehe 1.3.3.1). POIREL et al. (2003) identifizierten die Mutation Ala146Val im chromosomalen *bla*_{SHV}-Gen eines klinischen *K. pneumoniae*-Isolats. Die resultierende SHV-38- β -Laktamase vermittelte unter anderem Resistenz gegen Piperacillin-Tazobactam sowie reduzierte Empfindlichkeit gegenüber einigen Breitspektrum-Cephalosporinen, Aztreonam und Imipenem.

1.3.3 Resistenz durch erworbene Resistenzgene

Resistenzgene können über verschiedene mobile Elemente in die bakterielle Zelle gelangen (siehe 1.3.3.5). Bei *K. pneumoniae* sind sowohl erworbene β -Laktamasen als auch Aminoglykosid-, Tetracyclin- und Antifolat-Resistenz vermittelnde Enzyme von großer Bedeutung.

1.3.3.1 Erworbene β -Laktamasen

β -Laktamasen stellen eine große und sehr heterogene Enzymgruppe dar. Im Jahre 2001 waren bereits über 340 verschiedene β -Laktamasen aus klinischen Isolaten bekannt (BUSH, 2001). Eine Einteilung dieser Enzyme in verschiedene Gruppen nach Substratprofil sowie Empfindlichkeit gegenüber β -Laktamase-Inhibitoren kann mit Hilfe des Klassifizierungssystems von Bush, Jacoby und Medeiros (BJM) vorgenommen werden (BUSH et al., 1995). Eine ältere Klassifizierung in die Ambler-Klassen A bis D (AMBLER, 1980) beruht auf den Aminosäuresequenzen, führt jedoch zu ähnlichen Ergebnissen wie das BJM-Schema (Tabelle 1.1).

Neben der chromosomalen SHV-1- β -Laktamase, die sich den Breitspektrum- β -Laktamasen der BJM-Gruppe 2b zuordnen lässt, kann *K. pneumoniae* eine Vielzahl plasmidkodierter β -Laktamasen erwerben. Besondere Bedeutung kommt dabei den β -Laktamasen mit erweitertem Wirkspektrum (extended-spectrum β -lactamases, kurz ESBL) zu, welche in die BJM-Gruppe 2be bzw. die Ambler-Klasse A eingeordnet werden. Diese Enzyme hydrolysieren neben Cephalosporinen der Gruppen 1 und 2 (Cefuroxim u.a.) auch Oxyimino-Cephalosporine der Gruppen 3a (Cefotaxim, Ceftriaxon) und 3b (Ceftazidim) sowie Monobaktame (Aztreonam). Auch gegenüber Cephalosporinen der Gruppe 4 (Cefepim, Cefpirom) kommt es zu klinischen Resistenzen, während Cephalosporine der Gruppe 5 (Cefoxitin) sowie Carbapeneme (Imipenem, Meropenem, Ertapenem) nicht hydrolysiert werden können. Trotz ihres erweiterten Wirkspektrums bleiben ESBLs durch β -Laktamase-Inhibitoren (Clavulansäure, Sulbactam, Tazobactam) hemmbar (PATERSON & BONOMO, 2005).

Tabelle 1.1: Klassifizierung der β -Laktamasen (nach BUSH, 2001).

BJM-Gruppe	Untergruppe	Ambler-Klasse	Eigenschaften	Substrate	Hemmung	Beispiele
1	-	C	chromosomal oder plasmidkodiert, bei Gramneg.	alle β -Laktame außer Carbapeneme	keine Hemmung durch Clavulansäure	AmpC
2	2a	A	Penicillinasen	Penicilline	durch Clavulansäure hemmbar	BlaZ
	2b	A	Breitspektrum- β -Laktamasen	Penicilline, Breitspektrum-Cephalosporine	durch Clavulansäure hemmbar	TEM-1, SHV-1
	2be	A	β -Laktamasen mit erweitertem Spektrum (ESBL)	Oxyimino-Cephalosporine und Monobaktame	durch Clavulansäure hemmbar	SHV-2, SHV-12, CTX-M-2, TEM-3 bis 20
	2br	A	Breitspektrum- β -Laktamasen	Penicilline, Breitspektrum-Cephalosporine	nicht durch Inhibitoren hemmbar	TEM-30 bis 40, SHV-10
	2c	A	Carbencillinasen	Carbencillin	durch Clavulansäure hemmbar	PSE-1, BRO-1
	2d	D	sehr heterogene Gruppe	Oxacillin, Cloxacillin	schwache Hemmung durch Clavulansäure	OXA-1 bis 10
	2e	A	Cephalosporinasen	Cephalosporine	durch Clavulansäure hemmbar	FPM-1, CepA
	2f	A	Serin-Carbapenemasen	Carbapeneme	schwache Hemmung durch Clavulansäure	KPC-1, SHV-38
3	3a, 3b, 3c	B	Metallo- β -Laktamasen	alle β -Laktame außer den Monobaktamen	keine Hemmung durch Clavulansäure, durch EDTA hemmbar	IMP-1, VIM-2
4	-	-	unsequenzierte Enzyme, welche nicht in die anderen Gruppen einzuordnen sind			

Die klassischen ESBLs vom TEM- und SHV-Typ sind strukturelle Derivate normaler Breitspektrum- β -Laktamasen (original-spectrum β -lactamases, kurz OSBL), die bereits durch wenige Punktmutationen aus den ursprünglichen Enzymen SHV-1 sowie TEM-1 und TEM-2 entstehen können. Mittlerweile sind 80 verschiedene SHV- sowie 139 verschiedene TEM-Enzyme beschrieben worden (www.lahey.org/studies), von denen die Mehrheit einen ESBL-Phänotyp besitzt. Die häufigste Mutation bei ESBLs vom SHV-Typ ist ein Aminosäure-Austausch an Position 238. Er bewirkt eine Vergrößerung des aktiven Zentrums und dadurch eine verbesserte Bindung der großen Seitenketten von Oxyiminocephalosporinen. Oft ist dieser Austausch mit einer weiteren Substitution an Position 240 assoziiert, durch welche neben der Hydrolyse von Cefotaxim auch eine verstärkte Hydrolyse von Ceftazidim ermöglicht wird (HULETSKY et al., 1993).

Seit der ersten Beschreibung einer ESBL (SHV-2 in Deutschland, KNOTHE et al., 1983) sind diese β -Laktamasen weltweit bei verschiedenen *Enterobacteriaceae* und *P. aeruginosa* gefunden worden. Am häufigsten kommen ESBLs nach wie vor bei *K. pneumoniae* vor, wobei der Grund für diese Präferenz bislang ungeklärt ist (PATERSON & BONOMO, 2005). Die meisten nosokomialen Ausbrüche von *K. pneumoniae* werden durch ESBL-produzierende Stämme hervorgerufen.

Neben den klassischen TEM- und SHV-Enzymen gewinnen die ebenfalls plasmidkodierten CTX-M- β -Laktamasen ("Cefotaximasen") zunehmend klinische Relevanz. Sie zeichnen sich durch eine hohe katalytische Aktivität gegenüber den Cephalosporinen der Gruppe 3a (Cefotaxim, Ceftriaxon) aus, während Ceftazidim (Gruppe 3b) im Allgemeinen schlechter hydrolysiert wird. Inzwischen sind jedoch auch Varianten bekannt, die eine hohe Aktivität gegenüber Ceftazidim besitzen (BONNET, 2004). CTX-M-ESBLs werden in den letzten Jahren häufiger, auch im Rahmen von nosokomialen Ausbrüchen, bei *K. pneumoniae* gefunden (MENA et al., 2006).

Plasmidkodierte AmpC- β -Laktamasen (Ambler-Klasse C, BJM-Gruppe 1) vermitteln Resistenz gegenüber allen β -Laktamen mit Ausnahme von Cefepim, Cefpirom und Carbapenemen. Zudem sind sie unempfindlich gegenüber allen handelsüblichen β -Laktamase-Inhibitoren (LIVERMORE, 1995). Im Vergleich zu ESBLs spielen AmpC-Enzyme bei *K. pneumoniae* bisher eine untergeordnete Rolle, dennoch wurden sie seit ihrer ersten Beschreibung in einem *K. pneumoniae*-Isolat (CMY-1, BAUERNFEIND et al., 1989) auch in dieser Spezies regelmäßig gefunden. Sie treten teilweise zusammen mit ESBLs im gleichen Stamm auf und sind wie diese an nosokomialen Ausbrüchen multiresistenter *K. pneumoniae* beteiligt (OHANA et al., 2005; SONG et al., 2006).

Die Expression von AmpC- β -Laktamasen kann bei *K.-pneumoniae*-Stämmen auch zu Resistenz gegenüber Carbapenemen führen, welche als eine der letzten Therapieoptionen gegen multiresistente, ESBL-produzierende Klebsiellen gelten. Wie ESBLs hydrolysieren plasmidkodierte AmpC- β -Laktamasen die Carbapeneme normalerweise nicht effektiv genug, um klinische Resistenz gegenüber dieser Antibiotika-Klasse zu vermitteln. Bei einem gleichzeitigen Verlust der beiden Porine OmpK35 und OmpK36 ist der Einstrom der Antibiotika in die Zelle jedoch so weit herabgesetzt, dass die katalytische Aktivität einer AmpC- β -Laktamase ausreicht, um zu Carbapenem-Resistenz zu führen (BRADFORD et al., 1997; JACOBY et al., 2004).

Klassische Carbapenemasen werden bei *K. pneumoniae* bisher selten gefunden. Im Jahre 2001 wurde erstmalig die Klasse-A-Serin-Carbapenemase KPC-1 (BJM-Gruppe 2f) in einem *K.-pneumoniae*-Stamm in den USA beschrieben (YGIT et al., 2001). Die Varianten KPC-1, KPC-2 und KPC-3 wurden seitdem mehrfach auch im Rahmen von *K.-pneumoniae*-Ausbrüchen detektiert. Zunächst schienen sie auf die USA beschränkt zu sein, inzwischen wurden sie aber auch in Frankreich und China gefunden (NAAS et al., 2005; WEI et al., 2007), so dass mit weiterer Ausbreitung dieser Enzyme zu rechnen ist. Metallo-Carbapenemasen der molekularen

Klasse B (BJM-Gruppe 3), die sämtliche β -Laktame mit Ausnahme der Monobaktame hydrolysieren, werden bei *K. pneumoniae* ebenfalls zunehmend häufiger gefunden (WALSH et al., 2005). VIM- und IMP-Enzyme wurden bei Klebsiellen bereits im Rahmen von Ausbrüchen beschrieben (IKONOMIDIS et al., 2005; YAN et al., 2001).

1.3.3.2 Aminoglykosid-modifizierende Enzyme

Die Wirkung von Aminoglykosiden beruht auf der Störung der bakteriellen Proteinbiosynthese durch irreversible Bindung an die 30S-Untereinheit der Ribosomen, was zu Ablesefehlern und Nonsense-Proteinen führt. Die Penetration dieser Antibiotika in die Zelle erfolgt Porinunabhängig durch äußere Membran und Cytoplasmamembran (VAKULENKO & MOBASHERY, 2003). Der wichtigste bakterielle Resistenzmechanismus ist die Kofaktor-abhängige Modifikation durch Aminoglykosid-modifizierende Enzyme (AME). Hierdurch wird die Affinität der Aminoglykoside an ihre Zielstruktur stark reduziert. N-Acetyltransferasen (AAC) nutzen Acetyl-Coenzym A als Donor zur Acetylierung bestimmter Aminogruppen, O-Nukleotidyltransferasen (ANT oder AAD) und P-Phosphotransferasen (APH) nutzen den Donor ATP und modifizieren Hydroxylgruppen der Aminoglykoside (MINGEOT-LECLERCQ et al., 1999). Inzwischen sind sehr viele AME identifiziert worden, wobei es sich oft um Isoenzyme handelt, welche die gleiche Reaktion katalysieren, genetisch jedoch nicht sehr nahe verwandt sind (SHAW et al., 1993).

Die Gene Aminoglykosid-modifizierender Enzyme sind meist plasmidkodiert und liegen häufig auf Transposons oder als Genkassetten in Integrons (siehe 1.3.3.5). Bei *K. pneumoniae* kommen sie oft zusammen mit ESBLs und anderen Resistenzgenen auf großen Multiresistenzplasmiden vor, was zu einer Koselektion von Aminoglykosid- und β -Laktam-Resistenz führen kann.

1.3.3.3 Tetracyclin-Resistenzgene

Tetracycline hemmen die bakterielle Proteinbiosynthese durch reversible Blockierung der Aminoacyl-tRNA-Bindestelle an der 30S-Untereinheit der Ribosomen. Wie β -Laktame gelangen auch Tetracycline bei gramnegativen Bakterien durch die Porine der äußeren Membran ins Periplasma, wo sie zunächst akkumulieren und nachfolgend mittels aktiven Transports ins Cytoplasma aufgenommen werden (ROBERTS, 1996). Tetracyclin-Resistenz wird durch aktiven Efflux, Modifikation der Zielstruktur am Ribosom oder Tetracyclin-inaktivierende Enzyme vermittelt. Diese Mechanismen werden durch erworbene Resistenzgene kodiert, welche

häufig auf konjugativen oder mobilisierbaren Plasmiden und Transposons liegen und als *tet*-Gene bezeichnet werden (als Übersicht in ROBERTS, 1996). Bei gramnegativen Bakterien werden in der Regel induzierbare Effluxpumpen gefunden, welche das Antibiotikum mittels eines aktiven H⁺/Tetracyclin-Antiports aus der Zelle schleusen. Bei *K. pneumoniae* sind bisher die Tetracyclin-Efflux-Gene *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)* und *tet(D)* sowie das Ribosomen-Schutz-Gen *tet(M)* nachgewiesen worden (als Übersicht in CHOPRA & ROBERTS, 2001; ROBERTS 2005). Auch diese Resistenzdeterminanten liegen häufig auf Multiresistenzplasmiden.

1.3.3.4 Sonstige Resistenzdeterminanten

Antifolate (Sulfonamide und Trimethoprim) hemmen den bakteriellen Folsäure-Stoffwechsel. Sulfonamide (Sulfamethoxazol) binden kompetitiv an die Substratbindestelle der Dihydropteroat-Synthetase, während Trimethoprim auf die gleiche Weise die Dihydrofolat-Synthase inhibiert. In der Therapie wird oft Cotrimoxazol eingesetzt, eine synergistisch wirkende Kombination beider Substanzen.

Der wichtigste Resistenzmechanismus gegenüber Antifolaten ist der Erwerb alternativer, plasmidkodierter Dihydropteroat-Synthetasen und Dihydrofolat-Synthasen, deren Substratbindestellen kaum Affinität zu Antifolaten besitzen. Sulfonamid-Resistenz wird bei gramnegativen Bakterien hauptsächlich durch die Gene *sull* und *sullI* vermittelt (SKÖLD, 2001), wobei *sull* Teil des 3'-konservierten Bereiches von Klasse-I-Integrans ist (BENNETT, 1999). Trimethoprim-Resistenz wird durch eine größere Anzahl verschiedener *dhfr*-Gene vermittelt, die am häufigsten bei *Enterobacteriaceae* gefunden werden und meist als Genkassetten auf Integrans liegen. Bei *K. pneumoniae* spielen außerdem aktiver Efflux sowie eine herabgesetzte Membranpermeabilität durch den Verlust von Porinen eine Rolle (HUOVINEN, 2001).

Chloramphenicol ist ein Breitspektrum-Antibiotikum, dessen bakteriostatische Wirkung auf der reversiblen Hemmung der bakteriellen Proteinbiosynthese durch Bindung an die Peptidyltransferase der ribosomalen 50S-Untereinheit beruht. Aufgrund gravierender Nebenwirkungen wird Chloramphenicol heute nur noch als Reserveantibiotikum zur Behandlung schwerer Infektionen wie Typhus oder bakterieller Meningitis eingesetzt.

Bakterielle Resistenz gegenüber Chloramphenicol beruht meist auf enzymatischer Inaktivierung, seltener auf aktivem Efflux, Modifikationen des Targets oder Impermeabilität. Die Inaktivierung des Antibiotikums erfolgt mittels Acetylierung durch erworbene Chloramphenicol-Acetyltransferasen, welche durch die Gruppe der *cat*-Gene kodiert werden. Bei *Enterobacteriaceae* werden häufig *catI*, *catII*, *catIII* sowie Enzyme der *catB*-Familie detektiert. Der

Efflux von Chloramphenicol kann entweder durch unspezifische Effluxpumpen wie AcrAB oder durch erworbene spezifische Pumpen der *cml*-Familie, meist *cmlA*, vermittelt werden. Effluxpumpen der *flo*-Familie transportieren neben Chloramphenicol auch das fluoriierte Derivat Florphenicol aus der Zelle (als Übersicht in SCHWARZ et al., 2004).

Chinolon-Resistenz beruht bei *K. pneumoniae* hauptsächlich auf Targetmutationen oder Effluxpumpen-Überexpression (siehe 1.3.2.3 und 1.3.2.2). Inzwischen wird jedoch mehrfach, auch bei *K. pneumoniae*, über das Auftreten plasmidkodierter Chinolon-Resistenz berichtet. Das verantwortliche Qnr-Protein wurde erstmals 1998 in *K. pneumoniae* beschrieben und verringert die Chinolon-Empfindlichkeit über einen Mechanismus der Zielstruktur-Protektion (TRAN et al., 2005). Auch wenn es allein keine klinische Resistenz vermittelt, so erleichtert es die Selektion hochresistenter Mutanten und verstärkt bereits bestehende Resistenz (MARTINEZ-MARTINEZ et al., 2003), wodurch es klinisch relevant sein kann.

1.3.3.5 Lokalisation und Verbreitung erworbener Resistenzgene bei *K. pneumoniae*

Plasmide stellen den wichtigsten Mechanismus zur Verbreitung erworbener Resistenzgene dar. Es handelt sich um autonome zirkuläre DNA-Doppelstränge mit einer Größe von 3×10^3 bis $4,5 \times 10^5$ bp, die im Zytoplasma lokalisiert sind und unabhängig vom Chromosom repliziert werden. Sie sind für die Bakterienzelle nicht essentiell, können jedoch sowohl Resistenzdeterminanten als auch andere wichtige Gene wie Virulenzfaktoren beherbergen. Große Plasmide liegen in der Regel in ein bis zwei, kleine Plasmide dagegen in bis zu 100 Kopien in einer Zelle vor (KAYSER et al., 2001). Die Kopienzahl kann bei Resistenzgenen eine Rolle spielen, da eine erhöhte Kopienzahl eine erhöhte Proteinmenge und somit ein höheres Resistenzniveau bedeuten kann. Plasmide werden vertikal bei der Zellteilung an die Tochterzellen sowie horizontal durch Konjugation weitergegeben, wobei der horizontale Transfer sowohl zwischen verschiedenen Stämmen einer Bakterienspezies als auch zwischen verschiedenen Spezies erfolgen kann. Konjugative Plasmide besitzen alle zur Steuerung der Konjugation notwendigen Gene, während mobilisierbare Plasmide nur zusammen mit einem konjugativen Plasmid übertragen werden können.

Bei *K. pneumoniae* kommen häufig große Multiresistenzplasmide vor, die sowohl ESBLs als auch weitere Resistenzgene gegen verschiedene Antiinfektiva tragen. Nicht selten sind diese Plasmide konjugierbar, so dass es zur gleichzeitigen Verbreitung von Resistenz gegen mehrere verschiedene Antibiotika-Klassen kommen kann.

Mobile genetische Elemente stellen das Bindeglied zwischen chromosomal kodierter und plasmidkodierter Resistenz dar, da sie Resistenzgene vom bakteriellen Chromosom auf Plasmide transferieren können. Eine herausragende Rolle in der Verbreitung von Resistenzgenen nehmen Integrons ein. Diese genetischen Elemente besitzen ein Rekombinationssystem, das sie dazu befähigt, als Genkassetten vorliegende Gene zu akquirieren und zu mobilisieren (HALL & COLLIS, 1995). Da Integrons über einen Promotor zur Expression dieser Genkassetten verfügen, dienen sie als natürliche bakterielle Klonierungs- und Expressionssysteme.

Bisher wurden fünf Klassen von Resistenz-Genkassetten enthaltenden Integrons identifiziert, wobei Klasse-1-Integrons die häufigste und am besten charakterisierte Gruppe darstellen (MAZEL, 2006). Zu den essentiellen Bestandteilen jedes bekannten Integrons gehören ein *intI*-Gen, das für eine sequenzspezifische Integrase kodiert, eine angrenzende *attI*-Sequenz, die von der Integrase erkannt wird, sowie ein auswärts-orientierter Promotor P_c zur Transkription der Genkassetten. Bei Klasse-1-Integrons wird dieser stark konservierte vordere Bereich als 5'CS (5' conserved segment) bezeichnet. Im Anschluss daran folgt der variable Bereich, in welchem eine oder mehrere Genkassetten liegen. Sie bestehen aus einem meist für Antibiotika-Resistenz kodierenden Gen sowie einer spezifischen Rekombinationsstelle, dem 59-Basenelement *attC*. Freie Genkassetten liegen in zirkulärer Form vor. Ihr 59-Basenelement wird von der Integrase erkannt, welche die Kasette über Rekombination von *attC* mit *attI* oder einem zweiten 59-Basenelement in das Integron einfügen und auch wieder mobilisieren kann (als Übersicht in HALL & COLLIS, 1995). Inzwischen sind über 80 verschiedene Genkassetten in Klasse-1-Integrons beschrieben worden, zumeist Resistenzgene gegen die verschiedensten Antibiotika-Klassen, wobei ein Integron bis zu acht verschiedene Genkassetten tragen kann (MAZEL, 2006). In vielen Integrons folgt auf die variable Region ein zweiter konservierter Bereich, der als 3'CS (3' conserved segment) bezeichnet wird. Er umfasst das Gen *qacEΔ1* für ein partiell funktionales Effluxprotein, welches Resistenz gegen quaternäre Ammoniumverbindungen vermittelt (PAULSEN et al., 1993), das Sulfonamid-Resistenzgen *sulI* sowie *orf5*, dessen Funktion noch ungeklärt ist (Abbildung 1.4).

Integrons haben ihre eigene Mobilität durch Mutationen verloren, liegen jedoch häufig auf mobilen Transposons oder konjugativen Plasmiden.

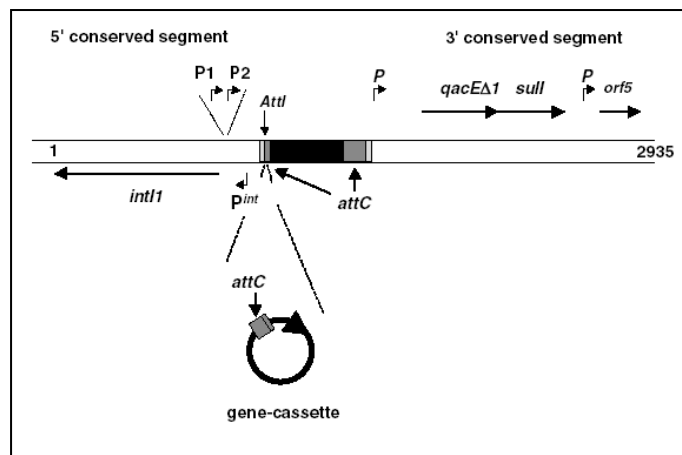
Transposons sind mobile genetische Elemente, die an verschiedenen Stellen in das bakterielle Genom inserieren können, ohne dass homologe Bereiche benötigt werden. Sie sind teilweise sehr komplex aufgebaut und tragen neben den für ihre Transposition benötigten Genen weitere genetische Elemente wie beispielsweise Antibiotika-Resistenzgene. Eine besondere Gruppe

stellen konjugative Transposons dar. Sie sind in das bakterielle Chromosom integriert, können aber ausgeschnitten und als zirkuläre Intermediate konjugativ auf andere Zellen übertragen werden (SALYERS et al., 1995).

Die einfachsten und kleinsten bakteriellen transposablen Elemente sind die sogenannten Insertions-Sequenzen oder IS-Elemente. Diese mobilen genetischen Elemente haben eine Größe von 700 bis 1800 bp und besitzen nur die für ihre Transposition nötigen Gene. Sie werden von sogenannten "inverted repeats" (IR) flankiert, welche die Erkennungssequenzen für die Transpositions-Enzyme (Transposasen) darstellen (MAHILLON & CHANDLER, 1998).

Abb. 1.4: Schema eines Klasse-1-Integrans.

P₁: Promotor zur Transkription der Genkassetten; P₂: zweiter inaktiver Promotor; *intI1*: Integrase-Gen; P_{int}: Promotor der Integrase; *attI*: Integrationssequenz; P: Promotor von *qacEΔ1* und *sull* bzw. *orf5*; *attC*: 59-Basenelement auf der Genkassette. Weitere Erläuterungen siehe Text. (nach FLUIT & SCHMITZ, 2004)



1.4 Aktuelle Resistenzsituation bei *K. pneumoniae*

1.4.1 Multiresistenz

Sowohl die Resistenz gegen einzelne Antibiotika als auch die Multiresistenz gegen mehrere verschiedene Antibiotika-Klassen nimmt bei *K. pneumoniae* stetig zu. Die kontinuierlich erhobenen Daten des GENARS-Projektes (German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance) ergaben für 3.077 klinische *K.-pneumoniae*-Isolate aus sechs deutschen Krankenhäusern im Zeitraum 2002 bis 2004 Resistenzraten von 5,0% gegenüber Ceftazidim sowie 4,6% gegenüber Cefotaxim. Gegenüber Piperacillin wurde eine Resistenzrate von 17,4% sowie ein ungewöhnlich hoher Anteil intermediär getesteter Isolate von 32,9% ermittelt. 5,4% der Stämme waren auch gegenüber der Kombination Piperacillin-Tazobactam resistent. Die Resistenzraten gegenüber Gentamicin und Ciprofloxacin betragen 4,0% bzw. 3,1% (NOLL et al., 2005). Meropenem-Resistenz ist in Deutschland bei Klebsiellen noch sehr selten und betrug in der GENARS-Studie lediglich 0,1%. In der im Jahre 2004 durchgeführten Studie der PEG (Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie) betragen die Resistenzraten klinischer *K.-pneumoniae*-Isolate aus Deutschland, Österreich und der Schweiz gegenüber Amikacin

1,4%, gegenüber Meropenem 0,3% sowie gegenüber Cotrimoxazol, Cefoxitin und Doxycyclin 11,8%, 10,4% und 23,3% (KRESKEN et al., 2004).

Nach der EARSS-Studie 2005 (European Antimicrobial Resistance Surveillance System), in welcher die Resistenzdaten invasiver *K.-pneumoniae*-Isolate aus 24 europäischen Ländern ausgewertet wurden, liegen die Resistenzraten gegenüber Drittgenerations-Cephalosporinen, Fluorchinolonen und Aminoglykosiden in Deutschland im europäischen Vergleich im unteren Mittelfeld. In der EARSS-Studie wurde ein deutliches Gefälle von sehr niedrigen Raten in Skandinavien bis zu Resistenzraten von über 50% in ost- und südeuropäischen Ländern festgestellt. Die Carbapenem-Resistenz lag in Deutschland bei 2% sowie in den übrigen Ländern unter 1%, wobei Griechenland mit 28% eine Ausnahme bildete (EARSS-Report 2005; Abbildung 1.5).

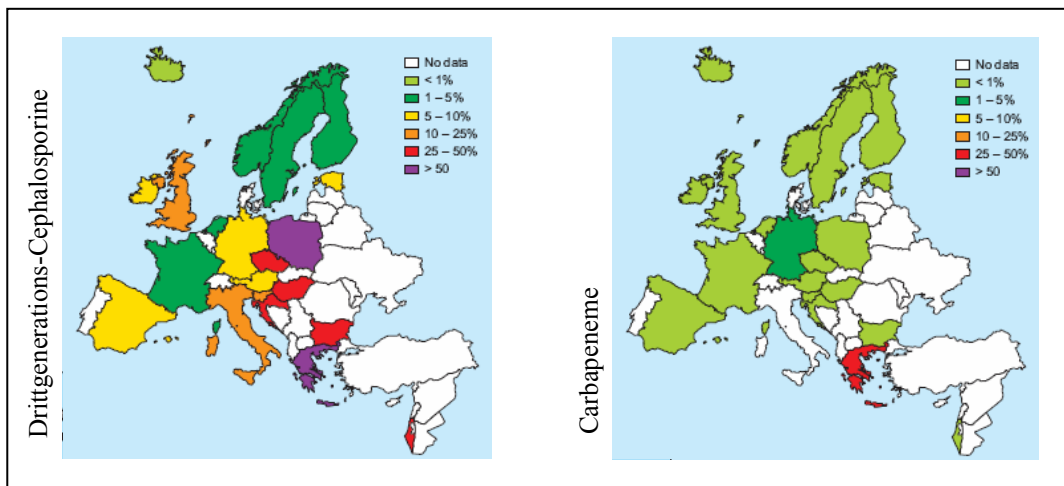


Abb. 1.5: Resistenzraten invasiver *K.-pneumoniae*-Isolate 2005. Links: Resistenz gegenüber Drittgenerations-Cephalosporinen, rechts: Resistenz gegenüber Carbapenemen. (Quelle: EARSS-Report 2005)

Das größte Gefahrenpotential geht nicht von Resistenzen gegen einzelne Substanzen, sondern von Erregern mit Mehrfachresistenzen aus. In der GENARS-Studie wurde Multiresistenz (definiert als Resistenz gegenüber mindestens vier der sechs Substanzen Piperacillin, Cefotaxim, Ceftazidim, Gentamicin, Ciprofloxacin und Meropenem) bei 2,3% der untersuchten *K.-pneumoniae*-Isolate festgestellt (NOLL et al., 2005). In der EARSS-Studie wurde Multiresistenz gegenüber mindestens drei verschiedenen Antibiotika-Klassen bei 9,6% der *K.-pneumoniae*-Isolate verzeichnet (EARSS-Report 2005).

Besondere Probleme gehen nach wie vor von ESBL-Produzenten aus. Zum einen schränkt die Expression einer ESBL das therapeutische Spektrum erheblich ein, zum anderen muss auf die verbleibenden therapeutischen Optionen ausgewichen werden, so dass weiterer Selektions-

druck entsteht und das Auftreten von Multiresistenzen fördert. Zudem liegen ESBLs häufig auf Multiresistenzplasmiden, so dass eine kombinierte Resistenz gegen Drittgenerations-Cephalosporine, Aminoglykoside, Tetracycline, Chloramphenicol und Antifolate vermittelt und selektiert werden kann (BRADFORD, 2001). Auch Fluorchinolon-Resistenz tritt bei ESBL-positiven Klebsiellen häufiger auf als bei ESBL-negativen Isolaten (PATERSON et al., 2000). In der PEG-Studie 2004 wurde eine Prävalenz ESBL-produzierender *K. pneumoniae* von 7,3% festgestellt. Im Rahmen des GENARS-Projektes wurde 2004 mit 7,1% eine ähnliche ESBL-Rate ermittelt (HUPPERTZ et al., 2005). Die Prävalenz von ESBLs kann jedoch von Krankenhaus zu Krankenhaus stark schwanken. BABINI & LIVERMORE (2000) fanden bei *K. pneumoniae*-Isolaten von 35 europäischen Intensivstationen eine durchschnittliche ESBL-Prävalenz von 25%, wobei die Raten der individuellen Kliniken zwischen 0% und 83% lagen. Auf den drei in der Studie untersuchten deutschen Intensivstationen wurden Raten von 5%, 24% und 34,5% ermittelt.

Der wichtigste Risikofaktor für eine Infektion mit einem ESBL-produzierenden *K.-pneumoniae*-Stamm ist laut einer aktuellen Studie (TUMBARELLO et al., 2006) eine vorangegangene Antibiotika-Therapie (Odds Ratio OR 11,81). ASENSIO et al. (2000) ermittelten als größten Risikofaktor für die Kolonisation oder Infektion mit einem multiresistenten, ESBL-produzierenden Ausbruchsstamm die Kombinationstherapie mit Drittgenerations-Cephalosporinen und Aminoglykosiden (OR 21,6), gefolgt von der Monotherapie mit Drittgenerations-Cephalosporinen (OR 17,8) oder Aminoglykosiden (OR 10,2). Infektionen mit ESBL-Produzenten führen wiederum zu einer längeren Verweildauer der betroffenen Patienten in der Klinik sowie zu einer erhöhten Letalität (KIM et al., 2002a und 2002b).

Die Expression von AmpC- β -Laktamasen ist bei *K. pneumoniae* zwar erheblich seltener als das Vorkommen von ESBLs, kann jedoch wie beschrieben zu besonderen therapeutischen Problemen führen, da dieses Enzym in Verbindung mit einem Porinverlust klinische Carbapenem-Resistenz vermittelt. Während klassische Carbapenemasen wie VIM- oder IMP-Enzyme in Deutschland noch sehr selten beschrieben werden (HENRICHFREISE et al., 2005), kommen plasmidkodierte AmpC- β -Laktamasen zunehmend häufiger vor. 2004 wurde unter den klinischen Isolaten der GENARS-Studie eine AmpC-Rate von 1,8% bei *K. pneumoniae* sowie 1,1% bei *E. coli* festgestellt. In den nächsten Jahren ist daher mit einer weiteren Verbreitung dieser β -Laktamasen zu rechnen, was sich bereits in aktuellen Studien widerzuspiegeln beginnt (WIEGAND et al., 2007).

1.4.2 Panresistenz

Als panresistent werden Stämme bezeichnet, die Resistenz gegenüber allen klinisch einsetzbaren Antibiotika aufweisen. Panresistenz tritt in erster Linie bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* auf, da diese Spezies bereits gegen viele Antibiotika natürlich resistent sind. In den letzten Jahren wurde jedoch auch über erste Fälle panresistenter *K.-pneumoniae*-Isolate in Griechenland berichtet (FALAGAS et al., 2005; MIRIAGOU et al., 2005).

Die Definitionen des Begriffs Panresistenz weichen teilweise voneinander ab. Einige Autoren verwenden ihn bereits für Isolate, die nur noch gegen ein Antibiotikum empfindlich sind (DEMKO et al., 1998). Nach MIRIAGOU et al. (2005) werden Isolate dann als panresistent bezeichnet, wenn sie resistent gegenüber allen klinisch verfügbaren Antibiotika mit Ausnahme von Colistin sind. FALAGAS & KASIAKOU (2005) vertreten dagegen die Auffassung, dass diese Bezeichnung nicht für gramnegative Bakterien verwendet werden sollte, die noch empfindlich gegenüber Polymyxinen sind.

Polymyxine (Colistin, Polymyxin B) gehören zur Klasse der Polypeptid-Antibiotika, deren bakterizide Wirkung gegenüber gramnegativen Bakterien auf einer Permeabilisierung der Cytoplasmamembran beruht. Die Penetration der äußeren Membran erfolgt Porin-unabhängig durch Interaktion mit Membran-Lipopolysacchariden (HANCOCK & CHAPPLE, 1999). Erstmals 1959 zugelassen, wurde Colistin aufgrund seiner starken nephrotoxischen Nebenwirkungen und der Entwicklung verträglicherer Breitspektrum-Antibiotika seit den 1980er Jahren nicht mehr systemisch, sondern nur noch zur Inhalationstherapie bei Cystischer Fibrose, peroral zur Darmdekontamination sowie örtlich bei Hautinfektionen eingesetzt (MUTSCHLER, 2001). Seit einigen Jahren wird Colistin jedoch wieder als Reserveantibiotikum gegen Infektionen mit panresistenten Erregern verwendet, da Resistenzen noch selten auftreten (FALAGAS & BLIZIOTIS, 2007) und mittels intravenöser Therapie therapeutische Erfolge bei vertretbaren Nebenwirkungen erzielt werden konnten (MICHALPOULOS et al., 2004; KASIAKOU et al., 2005). In Griechenland, wo Colistin auf Intensivstationen inzwischen routinemäßig als Reserveantibiotikum verwendet wird, sind jedoch bereits Colistin-resistente *K.-pneumoniae*-Stämme isoliert worden (ANTONIADOU et al., 2007).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

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

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

Für die nächsten Jahre ist mit einer weiteren Verschärfung dieser Problematik zu rechnen, da die Resistenzraten bei *K. pneumoniae* nach wie vor steigen, neue Resistenzgene auftauchen und verbreitet werden und sich im Gegenzug nur wenige neue Antibiotika in der Entwicklung befinden, die zudem keine neuen Wirkmechanismen gegen gramnegative Problemerreger vorzuweisen haben (TALBOT et al., 2006). Vor diesem Hintergrund ist es von äußerster Wichtigkeit, die verbleibenden Antibiotika gegen multiresistente *K.-pneumoniae*-Stämme rational einzusetzen und die Therapie auf den Erreger und dessen Resistenzphänotyp abzustimmen. Ebenso wichtig ist es, durch strikte Überwachungs- und Hygienemaßnahmen einen möglichst hohen Anteil nosokomialer Infektionen zu vermeiden, so dass die Notwendigkeit einer Antibiotika-Therapie und der damit verbundene Selektionsdruck gering gehalten werden können. Hierzu ist mehr Kenntnis über die Lokalisation und das Zusammenwirken bestehender Resistenzgene ebenso erforderlich wie Kenntnisse über die Verbreitung und mögliche Veränderung nosokomialer Stämme und deren Resistenzmechanismen während eines Ausbruchsgeschehens.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen nosokomiale Ausbrüche multiresistenter *K. pneumoniae* auf drei benachbarten Intensivstationen einer Universitätsklinik untersucht werden. Das Ausmaß der Ausbrüche soll im Hinblick auf den zeitlichen Verlauf sowie die Anzahl der betroffenen Patienten dokumentiert werden. Nach Möglichkeit sollen Mechanismen der Ausbreitung der *K.-pneumoniae*-Stämme aufgeklärt werden. Durch Analyse patientenbezogener Daten sollen Selektionspotential und Erfolg der eingesetzten antimikrobiellen Therapie im Hinblick auf die Eradikation der Ausbruchsstämme aus der patienteneigenen mikrobiellen Flora untersucht werden.

Auf molekularbiologischer Ebene soll bei ausgewählten Ausbruchsstämmen geklärt werden, welche Resistenzdeterminanten zur Entstehung des multiresistenten Phänotyps führen. Ein möglicher Fitnessverlust der Stämme soll ebenso untersucht werden wie ihr Potential zum Erwerb weiterer Resistenzmechanismen gegen bisher noch wirksame Antibiotika-Gruppen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

2.1.1.1 Klinische *K.-pneumoniae*-Stämme

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Studie unter Einbeziehung von Bakterienstämmen und Patientendaten von der anästhesiologischen (AI), chirurgischen (CI) und kardiochirurgischen (KI) Intensivstation der Universitätsklinik Bonn durchgeführt. Die in Tabelle 2.2 aufgeführten Patientenisolat sowie die in Tabelle 2.1 aufgelisteten Umgebungsisolat wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. Marklein (Institut für Medizinische Mikrobiologie) zur Verfügung gestellt. In Tabelle 2.3 sind die Stämme angegeben, die aus Stuhlproben von Patienten der anästhesiologischen und chirurgischen Intensivstation sowie aus einer Stuhlprobe des Pflegepersonals isoliert wurden.

Tab. 2.1: Klinische *K.-pneumoniae*-Isolate aus Umgebungsuntersuchungen

Stammnummer	Station	Isolationsdatum	Materialart	Standort der Dauerkultur
U-238	CI	11.01.02	Waschbecken-Siphon Patientenzimmer	14-05-78
U-243	AI	11.01.02	Waschbecken-Siphon Patientenzimmer	14-05-80
U-245	AI	11.01.02	Waschbecken-Siphon Patientenzimmer	13-03-10
U-2761	KI	04.04.02	Waschbecken-Siphon Patientenzimmer	13-03-14
U-2778	KI	04.04.02	Waschbecken-Siphon Patientenzimmer	13-03-13
U-7448	CI	30.08.02	Waschbecken-Siphon Patientenzimmer	13-03-11
U-7519	CI	03.09.02	Waschbecken-Siphon Patientenzimmer	13-03-16
U-7643	CI	04.09.02	Waschbecken-Siphon Patientenzimmer	13-03-15
U-8369	CI	26.09.02	Waschbecken-Siphon Patientenzimmer	13-03-12
U-12493	CI	15.12.03	Patientenbett	14-05-49
U-12504	CI	15.12.03	Tee (in Thermoskanne)	14-05-50
U-12509	CI	15.12.03	Waschbecken-Siphon Patientenzimmer	14-05-51
U-12613	AI	16.12.03	Waschbecken-Siphon Patientenzimmer	14-05-56
U-12614	AI	16.12.03	Waschbecken-Siphon Patientenzimmer	14-05-53
U-12635	CI	16.12.03	Waschbecken-Siphon Patientenzimmer	14-05-52
U-12637	CI	16.12.03	Waschbecken-Siphon Patientenzimmer	14-05-55

AI: anästhesiologische Intensivstation, CI: chirurgische Intensivstation, KI: kardiochirurgische Intensivstation

Tab. 2.2: Klinische *K.-pneumoniae*-Isolate aus Patientenmaterial

Stammnummer	Patient	Station	Isolationsdatum	Materialart	Standort der Dauerkultur
I-00734	CI-04	CI	14.01.02	Sheldonkatheter	14-05-81
I-01082	CI-01	CI	20.01.02	Trachealsekret	14-05-79
I-05111	CI-02	CI	07.04.02	Arterienkatheterspitze	13-03-19
I-05113	CI-03	CI	06.04.02	Blasenkatheterspitze	13-03-20
I-05134	CI-06	CI	06.04.02	ZVK-Spitze	13-03-21
I-11531	AI-02	AI	05.08.03	ZVK-Spitze	14-05-60
I-14885	CI-18	CI	06.10.03	Trachealsekret	14-05-68
I-15211	CI-17	CI	13.10.03	Rachenabstrich	14-05-61
I-15258	AI-09	AI	13.10.03	Rachenabstrich	14-05-59
I-15633	AI-04	AI	20.10.03	Trachealsekret	14-05-63
I-16296	AI-15	AI	03.11.03	Trachealsekret	14-05-64
I-16299	AI-13	AI	03.11.03	Trachealsekret	14-05-58
I-16330	AI-14	KI	03.11.03	Rachenabstrich	14-05-62
I-16447	KI-09	KI	04.11.03	Leistenabstrich	14-05-67
I-16462	CI-22	CI	04.11.03	Trachealsekret	14-05-65
I-16602	AI-16	AI	07.11.03	Sheldonkatheter	14-05-66
I-16706	CI-21	CI	10.11.03	Trachealsekret	14-05-69
I-18573	AI-10	AI	15.12.03	Thoraxabstrich	14-05-77
I-18620	CI-29	CI	15.12.03	Rachenabstrich	14-05-71
I-18650	CI-17	MI	15.12.03	Rachenabstrich	14-05-72
I-18655	CI-30	CI	15.12.03	Rachenabstrich	14-05-73
I-18856	AI-19	AI	19.12.03	Trachealsekret	14-05-74
I-00401	AI-04	AI	08.01.04	Rachenabstrich	14-05-40
I-00442	CI-32	CI	08.01.04	Rachenabstrich	14-05-41
I-01658	CI-34	CI	29.01.04	Trachealsekret	14-05-43
I-01664	CI-36	CI	29.01.04	Trachealsekret	14-05-45
I-01667	CI-33	CI	29.01.04	Rachenabstrich	14-05-42
I-01865	CI-35	CI	02.02.04	Trachealsekret	14-05-44
I-01867	CI-34	CI	02.02.04	Trachealsekret	14-05-47
I-02760	CI-36	CI	16.02.04	Rachenabstrich	14-05-48
P-6068	CI-25	CNS	16.12.03	Rachenabstrich	14-05-76
O-19686	unbekannt	KNS	10.12.03	Rachenabstrich	14-05-75
B-11238	unbekannt	UNS	22.10.03	Blut	14-05-70

AI: anästhesiologische Intensivstation, CI: chirurgische Intensivstation, KI: kardiochirurgische Intensivstation, MI: Intensivstation Innere Medizin, CNS: chirurgische Normalstation, KNS: kardiologische Normalstation, UNS: urologische Normalstation, ZVK = zentraler Venenkatheter

Tab. 2.3: Klinische *K.-pneumoniae*-Isolate aus Stuhlproben

Stammnummer	Patient	Station	Isolationsdatum	Materialart	Standort der Dauerkultur
S-12573	ST-01	CI	15.12.03	Analabstrich	14-05-01
S-12574	ST-02	CI	16.12.03	Analabstrich	14-05-02
S-12577	AI-17	AI	13.12.03	Stuhlprobe (Anreicherung)	14-05-03
S-12578	AI-17	AI	16.12.03	Stuhlprobe	14-05-04
S-12579	AI-04	AI	16.12.03	Stuhlprobe	14-05-05
S-12639	AI-10	AI	16.12.03	Stuhlprobe	14-05-12
S-12770	AI-10	AI	17.12.03	Stuhlprobe	14-05-39
S-12938-a	AI-17	AI	22.12.03	Stuhlprobe	14-05-06
S-12938-b	AI-17	AI	22.12.03	Stuhlprobe	14-05-07
S-12939	AI-10	AI	22.12.03	Stuhlprobe (Anreicherung)	14-05-13
S-12941-a	AI-17	AI	23.12.03	Stuhlprobe	14-05-08
S-12941-b	AI-17	AI	23.12.03	Stuhlprobe	14-05-09
S-12942	CI-23	AI	15.12.03	Stuhlprobe (Anreicherung)	14-05-10
S-12947	CI-23	AI	27.12.03	Stuhlprobe	14-05-11
S-00001-a	AI-04	AI	31.12.03	Stuhlprobe (Anreicherung)	14-05-19
S-00001-b	AI-04	AI	31.12.03	Stuhlprobe (Anreicherung)	14-05-20
S-00005	CI-23	CNS	02.01.04	Stuhlprobe	14-05-14
S-00006	AI-19	CNS	02.01.04	Stuhlprobe (Anreicherung)	14-05-15
S-00031	AI-19	CNS	05.01.04	Stuhlprobe (Anreicherung)	14-05-28
S-00032	CI-23	CNS	05.01.04	Stuhlprobe	14-05-16
S-00060	CI-27	CNS	05.01.04	Stuhlprobe	14-05-17
S-00061	CI-23	CNS	06.01.04	Stuhlprobe	14-05-18
S-00444-a	AI-19	CNS	18.01.04	Stuhlprobe	14-05-25
S-00444-b	AI-19	CNS	18.01.04	Stuhlprobe	14-05-26
PS-032A	PA-02	AI	19.03.04	Stuhlprobe (Personal)	14-05-37

AI: anästhesiologische Intensivstation, CI: chirurgische Intensivstation, CNS: chirurgische Normalstation

2.1.1.2 Labor-, Referenz- und Donorstämme

In Tabelle 2.4 sind Bakterienstämme aufgelistet, die bei phänotypischen und genotypischen Untersuchungen als Kontrollstämme oder bei Konjugationsexperimenten als Rezipienten eingesetzt wurden. In Tabelle 2.5 sind alle klinischen Isolate angegeben, die als Donorstämme für Konjugationsversuche mit Klon I (Stamm I-05111) eingesetzt wurden. Diese Stämme besitzen konjugierbare plasmidkodierte AmpC- oder CTX-M- β -Laktamasen.

Tab 2.4: Labor- und Referenzstämmen

Bakterienstamm	Verwendung und Charakteristika	Standort der Dauerkultur
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	Typstamm, Referenzstamm für MHK-Bestimmungen, Wachstumskinetiken, Mutationsfrequenzen	13-03-73
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 27736	Referenzstamm für Wachstumskinetiken, Mutationsfrequenzen	13-03-54
<i>K. pneumoniae</i> PEG-8	Referenz für Porinpräparationen	13-03-81
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Kontrollstamm für MHK-Bestimmungen, β -Laktamase-negativ	04-10-03
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	Kontrollstamm für MHK-Bestimmungen, β -Laktamase-positiv	04-10-34
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Kontrollstamm für MHK-Bestimmungen, β -Laktamase-positiv	04-10-06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Kontrollstamm für MHK-Bestimmungen	04-10-11
<i>E. coli</i> W3110 <i>lac</i> ⁻ Rif ^R	Rezipient für Konjugationen, <i>lac</i> ⁻ , Rifampicin-resistent	10-03-02
<i>E. coli</i> MC-1061-4	Rezipient für Konjugationen, <i>lac</i> ⁻ , Rifampicin-resistent	10-03-13
<i>E. coli</i> R27	Referenz für Plasmidpräparationen (Plasmid R27)	10-04-63
<i>E. coli</i> V517	Referenz für Plasmidpräparationen (8 Plasmide)	10-04-64
<i>Enterobacter cloacae</i> 11-14	AmpC-Referenz für β -Laktamase-Gele und IEF (R1)	02-06-33
<i>E. coli</i> JM83 pBR322	TEM-1-Referenz für β -Laktamase-Gele und IEF (R2)	10-03-05
<i>E. coli</i> C2	CTX-M-2-Referenz für β -Laktamase-Gele und IEF (R3)	13-03-18
<i>P. aeruginosa</i>	PSE-1-Referenz für IEF (R4)	04-03-13
<i>E. coli</i> W3110	OXA-1-Referenz für IEF (R5)	04-03-08
<i>K. pneumoniae</i> S9	SHV-1-Referenz für IEF (R6)	00-00-00
<i>K. pneumoniae</i> 01-PV1	Stamm I-05111 nach Verlust der SHV-12	13-03-77

Tab. 2.5: Donorstämme für Konjugationen mit Klon I

Bakterienstamm	β -Laktamase	Referenz	Standort der Dauerkultur
<i>E. coli</i> 56	CMY-2 (AmpC)	SHERWOOD, 2004	10-04-45
<i>E. coli</i> 76	CMY-2 (AmpC)	SHERWOOD, 2000	10-03-08
<i>E. coli</i> Dp317	BIL-1 (AmpC)	PAYNE et al., 1992	10-07-45
<i>E. coli</i> BWU 2206	FOX-2 (AmpC)	BAUERNFEIND et al., 1997	10-07-50
<i>K. pneumoniae</i> HEL-1	CMY-2 (AmpC)	BAUERNFEIND et al., 1996	10-07-51
<i>K. pneumoniae</i> P20	LAT-1 (AmpC)	GAZOULI et al., 1996	10-07-22
<i>K. pneumoniae</i> N10	LAT-2 (AmpC)	GAZOULI et al., 1996	10-07-23
<i>K. pneumoniae</i> N12	LAT-2 (AmpC)	GAZOULI et al., 1996	10-07-24
<i>K. pneumoniae</i> T80	CTX-M-15	GAZOULI et al., 1996	10-07-25
<i>E. coli</i> E2	CTX-M-15	AL-AGAMY et al., 2006	13-03-64
<i>E. coli</i> E6	CTX-M-27	AL-AGAMY et al., 2006	13-03-65
<i>E. coli</i> E14	CTX-M-15	AL-AGAMY et al., 2006	13-03-66
<i>E. coli</i> E15	CTX-M-15	AL-AGAMY et al., 2006	13-03-67
<i>E. coli</i> E34	CTX-M-18	AL-AGAMY et al., 2006	13-03-68
<i>E. coli</i> E51	CTX-M-15	AL-AGAMY et al., 2006	13-03-69

2.1.1.3 Transkonjuganten

Durch Konjugationsversuche wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Transkonjuganten hergestellt, die in Tabelle 2.6 aufgelistet sind.

Tab. 2.6: Transkonjuganten

Transkonjugant	Donor	Rezipient	Standort der Dauerkultur
<i>K. pneumoniae</i> TK-A	<i>E. coli</i> 56	<i>K. pneumoniae</i> Klon I	13-03-28
<i>K. pneumoniae</i> TK-B			13-03-29
<i>K. pneumoniae</i> TK-C			13-03-30
<i>K. pneumoniae</i> TK-D			13-03-31
<i>K. pneumoniae</i> TK-E			13-03-32
<i>K. pneumoniae</i> TK-F			13-03-33
<i>K. pneumoniae</i> TK-G			13-03-34
<i>K. pneumoniae</i> TK-H			13-03-35
<i>K. pneumoniae</i> TK-I			13-03-36
<i>K. pneumoniae</i> TK-J			13-03-37
<i>K. pneumoniae</i> TK-K			13-03-38
<i>K. pneumoniae</i> TK-L			13-03-39
<i>K. pneumoniae</i> TK-M			13-03-40
<i>K. pneumoniae</i> TK-N			13-03-41
<i>K. pneumoniae</i> TK-O			13-03-42
<i>K. pneumoniae</i> TK-P			13-03-43
<i>E. coli</i> 01-CAZ-1	<i>K. pneumoniae</i> Klon I	<i>E. coli</i> W3110 <i>lac</i> ⁻ Rif ^R	13-06-41
<i>E. coli</i> 01-STR-2			13-06-38
<i>E. coli</i> 01-CMP-1			13-06-31
<i>E. coli</i> 01-CMP-2			13-06-32
<i>E. coli</i> 01-GEN-1			13-06-39
<i>E. coli</i> 15-CTX-2	<i>K. pneumoniae</i> Klon II-A	<i>E. coli</i> W3110 <i>lac</i> ⁻ Rif ^R	13-06-16
<i>E. coli</i> 15-STR-1			13-06-17
<i>E. coli</i> 12-CTX-1	<i>K. pneumoniae</i> Klon II-B1	<i>E. coli</i> W3110 <i>lac</i> ⁻ Rif ^R	13-06-25
<i>E. coli</i> 12-STR-12			13-06-28
<i>E. coli</i> 12-CMP-1			13-06-21
<i>E. coli</i> 18-CTX-1	<i>K. pneumoniae</i> Klon II-B2	<i>E. coli</i> W3110 <i>lac</i> ⁻ Rif ^R	13-06-05
<i>E. coli</i> 18-STR-3			13-06-08

2.1.2 Patienten

Im Rahmen der epidemiologischen Studien wurden Daten von insgesamt 47 Patienten erhoben, die mit multiresistenten *K. pneumoniae* kolonisiert waren oder deren Stuhlproben untersucht wurden. Alle Patienten sind im Zeitraum Januar 2002 bis April 2004 auf der anästhesiologischen, chirurgischen oder kardiochirurgischen Intensivstation der Universitätsklinik Bonn behandelt worden. Sie sind in Tabelle 2.7 aufgeführt.

Tab. 2.7: Patienten

Patienten-kürzel	Alter (Jahre)	Geschlecht	Intensivstation	Isolat	Stuhlproben	Ausbruch
CI-01	72	w	CI	+		I
CI-02	69	m	CI	+		I
CI-03	32	w	CI	+		I
CI-04	65	m	CI	+		I
CI-06	46	m	CI	+		I
CI-08	65	m	CI, AI			I
CI-09	71	m	CI	+		I
AI-22	51	w	AI			I
AI-23	27	m	AI	+		I
AI-01	37	m	AI			II
AI-02	69	m	AI			II
AI-03	64	w	CI, AI			II
AI-04	36	w	AI	+	+	II
AI-05	63	m	AI	+		II
AI-06	45	m	AI	+		II
AI-08	68	m	AI	+		II
AI-09	66	m	AI	+		II
AI-10	67	w	AI	+	+	II
AI-13	77	w	AI	+		II
AI-14	69	m	CI, AI, KI			II
AI-15	66	m	AI	+		II
AI-16	26	m	AI			II
AI-17	65	w	CI, AI	+	+	II
AI-18	12	m	AI			II
AI-19	55	m	CI, AI	+	+	II

Patienten-kürzel	Alter (Jahre)	Geschlecht	Intensivstation	Isolat	Stuhlproben	Ausbruch
AI-21	71	m	AI			II
CI-17	65	m	CI	+		II
CI-18	73	m	CI	+		II
CI-21	79	m	CI	+		II
CI-22	60	w	CI	+		II
CI-23	76	m	CI, AI	+	+	II
CI-24	74	m	AI, CI			II
CI-25	41	m	CI	+		II
CI-26	34	w	CI, AI			II
CI-27	62	m	CI, AI	+	+	II
CI-28	67	m	CI, AI		+	II
CI-29	59	m	CI, AI	+	+	II
CI-30	79	m	CI, AI	+		II
CI-31	60	w	AI, CI		+	II
CI-32	41	w	CI	+		II
CI-33	79	m	CI	+		II
CI-34	51	m	CI	+		II
CI-35	73	m	AI, CI	+		II
CI-36	80	m	CI	+		II
CI-37	76	m	CI, KI			II
KI-08	77	m	KI			II
KI-09	76	m	KI	+		II
ST-01	51	m	CI			II
ST-02	47	w	CI			II
ST-03	35	m	CI			II

AI: anästhesiologische Intensivstation, CI: chirurgische Intensivstation, KI: kardiochirurgische Intensivstation, m: männlich, w: weiblich

2.1.3 Antibiotika

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika sind in Tabelle 2.8 aufgeführt. Des Weiteren wurden zur MHK-Bestimmung Mikrotitrationsplatten der Firma MERLIN DIAGNOSTIKA eingesetzt, welche verschiedene Antibiotika in dehydratisierter Form enthielten.

Tab. 2.8: Antibiotika

Antibiotikum	Bezugsquelle
Amikacin	Bristol-Myers-Squibb GmbH, Regensburg
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ceftazidim	GlaxoWellcome GmbH & Co, Bad Oldesloe
Cefotaxim	Hoechst Marion Roussel, Frankfurt a.M.
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ciprofloxacin	Bayer AG, Leverkusen
Clavulansäure	Smith Kline Beecham Pharmaceuticals, Worthing, UK
Colistinsulfat	Grünenthal GmbH, Stolberg
Gentamicin	Merck KGaA, Darmstadt
Imipenem	Merck & Co Inc., West Point, PA, USA
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rifampicin	Fluka (Sigma-Aldrich GmbH, Seelze)
Streptomycin	Hoechst Marion Roussel, Frankfurt a.M.
Sulbactam	Pfizer GmbH, Karlsruhe

2.1.4 Enzyme

In Tabelle 2.9 sind alle Enzyme angegeben, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die für die optimale Aktivität der Enzyme erforderlichen Reaktionspuffer wurden in 10x-Konzentration mitgeliefert und nach Herstellerangabe verwendet.

Tab. 2.9: Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
DNase A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Lysozym	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Master-Taq [®] DNA-Polymerase	Eppendorf AG, Hamburg
NheI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Qiagen GmbH, Hilden
REDTaq [®] DNA Polymerase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RNaseA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Qiagen GmbH, Hilden
Taq-Polymerase	Promega, Madison, Wisconsin, USA
XbaI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.

2.1.5 Chemikalien und sonstige Materialien

In Tabelle 2.10 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und sonstigen Materialien unter Angabe des Herstellers aufgelistet.

Tab. 2.10: Chemikalien und Materialien

Chemikalien und Materialien	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Agar-Agar	Merck KGaA, Darmstadt
Agarose	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Agarose SeaKem ^R LE	Cambrex BioScience, Rockland, USA
Agarose, Small DNA	Biozym GmbH, Hess. Ollendorf
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories, München
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bac-Tracker (DNA-Größenstandard)	Epicentre Biotechnologies
Brij 58	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Serva GmbH, Heidelberg
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform p.A.	Merck KGaA, Darmstadt
Coomassie-Brilliant-Blau R-250	Merck KGaA, Darmstadt
Criterion IEF-Gel (3% Polyacrylamid, 2% Ampholyte, pH 3-10)	Bio-Rad Laboratories, München
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka (Sigma-Aldrich GmbH, Seelze)
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DNeasy Tissue Kit TM	Qiagen GmbH, Hilden
dNTPs	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Essigsäure	Riedel-de-Haen (Sigma-Aldrich GmbH, Seelze)
Ethanol p.A.	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ficoll	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Filterpapier	Schleicher und Schüll, Dassel
Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz	Merck KGaA, Darmstadt
GenePath PFGE Gel Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glucose	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Bio-Rad Laboratories, München
Hefeextrakt	Merck KGaA, Darmstadt
Indol-Reagenz	Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kalium-Natrium-Tartrat	Merck KGaA, Darmstadt
LMP-Agarose	BRL, Gaithersburg, USA
MC-207,110 (Phe-Arg-β-Naphthylamid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Fortsetzung Tab. 2.10: Chemikalien und Materialien

Chemikalien und Materialien	Hersteller
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Mikrotitrationsplatten Mikronaut E	Merlin Diagnostika, Bornheim
Mikrotitrationsplatten Mikronaut E	Merlin Diagnostika, Bornheim
MinElute PCR Purification Kit TM	Qiagen GmbH, Hilden
Mitsubishi Thermo Papier K61B	Mitsubishi, Japan
Na ₂ -EDTA	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Na-Desoxycholat	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Na-Lauroylsarcosin	Serva, Heidelberg
Nitrocefin	Oxoid, Basingstoke, England
Nitrocellulose-Filter	Sartorius, Göttingen
Parafilm	American National Can TM , Menasha, USA
Paraffinöl	Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim
PhaseLockGel TM Heavy 2ml	Eppendorf AG, Hamburg
Phenol	Merck KGaA, Darmstadt
Phosphorsäure 89%-ig	Merck KGaA, Darmstadt
Proteinmarker Broad Range	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
Proteinmarker Broad Range Prestained	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
SmartLadder (DNA-Größenstandard)	Eurogentec, Seraing, Belgien
SmartLadder SF (Small Fragment)	Eurogentec, Seraing, Belgien
Sterilfilter	Schleicher und Schüll, Dassel; Pall Corp., Ann Arbor, USA
TDA-Reagenz	Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim
TEMED	Bio-Rad Laboratories, München
Titriplex III (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt
Triton-X-100	Fluka (Sigma-Aldrich GmbH, Seelze)
Trizma Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trizma Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypton	MP Biomedicals Inc, Illkirch, France
Wasser, HPLC rein	Merck KGaA, Darmstadt
Xylencyanol	Fluka AG, Buchs, Schweiz

2.1.6 Lösungen und Puffer

In Tabelle 2.11 sind alle in dieser Arbeit eingesetzten Lösungen und Puffer unter Angabe des Herstellers oder der Zusammensetzung aufgeführt.

Tab. 2.11: Lösungen und Puffer

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung/Hersteller
BSA für Restriktionsverdau (100x)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
Coomassie-Färbelösung für SDS-PAGE	0,1% Coomassie-Brilliant-Blau R-250, 25% Methanol, 10% Essigsäure
Entfärbelösung für SDS-PAGE	20% Methanol, 10% Essigsäure
DNeasy Tissue Kit TM : ATL-Puffer, AL-Puffer, AW1-Puffer, AW2-Puffer, AE-Puffer	Qiagen GmbH, Hilden
Elektrophoresepuffer für SDS-PAGE	25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1% SDS
<u>Isoelektrische Fokussierung:</u> Kathodenpuffer Anodenpuffer Probenpuffer für IEF-Gele	20 mM Lysin, 20 mM Arginin (Bio-Rad Lab., München) 7 mM Phosphorsäure (440,5µl 89%ige Phosphorsäure ad 1000 ml H ₂ O) 30% Glycerin in A.demin.
Ladepuffer (für DNA- Gelelektrophorese)	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 15% Ficoll
MinElute PCR Purification Kit TM : PB-Puffer, PE-Puffer, EB-Puffer	Qiagen GmbH, Hilden
NEB2-Puffer für Restriktionsenzyme	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
Nitrocefin-Lösung	5 mg Nitrocefin in 0,5 ml DMSO ad 10 ml mit 0,1 M Sörensen-Phosphatpuffer
Physiologische Kochsalzlösung	0,9% NaCl in A.demin.
<u>PFGE:</u> Resuspensionspuffer TEN-1 Lysispuffer ES-Puffer ESP-Puffer TE-1-Puffer TE-2-Puffer NEB2-Puffer TBE-Puffer 10x PFGE-Ladepuffer für Blöckchen 1% Molecular Certified Agarose 20x Elektrophoresepuffer für PFGE	10 mM Tris, 10 mM EDTA, 0,1 M NaCl, pH 7,5 6 mM Tris, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, 0,5% Brij, 0,2% Na-Desoxycholat, 0,5% Na-Lauroylsarcosin, pH 7,5 0,5 M EDTA pH 9, 1% Na-Lauroylsarcosin 1 mg/ml Proteinase K in ES-Puffer 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0 10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,0 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM Dithiothreitol 1 M TrisBase, 1 M Borsäure, 4 mM EDTA, pH 8,5 200 mg Na ₂ -EDTA, 20 g Saccharose, 15 mg Bromphenolblau, 50 ml A.demin. Bio-Rad Laboratories GmbH, München Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<u>Plasmid-Präparation nach Maniatis:</u> Puffer P1 (Resuspensionspuffer) Puffer P2 (Lysis-Puffer) Puffer P3 (Neutralisationspuffer)	Qiagen GmbH, Hilden

Fortsetzung Tab. 2.11: Lösungen und Puffer

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung/Hersteller
<u>Plasmid-Präparation nach Tietze:</u>	
Puffer Pub1	20 mM 0,5 M EDTA (pH 8,0), 25 ml 1M Tris (pH 8,0), ad 1000 ml mit A.demin., nach dem Autoklavieren Zugabe von 23 ml 40% Glucose (steril), 5 ml RNaseA (10 mg/ml)
Puffer Pub2	4,4 ml steriles A.demin., 100 µl 10 N NaOH, 500 µl 10% SDS
Puffer Pub3	3 M K-Acetat pH 5,5
TB-Puffer 5x	54,5 g Tris, 27,5 g Borsäure, 3,7 g EDTA, ad 1000 ml mit A.demin., pH 8,3
<u>Proteinbestimmung nach Lowry:</u>	
Alkalisches Kupferreagenz	2% Lösung A, 2% Lösung B, 96% Lösung C
Lösung A	3% Na ₂ CO ₃ in 0,1 M NaOH
Lösung B	2% CuSO ₄ x 5H ₂ O
Lösung C	4% K-Na-Tartrat
<u>SDS-PAGE nach Laemmli:</u>	
Puffer 1 (Lower Tris)	1,5 M TrisHCl; pH 8,8
Puffer 2 (Upper Tris)	0,5 M TrisHCl; pH 6,8
10% APS	0,1 g Ammoniumpersulfat in 1 ml Aqua demin.
Elektrophoresepuffer 10x	6 g Tris, 28,8 g Glycin ad 200 ml
Laemmli-SDS-Probenpuffer	125 mM Tris/HCl pH 6,8, 25% Glycerin, 2% SDS, 0,01% Bromphenolblau, 5% β-Mercaptoethanol
Probenpuffer für β-Laktamase-Gele	125 mM Tris/HCl pH 6,8, 25% Glycerin, 2% SDS, 0,01% Bromphenolblau
Sörensen-Phosphatpuffer 0,1 M	0,1 M Na ₂ HPO ₄ , 0,1 M KH ₂ PO ₄ ; pH 7,0
STE-Puffer	0,1 M NaCl, 10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA; pH 8,0
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA; pH 8,0
TBE-Puffer	90 mM Tris/HCl, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA, pH 8,3
TE-Puffer	10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

2.1.7 Nährmedien

In Tabelle 2.12 sind die in dieser Arbeit zur Anzucht von Bakterien verwendeten Nährmedien angegeben. Die Fertig-Medien wurden entsprechend der Herstellerangaben eingewogen. Sämtliche Nährmedien wurden direkt nach der Einwaage in A.demin. gelöst und 15-20 min bei 121°C autoklaviert.

