

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene

Kommissarischer Geschäftsführender Direktor:

Prof. Dr. M. Lohoff

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum

Gießen und Marburg GmbH,

Standort Marburg

**Untersuchungen zur Biofilmbildung bei MRSA (Methicillin-
resistenter *Staphylococcus aureus*) – Zusammenhang
zwischen Biofilmbildung und klinischen Parametern**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten

Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Daniel Reidel aus Buchen (Odenwald)

Marburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
07. August 2008

Gedruckt mit freundlicher Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. R. Mutters

1. Korreferent: Prof. Dr. Dr. R. Bals

1	EINLEITUNG	- 1 -
1.1	METHICILLIN-RESISTENTER <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> (MRSA)	- 1 -
1.1.1	<i>Epidemiologie</i>	- 1 -
1.1.2	<i>Die Methicillin-Resistenz des MRSA</i>	- 5 -
1.1.3	<i>Unterschied zwischen „community-acquired“ MRSA (ca-MRSA) und „hospital-acquired“ MRSA (ha-MRSA)</i>	- 8 -
1.2	BIOFILM	- 11 -
1.3	ZIELE DER ARBEIT	- 15 -
2	MATERIAL UND METHODEN	- 17 -
2.1	MATERIAL.....	- 17 -
2.1.1	<i>Bakterienstämme</i>	- 17 -
2.1.2	<i>Kontrollstämme</i>	- 17 -
2.1.3	<i>Nährmedien</i>	- 18 -
2.1.4	<i>Puffer</i>	- 19 -
2.1.5	<i>Chemikalien</i>	- 19 -
2.1.6	<i>Geräte und Verbrauchsmaterialien</i>	- 19 -
2.2	METHODEN	- 20 -
2.2.1	<i>Biofilm – Adhärenztest</i>	- 20 -
2.2.2	<i>Patientendaten</i>	- 21 -
2.2.3	<i>Statistik</i>	- 21 -
3	ERGEBNISSE	- 23 -
3.1	BIOFILMERGEBNISSE	- 23 -
3.1.1	<i>Klinische MRSA-Stämme</i>	- 23 -
3.1.2	<i>Positivkontrolle S. epidermidis RP62A und Negativkontrolle S. carnosus TM300</i>	- 23 -
3.2	MRSA-PROBENISOLATE	- 24 -
3.2.1	<i>Antibiotika-Resistenzmuster</i>	- 24 -
3.2.2	<i>Probengruppen</i>	- 25 -
3.2.3	<i>Patientendaten</i>	- 28 -
3.3	INDUKTIVE STATISTIK.....	- 30 -
3.3.1	<i>Zusammenhänge der Biofilmproduktion</i>	- 30 -
3.4	EINTEILUNG DER BIOFILMSTÄRKE	- 32 -
3.4.1	<i>Gegenüberstellung der verschiedenen Einteilungen der Gruppen der Biofilmstärke</i> ... - 32 -	
4	DISKUSSION	- 37 -
4.1.1	<i>MRSA und Biofilmbildung</i>	- 37 -
4.1.2	<i>Patientendaten und Probenmaterial</i>	- 38 -
4.1.3	<i>Zusammenhang der Biofilmwerte mit dem Parameter der klinischen Ausprägung</i>	- 39 -
4.1.4	<i>Zusammenhang der Biofilmwerte mit einer vorausgegangenen Antibiotikatherapie</i> ... - 40 -	
4.1.5	<i>Einteilung der Biofilmwerte in Gruppen der Biofilmstärke</i>	- 43 -
5	ZUSAMMENFASSUNG	- 49 -
6	ANHANG	- 51 -
6.1	TABELLEN	- 51 -
6.2	ABBILDUNGEN	- 65 -
7	LITERATURVERZEICHNIS	- 74 -
8	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER	- 82 -
9	DANKSAGUNGEN	- 83 -

Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
<i>aux</i>	auxiliary-Gene
β	Beta
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BHI	Brain Heart Infusion
°C	Grad Celsius
ca-MRSA	community-acquired MRSA
<i>ccr</i>	cassette chromosome recombinase
co-MRSA	community-onset MRSA
η	Eta
EARSS	European Antimicrobial Resistance Surveillance System
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>fem</i>	factor essential for methicillin resistance
g	Gramm
GENARS	German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance
h	Stunde
H_0	Nullhypothese
H_1	Alternativhypothese
ha-MRSA	hospital-acquired MRSA
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>ica</i>	intercellular adhesin
IS	Insertionssequenz
KISS	Krankenhaus-Infektions-Surveillance-Systems
<i>luk</i>	für den Virulenzfaktor Panton-Valentin Leukocidin kodierendes Gen
μ	My
μg	Mykrogramm
<i>M. catarrhalis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>mec</i>	für die Methicillin-Resistenz kodierendes Gen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>

MSSA	Methicillin-sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>
MW	Mittelwert
n	Anzahl
neg	negativ
nm	Nanometer
NNIS	National Nosocomial Infections Surveillance System
OD	Optische Dichte
OD _C	Wert der Optischen Dichte am Cut-Off
p	Signifikanz
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBP	Penicillin-Bindeprotein
PBS	Phosphat buffered saline
PEG	Paul-Ehrlich-Gesellschaft
PIA	polysaccharides interzelluläres Adhäsion
pos	positiv
PVL	Panton-Valentin Leukocidin
RKI	Robert-Koch-Institut
SARI	Surveillance der Antibiotika-Anwendung und der bakteriellen Resistenzen auf Intensivstationen
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. carnosus</i>	<i>Staphylococcus carnosus</i>
SCC	staphylococcal cassette chromosome
SD	Standardabweichung
SENTRY	European Antimicrobial Surveillance Programme
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
spp.	mehrere Spezies/species
TSB	Tryptic Soy Bouillon
ZKP	Zell-Kultur-Platte

1 Einleitung

1.1 Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA)

1.1.1 Epidemiologie

Seit dem ersten nachgewiesenen Auftreten von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) im Jahr 1961 hat sich die Brisanz um diesen Keim durch seine Entwicklung und seine massive Verbreitung um die Welt stetig gesteigert. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ist inzwischen einer der bedeutendsten Erreger ambulant und nosokomial erworbener Infektionen. In den USA, wo *S. aureus* als Erreger nosokomial erworbener Pneumonien und chirurgischer Begleitinfektionen/Wundinfektionen Platz eins und bei nosokomial erworbener Sepsis/Bakteriämie Platz zwei belegt, machte MRSA auf US-amerikanischen Intensivstationen im Jahr 2000 einen Anteil von 55,3% aus. Dies war ein mittlerer Anstieg von 29% im Vergleich zu den Jahren 1995-1999 (NNIS 2001). Diese besorgniserregend rasante Verbreitung von MRSA ist Ausdruck der Entstehung molekular definierter Epidemiestämme (WITTE, W. et al. 2005). Diese haben eine ausgeprägte Fähigkeit zur Ausbreitung in Krankenhäusern und können durch molekulare Typisierung von sporadisch auftretenden Stämmen abgegrenzt werden (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2007b). MRSA ist, wie auch der Methicillin-sensible *S. aureus* (MSSA), ein nur fakultativ pathogener Keim, der bevorzugt die Nasenvorhöfe, den Rachen, das Perineum und die Leistengegend besiedeln kann (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2007a). Die Mehrheit der kolonisierten Patienten ist klinisch unauffällig und der Erwerb von MRSA, ob innerhalb oder außerhalb des Krankenhauses, bleibt regelmäßig unbemerkt, bis sich eine klinisch relevante Infektion entwickelt (SALGADO, C. D. et al. 2003). Zur Ausbreitung des MRSA in Krankenhäusern tragen mehrere Faktoren bei:

- Selektionsvorteil der MRSA bei Anwendung von Antibiotika (z.B. Chinolone),
- Fehler oder Inkonsequenz im Hygieneregime,
- Zunahme von MRSA-Infektionen bei prädisponierten Patienten,
- Zunahme intensivmedizinischer Maßnahmen und Implantationen,

- mangelnde Information der Nachfolgeeinrichtungen bei Verlegungen von MRSA-kolonisierten oder -infizierten Patienten innerhalb der eigenen Klinik oder in andere Einrichtungen einschließlich inkonsequenter Nachbetreuung.

(cit.: (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2007a)

Da Infektionen mit MRSA im Vergleich zu Infektionen mit MSSA zu verlängerten Krankenhausaufenthalten und höheren Krankenhauskosten führen, gilt MRSA als immer größer werdendes Problem im Gesundheitswesen. Ob Infektionen mit MRSA auch zu einer erhöhten Mortalität führen, ist zwar anzunehmen, wird aber in mehreren Studien kontrovers diskutiert (COSGROVE, S. E. et al. 2003; COSGROVE, S. E. et al. 2005; GASTMEIER, P. et al. 2005).

Epidemiologie des hospital-acquired MRSA (ha-MRSA) in Europa

Die MRSA-Prävalenzen sind innerhalb Europas sehr unterschiedlich. Im Allgemeinen besteht ein Nord-Süd-Gradient des MRSA-Anteils an *S. aureus*-Isolaten mit niedrigen Prävalenzen in den nordeuropäischen Ländern und einem hohen MRSA-Anteil in den südeuropäischen Ländern. In der Studie von Fluit et al. wurden 3.051 *S. aureus*-Isolate aus 25 Universitätskliniken (Teilnehmer der SENTRY-Studie) aus 15 Ländern Zentral- und Südeuropas im Zeitraum von 1997 bis 1999 untersucht. Von allen Isolaten wurden 25% als MRSA identifiziert (FLUIT, A. C. et al. 2001). MacKenzie et al. untersuchten Daten von 173 Kliniken aus 34 europäischen Ländern und Israel aus dem Jahr 2001. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass der Gesamtanteil von MRSA an *S. aureus*-Isolaten 20,8% ausmachte (MACKENZIE, F. M. et al. 2007). Eine Angabe für Gesamteuropa ist dennoch nicht sinnvoll, da die Unterschiede zwischen verschiedenen europäischen Ländern zu stark variieren. Tiemersma et al. konstatierten schon 2004 einen fast 100-fachen Unterschied zwischen nord- und südeuropäischen Ländern (TIEMERSMA, E. W. et al. 2004) und auch MacKenzie et al. zeigten auf, dass die Variationsbreite mit Werten von 0% bis 69% sehr groß ist. Die neusten Daten des European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) von 2005 bestätigen die Daten von MacKenzie et al. weitgehend.

Das EARSS, als eine der größten europäischen multizentrischen Studien, beruft sich im Jahr 2005 auf 27.095 *S. aureus*-Isolate aus 30 europäischen Ländern. Von diesen hatten 7 Länder einen MRSA-Anteil <3%, wobei Island mit einem durchschnittlichen MRSA-

Anteil von <1% den niedrigsten Anteil hatte. Dennoch wurde auch unter diesen 7 Ländern in den Niederlanden, Dänemark und Finnland ein signifikanter Anstieg der MRSA-Prävalenz seit 1999 verzeichnet. Alle südeuropäischen Länder hatten eine MRSA-Anteil >25% wobei bei 8 Ländern über einen Anteil von mehr als 40% berichtet wurde. Den höchsten MRSA-Anteil hat Rumänien mit 61%. Insgesamt gab es in 12 europäischen Ländern einen signifikanten Anstieg des MRSA-Anteils zu verzeichnen. In vier europäischen Ländern ist dieser Anstieg besonders auffällig in Erscheinung getreten. In der Tschechischen Republik, Deutschland, der Slowakei und in Ungarn lag der MRSA-Anteil vor 2001 relativ stabil unter 10%. Erst in den letzten 4 Jahren erfuhren diese Länder einen dramatischen Anstieg des MRSA-Anteils (Tschechische Republik 13%, Slowakei 19%, Ungarn 19% und Deutschland 21% im Jahr 2005). Nur in zwei Ländern, Frankreich und Slowenien, ist seit 5-6 Jahren ein stetiger Abwärtstrend zu beobachten (Slowenien von 21% 1999 auf 10% 2005 und Frankreich von 33% 2001 auf 27% 2005) (EARSS ANNUAL REPORT 2005).

Epidemiologie des ha-MRSA in Deutschland

Wie in Europa unterliegt auch in Deutschland die MRSA-Prävalenz erheblichen Variationen. Die Daten für Deutschland differieren je nach Studie (EARSS, KISS, PEG, SARI, GENARS), je nach Krankenhaus und innerhalb eines Krankenhauses je nach Risikobereich zwischen 0 und 35%, in Einzelfällen sogar bis zu 60%. In den Kliniken stehen die intensivmedizinischen Bereiche und hier insbesondere die chirurgischen Intensivstationen im Vordergrund (WITTE, W. et al. 2005). Für Gesamtdeutschland kann für die Jahre 2005 und 2006 von einer mittleren MRSA-Rate zwischen 20 und 23% ausgegangen werden (EARSS ANNUAL REPORT 2005; GENARS 2007; PEG 2007; SARI 2007). Wichtiger aber als die absoluten Daten der MRSA-Prävalenz ist die gesamtdeutsche Entwicklung des MRSA-Anteils. Auch hier ist die Datenlage der unterschiedlichen Studien nicht völlig übereinstimmend. Gemeinsam ist allen, dass es seit den 1990er-Jahren zu einem starken Anstieg der MRSA-Prävalenz gekommen ist. Die Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie beschreibt einen Anstieg der Oxacillin-Resistenz von 1,7% 1990 über 15,2% 1998 auf 22,4% im Jahre 2004 (PEG 2007).

Epidemische ha-MRSA in Deutschland

Im Jahr 2002 wurde eine international gültige Nomenklatur für epidemische MRSA mittels Multi-Locus-Sequenz-Typisierung erarbeitet. Damit können epidemische MRSA-Isolate mit ihren verschiedenen nationalen Bezeichnungen eindeutig ihrer genotypischen Gruppe zugeordnet werden. Jede genotypische Gruppe wird einer internationalen Kennziffer (ST...) zugeordnet (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2002). In Deutschland sind bisher 7 Epidemiestämme bekannt:

- Norddeutscher Epidemiestamm (ST247)
- Hannoverscher Epidemiestamm (ST254)
- Wiener Epidemiestamm (ST239)
- Berliner Epidemiestamm (ST45)
- Barnimer Epidemiestamm (ST22)
- Süddeutscher Epidemiestamm (ST28)
- Rhein-Hessen-Epidemiestamm (ST5/ST225)

Davon sind vier, der Barnimer (ST22), der Berliner (ST45), der Rhein-Hessen-(ST5/ST225) und der Süddeutsche (ST28) Epidemiestamm am weitesten in Deutschland verbreitet. Auffallend ist, dass einige Epidemiestämme bei bestimmten Infektionen besonders hervortreten, z.B. dominieren der Rhein-Hessen-Epidemiestamm (ST5/ST225) und der Barnimer Epidemiestamm (ST22) bei Blutkultur-Isolaten und bei Isolaten aus Harnwegsinfektionen. Bei der Herkunft der Einsendungen dominieren die großen klinischen Fächer: Chirurgie, Innere Medizin, sowie die Intensivmedizin (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2007b).

Epidemiologie des community-acquired MRSA (ca-MRSA) in Deutschland

Erstmals in den USA und Australien im Zusammenhang mit tiefgehenden Infektionen der Haut beschrieben, häuften sich Berichte über Infektionen mit ca-MRSA bei Personengruppen, welche in enger räumlicher Beziehung standen. Auch das Fehlen von Risikofaktoren für eine MRSA-Infektion war bei den Betroffenen vorhanden (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2004a). Obwohl ca-MRSA in Deutschland noch relativ wenig verbreitet sind, wird auch hier eine, wenn auch langsame Zunahme der Prävalenz verzeichnet. Im Jahr 2005 waren 1,52% der MRSA-Isolate ca-MRSA, im Jahr 2006 waren es schon 2,7%. Im Vordergrund stehen auch hier tiefe Haut-Weichteil-

Infektionen; über seltene Fälle von Pneumonien und Septikämie wurde berichtet (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2007b).

1.1.2 Die Methicillin-Resistenz des MRSA

Die Methicillin-Resistenz von Staphylokokken wurde, wie schon bei der Penicillin-Resistenz, bereits kurz nach der Einführung des Antibiotikums in den klinischen Alltag beobachtet (BARBER, M. 1961; JEVONS, M. P. 1961). Die Resistenz gegenüber Methicillin wird als „intrinsisch“ bezeichnet, da es nicht zu einer Zerstörung des Antibiotikums durch β -Lactamase kommt (SELIGMAN, S. J. 1966). Zu ersten Ausbrüchen von Infektionen, verursacht durch MRSA, kam es erstmals 1963 in europäischen Kliniken (STEWART, G. T. et al. 1963) und 1968 in Amerika (BARRETT, F. F. et al. 1968).

Der Unterschied zwischen MRSA und MSSA

Der Unterschied zwischen MRSA und MSSA liegt im Vorhandensein einer zusätzlichen mobilen Gen-Kassette bei MRSA. Diese *SCC_{mec}* (staphylococcal cassette chromosome *mec*) Gen-Kassette wird heute in mindestens fünf Hauptgruppen (I – V) differenziert (ITO, T. et al. 2004). Die *SCC_{mec}*-Gen-Kassette ist durch die Anwesenheit von terminalen „inverted repeats“ (gegenläufige Wiederholungssequenzen) und „direct repeats“ (gleichgerichtete Wiederholungssequenzen), durch den *ccr*-Gen-Komplex und den *mec*-Gen-Komplex charakterisiert (ITO, T. et al. 2001). Unterschiedliche Kombinationen der verschiedenen *mec*-Gen-Komplex-Klassen (A – E) mit den verschiedenen Typen des *ccr*-Gen-Komplexes definieren die *SCC_{mec}*-Hauptgruppen (ITO, T. et al. 2004). Der *mec*-Gen-Komplex ist derjenige Teil der *SCC_{mec}*-Gen-Kassette, der für die Methicillin – Resistenz kodiert. Die *ccr*-Gene *ccrA*, *ccrB* und *ccrC* (für cassette chromosome recombinase) sind seitenspezifische Rekombinase-Gene die speziell für Rekombinationsereignisse (Integration und Exzision) der mobilen *SCC_{mec}*-Gen-Kassette zuständig sind (ITO, T. et al. 2004; KATAYAMA, Y. et al. 2000). Der multiresistente Phänotyp, der für die meisten Methicillin-resistenten Staphylokokken typisch ist, kann durch die Fähigkeit der zusätzlichen Insertionssequenzen *IS431* erklärt

werden, durch homologe Rekombination Resistenzdeterminanten mit ähnlichen Insertionssequenz-Elementen anzuhäufen (CHAMBERS, H. F. 1997).

Der *mec*-Gen-Komplex

Der *mec*-Gen-Komplex, der bei Methicillin-sensiblen Staphylokokken nicht vorkommt (KONDO, N. et al. 1996), besteht aus dem Struktur-Gen *mecA*, welches für das Penicillin-Bindeprotein PBP 2a (=PBP 2') kodiert, aus den Regulationselementen Δ *mecRI* oder *mecI* und *mecRI*, welche die Transkription von *mecA* kontrollieren und den Insertionssequenzen IS431 und IS1272 (CHAMBERS, H. F. 1997; DEURENBERG, R. H. et al. 2007).

MRSA sowie MSSA bilden vier Hauptgruppen von Penicillin-Bindeproteinen (PBP): PBP 1, 2, 3 und 4 (GEORGOPAPADAKOU, N. H. et al. 1980). Diese Proteine sind Membran-gebundene Enzyme, die die Transpeptidase-Reaktion zur Quervernetzung der Peptidoglykane der bakteriellen Zellwand katalysieren. β -Laktam-Antibiotika sind Substrat-Analoga, die sich kovalent an diese Proteine binden und so die Enzyme inaktivieren. Die Bindung von β -Laktam-Antibiotika an die PBPs ist für die Bakterien letal (CHAMBERS, H. F. 1997). Die Methicillin-Resistenz des MRSA wird durch das zusätzliche PBP 2a determiniert. Das PBP 2a besitzt eine geringere Bindungsaffinität für β -Laktam-Antibiotika als die vier Haupt-PBPs. Daher kann PBP 2a in Anwesenheit von β -Laktam-Antibiotika die essentiellen Funktionen der hoch-affinen PBPs übernehmen und so das Überleben in sonst letalen Antibiotika-Konzentrationen möglich machen (CHAMBERS, H. F. 1997).

Ausprägungen der Methicillin-Resistenz

Die Methicillin-Resistenz weist ein Phänomen auf, dessen Mechanismus bis heute ungeklärt ist. Die Methicillin-Resistenz verschiedener Staphylokokken-Stämme kann heterogener oder homogener Natur sein. Während Staphylokokken-Stämme mit homogener Resistenzausprägung regelmäßig gegen hohe Methicillin-Konzentrationen resistent sind, zeigt sich die Mehrzahl der Bakterien in einem Stamm mit heterogener Resistenzausprägung empfindlich gegenüber Methicillin, auch schon bei niedrigen Antibiotika-Konzentrationen (HARTMAN, B. J. et al. 1986). Die Mehrzahl der klinisch isolierten Methicillin-resistenten Staphylokokken zeigt unter konventionellen

Wachstumsbedingungen die heterogene Resistenzprägung. Ein Zusatz von β -Laktam-Antibiotika bei der Anzucht von heterogenen Stämmen bewirkt einen Selektionsdruck, bei dem nur noch eine kleine Subpopulation von Bakterien wächst. Diese Subpopulation besteht aus hochresistenten Zellen mit einer homogenen Resistenzprägung, welche noch bei Methicillin-Konzentrationen von bis zu 100 μ g/ml wachsen können (CHAMBERS, H. F. et al. 1987). Erstaunlicherweise ist die Eigenschaft der Selektion umkehrbar, denn wiederholtes Anzichten von Subkulturen der hochresistenten Subpopulation in Antibiotika-freien Nährmedien verändert die Resistenzeigenschaften zurück in die heterogene Ausprägung (CHAMBERS, H. F. 1997).

Eine Hypothese zur heterogenen Resistenz von H. F. Chambers lautet, dass heterogene Stämme in einem Faktor defizitär oder in Ermangelung einer entscheidenden Modifikation eines biochemischen Reaktionsweges ein nicht voll funktionsfähiges PBP 2a besitzen. Homogene Stämme können dann aus heterogenen Stämmen hervorgehen, wenn diese die genetischen Voraussetzungen für ein voll funktionsfähiges PBP 2a haben (CHAMBERS, H. F. 1997; SUZUKI, E. et al. 1993).

Eine weitere Ausprägung der Methicillin-Resistenz stellt die so genannte Borderline-Resistenz dar. Diese Stämme sind durch eine Methicillin-MHK am oder kurz über dem Empfindlichkeits-Umbruchpunkt charakterisiert. (typischerweise Oxacillin-MHK von 4 bis 8 μ g/ml) (CHAMBERS, H. F. 1997).

Borderline-Stämme können in zwei Kategorien eingeteilt werden: in Stämme mit und solche ohne *mecA*-Gen. Stämme mit *mecA*-Gen sind extrem heterogener Natur, produzieren aber trotzdem PBP 2a. Diese Stämme besitzen eine resistente Subpopulation von Zellen, die auch bei hohen Antibiotika-Konzentrationen wachsen können, wenn auch die Subpopulation äußerst klein ist (GERBERDING, J. L. et al. 1991). Borderline-Stämme, die das *mecA*-Gen nicht besitzen, können von extrem heterogenen *mecA*-positiven Stämmen durch die nicht vorhandenen hoch-resistenten Klone unterschieden werden. Man nimmt an, dass die *mecA*-negative Borderline-Resistenz das Resultat einer Veränderung des normalen PBP-Gens ist oder durch eine Überproduktion von β -Laktamase zustande kommt (MCDOUGAL, L. K. et al. 1986; TOMASZ, A. et al. 1989).

Einflussfaktoren auf die Ausprägung der Methicillin-Resistenz

Verschiedene Gene haben Einfluss auf die Ausprägung der Methicillin-Resistenz. So wurden z.B. mehrere auxiliary-Gene (*aux*) gefunden, so genannte *fem*-Gene (*fem* für factor essential for methicillin resistance), die Einfluss auf die Methicillin-Resistenz haben (CHAMBERS, H. F. 1997). Daneben haben auch exogene Faktoren Einfluss auf die Resistenzausprägung, die sich bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen zeigen. In Abhängigkeit von Kulturbedingungen und in Anwesenheit von β -Laktam-Antibiotika kann die Methicillin-Resistenz in ihrem Resistenzlevel schwanken. Verschiedene Kulturbedingungen können die Methicillin-Resistenz verstärken, aber auch abschwächen (CHAMBERS, H. F. 1997; HARTMAN, B. J. et al. 1986; SABATH, L. D. et al. 1971).

1.1.3 Unterschied zwischen „community-acquired“ MRSA (ca-MRSA) und „hospital-acquired“ MRSA (ha-MRSA)

Chambers beschrieb 2001 (CHAMBERS, H. F. 2001), dass sich Penicillin-resistente *S. aureus* in der Gesellschaft verbreiteten, als die Penicillin-Resistenz-Rate der klinischen *S. aureus*-Isolate 40-50% überschritten hatte. Aufgrund dieser Erkenntnis war anzunehmen, dass sich auch MRSA mit weiterer prozentualer Zunahme an *S. aureus*-Klinikisolaten in der Gesellschaft verbreiten würde. Tatsächlich häufen sich Berichte über den so genannten „community-acquired“ MRSA (ca-MRSA) aus vielen Teilen der Welt. Epidemiologischen Berichten zufolge hat der „hospital-acquired“ MRSA-Anteil (ha-MRSA) in manchen Ländern und Kliniken den Wert von 40-50% schon erreicht oder sogar überschritten.

