

Aus der Medizinischen Klinik I

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. H. Lehnert

**Nasale *Staphylococcus aureus* Besiedlung und  
Katheteraustrittsstelleninfektion bei  
kontinuierlicher ambulanter Peritonealdialyse:  
Eine klinische und experimentelle Studie**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

– Aus der Medizinischen Fakultät –

vorgelegt von

Sandra Eckstein

aus Freiburg i.Br.

Lübeck 2008

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Burkhard Kreft

2. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. Frauke Matter

Tag der mündlichen Prüfung: 24.09.2009

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 24.09.2009

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung und Fragestellung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Patienten, Material und Methoden</b>	<b>9</b>
<b>2.1.</b>	<b>Patienten</b>	<b>9</b>
2.1.1.	Studie und Patientenkollektiv	9
2.1.2.	Peritonealdialysekatheter	9
2.1.3.	Probengewinnung und Identifizierung von <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2.1.4.	Klinische Dokumentation des Katheteraustrittsstellenbefundes / der Katheteraustrittsstelleninfektion (KAI)	11
2.1.5.	Katheterpflege und Therapie der Katheteraustrittsstelleninfektion	12
2.1.6.	Nasales Trägertum von <i>Staphylococcus aureus</i>	12
<b>2.2.</b>	<b>Reagenzien, Zellkultur und Materialien</b>	<b>13</b>
<b>2.3.</b>	<b>HEp-2 Zelllinie und Zellkultur</b>	<b>14</b>
<b>2.4.</b>	<b>Bakterien</b>	<b>14</b>
2.4.1.	Verwendete Stämme	14

<b>2.5.</b>	<b>Adhärenzbestimmung mittels MTT</b>	15
2.5.1.	Kolorimetrischer Nachweis vitaler Bakterien mittels MTT	15
2.5.2.	Intrinsische Spaltung von MTT	15
2.5.3.	Bakterienadhärenz an HEp-2 Zellen	16
2.5.4.	Bakterienadhärenz an Silikon vermittelt durch Fibronectin	17
2.5.5.	Bakterienadhärenz an Peritonealdialysekathetern	17
<b>2.6.</b>	<b>Adhärenzbestimmung mittels Lichtmikroskopie</b>	18
<b>2.7.</b>	<b>Adhärenzbestimmung von radioaktiv markierten Bakterien an Peritonealdialysekathetern</b>	18
<b>2.8.</b>	<b>Statistik</b>	19
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	21
<b>3.1.</b>	<b>Demographische Daten der Patienten</b>	21
<b>3.2.</b>	<b>Besiedlung der Katheteraustrittsstelle</b>	22
3.2.1.	Mikrobiologische Befunde der Katheteraustrittsstellen- Abstriche	22
3.2.2.	Mikrobiologische Differenzierung der keimpositiven Katheteraustrittsstellen- Abstriche	24

<b>3.3.</b>	<b>Besiedlung der Nase</b>	26
3.3.1.	Mikrobiologische Befunde der Nasen-Abstriche	26
3.3.2.	Nasale Besiedlung im Vergleich zur Besiedlung der Katheteraustrittsstelle am selben Tag	26
3.3.3.	Nasales Trägertum von <i>Staphylococcus aureus</i>	29
3.3.4.	Nasales Trägertum von <i>Staphylococcus aureus</i> und Infektion der Katheteraustrittsstelle	30
3.3.5.	Diabetes mellitus und <i>Staphylococcus aureus</i> Besiedlung	36
<b>3.4.</b>	<b>Kolorimetrische Adhärenzbestimmung mittels MTT</b>	36
3.4.1.	Intrinsische Spaltung von MTT	36
3.4.2.	Quantifizierung von <i>Staphylococcus aureus</i> mittels MTT	38
3.4.3.	Adhärenz der Kontrollkeime ATCC 29213 und ATCC 25923 an HEp-2 Zellen	39
3.4.4.	Adhärenz der Patientenisolat an HEp-2 Zellen	42
3.4.4.1.	Beziehung der Adhärenz der Katheteraustrittsstellenisolate zum Infektionsgrad am gleichen Tag	42
3.4.4.2.	Beziehung der Adhärenz nasaler <i>Staphylococcus aureus</i> Isolate zum Infektionsstadium	44
3.4.5.	Bakterienadhärenz vermittelt durch Fibronektin	45
3.4.6.	Bakterienadhärenz an Peritonealdialysekathetern	46
<b>3.5.</b>	<b>Adhärenzbestimmung an HEp-2 Zellen mittels Lichtmikroskopie</b>	46
3.5.1.	Adhärenz der Kontrollkeime ATCC 29213 und ATCC 25923 an HEp-2 Zellen	46

3.5.2.	Adhärenz der Katheteraustrittsstellenisolate an HEp-2 Zellen	47
3.6.	<b>Adhärenzbestimmung von radioaktiv markierten Bakterien an Peritonealdialysekathetern</b>	48
4.	<b>Diskussion</b>	50
5.	<b>Schlussfolgerung</b>	60
6.	<b>Zusammenfassung</b>	61
7.	<b>Literaturverzeichnis</b>	62
8.	<b>Danksagungen</b>	69
9.	<b>Lebenslauf</b>	71

## Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Serum Albumin
CAPD	Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis
cpm	Counts per minute
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
KA	Katheteraustrittsstelle
KAI	Katheteraustrittsstelleninfektion
PBS	Phosphate buffered Saline
S. aureus	Staphylococcus aureus

## 1. Einleitung und Fragestellung

Die kontinuierliche ambulante Peritonealdialyse (Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis, CAPD) gilt heute als sicheres und effektives Dialyseverfahren bei terminaler Niereninsuffizienz. Ein Silikonkatheter, der einen dauerhaften Zugang zur Peritonealhöhle ermöglicht, und das zur Diffusion und osmotischen Ultrafiltration befähigte Peritoneum stellen die Voraussetzungen der CAPD dar.

Die Möglichkeit, das Peritoneum zur Entgiftung harnpflichtiger Substanzen zu nutzen, wurde bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts diskutiert. 1923 beschrieb Ganter erstmalig die Instillation von Kochsalzlösung in die Bauchhöhle zur Entfernung urämischer Gifte bei Meerschweinchen (25). Eine Peritonealdialysebehandlung an Patienten wurde erstmalig durch Heusser und Werder 1927 durchgeführt, war jedoch noch nicht effektiv (28). 1946 beschrieben Seligmann et al. die Peritonealdialyse als effizientes Therapieverfahren bei akutem Nierenversagen (22). Das extrem hohe Infektionsrisiko, die schwierige technische Handhabung sowie der erste erfolgreiche Hämodialyseversuch durch Kolff 1943 ließ die Peritonealdialyse jedoch nur in Ausnahmefällen etwa beim akuten Nierenversagen Anwendung finden (33). Fortschritte der Peritonealdialyse wurden möglich durch einen verbesserten, risikoärmeren Zugang zur Bauchhöhle. Bereits 1959 führte Maxwell einen Plastikkatheter anstelle der bislang verwendeten Metall- bzw. Gummikanülen ein (43). Jedoch ermöglichte erst der von Tenckhoff und Schechter 1968 entwickelte Silastic Verweilkatheter einen sicheren und dauerhaften Zugang zur Bauchhöhle (68) und erlaubte damit eine über einen längeren Zeitraum anwendbare Behandlung auch bei chronisch niereninsuffizienten Patienten.

Die Verfügbarkeit von Antibiotika zur Behandlung von Peritonealdialyse assoziierten Infektionen, sowie von Spüllösungen, die die Patienten vor zu

großen Volumen- und Mineralienverlusten schützten trugen ebenfalls zur Fortentwicklung der Peritonealdialyse bei.

Die moderne Ära der Peritonealdialyse geht auf Popovich et al. zurück. 1976 beschrieben sie die intraperitoneale Infusion von 2l Peritonealdialyselösung, die im 5h Intervall ausgewechselt wurde, wobei der Patient in der Zwischenzeit seiner gewohnten Aktivität nachgehen konnte (57). Unterbrochen nur von kurzen Austauschperioden des Dialysats mehrmals am Tag, wurde eine kontinuierliche ambulante Dialyse ermöglicht (58).

Die heutige CAPD ist eine modifizierte Form dieser Erstbeschreibung durch Popovich: Ein operativ implantierter Silikonkatheter, dessen Spitze im kleinen Becken hinter der Harnblase liegt, wird in der Regel über eine etwa 3 cm lange intrakutane Tunnelung zumeist 3-4 cm unterhalb des Bauchnabels ausgeführt. Der Dialysatbeutel mit steriler hyperosmolarer Glucoselösung wird mit dem Ausgangsstück des Katheters verbunden und in die Peritonealhöhle infundiert. Der leere Beutel wird dann zusammengerollt am Körper getragen, ohne diskonnektiert zu werden. Nach etwa 4-8 h wird der Beutel aufgerollt und das Dialysat mittels Schwerkraft in den Beutel zurückgeführt. Im Anschluss wird ein neuer Beutel angeschlossen, ein neuer Zyklus begonnen, so dass eine kontinuierliche Entgiftung mit einer Mindestanzahl an Katheterdiskonnektionen ermöglicht wird. Der Beutelwechsel sollte viermal täglich stattfinden und kann vom Patienten selbstständig durchgeführt werden (23). Inzwischen sind eine Reihe technischer Modifikationen dieses Prinzips etabliert.

Die Entgiftung urämischer Patienten mittels Peritonealdialyse ist ein komplexer Vorgang. Die Leistungsfähigkeit der Peritonealdialyse wird dabei nach den Prinzipien der Diffusion und der osmotischen Ultrafiltration über eine semipermeable Membran, dem Peritoneum, erreicht. Über die Instillation von hyperosmolaren Glucoselösungen wird ein Konzentrationsgradient für die Diffusion und die Ultrafiltration der retinierten urämischen Metabolite und Flüssigkeit erzeugt. Zu einer

bedarfsgerechten Entgiftung und Volumenentzug können Spüllösungsmenge (Volumen und Anzahl der Beutelwechsel) und Glucosekonzentration der Spüllösung angepasst werden (23).

Die heutige CAPD stellt also eine sichere Form der Nierenersatztherapie dar, deren Vorteile gegenüber der Hämodialyse in der kontinuierlichen Elimination von urämischen Metaboliten und Flüssigkeit liegen. Des Weiteren bedarf es keines Gefäßzugangs oder einer systemischen Antikoagulation und ist mit einem erheblich geringeren apparativen Aufwand verbunden (24).

Nachteile bzw. Risiken der CAPD liegen insbesondere in infektiologischen Problemen begründet, wobei demographische, technische, epidemiologische und immunologische Faktoren CAPD assoziierte Infektionen möglicherweise beeinflussen (8, 51).

Katheterassoziierte Infektionen wie Katheteraustrittsstelleninfektion, Kathetertunnelinfektion und Peritonitis gehören zu den häufigsten Gründen eines Therapieabbruchs (1, 56, 79). Sie führen zu einer erhöhten Gesamtmorbidität sowie Mortalität und belasten den Patienten durch zusätzliche Therapiemaßnahmen sowie stationäre Aufenthalte (1, 12, 15, 38, 79). In schweren Fällen kann es zu Katheterverlust mit Unterbrechung oder Abbruch der CAPD oder schwersten Infektionen mit Todesfolge kommen (1, 8, 16, 79).

Die Peritonitis stellt eine vitale Bedrohung für den Patienten dar und gilt als Hauptursache für Therapieabbrüche (15, 79). Hinzu kommt, dass es im Rahmen rezidivierender Peritonitiden zur Verminderung der peritonealen Austauschfläche kommen kann und damit die Effizienz dieses Nierenersatztherapieverfahrens eingeschränkt wird (23). Untersuchungen zu Peritonitiden stehen daher im Mittelpunkt klinischer und experimenteller Studien.

Prinzipiell können alle katheterassoziierten Infektionen unabhängig voneinander auftreten (56). Infektionen der Katheteraustrittsstelle sind jedoch mit einer signifikant erhöhten konsekutiven Tunnelinfektions- bzw.

Peritonitisrate assoziiert (56, 79). Patienten mit einer Katheteraustrittsstelleninfektion in der Vorgeschichte erkranken außerdem häufiger an einer weiteren Katheteraustrittsstelleninfektion (56). Die Früherkennung der Katheteraustrittsstelleninfektion sowie deren Risikofaktoren stellen daher eine wichtige Rolle im Therapiekonzept der CAPD dar (12, 56).

Die Katheteraustrittsstelleninfektion ist in der Literatur, im Gegensatz zu Peritonitis, nicht einheitlich definiert (38), dabei umfassen Definitionskriterien eine visuell wahrnehmbare Entzündung mit oder ohne mikrobiellen Keimnachweis mit den klassischen Entzündungszeichen am Katheteraustritt: Rötung, Schwellung, Schmerz und Exsudat. Einige Autoren gehen von der Möglichkeit einer Entzündung ohne obligaten Keimnachweis aus (1, 70), wohingegen andere den Keimnachweis als Bestätigung der Infektion fordern (15, 79). Die Angaben über die Inzidenz der Katheteraustrittsstelleninfektion schwanken in der Literatur zwischen 0,05 und 1,02 Infektionen pro Patient und Jahr (1, 39, 40, 63). Diese Zahlen sind jedoch aufgrund der unterschiedlichen Definitionen und der Unklarheit des Beginns einer neuen Infektionsperiode nur schwer zu vergleichen. Da Katheteraustrittsstelleninfektionen häufig über einen Zeitraum von 10-14 Tagen therapiert werden, erscheint es sinnvoll, von einer neuen Episode erst 4 Wochen nach Beginn der vorangegangenen Episode zu sprechen (39). Neben den Problemen der Diagnosestellung und der Definition eines Rezidivs spielt möglicherweise auch eine ungenaue Abgrenzung zur Tunnelinfektion eine Rolle in den unterschiedlichen Inzidenzangaben (79). Es wird deutlich, dass sich für epidemiologische Untersuchungen eine einheitliche Definition der Katheteraustrittsstelleninfektion als sinnvoll erweisen würde.

Ätiologisch überwiegen *Staphylokokken* assoziierte Infektionen der Katheteraustrittsstelle. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ist dabei einer der am häufigsten isolierten Mikroorganismen und ist insbesondere für schwere und rezidivierende Infektionsverläufe der Katheteraustrittsstelle verantwortlich (1, 38, 63). In 25-85% der Katheteraustrittsstelleninfektionen wird *S. aureus* nachgewiesen (38, 56, 79) und für einen Großteil der

Tunnelinfektionen verantwortlich gemacht (38, 56). Die große Anzahl und der schwerwiegende Verlauf *S. aureus* induzierter Infektionen zeigt, dass mehr Informationen über die Epidemiologie, Pathogenese, Risikofaktoren und Prävention von *S. aureus* Infektionen bei CAPD Patienten benötigt werden.

*S. aureus* besiedelt beim Menschen Haut und Schleimhäute. Dabei ist die vordere Nasenhöhle (vestibulum nasi anterior) das wichtigste, beständigste Reservoir für *S. aureus* (76). In longitudinalen Studien an gesunden Personen konnten drei verschiedene Trägertypen für *S. aureus* definiert werden: persistierende Träger, intermittierende Träger und Nicht-Träger. Zwischen 10 und 35% der Probanden sind fast immer mit *S. aureus* kolonisiert und werden daher als persistierende Träger definiert. Etwa 20-75% sind dagegen nur intermittierend kolonisiert und werden als intermittierende Träger bezeichnet. Nicht-Träger sind niemals mit *S. aureus* kolonisiert und machen zwischen 5-50% der gesunden Probanden aus (18, 76). Es konnte gezeigt werden, dass persistierende Träger im Vergleich zu intermittierenden Trägern eine höhere Bakterienlast und damit potentiell ein höheres Infektionsrisiko haben können (76). Viele Patientenstudien ermitteln das nasale Trägertum jedoch mit einem einzelnen Abstrich, bzw. mit mehreren Abstrichen von denen nur einer positiv für *S. aureus* sein muss, um den Patienten als nasalen Träger zu definieren (40, 53, 74). Die zugrunde liegenden Mechanismen für das nasale *S. aureus* Trägertum sind nicht vollständig verstanden und sicher multifaktoriell (75).

Etwa 43% (Verteilung 17-51%) der CAPD Patienten sind nasale *S. aureus* Träger, dabei konnte in Studien gezeigt werden, dass nasales Trägertum von *S. aureus* mit einer erhöhten Rate von *S. aureus* bedingten Katheteraustrittsstelleninfektionen assoziiert ist (15, 27, 40, 51, 53, 63). Obwohl Studien bei CAPD Patienten gezeigt haben, dass es temporär möglich ist, *S. aureus* nasal effizient zu eradizieren und die *S. aureus* Katheteraustrittsstelleninfektionsrate für diesen Zeitraum zu senken (14, 53, 78) stellen sich hier weitergehende Fragen. Mögliche Nebenwirkungen der Therapie, Resistenzentwicklung, fragliche Kosteneffizienz und Verschiebung der nasalen Besiedlung in den gramnegativen Bereich (9,

11, 14, 27, 48, 53, 78), aber vor allem die häufige Wiederbesiedlung der Nase und die große Anzahl an nasalen *S. aureus* Trägern, die keine relevanten Infektionen entwickelt (48, 49, 74) machen es notwendig, die Träger zu identifizieren, die tatsächlich von einem erhöhten Risiko für eine *S. aureus* induzierte Infektion betroffen sind und damit von therapeutischen Konsequenzen profitieren würden.