Tabelle 2.12: Nährmedien

Nährmedium	Bezugsquelle bzw. Herstellungsvorschrift
Chinablau-Lactose-Agar	Oxoid, Basingstoke, England
MacConkey-Agar No. 3 (CM115)	Oxoid, Basingstoke, England
MacConkey-Nährbouillon	Merck KGaA, Darmstadt
BBL™ Mueller Hinton II Agar	Becton, Dickinson & Co, Sparks USA
BBL™ Mueller Hinton II Bouillon (Kationen-adjustiert)	Becton, Dickinson & Co, Sparks USA
LB-Medium	1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl
LB-Agar	1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, 1,5% Agar-Agar
Standard-No.I-Nährbouillon	Merck KGaA, Darmstadt

2.1.8 Oligonukleotide

Die in der vorliegenden Arbeit als Primer zur Amplifikation und Sequenzierung eingesetzten Oligonukleotide sind der Tabelle 2.13 zu entnehmen. Sie wurden von der Firma OPERON (Köln) synthetisiert.

Tab. 2.13: Oligonukleotide

Bezeichnung	Target	Funktion	Sequenz 5' → 3'	Referenz
OmpK35-F	<i>ompK35</i>	A, S	TGGAAAGATGCCTCCAGACA	diese Arbeit
OmpK35-R		A, S	ATTGGTAAACGATACCCACGG	diese Arbeit
OmpK36-F	<i>ompK36</i>	A, S	TGGATTATTCTGCATTTTACAGC	diese Arbeit
OmpK36-R		A	AACCACGTCGTCGGTAGAGATA	diese Arbeit
L1730	<i>ompK36</i>	A, S	CGTGCTTAGAACTGGTAAACC	HERNANDEZ-ALLES et al., 1999a
AcrR-F	<i>acrR</i>	A, S	CCTATGGCACGAAAAACCAA	diese Arbeit
AcrR-R		A, S	TTAAGCTGACAAGCTCTCCG	
SHV-1	<i>bla_{SHV}</i>	A, S	ATGCGTTATATTCGCCTGTG	WIEGAND, pers.Mitteilung
SHV-2		A, S	GTTAGCGTTGCCAGTGCTCG	
NI-1	<i>bla_{SHV}</i>	A, S	GCCCGGGTTATTCTTATTTGTCCG	NÜESCH-INDERBINEN et al., 1996
NI-2		A, S	TCTTTCCGATGCCGCCAGTCA	
OT3	<i>bla_{TEM}</i>	A, S	ATGAGTATTCAACATTTCCG	ARLET et al., 1995
OT4		A, S	CCAATGCTTAATCAGTGAGG	
TEM-T1	<i>bla_{TEM}</i>	A, S	ATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTC	WIEGAND, pers.Mitteilung
TEM-T3		A, S	TTGGTCTGACAGTTACCAATGC	
CTX-MA	<i>bla_{CTX-M}</i>	A, S	CGCTTTGCGATGTGCAG	BONNET et al., 2001
CTX-MB		A, S	ACCGCGATATCGTTGGT	
CTXM-2-F	<i>bla_{CTX-M-2}</i>	A, S	ATGATGACTCAGAGCATTCG	STEWART et al., 2001
CTXM-2-R		A, S	TTATTGCATCAGAAACCGTG	
ALA2	<i>bla_{CTX-M}</i> Gruppe 1	A	ATGGTTAAAAAATCACTGCG	BARANIAK et al., 2002
P2D		A	CAGCGCTTTTGCCGTGTAAG	
CTXM-C1	<i>bla_{CTX-M}</i> Gruppe 9	A	AACACGGATTGACCGTCTTG	CHANAWONG et al., 2002
CTXM-C2		A	TTACAGCCCTTCGGCGAT	

Fortsetzung Tab. 2.13: Oligonukleotide

Bezeichnung	Target	Funktion	Sequenz 5' → 3'	Referenz
CTXM-2for	<i>bla</i> _{CTX-M} Gruppe 2	A	CGACGCTACCCCTGCTATT	WOODFORD et al., 2005
CTXM-2rev		A	CCAGCGTCAGATTTTTTCAGG	
CTXM-1for	<i>bla</i> _{CTX-M} Gruppe 1	A	AAAAATCACTGCGCCAGTTC	WOODFORD et al., 2005
CTXM-1rev		A	AGCTTATTCATCGCCACGTT	
CTXM-9for	<i>bla</i> _{CTX-M} Gruppe 9	A	CAAAGAGAGTGAACGGATG	WOODFORD et al., 2005
CTXM-9rev		A	ATTGGAAAGCGTTCATCACC	
CTXM-8for	<i>bla</i> _{CTX-M-8}	A	ACATGCCGTTAAGCGGAT	WOODFORD et al., 2005
CTXM-25for	<i>bla</i> _{CTX-M-25/26}	A	GCACGATGACATTCGGG	
CTXM-25rev	<i>bla</i> _{CTX-M-25/26/8}	A	AACCCACGATGTGGGTAGC	
AmpC-P1	<i>ampC</i>	A	GGATTCCGGGTATGGCSGTNGC	SHERWOOD, 2000
AmpC-P4		A	TCCCAGCCTARYCCCTGRTACAT	
AmpC-C1	<i>ampC</i> _{Citrobacter}	A, S	ATGATGAAAAAATCGTTATGC	KOECK et al., 1997
AmpC-C2		A, S	TTGCAGCTTTTCAAGAATGCGC	
IMP AS	<i>bla</i> _{IMP}	A	TCYCCAAAYTTCACRTGACT	YATSUYANAGI et al., 2004
IMP S		A	AAAGATACTGAAAAGTTAGT	
VIM AS	<i>bla</i> _{VIM}	A	GAATGCGCAGCACCAGGAT	YATSUYANAGI et al., 2004
VIM S		A	CCGATGGTGTTTGGTTCGCAT	
OXA-IA	OXA-Gruppe I (OXA-10-Gr.)	A	TCAACAAATCGCCAGAGAAG	BERT et al., 2002
OXA-IB		A	TCCCACACCAGAAAAACCAG	
OXA-2f	OXA-Gr. II (OXA-2-Gr.)	A	AAGAAACGCTACTCGCCTGC	BERT et al., 2002
OXA-2r		A	CCACTCAACCCATCCTACCC	
OXA-F	OXA-Gr. III (OXA-1-Gr.)	A	TTTTCTGTTGTTTGGGTTTT	BERT et al., 2002
OXA-R		A	TTTCTTGGCTTTTATGCTTG	
GyrA 5-1	<i>gyrA</i>	A, S	GAATCCGGGATACAGTAGAGGGATAG	ABU MRAHEIL, 1999
GyrA 3-1		A, S	GGAATTTTGGTTGGCATGACGTCCGGA	
ParC S	<i>parC</i>	A, S	GTATGCGATGTCTGAACTGGGCCTG	HEISIG, 1996
ParC U		A, S	ACCGGGATTTCGGTGTAACGCATTGC	
int1-F	<i>intI1</i>	A	CCTCCCGCACGATGATC	GOLDSTEIN et al., 2001
int1-R		A	TCCACGCATCGTCAGGC	
5'CS	5'-konservierte Region Klas- sel-Integrans	A, S	GGCATCCAAGCAGCAAG	LEVESQUE et al., 1995
3'CS	3'-konservierte Region Klas- sel-Integrans	A, S	AAGCAGACTTGACCTGA	
IS1-F	<i>isI</i>	A	TTAAAAAACTCAGGCCGAGTCG	SHERWOOD, 2004
IS1-R		A	ATTCATAMAGCGGCCAGCCATC	
IS1-F2		A, S	GCCGTTCATAGCCATATCAATG	
aph(3)-Ia-F	<i>aph(3')-Ia</i>	A, S	TTATGCCTCTTCCGACCATC	NG et al., 1999
aph(3)-Ia-R		A, S	GAGAAAACTCACCGAGGCAG	
aac(3)-Ia-F	<i>aac(3)-Ia</i>	A	ACCTACTCCCAACATCAGCC	CHOI et al., 2002
aac(3)-Ia-R		A	ATATAGATCTCACTACGCGGCT	
aac(3)-IIc-F	<i>aac(3)-IIc</i>	A, S	ACTGTGATGGGATACGCGTC	CHOI et al., 2002
aac(3)-IIc-R		A, S	CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA	
aac(3)-IVa-F	<i>aac(3)-IVa</i>	A	CTTCAGGATGGCAAGTTGGT	CHOI et al., 2002
aac(3)-IVa-R		A	TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	
aac(6')-Ib-F	<i>aac(6')-Ib</i>	A, S	TATGAGTGGCTAAATCGAT	CHOI et al., 2002
aac(6')-Ib-R		A, S	CCCCTTTCTCGTAGCA	

Fortsetzung Tab. 2.13: Oligonukleotide

Bezeichnung	Target	Funktion	Sequenz 5' → 3'	Referenz
ant(2'')-Ia-F	<i>ant(2'')-Ia</i>	A	ACACAACGCAGGTCACA	CHOI et al., 2002
ant(2'')-Ia-R		A	CATGCGAGCCTGTAGGA	
ant(4')-IIa-F	<i>ant(4')-IIa</i>	A	ATCGATCGTCTGCGAGA	CHOI et al., 2002
ant(4')-IIa-R		A	CGACCAGACCCATGCA	
aac(6')-II-F	<i>aac(6')-II</i>	A	CCSCACATHGTYGARTGGTGGGG	SHERWOOD, 2004
aac(6')-II-R		A	GCCTTCTCRTAGCAGCGWATGGC	
ant(3)Ia-F	<i>ant(3'')-Ia</i>	A, S	GTGGATGGCGGCCTGAAGCC	NOGRADY et al., 2003
ant(3)Ia-B		A, S	ATTGCCAGTCGGCAGCG	
strA-F	<i>aph(3'')-I</i>	A, S	TGACTGGTTGCTGTGAGAGG	KEHRENBERG & SCHWARZ, 2001
strA-R		A, S	CCAGTTCTCTTCGGCGTTAGCA	
strB-F	<i>aph(6)-I</i>	A, S	ATCGTCAAGGGATTGAAACC	GEBREYES & ALTIER, 2002
strB-R		A, S	GGATCGTAGAACATATTG	
sulI-F	<i>sulI</i>	A, S	CTTCGATGAGAGCCGGCGGC	SANDVANG et al., 1997
sulI-B		A, S	GCAAGGCGGAAACCCGCGCC	
sulII-F	<i>sulII</i>	A, S	ACAGTTTCTCCGATGGAGGCC	KEHRENBERG & SCHWARZ, 2001
sulII-R		A, S	CTCGTGTGTGCGGATGAAGTC	
tet(A)-F	<i>tet(A)</i>	A	GCTACATCCTGCTTGCCTTC	Ng et al., 2001
tet(A)-R		A	CATAGATCGCCGTGAAGAGG	
tet(B)-F	<i>tet(B)</i>	A	TTGGTTAGGGCAAGTTTTG	Ng et al., 2001
tet(B)-R		A	GTAATGGGCCAATAACACCG	
tet(C)-F	<i>tet(C)</i>	A	CTTGAGAGCCTTCAACCCAG	Ng et al., 2001
tet(C)-R		A	ATGGTCGTCATCTACCTGCC	
tet(D)-F	<i>tet(D)</i>	A	AAACCATTACGGCATTCTGC	Ng et al., 2001
tet(D)-R		A	GACCGGATACACCATCCATC	
tet(E)-F	<i>tet(E)</i>	A	AAACCACATCCTCCATACGC	Ng et al., 2001
tet(E)-R		A	AAATAGGCCACAACCGTCAG	
tet(G)-F	<i>tet(G)</i>	A	GCTCGGTGGTATCTCTGCTC	Ng et al., 2001
tet(G)-R		A	AGCAACAGAATCGGGAACAC	
catI-F	<i>catI</i>	A, S	GGCATTTCAGTCAGTTG	VASSORT-BRUNEAU et al., 1996
catI-R		A, S	CCGCCCTGCCACTCATC	
catII-F	<i>catII</i>	A	CCTGGAACCGCAGAGAAC	VASSORT-BRUNEAU et al., 1996
catII-R		A	CCTGCTGAAACTTTGCCA	
catIII-F	<i>catIII</i>	A	ATTGGGTTCCCGTGAGC	VASSORT-BRUNEAU et al., 1996
catIII-R		A	AGTCTATCCCCTTCTTG	
catB-FA	<i>catB</i>	A	TAYAGCTAYTAYTCYGGYTAYTAYC	SHERWOOD, 2004
catB-RC		A	GARCCDATCCAACVACRTCATKDCC	
cml-F	<i>cmlA</i>		CCGCCACGGTGTGTTGTTATC	KEYES et al., 2000
cml-R			CACCTTGCCTGCCATCATTAG	
flo-F	<i>flo</i>	A	TATCTCCCTGTGCTCCAG	KEYES et al., 2000
flo-R		A	AGAACTCGCCGATCAATG	
qnr-F	<i>qnrB</i>	A	GGGTATGGATATTATTGATAAAG	WANG et al., 2003
qnr-R		A	CTAATCCGGCAGCACTATTA	

IUB-Code gemischter Basen: M = A+C, S = G+C, R = A+G, Y = C+T, W = A+T, K = G+T, V = A+G+C, H = A+C+T, D = A+G+T, B = G+C+T, N = A+T+C+G, A: Amplifikation, S: Sequenzierung

2.1.9 Geräte

Alle in dieser Arbeit genutzten Geräte sind in Tabelle 2.14 aufgelistet.

Tab. 2.14: Geräte

Geräte	Hersteller
Achtkanalpipette Titertek, Multistep	Labsystems, Helsinki, Finnland
Analog-pH-Meter CG 810	Schott, Hofheim
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Auslaufstäbe, Glas	Glasbläser Eich, Bonn
Biofuge 28S, Rotoren 3042, 3751	Heraeus, Osterode
Brutschrank	Heraeus, Osterode
Electrophoresis Power Supply	LKB Pharmacia, Freiburg
Electrophoresis Power Supply	Gibco BRL, Eggenstein
Electrophoresis Power Supply PowerPac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Eppendorf MiniSpin	Eppendorf AG, Hamburg
Geldokumentations-System Gel Doc EC mit Software QuantityOne®	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gelelektrophorese-Apparatur Typ 30015 und 300414	Renner, Dannstadt
Gelkammer Mini-Protean 3	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gelkammer Criterion	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Heizrührer	Cenco Instrumente, Breda, Niederlande
Heizwasserbad Julabo MWB	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
iCycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Kolbenhubpipetten Gilson Pipetman P2, P20, P100, P200, P1000, P5000	Abimed, Langenfeld
Kolbenhubpipette Eppendorf 10µl	Eppendorf AG, Hamburg
Kühlzentrifuge J2-21, Rotor JA-10	Beckman Instruments GmbH, München
Labsystems Multiskan Photometer	Labsystems, Helsinki, Finnland
Mikrotiterplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen
PCR Uno-Thermoblock	Biometra, Göttingen
PFGE-Gerät GenePath™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Reinstwasseranlage Easy Pure LF®	Barnstead, Dubuque, USA
Rollinkubator	Schütt, Göttingen
Scanner Agfa e40	Agfa-Gevaert AG, Leverkusen
Schüttelinkubator Certomat H	Braun Biotech
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific Co, New Jersey, USA
Schüttelwasserbad GFL 1083	GFL, Burgwedel
Spectrophotometer Novaspec® II	Pharmacia Biotech, Freiburg
Sterilfilter-Einheit FP30/0,2 CA-S	Schleicher & Schuell, Dassel
Ultraschallprozessor UP 50H	Dr. Hielscher GmbH, Teltow
Ultrazentrifuge L8-55 mit Rotor 60Ti	Beckman Instruments GmbH, München
Universalwaage	Sartorius, Göttingen

Fortsetzung Tab. 2.14: Geräte

Geräte	Hersteller
UV-Bank	Biometra GmbH, Göttingen
Videodokumentationsanlage mit Programm WINCAM 2.2 und Thermoprinter	INTAS, Göttingen Cybertec, Berlin (über INTAS) Mitsubishi, Japan
Vortexer VortexGenie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA

2.2 Epidemiologische Methoden

2.2.1 Datenerhebung

Resistenzdaten:

Auf der anästhesiologischen (AI), chirurgischen (CI) und kardiochirurgischen (KI) Intensivstation der Universitätsklinik Bonn wurden im Zeitraum Januar 2002 bis April 2004 nosokomiale Ausbrüche multiresistenter *K. pneumoniae* dokumentiert. Dies erfolgte durch retrospektive Analyse der mikrobiologischen Befunde und der zugehörigen Antibiotika-Testresultate (Antibiogramme).

Nach §23 IfSchG (Infektions-Schutzgesetz) müssen Erreger mit speziellen Resistenzen und Multiresistenzen, die in der Klinik isoliert werden, durch gesonderte Niederschrift dokumentiert werden. Dadurch war es möglich, alle im Studienzeitraum in den mikrobiologischen Untersuchungen der drei Intensivstationen aufgetretenen *K.-pneumoniae*-Isolate mit Einfach- oder Mehrfachresistenz als Datensatz zu erfassen. Ein solcher Datensatz bestand aus folgenden Angaben:

- Stammnummer
- Patientenkürzel
- Station
- Untersuchungsmaterial
- Entnahmedatum
- Antibiogramm

Das Antibiogramm bestand jeweils aus Resistenzdaten gegenüber 16 mittels Agar-Diffusionstest geprüften Substanzen: Ampicillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Ampicillin/Sulbactam, Mezlocillin, Piperacillin, Piperacillin/Tazobactam, Ceftazidim, Cefotaxim, Ceftriaxon, Cefazolin, Cefoxitin, Ciprofloxacin, Gentamicin, Tobramycin, Amikacin, Imipenem/Meropenem.

Die Testresultate dieser Substanzen waren als resistent, intermediär oder sensibel angegeben. Anhand der Resistenzmuster, die sich aus den Antibiogrammen ergaben, wurden die Datensätze zu Gruppen mit gleichem oder ähnlichem Resistenzphänotyp zusammengefasst. Auf diese Weise konnte das dominierende Resistenzmuster des Ausbruchsstammes identifiziert werden.

Patientendaten:

Alle Patienten, deren Befunde ein oder mehrere Isolate des dominierenden Resistenzmusters aufwiesen, wurden in die weitere Datenerhebung einbezogen.

Aus den medizinischen Akten dieser Patienten wurden für jeden Tag ihres Aufenthaltes auf den Intensivstationen die folgenden Daten erhoben:

- Mikrobiologische Befunde: Material, Ergebnis (*K. pneumoniae* / andere Spezies / kein Wachstum)
- Antibiotika-Therapie: Substanz und Dosierung (nur für Ausbruch 2)
- Beatmung: maschinell beatmet / spontan atmend (nur für Ausbruch 2)

2.2.2 Stuhlproben

Zur Untersuchung einer möglichen intestinalen Kolonisation mit *K. pneumoniae* wurden im Zeitraum Dezember 2003 bis Januar 2004 insgesamt 31 Stuhlproben von 12 verschiedenen Patienten der anästhesiologischen und chirurgischen Intensivstation quantitativ analysiert (vgl. 2.3.7). Stichprobenartig wurden ebenfalls neun Stuhlproben des Pflegepersonals dieser Stationen untersucht.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Identifizierung mit Micronaut E

Zur Identifizierung bzw. Reidentifizierung der Isolate wurde das Micronaut-E-System (MERLIN DIAGNOSTIKA) verwendet. Dieses Identifizierungssystem für *Enterobacteriaceae* und andere gramnegative, Oxidase-negative Bakterienarten basiert auf 21 unterschiedlichen biochemischen Reaktionen in Mikrotitrationsplatten, deren Nachweis über Säure-Indikatoren, Trübung der Suspension oder chromogene Substrate erfolgt.

Von 18-24 h bebrüteten Übernachtskulturen auf Mueller Hinton (MH) Agar wurden Einzelkolonien in physiologischer Kochsalzlösung (0,9%iger NaCl-Lösung) suspendiert. Die optische Dichte der Suspension wurde photometrisch auf eine OD_{560} von $0,12 \pm 0,02$ eingestellt, was dem MacFarland-Standard 0,5 und somit einer Zelldichte von ca. 1×10^8 KBE/ml entspricht. Mit Hilfe einer Mehrkanalpipette wurden jeweils 100 μ l der Bakteriensuspension in die Vertiefungen der Micronaut-E-Mikrotitrationsplatten geimpft. Einzelne Kavitäten wurden nach Angaben des Herstellers mit Paraffinöl überschichtet, die Platte anschließend mit Folie abgeklebt und 18-24 h bei 37°C bebrütet. Nach der Inkubation wurde einzelnen Vertiefungen nach Herstellerangabe Indol- bzw. TDA-Reagenz zugefügt. Anschließend wurden die Platten photometrisch abgelesen, die Auswertung erfolgte über die zugehörige Computersoftware MCN.

2.3.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) ist ein Maß für die Empfindlichkeit eines Bakterienstammes gegenüber einem bestimmten Antibiotikum. Sie ist definiert als die geringste Konzentration eines Antibiotikums, die gerade ausreicht, um unter definierten Bedingungen ein sichtbares Bakterienwachstum zu verhindern. Die MHK-Bestimmung erfolgte mit Hilfe eines standardisierten Mikrodilutionsverfahrens in Mikrotitrationsplatten nach den Empfehlungen des European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

Zur MHK-Bestimmung wurden zum Teil Micronaut-S-Mikrotitrationsplatten (MERLIN DIAGNOSTIKA) verwendet. Diese Platten enthalten Antibiotika in dehydratisierter Form, die durch Zugabe einer Bakteriensuspension wieder rehydratisiert werden können. Weitere Mikrotitrationsplatten zur MHK-Bestimmung wurden durch Eintropfen von jeweils 50 μ l der Antibiotikallösungen hergestellt und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

Zur Herstellung des Inokulums wurden Einzelkolonien von 18-24 h bebrüteten Übernachtskulturen (MH-Agar) in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und wie unter 2.3.1 beschrieben auf eine Zelldichte von ca. 1×10^8 KBE/ml eingestellt. Diese Bakteriensuspension

wurde anschließend in MH-Bouillon auf eine finale Keimzahl von 5×10^5 KBE/ml verdünnt. Mittels einer Mehrkanalpipette wurden jeweils 100 μ l der Bakteriensuspension (bzw. 50 μ l einer doppelt konzentrierten Suspension für die selbst hergestellten Testplatten) in die Vertiefungen der Mikrotitrationsplatten geimpft. Die abgedeckten Mikrotitrationsplatten wurden anschließend 18-22 h bei 37°C inkubiert und visuell ausgewertet.

Zur Einordnung der Stämme als resistent, intermediär oder empfindlich wurden die Grenzwerte nach DIN 58940 (DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG, 2004) bzw. nach EUCAST verwendet. Zur Qualitätssicherung wurden bei jeder MHK-Bestimmung der *K.-pneumoniae*-Typstamm ATCC 13883, sowie alternierend die Kontrollstämme *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 27853 oder *S. aureus* ATCC 29213 getestet.

2.3.3 Keimzahlbestimmung

Die Anzahl lebensfähiger Zellen in einer Bakteriensuspension wurde durch eine Verdünnungsreihe in physiologischer Kochsalzlösung ermittelt. Die Verdünnung erfolgte in Schritten von jeweils 1:10 je nach der erwarteten Keimzahl über mehrere Zehnerpotenzen. Je 50 μ l der geeigneten Verdünnungsstufen wurden auf MH-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Kolonien ausgezählt und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) pro ml Bakteriensuspension berechnet. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt bei 20 KBE/ml. Lag die zu erwartende Keimzahl unter dieser Nachweisgrenze, so wurde 1 ml der unverdünnten Probe ausplattiert, wodurch die Nachweisgrenze auf 1 KBE/ml gesenkt werden konnte. Alle Keimzahlbestimmungen wurden als Mehrfachbestimmungen durchgeführt.

2.3.4 Wachstumskinetiken zur Bestimmung der Generationszeit

Die Vermehrung von Bakterien erfolgt als exponentielles Wachstum durch binäre Teilung. In einer statischen Bakterienkultur gliedert sich das Wachstum in mehrere Phasen: Mit dem Animpfen der Kultur beginnt die Anlaufphase (lag-Phase), in der eine Anpassung an das vorliegende Medium und die Wachstumsbedingungen erfolgt. Das Erreichen der maximalen Teilungsrate kennzeichnet den Beginn der exponentiellen Phase (log-Phase). In dieser Wachstumsphase vermehren sich die Bakterien mit ihrer für die vorliegenden Bedingungen charakteristischen minimalen Generationszeit. Mit abnehmender Wachstumsrate geht die Kultur in die stationäre Phase über, in der aufgrund von Nährstoffmangel, hoher Zelldichte und Ansammlung toxischer Stoffwechselprodukte keine Zunahme der Zellzahl mehr erfolgt. Abhängig von ihrer Empfindlichkeit können die Zellen lange in dieser Phase bleiben, bevor sich die Absterbephase anschließt.

Die Generationszeit einer Bakterienkultur wird innerhalb der exponentiellen Phase mit Hilfe einer Wachstumskurve und folgender Formel ermittelt:

<u>Berechnung der Anzahl der Teilungen n:</u>	
$N = N_0 \times 2^n$	n: Anzahl der Zellteilungen
$\lg N = \lg (N_0 \times 2^n) = \lg N_0 + n \lg 2$	N: Zellzahl nach n Teilungen zum Zeitpunkt t
$n = (\lg N - \lg N_0) / \lg 2$	N_0 : Zellzahl zum Zeitpunkt t_0
<u>Berechnung der Teilungsrate v:</u>	
$v = n / (t - t_0) = (\lg N - \lg N_0) / \lg 2 \times (t - t_0)$	m: Steigung der Regressionsgeraden im Bereich der log-Phase bei halblogarithmischer Auftragung der Wachstumskurve
$\Rightarrow v \times \lg 2 = (\lg N - \lg N_0) / (t - t_0)$	
$(\lg N - \lg N_0) / (t - t_0) = m \quad \Rightarrow \quad v = m / \lg 2$	
<u>Berechnung der Generationszeit g:</u>	
$g = 1 / v \quad \Rightarrow \quad g = \lg 2 / m$	

Zur Bestimmung der Generationszeit eines Bakterienstammes wurde eine statische Kultur unter standardisierten Bedingungen angeimpft. Der Stamm wurde aus Dauerkultur auf MH-Agar ausgeimpft, über Nacht bei 37°C bebrütet, einmal auf MH-Agar passagiert und erneut über Nacht bei 37°C inkubiert. Von dieser Agarplatte wurden Einzelkolonien in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und wie unter 2.3.1 beschrieben auf eine Zelldichte von ca. 1×10^8 KBE/ml eingestellt. Diese Suspension wurde 1:10.000 in 100 ml MH-Bouillon verdünnt, so dass eine Ausgangskeimzahl von 1×10^4 KBE/ml vorlag. Die Kultur wurde im Schüttelinkubator bei 37°C und 120 upm inkubiert. In Abständen von 30 min wurden Proben zur Keimzahlbestimmung entnommen. Die Werte wurden als halblogarithmische Wachstumskurve aufgetragen. Aus einem Bereich der exponentiellen Phase, der mindestens 10 Werte umfasste, wurde die minimale Generationszeit des Stammes berechnet.

2.3.5 Bestimmung der Mutationsfrequenz

Für ausgewählte Stämme wurden die Mutationsfrequenzen für Carbapenem-Resistenz vermittelnde Mutationen sowie als Kontrolle die Mutationsfrequenzen für Rifampicin-Resistenz vermittelnde Mutationen bestimmt. Hierzu wurden 25 ml einer 16 h-Übernachtskultur (MH-Bouillon) des jeweiligen Stammes abgeerntet (10 min, 5.300 upm, 4°C, Rotor 3751), in 4 ml physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert und in Dezimalschritten verdünnt. Von den Verdünnungsstufen 10^0 - 10^{-2} wurden jeweils 4x 250 µl auf Imipenem-Agar (MH-Agar supplementiert mit 4 µg/ml bzw. 8 µg/ml Imipenem) sowie 4x 250 µl auf Rifampicin-Agar

(MH-Agar supplementiert mit 100 µg/ml bzw. 200 µg/ml Rifampicin) ausplattiert und 48 h bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurde unter Verwendung der Verdünnungsstufen 10^{-6} - 10^{-10} eine Keimzahlbestimmung auf MH-Agar als Dreifachbestimmung durchgeführt. Der Quotient aus der Anzahl der Rifampicin-resistenten bzw. Imipenem-resistenten Mutanten (Selektivagar) und der Keimzahl der Gesamtpopulation (MH-Agar) ergab die Mutationsfrequenz des Teststammes. Die Mutationsfrequenz wurde für jeden Stamm doppelt bestimmt. Als Kontrolle wurden die Mutationsfrequenzen der ATCC-Stämme *K. pneumoniae* ATCC 13883 und *K. pneumoniae* ATCC 27736 bestimmt.

2.3.6 Effluxpumpen-Inhibitionstest

Die Überexpression von Effluxpumpen wurde mit Hilfe des Effluxpumpen-Inhibitionstests untersucht (LOMOVSKAYA et al., 2001). Hierzu wurde die MHK verschiedener Antibiotika jeweils in An- und Abwesenheit des Breitspektrum-Effluxpumpen-Inhibitors MC-207,110 (Phe-Arg-β-Naphthylamid, 20 µg/ml) mit einem Inokulum von 1×10^4 KBE/ml bestimmt.

2.3.7 Untersuchung von Stuhlproben

2.3.7.1 Probenentnahme

Die in dieser Studie verwendeten Stuhlproben von Patienten der anästhesiologischen und der chirurgischen Intensivstation wurden freundlicherweise durch das Pflegepersonal der Stationen entnommen und an das Hygiene-Institut geschickt. Dort wurden sie bis zur weiteren Untersuchung für maximal 10 Tage bei -20°C eingefroren. Stuhlproben des Pflegepersonals wurden auf freiwilliger Basis mit einem anonymisierten Begleitschein an das Hygiene-Institut übersandt und dort ebenfalls für maximal 10 Tage bei -20°C eingefroren.

2.3.7.2 Aufbereitung und Untersuchung der Stuhlproben

Zur quantitativen Bestimmung des Keimgehaltes der Stuhlproben wurde 0,2-0,3g Stuhlmasse abgewogen, mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:100 verdünnt und durch Schütteln gelöst. Ausgehend von dieser Suspension (Verdünnungsstufe 10^{-2}) wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt.

2.3.7.2.1 Bestimmung der Gesamtkeimzahl der *Enterobacteriaceae* in den Stuhlproben

Je 50 µl der Verdünnungsstufen 10^{-2} - 10^{-7} wurden auf MacConkey-Agar No.3 ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Kolonien ausgezählt und die Anzahl

der koloniebildenden Einheiten (KBE) pro g Stuhlmasse berechnet. MacConkey-Agar No.3 ist ein Selektivmedium zur Isolierung coliformer Bakterienspezies sowie *Salmonella* und *Shigella*. Das Medium hemmt aufgrund seines Gehaltes an Gallensalzen und Kristallviolett das Wachstum grampositiver Bakterien. Durch die enthaltene Lactose und den pH-Indikator Neutralrot können außerdem Lactose-Fermenter nachgewiesen werden. Auf diesem Nährboden bildet *K. pneumoniae* charakteristische hellviolette, schleimige Kolonien und ist somit bereits aufgrund der Koloniemorphologie von anderen *Enterobacteriaceae* unterscheidbar.

2.3.7.2.2 Bestimmung der Keimzahl resistenter *K. pneumoniae* in den Stuhlproben

Zur Bestimmung der Keimzahl resistenter *K. pneumoniae* in den Stuhlproben wurde MacConkey-Selektivagar (supplementiert mit 2 µg/ml Ciprofloxacin und 4 µg/ml Cefotaxim) genutzt. Je 50 µl der Verdünnungsstufen 10^{-2} - 10^{-5} wurden auf diesem Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kolonien wurden ausgezählt und die Anzahl der KBE pro g Stuhlmasse berechnet.

2.3.7.2.3 Anreicherungskulturen

Um auch resistente *K. pneumoniae* zu isolieren, deren Keimzahl unter der Nachweisgrenze der Keimzahlbestimmung lag, wurde jeweils 1 ml der Verdünnungsstufe 10^{-2} in ein Röhrchen mit 9 ml Standard-No.I-Nährbouillon (supplementiert mit 2 µg/ml Ciprofloxacin und 4 µg/ml Cefotaxim) pipettiert und über Nacht im Schüttler bei 120 upm und 37°C inkubiert. Aus diesen Anreicherungskulturen wurde anschließend eine Verdünnungsreihe hergestellt und zur Bestimmung der Keimzahl je 50 µl der Verdünnungsstufen 10^{-0} - 10^{-7} auf MacConkey-Selektivagar (2 µg/ml Ciprofloxacin, 4 µg/ml Cefotaxim) ausplattiert.

2.3.7.2.4 Isolierung der Stämme

Die auf den Selektionsplatten gewachsenen *K.-pneumoniae*-Kolonien wurden gepickt (zwei repräsentative Isolate pro Stuhlprobe), zur Vereinzelung nochmals auf MacConkey-Selektivagar (2 µg/ml Ciprofloxacin, 4 µg/ml Cefotaxim) ausgestrichen und über Nacht bebrütet. Zur Reinheitskontrolle wurde diese Kultur auf MH-Agar ausgestrichen, über Nacht inkubiert, anschließend in Dauerkultur überimpft und bei -70°C eingefroren.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Präparation von Membranproteinen der äußeren Membran

Um Porine gelelektrophoretisch nachweisen zu können, müssen sie zunächst aufgereinigt werden. Da es sich um integrale Membranproteine der äußeren Membran gramnegativer Bak-

terien handelt, werden diese äußeren Membranen während der Präparation von den Cytoplasmamembranen getrennt. Hierzu wurde eine modifizierte Methode nach FILIP et al. (1973) und TOMAS et al. (1986) eingesetzt.

Eine Übernachtskultur wurde 1:50 in 500 ml frischem LB-Medium verdünnt und im Schüttelinkubator bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,6 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgeerntet (7.000 upm, 5.400 g, 10 min, 4°C, Rotor JA-10), zweimal in je 100 ml eiskaltem 10 mM Tris-Puffer (pH 7,5) gewaschen, in 10 ml 10 mM Tris-Puffer (pH 7,5) aufgenommen und zur Erleichterung des Zellaufschlusses über Nacht bei -20°C eingefroren.

Zum Zellaufschluss wurden die Proben aufgetaut und nach Zugabe von Lysozym (Endkonzentration 200 µg/ml), RNase (Endkonzentration 100 µg/ml) und DNase (Endkonzentration 100 µg/ml) für 1 h auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mittels Ultraschall im Eisbad aufgeschlossen. Hierzu wurden die Proben fünfmal für je 20 sec mit Ultraschall behandelt und dazwischen für jeweils 30 sec auf Eis abgekühlt. Durch anschließende Zentrifugation (5.300 upm, 4°C, 15 min, Rotor 3751) wurden unlösliche Zellbestandteile entfernt. Aus dem Überstand wurde die Membranfraktion durch Ultrazentrifugation (37.000 upm, 100.000 g, 1 h, 4°C) sedimentiert. Das Pellet wurde in 10 ml 10 mM Tris-Puffer (pH 7,5) mit 2% Natrium-Lauroylsarcosinat resuspendiert und 30 min bei RT inkubiert. Das Detergenz bewirkt eine selektive Solubilisierung der Cytoplasmamembranen, während die äußeren Membranen unlöslich bleiben und durch erneute Ultrazentrifugation (100.000 g, 1 h, 4°C) sedimentiert werden können. Dieser Schritt wurde wiederholt, anschließend wurde das Pellet in 250 µl 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5) mit 5 mM $MgCl_2$ aufgenommen und bei -20°C eingefroren. Diese Membranpräparation kann nun zur Detektion der Porine mittels SDS-PAGE aufgetrennt werden.

2.4.2 Präparation von β -Laktamase-Rohextrakten

Zur Präparation eines β -Laktamase-Rohextraktes wurde eine Übernachtskultur des jeweiligen Bakterienstammes 1:50 in MH-Bouillon verdünnt und im Schüttelinkubator bei 37°C und 120 upm inkubiert. Bei Erreichen einer OD_{600} von 1,0 wurden 80 ml dieser Kultur abgeerntet (15 min, 5.300 upm, 4°C, Rotor 3751). Das Pellet wurde mit 20 ml eiskaltem Tris-Puffer (10 mM, pH 7,0) gewaschen, nochmals abzentrifugiert, in 4 ml eiskaltem Tris-Puffer aufgenommen und über Nacht bei -20°C eingefroren. Das Einfrieren und anschließende Auftauen der Zellen erleichtert den Zellaufschluss.

Die Proben wurden aufgetaut, mit Lysozym versetzt (Endkonzentration 100 µg/ml) und 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall im Eisbad aufgeschlossen. Hierzu wurden die Proben sechsmal für je 10 sec mit Ultraschall behandelt und dazwischen für jeweils 30 sec auf Eis abgekühlt. Durch anschließende Zentrifugation bei

26.000 g (18.000 upm, 20 min, 4°C, Rotor 3042) wurden die Zelltrümmer sedimentiert. Der klare Überstand stellte den β -Laktamase-Rohextrakt dar und konnte ohne Aktivitätsverlust bei -20°C gelagert werden.

2.4.3 Photometrische Bestimmung der spezifischen β -Laktamase-Aktivität

Die Aktivität der β -Laktamasen im Enzymrohextrakt (vgl. 2.4.2) wurde spektralphotometrisch nach der Methode von O'CALLAGHAN et al. (1968) bestimmt. Als Substrat für die β -Laktamasen wurde Nitrocefin verwendet, ein chromogenes Cephalosporin, dessen Farbe bei Hydrolyse des β -Laktamringes durch β -Laktamasen von gelb nach rot umschlägt. Dieser Farbumschlag ist durch eine Extinktionszunahme bei 485 nm photometrisch messbar und kann zur β -Laktamase-Aktivität in Beziehung gesetzt werden. Der nachfolgende Versuchsansatz wurde im Spektralphotometer über 3 min gegen Sörensen-Puffer gemessen:

0,1M Sörensenpuffer	900 μ l
1mM Nitrocefin-Stammlösung	50 μ l
β -Laktamase-Rohextrakt in geeigneter Verdünnung	50 μ l

Die β -Laktamase-Aktivität lässt sich aus den gemessenen Absorptionsänderungen pro Zeiteinheit mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmen:

$E = \epsilon \times c \times d$	E = Extinktion
	ϵ = molarer Extinktionskoeffizient des eingesetzten Substrates [$l \times mmol^{-1} \times cm^{-1}$]
	c = Konzentration des eingesetzten Substrates [$mmol \times l^{-1}$]
	d = Schichtdicke der Küvette [cm]

Die Umsatzgeschwindigkeit v eines Enzyms ist definiert als die Änderung der Substratkonzentration Δc pro Zeiteinheit Δt :

$$v = \Delta c / \Delta t \quad [\mu mol \times ml^{-1} \times min^{-1}]$$

Durch Kombination dieser Gleichung mit dem Lambert-Beerschen Gesetz ergibt sich für die enzymatische Umsatzgeschwindigkeit der β -Laktamasen die folgende Formel:

$$v = \Delta E / (\epsilon \times d \times \Delta t) \quad [\mu mol \times ml^{-1} \times min^{-1}]$$

Die Umsatzgeschwindigkeit v eines Enzyms ist gleich der Aktivität U (U = Unit; 1 U stellt die Menge Enzym dar, die 1 μ mol Substrat in 1 min umsetzt).

Um die Enzymaktivitäten verschiedener Proben miteinander vergleichen zu können, wurde die spezifische β -Laktamase-Aktivität berechnet. Hierzu wurde die Umsatzgeschwindigkeit v auf den Proteingehalt C_p [mg/ml] der Probe bezogen:

$$\text{Spez. Aktivität} = v / C_p \quad [\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}] = [\text{U} \times \text{mg}^{-1}]$$

2.4.4 Proteinbestimmung nach LOWRY

Die Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (1951) beruht auf der Eigenschaft von Kupfer-II-Ionen, in alkalischer wässriger Lösung mit den Peptidbindungen und Tyrosinresten von Proteinen rotviolette Komplexsalze zu bilden. Zusätzlich wird durch bestimmte Aminosäuren der Proteine (hauptsächlich Tyrosin und Tryptophan, in geringerem Maße auch Cystein, Cystin und Histidin) Phosphomolybdat und Phosphowolframat aus dem Folin-Ciocalteau-Reagenz reduziert, was zu einer tiefblauen Färbung der Lösung führt.

Zur Proteinbestimmung wurden 100 μl der in 0,1 M Sörensen-Puffer geeignet verdünnten Proteinlösung mit 1 ml alkalischem Kupferreagenz vermischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 μl Folin-Ciocalteau-Phenol-Reagenz (frisch 1:3 mit A.demin. verdünnt) zugegeben, der Ansatz sofort gründlich gemischt und 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nachfolgend wurde die Extinktion der Probe photometrisch bei 578 nm gegen einen Leerwert gemessen. Mit BSA-Lösungen bekannten Proteingehaltes (0-240 $\mu\text{g/ml}$) wurde eine Eichreihe aufgenommen, anhand derer die Proteinmenge der Proben ermittelt werden konnte. Alle Proteinbestimmungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

2.4.5 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

2.4.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels Elektrophorese können geladene Makromoleküle aufgrund ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit, die von Größe und spezifischer Ladung eines Proteins abhängt.

Das Trägermaterial Polyacrylamid wird durch radikalische Copolymerisation von Acrylamid (AA) und dem Vernetzer N,N' -Methylenbisacrylamid (Bis) hergestellt. Als Polymerisationsstarter dient Ammoniumpersulfat (APS), als Katalysator der Reaktion N,N,N',N' -Tetra-

methylethylendiamin (TEMED). Es entsteht ein dreidimensionales, durch Bisacrylamid quervernetztes Molekülgerüst, dessen Porengröße über die Acrylamid-Konzentration variiert werden kann. Das AA:Bis-Verhältnis wird konstant gehalten.

In dieser Arbeit wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE nach LAEMMLI (1970) mit einem SDS-haltigen Tris-Chlorid/Tris-Glycin-Puffersystem eingesetzt. Bei einer diskontinuierlichen PAGE werden ein engporiges Trenngel und ein darüber gegossenes weitporiges Sammelgel mit verschiedenen Puffersystemen verwendet, wodurch eine zusätzliche Fokussierung der Proteinbanden und somit eine verbesserte Trennleistung erreicht wird. Das Trenngel enthält 0,375 mol/l Tris-HCl (pH 8,8), das Sammelgel 0,125 mol/l Tris-HCl (pH 6,8). Der pH-Wert des Sammelgels liegt nahe am isoelektrischen Punkt des Glycins im Elektrophoresepuffer, so dass das Glycin zu Beginn der Trennung eine sehr geringe elektrophoretische Mobilität besitzt (Folge-Ionen), während die Chlorid-Ionen eine sehr hohe Mobilität besitzen (Leit-Ionen). Zwischen Leit- und Folge-Ionen entsteht während der Elektrophorese ein Feldstärkegradient, worin die Protein-Ionen einen "Stapel" in der Reihenfolge ihrer Mobilität bilden. Diese Aufkonzentrierung der Proteine wird durch einen erhöhten Reibungswiderstand am Übergang in das Trenngel noch verstärkt. Im Trenngel löst sich die konzentrierte Proteinbande auf und die Proteine werden nach ihrer Molekülgröße und Ladung aufgetrennt.

Durch den Einsatz des anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) erreicht man eine Auftrennung der Proteine ausschließlich nach ihrer Molekülgröße. Die Proteinproben werden durch Aufkochen in SDS-Probenpuffer hitzedenaturiert. Dabei lagert sich das SDS in einem bestimmten Verhältnis an die gestreckten Aminosäure-Ketten und überdeckt die Eigenladung der Proteine. So entstehen anionische Micellen mit konstanter negativer Nettoladung pro Masseneinheit, die im elektrischen Feld zur Anode wandern. Auf diese Weise erhält man bei einer SDS-PAGE mit 0,1% SDS über bestimmte Bereiche eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichtes und der Wanderungsstrecke der SDS-Polypeptid-Micellen. Mit Hilfe von Standards lässt sich das Molekulargewicht der Proteine bestimmen.

Die in dieser Arbeit eingesetzte SDS-PAGE bestand aus einem 4%igen Sammelgel und einem 11%igen Trenngel (Tabelle 2.15). Acrylamid und Bisacrylamid wurden als Stammlösung mit einem Mischungsverhältnis von 37,5:1 (30% AA / 0,8% Bis) verwendet.

Tab. 2.15: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele**A: Trenngel (11% AA, 0,3% Bis)**

Komponente	Volumen
Acrylamid/Bisacrylamid	3,767 ml
1,5 M TrisHCl; pH 8,8	2,5 ml
H ₂ O	3,633 ml
10% SDS	100 µl
10% APS	50 µl
TEMED	10 µl

B: Sammelgel (4% AA, 0,01% Bis)

Komponente	Volumen
Acrylamid/Bisacrylamid	0,685 ml
0,5 M TrisHCl; pH 6,8	1,25 ml
H ₂ O	3,015 ml
10% SDS	50 µl
10% APS	25 µl
TEMED	5 µl

Zur Auftrennung isolierter Porin-Proteine wurden die Proben aufgetaut, mit 2x Laemmli-SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min im Wasserbad aufgeköcht. Bei der Herstellung von β -Laktamase-Gelen wurde ein Probenpuffer ohne denaturierendes β -Mercaptoethanol verwendet und auf das Aufkochen der Proben verzichtet, um eine spätere Renaturierung der β -Laktamasen für die Aktivitätsfärbung mit Nitrocefin zu ermöglichen. Die SDS-PAGE erfolgte in einer vertikalen Gelapparatur (Mini-Protean 3, BIO-RAD) bei einer Spannung von 90-120 V für 120-140 min. Die gesamte Gelkammer wurde auf 4°C gekühlt, um die Proteine vor Erwärmung zu schützen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit Coomassie (vgl. 2.4.5.3) bzw. die β -Laktamase-Gele mit Nitrocefin (vgl. 2.4.5.4) gefärbt und durch Einscannen dokumentiert.

2.4.5.2 Analytische isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) ist ein elektrophoretisches Verfahren zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI) von Proteinen. Die Proteine wandern im elektrischen Feld entlang eines pH-Gradienten, bis sie an den pH-Wert gelangen, an dem ihre Nettoladung gleich Null ist. Dies ist der isoelektrische Punkt der jeweiligen Proteine, an dem sie "fokussiert" werden und stationär im Gel verbleiben.

Die analytische isoelektrische Fokussierung wird meist in großporigen Polyacrylamidgelen durchgeführt. Der pH-Gradient kann entweder durch freie Trägerampholyte oder durch immobilisierte, kovalent mit dem Gel vernetzte Gruppen gebildet werden. Freie Trägerampholyte, wie sie hier verwendet wurden, sind heterogene Gemische aus verschiedenen niedermolekularen aliphatischen Oligoamino-Oligocarbonsäuren, die sich in ihren isoelektrischen Punkten unterscheiden. Während der Elektrophorese bilden sie unter Einfluss des elektrischen Feldes einen kontinuierlichen pH-Gradienten im Gel aus, worin sich die Probenproteine nach ihrem pI anordnen. Zur Bestimmung der isoelektrischen Punkte werden Markerproteine mit bekanntem pI auf das Gel aufgetragen.

In dieser Arbeit wurden nicht-denaturierende 3%ige Polyacrylamid-Gele mit 2% Ampholyten und einem pH-Bereich von pH 3-10 verwendet (Criterion-Fertig-Gele, BIO-RAD). Die Proben wurden in 10 mM Tris-Puffer (pH 7,0) aufgenommen, da ein höherer Salzgehalt die IEF stört. Um präzipitierte Proteine zu entfernen, wurden sie nach dem Auftauen zunächst abzentrifugiert (18.000 upm, 20 min, 4°C, Rotor 3042). Der Überstand wurde mit 30% Glycerin versetzt und auf das IEF-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 2,5 h mit einer schrittweisen Erhöhung der angelegten Spannung:

100 V	60 min
250 V	60 min
500 V	30 min

Die IEF wurde in einer vertikalen Gelkammer (Criterion-Kammer, BIO-RAD) durchgeführt. Während der Fokussierung wurde die gesamte Kammer auf 4°C gekühlt, um die Proteine vor Erwärmung zu schützen. Nach der Elektrophorese wurden die IEF-Gele zur Detektion der β -Laktamasen mit Nitrocefin gefärbt und durch Einscannen dokumentiert.

2.4.5.3 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Bei der Coomassie-Färbung handelt es sich um eine Gesamtproteinfärbung, da der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau unspezifisch an fast alle Proteine bindet. Zur Färbung wurden die Gele 15 min in der Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurden sie 30-60 min in frischer Coomassie-Entfärbelösung entfärbt.

2.4.5.4 Nitrocefin-Färbung von β -Laktamase-Gelen

Bei der Aktivitätsfärbung mit Nitrocefin werden nach der Elektrophorese eines Gesamtproteinextraktes selektiv die β -Laktamasen im Gel angefärbt. Nitrocefin ist ein chromogenes Cephalosporin, dessen Farbe bei Hydrolyse des β -Laktam-Ringes durch β -Laktamasen von gelb nach rot umschlägt.

Die SDS-Polyacrylamid-Gele wurden vor der Färbung 1 h in eiskalter 2,5%iger Triton-X-100-Lösung geschüttelt. Dieses Detergenz löst das SDS von den Proteinen, so dass unempfindlichere Proteine wie β -Laktamasen renaturieren können. Bei der Färbung von IEF-Gelen entfiel dieser Schritt, da die IEF unter nativen Bedingungen durchgeführt wird.

Zur Nitrocefin-Färbung wurde das Gel auf eine Folie gelegt und mit 1 mM Nitrocefin-Lösung überschichtet, bis die β -Laktamasen als rot gefärbte Banden sichtbar wurden. Das gefärbte Gel wurde durch Einscannen dokumentiert.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mittels alkalischer Lyse. Bei einem stark alkalischen pH-Wert wird die genomische DNA vollständig denaturiert. In der Plasmid-DNA, die eine überspiralisierte Konformation besitzt, werden nur die Wasserstoffbrücken zwischen den Basen aufgebrochen. Die komplementären DNA-Einzelstränge der Plasmide bleiben in räumlicher Nähe zueinander und können bei der anschließenden Neutralisation korrekt renaturieren. Die genomische DNA dagegen kann nicht wieder komplementär hybridisieren, fällt aus und kann abzentrifugiert werden.

2.5.1.1 Plasmid-Präparation nach MANIATIS

Die Schnellpräparation von Plasmiden nach MANIATIS et al. (1989) wurde zur Gewinnung von Plasmid-DNA als Template für PCR-Reaktionen eingesetzt. 1,5 ml einer Übernachtskultur des jeweiligen Bakterienstammes wurden abgeerntet (1 min, 13.400 upm, RT), durch Resuspendieren in 1 ml STE-Puffer und erneute Zentrifugation gewaschen und nachfolgend in 100 µl Puffer P1 mit RNaseA (100 µg/ml) aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von 150 µl Lysispuffer P2 und 5 min Inkubation bei RT. Durch Zugabe von 150 µl Neutralisationspuffer P3 und 15 min Inkubation auf Eis wurden genomische DNA und Zelltrümmer ausgefällt und anschließend abzentrifugiert (15 min, 15.000 upm, 4°C, Rotor 3743). Zur Extraktion der Proteine wurde der Überstand mit 1 Vol. Phenol/Chloroform (1:1) versetzt, geschüttelt, abzentrifugiert (5 min, 13.400 upm, RT) und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde bis zum Erhalt eines klaren Überstandes wiederholt. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 2 Vol. 100% Ethanol ausgefällt, 5 min bei RT inkubiert und abzentrifugiert (25 min, 13.000 upm, 4°C, Rotor 3743). Das Pellet wurde mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (20 min, 13.000 upm, 4°C, Rotor 3743), bei 37°C getrocknet, in 50 µl EB-Puffer aufgenommen und bei -20°C eingefroren.

2.5.1.2 Kalium-Acetat-Plasmidpräparation nach TIETZE

Die Kalium-Acetat-Plasmidpräparation nach TIETZE (Robert-Koch-Institut Wernigerode, mündl. Mitteilung) stellt eine Modifikation der Methode nach MANIATIS (1989) dar. Sie wurde eingesetzt, um große Plasmide zu präparieren und mittels Agarose-Gelelektrophorese aufzutrennen.

3 ml einer Übernachtskultur des jeweiligen Bakterienstammes in LB-Medium wurden abzentrifugiert (5 min, 5.000 upm, RT), durch Resuspendieren in 1 ml STE-Puffer und erneute

Zentrifugation gewaschen, in 100 µl eiskaltem Pub1-Puffer mit RNaseA (100 µg/ml) resuspendiert und auf Eis gelagert. Durch Zugabe von 200 µl eiskaltem Pub2-Puffer wurden die Zellen lysiert. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde 150 µl eiskalter Pub3-Neutralisationspuffer zugegeben, kurz geschwenkt und 20 min auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurden die festen Bestandteile abzentrifugiert (15 min, 15.000 upm, 4°C, Rotor 3743). Zur Extraktion der Proteine wurde der Überstand mit 1 Vol. Phenol/Chloroform (1:1) versetzt, geschüttelt, kurz auf Eis inkubiert, abzentrifugiert (5 min, 13.400 upm, RT) und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde bis zum Erhalt eines klaren Überstandes wiederholt und zum Teil in PhaseLockGelTM-Reaktionsgefäßen (Eppendorf) durchgeführt. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 2 Vol. 100% Ethanol ausgefällt, 5 min bei RT inkubiert und abzentrifugiert (25 min, 15.000 upm, 4°C, Rotor 3743). Das Pellet wurde mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (15 min, 15.000 upm, 4°C, Rotor 3743), bei 37°C getrocknet, in 10-20 µl EB-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 4°C gelagert.

Am nächsten Tag wurde die gesamte Probe mit 5 µl Ladepuffer versetzt und auf ein 0,7%iges Agarose-Gel in 0,7x TBE-Puffer in einer großen Horizontalgelkammer aufgetragen. Dem Agarose-Gel wurde kein Ethidiumbromid zugesetzt, da große Plasmide durch Interkalation dieses Farbstoffes während der Elektrophorese zerstört werden. Die Gelelektrophorese wurde für 3,5-4 h bei 100 V und 4°C in 0,7x TBE-Puffer durchgeführt. Anschließend wurde das Gel 15 min in einem Färbepad (2 µg/ml Ethidiumbromid in A.demin.) gefärbt, 30 min in A.demin. entfärbt und unter UV-Licht-Bestrahlung mit einer Videoanlage dokumentiert. Zur Größenabschätzung wurden die Referenzplasmide der Stämme *E. coli* R27 und *E. coli* V517 sowie der Größenstandard Bac-Tracker (Epicentre) auf das Gel aufgetragen.

2.5.2 Extraktion von genomischer DNA (DNeasy Tissue KitTM)

Eine 2 ml-Übernachtskultur des jeweiligen Stammes in LB-Medium wurde abgeerntet (10 min, 7.500 upm, RT) und in 180 µl ATL-Puffer resuspendiert. Die Deproteinisierung der Probe erfolgte durch Zugabe von 20 µl ProteinaseK und 2h Inkubation bei 55°C. Anschließend wurde die Probe 15 sec gevortext, mit 200 µl AL-Puffer versetzt, erneut gevortext und 10 min bei 70°C inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl 100% Ethanol wurde die Probe in ein DNeasy-Säulchen überführt und die genomische DNA durch Zentrifugation (1 min, 8.000 upm, RT) auf das Säulchen gebunden. Daraufhin wurde das Säulchen zunächst mit 500 µl AW1-Puffer (Zentrifugation 1 min, 8000 upm, RT), danach mit 500 µl AW2-Puffer (Zentrifugation 3 min, 13.400 upm, RT) gewaschen und getrocknet. Abschließend wurde die genomische DNA mit 200 µl AE-Puffer in ein Reaktionsgefäß eluiert (Zentrifugation 1 min, 8000 upm, RT) und bei 4°C gelagert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in der MiniSpin-Zentrifuge.

2.5.3 Aufkoch-Präparation von Gesamt-DNA

Zur Gewinnung von Template-DNA für die PCR wurden 3-5 Kolonien einer frischen Übernachtskultur auf LB-Agar in 100 µl HPLC-Wasser in einem PCR-Reaktionsgefäß resuspendiert und 10 min bei 99°C inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (10 min, 13.4000 upm, RT, MiniSpin-Zentrifuge) und der Überstand bei -20°C eingefroren. Die im Überstand gelöste Bakterien-DNA diente als Matrize für die PCR-Reaktionen.

2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der gezielten *in vitro*-Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnittes zwischen zwei flankierenden DNA-Regionen bekannter Sequenz (SAIKI et al., 1985). Bei diesem zyklischen Verfahren wird die Anzahl der DNA-Fragmente in jedem Zyklus verdoppelt und steigt somit exponentiell an. Für die Reaktion werden eine DNA-Matrize (Template), zwei verschiedene Oligonukleotid-Primer, deren Sequenz komplementär zu den beiden flankierenden Sequenzen des DNA-Abschnittes ist, Didesoxynukleotide (dNTPs) und eine hitzestabile DNA-Polymerase benötigt.

Eine Standard-PCR besteht aus fünf Schritten:

1. Initialer Denaturierungsschritt: Die DNA-Matrize wird vollständig denaturiert und liegt dann als einzelsträngige DNA vor (95°C, 3-4 min).
2. Denaturierung: Doppelsträngige Matrizen-Moleküle sowie Matrizen-Primer-Hybride werden gespalten (94°C, 30-60 sec).
3. Primer-Anlagerung (Annealing): Bei einer bestimmten Annealing-Temperatur binden die Primer gegenläufig komplementär an die einzelsträngige DNA-Matrize und stellen das freie 3'-OH-Ende zur Verfügung, das die DNA-Polymerase zur Strangverlängerung benötigt. Die Annealing-Temperatur errechnet sich aus den Schmelztemperaturen der eingesetzten Primer und liegt in der Regel 0-5°C unter der errechneten Schmelztemperatur (Dauer 30-60 sec).
4. Synthesephase (Elongation): Hier erfolgt die Synthese des DNA-Bereiches zwischen den Primern durch die DNA-Polymerase. Die Dauer errechnet sich aus der Länge der zu amplifizierenden DNA, unter der Annahme, dass 1 kb/min synthetisiert wird. Die Temperatur ist abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase.
5. Finale Elongation: Bereits begonnene unvollständige Amplifikationen werden in dieser Phase durch die DNA-Polymerase fertiggestellt (10 min, Temperatur wie in Phase 4).

Die Schritte 2-4 werden 35x wiederholt.

Die Schmelztemperatur der Primer berechnet sich nach folgender Formel:

$$T_m[^\circ\text{C}] = 2(\Sigma \text{dATP} + \Sigma \text{dTTP}) + 4(\Sigma \text{dCTP} + \Sigma \text{dGTP})$$

In dieser Arbeit wurde die PCR zum Nachweis erworbener Resistenzdeterminanten sowie zur Amplifikation chromosomaler Gene zwecks nachfolgender Sequenzierung eingesetzt. Als Matrizen-DNA wurde mittels Aufkochpräparation gewonnene Gesamt-DNA (vgl. 2.5.3) sowie präparierte genomische DNA (vgl. 2.5.2) oder Plasmid-DNA (vgl. 2.5.1) eingesetzt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind der Tabelle 2.13 zu entnehmen. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze sowie die Laufbedingungen sind in Tabelle 2.16 aufgeführt. Die Temperatur in der Synthese-Phase betrug für die REDTaq-DNA-Polymerase 72°C sowie für die Master-Taq-DNA-Polymerase 74°C.

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (vgl. 2.5.5). Sollte die DNA zur Sequenzierung weiterverwendet werden, so wurde sie mit Hilfe des MinElute PCR Purification KitTM (QIAGEN, Hilden) gereinigt (vgl. 2.5.6)

Tab. 2.16: Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze

Zielstruktur der PCR	Primer	MgCl ₂ -Konzentration	Primer-Konzentration	dNTP-Konzentration	Annealing-Temperatur [°C]	Synthesezeit	Größe des PCR-Produkts [bp]	Enzym
<i>ompK35</i>	OmpK35-F, OmpK35-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	58	1,5 min	1194	R, M
<i>ompK36</i>	OmpK36-F, OmpK36-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	56	1,5 min	1206	R, M
<i>ompK36</i>	OmpK36-F, L1730	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	58	1,5 min	1236	R, M
<i>acrR</i>	AcrR-F, AcrR-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	58	1 min	654	M
<i>bla_{SHV}</i>	SHV-1, SHV-2	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	57	1 min	862	R, M
<i>bla_{SHV}</i>	NI-1, NI-2	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	59	1 min	1016	R, M
<i>bla_{TEM}</i>	OT-3, OT-4	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50	1 min	858	R, M
<i>bla_{TEM}</i>	TEM-T1, TEM-T3	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50	1 min	1082	R, M
<i>bla_{CTX-M}</i>	CTX-MA, CTX-MB	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	54	1 min	550	R, M
<i>bla_{CTX-M-2}</i>	CTXM-2-F, CTXM-2-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	54	1 min	884	M
<i>bla_{CTX-M}</i> Gruppe 1	ALA2, P2D	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	56	1 min	941	R
<i>bla_{CTX-M}</i> Gruppe 9	CTXM-C1, CTXM-C2	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	56	1 min	906	R
<i>bla_{CTX-M}</i> Gruppe 2	CTXM-2for, CTXM-2rev	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	52	1 min	552	M
<i>bla_{CTX-M}</i> Gruppe 1	CTXM-1for, CTXM-1rev	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	52	1 min	415	M
<i>bla_{CTX-M}</i> Gruppe 9	CTXM-9for, CTXM-9rev	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	52	1 min	205	M
<i>bla_{CTX-M-8}</i>	CTXM-8for, CTXM-25rev	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	52	1 min	677	M
<i>bla_{CTX-M-25/26}</i>	CTXM-25for, CTXM-25rev	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	52	1 min	327	M

Fortsetzung Tab. 2.16: Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze

Zielstruktur der PCR	Primer	MgCl ₂ -Konzentration	Primer-Konzentration	dNTP-Konzentration	Annealing-Temperatur [°C]	Syntheszeit	Größe des PCR-Produkts [bp]	Enzym
<i>ampC</i>	AmpC-P1, AmpC-P4	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	58	1 min	748	R
<i>bla_{CMY-2}</i>	AmpC-C1, AmpC-C2	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50	1 min	1125	R, M
<i>bla_{IMP}</i>	IMP S, IMP AS	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50	1 min	446	M
<i>bla_{VIM}</i>	VIM S, VIM AS	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	60	1 min	391	M
OXA-Gr. I	OXA-IA, OXA-IB	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	54	1 min	276	M
OXA-Gr. II	OXA-2f, OXA-2r	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	57	1 min	478	M
OXA-Gr. III	OXA-F, OXA-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50	1 min	427	M
<i>gyrA</i>	GyrA 5-1, GyrA 3-1	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55	1 min	524	R, M
<i>parC</i>	ParC S, ParC U	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55	1 min	236	R, M
<i>intI1</i>	int1-F, int1-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55	1 min	280	R
Klasse-I-Integron	5'CS, 3'CS	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55	1-2 min	variabel	R, M
<i>is1</i>	IS1-F, IS1-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55	1 min	268	M
<i>is1-ompK36</i>	IS1-F2, L1730	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55	1 min	variabel	M
<i>aph(3')-Ia</i>	aph(3)-Ia-F, aph(3)-Ia-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	58	1 min	489	R, M
<i>aac(3)-Ia</i>	aac(3)-Ia-F, aac(3)-Ia-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	54	1 min	158	R
<i>aac(3)-IIc</i>	aac(3)-IIc-F, aac(3)-IIc-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55	1 min	237	R, M
<i>aac(3)-IVa</i>	aac(3)-IVa-F, aac(3)-IVa-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	54	1 min	286	R
<i>aac(6')-Ib</i>	aac(6')-Ib-F, aac(6')-Ib-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50	1 min	395	R, M
<i>ant(2'')-Ia</i>	ant(2'')-Ia-F, ant(2'')-Ia-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	52	1 min	446	R
<i>ant(4')-IIa</i>	ant(4')-IIa-F, ant(4')-IIa-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	52	1 min	567	R
<i>aac(6')-II</i>	aac(6')-II-F, aac(6')-II-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	54	1 min	375	R
<i>ant(3'')-Ia</i>	ant(3'')Ia-F, ant(3'')Ia-B	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	60	1 min	525	R, M
<i>strA</i>	strA-F, strA-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	48	1 min	650	R
<i>strB</i>	strB-F, strB-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	48	1 min	509	R
<i>strA-strB</i>	strA-F, strB-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	48	1 min	ca. 1200	R, M
<i>sulI</i>	sul1-F, sul1-B	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	64	1 min	436	R
<i>sulII</i>	sulII-F, sulII-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	60	1 min	700	R
<i>tet(A)</i>	tet(A)-F, tet(A)-R	3 mM	0,25 µM	100 µM	55	1 min	210	R
<i>tet(B)</i>	tet(B)-F, tet(B)-R	4 mM	0,25 µM	100 µM	59	1 min	659	R
<i>tet(C)</i>	tet(C)-F, tet(C)-R	4 mM	0,25 µM	100 µM	55	1 min	418	R
<i>tet(D)</i>	tet(D)-F, tet(D)-R	4 mM	0,25 µM	100 µM	55	1 min	787	R
<i>tet(E)</i>	tet(E)-F, tet(E)-R	3 mM	0,25 µM	100 µM	55	1 min	278	R
<i>tet(G)</i>	tet(G)-F, tet(G)-R	3 mM	0,25 µM	100 µM	55	1 min	468	R
<i>catI</i>	catI-F, catI-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50	1 min	585	R, M
<i>catII</i>	catII-F, catII-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50	1 min	495	R
<i>catIII</i>	catIII-F, catIII-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50	1 min	508	R
<i>catB</i>	catB-FA, catB-RC	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	48	1 min	280	R
<i>cmlA</i>	cml-F, cml-R	2 mM	0,5 µM	250 µM	58	1 min	698	R, M
<i>flo</i>	flo-F, flo-R	2 mM	0,2 µM	100 µM	57	1 min	399	R
<i>qnrB</i>	qnr-F, qnr-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50	1 min	660	R

R: REDTaq DNA-Polymerase, M: Master-Taq DNA-Polymerase

2.5.4.1 Screening nach erworbenen Resistenzmechanismen

Zum Nachweis einer großen Anzahl relevanter erworbener Resistenzgene wurden PCR-Screenings durchgeführt. Eine genaue Identifizierung der detektierten Gene erfolgte durch die Sequenzierung des Amplikons. Das Screening umfasste die folgenden Resistenzdeterminanten:

β-Laktamasen:

*bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-25/26}, Gene für die CTX-M-Gruppen 1, 2, 9, AmpC-β-Laktamasen, Gene für die OXA-Gruppen I, II, III, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}

Aminoglykosid-modifizierende Enzyme:

Acetyltransferasen: *aac(3)-Ia*, *aac(3)-IIc*, *aac(3)-IVa*, *aac(6')-Ib*, *aac(6')-II*

Nukleotidyltransferasen: *ant(2'')-Ia*, *ant(4')-IIa*, *ant(3'')-Ia*

Phosphorylasen: *aph(3')-Ia*, *aph(3'')-I (strA)*, *aph(6)-I (strB)*

Tetracyclin-Resistenzgene:

tet(A), *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*

Chloramphenicol-Resistenzgene:

catI, *catII*, *catIII*, *catB*, *cmlA*, *flo*

Sonstige Resistenzdeterminanten:

sulI, *sulII* (Sulfonamid-Resistenz), *qnrB* (Chinolon-Resistenz)

2.5.4.2 Nachweis von Klasse-1- und Klasse-2-Integrans

Zum Nachweis von Integrans, die erworbene Resistenzgene beherbergen können, wurde ein PCR-Screening für *intI1* und *intI2* durchgeführt. Diese Gene kodieren für die Integrasen der Klasse-1- und Klasse-2-Integrans.