„Wirkliche *community acquired* MRSA (cMRSA) im Sinne dieser Definition treten völlig unabhängig von Krankenhäusern auf. Bei den betroffenen Patienten fehlen die üblicherweise für Krankenhausinfektionen mit MRSA bekannten Risikofaktoren, wie z.B. vorheriger Krankenhausaufenthalt, schwere Grunderkrankungen, vorliegende Behandlung mit Antibiotika.“

(cit.: (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2004a)

Unter ca-MRSA werden Stämme verstanden, die entweder bei Patienten im ambulanten Bereich isoliert wurden, oder von Patienten innerhalb der ersten 48 Stunden eines Krankenhausaufenthaltes. Darüber hinaus dürfen diese Patienten keine Krankengeschichte einer MRSA-Infektion oder -Kolonisation besitzen und keine Anamnese von vorhergehenden Krankenhausaufenthalten, Aufnahme in einem Pflege- oder Altersheim und keine vorhergehenden Operationen über einen Zeitraum eines Jahres haben. Außerdem sollten die Patienten keine dauerhaft einliegenden Katheter oder medizinische Geräte, die die Haut penetrieren, haben (DEURENBERG, R. H. et al. 2007). Für den Erwerb eines HA-MRSA sind folgende Risikofaktoren postuliert:

- Alter >60 Jahre,
- männliches Geschlecht,
- periphere Gefäßerkrankungen,
- schlechter Zustand der Haut,
- Ulcera,
- Anus praeter,
- Patient aus einem Pflegeheim, neurologische Rehabilitation,
- vorangegangener Krankenhausaufenthalt (< 12 Monate),
- vorangegangene MRSA-Besiedlung/Infektion,
- vorangegangene antibiotische Behandlung (< 3 Monate),
- Dauer des Krankenhausaufenthaltes,
- Nasogastrale Sonde

(cit.: (HEIZMANN P. et al. 2005).

Dennoch bleiben die Grenzen zwischen ca-MRSA und ha-MRSA verschwommen. Zwar gibt es die molekulargenetischen und klinischen Unterschiede zwischen ca-MRSA und ha-MRSA, dennoch ist die Eindeutigkeit eines wirklichen „community-acquired“ MRSA nicht immer gegeben. Wie unten beschrieben gibt es molekulargenetisch gegenläufige Berichte zur Eindeutigkeit des ca-MRSA. Zusätzlich gelangen heute mehr Patienten schon mit einer MRSA-Besiedlung oder -Infektion in die Krankenhäuser, so dass die Frage aufgeworfen werden muss, ob es sich um wirkliche ca-MRSA handelt oder ob es sich um den Erwerb eines ha-MRSA außerhalb des Krankenhauses handelt. Salgado et al. formulierte 2003 den Vorschlag, neu identifizierte MRSA nach der Definition für ca-MRSA als „community-onset“ MRSA

(co-MRSA) mit oder ohne Risikofaktoren zu nennen. Dieser Begriff ist klinisch deshalb sinnvoller, da er nicht die Tatsache impliziert, wo der Erwerb des MRSA erfolgte, sondern unter welchen Gegebenheiten der MRSA identifiziert wurde (SALGADO, C. D. et al. 2003).

In einer Studie von Naimi et al. aus dem Jahr 2003 wurden weitere klinische Unterschiede zwischen ha-MRSA und ca-MRSA gefunden. So waren die Patienten mit ca-MRSA signifikant jünger als Patienten mit ha-MRSA. Daneben unterschied sich die Verteilung der Infektionen von ha-MRSA und ca-MRSA signifikant voneinander. Bei ca-MRSA herrschten tiefe Haut- und Weichteilinfektionen vor, während ha-MRSA signifikant häufiger bei Blutkulturisolaten, Atemwegs- und Harnwegsinfektionen vorkamen (NAIMI, T. S. et al. 2003).

Molekulargenetischer Unterschied des ca-MRSA

Ca-MRSA unterscheiden sich vor allem im genetischen Material und in ihrer Resistenzvielfalt von den bisherigen MRSA. Bei einer Kolonisation oder einer manifesten Infektion mit ca-MRSA fehlen in der Regel jegliche Risikofaktoren für den Erwerb eines MRSA, z.B. vorhergehende Klinikaufenthalte oder Operationen, Bewohnen einer Langzeit-Versorgungseinrichtung, Dialyse, medizinische Fremdkörper oder einliegende Katheter (VANDENESCH, F. et al. 2003). Bis vor kurzem wurde als eindeutiges Charakteristikum des ca-MRSA der Zusammenhang zwischen dem SCC*mec*-Typen IV und dem *lukS-lukF*-Gens beschrieben. *lukS-lukF*, welches für Panton-Valentin Leukocidin (PVL) kodiert, ist eine Pathogenitätseigenschaft, die mit nekrotisierenden Haut- und Weichteilinfektionen und nekrotisierender Pneumonie assoziiert ist (DEURENBERG, R. H. et al. 2007; ROBERT-KOCH-INSTITUT 2004a; VANDENESCH, F. et al. 2003). Zwar gibt es Untersuchungen, die diese These unterstützen (SHUKLA, S. K. et al. 2004), dennoch gibt es auch widersprüchliche Veröffentlichungen im Hinblick auf diesen Zusammenhang (O'BRIEN, F. G. et al. 2004; RAMDANI-BOUGUESSA, N. et al. 2006; ROBERT-KOCH-INSTITUT 2004b; WANNET, W. J. et al. 2005).

Das zweite Charakteristikum, welches ca-MRSA von ha-MRSA abgrenzen soll, ist die non-multiresistente Natur, die auch mit den kürzeren SCC*mec*-Gen-Kassetten vom Typ IV oder V (20,9 bis 28 kb) einhergeht (BABA, T. et al. 2002; ITO, T. et al. 2004; OKUMA, K. et al. 2002). Die SCC*mec*-Kassetten besitzen neben dem *mecA*-Gen für

die Methicillin-Resistenz entweder keine weiteren Gene für andere Antibiotika – Resistenzen oder nur wenige weitere Resistenz-Gene (beschrieben sind Fluorchinolon-, Fusidinsäure-Natrium-, Oxytetracyclin- und Kanamycin-Resistenzen) (RAMDANI-BOUGUESSA, N. et al. 2006; WITTE, W. et al. 2005). Jedoch kann es weder als allgemein gültig angesehen werden, dass ca-MRSA ausschließlich die SCC_{mec}-Gen-Kassetten vom Typ IV oder V besitzen (siehe oben), noch kann davon ausgegangen werden, dass ca-MRSA keine Multiresistenzen besitzt (OKUMA, K. et al. 2002; RAMDANI-BOUGUESSA, N. et al. 2006).

1.2 Biofilm

Ein Biofilm ist ein Zusammenschluss von Bakterien, die sich sesshaft einer Oberfläche anhaften. Antonie van Leeuwenhoek war im 17. Jahrhundert der Erste, der das Phänomen Biofilm beschrieb. Von seinen eigenen Zähnen kratzte er die Plaque und beobachtete mit Hilfe eines Mikroskops die „animalculi“, die diese mikrobielle Gemeinschaft bildeten. In den 40er Jahren des 19. Jahrhunderts wurde Biofilm dann im Zusammenhang mit natürlichen Wasserökosystemen und später in industriellen Wassersystemen beschrieben (ZOBELL, C. E. 1943). Dort konnte mit Hilfe direkter mikroskopischer Beobachtungen eindeutig nachgewiesen werden, dass mehr als 99,9% der Bakterien in der sesshaften Form eines Biofilms an einer großen Vielzahl von Oberflächen wachsen. Erst 1978 wurde die generelle These aufgestellt, dass die Mehrheit der Bakterien in Nährstoff-suffizienten Wasserökosystemen an Oberflächen anhaftend in Matrix-umhüllten Biofilmen wachsen. Die sesshaften Bakterien unterscheiden sich dabei tief greifend von ihren frei schwimmenden Arten. Da die sesshaften Bakterien in industriellen Wassersystemen ernsthafte Probleme verursachten, wurden dort die Grundsteine der Erforschung des Biofilms und konsequenterweise der Forschung zur Bekämpfung von Biofilmen gelegt (DONLAN, R. M. et al. 2002).

Die allgemeine Meinung, dass Bakterien in natürlichen und industriellen Systemen bevorzugt in der sesshaften Form in einem Biofilm wachsen, wurde außer im Zusammenhang mit der dentalen Plaque auf medizinischem Gebiet nicht unmittelbar angenommen. 1972 entdeckten Bayston und Penny das mukoide Wachstum von Koagulase-negativen Staphylokokken an zerebrospinalen Holter-Shunts (BAYSTON,

R. et al. 1972) und starteten damit eine Welle zur Erforschung natürlich infizierter Katheter. Mehrere Forschergruppen konnten mit elektronenmikroskopischer Hilfe die Kolonisation der Katheter mit Koagulase-negative Staphylokokken bestätigen (CHRISTENSEN, G. D. et al. 1985).

Meist handelt es sich um Multispezies-Biofilme. Nur ein geringer Teil der Biofilme wird durch eine einzelne Spezies von Bakterien gebildet. Die Entstehung eines Biofilms erfolgt in mehreren Schritten. Zunächst erfolgt die initiale Anlagerung der Bakterien an eine Oberfläche. Dabei spielen je nach Bakterienspezies bakterielle Adhäsine, Flagellen oder Pili die entscheidende Rolle (DAVEY, M. E. et al. 2000; GÖTZ, F. 2002). Durch Zell-Zell-Interaktion und die Produktion einer extrazellulären polymerischen Substanz (EPS) bilden sich die ersten Schichten von Mikrokolonien, die das Anhaften an die Oberfläche verstärken. Durch Zellteilung und weitere Produktion von EPS wächst die Gemeinschaft der Bakterien zu einem reifen dreidimensionalen Biofilm. Die Umgebungsumstände, z.B. die umgebende Hydrodynamik oder das Nährstoffangebot, bedingen das Wachstum des Biofilms sowohl in seinem Ausmaß als auch in seiner Form und Architektur aus Poren, Kanälen und der Anordnung der Bakterienzellen. Zu einem reifen Biofilm gehört ebenso wie das Anlagern der Bakterien an Oberflächen auch das Herauslösen von Zellen aus dem Biofilm. Dies ermöglicht den Bakterien das Auffinden weiterer nährstoffreicher Bereiche (STOODLEY, P. et al. 2002).

Ein Biofilm besteht zu 97% aus Wasser. Die Bestandteile des EPS sind hauptsächlich Polysaccharide, Proteine und Nukleinsäuren (STOODLEY, P. et al. 2002). Abhängig von Bakterienspezies und Umgebungsangebot unterscheiden sich die EPS erheblich voneinander (SUTHERLAND, I. 2001). Als vorherrschendes Polymer bei Staphylokokken wurde das polysaccharide interzelluläre Adhäsion (PIA) beschrieben, welches das Genprodukt des *icaADBC*-Gens ist (GÖTZ, F. 2002).

Der Nachweis, dass für zerebrospinale Infektionen mit Koagulase-negativen Staphylokokken besiedelte Shunts verantwortlich waren (BAYSTON, R. et al. 1972), führte zu der heutigen Meinung, dass Infektionen durch medizinische Fremdmaterialien praktisch ausschließlich mit Biofilm-bildenden Bakterien assoziiert sind. Neben Koagulase-negativen und -positiven Staphylokokken spielen Pseudomonaden, Gram-

negative Bacilli, *E. coli*, Enterokokken, Klebsiellen, Streptokokken und viele mehr eine Rolle bei Fremdkörper-assoziierten Infektionen. Aber auch Hefen, wie *Candida spp.* können an medizinischem Fremdmaterial adhären, einen Biofilm bilden und Infektionen auslösen (LYNCH, A. S. et al. 2007; O'TOOLE, G. et al. 2000). Da das Ausmaß der Verwendung von medizinischem Fremdmaterial in allen Fachrichtungen der Medizin zunimmt, liegt das Hauptaugenmerk bezüglich Biofilm auf den Fremdkörper-assoziierten Infektionen. Dabei darf nicht außer Acht gelassen werden, dass bestimmte chronische Infektionen mit der Biofilmbildung bestimmter Bakterien zusammenhängen. Dazu zählen vor allem die durch *P. aeruginosa* vermittelte zystische Fibrose der Lunge, die natürliche Herzklappenendokarditis vor allem durch vergrünende Streptokokken, Urogenitalinfektionen durch uropathogene *E. coli*, aber auch chronische Mittelohrentzündungen durch *H. influenzae*, *S. pneumoniae* und *M. catarrhalis* (DONLAN, R. M. et al. 2002; LYNCH, A. S. et al. 2007).

Nicht ganz zu Unrecht formulierten Stewart und Costerton das Charakteristikum des Biofilms eher als eine hartnäckige Überlebensstrategie als eine aggressive Virulenz, auch wenn dies nur teilweise gelten kann (STEWART, P. S. et al. 2001). Ist eine Infektion mit Biofilm assoziiert, kommt es durch die Mechanismen der erhöhten Resistenz gegenüber Antibiotika und Immunabwehr häufig zu einer Persistenz der Bakterien an entsprechender Stelle im Körper. Die indirekte Virulenz des Biofilms kann dann unterschiedlich starke Ausprägungen annehmen. Besonders im Falle von immunkomprimierten Patienten kann dies besonders schwerwiegend sein, da diese Patienten weniger Abwehrkräfte gegenüber persistierenden oder eindringenden Bakterien haben. Auch der Infektionsort spielt eine wesentliche Rolle in der Virulenz des Biofilms. So sind Morbidität und Mortalität durch chronische Infektionen künstlicher Herzklappen, Gelenkprothesen und anderer Fremdkörper, aber auch bei Patienten mit zystischer Fibrose, bedrohlich erhöht. Andere chronische, Biofilm-assoziierte Infektionen haben eine weniger starke Virulenz, zeichnen sich aber durch ihre erschwerte Behandlung und ihre häufigen Rezidive aus. Dazu gehören die chronischen Harnwegsinfektionen genauso wie die chronischen Mittelohrentzündungen und die Periodontitis (LEWIS, K. 2001).

Die Virulenz eines Biofilms kommt durch mehrere Faktoren zustande. Ständig aufflammende akute Infektionen entstehen durch das Herauslösen von Bakterien oder Bakterienaggregaten aus dem Biofilm und deren Einschwemmung in die Blutbahn.

Zusätzlich wird durch die Bildung von Endotoxinen im Falle gramnegativer Erreger am Ort des Biofilms eine lokale Immunantwort bewirkt. Diese Immunantwort ist aber nicht suffizient in der Beseitigung des Biofilms sondern resultiert in einer lokalen Zerstörung von Gewebe (COSTERTON, J. W. et al. 1999).

Die erschwerten Behandlungsmöglichkeiten Biofilm-assoziiierter Infektionen drücken sich in den daraus entstehenden Mehrkosten für das Gesundheitswesen aus. Sind Katheter-assoziierte Infektionen noch relativ kostengünstig ohne chirurgische Interventionen zu beseitigen, wird das Ausmaß der Kosten bei einer besiedelten künstlichen Herzklappe deutlich. Denn häufig bleibt als einzige Möglichkeit die chirurgische Sanierung durch Austausch der Materialien übrig. Analog lässt sich dies auf alle chirurgisch implantierten Fremdmaterialien übertragen. Auch Septikämien bei Patienten der chronischen Hämodialyse durch Katheter-assoziierte Infektionen erhöhen die Kosten erheblich. Darüber hinaus steigt bei diesen Patienten die Wahrscheinlichkeit an, Sekundärkomplikationen wie z.B. eine infektiöse Endokarditis oder Osteomyelitis zu erhalten. Neben den Kosten für das Gesundheitssystem sind auch die Belastungen für die betroffenen Patienten und das Krankenhauspersonal zu bedenken (LYNCH, A. S. et al. 2007).

Bakterien, die sich in einem Biofilm einbetten und organisieren, weisen eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Immunsystem und einer Antibiotikatherapie auf. Sie sind im Biofilm vor Abtötung geschützt. Leid et al. konnten zeigen, dass humane Leukozyten in einen Biofilm eindringen können, aber nicht in der Lage sind die dort ansässigen Bakterien zu phagozytieren (LEID, J. G. et al. 2002). Die Resistenz gegenüber Antibiotika kann bei Bakterien innerhalb eines Biofilms um das 100- bis 1000fache gegenüber ihren planktonischen Gegenstücken gesteigert sein (CERI, H. et al. 1999). Es wurde zwar gezeigt, dass ein Teil der Biofilmbakterien trotz ihrer erhöhten Resistenz durch Antibiotika abgetötet werden können. Eine kleine Population von Zellen im Biofilm überleben aber auch dann noch, wenn die Konzentration des Antibiotikums extensiv gesteigert wird (BROOUN, A. et al. 2000). Anderl et al. fanden heraus, dass bestimmte Antibiotika den Biofilm nicht oder nur langsam penetrieren (ANDERL, J. N. et al. 2000). Ursache dafür ist die Bildung von β -Laktamasen, die in den oberen Schichten des Biofilms das Antibiotikum schneller inaktivieren als es in den Biofilm eindringen kann. Andere Antibiotika dringen innerhalb kurzer Zeit in den

Biofilm ein, bleiben in ihre Wirkung dennoch insuffizient, die Bakterien innerhalb des Biofilms effektiv abzutöten. Daher müssen auch andere Mechanismen bei der Resistenz eine Rolle spielen. Man nimmt an, dass der Übergang mancher Zellen in eine stationäre Phase mit sehr langsamem oder ohne Wachstum dafür verantwortlich ist. Mehrere Studien zeigten, dass sich die Resistenz von Bakterien gegenüber gewissen Antibiotika erhöht, wenn sich die Phase des Wachstums verlangsamt. Zum Beispiel sind Penicilline in ihrer Wirkung auf wachsende Zellen angewiesen (ANDERL, J. N. et al. 2003; FUX, C. A. et al. 2005; MAH, T. F. et al. 2001; STEWART, P. S. et al. 2001).

Ein Teil der Zellen innerhalb eines reifen Biofilms tritt nach einer gewissen Zeit in eine stationäre Phase ein. Auslöser hierfür ist die Aktivierung einer Stressantwort. Hohe Zelldichte, Unterschiede im Nährstoffangebot, pH-Wert Unterschiede, chemische Stoffe wie Abfallprodukte oder antimikrobielle Substanzen, Hitze- oder Kälteschocks oder Sauerstofflimitierung führen zu deren Aktivierung und damit zu einer geringeren Wachstumsrate. Da es aber auch Unterschiede der Resistenz zwischen Biofilmzellen und planktonischen Zellen in der stationären Phase gibt, bedeutet das, dass dies nicht der einzig verantwortliche Mechanismus für die erhöhte Resistenz in einem Biofilm sein kann. Eine weitere Hypothese sagt, dass sich die Bakterien in einem Biofilm in einen Biofilm-spezifischen Phänotyp umwandeln. Gestützt wird diese These durch Studien zu veränderten Genexpressionen und -repressionen zwischen Biofilm- und Planktonischen Zellen. (ANDERL, J. N. et al. 2000; ANDERL, J. N. et al. 2003; DONLAN, R. M. et al. 2002; FUX, C. A. et al. 2005; MAH, T. F. et al. 2001; STEWART, P. S. et al. 2001).

1.3 Ziele der Arbeit

Der meist multiresistente Charakter des MRSA und die zum Teil stark eingeschränkten Therapiemöglichkeiten manifester Infektionen, sowie die langwierige und aufwendige Sanierung MRSA-kolonisierter Patienten, werfen die Frage auf, ob dies möglicherweise in der unterschiedlichen Fähigkeit zur Biofilmbildung von MRSA-Stämmen begründet sein könnte. Diese könnte auch eine Erklärung sein für die bisweilen beobachtbare Divergenz zwischen Ergebnissen aus *in vitro*-Prüfungen gegenüber Antibiotika und Desinfektionsmitteln und der unterschiedlichen *in vivo*-Empfindlichkeit von MRSA-Stämmen. Dieser zusätzliche Virulenzfaktor würde die Behandlung MRSA-besiedelter

oder -infizierter Patienten zusätzlich erschweren. Jones et al. fanden, dass eine Kombinationstherapie mit Vancomycin und Rifampicin einen Biofilm von MRSA an Kathetern nicht signifikant reduzieren konnte, obwohl die planktonischen MRSA-Isolate sensibel gegenüber diesen beiden Antibiotika waren (JONES, S. M. et al. 2001).

Um herauszufinden ob MRSA die Fähigkeit zur Biofilmbildung besitzt, wurden in dieser Arbeit mit Hilfe des von Christensen et al. beschriebenen und allgemein anerkannten Biofilm-Adhärenztests (CHRISTENSEN, G. D. et al. 1985), die gesamten MRSA-Patientenisolate des Jahres 2004 des Universitätsklinikums der Philipps-Universität Marburg auf ihre Fähigkeit zur Biofilmbildung überprüft. Daraus leiten sich folgende Fragestellungen ab:

- 1.) Hat MRSA im Allgemeinen die Fähigkeit zur Biofilmbildung?
- 2.) Falls MRSA-Stämme die Fähigkeit zur Biofilmbildung besitzen, kann mit Hilfe des Adhärenztestes diese Biofilmbildung quantifiziert werden und darüber hinaus eine Aussage über eine Einteilung der Stärke des Biofilms abgeleitet werden?
- 3.) Kann im Falle einer positiven Biofilmbildung mit Hilfe der angegebenen Patientendaten und geeigneter statistischer Tests ein Zusammenhang zwischen der Biofilmstärke und ausgewählten klinischen Parametern der Patienten gefunden werden?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Philipps-Universität Marburg werden seit 2001 kontinuierlich alle isolierten MRSA-Stämme aus eingesandten klinischen Proben des Universitätsklinikums der Philipps-Universität Marburg gesammelt und konserviert. Die in dieser Arbeit getesteten klinischen MRSA-Isolate umfassen alle Patienten, bei denen im Laufe des Jahres 2004 mindestens ein MRSA-Isolat nachgewiesen werden konnte.

Die Antibiogramme der MRSA-Isolate wurden routinemäßig bei der Identifikation der klinischen Proben durchgeführt und dokumentiert. Sie gehen aus den Befundberichten der dazugehörigen Patienten hervor.

In Tabelle 1 des Anhangs sind die Informationen zu den einzelnen MRSA-Isolaten aufgeführt. Tabelle 2 des Anhangs gibt einen Überblick über das klinische Probenmaterial der MRSA-Isolate, wie es auf den Begleitscheinen beschrieben wurde.

2.1.2 Kontrollstämme

Positiv – Kontrollstamm:

S. epidermidis RP62A, ATCC 35984

Negativ – Kontrollstamm:

S. carnosus TM300

(ZIEBUHR, W. et al. 1997)

2.1.3 Nährmedien

<p>BBL™ BHI (Brain Heart Infusion) – Medium (gebrauchsfertig), Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ USA</p>	<p>Zusammensetzung: pro 1000 ml bidestilliertem Wasser: Peptic Digest of Animal Tissue 6,0 g Brain Heart Infusion (from solids) 6,0 g Natriumchlorid 5,0 g Dextrose 3,0 g Pancreatic Digest of Gelatin 14,5 g Dinatriumphosphat 2,5 g</p>
<p>Blutagar (gebrauchsfertig), BD Columbia Agar mit 5% Schafsblut Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ USA</p>	<p>Zusammensetzung: pro 1000 ml bidestilliertem Wasser: Pancreatic Digest of Casein 12,0 g Peptic Digest of Animal Tissue 5,0 g Hefeextrakt 3,5 g Rinderextrakt 3,0 g Maisstärke 1,0 g Natriumchlorid 5,0 g Agar-Agar 13,5 g Schafsblut, entfibriniert 5%</p>
<p>Tryptische Soja Nährbouillon, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ USA</p>	<p>Zusammensetzung: pro 1000 ml bidestilliertem Wasser: Sojabohnen-Casein-Abbau-Nährboden 30,0 g Pankreatisch abgebautes Casein 17,0 g Enzymatisch abgebautes Sojamehl 3,0 g Dextrose 4,5 g Natriumchlorid 8,0 g Dikaliumphosphat 2,5 g</p>

2.1.4 Puffer

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS – Puffer), Merck, Darmstadt, Deutschland	Zusammensetzung: pro 1000ml bidestilliertem Wasser: Kaliumdihydrogenphosphat 4,84 g Dinatriumhydrogenphosphat 5,53 g Natriumchlorid 6,98 g mit Natronlauge auf pH 6,8 einstellen.
--	--

Alle eigens hergestellten Medien und Puffer wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und über 20 Minuten autoklaviert.

2.1.5 Chemikalien

Kristallviolett (Karbolfiolett), Merck, Darmstadt. Deutschland	Zusammensetzung: Kristallviolett 1.01408 10 g 96% Ethanol 100 ml
---	--

2.1.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Brutschränke: Heraeus Function Line B20 Heraeus B6200	Heraeus, Hanau, Deutschland
Cellstar® Zellkulturplatte, 96 Wells, Flachboden, steril	Greiner Bio-One, Nürtingen, Deutschland
Computerprogramm zur statistischen Auswertung: SPSS 11.0.1	SPSS GmbH Software, München, Deutschland
Gefrierschrank: Liebherr Profiline	Liebherr, Biberach, Deutschland
Impfösen, 10µl, steril	Greiner Bio-One, Nürtingen, Deutschland
Kühlschrank: Liebherr Profiline	Liebherr, Biberach, Deutschland

Pipette, 10ml, Glas, steril	Hirschmann® Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Pipette Research® (variabel) 20 – 200µl 100 – 1000µl Pipette Research® (Mehrkanal), 8-Kanal 30 – 300µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 2 – 200µl, gelb 100 – 1000µl, blau	Greiner Bio-One, Nürtingen, Deutschland
Pipettierhilfe: Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Schüttler: IKA Minishaker MS1	IKA, Staufen, Deutschland
Spektrophotometer LP400	Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, Frankreich
Stammhaltung: Cryobank™	Mast Diagnostica, Reinfeld, Deutschland
Zellkulturschale, 145x20mm, steril	Greiner Bio-One, Nürtingen, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Biofilm – Adhärenztest

Die mittels Cryobank™-System eingefrorenen MRSA-Isolate und -Referenzstämme wurden auf BD Columbia Blutagar bei 37°C über 24h angezchtet. Davon wurde jeweils eine Kolonie eines Isolates mit einer sterilen Einmal-Öse in 8ml BBL™ BHI überimpft. Die Lösung wurde bei 37°C über 24h inkubiert. Nach 24h wurde die Lösung durch einen Schüttler großzügig durchmischt um eine homogene Lösung zu erhalten.