Die Adhärenz von Bakterien an Epithelien und körperfremden Oberflächen gilt als ein wichtiger Pathogenitätsfaktor in der Genese von Infektionskrankheiten (13, 34, 41, 50, 60, 69). Dabei spielt die Adhärenz eine Schlüsselrolle in der nachfolgenden Kolonisation und Infektion. Das Adhärenzvermögen von *S. aureus* an Epithelien der Nase und der Katheteraustrittsstelle könnte somit ein wesentlicher Schritt in der Kolonisation und einer konsekutiven Infektion sein (31). Es gibt Hinweise, dass *S. aureus* eine größere Affinität zu nasalen epithelialen Zellen von *S. aureus* Trägern *in vitro* hat (2, 3). Weiterhin sind Staphylokokken in der Lage, auf polymeren Silikonmaterialien zu adhären und Mikrokolonien zu bilden (5, 20, 29, 37, 54). Adhärenz von *S. aureus* an Silikonperitonealdialysekathetern könnte somit ebenfalls ein wichtiger Faktor für die Kolonisation und Infektion der Katheteraustrittsstelle sein.

Die Mechanismen, die der Adhärenz von *S. aureus* an Zellen und Biomaterialien unterliegen sind vielseitig und Gegenstand zahlreicher Studien (5, 71). Sie umfassen spezifische Faktoren des Erregers wie Oberflächenrezeptoren: Fibronectin-bindende Proteine, Fibrinogen-bindende Proteine, Kollagen-bindende Proteine und Protein A - sogenannte MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules), die an Zellstrukturen oder Plasmaproteinen spezifisch binden können (71) aber auch unspezifische Faktoren wie die inokulierte Bakterienanzahl und hydrophobe Wechselwirkungen (29, 37) werden in der Literatur diskutiert.

Fibronectin wird in der Literatur als adhärenzvermittelnder Faktor beschrieben (36). Es handelt sich um ein großes Glycoprotein, das sich zum einen in einer löslichen Form im Plasma befindet, zum anderen aber

auch in einer unlöslichen multimeren Form in der extrazellulären Matrix. *S. aureus* exprimiert ein oder zwei Fibronectin bindende Rezeptoren (fibronectin-binding proteins FnBPs), FnBPA und FnBPB. (19, 30, 36) Diese binden dabei irreversibel und spezifisch an Fibronectin. Es konnte gezeigt werden, dass das Adhärenzvermögen von *S. aureus* an Wirtsstrukturen signifikant durch Fibronectin gesteigert wird, wobei es unabhängig ist, ob ein oder beide FnBPs exprimiert werden (52, 59). Körperfremde Materialien mit Oberflächen aus polymeren Kunststoffen wie Katheter- werden nach Implantation nahezu sofort mit Plasmaproteinen überzogen (26). Es konnte gezeigt werden, dass abgelagertes Fibronectin auf explantierten Kathetermaterialien eine dosisabhängige Adhärenz von klinischen *S. aureus* Isolaten fördert (26, 72). Fibronectin muss daher als ein wichtiger Mediator in der Adhärenz von *S. aureus* an polymerem Silikonmaterial diskutiert werden (44).

Es wurde eine klinische und experimentelle Studie durchgeführt, um

- a) den epidemiologischen Zusammenhang zwischen Kolonisation der Nase und der Katheteraustrittsstelle mit *S. aureus* und
- b) die Adhärenz von klinischen *S. aureus* Isolaten an Epithelzellen und polymerem Silikon zu untersuchen und
- c) eine eventuelle Assoziation zwischen Erregeradhärenz und dem klinischen Verlauf zu erfassen.

In der vorliegenden Arbeit werden die folgenden Fragen untersucht:

1. Kann die Bindung von *S. aureus* an Epithelzellen und polymerem Silikon messbar gemacht werden?
2. Liegen signifikante Unterschiede bezüglich der Adhärenz an Epithelzellen und polymerem Silikon zwischen den verschiedenen klinischen *S. aureus* Isolaten vor?
3. Wird das Adhärenzvermögen von *S. aureus in vitro* durch Fibronektin gesteigert?
4. Korreliert das Adhärenzvermögen von *S. aureus* an Epithelien *in vitro* mit dem Schweregrad einer Katheteraustrittsstelleninfektion *in vivo*?
5. Korreliert das Adhärenzvermögen von *S. aureus* an polymerem Silikon *in vitro* mit dem Schweregrad einer Katheteraustrittsstelleninfektion *in vivo*?
6. Kann durch eine differenzierte Definition des nasalen Trägertums von *S. aureus* eine prognostische Aussage über die konsekutive Infektionswahrscheinlichkeit der Katheteraustrittsstelle vorgenommen werden?

## **2. Patienten, Material und Methoden**

### **2.1. Patienten**

#### **2.1.1. Studie und Patientenkollektiv**

Die Studie wurde von Herrn Prof. Dr. med. M. Trautmann, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Ulm, initiiert und durch die Paul Ehrlich Gesellschaft für Chemotherapie gefördert. In diese prospektive Studie wurden 72 CAPD Patienten aus 2 Dialysezentren (Medizinische Universität zu Lübeck, Virchow Klinikum Berlin) aufgenommen. Diese Patienten rekrutierten sich aus der jeweiligen Peritonealdialyseambulanz der Zentren vom 25.1.1993 - 31.1.1995. Es gab keine Aufnahmebeschränkungen aufgrund von Alter, Geschlecht, Grunderkrankungen oder vorausgegangener Nierenersatztherapie. Die demographischen Daten der Patienten sind im Ergebnisteil in Tabelle 2 wiedergegeben. Als Alter der Patienten wurde das Alter zur Zeit des Studieneintritts angegeben. Studieneintritt war nicht notwendigerweise der Beginn der CAPD für den einzelnen Patienten, sondern war zu jedem Zeitpunkt möglich.

#### **2.1.2. Peritonealdialysekatheter**

Alle bei den Patienten eingesetzten Peritonealdialysekatheter bestanden aus Silikonkautschuk, folgende Ausführungen waren dabei in dieser Studie von Gebrauch: Tenckhoff Katheter mit geradem oder geringeltem intraabdominellen Anteil, Swan-neck Katheter und Oreopoulos-Zellermann-Katheter. Da die Studie nicht bei Beginn der individuellen Peritonealdialyse begann, wurden die Patienten nicht systematisch mit einheitlichen Kathetern versorgt.

### 2.1.3. Probengewinnung und Identifizierung von *Staphylococcus aureus*

In Intervallen von vier bis sechs Wochen fanden ambulante Vorstellungstermine der Patienten in den Dialysezentren statt. Bei jedem Besuch führten die teilnehmenden Studienärzte jeweils Abstriche zur Probengewinnung von Nase- und Katheteraustrittsstelle durch. Der Nasenabstrich erfolgte aus beiden vestibula nasi mit einem Transwabtupfer. Mit einem zweiten Tupfer (Port-a-cul) wurde die Haut um die Katheteraustrittsstelle zirkulär abgestrichen. Beide Tupfer wurden sofort in Stuart's transport medium (Culturette System, Becton Dickinson, Cockeysville MD, USA) gebracht und per Post an das Labor von Herrn Prof. Dr. med. M. Trautmann versandt. Direkt nach Erhalt wurden die Tupfer dort auf Blut- und Mc Conkey Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C für 18-24h Stunden unter aeroben Bedingungen inkubiert. *S. aureus* wurde durch Kolonienmorphologie, positiven Katalasetest und positiven Glasträgerkoagulasetest (clumping factor) identifiziert. War trotz verdächtiger Kolonienmorphologie der Glasträgerkoagulasetest zweifelhaft oder negativ, wurde die Staphytect reaction (Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, England) durchgeführt. Diese weist sowohl clumping factor und Protein A nach. Alle positiv identifizierten *S. aureus* Stämme wurden im Microbanksystem (Pro-Lab Diagnostics, Ontario, Canada) bei -25°C aufbewahrt. Die so isolierten Stämme wurden uns dann zur Verfügung gestellt. Diese beschriebenen mikrobiologischen Arbeiten wurden komplett im Labor von Prof. Dr. med. M. Trautmann durchgeführt und sind nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

#### 2.1.4. Klinische Dokumentation des Katheteraustrittstellenbefundes/ der Katheteraustrittsstelleninfektion (KAI)

Bei jedem der oben beschriebenen Besuche der Patienten wurde die Katheteraustrittsstelle durch den jeweils behandelnden Arzt klinisch beurteilt. Eine Infektion der Katheteraustrittsstelle wurde klinisch aufgrund von visuell erfassbaren Entzündungszeichen mit oder ohne mikrobiologischem Keimnachweis definiert. Die Einteilung in Schweregrade erfolgte nach Twardowsky (Tabelle 1, (70)).

*Tab. 1: Klinische Stadieneinteilung der Katheteraustrittsstelleninfektionen (KAI, Grad 0-IV, modifiziert nach (70)). Die Einteilung wurde durch den jeweils behandelnden Arzt vorgenommen.*

*+: wenig, ++: moderat, +++: intensiv*

<b>KAI</b>	<b>Rötung</b>	<b>Schwellung</b>	<b>Schmerz</b>	<b>Sekretion</b>	<b>Eiter</b>
<b>0</b>	Nein	nein	Nein	nein	nein
<b>I</b>	< 2 mm	nein	Nein	nein	nein
<b>II</b>	> 2 mm	nein	Nein	+	nein
<b>III</b>	> 2 mm	ja	Ja	++	+
<b>IV</b>	> 2 mm	ja	Ja	+++	+++

Der Befund der Katheteraustrittsstelle wurde dann als neues Ereignis gewertet, wenn i) nach Abschluss einer mindestens 2 wöchigen Therapie einer KAI mindestens 2 weitere Wochen vergangen waren, d.h. mindestens vier Wochen nach dem vorangegangenen Ereignis, ii) oder vorher, wenn ein Wechsel im Infektionsstadium stattfand, dem

zwischenzeitlich ein negativer oder mit einem anderen Keim positiver Abstrich vorausging, iii) sowie jeder erste dokumentierte Befund der Katheteraustrittsstelle bei Studienbeginn.

#### 2.1.5. Katheterpflege und Therapie der Katheteraustrittsstelleninfektion

Die Katheteraustrittsstelle wurde alle 2 Tage beim Verbandswechsel mit 0.005% Na-Hypochlorid Lösung gesäubert. Zum Duschen verwendeten die Patienten Betaisodona-Seifenlösung (Mundipharma, Wien, Österreich). Weiterhin sollte der Katheter am Körper fixiert werden, um akzidentelle Mikrotraumen zu vermeiden.

Bei Katheteraustrittsstelleninfektionen Grad I wurde der Verbandswechsel zunächst täglich durchgeführt. Katheteraustrittsstelleninfektionen Grad II-IV wurden zweimal täglich lokal antiseptisch behandelt und verbunden. Eine antibiotische Therapie i.v. wurde bei Katheteraustrittsstelleninfektion Grad III und IV durchgeführt (Vancomycin, bei Erregernachweis nach Antibiogramm).

#### 2.1.6. Nasaless Trägertum von *Staphylococcus aureus*

Eine Mindestanzahl von 3 nasalen Abstrichen im Abstand von minimal 4 Wochen war Voraussetzung zur Definition des nasalen Trägerstatus. Gemäß Nachweisfrequenz von *S. aureus* in der Nase wurden die Patienten, die diese Voraussetzung erfüllten in 4 Gruppen unterteilt. Ein Patient wurde als chronischer nasaler *S. aureus* Träger bezeichnet, wenn mindestens zwei von drei aufeinander folgenden Nasenabstrichen positiv für diesen Keim waren. War diese Definition nicht erfüllt, der Keim aber mehr als einmal im Studienzeitraum nachgewiesen, galt dieser Patient als intermittierender Träger. Weiterhin gab es eine Gruppe mit einmaligem Nachweis von *S. aureus* in der Nase. Konnte zu keinem Zeitpunkt *S. aureus* in der Nase nachgewiesen werden, wurde der Patient als Nicht-

Träger definiert.

Eine intranasale antibakterielle Therapie wurde zu keinem Zeitpunkt durchgeführt.

## **2.2. Reagenzien, Zellkultur und Materialien**

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) wurde von Sigma (Deisenhofen) erworben, in einer Konzentration von 1mg/ml in Medium 199 ohne Phenolrot gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

Humanes Fibronectin wurde von Sigma bezogen, bei 4-8°C gelagert und für die jeweiligen Experimente in Phosphatpuffer (PBS 7,2) verdünnt.

Alle Zellkulturmedien waren von Bio Whittaker (Verviers, Belgien). Die Zusätze für das Medium der humanen Epithelzelllinie HEP-2 wurden von Sigma bezogen und bei -20°C aliquotiert aufbewahrt. Fetales Kälberserum kam von Gibco BRL.

Tryptic soy agar und Tryptic soy broth für die Bakterienkultur sowie bovines Serumalbumin waren von Sigma.

Kristallviolett und Methanol wurden von Merck (Darmstadt) erworben. Glutaraldehyd war von Fluko Bio Chemika (Buchs, Schweiz), wurde mit aqua dest zu einer 1,25% Lösung verdünnt und bei 4-8°C gelagert.

Soweit nicht anders vermerkt wurden alle Zell- und Bakterienkulturmaterialien von Sarstedt (Nürnbrecht) bezogen.

(methyl<sup>3</sup>H) Thymidine wurde von Amersham (Braunschweig, Liquid scintillation Cocktail (LSC Cocktail Hydroluma) von Baker (Deventer, Niederlande) bezogen.

Silikondialysekatheter (safe-lock-system) wurden freundlicherweise von Fresenius (Bad Homburg) zur Verfügung gestellt.

## **2.3. HEp-2 Zelllinie und Zellkultur**

Die humane Epithelzelllinie HEp-2 (American Type Culture Collection, ATCC: CCL 23) entstammt einem humanen Karzinom des Larynx (45). Die Bakterienadhärenz an HEp-2 Zellkulturen hat sich als *in vitro* Modell für die Interaktionen zwischen pro- und eukaryonten Zellen bewährt. Dabei können mit diesem Modell quantitative Unterschiede im Adhärenzverhalten einzelner Bakterienstämme differenziert werden (46, 65). Die Adhärenz bestimmter Bakterienstämme an HEp-2 Zellen gilt als Virulenzfaktor für Infektionen beim Menschen (13, 41).

Das Medium für die HEp-2 Zellen bestand aus Dulbecco's modified Eagle Medium, DMEM (4,5g Glucose/l) mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) und 1% Penicillin/Streptomycin. Die Zelllinie wurde in 75cm<sup>2</sup> Kulturflaschen in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C kultiviert und zweimal wöchentlich in einem Verhältnis von 1:4 subkultiviert.

Für die Adhärenzversuche wurden die Zellen in 96- Lochplatten, Falcon (Heidelberg) gesät (7,5-30.000) Zellen/Loch und bei 95% Luftfeuchte mit 5% CO<sub>2</sub> Gehalt über Nacht inkubiert, so dass für die Experimente konfluente Zellrasen zur Verfügung standen (mikroskopische Kontrolle). Das überschüssige Medium wurde nach der Inkubationszeit entfernt. Die Zellen wurden eine Stunde bei Raumtemperatur mit 1,25% Glutaraldehyd (100µl/Loch) fixiert und anschließend bis zum Verwendungstag bei 4-8°C aufbewahrt.

## **2.4. Bakterien**

### **2.4.1. Verwendete Stämme**

Für die Experimente wurden zwei gut charakterisierte *S. aureus* Stämme (ATCC 29213 und ATCC 25923) verwendet, die uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. Trautmann, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Ulm, zur Verfügung gestellt wurden. Die Patientenisolat wurden wie oben beschrieben (2.1.3.) von der

Katheteraustrittsstelle bzw. Nasenabstrichen gewonnen. Alle Bakterien wurden in einem Microbanksystem bei -20°C aufbewahrt.

Bei allen Experimenten wurden die Bakterien über Nacht auf Tryptic Soy agar angezüchtet, geerntet und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Mit Medium 199 ohne Phenolrot wurde eine Suspension mit der optischen Dichte von 1,0 bei 578 nm hergestellt. Dies entspricht einer Keimzahl von  $10^9$ /ml, wie in einer Verdünnungsreihe dokumentiert wurde. Für einige Experimente wurden Verdünnungen von dieser Suspension hergestellt.