2.5.4.3 Nachweis von durch Mutation erworbenen Resistenzmechanismen

Um Resistenzmechanismen zu untersuchen, die auf Mutationen in chromosomalen Genen beruhen, wurden die entsprechenden Loci ausgewählter Stämme mittels PCR amplifiziert und sequenziert.

2.5.4.3.1 Modifikationen der TypII-Topoisomerasen

Die Hauptursache für Chinolonresistenz bei *K. pneumoniae* sind bestimmte Mutationen in den Genen *gyrA* und *parC*, die für Untereinheiten der TypII-Topoisomerasen DNA-Gyrase und Topoisomerase IV kodieren. Daher wurde die Chinolon-Resistenz vermittelnde Region (QRDR) der Gene *gyrA* und *parC* für alle ausgewählten Stämme sequenziert.

2.5.4.3.2 Modifikationen der Porine

Der Verlust der Porine OmpK35 und OmpK36 trägt bei *K. pneumoniae* zu einer Erhöhung des durch weitere Resistenzmechanismen vermittelten Resistenzniveaus bei. Daher wurden die Gene *ompK35* und *ompK36* bei allen untersuchten Klonen sequenziert.

2.5.4.3.3 Überexpression von Effluxpumpen

Die häufigste Ursache für erhöhten Efflux bei *K. pneumoniae* ist eine Überexpression des Effluxsystems AcrAB-TolC. Daher wurde für alle untersuchten Klone das für den Regulator dieses Effluxsystems kodierende Gen *acrR* sequenziert.

2.5.5 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe aufgetrennt werden. Im elektrischen Feld wandern die aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladenen DNA-Moleküle zur Anode. Bei der Wanderung durch die Poren des Agarose-Gels werden größere Fragmente stärker behindert als kleinere. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle im Gel ist abhängig von der Stärke des angelegten elektrischen Feldes, von der Agarosekonzentration (welche die Porengröße bestimmt), von der Ionenstärke und dem pH-Wert des Elektrophoresepuffers sowie von der Konformation der DNA. Zwischen Wanderungstrecke und Länge eines bestimmten DNA-Moleküls besteht ein nicht-linearer Zusammenhang.

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde in Horizontalapparaturen bei konstanter Spannung von 80-100 V in TAE-Laufpuffer durchgeführt. Je nach erwarteter Fragmentgröße wurde die Agarose in Konzentrationen von 0,7-1,5% eingesetzt und in TAE-Puffer gelöst. Zur Detektion der DNA-Moleküle wurde der Agarose vor dem Auspolymerisieren Ethidiumbromid-Lösung (Endkonzentration 0,3 µg/ml) zugesetzt. Die positiv geladenen planaren Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren in die DNA-Doppelhelix, fluoreszieren unter UV-Licht-Bestrahlung und ermöglichen dadurch die Dokumentation des Gels unter einer Videoanlage.

Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit Ladepuffer versetzt. Zur Größenabschätzung der Fragmente wurden Größenmarker mit auf das Gel aufgetragen. Je nach den Laufbedingungen der Elektrophorese besteht für einen bestimmten Größenbereich ein linearer Zusammenhang zwischen der Wanderungstrecke (cm) und dem Logarithmus der Größe (bp) der Fragmente. In diesem Bereich konnte mit Hilfe der Marker die Fragmentgröße abgeschätzt werden.

In dieser Arbeit wurde die Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von PCR-Fragmenten, DNA-Restriktionsfragmenten und isolierten Plasmiden sowie zur Mengenabschätzung aufgereinigter PCR-Fragmente eingesetzt.

2.5.6 Aufreinigung von PCR-Fragmenten (MinElute PCR Purification Kit™)

Um amplifizierte DNA-Fragmente in Sequenzierungsreaktionen einsetzen zu können, müssen sie zunächst von den Bestandteilen der PCR-Reaktion gereinigt und aufkonzentriert werden. Hierzu wurde der MinElute PCR Purification Kit™ (QIAGEN, Hilden) eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden mit 5 Vol. PB-Puffer versetzt und auf ein MinElute-Säulchen aufgetragen. Durch Zentrifugation wurde die DNA auf das Säulchen gebunden. Anschließend wurde das Säulchen durch Zugabe von 750 µl PE-Puffer und Zentrifugation gewaschen. Mittels einer zusätzlichen Zentrifugation wurden Ethanolreste entfernt, bevor das Säulchen auf ein steriles Reaktionsgefäß überführt wurde. Nach Zugabe von 10-20 µl EB-Puffer und 10 min Inkubation bei RT erfolgte die Elution der DNA durch eine weitere Zentrifugation. Alle Zentrifugationsschritte wurden in der MiniSpin-Zentrifuge durchgeführt (13.400 upm, 1 min, RT).

2.5.7 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierungen sämtlicher PCR-Produkte wurden von der Firma SEQLAB SEQUENCE LABORATORIES GmbH (Göttingen) durchgeführt.

2.5.8 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen bakteriellen Ursprungs, die in der Lage sind, doppelsträngige DNA-Moleküle an spezifischen Erkennungssequenzen zu binden und hydrolytisch zu spalten. DNA-Fragmente, die mittels Restriktion an definierten Erkennungsstellen analysiert werden sollten, wurden gemäß den Angaben des Herstellers mit dem entsprechenden Restriktionsenzym, Reaktionspuffer und BSA-Lösung versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Restriktion von 1 µg DNA wurde ca. 1 Unit Restriktionsenzym eingesetzt. Die Analyse des Verdaus erfolgte anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 2.5.5).

2.5.9 Übertragung von Resistenzgenen mittels Konjugation

Bei der Konjugation erfolgt ein gerichteter horizontaler Gentransfer von einer Spenderzelle (Donor) in eine Empfängerzelle (Rezipient), der durch direkten Zell-Zell-Kontakt über eine Plasmabrücke ermöglicht wird. Auf diese Weise können Plasmide sowohl zwischen verschiedenen Stämmen einer Bakterienspezies als auch zwischen verschiedenen Spezies übertragen werden. Als Donor können nur Stämme fungieren, die konjugative Plasmide mit sogenannten

tra-Genen besitzen, welche die Konjugation steuern. Während der Konjugation können jedoch auch weitere genetische Elemente ohne eigene *tra*-Regionen mobilisiert und in die Rezipientenzelle übertragen werden. Als Transkonjugant wird ein Rezipient bezeichnet, der DNA vom Donor aufgenommen hat.

In dieser Arbeit wurden Konjugationsversuche mittels Filtermating (WANG et al., 2003) durchgeführt. Donor und Rezipient wurden aus einer LB-Übernachtskultur 1:100 in frischem LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₅₄₆ im Schüttelinkubator bei 37°C bebrütet. Nach 30 min Inkubation bei 37°C ohne Schütteln wurde jeweils 1 ml Donor und 1 ml Rezipient abzentrifugiert (2 min, 5.000 upm, RT, MiniSpin-Zentrifuge). Die Pellets wurden in 100 µl LB-Medium aufgenommen, gemischt, auf einen sterilen Nitrocellulose-Filter auf einer LB-Agarplatte getropft und über Nacht (14 h) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung vom Filter gewaschen und aus dieser Suspension eine Verdünnungsreihe erstellt. Auf Selektivagar (LB-Agar mit geeigneten Antibiotika) wurden Keimzahlbestimmungen von Donor und Transkonjuganten durchgeführt.

Zum Nachweis konjugativer Resistenzplasmide wurden ausgewählte Stämme als Donorstämme mit dem Rifampicin-resistenten Rezipienten *E. coli* W3110 *lac*⁻ Rif^R konjugiert. Um die Möglichkeit der Entstehung eines panresistenten Transkonjuganten aus Klon I zu untersuchen, wurde Klon I als Rezipient mit verschiedenen Donorstämmen konjugiert, die eine AmpC- oder CTX-M-β-Laktamase auf einem konjugierbaren oder mobilisierbaren Plasmid besitzen (vgl. Tabelle 2.5).

2.5.10 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Bei der Analyse von Restriktionsmustern chromosomaler DNA mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) handelt es sich um eine molekularbiologische Methode zur Typisierung von Bakterienstämmen, die für epidemiologische Untersuchungen eingesetzt wird. Sie beruht darauf, dass bei verschiedenen Stämmen einer Bakterienspezies keine vollständige Homologie der genomischen DNA besteht. Die geringen Unterschiede können mittels eines Restriktionsverdau des gesamten Genoms und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung anhand unterschiedlicher Fragmentmuster nachgewiesen werden. Für jeden Stamm erhält man ein charakteristisches Fragmentmuster, das von Anzahl und Position der Schnittstellen des verwendeten Restriktionsenzym abhängt. Die Erkennungssequenz des hier eingesetzten Enzyms XbaI kommt bei *Klebsiella* spp. ca. 20mal vor, die resultierenden Fragmentgrößen liegen zwischen 10 kb und 700 kb (TENOVER et al., 1995).

Um eine partielle Zerstörung der hochmolekularen DNA-Fragmente durch Strangbrüche zu vermeiden, werden die Bakterienzellen zur Präparation der DNA in Agarose-Blöckchen eingeschlossen. Sämtliche Schritte zur Isolierung der DNA-Fragmente (Zellaufschluss, Restriktionsverdau) erfolgen durch Inkubation der Agarose-Blöckchen in den entsprechenden Puffern. Zur Elektrophorese werden die Blöckchen in die Auftragstaschen eines 1%igen Agarose-Gels eingebracht.

Konventionelle Gelelektrophorese-Apparaturen mit einem konstanten elektrischen Feld sind nicht in der Lage, die hochmolekularen DNA-Fragmente aufzutrennen, die bei diesem Restriktionsverdau entstehen. Daher nutzt man spezielle Gelkammern mit einem sogenannten Pulsfeld, bei dem die Richtung des elektrischen Feldes in bestimmten Zeitintervallen wechselt. Diese Methode bedient sich der Eigenschaft von DNA-Molekülen, in freier Lösung ohne ein elektrisches Feld in relaxierter globulärer Form vorzuliegen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes werden die Moleküle entlang des Feldvektors ausgerichtet und bewegen sich in Richtung der Anode. Wechselt man nun die Richtung des elektrischen Feldes, so muss das DNA-Molekül zunächst wieder relaxieren und sich anschließend entlang des neuen Feldes ausrichten. Da größere Fragmente mehr Zeit für Relaxation und Reorientierung benötigen, steht ihnen weniger Zeit zur Wanderung im elektrischen Feld zur Verfügung als kleineren Molekülen. Auf diese Weise werden die Fragmente nach der Größe aufgetrennt. Bei der in dieser Arbeit eingesetzten CHEF-Methode (clamped-homogenous electric field) sind die Elektroden hexagonal um das Gel angeordnet. Die Richtung des elektrischen Feldes wechselt zwischen $+60^\circ$ und -60° zur vertikalen Laufrichtung des Gels, so dass die Fragmente in einem "Zick-Zack-Kurs" durch das Gel wandern.

Probenvorbereitung:

Die Präparation der Proben für die PFGE wurde mittels einer modifizierten Methode nach SAHLY et al. (2000), GOUBY et al. (1994) und ARLET et al. (1994) durchgeführt. Eine MH-Übernachtskultur des jeweiligen Bakterienstammes wurde 1:20 in frischer MH-Bouillon verdünnt und 4 h bei 37°C inkubiert. 3 ml Kultur wurden abgeerntet (2 min, 14.000 upm, 4°C), durch zweimaliges Resuspendieren in 1 ml eiskaltem TEN-Puffer und erneutes Zentrifugieren gewaschen, in 250 μl TEN-Puffer aufgenommen und auf Eis gelagert. Um später auf dem Gel vergleichbare Bandenintensitäten zu erreichen, wurden alle Proben mit TEN-Puffer auf eine einheitliche OD_{650} von 1,25 verdünnt. Die Zellsuspensionen wurden anschließend mit gleichem Volumen 1,6%iger LMP-Agarose (auf 55°C temperiert) versetzt und 100 μl dieser Mischung in eine sterile Gießform pipettiert. Die Gießform wurde zunächst 5 min bei -20°C ,

danach 20 min bei 4°C inkubiert. Das auspolymerisierte Agarose-Blöckchen wurde anschließend in ein Reaktionsgefäß mit 1 ml Lysislösung mit RNaseA (Endkonzentration 0,1 mg/ml) und Lysozym (Endkonzentration 1 mg/ml) überführt und darin 16 h bei 37°C inkubiert. Zur Deproteinisierung wurde die Lysis-Lösung abpipettiert und das Blöckchen zunächst 30 min in 1 ml ES-Puffer äquilibriert. Danach wurde das Blöckchen für 17 h bei 50°C in 1 ml ESP-Puffer mit ProteinaseK (Endkonzentration 1 mg/ml) inkubiert. Anschließend wurde das Blöckchen zunächst zweimal 60 min in je 15 ml TE-1-Puffer, dann zweimal 60 min in 15 ml TE-2-Puffer gewaschen, um die ProteinaseK zu entfernen. Nach 30 min Äquilibrieren in einem Reaktionsgefäß mit 1 ml NEB2-Puffer wurde dieser abpipettiert und 55 µl des Restriktionsansatzes (2 µl XbaI, 5,5 µl 10x NEB2-Puffer, 0,55 µl 100x BSA in HPLC-Wasser) zugegeben. Der Restriktionsverdau erfolgte über Nacht bei 37°C. Durch Zugabe von 50 µl PFGE-Ladepuffer wurde der Verdau anschließend abgestoppt und das Blöckchen bis zur PFGE in 1 ml 0,5x TBE-Puffer bei 4°C gelagert.

Elektrophorese:

Die PFGE wurde in einem GenePath™-Gerät (BIO-RAD, München) durchgeführt, das auf einer CHEF-Gelkammer beruht. Jeweils ein halbes Agarose-Blöckchen wurde in die Taschen eines 1%igen Agarose-Gels (GenePath Molecular Certified Agarose, BIO-RAD) geschoben und mit LMP-Agarose überschichtet. Als Größenstandard wurde auf jedes Gel Klon I (Stamm I-05111) mit aufgetragen. Die PFGE erfolgte in GenePath-Elektrophoresepuffer (BIO-RAD) unter folgenden Bedingungen:

Initiale Pulszeit	5,3 sec
Finale Pulszeit	49,9 sec
Anstieg	linear
Spannung	6V/cm
Winkel	120°
Laufzeit	20h
Temperatur	14°C

Nach der Elektrophorese wurde das Gel 15 min in einem Färbebad (2 µg/ml Ethidiumbromid in A.demin.) gefärbt, 30 min in A.demin entfärbt und mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage (Gel Doc EC, BIO-RAD) fotografiert.

Auswertung:

Das für *K. pneumoniae* etablierte PFGE-Protokoll wurde zunächst durch einen Lauf mit sowohl verwandten als auch nicht-verwandten *K.-pneumoniae*-Stämmen validiert, um die Reproduzierbarkeit und Unterscheidbarkeit der Bandenmuster sicherzustellen. Die Reproduzierbarkeit wurde außerdem durch Auftragen von Klon I (Stamm I-05111) auf jedes Gel sichergestellt.

Die Auswertung der PFGE-Muster erfolgte nach von TENOVER et al. (1995) aufgestellten Kriterien. Als Isolat wird dort die Reinkultur eines Bakteriums bezeichnet, die mittels Subkultur von einer primären Isolationsplatte gewonnen wurde. Als Stamm wird ein Isolat oder eine Gruppe von Isolaten bezeichnet, die phänotypisch und/oder genotypisch von anderen Isolaten derselben Spezies unterscheidbar ist. Als Klon werden Isolate/Stämme bezeichnet, die mittels genetischer Tests - wie der PFGE - nicht voneinander unterscheidbar sind (identisches PFGE-Muster) bzw. sehr ähnlich sind (2-3 Unterschiede im PFGE-Muster), so dass von einem gemeinsamen genetischen Ursprung ausgegangen werden kann. Das Auftreten von 2-3 Fragmentunterschieden im PFGE-Muster kann durch ein einziges genetisches Ereignis erklärt werden. Durch eine Punktmutation kann es zum Verlust einer bestehenden oder zum Erwerb einer zusätzlichen Schnittstelle kommen (jeweils drei resultierende Fragmentunterschiede), durch Deletion oder Insertion von DNA-Bereichen kann es zur Vergrößerung oder Verkleinerung eines Fragmentes kommen (jeweils zwei resultierende Fragmentunterschiede). Sehr nahe verwandte Klone, deren PFGE-Muster maximal drei Fragmentunterschiede aufweist, werden daher als Varianten eines Klons angesehen. Die Kriterien zur Interpretation von PFGE-Mustern sind in Tabelle 2.17 zusammengefasst.

Tabelle 2.17: Kriterien zur Interpretation von PFGE-Mustern (nach TENOVER et al., 1995)

Kategorie	Anzahl der genetischen Unterschiede	Typischerweise resultierende Anzahl der Fragmentunterschiede	Epidemiologische Interpretation
nicht unterscheidbar	0	0	Isolat ist Teil des Ausbruchsstammes / Klons
nahe verwandt	1	2 - 3	Isolat ist wahrscheinlich Teil des Ausbruchsstammes / Klons (Variante)
möglicherweise verwandt	2	4 - 6	Isolat hat möglicherweise denselben genetischen Ursprung wie der Klon
unterschiedlich	≥ 3	≥ 7	Isolat hat nicht denselben genetischen Ursprung wie der Klon

3 Ergebnisse

3.1 Patientendaten

Im Zeitraum Januar 2002 bis April 2004 wurden nosokomiale Ausbrüche multiresistenter *K. pneumoniae* auf der anästhesiologischen (AI), chirurgischen (CI) und kardiochirurgischen (KI) Intensivstation der Universitätsklinik Bonn untersucht. Diese drei Intensivstationen liegen benachbart auf einer Etage des Chirurgischen Zentrums und verfügen jeweils über zehn Betten.

3.1.1 Auswertung der erfassten Datensätze

Im Rahmen der retrospektiven Studie wurden zunächst alle im Studienzeitraum nach §23 IfSchG dokumentierten *K.-pneumoniae*-Isolate mit Einfach- oder Mehrfachresistenz als Datensatz erfasst. Ein solcher Datensatz entsprach jeweils einem Isolat und dem dazugehörigen Antibiogramm (vgl. 2.2.1). Anhand der Resistenzmuster, die sich aus den Antibiogrammen (Bewertung: resistent, intermediär, sensibel) von 14 der 16 Prüfsubstanzen ergaben, konnten die Isolate bestimmten Gruppen zugeordnet werden. Die Resistenzdaten gegenüber Amikacin und Tobramycin wurden nicht in die Resistenzmuster einbezogen, da die Ergebnisse der Agar-Diffusionstests sehr nahe an den Grenzwerten lagen und deshalb zwischen resistent, intermediär und sensibel schwankten.

Insgesamt wurden 570 Datensätze von 71 verschiedenen Patienten ausgewertet. 80,2% dieser Datensätze entsprachen einem einheitlichen Resistenzphänotyp, 16,5% wurden verschiedenen anderen Mustern zugeordnet, 3,3% waren aufgrund unvollständiger Antibiogramme nicht eindeutig auswertbar. Das mit 310 Datensätzen am häufigsten auftretende Resistenzmuster war durch Resistenz gegen alle getesteten Substanzen mit Ausnahme von Imipenem/Meropenem charakterisiert. Diesem einheitlichen Resistenzphänotyp wurden weitere 147 Datensätze zugeordnet, die bei höchstens zwei Substanzen das Testergebnis intermediär statt resistent aufwiesen. Acht Datensätze zeigten das Testergebnis resistent gegenüber allen 14 Substanzen einschließlich Imipenem/Meropenem.

47 Patienten waren mit *K.-pneumoniae*-Isolaten dieses einheitlichen Resistenzphänotyps kolonisiert, während bei 24 Patienten nur Klebsiellen mit anderen Resistenzmustern gefunden wurden. In Abbildung 3.1 ist der zeitliche Verlauf des Auftretens von Isolaten mit dem dominierenden Resistenzphänotyp dargestellt. Es ergaben sich zwei deutliche Häufungen der Fälle: Im Zeitraum von Januar bis August 2002 kam es zu einem Ausbruch, von dem relativ wenig Patienten betroffen waren. Ein größerer Ausbruch fand von Juni 2003 bis April 2004 statt. Im

Rahmen dieses zweiten Ausbruchs waren auf den drei untersuchten Intensivstationen bis zu 19 Patienten gleichzeitig mit *K.-pneumoniae*-Stämmen des dominierenden Resistenzphänotyps kolonisiert oder infiziert.

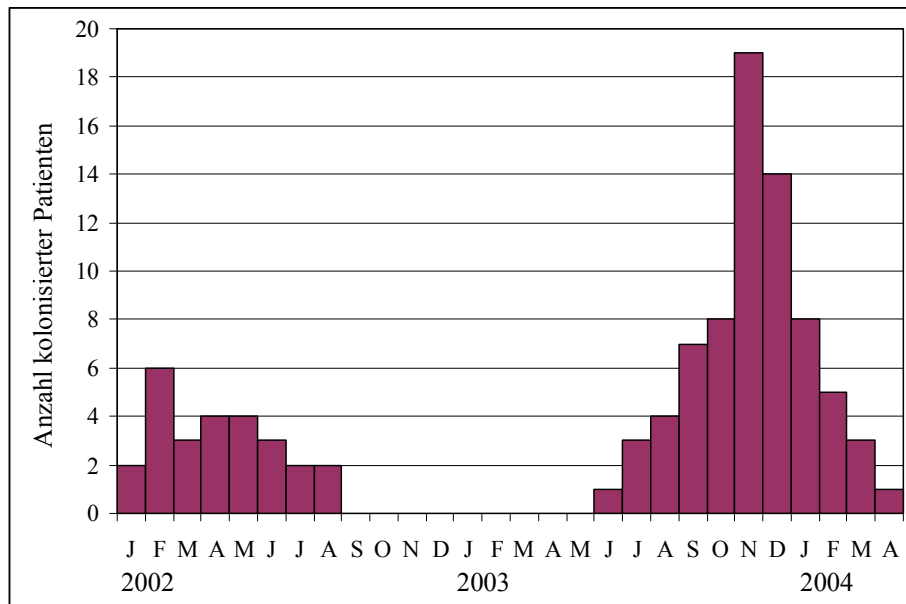


Abb. 3.1: Monatliche Anzahl der mit *K. pneumoniae* des häufigsten Resistenzmusters kolonisierten Patienten

Aufgrund der in beiden Ausbrüchen einheitlichen Antibiogramme wurde zunächst vermutet, dass es sich um zwei aufeinanderfolgende Ausbrüche durch die klonale Verbreitung desselben Stammes handelte. Die PFGE-Typisierung sowie MHK-Bestimmung stichprobenartig asservierter Patientenisolat e führte jedoch zu einem anderen Ergebnis (vgl. Abschnitt 3.3). Aus dem Zeitraum des ersten Ausbruchs waren Patientenisolat e von fünf der neun betroffenen Patienten sowie zwei Umgebungsisolat e verfügbar, die ausnahmslos Klon I zugeordnet wurden. Während des zweiten Ausbruchs wurden 50 Patientenisolat e asserviert, wobei es sich zum Teil um Mehrfachisolat e von einem Patienten handelte. Somit waren von 26 der im zweiten Ausbruch betroffenen 41 Patienten ein oder mehrere Isolat e verfügbar. 48 dieser Stämme sowie drei Umgebungsisolat e aus dem gleichen Zeitraum entsprachen Klon II, welcher keine klonale Verwandtschaft zu Klon I aufwies. Im Untersuchungszeitraum ist es demnach auf den drei Intensivstationen zu zwei klonalen Ausbrüchen mit zwei unterschiedlichen nosokomialen *K.-pneumoniae*-Stämmen (Klon I bzw. Klon II) gekommen.

3.1.2 Korrelation von Liegezeiten und *K.-pneumoniae*-Kolonisation

Für die neun im ersten Ausbruch sowie die 38 im zweiten Ausbruch betroffenen Patienten wurde für jeden Tag ihres Aufenthaltes auf den drei Intensivstationen das Ergebnis der mikrobiologischen Untersuchungen erfasst. Ermittelt wurde sowohl die Art des Probenmaterials als

auch das Untersuchungsergebnis (*K. pneumoniae* vom gesuchten Resistenzmuster / anderes Resistenzmuster oder andere Spezies / kein Wachstum). Mit Hilfe dieser Daten konnte die Liegezeit der Patienten mit dem Zeitraum ihrer Kolonisation mit Klon I bzw. Klon II korreliert werden. In Abbildung 3.2 ist die Liegezeit des jeweiligen Patienten sowohl auf den drei untersuchten Intensivstationen (farblich markierter Balken) als auch auf den Normalstationen der Klinik (grau markierter Balken) dargestellt. Der rote Balken bezeichnet den Zeitraum vom ersten bis zum letzten mikrobiologischen Nachweis von *K. pneumoniae* des gesuchten Resistenzmusters. Zwischenzeitlich negative mikrobiologische Befunde wurden vernachlässigt. Da für die Liegezeiten auf den Normalstationen keine mikrobiologischen Befunde vorlagen, bedeutet das Ende des roten Balkens bei Verlegung auf eine Normalstation nicht das Ende der Kolonisationsdauer. Das Patientenkürzel am Anfang des Balkens setzt sich zusammen aus einer Identnummer sowie der Station, auf welcher bei dem jeweiligen Patienten zum ersten Mal Klebsiellen des gesuchten Resistenzmusters isoliert wurden. Am Ende des Balkens ist der Verlauf der Behandlung dargestellt, wobei zwischen Entlassung (e), Verlegung in eine externe Klinik, Pflege- oder Reha-Einrichtung (v) sowie Tod des Patienten (†) unterschieden wurde. Patient CI-30 wurde zwischenzeitlich in eine Reha-Klinik verlegt (schwarze Linie) und kehrte danach zurück auf die AI. Die Liegezeit der Patienten CI-01, CI-04 und CI-08 begann bereits vor dem Studienzeitraum und ist daher in Abbildung 3.2 verkürzt dargestellt.

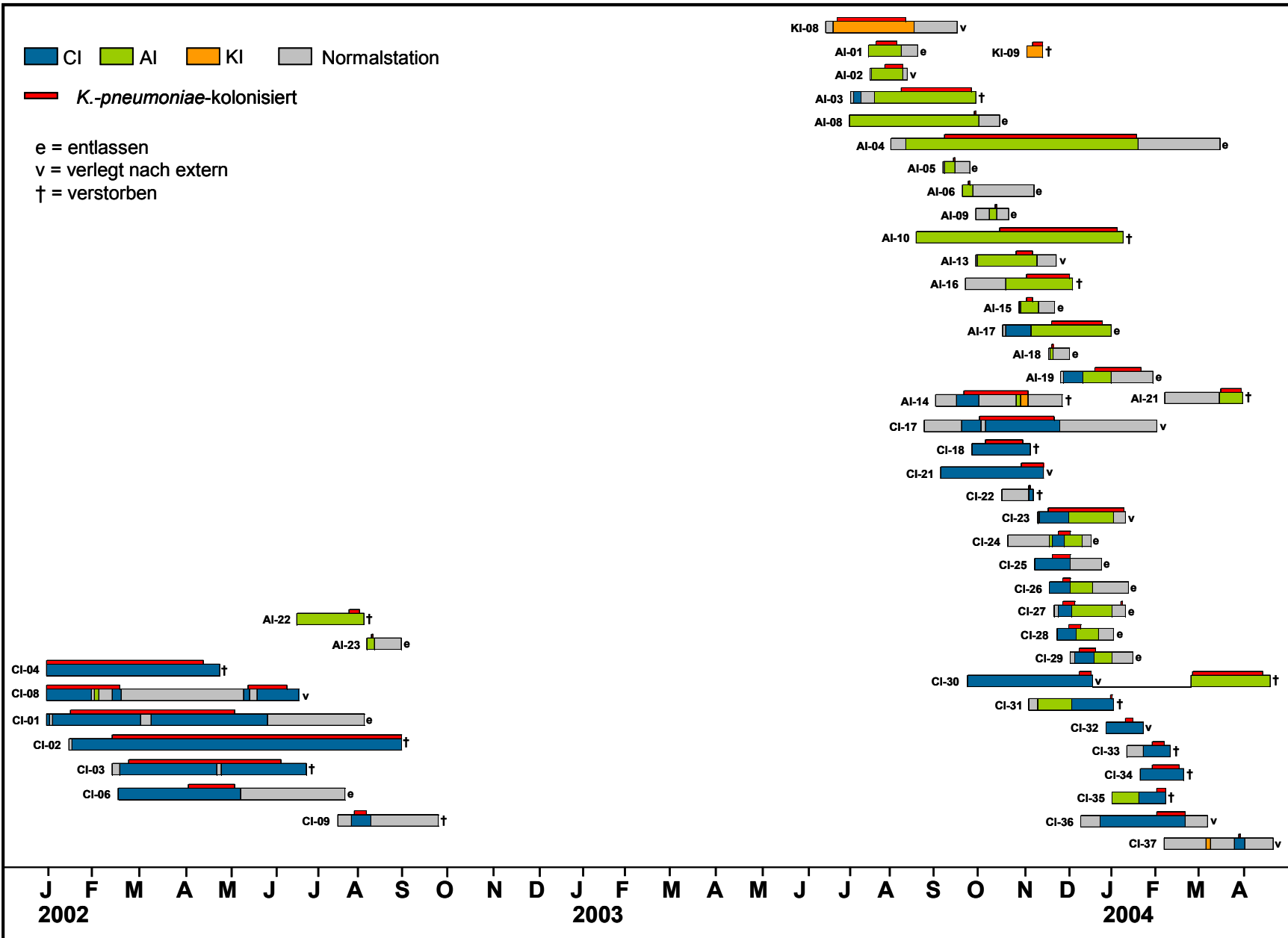
Die Grafik zeigt deutliche Unterschiede zwischen den beiden nosokomialen Ausbrüchen. Im ersten Ausbruch waren sieben Patienten auf der CI sowie zwei Patienten auf der AI betroffen. Die 38 Patienten des zweiten Ausbruchs lassen sich nur bedingt einzelnen Stationen zuordnen, da es häufiger zu Verlegungen zwischen den drei Stationen gekommen ist. Beispielsweise wurden im Dezember 2003 acht Patienten mit nachgewiesener Klebsiellen-Kolonisation zur Kohortenisolation von der CI auf die AI verlegt. Dennoch kann der Grafik eine relativ gleiche Verteilung der kolonisierten Patienten auf AI und CI entnommen werden, während auf der KI nur zwei Patienten betroffen waren.

Im zweiten Ausbruch war somit die vierfache Zahl von Patienten kolonisiert. Demgegenüber ist die durchschnittliche Liegezeit im ersten Ausbruch deutlich länger (Tabelle 3.1).

Tab. 3.1: Vergleich der beiden nosokomialen Ausbrüche

	Anzahl betroffener Patienten	Durchschnittliche Gesamt-Liegezeit (Tage)	Durchschnittliche Liegezeit auf Intensivstationen CI, AI, KI (Tage)
Ausbruch 1	9	139,1	101,4
Ausbruch 2	38	59,2	40,3

Abb. 3.2: Liegezeiten der Patienten und Dauer der Kolonisation mit *K. pneumoniae*.
Weitere Erläuterungen im Text.



3.1.3 Auswertung der Patientendaten des zweiten Ausbruchs

Von den 38 im zweiten Ausbruch betroffenen Patienten wurden neben den mikrobiologischen Befunden für jeden Tag ihres Aufenthaltes auf den drei Intensivstationen Art und Dosierung der verabreichten Antibiotika erfasst. Außerdem wurden für diese Patienten die Anzahl der Tage mit maschineller Beatmung sowie Informationen zur Grunderkrankung ermittelt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse für alle Patienten ist in Tabelle 3.3 dargestellt. Die Gesamtdaten ausgewählter Patienten sind im Anhang unter 7.7 angegeben.

3.1.3.1 Patienten, Beatmung, Erkrankungen

Mit Klebsiellen kolonisiert waren 29 männliche sowie 9 weibliche Patienten. Ihr Durchschnittsalter betrug 62 Jahre, wobei der jüngste Patient 12 und der älteste 80 Jahre alt waren. Die Aufenthaltsdauer der Patienten auf den Intensivstationen betrug mindestens zwei und höchstens 157 Tage mit einem Mittelwert von 40,3 Tagen. Die Patienten wurden durchschnittlich 34,3 Tage beatmet, wobei die Spannweite von einem bis zu 139 Beatmungstagen reichte. Sämtliche Patienten wiesen bei Einlieferung auf die Intensivstationen schwere, oft multimorbide Grunderkrankungen auf (s. Tabelle 3.3). Bei 17 Patienten wurde zudem eine Pneumonie sowie bei 12 Patienten eine Sepsis diagnostiziert. In sieben Fällen wurde *K. pneumoniae* als Erreger der Pneumonie festgestellt, bei insgesamt 12 Patienten fand sich in der Akte ein Hinweis auf Besiedelung oder Infektion mit multiresistenten Klebsiellen.

3.1.3.2 Kolonisation mit *K. pneumoniae*

Die Erstisolierung der multiresistenten *K. pneumoniae* erfolgte einen bis 85 Tage nach Einlieferung des Patienten auf die Intensivstationen. Im Durchschnitt wurden die Patienten nach 17,8 Tagen mit *K. pneumoniae* besiedelt. Die längste Kolonisationsdauer eines Patienten auf der Intensivstation betrug mindestens 83 Tage (Patient AI-10).

3.1.3.3 Therapie, Eradikation der Klebsiellen

Bei den Patienten dieser Studie wurden 26 verschiedene Substanzen zur antimikrobiellen Therapie eingesetzt. In der Studie wurden insgesamt 1573 Patiententage auf den drei Intensivstationen ausgewertet. In Tabelle 3.2 ist die Anzahl der Patiententage pro Substanz angegeben. Ihre Gesamtsumme beträgt 3053 Tage, da einem Patienten durchschnittlich 1,94 und maximal fünf Substanzen oder Substanzkombinationen gleichzeitig verabreicht wurden. Am häufigsten kamen Meropenem, Piperacillin/Sulbactam, Levofloxacin, Ciprofloxacin und Amikacin zum Einsatz.

Tab. 3.2: Häufigkeit des Einsatzes verschiedener Antibiotika (Stationen AI, CI, KI)

Antibiotikum	Patiententage	Antibiotikum	Patiententage
Meropenem	605	Teicoplanin	45
Piperacillin/Sulbactam	447	Cefotaxim	34
Levofloxacin	378	Erythromycin	32
Ciprofloxacin	283	Moxifloxacin	29
Amikacin	278	Ampicillin/Sulbactam	28
Linezolid	132	Cefuroxim	27
Fosfomycin	129	Penicillin/Sulbactam	18
Ceftazidim/Sulbactam	107	Ceftriaxon	17
Metronidazol	89	Tobramycin	16
Vancomycin	86	Ceftriaxon/Sulbactam	15
Clindamycin	66	Ceftazidim	5
Cefotaxim/Sulbactam	61	Piperacillin/Tazobactam	4
Gentamicin	59	Doxycyclin	3
Cotrimoxazol	58	Mezlocillin	2

Die Initialtherapie erfolgte bei allen Patienten unter anderem mit einem β -Laktam. In 22 Fällen wurde initial mit Piperacillin/Sulbactam sowie in weiteren elf Fällen zunächst kurzzeitig mit einem Cephalosporin und nachfolgend mit Piperacillin/Sulbactam therapiert. Lediglich bei sechs Patienten wurde von diesem Therapieschema abgewichen. In Tabelle 3.3 ist die Therapie in den letzten zehn Tagen vor der jeweiligen Erstisolierung von Klebsiellen angegeben. 33 Patienten wurden in dieser Zeit mit Piperacillin/Sulbactam therapiert, meist in Kombination mit Ciprofloxacin, Levofloxacin oder Metronidazol.

Bei 27 Patienten erfolgte einen bis neun Tage nach dem ersten Klebsiellen-Befund eine Umstellung der Therapie auf Meropenem, oft in Kombination mit Amikacin und/oder einem Fluorchinolon. In acht weiteren Fällen wurden die Klebsiellen erst im letzten Abstrich vor der Verlegung isoliert, so dass über die weitere Therapie keine Aussage gemacht werden kann. In vier Fällen bleibt unklar, aus welchem Grund keine Umstellung auf Meropenem erfolgte.

Nur bei drei der 27 mit Meropenem therapierten Patienten (CI-26, CI-28, CI-32) konnte Klon II unter der Therapie mit Meropenem zweifelsfrei eradiziert werden. Diese Patienten wurden mit der Kombination Meropenem/Amikacin behandelt. Bei 16 Patienten konnten die Klebsiellen durch die Meropenem-Therapie nicht eradiziert werden und waren bis zur Verlegung, teilweise auch noch auf der Normalstation, in den Abstrichen oder im Stuhl nachweisbar. In acht Fällen kann keine Aussage getroffen werden, da die Klebsiellen entweder erst im letzten Befund vor der Verlegung (zwei Patienten) oder später auf der Normalstation (ein Patient) nachgewiesen wurden, oder da nur der letzte Befund negativ war (fünf Patienten).

Tab. 3.3: Überblick über die im zweiten Ausbruch betroffenen Patienten

Patient	AI-01	AI-02	AI-03	AI-04 (Stuhluntersuchung)	AI-05	AI-06	AI-08	AI-09	AI-10 (Stuhlunters.)
Gesamte Liegezeit (Tage)	32	24	83	221	17	47	100	21	139
Liegezeit Intensivstationen (Tage)	22 AI	21 AI	4 CI, 67 AI	157 AI	7 AI	7 AI	87 AI	5 AI	139 AI
Alter, Geschlecht	37, m	69, m	64, w	36, w	63, m	45, m	68, m	66, m	67, w
Grunderkrankung	Polytrauma (Fenstersturz)	Bypass-Operation	großflächige septische Hautnekrosen	Mediastinitis, Pleuraempyem	Nasennebenhöhlen-Karzinom	Polytrauma (Motorradunfall)	Nierenzell-Karzinom	Bronchial-Karzinom	Meningitis, Sepsis, Lungenhämatom
Zusätzl. relevante Diagnosen	Kpneu-Pneumonie, Wundinfektion	Pneumonie	Sepsis	Sepsis	Bronchopneumonie	-	Pneumonie, Lungenversagen	-	-
Verlauf	Verlegung NS, Entlassung	Verlegung NS, Verlegung exKH	Tod (septisches MOV)	Verlegung NS, Entlassung	Verlegung NS, Entlassung	Verlegung NS, Entlassung	Verlegung NS, Entlassung	Verlegung NS, Entlassung	Tod
Beatmungstage	19	20	64	121	6	6	87	2	139
Kpneu isoliert (Tag auf Intensiv)	6.	10.	19. AI	28.	7.	5.	85.	5.	57.
Umstellung auf Meropenem (Tag)	12.	15.	28. AI	31.	-	-	-	-	64.
Antibiose 10 Tage vor 1. Kpneu-Iso	PIS+CIP	PIS bzw. PIS+LEV	CAZ+SUL+CIP+LIZ bzw. VAN+GEN	PIS+LEV+FOS bzw. CAZ+SUL+LEV+FOS	CXM bzw. PIS+LEV	CXM bzw. PIS	AMS	CXM	PIS+CIP bzw. CAZ+SUL+VAN
Kombination von Meropenem mit	MER+FOS	MER allein	MER+AMK bzw. MER+AMK+CIP	MER + diverse	-	-	-	-	MER+MOX bzw. MER+AMK
Eradikation der Kpneu ?	nein (bis letzter Befund)	nein (bis Verlegung)	nein (bis letzter Befund)	nein (bis Verlegung)	? (1. Isolation letzter Tag)	? (1. Isolation letzter Befund)	? (1. Isolation letzter Befund)	? (1. Isolation letzter Tag)	nein (bis letzter Befund)
Kpneu-kolonisiert (Tage Intensiv)	≥ 14	≥ 12	≥ 50	52	1	≥ 1	≥ 1	1	≥ 83
Material mit Kpneu	N, R, T, W	N, R, T, ZVK	T, R, N, W, ZVK, Blut	T, R, N, W, Stuhl	R	R	T, R	R	T, R, BS, N, ZVK, W, Stuhl
Stuhlisolat	-	-	-	Klon II-B	-	-	-	-	Klon II-B
anderes Isolat	-	Klon II-A	-	Klon II-A, Klon II-C	-	-	-	Klon II-A	Klon II-B2
Bemerkungen	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fortsetzung Tab. 3.3: Überblick über die im zweiten Ausbruch betroffenen Patienten

Patient	AI-13	AI-14	AI-15	AI-16	AI-17 (Stuhllunters.)	AI-18	AI-19 (Stuhllunters.)	AI-21	CI-17
Gesamte Liegezeit (Tage)	53	84	23	81	72	13	61	53	155
Liegezeit Intensivstationen (Tage)	40 AI	15 CI, 8 AI/KI	12 AI	43 AI	17 CI, 54 AI	2 AI	13 CI, 19 AI	16 AI	63 CI
Alter, Geschlecht	77, w	69, m	66, m	26, m	65, w	12, m	55, m	71, m	65, m
Grunderkrankung	perfor. Diverticulitis, Peritonitis	Aspirationspneumonie, Leberresektion	Ösophagus-Karzinom	kutanes T-Zell-Lymphom	Sepsis, Abszesse, Meningitis	Ewing-Sarkom	Ösophagus-Karzinom	Leberabszesse, Leberzirrhose	Leberzellkarzinom, Transplantation
Zusätzl. relevante Diagnosen	Wundinfektion	Kpneu-Pneumonie, Lungenödem	-	Kpneu-Pneumonie, Aspergillose	Pneumonie	-	post-OP: Sepsis, Pneumonie	Lungenversagen, Sepsis	Immunsuppression
Verlauf	Verlegung NS, Verlegung exKH	Verlegung NS, Tod (MOV)	Verlegung NS, Entlassung	Tod (septisches MOV)	Entlassung (Reha)	Verlegung NS, Entlassung	Verlegung NS, Entlassung	Tod (septisches MOV)	Verlegung NS
Beatmungstage	34	11	10	43	52	1	29	16	38
Kpneu isoliert (Tag auf Intensiv)	28.	6.	5.	13.	32.	2.	4.	8.	13.
Umstellung auf Meropenem (Tag)	-	10.	8.	15.	40.	-	5.	13.	17.
Antibiose 10 Tage vor 1. Kpneu-Iso	PIS	PIS+LEV	PIS+MTR	PIS+LEV+DOX bzw. PIS+LEV+LIZ	LEV+CLI+LIZ bzw. FOS+CLI+MTR	CXM	PIS+MTR	PIS+MTR bzw. PIS+CIP	PIS+CIP+CLI bzw. PIT+CIP
Kombination von Meropenem mit	-	MER+AMK bzw. MER+CRO	MER+CIP+AMK bzw. MER+CIP	MER+CIP bzw. MER+CIP+AMK	MER-LEV-FOS bzw. MER-AMK	-	MER+AMK bzw. MER+AMK+LIZ	MER allein	MER+LEV+VAN MER+LEV+LIZ MER+CIP+VAN
Eradikation der Kpneu ?	nein (bis letzter Befund)	nein (bis Verlegung)	? (nur letzter Befund negativ)	nein (bis letzter Befund)	nein (Stuhl bleibt positiv)	? (1. Isolation letzter Tag)	nein (Stuhl + Befunde auf CNS positiv)	nein (bis letzter Befund)	nein (positiv auch nach Verlegung)
Kpneu-kolonisiert (Tage Intensiv)	≥ 11	≥ 19 +25 CNS	≥ 4	≥ 16	≥ 26	1	29	≥ 9	≥ 50
Material mit Kpneu	R, T, N, Vaginalabstrich	R, T, B	T, R, B, N	T, R, N, W, KS	R, T, N, Stuhl	N	T, R, N, Drainage, Stuhl	T, R, N	T, R, Analabstrich, Drainage
Stuhlisolat	-	-	-	-	Klon II-B	-	Klon II-A, Klon II-B	-	-
anderes Isolat	Klon II-A	Klon II-A	Klon II-A	Klon II-B2	-	-	Klon II-A	-	Klon II-B2
Bemerkungen	Kein MER trotz Kpneu. 07/2004 erneut Kpneu	Verlegung von AI auf KI wegen Kapazität	-	Mit MER keine Kpneu, nach Absetzen erneut	Trotz MER Kpneu im Stuhl. Kohortenisolation auf AI.	-	Kohortenisolation auf AI wegen Kpneu	-	Klon II-B2 auch später auf MI (21 Tage nach CI)

Fortsetzung Tab. 3.3: Überblick über die im zweiten Ausbruch betroffenen Patienten

Patient	CI-18	CI-21	CI-22	CI-23 (Stuhluntersuchung)	CI-24	CI-25	CI-26	CI-27 (Stuhluntersuchung)
Gesamte Liegezeit (Tage)	39	69	20	58	55	44	52	47
Liegezeit Intensivstationen (Tage)	39 CI	69 CI	3 CI	20 CI, 30 AI	2 AI, 8 CI, 12 AI	24 CI	14 CI, 15 AI	9 CI, 27 AI
Alter, Geschlecht	73, m	79, m	60, w	76, m	74, m	41, m	34, w	62, m
Grunderkrankung	BAA, Dünndarm-Perforation	Nierenblutung	Leukämie, eitrige Peritonitis	Bauchaorten-Aneurysma, Beinamputation, Nekrosen	Rektum-Amputation (Karzinom)	Polytrauma	akutes Leberversagen	Bronchial-Karzinom
Zusätzl. relevante Diagnosen	Sepsis, MOV	bleibt beatmungspflichtig	post-OP: Sepsis, Pneumonie	Kpneu-Besiedelung, Wundinfektion, gramneg. Sepsis	Kpneu-Besiedelung der Bauchwunde	Lungenhämatom, Fieber	Kpneu-Besiedelung	Klebsiellen-Pneumonie
Verlauf	Tod (septisches MOV)	Verlegung exKH, dort Tod	Tod (septisches MOV)	Verlegung NS, Verlegung exKH	Verlegung NS, Entlassung	Verlegung NS, Entlassung	Verlegung NS, Entlassung	Verlegung NS, Entlassung
Beatmungstage	39	69	3	31	13	23	24	20
Kpneu isoliert (Tag auf Intensiv)	10.	55.	1.	7.	7.	13.	10.	4.
Umstellung auf Meropenem (Tag)	19.	-	2.	16.	10.	19.	11.	8.
Antibiose 10 Tage vor 1. Kpneu-Iso	AMS bzw. PIS+GEN	PIS+CIP bzw. PIS	PIT+MTR	PIS+MTR bzw. PIS+MTR+CIP	PIS+MTR	PIS+LEV	PIS bzw. PIS+CIP	CXM
Kombination von Meropenem mit	MER+CIP bzw. MER+CIP+VAN	-	MER+LEV	MER+AMK bzw. MER+AMK+CLI	MER+LEV bzw. MER+AMK	MER allein	MER+AMK	MER+AMK+CIP bzw. MER+AMK+CRO
Eradikation der Kpneu ?	? (nur letzter Befund negativ)	nein (bis Verlegung)	? (nur ein Befund)	nein (Befunde frei, Stuhl bleibt positiv)	? (nur letzter Befund negativ)	nein (bis Verlegung)	ja (negativ ab Tag 17)	? (negativ ab Tag 15, Stuhl später positiv)
Kpneu-kolonisiert (Tage Intensiv)	≥ 25	≥ 15	≥ 14	≥ 52	≥ 8	≥ 13	≥ 5	≥ 8
Material mit Kpneu	T, R, ZVK, W	T, R	T, R	T, R, W, KS, ZVK, Stuhl	R, T, W, ZVK	R, T	R	R, B
Stuhlisolat	-	-	-	Klon II-B	-	-	-	Klon II-A
anderes Isolat	Klon II-A	Klon II-A	Klon II-A	-	-	Klon II-A	-	-
Bemerkungen	-	Keine MER-Therapie trotz Kpneu	Kpneu ab Tag 1, stammen von CNS?	Kohortenisolation AI. Befunde frei ab Tag 28, Stuhl bleibt positiv auf CNS	Kohortenisolation auf AI wegen Kpneu	Klon II-A später auf CNS isoliert	Kohortenisolation auf AI wegen Kpneu	Kohortenisolation AI. Stuhl erst auf CNS positiv (MER abgesetzt)

Fortsetzung Tab. 3.3: Überblick über die im zweiten Ausbruch betroffenen Patienten

Patient	CI-28 (Stuhluntersuchung)	CI-29 (Stuhluntersuchung)	CI-30 1. Liegezeit	CI-30 2. Liegezeit	CI-31 (Stuhluntersuchung)	CI-32	CI-33	CI-34
Gesamte Liegezeit (Tage)	37	41	84	53	56	25	28	28
Liegezeit Intensivstationen (Tage)	13 CI, 15 AI	13 CI, 12 AI	84 CI	53 AI	23 AI, 28 CI	25 CI	18 CI	28 CI
Alter, Geschlecht	67, m	59, m	79, m	80, m	60, w	41, w	79, m	51, m
Grunderkrankung	schweres Thoraxtrauma (Reitunfall)	Bandscheiben-OP	Bauchaorten-Aneurysma	Sepsis, Nekrosen, Kpneu-Pneumonie	Nieren-Karzinom, lymph. Metastasen	Lungenversagen, Dyspnoe	retroperitoneale Blutung, OP	Dickdarm-Diverticulitis, sept. Peritonitis
Zusätzl. relevante Diagnosen	Klebsiellen-Pneumonie	post-OP: Pneumonie & Sepsis	post-OP: MOV, Kpneu-Pneumonie	Lungenfibrose	Pneumonie, Sepsis	-	fulminante Klebsiellen-Pneumonie	Sepsis
Verlauf	Verlegung NS, Entlassung	Verlegung NS, Entlassung	Verlegung Reha	Tod (septisches MOV)	Tod (septisches MOV)	Verlegung exKH	Tod (MOV)	Tod (septisches MOV)
Beatmungstage	22	22	84	53	51	22	18	29
Kpneu isoliert (Tag auf Intensiv)	9.	4.	76.	2.	50.	14.	7.	9.
Umstellung auf Meropenem (Tag)	13.	9.	80.	6.	-	19.	9.	14.
Antibiose 10 Tage vor 1. Kpneu-Iso	PIS bzw. PIS+LEV	PIS+LEV	PIS+CIP	PIS+LEV	CTX+SUL+CIP+SXT bzw. CIP+SXT+CLI	PIS+LEV+ERY	PIS+LEV	PIS+CIP+MTR
Kombination von Meropenem mit	MER+AMK+CIP bzw. MER+AMK	MER+LEV bzw. MER+AMK+CIP	MER allein	MER+AMK	-	MER+AMK	MER+AMK bzw. MER+AMK+TEI	MER+AMK
Eradikation der Kpneu ?	ja (keine Kpneu ab Tag 19, Stuhl negativ)	? (weiter keine Befunde, Stuhl negativ)	nein (bis letzter Tag)	nein (Kpneu erster bis letzter Befund)	? (erstes Isolat vorletzter Tag)	ja (keine Kpneu ab Tag 21)	? (nur letzter Befund negativ)	? (nur letzter Befund negativ)
Kpneu-kolonisiert (Tage Intensiv)	≥ 8	≥ 11	≥ 8	≥ 47	≥ 1	≥ 5	≥ 8	≥ 15
Material mit Kpneu	R	R, KS, ZVK, Blut	R, T, ZVK	ZVK, T, R, N, W	R	T, R	T, R	T, R
Stuhlisolat	-	-	-	-	-	-	-	-
anderes Isolat	-	-	Klon II-A	-	-	Klon II-A	Klon II-A	Klon II-A
Bemerkungen	Kohortenisolation AI. Stuhl auf CNS negativ (MER abgesetzt)	Kohortenisolation AI. Stuhl negativ, Rachen positiv	Kpneu mit in Reha-Klinik?	Kpneu seit 1. Liegezeit? Therapieeinstellung Tag 24	Bereits vor Kpneu-Befund 15 Tage MER	-	-	Therapieeinstellung Tag 28

Fortsetzung Tab. 3.3: Überblick über die im zweiten Ausbruch betroffenen Patienten

Patient	CI-35	CI-36	CI-37	KI-08	KI-09
Gesamte Liegezeit (Tage)	35	85	72	92	11
Liegezeit Intensivstationen (Tage)	18 AI, 18 CI	57 CI	3 KI, 7 CI	57 KI	11 KI
Alter, Geschlecht	73, m	80, m	76, m	77, m	76, m
Grunderkrankung	Sepsis, MOV bei gramneg. Sepsis	Bauchaorten-Aneurysma	Bypass-OP, Magenresektion (Karzinom)	Bypass-OP	Bypass-OP, Schlaganfall
Zusätzl. relevante Diagnosen	Pneumonie, Lungenversagen	-	-	Wundheilungsstörungen Sternum	Sepsis, Pneumonie
Verlauf	Tod (gramneg. sept. MOV)	Verlegung NS, Verlegung exKH	Verlegung NS, Verlegung Reha	Verlegung NS, Verlegung exKH	Tod (sept. MOV)
Beatmungstage	28	51	4	22	11
Kpneu isoliert (Tag auf Intensiv)	31.	39.	4. CI	4.	5.
Umstellung auf Meropenem (Tag)	-	40.	-	-	-
Antibiose 10 Tage vor 1. Kpneu-Iso	PIS+LEV	GEN+LIZ bzw. PIS+CIP	PIS+MTR	PIS+LEV	PIS
Kombination von Meropenem mit	-	MER+AMK	-	-	-
Eradikation der Kpneu ?	nein (bis letzter Tag positiv)	nein (bis letzter Tag positiv)	? (nur ein Befund)	nein (bis letzter Befund)	nein (bis letzter Tag positiv)
Kpneu-kolonisiert (Tage Intensiv)	≥ 6	≥ 19	≥ 1	≥ 48	≥ 7
Material mit Kpneu	T, R, KS, W	T, R	T, R	T, R, B, OP-Wunden	W, T, R
Stuhlisolat	-	-	-	-	-
anderes Isolat	Klon II-A	Klon II-A	-	-	Klon II-A
Bemerkungen	-	-	-	Keine MER-Therapie trotz Kpneu	Keine MER-Therapie trotz Kpneu

Abkürzungen:

Kpneu = *Klebsiella pneumoniae*
(hier: Klon II)

BAA = Bauchaorten-Aneurysma
MOV = multiples Organversagen

NS = Normalstation
CNS = chirurgische Normalstation
AI = anästhesiologische Intensivstation
CI = chirurgische Intensivstation
KI = kardiochirurgische Intensivstation
MI = medizinische Intensivstation

exKH = externes Krankenhaus
Reha = Rehabilitationsklinik
R = Rachenabstrich
T = Trachealsekret
B = Bronchialsekret
N = Nasenabstrich
W = Wundabstrich
KS = Katheterspitze
ZVK = zentraler Venenkatheter

Antibiotika-Abkürzungen nach DIN:
s. Anhang 7.2

3.2 Untersuchung von Stuhlproben

3.2.1 Stuhlproben der Patienten

Die intestinale Kolonisation hospitalisierter Patienten ist ein wichtiges Reservoir für die Ausbreitung multiresistenter Stämme. Während des zweiten Ausbruchs wurden daher in einem Zeitraum von 37 Tagen (13.12.03-18.01.04) Stuhlproben von insgesamt zwölf Patienten untersucht. Vier Patienten lagen zum Zeitpunkt der Stuhluntersuchung auf der CI, acht weitere auf der AI. Die Liegezeiten für den relevanten Zeitraum, die Zeitpunkte der Stuhlprobennahme, der zeitgleiche Nachweis von *K. pneumoniae* in anderen Materialien sowie die Therapie mit Meropenem und Amikacin sind in Abbildung 3.3 dargestellt.

Tab. 3.4: Ergebnisse der Stuhluntersuchungen. (Abkürzungen s. Legende Tab. 3.3)

Patient	Probe	Entnahmedatum	Station	Isolat	Zellzahl <i>K. pneumoniae</i> (KBE/g Stuhl)	Gesamtzellzahl <i>Enterobacteriaceae</i> (KBE/g Stuhl)
ST-01	1	15.12.03	CI	Klon III (S-12573)	- (Abstrich)	-
ST-02	1	16.12.03	CI	Klon III (S-12574)	- (Abstrich)	-
AI-17	1	13.12.03	AI	Klon II-B (S-12577)	- (Anreicherung)	-
	2	16.12.03	AI	Klon II-B (S-12578)	3,6 x 10 ⁵	3,6 x 10 ⁵
	3	22.12.03	AI	Klon II-B (S-12938)	2,7 x 10 ⁶	2,7 x 10 ⁶
	4	23.12.03	AI	Klon II-B (S-12941)	6,4 x 10 ⁷	6,4 x 10 ⁷
AI-04	1	16.12.03	AI	Klon II-B (S-12579)	6,0 x 10 ³	6,0 x 10 ³
	2	31.12.03	AI	Klon II-B (S-00001)	1,1 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁵
AI-10	1	16.12.03	AI	Klon II-B (S-12639)	1,5 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁶
	2	17.12.03	AI	Klon II-B (S-12770)	4,0 x 10 ⁴	5,9 x 10 ⁶
	3	22.12.03	AI	Klon II-B (S-12939)	- (Anreicherung)	1,8 x 10 ⁴
AI-19	3	02.01.04	CNS	Klon II-B (S-00006)	4,0 x 10 ³	1,9 x 10 ⁵
	4	05.01.04	CNS	Klon II-A (S-00031)	1,3 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁸
	5	18.01.04	CNS	Klon II-A (S-00444)	4,8 x 10 ⁷	8,8 x 10 ⁷
CI-23	1	15.12.03	AI	Klon II-B (S-12942)	- (Anreicherung)	-
	2	27.12.03	AI	Klon II-B (S-12947)	2,0 x 10 ³	2,0 x 10 ³
	3	02.01.04	CNS	Klon II-B (S-00005)	2,0 x 10 ³	2,0 x 10 ³
	4	05.01.04	CNS	Klon II-B (S-00032)	2,0 x 10 ³	2,0 x 10 ³
	5	06.01.04	CNS	Klon II-B (S-00061)	4,0 x 10 ³	3,0 x 10 ⁵
CI-27	4	05.01.04	CNS	Klon II-A (S-00060)	3,2 x 10 ⁶	6,0 x 10 ⁶

Bei sechs Patienten auf der AI sowie zwei Patienten auf der CI konnten im Stuhl multiresistente *K. pneumoniae* nachgewiesen werden (Tabelle 3.4). Die spätere PFGE-Untersuchung und MHK-Bestimmung (vgl. 3.3) zeigte, dass alle Isolate von der AI dem Klon II zuzuordnen waren, während die zwei Patienten auf der CI mit Klebsiellen eines abweichenden PFGE- und Resistenzmusters (Klon III) kolonisiert waren. Bei vier Patienten war Klon II bereits auf der AI im Stuhl nachweisbar. Trotz der zeitgleichen Kombinationstherapie mit Meropenem und

Amikacin traten hohe Zellzahlen von bis zu $6,4 \times 10^7$ KBE/g Stuhl auf. Bei einem dieser Patienten (CI-23) konnte auch nach der Verlegung auf eine chirurgische Normalstation eine fort-dauernde Besiedelung des Gastrointestinaltraktes mit *K. pneumoniae* nachgewiesen werden. In den Stuhlproben von zwei weiteren Patienten (AI-19, CI-27) waren unter der Merope-nem/Amikacin-Therapie auf der AI keine Klebsiellen nachweisbar. Nach Verlegung auf die Normalstation und Absetzen der Antibiotika konnte der Klon II jedoch auch bei diesen Pati-enten mit hohen Zellzahlen von bis zu $1,3 \times 10^8$ KBE/g Stuhl isoliert werden.

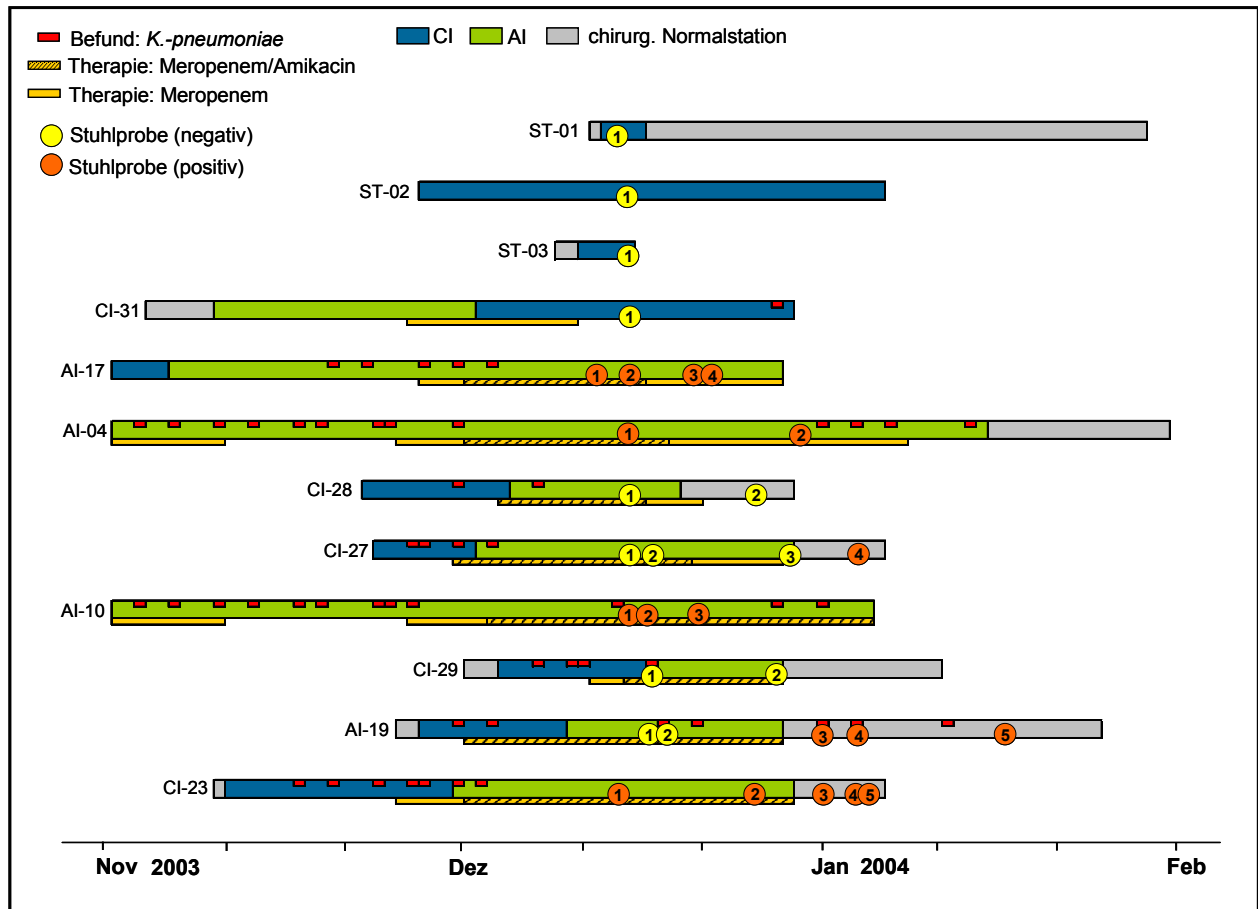


Abb. 3.3: Ergebnisse der Stuhluntersuchungen. Berücksichtigt wurden nur die Antibiotika Meropenem und Amikacin. Die Nummerierung der Stuhlproben bezieht sich auf Tabelle 3.4. Einige Liegezeiten sind ausschnitts-weise dargestellt.

3.2.2 Stuhlproben des Personals

Da auch kolonisiertes Personal eine wichtige Kontaminationsquelle darstellt, wurde eine Stuhluntersuchung des Pflegepersonals der drei Stationen angestrebt. Es konnten jedoch nur sieben Proben von der AI sowie zwei von der CI erhalten werden. In acht Proben wurden kei-ne Klebsiellen nachgewiesen, während aus einer Probe von der AI der nicht-multiresistente Stamm PS-032A (Klon IV) isoliert wurde, dessen PFGE-Muster nicht mit Klon I oder Klon II übereinstimmte.

3.3 Epidemiologie der *K.-pneumoniae*-Stämme

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden im Zeitraum Januar 2002 bis März 2004 auf drei Intensivstationen 57 Patientenisolat von 32 verschiedenen Patienten sowie 16 Isolate aus der Umgebung der Patienten asserviert (vgl. Tab. 2.1, 2.2, 2.3). 24 Patientenisolat stammten aus untersuchten Stuhlproben, während die weiteren 33 Stämme aus Untersuchungsmaterialien verschiedener Herkunft isoliert wurden. Am häufigsten waren dies Rachenabstriche und Trachealsekret, seltener Wundabstriche sowie Abstriche von Katheterspitzen (Blasen-, Sheldon-, Arterien- und ZV-Katheter). Ein weiterer Stamm wurde aus einer Stuhlprobe des Pflegepersonals isoliert.

3.3.1 Identifizierung

Alle aus der Universitätsklinik übersandten Isolate wurden biochemisch als *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* reidentifiziert. Ebenso wurden alle aus den Stuhlproben isolierten Stämme als *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* identifiziert.

3.3.2 Typisierung mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese

Im Anschluss an die Identifizierung erfolgte die Typisierung der 74 Isolate mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE). Wie unter 2.5.10 beschrieben, wurde bei Isolaten mit identischem Fragmentmuster angenommen, dass es sich um den gleichen Klon handelte. Isolate mit zwei bis drei Unterschieden im Bandenmuster wurden als Varianten eines Klons betrachtet. Die Ergebnisse der PFGE-Typisierung sind in Tabelle 3.5 dargestellt, Abbildung 3.4 zeigt exemplarische PFGE-Gele. Die Fragmentmuster aller untersuchten Stämme sind im Anhang 7.6 abgebildet. Aus einigen Stuhlproben wurden zwei Isolate mit unterschiedlicher Koloniemorphologie asserviert. Diese sind in Tabelle 3.5 mit dem Zusatz a (stark schleimende Kolonie) und b (sehr wenig Schleimbildung) versehen.

Anhand der PFGE-Fragmentmuster konnten zwei verschiedene gehäuft auftretende Klone identifiziert werden. Sieben Stämme, darunter alle fünf Patientenisolat aus dem Jahr 2002 sowie zwei Umgebungsisolat aus dem gleichen Zeitraum (Januar 2002 bis April 2002), wurden Klon I zugeordnet. Zwei dieser Patientenisolat bildeten Varianten des Klons I (Ia, Ib).

Insgesamt 53 Stämme, darunter 28 Patientenisolat, 22 Patientenisolat aus Stuhlproben und drei Umgebungsisolat, konnten Klon II zugeordnet werden. Sechs dieser Isolate bildeten vier verschiedene Varianten des Klons II (IIa, IIb, IIc, IId), während die anderen 47 Isolate identische Bandenmuster aufwiesen. Alle Isolate des Klons II stammen aus dem Zeitraum August 2003 bis Februar 2004.

14 Isolate aus dem Stammkollektiv zeigten von Klon I und II abweichende Fragmentmuster und wurden zehn weiteren Klonen zugeordnet (Klon III - Klon XII). Keines dieser Fragmentmuster trat häufiger als zweimal auf. In diese Gruppe konnten auch zwei Isolate aus Stuhlproben (Klon III) sowie ein *K.-pneumoniae*-Stamm aus einer Stuhlprobe des Pflegepersonals (Klon IV) eingeordnet werden.