Die BHI-Kultur wurde über eine Verdünnungsreihe in TSB um das 10000-fache verdünnt. 200µl dieser Suspension wurden in 64 Vertiefungen der Cellstar® Flachboden-Zellkulturplatte gegeben. Die Platten wurden bei 37°C über 24h inkubiert. Die überschüssige Lösung wurde abgeschüttet und die Vertiefungen dreimal mit 340µl PBS-Puffer pH 6,8 gewaschen. Anschließend wurden die noch anhaftenden Bakterien mit Kristallviolett über 5 Minuten gefärbt. Die überschüssige Farbe wurde vorsichtig unter fließendem Wasser entfernt und die Platten kopfüber getrocknet. Die optische

Dichte des angefärbten Biofilms wurde im Spektrophotometer bei 550nm gemessen. Aus den Ergebnissen wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. In äquivalenter Weise wurden die Ergebnisse der Positiv- und Negativkontrollen erzielt. Sie liefen bei jedem Isolat in jeweils 16 Vertiefungen auf derselben Flachboden-Zellkulturplatte parallel mit, um Umgebungsfehler auszuschließen.

2.2.2 Patientendaten

Die Patientendaten wurden der Datenbank des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Philipps - Universität Marburg entnommen. Sie wurden retrospektiv aus den Probenbegleitscheinen erfasst und ausgewertet. Als Informationen zur eingesendeten Probe konnten das Untersuchungsmaterial sowie Ergänzungen, die Diagnose und die Fragestellung und eine eventuelle antibiotische Vorbehandlung angegeben werden.

MRSA-Isolate von gleichen Patienten wurden als getrennte Stämme behandelt, wenn sich in ihrem Resistenzmuster das Resistenzverhalten insgesamt um mindestens zwei Schritte unterschied. Ein Schritt ist z.B. der Übergang von einem sensiblen zu einem intermediären Resistenzverhalten. Zwei Schritte sind von einem sensiblen zu einem resistenten Empfindlichkeitsverhalten.

2.2.3 Statistik

Das Signifikanzniveau aller statistischen Berechnungen betrug $\alpha < 0,05$.

Nicht-parametrische Verfahren zum Zusammenhang zwischen nominal und metrisch skalierten Ausprägungen:

Der Vergleich zweier unabhängiger nominal skalierten Stichproben auf ihre metrisch skalierten Ausprägungen wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests untersucht.

Bei mehr als zwei unabhängigen Stichproben wurde der H-Test nach Kruskal-Wallis angewendet.

Die Stärke des Zusammenhangs zwischen Mittelwerten und klinischen Parametern wurde mit dem Zusammenhangsmaß Eta (η) und Eta² (η^2) berechnet.

Zusammenhang zwischen nominal skalierten Ausprägungen:

Zur Berechnung des Zusammenhangs wurde der Chi²-Test für 2 x 2 Felder oder k x 1 Felder angewendet. Waren die Anforderungen des Chi²-Testes nicht erfüllt, wurde der exakte Test nach Fisher angewandt.

Die Stärke des Zusammenhangs beim Chi²-Test für k x 1 Felder wurde mittels des Cramér-Koeffizienten C berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Biofilmergebnisse

3.1.1 Klinische MRSA-Stämme

Es wurden 165 Isolate auf ihre Biofilmbildung überprüft. Der Mittelwert (MW) der Ergebnisse der 165 Isolate betrug $OD_{550} 0,237 \pm 0,147$ Standardabweichung (SD) bei einem Standardfehler des MW von 0,011. Der Median lag bei 0,199 OD_{550} . Die Spannweite betrug 0,880 OD_{550} mit einem Minimum der Probennummer 149 bei $0,060 \pm 0,007$ OD_{550} und einem Maximum der Nr. 142 mit $0,940 \pm 0,206$ OD_{550} . 50% der Werte lagen zwischen $OD_{550} 0,139$ und 0,284, während sich 95% der Werte zwischen $OD_{550} 0,084$ und 0,673 befanden. Die Schiefe betrug 2,021 bei einem Standardfehler von 0,189, die Wölbung 5,311 bei einem Standardfehler von 0,376 (Siehe Abbildung 1 im Anhang).

3.1.2 Positivkontrolle *S. epidermidis* RP62A und Negativkontrolle *S. carnosus* TM300

Für die Positivkontrollen ergab sich ein MW von $OD_{550} 0,173 \pm 0,037$ SD bei einem Standardfehler des Mittelwerts von 0,003. Das 95%-Konfidenzintervall des MW lag zwischen $OD_{550} 0,167$ und 0,179, wiederum bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%. Der Median lag bei dem OD_{550} -Wert von 0,175. Die Spannweite der Positivkontrollen betrug bei 165 Werten 0,184 OD_{550} mit einem Minimum bei $0,099 \pm 0,018$ OD_{550} (Probennummer 16) und einem Maximum (Nr. 167) bei $0,283 \pm 0,064$ OD_{550} . Die Perzentilen betragen $P_{2,5}=0,111$, $P_{25}=0,143$, $P_{75}=0,198$ und $P_{97,5}=0,260$ bei OD_{550} . Die Schiefe betrug 0,242 bei einem Standardfehler von 0,189 und die Wölbung -0,231 bei einem Standardfehler von 0,376 (Siehe Abbildung 2a im Anhang).

Der MW der Negativkontrollen betrug bei $OD_{550} 0,0576 \pm 0,004$ SD und einem Standardfehler von 0,0004. Der Median lag bei 0,0568 OD_{550} . Die Spannweite mit 0,026 OD_{550} lag zwischen Probennummer 20 mit $0,048 \pm 0,004$ OD_{550} (Minimum) und Probennummer 157 mit $0,074 \pm 0,014$ OD_{550} (Maximum). 50% der Messergebnisse lagen in einem Bereich zwischen 0,054 und 0,060 OD_{550} , 95% zwischen 0,050 und 0,068 OD_{550} . Die Schiefe betrug 0,818 bei einem Standardfehler von 0,189 und die

Wölbung betrug 0,756 bei einem Standardfehler von 0,376 (Siehe Abbildung 2b im Anhang).

3.2 MRSA-Probenisolate

3.2.1 Antibiotika-Resistenzmuster

β-Lactame

Getestet wurden Penicillin G, Oxacillin, Ampicillin, Ampicillin/Sulbactam, Cefazolin, Cefuroxim, Imipenem und Meropenem. Diese wurden bei 165 Isolaten (100%) getestet und alle Isolate (100%) waren resistent.

Aminoglykoside, Fluorchinolone, Tetracycline, Makrolide und Lincosamide, sowie Sulfonamide, Glykopeptide, Oxazolidinone, Rifampicin, Fosfomycin, Chloramphenicol:

Bei Amikacin zeigten 2,4% der MRSA-Isolate ein resistentes, 91,5% sensibles und 5,5% intermediäres Resistenzverhalten. Ein Isolat (0,6%) wurde nicht getestet. Bei Gentamicin waren 9,1% resistent, 90,3% sensibel und 0,6% intermediär. Gegenüber Ciprofloxacin waren 98,8% resistent, 0,6% sensibel und 0,6% intermediär. Gegenüber Levofloxacin waren 95,8% resistent, 1,2% sensibel und 3% intermediär. Bei Tetracyclin waren 1,8% der Isolate resistent, 97% sensibel und 0,6% intermediär. Ein Isolat (0,6%) wurde nicht getestet. Gegenüber Erythromycin zeigten 94,5% ein resistentes und 5,5% ein sensibles Resistenzverhalten. Gegen Clindamycin waren 93,3% der Isolate resistent und 6,7% sensibel (Siehe Abbildung 3a und Tabelle 4 im Anhang).

Bei Chloramphenicol zeigten 2,4% ein resistentes, 73,3% sensibles und 1,2% intermediäres Resistenzverhalten. 38 Isolate (23%) wurden nicht getestet. Bei Fosfomycin waren 1,2% resistent und 73,3% sensibel. 42 Isolate (25,5%) wurden nicht getestet. Gegenüber Linezolid waren 0,6% resistent und 76,4% sensibel. 38 Isolate (23%) wurden nicht getestet. Gegenüber Rifampicin waren 3% resistent und 97% sensibel. Bei Teicoplanin waren 2,4% der Isolate resistent, 72,1% sensibel und 1,8% intermediär. 39 Isolate (23,6%) wurden nicht getestet. Gegenüber

Trimethoprim/Sulfamethoxazol zeigten 0,6% ein resistentes und 99,4% ein sensibles Resistenzverhalten. Gegen Vancomycin war kein Isolat resistent, 99,4% sensibel und 0,6% intermediär (Siehe Abbildung 3b und Tabelle 5 im Anhang).

3.2.2 Probengruppen

Die aus den verschiedenen Probenmaterialien gewonnenen MRSA-Isolate (Abschnitt 2.1.1) wurden in Gruppen der Organlokalisation zusammengefasst. Dies gibt Abbildung 4a und Tabelle 3 im Anhang wieder.

Vergleich der Biofilmstärke innerhalb der Gruppen des Probenmaterials

Die Mittelwerte der Probengruppen ergaben folgende Werte: Für die Gruppe „Haut- und Schleimhautisolate“ ergab sich der MW OD_{550} 0,192 \pm 0,074 SD. Der Standardfehler des MW betrug 0,021, die Varianz $\sigma^2=0,005$. Das 95%-Konfidenzintervall lag zwischen OD_{550} 0,145 und 0,239. Der Median lag bei 0,173 OD_{550} . Das Minimum, die Probennummer 20, hatte einen Wert von 0,096 OD_{550} , das Maximum betrug 0,303 OD_{550} , welches die Probennummer 54 war. Damit umfasste die Spannweite 0,207 OD_{550} . Insgesamt waren 12 Fälle in der Gruppe der Haut- und Schleimhautisolate.

Die Gruppe „Atemwegs isolate“ hatte bei einer Fallzahl von $n=39$ den MW 0,241 \pm 0,182 OD_{550} bei einem Standardfehler von 0,029. Das 95%-Konfidenzintervall lag zwischen 0,182 und 0,300. Der Median lag bei 0,183 OD_{550} , die Varianz betrug $\sigma^2=0,033$. Das Minimum, die Probennummer 43 hatte einen Wert von 0,089 OD_{550} , das Maximum, die Probennummer 142, einen Wert von 0,940 OD_{550} . Damit umfasste die Spannweite 0,851 OD_{550} .

Die Gruppe „Blutisolate“ umfasste $n=9$ Fälle mit einem MW von 0,214 \pm 0,089 OD_{550} . Der Standardfehler betrug 0,030. Das 95%-Konfidenzintervall umfasste einen Bereich zwischen OD_{550} 0,145 und 0,282. Der Median lag bei 0,191 OD_{550} , die Varianz betrug $\sigma^2=0,008$. Das Minimum mit der Probennummer 132 betrug 0,101 OD_{550} , das Maximum hatte die Probennummer 106 mit einem Wert von 0,374 OD_{550} . Die Spannweite umfasste somit einen Bereich über 0,273 OD_{550} .

Die Gruppe „Fremdmaterial“ umfasste $n=18$ Fälle. Der MW betrug 0,361 \pm 0,230 OD_{550} . Der Standardfehler betrug 0,054. Das 95%-Konfidenzintervall lag zwischen

OD₅₅₀ 0,246 und 0,475. Der Median lag bei OD₅₅₀ 0,333, die Varianz betrug $\sigma^2=0,053$. Die Probennummer 43 hielt mit 0,089 OD₅₅₀ das Minimum inne, die Probennummer 142 das Maximum mit 0,940 OD₅₅₀. Die Spannweite betrug in dieser Gruppe 0,851 OD₅₅₀.

Die Gruppe „Harnwegs isolate“ enthielt n=5 Fälle, deren MW 0,394 \pm 0,310 OD₅₅₀ ergab. Der Standardfehler des MW betrug 0,139. Das 95%-Konfidenzintervall lag zwischen OD₅₅₀ 0,008 und 0,779. Beim Median ergab sich ein Wert von 0,302 OD₅₅₀, bei der Varianz $\sigma^2=0,096$. Minimum und Maximum hatten die Probennummern 35 und 135 mit den Werten 0,091 OD₅₅₀ und 0,820 OD₅₅₀. Daraus errechnete sich die Spannweite in dieser Gruppe mit 0,729 OD₅₅₀.

Die größte Gruppe, die „Wundinfektionen“, bestanden aus n=92 Fällen. Der errechnete MW betrug 0,223 \pm 0,122 OD₅₅₀ bei einem Standardfehler des MW von 0,013. Das 95%-Konfidenzintervall umfasste einen Bereich zwischen 0,198 und 0,248 OD₅₅₀. Der Median lag bei 0,198 OD₅₅₀, die Varianz ergab $\sigma^2=0,015$. Mit einem Wert von 0,060 OD₅₅₀ war die Probennummer 149 das Minimum, mit 0,674 OD₅₅₀ war die Probennummer 165 das Maximum. Die Spannweite betrug somit 0,614.

Ein Isolat fiel in keine der Gruppen, da keine Angaben über Herkunft oder sonstige klinische Angaben gemacht wurden. Dieses Isolat mit der Probennummer 86 wurde als „nicht klassifizierbar“ eingestuft und aus den Gruppenanalysen ausgeschlossen.

(Siehe Abbildung 4b im Anhang).

Auftreten der MRSA-Isolate in den verschiedenen klinischen Disziplinen

Die untersuchten klinischen MRSA-Isolate kamen vorwiegend aus Einsendungen der Intensivstationen (31,5%), gefolgt von den großen klinischen Disziplinen der Inneren Medizin (21,8%) und der Chirurgie (13,9%), sowie Diagnosen aus dem ambulanten Bereich (23%). Aus anderen Disziplinen wie Neurologie (0,6%), Orthopädie (1,8%), Urologie (1,8%) und Gynäkologie (1,2%) gab es wenige Einsendungen. Auf restliche klinische Disziplinen (andere) entfielen 4,2% (Siehe Abbildung 5 im Anhang).

Klinische Ausprägung

Aus Probenmaterial und klinischen Angaben wurden die Isolate in Gruppen der klinischen Ausprägung eingeteilt. Von 165 MRSA-Isolaten wurden 11 Isolate (6,7%) als Besiedlung eingestuft, 135 Isolate (81,8%) stammten aus infiziertem Gewebe und 18 Isolate (10,9%) waren im Zusammenhang mit Fremdmaterial isoliert worden. Ein Isolat (0,6%) konnte nicht zugeordnet werden, dieses wurde bei der statistischen Analyse nicht berücksichtigt (Siehe Abbildung 6a im Anhang).

Für den MW der Gruppe „Besiedlung“ errechnete sich ein Wert von 0,195 OD₅₅₀ bei einem Standardfehler des MW von 0,023. Die SD betrug 0,077 OD₅₅₀, die Varianz 0,006. Das 95%-Konfidenzintervall des MW lag zwischen 0,143 und 0,247 OD₅₅₀. Zwischen dem Minimum mit 0,096 OD₅₅₀ (Probennummer 20) und dem Maximum 0,303 OD₅₅₀ (Probennummer 54) lag eine Spannweite von 0,207 OD₅₅₀.

Die Gruppe „Infektion“ hatte einen MW von 0,222 OD₅₅₀ mit einem Standardfehler des MW von 0,011. Die SD betrug 0,129 OD₅₅₀, die Varianz 0,017. Das 95%-Konfidenzintervall des MW lag zwischen 0,200 und 0,244 OD₅₅₀. Das Minimum (Probennummer 149) mit 0,060 OD₅₅₀ und das Maximum (Probennummer 135) mit 0,820 OD₅₅₀ umfassten eine Spannweite von 0,759 OD₅₅₀.

Die Gruppe „Fremdmaterial“ besaß einen MW von 0,361 OD₅₅₀ bei einem Standardfehler von 0,054. Das 95%-Konfidenzintervall lag zwischen 0,246 und 0,475 OD₅₅₀. Die SD betrug 0,230 OD₅₅₀ und die Varianz 0,053. Die Spannweite von 0,851 OD₅₅₀ lag zwischen der Probennummer 43 mit dem Wert 0,089 OD₅₅₀ (Minimum) und der Probennummer 142 mit dem Wert 0,940 OD₅₅₀ (Maximum).

(Siehe Abbildung 6b im Anhang).

Vorausgegangene Antibiotikatherapie bei Probenentnahme

Von den 165 Isolaten waren 50 Isolate (30,3%) keiner Antibiotikatherapie ausgesetzt, 71 Isolate (43,0%) waren einem Antibiotikum ausgesetzt und bei 44 Isolaten (26,7%) wurde auf den Begleitscheinen keine Angabe gemacht (Siehe Abbildung 7a im Anhang).

Die Gruppe ohne vorausgegangene Antibiotikatherapie hatte einen MW von 0,217 OD₅₅₀ bei einem Standardfehler von 0,017. Das 95%-Konfidenzintervall des MW lag zwischen 0,182 und 0,252 OD₅₅₀. Die SD betrug 0,122 OD₅₅₀, die Varianz 0,015. Die

Spannweite von 0,614 OD₅₅₀ lag zwischen dem Minimum von 0,060 OD₅₅₀ (Probennummer 149) und dem Maximum von 0,674 OD₅₅₀ (Probennummer 165).

Für die Gruppe mit vorausgegangener Antibiotikatherapie errechnete sich ein MW von 0,263 OD₅₅₀ bei einem Standardfehler von 0,019. Die SD betrug 0,164 OD₅₅₀, die Varianz 0,027. Das 95%-Konfidenzintervall des MW lag zwischen 0,224 und 0,301 OD₅₅₀. Das Minimum dieser Gruppe betrug 0,089 OD₅₅₀ (Probennummer 32, 43), das Maximum 0,940 OD₅₅₀ (Probennummer 142). Damit umfassten die Werte der Gruppe eine Spannweite von 0,851 OD₅₅₀.

Für die Gruppe, bei der keine Angaben zur Antibiotikatherapie gemacht wurden, errechnete sich ein MW von 0,216 OD₅₅₀ bei einem Standardfehler von 0,021. Die SD betrug 0,142 OD₅₅₀, die Varianz 0,020. Das 95%-Konfidenzintervall des MW lag zwischen 0,173 und 0,259 OD₅₅₀. Die Spannweite umfasste 0,744 OD₅₅₀ bei einem Minimum von 0,076 OD₅₅₀ (Probennummer 16) und einem Maximum von 0,820 OD₅₅₀ (Probennummer 135).

(Siehe Abbildung 7b im Anhang).

3.2.3 Patientendaten

Patienten

Unter den 165 MRSA-Patientenisolaten waren 129 (78,2%) verschiedene Patienten. Von 97 Patienten (75,2%) wurde genau ein Isolat (58,8%) auf die quantitative Biofilmbildung getestet. Bei 28 Patienten (21,7%) wurden zwei MRSA-Isolate (33,9%), bei 4 Patienten (3,1%) drei Isolate (7,3%) untersucht. Daraus ergab sich, dass bei 24,8% (32 Patienten) ein MRSA doppelt oder dreifach isoliert wurde.

Bei den 129 Patienten handelte es sich bei 71 Patienten um Männer (55,0%) und bei 58 Patienten um Frauen (45,0%) (Siehe Abbildung 8a im Anhang). Das Alter der Patienten verteilte sich wie folgend: Der MW betrug 61,9 Jahre bei einer Standardabweichung von 18,3 Jahren. Das Minimum hatte mit 0 Jahren ein Patient der Pädiatrie mit der Probennummer 113, das Maximum mit 94 Jahren der Patient mit der Probennummer 123. Der Median lag bei 65,6 Jahren, 50% der Patienten hatten ein Alter zwischen 50,2 und 75,3 Jahren (Siehe Abbildung 8b im Anhang).

Patientenaufenthaltort bei Probenentnahme

Von den 129 Patienten befanden sich 37 Patienten (28,7%) während der Probenentnahme im ambulanten Bereich. Der Hauptteil der Patienten, 57 (44,2%), befand sich im stationären Bereich auf peripheren Stationen, wohingegen sich 35 Patienten (27,1%) auf einer Intensivstation befanden (Siehe Abbildung 9 im Anhang).

Vorausgegangene Antibiotikatherapie bei Probenentnahme

Bei neun Patienten, die mehrfach getestet wurden, war eine Neuinfektion mit einem neuen MRSA-Stamm erfolgt, woraufhin diese Patienten neu bewertet wurden.

47 Patienten (36,4%) erhielten vor der Probenentnahme keine Antibiotikatherapie, 53 Patienten (35,7%) hingegen erhielten eine Therapie. Bei 38 Patienten (27,9%) wurden keine Angaben über eine Antibiotikatherapie gemacht (Siehe Abbildung 10a im Anhang).

Die Gruppe ohne vorausgegangene Antibiotikatherapie hatte einen MW von 0,220 OD₅₅₀ bei einem Standardfehler von 0,018. Das 95%-Konfidenzintervall des MW lag zwischen 0,183 und 0,256 OD₅₅₀. Die SD betrug 0,125 OD₅₅₀, die Varianz 0,016. Die Spannweite von 0,614 OD₅₅₀ lag zwischen dem Minimum von 0,060 OD₅₅₀ (Probennummer 149) und dem Maximum von 0,674 OD₅₅₀ (Probennummer 165).

Für die Gruppe mit vorausgegangener Antibiotikatherapie errechnete sich ein MW von 0,281 OD₅₅₀ bei einem Standardfehler von 0,022. Die Standardabweichung betrug 0,157 OD₅₅₀, die Varianz 0,025. Das 95%-Konfidenzintervall des MW lag zwischen 0,238 und 0,325 OD₅₅₀. Das Minimum dieser Gruppe betrug 0,089 OD₅₅₀ (Probennummer 32, 43), das Maximum 0,940 OD₅₅₀ (Probennummer 142). Damit umfassten die Werte der Gruppe eine Spannweite von 0,851 OD₅₅₀.

Bei unbekannter vorausgegangener Antibiotikatherapie betrug der MW 0,216 OD₅₅₀ bei einem Standardfehler von 0,021. Für die SD errechnete sich ein Wert von 0,142 OD₅₅₀, für die Varianz 0,020. Das 95%-Konfidenzintervall des MW lag zwischen 0,173 und 0,259 OD₅₅₀. Das Minimum der Gruppe hatte die Probennummer 16 mit 0,076 OD₅₅₀, das Maximum die Probennummer 135 mit 0,820 OD₅₅₀. Diese umfassten eine Spannweite von 0,744 OD₅₅₀.

(Siehe Abbildung 10b im Anhang).

3.3 Induktive Statistik

3.3.1 Zusammenhänge der Biofilmproduktion

Mittels statistischer Tests wurde der Zusammenhang zwischen ausgewählten klinischen Parametern und der absoluten Biofilmstärke ermittelt.

Vergleich der Biofilmstärke innerhalb der Gruppen der vorausgegangenen Antibiotikatherapie:

Die Gruppe der vorausgegangenen Antibiotikatherapie „unbekannt“ wurde bei den folgenden Auswertungen ausgeschlossen.

Hypothesen:

- $H_0: \mu_1 = \mu_2$; Die beiden Gruppen der vorausgegangenen Antibiotikatherapie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Biofilmstärke nicht.
- $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$; Die beiden Gruppen der vorausgegangenen Antibiotikatherapie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Biofilmstärke signifikant.

Mittels des Mann-Whitney-U-Tests wurden die Gruppen der vorausgegangenen Antibiotikatherapie auf ihre Biofilmstärke untersucht. Bei der Fallzahl $n=121$ ergab sich der Wert $U=1490,00$ für den Mann-Whitney-U-Test bei einer zweiseitigen asymptotischen Signifikanz von $p=0,134$.

Wurde der Test auf die einzelnen Patienten angewendet, so ergab sich für die Fallzahl $n=100$ der Wert $U=903,000$ für den Mann-Whitney-U-Test bei einer zweiseitigen asymptotischen Signifikanz von $p=0,018$.

Korrelation der Mittelwerte der Biofilmstärke mit den Gruppen der vorausgegangenen Antibiotikatherapie:

Die Fallzahl betrug $n=121$. Das Zusammenhangsmaß η ergab $\eta=0,151$ und $\eta^2=0,023$.

Wurden doppelte Patienten ausgeschlossen, ergaben sich bei einer Fallzahl von $n=100$ folgende Werte: Das Zusammenhangsmaß ergab $\eta=0,212$ und $\eta^2=0,045$.

Vergleich der Biofilmstärke zwischen den Gruppen der klinischen Ausprägung:

Die Gruppe „nicht klassifizierbar“ der Gruppe der Manifestation wurde aus den folgenden Statistiken ausgeschlossen. Die Fallzahl betrug $n=164$. Es wurde der nicht-parametrische Test nach Kruskal-Wallis zum Vergleich der Biofilmstärke angewendet.

Hypothesen:

- $H_0: \mu_1=\mu_2=\mu_3$; Die Biofilmstärke der verschiedenen Gruppen der klinischen Ausprägung unterscheiden sich nicht voneinander.
- $H_1: \mu_1\neq\mu_2\neq\mu_3$; Die Biofilmstärke der verschiedenen Gruppen der klinischen Ausprägung unterscheiden sich signifikant voneinander.

Der Kruskal-Wallis-H-Test ergab den Wert $H=8,325$ mit einer Signifikanz von $p=0,016$. Zur Untersuchung der Unterschiede der Biofilmstärke zwischen den einzelnen Gruppen wurden diese einzeln untereinander mittels des Mann-Whitney-U-Tests verglichen. Für den Vergleich der Gruppen „Besiedlung“ und „Infektion“ ergab sich ein U-Wert von $U=706,000$ ($n=146$) bei einer zweiseitigen asymptotischen Signifikanz von $p=0,787$. Zwischen „Besiedlung“ und „Fremdmaterial“ ($n=29$) ergab sich ein U-Wert von $U=53,000$ bei der zweiseitigen asymptotischen Signifikanz von $p=0,039$. Beim Vergleich von „Fremdmaterial“ und „Infektion“ ($n=153$) betrug der U-Wert $U=715,000$ bei einer zweiseitigen asymptotischen Signifikanz von $p=0,005$.

Das Zusammenhangsmaß η ergab $\eta=0,304$, η^2 betrug $\eta^2=0,092$.

(Siehe Abbildung 11 im Anhang).

Vergleich der Biofilmstärke zwischen den Gruppen der Probengruppen:

Innerhalb der Probengruppen waren mehrere Isolate gleichzeitig verschiedenen Gruppen zugeordnet, da sie sowohl den Anforderungen der einen als auch einer anderen Gruppe genügten. Dadurch ergab sich eine Fallzahl von $n=175$.