## **2.5. Adhärenzbestimmung mittels MTT**

### **2.5.1. Kolorimetrischer Nachweis vitaler Bakterien mittels MTT**

Das farblose Tetrazoliumsalz MTT 3- ( (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) wird von aktiven Mitochondrien in der Atmungskette enzymatisch zu Formazankristallen gespalten (66) und ist somit für Vitalitätsbestimmungen geeignet. Die entstehenden Formazankristalle haben eine blaue Färbung, in Methanol gelöst können diese quantitativ kolorimetrisch als Extinktion in einem Plattenphotometer bestimmt werden.

Diese kolorimetrische Bestimmung hat sich zur Quantifizierung zelladhärenter Bakterien als geeignet erwiesen (46).

### **2.5.2. Intrinsische Spaltung von MTT**

Um darzustellen, dass Extinktionsunterschiede bei der kolorimetrischen Messung nicht auf Unterschieden im Spaltungsvermögen der einzelnen Bakterien beruht, sondern vitale Bakterien quantitativ nachweist, wurde die intrinsische Spaltungskapazität der Bakterien wie folgt erfasst. Die wie unter 2.4.1. beschriebenen hergestellten Bakteriensuspensionen wurden in

einer Konzentration von  $10^9$ /ml auf 96- Lochplatten (100 $\mu$ l/Loch) aufgetragen, die keine Epithelzellen enthielten. Dazu wurde MTT 1mg/ml Medium 199 ohne Phenolrot hinzugefügt. Nach 3h Inkubation bei 37°C wurden die Platten 10 min bei 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, der Überstand entfernt und die blauen Formazankristalle unter vorsichtigem Schütteln in 100% Methanol gelöst. Die Extinktion OD wurde bei 570 nm im Plattenphotometer (Behring EL 311) gemessen.

Dieser Versuch wurde modifiziert, um die Keimzahl/ Extinktionskorrelation für die Standardkeime ATCC 29213 und ATCC 25923 exemplarisch darzustellen. Hierfür wurde die Bakteriensuspension mit der optischen Dichte 1,0 bei 578 nm in Verhältnissen von 1:2- 1:1024 verdünnt und nach obigem Schema untersucht.

### 2.5.3. Bakterienadhärenz an HEp-2 Zellen

Vor den Adhärenzversuchen wurden die unter 2.3. beschriebenen vorbereiteten fixierten konfluenten Zellrasen dreimal mit PBS gewaschen und mit 2% bovinem Serum Albumin in PBS (100 $\mu$ l/Loch) für eine Stunde blockiert, um eine unspezifische Bindung von Bakterien zu verhindern (46). Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS folgte die Zugabe der Bakteriensuspensionen mit einer Konzentration von  $10^9$ /ml (100 $\mu$ l/Loch) der Patientenisolate sowie der Kontrollkeime ATCC 29213 und ATCC 25923. Als Kontrolle wurde Medium 199 ohne Phenolrot (100 $\mu$ l/Loch) verwendet. Die so beschickten Platten wurden 10 min bei 1000U/min zentrifugiert und anschließend für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Auswaschen (dreimal mit PBS) nicht adhärenter Bakterien wurde MTT 1mg/ml Medium 199 ohne Phenolrot hinzugefügt (100  $\mu$ l/Loch) und für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde 100% Methanol (100 $\mu$ l/Loch) hinzugefügt und die entstandenen Formazankristalle unter vorsichtigem Schütteln gelöst. Die Extinktion OD wurde bei 570 nm im Plattenphotometer gemessen.

Um die Abhängigkeit der adhärierenden Bakterienzahl von der HEp-2 Zellzahl auf der Zellkulturplatte und der Bakterienzahl in der Ausgangssuspension darzustellen, wurde der Versuch mit variiertes Zell- bzw. Bakterienzahl durchgeführt.

#### 2.5.4. Bakterienadhärenz an Silikon vermittelt durch Fibronectin

Die Adhärenz von *S. aureus* – exemplarisch der Standardkeime ATCC 29213 und 25923 - an Fibronectin, wurde mit Hilfe von Polystyrol cover beads (F.A.S.T.-plates, Falcon) untersucht. Hier ragen Deckelzapfen in die Löcher einer 96-Lochplatte, in die die Inkubationslösung eingegeben werden kann.

Die Deckelzapfen der Platten wurden über Nacht in die Fibronectinlösungen verschiedener Konzentrationen getaucht. Anschließend wurden die Zapfen dreimal in PBS gewaschen, um dann für zwei Stunden mit Bakteriensuspensionen in verschiedenen Verdünnungen (100µl/Loch) bei 37°C inkubiert zu werden. Als Kontrolle wurde Medium 199 ohne Phenolrot verwendet. Nach Abwaschen der nicht adhärenen Bakterien (dreimal mit PBS) wurden die Deckelzapfen in MTT 1 mg/ml in M199 ohne Phenolrot (100µl/Loch) getaucht und für 3h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Formazankristalle von den Deckelzapfen in 100% Methanol (100µl/Loch) unter vorsichtigem Schütteln gelöst. Die Extinktion wurde bei 570 nm im Plattenphotometer gemessen.

#### 2.5.5. Bakterienadhärenz an Peritonealdialysekathetern

Die original verpackten Peritonealdialysekatheterschläuche wurden unter sterilen Bedingungen in 1 cm große Stücke geschnitten und gewogen. Je ein Schlauchstück wurde in einer 24 Lochplatte (Falcon, Heidelberg) gegeben und mit Bakteriensuspensionen (1ml/Loch) verschiedener Konzentrationen des Kontrollkeimes ATCC 29213 für 2 h bei 37°C

inkubiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schlauchstücke gleichmäßig innen und außen mit Bakteriensuspension bedeckt waren. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Bestimmung der adhärenen Keime kolorimetrisch mittels MTT (2.5.3.)

## **2.6. Adhärenzbestimmung mittels Lichtmikroskopie**

Konfluente Zellrasen von HEp-2 Zellen (2.3.) wurden trypsiniert und zu einer Suspension von  $10^5$  Zellen/ml verdünnt. 100  $\mu$ l dieser Verdünnung wurden mit 100  $\mu$ l Bakteriensuspension der Patientenisolate variabler Konzentration 30 min auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mittels Cytospin auf Objektträger gebracht. Es erfolgte nach Lufttrocknung der Präparate eine Färbung nach Pappenheim mit May-Grünwald und Giemsa Lösung. Die adhärenen Bakterien an HEp-2 Zellen wurden bei 600-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop (Zeiss ID 03) ausgezählt. Zellkonglomerate sowie freiliegende Zellen wurden nicht gezählt. Die Zahl der ausgezählten HEp-2 Zellen betrug 100 pro Versuch pro Bakterienstamm.

## **2.7. Adhärenzbestimmung von radioaktiv markierten Bakterien an Peritonealdialysekathetern**

Für die radioaktiven Adhärenzexperimente wurden die Bakterien, in Anlehnung an Espersen et al., mit Tryptic soy broth (TSB) zu einer Suspension mit der optischen Dichte von 1,0 bei 578 nm eingestellt und mit 5  $\mu$ Ci 3H-thymin/4ml für 18h bei 37°C inkubiert (20). Die so radioaktiv markierte Suspension wurde 4:1 mit TSB ( $10^8$ /ml) verdünnt. Die Katheterschläuche wurden unter sterilen Bedingungen in 2,4 cm lange Stücke geschnitten, halbiert und der Länge nach geteilt. Jedes der vier Schlauchstücke wurde in je ein Loch einer 24-Lochplatte gegeben und mit der radioaktiv markierten Bakteriensuspension (1ml/Loch) drei Stunden bei

37°C inkubiert. Anschließend wurden die Schlauchstücke dreimal mit PBS gewaschen, um die nicht adhärenen Bakterien zu entfernen. Jedes Schlauchstück wurde anschließend in 8 ml Liquid Scintillation cocktail (LSC) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Die schlauchgebundene Radioaktivität wurde in einem Szintillationszähler bestimmt. Die dargestellten Daten stellen jeweils den Mittelwert der vier einzelnen Katheterstücke dar.

## **2.8. Statistik**

Klinische Daten: Für den statistischen Vergleich der verschiedenen Patientengruppen wurde der Sokal2-test (67) angewendet.

Experimentelle Daten: Für jeden Versuch wurden Mittelwert, Standardabweichung, Median und das 95% Vertrauensintervall bestimmt. Jeder Versuch wurde mindestens dreimal an je unterschiedlichen Versuchstagen durchgeführt. Bei den Versuchen mit radioaktiven Materialien war dies nicht möglich, die Zahl der Versuche ist im Ergebnisteil genannt. Der statistische Vergleich unabhängiger Stichproben erfolgte mit Hilfe des U-testes von Wilcoxon, Mann und Whitney (61). Unterschiede wurden als signifikant gewertet wenn  $p < 0,05$  war.

Die Adhärenz (X) der Patientenisolate (gemessene Extinktion bei 570 nm) in den kolorimetrischen MTT Experimenten wurde an jedem der drei Versuchstage (1-3) simultan mit dem Kontrollkeim ATCC 29213 gemessen und in die statistische Analyse mit eingeschlossen. Somit war es möglich, eine relative Adhärenz Q zum Kontrollkeim ATCC 29213 zu bestimmen und die Experimente der verschiedenen Versuchstage untereinander vergleichbar zu machen. Diese relative Adhärenz wurde folgendermaßen berechnet:

$$Q = [X \text{ Patientenisolate}(1-3) - X \text{ ATCC 29213}(1-3)] : X \text{ ATCC 29213 (1-3)}$$

Diese Berechnung erfolgte auf Grundlage einer biometrischen Beratung im

Institut für medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Demographische Daten der Patienten

Es konnten insgesamt 72 CAPD Patienten aus den Peritonealdialyseambulanzen Berlin / Lübeck aufgenommen werden. Es gab keine Aufnahmeeinschränkung aufgrund von Alter, Geschlecht, Grunderkrankungen oder vorangegangener Nierenersatztherapie. Die demographischen Daten der Patienten sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

*Tab. 2: Demographische Daten der in die Studie aufgenommenen Patienten*

<sup>a</sup> Jahre, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung zu Beginn der Studie, Altersverteilung: 12-84 Jahre.

<sup>b</sup> Monate, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, <sup>c</sup> Monate.

	<b>Gesamt</b>	<b>Weiblich</b>	<b>Männlich</b>
<b>Anzahl (%)</b>	72 (100)	29 (40,3)	43 (59,7)
<b>Alter <sup>a</sup></b>	50,0 $\pm$ 16,0	53,3 $\pm$ 15,0	48,2 $\pm$ 16,4
<b>Diabetiker (%)</b>	18 (25)	6 (20,7)	12 (27,9)
<b>Dauer der CAPD <sup>b</sup></b>	23 $\pm$ 17,8	23,6 $\pm$ 19,1	22,7 $\pm$ 18,1
<b>Studienzeitraum <sup>b</sup></b>	8,9 $\pm$ 7,3	8,0 $\pm$ 7,5	9,2 $\pm$ 7,2
<b>Kumulativer Studienzeitraum <sup>c</sup></b>	645	233	412

### **3.2. Besiedlung der Katheteraustrittsstelle**

#### **3.2.1. Mikrobiologische Befunde der Katheteraustrittsstellen- Abstriche**

Alle Abstriche der Katheteraustrittsstelle wurden ohne Berücksichtigung des klinischen Infektionsgrades abgenommen. Ein positives Kulturergebnis wurde mit einer Besiedlung der Katheteraustrittsstelle durch diese Bakterien gleichgesetzt. Von insgesamt 378 Abstrichen der Katheteraustrittsstelle wurden 99 (26%) als keimpositiv und 279 (74%) als keimnegativ identifiziert. In den Fällen einer schweren Infektion der Katheteraustrittsstelle (Grad III und IV) waren 7 von 13 (54%) Abstrichen positiv (Grad III 44%, Grad IV 75%), während bei keiner Infektion (Grad 0) und Infektionsgraden I/II insgesamt 92 von 365 (25%) Abstrichen keimpositiv waren ( $p < 0,05$ ). Die Isolationshäufigkeit von Keimen an der Katheteraustrittsstelle war bei klinisch schwerstwiegenden Infektionen (Grad III/IV) somit signifikant erhöht (Tabelle 3).

Die jedoch nicht geringe Anzahl der kulturell negativen Abstriche bei Grad III/IV (6 von 13; 46%) könnte durch technische Bedingungen wie Transport, fehlerhafte Abstrichtechnik oder Selbstbehandlung der Patienten bedingt sein.

*Tab. 3: Mikrobiologische Befunde der Katheteraustrittsstellen- Abstriche (n gesamt =378), differenziert nach bakteriellem Wachstum (positiv, negativ) und dem Infektionsgrad der Katheteraustrittsstelle (KAI, 0-IV). Anzahl der Abstriche absolut und in Prozent (%), \* p<0,05 Signifikanz zu KAI Grad 0, I, II.*

<b>KAI Grad</b>	<b>Bakterielles Wachstum (%)</b>		
	<i>Positiv</i>	<i>Negativ</i>	<i>Gesamt</i>
<b>0</b>	47 (25)	141 (75)	188 (100)
<b>I</b>	31 (26)	90 (74)	120 (100)
<b>II</b>	14 (25)	43 (75)	57 (100)
<b>III</b>	4* (44)	5 (55)	9 (100)
<b>IV</b>	3* (75)	1 (25)	4 (100)
<b>Gesamt</b>	99 (26)	279 (74)	378 (100)

### 3.2.2. Mikrobiologische Differenzierung der keimpositiven Katheteraustrittsstellen- Abstriche

Die mikrobiologisch positiven Abstriche der Katheteraustrittsstelle wurden einer weiteren bakteriologischen Differenzierung unterzogen (siehe 2.1.3.). Bei 25 der 99 (25%) kulturell positiven Abstrichen der Katheteraustrittsstelle konnte *S. aureus* identifiziert werden.

Eine Differenzierung der Abstrichergebnisse nach dem Infektionsgrad der Katheteraustrittsstelle (Grad 0-IV) ergab einen signifikant höheren Anteil *S. aureus* positiver Abstriche in der Gruppe mit schwerwiegenden und schwerstwiegenden Katheteraustrittsstelleninfektionen (Grad II-IV). Bei mikrobiologisch positiven Abstrichen mit Infektionsgrad II-IV konnte in 10 von 21 Abstrichen *S. aureus* isoliert werden, wohingegen sich bei 78 keimpositiven Abstrichen mit Infektionsgrad 0-I in 15 Abstrichen *S. aureus* positive Kulturen fanden ( $p < 0,05$ ).

Die Isolationswahrscheinlichkeit von *S. aureus* stieg folglich mit dem klinischen Schweregrad einer Katheteraustrittsstelleninfektion (Tabelle 4).

Tab. 4: Differenzierung der keimpositiven Katheteraustrittsstellen Abstriche (n=99) in *S. aureus* positive und andere Keime; gesamt und in Relation zum Grad der Katheteraustrittsstelleninfektion (KAI, 0-IV). Anzahl der Abstriche absolut und in Prozent (%). \* p<0,05 Signifikanz zu KAI Grad 0, I.

<b>KAI</b>	<b>Keimpositive Abstriche %</b>		
	<i>S. aureus</i>	andere	gesamt
<b>0</b>	9 (19)	38 (81)	47 (100)
<b>I</b>	6 (19)	25 (81)	31 (100)
<b>II</b>	7* (50)	7 (50)	14 (100)
<b>III</b>	1* (25)	3 (75)	4 (100)
<b>IV</b>	2* (75)	1 (25)	3 (100)
<b>Gesamt</b>	25 (25)	74 (75)	99 (100)

### 3.3. Besiedlung der Nase

#### 3.3.1. Mikrobiologische Befunde der Nasen-Abstriche

Von insgesamt 378 Nasenabstrichen waren 73 (19,3%) positiv für *S. aureus*, 245 (64,8%) positiv für andere Keime (hauptsächlich koagulasenegative Staphylokokken) und 60 mikrobiologisch negativ (15,8%).

#### 3.3.2. Nasale Besiedlung im Vergleich zur Besiedlung der Katheteraustrittsstelle am selben Tag

Bei den 73 nasalen Abstrichen, die für *S. aureus* positiv waren, war die Katheteraustrittsstelle in 16 Ereignissen für *S. aureus* am selben Tag positiv (21,9 %). In 5 dieser 73 Ereignisse (7%), lag ein Infektionsstadium III / IV vor. Bei einem mikrobiologisch negativen Nasenabstrich oder einem für andere Keime positivem Befund lag der Infektionsgrad der Katheteraustrittsstelle in 8 / 305 Fällen (4%) bei einem Stadium III / IV ( $p > 0,05$ ).