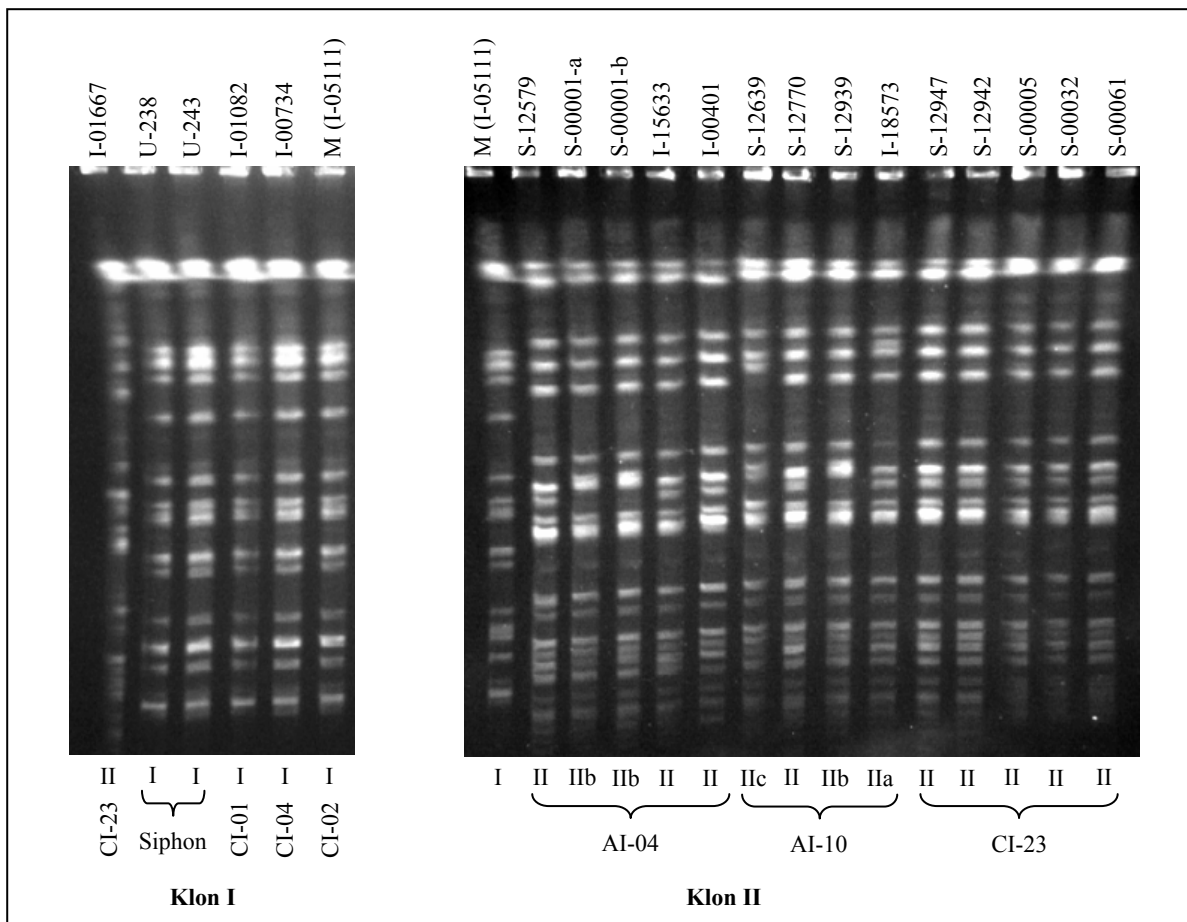


Abb. 3.4: Exemplarische PFGE-Gele von Klon I und Klon II. Über dem Gel sind die einzelnen Stämme angegeben. Der mit M bezeichnete Stamm (Klon I) wurde auf jedes Gel als Marker aufgetragen. Unter dem Gel sind die zugehörigen PFGE-Typen sowie die Patienten bzw. Isolationsorte angegeben, von denen die jeweiligen Isolate stammen.

Die Ergebnisse der PFGE-Typisierung zeigen, dass es im Untersuchungszeitraum auf den drei Intensivstationen zu zwei klonalen Ausbrüchen mit zwei unterschiedlichen nosokomialen *K.-pneumoniae*-Stämmen (Klon I bzw. Klon II) gekommen ist. Klon I trat im Rahmen des ersten Ausbruchs von Januar 2002 bis April 2002 auf, während Klon II für den zweiten Ausbruch von August 2003 bis März 2004 verantwortlich war.

Tab. 3.5: Antibiotika-Empfindlichkeit, MHK-Muster und PFGE-Profil der *K.-pneumoniae*-Isolate. Grau unterlegt: Resistent oder intermediär nach DIN bzw. EUCAST.

Stamm	PFGE-Profil	MHK-Muster	Antibiotika-Empfindlichkeit: MHK (µg/ml)																							
			Ampicillin	Amoxicillin/ Clavulansre.	Ampicillin/ Sulbactam	Piperacillin/ Sulbactam	Piperacillin/ Tazobactam	Imipenem	Meropenem	Ertapenem	Ceftazidim	Ceftazidim/ Clavulansre.	Cefotaxim	Cefotaxim/ Clavulansre.	Cefepim	Cefuroxim	Ceftriaxon	Cefoxitin	Amikacin	Tobramycin	Gentamicin	Cipro- floxacin	Moxi- floxacin	Doxycyclin	Co- trimoxazol	Chlor- amphenicol
I-05111	I	D	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	0,5	≤0,25	1	>32	2/4	>32	0,5/4	>32	>128	>32	128	8	16	128	>128	>8	8	>128	>128
I-05113	Ia	D	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	≤0,25	≤0,25	0,5	>32	1/4	>32	0,5/4	>32	>128	>32	64	8	8	128	>128	>8	4	>128	>128
I-05134	Ib	D	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	0,5	≤0,25	1	>32	4/4	>32	0,5/4	>32	>128	>32	128	8	16	128	>128	>8	8	>128	>128
I-00734	I	D	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	0,5	≤0,25	0,5	>32	2/4	32	0,5/4	16	128	32	64	8	16	128	>128	>8	4	>128	>128
I-01082	I	D	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	0,5	≤0,25	0,5	>32	2/4	32	1/4	16	128	32	128	16	16	>128	>128	>8	8	>128	>128
U-238	I	D	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	0,5	≤0,25	0,5	>32	2/4	>32	1/4	16	128	>32	128	16	8	64	>128	>8	4	>128	64
U-243	I	D	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	0,5	≤0,25	0,5	>32	4/4	32	4/4	8	128	>32	128	8	16	128	>128	>8	8	>128	>128
I-11531	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	0,5	≤0,25	≤0,25	16	1/4	>32	≤0,25/4	>32	>128	>32	8	1	4	64	32	8	2	>128	>128
I-14885	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	≤0,25	≤0,25	≤0,25	16	1/4	>32	≤0,25/4	>32	>128	>32	16	1	2	32	32	8	2	>128	>128
I-15258	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	≤0,25	≤0,25	≤0,25	32	2/4	>32	≤0,25/4	>32	>128	>32	8	2	4	32	32	8	2	>128	>128
I-15633	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	0,5	≤0,25	≤0,25	32	2/4	>32	≤0,25/4	>32	>128	>32	16	2	4	128	32	>8	4	>128	>128
I-16296	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	0,5	≤0,25	≤0,25	32	2/4	>32	≤0,25/4	>32	>128	>32	16	2	8	>128	64	>8	2	>128	>128
I-16299	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	0,5	≤0,25	≤0,25	32	2/4	>32	1/4	>32	>128	>32	32	1	4	128	32	>8	2	>128	>128
I-16330	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	0,5	≤0,25	≤0,25	32	1/4	>32	≤0,25/4	32	>128	>32	32	1	2	64	32	8	2	>128	>128
I-16447	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	0,5	≤0,25	≤0,25	16	1/4	>32	≤0,25/4	16	>128	>32	8	1	2	32	32	8	2	>128	>128
I-16462	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	0,5	≤0,25	≤0,25	16	1/4	>32	≤0,25/4	>32	>128	>32	8	1	2	32	64	>8	2	>128	>128
I-16706	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	≤0,25	≤0,25	≤0,25	32	2/4	>32	≤0,25/4	>32	>128	>32	8	1	2	32	64	8	2	>128	>128
I-18620	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	0,5	≤0,25	≤0,25	32	1/4	>32	≤0,25/4	>32	>128	>32	16	2	4	>128	32	>8	2	>128	>128
I-18655	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	0,5	≤0,25	≤0,25	32	2/4	>32	≤0,25/4	>32	>128	>32	8	1	2	128	32	8	2	>128	>128
I-18856	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	≤0,25	≤0,25	≤0,25	32	2/4	>32	≤0,25/4	>32	>128	>32	8	1	2	64	32	8	2	>128	>128
I-00422	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	0,5	≤0,25	≤0,25	32	0,5/4	>32	≤0,25/4	32	>128	>32	8	1	2	32	32	8	2	>128	>128
I-01658	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	≤0,25	≤0,25	≤0,25	16	1/4	>32	≤0,25/4	>32	>128	>32	8	2	4	64	32	>8	2	>128	>128
I-01664	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	0,5	≤0,25	≤0,25	32	0,5/4	>32	≤0,25/4	32	>128	>32	8	2	2	64	32	8	2	>128	>128
I-01667	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	1	≤0,25	≤0,25	16	1/4	>32	≤0,25/4	>32	>128	>32	8	1	2	32	32	>8	2	>128	>128
I-01865	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	0,5	≤0,25	≤0,25	16	1/4	>32	≤0,25/4	32	>128	>32	16	1	2	32	32	8	2	>128	>128

Fortsetzung Tab. 3.5: Antibiotika-Empfindlichkeit, MHK-Muster und PFGE-Profil. Grau unterlegt: Resistent oder intermediär nach DIN bzw. EUCAST.

Stamm	PFGE-Profil	MHK-Muster	Antibiotika-Empfindlichkeit: MHK (µg/ml)																							
			Ampicillin	Amoxicillin/ Clavulansre.	Ampicillin/ Sulbactam	Piperacillin/ Sulbactam	Piperacillin/ Tazobactam	Imipenem	Meropenem	Ertapenem	Ceftazidim	Ceftazidim/ Clavulansre.	Cefotaxim	Cefotaxim/ Clavulansre.	Cefepim	Cefuroxim	Ceftriaxon	Cefoxitin	Amikacin	Tobramycin	Gentamicin	Cipro- floxacin	Moxi- floxacin	Doxycyclin	Co- trimoxazol	Chlor- amphenicol
I-01867	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	1	≤0,25	≤0,25	16	0,5/4	>32	≤0,25/4	>32	>128	>32	8	1	2	32	32	8	2	>128	>128
I-02760	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	1	≤0,25	≤0,25	32	1/4	>32	≤0,25/4	>32	>128	>32	8	2	4	32	32	>8	2	>128	>128
P-6068	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	0,5	≤0,25	≤0,25	32	2/4	>32	≤0,25/4	>32	>128	>32	16	2	4	128	32	>8	2	>128	>128
B-11238	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	≤0,25	≤0,25	≤0,25	32	1/4	>32	≤0,25/4	>32	>128	>32	8	2	4	128	32	8	2	>128	>128
O-19686	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	0,5	≤0,25	≤0,25	>32	2/4	>32	≤0,25/4	>32	>128	>32	16	2	4	128	32	>8	4	>128	>128
S-00444-a	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	0,5	≤0,25	≤0,25	32	2/4	>32	≤0,25/4	>32	>128	>32	16	2	4	128	32	>8	2	>128	128
S-00444-b	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	≤0,25	≤0,25	0,5	>32	2/4	>32	0,5/4	>32	>128	>32	16	2	4	128	64	>8	2	>128	128
S-00031	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	0,5	≤0,25	0,5	>32	2/4	>32	0,5/4	>32	>128	>32	16	2	4	>128	64	>8	2	>128	128
S-00060	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	≤0,25	≤0,25	≤0,25	16	1/4	>32	1/4	32	>128	>32	16	1	2	32	64	8	2	>128	>128
S-12577	II	B	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	8	4	16	>32	16/4	>32	32/4	>32	>128	>32	128	2	8	>128	64	>8	2	>128	>128
S-12578	II	B	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	8	4	16	>32	16/4	>32	>32/4	>32	>128	>32	128	2	8	>128	64	>8	2	>128	>128
S-12579	II	B	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	16	16	32	>32	>32/4	>32	>32/4	>32	>128	>32	128	2	8	128	32	>8	4	>128	>128
S-12639	IIc	B	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	8	16	32	>32	>32/4	>32	>32/4	>32	>128	>32	>128	2	4	128	32	8	2	>128	>128
S-12770	II	B	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	4	4	8	>32	32/4	>32	>32/4	>32	>128	>32	128	1	2	64	128	>8	8	>128	>128
S-12938-a	II	B	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	16	8	32	>32	16/4	>32	>32/4	>32	>128	>32	128	2	8	>128	64	8	4	>128	>128
S-12938-b	II	B	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	8	4	32	32	16/4	>32	>32/4	>32	>128	>32	128	2	16	>128	32	8	2	>128	>128
S-12939	IIb	B	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	8	8	32	>32	>32/4	>32	>32/4	>32	>128	>32	128	2	4	128	32	8	2	>128	>128
S-12941-a	IIId	B	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	8	4	16	>32	8/4	>32	32/4	>32	>128	>32	128	2	8	>128	64	>8	2	>128	>128
S-12941-b	II	B	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	8	8	32	>32	16/4	>32	>32/4	>32	>128	>32	128	1	4	>128	64	8	2	>128	>128
S-12942	II	B	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	4	4	16	>32	16/4	>32	>32/4	>32	>128	>32	64	1	4	32	32	>8	8	>128	>128
S-12947	II	B	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	4	4	16	>32	32/4	>32	>32/4	>32	>128	>32	64	2	4	128	32	>8	4	>128	>128
S-00001-a	IIb	B	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	8	8	>32	>32	>32/4	>32	>32/4	>32	>128	>32	128	2	4	>128	64	8	4	>128	>128
S-00001-b	IIb	B	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	8	8	>32	>32	>32/4	>32	>32/4	>32	>128	>32	128	2	4	128	64	8	2	>128	>128
S-00005	II	B	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	4	4	16	32	16/4	>32	>32/4	>32	>128	>32	64	1	2	64	32	>8	8	>128	>128
S-00006	II	B	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	8	4	16	>32	32/4	>32	>32/4	>32	>128	>32	128	2	4	>128	64	>8	2	>128	>128

Fortsetzung Tab. 3.5: Antibiotika-Empfindlichkeit, MHK-Muster und PFGE-Profil. Grau unterlegt: Resistent oder intermediär nach DIN bzw. EUCAST.

Stamm	PFGE-Profil	MHK-Muster	Antibiotika-Empfindlichkeit: MHK (µg/ml)																							
			Ampicillin	Amoxicillin/ Clavulansre.	Ampicillin/ Sulbactam	Piperacillin/ Sulbactam	Piperacillin/ Tazobactam	Imipenem	Meropenem	Ertapenem	Ceftazidim	Ceftazidim/ Clavulansre.	Cefotaxim	Cefotaxim/ Clavulansre.	Cefepim	Cefuroxim	Ceftriaxon	Cefoxitin	Amikacin	Tobramycin	Gentamicin	Cipro- floxacin	Moxi- floxacin	Doxycyclin	Co- trimoxazol	Chlor- amphenicol
S-00032	II	B	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	4	4	16	>32	16/4	>32	>32/4	>32	>128	>32	64	1	4	64	64	>8	8	>128	>128
S-00061	II	B	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	4	4	16	>32	32/4	>32	>32/4	>32	>128	>32	64	1	2	64	64	>8	8	>128	>128
I-18573	IIa	B2	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	2	1	16	>32	>32/4	>32	>32/4	>32	>128	>32	128	2	8	>128	32	>8	4	>128	>128
I-16602	II	B2	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	2	2	8	32	16/4	>32	>32/4	>32	>128	>32	64	1	4	128	32	>8	2	>128	>128
I-18650	II	B2	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	1	2	8	32	16/4	>32	>32/4	>32	>128	>32	64	1	2	64	64	>8	2	>128	>128
I-15211	II	B2	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	2	2	16	32	16/4	>32	>32/4	>32	>128	>32	64	2	8	128	32	8	2	>128	>128
I-00401	II	C	128	4/2	4/8	4/8	4/4	0,5	≤0,25	≤0,25	1	0,5/4	0,5	≤0,25/4	1	16	≤0,25	8	2	≤0,25	≤0,125	32	>8	4	4	8
U-12493	II	C	64	4/2	4/8	2/8	4/4	≤0,25	≤0,25	≤0,25	1	0,5/4	≤0,25	≤0,25/4	≤0,25	8	≤0,25	8	2	≤0,25	0,5	32	8	2	8	8
U-12504	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	≤0,25	≤0,25	≤0,25	32	2/4	>32	≤0,25/4	>32	>128	>32	8	2	4	64	32	>8	2	>128	>128
U-12509	II	A	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	≤0,25	≤0,25	≤0,25	32	4/4	>32	≤0,25/4	>32	>128	>32	16	2	4	64	32	>8	2	>128	>128
U-12613	V	-	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	≤0,25	≤0,25	≤0,25	>32	0,5/4	32	≤0,25/4	4	64	32	32	16	8	8	2	2	>32	32	>128
U-12614	V	-	>128	>128/2	>64/8	>128/8	>128/4	0,5	≤0,25	≤0,25	>32	0,5/4	16	≤0,25/4	4	64	32	32	8	8	8	2	2	32	64	>128
U-12635	VI	-	>128	8/2	>64/8	128/8	32/4	≤0,25	≤0,25	≤0,25	1	≤0,25/4	0,5	≤0,25/4	0,5	32	≤0,25	32	1	≤0,25	≤0,125	4	8	>32	>128	>128
U-12637	VI	-	>128	16/2	>64/8	64/8	16/4	≤0,25	≤0,25	≤0,25	1	≤0,25/4	0,5	≤0,25/4	≤0,25	32	≤0,25	32	0,5	≤0,25	≤0,125	4	8	>32	>128	>128
U-245	VII	-	>128	64/2	>64/8	128/8	>128/4	≤0,25	≤0,25	≤0,25	>32	0,5/4	16	≤0,25/4	4	64	32	32	16	4	0,5	1	1	2	2	16
U-2761	VIII	-	>128	32/2	>64/8	128/8	>128/4	≤0,25	≤0,25	≤0,25	>32	0,5/4	32	≤0,25/4	8	64	32	16	>32	32	8	32	>8	16	>128	>128
U-2778	IX	-	>128	8/2	64/8	16/8	16/4	≤0,25	≤0,25	≤0,25	1	0,5/4	0,5	≤0,25/4	0,5	32	≤0,25	32	1	≤0,25	≤0,125	0,25	1	16	4	64
U-7448	X	-	32	8/2	8/8	8/8	16/4	0,5	≤0,25	≤0,25	1	0,5/4	≤0,25	≤0,25/4	≤0,25	32	≤0,25	32	1	≤0,25	≤0,125	0,25	1	16	8	128
U-7519	XI	-	128	4/2	4/8	4/8	8/4	1	≤0,25	≤0,25	1	0,5/4	≤0,25	≤0,25/4	≤0,25	16	≤0,25	16	2	1	0,25	1	1	8	8	64
U-7643	XI	-	>128	16/2	32/8	16/8	16/4	0,5	≤0,25	≤0,25	>32	1/4	16	≤0,25/4	2	64	16	32	16	4	0,5	1	2	16	8	64
U-8369	XII	-	>128	>128/2	>64/8	64/8	>128/4	0,5	≤0,25	≤0,25	>32	1/4	32	≤0,25/4	8	64	32	64	8	4	0,5	1	4	16	64	128
S-12573	III	-	128	8/2	32/8	16/8	16/4	≤0,25	≤0,25	0,5	1	0,5/4	2	1/4	1	128	0,5	128	1	≤0,25	0,5	2	4	16	16	8
S-12574	III	-	128	4/2	16/8	16/8	16/4	≤0,25	≤0,25	0,5	2	0,5/4	2	1/4	2	64	0,5	128	2	≤0,25	≤0,25	1	4	16	16	8
PS-032A	IV	-	64	4/2	2/8	≤1/8	2/4	0,5	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25/4	≤0,25	≤0,25/4	≤0,25	2	≤0,25	4	2	≤0,25	0,25	≤0,125	0,125	2	4	8

3.3.3 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die Antibiotika-Empfindlichkeit der 74 Stämme wurde ermittelt, indem für alle Isolate die MHK-Werte von 24 verschiedenen Antibiotika bestimmt wurden (Tabelle 3.5). Die klinische Beurteilung der MHK-Daten erfolgte anhand der Grenzwerte nach DIN. Für Ertapenem wurden die Grenzwerte nach EUCAST gewählt, da keine Beurteilungskriterien nach DIN vorlagen. Als klinisch intermediär oder klinisch resistent eingestufte MHK-Werte sind grau unterlegt. Anhand der MHK-Daten konnten die Stämme in Gruppen mit verschiedenen Resistenzmustern eingeteilt werden, welche in Tabelle 3.5 mit A-D bezeichnet sind. Lediglich die 14 Isolate mit von Klon I und II abweichenden PFGE-Profilen zeigten auch unterschiedliche Resistenzprofile und konnten keinem der Muster zugeordnet werden.

3.3.4 Korrelation von PFGE- und Resistenzmuster

Der bereits aus Tabelle 3.5 ersichtliche Zusammenhang zwischen PFGE-Profil und Resistenzmuster der untersuchten Stämme ist in Tabelle 3.6 zusammengefasst. Für Klone mit mehr als zwei Stämmen wurde der Median der MHK angegeben. Lagen pro Klon nur zwei Stämme vor, so wurde der höhere Wert angegeben. Wichen die MHK-Werte um mehr als zwei Stufen ab, so wurde der entsprechende Stamm gesondert aufgeführt. Als resistent bzw. intermediär eingestufte MHK-Werte sind grau unterlegt.

Alle Isolate des Klons I zeigten das Resistenzmuster D, das sich durch Resistenz gegenüber allen getesteten Penicillinen, Cephalosporinen, Fluorchinolonen und Aminoglykosiden sowie Cotrimoxazol und Chloramphenicol auszeichnete. Gegenüber Amikacin bestand eine intermediäre Resistenz, während die Stämme gegenüber den getesteten Carbapenemen und Cephalosporin/ β -Laktamase-Inhibitor-Kombinationen empfindlich waren.

Die Isolate des Klons II zeigten verschiedene Resistenzphänotypen und ließen sich den Resistenzmustern A, B, B2 oder C zuordnen. 29 Isolate (55%) entfielen auf Muster A, das sich von Muster D nur durch die Empfindlichkeit gegenüber Amikacin unterschied. 18 Isolate (34%) ließen sich zu Resistenzprofil B zusammenfassen, da sie im Gegensatz zu Muster A Resistenz oder intermediäre Resistenz gegenüber den getesteten Carbapenemen sowie Cephalosporin/ β -Laktamase-Inhibitor-Kombinationen aufwiesen. Das Resistenzprofil B2 ist als ein Untertyp des Musters B anzusehen. Die vier Isolate dieses Resistenzphänotyps waren zwar resistent gegenüber Ertapenem, jedoch nicht gegenüber den weiteren getesteten Carbapenemen (Imipenem und Meropenem). Zwei Isolate des Klons II ließen sich dem Resistenzprofil C zuordnen, das sich von den anderen Mustern durch eine deutlich verminderte Zahl von Resistenz-

eigenschaften unterschied. Diese Stämme waren trotz ihres mit Klon II identischen PFGE-Musters nur gegen Fluorchinolone, Tetracycline sowie einige β -Laktame resistent.

Tab. 3.6: Korrelation von PFGE-Profil und Resistenzmuster. Grau unterlegt: resistent bzw. intermediär.

Epidemiologie					MHK ($\mu\text{g/ml}$)												
Klon (PFGE-Typ)	Herkunft (Station, Zeitraum)	Anzahl Isolate	Anzahl Patienten	MHK-Subtyp (Anzahl Isolate)	Meropenem	Ertapenem	Cefotaxim	Cefotaxim/Clavulansäure	Cefoxitin	Piperacillin/Tazobactam	Gentamicin	Amikacin	Ciprofloxacin	Doxycyclin	Cotrimoxazol	Chloramphenicol	
Ausbruch I	I Patient (CI, 01/02-04/02)	5	5	D (5)	$\leq 0,25$	0,5	>32	0,5/4	128	>128/4	128	8	>128	8	>128	>128	
	I Umgebung (AI, CI, 01/02)	2	-	D (2)	$\leq 0,25$	0,5	>32	2/4	128	>128/4	128	16	>128	8	>128	>128	
Ausbruch 2	II Patient (AI, CI, KI, 08/03-02/04)	26	22	A (21)	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	>32	$\leq 0,25/4$	16	>128/4	64	1	32	2	>128	>128	
				B2 (4)	2	16	>32	>32/4	64	>128/4	128	2	32	2	>128	>128	
				C (1)	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	0,5	$\leq 0,25/4$	8	8/4	$\leq 0,125$	1	32	4	4	8	
	II Patient Stuhl (AI, CNS, 12/03-01/04)	22	6	A (4)	$\leq 0,25$	0,5	>32	0,5/4	16	>128/4	128	2	64	2	>128	>128	
				B (18)	8	16	>32	>32/4	128	>128/4	128	2	64	4	>128	>128	
	II Umgebung (CI, 12/03)	3	-	A (2)	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	>32	$\leq 0,25/4$	16	>128/4	64	2	32	2	>128	>128	
C (1)				$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25/4$	8	4/4	0,5	2	32	2	8	8		
Weitere Klone	III Patient Stuhl (CI, 12/03)	2	2	-	$\leq 0,25$	0,5	2	1/4	128	16/4	0,5	2	2	16	16	8	
	IV Personal Stuhl (AI, 03/04)	1	-	-	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25/4$	4	2/4	0,25	2	$\leq 0,125$	2	4	8	
	V Umgebung (AI, 12/03)	2	-	-	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	32	$\leq 0,25/4$	32	>128/4	8	16	2	>32	64	>128	
	VI Umgebung (CI, 12/03)	2	-	-	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	0,5	$\leq 0,25/4$	32	32/4	$\leq 0,125$	1	4	>32	>128	>128	
	VII Umgebung (AI, 01/02)	1	-	-	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	16	$\leq 0,25/4$	32	>128/4	0,5	16	1	2	2	16	
	VIII Umgebung (KI, 04/02)	1	-	-	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	32	$\leq 0,25/4$	16	>128/4	8	>32	32	16	>128	>128	
	IX Umgebung (KI, 04/02)	1	-	-	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	0,5	$\leq 0,25/4$	32	16/4	$\leq 0,125$	1	0,25	16	4	64	
	X Umgebung (CI, 08/02)	1	-	-	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25/4$	32	16/4	$\leq 0,125$	1	0,25	16	8	128	
	XI Umgebung (CI, 09/02)	2	-	-	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25/4$	16	8/4	0,25	2	1	8	8	64	
				-	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	16	$\leq 0,25/4$	32	16/4	0,5	16	1	16	8	64	
	XII Umgebung (CI, 09/02)	1	-	-	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	32	$\leq 0,25/4$	64	>128/4	0,5	8	1	16	64	128	

In Tabelle 3.7 sind die Isolate des Klons II den jeweiligen Patienten zugeordnet. Es wird ersichtlich, dass sich weder die verschiedenen PFGE-Varianten noch die Resistenzprofile von Klon II grundsätzlich mit bestimmten Patienten korrelieren lassen. Während von einigen

Patienten nur Stämme desselben MHK-Musters isoliert wurden, treten bei anderen Patienten Isolate mit verschiedenen Resistenzphänotypen auf.

Tabelle 3.7: Zuordnung der Isolate zu den jeweiligen Patienten

Patient	Stamm	Station	Isolationsdatum	Material	PFGE-Muster	MHK-Muster
AI-02	I-11531	AI	05.08.03	KS	II	A
AI-04	I-15633	AI	20.10.03	TS	II	A
	S-12579	AI	16.12.03	S	II	B
	S-00001-a	AI	31.12.03	S	IIb	B
	S-00001-b	AI	31.12.03	S	IIb	B
	I-00401	AI	08.01.04	RA	II	C
AI-09	I-15258	AI	13.10.03	RA	II	A
AI-10	I-18573	AI	15.12.03	WA	IIa	B2
	S-12639	AI	16.12.03	S	IIc	B
	S-12770	AI	17.12.03	S	II	B
	S-12939	AI	22.12.03	S	IIb	B
AI-13	I-16299	AI	03.11.03	TS	II	A
AI-14	I-16330	KI	03.11.03	RA	II	A
AI-15	I-16296	AI	03.11.03	TS	II	A
AI-16	I-16602	AI	07.11.03	KS	II	B2
AI-17	S-12577	AI	13.12.03	S	II	B
	S-12578	AI	16.12.03	S	II	B
	S-12938-a	AI	22.12.03	S	II	B
	S-12938-b	AI	22.12.03	S	II	B
	S-12941-a	AI	23.12.03	S	II d	B
	S-12941-b	AI	23.12.03	S	II	B
KI-09	I-16447	KI	04.11.03	WA	II	A
CI-17	I-15211	CI	13.10.03	RA	II	B2
	I-18650	MI	15.12.03	RA	II	B2

Patient	Stamm	Station	Isolationsdatum	Material	PFGE-Muster	MHK-Muster
AI-19	I-18856	AI	19.12.03	TS	II	A
	S-00006	CNS	02.01.04	S	II	B
	S-00031	CNS	05.01.04	S	II	A
	S-00444-a	CNS	18.01.04	S	II	A
	S-00444-b	CNS	18.01.04	S	II	A
CI-18	I-14885	CI	06.10.03	TS	II	A
CI-21	I-16706	CI	10.11.03	TS	II	A
CI-22	I-16462	CI	04.11.03	TS	II	A
CI-23	S-12942	AI	15.12.03	S	II	B
	S-12947	AI	27.12.03	S	II	B
	S-00005	CNS	02.01.04	S	II	B
	S-00032	CNS	05.01.04	S	II	B
	S-00061	CNS	06.01.04	S	II	B
CI-25	P-6068	CNS	16.12.03	RA	II	A
CI-27	S-00060	CNS	05.01.04	S	II	A
CI-29	I-18620	CI	15.12.03	RA	II	A
CI-30	I-18655	CI	15.12.03	RA	II	A
CI-32	I-00442	CI	08.01.04	RA	II	A
CI-33	I-01667	CI	29.01.04	RA	II	A
	I-01658	CI	29.01.04	TS	II	A
CI-34	I-01867	CI	02.02.04	TS	II	A
	I-01865	CI	02.02.04	TS	II	A
CI-35	I-01865	CI	02.02.04	TS	II	A
	I-01664	CI	29.01.04	TS	II	A
CI-36	I-02760	CI	16.02.04	RA	II	A
	I-02760	CI	16.02.04	RA	II	A

AI: anästhesiologische Intensivstation, CI: chirurgische Intensivstation, KI: kardiochirurgische Intensivstation, MI: Intensivstation Innere Medizin, CNS: chirurgische Normalstation, S: Stuhl, KS: Katheterspitze, TS: Trachealsekret, RA: Rachenabstrich, WA: Wundabstrich

3.4 Untersuchung der Resistenzmechanismen ausgewählter Stämme

3.4.1 Stammauswahl

Zur weiteren phänotypischen und genotypischen Charakterisierung wurden insgesamt fünf Stämme ausgewählt (Tabelle 3.8). Hierzu gehören ein Patientenisolat des Klons I sowie vier Patientenisolate des Klons II mit den verschiedenen Resistenzmustern A, B, B2 und C. Drei der vier Isolate von Klon II stammen von demselben Patienten (AI-04). Die PFGE-Muster dieser Stämme sind in Abbildung 3.4 dargestellt. Im Folgenden werden die Stämme als Klon I, II-A, II-B, II-B2 und II-C bezeichnet.

Tab. 3.8: Zur genauen Charakterisierung ausgewählte *K.-pneumoniae*-Isolate

Stammnummer	Repräsentierter Klon	Patient	Station	Isolationsdatum	Materialart
I-05111	Klon I	CI-02	CI	07.04.02	Arterienkatheterspitze
I-15633	Klon II-A	AI-04	AI	20.10.03	Trachealsekret
12579 ST	Klon II-B	AI-04	AI	16.12.03	Stuhlprobe
I-18573	Klon II-B2	AI-10	AI	15.12.03	Thoraxabstrich
I-00401	Klon II-C	AI-04	AI	08.01.04	Rachenabstrich

AI: anästhesiologische Intensivstation, CI: chirurgische Intensivstation

Zunächst wurde die Antibiotika-Empfindlichkeit der fünf ausgewählten Stämme gegenüber weiteren Substanzen bestimmt (Tabelle 3.9). Die klinische Beurteilung der MHK-Daten erfolgte anhand der Grenzwerte nach DIN oder, sofern keine Beurteilungskriterien nach DIN vorlagen, nach EUCAST, amerikanischem Standard (CLSI) oder französischem Standard (SFM).

Neben den bereits unter 3.3.4 beschriebenen Resistenzen waren Klon I sowie Klon II-A, II-B und II-B2 auch resistent gegenüber allen weiteren getesteten Penicillinen und Cephalosporinen, dem Monobaktam Aztreonam, allen getesteten Fluorchinolonen, Antifolaten und sonstigen Substanzen. Gegenüber allen getesteten älteren Tetracyclinen waren sie ebenfalls resistent, jedoch empfindlich gegenüber Tigecyclin. Während Klon I Resistenz oder intermediäre Resistenz gegenüber allen getesteten Aminoglykosiden aufwies, blieben Klon II-A, II-B und II-B2 empfindlich gegenüber Amikacin und Kanamycin.

Tab. 3.9: MHK-Werte [$\mu\text{g/ml}$] der ausgewählten *K.-pneumoniae*-Isolate. Grau: resistent bzw. intermediär

Antibiotikum		Klon I	Klon II			
		I-05111	Klon II-A I-15633	Klon II-B S-12579	Klon II-B2 I-18573	Klon II-C I-00401
β-Laktame	Ampicillin	>2048	>2048	>2048	>2048	128
	Amoxicillin/Clavulansäure	>128/2	>128/2	>128/2	>128/2	4/2
	Ampicillin/Sulbactam	>64/8	>64/8	>64/8	>64/8	4/8
	Mezlocillin	>256	>256	>256	>256	32
	Piperacillin	>128	>64	>64	>64	16
	Piperacillin/Tazobactam	>128/4	>128/4	>128/4	>128/4	4/4
	Piperacillin/Sulbactam	>128/8	>128/8	>128/8	>128/8	4/8
	Cefuroxim	>128	>128	>128	>128	16
	Ceftriaxon	>32	>32	>32	>32	$\leq 0,25$
	Cefpodoxim	>64	>16	>16	>16	1
	Cefotaxim	>32	512	4096	>32	0,5
	Cefotaxim/Clavulansäure	0,5/4	$\leq 0,25/4$	128/4	>32/4	$\leq 0,25/4$
	Ceftazidim	>32	32	>32	>32	1
	Ceftazidim/Clavulansäure	2/4	2/4	>32/4	>32/4	0,5/4
	Cefepim	>32	>32	>32	>32	1
	Cefoxitin	128	16	128	128	8
	Aztreonam	>512	64	>64	>32	0,25
	Imipenem	0,5	0,5	16	2	0,5
Meropenem	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	16	1	$\leq 0,25$	
Ertapenem	1	$\leq 0,25$	32	16	$\leq 0,25$	
Fluorchinolone	Norfloxacin	>64	>64	>64	>64	>64
	Ciprofloxacin	>128	32	32	32	32
	Enoxacin	>32	>32	>32	>32	>32
	Fleroxacin	>32	32	>32	>32	>32
	Ofloxacacin	>32	32	32	32	32
	Sparfloxacin	>32	16	16	16	16
	Moxifloxacin	>8	>8	>8	>8	>8
Aminoglykoside	Amikacin	8	2	2	2	2
	Gentamicin	128	128	128	>128	$\leq 0,125$
	Netilmicin	128	16	32	16	$\leq 0,063$
	Tobramycin	16	4	8	8	$\leq 0,25$
	Kanamycin	>256	8	8	16	2
	Streptomycin	>256	16	32	32	2
Tetra- cycline	Tetracyclin	8	4	4	4	4
	Doxycyclin	8	4	4	4	4
	Minocyclin	8	4	4	4	4
	Tigecyclin	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Anti- folate	Cotrimoxazol	>256	>256	>256	>256	4
	Trimethoprim	>64	>64	>64	>64	0,5
	Sulfamethoxazol	>512	>512	>512	>512	16
Sonstige	Chloramphenicol	>128	>128	>128	>128	8
	Fosfomycin	128	128	>128	>128	>128
	Rifampicin	64	32	>32	32	>32
	Nitrofurantoin	128	128	128	128	128
	Colistin	1	8	32	16	32

Klon II-C wies wie bereits erwähnt ein deutlich vermindertes Resistenzspektrum auf. Er war empfindlich gegenüber den meisten getesteten β -Laktamen, allen Aminoglykosiden und Antifolaten sowie Chloramphenicol, jedoch resistent gegenüber Fluorchinolonen, Tetracyclinen und einigen weiteren Substanzen.

Bemerkenswert ist die Resistenz aller Stämme des Klons II sowie das intermediäre Testergebnis von Klon I gegenüber dem Reserveantibiotikum Colistin.

3.4.2 Analyse der durch Mutationen vermittelten Resistenz

3.4.2.1 Expression der Porine der äußeren Membran

Veränderungen im Expressionsmuster der in der äußeren Membran lokalisierten Porine tragen bei *K. pneumoniae* erheblich zur Ausprägung von Multiresistenz bei. Ein Verlust oder eine verminderte Expression der unspezifischen Porine OmpK35 und OmpK36 setzt den Einstrom bestimmter Antibiotika in die Zelle herab, so dass es zu Resistenz oder einer Erhöhung des Resistenzniveaus gegenüber diesen Substanzen kommt (MARTINEZ-MARTINEZ et al., 1996).

3.4.2.1.1 SDS-PAGE der Porin-Präparationen

Um den Einfluss der Porinexpression der ausgewählten Stämme auf das Resistenzmuster zu untersuchen, wurden die Proteine der äußeren Membran präpariert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 3.5). Die elektrophoretische Mobilität der Porine kann sich schon bei geringen Variationen der zur Elektrophorese eingesetzten Puffersysteme und Bedingungen deutlich verändern (HERNANDEZ-ALLES et al., 1999b). Daher wurden die Porine des Referenzstammes *K. pneumoniae* PEG-8 ebenfalls präpariert und auf die Gele aufgetragen, um die Expressionsmuster vergleichen zu können. Dieser Stamm besitzt trotz nachgewiesener Produktion einer ESBL (WIEGAND, 1997) eine Cefoxitin-MHK von nur 8 $\mu\text{g/ml}$, so dass von der Expression beider Porine ausgegangen werden kann.

Die Porine sind als deutliche Proteinbanden im SDS-Gel sichtbar. Die unterste dieser Banden bei etwa 35 kDa ist bei allen untersuchten Stämmen vorhanden. Aufgrund ihrer Größe und ihres Verschwindens bei weiterer Aufreinigung der Porine (hier nicht durchgeführt) lässt sie sich dem Membranprotein OmpA zuordnen (HERNANDEZ-ALLES et al., 1999b), das bei *K. pneumoniae* ein errechnetes Molekulargewicht von 35,02 kDa besitzt. Das multifunktionale Membranprotein OmpA gehört zu den Hauptproteinen der äußeren Membran gramnegativer

Bakterien. Es ist kein Porin, spielt jedoch eine wichtige Rolle für die strukturelle Integrität der äußeren Membran sowie für die Virulenz der Zellen (HAEUW et al., 1998).

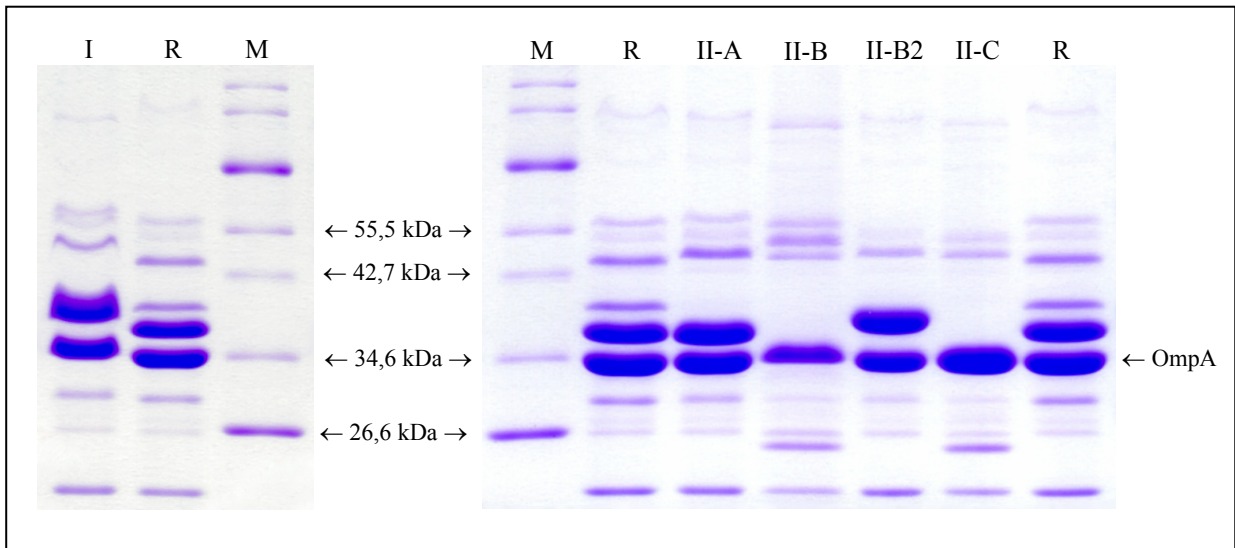


Abb. 3.5: SDS-PAGE der Porinpräparationen der ausgewählten *K.-pneumoniae*-Isolate. M: Proteinmarker, R: Referenzstamm PEG-8, I: Klon I, II-A: Klon II-A, II-B: Klon II-B, II-B2: Klon II-B2, II-C: Klon II-C.

Bei dem Referenzstamm PEG-8 sind oberhalb der OmpA-Bande zwei Porinbanden unterscheidbar, wobei eine Bande deutlich schwächer exprimiert wird. Aufgrund der im Gel sichtbaren Reihenfolge wurde die Porinbande mit offenbar geringerem Molekulargewicht dem Porin OmpK35, die Bande mit scheinbar etwas größerem Molekulargewicht dem Porin OmpK36 zugeordnet.

Klon I besitzt nur eine Porinbande. Ihre Intensität entspricht der OmpK35-Bande des Referenzstammes, ihre Laufhöhe liegt jedoch zwischen OmpK35 und OmpK36. Eine Identifikation des Porins ist somit allein aufgrund der gelelektrophoretischen Auftrennung nicht möglich. Klon II-A besitzt ebenfalls nur eine Porinbande, deren Laufhöhe dem vermuteten Porin OmpK35 von Stamm PEG-8 entspricht. Bei Klon II-B ist keine der beiden Banden erkennbar, so dass ein Verlust beider Porine angenommen werden kann. Klon II-B2 besitzt wie II-A eine Porinbande, deren Molekulargewicht etwas größer zu sein scheint. Sie liegt wie bei Klon I zwischen den beiden Porinbanden des Referenzstammes, so dass auch hier keine eindeutige Identifikation des Porins möglich war. Bei Klon II-C fehlen beide Porinbanden, weshalb man von einem Verlust beider Porine ausgehen kann.

3.4.2.1.2 Amplifikation und Sequenzierung der Porin-Gene

Um die molekularen Ursachen des Porinverlustes zu ermitteln und die Identität der in der SDS-PAGE detektierten Porine eindeutig aufzuklären, wurden die entsprechenden Gene *ompK35* und *ompK36* mittels PCR amplifiziert (Abbildung 3.6) und, sofern möglich, sequenziert.

Die PCR-Amplifikons von *ompK35* wiesen bei allen Klonen die erwartete Größe von 1194 bp auf. Die *ompK36*-Fragmente von Klon I, Klon II-A und II-B2 entsprachen ebenfalls der berechneten Größe von 1236 bp. Das bei Klon II-B amplifizierte Fragment war etwas kleiner, während bei Klon II-C auch nach wiederholten Versuchen kein Fragment amplifiziert werden konnte.

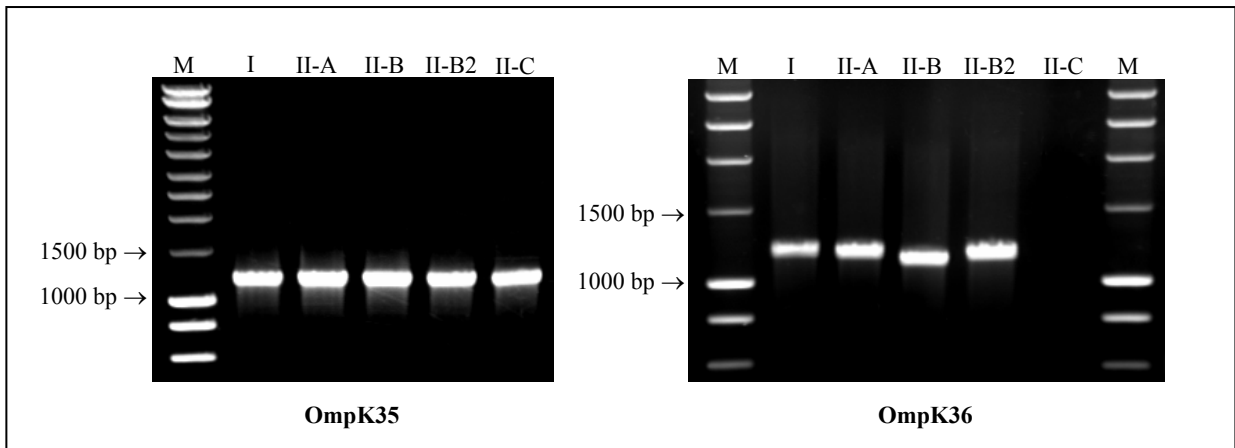


Abb. 3.6: *ompK35*- und *ompK36*-PCR der ausgewählten *K.-pneumoniae*-Isolate. M: Marker, I: Klon I, II-A: Klon II-A, II-B: Klon II-B, II-B2: Klon II-B2, II-C: Klon II-C.

Die Ergebnisse der Sequenzierung der Porin-Gene sind in Tabelle 3.10 zusammengefasst, im Anhang unter 7.3 und 7.4 sind die vollständigen Aminosäure-Alignments angegeben. Die Porinsequenzen der untersuchten Stämme wurden mit publizierten Sequenzen für *ompK35* (GenBank Accession No. AJ011501 und AJ303057) bzw. *ompK36* (GenBank Accession No. Z33506 und AJ344089) verglichen. Die theoretischen Molekulargewichte der sequenzierten Porine wurden mit Hilfe der Programme des ExPASy Proteomics Servers (GASTEIGER et al., 2003) nach Abzug der Signalsequenz berechnet.

Tab. 3.10: Ergebnisse von SDS-PAGE und Sequenzierung der Porine der *K.-pneumoniae*-Isolate

Stamm	Porin	Ergebnis der SDS-PAGE	Ergebnis der Sequenzierung	Molekulargewicht, Anzahl AS
Klon I	OmpK35	<i>keine Expression</i>	Frameshift Codon 10, Stop Codon 27	2,88 kDa, 26 AS *
	OmpK36	Expression	intakt (einige AS-Substitutionen, Insertion D117 in Loop 3)	38,16 kDa, 346 AS
Klon II-A	OmpK35	<i>keine Expression</i>	Frameshift Codon 86, Stop Codon 90	7,57 kDa, 67 AS
	OmpK36	Expression	intakt (einige AS-Substitutionen)	37,97 kDa, 344 AS
Klon II-B	OmpK35	<i>keine Expression</i>	Frameshift Codon 86, Stop Codon 90	7,57 kDa, 67 AS
	OmpK36	<i>keine Expression</i>	Deletion AS 321-336, einige AS-Substitutionen	36,12 kDa, 328 AS
Klon II-B2	OmpK35	<i>keine Expression</i>	Frameshift Codon 86, Stop Codon 90	7,57 kDa, 67 AS
	OmpK36	Expression	intakt (einige AS-Substitutionen, Insertion T116, D117 in Loop 3)	38,12 kDa, 346 AS
Klon II-C	OmpK35	<i>keine Expression</i>	Frameshift Codon 86, Stop Codon 90	7,57 kDa, 67 AS
	OmpK36	<i>keine Expression</i>	nicht sequenziert (kein PCR-Fragment)	--

AS: Aminosäuren. Angabe des theoretischen Molekulargewichtes sowie der AS-Anzahl nach Abzug der Signalsequenz. *Aufgrund der geringen Länge des Peptids ist der Abzug der Signalsequenz nicht möglich.

In der *ompK35*-Sequenz von Klon I kommt es bereits in Codon 10 zu einem Frameshift durch eine 1-bp-Insertion. Diese Leserahmen-Verschiebung führt zur Entstehung eines Stop-Codons in Codon 27, so dass statt des aus 359 Aminosäuren bestehenden Porins nur ein 26 Aminosäuren langes nicht-funktionales Peptid synthetisiert werden kann. Die *ompK36*-Sequenz von Klon I ist intakt und unterscheidet sich nur durch einige Aminosäure-Austausche von den publizierten Sequenzen (siehe oben). Bei dem mittels SDS-PAGE in Klon I nachgewiesenen Porin handelt es sich demnach um OmpK36, während OmpK35 aufgrund einer chromosomalen Mutation nicht exprimiert wird.

Die *ompK35*-Sequenz von Klon II weist ebenfalls eine Frameshift-Mutation auf. Durch eine 4-bp-Insertion in Codon 86 entsteht ein Stoppsignal in Codon 90. So wird nur ein 89 Aminosäuren langes, ebenfalls nicht-funktionales Peptid exprimiert. Die beschriebene chromosomale Mutation ist bei allen vier untersuchten Stämmen von Klon II (II-A, II-B, II-B2, II-C) identisch. Sie war offenbar bereits bei dem Ursprungsstamm vorhanden, bevor durch weitere Mutationen verschiedene Varianten des Klons II entstanden sind.

Die *ompK36*-Sequenz hingegen unterscheidet sich bei den vier Stämmen des Klons II. Stamm II-A weist ein intaktes *ompK36*-Gen auf, das nur durch einige Aminosäure-Substitutionen von

den publizierten Sequenzen abweicht. Bei der einzelnen Porinbande in der SDS-PAGE handelt es sich somit auch bei diesem Stamm um OmpK36. Die Porine scheinen in den SDS-Gelen nicht nach ihrem Molekulargewicht, sondern in umgekehrter Reihenfolge aufgetrennt zu werden. Dieses Phänomen wurde bereits von HERNANDEZ-ALLES et al. (1999b) beschrieben. Sie konnten das Porin OmpK36 auf demselben Gel je nach *K.-pneumoniae*-Isolat in einigen Fällen als das schneller wandernde, in anderen Fällen als das langsamer wandernde Porin identifizieren.

Die *ompK36*-Sequenz von Klon II-B unterscheidet sich von II-A durch eine 48-bp-Deletion im N-terminalen Bereich des Proteins. Diese Mutation führt nicht zu einer Leseraster-Verschiebung, jedoch zum Verlust von 16 Aminosäuren. Hierdurch verringert sich das berechnete Molekulargewicht von 37,97 kDa auf 36,12 kDa. Ein solches Protein wäre immer noch in der SDS-PAGE sichtbar. Da im Gel jedoch beide Porinbanden fehlen, ist davon auszugehen, dass sich das verkürzte OmpK36 nicht korrekt faltet, dadurch nicht in die äußere Membran integriert wird und somit bei der Porinpräparation nicht mit aufgereinigt wird. Die Deletion von 48 bp erklärt auch das kleinere *ompK36*-PCR-Fragment des Stammes II-B.

Bei Klon II-B2 ist wie bei II-A eine Porinbande im Gel erkennbar. Da OmpK35 aufgrund des Frameshifts nicht exprimiert werden kann, muss es sich um OmpK36 handeln. Dies wird dadurch bestätigt, dass die *ompK36*-Sequenzen von II-B2 und II-A weitgehend übereinstimmen. Einziger Unterschied ist eine Insertion von zwei Aminosäuren (Threonin 116, Aspartat 117) bei Klon II-B2. Diese Insertion liegt in Loop 3 der vorhergesagten Porinstruktur (DUTZLER et al., 1999). Da Loop 3 den Porendurchmesser bestimmt, könnte die Insertion der beiden Aminosäuren bei Klon II-B2 zu einer Verengung des Porins führen. Ähnliches gilt auch für Klon I, dessen *ompK36*-Sequenz an gleicher Stelle die Insertion einer Aminosäure (Aspartat 117) aufweist.

OmpK36 von Klon II-C konnte nicht sequenziert werden, da es nicht möglich war, das Gen mittels PCR zu amplifizieren. Man kann von einer mutativen Veränderung des Gens durch Deletion oder Insertion größerer DNA-Bereiche ausgehen, wodurch auch die fehlende Expression des Porins zu erklären ist.

Die Klone I, II-A und II-B2 exprimieren somit eines der beiden Hauptporine der Spezies, während es bei II-B und II-C zum Verlust beider Membrankanäle gekommen ist. Die verringerte Membranpermeabilität des Klons II-B im Gegensatz zu II-A ist eine mögliche Erklärung für das erweiterte Resistenzspektrum dieses Stammes. Die Ertapenem-Resistenz von II-B2 ist

möglicherweise durch einen verengten Porendurchmesser zu erklären. Klon II-C schließlich zeigt trotz des vollständigen Porinverlustes nur einen eingeschränkten Resistenzphänotyp.

3.4.2.2 Überexpression von Effluxpumpen

3.4.2.2.1 Effluxpumpen-Inhibitionstest

Die Überexpression chromosomaler Breitspektrum-Effluxpumpen spielt bei *K. pneumoniae* eine wichtige Rolle in der Ausprägung eines multiresistenten Phänotyps. Um den Einfluss solcher Effluxsysteme auf das Resistenzniveau der untersuchten Stämme zu ermitteln, wurden zunächst phänotypische Effluxpumpen-Inhibitionstests durchgeführt. Hierzu wurden die MHK-Werte verschiedener Antibiotika in An- und Abwesenheit des Inhibitors MC-207,110 (Phe-Arg- β -Naphthylamid, PA β N, 20 μ g/ml) bestimmt (Tabelle 3.11). Dieser Inhibitor hemmt verschiedene Effluxsysteme gramnegativer Bakterien, unter anderem auch AcrAB-TolC, das wichtigste Effluxsystem von *K. pneumoniae*. Von einer Effluxpumpen-Überexpression wurde ausgegangen, sofern die Reduktion der MHK-Werte signifikant höher war als bei dem als Referenz getesteten Typstamm *K. pneumoniae* ATCC 13883.

Die MHK von Tetracyclin wird bei allen untersuchten Stämmen durch den Inhibitor 4-fach, die Doxycyclin-MHK sogar 8-fach bei Klon I und 16-fach bei Klon II reduziert. Auch die MHK der getesteten Fluorchinolone wird durch PA β N um den Faktor 8-16 gesenkt, die MHK von Chloramphenicol mindestens 4- bis 8-fach. Diese drei Substanzklassen sind Substrate der Pumpe AcrAB-TolC, so dass von einer Überexpression dieses Effluxsystems ausgegangen werden kann. Für Cotrimoxazol kann aufgrund der hohen MHK-Werte der anderen Stämme nur bei Klon II-C eine Aussage getroffen werden. Hier kommt es zu einer 8-fachen Reduktion der MHK. Demnach stellen auch Antifolate bei *K. pneumoniae* ein Substrat für Effluxpumpen dar.

Die MHK der meisten getesteten Substanzen bleibt auch in Anwesenheit von PA β N im intermediären oder resistenten Bereich, was darauf hindeutet, dass die Effluxpumpen-Überexpression in den untersuchten Stämmen nicht als einziger Mechanismus Resistenz gegen diese Antibiotika vermittelt. Die Tetracyclin-Resistenz der getesteten Stämme wird dagegen durch den Inhibitor vollständig unterdrückt. Demnach handelt es sich offenbar um den einzigen Resistenzmechanismus dieser Stämme gegenüber Tetracyclinen.

Tab. 3.11: Ergebnisse des Effluxpumpen-Inhibitionstests

Antibiotikum (MHK in µg/ml)		Klon I	Klon II				<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883
		I-05111	Klon II-A I-15633	Klon II-B S-12579	Klon II-B2 I-18573	Klon II-C I-00401	
Doxycyclin	mit PAβN	8	4	4	4	4	1
	ohne PAβN	1	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5
	Reduktion (Faktor)	8	16	16	16	16	2
Tetracyclin	mit PAβN	8	4	4	4	4	1
	ohne PAβN	2	1	1	1	1	1
	Reduktion (Faktor)	4	4	4	4	4	1
Ciprofloxacin	mit PAβN	>128	32	32	32	32	0,25
	ohne PAβN	32	8	8	8	8	0,125
	Reduktion (Faktor)	≥8	4	4	4	4	2
Sparfloxacin	mit PAβN	>32	16	16	16	16	0,125
	ohne PAβN	4	2	2	2	2	0,0625
	Reduktion (Faktor)	≥16	8	8	8	8	2
Cotrimoxazol	mit PAβN	>256	>256	>256	>256	4	4
	ohne PAβN	>256	>256	>256	>256	0,5	2
	Reduktion (Faktor)	-	-	-	-	8	2
Chloramphenicol	mit PAβN	>128	>128	>128	>128	4	>128
	ohne PAβN	64	32	32	16	0,5	128
	Reduktion (Faktor)	≥4	≥8	≥8	≥8	8	≥2

Um zu untersuchen, ob die selektive Ertapenem-Resistenz des Klons II-B2 durch erhöhten Efflux verursacht wird, wurde die Carbapenem-MHK dieses Stammes ebenfalls in An- und Abwesenheit von PAβN getestet (Tabelle 3.12). Weder die Carbapenem-MHK noch die MHK der zusätzlich getesteten Aminoglykoside wurde durch den Inhibitor um mehr als eine Stufe gesenkt.

Tab. 3.12: Ergebnisse des Effluxpumpen-Inhibitionstests von Klon II-B2 mit Carbapenemen und Aminoglykosiden.

MHK [µg/ml]									
Ertapenem	Ertapenem mit PAβN	Meropenem	Meropenem mit PAβN	Imipenem	Imipenem mit PAβN	Amikacin	Amikacin mit PAβN	Tobramycin	Tobramycin mit PAβN
8	8	1	1	2	1	2	2	8	4

3.4.2.2 Analyse von Mutationen im Repressor AcrR

Durch den phänotypischen Inhibitionstest mit PAßN konnte eine Überexpression von Effluxpumpen nachgewiesen werden. Das wichtigste Effluxsystem von *K. pneumoniae*, die Breitpektrum-Pumpe AcrAB-TolC, kann sowohl durch globale Aktivatoren als auch durch Mutationen im lokalen Repressor AcrR hochreguliert werden. Um AcrR-Mutationen nachzuweisen, wurde das Repressorgen *acrR* der untersuchten Stämme mittels PCR amplifiziert, sequenziert und mit der veröffentlichten Sequenz für *acrR* von *K. pneumoniae* (GenBank Accession No. AJ318073) verglichen. Die vollständigen Aminosäure-Alignments sind im Anhang unter 7.5 angegeben.

Die *acrR*-Sequenzen der Klone II-A, II-B, II-B2 und II-C sind identisch. Nach den ersten 46 Aminosäuren weisen sie einen Frameshift durch eine 1-bp-Deletion auf, welcher zur Bildung eines Stop-Signals in Codon 93 führt. Dadurch kann statt des 216 AS langen Repressormoleküls nur ein 92 AS langes nicht-funktionales Peptid synthetisiert werden. Da es ohne den Repressor AcrR zur Überexpression der Strukturgene AcrA und AcrB kommt, ist die Repressormutation bei diesen Stämmen als molekulare Ursache für die konstitutive Überexpression der Effluxpumpe anzusehen.

In der *acrR*-Sequenz des Klons I konnte keine derartige Mutation festgestellt werden. Zwar weist sie im Vergleich zur publizierten Sequenz sieben Aminosäure-Substitutionen (P160R, G163A, F171S, R172G, L194V, F196I, K200M) auf. Diese Mutationen wurden jedoch bereits von SCHNEIDERS et al. (2003) bei verschiedenen, teilweise nicht-multiresistenten *K. pneumoniae*-Isolaten beschrieben und als genetische Variation ohne Einfluss auf den Resistenzphänotyp eingeordnet. Klon I besitzt demnach einen intakten Repressor. Es ist anzunehmen, dass die Effluxpumpen-Überexpression in diesem Stamm durch Mutationen in anderen, hier nicht untersuchten regulatorischen Sequenzen verursacht wird.

3.4.2.3 Modifikationen der Typ-II-Topoisomerasen

Effluxpumpen und Porinverlust tragen bei *K. pneumoniae* zwar zur Chinolon-Resistenz bei, der Hauptmechanismus sind jedoch Mutationen in den Genen der Zielstrukturen dieser Substanzklasse. Wie bei *E. coli* ist auch bei *K. pneumoniae* die DNA-Gyrase das primäre Target der Chinolone, während die Topoisomerase IV ein sekundäres Ziel darstellt. Die QRDR (quinolone resistance determining region) beider Enzyme wurde sequenziert, um resistenzrelevante Mutationen zu identifizieren. In Tabelle 3.13 sind die relevanten Modifikationen im Vergleich zur Sequenz des Chinolon-empfindlichen Typstammes aufgeführt.

In jedem Stamm konnten drei bereits bei *K. pneumoniae* beschriebene relevante Modifikationen (DEGUCHI et al., 1997) detektiert werden. Es handelt sich jeweils um zwei Aminosäure-Substitutionen in *gyrA*, das für eine Untereinheit der DNA-Gyrase kodiert, sowie einen weiteren Austausch in *parC*, dem Gen für eine Untereinheit der Topoisomerase IV. Da sich die Resistenz mit der Anzahl der Mutationen schrittweise erhöht, erklärt die Dreifachmutation das hohe Resistenzniveau gegenüber Fluorchinolonen. Das Auftreten identischer Mutationen bei allen Varianten von Klon II ist zudem ein weiterer Beweis für den gemeinsamen genetischen Ursprung dieser Stämme.

Tab. 3.13: Aminosäure-Substitutionen in der QRDR von *gyrA* und *parC* der *K.-pneumoniae*-Isolate

Gen		<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	Klon I	Klon II-A, II-B, II-B2, II-C			
			I-05111	Klon II-A I-15633	Klon II-B S-12579	Klon II-B2 I-18573	Klon II-C I-00401
<i>gyrA</i>	Codon Ser 83	Ser (TCC)	Phe (TTC)	Phe (TTC)	Phe (TTC)	Phe (TTC)	Phe (TTC)
	Codon Asp 87	Asp (GAC)	Asn (AAC)	Gly (GGC)	Gly (GGC)	Gly (GGC)	Gly (GGC)
<i>parC</i>	Codon Ser 80	Ser (AGC)	Ser (AGC)	Ile (ATC)	Ile (ATC)	Ile (ATC)	Ile (ATC)
	Codon Glu 84	Glu (GAA)	Lys (AAA)	Glu (GAA)	Glu (GAA)	Glu (GAA)	Glu (GAA)

Grau schattiert: relevante Mutationen

3.4.3 Analyse der durch erworbene Resistenzgene vermittelten Resistenz

3.4.3.1 β -Laktam-Resistenz

Der bedeutsamste Resistenzmechanismus gramnegativer Bakterien gegenüber β -Laktamen ist die Expression von β -Laktamasen. Mittels PCR wurden die Stämme auf die bei *K. pneumoniae* häufigen β -Laktamase-Typen TEM, SHV und CTX-M sowie auf OXA-, VIM-, IMP- und AmpC-Enzyme getestet (Tabelle 3.14).

Tab. 3.14: Mittels PCR und Sequenzierung detektierte β -Laktamasen

Typ	Klon I	Klon II			
	I-05111	Klon II-A I-15633	Klon II-B S-12579	Klon II-B2 I-18573	Klon II-C I-00401
ESBL	SHV-12	CTX-M-2	CTX-M-2	CTX-M-2	--
OSBL	SHV-11 TEM-1b TEM-1a	SHV-1 TEM-1b	SHV-1 TEM-1b	SHV-1 TEM-1b	SHV-1

Bei allen Stämmen außer Klon II-C konnte ein TEM-Enzym amplifiziert werden. Die Sequenzierung des Amplikons zeigte, dass die Klone II-A, II-B und II-B2 die OSBL (original-

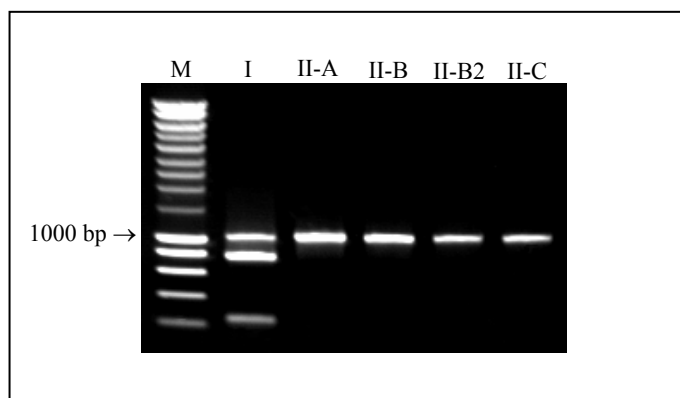
spectrum β -lactamase) TEM-1b besitzen. Bei Klon I konnten zwei Varianten dieses Enzyms (TEM-1a und TEM-1b) detektiert werden.

Auch die SHV-PCR lieferte bei allen Stämmen ein positives Ergebnis. Mit Hilfe des PCR/*NheI*-Tests nach NÜESCH-INDERBINEN et al. (1996) wurde untersucht, ob es sich um ESBLs (extended-spectrum β -lactamases) handelt. Hierzu wurden die 1017 bp großen PCR-Fragmente mit dem Restriktionsenzym *NheI* verdaut (Abbildung 3.7). Nur SHV-Gene mit der ESBL-typischen Mutation G238S werden in zwei Fragmente von 770 bp und 247 bp Länge gespalten, da diese Mutation zur Entstehung einer *NheI*-Schnittstelle führt. Da die Amplikons des Klons II nicht geschnitten wurden, scheinen diese Stämme nur eine OSBL vom SHV-Typ zu besitzen. Durch Sequenzierung wurde bestätigt, dass es sich um SHV-1 handelt. Diese β -Laktamase kommt bei den meisten *K.-pneumoniae*-Stämmen als Spezies-spezifisches, chromosomal kodiertes Klasse-A-Enzym vor (CHAVES et al., 2001).

Bei Klon I ist nach dem *NheI*-Verdau sowohl ein geschnittenes als auch ein ungeschnittenes Fragment vorhanden, er scheint demnach zwei verschiedene SHV-Enzyme zu besitzen. Die ESBL wurde aus Plasmid-DNA des Stammes amplifiziert und mittels Sequenzierung als SHV-12 identifiziert. Um die vermutlich chromosomale OSBL ohne den Hintergrund der SHV-12 sequenzieren zu können, wurde der Stamm zehnmal auf MH-Agar passagiert. Durch Überpicken von 30 Kolonien auf MH-Agar mit und ohne 50 μ g/ml Cefotaxim konnte ein Subklon identifiziert werden, der die SHV-12 verloren hatte (Stamm I-PV01). Aus diesem Stamm konnte die chromosomale β -Laktamase amplifiziert und durch Sequenzierung als SHV-11 identifiziert werden. Diese OSBL unterscheidet sich von SHV-1 nur durch die Mutation L35Q, die ihr keine ESBL-Aktivität verleiht.