Hypothesen:

- H_0 : Die Biofilmstärken der Probengruppen unterscheiden sich nicht voneinander.
- H_1 : Die Biofilmstärken der Probengruppen unterscheiden sich signifikant voneinander.

Zur Überprüfung der Hypothesen wurde der nicht-parametrische Test nach Kruskal-Wallis angewandt. Für den H-Wert errechnete sich: $H=8,709$. Die asymptotische Signifikanz betrug $p=0,121$ (Siehe Abbildung 12 im Anhang).

3.4 Einteilung der Biofilmstärke

3.4.1 Gegenüberstellung der verschiedenen Einteilungen der Gruppen der Biofilmstärke

Die Einteilung der Biofilmstärke in Gruppen nach Stepanovic et al. aus dem Jahr 2000 stellte sich folgendermaßen dar: Der Cut-Off-Wert wurde bei drei Standardabweichungen über dem durchschnittlichen Wert der Negativ-Kontrollen für jede einzelne Mikrotiter-Platte festgelegt ($OD_C = OD_{Neg} + 3 \times SD_{Neg}$) (STEPANOVIC, S. et al. 2000). Nach diesem Wert erfolgte die Einteilung der Gruppen der Biofilmstärke wie folgt:

$OD \leq OD_C$	keine Biofilmproduktion
$OD_C < OD \leq 2 \times OD_C$	schwache Biofilmproduktion
$2 \times OD_C < OD \leq 4 \times OD_C$	moderate Biofilmproduktion
$4 \times OD_C < OD$	starke Biofilmproduktion

Bei eigener Einteilung wurde der Cut-Off zwischen Biofilm-negativ und Biofilm-positiv für alle Isolate gleich festgelegt: $OD_C=0,100$. Isolate mit Biofilmwerten kleiner/gleich 0,100 wurden als Biofilm-negativ eingestuft, Isolate mit Werten über 0,100 galten als Biofilm-positiv. Die Einteilung in verschiedene Stufen der Biofilmstärke ergab sich wie folgt:

OD \leq 0,100	keine Biofilmproduktion
0,100 < OD \leq 0,250	schwache Biofilmproduktion
0,250 < OD \leq 0,400	moderate Biofilmproduktion
0,400 < OD	starke Biofilmproduktion

Bei der Einteilung nach Stepanovic et al. produzierten 4 Isolate (2,4%) keinen Biofilm, 49 Isolate (29,7%) produzierten einen schwachen Biofilm, 77 Isolate (46,7%) bildeten einen moderaten Biofilm und 35 Isolate (21,2%) waren starke Biofilmproduzenten. Insgesamt waren nach der Einteilung nach Stepanovic et al. 97,6% der MRSA-Stämme Biofilm-positiv (Siehe Abbildung 13a im Anhang).

Nach eigener Einteilung waren 20 Isolate (12,1%) Biofilm-negativ und produzierten keinen Biofilm. Daraus folgte, dass 145 Isolate (87,9%) Biofilm-positiv waren, die sich folgendermaßen unterteilten: 90 Isolate (54,5%) bildeten einen schwachen Biofilm, 38 Isolate (23,0%) einen moderaten Biofilm und 17 Isolate (10,3%) bildeten einen starken Biofilm (Siehe Abbildung 13b im Anhang).

Gegenüberstellung der Einteilungen im Hinblick auf den Zusammenhang der Biofilmgruppen und dem klinischen Merkmal der vorausgegangenen Antibiotikatherapie

Im Vergleich zwischen den Biofilmgruppen nach eigener Einteilung und nach Stepanovic et al. zeigte sich folgende Verteilung:

Nach eigener Einteilung waren die Häufigkeiten bei den 50 Isolaten ohne vorausgegangene Antibiotikatherapie wie folgt verteilt: 12% der Isolate bildeten keinen Biofilm, 60% einen schwachen Biofilm, 20% einen moderaten Biofilm und 8% einen starken Biofilm. Bei 71 Isolaten mit vorhandener Antibiotikatherapie bildeten 9,9% der Isolate keinen Biofilm, 47,9% einen schwachen Biofilm, 26,8% einen moderaten Biofilm und 15,5% der Isolate einen starken Biofilm (Siehe Abbildung 14a und Tabelle 6 im Anhang).

Nach der Einteilung nach Stepanovic et al. verteilten sich die Isolate folgendermaßen: Von 50 Isolaten, die keiner Antibiotikatherapie ausgesetzt waren, bildeten 6% der Isolate keinen Biofilm, 28% einen schwachen Biofilm, 54% einen moderaten Biofilm und 12% der Isolate einen starken Biofilm. Bei 71 Isolaten mit vorausgegangener Antibiotikatherapie produzierte kein Isolat keinen Biofilm, 28,2% der Isolate

produzierten einen schwachen Biofilm, 40,8% einen moderaten Biofilm und 31% der Isolate einen starken Biofilm (Siehe Abbildung 14b und Tabelle 7 im Anhang).

Die Hypothesen für den Zusammenhang lauten:

- H_0 : Das Merkmal „Biofilmgruppe“ ist vom Merkmal „Vorausgegangene Antibiotikatherapie“ stochastisch unabhängig.
- H_1 : Das Merkmal „Biofilmgruppe“ ist vom Merkmal „Vorausgegangene Antibiotikatherapie“ stochastisch abhängig.

Bei eigener Einteilung ergab der Chi²-Test folgendes Ergebnis: $\chi^2=2,827$. Die zweiseitige asymptotische Signifikanz betrug $p=0,419$ (Siehe Tabelle 6 im Anhang).

Nach Stepanovic et al. ergab der exakte Test nach Fisher für die zweiseitige exakte Signifikanz $p=0,015$ (Siehe Tabelle 7 im Anhang).

Ausschluss doppelter Patienten

Nach Ausschluss doppelter Patienten zeigte sich folgende Verteilung: Bei eigener Einteilung erfuhren 47 Isolate keine vorausgegangene Antibiotikatherapie. Keinen Biofilm bildeten 12,8% der Isolate, einen schwachen Biofilm 57,4% der Isolate, einen moderaten Biofilm 21,3% der Isolate und einen starken Biofilm 8,5% der Isolate. Von 53 Isolat, die einer Antibiotikatherapie ausgesetzt waren, bildeten 3,8% der Isolate keinen Biofilm, 47,2% einen schwachen Biofilm, 32,1% einen moderaten Biofilm und 17% einen starken Biofilm (Siehe Abbildung 15a und Tabelle 8 im Anhang).

Nach Einteilung nach Stepanovic et al. unterteilten sich die MRSA-Isolate folgendermaßen: Ohne vorausgegangene Antibiotikatherapie bildeten 6,4% der Isolate keinen Biofilm, 27,7% einen schwachen Biofilm, 53,2% einen moderaten Biofilm und 12,8% der Isolate einen starken Biofilm. Insgesamt waren wiederum 47 Isolate keiner Antibiotikatherapie ausgesetzt. Bei vorausgegangener Antibiotikatherapie unterteilten sich 53 Isolate folgendermaßen: kein Isolat bildete keinen Biofilm, 18,9% der Isolate bildeten einen schwachen Biofilm, 45,3% einen moderaten Biofilm und 35,8% einen starken Biofilm (Siehe Abbildung 15b und Tabelle 9 im Anhang).

Die Hypothesen entsprechen denen ohne Ausschluss der doppelten Patienten.

Nach eigener Einteilung betrug nach dem Fisher Exakt Test die zweiseitige exakte Signifikanz $p=0,153$ (Siehe Tabelle 8 im Anhang).

Bei der Einteilung nach Stepanovic et al. betrug nach dem exakten Test nach Fisher die exakte Signifikanz $p=0,016$ (Siehe Tabelle 9 im Anhang).

Gegenüberstellung der Einteilungen im Hinblick auf den Zusammenhang der Biofilmgruppen und der klinischen Ausprägung

Der Vergleich zwischen eigener Einteilung und der Einteilung nach Stepanovic et al. zeigte folgende Unterschiede:

Nach eigener Einteilung waren von 11 Isolaten der Gruppe „Besiedlung“ 9,1% keine Biofilmbildner, 54,5% der Isolate bildeten einen schwachen Biofilm und 36,4% einen moderaten Biofilm. Kein Isolat bildete einen starken Biofilm. Von 135 Isolaten der Gruppe „Infektion“ bildeten 12,6% keinen Biofilm, 59,3% einen schwachen Biofilm, 20% einen moderaten Biofilm und 8,1 % einen starken Biofilm. In der Gruppe „Fremdmaterial“ waren von 18 Isolaten 11,1% keine Biofilmbildner, 22,2% bildeten einen schwachen Biofilm, 38,9% einen moderaten Biofilm und 27,8% einen starken Biofilm (Siehe Abbildung 16 und Tabelle 10 im Anhang).

Nach Einteilung nach Stepanovic et al. waren 11 Isolate der Gruppe „Besiedlung“ zugeteilt. Kein Isolat bildete keinen Biofilm, 45,5% bildeten einen schwachen Biofilm, 36,4% einen moderaten und 18,2% der Isolate einen starken Biofilm. Von 135 Isolaten der Gruppe „Infektion“ bildeten 3% der Isolate keinen Biofilm, 30,4% einen schwachen Biofilm, 49,6% der Isolate einen moderaten Biofilm und 17% einen starken Biofilm. In der Gruppe „Fremdmaterial“ bildete von insgesamt 18 Isolaten kein Isolat keinen Biofilm, 16,7% der Isolate bildeten einen schwachen Biofilm, 33,3% der Isolate einen moderaten Biofilm und 50% der Isolate einen starken Biofilm (Siehe Abbildung 17 und Tabelle 11 im Anhang).

Hypothesen:

- H_0 : Das Merkmal „Biofilmgruppe“ ist vom Merkmal „Klinische Ausprägung“ stochastisch unabhängig.
- H_1 : Das Merkmal „Biofilmgruppe“ ist vom Merkmal „Klinische Ausprägung“ stochastisch abhängig.

Nach eigener Einteilung errechnete sich nach dem exakten Test nach Fisher eine zweiseitige exakte Signifikanz von $p=0,018$ (Siehe Tabelle 10 im Anhang).

Nach der Einteilung nach Stepanovic et al. ergab der exakte Test nach Fisher für die zweiseitige exakte Signifikanz $p=0,096$ (Siehe Tabelle 11 im Anhang).

Wurden die Biofilmgruppen asymmetrisch reduziert, indem man sich im Merkmal „Klinische Ausprägung“ auf die Gruppen „Infektion“ und „Fremdmaterial“ beschränkte, so ergab nach eigener Einteilung der exakte Test nach Fisher eine zweiseitige exakte Signifikanz von $p=0,004$ (Siehe Tabelle 12 im Anhang).

Nach Stepanovic et al. errechnete sich nach dem Fisher Exakt Test eine zweiseitige exakte Signifikanz von $p=0,029$ (Siehe Tabelle 13 im Anhang).

4 Diskussion

4.1.1 MRSA und Biofilmbildung

Die Biofilmbildung durch Methicillin-sensible *S. aureus* (MSSA) wurde beschrieben und gilt heute als gesichert (CRAMTON, S. E. et al. 1999; MCKENNEY, D. et al. 1999). Aber auch die Berichte über offenbar Biofilm-produzierende MRSA nehmen stetig zu (ANDO, E. et al. 2004; FITZPATRICK, F. et al. 2006; GRINHOLC, M. et al. 2007; JONES, S. M. et al. 2001; RAAD, I. et al. 2007). Diese Veröffentlichungen unterstützen die Annahme, dass MRSA die Fähigkeit besitzt, Biofilme zu bilden. Um dies nachzuweisen, wurden 165 klinische MRSA-Isolate des Jahres 2004 aus dem Universitätsklinikum der Philipps-Universität Marburg mittels Zellkulturplatten-Test (ZKP) auf Biofilmbildung getestet. Von allen Patienten, bei denen im Jahr 2004 mindestens ein positiver Befund von MRSA nachgewiesen werden konnte, wurde mindestens ein Isolat auf Biofilmbildung getestet.

Im Ergebnis ergab die optische Bestimmung der Biofilmbildung aller MRSA-Isolate einen Extinktions-Mittelwert der OD₅₅₀ von $0,247 \pm 0,147$ SD. Die Werte bewegten sich zwischen 0,060 und 0,940 OD₅₅₀. Damit waren die Ergebnisse größtenteils konform mit den wenigen Veröffentlichungen, in denen auf die absolut gemessenen Biofilmwerte eingegangen wurde (ANDO, E. et al. 2004; MANAGO, K. et al. 2006). Manago et al. und Ando et al. untersuchten in ihren Arbeiten ebenso klinische MRSA-Isolate. Die geringen Unterschiede zwischen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und denen der Veröffentlichungen kann durch unterschiedliche Wellenlängenfilter der Spektrophotometer sowie durch unterschiedliche Versuchsdurchführungen erklärt werden. Manago et al. erzielten zwar in ihrer Arbeit deutlich höhere Maxima, allerdings wurden in der eigenen Untersuchung vier Isolate mit nicht interpretierbar hohen Ergebnissen ausgeschlossen. Die Konformität zeigte sich auch darin, dass die Streuung der Ergebnisse in allen Arbeiten relativ groß war.

Der Vergleich der eigenen Ergebnisse der absoluten Biofilmwerte der Positivkontrolle *S. epidermidis* RP62A mit denen anderer Veröffentlichungen zeigte, dass andere Autoren bei *S. epidermidis* RP62A eine ungleich höhere Biofilmbildung nachweisen konnten (ARCIOLA, C. R. et al. 2006; CHRISTENSEN, G. D. et al. 1985; MACK, D.

et al. 1992). Zu erklären sind die Unterschiede durch einen divergierenden Versuchsaufbau. So unterschieden sich neben dem verwendeten Wellenlängenfilter, die gewählte Verdünnung, die Nährmedien und die Inkubationszeit. Allerdings bleibt die Frage offen, warum bei solch unterschiedlichen Versuchsaufbauten, die Biofilmwerte der MRSA-Isolate dennoch konform sind, wohingegen sich die Werte der Positivkontrolle so stark unterscheiden. Eine Erklärung, die spekulativ bleiben muss, könnte sein, dass die unterschiedlichen Versuchsaufbauten einen unterschiedlich starken Einfluss auf die Biofilmbildung bei *S. epidermidis* haben. Verschiedene Autoren konnten unterschiedliche Einflussfaktoren auf die Biofilmbildung unterschiedlicher Staphylokokken-Spezies zeigen (CRAMTON, S. E. et al. 2001; DOBINSKY, S. et al. 2003; GÖTZ, F. 2002; JOHNSON, M. et al. 2005; LIM, Y. et al. 2004).

4.1.2 Patientendaten und Probenmaterial

Das Patientengut entsprach dem Risikoprofil einer MRSA-Besiedlung oder -Infektion, wie sie Heizmann et al. formuliert haben. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug 61,9 Jahre. Mit 55% war der Hauptteil der Patienten männlichen Geschlechts. Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse stehen somit im Einklang mit epidemiologischen Daten über die Alters- und Geschlechtsverteilung MRSA-positiver Patienten (HEIZMANN P. et al. 2005; HUANG, S. S. et al. 2003; NAIMI, T. S. et al. 2003).

Die prozentualen Häufigkeiten der eingesandten MRSA-Isolate aus den verschiedenen klinischen Disziplinen entsprachen zum größten Teil der Studie des Robert-Koch-Instituts von 2007 (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2007b). Am häufigsten waren Einsendungen von den verschiedenen Intensivstationen (31,5%) des Universitätsklinikums Marburg. Gefolgt wurden diese von ambulant diagnostizierten Einsendungen (23%). Bei den ambulant diagnostizierten MRSA-Isolaten wurde von ha-MRSA-Besiedelten oder -infizierten Patienten ausgegangen, nicht von ca-MRSA. Darauf deuteten die Resistenzmuster der MRSA-Isolate hin, die mit den Resistenzmustern des Rhein-Hessen- (ST5), Berliner (ST45) oder Barnimer (ST22) Epidemiestamm aus dem Jahr 2003 übereinstimmten. Vertreter aller dieser Epidemiestämme wurden im Jahr 2003 in Mittelhessen isoliert (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2004b). Die MRSA-Isolate stimmten in ihrem Resistenzmuster zu 75,8%

überein mit Resistenzen gegenüber Ciprofloxacin, Levofloxacin, Erythromycin und Clindamycin. Darüber hinaus waren viele Einsendungen aus den Polikliniken des Universitätsklinikums Marburg eingegangen. Das könnte bedeuten, dass die Patienten in den Polikliniken der verschiedenen klinischen Disziplinen bereits als MRSA-Träger bekannt waren. Nach dem ambulanten Bereich waren die großen klinischen Disziplinen der Inneren Medizin (21,8%) und der Chirurgie (13,9%) die führenden Einsender von Materialien mit MRSA-Nachweis. Andere klinische Disziplinen spielten eine untergeordnete Rolle.

Die Gruppen der Abstrichmaterialien konnten zwar eindeutig eingeteilt werden, die Gruppenstärken aber waren sehr unterschiedlich. Die Gruppe der Harnwegs isolate war mit 5 Fällen die kleinste, wohingegen die Gruppe der Wundinfektionen mit 92 Fällen die größte Gruppe darstellte. Die Ergebnisse zeigten im Trend, dass die unterschiedlichen Abstrichorte einen Einfluss auf die Biofilmstärke hatten, statistisch konnte aber kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Durch die starken Gruppenunterschiede waren die Biofilmstärken nicht zu vergleichen. Auffallend bei den Gruppen der Probenmaterialien war die in jeder Gruppe relativ breite Spannweite. Die Erkenntnis, dass sich in allen Gruppen schwächere und stärkere Biofilmproduzenten befanden, deckt sich mit Ergebnissen anderer Veröffentlichungen (CHRISTENSEN, G. D. et al. 1985; MANAGO, K. et al. 2006; VOGEL, L. et al. 2000).

4.1.3 Zusammenhang der Biofilmwerte mit dem Parameter der klinischen Ausprägung

Beim Zusammenhang der Biofilmstärke und der klinischen Ausprägung stellte sich die Frage, ob die Herkunft der Isolate einen Einfluss auf die Biofilmstärke ausmachen würde. So wurde in verschiedenen Arbeiten postuliert, dass Bakterien, die Fremdkörper-assoziierte Infektionen auslösen, einen stärkeren Biofilm produzieren als Bakterien anderer Infektionen (ANDO, E. et al. 2004; MANAGO, K. et al. 2006; VOGEL, L. et al. 2000). Ebenso konnten Manago et al. in ihrer Veröffentlichung zeigen, dass kolonisierende Bakterien einen schwächeren Biofilm bilden als Bakterien bei manifesten Infektionen (MANAGO, K. et al. 2006).

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Werte zeigten, dass sich die Biofilmmittelwerte der verschiedenen Gruppen signifikant voneinander unterscheiden ($p=0,016$). Die Gruppe „Fremdmaterial“ hatte mit $0,361 \text{ OD}_{550}$ die erwartungsgemäß höchste Biofilmbildung. Beim Mittelwertvergleich der Gruppen untereinander unterschied sich die Gruppe „Fremdmaterial“ auch signifikant von den anderen Gruppen ($p=0,004$ zwischen „Fremdmaterial“ und „Infektion“ bzw. $p=0,040$ zwischen „Fremdmaterial“ und „Besiedlung“). Ein signifikanter Unterschied zwischen „Infektion“ ($0,222 \text{ OD}_{550}$) und „Besiedlung“ ($0,195 \text{ OD}_{550}$) konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Damit stehen die gefundenen Ergebnisse nur zum Teil im Einklang mit vorhergehenden Veröffentlichungen. Die Ergebnisse zeigten Konformität mit Ando et al., die einen signifikanten Unterschied zwischen Fremdkörper-assoziierten Infektionen und anderen Infektionen zeigen konnten, ebenso wie mit der Veröffentlichung von Vogel et al. (ANDO, E. et al. 2004; VOGEL, L. et al. 2000). Die Ergebnisse von Manago et al. konnten mit den eigenen Ergebnissen dagegen nicht bestätigt werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen Besiedlungskeimen und Infektionskeimen konnte wie bei Manago et al. nicht nachgewiesen werden (MANAGO, K. et al. 2006). Problematisch zu beurteilen sind die eigenen Ergebnisse durch sehr starke Unterschiede in der Gruppenstärke. So machte die Gruppe der Infektionen 81,8% aller Isolate aus. Dies wirkte sich direkt auf die statistische Berechnung aus. Denn zwar hatte die Gruppe „Besiedlung“ den niedrigsten Biofilmmittelwert, durch die geringe Gruppenstärke (nur 6,7% aller Isolate) errechnete sich aber kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Gruppe „Infektion“. Der Nachteil der stark unterschiedlichen Gruppenstärken blieb konsequenterweise in allen Berechnungen bei Beteiligung der klinischen Ausprägung bestehen.

4.1.4 Zusammenhang der Biofilmmwerte mit einer vorausgegangenen Antibiotikatherapie

Da vor der Isolierung eines MRSA zumeist eine kalkulierte Antibiotikatherapie verabreicht wird, welche keine Wirksamkeit gegen MRSA zeigt, wurde davon ausgegangen, dass eine vorausgegangene Antibiotikatherapie häufig Stress für die Bakterien darstellt und somit eine Biofilmbildung induziert. Dies belegten die Daten allerdings nur teilweise.

Die Ergebnisse zeigten, dass MRSA-Isolate bei einer vorausgegangenen Antibiotikabehandlung höhere Biofilmwerte aufwiesen. In der Gruppe mit vorausgegangener Antibiotikabehandlung war der durchschnittliche Biofilmwert 0,263 OD₅₅₀ im Gegensatz zu 0,217 OD₅₅₀ ohne vorausgegangene Antibiotikabehandlung. Der Unterschied der beiden Gruppen war aber nicht signifikant. Erst als bei der statistischen Auswertung Patienten ausgeschlossen wurden, die doppelt auf einen positiven MRSA-Befund getestet wurden, errechnete sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,018$) zwischen den Gruppen. Nach Ausschluss lagen die Mittelwerte der beiden Gruppen bei 0,281 OD₅₅₀ bei einer vorausgegangenen Antibiotikabehandlung, bzw. 0,220 OD₅₅₀ ohne vorausgegangene Antibiotikabehandlung. Die Mittelwerte nahmen zu, weil bei Ausschluss doppelter Patienten immer der höhere Biofilmwert als der höchstmöglich erzielbare Biofilmwert angenommen wurde. Aus der Gruppe mit vorausgegangener Antibiotikabehandlung fielen mehr doppelte Patienten heraus als aus der Gruppe ohne vorausgegangener Antibiotikabehandlung. Somit blieben in der Gruppe mit vorausgegangener Antibiotikabehandlung häufiger die höheren Biofilmwerte übrig.

Im Zusammenhang mit einer vorausgegangenen Antibiotikatherapie konnte nicht auf die verschiedenen Therapieschemata eingegangen werden, da diese zu unterschiedlich und die Gruppen zu klein waren. Dies war bedauerlich, da es für bestimmte Antibiotika Hinweise auf eine Biofilmwirksamkeit gibt (AMORENA, B. et al. 1999; JONES, S. M. et al. 2001; RAAD, I. et al. 2007). Zu einer Biofilm-induzierenden Wirkung durch Antibiotika gibt es verschiedene Berichte, zum einen durch eine Vielzahl unterschiedlicher Antibiotikaklassen, zum anderen durch die Testung unterschiedlicher biofilmbildender Bakterien. Rachid et al. untersuchten den Einfluss mehrerer Antibiotika auf die Biofilmbildung bei *S. epidermidis*. Dabei konnten sie zeigen, dass subinhibitorische Konzentrationen von Quinupristin-Dalfopristin und Tetracycline die Biofilmbildung um das 9- bis 11-fache erhöhten. Die getesteten Penicillin, Oxacillin, Chloramphenicol, Clindamycin, Gentamicin, Ofloxacin, Vancomycin und Teicoplanin hatten keinen Einfluss auf die *ica*-Expression. Untersuchungen zur Biofilmbildung unter Einwirkung dieser Antibiotika wurden nicht unternommen (RACHID, S. et al. 2000). Kränzler untersuchte *S. epidermidis* und *S. aureus* auf die Biofilmbildung unter inhibitorischen Konzentrationen mehrerer Antibiotika. Für *S. epidermidis* konnte er signifikante Verringerungen der Biofilmbildung durch Quinopristin-Dalfopristin,

Erythromycin und Clindamycin nachweisen, wohingegen er bei Kanamycin, Gentamicin und Tetracyclin keine signifikante Reduktion nachweisen konnte. Bei seinen Untersuchungen zur Auswirkung von Quinopristin-Dalfopristin auf die Biofilmbildung bei *S. aureus* konnte er sogar einen Rückgang der Biofilmbildung beobachten. Interessanterweise zeigte Quinopristin-Dalfopristin eine geringere Wirksamkeit gegenüber *S. aureus* als gegen *S. epidermidis* (KRÄNZLER H.M. 2006). Das könnte darauf hinweisen, dass subinhibitorische Konzentrationen wirksamer Antibiotika eine Biofilmbildung induzieren, wohingegen bei natürlichen Resistenzen die Biofilmbildung nicht notwendig ist. Dies wird durch die Veröffentlichungen von Hoffman et al. und Jones et al. unterstützt. Hoffman et al. konnten 2005 in ihrer Arbeit nachweisen, dass subinhibitorische Konzentrationen von Aminoglykosiden die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* und *E. coli* induzieren konnten (HOFFMAN, L. R. et al. 2005). Jones et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass MRSA in der Lage war, Katheter in der Anwesenheit von Vancomycin und Rifampicin zu kolonisieren und Biofilm zu bilden, obwohl oder gerade weil diese MRSA Vancomycin- und Rifampicin-sensibel waren (JONES, S. M. et al. 2001).