Dies zeigt, dass die nasale Besiedlung von *S. aureus* am gleichen Tag nicht gehäuft bei Patienten mit Katheteraustrittsstelleninfektionsstadium III-IV vorkommt, deren Infektion durch *S. aureus* verursacht wird.

Auch bei Patienten, bei denen eine Infektion der Katheteraustrittsstelle Grad II-IV vorlag, die nicht durch *S. aureus* hervorgerufen worden war, fand sich häufig *S. aureus* im Nasenabstrich (57/353; 16,1%). Außerdem war in 63/73 Fällen, in denen die Nase mit *S. aureus* besiedelt war, die Katheteraustrittsstelle nicht behandlungsbedürftig (Stadium 0 / I) infiziert. Hieraus lässt sich ableiten, dass ein einzelner nasaler *S. aureus* Nachweis nicht die Morbidität für eine gleichzeitige schwere Infektion der Katheteraustrittsstelle erhöht.

Eine detaillierte Differenzierung der nasalen Besiedlung im Vergleich zur Besiedlung der Katheteraustrittsstelle und deren Infektionsgrad am selben Tag zeigt Tabelle 5.

*Tab. 5: Mikrobiologische Differenzierung der nasalen Besiedlung im Vergleich zur Besiedlung Katheteraustrittsstelle (keimnegativ, andere Keime, S. aureus) und deren Infektionsgrad (KAI, 0-IV) am selben Tag. n= Anzahl der Abstriche gesamt beim jeweiligen Besiedlungsbefund. Befunde absolut und in Prozent (%).*

Katheteraustrittsstelle		Nasale Besiedlung (%)		
<i>KAI</i>	<i>keimnegativ</i>	<i>S. aureus</i>	<i>andere Keime (nicht S. aureus)</i>	<i>keimnegativ</i>
0	(n=144)	28 (19,4)	94 (65,3)	22 (15,3)
I	(n=90)	13 (14,4)	63 (70)	14 (15,6)
II	(n=39)	2 (5,1)	28 (71,8)	9 (29,1)
III	(n=5)	1 (20)	3 (60)	1 (20)
IV	(n=1)	0 (0)	0 (0)	1(100)
<i>Gesamt</i>	<i>(n=279)</i>	<i>44 (15,7)</i>	<i>188 (67,4)</i>	<i>47 (16,8)</i>
<i>KAI</i>	<i>andere Keime (nicht S. aureus)</i>	<i>S. aureus</i>	<i>andere Keime</i>	<i>Keimnegativ</i>
0	(n=38)	6 (15,7)	27 (71,1)	5 (13,2)
I	(n=25)	6 (24)	13 (52)	6 (24)
II	(n=7)	0 (0)	6 (85,7)	1 (14,3)
III	(n=3)	1 (33)	2 (67)	0 (0)
IV	(n=1)	0 (0)	1 (100)	0 (0)
<i>gesamt</i>	<i>(n=74)</i>	<i>13 (17,5)</i>	<i>49 (66,2)</i>	<i>12 (16,2)</i>
<i>KAI</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Andere</i>	<i>Negativ</i>
0	(n=9)	6 (66,6)	2 (22,2)	1 (11,1)
I	(n=6)	4 (66,6)	2 (33,3)	0 (0)
II	(n=7)	3 (42)	4 (58)	0 (0)
III	(n=1)	1 (100)	0 (0)	0 (0)
IV	(n=2)	2 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>gesamt</i>	<i>(n=25)</i>	<i>16 (64)</i>	<i>8 (32)</i>	<i>1 (4)</i>
<b><i>Gesamt</i></b>	<b><i>(n=378)</i></b>	<b><i>73 (19,3)</i></b>	<b><i>245 (64,8)</i></b>	<b><i>60 (15,8)</i></b>

### 3.3.3. Nasales Trägertum von *Staphylococcus aureus*

Mindestens drei Abstriche von Nase und Katheteraustrittsstelle im Abstand von jeweils mindestens vier Wochen waren notwendig, um einen nasalen Trägerstatus zu ermitteln. 41 der 72 Studienpatienten erfüllten diese Voraussetzung. Um zu untersuchen, ob mittels einer modifizierten nasalen *S. aureus* Trägerdefinition eine klinische Risikostratifizierung für konsekutive Katheteraustrittsstelleninfektion möglich ist, wurden die Patienten mit nasaler *S. aureus* Nachweis in folgende Untergruppen aufgeteilt:

- Chronische *S. aureus* Träger (mindestens zwei von drei aufeinander folgenden Nasenabstrichen waren positiv für *S. aureus*)
- Intermittierende Träger (mindestens zweimaliger *S. aureus* Nachweis, jedoch chronische Trägerdefinition nicht erfüllt)
- Einmalige Träger (einmaliger *S. aureus* Nachweis).

Hieraus ergab sich eine Vergleichsmöglichkeit von chronischen, intermittierenden und einmaligen Trägern von *S. aureus* gegenüber Patienten, bei denen dieser Keim niemals in der Nase nachgewiesen wurde (Nicht-Träger).

13 Patienten konnten als chronische nasale Träger von *S. aureus* identifiziert werden, 3 Patienten waren intermittierende Träger und bei 6 Patienten wurde *S. aureus* einmalig aus dem Nasenabstrich isoliert. Bei 19 Patienten konnte niemals *S. aureus* in der Nase nachgewiesen werden, sie wurden als Nicht-Träger bezeichnet.

Der kumulative Beobachtungszeitraum der 41 Patienten betrug 599 Monate (Tabelle 6)

Tab 6: nasaler S. aureus Trägerstatus und Beobachtungsdauer angegeben in Monaten (m), kumulativ, Mittelwert und Verteilung.

Trägerstatus	Beobachtungsdauer (m)		
	Kumulativ	Mittelwert	Verteilung
<b>Chronisch (n=13)</b>	164	12,6	6-21
<b>Intermittierend (n=3)</b>	63	21	15-24
<b>Einmalig (n=6)</b>	94	15,7	6-21
<b>Niemals (n=19)</b>	278	14,6	6-24

#### 3.3.4. Nasales Trägertum von *Staphylococcus aureus* und Infektion der Katheteraustrittsstelle

Insgesamt, also unabhängig vom Erreger, unterschied sich die Inzidenz für Besiedlung/Infektionen der Katheteraustrittsstelle (KAI/Patient/Jahr) bei chronischen nasalen *S. aureus* Trägern gegenüber Patienten bei denen *S. aureus* nie nachgewiesen wurde nicht (7,985 Episoden/Patient/Jahr versus 6,878, nicht signifikant). Dies zeigte sich auch bei Differenzierung nach Schweregraden (KAI 0-IV). Chronische Träger von *S. aureus* erlitten nicht signifikant unterschiedlich eine schwere Katheteraustrittsstelleninfektion Grad II-IV als Nicht-Träger (Tabelle 7).

Tab. 7: nasaler Trägerstatus und Inzidenz von Katheteraustrittsstelleninfektionen ( KAI / Patient / Jahr) gesamt, unterteilt nach klinischen Schweregraden der Katheteraustrittsstelleninfektion (KAI 0-IV); n= Patientenzahl.

Nasaler <i>S. aureus</i> Nachweis	Katheteraustrittsstelleninfektion Episode/Patient/Jahr		
	Grad 0-I	Grad II-IV	Gesamt Grad 0-IV
<b>Chronisch (n=13)</b>	7,032	0,89	7,985
<b>Intermittierend (n=3)</b>	3,428	4	7,428
<b>Einmalig (n=6)</b>	5,350	0,127	6,24
<b>Niemals (n=19)</b>	5,494	1,537	6,878

Für die Inzidenz *S. aureus* bedingter Katheteraustrittsstelleninfektionen zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied beim Vergleich zwischen chronischen nasalen Trägern und Nicht-Trägern. Chronisch nasale Träger erkrankten signifikant häufiger an einer *S. aureus* bedingten Katheteraustrittsstelleninfektion als Nicht-Träger (1,172 Episoden/Patient/Jahr versus 0,043;  $p < 0,05$ ). Die Inzidenz einer *S. aureus* bedingten Katheteraustrittsstellen Besiedlung/Infektion war bei chronischen Trägern damit über 20-fach erhöht.

Bei intermittierenden nasalen *S. aureus* Trägern, konnte gegenüber Nicht-Trägern keine signifikante Häufung von *S. aureus* bedingten Katheteraustrittsstelleninfektionen festgestellt werden. Dies gilt ebenso für den einmaligen Nachweis von *S. aureus* aus der Nase.

Nur chronische nasale *S. aureus* Träger erlitten also signifikant gehäuft *S. aureus* bedingte Katheteraustrittsstelleninfektionen. Die Unterteilung nach Infektionsgraden hob diesen Unterschied noch deutlicher hervor, die Inzidenz einer *S. aureus* bedingten Katheteraustrittsstelleninfektion bei Grad II-IV betrug 0,586 Episoden/Patient/Jahr versus 0 bei den Nicht-Trägern ( $p < 0.05$ ).

Einen Überblick über die Beziehung von *S. aureus* Trägerstatus und Infektionsinzidenz gibt Tabelle 8.

Tab. 8: *nasaler Trägerstatus und Inzidenz von S. aureus bedingten Katheteraustrittsstelleninfektionen (KAI / Patient / Jahr) differenziert nach dem klinischem Schweregrad (KAI 0-IV); n= Patientenzahl. \*: p< 0,05 für chronische Träger versus Nicht- Träger*

<b>Nasaler S. aureus Nachweis</b>	<b>Katheteraustrittsstelleninfektion/Jahr/Patient</b>					
	<b>S. aureus positiv</b>			<b>S. aureus negativ</b>		
	<b>Grad 0-I</b>	<b>Grad II-IV</b>	<b>Grad 0-IV</b>	<b>Grad 0-I</b>	<b>Grad II-IV</b>	<b>Grad 0-IV</b>
<b>Chronisch (n=13)</b>	0,586	0,586*	1,172*	6,446	0,366	6,813
<b>Intermittierend (n=3)</b>	0,190	0	0,190	3,238	4	7,238
<b>Einmalig (n=6)</b>	0,127	0,127	0,255	5,350	0,764	5,987
<b>Niemals (n=19)</b>	0,043	0*	0,043*	5,451	1,341	6,835

Insgesamt gab es 20 *S. aureus* positive Episoden einer Katheteraustrittsstelleninfektion, davon fanden 16 bei chronischen Trägern statt. 80% dieser Episoden fanden also bei chronischen Trägern statt.

Von 9 schweren Katheteraustrittsstelleninfektionen mit positivem *S. aureus* Nachweis (Grad II-IV) waren 8 bei chronischen Trägern (88,9 % versus 11,1% bei Nicht- Trägern)

Von insgesamt 13 chronischen Trägern fand sich die Katheteraustrittsstelle bei 6 Patienten mit *S. aureus* besiedelt, dagegen zeigten nur einer von 19 Nicht-Trägern eine *S. aureus* positive Episode. Die Wahrscheinlichkeit an einer *S. aureus* positiven Katheteraustrittsstelleninfektion zu erkranken betrug für die Gruppe der chronischen Träger 46% versus 5,2% bei Nicht-Trägern.

In Tabelle 9 sind die *S. aureus* positiven Episoden von Katheteraustrittsstelleninfektionen differenziert nach Trägerstatus und Schweregrad der Infektion dargestellt.

*Tab. 9: Nasaler S. aureus Trägerstatus, Anzahl der Patienten gesamt der jeweiligen Trägerkategorie und Anzahl der Patienten, bei denen innerhalb dieser Trägerkategorie S. aureus an der Katheteraustrittsstelle (KA) nachgewiesen wurde. Sowie die Anzahl der S. aureus positiven Katheteraustrittsstelleninfektionen, differenziert nach Infektionsgrad (KAI 0-IV) in der jeweiligen Patienten-kategorie.*

Nasaler Trägerstatus	Chronisch	Intermittierend	Einmalig	Nicht-Träger	gesamt
<i>Patienten</i>	13	3	6	19	41
<i>Patienten mit S. aureus Nachweis an der KA</i>	6	1	1	1	9
<i>S. aureus KAI gesamt</i>	16	1	2	1	20
<i>0-I</i>	8	1	1	1	11
<i>II-IV</i>	8	0	1	0	9

### 3.3.5. Diabetes mellitus und *Staphylococcus aureus* Besiedlung

Insgesamt waren 25 der 72 Studienpatienten Diabetiker (Typ I + II), es ergab sich für diese Patienten weder eine gehäufte Besiedlung der Katheteraustrittsstelle mit Bakterien insgesamt, noch eine gehäufte Besiedlung mit *S. aureus*.

Von den 41 Patienten für die ein differenzierter nasaler *S. aureus* Status erhoben werden konnte waren 12 Diabetiker (Typ I + II). Diabetiker hatten kein erhöhtes Risiko für chronisches nasales *S. aureus* Trägertum. Von 12 Diabetikern waren 4 chronische nasale *S. aureus* Träger (33,3%), im Vergleich zu Nichtdiabetikern (n=29), von denen 9 chronische nasale Träger für *S. aureus* waren (31,03%),  $p > 0,05$ , nicht signifikant).

## 3.4. Kolorimetrische Adhärenzbestimmung mittels MTT

### 3.4.1. Intrinsische Spaltung von MTT

Für die *in vitro* Zelladhärenzbestimmung wurde ein Zelladhärenzassay mit kolorimetrischer Quantifizierung entwickelt (siehe 2.5.).

Hierfür wurde zunächst die Fähigkeit von zwei *S. aureus* Stämmen getestet MTT zu spalten. Bakteriensuspensionen der Standardkeime ATCC 29213 und 25923 wurden in verschiedenen Konzentrationen (Ausgangssuspension war in der Konzentration von  $10^9$ /ml) mit MTT 1mg/ml (jeweils 100 $\mu$ l/Loch) für drei Stunden inkubiert. Dabei konnte in wiederholten Experimenten gezeigt werden, dass das Spaltungsvermögen von MTT der beiden Standardkeime sich nicht signifikant voneinander unterschied,  $p > 0,05$ . (Tabelle 10)

*Tab. 10: Spaltungsvermögen von MTT der Standardkeime ATCC 29213 und ATCC 25923 im Vergleich zueinander und in verschiedenen Verdünnungsstufen. Verdünnungsstufe 1:1 entspricht der Ausgangssuspension mit einer Keimzahl von  $10^9$ /ml. Kontrolle (K), n= Anzahl der parallelen Messungen, Mittelwerte (MW), Standardabweichung (SD). Extinktion OD gemessen bei 570nm.*

		Verdünnungsstufe						
		1:1 n=8	1:2 n=8	1:4 n=8	1:8 n=8	1:16 n=8	1:32 n=8	K n=8
<b>ATCC29213</b>	MW	2,221	1,884	1,422	0,833	0,371	0,177	0,076
	SD	0,13	0,1	0,14	0,07	0,04	0,007	0,003
<b>ATCC25923</b>	MW	2,338	1,876	1,079	0,53	0,334	0,299	0,065
	SD	0,16	0,2	0,1	0,05	0,006	0,02	0,003

Es zeigte sich jedoch, dass die gemessenen Extinktionen für den jeweiligen Bakterienstamm zwischen den einzelnen Versuchstagen variierte (Tabelle 11). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Spaltungsvermögen der Keime zueinander nicht signifikant variierte und damit unabhängig war vom Staphylokokkentyp, sich jedoch an den einzelnen Versuchstagen unterschied.

Um die folgenden Experimente mit den Patientenisolaten an den verschiedenen Untersuchungstagen miteinander vergleichbar zu machen, wurden die beiden Standardkeime bei jedem Versuchsansatz mitgemessen und dann eine relative Adhärenz errechnet (2.8.).

Tab. 11: MTT Spaltung der Standardkeime ATCC 29213 und 25923 (Keimkonzentration  $10^9$ /ml) an 3 verschiedenen Versuchstagen, n=Anzahl der parallelen Messungen, Mittelwerte (MW) +/- Standardabweichung (SD). Gemessene Extinktion OD bei 570nm.