Abb. 3.7: *NheI*-Verdau der SHV-PCR-Fragmente.

M: Marker, I: Klon I, II-A: Klon II-A, II-B: Klon II-B, II-B2: Klon II-B2, II-C: Klon II-C.



In Klon II-A, II-B und II-B2 konnte mittels PCR und Sequenzierung die ESBL CTX-M-2 detektiert werden, während bei Klon II-C keine ESBL nachgewiesen wurde. Bei keinem der Stämme konnten Gene für AmpC-, VIM-, IMP- oder OXA-Enzyme amplifiziert werden.

Um die β -Laktamase-Expression in den ausgewählten Stämmen zu untersuchen, wurden β -Laktamase-Rohextrakte zunächst mittels konventioneller SDS-PAGE aufgetrennt. Durch eine Aktivitätsfärbung mit Nitrocefin konnten die β -Laktamasen detektiert werden (Abbildung 3.8). Als Referenzen wurden verschiedene β -Laktamasen bekannten Molekulargewichts aufgetragen.

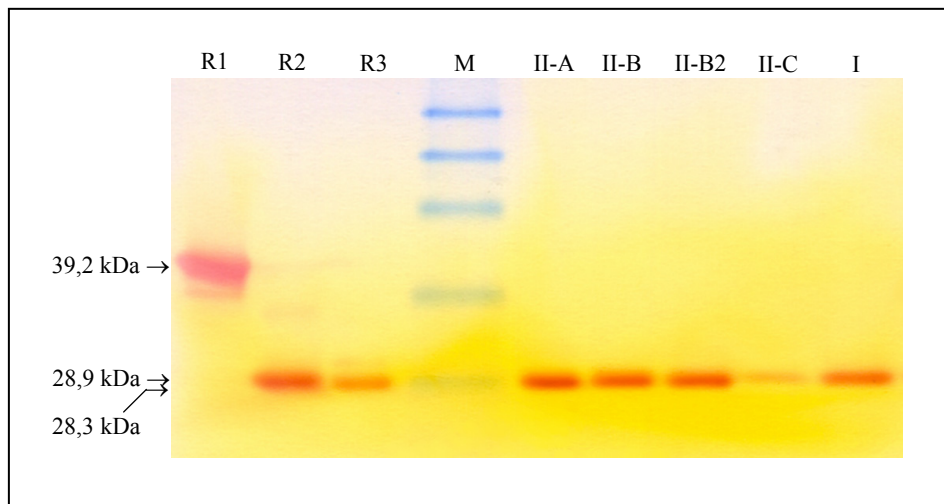


Abb. 3.8: SDS-PAGE und Nitrocefin-Färbung der β -Laktamase-Rohextrakte.
M: Proteinmarker, R1: AmpC (39,2 kDa), R2: TEM-1 (28,9 kDa), R3: CTX-M-2 (28,3 kDa).
I: Klon I, II-A: Klon II-A, II-B: Klon II-B, II-B2: Klon II-B2, II-C: Klon II-C.

Sowohl bei Klon I als auch bei allen Stämmen von Klon II konnte im Gel jeweils nur eine Bande detektiert werden, deren Höhe den Klasse-A-Referenz-Enzymen TEM-1 und CTX-M-2 entspricht. Da Klasse-A- β -Laktamasen ähnliche Molekulargewichte besitzen, konnte aufgrund der SDS-PAGE nur festgestellt werden, dass alle untersuchten Stämme ein oder mehrere Klasse-A-Enzyme besitzen. Klasse-C- β -Laktamasen, deren Molekulargewicht bei etwa 40 kDa liegt, werden dagegen nicht exprimiert. Auffällig ist die deutlich schwächere β -Laktamase-Aktivität des Klons II-C im Vergleich zu den übrigen Stämmen. Zudem wurde bei Klon II-C mit 48,6 μ g eine etwa 20- bis 30-fach höhere Proteinmenge aufgetragen als bei den anderen Stämmen von Klon II (1,46 μ g - 2,26 μ g). Der reale Aktivitätsunterschied ist somit deutlich größer als im Gel erkennbar.

Durch Auftrennung mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) können β -Laktamasen anhand ihres isoelektrischen Punktes (pI) identifiziert werden. Auch auf dem IEF-Gel (Abbildung 3.9) wurden bekannte β -Laktamasen als Referenz aufgetragen. Bei den unterhalb der Refe-

renz-Enzyme fokussierenden schwachen Banden handelt es sich um sogenannte Satellitenbanden, die als Artefakte zu betrachten und zu vernachlässigen sind.

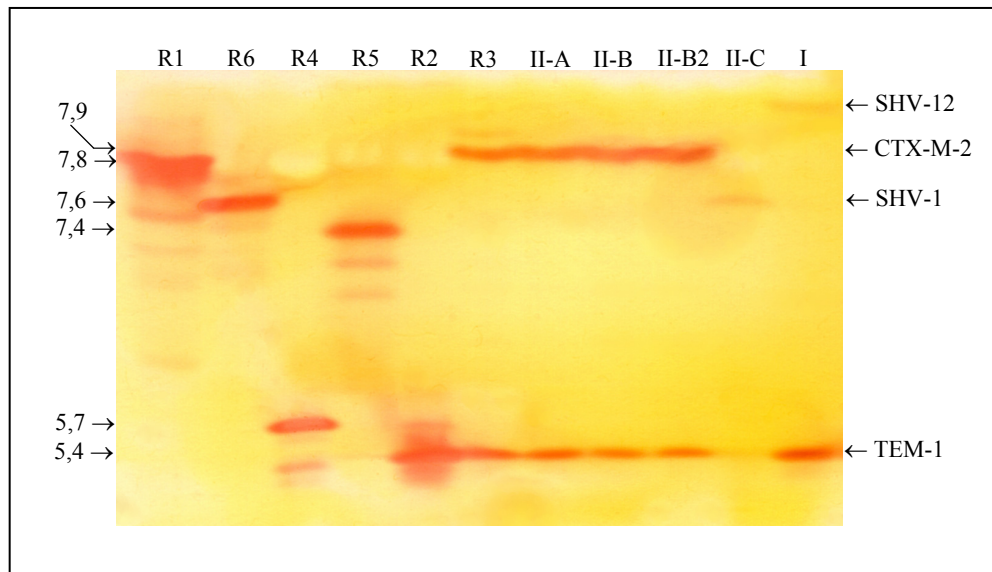


Abb. 3.9: Isoelektrische Fokussierung der β -Laktamase-Rohextrakte.
 R1: AmpC (pI 7,8), R2: TEM-1 (pI 5,4), R3: CTX-M-2 (pI 7,9), R4: PSE-1 (pI 5,7),
 R5: OXA-1 (pI 7,4), R6: SHV-1 (pI 7,6). I: Klon I, II-A: Klon II-A, II-B: Klon II-B,
 II-B2: Klon II-B2, II-C: Klon II-C.

Erwartungsgemäß konnten bei den Klonen II-A, II-B und II-B2 jeweils ein CTX-M-2-Enzym (pI 7,9) sowie ein TEM-1-Enzym (pI 5,4) detektiert werden, welche mit den Referenz-Enzymen kofokussierten. In Klon II-C sind diese β -Laktamasen nicht vorhanden, als einziges Enzym ist die schwache Bande der SHV-1 (pI 7,6) zu erkennen. Dass bei den anderen Stämmen die chromosomale SHV- β -Laktamase nicht im Gel sichtbar war, ist auch hier dadurch zu erklären, dass bei II-C eine etwa 20- bis 30-fach höhere Proteinmenge aufgetragen wurde als bei den anderen Stämmen.

Bei Klon I ist neben der TEM-1-Bande eine weitere Bande im oberen Teil des IEF-Gels erkennbar. Aufgrund der Laufhöhe ist sie SHV-12 (pI 8,2) zuzuordnen. Ihre im Vergleich zu den TEM-Enzymen schwächere Aktivität ist dadurch zu erklären, dass es bei ESBLs vom TEM- und SHV-Typ durch Mutationen zwar zu einer Erweiterung des hydrolytischen Spektrums, aber auch zu einer Abnahme der Enzym-Aktivität kommt.

Weitere β -Laktamasen konnten bei keinem der Stämme detektiert werden. Die Klone II-A, II-B und II-B2 weisen nach diesen Ergebnissen keine Unterschiede in ihrer β -Laktamase-Ausstattung auf. Der Erwerb einer zusätzlichen β -Laktamase ist demnach als Erklärung für die Ertapenem-Resistenz des Stammes II-B2 auszuschließen. Um die Möglichkeit einer Über-

expression der vorhandenen Enzyme in diesem Stamm zu untersuchen, wurden β -Laktamase-Rohextrakte von allen Stämmen unter exakt gleichen Bedingungen präpariert und die spezifische β -Laktamase-Aktivität dieser Extrakte ermittelt (Abbildung 3.10). Die Aktivität ist zwar bei Klon II-B2 geringfügig höher als bei den anderen Isolaten, jedoch liegen diese Unterschiede im Fehlerbereich der mit großen Messschwankungen behafteten Methode. Eine deutliche β -Laktamase-Überexpression ist nicht erkennbar.

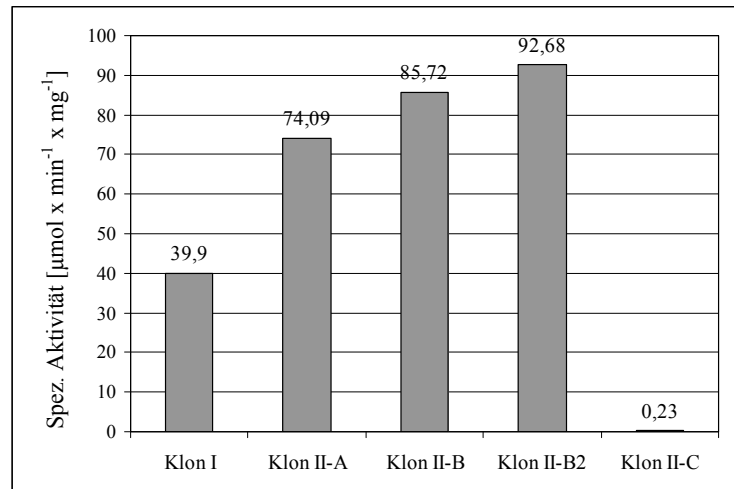


Abb. 3.10: Spezifische β -Laktamase-Aktivität der *K. pneumoniae*-Isolate

3.4.3.2 PCR-Screening nach erworbenen Resistenzgenen

Zur Detektion weiterer erworbener Resistenzdeterminanten wurde ein umfangreiches PCR-Screening nach relevanten Resistenzgenen durchgeführt, welches insgesamt 38 Gene berücksichtigte. Hierzu gehörten neben zehn β -Laktamase-Genen bzw. -Gruppen (vgl. 3.4.3.1) elf Gene für Aminoglykosid-modifizierende Enzyme (AME), sowie sechs Tetracyclin-, sechs Chloramphenicol- und zwei Sulfonamid-Resistenzdeterminanten (vgl. 2.5.4.1). Auch das Vorhandensein des plasmidkodierten *qnrB*-Gens, das die Empfindlichkeit gegenüber Chinolonen senkt, sowie der für Klasse-1- und Klasse-2-Integrone charakteristischen Integrase-Gene *intI1* und *intI2* wurde überprüft. Positive PCR-Ergebnisse wurden durch Sequenzierung des Amplikons verifiziert.

In das PCR-Screening wurden neben den fünf ausgewählten Stämmen weitere sechs Isolate des Klons II einbezogen, um die verschiedenen PFGE-Varianten IIa, IIb, IIc, IId sowie die Umgebungsisolate zu berücksichtigen. In Tabelle 3.15 sind die Ergebnisse aller PCRs dargestellt.

Tab. 3.15: Ergebnisse des PCR-Screenings

Stamm	PFGE-Muster	Resistenzdeterminanten gegen:					Integrase-Gen
		β -Laktame	Aminoglykoside	Tetra-cycline	Sulfon-amide	Chlor-amphenicol	
Klon I	I	<i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{SHV-11} , <i>bla</i> _{TEM-1a} , <i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>aac(3)-IIc</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>ant(3'')-Ia</i> , <i>aph(3'')-I (strA)</i> , <i>aph(6)-I (strB)</i>	--	<i>sulII</i>	<i>catI</i>	<i>intII</i>
Klon II-A	II	<i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aac(3)-IIc</i> , <i>ant(3'')-Ia</i>	--	<i>sulI</i>	<i>catI</i>	<i>intII</i>
Klon II-B	II						
Klon II-B2	IIa						
S-00001-a	IIb						
S-12639	IIc						
S-12941	IId						
S-00060	II						
U-12504	II						
U-12509	II						
Klon II-C	II	--	--	--	--	--	--

Klon I besitzt deutlich mehr erworbene Resistenzdeterminanten als Klon II. In diesem Stamm wurden neben vier verschiedenen β -Laktamase-Genen sechs AME-Gene sowie *sulII* und *catI* gefunden. Klon II beherbergt lediglich drei β -Laktamase-Gene, zwei AME-Gene sowie *sulI* und *catI*. Da bei beiden Klonen *intII* detektiert werden konnte, besitzen sie offenbar Klasse-1-Integrans. *IntI2* und *qnr* wurden nicht nachgewiesen. Zwischen neun der zehn untersuchten Stämme von Klon II konnten keine Unterschiede in der Ausstattung mit erworbenen Resistenzgenen festgestellt werden. Eine Ausnahme bildete Klon II-C, bei dem keins der erworbenen Resistenzgene gefunden werden konnte. Dies erklärt das im Vergleich zu den anderen Isolaten von Klon II deutlich niedrigere Resistenzniveau des Stammes.

3.4.4 Lokalisation der erworbenen Resistenzgene

Erworbenes Resistenzgene liegen häufig auf mobilen genetischen Elementen wie Plasmiden, Transposons oder Integrans, wodurch ihre Übertragung zwischen Stämmen derselben oder verschiedener Spezies begünstigt wird.

3.4.4.1 Plasmide

Mittels der Plasmidpräparation nach TIETZE (vgl. 2.5.1.2) konnten aus Klon I, II-B und II-C gelelektrophoretisch auftrennbare Plasmide gewonnen werden, während die Auftrennung der Plasmidpräparationen von Klon II-A und II-B2 aufgrund der stärkeren Schleimbildung der

Stämme nicht möglich war (Abbildung 3.11). Zum Größenvergleich wurden Referenzplasmide der Stämme R27 und V517 aufgetragen.

Erwartungsgemäß besitzen Klon I und Klon II unterschiedliche Plasmidprofile. Das bei Klon II-B größte erkennbare Plasmid mit einer Größe von etwa 180 kb fehlt bei Klon II-C. Möglicherweise liegen die bei Stamm II-C fehlenden Resistenzgene zumindest teilweise auf diesem Plasmid, jedoch konnte nicht geklärt werden, ob das Plasmid auch bei Klon II-A und II-B2 vorhanden ist.

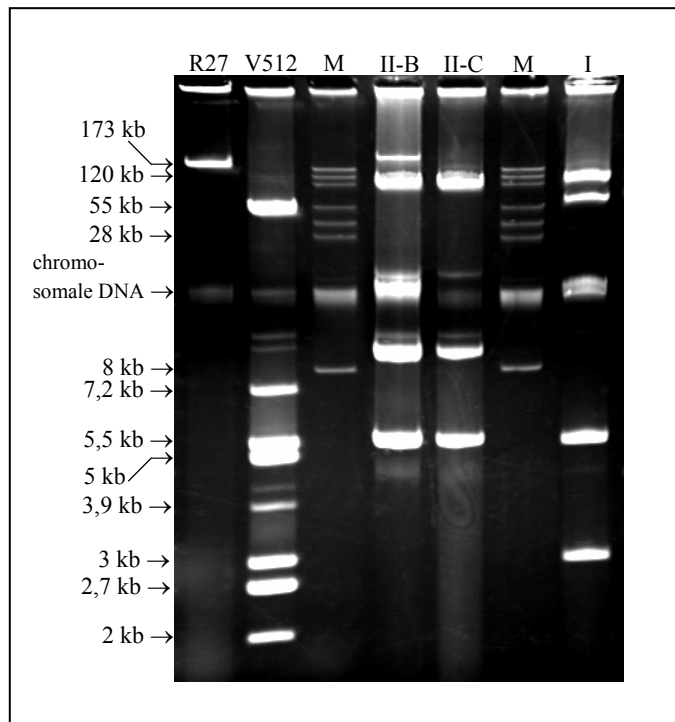


Abb. 3.11: Gelelektrophoretische Auftrennung der Plasmidpräparationen ausgewählter Stämme.

M: Größenmarker, R27: Referenzstamm, V517: Referenzstamm. I: Klon I, II-B: Klon II-B, II-C: Klon II-C.

3.4.4.2 Integrons

In allen mittels PCR untersuchten Stämmen mit Ausnahme von Klon II-C wurde das Integrase-Gen der Klasse-1-Integrons (*intI1*) detektiert. In Klon I konnte mit Hilfe der Primer 5'CS und 3'CS, die in den konservierten Randbereichen von Typ-1-Integrons binden, der variable Bereich des Integrons amplifiziert werden. Er bestand aus einer Genkassette, welche mittels Sequenzierung als *dfrV* identifiziert wurde. Diese alternative Dihydrofolatreduktase vermittelt Resistenz gegenüber Trimethoprim. In Klon I konnte kein *sull*-Gen detektiert werden, welches zum 3'-konservierten Bereich von Klasse-1-Integrons gehört. Da auch durch Mapping von *sull* mit dem davor liegenden *qacEΔ1*-Gen kein Produkt amplifiziert werden konnte, ist davon auszugehen, dass der 3'-konservierte Bereich des Integrons einen Defekt aufweist.

Obwohl die Klone II-A, II-B und II-B2 das *intI1*-Gen sowie die Gene *sull* und *qacEΔ1* besitzen, konnte mit Hilfe der 5'CS-3'CS-Primer kein Produkt amplifiziert werden. Das Mapping

der Resistenzgene *catI*, *aac(3)-IIc* und *ant(3'')-Ia* mit der 5'CS- sowie der 3'CS-Region lieferte ebenfalls kein PCR-Produkt. Es ist daher zu vermuten, dass Klon II eines oder mehrere Klasse-1-Integrone besitzt, welche jedoch mit Hilfe des PCR-Mappings nicht charakterisiert werden konnten.

3.4.4.3 Konjugation

Sowohl konjugative oder mobilisierbare Plasmide als auch konjugative Transposons können Resistenzgene auf andere Stämme übertragen und dadurch eine Ausbreitung der Antibiotika-Resistenz bewirken. Durch Konjugationsversuche sollte geprüft werden, ob und mit welcher Frequenz die erworbenen Resistenzgene der untersuchten Stämme auf andere Bakterienstämme übertragen werden können. Die Klone I, II-A, II-B und II-B2 wurden mit dem Rifampicin-resistenten Rezipienten *E. coli* W3110 *lac*⁻ konjugiert. Da bei Klon II-C keine erworbenen Resistenzgene detektiert werden konnten, wurden mit diesem Stamm keine Konjugationsversuche durchgeführt. Die Selektion möglicher Transkonjuganten erfolgte auf LB-Agar mit verschiedenen Antibiotika (20 µg/ml Ampicillin, 8 µg/ml Cefotaxim, 8 µg/ml Ceftazidim, 20 µg/ml Chloramphenicol, 10 µg/ml Gentamicin, 8 µg/ml Streptomycin). Ansätze mit Klon II-B wurden außerdem auf LB-Agar mit 4 µg/ml und 8 µg/ml Imipenem selektiert, um eine mögliche Übertragbarkeit der Carbapenem-Resistenz zu testen. Wegen der großen Anzahl erworbener AMEs wurde bei Klon I zusätzlich mit 20 µg/ml Kanamycin selektiert.

Nach der Konjugation mit Klon I wurden auf allen Antibiotika-haltigen Nährböden Transkonjuganten selektiert, bei Klon II auf allen Antibiotika außer Ceftazidim und Imipenem (Tabelle 3.16). Die Konjugationsfrequenzen lagen bei Klon II-A und II-B2 im Bereich 10^{-4} bis 10^{-5} , bei Klon II-B mit 10^{-6} eine Zehnerpotenz darunter. Bei Klon I wurden verschiedene Übertragungsfrequenzen ermittelt, was auf das Vorhandensein mehrerer mobiler Elemente hindeutet. Während die Resistenz gegenüber Ampicillin, Ceftazidim, Streptomycin und Kanamycin mit einer Frequenz von 10^{-4} bis 10^{-5} übertragen wurde, konnten Transkonjuganten auf Cefotaxim, Chloramphenicol und Gentamicin nur mit einer Frequenz von 10^{-8} selektiert werden.

Von den verschiedenen Selektionsplatten jedes Donors wurden zwei Transkonjuganten auf alle anderen eingesetzten Antibiotika überpickt. Im Falle verschiedener Resistenzmuster wurden beide, andernfalls ein Stamm in die nachfolgende MHK-Bestimmung einbezogen. Mit diesen 26 Transkonjuganten wurde außerdem ein PCR-Screening auf die erworbenen Resistenzgene des jeweiligen Donorstammes durchgeführt. Ausgewählte Transkonjuganten mit

unterschiedlichen MHK-Werten oder PCR-Ergebnissen sind in den Tabellen 3.17 und 3.18 aufgeführt.

Tab. 3.16: Konjugationsfrequenzen

Konjugationsfrequenz auf	Donorstamm			
	Klon I	Klon II-A	Klon II-B	Klon II-B2
Ampicillin	$1,2 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-4}$
Cefotaxim	$1,5 \times 10^{-8}$	$1,2 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-5}$
Ceftazidim	$1,0 \times 10^{-5}$	--	--	--
Imipenem	nd	nd	--	nd
Chloramphenicol	$4,4 \times 10^{-8}$	$3,1 \times 10^{-5}$	$3,7 \times 10^{-6}$	$7,1 \times 10^{-5}$
Gentamicin	$2,1 \times 10^{-8}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$3,7 \times 10^{-6}$	$7,3 \times 10^{-5}$
Streptomycin	$9,2 \times 10^{-5}$	$2,6 \times 10^{-5}$	$2,8 \times 10^{-6}$	$7,9 \times 10^{-5}$
Kanamycin	$7,5 \times 10^{-5}$	nd	nd	nd

nd: nicht durchgeführt; --: unterhalb der Nachweisgrenze von 2 KBE/ml

Alle Transkonjuganten von Klon II-A und II-B2 wiesen ein einheitliches Resistenzmuster auf, hier repräsentiert durch die Stämme 15-CTX-2 bzw. 18-CTX-1. Lediglich die auf Streptomycin selektierten Transkonjuganten (15-STR-1, 18-STR-3) zeigten erhöhte Aminoglykosid-MHK-Werte, jedoch keine Unterschiede im PCR-Screening. Auch bei Klon II-B fanden sich diese beiden Typen (12-CTX-1, 12-STR-12), zusätzlich jedoch ein weiterer Typ mit deutlich verringerten Cephalosporin-MHK-Werten, erklärbar durch das Fehlen der CTX-M-2-β-Laktamase. Bei Klon II liegen demnach *bla*_{CTX-M-2} und die weiteren erworbenen Resistenzgene auf mindestens zwei unterschiedlichen Plasmiden oder anderen mobilen Elementen. Erwartungsgemäß wurde die Carbapenem-Resistenz von Klon II-B nicht übertragen.

Auch die Transkonjuganten von Klon I zeigten bei Selektion auf Streptomycin erhöhte Aminoglykosid-MHK-Werte bei gleicher Genausstattung (01-CAZ-1, 01-STR-2). Insgesamt konnten von diesem Stamm Transkonjuganten mit vier verschiedenen Kombinationen der Resistenzgene selektiert werden, was folgende Zuordnung der Gene zu einzelnen Plasmiden oder mobilen Elementen ermöglicht:

Gruppe A: *bla*_{SHV-12}

Gruppe B: *bla*_{TEM}, *ant*(3'')-Ia, *aac*(6')-Ib

Gruppe C: *strA*, *strB*, *aph*(3')-Ia, *sullI*, *catI*, Integron mit *dfrV*

Gruppe D: *aac*(3)-IIc

Diese Gruppen traten in den Kombinationen **A+B** (01-CAZ-1, 01-STR-2), **B+C** (01-CMP-1), **B+C+D** (01-CMP-2) sowie **A+B+C+D** (01-GEN-1) auf.

Tab. 3.17: MHK-Werte und PCR-Ergebnisse ausgewählter Transkonjuganten von Klon II-A, II-B, II-B2

Antibiotikum	Rezipient <i>E. coli</i> W3110	Donor Klon II-A	15-CTX-2	15-STR-1	Donor Klon II-B2	18-CTX-1	18 STR-3	Donor Klon II-B	12-CTX-1	12-STR-12	12-CMP-1	MHK (µg/ml) von
Ampicillin	2	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	
Amoxicillin/CLA	2/2	>128/2	64/2	32/2	>128/2	64/2	64/2	>128/2	64/2	64/2	64/2	
Ampicillin/SUL	≤1/8	>64/8	>64/8	>64/8	>64/8	>64/8	>64/8	>64/8	>64/8	>64/8	>64/8	
Piperacillin/SUL	≤1/8	>128/8	64/8	16/8	>128/8	64/8	32/8	>128/8	64/8	32/8	32/8	
Piperacillin/TAB	≤1/4	>128/4	≤1/4	≤1/4	>128/4	≤1/4	≤1/4	>128/4	≤1/4	≤1/4	≤1/4	
Imipenem	≤0,25	1	0,5	0,5	2	0,5	≤0,25	16	0,5	0,5	0,5	
Meropenem	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	1	≤0,25	≤0,25	32	≤0,25	≤0,25	≤0,25	
Ertapenem	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	8	≤0,25	≤0,25	32	≤0,25	≤0,25	≤0,25	
Ceftazidim	≤0,25	32	2	1	>32	2	1	>32	2	1	≤0,25	
Ceftazidim/CLA	≤0,25/4	2/4	≤0,25/4	≤0,25/4	>32/4	≤0,25/4	≤0,25/4	32/4	≤0,25/4	≤0,25/4	≤0,25/4	
Cefotaxim	≤0,25	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	≤0,25	
Cefotaxim/CLA	≤0,25/4	≤0,25/4	≤0,25/4	≤0,25/4	>32/4	≤0,25/4	≤0,25/4	>32/4	≤0,25/4	≤0,25/4	≤0,25/4	
Cefepim	≤0,25	>32	16	16	>32	16	16	>32	16	8	≤0,25	
Cefuroxim	2	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	2	
Ceftriaxon	≤0,25	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	≤0,25	
Cefoxitin	2	16	4	4	128	4	4	128	4	4	4	
Amikacin	0,5	2	1	1	8	1	1	2	0,5	0,5	1	
Tobramycin	0,125	4	2	4	8	2	2	8	2	2	2	
Gentamicin	0,125	128	32	64	>128	32	32	128	32	32	32	
Kanamycin	0,5	8	2	8	16	2	8	8	2	4	4	
Netilmicin	≤0,06	16	4	8	16	4	8	32	4	4	4	
Neomycin	0,5	1	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5	0,25	
Streptomycin	1	16	16	64	32	16	64	32	16	64	16	
Moxifloxacin	0,25	>8	0,25	0,25	>8	0,25	0,25	>8	0,25	0,25	0,25	
Ciprofloxacin	0,25	>8	0,25	0,25	32	0,25	0,25	>8	0,25	0,25	0,25	
Doxycyclin	≤0,25	4	≤0,25	≤0,25	2	≤0,25	≤0,25	4	≤0,25	≤0,25	≤0,25	
Cotrimoxazol	≤1	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	
Chloramphenicol	2	>128	128	128	>128	128	128	>128	128	128	128	
<i>bla</i> _{CTX-M}	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
<i>bla</i> _{TEM}	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>bla</i> _{SHV}	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	
<i>aac(3)-IIc</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>ant(3'')-Ia</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>sull</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>catI</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>intI1</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

CLA: Clavulansäure; SUL: Sulbactam; TAB: Tazobactam; rot: MHK gegenüber dem Rezipienten um mindestens zwei Stufen erhöht; blau: MHK des Donors; + positives PCR-Ergebnis (bei den Transkonjuganten grau schattiert); - negatives PCR-Ergebnis

Tab. 3.18: MHK-Werte und PCR-Ergebnisse ausgewählter Transkonjuganten von Klon I

	Antibiotikum	Rezipient <i>E. coli</i> W3110	Donor (Klon I)	MHK (µg/ml) von				
				01-CAZ-1	01-STR-2	01-CMP-1	01-CMP-2	01-GEN-1
	Ampicillin	2	>128	>128	>128	>128	>128	>128
	Amoxicillin/CLA	2/2	>128/2	16/2	16/2	16/2	16/2	64/2
	Ampicillin/SUL	≤1/8	>64/8	4/8	4/8	2/8	4/8	4/8
	Piperacillin/SUL	≤1/8	>128/8	≤1/8	≤1/8	≤1/8	2/8	4/8
	Piperacillin/TAB	≤1/4	>128/4	≤1/4	≤1/4	≤1/4	≤1/4	≤1/4
	Imipenem	≤0,25	0,5	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25
	Meropenem	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25
	Ertapenem	≤0,25	1	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25
	Ceftazidim	≤0,25	>32	>32	32	≤0,25	≤0,25	32
	Ceftazidim/CLA	≤0,25/4	2/4	≤0,25/4	≤0,25/4	≤0,25/4	≤0,25/4	≤0,25/4
	Cefotaxim	≤0,25	>32	16	8	≤0,25	≤0,25	4
	Cefotaxim/CLA	≤0,25/4	1/4	≤0,25/4	≤0,25/4	≤0,25/4	≤0,25/4	≤0,25/4
	Cefepim	≤0,25	32	2	0,5	≤0,25	≤0,25	0,5
	Cefuroxim	2	>128	32	16	2	2	16
	Ceftriaxon	≤0,25	>32	8	4	≤0,25	≤0,25	4
	Cefoxitin	2	128	4	2	2	2	4
	Amikacin	0,5	16	8	8	8	8	4
	Tobramycin	0,125	16	2	4	4	4	8
	Gentamicin	0,125	128	0,5	0,5	0,5	32	32
	Kanamycin	0,5	>256	32	32	>256	>256	>256
	Netilmicin	≤0,06	128	8	16	16	16	16
	Neomycin	0,5	64	1	1	64	64	64
	Streptomycin	1	>256	8	64	128	128	256
	Moxifloxacin	0,25	>8	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
	Ciprofloxacin	0,25	>8	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
	Doxycyclin	≤0,25	8	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25
	Cotrimoxazol	≤1	>128	≤1	≤1	>128	>128	>128
	Chloramphenicol	2	>128	2	2	>128	>128	>128
Ergebnis der PCRs	<i>bla_{SHV}</i>	-	+	+	+	-	-	+
	<i>bla_{TEM}</i>	-	+	+	+	+	+	+
	<i>aac(3)-IIc</i>	-	+	-	-	-	+	+
	<i>ant(3'')-Ia</i>	-	+	+	+	+	+	+
	<i>aac(6')-Ib</i>	-	+	+	+	+	+	+
	<i>strAB</i>	-	+	-	-	+	+	+
	<i>aph(3')-Ia</i>	-	+	-	-	+	+	+
	<i>sullI</i>	-	+	-	-	+	+	+
	<i>catI</i>	-	+	-	-	+	+	+
	<i>intI1</i>	-	+	-	-	+	+	+
	Genkass. (<i>dfrV</i>)	-	+	-	-	+	+	+
PCR- <i>NheI</i> -Test	nd	ESBL + OSBL	ESBL	nd	ESBL	nd	ESBL	

CLA: Clavulansäure; SUL: Sulbactam; TAB: Tazobactam; rot: MHK gegenüber dem Rezipienten um mindestens zwei Stufen erhöht; blau: MHK des Donors; + positives PCR-Ergebnis (bei den Transkonjuganten grau schattiert); - negatives PCR-Ergebnis; nd: nicht durchgeführt.

3.4.5 Bestimmung der Mutationsfrequenzen

Die Carbapenem-Resistenz vermittelnde Mutationsfrequenz sollte bestimmt werden, um abschätzen zu können, mit welcher Häufigkeit sich aus einem Carbapenem-empfindlichen Stamm wie Klon II-A ein Carbapenem-resistenter Subklon wie Klon II-B entwickeln kann. Die Mutationsfrequenz auf Rifampicin diene als Kontrolle. In Tabelle 3.19 sind die ermittelten Frequenzen aufgeführt. Für den bereits Carbapenem-resistenten Klon II-B entfiel die Mutationsfrequenz-Bestimmung auf Imipenem. Ebenso wurden für Klon I und II-B keine Werte auf 100 µg/ml Rifampicin ermittelt, da die Konzentration zu nah an der MHK (64 µg/ml) liegt.

Nach den Versuchsergebnissen liegt die Frequenz für Carbapenem-Resistenz vermittelnde Mutationen bei den untersuchten Stämmen deutlich unter der normalen Mutationsfrequenz für Punktmutationen (1×10^{-8}). Für die Kontrollstämmen wurden jedoch mindestens ebenso niedrige Frequenzen ermittelt.

Die Rifampicin-Resistenz entsteht bei den Klonen I, II-A und II-B2 wie bei den Kontrollstämmen mit Mutationsfrequenzen von $1,2 \times 10^{-8}$ bis $2,7 \times 10^{-8}$, demnach handelt es sich nicht um Mutatorstämmen. Klon II-B dagegen zeigt auf Rifampicin eine deutlich erhöhte Mutationsfrequenz, aufgrund welcher er als Hypermutator einzuordnen ist.

Tab. 3.19: Mutationsfrequenzen

Stamm	Mutationsfrequenz auf Rifampicin 100	Mutationsfrequenz auf Rifampicin 200	Mutationsfrequenz auf Imipenem 4 / Imipenem 8
Klon II-A	$2,66 \times 10^{-8}$	$1,74 \times 10^{-8}$	$< 3,44 \times 10^{-11}$ *
Klon II-B	nd	$6,13 \times 10^{-6}$	nd
Klon II-B2	$2,31 \times 10^{-8}$	$1,69 \times 10^{-8}$	$< 2,99 \times 10^{-11}$ *
Klon I	nd	$2,38 \times 10^{-8}$	$< 2,15 \times 10^{-11}$ *
ATCC 13883	$1,87 \times 10^{-8}$	$1,85 \times 10^{-8}$	$< 3,01 \times 10^{-11}$ *
ATCC 27736	$1,21 \times 10^{-8}$	$1,27 \times 10^{-8}$	$< 5,38 \times 10^{-11}$ *

Angabe der Antibiotika-Konzentrationen in µg/ml; nd: nicht durchgeführt; * Angabe der jeweiligen Nachweisgrenze

3.4.6 Bestimmung der Generationszeit

Klon II-B unterscheidet sich von Klon II-A durch den Verlust des Porins OmpK36. Mittels Bestimmung der Generationszeiten dieser Stämme sollte untersucht werden, ob für Klon II-B durch das Fehlen des zweiten Porins ein Wachstumsnachteil entsteht. Die Wachstumskurven beider Stämme (Abbildung 3.12) wurden jeweils an gleichen Tagen unter gleichen Bedingungen ermittelt. Die berechnete Generationszeit betrug für Klon II-A 19,55 min, für Klon II-B jedoch 32,02 min, was auf eine deutlich verminderte Fitness dieses Stammes schließen lässt.

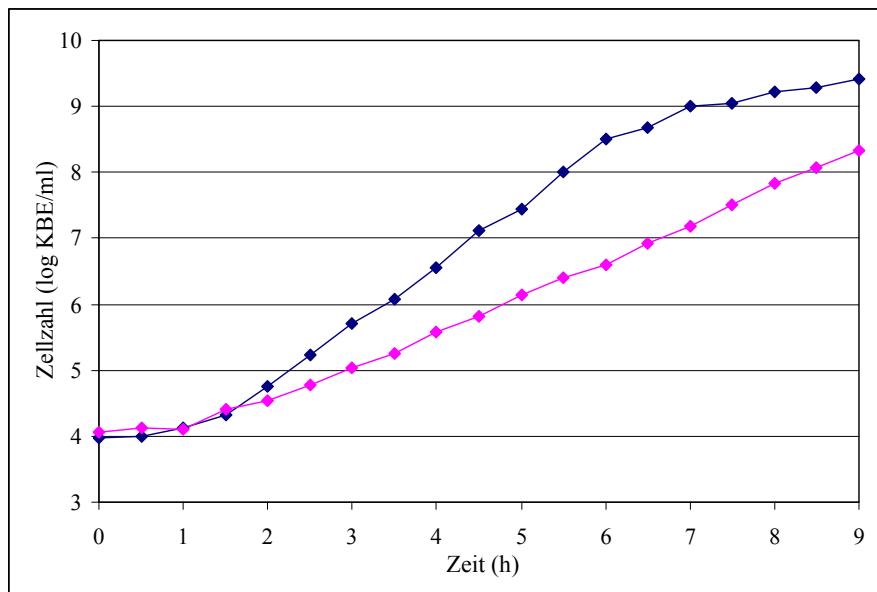


Abb. 3.12: Vergleich der Wachstumskurven. ◆ Klon II-A, ◆ Klon II-B

3.5 Entstehung eines panresistenten Stammes aus Klon I

Klon I ist resistent gegenüber den meisten zur Therapie von *K.-pneumoniae*-Infektionen eingesetzten Antibiotika, so dass im Fall einer schweren nosokomialen Infektion mit diesem Stamm die Carbapeneme als eine der letzten Therapieoptionen verbleiben. Eine mögliche Ausprägung von Carbapenem-Resistenz würde auch diese Option vernichten.

Bei *K.-pneumoniae*-Stämmen mit Defiziten in der Porinexpression kann bereits der Erwerb plasmidkodierter AmpC- oder CTX-M- β -Laktamasen zu Carbapenem-Resistenz führen. Da diese Enzyme bei *K. pneumoniae* erheblich häufiger als Carbapenemasen vorkommen, sollte durch Konjugation mit verschiedenen Donorstämmen überprüft werden, ob auch Klon I in der Lage ist, durch Aufnahme einer solchen β -Laktamase Carbapenem-Resistenz zu erwerben.

3.5.1 Konjugationen mit CTX-M-tragenden Donorstämmen

Klon I wurde mit sieben verschiedenen klinischen *E.-coli*-Isolaten konjugiert, welche die plasmidkodierten β -Laktamasen CTX-M-15, CTX-M-18 und CTX-M-27 besaßen (vgl. 2.1.1.2). Die Selektion möglicher Transkonjuganten erfolgte auf MH-Agar, supplementiert mit Imipenem (Konzentrationen 2 $\mu\text{g/ml}$ und 4 $\mu\text{g/ml}$). Mit keinem der Donorstämme konnten Carbapenem-resistente Transkonjuganten selektiert werden.

3.5.2 Konjugationen mit AmpC-tragenden Donorstämmen

Als Donorstämme wurden neun verschiedene klinische *E.-coli*- und *K.-pneumoniae*-Isolate mit den plasmidkodierten, konjugierbaren AmpC- β -Laktamasen CMY-2, LAT-1, LAT-2, BIL-1 und FOX-2 eingesetzt. Die Selektion erfolgte ebenfalls auf MH-Agar mit 2 $\mu\text{g/ml}$ und 4 $\mu\text{g/ml}$ Imipenem. Mit dem Donorstamm *E. coli* 56 konnten Carbapenem-resistente Transkonjuganten mit einer Frequenz von $1,7 \times 10^{-8}$ selektiert werden. Da die Konjugationsfrequenz sehr niedrig lag, wurde eine Kontrollkonjugation des Donors *E. coli* 56 mit dem Rezipienten *E. coli* MC-1061-4 Rif^R durchgeführt (Selektion auf MH-Agar mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin sowie 100 $\mu\text{g/ml}$ Rifampicin). Transkonjuganten mit aufgenommener AmpC- β -Laktamase konnten hierbei mit einer Frequenz von $6,5 \times 10^{-5}$ selektiert werden.

3.5.3 Charakterisierung ausgewählter Transkonjuganten

3.5.3.1 MHK-Werte und erworbene Resistenzgene

In Tabelle 3.20 sind die MHK-Werte von drei zufällig ausgewählten Transkonjuganten aufgeführt. Wie erwartet zeigen sie klinische Resistenz gegenüber Carbapenemen. Auch die MHK-Werte von Doxycyclin und Clavulansäure sind deutlich erhöht, während die Werte von Cefepim, Cefoxitin und Tigecyclin jeweils um mindestens eine Stufe steigen.

Tab. 3.20: MHK-Werte (µg/ml) ausgewählter AmpC-Transkonjuganten

Antibiotikum	Rezipient: Klon I	Donor: <i>E. coli</i> 56	TK-A	TK-B	TK-C
Ampicillin	>2048	>2048	>2048	>2048	>2048
Amoxicillin/CLA	>128/2	256/2	>128/2	>128/2	>128/2
Piperacillin/TAB	>256/4	32/4	>256/4	>256/4	>256/4
Imipenem	0,5	1	16	16	16
Meropenem	≤0,25	0,125	8	8	8
Ertapenem	1	nd	32	32	32
Aztreonam	>512	16	>64	>64	>64
Ceftazidim	>32	32	>32	>32	>32
Ceftazidim/CLA	2/4	32/4	>32/4	>32/4	>32/4
Cefotaxim	>32	64	>32	>32	>32
Cefotaxim/CLA	1/4	32/4	>32/4	>32/4	>32/4
Cefuroxim	>128	>32	>128	>128	>128
Ceftriaxon	>32	32	>32	>32	>32
Cefepim	32	0,5	64	64	64
Cefoxitin	128	>128	>128	>128	>128
Amikacin	16	16	16	16	16
Tobramycin	16	8	16	16	16
Gentamicin	128	8	128	128	128
Ciprofloxacin	>32	16	>32	>32	>32
Doxycyclin	8	64	64	64	64
Tigecyclin	0,5	nd	1	1	1
Cotrimoxazol	>256	>256	>256	>256	>256
Chloramphenicol	>128	>128	>128	>128	>128
Fosfomycin	128	0,5	128	128	128
Colistin	1	nd	1	1	1

CLA: Clavulansäure; SUL: Sulbactam; TAB: Tazobactam; rot: MHK gegenüber dem Rezipienten um mindestens zwei Stufen erhöht; blau: MHK des Donors; nd: nicht durchgeführt.

Mittels PCR und Sequenzierung wurde bei den drei ausgewählten Transkonjuganten die Aufnahme der CMY-2-β-Laktamase aus *E. coli* 56 bestätigt. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die Transkonjuganten keines der im Rezipienten (Klon I) vorhandenen Resistenzgene verloren hatten. Zusätzlich konnten die Resistenzgene *tet(A)*, *ant(3'')-Ib*, *flo*, *dfr12* und *sull* detektiert werden, die im Donorstamm auf dem gleichen Plasmid liegen wie *bla_{CMY-2}* (SHER-

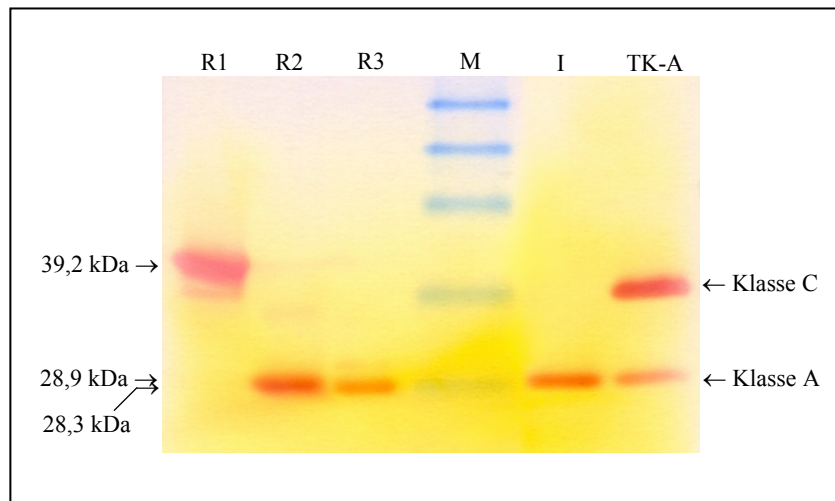
WOOD, 2004) und zusammen übertragen wurden. Während die CMY-2-Laktamase Carbapenem-Resistenz vermittelt, ist die Tetracyclin-spezifische Effluxpumpe Tet(A) für die erhöhte Doxycyclin-MHK verantwortlich. Die Tigecyclin-MHK wird nur um eine Stufe erhöht, da dieses neue Glycylcyclin kein Substrat für die klassischen Tetracyclin-Effluxpumpen darstellt.

3.5.3.2 β -Laktamase-Expression

Die Expression der AmpC- β -Laktamase sollte am Beispiel des Transkonjuganten TK-A mittels gelelektrophoretischer Auftrennung eines β -Laktamase-Rohextraktes und nachfolgender Nitrocefin-Aktivitätsfärbung nachgewiesen werden. Durch eine konventionelle SDS-PAGE (Abbildung 3.13) wurden die β -Laktamasen zunächst nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und mit bekannten β -Laktamasen verglichen (vgl. 3.4.3.1). Wie bereits beschrieben, exprimiert Klon I nur Klasse-A-Enzyme, deren Molekulargewicht im Gel den Referenz-Enzymen TEM-1 und CTX-M-2 entspricht. Bei dem Stamm TK-A ist dagegen eine weitere β -Laktamase erkennbar. Da sie im Gel auf etwa gleicher Höhe wie die AmpC-Referenz läuft, ist davon auszugehen, dass es sich um die per Konjugation erworbene CMY-2- β -Laktamase handelt, welche ein Molekulargewicht von 39,7 kDa besitzt.

Abb. 3.13: SDS-PAGE und Nitrocefin-Färbung der β -Laktamase-Rohextrakte von Klon I und seinem Transkonjuganten TK-A.

M: Proteinmarker,
 R1: AmpC (39,2 kDa),
 R2: TEM-1 (28,9 kDa),
 R3: CTX-M-2 (28,3 kDa).
 TK-A: Transkonjugant TK-A,
 I: Klon I.



Die isoelektrische Fokussierung (Abbildung 3.14) bestätigt dieses Ergebnis. Während bei Klon I die bereits beschriebenen Enzyme TEM-1 und SHV-12 erkennbar sind, zeigt der Transkonjugant TK-A eine weitere Bande. Sie fokussiert am oberen Rand des IEF-Gels, was mit dem für CMY-2 berechneten pI von 9,1 übereinstimmt. Die schwache SHV-12-Bande ist bei dem Transkonjuganten nicht erkennbar. Dies ist dadurch zu erklären, dass bei diesem Stamm nur halb so viel Zellprotein (3,43 μ g) aufgetragen wurde wie bei Klon I (6,39 μ g), um

die CMY-2-Bande nicht zu überfärben. Mittels des PCR/*NheI*-Tests konnte jedoch die Anwesenheit des *bla*_{SHV-12}-Gens in den Transkonjuganten nachgewiesen werden.

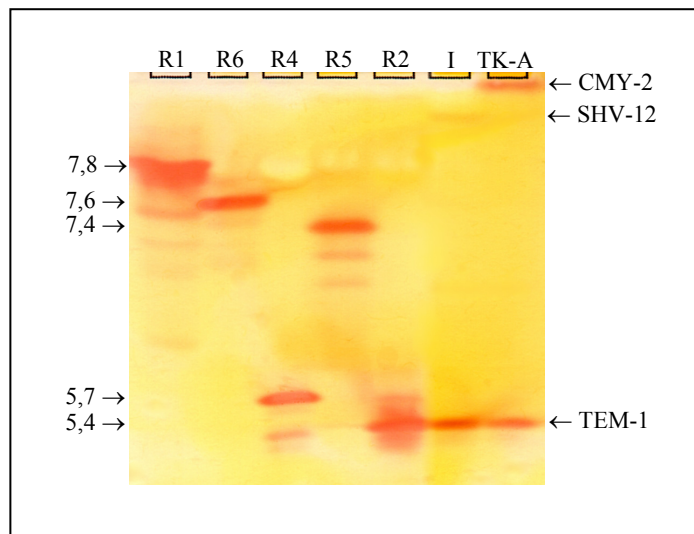


Abb. 3.14: Isoelektrische Fokussierung der β -Laktamase-Rohextrakte.

R1: AmpC (pI 7,8), R2: TEM-1 (pI 5,4), R4: PSE-1 (pI 5,7), R5: OXA-1 (pI 7,4), R6: SHV-1 (pI 7,6). I: Klon I, TK-A: Transkonjugant TK-A.

3.5.3.3 Porin-Expression

Um das Porin-Expressionsmuster der drei ausgewählten Transkonjuganten zu überprüfen, wurden die Proteine der äußeren Membran isoliert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 3.15).

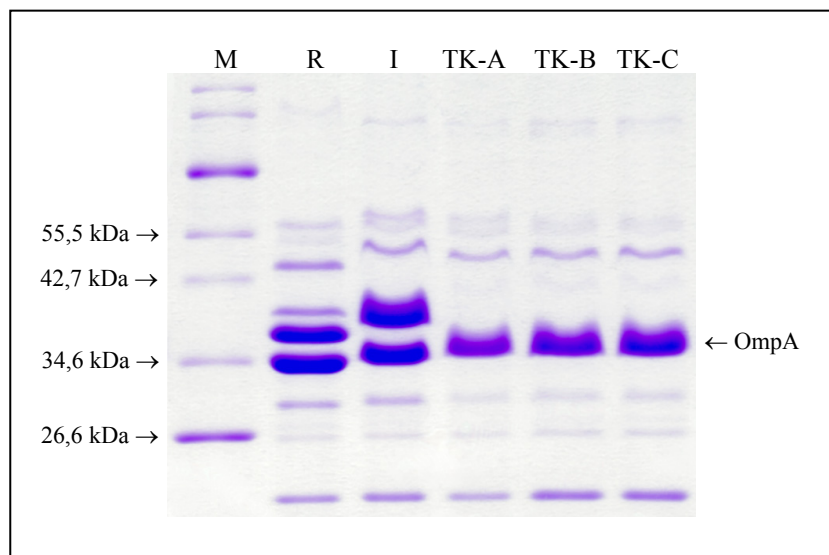


Abb. 3.15: SDS-PAGE der Porinpräparationen von drei ausgewählten Transkonjuganten im Vergleich mit Klon I.

M: Proteinmarker, R: Referenzstamm PEG-8, I: Klon I, TK-A: Transkonjugant TK-A, TK-B: Transkonjugant TK-B, TK-C: Transkonjugant TK -C.

Bei den drei untersuchten Transkonjuganten ist auf dem Gel der Verlust des zweiten Porins OmpK36 erkennbar, welches in Klon I noch exprimiert wird. Eine erworbene AmpC- β -Laktamase kann in diesem Stamm folglich nur nach Verlust des zweiten Porins Carbapenem-Resistenz vermitteln. Die gegenüber der Kontrollkonjugation um 2,5 Zehnerpotenzen niedrigere Konjugationsfrequenz ist somit dadurch zu erklären, dass neben der Aufnahme des

Plasmids mit dem Verlust des funktionsfähigen *ompK36*-Gens ein weiteres genetisches Ereignis im Rezipienten stattfinden muss, um Imipenem-Resistenz zu vermitteln.

Um die molekulare Ursache des Porinverlustes zu klären, wurden die Porin-Gene *ompK35* und *ompK36* von 14 Transkonjuganten mittels PCR amplifiziert. Während in der *ompK35*-PCR (Abbildung 3.16) keine Veränderungen gegenüber dem Ausgangsstamm erkennbar waren, zeigten sich in der *ompK36*-PCR (Abbildung 3.17) deutliche Unterschiede. Nur bei sechs Stämmen entsprach das PCR-Fragment der erwarteten Größe von 1236 bp, während bei zwei Stämmen ein ca. 2 kb großes Amplikon entstand. Bei den übrigen acht Transkonjuganten konnte auch nach wiederholten Versuchen kein Fragment amplifiziert werden. Der Porinverlust wird folglich in den verschiedenen Stämmen durch verschiedene genetische Ereignisse verursacht. Während ein Fragment in der erwarteten Größe auf Punktmutationen schließen lässt, entsteht ein deutlich größeres Fragment durch Insertionen großer DNA-Bereiche. Das Fehlen eines Amplikons kann durch die Deletion des gesamten Gens, durch Insertionen sehr großer DNA-Bereiche oder durch Mutationen in den Primerbindestellen erklärt werden.

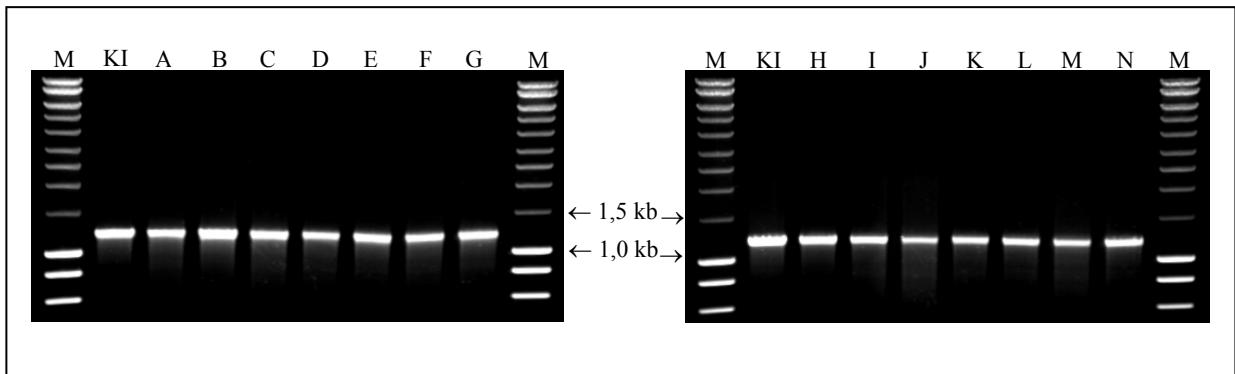


Abb. 3.16: *ompK35*-PCR von 14 Transkonjuganten im Vergleich zu Klon I. M: Marker, KI: Klon I, A-N: Transkonjuganten TK-A - TK-N.

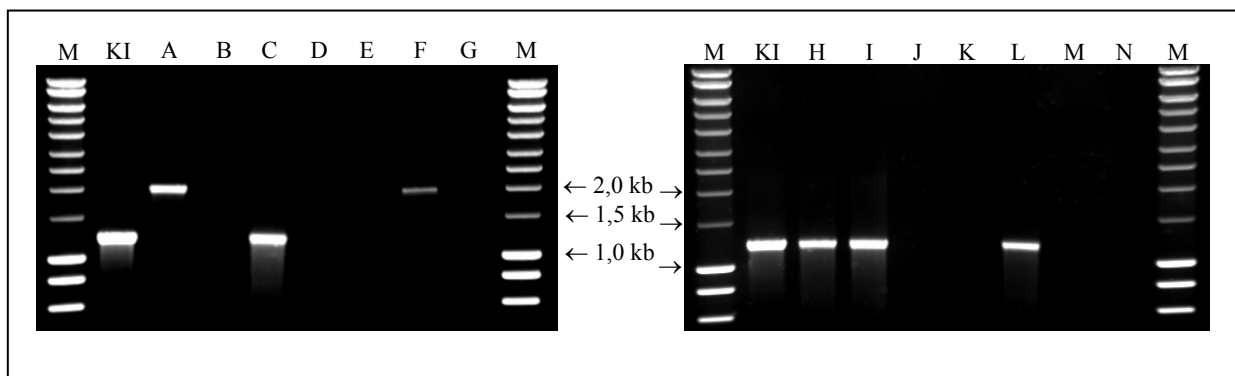


Abb. 3.17: *ompK36*-PCR von 14 Transkonjuganten im Vergleich zu Klon I. M: Marker, KI: Klon I, A-N: Transkonjuganten TK-A - TK-N.

Exemplarisch wurden die Porin-Gene der Transkonjuganten TK-A, TK-B und TK-C sequenziert (Tabelle 3.21). Wie erwartet entsprach die *ompK35*-Sequenz aller drei Isolate dem Ausgangsstamm (Klon I), in dem bereits eine Frameshift-Mutation vorliegt (vgl. 3.4.2.1).

Das *ompK36*-Gen des Transkonjuganten TK-A ist 64 bp nach dem Startcodon durch die Insertions-Sequenz IS1 unterbrochen. Die Insertion dieses 775 bp großen Elementes verhindert eine funktionelle Expression von OmpK36. In Stamm TK-B konnte kein *ompK36*-Fragment amplifiziert werden. Im *ompK36*-Gen von Stamm TK-C wurde 365 bp nach dem Startcodon eine 1-bp-Deletion in Codon 122 detektiert, welche die Bildung eines Stop-Signals in Codon 123 bewirkt. Dadurch kann nur ein 122 Aminosäuren langes, nicht-funktionales Protein mit einem Molekulargewicht von 13,37 kDa translatiert werden.

Tab. 3.21: Ergebnisse von SDS-PAGE und Sequenzierung der Porine der AmpC-Transkonjuganten

Transkonjugant	Porin	Ergebnis der SDS-PAGE	Ergebnis der Sequenzierung
TK-A	OmpK35	<i>keine Expression</i>	Frameshift Codon 10, Stop Codon 27
	OmpK36	<i>keine Expression</i>	Insertion von IS1
TK-B	OmpK35	<i>keine Expression</i>	Frameshift Codon 10, Stop Codon 27
	OmpK36	<i>keine Expression</i>	?*
TK-C	OmpK35	<i>keine Expression</i>	Frameshift Codon 10, Stop Codon 27
	OmpK36	<i>keine Expression</i>	Frameshift Codon 122, Stop Codon 123

AS: Aminosäuren. *Aufgrund des fehlenden PCR-Fragmentes nicht sequenzierbar.

3.5.3.4 Generationszeit

Da die AmpC-Transkonjuganten nicht nur ein weiteres Resistenzplasmid aufgenommen, sondern auch das zweite Porin verloren haben, ist ein Fitnessverlust gegenüber dem Ausgangsstamm (Klon I) zu erwarten. Dies sollte exemplarisch anhand der Generationszeiten von Klon I und Stamm TK-A überprüft werden. Die Wachstumskurven beider Stämme (Abbildung 3.18) wurden an gleichen Tagen unter gleichen Bedingungen ermittelt. Die berechneten Generationszeiten betragen 20,90 min für Klon I sowie 25,51 min für TK-A, was auf einen Wachstumsnachteil des Transkonjuganten schließen lässt. Dieser ist jedoch geringer als der Wachstumsnachteil von Klon II-B gegenüber II-A (vgl. 3.4.6).

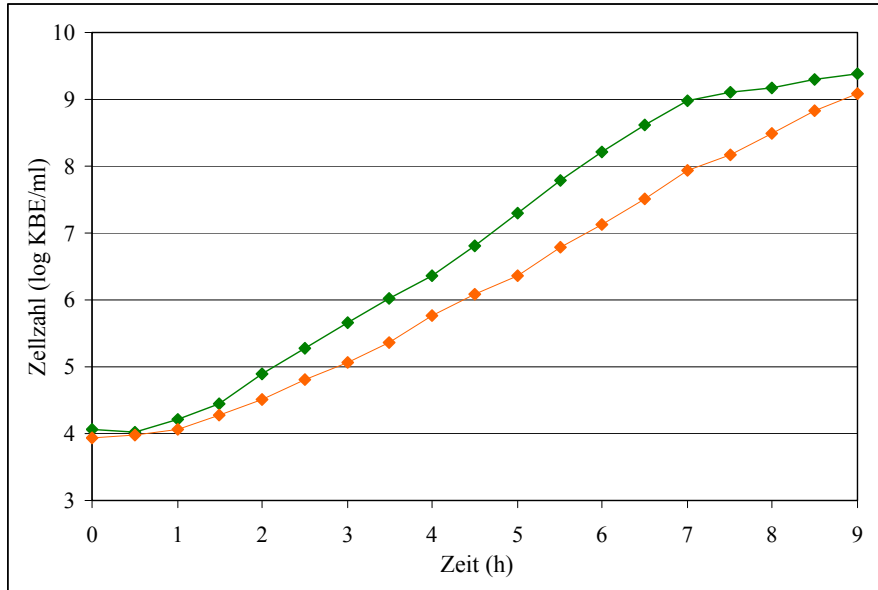


Abb. 3.18: Vergleich der Wachstumskurven.

◆ Klon I, ◆ Transkonjugant TK-A

4 Diskussion

Die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung nosokomialer Ausbrüche lieferte Einblicke in die Mechanismen, durch welche *K. pneumoniae* zu einem Erreger schwer therapierbarer oder sogar nicht mehr beherrschbarer nosokomialer Infektionen werden kann.

In einem Zeitraum von 28 Monaten wurden nosokomiale Ausbrüche multiresistenter *K.-pneumoniae*-Stämme auf drei benachbarten Intensivstationen einer Universitätsklinik dokumentiert. Ausgangspunkt für diese Studie war das gehäufte Auftreten von *K.-pneumoniae*-Isolaten eines einheitlichen Resistenzphänotyps, was einen klonalen Ausbruch vermuten ließ. Die retrospektive Auswertung der nach §23 IfSchG dokumentierten mikrobiologischen Befunde zeigte das Auftreten zweier aufeinanderfolgender Ausbrüche, wobei aufgrund der identischen Antibiogramme zunächst die wiederholte Verbreitung eines einzelnen Ausbruchstammes angenommen wurde. Durch molekulare Typisierung stichprobenartig gesammelter Isolate konnte jedoch gezeigt werden, dass die beiden Ausbrüche von zwei verschiedenen multiresistenten *K.-pneumoniae*-Stämmen verursacht wurden. Während der erste Ausbruchstamm (Klon I) ein einheitliches Resistenzmuster aufwies, konnten bei dem zweiten Ausbruchstamm (Klon II) mittels MHK-Bestimmung vier verschiedene Resistenzphänotypen festgestellt werden.

4.1 Multiresistenz: Zusammenwirken von Resistenzmechanismen

Bei den Ausbruchstämmen wurde ein Zusammenspiel von spezifischen, gegen eine bestimmte Antibiotika-Klasse gerichteten Resistenzmechanismen sowie unspezifischen, gegen mehrere strukturell unverwandte Antibiotika-Gruppen wirkenden Resistenzmechanismen nachgewiesen. Klon I ist gegenüber nahezu allen herkömmlicherweise zur Therapie von *K.-pneumoniae*-Infektionen eingesetzten Antibiotika mit Ausnahme der Carbapeneme resistent, wobei gegenüber Amikacin und dem Reserveantibiotikum Colistin eine intermediäre Resistenz besteht. Bei diesem Stamm konnten zwölf, bei Klon II sechs verschiedene plasmid-kodierte Resistenzgene sowie mehrere chromosomale Mutationen nachgewiesen werden (Tabelle 4.1). Der überwiegende Teil der Isolate von Klon II (Variante II-A) ist sowohl gegenüber Amikacin als auch gegenüber Carbapenemen empfindlich. Im Verlauf des zweiten Ausbruchs ist es jedoch bei diesem Stamm durch chromosomale Mutationen zum Erwerb von Resistenz gegenüber allen Carbapenemen (Variante II-B) bzw. selektiv gegenüber Ertapenem (Variante II-B2) gekommen. Zwei Isolate (Variante II-C) zeigen ein deutlich vermindertes

Resistenzspektrum, da ihnen sämtliche erworbenen, vermutlich auf einem 180 kb großen Plasmid liegenden Resistenzgene fehlen und sie somit nur den durch chromosomale Mutationen verursachten Resistenzphänotyp aufweisen.

Tab. 4.1: Resistenzmechanismen der Ausbruchsstämme.

Stamm	Ausbruch 1		Ausbruch 2				
	Klon I	TK-A	Klon II-A	Klon II-B	Klon II-B2	Klon II-C	
Eigen-schaften	Carbapenem-S Amikacin-I	Carbapenem-R Amikacin-I (AmpC-Transkonjugant von Klon I)	Carbapenem-S Amikacin-S	Carbapenem-R Amikacin-S	Ertapenem-R Imi/Mero-S Amikacin-S	Carbapenem-S Amikacin-S Plasmidverlust	
Expression der Porine	OmpK35 – OmpK36 +	OmpK35 – OmpK36 –	OmpK35 – OmpK36 +	OmpK35 – OmpK36 +	OmpK35 – OmpK36 + (Pore enger?)	OmpK35 – OmpK36 –	
weitere Resistenzmechanismen	chromosomal	SHV-11 2 Mutationen <i>gyrA</i> , 1 Mutation <i>parC</i> aktiver Efflux	wie Klon I	SHV-1 2 Mutationen <i>gyrA</i> , 1 Mutation <i>parC</i> aktiver Efflux	wie Klon II-A	wie Klon II-A	wie Klon II-A
	plasmidkodiert	SHV-12 TEM-1a, TEM-1b <i>aac(6')-Ib</i> , <i>strA</i> , <i>aac(3)-IIc</i> , <i>strB</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>ant(3'')-Ia</i> , <i>sullI</i> , <i>dfrV</i> , <i>catI</i>	wie Klon I + CMY-2 <i>ant(3'')-Ib</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sullI</i> , <i>dfr12</i> , <i>flo</i>	CTX-M-2 TEM-1b <i>aac(3)-IIc</i> , <i>ant(3'')-Ia</i> <i>sullI</i> , <i>catI</i>	wie Klon II-A	wie Klon II-A	keine

Die β -Laktame stellen nach wie vor die wichtigste Antibiotika-Klasse zur Bekämpfung von Infektionen durch gramnegative Erreger dar. Die β -Laktam-Resistenz der untersuchten Stämme wird durch das Zusammenwirken verschiedener erworbener und chromosomal kodierter β -Laktamasen mit dem Verlust von Porinen der äußeren Membran hervorgerufen. Beide Ausbruchsstämme exprimieren eine ESBL, wobei die jeweiligen Enzyme jedoch verschiedenen ESBL-Typen zuzuordnen sind.

Das SHV-12-Enzym von Klon I wurde erstmals 1997 in der Schweiz beschrieben und besitzt die Aminosäure-Substitutionen L35Q, G238S und E240K (NÜESCH-INDERBINEN et al., 1997). Die ESBL-typische Mutation G238S erweitert das aktive Zentrum und ermöglicht dadurch die Hydrolyse von Oxyiminocephalosporinen, führt jedoch gleichzeitig zu einer größeren Entfernung zwischen β -Laktam-Ring und katalytischem Serinrest, was die Effizienz des Enzyms herabsetzt (HERITAGE et al., 1999). Die zusätzliche Substitution E240K bewirkt eine verbesserte Hydrolyse von Ceftazidim und Aztreonam (KIM et al., 1998). Die auch bei SHV-11 vorhandene Mutation L35Q liegt dagegen weit entfernt vom aktiven Zentrum und verleiht allein keinen ESBL-Phänotyp (HOWARD et al., 2002), auch wenn im Vergleich mit SHV-1 eine

leicht erhöhte Hydrolyserate von Drittgenerations-Cephalosporinen gemessen wurde (AHAMED et al., 1999). SHV-12- β -Laktamasen wurden am häufigsten in Italien und Korea gefunden, kommen jedoch inzwischen weltweit vor. LAKSAI et al. (2000) beschrieben ein *bla*_{SHV-12}-Gen auf einem kleinen, nicht konjugierbaren, aber mobilisierbaren Plasmid, das keine weiteren Resistenzdeterminanten trug. Möglicherweise liegt bei Klon I ein ähnliches Plasmid vor, da *bla*_{SHV-12} zwar unabhängig von den anderen Resistenzgenen, jedoch nur in Kombination mit weiteren konjugierbaren Plasmiden auf einen Rezipienten übertragen werden konnte.