Die Überlegung, dass MRSA einen stärkeren Biofilm bilden, wenn sie einer Antibiotikabehandlung ausgesetzt sind, entspringt der Annahme, dass der Biofilm als ein Überlebensmechanismus angesehen werden sollte. Die Produktion von Biofilm wird durch umweltbedingte Stressfaktoren begünstigt. Eine Antibiotikabehandlung ist ein ebensolcher Stressfaktor, der das Überleben der Bakterien bedroht. Der Biofilm ist ein Mechanismus, das Überleben zu sichern. Auf der anderen Seite wurde auch vielen Antibiotika die Eigenschaft zugesagt, die Biofilmbildung zu reduzieren. So konnte für Vancomycin und Rifampicin dies für die Biofilmbildung bei MRSA nachgewiesen werden. Man muss aber festhalten, dass auch unter diesen MRSA-wirksamen Antibiotika eine Biofilmbildung immer noch möglich war. Diese Versuche wurden allerdings in *in vitro*-Modellen durchgeführt mit hohen Antibiotikakonzentrationen, die unter klinischen Bedingungen nicht gegeben sind (JONES, S. M. et al. 2001; RAAD, I. et al. 2007).

4.1.5 Einteilung der Biofilmwerte in Gruppen der Biofilmstärke

Aus den absoluten Werten der Biofilmbildung ergaben sich zwei Aspekte großen Interesses. Zum einen interessierte im Hinblick auf eine Korrelation des Biofilms mit klinischen Parametern, bei welchem Wert die Grenze (Cut-Off) zwischen Biofilm-negativen und -positiven zu ziehen war. Zum anderen war die Frage, ob durch eine Einteilung von Gruppen der Biofilmstärke eine Korrelation mit einer erhöhten Virulenz nachgewiesen werden könnte.

Die Schwierigkeit begann bei der Einordnung der Biofilmwerte. Zahlreiche Autoren haben sich dem Biofilm im Allgemeinen und Biofilm-bildenden Staphylokokken im Speziellen gewidmet. Christensen et al. konnten bei *S. epidermidis* zwar eine positive signifikante Korrelation zwischen Messwerten der Optischen Dichte und dem Gewicht des bakteriellen Biofilms herstellen (CHRISTENSEN, G. D. et al. 1985), doch Stepanovic et al. machten 2007 auf das Problem der Einordnung der Biofilmwerte aufmerksam. Bis heute gibt es keine einheitliche Einteilung der Biofilmergebnisse, die mittels des Biofilmtests gemessen wurden. Insgesamt sieben verschiedene Arten konnten Stepanovic et al. zusammentragen, wie unterschiedliche Autoren die Grenze zwischen Biofilm-negativen und Biofilm-positiven Staphylokokken-Stämmen in ihren Veröffentlichungen ermittelten (STEPANOVIC, S. et al. 2007).

Zwei unterschiedliche Einteilungen des Cut-Off und der Gruppen der Biofilmstärke

Um die Problematik der unterschiedlichen Einteilungen deutlich zu machen, wurden exemplarisch zwei Einteilungen des Cut-Off zwischen Biofilm-negativen und -positiven MRSA-Isolaten sowie deren Einteilung in die Gruppen der Biofilmstärke gegenüber gestellt. Die sich daraus ergebenden Gruppeneinteilungen zeigten deutlich den Einfluss der unterschiedlichen Einteilung auf die Ergebnisse. Die erste Einteilung folgte der Empfehlung von Stepanovic et al. aus dem Jahr 2007 (STEPANOVIC, S. et al. 2007). Dem gegenüber wurde eine eigene Einteilung in Anlehnung einer Veröffentlichung von Mack et al. erstellt (MACK, D. et al. 1992).

Ein Vergleich der beiden Einteilungen der Biofilmgruppen zeigt, dass sich die Gruppenstärken stark unterscheiden. Nach der Einteilung nach Stepanovic et al. waren 4 Isolate (2,4%) Biofilm-negativ. Nach der eigenen Einteilung waren es 20 Isolate

(12,1%). Einen schwachen Biofilm bildeten gemäß Stepanovic et al. 49 Isolate (29,7%), gemäß der eigenen Einteilung waren es 90 Isolate (53,5%). Diese Gruppe war bei der eigenen Einteilung zahlenmäßig am stärksten. Die zahlenmäßig stärkste Gruppe der Einteilung nach Stepanovic et al. war mit 77 Isolaten (46,7%) die Gruppe der moderaten Biofilmbildung. Bei eigener Einteilung waren in dieser Gruppe nur 38 Isolate (23%) vertreten. Die Gruppe der starken Biofilmbildner umfasste bei Stepanovic et al. 35 Isolate (21,2%), bei eigener Einteilung hingegen nur 17 Isolate (10,3%).

Damit wären nach der Einteilung von Stepanovic et al. die untersuchten MRSA-Isolate noch stärkere Biofilmbildner als das nach der eigenen Einteilung angenommen werden muss. Gemäß der Einteilung nach Stepanovic et al. war zudem der überaus größte Teil der MRSA in der Lage einen Biofilm zu bilden, insgesamt 97,6% der MRSA-Isolate. Bei eigener Einteilung war es mit 87,9% der Isolate immer noch ein sehr hoher Anteil, dennoch waren Biofilm-negative MRSA-Isolate häufiger. Vergleicht man Veröffentlichungen über die Biofilmbildung bei klinischen Staphylokokken-Isolaten, findet man eine sehr heterogene Datenlage. Vuong et al. untersuchten 105 klinische *S. aureus*-Isolate auf ihre Biofilmbildung und beschrieben nur einen Anteil von 25% aller Isolate als Biofilm-positiv (VUONG, C. et al. 2000). Grinholc et al. untersuchten sowohl MSSA als auch MRSA auf die Biofilmbildung. Bei ihnen waren 66% der MSSA-Isolate bzw. 45% der MRSA-Isolate Biofilm-positiv (GRINHOLC, M. et al. 2007). Ando et al. untersuchten MRSA-Isolate aus Harnwegsinfektionen auf die Biofilmbildung. Bei ihnen waren 95,6% aller Isolate Biofilm-positiv (ANDO, E. et al. 2004). Arslan et al. untersuchten verschiedene Staphylokokken-Subspezies auf die Biofilmbildung. *S. aureus* war zu 29,5% Biofilm-positiv. Von allen Staphylokokken-Isolaten waren 38,5% Biofilm-positiv (ARSLAN, S. et al. 2007). Bei Mathur et al. waren 54% der 152 klinischen Staphylokokken-Isolate Biofilm-positiv (MATHUR, T. et al. 2006). Somit waren die eigenen Ergebnisse am ehesten mit denen von Ando et al. vergleichbar.

Die Problematik der Unterscheidung zwischen Biofilm-positiven und Biofilm-negativen Staphylokokken-Isolaten machten Fitzpatrick et al. und Knobloch et al. nochmals deutlich. Beide untersuchten *S. aureus* auf die Biofilmbildung in verschiedenen Nährmedien mit unterschiedlichen Zusätzen. Fitzpatrick et al. unterschieden darüber hinaus zwischen MRSA und MSSA. Bei beiden Studien änderte sich der Anteil der Biofilm-positiven Isolate je nach Nährmedium und Zusatz. Bei

Fitzpatrick et al. variierte der Anteil der Biofilm-positiven MSSA-Isolate zwischen 33% und 80%, bzw. für die MRSA-Isolate zwischen 18% und 82%. Insgesamt lag der Anteil der Biofilm-positiven Isolate je nach Nährmedium und Zusatz zwischen 37% und 81% (FITZPATRICK, F. et al. 2002). Bei Knobloch et al. war die Datenlage ähnlich. Der Anteil der Biofilm-positiven Isolate lag wiederum je nach Medium zwischen 3,1% und 38,3%. Insgesamt waren 57% der Isolate in mindestens einem der Nährmedien Biofilm-positiv (KNOBLOCH, J. K. et al. 2002).

Zusammenhang der Biofilmgruppen mit dem Parameter der klinischen Ausprägung

Wurden die Isolate in Gruppen der Biofilmstärke eingeteilt und dann mit den klinischen Parametern korreliert, zeigten sich folgende Ergebnisse: Nach der Einteilung nach Stepanovic et al. gab es in der Gruppe der Fremdkörper-assoziierten Infektionen kein Biofilm-negatives MRSA-Isolat. Demnach könnte vermutet werden, dass Fremdkörper-assoziierte Infektionen immer mit einem Biofilm einhergehen, der aber in der Stärke variieren kann. Trotzdem war die Abhängigkeit der Biofilmgruppen mit dem Merkmal der klinischen Ausprägung nicht signifikant. Erst als die Abhängigkeit auf die Ausprägungen „Infektion“ und „Fremdmaterial“ beschränkt wurde, ergab sich ein signifikantes Ergebnis ($p=0,029$). Zusätzlich waren gemäß der Einteilung nach Stepanovic et al. insgesamt nur 4 Isolate Biofilm-negativ. Bei einer größeren Anzahl von klinischen Stämmen könnten auch Biofilm-negative Isolate in der Gruppe der Fremdkörper-assoziierten Infektionen vorkommen. Bei den absoluten Werten war in dieser Gruppe das Minimum ebenso sehr gering ($0,089 \text{ OD}_{550}$). Auch die deutlichen Unterschiede der Gruppenstärken machten eine Interpretation der Ergebnisse schwierig. Der eigenen Einteilung zufolge wären auch MRSA-Stämme in der Lage, eine Fremdkörper-assoziierte Infektion auszulösen, obwohl sie nicht in der Lage waren einen Biofilm zu bilden. Zwei der Fremdkörper-assoziierten MRSA-Isolate waren demnach Biofilm-negativ. Statistisch gesehen war der Zusammenhang nach der eigenen Einteilung signifikant ($p=0,018$) im Gegensatz zur Einteilung nach Stepanovic et al. Wurden entsprechend nur die Ausprägungen „Infektion“ und „Fremdmaterial“ verglichen, so ergab sich sogar ein hochsignifikantes Ergebnis ($p=0,004$). Wie bei der Einteilung nach Stepanovic et al. blieb die Beurteilbarkeit der Ergebnisse durch die starken Unterschiede der Gruppenstärke eingeschränkt.

Zusammenhang der Biofilmgruppen mit dem Parameter der vorausgegangenen Antibiotikatherapie

Bei der Korrelation zwischen den Biofilmgruppen und einer vorausgegangenen Antibiotikatherapie ergab sich sowohl bei Einschluss als auch nach Ausschluss der doppelten Patienten nur für die Einteilung nach Stepanovic et al. eine signifikante Korrelation ($p=0,015$ bzw. $p=0,016$). Der Ausschluss der doppelt getesteten Patienten machte keinen Unterschied in der Aussage über eine signifikante Korrelation.

Es zeigte sich, dass beide Einteilungen eine signifikante Korrelation ergaben: bei Stepanovic et al. im Hinblick auf die vorausgegangene Antibiotikatherapie, bei der eigenen Einteilung im Hinblick auf die klinische Ausprägung. Nicht zu entscheiden war aber, welche Einteilung als richtig anzusehen sei. Dazu kommt, dass im Hinblick auf die Korrelation zwischen Biofilmgruppen und klinischen Parametern keine vergleichbaren Veröffentlichungen vorlagen. Im Folgenden wurden daher die Vor- und Nachteile der beiden Einteilungen dargelegt, ohne eine Aussage über die Richtigkeit der einen oder anderen Einteilung machen zu können.

Vor- und Nachteile der Gruppeneinteilungen der Biofilmstärke nach Stepanovic et al.

Die Einteilung nach Stepanovic et al. wurde als Vergleichseinteilung verwendet, weil sie keinen vordefinierten Cut-Off-Wert besitzt, im Gegensatz zu den vielen Einteilungen anderer Autoren und auch der hier eigens bestimmten Gruppeneinteilungen. Durch den für jede Mikrotiterplatte anhand der Negativkontrollen neu bestimmten Cut-Off-Wert ist die Einteilung nach Stepanovic et al. keine statische Einteilung, sondern unterliegt der Dynamik des Cut-Off-Werts der Negativkontrollen jeder getesteten Mikrotiterplatte. Vorteile dieser Einteilung sind ein weitestgehender Ausschluss von Umgebungsfehlern. Da die Negativkontrollen auf jeder Mikrotiterplatte parallel mitgeführt wurden, wurden zum einen eventuelle Fertigungsunterschiede der einzelnen Mikrotiterplatten ausgeschlossen. Zum anderen wurden durch die zeitgleich durchgeführten Testungen der Negativkontrollen und der einzelnen Stämme auf jeder Mikrotiterplatte eventuelle Unterschiede der einzelnen Versuchsdurchführung eliminiert. Gestützt wurde diese Festlegung des Cut-Off-Punktes in der eigenen Arbeit durch die parallel getesteten Positivkontrollen. Diese lagen nach entsprechender

Berechnung alle im Biofilm-positiven Bereich, obwohl die Streuung der 165 Werte der Positivkontrollen relativ groß war. Bei einem Mittelwert von $OD_{550} 0,173 \pm 0,037$ SD lag die Spannweite mit $0,184 OD_{550}$ zwischen $0,099$ und $0,283 OD_{550}$. Da die Wertigkeit der Positivkontrollen von den Negativkontrollen und deren Standardabweichung abhängig waren, war der absolute Wert der Positivkontrollen weniger bedeutend. Das gleiche galt konsequenterweise auch für die getesteten MRSA-Isolate.

Problematisch an der Einteilung nach Stepanovic et al. ist, im Bezug auf die hier erzielten Ergebnisse, die Einteilung der Positivkontrollen in Gruppen der Biofilmstärke. Nach dieser Einteilung würden 58 Isolate (35,2%) in die Gruppe der „schwachen Biofilmbildung“ fallen, während 107 Isolate (64,8%) in die Gruppe der „moderaten Biofilmbildung“ fallen. Dieses Ergebnis war zum einen deswegen problematisch, da man davon ausgehen muss, dass bei gleicher Versuchsdurchführung und -bedingung der gleiche Stamm, auch bei einer gewissen Streuung der Ergebnisse, in die gleiche Biofilmgruppe fallen sollte. Zum anderen standen, wie oben besprochen, die Ergebnisse des Stammes *S. epidermidis* RP62A im Widerspruch zu mehreren Veröffentlichungen, die diesem Stamm eine deutlich höhere Biofilmproduktion zusprachen (ARCIOLA, C. R. et al. 2006; CHRISTENSEN, G. D. et al. 1985; MACK, D. et al. 1992).

Eine weitere Auffälligkeit bezieht sich auf den Anteil der Biofilm-positiven MRSA-Isolate. Die heterogene Datenlage zum Anteil Biofilm-positiver Staphylokokken-Stämme wurde besprochen. Der Anteil der Biofilm-positiven Staphylokokken-Stämme war in der vorliegenden Arbeit deutlich höher als in der Literatur.

Vor- und Nachteile der Gruppeneinteilung der Biofilmstärke nach eigener Festlegung

Die eigene Einteilung erfolgte aufgrund mehrerer Überlegungen. Der Cut-Off bei $0,100 OD_{550}$ und die Gruppeneinteilungen wurden anhand der Ergebnisse der Kontrollstämme festgelegt. Damit deckte sich der eigene Cut-Off mit dem der Veröffentlichung von Mack et al. (MACK, D. et al. 1992). Wurden die Werte der Positivkontrollen untersucht, so ergab sich der Mittelwert von $OD_{550} 0,173 \pm 0,037$. Bei der Normalverteilung der Positivkontrollen lagen 95% innerhalb der Grenzen zwischen Mittelwert ± 2 Standardabweichungen. Daraus errechneten sich für die untere Grenze $0,099 OD_{550}$ und für die obere Grenze $0,247 OD_{550}$. Zur besseren Übersichtlichkeit

wurden die Grenzen für die Gruppe „schwacher Biofilm“ auf 0,100 OD₅₅₀ und 0,250 OD₅₅₀ aufgerundet. Die Gruppe „moderater Biofilm“ wurde daraufhin so gewählt, dass die Gruppe die gleiche Spannweite umfasste wie die Gruppe „schwacher Biofilm“. Alles was über der Grenze der moderaten Biofilmbildung lag, wurde als „starker Biofilm“ bezeichnet. Die Nachteile dieser Einteilung ergaben sich daraus, dass es sich bei dieser vorab festgelegten Einteilung um eine starre Einteilung handelte. Eventuelle Fertigungsunterschiede der verwendeten Platten sowie die Biofilmbildung beeinflussende Umgebungsfehler hätten bewirken können, dass ein getesteter Stamm in eine falsche Gruppe eingeteilt wurde. Unterstützend auf diese Einteilung wirkte, dass 97% der Positivkontrollen in der gleichen Gruppe „schwacher Biofilm“ vorhanden waren, wohingegen nur 2,4% in die Gruppe „moderater Biofilm“ eingeteilt wurden. Diese konnte man als Ausreißer betrachten. Eine Positivkontrolle (0,6%) lag mit 0,099 OD₅₅₀ im Bereich keiner Biofilmbildung. Da die Grenzen aber korrigiert wurden, konnte auch diese Positivkontrolle als Biofilm-positiv angesehen bzw. als Ausreißer vernachlässigt werden. Der Vorteil der homogenen Positivkontrolle, nur eine Gruppe zu repräsentieren, war zugleich auch ihr Nachteil. Weil die Positivkontrolle nach dieser Einteilung die Ausprägung eines schwachen Biofilmbildners zeigte, ergab sich noch stärker das Problem, dass mehrere Veröffentlichungen der Positivkontrolle eine höhere Biofilmstärke zusprachen.

5 Zusammenfassung

Die Fähigkeit von Bakterien, einen Biofilm zu bilden, wird mit immer mehr Aufmerksamkeit wahrgenommen. Die mit dieser Fähigkeit verbundene Eigenschaft, chronische Infektionen durch eine besonders resistente Besiedlung hervorzurufen und in Gang zu halten, erfordert neue Strategien zur Bekämpfung biofilmbildender Bakterien. Vor allem die Besiedlung artifizierlicher Oberflächen jeglicher medizinischer Implantate bedeutet eine große Herausforderung für die Bekämpfung dieser Bakterien in der Zukunft.

Für MRSA als einem der bedeutendsten Krankenhaus-assoziierten Krankheitserreger konnte in der vorliegenden Arbeit die Fähigkeit zur Biofilmbildung nachgewiesen werden. So zeigte sich für 165 klinische MRSA-Isolate eine durchschnittliche Biofilmstärke von 0,237 OD₅₅₀. Die per se schon breiten Resistenzmuster vieler MRSA-Stämme werden durch die Biofilmbildung noch einmal verstärkt, da Biofilm-umgebene Bakterien ein höheres Resistenzverhalten aufweisen als planktonische Zellen. Dies muss in der Erforschung neuer Behandlungsstrategien gegen MRSA berücksichtigt werden.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Stärke der Biofilmbildung mit verschiedenen Faktoren zusammenhängt. So konnte nachgewiesen werden, dass Fremdkörper-assoziierte Infektionen auch bei MRSA mit einer durchschnittlich höheren Biofilmbildung einhergeht als Infektionen anderer Art ($p=0,005$) und einfache Besiedlungen ($p=0,039$). Auch eine vorausgegangene Antibiotikatherapie scheint einen Einfluss auf die Biofilmstärke zu haben. Dieser Einfluss war aber nicht signifikant nachweisbar.

Der Versuch, die Biofilmbildung auf der Grundlage der Kriterien publizierter Studien in objektive und präzise Gruppen der Biofilmstärke einzuordnen, erwies sich als schwierig. Die sehr heterogene Datenlage zu den Gruppenbildungen verschiedener Autoren zeigte keine einheitliche Einteilung. In der vorliegenden Arbeit konnte folglich gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Gruppeneinteilungen zu stark unterschiedlichen Ergebnissen führen. Für die Gruppeneinteilung nach Stepanovic et al. gab es alleine für den Zusammenhang zwischen den Biofilmgruppen und einer vorausgegangenen Antibiotikatherapie eine signifikante Korrelation, wohingegen nur die eigens gewählte Gruppeneinteilung eine signifikante Korrelation der Biofilmgruppen mit der klinischen Ausprägung zeigte. Hinzu kam, dass es keine

Standardisierung des ZKP-Tests gibt, so dass auch die verschiedenen Ergebnisse nicht direkt vergleichbar sind. Hier müssen grundlegende Untersuchungen zur Standardisierung des ZKP-Tests angeknüpft werden, um die stärksten biofilminduzierenden Bedingungen herauszufinden. Darüber hinaus müssen weitere Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen den Ergebnissen des ZKP-Tests und der Einteilung der Biofilmstärke folgen. Allein mittels des ZKP-Tests kann nicht herausgefunden werden, welche Einteilung der Realität am nächsten kommt. Zu fragen ist in dieser Hinsicht, ob eine Einteilung der Biofilmstärke in Gruppenstärken grundsätzlich sinnvoll ist.

6 Anhang

6.1 Tabellen

Tab. 1: Informationen zu den einzelnen MRSA-Isolaten und den Patienten aus Marburg 2004

Proben-Nr.	Stamm - Nr. 00	Material	Geschlecht	Alter	Klinische Angaben	Antibiotikatherapie	Entnahmedatum
1	401493	Blutkultur	weiblich	59	mit Hämolyse, MRSA-Sepsis, Endokarditis	Ja	01/2004
2	401548	Wundabstrich	weiblich	59	Gluteal	Ja	01/2004
3	401899	Gewebe	weiblich	59	Herzklappe, Endokarditis	Ja	01/2004
4	401511	Wundabstrich	weiblich	81	Gesäß	Ja	01/2004
5	401900	Abstrich	weiblich	77	Vorfußballen, Digit I links	Unbekannt	01/2004
6	402110	Wundabstrich	weiblich	54		Nein	01/2004
7	402337	Bronchiallavage	männlich	52		Unbekannt	01/2004
8	402394	Trachealsekret	männlich	66		Nein	02/2004
9	402668	Hautabstrich	männlich	68		Ja	02/2004
10	402860	Trachealsekret	männlich	66	V.a. Pneumonie	Nein	02/2004
11	403511	Hautabstrich	männlich	68		Unbekannt	02/2004
12	404436	Trachealsekret	männlich	36	Polyarthrit, unklare Leukopenie	Ja	02/2004
13	404517	Wundabstrich	weiblich	72		Nein	02/2004
14	404607	Bronchiallavage	männlich	70		Nein	02/2004
15	404949	Wundabstrich	weiblich	48		Unbekannt	03/2004
16	405023	Wundabstrich	weiblich	50		Unbekannt	03/2004
17	405112	Trachealsekret	weiblich	48		Unbekannt	03/2004
18	405169	ZVK	männlich	39		Ja	03/2004
19	405194	Eiterabstrich	männlich	58	Gangrän, Vorfuß, Z.n. Teilamputation links	Ja	03/2004
20	405265	Hautabstrich	männlich	67	Gesäß	Unbekannt	03/2004
21	405313	Wundabstrich	männlich	70		Nein	03/2004

Proben-Nr.	Stamm - Nr. 00	Material	Geschlecht	Alter	Klinische Angaben	Antibiotikatherapie	Entnahmedatum
22	405562	Wundabstrich	männlich	29		Unbekannt	03/2004
23	405732	Trachealsekret	männlich	76	V.a. Pneumonie	Ja	03/2004
24	405927	Eiterabstrich	weiblich	63		Unbekannt	03/2004
25	406031	Wundabstrich	männlich	54	Ulcus, diab. Fuß rechts	Ja	03/2004
26	406394	Wundabstrich	weiblich	51	Unterschenkel rechts	Ja	03/2004
27	406462	Wundabstrich	männlich	90		Unbekannt	03/2004
28	406593	Wundabstrich	weiblich	91	chronische Wunde Fuß links	Nein	03/2004
29	406596	Blutkultur	männlich	65	Fieber	Ja	03/2004
30	407580	BAL	männlich	53	Bronchial-Ca, Fieber	Unbekannt	04/2004
31	407591	Trachealsekret	männlich	78		Nein	04/2004
32	407695	Wundabstrich	männlich	68		Ja	04/2004
33	407971	Trachealsekret	männlich	72		Ja	04/2004
34	408165	Eiterabstrich	männlich	62	Epiduraler Abszeß	Unbekannt	04/2004
35	408485	Urin	männlich	66		Unbekannt	04/2004
36	408752	Urin	männlich	78	BPH, Cystofix-Anlage	Nein	04/2004
37	409168	Wundabstrich	weiblich	78	tiefe Hüftinfektion	Nein	04/2004
38	410177	Eiterabstrich	männlich	57	Bronchial-Ca	Unbekannt	05/2004
39	410229	Wundabstrich	männlich	47	Wundinfektion post-op	Ja	05/2004
40	410357	Wundabstrich	weiblich	82		Nein	05/2004
41	410440	Eiterabstrich	männlich	38	Osteomyelitis Oberarm links	Nein	05/2004
42	410774	Wundabstrich	männlich	47	Wundinfektion post-op	Ja	05/2004
43	411067	Trachealsekret	männlich	68	COPD, Trachealkanüle	Ja	05/2004
44	411200	Wundabstrich	weiblich	80	Dekubitus	Nein	05/2004
45	411254	Wundabstrich	weiblich	42	Dekubitus, Steiß	Nein	05/2004
46	411339	Douglas-Raum	weiblich	37		Ja	05/2004
47	411374	ZVK	männlich	65		Ja	05/2004
48	411756	Eiterabstrich	weiblich	66	Kniegelenkexartikulation	Nein	05/2004
49	411773	Wundabstrich	männlich	69	suprapubischer Katheter	Ja	05/2004
50	411909	Wundabstrich	weiblich	66		Nein	05/2004