	Versuch 1 n=8	Versuch 2 n=8	Versuch 3 n=8
	MW +/- SD	MW +/- SD	MW +/- SD
ATCC 29213	2,221+/-0,13	1,11+/-0,06	1,884+/-0,1
ATCC 25923	2,238+/-0,16	1,282+/-0,11	1,876+/-0,2

#### 3.4.2. Quantifizierung von *Staphylococcus aureus* mittels MTT

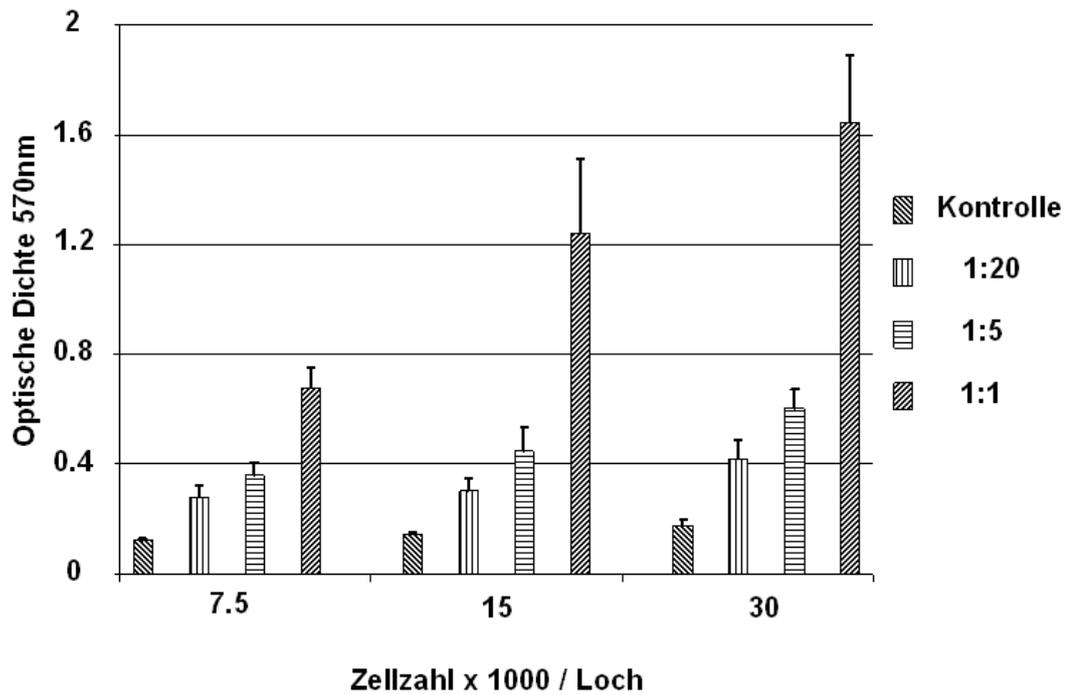
Um die Keimzahl / Extinktionskorrelation für die Kontrollkeime ATCC 25923 und ATCC 29213 darzustellen, wurden Keimsuspension in eine Keimkonzentration von  $10^9$ /ml) in Stufen von 1:1 bis 1:1024 verdünnt und mit MTT (1mg/ml) für 3h inkubiert.

Es konnte eine Keimzahl/Extinktionskorrelation für die Verdünnungen 1:1 bis 1:256 gezeigt werden. Höhere Verdünnungen entsprachen dem Kontrollwert (nicht abgebildet). Der Versuchsaufbau zeigte sich damit zur zuverlässigen Quantifizierung von Staphylokokken als geeignet.

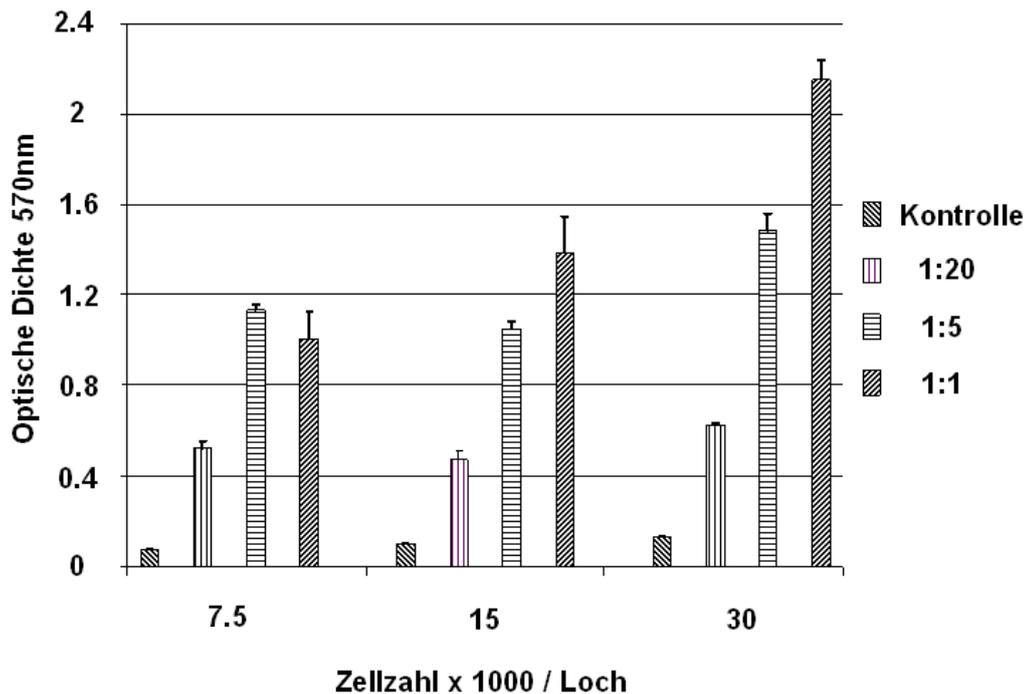
### 3.4.3. Adhärenz der Kontrollkeime ATCC 29213 und ATCC 25923 an HEp-2 Zellen

Zur Darstellung der Abhängigkeit der adhärierenden Keimzahl von der Zell- bzw. Keimzahl, wurde eine Bakterienadhärenzmessung mit variiertes Zell- bzw. Keimzahl durchgeführt.

Die Adhärenz der *S. aureus* Stämme ATCC 29213 und 25923 an HEp-2 Zellen war sowohl von der eingesäten Zell- bzw. inkubierten Bakterienzahl abhängig. Je niedriger die eingesäte Zell- bzw. inkubierte Bakterienzahl war, desto niedriger war die gemessene Extinktion. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle fanden sich für die Bakterienadhärenz bis zu einer Verdünnung von 1:20 der ursprünglichen Keimkonzentration von  $10^9$ /ml (siehe Abbildung 1 für *S. aureus* ATCC 29213, Abbildung 2 für *S. aureus* ATCC 25923). Für die weiteren Unterschiedsmessungen im Adhärenzverhalten erwies sich eine eingesäte Zellzahl von 30.000/Loch und eine inkubierte Keimzahl von  $10^9$ /ml als am günstigsten.



*Abb. 1: Einfluss von variierter Zellzahl (7.5-30x10<sup>3</sup>/Loch) und Keimzahl (1:1, 1:5, 1:20; Verdünnungsstufe 1:1 entspricht der Ausgangssuspension mit einer Keimzahl von 10<sup>9</sup>/ml) auf die Adhärenz von Standardkeim ATCC 29213 an HEp-2 Zellen. Mittelwerte +/- Standardabweichung. Anzahl der parallelen Messungen n=8, Extinktion OD gemessen bei 570 nm.*



*Abb. 2: Einfluss von variiertes Zellzahl ( $7.5-30 \times 10^3/\text{Loch}$ ) und Keimzahl (1:1, 1:5, 1:20; Verdünnungsstufe 1:1 entspricht der Ausgangssuspension mit einer Keimzahl von  $10^9/\text{ml}$ ) auf die Adhärenz von Standardkeim ATCC 25923 an HEP-2 Zellen. Mittelwerte +/- Standardabweichung. Anzahl der parallelen Messungen  $n=8$ , Extinktion OD gemessen bei 570 nm.*

Weiterhin konnten wiederholbare signifikante Unterschiede in dem Adhärenzverhalten der beiden Standardkeime zueinander festgestellt werden. ATCC 29213 zeigte niedrige, ATCC 25923 hohe Adhärenz zu HEP-2 Zellen (Tabelle 12). Daher wurden beide Stämme zu vergleichenden Zwecken mit in die Adhärenzversuche der Patientenisolate mit einbezogen.

Tab. 12: Adhärenz der Standardkeime ATCC29213 und 25923 an HEp-2 Zellen ( $30 \times 10^3$ /Loch) an drei verschiedenen Versuchstagen, n= Anzahl der parallel gemessenen Ansätze, gemessene Extinktion OD bei 570 nm, Mittelwert (MW)+/- Standardabweichung (SD).

	Versuch 1 n=8	Versuch 2 n=8	Versuch 3 n=8
	MW +/- SD	MW +/- SD	MW +/- SD
ATCC 29213	1,648+/-0,24	0,316+/-0,013	0,704+/-0,15
ATCC 25923	2,149+/-0,09	0,654+/-0,029	1,432+/-0,07

#### 3.4.4. Adhärenz der Patientenisolate an HEp-2 Zellen

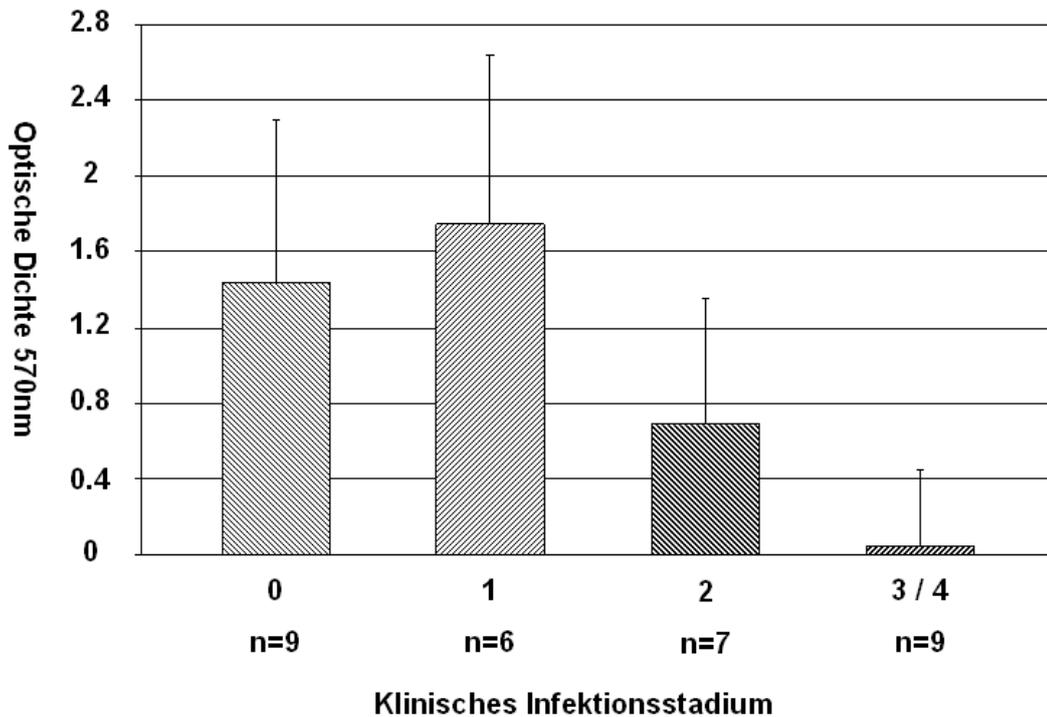
##### 3.4.4.1. Beziehung der Adhärenz der Katheteraustrittsstellenisolate zum Infektionsgrad am gleichen Tag

Gemäß der Fragestellung dieser Studie wurde die Adhärenz aller klinischen *S. aureus* Isolate der Katheteraustrittsstellen an HEp-2 Zellen im beschriebenen MTT-Assay untersucht. Für die statistischen Vergleiche wurde eine relative Adhärenz aus den drei Versuchstagen zu dem Standardkeim ATCC 29213 berechnet (2.8.)

Es konnte keine positive signifikante Korrelation zwischen der Adhärenz an HEp-2 Zellen *in vitro* und dem klinischen Infektionsstadium *in vivo* gezeigt werden. Großes Adhärenzvermögen fand sich sowohl bei den Isolaten von nicht oder wenig entzündeten, als auch von stark entzündeten Katheteraustrittsstellen, so dass die Adhärenz der klinischen Isolate vom Katheteraustrittsstelle an HEp-2 Zellen, gemessen im MTT-Assay, nicht mit einer gesteigerten inflammatorischen Reaktion *in vivo* assoziiert ist. Das Adhärenzvermögen der Patientenisolate ließ somit keine signifikante

Aussage über die katheterassoziierte Morbiditätsrate der Patienten zu.

Dagegen konnte mit Zunahme des klinischen Infektionsgrades der Katheteraustrittsstelle eine tendenzielle, nicht signifikante, Abnahme der Adhärenz der Isolate an HEp-2 Zellen beobachtet werden (Abbildung 3).



*Abb. 3: Relative Adhärenz von S. aureus Isolaten gewonnen von der Katheteraustrittsstelle (n=Anzahl Isolate) in Abhängigkeit zum klinischen Infektionsstadium (KAI 0-IV). Mittelwerte der relativen Adhärenz der jeweiligen Isolate in einer Gruppe +/- Standardabweichung.*

### 3.4.4.2. Beziehung der Adhärenz nasaler *Staphylococcus aureus* Isolate zum Infektionsstadium

Die nasalen Isolate wurden ebenfalls bezüglich ihres Adhärenzverhaltens an HEp-2 Zellen untersucht. Es wurden jedoch nur die Isolate getestet, bei denen die Katheteraustrittsstelle am selben Tag für *S. aureus* positiv war (n=16). Auch hier konnte keine Korrelation zwischen der relativen Adhärenz (berechnet aus den 3 Versuchstagen, siehe 2.8.) der nasalen Isolate *in vitro* und den klinischen Infektionsstadien gezeigt werden (Abbildung 4).

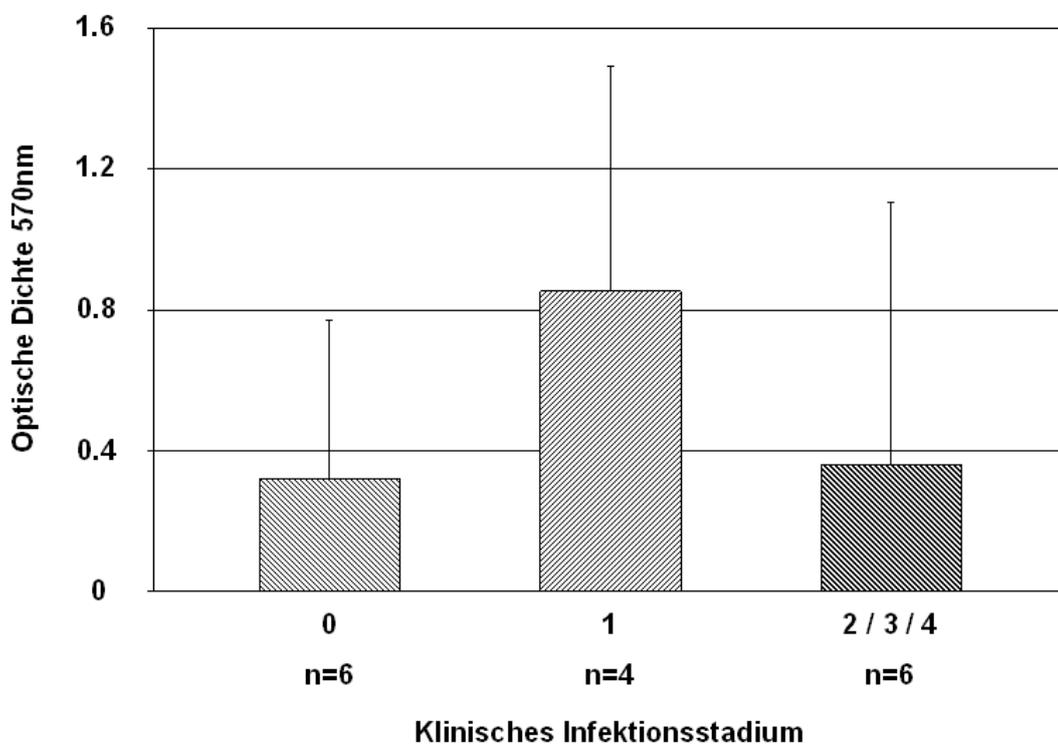
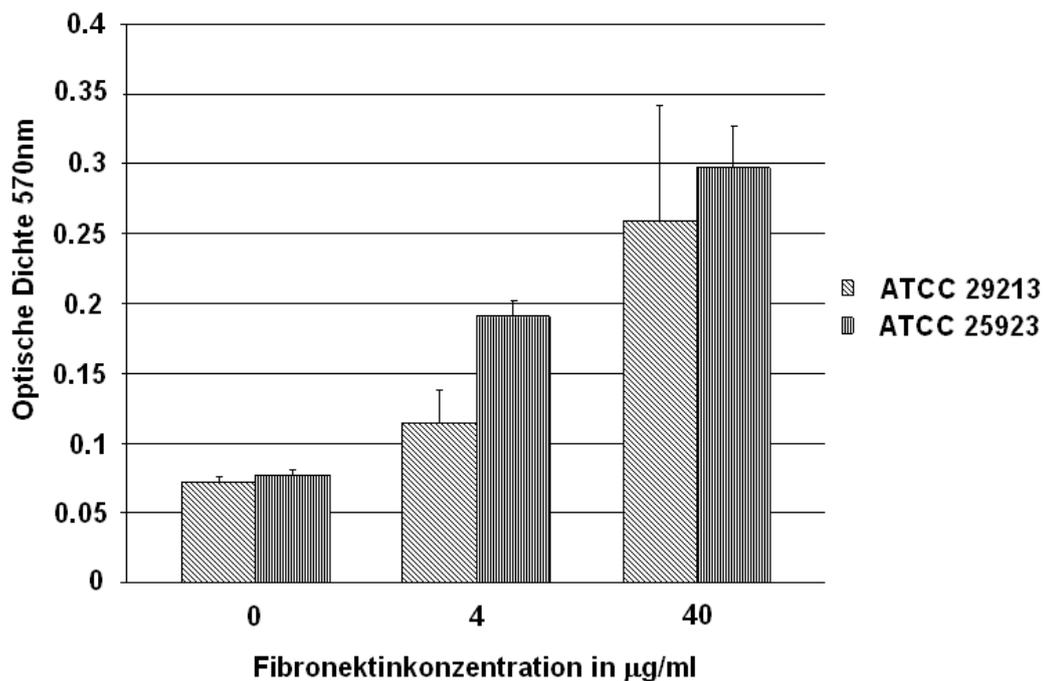


Abb. 4: Relative Adhärenz von nasalen *S. aureus* Isolaten (n= Anzahl der Isolate) in Abhängigkeit zum klinischen Infektionsstadium (KAI 0-IV). Mittelwerte der relativen Adhärenz der jeweiligen Isolate in einer Gruppe +/- Standardabweichung.