Die SHV-11- β -Laktamase ist bei Klon I chromosomal kodiert und hat sich wahrscheinlich durch Mutation der Position L35 aus der Spezies-spezifischen chromosomalen SHV-1 entwickelt. Wie LEE et al. (2006) kürzlich berichteten, scheint die Kombination einer chromosomalen SHV-11 mit der plasmidkodierten SHV-12 bei *K. pneumoniae* häufig vorzukommen.

Die Cefoxitin-MHK von 128 $\mu\text{g/ml}$ des Klons I kann nicht allein durch die vorhandenen β -Laktamasen erreicht werden, die keine Cephامycin-Resistenz vermitteln. Dies wurde durch Konjugation bestätigt, da die Transkonjuganten mit *bla*_{SHV-12} und *bla*_{TEM-1} Cefoxitin-empfindlich blieben. Der Grund für die hohe Cefoxitin-Resistenz des Klons I dürfte vielmehr das Zusammenwirken der β -Laktamasen mit dem Verlust von OmpK35 sein (MARTINEZ-MARTINEZ et al., 1996). Durch den Porinverlust kommt es zu einem verringerten Einstrom von Cefoxitin in den periplasmatischen Raum, wo die Konzentration des Antibiotikums so weit herabgesetzt ist, dass durch die Aktivität der vorhandenen β -Laktamasen klinische Cefoxitin-Resistenz erreicht werden kann.

Klon II exprimiert eine plasmidkodierte CTX-M-2- β -Laktamase. ESBLs vom CTX-M-Typ, die erstmals 1990 beschrieben wurden (BAUERNFEIND et al.) und vermutlich von chromosomalen Enzymen der Spezies *Kluyvera* abstammen, haben durch ihre weite Verbreitung in den letzten zehn Jahren zunehmende klinische Relevanz erlangt (BONNET, 2004). Wie die meisten CTX-M-Enzyme hydrolysiert auch CTX-M-2 Cefotaxim schlechter als Cefotaxim und vermittelt bei *K. pneumoniae* keine klinische Cefotaxim-Resistenz (OHKAWA et al., 2002). Dies wurde durch Konjugationen bestätigt: Die Transkonjuganten von Klon I mit *bla*_{CTX-M-2} und *bla*_{TEM-1b} zeigten zwar Cefotaxim-MHK-Werte von $>32 \mu\text{g/ml}$, ihre Cefotaxim-MHK-Werte lagen jedoch mit 1-2 $\mu\text{g/ml}$ unterhalb des Grenzwertes für klinische Resistenz. Dennoch weisen die Klone II-A, II-B und II-B2 Cefotaxim-MHK-Werte von 32 bzw. $>32 \mu\text{g/ml}$ auf. Auch in diesen Stämmen dürfte somit der Porinverlust entscheidend zur β -Laktam-Resistenz beitragen und zu deutlich höherer Cefotaxim-Resistenz führen, als sie das CTX-M-Enzym allein vermitteln könnte.

Besonders deutlich wird der synergistische Effekt von Porinverlust und β -Laktamasen bei Klon II-B, der weder OmpK35 noch OmpK36 exprimiert. Dieser Stamm ist im Gegensatz zu den Stämmen II-A und II-B2, die OmpK36 noch exprimieren, auch gegen die Kombination von Drittgenerations-Cephalosporinen mit Clavulansäure resistent. Demnach scheint die erhöhte Impermeabilität der äußeren Membran von Klon II-B einen ausreichenden Einstrom des β -Laktamase-Inhibitors zu verhindern. Die ESBL-typische Hemmbarkeit durch Clavulansäure um mindestens drei MHK-Stufen konnte auch bei Klon II-B beobachtet werden, jedoch auf einem deutlich höheren Level (Reduktion der Cefotaxim-MHK von 4096 $\mu\text{g/ml}$ auf 128 $\mu\text{g/ml}$ in Anwesenheit von 4 $\mu\text{g/ml}$ Clavulansäure).

Klon II-B unterscheidet sich von Klon II-A nicht nur durch die Resistenz gegenüber β -Laktamase-Inhibitoren, sondern auch durch klinische Resistenz gegenüber allen getesteten Carbapenemen. Der Verlust beider Porine kann bei *K. pneumoniae* wie bereits beschrieben im Zusammenspiel mit der Expression einer AmpC- β -Laktamase zu Carbapenem-Resistenz führen (JACOBY et al., 2004). Mittels SDS-PAGE, isoelektrischer Fokussierung und PCR-Screening konnte jedoch bei Klon II-B weder ein AmpC-Enzym noch eine andere im Vergleich mit Klon II-A zusätzlich erworbene β -Laktamase detektiert werden. Auch eine starke Überexpression der vorhandenen β -Laktamasen sowie eine konjugative Übertragbarkeit der Carbapenem-Resistenz wurden ausgeschlossen. Demnach scheint die Carbapenem-Resistenz von Klon II-B allein durch den Verlust des zweiten Porins im Zusammenspiel mit der CTX-M-2- β -Laktamase verursacht zu werden.

Carbapenem-Resistenz bei CTX-M-produzierenden *K.-pneumoniae*-Isolaten wurde bereits in anderen Fällen beschrieben (WARD et al., 2005; MENA et al., 2006). Auch dort entwickelte ein anfangs Carbapenem-empfindlicher Ausbruchsstamm unter der Therapie mit Imipenem oder Meropenem durch Verlust des zweiten Porins Resistenz gegenüber diesen Substanzen. Da Carbapeneme die wichtigste Therapieoption gegen schwere Infektionen mit *K. pneumoniae* darstellen, ist diese Entwicklung von großer Bedeutung. Während von klassischen Carbapenemasen aufgrund ihres seltenen Vorkommens in Deutschland zurzeit noch wenig Gefahr droht, nimmt die Häufigkeit von AmpC- und CTX-M- β -Laktamasen stetig zu. CTX-M-Enzyme werden zudem vermehrt auch bei ambulanten Patienten ohne vorangegangene Hospitalisierung gefunden (VALVERDE et al., 2004). Hinzu kommt, dass ESBL-produzierende *K.-pneumoniae*-Isolate meist nur OmpK36 exprimieren und somit lediglich eine chromosomale Punktmutation benötigen, um auch dieses zweite Porin zu verlieren. Daher verleiht die zunehmende Verbreitung von CTX-M- β -Laktamasen klinischen *K.-pneumoniae*-Stämmen ein besorgniserregendes Potential zur Entwicklung von Carbapenem-Resistenz.

Da die Porine der äußeren Membran gramnegativer Bakterien in erster Linie dem Durchtritt von Wasser, Ionen und kleinen hydrophilen Molekülen und somit dem Stoffaustausch mit der Umgebung dienen, ist zu erwarten, dass sich ihr Verlust verlangsamernd auf den Zellstoffwechsel auswirkt und dadurch einen Fitnessverlust für die Zelle bedeutet. Der Vergleich der Wachstumsraten von Klon II-A und Klon II-B bestätigte diese Vermutung anhand einer deutlich erhöhten Generationszeit von Klon II-B gegenüber Klon II-A (32,02 Minuten versus 19,55 Minuten). Da ein verringerter Antibiotika-Influx demnach mit einer verminderten Fitness bezahlt werden muss, dürfte der Verlust des zweiten Porins nur unter der Carbapenem-Therapie einen Selektionsvorteil bieten. Nach Beendigung der Therapie wird der resistente Subklon II-B möglicherweise von der empfindlichen, aber schneller wachsenden Variante II-A verdrängt. Andererseits könnte der Verlust von OmpK36 *in vivo* einen weiteren Vorteil für die Kolonisation des Patienten bedeuten, da OmpK36 den Hauptaktivator des Komplementsystems der unspezifischen Immunantwort darstellt (ALBERTI et al., 1993).

Die Fragestellung, mit welcher Frequenz das zweite Porin von Klon II-A durch Mutation verloren geht, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Möglicherweise liegt die Mutationsfrequenz unter der Nachweisgrenze der durchgeführten Versuche (3×10^{-11}). Dies stimmt mit Ergebnissen von PRAGAI & NAGY (1998) überein, die den Verlust des zweiten Porins mit einer Frequenz von 4×10^{-12} beobachten konnten. Da die Mutationsfrequenz von Klon II-B auf Rifampicin jedoch um zwei Zehnerpotenzen niedriger lag als bei den übrigen Klonen, handelt es sich sehr wahrscheinlich um einen Mutatorstamm, für den auch eine höhere Frequenz des Porinverlustes anzunehmen ist.

Der Verlust des Porins OmpK35 konnte bei beiden Ausbruchsstämmen auf eine Punktmutation im *ompK35*-Gen zurückgeführt werden. Der auch hier festzustellende bevorzugte Verlust von OmpK35 gegenüber OmpK36 wurde bereits von HERNANDEZ-ALLES et al. (1999b) beschrieben und auf die unterschiedlichen Selektivitäten der beiden Poren zurückgeführt. Da OmpK36 eine höhere Kationenselektivität und einen langsameren Solutedurchfluss aufweist (DUTZLER et al., 1999), vermittelt die alleinige Expression von OmpK36 ein höheres Resistenzniveau als OmpK35. DOMENECH-SANCHEZ et al. (2003) ermittelten durch Expression von OmpK35 in einem Porin-insuffizienten *K.-pneumoniae*-Stamm eine 4-fach (Cefepim), 8-fach (Cefotaxim) oder 128-fach (Ceftazidim) stärkere Reduktion der MHK-Werte als durch die Expression von OmpK36.

Die molekulare Ursache für den Verlust von OmpK36 in Klon II-B dürfte in der Deletion von 16 Aminosäuren im N-terminalen Bereich des Proteins und der daraus resultierenden Fehlfaltung des Porins liegen. Am Strukturmodell von OmpK36 (DUTZLER et al., 1999) lässt sich erkennen, dass diese Deletion den größten Teil der β -Faltblätter 14 und 15 sowie den periplasmatischen Loop 8 betrifft (Abbildung 4.1), so dass von einer inkorrekten Faltung des Porins ausgegangen werden kann.

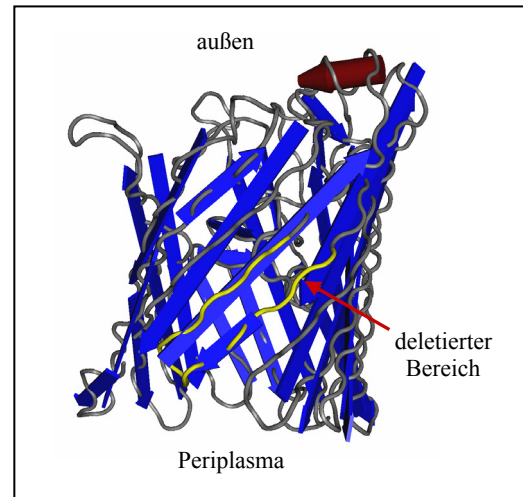


Abb. 4.1: Deletion von 16 Aminosäuren im Porin OmpK36 bei Klon II-B. Gelb: Deletierter Bereich der β -Faltblätter 14 und 15

Klon II-B2 exprimiert zwar wie Klon II-A das Porin OmpK36, ist jedoch im Gegensatz zu Stamm II-A Ertapenem-resistent, während er gegenüber Meropenem und Imipenem empfindlich bleibt. Der Erwerb einer zusätzlichen β -Laktamase wurde als Grund für die Ertapenem-Resistenz ebenso ausgeschlossen wie eine Überexpression der vorhandenen β -Laktamasen oder eine Beteiligung von Effluxsystemen, die bei *Enterobacter* zu Ertapenem-Resistenz führen kann (SZABO et al., 2006).

Das 2002 zugelassene Ertapenem unterscheidet sich von Imipenem und Meropenem durch mangelnde Aktivität gegenüber gramnegativen Nonfermentern wie *P. aeruginosa* und wird zur Therapie schwerer ambulanter und früher nosokomialer Pneumonien sowie intraabdominaler Infektionen eingesetzt (VOGEL et al., 2004). Generell wird dieser Substanz ein geringes Potential zur Selektion gramnegativer Problemerreger wie ESBL-Produzenten zugesprochen (SCHMITZ, 2006). Ähnliche Ertapenem-Resistenzphänotypen wie bei Klon II-B2 wurden jedoch kürzlich von WOODFORD et al. (2007) bei einem Kollektiv von 95 *Klebsiella*-Isolaten aus England beschrieben. Diese Stämme zeigten Ertapenem-MHK-Werte von 4 $\mu\text{g/ml}$ bis $>16 \mu\text{g/ml}$, exprimierten bis auf eine Ausnahme keine klassische Carbapenemase und waren empfindlich gegenüber Meropenem und Imipenem. Die Autoren führen die Ertapenem-Resistenz auf eine reduzierte Permeabilität der äußeren Membran in Verbindung mit der Expression von CTX-M- β -Laktamasen zurück.

Die Porin-Expressionsmuster von Klon II-B2 und Klon II-A sind allerdings identisch, so dass sich die Ertapenem-Resistenz von Stamm II-B2 nicht allein durch den Verlust von OmpK35 im Zusammenspiel mit der CTX-M-2 erklären lässt. CROWLEY et al. (2002) wiesen einen

reduzierten Expressionslevel von OmpK36 als Grund für Carbapenem-Resistenz nach. Dies wäre jedoch bei Klon II-B2 anhand einer schwächeren Porinbande im Gel erkennbar und würde zudem Resistenz gegenüber allen Carbapenemen vermitteln. ELLIOTT et al. (2006) zeigten bei einem CTX-M-1-exprimierenden *K.-pneumoniae*-Isolat den Erwerb von Ertapenem-Resistenz unter der Therapie, welcher sich auf einen Verlust beider Porine zurückführen ließ. OmpK36 wird bei Klon II-B2 zwar exprimiert, weist aber im Vergleich mit Klon II-A eine Insertion von zwei Aminosäuren (Threonin 116, Aspartat 117) in Loop 3 auf, der innerhalb der Pore liegt und durch die sogenannte Einschnürung ihren Durchmesser bestimmt (Abbildung 4.2). LOU et al. (1996) konnten anhand von mutierten OmpF-Porinen bei *E. coli* zeigen, dass Mutationen im konservierten Loop 3 zu einer Veränderung des Porendurchmessers führen, während die äußere tonnenförmige Porenstruktur auch von größeren Deletionen in Loop 3 unbeeinflusst bleibt. Auf Höhe der Einschnürung des Porins interagieren zwei negativ geladene Aminosäurereste von Loop 3 mit einem Cluster aus drei positiv geladenen Resten an der Porenwand. Sie bilden ein starkes elektrostatisches Feld, welches die Leitfähigkeit der Pore bestimmt (LOU et al., 1996). Bei Klon II-B2 kommt es durch die Insertion von zwei Aminosäuren möglicherweise zu einer veränderten Konformation von Loop 3, welche die Pore stärker einengt. Die von Aspartat 117 eingebrachte zusätzliche negative Ladung dürfte außerdem zu einer Verstärkung des lokalen elektrischen Feldes führen.

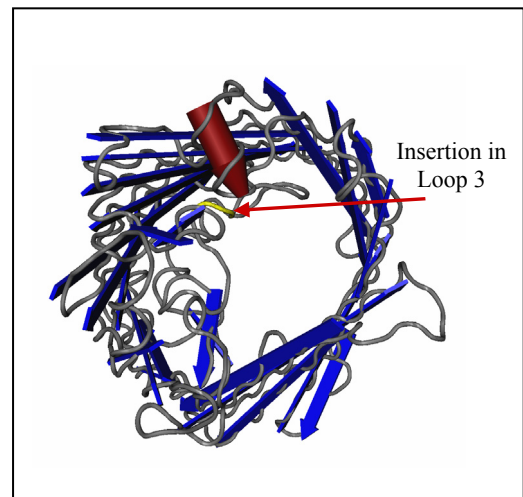


Abb. 4.2: Insertion von zwei Aminosäuren im Porin OmpK36 bei Klon II-B2.

Gelb: Insertion T116 und D117 in Loop 3

Ertapenem unterscheidet sich von Imipenem und Meropenem durch einen zusätzlichen großen Substituenten in Form einer Carboxyl-substituierten Benzoesäure (Abbildung 4.3). Der aromatische Ring erhöht das Molekulargewicht auf 497,5 Da (Imipenem: 317,4 Da, Meropenem 437,5 Da) und verstärkt den lipophilen Charakter des Moleküls, während die Carboxylgruppe zu einer negativen Nettoladung des Moleküls führt. Diese Substitutionen wurden eingefügt, um die Plasmaproteinbindung zu erhöhen, so dass durch eine verlängerte Halbwertszeit der Substanz eine Einmal-tägliche-Dosierung ermöglicht wird. Die Substitutionen sind vermutlich auch für die Unempfindlichkeit von *P. aeruginosa* gegenüber Ertapenem verantwortlich, das im Gegensatz zu anderen Carbapenemen nicht durch das kationische Substanzen

bevorzugende Porin OprD diffundieren kann (HAMMOND, 2004). Bei Klon II-B2 dürfte die selektive Ertapenem-Resistenz eine ähnliche Ursache haben. Das durch Mutation verengte und stärker negativ geladene OmpK36-Porin kann von Meropenem und Imipenem noch passiert werden, der Durchtritt des negativ geladenen und größeren Ertapenem-Moleküls wird jedoch verhindert.

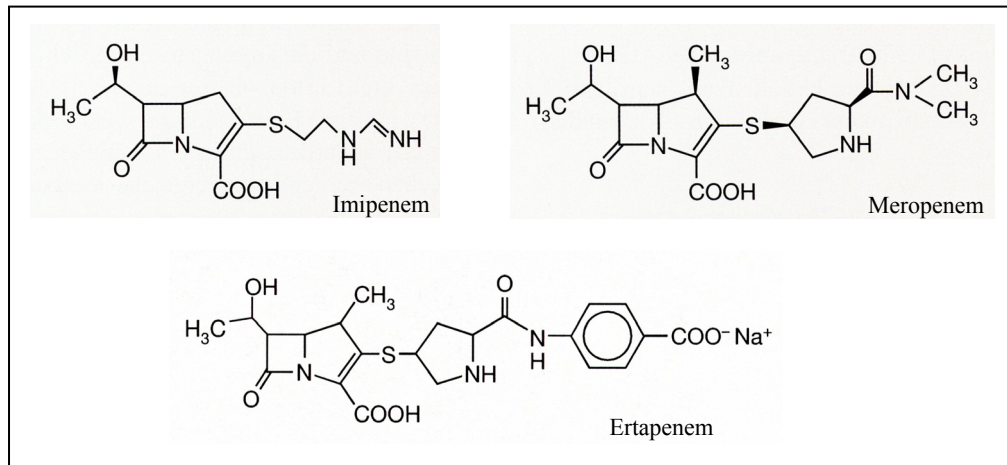


Abb. 4.3: Strukturformeln der Carbapeneme Imipenem, Meropenem und Ertapenem

Das OmpK36-Porin von Klon I besitzt ebenfalls eine der beiden beschriebenen Aminosäure-Insertionen (Aspartat 117). Auch dieser Stamm zeigt eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Ertapenem, erreicht jedoch keine klinische Resistenz, sondern ist als intermediär einzustufen. Die durch den Aspartat-Rest eingebrachte zusätzliche negative Ladung ist demnach nicht allein für die herabgesetzte Permeabilität der Pore verantwortlich, sondern wird durch den Threoninrest, möglicherweise über eine Strukturveränderung, unterstützt.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass für die Ausprägung von Ertapenem-Resistenz bei ESBL-produzierenden *K.-pneumoniae*-Stämmen kein vollständiger, mit den möglichen Wachstumsnachteilen verbundener Verlust des zweiten Porins nötig ist, sondern lediglich eine mutative Einengung des Porendurchmessers. Auch wenn Ertapenem aufgrund der fehlenden *Pseudomonas*-Wirksamkeit nicht zur Initialtherapie schwerer nosokomialer Infektionen eingesetzt wird, so entfällt mit der Resistenzentwicklung bei *K. pneumoniae* doch eine weitere Therapieoption, die gezielt gegen Infektionen mit diesem Erreger eingesetzt werden könnte.

Aminoglykoside, insbesondere Amikacin, stellen eine weitere therapeutische Option bei Infektionen mit multiresistenten Klebsiellen dar. Die Resistenz der Ausbruchsstämme gegenüber diesen Antibiotika wird durch die Expression verschiedener Aminoglykosid-modifizierender Enzyme (AME) vermittelt.

Die beiden in Klon II detektierten AME inaktivieren lediglich Gentamicin, Tobramycin, Netilmycin und Streptomycin, so dass dieser Stamm gegenüber Amikacin, Kanamycin und Neomycin empfindlich bleibt. In Klon I wurden insgesamt sechs AME gefunden, welche Resistenz gegenüber allen getesteten Aminoglykosiden vermitteln. Da die Amikacin-MHK trotz des Vorhandenseins des Amikacin-Resistenz vermittelnden Enzyms AAC(6')-Ib im intermediären Bereich bleibt, ist ein geringes Expressionslevel des *aac(6')-Ib*-Gens zu vermuten. Bemerkenswert ist, dass mehrere der bei Klon I detektierten AME das gleiche Resistenzspektrum abdecken. Beispielsweise vermitteln *strA*, *strB* und *ant(3'')-Ia* jeweils Resistenz gegenüber Streptomycin. Die Expression vieler Resistenzgene kostet eine Zelle Ressourcen und Energie, was einen Wachstumsnachteil bedeuten kann. Dies scheint jedoch bei Klon I nicht der Fall zu sein, da seine Generationszeit mit 20,9 Minuten im Rahmen der für *Enterobacteriaceae* bekannten Werte liegt. Somit besteht für diesen Stamm keine Notwendigkeit, redundante Resistenzgene aus der Zelle zu entfernen, um einen Fitnessverlust auszugleichen.

Anhand der nahezu identischen Aminoglykosid-MHK-Werte von Klon II-A und II-B sowie des Effluxpumpen-Inhibitionstests wird ersichtlich, dass weder der Porinverlust noch die Effluxpumpen-Überexpression die Aminoglykosid-Resistenz beeinflussen. Dies entspricht den Erwartungen, da Aminoglykoside Porin-unabhängig durch die äußere Membran diffundieren und keine Substrate für die Effluxpumpe AcrAB darstellen.

Fluorchinolone werden häufig in Kombination mit weiteren Antibiotika zur Initialtherapie nosokomialer Infektionen eingesetzt. Beide Ausbruchsstämme weisen eine hohe Chinolon-Resistenz auf, die ausschließlich durch chromosomale Mutationen vermittelt wird. Den größten Anteil haben spezifische Mechanismen in Form der Targetmutationen in *gyrA* und *parC*, jedoch tragen auch unspezifische Effluxpumpen in einer Größenordnung von mehreren MHK-Stufen zur Chinolon-Resistenz bei. Bei Klon I ist deren Anteil an der auch insgesamt höheren Resistenz deutlich größer als bei Klon II, so dass man bei diesem Stamm eine höhere Überexpression der intrinsischen Effluxsysteme vermuten kann. Während bei Klon II eine Mutation des lokalen Repressors AcrR detektiert wurde, ist dies als Ursache der Überexpression von AcrAB in Klon I auszuschließen. Da die Expression von AcrAB jedoch durch diverse globale Regulatoren beeinflusst wird, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurden, ist anzunehmen, dass die phänotypisch nachgewiesene Effluxpumpen-Überexpression in Klon I durch andere Regulationsmechanismen hervorgerufen wird.

Ein von DOMENECH-SANCHEZ et al. (2003) beschriebener Einfluss des Porinverlustes auf das Resistenzniveau gegenüber Fluorchinolonen konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da keine Unterschiede in den Chinolon-MHK-Werten zwischen Klon II-A und II-B auftraten.

Die Tetracyclin-Resistenz beruht bei beiden Klonen ausschließlich auf unspezifischem Efflux, während keine spezifischen *tet*-Resistenz-Gene detektiert werden konnten. Dies erklärt das relativ niedrige Resistenzniveau der Isolate. Die AmpC-Transkonjuganten von Klon I zeigen, dass beispielsweise der Erwerb des weit verbreiteten plasmidkodierten *tet(A)*-Gens die Doxycyclin-MHK deutlich erhöht. Da Tetracycline jedoch auf den drei Intensivstationen kaum eingesetzt wurden, ist anzunehmen, dass aufgrund des nicht vorhandenen Selektionsdruckes kein Erwerb von *tet*-Genen erfolgte.

Antifolat-Resistenz wird bei den Ausbruchsstämmen sowohl durch unspezifischen Efflux als auch durch *sul*- und *dhfr*-Gene vermittelt. Aufgrund der hohen Cotrimoxazol-MHK ist auch bei Klon II das Vorhandensein eines *dhfr*-Gens zusätzlich zu *sulI* zu erwarten. Es liegt möglicherweise auf dem vermuteten Klasse-1-Integron, das durch Mapping nicht weiter charakterisiert werden konnte.

Da Chloramphenicol aufgrund der schweren Nebenwirkungen auch als Reserveantibiotikum kaum noch eingesetzt wird, dürfte kein Selektionsdruck zum Erhalt von Chloramphenicol-Resistenzgenen in nosokomialen Stämmen vorhanden sein. Dennoch besitzen beide Ausbruchsstämme das *catI*-Gen. Grund für die nach wie vor ubiquitäre Verbreitung von Chloramphenicol-Resistenzgenen scheint ihre Ko-Lokalisation mit anderen Resistenzdeterminanten auf mobilen Elementen zu sein, was zur Verbreitung und Koselektion dieser Gene führt (SCHWARZ et al., 2004). Auch bei den hier untersuchten Stämmen wird *catI* mit anderen Resistenzmechanismen kotransferiert und liegt beispielsweise bei Klon I zusammen mit mindestens fünf weiteren Resistenzgenen auf einem Multiresistenzplasmid.

Da die Chloramphenicol-MHK in Gegenwart des Effluxpumpen-Inhibitors bei Klon I und II um vier bzw. acht Stufen gesenkt wird, hat zudem die Überexpression chromosomaler Effluxpumpen in diesen Stämmen einen deutlichen Anteil an der Chloramphenicol-Resistenz.

Durch Konjugationsversuche konnten bei Klon I vier Gruppen von Resistenzgenen unterschieden werden, die in verschiedenen Kombinationen mit verschiedenen Frequenzen konjugativ übertragbar waren. Es ist anzunehmen, dass es sich um die vier auf dem Plasmidgel

erkennbaren Plasmide handelt. Bei Klon II treten mindestens zwei verschiedene mobile Elemente auf, da das *bla*_{CTX-M-2}-Gen im Gegensatz zu den restlichen Resistenzgenen nicht auf alle Transkonjuganten übertragen wurde. Auf dem Plasmidgel ist bei Klon II-C, dem alle mobilen Resistenzgene fehlen, jedoch nur der Verlust einer Plasmidbande erkennbar. Möglicherweise ist das zweite Plasmid aufgrund einer niedrigen Kopienzahl nicht sichtbar. Es ist aber auch denkbar, dass *bla*_{CTX-M-2} auf einem konjugativen Transposon liegt, das normalerweise im bakteriellen Chromosom inseriert vorliegt, jedoch ausgeschnitten und mittels Konjugation als zirkuläres Intermediat übertragen werden kann.

Die niedrigeren Konjugationsfrequenzen von Klon II-B wurden vermutlich durch die deutlich verringerte Wachstumsrate des Stammes verursacht, die zu einem ungünstigeren Verhältnis von Donor und Rezipient führte.

Es ist hervorzuheben, dass sämtliche plasmidkodierte Resistenzgene der Ausbruchsstämme mittels Konjugation auf einen *E.-coli*-Rezipienten übertragen werden konnten. Dies verdeutlicht das Potential der Stämme zur horizontalen, auch Speziesgrenzen überschreitenden Übertragung von Resistenzgenen, welches ebenso wie eine klonale Ausbreitung zur Resistenzverbreitung beitragen kann.

4.2 Erwerb von Panresistenz: Eine zukünftige Bedrohung

Die beiden in dieser Arbeit charakterisierten Ausbruchsstämme sind resistent gegenüber den meisten Substanzen, die zur kalkulierten Initialtherapie nosokomialer Pneumonien, Harnwegsinfektionen und Sepsen eingesetzt werden. Beispielsweise wird zur Therapie schwerer nosokomialer Pneumonien ein Cephalosporin der Gruppe 3b/4, eine Kombination von Acylaminopenicillin und β -Laktamase-Inhibitor oder ein Carbapenem, jeweils kombiniert mit einem Fluorchinolon oder Aminoglykosid empfohlen (VOGEL et al., 2004). Bei einer Initialtherapie, die ohne Kenntnis von Erreger und Antibiotogramm eingeleitet werden muss, besteht somit im Fall von Infektionen mit Klon I oder II ein hohes Risiko des Therapieversagens.

Klon I ist zwar empfindlich gegenüber Drittgenerations-Cephalosporinen in Kombination mit β -Laktamase-Inhibitoren, jedoch wird der Einsatz dieser Substanzen gegen ESBL-Produzenten auch bei *in vitro* getesteter Empfindlichkeit aufgrund möglichen Therapieversagens nicht empfohlen (BRADFORD, 2001). Carbapeneme stellen somit die letzte gängige Therapieoption gegen Klon I dar, was zu der Frage führt, ob der Stamm in der Lage ist, auch diese letzte Therapiemöglichkeit durch Erwerb eines weiteren Resistenzmechanismus zu umgehen. Im Gegensatz zu einem CTX-M-Enzym vermag die vorhandene SHV-12 auch bei Verlust des

zweiten Porins keine Carbapenem-Resistenz zu vermitteln (JACOBY et al., 2004). Eine solche chromosomale Mutation wäre demnach nicht ausreichend und macht zusätzlich die Aufnahme einer AmpC- oder CTX-M- β -Laktamase mittels Konjugation erforderlich. Wenn man bedenkt, dass innerhalb der sich ständig verändernden mikrobiellen Flora einer Klinik verschiedene *Enterobacteriaceae*-Stämme mit diversen ESBLs und AmpC-Enzymen auftreten, und dass zudem durch neu eingelieferte Patienten fortwährend neue ESBL-produzierende Stämme eingebracht werden (BEN-AMI et al., 2006), wird deutlich, dass einem in der Klinikflora residierenden *K.-pneumoniae*-Stamm wie Klon I ein großer Pool plasmidkodierter β -Laktamasen zur Verfügung steht. Auf den dicht besiedelten Schleimhäuten des Gastrointestinal- und Respirationstraktes der Patienten dürfte eine konjugative Übertragung solcher Enzyme ohne weiteres möglich sein und wurde bereits in mehreren Fällen nachgewiesen (BIDET et al., 2005; WACHINO et al., 2006).

Die Möglichkeit einer solchen Resistenzentwicklung wurde in dieser Arbeit *in vitro* gezeigt. Die Konjugationen waren mit einem von insgesamt 16 klinischen Donorstämmen erfolgreich, wobei der Misserfolg der anderen Konjugationen auf Inkompatibilitäten zwischen dem jeweiligen AmpC-Plasmid und den vier bereits in Klon I vorhandenen Resistenzplasmiden zurückzuführen sein dürfte. Mit dem Verlust des zweiten Porins und der Aufnahme einer CMY-2- β -Laktamase haben in den erzeugten Transkonjuganten zwei natürlich vorkommende genetische Ereignisse unter entsprechendem Selektionsdruck zur Ausprägung von Carbapenem-Resistenz geführt. Da die Transkonjuganten zudem wie Klon I intermediär gegenüber Colistin getestet wurden und somit bei Einsatz dieses Reserveantibiotikums eine schnelle Resistenzentwicklung nicht auszuschließen ist, können sie als panresistent angesehen werden. Die ermittelte Frequenz von 2×10^{-8} scheint nicht hoch zu sein, erklärt sich jedoch durch die Notwendigkeit zweier unabhängiger genetischer Ereignisse. Sie relativiert sich zudem durch die bei den kolonisierten Patienten ermittelten hohen Zellzahlen des Ausbruchsstammes von 2×10^3 bis 1×10^8 KBE/g Stuhl.

Bei Klon II-A ist es im Verlauf des Ausbruches unter der Therapie mit Meropenem bereits zur Entwicklung von Carbapenem-Resistenz gekommen, so dass der resultierende Klon II-B nur noch gegenüber Amikacin empfindlich bleibt. Zur Ausprägung von Amikacin-Resistenz wäre lediglich die Aufnahme eines ebenfalls auf Resistenzplasmiden kodierten, weit verbreiteten AAC(6')-I-Enzyms erforderlich, was bei entsprechendem Selektionsdruck ohne weiteres möglich sein dürfte. Denkbar wäre beispielsweise die Aufnahme des *aac(6')-Ib*-tragenden Plasmides B von Klon I. Da Klon II zudem bereits Colistin-resistent ist, wäre auch ein solcher Stamm als panresistent zu bezeichnen.

Als Therapieoption gegen einen panresistenten Klon II könnte lediglich Tigecyclin in Betracht gezogen werden. Das semisynthetische Tetracyclin-Derivat aus der Gruppe der Glycylcycline war zum Zeitpunkt der untersuchten nosokomialen Ausbrüche noch nicht auf dem Markt, ist jedoch seit dem 1. Mai 2006 in Deutschland zur Behandlung von Haut- und Weichgewebe- sowie intraabdominalen Infektionen zugelassen. Es umgeht alle gängigen Tetracyclin-Resistenzmechanismen und besitzt ein breites antimikrobielles Spektrum gegen multi-resistente grampositive und gramnegative Erreger. Obwohl Resistenzen noch selten sind, wurde bereits vereinzelt über Tigecyclin-resistente *K.-pneumoniae*-Isolate berichtet, deren Resistenz auf die Überexpression intrinsischer Effluxpumpen zurückgeführt wurde (LIVERMORE, 2005; WOODFORD et al., 2007). In Anbetracht des großen Potentials von *K. pneumoniae* zur Ausprägung neuer Resistenzmechanismen dürfte das vermehrte Auftreten von Tigecyclin-Resistenz demnach nur eine Frage der Zeit sein.

4.3 Übertragungswege: Kolonisation von Patienten und Umgebung

Die Ermittlung der Kolonisationsdauer der betroffenen Patienten sowie die PFGE-Typisierung der Isolate verdeutlichte das Ausmaß der beiden untersuchten Ausbrüche. Auf dem Höhepunkt des zweiten Ausbruchs im November 2003 waren acht Patienten auf der anästhesiologischen (AI), zehn Patienten auf der chirurgischen (CI) sowie ein Patient auf der kardiochirurgischen (KI) Intensivstation mit dem Ausbruchsstamm kolonisiert oder infiziert. Zu diesem Zeitpunkt wurden klinikhygienische Interventionen wie zusätzliche Hygiene- und Desinfektionsmaßnahmen, die Kontaktisolierung der Patienten, die Durchführung von Umgebungsuntersuchungen sowie ein freiwilliges Screening des Personals eingeleitet. Sechs kolonisierte Patienten wurden zur Kohortenisolierung von der CI auf die AI verlegt, kolonisierte und nicht-kolonisierte Patienten wurden von getrenntem Personal versorgt und die Patientenzimmer nach Verlegung der Patienten durch eine Schlussdesinfektion gereinigt. Diese Maßnahmen wurden bis zum Frühjahr 2004 beibehalten und führten zu einer Eindämmung des Ausbruchs.

Trotz der durchgeführten Umgebungsuntersuchungen konnte keine eindeutige Kontaminationsquelle identifiziert werden. Literaturrecherchen zeigen, dass *K.-pneumoniae*-Stämme im Rahmen nosokomialer Ausbrüche an den unterschiedlichsten Orten in der Patientenumgebung isoliert wurden. Es bleibt jedoch in vielen Fällen schwierig zu entscheiden, ob es sich um eine transiente Kontamination oder um eine längerfristige Kolonisation handelt, die als Infektionsquelle betrachtet werden kann. *Enterobacteriaceae* und andere gramnegative Erreger werden

generell seltener auf abiotischen Oberflächen gefunden als grampositive Nosokomialkeime (LEMMEN et al., 2004), da sie weitaus weniger austrocknungsresistent und auf trockenen Oberflächen oft bereits nach Stunden nicht mehr lebensfähig sind (HOTA, 2004).

Im Verlauf der hier untersuchten Ausbrüche wurde der jeweilige Ausbruchsstamm aus mehreren Waschbecken-Siphons in den Patientenzimmern isoliert. Dies überrascht nicht, weil Ausscheidungen kolonisierter Patienten beispielsweise durch das Ausspülen von Waschschrüsseln in die Waschbecken gelangen können. Da Klebsiellen nicht nur auf menschlichen Epithelien, sondern auch auf abiotischen Oberflächen Biofilme bilden (DI MARTINO et al., 2003), ist davon auszugehen, dass sie die ständig feuchten Abflüsse auch über längere Zeit hinweg kolonisieren können. Über die Isolation von Ausbruchstämmen aus Abflüssen in Intensivstationen wurde bereits mehrfach berichtet (*Salmonella*, SIRINAVIN et al., 1991; *Pseudomonas*, KERR et al., 1995; *Serratia*, MILISAVLJEVIC et al., 2004). Während eines nosokomialen Ausbruchs multiresistenter *K. pneumoniae* konnten SU et al. (2000) die Ausbruchsstämme aus mehreren Siphons isolieren und vermuteten dort die Quelle der Kontaminationen. KAC et al. (2004) konnten durch ein Umgebungsscreening auf einer Intensivstation zeigen, dass trockene Oberflächen frei von ESBL-produzierenden *Enterobacteriaceae* blieben, diese Stämme jedoch für Wochen und Monate in den feuchten Spalten von Abflüssen und Waschbecken überlebten. Bisher wurde eine Infektion von Patienten über besiedelte Siphons nicht zweifelsfrei nachgewiesen. Es ist jedoch anzunehmen, dass es beim Verspritzen des laufenden Wassers sowohl zur Kontamination von Händen und Kontaktflächen als auch zur Aerosolbildung kommen kann.

Neben den Klonen I und II wurden sowohl während als auch zwischen beiden Ausbrüchen weitere multiresistente, ESBL-produzierende *K.-pneumoniae*-Isolate in den Siphons der drei Intensivstationen gefunden (Klon V-XII). Diese Stämme verursachten keine Ausbrüche, was gegen einen Übertragungsweg vom Siphon zum Patienten spricht. Es ist jedoch nicht bekannt, ob jeder nosokomiale *K.-pneumoniae*-Stamm potentiell in der Lage ist, einen Ausbruch zu verursachen, oder ob die Verbreitung erst durch bestimmte stammspezifische Eigenschaften wie beispielsweise die Adhäsionsfähigkeit ermöglicht wird.

Klon II wurde auch aus einem Patientenbett sowie aus in einer Thermoskanne vorbereitetem Tee isoliert. Bei dem Isolat aus dem Patientenbett dürfte es sich um eine vorübergehende Kontamination durch einen Patienten handeln. Diese Kontamination unterstreicht die Erfordernis sorgfältiger Hygienemaßnahmen nicht nur im Umgang mit kolonisierten Patienten, sondern auch mit von ihnen benutzten Gegenständen. Die Thermoskanne dagegen könnte insbesondere im Hinblick auf feuchte, schwer zu reinigende Spalten auch eine längerfristig

besiedelte Kontaminationsquelle darstellen, die durch Verunreinigung des Tees eine Gefahr für die Patienten bedeutet.

Die Persistenz von *K. pneumoniae* an Orten wie Siphons oder Thermoskannen zeigt die Notwendigkeit verbesserter Desinfektionsmaßnahmen und weist darauf hin, dass auch ungewöhnliche Kontaminationsquellen in Betracht gezogen, untersucht und bei Bedarf beseitigt werden müssen. So ist in diesem Fall die Nutzung von Thermoskannen ebenso zu überdenken wie eine regelmäßige Desinfektion oder geänderte Konstruktion der kontaminierten Abflüsse.

Als wichtigster Übertragungsweg nosokomialer Ausbruchsstämme zwischen verschiedenen Patienten werden nach wie vor die Hände des Pflegepersonals angesehen. Dies dürfte auch für die hier beschriebenen Ausbrüche zutreffen, zumal im Rahmen der Umgebungsuntersuchungen keine eindeutige Kontaminationsquelle ermittelt werden konnte und Klebsiellen länger als andere gramnegative Erreger auf der Haut überleben können (CASEWELL & DESAI, 1983). Auf den Intensivstationen befanden sich stets mehrere kolonisierte Patienten gleichzeitig, so dass eine Übertragung von Patient zu Patient naheliegend erscheint.

Von besonderer Bedeutung im Rahmen nosokomialer Ausbrüche ist die Kolonisation des Gastrointestinaltraktes der Patienten, welcher das wichtigste Reservoir zur Verbreitung der Stämme und zur Selektion von Multiresistenz darstellt. Die während des zweiten Ausbruchs durchgeführten Stuhluntersuchungen zeigten, dass die meisten Patienten, bei denen Klon II in anderen Abstrichmaterialien nachgewiesen wurde, auch intestinal kolonisiert waren. Insgesamt wurde Klon II im Stuhl von sechs der 12 untersuchten Patienten nachgewiesen und lag in den Proben teilweise in sehr hohen Zellzahlen von bis zu 1×10^8 KBE/g Stuhl vor. Diese hohe Zelldichte dürfte die Verbreitung des Stammes im Zuge der durchgeführten Pflegemaßnahmen begünstigt haben.

Eine intestinale Kolonisation des Pflegepersonals würde neben der transienten Kontamination der Hände eine weitere Übertragungsmöglichkeit darstellen. Das Screening des Personals mittels Stuhluntersuchungen konnte nur auf freiwilliger Basis durchgeführt werden und musste daher auf die Untersuchung von neun Personen beschränkt bleiben, bei denen keine Kolonisation durch Klon II nachgewiesen wurde. Die Stichprobe ist zu klein, um Rückschlüsse auf das gesamte Personal ziehen zu können. Zudem ist anzunehmen, dass Personen, die sich an einem freiwilligen Screening beteiligen, sich auch im Hinblick auf die vorgeschriebenen Hygienemaßnahmen besonders pflichtbewusst verhalten. Eine intestinale Kolonisation des

gesunden Pflegepersonals tritt jedoch allgemein selten auf, da eine intakte Darmflora die Besiedelung durch resistente Erreger unterdrückt (DONSKEY, 2004).

Verlegungen kolonisierter Patienten erschweren die Eindämmung eines Ausbruches. Viele Patienten, wie beispielsweise AI-04, AI-14, AI-19, CI-23, CI-25 und CI-36 (vgl. Abbildung 3.2), waren bis zu ihrer Verlegung auf eine Normalstation mit Klon II kolonisiert. Es ist davon auszugehen, dass solche Patienten auch auf den Normalstationen eine Kontaminationsquelle darstellen und den Ausbruchsstamm auf andere Stationen der Klinik verbreiten können. Bei den Patienten AI-19 und CI-23 konnte diese Problematik anhand der Stuhlproben verdeutlicht werden, die auch auf der chirurgischen Normalstation hohe Zellzahlen des Klons II aufwiesen. Ein anderer Fall, Patient AI-14, wurde in besiedeltem Zustand von der CI auf eine chirurgische Normalstation verlegt und war nach 25 Tagen bei seiner Rückkehr auf die AI nach wie vor mit Klon II kolonisiert. Demgegenüber war Patient CI-22 bereits am Tag seiner Verlegung von einer chirurgischen Normalstation auf die CI mit Klon II kolonisiert, so dass anzunehmen ist, dass er bereits auf der Normalstation in Kontakt mit dem Ausbruchsstamm kam.

Nach diesen Ergebnissen ist davon auszugehen, dass die Verbreitung von Klon II keinesfalls auf die drei untersuchten Intensivstationen beschränkt blieb, sondern möglicherweise klinikweit, in jedem Fall aber auf angrenzenden Normalstationen auftrat. Ein weiterer Hinweis darauf sind zwei Patientenisolate von einer kardiologischen und einer urologischen Normalstation, welche mittels PFGE ebenfalls als Klon II identifiziert wurden.

Neben der klinikweiten Ausbreitung ist im Zuge großer Ausbrüche auch die Übertragung nosokomialer Stämme auf externe Kliniken und medizinische Einrichtungen zu befürchten. Beispielsweise wurde Patient CI-21, dessen Atemwege mit Klon II besiedelt waren, im beatmeten Zustand in ein externes Krankenhaus einer anderen Stadt verlegt. Auch der kolonisierte Patient CI-30 wurde von der CI zunächst für zehn Tage in ein externes Krankenhaus, dann für zwei Monate in ein Rehabilitationszentrum verlegt. Da er bei seiner anschließenden Rückverlegung auf die AI bereits an einer Klebsiellen-Pneumonie erkrankt war und vom ersten Tag an Klon II nachgewiesen wurde, ist davon auszugehen, dass er während seines gesamten Aufenthaltes in externen Kliniken kolonisiert blieb. Durch solche Verlegungen kann es zu einer weiten Verbreitung multiresistenter Ausbruchsstämme kommen, was die Notwendigkeit einer sorgfältigen Dokumentation des Ausbruchsgeschehens und einer umfassenden Information extern weiterbehandelnder Ärzte unterstreicht.

4.4 Antibiotika-Therapie: Eradikation oder Selektion?

Bei den meisten Patienten des zweiten Ausbruchs wurde die Initialtherapie mit Piperacillin/Sulbactam begonnen oder nach kurzer Zeit auf diese Substanzkombination umgestellt, meist kombiniert mit Levofloxacin, Ciprofloxacin und/oder Metronidazol. Unter dieser Therapie kam es bei den Patienten früher oder später zur Kolonisation durch den multiresistenten *K.-pneumoniae*-Klon II.

Die Piperacillin-basierte Antibiotika-Therapie wird als sinnvolle Alternative zu Drittgenerations-Cephalosporinen angesehen (GLASMACHER et al., 2005), welche nachweislich ein großes Risiko des Erwerbs eines ESBL-Produzenten darstellen (ASENSIO et al., 2000). Für den Einsatz von Piperacillin in Kombination mit den β -Laktamase-Inhibitoren Tazobactam oder Sulbactam spricht das breite Wirkungsspektrum gegen gramnegative und grampositive Aerobier und Anaerobier einschließlich *Pseudomonas* und ESBL-Produzenten (HOYEN et al., 2003; VOGEL et al., 2004).

Im Falle des hier untersuchten Ausbruches schaffen die zur Initialtherapie eingesetzten Antibiotika jedoch nahezu ideale Selektionsbedingungen für den gegenüber diesen Substanzen resistenten Klon II. Die Kolonisation des Gastrointestinaltraktes durch ESBL-produzierende *Enterobacteriaceae* wird normalerweise durch die anaerobe Normalflora des Darms unterdrückt (HOYEN et al., 2003). Die Therapie mit einem Breitspektrum-Antibiotikum führt jedoch zum Wegfall der natürlichen Darmflora und deren Platzhalterfunktion, was die Kolonisation durch einen aus der Klinikflora erworbenen *K.-pneumoniae*-Stamm begünstigt. YOUNG & SCHMIDT (2004) konnten zeigen, dass die Therapie mit Amoxicillin/Clavulansäure zu einer deutlichen Reduktion der normalerweise dominierenden grampositiven Darmflora führte, während der Anteil der *Enterobacteriaceae* von 2% auf 34% anstieg. In diesem Zusammenhang spielt das während des zweiten Ausbruches häufig verabreichte Metronidazol eine Rolle, da der Einsatz eines solchen Anaerobier-Antibiotikums die natürliche anaerobe Flora besonders stark hemmt und dadurch die intestinale Kolonisation durch *Enterobacteriaceae* in hoher Zelldichte fördert (HOYEN et al., 2003). Der multiresistente Klon II findet demnach in den Patienten der drei Intensivstationen bestmögliche Bedingungen zur Besiedelung vor. Dies spiegelt sich in sehr hohen Zellzahlen dieses Stammes in den Stuhlproben wider, welche ihrerseits ein hohes Risiko der Übertragung dieses Stammes bedeuten.

Starre Therapieschemata bergen immer die Gefahr negativer Effekte im Hinblick auf Selektion und Resistenzentwicklung. Beispielsweise konnten MAKEDOU et al. (2005) zeigen, dass es auf vier Intensivstationen durch die Einführung einer auf Piperacillin/Tazobactam und Amikacin basierenden Initialtherapie innerhalb von zwei Jahren bei *K. pneumoniae* und

P. aeruginosa zu einem drastischen Resistenzanstieg gegenüber diesen Substanzen kam. Da eine inadäquate Initialtherapie zudem mit einer erhöhten Letalität assoziiert ist, die durch eine spätere Therapieanpassung nicht mehr rückgängig gemacht werden kann (KOLLEF, 2000), müssen bestehende Therapieschemata ständig überdacht und bei Bedarf an eine geänderte Resistenzlage angepasst werden. Ein früher Einsatz von Carbapenemen könnte möglicherweise die Verbreitung von Ausbruchstämmen eindämmen, bevor es zur Kolonisation vieler Patienten und zu weiterer Resistenzentwicklung kommt. RODLOFF et al. (2006) empfehlen, die auch hier durchgeführte Interventionstherapie, bei der erst nach Versagen der Initialtherapie auf ein potenteres Antibiotikum zurückgegriffen wird, zumindest bei schweren Infektionen durch eine sogenannte Deeskalationstherapie zu ersetzen. Hierbei wird zunächst eine aggressive Initialtherapie mit einem Breitspektrum-Antibiotikum wie den Carbapenemen eingeleitet, die später anhand mikrobiologischer Daten auf ein engeres antibiotisches Spektrum umgestellt werden kann. Möglicherweise könnte diese Strategie sowohl zu besseren therapeutischen Ergebnissen als auch zu einer günstigen Resistenzlage führen, wobei die Entwicklung von Carbapenem-Resistenz bei *K. pneumoniae* und anderen Spezies wie *P. aeruginosa* genau beobachtet werden muss.

Die Besiedelung eines Patienten durch Klon II erfolgte durchschnittlich erst 17,8 Tage nach seiner Einlieferung auf die Intensivstationen. Diese Zeitspanne ist jedoch wenig aussagekräftig, da sie neben der Antibiotika-Therapie durch weitere Faktoren wie dem Allgemeinzustand des Patienten, den durchgeführten invasiven Maßnahmen sowie der Möglichkeit des Kontaktes mit anderen kolonisierten Patienten beeinflusst wird. Als Reaktion auf den Nachweis von Klon II wurde die Therapie auf Meropenem umgestellt, oft in Kombination mit Amikacin und weiteren Substanzen. Auffällig ist, dass die Therapieumstellung teilweise erst neun Tage nach der Entnahme des ersten positiven Klebsiellen-Abstriches erfolgte. Hier wäre sicherlich eine schnellere Intervention sinnvoll, um sowohl das Risiko des Erwerbs einer nosokomialen Infektion als auch das Risiko der Weiterverbreitung zu minimieren.

Vier Patienten (AI-13, CI-21, KI-08, KI-09) wurden trotz des Nachweises von Klon II nicht auf Meropenem umgestellt und blieben erwartungsgemäß kolonisiert. Auch bei den auf Meropenem umgestellten Patienten konnte jedoch nur bei drei von 27 Fällen eine zweifelsfreie Eradikation des Ausbruchstammes festgestellt werden. 16 Patienten blieben bis zum Zeitpunkt der Verlegung oder Entlassung kolonisiert, obwohl der vorherrschende Klon II-A *in vitro* sowohl gegenüber Meropenem als auch gegenüber Amikacin empfindlich getestet wurde. Der Grund für die niedrige Eradikationsrate konnte anhand der vorliegenden Daten nicht

ermittelt werden. Eine denkbare Ursache wäre die Selektion des Carbapenem-resistenten Subklons II-B. Bei den Patienten AI-04 und AI-10 wurde dieser Klon während der Therapie mit Meropenem sowohl in den Atemwegen als auch im Stuhl gefunden, gleichzeitig blieb jedoch auch der empfindliche Klon II-A weiter nachweisbar. Bei AI-17 und CI-23 trat Klon II-B unter der Meropenem-Therapie nur im Stuhl auf, während aus anderen Materialien keine Klebsiellen mehr nachweisbar waren (vgl. Abbildung 4.4). Bei AI-19 wurde er dagegen aus Drainageflüssigkeit isoliert, während der Stuhl mit Klon II-A kolonisiert war. Eine Verdrängung von Klon II-A durch II-B hatte demnach nur bei einigen Patienten stattgefunden, während bei anderen Patienten beide Varianten koexistierten.

Insgesamt wurde Klon II-B bei fünf Patienten isoliert (Abbildung 4.4), wobei die PFGE-Typisierung keinen Aufschluss über die Art der Verbreitung geben konnte. Möglich ist sowohl eine unabhängige Selektion der Carbapenem-resistenten Variante in jedem der Patienten als auch die klonale Ausbreitung einer einzelnen Mutante (WOODFORD et al., 2007). Eine klonale Ausbreitung ist in diesem Fall durchaus möglich, da alle betroffenen Patienten zeitgleich auf der AI lagen. Besonders der Langzeitpatient AI-04 (Daten s. Anhang), der zudem an 95 von insgesamt 157 Tagen auf der AI mit Meropenem therapiert wurde, käme als Reservoir für Klon II-B in Frage. Ähnliche Überlegungen gelten für Klon II-B2, der bei drei verschiedenen Patienten isoliert wurde.

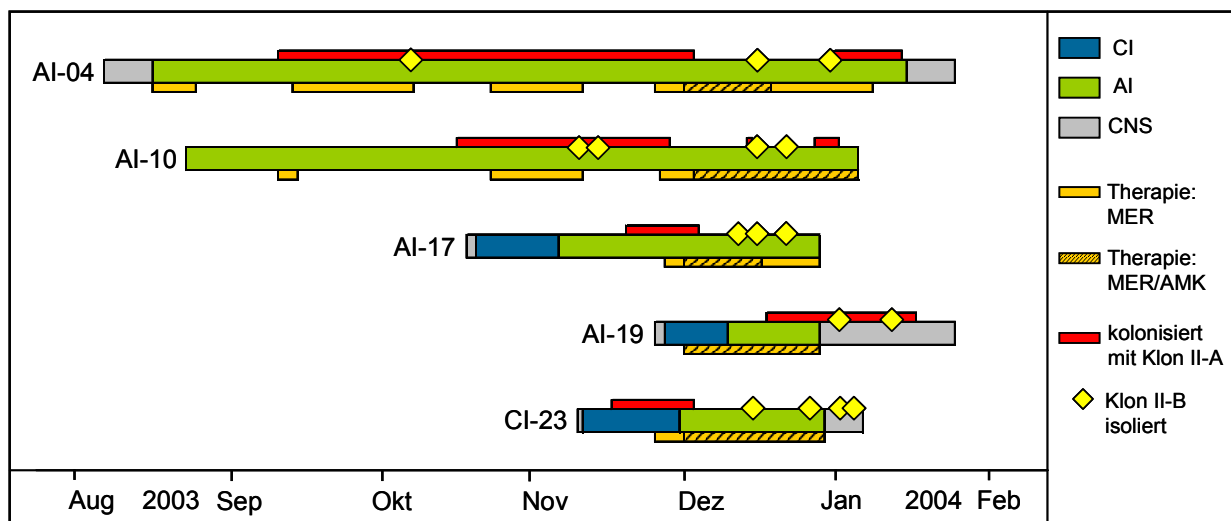


Abb. 4.4: Auftreten von Klon II-B bei fünf Patienten. Einige Liegezeiten sind ausschnittsweise dargestellt. CI: chirurgische Intensivstation; AI: anästhesiologische Intensivstation; CNS: chirurgische Normalstation; MER: Meropenem; AMK: Amikacin.

ASENSIO et al. (2000) konnten bei einem Ausbruch durch multiresistente *K. pneumoniae* zwar die aufgetretenen Infektionen erfolgreich mit Meropenem behandeln, die Patienten blieben jedoch intestinal kolonisiert, was die Autoren auf die pharmakokinetischen Eigenschaften des Antibiotikums zurückführten. Auch GUNDES et al. (2005) stellten fest, dass parenteral appliziertes Meropenem zwar die systemische Erkrankung kurieren, jedoch nicht die intestinale Kolonisation durch Klebsiellen verhindern konnte. Dies scheint hier bei den Patienten AI-17 und CI-23 der Fall zu sein.

Bei elf der hier betrachteten Patienten blieb Klon II allerdings unter der Meropenem-Therapie nicht nur im Stuhl, sondern auch in anderen Abstrichmaterialien, hauptsächlich aus den Atemwegen, nachweisbar. Eine ständige Neuinfektion durch die eigene Intestinalflora wäre zwar denkbar, dürfte jedoch durch die parenterale Meropenem-Therapie verhindert werden.

Bei drei weiteren Patienten wurde Klon II unter der Therapie nicht, danach jedoch erneut nachgewiesen. Beispielsweise waren bei CI-27 (vgl. Abbildung 3.3) nach siebentägiger Meropenem-Therapie keine Klebsiellen in Stuhl und Abstrichen mehr nachweisbar, einige Tage nach Absetzen der Therapie auf der Normalstation konnte Klon II-A jedoch wieder aus dem Stuhl isoliert werden. Dies ist dadurch erklärbar, dass die Antibiose zwar sowohl die natürliche Darmflora als auch den Nosokomialkeim hemmt, dieser jedoch in geringer Zellzahl persistiert und nach Beendigung der Therapie schneller anwächst als die restliche Flora (DONSKEY, 2004). Das scheint jedoch wiederum nicht bei allen Patienten der Fall zu sein, da in einem vergleichbaren Fall (CI-28) auch nach Absetzen von Meropenem keine Klebsiellen im Stuhl nachgewiesen wurden.

Aus der Tatsache, dass der Ausbruchstamm in den Routineabstrichen einiger Patienten zwischenzeitlich nicht nachweisbar war, ergeben sich mögliche Probleme im Hinblick auf die Surveillance. Zur Bekämpfung eines nosokomialen Ausbruchs ist eine sorgfältige mikrobiologische Überwachung nötig, um kolonisierte Patienten schnell erkennen und isolieren zu können. Da eine solche Isolation jedoch nicht nur einen erhöhten Arbeitsaufwand für das Pflegepersonal, sondern auch eine psychische Belastung für Patient und Angehörige darstellt, sollte sie nach erfolgreicher Therapie schnellstmöglich wieder aufgehoben werden.

Wiederholt negative Kontrollabstriche eines noch immer kolonisierten Patienten können allerdings eine Eradikation suggerieren, während der eigentliche Grund für die negativen Abstriche in einer therapiebedingten Reduktion der Keimzahl liegen dürfte, die später wieder zunehmen kann. Abbildung 4.5 zeigt diese Problematik an zwei ausgewählten Patienten. Bei AI-04 ist der Ausbruchstamm während einer Zeitspanne von 26 Tagen unter der Meropenem-

Therapie in den Routineabstrichen nicht nachweisbar, bei AI-17 bleiben die Abstriche sogar bis zur Verlegung negativ. Beide Patienten blieben jedoch während der scheinbar negativen Abstriche intestinal kolonisiert. Nach diesen Ergebnissen ist ein regelmäßiges Screening der intestinalen Besiedelung zusätzlich zu den durchgeführten Routineabstrichen anzuraten, um gesicherte Daten bezüglich der Kolonisation der Patienten erhalten zu können.

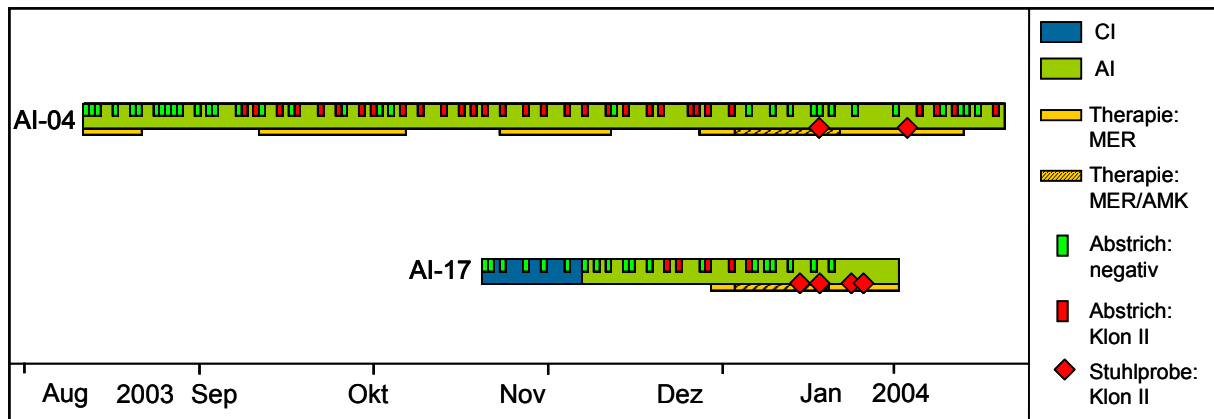


Abb. 4.5: Vergleich der Ergebnisse von Routineabstrichen und Stuhlproben. Dargestellt ist nur die Liegezeit auf den Intensivstationen. CI: chirurgische Intensivstation; AI: anästhesiologische Intensivstation; MER: Meropenem; AMK: Amikacin.

Da der Intestinaltrakt ein Reservoir für die verschiedensten Nosokomialkeime darstellt, wird seit langem die Möglichkeit einer selektiven Darmdekontamination diskutiert. Sie soll die pathogenen Mikroorganismen selektiv hemmen, ohne die natürliche Darmflora zu zerstören. Hierzu werden nicht-absorbierbare Antibiotika wie Colistin (Polymyxin E), Polymyxin B oder Tobramycin oral verabreicht. Eine solche Therapie scheint zwar bei einigen Patientengruppen zu einer verringerten Infektionsrate und Letalität zu führen, ein Einfluss auf den Anstieg der Antibiotikaresistenz ist jedoch nicht auszuschließen, so dass diese Maßnahme generell nicht empfohlen wird (KOLLEF, 2000). Die Kolonisation durch Klon II würde eine solche Therapie sogar gefördert, da dieser Stamm gegen Tobramycin und Colistin resistent ist.

Bei drei Patienten auf der CI (ST-01, ST-02, ST-03; vgl. Abbildung 3.3) konnte Klon II weder im Stuhl noch in anderen Materialien nachgewiesen werden. Da das Risiko, durch einen multiresistenten Stamm kolonisiert oder infiziert zu werden, mit der Länge der Liegezeit steigt (KOLLEF, 2000), ist zu vermuten, dass zwei der Patienten aufgrund ihres kurzen Aufenthaltes (4-5 Tage) nicht kolonisiert wurden. Andere Patienten mit ähnlich kurzen Liegezeiten (AI-09, AI-18, CI-22) wurden kolonisiert, jedoch dürfte die individuelle Exposition bei kurzen Aufenthalten sehr verschieden sein. Patient ST-02 (Gesamtdaten s. Anhang) ist aber

insofern hervorzuheben, als dass er während der Kernzeit des zweiten Ausbruches 40 Tage lang auf der CI lag und er trotz einer Pneumonie, einer Beatmungsdauer von 34 Tagen sowie einer Therapie mit Piperacillin/Sulbactam und Ceftazidim/Sulbactam nicht durch Klon II besiedelt wurde. Auch ein Patient, der vielen Risikofaktoren ausgesetzt ist, muss somit im Rahmen eines großen Ausbruches multiresistenter *K. pneumoniae* nicht zwangsläufig mit dem Ausbruchsstamm kolonisiert oder infiziert werden.

Bei multimorbiden Patienten ist es oft unmöglich festzustellen, welcher der isolierten opportunistischen Erreger für eine auftretende nosokomiale Infektion verantwortlich ist. Dementsprechend ist hier eine genaue Abstimmung der Antibiotikatherapie schwierig und erfordert häufig die Kombination mehrerer Substanzklassen. Bei einigen Patienten dieser Studie fiel jedoch auf, dass nach Nichtansprechen auf die Initialtherapie keine klare Umstellung auf eine Alternativtherapie erfolgte, sondern bis zu fünf Substanzen gleichzeitig verabreicht wurden und das Therapie-Regimen häufig gewechselt wurde.

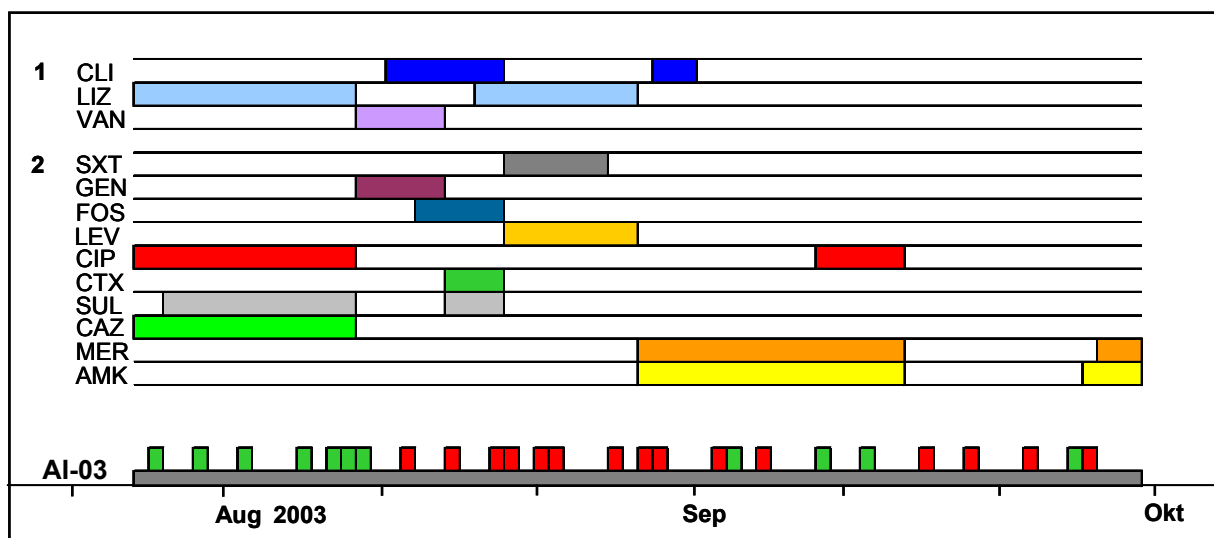


Abb. 4.6: Antibiotika-Therapie des Patienten AI-03. Dargestellt ist nur die Liegezeit auf der AI (grauer Balken). 1: Antibiotika gegen grampositive Erreger; 2: Antibiotika gegen gramnegative Erreger und Breit-spektrum-Antibiotika; ■ mikrobiologischer Befund ohne *K. pneumoniae*, ■ mikrobiologischer Befund mit Klon II. Kürzel der Antibiotika siehe Anhang.