Proben-Nr.	Stamm - Nr. 00	Material	Ge-schlecht	Alter	Klinische Angaben	Anti-biotika-therapie	Entnahme-datum
51	412008	Wund-abstrich	weiblich	71	rechter Oberschenkel	Ja	05/2004
52	405337	Nabel-abstrich	männlich	36		Ja	03/2004
53	405630	Nasen-abstrich	weiblich	47	AML, Fieber	Ja	03/2004
54	407250	Nasen-abstrich	weiblich	73		Ja	03/2004
55	407814	Rachen-abstrich	männlich	57		Nein	04/2004
56	407838	Penis-abstrich	männlich	69	Salmonellen	Ja	04/2004
57	410307	Wund-abstrich	männlich	57	Wundinfektion rechte Hüfte	Ja	05/2004
58	411343	Vaginal-abstrich	weiblich	22	Blasensprung	Nein	05/2004
59	411715	Sputum	männlich	48		Ja	05/2004
60	412467	Bronchial-sekret	männlich	67		Unbekannt	06/2004
61	412689	Sputum	weiblich	52		Unbekannt	06/2004
62	412735	Wund-abstrich	weiblich	85		Unbekannt	06/2004
63	412941	Blutkultur	männlich	56	ZVK, Pneumonie	Ja	06/2004
64	413010	Haut-abstrich	weiblich	85	Wunde Nagelbett, Nagelablösung	Nein	06/2004
65	413254	Wund-abstrich	männlich	69	AVK IV	Unbekannt	06/2004
66	413264	Tracheal-sekret	männlich	68		Nein	06/2004
67	413441	Blutkultur	weiblich	78		Unbekannt	06/2004
68	413638	Tracheal-sekret	weiblich	84		Unbekannt	06/2004
69	413697	Tracheal-sekret	männlich	56		Ja	06/2004
70	413877	Wund-abstrich	männlich	63		Unbekannt	06/2004
71	414052	Wund-abstrich	männlich	84		Ja	06/2004
72	414129	Sputum	weiblich	53	Z.n. Sepsis, MRSA	Nein	06/2004
73	414582	Tracheal-sekret	männlich	46		Unbekannt	06/2004
74	414621	Fistel-abstrich	männlich	74	Pseudomonas-Wunde Bein, bds. Stauungsniere	Ja	06/2004
75	414634	Tracheal-sekret	männlich	56	Pneumonie	Ja	06/2004
76	414638	Tracheal-sekret	männlich	56		Nein	06/2004
77	414858	Tracheal-sekret	männlich	46	Sub-arachnoidal-blutung	Ja	06/2004
78	414881	Blutkultur	männlich	62		Unbekannt	06/2004

Proben-Nr.	Stamm - Nr. 00	Material	Ge-schlecht	Alter	Klinische Angaben	Anti-biotika-therapie	Entnahme-datum
79	414904	Bronchial-lavage	männlich	56	Pneumonie	Ja	06/2004
80	415069	Wund-abstrich	weiblich	78	Fistel Oberschenkel	Ja	07/2004
81	415164	Eiter-abstrich	weiblich	73	Diabetisches Gangrän Fuß	Unbekannt	07/2004
82	415430	Wund-abstrich	weiblich	73		Nein	07/2004
84	415848	Urin	männlich	71	Urosepsis	Ja	07/2004
85	416413	Bronchial-lavage	männlich	47	Aspirations-pneumonie	Ja	07/2004
86	416511	Sonstiges	weiblich	43		Ja	07/2004
87	416646	Sputum	männlich	75		Ja	07/2004
88	416845	Bronchial-lavage	männlich	63	Unterblassen rechts	Unbekannt	07/2004
89	416858	Wund-abstrich	männlich	71	Skrotum	Nein	07/2004
90	416876	Bronchial-sekret	männlich	75		Ja	07/2004
91	416879	Punktion	männlich	52	Oberschenkel, Inferior Femur/Poplitea links	Unbekannt	07/2004
93	417342	Eiter-abstrich	weiblich	84	Peritonitis Oberbauch rechts	Unbekannt	07/2004
94	417444	Wund-abstrich	männlich	65	Amputations-stumpf	Nein	07/2004
95	418792	Wund-abstrich	männlich	79	Glutealabszess, Karbunkel	Nein	08/2004
96	419260	Wund-abstrich	männlich	44	Tracheostoma	Ja	08/2004
97	419347	Eiter-abstrich	männlich	42	Abszess	Nein	08/2004
98	419682	Sputum	weiblich	17	Bronchiektasen	Nein	08/2004
99	419722	Vaginal-abstrich	weiblich	75	Ureaplasmen, Mykoplasmen Genitalbereich	Unbekannt	08/2004
100	419858	Wund-abstrich	männlich	64	Unterschenkel-Gefäß-Op rechts	Nein	08/2004
101	419924	Rachen-abstrich	männlich	42	Lungenabszess	Ja	08/2004
102	419930	Rachen-abstrich	männlich	64		Unbekannt	08/2004
103	419992	Tracheal-sekret	männlich	62	Hirnblutung	Ja	08/2004
104	419994	Thorax-drainage	männlich	48	Pankreatitis	Nein	08/2004
105	420032	Punktat	männlich	77		Unbekannt	08/2004
106	420201	Blutkultur	weiblich	62		Ja	08/2004
107	420227	ZVK	weiblich	62		Ja	08/2004
108	420275	Abstrich Gehörgang	männlich	62		Ja	08/2004
109	420737	Drainage	männlich	50	Abszess Abdomen	Ja	09/2004

Proben-Nr.	Stamm - Nr. 00	Material	Ge-schlecht	Alter	Klinische Angaben	Anti-biotika-therapie	Entnahme-datum
111	421043	Wund-abstrich	männlich	62	Platzbauch n. Bypass Op BAA	Nein	09/2004
112	421244	Wund-abstrich	weiblich	87	linker Unterschenkel	Unbekannt	09/2004
113	421245	Bindehaut-abstrich	weiblich	0		Nein	09/2004
114	421269	Wund-abstrich	weiblich	93	Fuß links	Unbekannt	09/2004
115	421367	Wund-abstrich	männlich	62	Bauchwunde	Ja	09/2004
116	421464	Wund-abstrich	weiblich	51		Unbekannt	09/2004
117	421574	Bronchial-sekret	männlich	64	Salmonellose	Ja	09/2004
118	421577	Wund-abstrich	weiblich	51		Unbekannt	09/2004
119	421610	Blutkultur	männlich	64	Salmonellose	Ja	09/2004
120	421886	BAL	männlich	76	Unterlappen links	Nein	09/2004
121	422203	Wund-abstrich	weiblich	69	über Implantat	Ja	09/2004
122	422400	Sonstiges	weiblich	69	E-Kabel	Ja	09/2004
123	422481	Urin	männlich	94	nach Dauerkatheter	Ja	09/2004
124	424251	Rachen-abstrich	männlich	41		Unbekannt	10/2004
125	424800	Tracheal-sekret	männlich	22		Ja	10/2004
126	424928	Wund-abstrich	weiblich	85	linker Vorfuß	Unbekannt	10/2004
127	425080	DK-Spitze	weiblich	78		Ja	10/2004
128	425118	Wund-abstrich	männlich	22	Tracheostoma	Ja	10/2004
129	425272	Wund-abstrich	weiblich	45	Steiß	Nein	10/2004
130	425364	Wund-abstrich	weiblich	70		Unbekannt	10/2004
131	425491	Wund-abstrich	männlich	69		Ja	10/2004
132	425906	Blutkultur	weiblich	82	Z.n. Anteriorer Rectum-resektion	Ja	10/2004
133	425979	Wund-abstrich	männlich	65	rechte Ferse	Unbekannt	10/2004
134	426229	Tracheal-sekret	weiblich	41	ARDS, Peritonitis	Ja	10/2004
135	426232	Urin	weiblich	71		Unbekannt	10/2004
136	426641	Wund-abstrich	weiblich	69		Unbekannt	11/2004
137	426902	Wund-abstrich	weiblich	77	PAVK IV, DII Fuß rechts	Nein	11/2004
138	427014	Rachen-abstrich	weiblich	66		Ja	11/2004
139	427830	Urethral-katheter	weiblich	90		Unbekannt	11/2004

Proben-Nr.	Stamm - Nr. 00	Material	Geschlecht	Alter	Klinische Angaben	Antibiotikatherapie	Entnahmedatum
140	428834	Wundabstrich	männlich	63		Nein	11/2004
141	428874	Bronchialsekret	männlich	59	Dilatations-Tracheotomie, eitriges Sekret	Ja	11/2004
142	429163	Trachealsekret	männlich	59	Tracheotomie, eitriges Sekret, V.a. Pneumonie	Ja	11/2004
143	429186	Wundabstrich	weiblich	47	Bauchdeckenabszess, Fistel	Unbekannt	11/2004
144	429188	Eiterabstrich	weiblich	44	mediale Halszyste	Unbekannt	11/2004
147	429636	Trachealsekret	weiblich	58	Respiratorische Dekompensation, Z.n. Femurfraktur	Nein	11/2004
148	429774	Wundabstrich	weiblich	69	rechter Unterschenkel	Ja	11/2004
149	429791	Wundabstrich	männlich	55	Diabetischer Fuß links	Nein	11/2004
150	429892	Wundabstrich	weiblich	77	Ulcus cruris links	Nein	12/2004
151	430008	Wundabstrich	weiblich	73	Ferse, diabetischer Fuß links	Nein	12/2004
152	430059	Sputum	männlich	69		Nein	12/2004
153	430121	Wundabstrich	weiblich	82	Fuß Dekubitalulcus	Nein	12/2004
154	430554	Wundabstrich	weiblich	47	Bauchdeckenabszess	Unbekannt	12/2004
155	430693	Wundabstrich	männlich	65	Dekubitus	Nein	12/2004
156	430707	Punktat	weiblich	18	Hämatomflüssigkeit nach NTX	Ja	12/2004
157	430845	Wundabstrich	männlich	77	Oberschenkelstumpf	Ja	12/2004
158	430994	Wundabstrich	männlich	71		Unbekannt	12/2004
159	431240	Rachenabstrich	weiblich	66		Ja	12/2004
160	431390	Wundabstrich	weiblich	75		Nein	12/2004
161	431392	Blutkultur	weiblich	75	V.a. Endokarditis	Nein	12/2004
162	431416	Eiterabstrich	weiblich	25		Nein	12/2004
163	431435	Sputum	männlich	86		Unbekannt	12/2004
164	431443	Eiterabstrich	männlich	74	Multiple Revis. linke Hüfte, chronische Fistelung	Nein	12/2004
165	431536	Wundabstrich	männlich	79	Ulcera linker Unterschenkel	Nein	12/2004
166	431662	Wundabstrich	weiblich	79	D1, PAVK IV, Ferse	Nein	12/2004

Proben-Nr.	Stamm - Nr. 00	Material	Geschlecht	Alter	Klinische Angaben	Antibiotikatherapie	Entnahmedatum
167	431947	Wundabstrich	weiblich	73	Alter Ulcus, linker Fuß	Nein	12/2004
168	432361	Wundabstrich	weiblich	46	Bauchwunde	Unbekannt	12/2004
169	432379	Trachealsekret	männlich	1	Z.n. Epiduralblutung	Nein	12/2004
170	432490	Wundabstrich	weiblich	29	unterer Wundpol	Ja	12/2004

Tab. 2: Lokalisation und Häufigkeit der Marburger MRSA-Isolate 2004.

Probenmaterial	Häufigkeiten (n)
Abstrich	3
BAL	2
Blutkultur	9
Bronchiallavage	5
Bronchialsekret	4
DK-Spitze	1
Douglas-Raum	1
E-Kabel	1
Eiterabstrich	13
Fistelabstrich	1
Gewebe	1
Hautabstrich	4
Nabelabstrich	1
Nasenabstrich	2
Penisabstrich	1
Prothesenmaterial	1
Punktat	3
Rachenabstrich	6
Sonstiges	1
Sputum	8
Thoraxdrainage	1
Trachealsekret	21
Urethalkatheter	1
Urin	6
Vaginalabstrich	2
Wundabstrich	68
ZVK	3

Tab. 3: Gruppierung der MRSA-Stämme.

Probenmaterialgruppe	Häufigkeiten n (%)	Probenmaterial	Häufigkeiten n
Atemwegsisolate	39 (23,6)	BAL (Bronchialalveoläre Lavage)	2
		Bronchiallavage	5
		Bronchialsekret	4
		Sputum	7
		Trachealsekret	21
Blutisolate	9 (5,5)	Blutkultur	9
Fremdkörperassoziiert	7 (4,2)	DK-Spitze	1
		E-Kabel	1
		Thoraxdrainage	1
		Urethrkatheter	1
		ZVK	3
Harnwegsisolate	5 (3,0)	Urin	5
Haut- und Schleimhautisolate	12 (7,3)	Hautabstrich	4
		Nabelabstrich	1
		Nasenabstrich	2
		Rachenabstrich	5
Wundinfektionen	92 (55,8)	Abstrich	3
		Douglas-Raum	1
		Eiterabstrich	13
		Fistelabstrich	1
		Gewebe	1
		Penisabstrich	1
		Punktat	3
		Rachenabstrich	1
		Vaginalabstrich	2
		Wundabstrich	66
nicht klassifizierbar	1 (0,6)	Sonstiges	1
Total	165 (100)		165

Tab. 4: Absolute und relative Häufigkeiten der Resistenzverhalten der MRSA-Isolate gegenüber Aminoglykoside, Fluorchinolone, Tetracycline, Makrolide und Lincosamide. n = 165

Antibiotikum	Resistent n (%)	Sensibel n (%)	Intermediär n (%)	Nicht getestet n (%)
Amikacin	4 (2,4)	151 (91,5)	9 (5,5)	1 (0,6)
Gentamicin	15 (9,1)	149 (90,3)	1 (0,6)	0 (0)
Ciprofloxacin	163 (98,8)	1 (0,6)	1 (0,6)	0 (0)
Levofloxacin	158 (95,8)	2 (1,2)	5 (3)	0 (0)
Tetracyclin	3 (1,8)	160 (97)	1 (0,6)	1 (0,6)
Erythromycin	156 (94,5)	9 (5,5)	0 (0)	0 (0)
Clindamycin	154 (93,3)	11 (6,7)	0 (0)	0 (0)

Tab. 5: Absolute und relative Häufigkeiten der Resistenzverhalten der MRSA-Isolate gegenüber Sulfonamide, Glykopeptide, Oxazolidinone, Rifampicin, Fosfomycin und Chloramphenicol. n = 165

Antibiotikum	Resistent n (%)	Sensibel n (%)	Intermediär n (%)	Nicht getestet n (%)
Chloramphenicol	4 (2,4)	121 (73,3)	2 (1,2)	38 (23)
Fosfomycin	2 (1,2)	121 (73,3)	0 (0)	42 (25,5)
Linezolid	1 (0,6)	126 (76,4)	0 (0)	38 (23)
Rifampicin	5 (3)	160 (97)	0 (0)	0 (0)
Teicoplanin	4 (2,4)	119 (72,1)	3 (1,8)	39 (23,6)
Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	1 (0,6)	164 (99,4)	0 (0)	0 (0)
Vancomycin	0 (0)	164 (99,4)	1 (0,6)	0 (0)

Tab. 6: Kreuztabelle zum Zusammenhang zwischen einer vorausgegangenen Antibiotikatherapie und den Gruppen der Biofilmstärke nach eigener Einteilung. Die Fallzahl n = 121 ergibt sich nach Ausschluss der Gruppe „unbekannt“.

	Vorausgegangene Antibiotikatherapie		Gesamt n (%)
	nein n (%)	ja n (%)	
kein Biofilm	6 (12)	7 (9,9)	13 (10,7)
schwacher Biofilm	30 (60)	34 (47,9)	64 (52,9)
moderater Biofilm	10 (20)	19 (26,8)	29 (24)
starker Biofilm	4 (8)	11 (15,5)	15 (12,4)
Gesamt	50 (100)	71 (100)	121 (100)

Tab. 7: Kreuztabelle zum Zusammenhang zwischen einer vorausgegangenen Antibiotikatherapie und den Gruppen der Biofilmstärke nach Stepanovic et al. Die Fallzahl n = 121 ergibt sich nach Ausschluss der Gruppe „unbekannt“.

	Vorausgegangene Antibiotikatherapie		Gesamt n (%)
	ja n (%)	nein n (%)	
kein Biofilm	0 (0)	3 (6)	3 (2,5)
schwacher Biofilm	20 (28,2)	14 (28)	34 (28,1)
moderater Biofilm	29 (40,8)	27 (54)	56 (46,3)
starker Biofilm	22 (31)	6 (12)	28 (23,1)
Gesamt	71 (100)	50 (100)	121 (100)

Tab. 8: Kreuztabelle zum Zusammenhang zwischen einer vorausgegangenen Antibiotikatherapie und den Gruppen der Biofilmstärke nach eigener Einteilung. Die Fallzahl n = 100 ergibt sich nach Ausschluss der Gruppe „unbekannt“ und doppelter Patienten.

	Vorausgegangene Antibiotikatherapie		Gesamt
	nein n (%)	ja n (%)	
kein Biofilm	6 (12,8)	2 (3,8)	8 (8)
schwacher Biofilm	27 (57,4)	25 (47,2)	52 (52)
moderater Biofilm	10 (21,3)	17 (32,1)	27 (27)
starker Biofilm	4 (8,5)	9 (17)	13 (13)
Gesamt	47 (100)	53 (100)	100 (100)

Tab. 9: Kreuztabelle zum Zusammenhang zwischen einer vorausgegangenen Antibiotikatherapie und den Gruppen der Biofilmstärke nach Stepanovic et al. Die Fallzahl n = 100 ergibt sich nach Ausschluss der Gruppe „unbekannt“ und doppelter Patienten.

	Vorausgegangene Antibiotikatherapie		Gesamt
	ja n (%)	nein n (%)	
kein Biofilm	0 (0)	3 (6,4)	3 (3)
schwacher Biofilm	10 (18,9)	13 (27,7)	23 (23)
moderater Biofilm	24 (45,3)	25 (53,2)	49 (49)
starker Biofilm	19 (35,8)	6 (12,8)	25 (25)
Gesamt	53 (100)	47 (100)	100 (100)

Tab. 10: Kreuztabelle zum Zusammenhang zwischen der klinischen Ausprägung und den Gruppen der Biofilmstärke nach eigener Einteilung. Die Fallzahl n = 164 ergibt sich nach Ausschluss der Gruppe „unbekannt“.

	Klinische Ausprägung			Gesamt
	Besiedlung	Infektion	Fremdmaterial	
	n (%)	n (%)	n (%)	
kein Biofilm	1 (9,1)	17 (12,6)	2 (11,1)	20 (12,2)
schwacher Biofilm	6 (54,5)	80 (59,3)	4 (22,2)	90 (54,9)
moderater Biofilm	4 (36,4)	27 (20)	7 (38,9)	38 (23,2)
starker Biofilm	0 (0)	11 (8,1)	5 (27,8)	16 (9,8)
Gesamt	11 (100)	135 (100)	18 (100)	164 (100)

Tab. 11: Kreuztabelle zum Zusammenhang zwischen der klinischen Ausprägung und den Gruppen der Biofilmstärke nach Stepanovic et al. Die Fallzahl n = 164 ergibt sich nach Ausschluss der Gruppe „unbekannt“.

	Klinische Ausprägung			Gesamt
	Besiedlung	Infektion	Fremdmaterial	
	n (%)	n (%)	n (%)	
kein Biofilm	0 (0)	4 (3)	0 (0)	4 (2,4)
schwacher Biofilm	5 (45,5)	41 (30,4)	3 (16,7)	49 (29,9)
moderater Biofilm	4 (36,4)	67 (49,6)	6 (33,3)	77 (47)
starker Biofilm	2 (18,2)	23 (17)	9 (50)	34 (20,7)
Gesamt	11 (100)	135 (100)	18 (100)	164 (100)

Tab. 12: Kreuztabelle zum Zusammenhang der klinischen Ausprägung und den Gruppen der Biofilmstärke nach eigener Einteilung. Die Fallzahl n = 153 ergibt sich nach Ausschluss der Gruppe „unbekannt“ und der Gruppe „Besiedlung“.

	Klinische Ausprägung		Gesamt n (%)
	Infektion	Fremdmaterial	
	n (%)	n (%)	
kein Biofilm	17 (12,6)	2 (11,1)	19 (12,4)
schwacher Biofilm	80 (59,3)	4 (22,2)	84 (54,9)
moderater Biofilm	27 (20)	7 (38,9)	34 (22,2)
starker Biofilm	11 (8,1)	5 (27,8)	16 (10,5)
Gesamt	135 (100)	18 (100)	153 (100)

Tab. 13: Kreuztabelle zum Zusammenhang der klinischen Ausprägung und den Gruppen der Biofilmstärke nach Stepanovic et al. Die Fallzahl n = 153 ergibt sich nach Ausschluss der Gruppe „unbekannt“ und der Gruppe „Besiedlung“.

	Klinische Ausprägung		Gesamt n (%)
	Infektion	Fremdmaterial	
	n (%)	n (%)	
keine Biofilm	4 (3)	0 (0)	4 (2,6)
schwache Biofilm	41 (30,4)	3 (16,7)	44 (28,2)
moderate Biofilm	67 (49,6)	6 (33,3)	73 (47,7)
starke Biofilm	23 (17)	9 (50)	32 (20,9)
Gesamt	135 (100)	18 (100)	153 (100)

6.2 Abbildungen

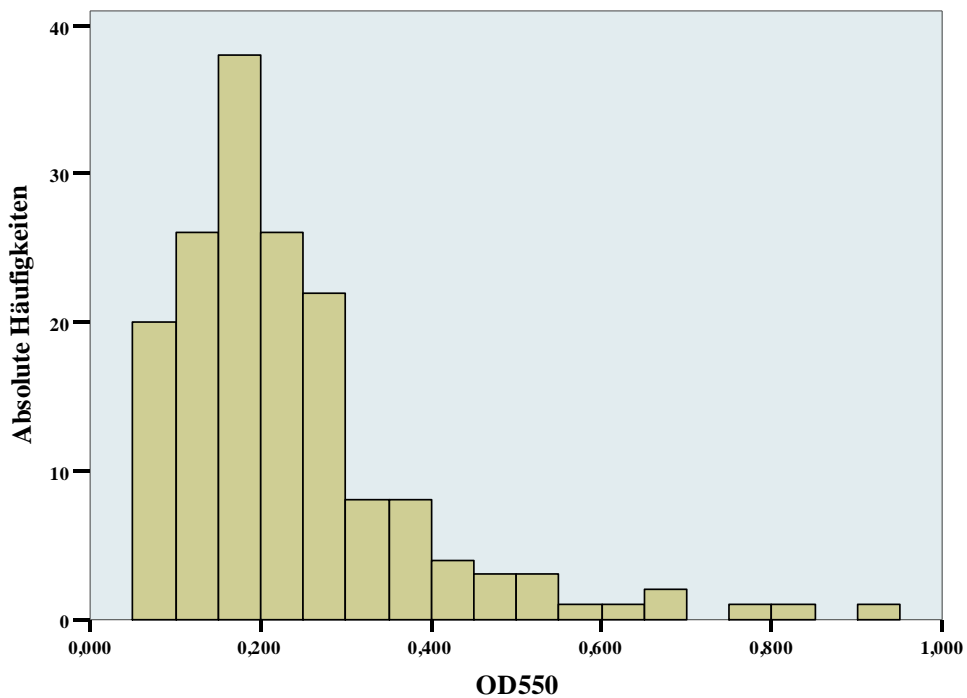


Abb. 1: Verteilung der absoluten Häufigkeiten der Biofilmwerte der 165 MRSA-Isolate. OD550 = Optische Dichte, gemessen bei einem Wellenlängenfilter von 550nm.

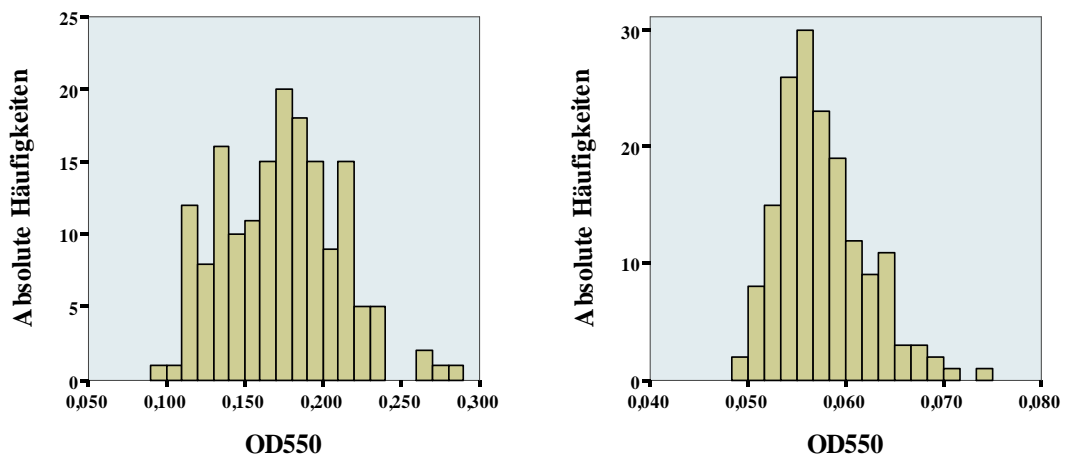


Abb. 2a: Verteilung der absoluten Häufigkeiten der Biofilmwerte der Positivkontrolle *S. epidermidis* RP62A. OD550 = Optische Dichte, gemessen bei einem Wellenlängenfilter von 550nm.

Abb. 2b: Verteilung der absoluten Häufigkeiten der Biofilmwerte der Negativkontrolle *S. carnosus* TM300. OD550 = Optische Dichte, gemessen bei einem Wellenlängenfilter von 550nm.

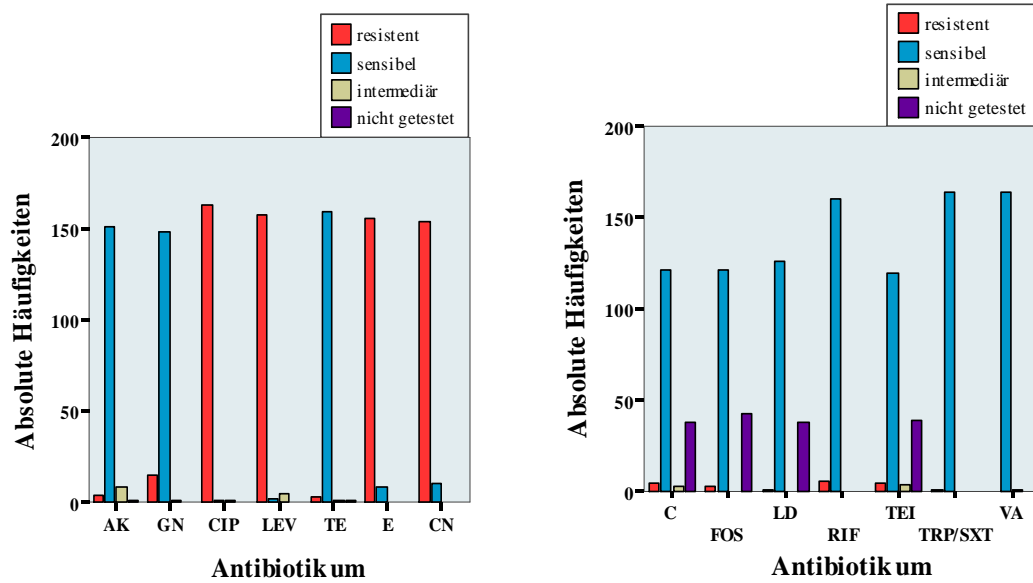


Abb. 3a: Absolute Häufigkeiten des Resistenzverhaltens der 165 MRSA-Isolate. Legende: AK = Amikacin, GN = Gentamicin, CIP = Ciprofloxacin, LEV = Levofloxacin, TE = Tetracyclin, E = Erythromycin, CN = Clindamycin.