### 3.4.5. Bakterienadhärenz vermittelt durch Fibronektin

FAST- Zapfenplatten wurden mit Fibronektin beschichtet und anschließend mit den Standardkeimen ATCC 29213 und 25923 inkubiert.

Wie unten dargestellt steigerte Fibronektin die Adhärenz von beiden Standardkeimen signifikant gegenüber der Kontrolle (Abbildung 5). Die Adhärenz war dabei ebenso abhängig von der inkubierten Keimzahl (ohne Abbildung).



*Abb. 5: Adhärenz der Standardkeime ATCC 25923 und ATCC 29213 an Fibronektin in verschiedenen Konzentrationen (µg/ml) bei konstanter Keimzahl  $10^9$ /ml). Anzahl der parallelen Messungen/Ansatz 8, Extinktion OD gemessen bei 570 nm. Mittelwerte +/- Standardabweichung.  $p < 0,05$  Signifikanz für beide Standardkeime bei Fibronektinkonzentration  $40 \mu\text{g/ml}$  gegenüber der Kontrolle (ohne Fibronektin).*

#### 3.4.6. Bakterienadhärenz an Peritonealdialysekathetern

Da Bakterienadhärenz an Kathetermaterial einen wichtigen Schritt in der Pathogenese von katheterassoziierten Infektionen darstellt wurde versucht, das oben beschriebene MTT-Assay für Bakterienadhärenz an Kathetermaterial zu etablieren. Zunächst wurde dabei die Adhärenz des Standardkeimes ATCC 29213 an Peritonealdialysekathetern, wie unter 2.5.5. beschrieben, untersucht. Im weiteren Versuchsablauf gelang es jedoch nicht, die entstandenen Formazankristalle vollständig vom Kathetermaterial zu lösen, um in Anschluss die Extinktion als Parameter der Bakterienadhärenz zu messen. Aufgrund dieses technischen Mangels ließen sich keine reproduzierbare Versuchsstandards etablieren, so dass sich das MTT-Assay hier als ungeeignet erwies.

### 3.5. Adhärenzbestimmung an HEP-2 Zellen mittels Lichtmikroskopie

#### 3.5.1. Adhärenz der Kontrollkeime ATCC 29213 und ATCC 25923 an HEP-2 Zellen

Zunächst wurde untersucht, ob dieser Versuchsaufbau geeignet war, Adhärenz an HEP-2 Zellen darzustellen.

Die an drei verschiedenen Versuchstagen durchgeführte Adhärenzbestimmung mittels Lichtmikroskopie zeigte für den Standardkeim ATCC 29213 eine vergleichbare Zahl adhärrierender Keime/Zelle (ohne Abbildung).

Verglich man die Adhärenz der Standardkeime ATCC 29213 und ATCC 25923 miteinander, so zeigte sich auch mittels Lichtmikroskopie ein deutlicher Unterschied im Adhärenzverhalten der beiden Standardkeime an HEP-2 Zellen (Tabelle 13).

Tab. 13: Adhärenz der beiden Standardkeime ATCC 29213 und ATCC 25923 an HEp-2 Zellen. 100 ausgezählte Zellen/Keim. Werte angegeben in Keime/Zelle. minimale (Min), maximale (Max) Anzahl der Keime/Zelle, sowie Mittelwert (MW, Standardabweichung (SD) und Median.

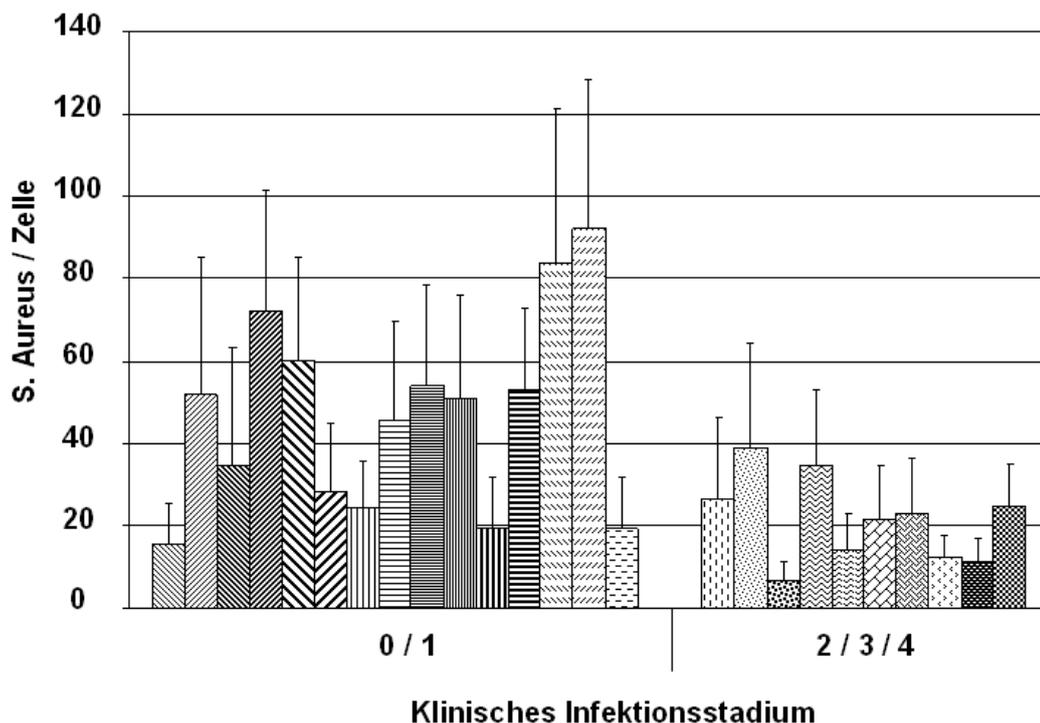
	Adhärenzte Keime/Zelle				
	Min	Max	MW	SD	Median
ATCC 29213	3	16	8,11	3,05	8
ATCC 25923	37	145	89,86	22,46	89

Das Adhärenzvermögen der Standardkeime an HEp-2 Zellen war dabei, bei gleicher Zellzahl, abhängig von der Bakterienzahl und der Dauer der Inkubation. Eine 30 minütige Inkubationszeit erwies sich am günstigsten, da sich bei längerer Inkubationszeit deutliche zytopathische Veränderungen der HEp-2 Zellen zeigten.

### 3.5.2. Adhärenz der Katheteraustrittsstellenisolate an HEp -2 Zellen

25 *S. aureus* Isolate der Katheteraustrittsstelle wurden untersucht. Die Isolate waren sowohl von entzündeten wie von klinisch blanden Katheteraustrittsstellen. Wie in Abbildung 6 dargestellt, korrelierte das Adhärenzverhalten der Patientenisolate *in vitro* nicht positiv mit dem Infektionsgrad der Katheteraustrittsstelle *in vivo*.

Jedoch war eine signifikante Abnahme der adhärenzten Keimzahl pro HEp-2 Zelle bei höherem Infektionsgrad der Katheteraustrittsstelle (KAI II-IV) zu beobachten. Bei Grad II-IV adhärenzten im Mittelwert 21,5 Bakterien/Zelle, bei Grad 0/I hingegen 41,5 Bakterien/Zelle.



*Abb. 6: Adhärenz der klinischen S. aureus Isolate gewonnen von der Katheteraustrittsstelle in Bezug zum klinischen Infektionsstadium (KAI 0-IV). Keimzahl pro 100 ausgezählte HEP-2 Zellen Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Jeder Balken stellt ein einzelnes S. aureus Isolat dar. KAI 0/1 gegen KAI 2/3/4:  $p < 0,05$ .*

### 3.6. Adhärenzbestimmung von radioaktiv markierten Bakterien an Peritonealdialysekathetern

Nachdem es nicht gelungen war das MTT-Assay zur Darstellung von Bakterienadhärenz an Peritonealdialysekathetern zu modifizieren, stellte sich eine Adhärenzbestimmung mittels radioaktiv markierter Bakterien als sinnvoll dar. Die unter 2.7. beschriebene Methode zeigte gute reproduzierbare Ergebnisse. Vorteil war, dass die adhärenzmarkierten Bakterien zur Messung nicht vom Kathetermaterial abgelöst werden mussten, sondern am Silikonschlauch haftend im Scintillation counter erfasst werden konnten.

Die Adhärenzintensität der Patientenisolate an Silikonkathetern *in vitro*

korrelierte positiv mit dem Infektionsgrad der Katheteraustrittsstelle *in vivo*.

Wie in Abbildung 7 dargestellt zeigten sich eine signifikant gesteigerte Adhärenzintensität der Patientenisolat an Silikonkathetern gewonnen von Katheteraustrittsstellen mit höherem Infektionsgrad (Grad II-IV) ( $p < 0,05$ )

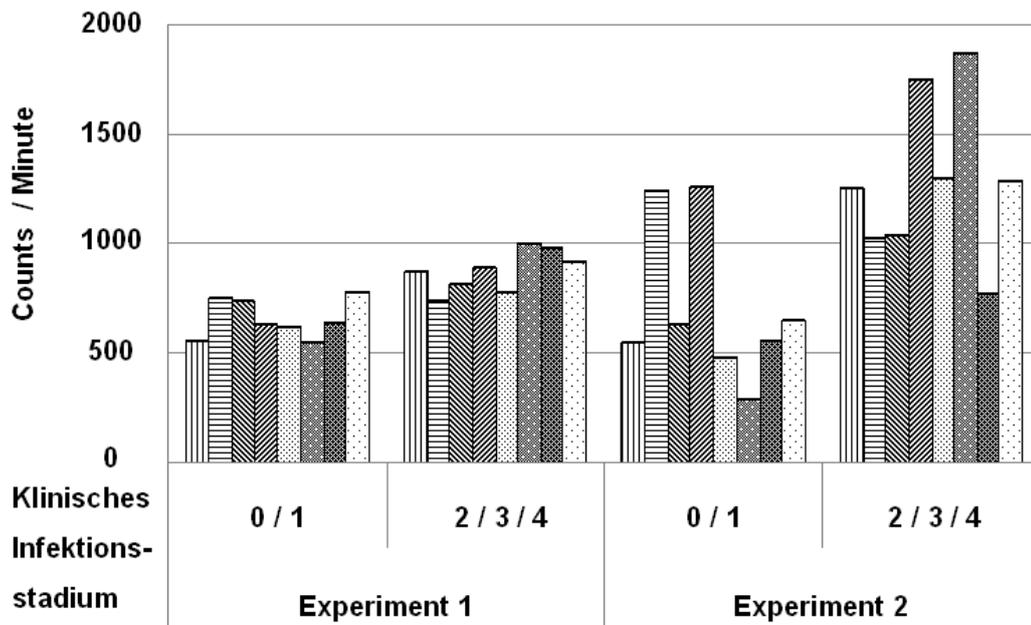


Abbildung 7: Adhärenz der klinischen *S. aureus* Katheteraustrittsstellenisolate an Silikonperitonealdialysekathetern in Bezug zum Infektionsstadium der Katheteraustrittsstelle (KAI I-IV). Gemessen in counts per minute, jeder Balken stellt ein einzelnes *S. aureus* Isolat dar. Signifikanz KAI 0/I gegen KAI II-IV:  $p < 0,05$  Experiment 1;  $p < 0,05$  Experiment 2

#### 4. Diskussion

Katheterassoziierte infektiologische Probleme sind schwerwiegende Komplikationen bei der kontinuierlichen ambulanten Peritonealdialyse (CAPD). Infektionen der Katheteraustrittsstelle, des Kathetertunnels und Peritonitiden belasten den Patienten durch zusätzliche Therapiemaßnahmen und führen zu Katheterverlust, Einschränkung dieses Nierenersatztherapieverfahrens und erhöhter Mortalität (1, 16, 39, 56, 62). Während es zahlreiche Untersuchungen zur Peritonitis als schwerwiegendster Komplikation der CAPD gibt, ist das Interesse an Infektionen der Katheteraustrittsstelle erst in den letzten Jahren gestiegen. Ätiologie und Epidemiologie der Katheteraustrittsstelleninfektion und deren Einfluss auf die CAPD assoziierte Morbidität sind derzeit Gegenstand der Forschung.

Diese Arbeit zeigt, dass *S. aureus* ein häufiger und klinisch bedeutsamer Erreger bei CAPD assoziierter Katheteraustrittsstelleninfektion ist. In 25% der kulturpositiven Katheteraustrittsstellen Abstriche konnte *S. aureus* nachgewiesen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei klinisch schwerwiegenderer Katheteraustrittsstelleninfektion (Grad II-IV) der Nachweis von *S. aureus* signifikant häufiger ist als bei Infektionen niedrigeren Grades (47% versus 19%). Es stieg also die Isolationswahrscheinlichkeit von *S. aureus* mit dem klinischen Infektionsgrad. In der Literatur ist *S. aureus* der am häufigsten isolierte Keim bei Katheteraustrittsstelleninfektion und er wird in 25-83% der kulturpositiven Katheteraustrittsstelleninfektionen isoliert (1, 15, 17, 39, 55, 62, 64, 79). Die dabei uneinheitlichen Definitionen der Katheteraustrittsstelleninfektion spiegeln sich möglicherweise in unseren Daten wieder. Weit gefasste Definitionen der Katheteraustrittsstelleninfektion unterschätzen dabei möglicherweise die Häufigkeit und Relevanz dieses Erregers. Unsere Daten der schwererwiegenden Infektionsgrade (Grad II-IV) bestätigen die Häufigkeit

und Relevanz von *S. aureus* aus anderen Studien (1, 39, 55, 62).

Nasales Trägertum von *S. aureus* wird in der Literatur als ein wichtiger Risikofaktor für CAPD assoziierte Infektionen durch diesen Erreger diskutiert. In einer Studie von Sewell et al. 1982 wurde *S. aureus* bei 57% (17/30) Peritonealdialysepatienten mindestens einmalig *S. aureus* in der Nase nachgewiesen. Bei 2 oder mehr positiven Abstrichen wurden diese Patienten als nasale *S. aureus* Träger definiert, diese hatten ein signifikant erhöhtes Risiko an einer *S. aureus* Peritonitis oder *S. aureus* Katheteraustrittsstelleninfektion zu erkranken (64). In einer prospektiven Studie mit größerer Patientenzahl (87 CAPD Patienten) konnten Davies et al. 1988 diesen Zusammenhang bestätigen (15). Nasale *S. aureus* Träger, definiert als mindestens zwei positive Abstriche im Studienzeitraum, hatten ein 6-fach erhöhtes Risiko für eine *S. aureus* Katheteraustrittsstelleninfektion. Luzar et al. konnten 1990 in einer prospektiven Studie über 5 Jahre 140 CAPD Patienten einschließen, 45% wurden nach einmaligem Abstrich als nasale *S. aureus* Träger definiert und hatten ein signifikant erhöhtes Risiko, überhaupt an einer Katheteraustrittsstelleninfektion sowie an einer *S. aureus* bedingten Katheteraustrittsstelleninfektion zu erkranken (40). Allerdings war auch in diesen Studien ein Teil der als nasale *S. aureus* Träger definierten Patienten ohne erhöhtes Risiko für *S. aureus* induzierte Infektionen.