In Abb. 4.6 ist dies exemplarisch an Patient AI-03 (Gesamtdaten s. Anhang) gezeigt. Bei diesem Patienten dürfte die Therapie mit Ceftazidim/Sulbactam die Selektion von Klon II begünstigt haben. Die nachfolgende Therapie mit vielen verschiedenen Substanzen führte ebenso wenig wie die spätere Therapieumstellung auf Meropenem/Amikacin zu einer Eradikation der Klebsiellen. Ein intensiver Einsatz verschiedener Antibiotika fördert zum einen die Kolo-

nisation oder Infektion durch verschiedene pathogene Spezies (DONSKEY, 2004) und begünstigt zum anderen das Entstehen von Resistenz sowohl im einzelnen Patienten als auch in der gesamten Klinik und darüber hinaus (CRISTINO, 1999). Unter diesen Aspekten ist eine Therapie, wie sie bei Patient AI-03 durchgeführt wurde, besonders kritisch zu betrachten. Sehr treffend wurde dies von BURKE (1995) zusammengefasst: "Despite the multifactorial nature of antibiotic resistance the central issue remains quite simple: the more you use it, the faster you lose it". Sinnvoll wäre in solchen Fällen die Einführung eines interdisziplinären Konsils aus Arzt (Betrachtung der Symptome), Mikrobiologe (Betrachtung der möglichen Erreger und deren Resistenzmuster) und klinischem Pharmazeuten (optimale Dosierung), im Zuge dessen der Erreger eingegrenzt und eine sinnvolle Therapie im Hinblick auf den Einzelpatienten und die lokale Resistenzlage festgesetzt werden könnte.

4.5 Schlussfolgerungen

Ein Erreger muss zwei generelle Voraussetzungen erfüllen, um schwer beherrschbare nosokomiale Ausbrüche verursachen zu können. Zum einen muss er über die nötige Fitness und Virulenz verfügen, so dass es ihm möglich ist, in der Krankenhausflora zu persistieren und viele Patienten zu kolonisieren und zu infizieren. Zum anderen muss er in der Lage sein, Resistenz gegen die im Klinikalltag eingesetzten Antibiotika zu erwerben, so dass er trotz therapeutischer Interventionen überleben kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass *K. pneumoniae* ein großes Potential zum Erwerb von Resistenz gegen alle klinisch relevanten Antibiotika besitzt. Die Analyse der Resistenzmechanismen verschiedener Ausbruchsstämme verdeutlicht, dass insbesondere die Resistenz gegen die häufig eingesetzten β -Laktam-Antibiotika, aber auch gegen andere Substanzklassen durch das Zusammenwirken einer Vielzahl erworbener Resistenzgene mit verschiedenen chromosomalen Mutationen entsteht. Besonders hervorzuheben ist bei *K. pneumoniae* der Verlust von Porinen der äußeren Membran. Es konnte gezeigt werden, dass durch diesen Porinverlust das Substratspektrum vorhandener β -Laktamasen deutlich erweitert wird und solche Mutationen daher ein besorgniserregendes Potential zum Erwerb von Carbapenem-Resistenz mit sich bringen.

Die Koselektion verschiedener auf Multiresistenzplasmiden kodierter Resistenzdeterminanten erleichtert den Erwerb von Multiresistenz, was bei den untersuchten Stämmen anhand des Vorhandenseins redundanter und nicht benötigter Resistenzgene erkennbar wird. Der Besitz von Resistenzplasmiden muss zudem nicht zwangsläufig einen Fitnessverlust bedeuten, son-

dern kann beispielsweise bei *E. coli* in Einzelfällen sogar einen Fitnessvorteil für den Wirtstamm mit sich bringen (ENNE et al., 2004). Die für Klon I und II-A ermittelten Wachstumsraten weisen darauf hin, dass der Besitz mehrerer Resistenzplasmide und der Erwerb von Multi-resistenz auch für diese Stämme zumindest keinen Wachstumsnachteil bedeutet.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die bereits multiresistenten Ausbruchsstämme als Anpassung an den Antibiotika-Selektionsdruck durchaus über das Potential zum Erwerb weiterer Resistenzen verfügen und dass nur wenige genetische Ereignisse sie davon trennen, Pan-resistenz zu entwickeln. Bei Klon II ist der wichtigste Schritt in diese Richtung, die Entstehung der Carbapenem-resistenten Variante II-B, bereits *in vivo* erfolgt, während dies bei Klon I *in vitro* nachvollzogen werden konnte. Nur diese letzte Erweiterung des Resistenzspektrums durch Verlust des zweiten Porins muss von beiden Klonen mit einer verminderten Fitness bezahlt werden, die bei Wegfall des Selektionsdruckes einen Nachteil gegenüber empfindlichen Stämmen bedeuten dürfte. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass dieser Nachteil *in vivo* durch Kompensationsmutationen ausgeglichen werden kann (BJÖRKMAN et al., 1998).

Mit ihrem weitreichenden Potential zum Erwerb von Multiresistenz erfüllt die opportunistisch pathogene Spezies *K. pneumoniae* somit bereits eine der Voraussetzungen für einen potenten nosokomialen Ausbruchstamm. Dies unterscheidet sie jedoch noch nicht von anderen gram-negativen opportunistischen Erregern wie beispielsweise *E. coli*, der zwar im Hinblick auf die Gesamtzahl nosokomialer Infektionen einen ähnlichen Stellenwert wie *K. pneumoniae* einnimmt (GEFFERS et al., 2004), jedoch weitaus seltener nosokomiale Ausbrüche verursacht (www.outbreak-database.com). Auch *E. coli* ist in der Lage, Multiresistenz zu erwerben (SHERWOOD, 2004), und auch bei dieser Spezies kann der Verlust beider Porine zu Carbapenem-Resistenz führen (POIREL et al., 2004). Aus der Häufigkeit von Berichten in der Literatur könnte man schließen, dass Multiresistenz bei *K. pneumoniae* häufiger vorkommt und demnach leichter zu erwerben ist als bei *E. coli*. Dieser Eindruck könnte jedoch verfälscht sein, dass Ausbruchsstämmen mehr Aufmerksamkeit zuteil wird und sie daher häufiger beschrieben werden als einzeln auftretende klinische Isolate.

Der entscheidende Vorteil von *K.-pneumoniae*-Stämmen dürfte vielmehr in der Fähigkeit zu einer schnellen und weitreichenden Verbreitung innerhalb der Klinikflora liegen, welche die zweite Voraussetzung für einen erfolgreichen Ausbruchstamm darstellt.

Bisher ist nur wenig darüber bekannt, welche Eigenschaften der Spezies *K. pneumoniae* eine derartige Ausbreitung ermöglichen. Während klassische grampositive nosokomiale Erreger wie *Staphylococcus aureus* sehr austrocknungsresistent sind und mehrere Monate auf trockene

nen Oberflächen überleben können, beträgt die Überlebensdauer gramnegativer Spezies in der Regel nur wenige Stunden (HOTA, 2004). Möglicherweise besitzen Klebsiellen jedoch durch ihre dicke Schleimkapsel einen besseren Austrocknungsschutz. Hinweise darauf liefern vergleichende Studien, in denen auf verschiedenen in der Klinik üblichen Materialien für *K. pneumoniae* eine deutlich längere Überlebenszeit als für *E. coli* ermittelt wurde (GASTMEIER et al., 2006). Auch auf den Händen überleben klinische *K.-pneumoniae*-Stämme deutlich länger als andere gramnegative Spezies (GONTIJO FILHO et al., 1985). Eine bessere Überlebensfähigkeit außerhalb menschlicher Schleimhäute ist zudem schon deshalb anzunehmen, weil Klebsiellen im Gegensatz zu *E. coli* auch in der Umwelt ubiquitär verbreitet sind.

Die Ausbreitung von *K.-pneumoniae*-Stämmen in der Klinikflora dürfte demnach durch mehrere Faktoren ermöglicht werden. Ihre Adhäsionsfähigkeit an menschliche Epithelzellen (DI MARTINO et al., 1997) befähigt Klebsiellen zu einer langfristigen intestinalen Kolonisation von Patienten, während die Übertragung von Patient zu Patient durch einen gewissen Austrocknungsschutz auf trockenen Oberflächen und Händen sowie durch eine längerfristige Kolonisation der abiotischen Umgebung mittels Biofilmbildung an feuchten Stellen (KAC et al., 2004) ermöglicht wird.

Auch die in dieser Arbeit untersuchten Ausbruchsstämme zeigten sowohl eine schnelle Ausbreitung als auch eine lange Persistenz in der Mikrobenflora der drei Intensivstationen. Ihre Verbreitung wurde zudem dadurch begünstigt, dass die zur Initialtherapie eingesetzten Antibiotika geradezu ideale Selektionsbedingungen für eine Besiedelung der Patienten durch diese Stämme schafften. Auch wenn keine eindeutige Kontaminationsquelle festgestellt werden konnte, so ist doch davon auszugehen, dass neben der Besiedelung mehrerer Siphons in erster Linie die intestinale Kolonisation der Patienten und die damit verbundene Übertragung von Patient zu Patient für die Verbreitung der Stämme verantwortlich war.

Die hier beschriebenen Ausbrüche stellen keinen Einzelfall dar. Während in den letzten Jahren weltweit häufig über nosokomiale Ausbrüche multiresistenter Klebsiellen berichtet wurde (SILVA et al., 2001; QUALE et al., 2002; GRUTEKE et al., 2003; OHANA et al., 2005; MENA et al., 2006), sind jedoch in Deutschland bisher nur wenige Fälle beschrieben worden. Zwei Ausbrüche (TRAUB et al., 2000; GASTMEIER et al., 2003) ereigneten sich auf Neugeborenenstationen, wo es zu schweren Infektionen kam. RITTER et al. berichteten bereits 1992 über einen Ausbruch eines ESBL-produzierenden *K.-pneumoniae*-Stammes, der nur durch das Schließen einer operativen Intensivstation mit anschließender Desinfektion zu beherrschen war. Ein ähnlicher Ausbruch (BAUERNFEIND et al., 1993) war durch eine 21 Monate andau-

ernde Persistenz des Ausbruchsstammes gekennzeichnet. Auch dort wurde die intestinale Kolonisation der Patienten als Reservoir vermutet, während es in einem anderen Fall (HOLLÄNDER et al., 2001) zu einem asymptomatischen Ausbruch unter zehn Patienten ohne nachweisbare intestinale Kolonisation kam.

In der vorliegenden Studie wurde der Umfang der Ausbrüche erst durch die retrospektive Datenanalyse deutlich, was zeigt, dass das Ausmaß nosokomialer Ausbrüche im Klinikalltag häufig unterschätzt oder zu spät wahrgenommen wird. Dieser Problematik könnte durch eine ständige Überwachung der im mikrobiologischen Routinelabor ermittelten Häufigkeiten und Resistenzen aller isolierten Stämme begegnet werden, die mit geringem Arbeitsaufwand mittels eines Computerprogramms erfolgen kann (HACEK et al., 2004). Der Verdacht auf einen klonalen Ausbruch sollte zudem durch die Anwendung molekularer Typisierungsmethoden überprüft werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die opportunistisch pathogene Spezies *K. pneumoniae* durch das Zusammenwirken verschiedener Mechanismen in die Lage versetzt wird, zu einem Erreger nicht beherrschbarer nosokomialer Infektionen zu werden. Durch ihr Potential zur Ausprägung intrinsischer Resistenzmechanismen und durch die Verfügbarkeit eines großen Pools mobiler Resistenzgene können nosokomiale *K.-pneumoniae*-Stämme während ihrer langen Persistenz in der Klinikflora unter entsprechendem Selektionsdruck Resistenzdeterminanten akkumulieren und Panresistenz ausprägen. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur weitreichenden Verbreitung können diese resistenten Stämme große Ausbrüche schwer oder nicht mehr therapierbarer nosokomialer Infektionen verursachen, die eine Bedrohung für jeden Intensivpatienten darstellen. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit ständiger Surveillance, strikter Hygienemaßnahmen und einer schnellen Elimination von Ausbruchstämmen aus der Klinikflora ebenso wie den Bedarf an neuen Antibiotika mit alternativen Wirkmechanismen gegen gramnegative nosokomiale Erreger wie *K. pneumoniae*.

5 Zusammenfassung

Die opportunistisch pathogene Spezies *Klebsiella pneumoniae* gehört zu den wichtigsten Erregern nosokomialer Infektionen. Multiresistente *K.-pneumoniae*-Stämme sind in der Lage, längere Zeit in der Klinikflora zu persistieren und klonale Ausbrüche zu verursachen, was zu großen klinikhygienischen und therapeutischen Problemen führen kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei innerhalb von 28 Monaten auftretende nosokomiale Ausbrüche multiresistenter Klebsiellen auf drei Intensivstationen einer Universitätsklinik untersucht. Durch molekulare Typisierung konnte die klonale Ausbreitung von zwei verschiedenen, ESBL-produzierenden Ausbruchsstämmen (Klon I und II) nachgewiesen werden, die bereits gegenüber den meisten einsetzbaren Antibiotika resistent waren. Die Analyse der Resistenzmechanismen beider Stämme zeigte, dass ihre Multiresistenz auf dem Zusammenwirken einer Vielzahl erworbener Resistenzgene mit verschiedenen chromosomalen Mutationen beruht. Besondere Bedeutung kommt dem Verlust der Porine OmpK35 und OmpK36 der äußeren Membran zu. Der Verlust beider Porine führte bei Klon II im Zusammenspiel mit einer CTX-M-2- β -Laktamase zur Ausprägung von Resistenz gegenüber Carbapenemen, einer der letzten Therapieoptionen gegen Infektionen mit diesen Stämmen. Zudem konnte gezeigt werden, dass Resistenz gegenüber Ertapenem keinen Verlust beider Porine erfordert, sondern bereits durch Verlust von OmpK35 und eine mutative Verengung von OmpK36 entsteht.

Es wurde nachgewiesen, dass die bereits multiresistenten Ausbruchsstämme durchaus über das Potential zum Erwerb weiterer Resistenzen verfügen und in der Lage sind, Panresistenz gegen alle klinisch verfügbaren Antibiotika auszuprägen. Diese Resistenzentwicklung konnte bei Klon I *in vitro* nachvollzogen werden, während anhand von Klon II gezeigt wurde, dass der Erwerb von Carbapenem-Resistenz bereits *in vivo* im kolonisierten Patienten unter der Meropenem-Therapie erfolgt war.

Umgebungs- und Stuhluntersuchungen wiesen darauf hin, dass neben möglichen Infektionsreservoirs im Patienten-Umfeld in erster Linie die intestinale Kolonisation der Patienten für die Verbreitung der Ausbruchsstämme verantwortlich war. Die Auswertung der Therapiedaten von 41 Patienten zeigte zudem, dass die zur Initialtherapie eingesetzten Antibiotika nahezu ideale Selektionsbedingungen für eine Besiedelung der Patienten durch die Ausbruchsstämme schafften und dass auch eine Umstellung der Therapie auf *in vitro* noch wirksame Substanzen in den meisten Fällen keine Eradikation der Klebsiellen bewirkte. Solche Ausbruchsstämme stellen ein großes Gefahrenpotential dar, da sie durch den Erwerb weniger zusätzlicher Resistenzmechanismen und ihre Fähigkeit zur Ausbreitung auf viele Patienten nicht beherrschbare nosokomiale Infektionen verursachen können.

6 Literaturverzeichnis

Abu Mraheil, M. 1999. Entwicklung eines Luciferase-Reportergensystems zur Bestimmung des Superspiralisierungsgrads in Bakterien. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Ahamed J, Kundu M. 1999. Molecular characterization of the SHV-11 β -lactamase of *Shigella dysenteriae*. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 2081-2083.

Al-Agamy MH, El-Din Ashour MS, Wiegand I. 2006. First description of CTX-M β -lactamase-producing clinical *Escherichia coli* isolates from Egypt. Int. J. Antimicrob. Agents 27: 545-548.

Alberti S, Marques G, Camprubi S, Merino S, Tomas JM, Vivanco F, Benedi VJ. 1993. C1q binding and activation of the complement classical pathway by *Klebsiella pneumoniae* outer membrane proteins. Infect. Immun. 61: 852-860.

Alberti S, Rodrigues-Quinones F, Schirmer T, Rummel G, Thomas JM, Rosenbusch JP, Benedi VJ. 1995. A porin from *Klebsiella pneumoniae*: sequence homology, three-dimensional structure, and complement binding. Infect. Immun. 63: 903-910.

Alvarez D, Merino S, Tomas JM, Benedi VJ, Alberti S. 2000. Capsular polysaccharide is a major complement resistance factor in lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. Infect. Immun. 68: 953-955.

Ambler RP. 1980. The structure of β -lactamases. Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci. 289:321-331.

Antoniadou A, Kontopidou F, Poulakou G, Koratzanis E, Galani I, Papadomichelakis E, Kopteridis P, Souli M, Armaganidis A, Giamarellou H. 2007. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. J. Antimicrob. Chemother. 2007, doi:10.1093/jac/dkl562.

Ardanuy C, Linares J, Dominguez MA, Hernandez-Alles S, Benedi VJ, Martinez-Martinez L. 1998. Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems. Antimicrob. Agents Chemother. 42:1636-1640.

Arlet G, Rouveau M, Casin I, Bouvet PJM, Lagrange PH, Phillipon A. 1994. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 and which were isolated in 14 french hospitals. J. Clin. Microbiol. 32: 2553-2558.

Arlet, G, Bami G, Decre D, Flippo A, Gaillot O, Lagrange PH, Phillipon A. 1995. Molecular characterisation by PCR - restriction fragment length polymorphism of TEM β -lactamases. FEMS Microbiol. Lett. 134: 203-208.

Asensio A, Oliver A, Gonzalez-Diego P, Baquero F, Perez-Diaz JC, Ros P, Cobo J, Palacios M, Lasheras D, Canton R. 2000. Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as a risk factor for colonization and infection. Clin. Infect. Dis. 30: 55-60.

Babini GS, Livermore DM. 2000. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella* spp. collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. J. Antimicrob. Chemother. 45:183-189.

Bärwolff S, Grundmann H, Schwab F, Tami A, Behnke M, Geffers C, Halle E, Göbel U, Schiller R, Jonas D, Klare I, Weist K, Witte W, Dinger E, Beilecke K, Rüden H, Gastmeier P. 2005. Inzidenz der Übertragung von Infektionserregern von einem Intensivpatienten zum anderen. Ergebnisse der SIR-3-Studie. Anaesthesist 54: 560-566.

Baraniak A, Fiett J, Hryniewicz W, Nordmann P, Gniadkowski M. 2002. Ceftazidime-hydrolysing CTX-M-15 extended spectrum β -lactamase (ESBL) in Poland. J. Antimicrob. Chemother. 50: 393-396.

Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S. 1989. Extended broad spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. Infection 17: 316-321.

- Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S.** 1990. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* 18: 294-298.
- Bauernfeind A, Rosenthal E, Eberlein E, Holley M, Schweighart S.** 1993. Spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 beta-lactamase among hospitalized patients. *Infection* 21: 18-22.
- Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Giamarellou H.** 1996. Characterization of the plasmidic β -lactamase CMY-2 which is responsible for cephamycin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 221-224.
- Bauernfeind A, Wagner S, Jungwirth R, Schneider I, Meyer D.** 1997. A novel class C β -lactamase (FOX-2) in *Escherichia coli* conferring resistance to cephamycins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 2041-2046.
- Ben-Ami R, Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Schwartz D, Giladi M, Chmelnitsky I, Leavitt A, Carmeli Y.** 2006. Influx of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* into the hospital. *Clin. Infect. Dis.* 42: 925-934.
- Bennett P.** 1999. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 43: 1-4.
- Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N.** 2002. Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J. Antimicrob. Chemother.* 50: 11-18.
- Bidet P, Burghoffer B, Gautier V, Brahimi N, Mariani-Kurkdijan P, El-Ghoneimi A, Bingen E, Arlet G.** 2005. In vivo transfer of plasmid-encoded ACC-1 AmpC from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in an infant and selection of impermeability to imipenem in *K. pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 3562-3565.
- Björkman J, Hughes D, Andersson DI.** 1998. Virulence of antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 3949-3953.
- Bonnet R, Dutour C, Sampaio JLM, Chanal C, Sirot D, Labia R, De Champs C, Sirot J.** 2001. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240 to Gly. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2269-2275
- Bonnet R.** 2004. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M-enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 1-14.
- Bradford PA.** 2001. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 933-951.
- Bradford P, Urban C, Mariano M, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K.** 1997. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC- β -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 563-569.
- Burke JP.** 1995. How to maintain the miracle of antibiotics. *Lancet* 345: 977.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1211-1233.
- Bush K.** 2001. New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin. Infect. Dis.* 32: 1085-1089.
- Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompарт CM, Alberti S, Bengoechea JA.** 2004. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* 72: 7107-7114.
- Carpenter JL.** 1990. *Klebsiella* pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Rev. Infect. Dis.* 12: 672-682.
- Casewell MW, Desai N.** 1983. Survival of multiply-resistant *Klebsiella aerogenes* and other Gram-negative bacteria on finger tips. *J. Hosp. Infect.* 4: 350-360.

- Cetre JC, Nicolle MC, Salord H, Perol M, Tigaud S, David G, Bourjault M, Vanhems P.** 2005. Outbreaks of contaminated broncho-alveolar lavage related to intrinsically defective bronchoscopes. *J. Hosp. Infect.* 61: 39-45.
- Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Xiong JH, Hawkey PM.** Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among *Enterobacteriaceae* in the People's Republic of China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 603-637.
- Chaves J, Ladona MG, Segura C, Coira A, Reig R, Ampurdanes C.** 2001. SHV-1 β -lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2856-2861.
- Choi S, Lee D, Choi J, Yoo J, Shin W, Kang M.** 2002. Detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes using multiplex PCR in *Escherichia coli*. 42nd Interscience Conference on Antimicrob. Agents Chemother., Poster C2-713.
- Chopra I, Roberts M.** 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 232-260.
- Cristino JM.** 1999. Correlation between consumption of antimicrobials in humans and development of resistance in bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents* 12: 199-202.
- Crowley B, Benedi VJ, Domenech-Sanchez A.** 2002. Expression of SHV-2 β -lactamase and of reduced amounts of OmpK36 porin in *Klebsiella pneumoniae* results in increased resistance to cephalosporins and carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3679-3682.
- Curie K, Speller DC, Simpson RA, Stephens M, Cooke DI.** 1978. A hospital epidemic caused by gentamicin-resistant *Klebsiella aerogenes*. *J. Hyg.* 80:115-123.
- De Champs C, Sauvart MP, Chanal C, Sirot D, Gazuy N, Malhuret R, Baguet JC, Sirot J.** 1989. Prospective survey of colonization and infection caused by expanded-spectrum- β -lactamase-producing members of the family *Enterobacteriaceae* in an intensive care unit. *J. Clin. Microbiol* 27:2887-90.
- Deguchi T, Fukuoka A, Yasuda M, Nakano M, Ozeki S, Kanematsu E, Nishino Y, Ishihara S, Ban Y, Kawada Y.** 1997. Alterations in the gyrA subunit of DNA gyrase and the parC subunit of topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 699-701.
- Demko CA, Stern RC, Doershuk CF.** 1998. *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis: incidence and prevalence. *Pediatr. Pulmonol.* 25: 304-308.
- Deutsches Institut für Normung e. V. Normenausschuss Medizin.** 2004. Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika. Bewertungsstufen für die minimale Hemmkonzentration, MHK-Grenzwerte von antibakteriellen Wirkstoffen. DIN 58940, Teil 4, Beiblatt 1, Februar 2004.
- Di Martino P, Sirot D, Joly B, Rich C, Darfeuille-Michaud A.** 1997. Relationship between adhesion to intestinal Caco-2 cells and multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 35:1499-1503.
- Di Martino P, Cafferini N, Joly B, Darfeuille-Michaud A.** 2003. *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Res. Microbiol.* 154: 9-16.
- Domenech-Sanchez A, Hernandez-Alles S, Martinez-Martinez L, Benedi VJ, Alberti S.** 1999. Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: Its role in β -lactam antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* 181: 2726-2732.
- Domenech-Sanchez A, Martinez-Martinez L, Hernandez-Alles S, Conejo MC, Pascual A, Tomas JM, Alberti S, Benedi VJ.** 2003. Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 3332-3335.
- Donskey CJ.** 2004. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. *Clin. Infect. Dis.* 39: 219-226.

Dutzler R, Rummel G, Alberti S, Hernandez-Alles S, Phale PS, Rosenbusch JP, Benedi VJ, Schirmer T. 1999. Crystal structure and functional characterization of OmpK36, the osmoporin of *Klebsiella pneumoniae*. *Structure* 7: 425-434.

EARSS-Report 2005. Erhältlich unter www.rivm.nl/earss

Eisen D, Russell EG, Tymms M, Roper EJ, Grayson ML, Turnidge J. 1995. Random amplified polymorphic DNA and plasmid analyses used in investigation of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 33: 713-717.

Elliott E, Brink AJ, van Greune J, Els Z, Woodford N, Turton J, Warner M, Livermore DM. 2006. In vivo development of ertapenem resistance in a patient with pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* with an extended-spectrum β -lactamase. *Clin. Infect. Dis.* 42: 95-98.

Enne VI, Bennett PM, Livermore DM, Hall LMC. 2004. Enhancement of host fitness by the sul2-coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure. *J. Antimicrob. Chemother.* 53: 958-963.

EUCAST - the European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing. European Antimicrobial Breakpoints. <http://www.srga.org/eucastwt/MICTAB/index.html>

Falagas ME, Bliziotis IA, Kasiakou SK, Samonis G, Athanassopoulou P, Michalopoulos A. 2005. Outcome of infections due to pandrug-resistant (PDR) Gram-negative bacteria. *BMC Infect. Dis.* 5: 24-30.

Falagas ME, Kasiakou SK. 2005. Correct use of the term 'pan-drug-resistant' (PDR) Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 11: 1049-1050.

Falagas ME, Bliziotis IA. 2007. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *Int. J. Antimicrob. Agents*, doi:10.1016/j.ijantimicag.2006.12.012.

Filip C, Fletcher G, Wulff JL, Earhart CF. 1973. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl-sarcosinate. *J. Bacteriol.* 115: 717-722.

Fluit AC, Schmitz FJ. 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clin. Microbiol. Infect.* 10: 272-288.

Friedländer C. 1882. Über die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie. *Virchows Archive für Pathologische Anatomie und Physiologie* 87:319-324.

Gaillot O, Maruejols C, Abachin E, Lecuru F, Arlet G, Simonet M, Berche P. 1998. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase, originating from a contaminated ultrasonography coupling gel. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1357-1360.

Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. 2003. ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31: 3784-3788.

Gastmeier P, Groneberg K, Weist K, Rüden H. 2003. A cluster of nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in a neonatal intensive care department: Identification of transmission and intervention. *Am. J. Infect. Control* 31: 424-430.

Gastmeier P, Schwab F, Bärwolff S, Rüden H, Grundmann H. 2006. Correlation between the genetic diversity of nosocomial pathogens and their survival time in intensive care units. *J. Hosp. Infect.* 62: 181-186.

Gazouli M, Tsouvelekis LS, Prinarakis E, Miriagou V, Tzelepi E. 1996. Transferable cefoxitin resistance in enterobacteria from greek hospitals and characterization of a plasmid-mediated group 1 β -lactamase (LAT-2). *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1736-1740.

Gebreyes WA., Altier C. 2002. Molecular characterization of multidrug resistant *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Typhimurium isolates from swine. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2813-2822.

Geffers C, Zuschneid I, Sohr D, Rüden H, Gastmeier P. 2004. Erreger nosokomialer Infektionen auf Intensivstationen: Daten des Krankenhaus-Infektions-Surveillance-Systems (KISS) aus 274 Intensivstationen. *Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* 39: 15-19.

- Geffers C, Gastmeier P, Rüden H.** 2002. Nosokomiale Infektionen. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 8. Verlag Robert-Koch-Institut, Berlin.
- Glasmacher A, Hahn C, Fleischhack G, Marklein G, Walger P.** 2005. Penicillin-basierte Strategien der Antibiotika-Therapie. *Chemother. J.* 14: 198-206.
- Goldstein C, Lee MD, Sanchez S, Hudson C, Phillips B, Register B, Grady M, Liebert C, Summers AO, White DG; Maurer JJ.** 2001. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 723-726.
- Gontijo Filho PP, Stumpf M, Cardoso CL.** 1985. Survival of gram-negative and gram-positive bacteria artificially applied on the hands. *J. Clin. Microbiol.* 21: 652-653.
- Gouby A, Neuwirth C, Bourg G, Bouziges N, Carles-Nurit MJ, Despaux E, Ramuz M.** 1994. Epidemiological study by pulsed-field gel electrophoresis of an outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric hospital. *J. Clin. Microbiol.* 32: 301-305.
- Grkovic S, Brown MH, Skurray RA.** 2002. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 671-701.
- Gruteke P, Goessens W, van Gils J, Peerbooms P, Lemmens-den Toom N, van Santen-Verheувel M, van Belkum A, Verbrugh H.** 2003. Patterns of resistance associated with integrons, the extended-spectrum β -lactamase SHV-5 gene, and a multidrug efflux pump of *Klebsiella pneumoniae* causing a nosocomial outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1161-1166.
- Gundes S, Arisoy AE, Kolayli F, Karaali E, Turker G, Sanic A, Arisoy ES, Vahaboglu H.** 2005. An outbreak of SHV-5 producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit; meropenem failed to avoid fecal colonization. *New Microbiol.* 28: 231-236.
- Hacek DM, Cordell RL, Noskin GA, Peterson LR.** 2004. Computer-assisted surveillance for detecting clonal outbreaks of nosocomial infection. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1170-1175.
- Haeggman S, Löfdahl S, Burman LG.** 1997. An allelic variant of the chromosomal gene for class A β -lactamase K2, specific for *Klebsiella pneumoniae*, is the ancestor of SHV-1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 2705-2709.
- Haeggman S, Löfdahl S, Paaуw A, Verhoef J, Brisse S.** 2004. Diversity and evolution of the class A chromosomal β -Laktamase-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 2400-2408.
- Haeuw JF, Raulу I, Zanna L, Libon C, Andreoni C, Nguyen TN, Baussant T, Bonnefoy JY, Beck A.** 1998. The recombinant *Klebsiella pneumoniae* outer membrane protein OmpA has carrier properties for conjugated antigenic peptides. *Eur. J. Biochem.* 255: 446-454.
- Hall RM, Collis CM.** 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* 15: 593-600.
- Hammond ML.** 2004. Ertapenem: a group 1 carbapenem with distinct antibacterial and pharmacological properties. *J. Antimicrob. Chemother.* 53 (Suppl. S2): 7-9.
- Hancock REW, Chapple DS.** 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1317-1323.
- Hasdemir UO, Chevalier J, Nordmann P, Pages JM.** 2004. Detection and prevalence of active drug efflux mechanisms in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2701-2706.
- Heisig P.** 1996. Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 879-885.
- Henrichfreise B, Wiegand I, Sherwood KJ, Wiedemann B.** 2005. Detection of VIM-2 metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Germany. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 1668-1669.

- Heritage J, M'Zali FH, Gascoyne-Binzi D, Hawkey PM.** 1999. Evolution and spread of SHV extended-spectrum β -lactamases in gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 44: 309-318.
- Hernandez-Alles S, Alberti S, Rubires X, Merino S, Thomas JM, Benedi VJ.** 1995. Isolation of Fe3-11, a bacteriophage specific for the *Klebsiella pneumoniae* porin OmpK36, and its use for the isolation of porin-deficient mutants. *Can. J. Microbiol.* 34: 908-911.
- Hernandez-Alles S, Benedi VJ, Martinez-Martinez L, Pascual A, Aguilar A, Tomas JM, Alberti S.** 1999a. Development of resistance during antimicrobial therapy caused by insertion sequence interruption of porin genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 937-939.
- Hernandez-Alles S, Alberti S, Alvarez D, Domenech-Sanchez A, Martinez-Martinez L, Gil J, Tomas JM, Benedi VJ.** 1999b. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology* 145: 673-679.
- Hernandez-Alles S, Conejo MC, Pascual A, Tomas JM, Benedi VJ, Martinez-Martinez L.** 2000. Relationship between outer membrane alterations and susceptibility to antimicrobial agents in isogenic strains of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 46: 273-277.
- Holländer R, Ebke M, Barck H, von Pritzbuere E.** 2001. Asymptomatic carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase by patients in a neurological early rehabilitation unit: Management of an outbreak. *J. Hosp. Infect.* 48: 207-213.
- Hota B.** 2004. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? *Clin. Infect. Dis.* 39: 1182-1189.
- Howard C, van Daal A, Kelly G, Schooneveldt J, Nimmo G, Giffard PM.** 2002. Identification and minisequencing-based discrimination of SHV β -lactamases in nosocomial infection-associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 659-664.
- Hoyen CK, Pultz NJ, Paterson DL, Aron DC, Donskey CJ.** 2003. Effect of parenteral antibiotic administration on establishment of intestinal colonization in mice by *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 3610-3612.
- Huletsky A, Knox JR, Levesque RC.** 1993. Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of third-generation cephalosporins by SHV-type β -lactamase probed by site-directed mutagenesis and three-dimensional modeling. *J. Biol. Chem.* 268: 3690-3697.
- Huovinen P.** 2001. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clin. Infect. Dis.* 32: 1608-1614.
- Huppertz K, Noll I, Pfister W, Pietzcker T, Ziesing S, Wiedemann B.** 2005. ESBL-strains of *E. coli* and *K. pneumoniae* in GENARS hospitals. 2005. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen, April 2-5, 2005, Poster 791.
- Ikonomidis A, Tokatlidou D, Kristo I, Sofianou D, Tsakris A, Mantzana P, Pournaras S, Maniatis AN.** 2005. Outbreaks in distinct regions due to a single *Klebsiella pneumoniae* clone carrying *bla*_{VIM-1} metallo- β -lactamase gene. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5344-5347.
- Jacoby GA, Mills DM, Chow N.** 2004. Role of β -lactamases and porins in resistance to ertapenem and other β -lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 3203-3206.
- Kabha K, Nissimov L, Athamna A, Keisari Y, Parolis H, Parolis LAS, Grue RM, Schlepper-Schafer J, Ezekowitz ARB, Ohman DE, Ofek I.** 1995. Relationships among capsular structure, phagocytosis, and mouse virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 63:847-852.
- Kac G, Podglajen I, Vaupre S, Colardelle N, Buu-Hoi A, Gutmann L.** 2004. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated from environmental and clinical specimens in a cardiac surgery intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 25: 852-855.
- Kasiakou SK, Michalopoulos A, Soteriades ES, Samonis G, Sermaidis GJ, Falagas ME.** 2005. Combination therapy with intravenous Colistin for management of infections due to multidrug-resistant gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 3136-3146.

Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM. 2001. Medizinische Mikrobiologie. 10. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Kehrenberg C, Schwarz S. 2001. Occurrence and linkage of genes coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and chloramphenicol in bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*. FEMS Microbiol. Lett. 205: 283-290.

Kerr JR, Moore JE, Curran MD, Graham R, Webb CH, Lowry KG, Murphy PG, Wilson TS, Ferguson WP. 1995. Investigation of a nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in an intensive care unit by random amplification of polymorphic DNA assay. J. Hosp. Infect. 30: 125-131.

Keyes K, Hudson C, Maurer JJ, Thayer S, White DG, Lee MD. 2000. Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chicken. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 814-820.

Kim J, Kwon Y, Pai H, Kim JW, Cho DT. 1998. Survey of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum β -lactamases: prevalence of SHV-12 and SHV-2a in Korea. J. Clin. Microbiol. 36: 1446-1449.

Kim BN, Woo JH, Kim MN, Ryu J, Kim YS. 2002a. Clinical implications of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. J. Hosp. Infect. 52: 99-106.

Kim YK, Pai H, Lee HJ, Park SE, Choi EH, Kim J, Kim JH, Kim EC. 2002b. Bloodstream infections by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. Antimicrob. Agents Chemother. 46: 1481-1491.

Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi M. 1983. Transferable resistance to cefotaxime, ceftioxin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection 11: 315-317.

Koeck JL, Arlet G, Philippon A, Basmaciogullari S, Thien HV, Buisson Y, Cavallo JD. 1997. A plasmid-mediated CMY-2 β -lactamase from an Algerian clinical isolate of *Salmonella senftenberg*. FEMS Microbiol. Lett. 152: 255 – 260.

Kollef MH. 2000. Opinion: The clinical use of selective digestive decontamination. Crit. Care 4: 327-332.

Kresken M, Hafner D, Schmitz FJ, Wichelhaus TA. PEG-Resistenzstudie 2004. Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. Erhältlich unter: www.p-e-g.org

Kühn I, Ayling-Smith B, Tullus K, Burman LG. 1993. The use of colonization rate and epidemic index as tools to illustrate the epidemiology of faecal *Enterobacteriaceae* strains in Swedish neonatal wards. J. Hosp. Infect. 23:287-297.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Laksai Y, Severino M, Perilli M, Amicosante G, Bonfiglio G, Stefani S. 2000. First identification of an SHV-12 extended-spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Italy. J. Antimicrob. Chemother. 45: 349-351.

Lee HY, Cho B, Bae IK, Chang CL, Jeong SH. 2006. *Klebsiella pneumoniae* strains carrying the chromosomal SHV-11 β -lactamase gene produce the plasmid-mediated SHV-12 extended-spectrum β -lactamase more frequently than those carrying the chromosomal SHV-1 β -lactamase gene. J. Antimicrob. Chemother. 57: 1259-1261.

Lemmen SW, Häfner H, Zolldann D, Stanzel S, Lütticken R. 2004. Distribution of multi-resistant Gram-negative versus Gram-positive bacteria in the hospital inanimate environment. J. Hosp. Infect. 56: 191-197.

Levesque C, Piche L, Larose C, Roy PH. 1995. Mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 185-191.

Livermore DM. 1995. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin. Microbiol. Rev. 8: 557-584.

Livermore DM. 2005. Tigecycline: what is it, and where should it be used? *J. Antimicrob. Chemother.* 5: 611-614.

Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, Blais J, Cho D, Chamberland S, Renau T, Leger R, Hecker S, Watkins W, Hoshino K, Ishida H, Lee VJ. 2001. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 105-116.

Lou KL, Saint N, Prilipov A, Rummel G, Benson SA, Rosenbusch JP, Schirmer T. 1996. Structural and functional characterization of OmpF porin mutants selected for larger pore size. *J. Biol. Chem.* 271: 20669-20675.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall A. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

Mahillon J, Chandler M. 1998. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 725-774.

Makedou KG, Tsiakiri EP, Bisiklis AG, Chatzidimitriou M, Halvantzis AA, Ntoutsou K, Alexiou-Daniel S. 2005. Changes in antibiotic resistance of the most common Gram-negative bacteria isolated in intensive care units. *J. Hosp. Infect.* 60: 245-248.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Markowitz SM, Veazey JM Jr, Macrina FL, Mayhall CG, Lamb VA. 1980. Sequential outbreaks of infection due to *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: implication of a conjugative R plasmid. *J. Infect. Dis.* 142:106-112.

Martinez-Martinez L, Hernandez-Alles S, Alberti S, Thomas JM, Benedi VJ, Jacoby GA. 1996. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 342-348.

Martinez-Martinez L, Pascual A, Conejo MC, Garcia I, Joyanes P, Domenech-Sanchez A, Benedi VJ. 2002. Energy-dependent accumulation of Norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and relationship to extended-spectrum β -lactamase production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3926-3932.

Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. 2003. Interaction of plasmid and host quinolone resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 1037-1039.

Mazel D. 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 608-620.

Mazzariol A, Zuliani J, Cornaglia G, Rossolini GM, Fontana R. 2002. AcrAB efflux system: Expression and contribution to fluoroquinolone resistance in *Klebsiella* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3984-3986.

Meacham KJ, Zhang L, Foxman B, Bauer RJ, Marrs CF. 2003. Evaluation of genotyping large numbers of *Escherichia coli* isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5224-5226.

Mena A, Plasencia V, Garcia L, Hidalgo L, Ayestaran JI, Alberti S, Borrell N, Perez JL, Oliver A. 2006. Characterization of a large outbreak by CTX-M-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development. *J. Clin. Microbiol.* 44: 2831-2837.

Michalopoulos AS, Tsiodras S, Rellos K, Mentzelpoulos S, Falagas ME. 2004. Colistin treatment in patients with ICU-acquired infections caused by multiresistant Gram-negative bacteria: the renaissance of an old antibiotic. *Clin. Microbiol. Infect.* 11: 115-121.

Milislavljevic V, Wu F, Larson E, Rubenstein D, Ross B, Drusin LM, Della-Latta P, Saiman L. 2004. Molecular epidemiology of *Serratia marcescens* outbreaks in two neonatal intensive care units. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 25: 719-721.

- Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y Tulkens PM.** 1999. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 727-737.
- Miriagou V, Tzelepi E, Daikos GL, Tassios PT, Tzouvelekis LS.** 2005. Panresistance in VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob. Chemother.* 55: 810-811.
- Moodley P, Coovadia YM, Sturm AW.** 2005. Intravenous glucose preparation as the source of an outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in the neonatal unit of a regional hospital in KwaZulu-Natal. *SAMJ* 95: 861-864.
- Mutschler E.** 2001. *Arzneimittelwirkungen*. 8. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Naas T, Nordmann P, Vedel G, Poyart C.** 2005. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 4423-4424.
- Nikaido H.** 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 178: 5853-5859.
- Ng LK, Mulvey MR, Martin I, Peters GA, Johnson W.** 1999. Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian Isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 3018-3021.
- Ng LK, Martin I, Alfa M, Mulvey M.** 2001. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistance genes. *Molecular and Cellular Probes.* 15: 209-215.
- Nogrady N, Gado I, Paszti J, Kiraly M.** 2003. Analysis of gene cassettes of streptomycin-spectinomycin resistance of Hungarian *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. *Acta Vet Hung.* 51: 137-151.
- Noll I, Beer J, Huppertz K, Pfister W, Pietzcker T, Schubert S, Wichelhaus T, Ziesing S, Wiedemann B.** 2005. Multi-resistance in *K. pneumoniae*: Epidemiological results from the GENARS-project. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen, April 2-5, 2005, Poster 1060.
- Nüesch-Inderbinnen MT, Hächler H, Kayser FH.** 1996. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV β -lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15: 398-402.
- Nüesch-Inderbinnen MT, Kayser FH, Hächler H.** 1997. Survey and molecular genetics of SHV β -lactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 943-949.
- O'Callaghan CH, Muggleton EW, Ross GW.** 1968. Effects of β -lactamase of gram-negative organisms on cephalosporins and penicillins. p. 57-63. In: G. L. Hobby (ed.), *Antimicrob. Agents Chemother.* ASM, Bethesda.
- Ohana S, Leflon V, Ronco E, Rottman M, Guillemot D, Lortat-Jacob S, Denys P, Loubert G, Nicolas-Chanoine MH, Gaillard JL, Lawrence C.** 2005. Spread of a *Klebsiella pneumoniae* strain producing a plasmid-mediated ACC-1 AmpC beta-lactamase in a teaching hospital admitting disabled patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 2095-2097.
- Ohkawa T, Yoshinaga M, Ikarimoto N, Miyanojara H, Miyata K, Doi Y, Shibata N, Arakawa Y.** 2003. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains that produce CTX-M-2-type broad spectrum β -lactamase isolated from a child with leukemia. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 21: 260-262.
- Pai H, Kang CI, Byeon JH, Lee KD, Park WB, Kim HB, Kim EC, Oh M, Choe KW.** 2004. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3720-3728.
- Panhotra BR, Saxena AK, Al-Mulhim AS.** 2005. Contamination of patients' files in intensive care units: an indication of strict handwashing after entering case notes. *Am. J. Infect. Control* 33: 398-401.
- Panknin HT, Schwemmler K, Vogel F.** 2001. Nosokomiale Infektionen auf operativen Intensivstationen – Ursachen und Prävention. *Medizin im Dialog* 1/2001.

- Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H, Von Gottberg A, Mohapatra S, Trenholme GM, Klugman KP, McCormack JG, Yu VL.** 2000. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum β -lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* 30: 473-478.
- Paterson DL, Bonomo RA.** 2005. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 657-686.
- Paulsen IT, Littlejohn TG, Radstrom P, Sundstrom L, Skold O, Swedberg G, Skurray RA.** 1993. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 761-768.
- Payne DJ, Woodford N, Amyes SGB.** 1992 Characterization of the plasmid mediated β -lactamase BIL-1. *J. Antimicrob. Chemother.* 30: 119-127.
- Pena C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Linares J, Ariza J, Gudiol F.** 1998. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 55-58.
- Podschun R, Ullmann U.** 1998. *Klebsiella* ssp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:89-603.
- Podschun R, Pietsch S, Höller C, Ullmann U.** 2001. Incidence of *Klebsiella* species in surface water and their expression of virulence factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3325-3327.
- Poirel L, Heritier C, Podglajen I, Sougakoff W, Gutmann L, Nordmann P.** 2003. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a chromosome-encoded SHV β -lactamases that compromises the efficiency of imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 755-758.
- Poirel L, Heritier C, Spicq C, Nordmann P.** 2004. In vivo acquisition of high-level resistance to imipenem in *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3831-3833.
- Pragai Z, Nagy E.** 1998. In-vitro selection of porin-deficient mutants of two strains of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibilities to meropenem, but not to imipenem. *J. Antimicrob. Chemother.* 42: 821-824.
- Prodinger WM, Fille M, Bauernfeind A, Stemplinger I, Amann S, Pfausler B, Lass-Flörl C, Dierich MP.** 1996. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 β -lactamase: Parallel outbreaks due to multiple plasmid transfer. 1996. *J. Clin. Microbiol.* 34: 564-568.
- Quale JM, Landman D, Bradford PA, Visalli M, Ravishankar J, Flores C, Mayorga D, Vangala K, Adejeji A.** 2002. Molecular epidemiology of a citywide outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infection. *Clin. Infect. Dis.* 35: 834-841.
- Rice LB, Carias LL, Hujer AM, Bonafede M, Hutton R, Huyen C, Bonomo RA.** 2000. High-Level expression of chromosomally encoded SHV-1 β -lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to Ceftazidime and Piperacillin-Tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 362-367.
- Ritter E, Bauernfeind A, Becker-Boost E, Fiehn A, Stöcker H, Wirsing von König CH, Finger H.** 1992. Ausbruch einer nosokomialen Infektion durch SHV-2-Betalaktamase-bildende *Klebsiella-pneumoniae*-Stämme in einer operativen Intensivstation. *Immun. Infekt.* 20: 3-6.
- Roberts MC.** 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol. Rev.* 19: 1-24.
- Roberts MC.** 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 245: 195-203.
- Rodloff AC, Goldstein EJC, Torres A.** 2006. Two decades of imipenem therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 58: 916-929.

- Ruzin A, Visalli MA, Keeney D, Bradford PA.** 2005. Influence of transcriptional activator RamA on expression of multidrug efflux pump AcrAB and Tigecycline susceptibility in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 1017-1022.
- Sadowski PL, Peterson BC, Gerding DN, Cleary PP.** 1979. Physical characterization of 10 R plasmids obtained from an outbreak of nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15:616-624
- Sahly H, Podschun R, Oelschlaeger TA, Greiwe M, Parolis H, Hasty D, Kekow J, Ullman U, Ofek I, Sela S.** 2000. Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 68: 6744-6749.
- Saiki RK, Scharf SJ, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N.** 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1352.
- Salyers AA, Shoemaker NB, Stevens AM, Li LY.** 1995. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol. Rev.* 59: 579-590.
- Sandvang D, Aarestrup FM, Jensen LB.** 1997. Characterization of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol. Lett.* 157: 177-181.
- Schmitz FJ.** 2006. Ertapenem als Therapieoption. *Chemother. J.* 15: 57-68.
- Schneiders T, Amyes SGB, Levy SB.** 2003. Role of AcrR and RamA in fluoroquinolone resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Singapore. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 2831-2837.
- Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckert A.** 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florphenicol. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 519-542.
- Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH.** 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* 57: 138-163.
- Sherwood KJ.** 2000. Molekulare Mechanismen der Multiresistenz bei *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Sherwood KJ.** 2004. Evolution der Multiresistenz bei *Escherichia coli*. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Silva J, Gatica R, Aguilar C, Becerra Z, Garza-Ramos U, Velazquez M, Miranda G, Leanos B, Solorzano F, Echaniz G.** 2001. Outbreak of infection with extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican hospital. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3193-3196.
- Sirinavin S, Hotrakitya S, Suprasongsin C, Wannaying B, Pakeecheep S, Vorachit M.** 1991. An outbreak of *Salmonella urbana* infection in neonatal nurseries. *J. Hosp. Infect.* 18: 231-238.
- Sköld O.** 2001. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet. Res.* 32: 261-273.
- Song W, Lee KM, Kim HS, Kim JS, Kim J, Jeong SH, Roh KH.** 2006. Clonal spread of both oxyiminocephalosporin- and cefoxitin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates co-producing SHV-2a and DHA-1 beta-lactamase at a burns intensive care unit. *Int. J. Antimicrob. Agents* 28: 520-524.
- Soulier A, Barbut F, Ollivier JM, Petit JC, Lienhart A.** 1995. Decreased transmission of *Enterobacteriaceae* with extended-spectrum β -lactamases in an intensive care unit by nursing reorganization. *J. Hosp. Infect.* 31: 89-97.
- Steinbrecher E, Sohr D, Nassauer A, Daschner F, Rüden H, Gastmeier P.** 2000. Die häufigsten Erreger bei Intensivpatienten mit nosokomialen Infektionen. *Chemother J.* 9:179-83.

Steward CD, Rasheed JK, Hubert SK, Biddle JW, Raney PM, Anderson GJ, Williams PP, Brittain KL, Oliver A, McGowan JE Jr, Tenover FC. 2001. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum β -lactamase detection methods. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2864-2872.

Struve C, Krogfelt KA. 2004. Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Environ. Microbiol.* 6: 584-590.

Su LH, Leu SH, Chiu YP, Chia JH, Kuo AJ, Sun CF, Lin TY, Wu TL and the infection control group. 2000. Molecular investigation of two clusters of hospital-acquired bacteremia caused by multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* using pulsed-field gel electrophoresis and infrequent restriction site PCR. *J. Hosp. Infect.* 46: 110-117.

Szabo D, Silveira F, Hujer AM, Bonomo RA, Hujer KM, Marsh JW, Bethel CR, Doi Y, Deeley K, Paterson DL. 2006. Outer membrane protein changes and efflux pump expression together may confer resistance to ertapenem in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 2833-2835.

Talbot GH, Bradley J, Edwards JE, Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG. 2006. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 42: 657-668.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2233-2239.

Tomas JM, Benedi VJ, Ciurana B, Jofre J. 1986. Role of capsule und O antigen in resistance of *Klebsiella pneumoniae* to serum bactericidal activity. *Infect. Immun.* 54: 85-89.

Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. 2005. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:118-125.

Traub WH, Schwarze I, Bauer D. 2000. Nosocomial outbreak of cross-infection due to multiple-antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae*: characterization of the strain and antibiotic susceptibility studies. *Chemotherapy* 46: 1-14.

Trevisan V. 1885. Caratteri di alcuni nuovi generi di Bacteriaceae. *Atti. Accad. fis.-med-stat. Milano ser. 4, 3:* 92-106.

Tumbarello M, Spanu T, Sanguinetti M, Citton R, Montuori E, Leone F, Fadda G, Cauda R. 2006. Blood-stream infections caused by extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*: risk factors, molecular epidemiology, and clinical outcome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 498-504.

Vakulenko SB, Mobashery S. 2003. Versality of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 430-450.

Valverde A, Coque TM, Sanchez-Moreno MP, Rollan A, Baquero F, Canton R. 2004. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4769-4775.

Van Bambeke F, Glupczynski Y, Plesiat P, Pechere JC, Tulkens PM. 2003. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 1055-1065.

Vassort-Bruneau C, Lesage-Descauses MC, Martel JL, Lafont JP, Chalus-Dancla E. 1996. CATIII chloramphenicol resistance in *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolated from calves. *J. Antimicrob. Chemother.* 38: 205-213.

Versalovic J, Koeth T, Lupski JR. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19: 6823-6831.

- Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoin MH, Wolff M, Spencer RC, Hemmer M.** 1995. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA*. 274 :639-644.
- Vogel F, Bodmann KF und die Expertenkommission der PEG.** 2004. Empfehlungen zur kalkulierten parenteralen Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen. *Chemother. J.* 13: 47-103.
- Wachino J, Kurokawa H, Yamane K, Shibata N, Kimura K, Ike Y, Arakawa Y.** 2006. Horizontal transfer of *bla*_{CMY}-bearing plasmids among clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates and emergence of cefepime-hydrolyzing CMY-19. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 534-541.
- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P.** 2005. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 306-325.
- Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC.** 2003. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 2242-2248.
- Ward ME, Woodford N, Warner M, Pike R, Palepou MF, Kaufmann ME, Turton J, Eltringham I, Livermore DM.** 2005. Carbapenem-resistant, CTX-M-producing *Klebsiella pneumoniae* in the UK. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen, April 2–5, 2005, P 1266. *Clin. Microbiol. Infect.* 11 (Suppl. 2): Abstract.
- Wei ZQ, Du XX, Yu YS, Shen P, Chen Y, Li LJ.** 2007. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 763-765.
- Wiegand I.** 1997. Epidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen von plasmidkodierten β -Laktamasen mit erweitertem Wirkspektrum in Deutschland. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Wiegand I, Geiss HK, Mack D, Stürenburg E, Seifert H.** 2007. Detection of extended-spectrum β -lactamases among *Enterobacteriaceae* using semi-automated microbiology systems and manual detection procedures. *J. Clin. Microbiol.* doi:10.1128./JCM.01988-06.
- Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ.** 2005. Development of a multiplex PCR assay for genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen, April 2–5, 2005, P 470. *Clin. Microbiol. Infect.* 11 (Suppl. 2): Abstract.
- Woodford N, Dallow JW, Hill RL, Palepou MF, Pike R, Ward ME, Warner M, Livermore DM.** 2007. Ertapenem resistance among *Klebsiella* and *Enterobacter* submitted in the UK to a reference laboratory. *Int J Antimicrob Agents.* 2007, doi: 10.1016./j.ijantmicag.2006.11.020.
- Yan JJ, Ko WC, Tsai SH, Wu HM, Wu JJ.** 2001. Outbreak of infection with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{IMP-8} in a university medical center in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 39: 4433-4439.
- Yatsuyanagi J, Saito S, Harata S, Suzuki N, Ito Y, Amano K, Enomoto K.** 2004. Class 1 integron containing metallo- β -lactamase gene *bla*_{VIM-2} in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 626-628.
- Ygit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC.** 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1151-1161.
- Young VB, Schmidt TM.** 2004. Antibiotic-associated diarrhea accompanied by large-scale alterations in the composition of the fecal microbiota. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1203-1206.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A	Alanin
AAC	N-Acetyltransferase
AAD	O-Nukleotidyltransferase
Abb.	Abbildung
A.demin.	demineralisiertes Wasser
AI	Anästhesiologische Intensivstation
Ala	Alanin
AME	Aminoglykosid-modifizierendes Enzym
ANT	O-Nukleotidyltransferase
APS	Ammoniumpersulfat
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
C	Cystein
°C	Grad Celsius
CI	Chirurgische Intensivstation
CLA	Clavulansäure
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Zentimeter
CNS	Chirurgische Normalstation
D	Guanin + Adenin + Thymin (IUB-Code)
D	Aspartat
Da	Dalton
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	Glutamat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESBL	extended-spectrum β -lactamase
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
F	Phenylalanin
G	Guanin
Glu	Glutamat
G	Glycin
g	Gramm
Gly	Glycin
H	Cytosin + Adenin + Thymin (IUB-Code)

H	Histidin
h	Stunden
HCl	Hydrochlorid
I	Isoleucin
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IfSchG	Infektions-Schutz-Gesetz
Ile	Isoleucin
IUB	International Union of Biochemistry
K	Guanin + Thymin (IUB-Code)
K	Lysin
kDa	Kilodalton
KI	Kardi chirurgische Intensivstation
kb	Kilobasenpaare (1000 Basenpaare)
KBE	Kolonie bildende Einheit
KNS	Kardiologische Normalstation
l	Liter
L	Leucin
LB	Lysogeny Broth (Nährmedium nach Bertani)
Lys	Lysin
M	molar
M	Adenin + Cytosin (IUB-Code)
M	Methionin
m	Meter
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MH	Mueller Hinton
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MI	Intensivstation Innere Medizin
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
N	Cytosin + Guanin + Adenin + Thymin (IUB-Code)
N	Asparagin
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
No.	number
OD _[Index]	Optische Dichte bei [Index] nm Wellenlänge
OSBL	original-spectrum β-lactamase
P	Prolin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
Phe	Phenylalanin
pI	isoelektrischer Punkt
Q	Glutamin
QRDR	quinolone-resistance determining region
R	Guanin + Adenin (IUB-Code)

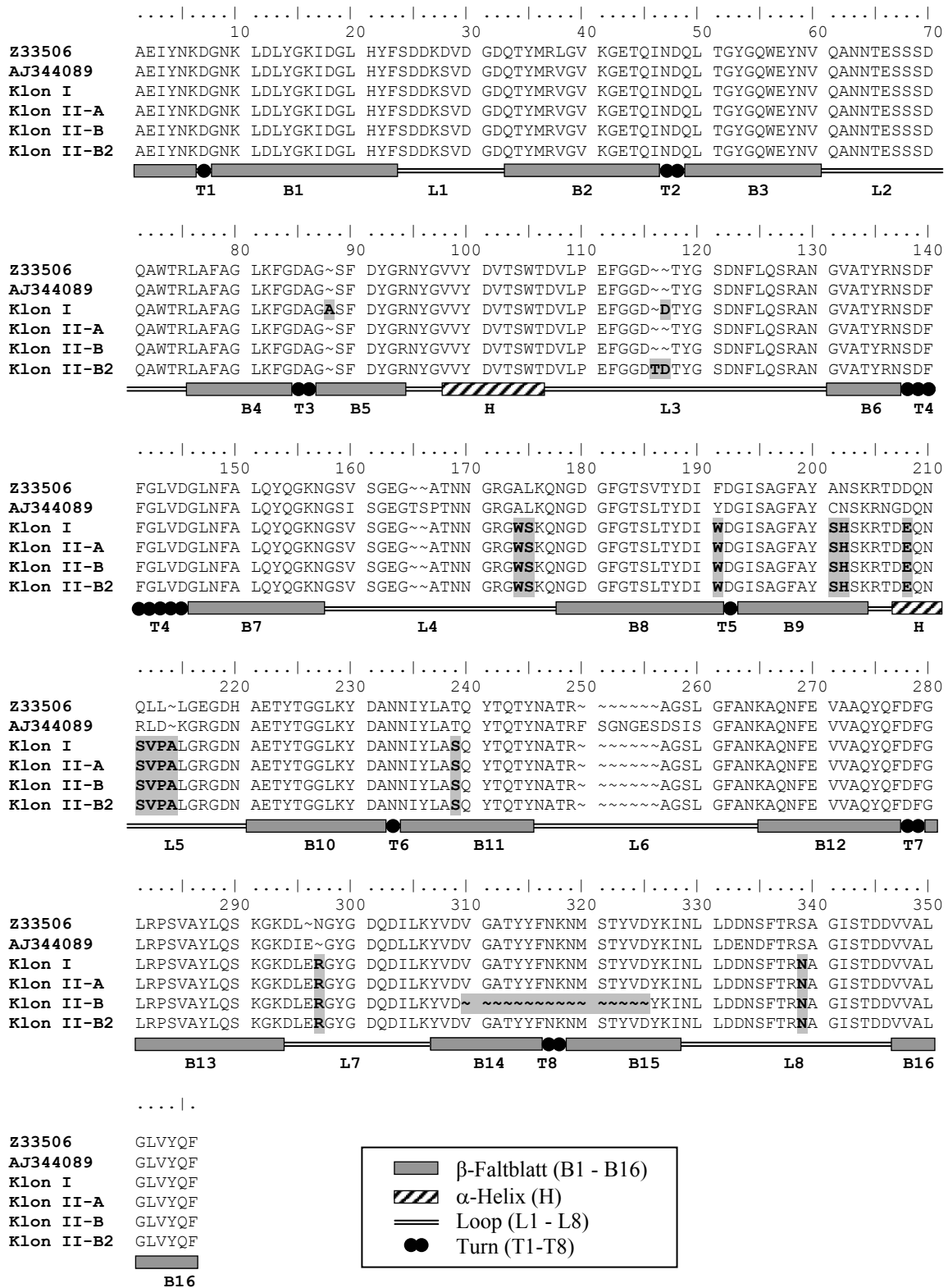
R	Arginin
Rif ^R	Rifampicin-resistent
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S	Cytosin + Guanin (IUB-Code)
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunden
Ser	Serin
SFM	Société Française de Microbiologie
sp.	Spezies (Singular)
spp.	Spezies (Plural)
ssp.	Subspezies (Unterart)
SUL	Sulbactam
T	Threonin
Tab.	Tabelle
TAB	Tazobactam
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Trizma Base)
U	Unit
UNS	Urologische Normalstation
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Cytosin + Guanin + Adenin (IUB-Code)
V	Volt
V	Valin
Val	Valin
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
W	Adenin + Thymin (IUB-Code)
W	Tryptophan
WT	Wildtyp
Y	Cytosin + Thymin (IUB-Code)
Y	Tyrosin
ZVK	zentraler Venenkatheter

7.2 Verzeichnis der Kurzzeichen für Antibiotika

Die hier angegebenen Kurzzeichen für antimikrobielle Chemotherapeutika entsprechen dem Codierungssystem nach DIN 58940-20.

AMK	Amikacin
AMS	Ampicillin + Sulbactam
CAZ	Ceftazidim
CIP	Ciprofloxacin
CLI	Clindamycin
CMP	Chloramphenicol
CRO	Ceftriaxon
CTX	Cefotaxim
CXM	Cefuroxim
DOX	Doxycyclin
ERY	Erythromycin
FOS	Fosfomycin
GEN	Gentamicin
LEV	Levofloxacin
LIZ	Linezolid
MER	Meropenem
MOX	Moxifloxacin
MTR	Metronidazol
PEN	Penicillin
PIS	Piperacillin + Sulbactam
PIT	Piperacillin + Tazobactam
STR	Streptomycin
SUL	Sulbactam
SXT	Co-trimoxazol
TEI	Teicoplanin
TOB	Tobramycin
VAN	Vancomycin

7.3 Aminosäure-Sequenz-Alignment des Porins OmpK36



Aufgeführt sind die Sequenzen der Klone I, II-A, II-B und II-B2 im Vergleich mit zwei in der GenBank veröffentlichten OmpK36-Sequenzen von *K. pneumoniae* (GenBank Accession No. Z33506, AJ344089). Die Signalsequenzen (Aminosäuren 1 - 21) wurden nicht dargestellt. In dieser Arbeit nachgewiesene Aminosäure-Austausche, Insertionen und Deletionen, die in keiner der beiden veröffentlichten funktionalen Proteinsequenzen auftreten, sind grau unterlegt. Unter den Sequenzen ist die Sekundärstruktur angegeben (nach ALBERTI et al., 1995).

7.4 Aminosäure-Sequenz-Alignment des Porins OmpK35

```

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      10      20      30      40      50      60
AJ011501 MMKRNILAVV IPALLVAGAA NAAEIYNKNG NKLDIFYGKMV GEHVWTTNGD TSSDDTTYAR
Klon II  MMKRNILAVV IPALLVAGAA NAAEIYNKNG NKLDIFYGKMV GEHVWTTNGD TSSDDTTYAR
Klon I   MMKRNILAVG DPCPAGSRCS QRCRNL ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      70      80      90      100     110     120
AJ011501 IGLKGETQIN DQLIGYGQWE YNMDASNVEG SQTTKTRLAF AGLKAGEYGS FDYGRNYGAI
Klon II  IGLKGETQIN DQLIGYGQWE YNMDACVQC ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
Klon I   ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      130     140     150     160     170     180
AJ011501 YDVEAATDML VEWGGDGWNY TDNYMTGRTN GVATYRNSDF FGLVDGLSFA LQYQGKNDHD
Klon II  ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
Klon I   ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      190     200     210     220     230     240
AJ011501 RAIRKQNGDG FSTAATYAFD NGIALSAGYS SSNRSVDQKA DGNGDKAEAW ATSAKYDANN
Klon II  ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
Klon I   ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      250     260     270     280     290     300
AJ011501 IYAAVMYSQT YNMTPEEDNH FAGKTQNFEA VVQYQFDFGL RPSIGYVQTK GKDLQSRAGF
Klon II  ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
Klon I   ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      310     320     330     340     350
AJ011501 SGGDADLVKY IEVGTWYYFN KNMNVYAAAYK FNQLDDNDYT KAAGVATDDQ AAVGIVYQF
Klon II  ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
Klon I   ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~

```

Aufgeführt sind die Sequenzen der Klone I und II im Vergleich mit einer in der GenBank veröffentlichten OmpK35-Sequenz von *K. pneumoniae* (GenBank Accession No. AJ011501). Die Sequenzen der Stämme II-A, II-B, II-B2 und II-C sind identisch und wurden daher als Klon II bezeichnet. Dargestellt sind die OmpK35-Sequenzen einschließlich der Signalsequenz (Aminosäuren 1 - 22). Aminosäure-Austausche, die in dieser Arbeit nachgewiesen wurden, sind grau unterlegt.

7.5 Aminosäure-Sequenz-Alignment des Repressors AcrR

```

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      10          20          30          40          50          60
AJ318073 MARKTKQAR ETRQLILDVA LRLFSQQGVS STSLATIACA AGVTRGAIYW HFKNKSDLFN
Klon I    MARKTKQAR ETRQLILDVA LRLFSQQGVS STSLATIACA AGVTRGAIYW HFKNKSDLFN
Klon II  MARKTKQAR ETRQLILDVA LRLFSQQGVS STSLATIACA AGVTRGLSTG ISRINQIYST

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      70          80          90          100         110         120
AJ318073 EIWELSDASI SDLEIEYRAK FPNDPLSVIR EILVYVLEAT VTEERRRLMM EIIYHKCEFV
Klon I    EIWELSDASI SDLEIEYRAK FPNDPLSVIR EILVYVLEAT VTEERRRLMM EIIYHKCEFV
Klon II  KFGSCQTPVL AISKLSIGQN SPTIHSQLSG RF.....

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      130         140         150         160         170         180
AJ318073 GEMTVVQQAQ RQLSLASYER IEQTLKECIA AKLLPANLLT PRAGVLMRSY LFRMLMENWLF
Klon I    GEMTVVQQAQ RQLSLASYER IEQTLKECIA AKLLPANLLT RRAAVLMRSY LSGLMENWLF
Klon II  .....

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      190         200         210
AJ318073 APDSFDLHAE ARDYLAFLLE KYQFCPTLRG PESLSA
Klon I    APDSFDLHAE ARDYVAFLLE MYQFCPTLRG PESLSA
Klon II  .....

```

Aufgeführt sind die Sequenzen der Klone I und II im Vergleich mit einer in der GenBank veröffentlichten AcrR-Sequenz von *K. pneumoniae* (GenBank Accession No. AJ318073). Die Sequenzen der Stämme II-A, II-B, II-B2 und II-C sind identisch und wurden daher als Klon II bezeichnet. Aminosäure-Austausche, die in dieser Arbeit nachgewiesen wurden, sind grau unterlegt.

7.6 PFGE-Fragmentmuster der untersuchten *K.-pneumoniae*-Isolate

In den Abbildungen 7.1 - 7.7 sind die PFGE-Fragmentmuster der 74 untersuchten *K.-pneumoniae*-Isolate dargestellt. Über dem Gel sind die jeweils aufgetragenen Stämme angegeben, unter dem Gel das zugehörige PFGE-Muster. Einige Stämme wurden wiederholt aufgetragen, um schlecht sichtbare Bandenmuster zu verifizieren. Das Kürzel "M" bezeichnet den Stamm I-05111, der auf jedes Gel als Marker aufgetragen wurde.