Abb. 3b: Absolute Häufigkeiten des Resistenzverhaltens der 165 MRSA-Isolate. Legende: C = Chloramphenicol, FOS = Fosfomycin, LD = Linezolid, RIF = Rifampicin, TEI = Teicoplanin, TRP/SXT = Trimethoprim/Sulfamethoxazol, VA = Vancomycin.

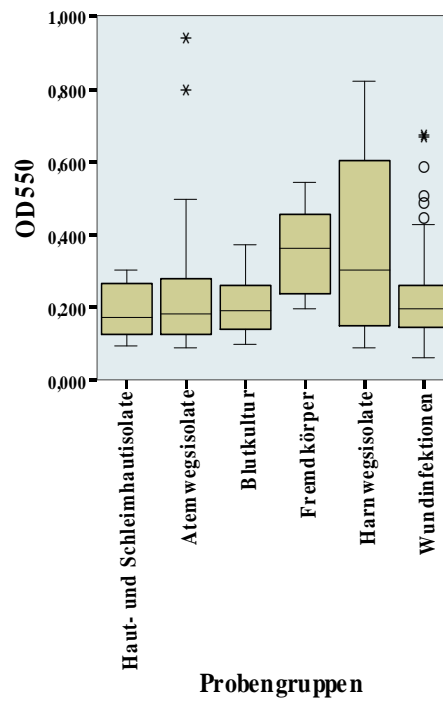
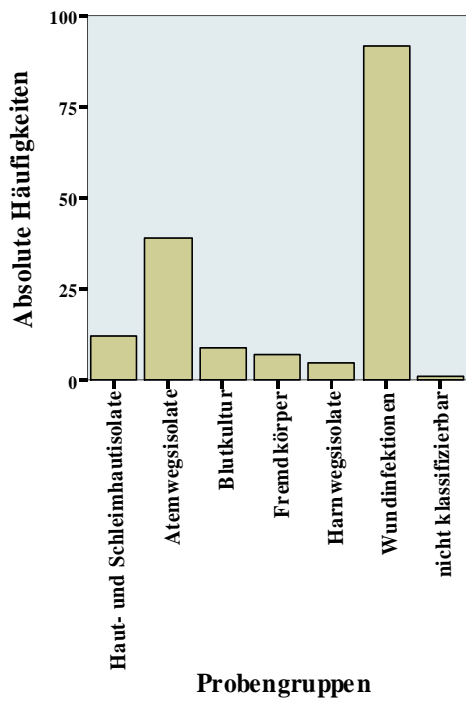


Abb. 4a: Absolute Häufigkeiten der 165 MRSA-Isolate in den Probengruppen.

Abb. 4b: Durchschnittliche Biofilmwerte der Probengruppen. OD₅₅₀ = Optische Dichte gemessen bei einem Wellenlängenfilter von 550nm. Die Gruppe „nicht klassifizierbar“ wurde ausgeschlossen.

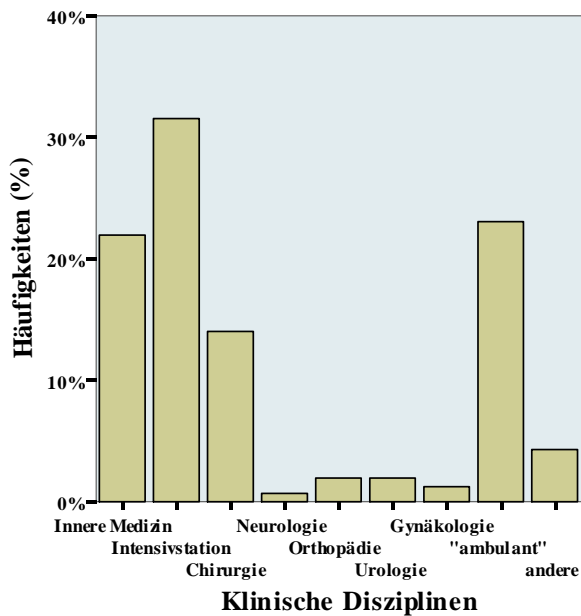


Abb. 5 Prozentualer Anteil der eingesendeten MRSA-Isolate aus den verschiedenen klinischen Disziplinen.

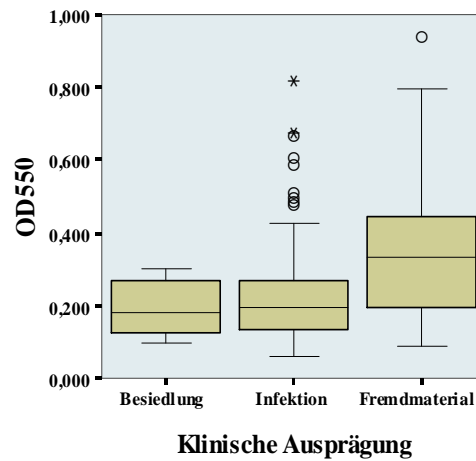
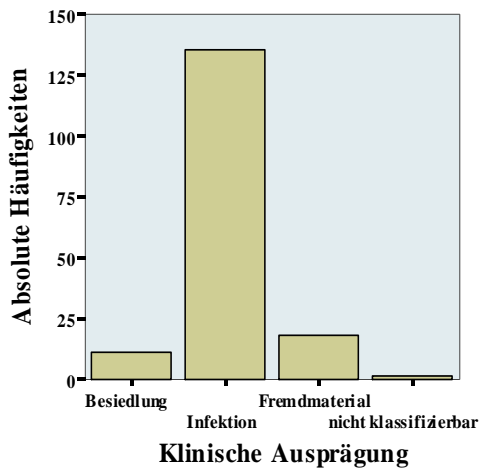


Abb. 6a: Absolute Häufigkeiten nach Einteilung der 165 MRSA-Isolate in die Gruppen der klinischen Ausprägung.

Abb. 6b: Durchschnittliche Biofilmwerte der Gruppen der klinischen Ausprägung. OD550 = Optische Dichte gemessen bei einem Wellenlängenfilter von 550nm. Die Gruppe „nicht klassifizierbar“ wurde ausgeschlossen.

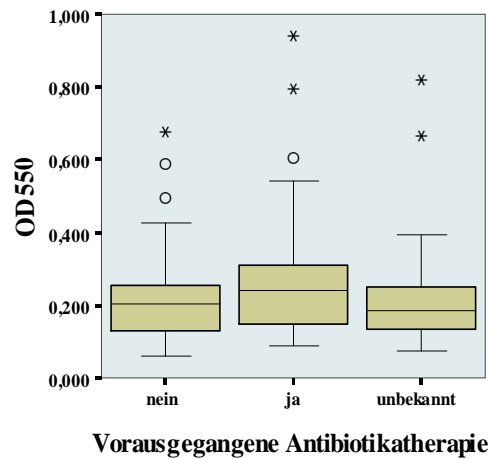
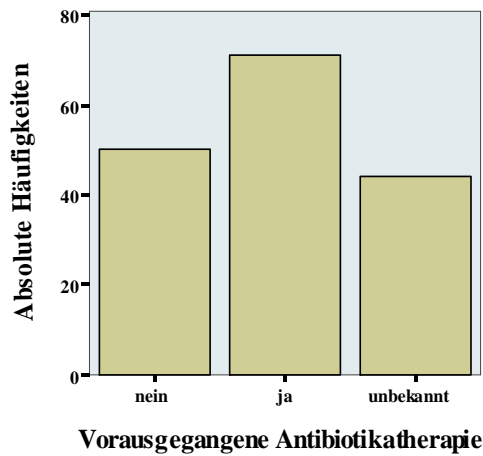


Abb. 7a: Absolute Häufigkeiten nach Einteilung der 165 MRSA-Isolate in Gruppen der Vorausgegangenen Antibiotikatherapie.

Abb. 7b: Durchschnittliche Biofilmwerte der Gruppen der vorausgegangenen Antibiotikatherapie. OD550 = Optische Dichte, gemessen bei einem Wellenlängenfilter von 550nm.

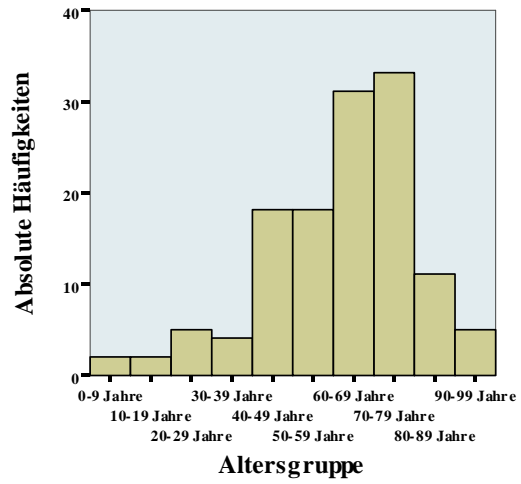
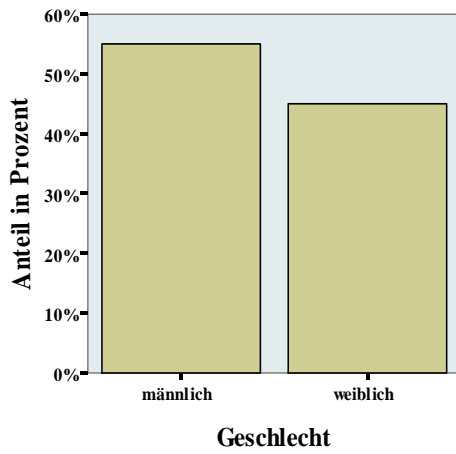


Abb. 8a: Prozentualer Anteil der Patienten, eingeteilt nach Geschlecht.

Abb. 8b: Absolute Häufigkeiten der nach Altersdekaden eingeteilten 129 Patienten.

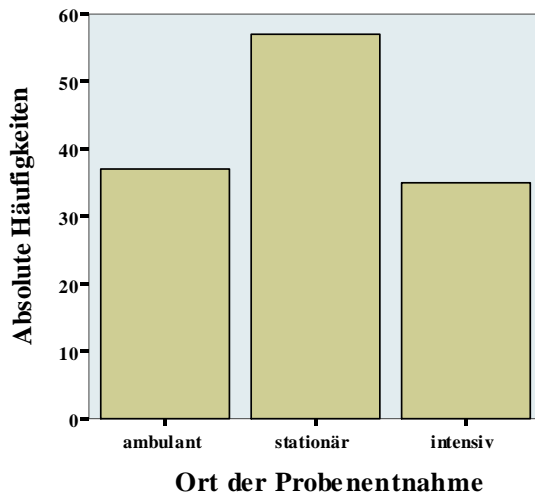


Abb. 9: Absolute Häufigkeiten über den Aufenthaltsort der Patienten bei Probenentnahme der MRSA-Isolate.

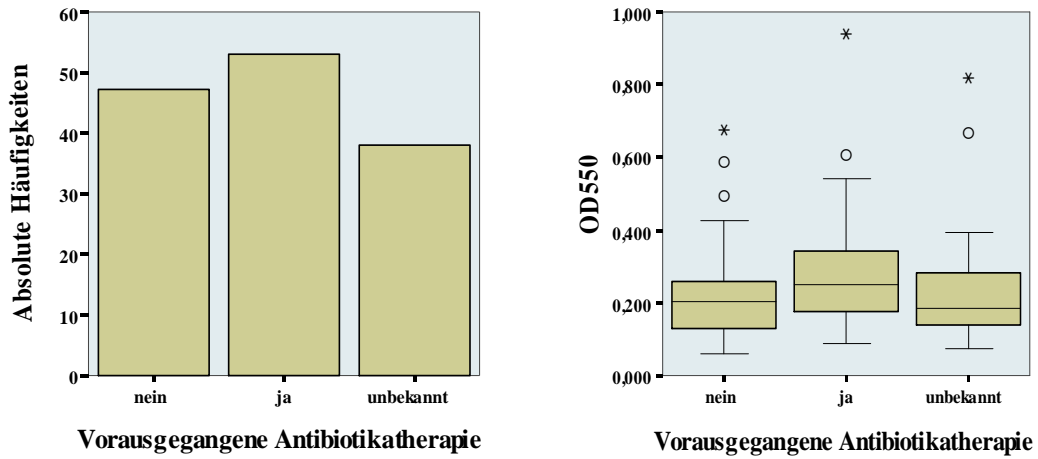


Abb. 10a: Absolute Häufigkeiten der 138 Patienten nach Gruppen der vorausgegangenen Antibiotikatherapie.

Abb. 10b: Durchschnittliche Biofilmwerte der Gruppen der vorausgegangenen Antibiotikatherapie. OD550 = Optische Dichte, gemessen bei einem Wellenlängenfilter von 550nm.

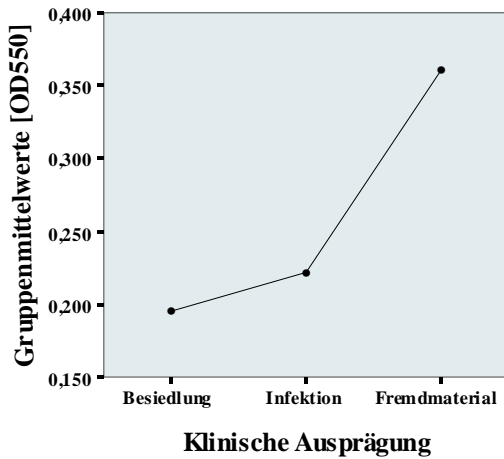


Abb. 11: Gruppenmittelwerte der klinischen Ausprägung. Mittelwerte der Gruppen sind die Biofilmwerte der gemessenen Optischen Dichten bei einem Wellenlängenfilter von 550nm.

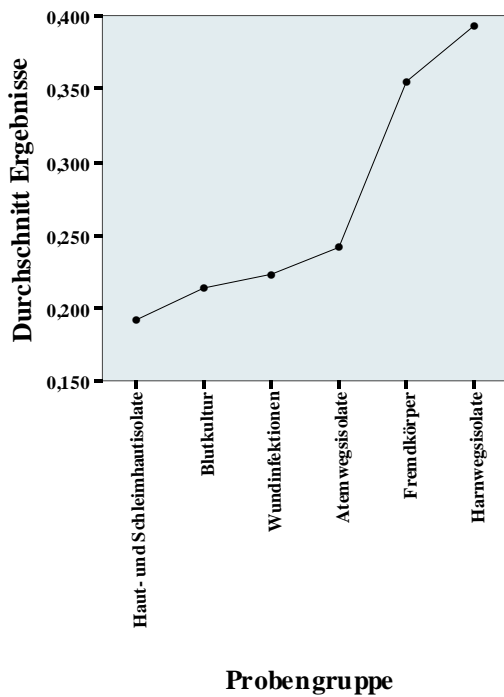


Abb. 12: Gruppenmittelwerte der Probengruppen. Mittelwerte der Gruppen sind die Biofilmwerte der gemessenen Optischen Dichten bei einem Wellenlängenfilter von 550nm.

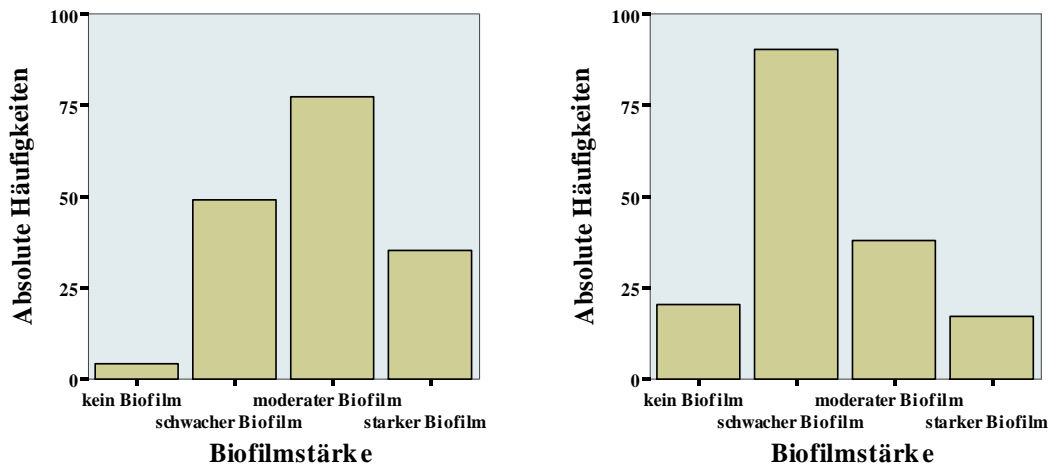


Abb. 13a: Einteilung der MRSA-Isolate in Gruppen der Biofilmstärke nach Stepanovic et al.
 Abb. 13b: Einteilung der MRSA-Isolate in Gruppen der Biofilmstärke nach eigener Einteilung.
 Die Fallzahl beträgt jeweils n = 165, es sind die absoluten Häufigkeiten angegeben.

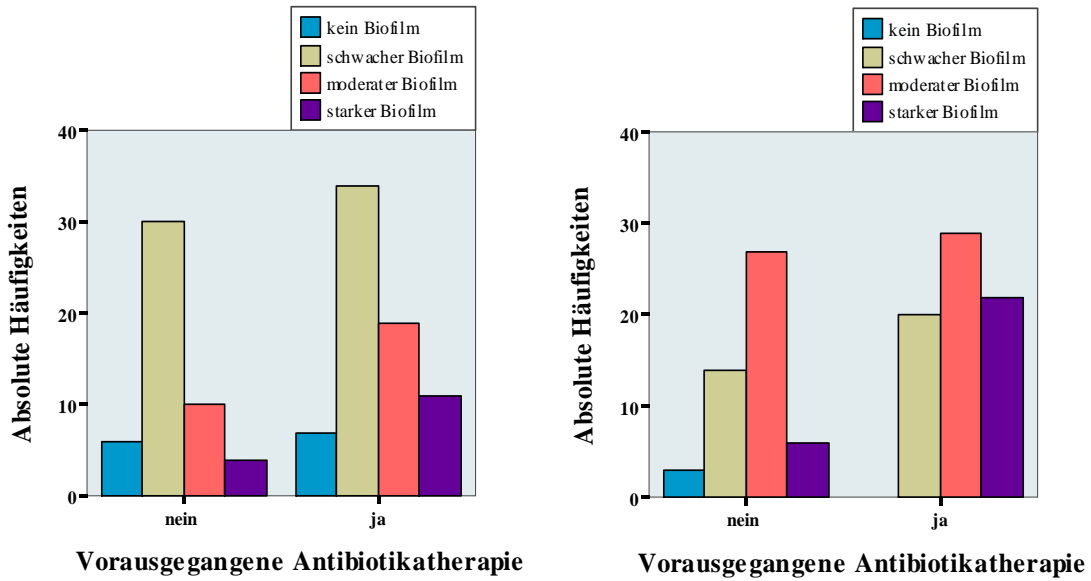


Abb. 14a: Verteilung der absoluten Häufigkeiten der MRSA-Isolate in Gruppen der Biofilmstärke nach eigener Einteilung bei vorausgegangener Antibiotikatherapie.

Abb. 14b: Verteilung der absoluten Häufigkeiten der MRSA-Isolate in Gruppen der Biofilmstärke nach Stepanovic et al. bei vorausgegangener Antibiotikatherapie.

Die Fallzahlen betragen nach Ausschluss der Gruppe „unbekannt“ n = 121.

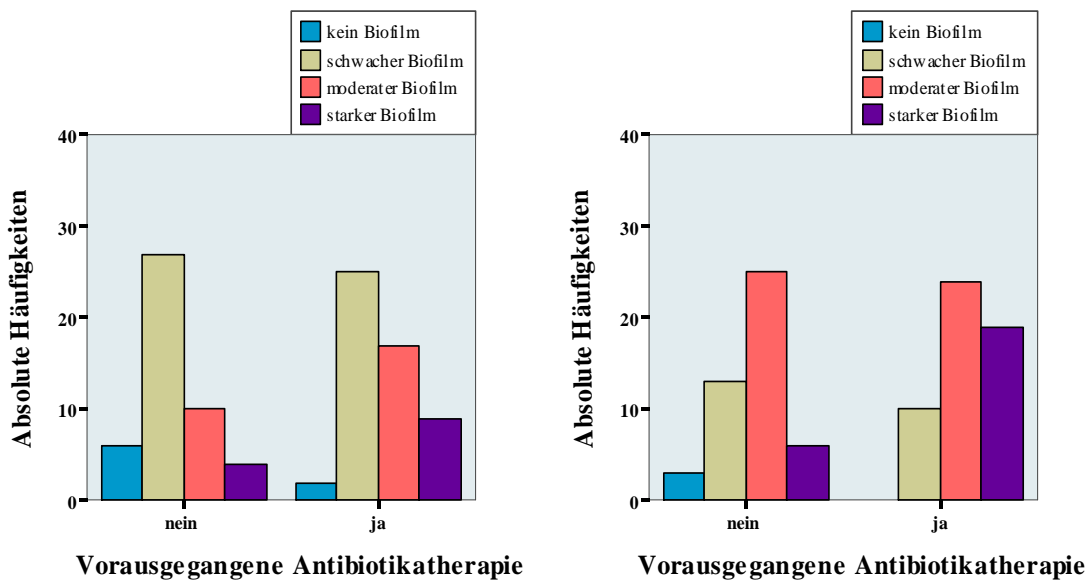


Abb. 15a: Verteilung der absoluten Häufigkeiten der MRSA-Isolate in Gruppen der Biofilmstärke nach eigener Einteilung bei vorausgegangener Antibiotikatherapie.

Abb. 15b: Verteilung der absoluten Häufigkeiten der MRSA-Isolate in Gruppen der Biofilmstärke nach Stepanovic et al. bei vorausgegangener Antibiotikatherapie.

Die Fallzahlen betragen jeweils nach Ausschluss der Gruppe „unbekannt“ und doppelter Patienten n = 100.

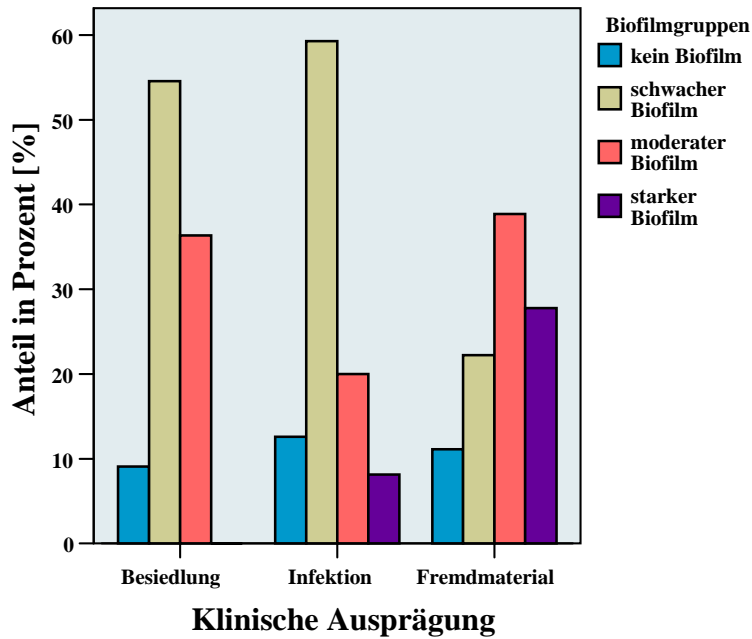


Abb. 16: Verteilung der prozentualen Anteile der MRSA-Isolate in Gruppen der Biofilmstärke nach eigener Einteilung bei klinischer Ausprägung.

Die Fallzahl beträgt nach Ausschluss der Gruppe „nicht klassifizierbar“ n = 164.

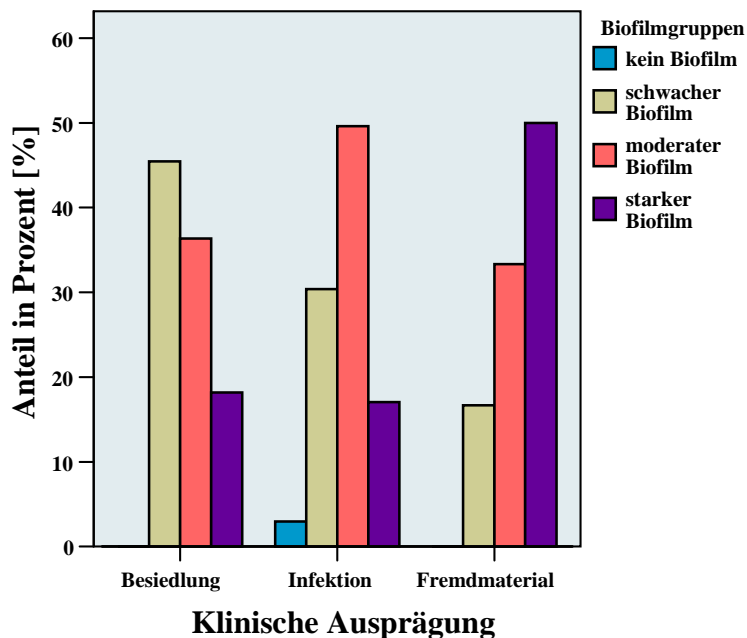


Abb. 17: Verteilung der prozentualen Anteile der MRSA-Isolate in Gruppen der Biofilmstärke nach Stepanovic et al. bei klinischer Ausprägung.

Die Fallzahl beträgt nach Ausschluss der Gruppe „nicht klassifizierbar“ n = 164.