Williams, Casewell und Hill und Erikson et al. beschreiben verschiedene Formen des nasalen *S. aureus* Trägerstatus bei Gesunden: persistierende, intermittierende und Niemals-Träger von *S. aureus* (9, 18, 76). Eine präzise Definition des nasalen Trägertums von *S. aureus* könnte relevant sein, da frühere Studien gezeigt haben, dass die durchschnittliche *S. aureus* Bakterienlast bei persistierenden Trägern gegenüber intermittierenden Trägern signifikant erhöht ist (3, 48, 75, 76). Dieses wiederum führt zu einer vermehrten Verteilung der Staphylokokken in die Umgebung und zu einem vergrößerten Infektionsrisiko für *S. aureus* Infektionen (32, 48, 63). Genetische Analysen der *S. aureus* Stämme zeigen, dass persistierende nasale *S. aureus* Träger häufiger mit einem identischen Stamm besiedelt sind, wohingegen intermittierende Träger

eher verschiedene Stämme tragen (48, 76). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *S. aureus* Infektionen bei persistierenden Trägern von *S. aureus* durch denselben Stamm verursacht werden, mit denen die Nase besiedelt ist (32, 49).

Einige Studien zeigen eine Unterteilung der Patienten, doch sind die Definitionen für das nasale Trägertum von *S. aureus* nicht einheitlich und häufig wurden maximal 2 Abstriche zur Unterteilung der Trägergruppen abgenommen (15, 40, 63, 64). Es gibt derzeit keinen allgemeinen Konsensus wie viele Abstriche abgenommen werden sollten und wie viele davon für *S. aureus* positiv sein müssen, um einen persistierenden Trägerstatus zu definieren (75). Vychtil et al. konnten zeigen, dass das Risiko für eine *S. aureus* Katheterinfektion bei Nicht-Diabetikern und nicht-immunsupprimierten Patienten nur dann erhöht ist, wenn mindestens 2 Nasenabstriche positiv für *S. aureus* waren (74). Die Wichtigkeit des nasalen *S. aureus* Trägertums und dessen genaue Klassifikation bei CAPD Patienten für konsekutive Infektionen konnte kürzlich in einer umfangreichen Studie von Nouwen et al. bestätigt werden. In dieser Untersuchung wurden bei 52 CAPD Patienten zunächst 6 Abstriche im wöchentlichen Abstand durchgeführt und anhand der Kulturergebnisse eine Einteilung des nasalen *S. aureus* Trägertums durchgeführt. Persistierende Träger mussten 6 von 6 Abstrichen positiv für *S. aureus* haben oder 5 von 6 und mindestens einen positiven Katheteraustrittstellenabstrich, weiterhin sollte die Genotypisierung dieser Isolate identisch sein. Als Nicht-Träger wurden Patienten definiert, bei denen keiner der 6 Abstriche für *S. aureus* positiv war, intermittierende Träger erfüllten keine der letzten beiden Definitionen. Im weiteren Verlauf wurden im 12 wöchigen Abstand Abstriche von Nase und Katheteraustrittsstelle abgenommen. Im Vergleich zu intermittierenden Trägern und Nicht-Trägern hatten persistierende Träger signifikant häufiger CAPD assoziierte Infektionen allgemein, sowie im speziellen Katheteraustrittsstelleninfektionen gesamt (0,09/Monat versus 0,02/Monat bei intermittierenden Trägern und 0,02/Monat bei Nicht-Trägern) und *S. aureus* bedingte Katheteraustrittsstelleninfektionen (0,07/Monat versus

0,01/Monat bei intermittierenden Trägern und 0,01/Monat bei Nicht-Trägern). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen intermittierenden Trägern zu Nicht-Trägern. Nouwen et al. schlussfolgern daraus, dass nur persistierendes und nicht intermittierendes nasales *S. aureus* Trägertum einen Risikofaktor für CAPD assoziierte Infektionen darstellt (49).

Wir konnten die Ergebnisse der oben genannten Studien bestätigen, wonach persistierende nasale Träger von *S. aureus* mit größerer Wahrscheinlichkeit an einer *S. aureus* bedingten Katheteraustrittsstelleninfektion erkranken als Nicht-Träger. Die Untersuchungen zum nasalen Trägerstatus ergaben für Patienten mit chronisch nasaler Besiedlung mit *S. aureus* gegenüber Nicht-Trägern ein signifikant erhöhtes Risiko, an einer durch *S. aureus* induzierten Infektion der Katheteraustrittsstelle zu erkranken (1,172 Episoden/Patient/Jahr versus 0,043). Wir konnten weiterhin zeigen, dass der einmalige Nachweis von *S. aureus* in der Nase, sowie ein intermittierender Trägerstatus kein Risikofaktor für die Entwicklung von Katheteraustrittsstelleninfektionen durch diesen Erreger darstellt.

Darüber hinaus konnten wir genauere Daten anhand von Analysen über Katheteraustrittsstelleninfektionen bei verschiedenen Infektionsgraden zusammenstellen, die die oben genannten Zahlen noch verdeutlichen: bei chronisch nasalen Trägern fanden sich 0,586 Katheteraustrittsstelleninfektions-Episoden Grad II-IV /Patient/Jahr verursacht durch *S. aureus* im Vergleich zu 0 Katheteraustrittsstelleninfektions-Episoden Grad II-IV /Patient/Jahr bei Nicht-Trägern. Von den insgesamt 20 *S. aureus* positiven Episoden einer Katheteraustrittsstelleninfektion fanden 16 bei chronischen Trägern statt, 3 bei intermittierendem oder einmaligem Nachweis, eine bei Nicht-Trägern. Von den insgesamt 9 schwerergradigen Katheteraustrittsstelleninfektionen (Grad II-IV), waren 8 bei chronischen Trägern, eine bei Patienten mit intermittierendem/einmaligem Nachweis, keine bei Nicht-Trägern (88,9% versus 11,1% versus 0).

Unsere Daten zeigen, dass eine Differenzierung zwischen chronischem und intermittierendem nasalen *S. aureus* Trägertum sowie Nicht-Trägern gut erfassbar und von klinischer Bedeutsamkeit ist. Voraussetzung zur Ermittlung des nasalen Trägerstatus waren dabei mindestens drei Abstriche in mindestens 4-wöchigem Abstand, die im Rahmen der üblichen Ambulanzbesuche abgenommen wurden. Diese Ermittlungsmethode des nasalen Trägerstatus eines Patienten könnte eine im klinischen Alltag gut umsetzbare und kostengünstige Risikostratifizierung für konsekutive *S. aureus* Katheterausstrittsstelleninfektionen ermöglichen.

Es liegt nahe, das Risiko der *S. aureus* assoziierten Infektionen mittels antibiotischer Eradikation der nasalen *S. aureus* Besiedlung zu reduzieren. Und obwohl einige klinische Studien gezeigt haben, dass es möglich ist *S. aureus* temporär zu eradizieren, und die *S. aureus* Infektionsrate zur gleichen Zeit zu reduzieren (6, 53, 74, 78) ergeben sich aus dieser Strategie doch einige Probleme. Eine hohe Wiederbesiedlungsrate macht dauerhafte oder zumindest eine periodische antibiotische Therapie notwendig (53). Damit verbunden sind Berichte von Resistenzbildungen, die das klinische Management erschweren (4). In einer Studie von Perez-Fontan et al. wird über ein gleichzeitiges Ansteigen von gramnegativen Infektionen berichtet, so dass die Gesamtfektionsrate nicht gesenkt werden konnte (53). Nicht zuletzt muss die Kosteneffizienz in Frage gestellt werden. So konnten Davey et al. zeigen, dass eine lokale nasale Therapie mit Mupirocin bei nasalen *S. aureus* Trägern die Rate der *S. aureus* bedingten Katheterausstrittsstelleninfektionen und damit die Folgekosten für Therapien dieser Infektionen senken konnte. Aufgrund der Mupirocinkosten selbst und einer nicht signifikant reduzierten Gesamtfektionsrate ergab sich letztlich jedoch kein Kostenvorteil für die Mupirocingruppe (14).

Es ist also von klinischer Relevanz, diejenigen Patienten zu ermitteln, die von einer solchen antibiotischen Prophylaxe tatsächlich profitieren würden, und damit unnötigen Antibiotikagebrauch mit den oben beschriebenen Problemen zu reduzieren. In unserer Studie konnten wir zeigen, dass weder intermittierende noch einmalige Träger von *S. aureus* in der Nase

von einem erhöhten *S. aureus* Katheteraustrittsstelleninfektionsrisiko gegenüber Nicht-Trägern betroffen sind. Gemäß unserer Trägerdefinition sollte eine antibiotische Prophylaxe allenfalls chronischen Trägern vorbehalten sein.

Jedoch entwickelte auch über die Hälfte der nasalen Träger von *S. aureus* (7 von 13) keine *S. aureus* bedingten Katheteraustrittsstelleninfektionen. Diese Daten legen nahe, dass es unter den nasalen *S. aureus* Trägern eine Gruppe von Patienten mit Hochrisiko für die Entwicklung einer *S. aureus* bedingten Katheteraustrittsstelleninfektion gibt. Es wäre hinsichtlich der Infektionsprävention und damit der Morbidität und Mortalität sowie der Effizienz CAPD wichtig, diese Patienten anhand weiterer Parameter zu identifizieren.

*S. aureus* Isolate, die CAPD katheterassoziierte Infektionen verursachen, verfügen möglicherweise über bestimmte Virulenzfaktoren, die die Kolonisation und Infektion erleichtern.

Die Adhärenz von Erregern an epithelialen Zellen ist ein wichtiger Schritt in der frühen Phase der Infektion (50). So gilt z.B. die Adhärenz von enteropathogenen *Escherichia coli* an HEp-2 Zellen als Indikator für bakterielle Virulenz und den Schweregrad bei Infektionen am Menschen (34, 41).

Wir haben vor diesem Hintergrund die Adhärenz von klinischen *S. aureus* Isolaten an HEp-2 Zellen untersucht. Die entwickelte Untersuchungsmethode zeigte, dass Adhärenz von *S. aureus* an HEp-2 Zellen mit reproduzierbaren Ergebnissen messbar ist. Auch konnten signifikant wiederholbare Unterschiede im Adhärenzverhalten von *S. aureus* an HEp-2 Zellen nachgewiesen werden. Die Methode war also geeignet, um Unterschiede im Adhärenzverhalten an HEp-2 Zellen zu messen.

Unsere Daten zeigen jedoch keine signifikante positive Korrelation zwischen der Adhärenz von *S. aureus* Isolaten (isoliert von Nase oder Katheteraustrittsstelle) an HEp-2 Zellen und den klinischen Stadien einer

Katheteraustrittsstelleninfektion.

Es gilt zu bedenken, dass die Extinktionen gleicher Ansätze zwischen den Versuchen relativ stark variierten. Durch die Berechnung einer relativen Adhärenz mithilfe des Standardkeims ATCC 29213 haben wir versucht, die verschiedenen Versuchstage miteinander vergleichbar zu machen. Hier könnten möglicherweise technische Mängel wie wechselnde Mikrotiterplattenqualität, unterschiedliche Intensität der Waschvorgänge oder variierendes Alter der Zellen zugrunde liegen.

Um mögliche technische Mängel der etablierten Methode zu überprüfen, untersuchten wir die Adhärenz der *S. aureus* Isolate der Katheteraustrittsstelle an HEp-2 Zellen mittels Kristallviolett-Färbung und anschließender Auszählung unter dem Lichtmikroskop. Auch hier konnte keine positive Korrelation zwischen der Adhärenz *in vitro* und dem klinischen Infektionsgrad gezeigt werden. Klinische Isolate der Katheteraustrittsstelle von höheren Infektionsgraden (II, III und IV) waren aber signifikant weniger adhärenz sein als solche die von niedrigen Infektionsstadien isoliert worden waren.

Es lässt sich schlussfolgernd sagen, dass die Adhärenz von *S. aureus* an HEp-2 Zellen *in vitro* zunächst keine Differenzierung zwischen klinischen *S. aureus* Isolaten, die lediglich eine Kolonisation oder eine klinisch relevante Infektion der Katheteraustrittsstelle verursachen ermöglicht, und damit in der verwendeten Methode nicht zur Beurteilung der Virulenz bzw. einer Risikostratifizierung von klinischen *S. aureus* Isolaten bei CAPD Patienten beiträgt.

Die negative Korrelation in unseren Versuchen deutet an, dass die Genese von *S. aureus* Infektionen ein komplexer Prozess ist, bei dem Adhärenz an epithelialen Zellen ein wichtiger initialer Faktor ist und eine Voraussetzung für die Kolonisation. Dagegen könnten im weiteren Infektionsverlauf bis hin zu einer klinisch schwerwiegenden Infektion andere Mechanismen bedeutender sein und die Adhärenz eventuell nicht mehr begünstigen.

Es gibt Hinweise darauf, dass ebenso Wirtsstrukturen die Adhärenz von *S.*

*aureus* an Epithelzellen und damit den nasalen Trägerstatus beeinflussen. Zum einen zeigen Untersuchungen an Gesunden, dass der nasale Trägerstatus von *S. aureus* abhängig ist von Alter, ethnischer Gruppe und Geschlecht (9). Zum anderen scheinen bestimmte Patientengruppen wie auch Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz unter Hämodialyse (78) bzw. unter CAPD (40) eine erhöhte nasale Trägerrate für *S. aureus* aufzuweisen. Diese Ergebnisse wurden durch *in vitro* Untersuchungen unterstützt. Aly et al. zeigten, dass Adhärenz von *S. aureus* an nasalen Mukosazellen isoliert von Trägern gegenüber an denen von Nicht-Trägern *in vitro* erhöht war (3). Weiterhin beschrieben Bibel et al., dass die Intensität der Hautkeratinisierung das Maß der Adhärenz von *S. aureus* an diesen Zellen maßgeblich beeinflusst (7).

Es stellt sich die Frage, ob Wirts- oder Bakterienstrukturen die Determinanten des nasalen *S. aureus* Trägertums sind. In einer 2004 veröffentlichten Studie wurden gesunde Probanden zunächst in persistierende nasale *S. aureus* Träger, intermittierende Träger und Nicht-Träger klassifiziert. Mittels nasaler Mupirocin Therapie wurde *S. aureus* bei allen positiven Patienten eradiziert. Allen Probanden wurde im Anschluss daran ein *S. aureus* Gemisch, bestehend aus vier verschiedenen Isolaten, in die Nase eingebracht. Dieses Gemisch beinhaltete unter anderem ein Isolat von einem intermittierenden Träger, einem persistierenden Träger und den jeweiligen eigenen Stamm der *S. aureus* Träger. Nicht-Träger eliminierten die eingebrachten Bakterien schnell, während die meisten chronischen Träger wieder durch ihr ursprüngliches Isolat besiedelt waren (7 von 11) oder durch ein fremdes das nicht aus dem Gemisch stammte (3 von 11). Die Untersucher schließen daraus, dass Wirtsstrukturen den *S. aureus* Trägerstatus wesentlich mitbestimmen, sowie dass *S. aureus* Stamm und Wirt optimal zueinander passen müssen (47).

Nasales Trägertum muss wahrscheinlich als ein multifaktorielles komplexes Zusammenspiel zwischen Wirts- u. Bakterienstrukturen interpretiert werden, zu dessen Erfassung weitere klinische Studien notwendig sein werden.

Auch bei der Pathogenese von Staphylokokkeninfektionen die mit polymeren Oberflächen assoziiert sind, ist die Adhärenz von Bakterien an diesem Material (intravenösen Verweilkathetern, Gelenkprothesen, Herzklappen) von entscheidender Bedeutung für die frühe Phase der Infektion (10, 21, 54). Adhärenz von *S. aureus* an diesen prothetischen Materialien wurde dabei an klinischen Explantaten und *in vitro* Modellen untersucht (5, 26, 42, 73).

Wir haben untersucht, ob die Adhärenz von klinischen *S. aureus* Isolaten an Silikonkathetern *in vitro* mit dem klinischen Infektionsstadium *in vivo* korreliert. Unsere *in vitro* Untersuchungen von *S. aureus* Isolaten von CAPD Patienten zeigen, dass das Ausmaß der Adhärenz von *S. aureus* an Silikondialysekathetern *in vitro* mit dem klinischen Infektionsstadium der Katheteraustrittsstelle *in vivo* korreliert. *S. aureus* Katheteraustrittsstellen Isolate, die bei Infektionsgrad II-IV isoliert wurden, waren signifikant adhärenter als solche die von niedrigeren Infektionsgraden isoliert wurden. Es konnte damit zum ersten Mal gezeigt werden, dass Adhärenz von *S. aureus* an Kathetermaterial *in vitro* mit dem klinischen Schweregrad einer Infektion *in vivo* korreliert.

Die gesteigerte Adhärenz von *S. aureus* an Silikon könnte ein Hinweis auf einen wesentlichen Virulenzfaktor von *S. aureus* Isolaten sein, da die Adhärenz am CAPD Katheter einen initialen Schritt für die konsekutive Kolonisation und Infektion darstellt.