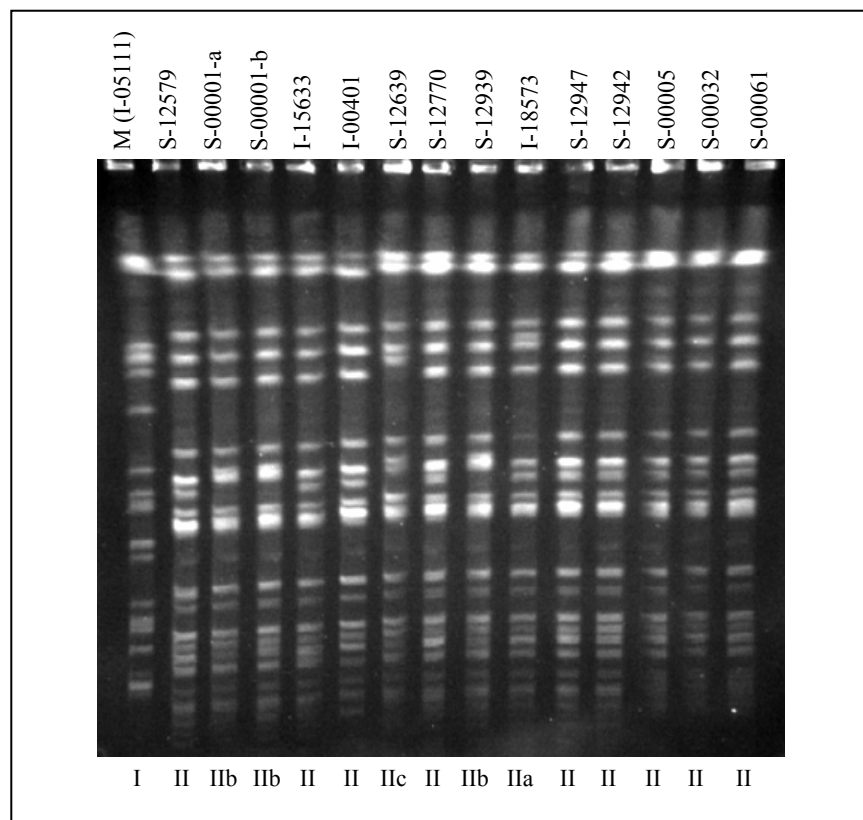


Abb. 7.1: PFGE-Gel 1

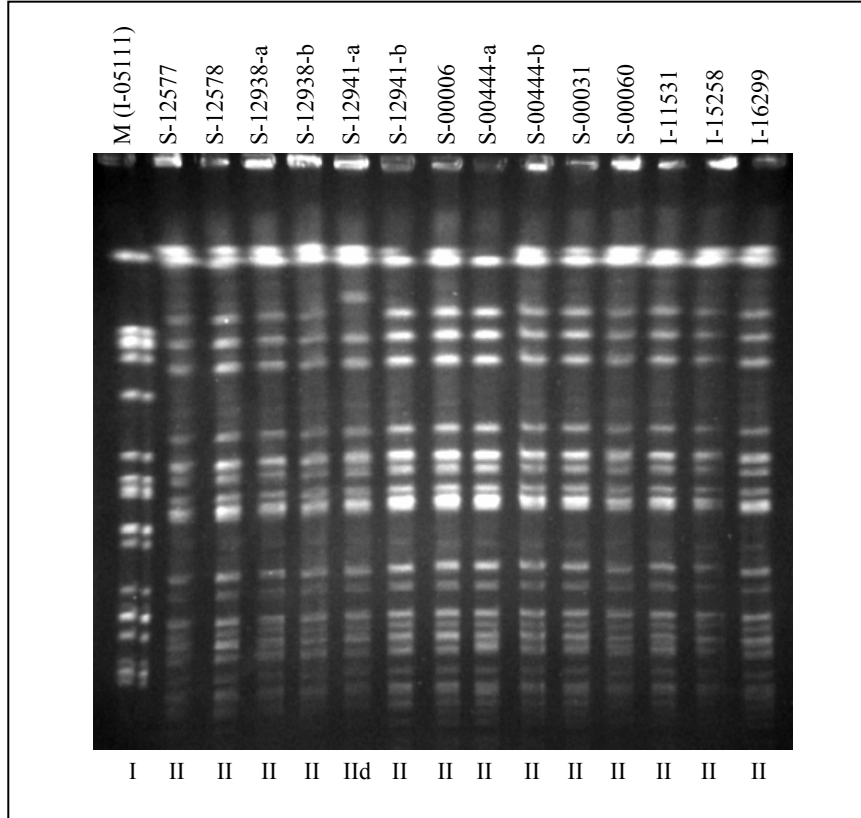


Abb. 7.2: PFGE-Gel 2

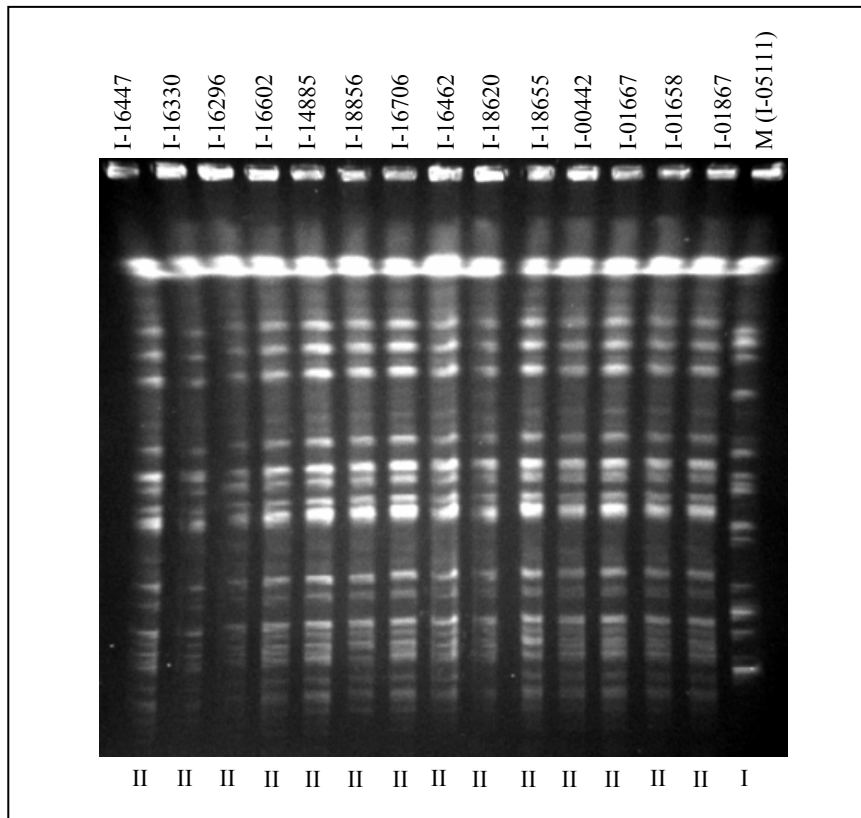


Abb. 7.3: PFGE-Gel 3

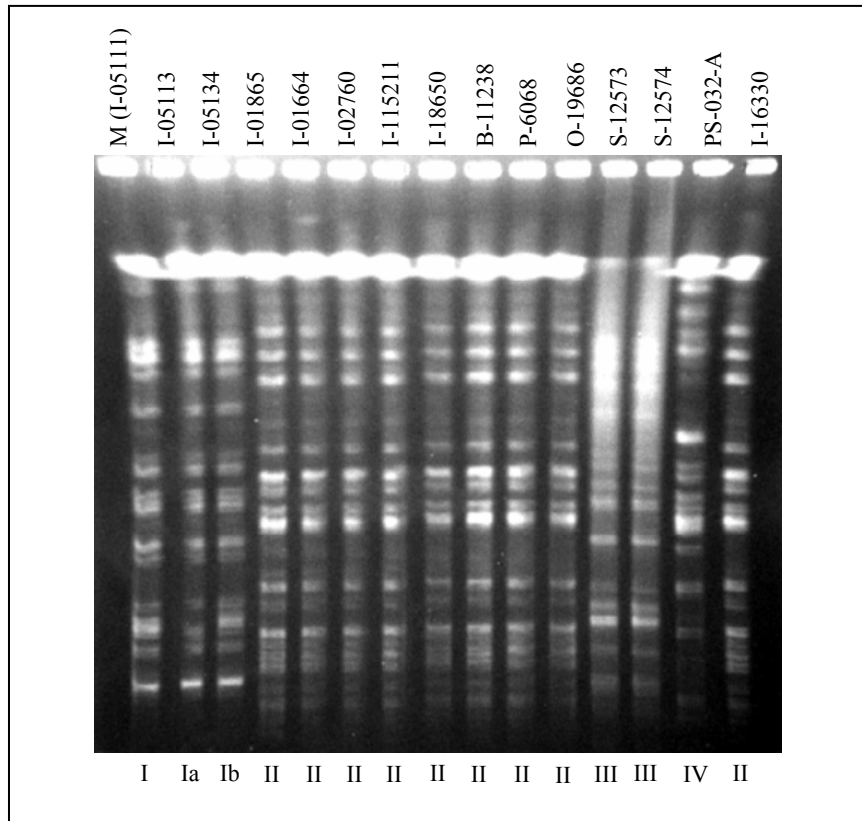


Abb. 7.4: PFGE-Gel 4

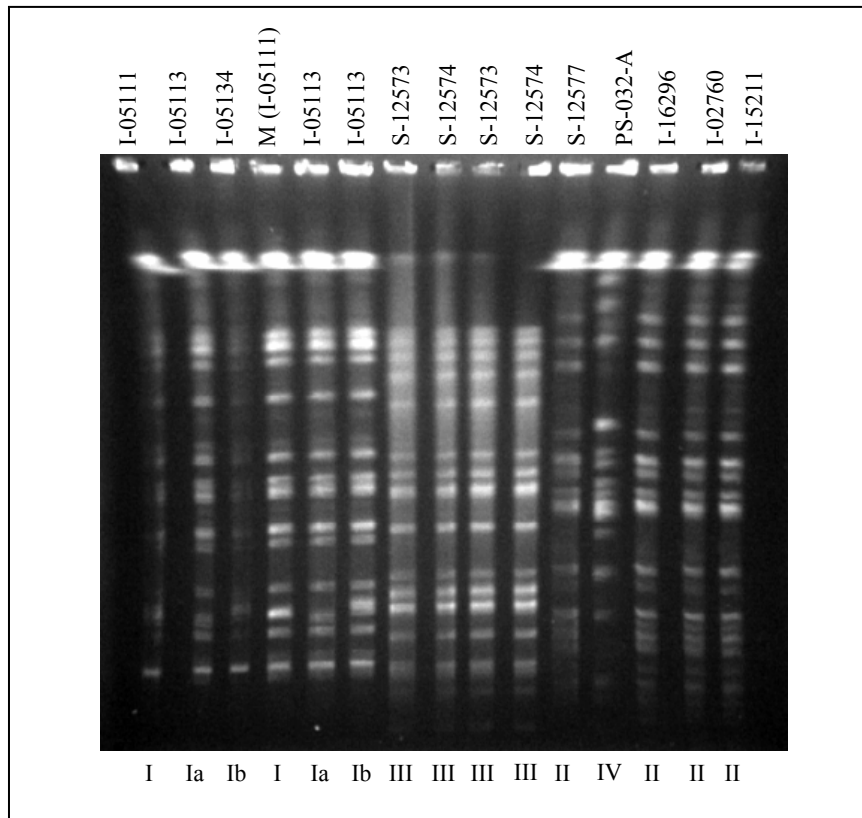


Abb. 7.5: PFGE-Gel 5

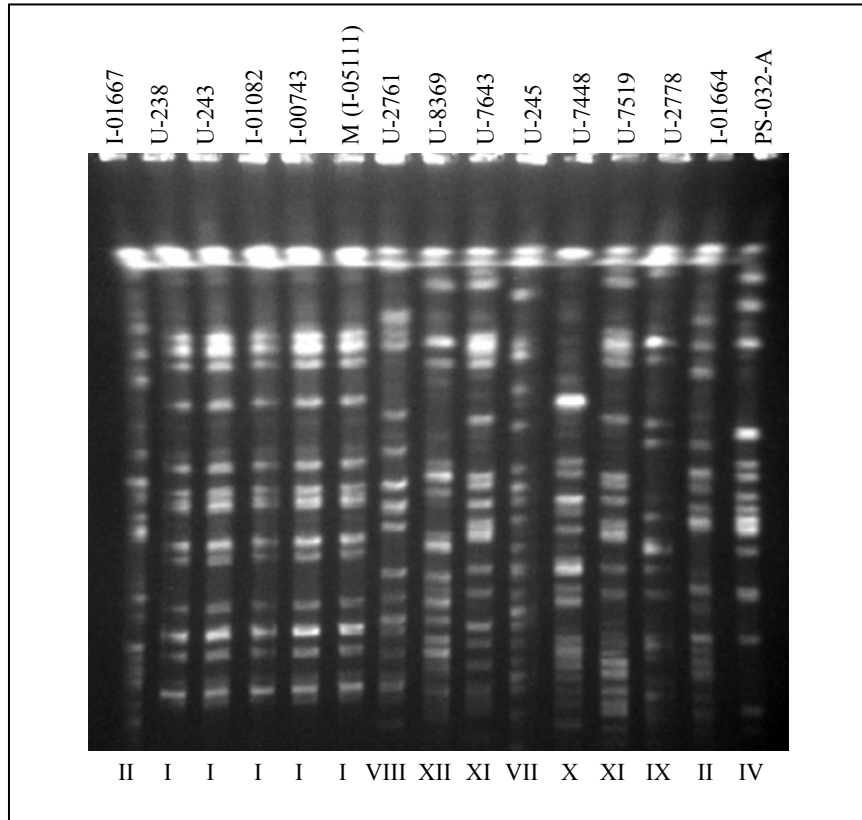


Abb. 7.6: PFGE-Gel 6

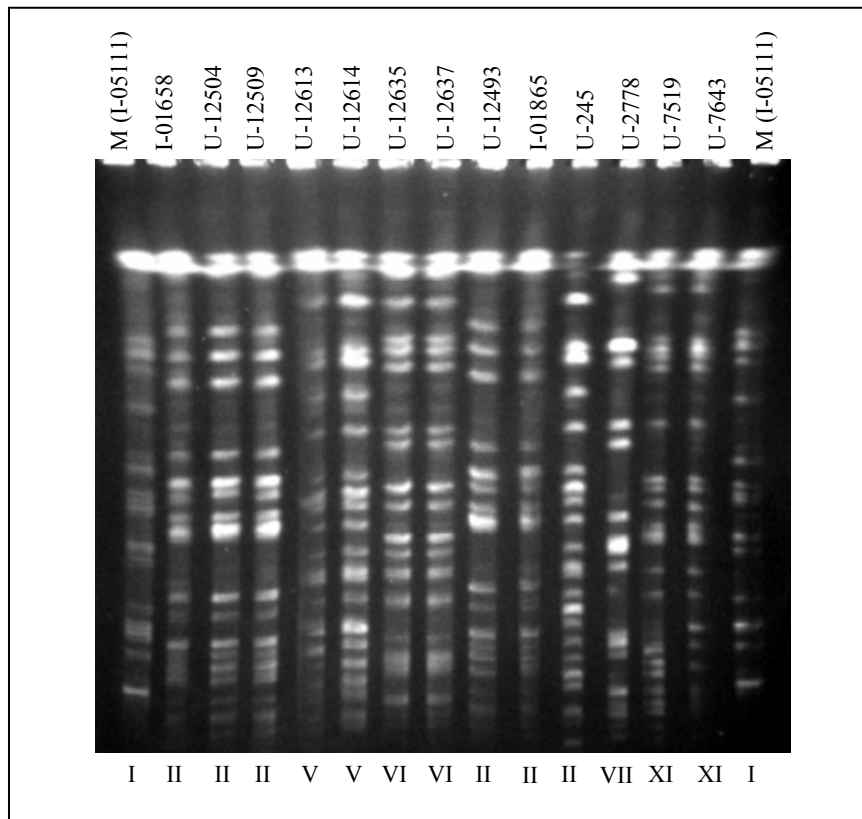


Abb. 7.7: PFGE-Gel 7

7.7 Datentabellen ausgewählter Patienten des zweiten Ausbruchs

Abkürzungen in den Tabellen 7.1 bis 7.8:	
NS = Normalstation	<u>Abstrichmaterial:</u>
CNS = chirurgische Normalstation	R = Rachenabstrich
AI = anästhesiologische Intensivstation	T = Trachealsekret
CI = chirurgische Intensivstation	BS = Bronchialsekret
KI = kardiochirurgische Intensivstation	N = Nasenabstrich
MI = medizinische Intensivstation	W = Wundabstrich
ext KKH = externes Krankenhaus	L = Liquor
	KS = Katheterspitze
BAA = Bauchaorten-Aneurysma	SK = Sheldon-Katheter
MOV = multiples Organversagen	AK = Arterien-Katheter
	ZVK = zentraler Venenkatheter
<u>Mikrobiologische Ergebnisse:</u>	BK = Blasenkatheeter
K-II = Klon II (Klon II-A, wenn nicht näher bez.)	D = Drainage
a = andere Spezies	A = Analabstrich
kw = kein Wachstum	V = Vaginalabstrich
- = kein Abstrich	U = Urethra
	H = Haaransatzabstrich
<u>Beatmung:</u>	<u>Antibiotika-Abkürzungen nach DIN:</u>
OT = oraler Tubus	s. Anhang 7.2
TK = Trachealkanüle	

Tab. 7.1: Datentabelle des Patienten ST-02

Datum	Station	Mikrobiolog. Ergebnisse	Material mit Klon II	Material ohne Klon II	Antibiotika	Beatmung	Bemerkungen	Tag
28.11.03	CI	-			AMS	OT		1
29.11.03	CI	-			AMS	OT	Aufnahme von ext KKH (Notfall: Lungenembolie)	2
30.11.03	CI	-			AMS	OT		3
01.12.03	CI	kw		T, R	PIS, MTR	OT		4
02.12.03	CI	-			PIS, MTR	OT		5
03.12.03	CI	-			PIS, MTR	OT		6
04.12.03	CI	a, kw		T, R, KS	PIS, LEV	OT		7
05.12.03	CI	-			PIS, LEV	OT		8
06.12.03	CI	-			PIS, LEV	OT		9
07.12.03	CI	-			PIS, LEV	OT		10
08.12.03	CI	kw		T, R, KS	PIS, LEV	OT		11
09.12.03	CI	a		SK	PIS, LEV	OT		12
10.12.03	CI	-			PIS, LEV	OT		13
11.12.03	CI	kw		T	PIS, LEV	OT		14
12.12.03	CI	-			PIS, LEV	OT		15
13.12.03	CI	kw		T, R, KS	PIS, LEV	OT		16
14.12.03	CI	-			PIS, LEV	OT		17
15.12.03	CI	-			PIS, LEV	OT		18
16.12.03	CI	a		Stuhl	CAZ, SUL, CIP	OT	Isolat S-12574	19
17.12.03	CI	kw		Blut	CAZ, SUL, CIP	OT	kein Klon II im Stuhl	20
18.12.03	CI	kw		T, R	CAZ, SUL, CIP, TEI	OT		21
19.12.03	CI	kw		SK, ZVK	CAZ, SUL, CIP	OT		22
20.12.03	CI	kw		AK	CAZ, SUL, CIP	OT		23
21.12.03	CI	-			CAZ, SUL, CIP	OT		24
22.12.03	CI	a, kw		T, R	CAZ, SUL, CIP	OT		25
23.12.03	CI	-			CAZ, SUL, CIP	OT		26
24.12.03	CI	-			CAZ, SUL, CIP	OT		27
25.12.03	CI	-			CAZ, SUL, CIP	OT		28
26.12.03	CI	-			CAZ, SUL, CIP	OT		29
27.12.03	CI	-			CAZ, SUL, CIP	-		30
28.12.03	CI	-			CAZ, SUL, CIP	OT		31
29.12.03	CI	a		T, R	CAZ, SUL, CIP	OT		32
30.12.03	CI	-			-	OT		33
31.12.03	CI	-			-	OT		34
01.01.04	CI	-			-	OT		35
02.01.04	CI	a		SK, R	-	-		36
03.01.04	CI	-			-	-		37
04.01.04	CI	-			-	-		38
05.01.04	CI	a		R	-	-		39
06.01.04	CI	kw		ZVK	-	-		40
07.01.04	CI	-			-	-	Verlegung nach ext KKH	41

Tab. 7.2: Datentabelle des Patienten AI-03

Datum	Station	Mikrobiolog. Ergebnisse	Material mit Klon II	Material ohne Klon II	Antibiotika	Beatmung	Bemerkungen	Tag
10.07.03	CI	a, kw		R, T, KS	MER, FOS	OT	Aufnahme von MI	1
11.07.03	CI	-			MER, FOS, CAZ, SUL	OT		2
12.07.03	CI	-			FOS, CAZ, SUL	OT		3
13.07.03	CI	-			FOS, CAZ, SUL, VAN	-		4
14.07.03	CI	a, kw		W, N, R, H, A, U	FOS, CAZ, SUL, VAN	-	Verlegung nach	5
15.07.03	CNS	-			FOS, VAN	-	CNS	6
16.07.03	CNS	a		R, N, V	FOS, VAN	-		7
17.07.03	CNS	-			FOS, VAN	-		8
18.07.03	CNS	a		N, R, W, H, U	FOS, VAN	-		9
19.07.03	CNS	-			FOS, VAN	-		10
20.07.03	CNS	a		W	FOS, VAN	-		11
21.07.03	CNS	a, kw		U, W, N, R, H	FOS, VAN	-		12
22.07.03	CNS	a, kw		V, W, N, R, H	FOS, VAN	-		13
23.07.03	CNS	a, kw		R, N, H	FOS, VAN	-		14
24.07.03	AI	-			CAZ, CIP, LIZ	OT	von CNS	15
25.07.03	AI	a, kw		A, W, N, R, H	CAZ, CIP, LIZ	OT	(septische Haut-	16
26.07.03	AI	-			CAZ, SUL, CIP, LIZ	OT	nekrosen)	17
27.07.03	AI	-			CAZ, SUL, CIP, LIZ	-		18
28.07.03	AI	a, kw		A, W, N, R, H	CAZ, SUL, CIP, LIZ	-		19
29.07.03	AI	-			CAZ, SUL, CIP, LIZ	-		20
30.07.03	AI	-			CAZ, SUL, CIP, LIZ	OT		21
31.07.03	AI	kw		N, R	CAZ, SUL, CIP, LIZ	OT		22
01.08.03	AI	-			CAZ, SUL, CIP, LIZ	OT		23
02.08.03	AI	-			CAZ, SUL, CIP, LIZ	OT		24
03.08.03	AI	-			CAZ, SUL, CIP, LIZ	OT		25
04.08.03	AI	a, kw		N, R, T, W	CAZ, SUL, CIP, LIZ	OT		26
05.08.03	AI	-			CAZ, SUL, CIP, LIZ	OT		27
06.08.03	AI	kw		T	CAZ, SUL, CIP, LIZ	OT		28
07.08.03	AI	a, kw		R, N, T, H, W, A, V, U, Blut	CAZ, SUL, CIP, LIZ	OT		29
08.08.03	AI	kw		ZVK	GEN, VAN	OT		30
09.08.03	AI	-			GEN, VAN	OT		31
10.08.03	AI	-			GEN, VAN, CLI	OT		32
11.08.03	AI	K-II, a, kw	W	W, N, R, H, T, U, Blut	GEN, VAN, CLI	OT	Nachweis Klon II	33
12.08.03	AI	-			GEN, VAN, CLI, FOS	OT		34
13.08.03	AI	-			GEN, VAN, CLI, FOS	OT		35
14.08.03	AI	K-II, a	T, R, N		CTX, SUL, CLI, FOS	OT		36
15.08.03	AI	-			CTX, SUL, CLI, FOS	OT		37
16.08.03	AI	-			CTX, SUL, CLI, FOS, LIZ	OT		38
17.08.03	AI	K-II, a	W	W	CTX, SUL, CLI, FOS, LIZ	OT		39
18.08.03	AI	K-II, a	R, N, KS	T	LEV, SXT, LIZ	OT		40
19.08.03	AI	-			LEV, SXT, LIZ	OT		41
20.08.03	AI	K-II, a	T, R, N, W, ZVK		LEV, SXT, LIZ, MER	OT		42
21.08.03	AI	K-II, a	W		LEV, SXT, LIZ, MER	OT		43
22.08.03	AI	-			LEV, SXT, LIZ, MER	OT		44
23.08.03	AI	-			LEV, SXT, LIZ, MER	OT		45
24.08.03	AI	-			LEV, SXT, LIZ, MER	OT		46
25.08.03	AI	K-II, a	N	A	LEV, LIZ, MER	OT		47
26.08.03	AI	-			LEV, LIZ, MER	OT		48
27.08.03	AI	K-II, a	V		MER, AMK	OT		49
28.08.03	AI	K-II, a, kw	N, R, W	T, H, A	MER, AMK, CLI	OT		50
29.08.03	AI	-			MER, AMK, CLI	OT		51
30.08.03	AI	-			MER, AMK, CLI	OT		52
31.08.03	AI	-			MER, AMK	OT		53
01.09.03	AI	K-II, a	N	T	MER, AMK	OT		54
02.09.03	AI	kw		W, ZVK	MER, AMK	OT		55
03.09.03	AI	-			MER, AMK	OT		56
04.09.03	AI	K-II, a	N, R	N, T	MER, AMK	OT		57
05.09.03	AI	-			MER, AMK	OT		58
06.09.03	AI	-			MER, AMK	OT		59
07.09.03	AI	-			MER, AMK	OT		60
08.09.03	AI	a	N, R	T	MER, AMK, CIP	OT		61
09.09.03	AI	-			MER, AMK, CIP	OT		62
10.09.03	AI	-			MER, AMK, CIP	OT		63
11.09.03	AI	a, kw		T, D	MER, AMK, CIP	OT		64
12.09.03	AI	-			MER, AMK, CIP	OT		65
13.09.03	AI	-			MER, AMK, CIP	OT		66
14.09.03	AI	-			-	OT		67
15.09.03	AI	K-II, a	R	T	-	OT		68
16.09.03	AI	-			-	OT		69
17.09.03	AI	-			-	OT		70
18.09.03	AI	K-II, a	T, R		-	OT		71
19.09.03	AI	-			-	OT		72
20.09.03	AI	-			-	OT		73
21.09.03	AI	-			-	OT		74
22.09.03	AI	K-II, a, kw	R, W	N	-	OT		75
23.09.03	AI	-			-	-		76
24.09.03	AI	-			-	-		77
25.09.03	AI	a	N, R		-	-		78
26.09.03	AI	K-II, a	Blut!		AMS, AMK	-		79
27.09.03	AI	-			AMS, AMK, MER, CIP	OT		80
28.09.03	AI	-			AMK, MER, CIP	OT	schwere Sepsis	81
29.09.03	AI	-			AMK, MER, CIP	OT	Tod: sept. MOV	82

Tab. 7.3: Datentabelle des Patienten AI-04

Datum	Station	Mikrobiolog. Ergebnisse	Material mit Klon II	Material ohne Klon II	Antibiotika	Beatmung	Bemerkungen	Tag
13.08.03	AI	a, kw		N, R, H, W	MER, CIP	OT	Aufnahme von	1
14.08.03	AI	a, kw		R, T	MER, CIP	OT	Innere Medizin NS	2
15.08.03	AI	kw		Punktat	MER, CIP	OT	(septischer Thorax)	3
16.08.03	AI	-			MER, CIP	OT		4
17.08.03	AI	-			MER, CIP	OT		5
18.08.03	AI	a, kw		R, T, Dialysat	MER, CIP	OT		6
19.08.03	AI	-			MER, CIP	OT		7
20.08.03	AI	-			MER, CIP	OT		8
21.08.03	AI	a, kw		R, T	MER, CIP	OT		9
22.08.03	AI	kw		R	MER, CIP	OT		10
23.08.03	AI	-			PIS, LEV	OT		11
24.08.03	AI	-			PIS, LEV	OT		12
25.08.03	AI	a, kw		T, R, W	PIS, LEV	OT		13
26.08.03	AI	kw		L	PIS, LEV	OT		14
27.08.03	AI	kw		Aszites	PIS, LEV, FOS	OT		15
28.08.03	AI	a, kw		T, R, N	PIS, LEV, FOS	OT		16
29.08.03	AI	kw		L	PIS, LEV, FOS	OT		17
30.08.03	AI	-			PIS, LEV, FOS	OT		18
31.08.03	AI	-			PIS, LEV, FOS	OT		19
01.09.03	AI	a, kw		N, R, T, H, L	PIS, LEV, FOS	OT		20
02.09.03	AI	-			PIS, LEV, FOS	OT		21
03.09.03	AI	a		ZVK, SK	PIS, LEV, FOS	OT		22
04.09.03	AI	a, kw		W, R, Aszites	PIS, LEV, FOS	-		23
05.09.03	AI	-			CAZ, SUL, LEV, FOS	-		24
06.09.03	AI	-			CAZ, SUL, LEV, FOS	OT		25
07.09.03	AI	-			CAZ, SUL, CRO, LEV, FOS	OT		26
08.09.03	AI	a, kw		T, R, N, Aszites	CAZ, SUL, CRO, LEV, LIZ	OT		27
09.09.03	AI	K-II, kw	W	Aszites	CRO, SUL, LEV, LIZ	OT	Nachweis Klon II	28
10.09.03	AI	-			CRO, SUL, LEV, LIZ	OT		29
11.09.03	AI	K-II, a	Drainage	R, N	CRO, SUL, LEV, LIZ	OT		30
12.09.03	AI	kw		Aszites	CRO, SUL, LEV, LIZ, MER	OT		31
13.09.03	AI	-			CRO, SUL, LEV, LIZ, MER	OT		32
14.09.03	AI	-			CRO, SUL, LIZ, MER	OT		33
15.09.03	AI	K-II, a, kw	R, N	T, R, N, Dialysat	CRO, SUL, LIZ, MER	OT		34
16.09.03	AI	-			MER, GEN	OT		35
17.09.03	AI	kw		Aszites	MER, GEN, VAN	OT		36
18.09.03	AI	K-II, a, kw	R	T, U	MER, GEN	OT		37
19.09.03	AI	-			MER, GEN	OT		38
20.09.03	AI	-			MER, GEN	OT		39
21.09.03	AI	-			MER, GEN	OT		40
22.09.03	AI	K-II, a, kw	R, N	T	MER, GEN	OT		41
23.09.03	AI	-			MER, GEN	OT		42
24.09.03	AI	-			MER, GEN, LIZ	OT		43
25.09.03	AI	K-II, a	R	N	MER, GEN, LIZ	OT		44
26.09.03	AI	kw		Aszites	MER, GEN, LIZ	OT		45
27.09.03	AI	-			MER, GEN, LIZ	OT		46
28.09.03	AI	-			MER, GEN, LIZ	OT		47
29.09.03	AI	K-II, a, kw	R	T, U	MER, GEN, LIZ	OT		48
30.09.03	AI	-			MER, GEN, LIZ	OT		49
01.10.03	AI	K-II, a, kw	T, R, N	L	MER, LIZ	OT		50
02.10.03	AI	a, kw		KS, U, W	MER, LIZ	OT		51
03.10.03	AI	-			MER, LIZ	OT		52
04.10.03	AI	a		W	MER, LIZ	OT		53
05.10.03	AI	-			MER, LIZ	OT		54
06.10.03	AI	K-II-B, a	T, R, N	U	MER, LIZ	OT	Klon II-B	55
07.10.03	AI	-			CAZ, SUL, LEV	OT	in T, R, N	56
08.10.03	AI	-			CAZ, SUL, LEV	OT		57
09.10.03	AI	K-II, a	T, R	W	CAZ, SUL, LEV	OT		58
10.10.03	AI	-			CAZ, SUL, LEV	OT		59
11.10.03	AI	-			CAZ, SUL, LEV	OT		60
12.10.03	AI	-			CAZ, SUL, LEV	OT		61
13.10.03	AI	K-II, a, kw	T, R, N	ZVK	CAZ, SUL, LEV	OT		62
14.10.03	AI	-			CAZ, SUL, CTX, TOB	OT		63
15.10.03	AI	-			CAZ, SUL, CTX, TOB	OT		64
16.10.03	AI	K-II, a	T, R, N		CTX, SUL, TOB	OT		65
17.10.03	AI	-			CTX, SUL, TOB	OT		66
18.10.03	AI	K-II, a	Abdomen		CTX, SUL, TOB, LIZ	OT		67
19.10.03	AI	-			CTX, SUL, TOB, LIZ	OT		68
20.10.03	AI	K-II, a	D, T, R, N	D	CTX, SUL, TOB, LIZ	OT	Isolat I-15633	69
21.10.03	AI	-			CTX, SUL, TOB, LIZ	OT		70
22.10.03	AI	-			CRO, SUL, AMK, LIZ	OT		71
23.10.03	AI	K-II, a	T, R		CRO, SUL, AMK, LIZ, MER	OT		72
24.10.03	AI	-			CRO, SUL, LIZ, MER	OT		73
25.10.03	AI	-			CRO, SUL, LIZ, MER	OT		74
26.10.03	AI	-			CRO, SUL, LIZ, MER	OT		75
27.10.03	AI	K-II, a	R	T	CRO, SUL, LIZ, MER, CIP	OT		76
28.10.03	AI	-			MER, CIP	OT		77
29.10.03	AI	-			MER, CIP	OT		78
30.10.03	AI	K-II, a	R	T, R	MER, CIP	TK		79

Fortsetzung Tab. 7.3: Datentabelle des Patienten AI-04

Datum	Station	Mikrobiolog. Ergebnisse	Material mit Klon II	Material ohne Klon II	Antibiotika	Beatmung	Bemerkungen	Tag
31.10.03	AI	-			MER, CIP	TK		80
01.11.03	AI	-			MER, CIP	TK		81
02.11.03	AI	-			MER, CIP	TK		82
03.11.03	AI	K-II, a	T, R		MER, CIP, MOX	TK		83
04.11.03	AI	-			MER, MOX	TK		84
05.11.03	AI	-			MER, MOX	TK		85
06.11.03	AI	K-II, a	T, R		MER, MOX	TK		86
07.11.03	AI	-			MER, MOX	TK		87
08.11.03	AI	-			MER, MOX	TK		88
09.11.03	AI	-			MER, MOX	TK		89
10.11.03	AI	K-II, a	R	T, U	MER, MOX	TK		90
11.11.03	AI	a, kw		BK, SK, ZVK	FOS, SXT	TK		91
12.11.03	AI	-			FOS, SXT	TK		92
13.11.03	AI	K-II, a	R, N	T	FOS, SXT	TK		93
14.11.03	AI	-			FOS, SXT	TK		94
15.11.03	AI	-			FOS, SXT	TK		95
16.11.03	AI	-			FOS, SXT	TK		96
17.11.03	AI	K-II, a	T, R		FOS, SXT	TK		97
18.11.03	AI	-			FOS, SXT	TK		98
19.11.03	AI	K-II, a	T, R, N		FOS, SXT	TK		99
20.11.03	AI	-			FOS, SXT	TK		100
21.11.03	AI	-			FOS, SXT	TK		101
22.11.03	AI	-			FOS, SXT	TK		102
23.11.03	AI	-			FOS, SXT	TK		103
24.11.03	AI	K-II, a	T, R, N	W	FOS, SXT	TK		104
25.11.03	AI	K-II, a, kw	D	W	FOS, SXT	TK		105
26.11.03	AI	-			FOS, SXT, MER	TK		106
27.11.03	AI	K-II, a	T, R		FOS, SXT, MER, LEV	TK		107
28.11.03	AI	-			MER, LEV	TK		108
29.11.03	AI	-			MER, LEV	TK		109
30.11.03	AI	-			MER, LEV	TK		110
01.12.03	AI	K-II, a, kw	R, N	T, W	MER, LEV	TK		111
02.12.03	AI	-			MER, LEV, AMK	TK		112
03.12.03	AI	-			MER, AMK	TK		113
04.12.03	AI	a		T, R	MER, AMK	TK	Kein Klon II mehr in	114
05.12.03	AI	-			MER, AMK	TK	Abstrichen	115
06.12.03	AI	-			MER, AMK	TK		116
07.12.03	AI	-			MER, AMK	TK		117
08.12.03	AI	a		N, R, T	MER, AMK	TK		118
09.12.03	AI	-			MER, AMK	-		119
10.12.03	AI	-			MER, AMK	-		120
11.12.03	AI	a, kw		T, R, U, SK, ZVK	MER, AMK	-		121
12.12.03	AI	-			MER, AMK	-		122
13.12.03	AI	-			MER, AMK	-		123
14.12.03	AI	-			MER, AMK	-		124
15.12.03	AI	a, kw		R, N, W	MER, AMK, VAN	-		125
16.12.03	AI	a	Stuhl: Klon II-B	U	MER, AMK	-	Isolat S-12579	126
17.12.03	AI	-			MER, AMK	-	Klon II-B im Stuhl	127
18.12.03	AI	a, kw		N, R	MER, AMK	-		128
19.12.03	AI	-			MER, AMK, VAN	-		129
20.12.03	AI	-			MER	-		130
21.12.03	AI	-			MER	-		131
22.12.03	AI	a, kw		U, N, R	MER, LIZ	-		132
23.12.03	AI	-			MER, LIZ	-		133
24.12.03	AI	-			MER, LIZ	-		134
25.12.03	AI	-			MER, LIZ	-		135
26.12.03	AI	-			MER, LIZ	-		136
27.12.03	AI	-			MER, LIZ	-		137
28.12.03	AI	-			MER, LIZ	-		138
29.12.03	AI	a, kw		R, N	MER, LIZ	-		139
30.12.03	AI	-			MER, LIZ	-		140
31.12.03	AI	-	Stuhl: Klon II-B		MER, LIZ	-	Isolat S-00001	141
01.01.04	AI	-			MER, LIZ	-		142
02.01.04	AI	K-II, a, kw	R	W, N, H	MER, LIZ	-	Klon II erneut in	143
03.01.04	AI	-			MER, LIZ	-	Abstrichen	144
04.01.04	AI	-			MER, LIZ	-		145
05.01.04	AI	K-II, a, kw	R	H, N	MER, LIZ	-		146
06.01.04	AI	kw		KS	MER, LIZ	-		147
07.01.04	AI	-			MER, LIZ	-		148
08.01.04	AI	K-II, a, kw	R	H	MER, LIZ	-	Isolat I-00401	149
09.01.04	AI	kw		SK	MER, LIZ	TK		150
10.01.04	AI	kw		W	-	TK		151
11.01.04	AI	-			-	TK		152
12.01.04	AI	a, kw		T, N	-	TK		153
13.01.04	AI	-			-	TK		154
14.01.04	AI	-			-	-		155
15.01.04	AI	K-II	R, N		-	-		156
16.01.04	AI	-			-	-	Verl. nach Innere NS	157

Tab. 7.4: Datentabelle des Patienten AI-10

Datum	Station	Mikrobiolog. Ergebnisse	Material mit Klon II	Material ohne Klon II	Antibiotika	Beatmung	Bemerkungen	Tag
21.08.03	AI	a, kw		T, R, N, H, L	CRO, FOS, CIP	OT	Aufnahme (Meningitis, Sepsis)	1
22.08.03	AI	-			CRO, FOS, CIP	OT		2
23.08.03	AI	a		T, R, N, H, L	CRO, FOS, CIP	OT		3
24.08.03	AI	-			CRO, FOS, LEV	OT		4
25.08.03	AI	a, kw		T, R, U	PIS, FOS, LEV	OT		5
26.08.03	AI	-			PIS, FOS, LEV	OT		6
27.08.03	AI	-			PIS, FOS, LEV	OT		7
28.08.03	AI	a, kw		T, R, N	PIS, FOS, LEV	OT		8
29.08.03	AI	a		T	PIS, FOS, LEV	OT		9
30.08.03	AI	kw		L	PIS, FOS, LEV	OT		10
31.08.03	AI	-			PIS, FOS, LEV	OT		11
01.09.03	AI	a, kw		Blut, R, T	CAZ, SUL, CIP	OT		12
02.09.03	AI	a, kw		ZVK, SK, AK	CAZ, SUL, CIP	OT		13
03.09.03	AI	kw		L	CAZ, SUL, CIP, FOS	OT		14
04.09.03	AI	a		T, R	CAZ, SUL, CIP, FOS	OT		15
05.09.03	AI	-			CAZ, SUL, CIP, FOS	OT		16
06.09.03	AI	-			CAZ, SUL, CIP, FOS	OT		17
07.09.03	AI	-			CAZ, SUL, CIP, FOS	OT		18
08.09.03	AI	a		T, R, N	CAZ, SUL, CIP, FOS	OT		19
09.09.03	AI	-			MER, FOS, LEV, VAN, MTR	OT		20
10.09.03	AI	-			MER, FOS, LEV, VAN, MTR	OT		21
11.09.03	AI	a		T, R, N	MER, FOS, LEV, MTR	OT		22
12.09.03	AI	-			MER, FOS, LEV, MTR	OT		23
13.09.03	AI	-			-	OT		24
14.09.03	AI	-			-	OT		25
15.09.03	AI	a, kw		T, N, Blut	-	OT		26
16.09.03	AI	a		U	-	OT		27
17.09.03	AI	-			PIS, CIP	OT		28
18.09.03	AI	a		U, T, R	PIS, CIP	OT		29
19.09.03	AI	-			PIS, CIP	OT		30
20.09.03	AI	a		KS	PIS, CIP	OT		31
21.09.03	AI	-			PIS, CIP	OT		32
22.09.03	AI	a		T, R, N, U	PIS, CIP	OT		33
23.09.03	AI	-			PIS, CIP	OT		34
24.09.03	AI	-			PIS, CIP	OT		35
25.09.03	AI	a		T, U	PIS, CIP	OT		36
26.09.03	AI	-			PIS, CIP	OT		37
27.09.03	AI	-			PIS, CIP	OT		38
28.09.03	AI	-			-	OT		39
29.09.03	AI	a		T, R	CAZ, SUL	OT		40
30.09.03	AI	-			CAZ, SUL	OT		41
01.10.03	AI	a		T, R, N, ZVK	CAZ, SUL, ERY	OT		42
02.10.03	AI	-			CAZ, SUL, ERY	OT		43
03.10.03	AI	-			CAZ, SUL	OT		44
04.10.03	AI	-			CAZ, SUL	OT		45
05.10.03	AI	-			CAZ, SUL	OT		46
06.10.03	AI	a		U, W, N	CAZ, SUL	OT		47
07.10.03	AI	-			-	OT		48
08.10.03	AI	-			PIS, CIP	OT		49
09.10.03	AI	a		R	PIS, CIP	OT		50
10.10.03	AI	-			PIS, CIP	OT		51
11.10.03	AI	-			PIS, CIP	OT		52
12.10.03	AI	-			PIS, CIP	OT		53
13.10.03	AI	a		T, R, N, U	CAZ, SUL, CIP, VAN	OT		54
14.10.03	AI	-			CAZ, SUL, VAN	OT		55
15.10.03	AI	-			CAZ, SUL, VAN	OT		56
16.10.03	AI	K-II, a	T		CAZ, SUL, VAN	OT	Nachweis Klon II	57
17.10.03	AI	-			CAZ, SUL, VAN	OT		58
18.10.03	AI	-			CAZ, SUL, VAN, LEV	OT		59
19.10.03	AI	-			CAZ, SUL, VAN, LEV	OT		60
20.10.03	AI	K-II, a	T, R	T	CAZ, SUL, VAN, LEV	OT		61
21.10.03	AI	-			CAZ, SUL, VAN, CRO, MOX	OT		62
22.10.03	AI	a		T	CRO, MOX, AMK	OT		63
23.10.03	AI	a		T, R	MER, MOX	OT		64
24.10.03	AI	-			MER, MOX	OT		65
25.10.03	AI	-			MER, MOX	OT		66
26.10.03	AI	-			MER, MOX	OT		67
27.10.03	AI	a		T, R, N, Thorax	MER, MOX	OT		68
28.10.03	AI	-			MER, MOX	OT		69
29.10.03	AI	K-II, a	ZVK	KS	MER, MOX	OT		70

Fortsetzung Tab. 7.4: Datentabelle des Patienten AI-10

Datum	Station	Mikrobiolog. Ergebnisse	Material mit Klon II	Material ohne Klon II	Antibiotika	Beatmung	Bemerkungen	Tag
30.10.03	AI	a, kw		T, W	MER, MOX	OT		71
31.10.03	AI	-			MER, MOX	OT		72
01.11.03	AI	-			MER, MOX	OT		73
02.11.03	AI	-			MER, MOX	OT		74
03.11.03	AI	K-II, a	Thorax, V	T, R, Thorax	MER, MOX, TEI	OT		75
04.11.03	AI	-			MER, MOX, TEI	OT		76
05.11.03	AI	a		R	MER, MOX, TEI	OT		77
06.11.03	AI	K-II, a	R, V	ZVK, T	MER, MOX, TEI	OT		78
07.11.03	AI	-			MER, MOX, TEI	OT		79
08.11.03	AI	-			MER, MOX	OT		80
09.11.03	AI	-			MER, MOX	OT		81
10.11.03	AI	K-II-B, a, kw	R	T, U, D	MER, MOX	OT	Klon II-B in R	82
11.11.03	AI	-			CAZ, SUL, SXT	OT		83
12.11.03	AI	-			CAZ, SUL, SXT	OT		84
13.11.03	AI	K-II-B, K-II, a	R, Thorax, N	U, T, Thorax	CAZ, SUL, SXT	OT	Klon II-B in R	85
14.11.03	AI	-			CAZ, SUL, SXT, TEI	OT		86
15.11.03	AI	-			CAZ, SUL, SXT	OT		87
16.11.03	AI	-			CAZ, SUL, SXT	OT		88
17.11.03	AI	K-II, a	R	U, T	CAZ, SUL, SXT	OT		89
18.11.03	AI	a		W	CAZ, SUL, SXT	OT		90
19.11.03	AI	K-II, a	R, BS	Thorax	CAZ, SUL, SXT	OT		91
20.11.03	AI	-			CAZ, SUL, SXT	OT		92
21.11.03	AI	a		W	CAZ, SUL, SXT, TEI	OT		93
22.11.03	AI	a		SK	CAZ, SUL, SXT	OT		94
23.11.03	AI	-			CAZ, SUL, SXT	OT		95
24.11.03	AI	K-II, a	R, N	T	CAZ, SUL, SXT	OT		96
25.11.03	AI	K-II, a	BS		CAZ, SUL, SXT	OT		97
26.11.03	AI	-			CAZ, SUL, SXT, TEI	OT		98
27.11.03	AI	K-II, a	T, R, W	U	MER, LEV	OT	Kein Klon II mehr in	99
28.11.03	AI	-			MER, LEV, TEI	OT	Abstrichen	100
29.11.03	AI	-			MER, LEV	OT		101
30.11.03	AI	-			MER, LEV, TEI	OT		102
01.12.03	AI	a		T, R, N, V, A	MER, LEV	OT		103
02.12.03	AI	a		U	MER, LEV, TEI	OT		104
03.12.03	AI	-			MER, LEV	OT		105
04.12.03	AI	a		T, R, U	MER, AMK, TEI	OT		106
05.12.03	AI	-			MER, AMK	OT		107
06.12.03	AI	-			MER, AMK	OT		108
07.12.03	AI	-			MER, AMK	OT		109
08.12.03	AI	a		T, R, N	MER, AMK	OT		110
09.12.03	AI	-			MER, AMK	OT		111
10.12.03	AI	-			MER, AMK	OT		112
11.12.03	AI	a		T, R, U	MER, AMK	OT		113
12.12.03	AI	-			MER, AMK	OT		114
13.12.03	AI	-			MER, AMK	OT		115
14.12.03	AI	-			MER, AMK	OT		116
15.12.03	AI	K-II, a	Thorax	T, R, Thorax	MER, AMK	TK	Isolat I-18573	117
16.12.03	AI	-	Stuhl: Klon II-B		MER, AMK	TK	Isolat S-12639	118
17.12.03	AI	a, kw	Stuhl: Klon II-B	T, R, N	MER, AMK	TK	Isolat S-12770	119
18.12.03	AI	a		U, W, Thorax	MER, AMK	TK	Klon II-B im Stuhl	120
19.12.03	AI	-			MER, AMK	TK		121
20.12.03	AI	-			MER, AMK	TK		122
21.12.03	AI	a		KS	MER, AMK	TK		123
22.12.03	AI	a, kw	Stuhl: Klon II-B	T, R, N, ZVK	MER, AMK	TK	Isolat S-12939	124
23.12.03	AI	-			MER, AMK	TK		125
24.12.03	AI	a		T, Thorax	MER, AMK	TK		126
25.12.03	AI	-			MER, AMK	TK		127
26.12.03	AI	-			MER, AMK, TEI	TK		128
27.12.03	AI	-			MER, AMK	TK		129
28.12.03	AI	a		SK	MER, AMK, TEI	TK		130
29.12.03	AI	K-II, a, kw	N	T, R	MER, AMK	TK	Klon II erneut in	131
30.12.03	AI	-			MER, AMK, TEI	TK	Abstrichen	132
31.12.03	AI	-			MER, AMK	TK		133
01.01.04	AI	-			MER, AMK, TEI	TK		134
02.01.04	AI	K-II, a, kw	R, N	T, H, A	MER, AMK	TK		135
03.01.04	AI	-			MER, AMK, TEI	TK		136
04.01.04	AI	-			MER, AMK	TK		137
05.01.04	AI	-			MER, AMK, TEI	TK		138
06.01.04	AI	-			MER, AMK	TK	Tod	139

Tab. 7.5: Datentabelle des Patienten AI-17

Datum	Station	Mikrobiolog. Ergebnisse	Material mit Klon II	Material ohne Klon II	Antibiotika	Beatmung	Bemerkungen	Tag
20.10.03	CI	kw		Blut, Abszess	PEN, CTX, SUL, LEV, MTR	OT		1
21.10.03	CI	a, kw		T, W, Büleau	PEN, CTX, SUL, LEV, MTR	OT	Aufnahme post-OP von Neuro Intensiv (Sepsis, Meningitis, Pneumonie)	2
22.10.03	CI	-			PEN, CTX, SUL, LEV, MTR	OT		3
23.10.03	CI	a, kw		T, R, L	PEN, CTX, SUL, LEV, MTR	OT		4
24.10.03	CI	-			PEN, CTX, SUL, LEV, MTR	OT		5
25.10.03	CI	-			PEN, CTX, SUL, LEV, MTR, ERY	OT		6
26.10.03	CI	-			PEN, CTX, SUL, LEV, MTR, ERY	OT		7
27.10.03	CI	a		T, R, L	PEN, CTX, SUL, LEV, MTR, ERY	OT	8	
28.10.03	CI	-			PEN, CTX, SUL, LEV, ERY	OT	9	
29.10.03	CI	-			PEN, CTX, SUL, LEV, ERY	OT	10	
30.10.03	CI	a, kw		T, L	PEN, CTX, SUL, LEV, VAN	OT	11	
31.10.03	CI	-			PEN, CTX, SUL, LEV, VAN	OT	12	
01.11.03	CI	-			PEN, CTX, SUL, LEV, VAN	OT	13	
02.11.03	CI	-			PEN, CTX, SUL, LEV, VAN	OT	14	
03.11.03	CI	a, kw		T, R, L, KS	PEN, CTX, SUL, LEV, VAN	OT	15	
04.11.03	CI	-			PEN, CTX, SUL, LEV, VAN	OT	16	
05.11.03	CI	-			PEN, CTX, SUL, LEV, VAN	OT	17	
06.11.03	AI	a		N, R, U	PEN, CTX, SUL, LEV, VAN	OT	Kohorteniso AI	18
07.11.03	AI	-			LEV, FOS, CLI, LIZ	OT		19
08.11.03	AI	a		W	LEV, CLI, LIZ	OT		20
09.11.03	AI	-			LEV, CLI, LIZ	OT		21
10.11.03	AI	a, kw		T, R, N, U, L, D	LEV, CLI, LIZ	OT		22
11.11.03	AI	-			LEV, CLI, LIZ	OT		23
12.11.03	AI	-			LEV, CLI, LIZ	OT		24
13.11.03	AI	a, kw		T, R, N, U	LEV, CLI, LIZ	OT		25
14.11.03	AI	kw		L	LEV, CLI, LIZ	OT		26
15.11.03	AI	-			LEV, CLI, LIZ	OT		27
16.11.03	AI	-			LEV, CLI, LIZ	OT		28
17.11.03	AI	a		R, T	FOS, CLI, MTR	OT		29
18.11.03	AI	-			FOS, CLI, MTR	OT		30
19.11.03	AI	-			FOS, CLI, MTR	TK		31
20.11.03	AI	K-II, a, kw	T, R, N	L	FOS, CLI, MTR	TK	Nachweis Klon II	32
21.11.03	AI	-			FOS, CLI, MTR	OT		33
22.11.03	AI	K-II, a	T, R, N	ZVK	FOS	OT		34
23.11.03	AI	-			FOS	TK		35
24.11.03	AI	-			FOS	TK		36
25.11.03	AI	-			FOS	TK		37
26.11.03	AI	a, kw		L	FOS	TK		38
27.11.03	AI	K-II, a	T, R, N		FOS	TK		39
28.11.03	AI	-			MER, LEV, FOS	TK		40
29.11.03	AI	-			MER, LEV, FOS	TK		41
30.11.03	AI	-			MER, LEV, FOS	TK		42
01.12.03	AI	K-II, a	R	N, T	MER, LEV, FOS	TK		43
02.12.03	AI	-			MER, LEV, FOS, AMK	TK		44
03.12.03	AI	-			MER, FOS, AMK	TK		45
04.12.03	AI	K-II, a, kw	T	R, N, W	MER, AMK	TK		46
05.12.03	AI	kw		W	MER, AMK	TK		47
06.12.03	AI	-			MER, AMK	TK		48
07.12.03	AI	a, kw		W	MER, AMK	TK	Klon II nicht mehr in Abstrichen	49
08.12.03	AI	a		T, R, N	MER, AMK	TK		50
09.12.03	AI	-			MER, AMK	TK		51
10.12.03	AI	-			MER, AMK	TK		52
11.12.03	AI	a		R, Sputum	MER, AMK	-		53
12.12.03	AI	-			MER, AMK	-		54
13.12.03	AI	-	Stuhl: Klon II-B		MER, AMK	-	Isolat S-12577	55
14.12.03	AI	-			MER, AMK, PIS	-	Klon II-B im Stuhl	56
15.12.03	AI	a, kw		T, R, N, W	MER, AMK, PIS, FOS	-		57
16.12.03	AI	-	Stuhl: Klon II-B		MER, AMK, FOS	-	Isolat S-12578	58
17.12.03	AI	-			MER, AMK, FOS	-		59
18.12.03	AI	a		T, R, N	MER, FOS	-		60
19.12.03	AI	-			MER, FOS	-		61
20.12.03	AI	-			MER, FOS	-		62
21.12.03	AI	-			MER, FOS	-		63
22.12.03	AI	-	Stuhl: Klon II-B		MER, FOS	-	Isolat S-12938	64
23.12.03	AI	-	Stuhl: Klon II-B		MER, FOS	-	Isolat S-12941	65
24.12.03	AI	-			MER, FOS	-		66
25.12.03	AI	-			MER	-		67
26.12.03	AI	-			MER	-		68
27.12.03	AI	-			MER	-		69
28.12.03	AI	-			MER	-		70
29.12.03	AI	-			MER	-	Entlassung	71

Tab. 7.6: Datentabelle des Patienten AI-19

Datum	Station	Mikrobiolog. Ergebnisse	Material mit Klon II	Material ohne Klon II	Antibiotika	Beatmung	Bemerkungen	Tag
28.11.03	CI	-			-	OT	Aufnahme von CNS	1
29.11.03	CI	-			PIS, MTR	OT	post-OP	2
30.11.03	CI	-			PIS, MTR	OT	(Ösoph.-Karzinom)	3
01.12.03	CI	K-II, a	T, R		PIS, MTR	OT	post-OP Sepsis,	4
02.12.03	CI	-			PIS, MTR, MER, AMK	OT	Pneumonie, Klon II	5
03.12.03	CI	-			MER, AMK	OT		6
04.12.03	CI	K-II, a	D, R		MER, AMK	OT		7
05.12.03	CI	kw		AK	MER, AMK	OT		8
06.12.03	CI	-			MER, AMK	-		9
07.12.03	CI	-			MER, AMK	-		10
08.12.03	CI	kw		ZVK, R, D	MER, AMK	OT		11
09.12.03	CI	a		Punktat	MER, AMK	OT		12
10.12.03	CI	a		Thorax	MER, AMK	OT		13
11.12.03	AI	a, kw		T, ZVK	MER, AMK	OT	Kohorteniso AI	14
12.12.03	AI	-			MER, AMK	OT	kein Klon II	15
13.12.03	AI	-			MER, AMK	OT		16
14.12.03	AI	-			MER, AMK	OT		17
15.12.03	AI	a, kw		T, R, N, ZVK	MER, AMK, LIZ	OT		18
16.12.03	AI	a		D	MER, AMK, LIZ	OT		19
17.12.03	AI	-			MER, AMK, LIZ	OT		20
18.12.03	AI	a, kw		T, R, N, H, Stuhl	MER, AMK, LIZ	OT	kein Klon II im Stuhl	21
19.12.03	AI	K-II	T	Stuhl	MER, AMK, LIZ	OT	Isolat I-18856	22
20.12.03	AI	-			MER, AMK, LIZ	OT	Klon II erneut in	23
21.12.03	AI	-			MER, AMK, LIZ	OT	Abstrichen	24
22.12.03	AI	K-II, a	R, N		MER, AMK, LIZ	OT		25
23.12.03	AI	-			MER, AMK, LIZ	OT		26
24.12.03	AI	-			MER, AMK, LIZ	OT		27
25.12.03	AI	-			MER, AMK, LIZ	OT		28
26.12.03	AI	-			MER, AMK, LIZ	OT		29
27.12.03	AI	-			MER, AMK, LIZ, CAZ, SUL	OT		30
28.12.03	AI	-			MER, AMK, LIZ, CAZ, SUL	OT		31
29.12.03	AI	a		R, N	MER, AMK, LIZ, CAZ, SUL	-	nach CNS	32
30.12.03	CNS	-			AMK, LIZ	-		33
31.12.03	CNS	-			LIZ	-		34
01.01.04	CNS	-			LIZ	-		35
02.01.04	CNS	K-II, a	Sputum, Stuhl: Klon II-B		LIZ	-	Isolat S-00006	36
03.01.04	CNS	-			LIZ	-	Klon II-B/A im Stuhl	37
04.01.04	CNS	-			LIZ	-		38
05.01.04	CNS	K-II-B, a	D, Stuhl: Klon II-A		LIZ	-	Isolat S-00031	39
06.01.04	CNS	-			LIZ	-	Klon II-B in D	40
07.01.04	CNS	-			LIZ	-		41
08.01.04	CNS	-			LIZ	-		42
09.01.04	CNS	-			LIZ	-		43
10.01.04	CNS	-			-	-		44
11.01.04	CNS	-			-	-		45
12.01.04	CNS	-			PIT	-		46
13.01.04	CNS	K-II-B, a	D		PIT	-	Klon II-B in D	47
14.01.04	CNS	kw		Pleurapunktat	PIT	-		48
15.01.04	CNS	-			PIT	-		49
16.01.04	CNS	-			PIT	-		50
17.01.04	CNS	-			PIT	-		51
18.01.04	CNS	-	Stuhl: Klon II-A		PIT	-	Isolat S-00444	52
19.01.04	CNS	-			PIT	-		53
20.01.04	CNS	-			PIT	-		54
21.01.04	CNS	-			PIT	-		55
22.01.04	CNS	-			PIT	-		56
23.01.04	CNS	-			-	-		57
24.01.04	CNS	-			-	-		58
25.01.04	CNS	-			-	-		59
26.01.04	CNS	-			-	-	Entlassung	60

Tab. 7.7: Datentabelle des Patienten CI-23

Datum	Station	Mikrobiolog. Ergebnisse	Material mit Klon II	Material ohne Klon II	Antibiotika	Beatmung	Bemerkungen	Tag
11.11.03	CI	-			PIS, MTR	OT	Aufnahme von Urologie NS	1
12.11.03	CI	-			PIS, MTR	OT	post-OP (BAA):	2
13.11.03	CI	a, kw		T, R	PIS, MTR	OT	Beinamputation,	3
14.11.03	CI	kw		W	PIS, MTR	OT	Wundinfektion, Gangrän,	4
15.11.03	CI	-			PIS, MTR	OT	gramnegative Sepsis	5
16.11.03	CI	-			PIS, MTR, CIP	OT		6
17.11.03	CI	K-II, a, kw	R	T, KS	PIS, MTR, CIP	OT	Nachweis Klon II	7
18.11.03	CI	-			PIS, MTR, CIP	OT		8
19.11.03	CI	-			PIS, CIP	OT		9
20.11.03	CI	K-II, a	T, R, W		PIS, CIP, CLI	OT		10
21.11.03	CI	kw		KS	PIS, CIP, CLI	OT		11
22.11.03	CI	-			PIS, CLI	OT		12
23.11.03	CI	-			PIS, CLI	OT		13
24.11.03	CI	K-II, a	T, R		CLI	OT		14
25.11.03	CI	a		W	CLI	OT		15
26.11.03	CI	-			MER	OT		16
27.11.03	CI	K-II, a	T, R, W, KS, ZVK	U, SK	MER	OT		17
28.11.03	CI	K-II, a	W		MER	OT		18
29.11.03	CI	-			MER	OT		19
30.11.03	CI	-			MER	OT		20
01.12.03	AI	K-II, a	R		MER	-	Kohorteniso AI	21
02.12.03	AI	-			MER, LEV, AMK	-		22
03.12.03	AI	K-II, a	W		MER, AMK	-		23
04.12.03	AI	a		R, N	MER, AMK	-	kein Klon II mehr in Abstrichen	24
05.12.03	AI	-			MER, AMK, CLI	-		25
06.12.03	AI	-			MER, AMK, CLI	-		26
07.12.03	AI	-			MER, AMK, CLI	-		27
08.12.03	AI	a		W, R	MER, AMK, CLI	OT		28
09.12.03	AI	-			MER, AMK, CLI	OT		29
10.12.03	AI	-			MER, AMK, CLI	OT		30
11.12.03	AI	-			MER, AMK	OT		31
12.12.03	AI	a		R, N	MER, AMK	OT		32
13.12.03	AI	-			MER, AMK	OT		33
14.12.03	AI	-			MER, AMK	OT		34
15.12.03	AI	a, kw	Stuhl: Klon II-B	T, R, N, W, Thorax	MER, AMK	OT	Isolat S-12942	35
16.12.03	AI	-			MER, AMK	OT	Klon II-B im Stuhl	36
17.12.03	AI	kw		Thorax	MER, AMK	OT		37
18.12.03	AI	a, kw		T, R, N	MER, AMK	OT		38
19.12.03	AI	kw		SK	MER, AMK	-		39
20.12.03	AI	a		W	MER, AMK	-		40
21.12.03	AI	-			MER, AMK	-		41
22.12.03	AI	a		R, N	MER, AMK	-		42
23.12.03	AI	-			MER, AMK	-		43
24.12.03	AI	-			MER, AMK	-		44
25.12.03	AI	-			MER, AMK	-		45
26.12.03	AI	-			MER, AMK	-		46
27.12.03	AI	-	Stuhl: Klon II-B		MER, AMK	-	Isolat S-12947	47
28.12.03	AI	-			MER, AMK	-		48
29.12.03	AI	-			MER, AMK	-		49
30.12.03	AI	-			MER, AMK	-	nach CNS:	50
31.12.03	CNS	-			-	-	weiter kolonisiert mit Klon II-B, keine Antibiose	51
01.01.04	CNS	-			-	-		52
02.01.04	CNS	-	Stuhl: Klon II-B		-	-	Isolat S-0005	53
03.01.04	CNS	-			-	-		54
04.01.04	CNS	-			-	-		55
05.01.04	CNS	-	Stuhl: Klon II-B		-	-	Isolat S-0032	56
06.01.04	CNS	-	Stuhl: Klon II-B		-	-	Isolat S-0061	57
07.01.04	CNS	-			-	-	Verlegung nach ext KKH	58

Tab. 7.8: Datentabelle des Patienten CI-27

Datum	Station	Mikrobiolog. Ergebnisse	Material mit Klon II	Material ohne Klon II	Antibiotika	Beatmung	Bemerkungen	Tag
24.11.03	CI	-			CXM	OT	Aufnahme von CNS	1
25.11.03	CI	-			CXM	OT	post-OP	2
26.11.03	CI	-			CXM, AMS	-	(Bronchial-Karzinom)	3
27.11.03	CI	K-II	R		AMS	-	Klebsiellen-Pneumonie,	4
28.11.03	CI	K-II	BS		PIS, LEV	-	Nachweis Klon II	5
29.11.03	CI	-			PIS, LEV	-		6
30.11.03	CI	-			PIS, LEV	-		7
01.12.03	CI	K-II	R		MER, AMK, LEV	OT		8
02.12.03	CI	-			MER, AMK, LEV	OT		9
03.12.03	AI	-			MER, AMK	OT	Kohorteniso AI	10
04.12.03	AI	K-II, a	R	T, N	MER, AMK	OT		11
05.12.03	AI	-			MER, AMK, CIP	OT		12
06.12.03	AI	-			MER, AMK, CIP	OT		13
07.12.03	AI	-			MER, AMK, CIP	OT		14
08.12.03	AI	a		T, R, N	MER, AMK, CIP	OT	kein Klon II mehr in	15
09.12.03	AI	-			MER	TK	Abstrichen	16
10.12.03	AI	kw		ZVK	MER, AMK, CRO	TK		17
11.12.03	AI	a, kw		T, R, N	MER, AMK, CRO	TK		18
12.12.03	AI	-			MER, AMK, CRO	TK		19
13.12.03	AI	-			MER, AMK, CRO	TK		20
14.12.03	AI	-			MER, AMK, CRO	TK		21
15.12.03	AI	a, kw		T, R, N	MER, AMK, CRO	TK		22
16.12.03	AI	kw		Stuhl	MER, AMK, CRO	TK	kein Klon II im Stuhl	23
17.12.03	AI	-			MER, AMK, CRO	TK		24
18.12.03	AI	a, kw		Stuhl, T, R, N	MER, AMK, CRO	TK	kein Klon II im Stuhl	25
19.12.03	AI	-			MER, AMK, CRO	-		26
20.12.03	AI	-			MER, AMK	-		27
21.12.03	AI	-			MER, AMK	-		28
22.12.03	AI	-			MER	-		29
23.12.03	AI	-			MER	-		30
24.12.03	AI	-			MER	-		31
25.12.03	AI	-			MER	-		32
26.12.03	AI	-			MER	-		33
27.12.03	AI	-			MER	-		34
28.12.03	AI	-			MER	-		35
29.12.03	AI	-			MER	-	nach CNS	36
30.12.03	CNS	-		Stuhl	-	-	kein Klon II im Stuhl	37
31.12.03	CNS	-			-	-		38
01.01.04	CNS	-			-	-		39
02.01.04	CNS	-			-	-		40
03.01.04	CNS	-			-	-		41
04.01.04	CNS	-			-	-		42
05.01.04	CNS	-	Stuhl: Klon II-A		-	-	Isolat S-0060	43
06.01.04	CNS	-			-	-	Klon II-A im Stuhl	44
07.01.04	CNS	-			-	-	Entlassung	45