7 Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

- Amorena,B.; Gracia,E.; Monzon,M.; Leiva,J.; Oteiza,C.; Perez,M.; Alabart,J.L.; Hernandez-Yago,J.: *Antibiotic Susceptibility Assay for Staphylococcus Aureus in Biofilms Developed in Vitro*. J.Antimicrob.Chemother.: 44(1): 43-55; 1999
- Anderl,J.N.; Franklin,M.J.; Stewart,P.S.: *Role of Antibiotic Penetration Limitation in Klebsiella Pneumoniae Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin*. Antimicrob.Agents Chemother.: 44(7): 1818-1824; 2000
- Anderl,J.N.; Zahller,J.; Roe,F.; Stewart,P.S.: *Role of Nutrient Limitation and Stationary-Phase Existence in Klebsiella Pneumoniae Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin*. Antimicrob.Agents Chemother.: 47(4): 1251-1256; 2003
- Ando,E.; Monden,K.; Mitsuata,R.; Kariyama,R.; Kumon,H.: *Biofilm Formation Among Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Isolates From Patients With Urinary Tract Infection*. Acta Med.Okayama: 58(4): 207-214; 2004
- Arciola,C.R.; Campoccia,D.; Baldassarri,L.; Donati,M.E.; Pirini,V.; Gamberini,S.; Montanaro,L.: *Detection of Biofilm Formation in Staphylococcus Epidermidis From Implant Infections. Comparison of a PCR-Method That Recognizes the Presence of Ica Genes With Two Classic Phenotypic Methods*. J.Biomed.Mater.Res.A: 76(2): 425-430; 2006
- Arslan,S.; Ozkardes,F.: *Slime Production and Antibiotic Susceptibility in Staphylococci Isolated From Clinical Samples*. Mem.Inst.Oswaldo Cruz: 102(1): 29-33; 2007
- Baba,T.; Takeuchi,F.; Kuroda,M.; Yuzawa,H.; Aoki,K.; Oguchi,A.; Nagai,Y.; Iwama,N.; Asano,K.; Naimi,T.; Kuroda,H.; Cui,L.; Yamamoto,K.; Hiramatsu,K.: *Genome and Virulence Determinants of High Virulence Community-Acquired MRSA*. Lancet: 359(9320): 1819-1827; 2002
- BARBER,M.: *Methicillin-Resistant Staphylococci*. J.Clin.Pathol.: 14: 385-393; 1961
- Barrett,F.F.; McGehee,R.F., Jr.; Finland,M.: *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus at Boston City Hospital. Bacteriologic and Epidemiologic Observations*. N.Engl.J Med: 279(9): 441-448; 1968
- Bayston,R.; Penny,S.R.: *Excessive Production of Mucoïd Substance in Staphylococcus SIIA: a Possible Factor in Colonisation of Holter Shunts*. Dev.Med Child Neurol.Suppl: 27: 25-28; 1972
- Brooun,A.; Liu,S.; Lewis,K.: *A Dose-Response Study of Antibiotic Resistance in Pseudomonas Aeruginosa Biofilms*. Antimicrob.Agents Chemother.: 44(3): 640-646; 2000
- Ceri,H.; Olson,M.E.; Stremick,C.; Read,R.R.; Morck,D.; Buret,A.: *The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms*. J.Clin.Microbiol.: 37(6): 1771-1776; 1999

- Chambers,H.F.: *Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications*. Clin.Microbiol.Rev.: 10(4): 781-791; 1997
- Chambers,H.F.: *The Changing Epidemiology of Staphylococcus Aureus?* Emerg.Infect.Dis.: 7(2): 178-182; 2001
- Chambers,H.F.; Hackbarth,C.J.: *Effect of NaCl and Nafcillin on Penicillin-Binding Protein 2a and Heterogeneous Expression of Methicillin Resistance in Staphylococcus Aureus*. Antimicrob.Agents Chemother: 31(12): 1982-1988; 1987
- Christensen,G.D.; Simpson,W.A.; Younger,J.J.; Baddour,L.M.; Barrett,F.F.; Melton,D.M.; Beachey,E.H.: *Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices*. J Clin.Microbiol.: 22(6): 996-1006; 1985
- Cosgrove,S.E.; Qi,Y.; Kaye,K.S.; Harbarth,S.; Karchmer,A.W.; Carmeli,Y.: *The Impact of Methicillin Resistance in Staphylococcus Aureus Bacteremia on Patient Outcomes: Mortality, Length of Stay, and Hospital Charges*. Infect.Control Hosp.Epidemiol.: 26(2): 166-174; 2005
- Cosgrove,S.E.; Sakoulas,G.; Perencevich,E.N.; Schwaber,M.J.; Karchmer,A.W.; Carmeli,Y.: *Comparison of Mortality Associated With Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Staphylococcus Aureus Bacteremia: a Meta-Analysis*. Clin.Infect Dis.: 36(1): 53-59; 2003
- Costerton,J.W.; Stewart,P.S.; Greenberg,E.P.: *Bacterial Biofilms: a Common Cause of Persistent Infections*. Science: 284(5418): 1318-1322; 1999
- Cramton,S.E.; Gerke,C.; Schnell,N.F.; Nichols,W.W.; Gotz,F.: *The Intercellular Adhesion (Ica) Locus Is Present in Staphylococcus Aureus and Is Required for Biofilm Formation*. Infect.Immun.: 67(10): 5427-5433; 1999
- Cramton,S.E.; Ulrich,M.; Gotz,F.; Doring,G.: *Anaerobic Conditions Induce Expression of Polysaccharide Intercellular Adhesin in Staphylococcus Aureus and Staphylococcus Epidermidis*. Infect.Immun.: 69(6): 4079-4085; 2001
- Davey,M.E.; O'Toole,G.A.: *Microbial Biofilms: From Ecology to Molecular Genetics*. Microbiol.Mol.Biol.Rev.: 64(4): 847-867; 2000
- Deurenberg,R.H.; Vink,C.; Kalenic,S.; Friedrich,A.W.; Bruggeman,C.A.; Stobberingh,E.E.: *The Molecular Evolution of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus*. Clin.Microbiol.Infect: 13(3): 222-235; 2007
- Dobinsky,S.; Kiel,K.; Rohde,H.; Bartscht,K.; Knobloch,J.K.; Horstkotte,M.A.; Mack,D.: *Glucose-Related Dissociation Between IcaADBC Transcription and Biofilm Expression by Staphylococcus Epidermidis: Evidence for an Additional Factor Required for Polysaccharide Intercellular Adhesin Synthesis*. J.Bacteriol.: 185(9): 2879-2886; 2003
- Donlan,R.M.; Costerton,J.W.: *Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms*. Clin.Microbiol.Rev.: 15(2): 167-193; 2002

- EARSS Annual Report: *The European Antimicrobial Resistance Surveillance System: Antibiotic resistance from 1999 to 2004*; 2005 <http://www.rivm.nl/earss/>
- Fitzpatrick,F.; Humphreys,H.; O'Gara,J.P.: *Environmental Regulation of Biofilm Development in Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Staphylococcus Aureus Clinical Isolates*. J.Hosp.Infect.: 62(1): 120-122; 2006
- Fitzpatrick,F.; Humphreys,H.; Smyth,E.; Kennedy,C.A.; O'Gara,J.P.: *Environmental Regulation of Biofilm Formation in Intensive Care Unit Isolates of Staphylococcus Epidermidis*. J.Hosp.Infect.: 52(3): 212-218; 2002
- Fluit,A.C.; Wienders,C.L.; Verhoef,J.; Schmitz,F.J.: *Epidemiology and Susceptibility of 3,051 Staphylococcus Aureus Isolates From 25 University Hospitals Participating in the European SENTRY Study*. J.Clin.Microbiol.: 39(10): 3727-3732; 2001
- Fux,C.A.; Costerton,J.W.; Stewart,P.S.; Stoodley,P.: *Survival Strategies of Infectious Biofilms*. Trends Microbiol.: 13(1): 34-40; 2005
- Gastmeier,P.; Sohr,D.; Geffers,C.; Behnke,M.; Daschner,F.; Ruden,H.: *Mortality Risk Factors With Nosocomial Staphylococcus Aureus Infections in Intensive Care Units: Results From the German Nosocomial Infection Surveillance System (KISS)*. Infection: 33(2): 50-55; 2005
- GENARS: *German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance*; 2007 www.genars.de
- Georgopapadakou,N.H.; Liu,F.Y.: *Binding of Beta-Lactam Antibiotics to Penicillin-Binding Proteins of Staphylococcus Aureus and Streptococcus Faecalis: Relation to Antibacterial Activity*. Antimicrob.Agents Chemother.: 18(5): 834-836; 1980
- Gerberding,J.L.; Miick,C.; Liu,H.H.; Chambers,H.F.: *Comparison of Conventional Susceptibility Tests With Direct Detection of Penicillin-Binding Protein 2a in Borderline Oxacillin-Resistant Strains of Staphylococcus Aureus*. Antimicrob.Agents Chemother.: 35(12): 2574-2579; 1991
- Götz,F.: *Staphylococcus and Biofilms*. Mol.Microbiol.: 43(6): 1367-1378; 2002
- Grinholc,M.; Wegrzyn,G.; Kurlenda,J.: *Evaluation of Biofilm Production and Prevalence of the IcaD Gene in Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Staphylococcus Aureus Strains Isolated From Patients With Nosocomial Infections and Carriers*. FEMS Immunol.Med.Microbiol.: 50(3): 375-379; 2007
- Hartman,B.J.; Tomasz,A.: *Expression of Methicillin Resistance in Heterogeneous Strains of Staphylococcus Aureus*. Antimicrob.Agents Chemother: 29(1): 85-92; 1986
- Heizmann P.; Heizmann W.R.; Hetzer R.: *MRSA: Resistenzmechanismen, Epidemiologie, Risikofaktoren, Prophylaxe, Therapie*. Z Herz- Thorax- Gefäßchir: 19(2): 78-88; 2005
- Hoffman,L.R.; D'Argenio,D.A.; MacCoss,M.J.; Zhang,Z.; Jones,R.A.; Miller,S.I.: *Aminoglycoside Antibiotics Induce Bacterial Biofilm Formation*. Nature: 436(7054): 1171-1175; 2005

- Huang,S.S.; Platt,R.: *Risk of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Infection After Previous Infection or Colonization*. Clin.Infect Dis.: 36(3): 281-285; 2003
- Ito,T.; Katayama,Y.; Asada,K.; Mori,N.; Tsutsumimoto,K.; Tiensasitorn,C.; Hiramatsu,K.: *Structural Comparison of Three Types of Staphylococcal Cassette Chromosome Mec Integrated in the Chromosome in Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus*. Antimicrob.Agents Chemother: 45(5): 1323-1336; 2001
- Ito,T.; Ma,X.X.; Takeuchi,F.; Okuma,K.; Yuzawa,H.; Hiramatsu,K.: *Novel Type V Staphylococcal Cassette Chromosome Mec Driven by a Novel Cassette Chromosome Recombinase, CcrC*. Antimicrob.Agents Chemother: 48(7): 2637-2651; 2004
- Jevons,M.P.: *Celbenin Resistant Staphylococci*. Br.Med.J.: 124-125; 1961
- Johnson,M.; Cockayne,A.; Williams,P.H.; Morrissey,J.A.: *Iron-Responsive Regulation of Biofilm Formation in Staphylococcus Aureus Involves Fur-Dependent and Fur-Independent Mechanisms*. J.Bacteriol.: 187(23): 8211-8215; 2005
- Jones,S.M.; Morgan,M.; Humphrey,T.J.; Lappin-Scott,H.: *Effect of Vancomycin and Rifampicin on Meticillin-Resistant Staphylococcus Aureus Biofilms*. Lancet: 357(9249): 40-41; 2001
- Katayama,Y.; Ito,T.; Hiramatsu,K.: *A New Class of Genetic Element, Staphylococcus Cassette Chromosome Mec, Encodes Methicillin Resistance in Staphylococcus Aureus*. Antimicrob.Agents Chemother: 44(6): 1549-1555; 2000
- Knobloch,J.K.; Horstkotte,M.A.; Rohde,H.; Mack,D.: *Evaluation of Different Detection Methods of Biofilm Formation in Staphylococcus Aureus*. Med.Microbiol.Immunol.: 191(2): 101-106; 2002
- Kondo,N.; Ito,T.; Hiramatsu,K.: *Genetic Basis for Molecular Epidemiology of MRSA*. J Infect Chemother: 2(3): 117-129; 1996
- Kränzler H.M.: *Untersuchung Zur Regulation Der Biofilmbildung Bei Staphylokokken*. 2006
- Leid,J.G.; Shirtliff,M.E.; Costerton,J.W.; Stoodley,A.P.: *Human Leukocytes Adhere to, Penetrate, and Respond to Staphylococcus Aureus Biofilms*. Infect Immun.: 70(11): 6339-6345; 2002
- Lewis,K.: *Riddle of Biofilm Resistance*. Antimicrob.Agents Chemother.: 45(4): 999-1007; 2001
- Lim,Y.; Jana,M.; Luong,T.T.; Lee,C.Y.: *Control of Glucose- and NaCl-Induced Biofilm Formation by Rbf in Staphylococcus Aureus*. J.Bacteriol.: 186(3): 722-729; 2004
- Lynch,A.S.; Robertson,G.T.: *Bacterial and Fungal Biofilm Infections*. Annu.Rev.Med.: 2007
- Mack,D.; Siemssen,N.; Laufs,R.: *Parallel Induction by Glucose of Adherence and a Polysaccharide Antigen Specific for Plastic-Adherent Staphylococcus*

- Epidermidis: Evidence for Functional Relation to Intercellular Adhesion.* Infect.Immun.: 60(5): 2048-2057; 1992
- MacKenzie,F.M.; Bruce,J.; Struelens,M.J.; Goossens,H.; Mollison,J.; Gould,I.M.: *Antimicrobial Drug Use and Infection Control Practices Associated With the Prevalence of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus in European Hospitals.* Clin.Microbiol.Infect.: 13(3): 269-276; 2007
- Mah,T.F.; O'Toole,G.A.: *Mechanisms of Biofilm Resistance to Antimicrobial Agents.* Trends Microbiol.: 9(1): 34-39; 2001
- Manago,K.; Nishi,J.; Wakimoto,N.; Miyanojara,H.; Sarantuya,J.; Tokuda,K.; Iwashita,M.; Yamamoto,K.; Yoshinaga,M.; Maruyama,I.; Kawano,Y.: *Biofilm Formation by and Accessory Gene Regulator Typing of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Strains Recovered From Patients With Nosocomial Infections.* Infect.Control Hosp.Epidemiol.: 27(2): 188-190; 2006
- Mathur,T.; Singhal,S.; Khan,S.; Upadhyay,D.J.; Fatma,T.; Rattan,A.: *Detection of Biofilm Formation Among the Clinical Isolates of Staphylococci: an Evaluation of Three Different Screening Methods.* Indian J.Med.Microbiol.: 24(1): 25-29; 2006
- McDougal,L.K.; Thornsberry,C.: *The Role of Beta-Lactamase in Staphylococcal Resistance to Penicillinase-Resistant Penicillins and Cephalosporins.* J Clin.Microbiol.: 23(5): 832-839; 1986
- Mckenney,D.; Pouliot,K.L.; Wang,Y.; Murthy,V.; Ulrich,M.; Doring,G.; Lee,J.C.; Goldmann,D.A.; Pier,G.B.: *Broadly Protective Vaccine for Staphylococcus Aureus Based on an in Vivo-Expressed Antigen.* Science: 284(5419): 1523-1527; 1999
- Naimi,T.S.; LeDell,K.H.; Como-Sabetti,K.; Borchardt,S.M.; Boxrud,D.J.; Etienne,J.; Johnson,S.K.; Vandenesch,F.; Fridkin,S.; O'Boyle,C.; Danila,R.N.; Lynfield,R.: *Comparison of Community- and Health Care-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Infection.* JAMA: 290(22): 2976-2984; 2003
- NNIS: *National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary From January 1992-June 2001, Issued August 2001.* Am.J.Infect.Control: 29(6): 404-421; 2001
- O'Brien,F.G.; Lim,T.T.; Chong,F.N.; Coombs,G.W.; Enright,M.C.; Robinson,D.A.; Monk,A.; Said-Salim,B.; Kreiswirth,B.N.; Grubb,W.B.: *Diversity Among Community Isolates of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus in Australia.* J.Clin.Microbiol.: 42(7): 3185-3190; 2004
- O'Toole,G.; Kaplan,H.B.; Kolter,R.: *Biofilm Formation As Microbial Development.* Annu.Rev.Microbiol.: 54: 49-79; 2000
- Okuma,K.; Iwakawa,K.; Turnidge,J.D.; Grubb,W.B.; Bell,J.M.; O'Brien,F.G.; Coombs,G.W.; Pearman,J.W.; Tenover,F.C.; Kapi,M.; Tiensasitorn,C.; Ito,T.; Hiramatsu,K.: *Dissemination of New Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Clones in the Community.* J.Clin.Microbiol.: 40(11): 4289-4294; 2002
- PEG: *Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V.*; 2007 www.p-e-g.de

- Raad,I.; Hanna,H.; Jiang,Y.; Dvorak,T.; Reitzel,R.; Chaiban,G.; Sherertz,R.; Hachem,R.: *Comparative Activities of Daptomycin, Linezolid, and Tigecycline Against Catheter-Related Methicillin-Resistant Staphylococcus Bacteremic Isolates Embedded in Biofilm*. Antimicrob.Agents Chemother.: 51(5): 1656-1660; 2007
- Rachid,S.; Ohlsen,K.; Witte,W.; Hacker,J.; Ziebuhr,W.: *Effect of Subinhibitory Antibiotic Concentrations on Polysaccharide Intercellular Adhesin Expression in Biofilm-Forming Staphylococcus Epidermidis*. Antimicrob.Agents Chemother.: 44(12): 3357-3363; 2000
- Ramdani-Bouguessa,N.; Bes,M.; Meugnier,H.; Forey,F.; Reverdy,M.E.; Lina,G.; Vandenesch,F.; Tazir,M.; Etienne,J.: *Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Strains Resistant to Multiple Antibiotics and Carrying the Panton-Valentine Leukocidin Genes in an Algiers Hospital*. Antimicrob.Agents Chemother.: 50(3): 1083-1085; 2006
- Robert-Koch-Institut: *International Einheitliche Nomenklatur Epidemischer MRSA Neu Eingeführt*. Robert-Koch-Institut: Epidemiologisches Bulletin: 27: 222-223; 2002
- Robert-Koch-Institut: *Community Acquired MRSA Weltweit Und in Deutschland*. Robert-Koch-Institut: Epidemiologisches Bulletin: 5: 33-36; 2004a
- Robert-Koch-Institut: *Zur MRSA-Situation in Deutschland Im Jahr 2003*. Robert-Koch-Institut: Epidemiologisches Bulletin: 42: 358-361; 2004b
- Robert-Koch-Institut: *Staphylokokken-Erkrankungen, insbesondere Infektionen durch MRSA*; 2007a www.rki.de
- Robert-Koch-Institut: *Zur MRSA-Situation in Deutschland 2005 Und 2006*. Robert-Koch-Institut: Epidemiologisches Bulletin: 6: 41-46; 2007b
- Sabath,L.D.; Wallace,S.J.: *The Problems of Drug-Resistant Pathogenic Bacteria. Factors Influencing Methicillin Resistance in Staphylococci*. Ann.N.Y.Acad.Sci.: 182: 258-266; 1971
- Salgado,C.D.; Farr,B.M.; Calfee,D.P.: *Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus: a Meta-Analysis of Prevalence and Risk Factors*. Clin.Infect Dis.: 36(2): 131-139; 2003
- SARI: *Surveillance der Antibiotika-Anwendung und der bakteriellen Resistenz auf deutschen Intensivstationen*; 2007 www.sari-antibiotika.de
- Seligman,S.J.: *Penicillinase-Negative Variants of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus*. Nature: 209(5027): 994-996; 1966
- Shukla,S.K.; Stemper,M.E.; Ramaswamy,S.V.; Conradt,J.M.; Reich,R.; Graviss,E.A.; Reed,K.D.: *Molecular Characteristics of Nosocomial and Native American Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Clones From Rural Wisconsin*. J Clin.Microbiol.: 42(8): 3752-3757; 2004

- Stepanovic,S.; Vukovic,D.; Dakic,I.; Savic,B.; Svabic-Vlahovic,M.: *A Modified Microtiter-Plate Test for Quantification of Staphylococcal Biofilm Formation*. J.Microbiol.Methods: 40(2): 175-179; 2000
- Stepanovic,S.; Vukovic,D.; Hola,V.; Bonaventura,G.D.; Djukic,S.; Cirkovic,I.; Ruzicka,F.: *Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of Testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by Staphylococci*. APMIS: 115(8): 891-899; 2007
- STEWART,G.T.; HOLT,R.J.: *Evolutio of Natural Resistance to the Newer Penicillins*. Br.Med.J.: 1(5326): 308-311; 1963
- Stewart,P.S.; Costerton,J.W.: *Antibiotic Resistance of Bacteria in Biofilms*. Lancet: 358(9276): 135-138; 2001
- Stoodley,P.; Sauer,K.; Davies,D.G.; Costerton,J.W.: *Biofilms As Complex Differentiated Communities*. Annu.Rev.Microbiol.: 56: 187-209; 2002
- Sutherland,I.: *Biofilm Exopolysaccharides: a Strong and Sticky Framework*. Microbiology: 147(Pt 1): 3-9; 2001
- Suzuki,E.; Kuwahara-Arai,K.; Richardson,J.F.; Hiramatsu,K.: *Distribution of Mec Regulator Genes in Methicillin-Resistant Staphylococcus Clinical Strains*. Antimicrob.Agents Chemother.: 37(6): 1219-1226; 1993
- Tiemersma,E.W.; Bronzwaer,S.L.; Lyytikainen,O.; Degener,J.E.; Schrijnemakers,P.; Bruinsma,N.; Monen,J.; Witte,W.; Grundman,H.: *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus in Europe, 1999-2002*. Emerg.Infect.Dis.: 10(9): 1627-1634; 2004
- Tomasz,A.; Drugeon,H.B.; de Lencastre,H.M.; Jabes,D.; McDougall,L.; Bille,J.: *New Mechanism for Methicillin Resistance in Staphylococcus Aureus: Clinical Isolates That Lack the PBP 2a Gene and Contain Normal Penicillin-Binding Proteins With Modified Penicillin-Binding Capacity*. Antimicrob.Agents Chemother.: 33(11): 1869-1874; 1989
- Vandenesch,F.; Naimi,T.; Enright,M.C.; Lina,G.; Nimmo,G.R.; Heffernan,H.; Liassine,N.; Bes,M.; Greenland,T.; Reverdy,M.E.; Etienne,J.: *Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Carrying Panton-Valentine Leukocidin Genes: Worldwide Emergence*. Emerg.Infect.Dis.: 9(8): 978-984; 2003
- Vogel,L.; Sloos,J.H.; Spaargaren,J.; Suiker,I.; Dijkshoorn,L.: *Biofilm Production by Staphylococcus Epidermidis Isolates Associated With Catheter Related Bacteremia*. Diagn.Microbiol.Infect.Dis.: 36(2): 139-141; 2000
- Vuong,C.; Saenz,H.L.; Gotz,F.; Otto,M.: *Impact of the Agr Quorum-Sensing System on Adherence to Polystyrene in Staphylococcus Aureus*. J.Infect.Dis.: 182(6): 1688-1693; 2000
- Wannet,W.J.; Spalburg,E.; Heck,M.E.; Pluister,G.N.; Tiemersma,E.; Willems,R.J.; Huijsdens,X.W.; de Neeling,A.J.; Etienne,J.: *Emergence of Virulent Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Strains Carrying Panton-Valentine Leucocidin Genes in The Netherlands*. J Clin.Microbiol.: 43(7): 3341-3345; 2005

Witte,W.; Mielke,M.; Ammon,A.; Nassauer,A.; Wischnewski,N.: *Fachtagung Der AG Nosokomiale Infektionen Am RKI Zur Intensivierung Der Umsetzung Von Präventionsstrategien Bei MRSA*. Robert-Koch-Institut: Epidemiologisches Bulletin: 5: 31-38; 2005

Ziebuhr,W.; Heilmann,C.; Gotz,F.; Meyer,P.; Wilms,K.; Straube,E.; Hacker,J.: *Detection of the Intercellular Adhesion Gene Cluster (Ica) and Phase Variation in Staphylococcus Epidermidis Blood Culture Strains and Mucosal Isolates*. Infect Immun.: 65(3): 890-896; 1997

Zobell,C.E.: *The Effect of Solid Surfaces Upon Bacterial Activity*. J.Bacteriol.: 46(1): 39-56; 1943

8 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Adamkiewicz, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Becker, Cetin, Christiansen, Czubayko, Eilers, Feuser, Fuchs, v. Garrel, Gerdes, Geus, Gotzen, Gress, Grimm, Griss, Gudermann, Heeg, Herzum, Hofbauer, Hofmann, Hoyer, Jungclas, Kann, Klenk, Köhler, Koolman, Krause, Krieg, Kroll, Lang, Lill, Lohoff, Maier, Maisch, Mandrek, Max, Mennel, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Remschmidt, Renz, Röhm, Rothmund, Schmidt, Seitz, Studer, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf

9 Danksagungen

Ich danke allen, die mir bei der Fertigstellung dieser Dissertation geholfen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Reinier Mutters für die Überlassung des Themas sowie die wissenschaftliche Betreuung.

Ein weiterer Dank geht an Frau Dr. Martina Klotz für bereitwillige Auskünfte und Bereitstellen ihrer Räumlichkeiten.

Darüber hinaus danke ich sehr herzlich den Medizinisch-technischen Assistentinnen des Instituts der Medizinischen Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, insbesondere Frau Susanne Riehl, Frau Ingrid Nau und Frau Helene Bykow, sowie Frau Annette Riehl für die freundliche Unterstützung.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Rainer Selg und Frau Louisa Sassen für die freundliche Unterstützung in statistischen Fragen.

Für Kritik, geistige Anregung und Korrekturlesen danke ich meinem Vater Herrn Dr. med. Michael Reidel, meiner Mutter Frau Marion Reidel und Herrn Dr. med. Michael Sassen.