Die genauen Adhärenzmechanismen von *S. aureus* an polymeren Oberflächen sind dabei noch weitgehend ungeklärt (35). Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Oberflächenstrukturen und Oberflächenspannung wurden bei Staphylokokken kontrovers diskutiert (21, 29, 37). Ein sicherlich wichtiger Adhärenzfaktor ist die plasmaproteinvermittelte Adhärenz. Da polymere Kunststoffmaterialien nahezu sofort nach Implantation in den menschlichen Körper mit Plasmaproteinen überzogen werden, sind Adhärenzuntersuchungen an sauberen Kathetern *in vitro* vielleicht eine zu vereinfachte Darstellung. Yanagisawa et al. untersuchten die Adhärenz von *S. aureus* an

explantierten Peritonealdialysekathetern, die zuvor mit gebrauchtem bzw. neuem Dialysat inkubiert wurden. Es fand sich eine gesteigerte Adhärenz für die Katheter, die zuvor mit der gebrauchten Lösung inkubiert worden waren (77). Vor allem Fibronectin wird hierbei als Brückenprotein in der Adhärenz von Kathetermaterial und *S. aureus* diskutiert. Vaudaux et al. (72), zeigten, dass explantierte Katheter mit Plasmaproteinen bedeckt sind und Fibronectin die Adhärenz von Bakterien hieran steigert. *Staphylococcus aureus* exprimiert zwei Fibronectin bindende Rezeptoren (fibronectin-binding proteins FnBPs), diese binden dabei irreversibel und spezifisch an Fibronectin. FnBPs gelten als Virulenzfaktoren von *S. aureus*, die dem Erreger Kolonisation und Infektion durch spezifische Adhärenz ermöglichen. Weiterhin gibt es Hinweise, dass FnBPs durch Phagozytose durch nicht-professionelle Phagozyten ebenso Invasine sein können (44).

Wir haben untersucht, ob die Adhärenz des Kontrollkeimes ATCC 29213 an Silikon durch Fibronectin *in vitro* gesteigert werden kann und konnten zeigen, dass Fibronectin konzentrationsabhängig die Adhärenz signifikant steigert.

Die oben zitierten Studien weisen überzeugend auf die Wichtigkeit der plasmaproteinvermittelnden Adhärenz hin. Um den klinisch relevanten Einfluss von plasmaproteinvermittelter Adhärenz an CAPD Kathetern zu erfassen, wäre es möglicherweise sinnvoll, genauere Daten über Zusammensetzung und Konzentration der Plasmaproteine an der Katheteraustrittsstelle zu erfassen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *S. aureus* ein wichtiger Erreger bei CAPD assoziierten Infektionen ist. Eine differenzierte Bestimmung des nasalen Trägerstatus von *S. aureus* stellt dabei ein wichtiges Instrument zur Stratifizierung von Risikogruppen dar. Nur chronisch nasale Träger hatten in unserer Studie ein erhöhtes Risiko für *S. aureus* assoziierte Katheteraustrittsstelleninfektionen. Einmalige und intermittierende Träger von *S. aureus* in der Nase hatten dagegen kein erhöhtes Risiko für *S. aureus* bedingte Infektionen. Aber auch über die Hälfte der chronisch nasalen *S. aureus* Träger entwickelte keine *S. aureus*

assoziierte Infektion. Die vorliegenden Experimente zeigen, dass Adhärenz von *S. aureus* an HEp-2 Zellen und Silikon messbar ist und dass sich weiterhin Unterschiede im Adhärenzverhalten der einzelnen Isolate nachweisen lassen. Es konnte dabei erstmalig eine Korrelation zwischen der Adhärenz von *S. aureus* Katheteraustrittsstellen Isolaten an Silikon *in vitro* und dem klinischen Infektionsstadium *in vivo* gezeigt werden. Für die Adhärenzuntersuchungen an HEp-2 Zellen *in vitro* zeigte sich kein solcher Zusammenhang. Unsere Daten könnten darauf hinweisen, dass nur Adhärenz an Silikon, aber nicht an HEp-2 Zellen, den Schweregrad und damit die Virulenz des Erregers detektieren können. Fibronektin steigert die Adhärenz von *S. aureus* an Silikon, das Vorkommen bzw. die Zusammensetzung von Plasmaproteinen an der Katheteraustrittsstelle müsste für spezifischere Aussagen jedoch genauer untersucht werden.

## **5. Schlussfolgerung**

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass eine differenzierte Trägerdefinition eine Risikostratifizierung für konsekutive *S. aureus* bedingte Katheteraustrittsstelleninfektionen ermöglicht und sich daraus eventuell gezieltere prophylaktische Maßnahmen ableiten lassen. Es bleibt jedoch zu berücksichtigen, dass über die Hälfte der chronischen *S. aureus* Träger keine *S. aureus* Katheteraustrittsstelleninfektion entwickelte. Adhärenz von *S. aureus* Katheteraustrittsstellenisolaten an Silikon könnte als wesentlicher Virulenzfaktor von klinischer Bedeutung sein. Dabei wäre es relevant weitere humane und erregerspezifische Risikofaktoren für *S. aureus* Infektionen bei CAPD Patienten zu ermitteln.

## 6. Zusammenfassung

Infektionen der Katheteraustrittsstelle bei kontinuierlicher ambulanter Peritonealdialyse können zu Katheterverlust mit konsekutivem Versagen der Therapie führen. *Staphylococcus aureus* Infektionen sind hierbei häufig und führen zu besonders schweren Infektionsverläufen. Als wichtiger Virulenzfaktor in der Genese von Infektionskrankheiten gilt die Adhärenz von Bakterien an Wirtsstrukturen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im Rahmen einer prospektiven multizentrischen Studie, die Inzidenz und den Schweregrad von Infektionen der Katheteraustrittsstelle in Abhängigkeit zum Erreger und dem nasalen Trägerstatus von *S. aureus* zu untersuchen. Weiterhin wurde geprüft, ob die Adhärenz von *S. aureus* Isolaten an Epithelien und Peritonealdialysekathetern *in vitro* mit dem klinischen Infektionsstadium *in vivo* korreliert.

*S. aureus* war ein häufig isolierter Keim an der Katheteraustrittsstelle, die Isolationshäufigkeit stieg darüber hinaus mit dem Schweregrad der Katheteraustrittsstelleninfektion an. Nur chronisch nasale *S. aureus* Träger erkrankten signifikant häufiger und schwerer an Infektionen der Katheteraustrittsstelle mit *S. aureus*. Die Adhärenz der *S. aureus* Katheteraustrittsstellen Isolate an Silikonkathetern war bei höhergradigen Infektionsstadien signifikant erhöht. Die Adhärenz dieser Isolate an Epithelzellen stand dagegen in keinem Bezug zum klinischen Infektionsstadium.

Diese Ergebnisse bestätigen die Relevanz von *S. aureus* Infektionen bei CAPD Patienten. Eine differenzierte Definition des nasalen Trägerstatus von *S. aureus* ermöglicht weiterhin, Patienten mit erhöhtem Infektionsrisiko zu erfassen, die von einer antimikrobiellen Prophylaxe möglicherweise profitieren würden. Es konnte eine Korrelation zwischen Adhärenz von *S. aureus* an Silikonkathetern und dem klinischen Infektionsstadium gezeigt werden, dies könnte als wesentlicher Virulenzfaktor von klinischer Bedeutung sein.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Abraham G, Savin E, Ayiomamitis A, Izatt S, Vas S I, Mathews R E, Oreopoulos D G: Natural history of Exit-Site Infection (ESI) in Patients on Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis (CAPD). *Perit Dial Int* 8, 211-216 (1988)
2. Aly R, Levit S: Adherence of *Staphylococcus aureus* to squamous epithelium: role of fibronectin and teichoic acid. *Rev Infect Dis Suppl* 4, S341-350 (1987)
3. Aly R, Shinefield H I, Strauss W G, Maibach H I: Bacterial adherence to nasal mucosal cells. *Infect Immun* 17, 546-549 (1977)
4. Annigeri R, Conly J, Vas S, Dedier H, Prakashan K P, Bargman J M, Jassal V, Oreopoulos D: Emergence of mupirocin-resistant *Staphylococcus aureus* in chronic peritoneal dialysis patients using mupirocin prophylaxis to prevent exit-site infection. *Perit Dial Int* 21, 554-559 (2001)
5. Ashkenazi S, Mirelman D: Adherence of bacteria to pediatric intravenous catheters and needles and its relation to phlebitis in animals. *Pediatr Res* 18, 1361-1366 (1984)
6. Bernardini J, Piraino B, Holley J, Johnston J R, Lutes R: A randomized trial of *Staphylococcus aureus* prophylaxis in peritoneal dialysis patients: mupirocin calcium ointment 2% applied to the exit site versus cyclic oral rifampin. *Am J Kidney Dis* 27, 695-700 (1996)
7. Bibel D J, Aly R, Shinefield H R, Maibach H I, Strauss W G: Importance of the keratinized epithelial cell in bacterial adherence. *J Invest Dermatol* 79, 250-253 (1982)
8. Bloembergen W E, Port F K: Epidemiological perspective on infections in chronic dialysis patients. *Adv Ren Replace Ther* 3, 201-207 (1996)
9. Casewell M W, Hill R L: The carrier state: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 18 Suppl A, 1-12 (1986)
10. 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, 996-1006 (1985)
11. Coles G A: Nasal mupirocin prevents *Staphylococcus aureus* exit-site infection during peritoneal dialysis. Mupirocin Study Group. *J Am Soc Nephrol* 7, 2403-2408 (1996)

12. Copley J B: Prevention of peritoneal dialysis catheter-related infections. *Am J Kidney Dis* 10, 401-407 (1987)
13. Cravioto A, Tello A, Villafan H, Ruiz J, del Vedovo S, Neeser J R: Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. *J Infect Dis* 163, 1247-1255 (1991)
14. Davey P, Craig A M, Hau C, Malek M: Cost-effectiveness of prophylactic nasal mupirocin in patients undergoing peritoneal dialysis based on a randomized, placebo-controlled trial. *J Antimicrob Chemother* 43, 105-112 (1999)
15. Davies S J, Ogg C S, Cameron J S, Poston S, Noble W C: *Staphylococcus Aureus* Nasal Carriage, Exit-Site Infection and Catheter Loss in Patients Treated with Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis (CAPD). *Perit Dial Int* 9, 61-64 (1989)
16. Digenis G E, Abraham G, Savin E, Blake P, Dombros N, Sombolos K, Vas S I, Mathews R E, Oreopoulos D G: Peritonitis-Related Deaths in Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis (CAPD) Patients. *Perit Dial Int* 10, 45-47 (1990)
17. Eisele G, Bailie G R, Lomaestro B: Relationship between peritonitis and exit site infections in CAPD. *Adv Perit Dial* 8, 227-229 (1992)
18. Eriksen N H, Espersen F, Rosdahl V T, Jensen K: Carriage of *Staphylococcus aureus* among 104 healthy persons during a 19-month period. *Epidemiol Infect* 115, 51-60 (1995)
19. Espersen F, Clemmensen I: Isolation of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 37, 526-531 (1982)
20. Espersen F, Wilkinson B J, Gahrn-Hansen B, Thamdrup Rosdahl V, Clemmensen I: Attachment of staphylococci to silicone catheters in vitro. *Apmis* 98, 471-478 (1990)
21. Espersen F, Wurr M, Corneliussen L, Hog A L, Rosdahl V T, Frimodt-Moller N, Skinhoj P: Attachment of staphylococci to different plastic tubes in vitro. *J Med Microbiol* 40, 37-42 (1994)
22. Frank H A, Seligman A M, Fine J: Treatment of uremia after acute failure by peritoneal irrigation. *J Amer Med Assoc* 130, 703 (1946)
23. Fuchs C, Schünemann B: Entwicklung des Verfahrens und theoretische Grundlagen. In: Scheler F, Fuchs C : *Praxis der CAPD*. 7-27, Bibliomed, Melsungen, 1981

24. Gahl G M, Jörres A: Infektiologische Probleme bei der chronischen Peritonealdialyse. In: Häring R: Peritonitis. 97-101, Georg Thieme Verlag, Stuttgart / New York, 1993
25. Ganter G: Über die Beseitigung giftiger Stoffe aus dem Blute durch Dialyse. Muench Med Wochenschrift 70, 1478-1480 (1923)
26. Herrmann M, Vaudaux P E, Pittet D, Auckenthaler R, Lew P D, Schumacher-Perdreau F, Peters G, Waldvogel F A: Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. J Infect Dis 158, 693-701 (1988)
27. Herwaldt L A: Staphylococcus aureus nasal carriage: role in continuous ambulatory peritoneal dialysis-associated infections. Perit Dial Int 13 Suppl 2, S301-305 (1993)
28. Heusser H, Werder H: Untersuchung über Peritonealdialyse. Bruns' Beitr. klin. Chir. 14, 28 (1927)
29. Hogt A H, Dankert J, de Vries J A, Feijen J: Adhesion of coagulase-negative staphylococci to biomaterials. J Gen Microbiol 129, 2959-2968 (1983)
30. Jonsson K, Signas C, Muller H P, Lindberg M: Two different genes encode fibronectin binding proteins in Staphylococcus aureus. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. Eur J Biochem 202, 1041-1048 (1991)
31. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H: Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev 10, 505-520 (1997)
32. Kluytmans J A, Wertheim H F: Nasal carriage of Staphylococcus aureus and prevention of nosocomial infections. Infection 33, 3-8 (2005)
33. Kolff W J, Berk J T, ter Welle M, van der Ley A J W, Dijk E C, van Noordwigk J: Een Dialysator met groot Oppervlak. Geneesk Gids 21, 409 (1943)
34. Kreft B, Carstensen O, Straube E, Bohnet S, Hacker J, Marre R: Adherence to and cytotoxicity of Escherichia coli for eucaryotic cell lines quantified by MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Zentralbl Bakteriologie 276, 231-242 (1992)
35. Kristinsson K G: Adherence of staphylococci to intravascular catheters. J Med Microbiol 28, 249-257 (1989)
36. Kuusela P: Fibronectin binds to Staphylococcus aureus. Nature 276, 718-720 (1978)

37. Ludwicka A, Jansen B, Wadstrom T, Pulverer G: Attachment of staphylococci to various synthetic polymers. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 256, 479-489 (1984)
38. Luzar M A: Exit-Site Infection in Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis: A Review. *Perit Dial Int* 11, 333-349 (1991)
39. Luzar M A, Brown C B, Balf D, Hill L, Issad B, Monnier B, Moulart J, Sabatier J-C, Wauquier J-P, Peluso F: Exit-Site Care and Exit-Site Infection in Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis (CAPD): Results of a Randomized Multicenter Trial. *Perit Dial Int* 10, 25-29 (1990)
40. Luzar M A, Coles G A, Faller B, Slingeneyer A, Dah G D, Briat C, Wone C, Knefati Y, Kessler M, Peluso F: Staphylococcus aureus nasal carriage and infection in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *N Engl J Med* 322, 505-509 (1990)
41. Mathewson J J, Cravioto A: HEp-2 cell adherence as an assay for virulence among diarrheagenic Escherichia coli. *J Infect Dis* 159, 1057-1060 (1989)
42. Maxe I, Ryden C, Wadstrom T, Rubin K: Specific attachment of Staphylococcus aureus to immobilized fibronectin. *Infect Immun* 54, 695-704 (1986)
43. Maxwell M H, Rockney R E, Kleemann C R: Peritoneal dialysis. I. Technique and applications. *JAMA* 170, 917 (1959)
44. Menzies B E: The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of Staphylococcus aureus infections. *Curr Opin Infect Dis* 16, 225-229 (2003)
45. Moore A E, Sabachewsky L, Toolan H W: Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res* 15, 598-602 (1955)
46. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63 (1983)
47. Nouwen J, Boelens H, van Belkum A, Verbrugh H: Human factor in Staphylococcus aureus nasal carriage. *Infect Immun* 72, 6685-6688 (2004)
48. Nouwen J, Schouten J, Schneebergen P, Snijders S, Maaskant J, Koolen M, van Belkum A, Verbrugh H A: Staphylococcus aureus carriage patterns and the risk of infections associated with continuous peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol* 44, 2233-2236 (2006)

49. Nouwen J L, Fieren M W, Snijders S, Verbrugh H A, van Belkum A: Persistent (not intermittent) nasal carriage of *Staphylococcus aureus* is the determinant of CPD-related infections. *Kidney Int* 67, 1084-1092 (2005)
50. Ofek I, Beachey E H: General Concepts and Principles of bacterial adherence in animals and men. In: Beachey E H: *Bacterial Adherence. Receptors and Recognition*. 1-31, Chapman and Hall, London / New York, 1980
51. Oxtan L L, Zimmerman S W, Roecker E B, Wakeen M: Risk factors for peritoneal dialysis-related infections. *Perit Dial Int* 14, 137-144 (1994)
52. Peacock S J, Day N P, Thomas M G, Berendt A R, Foster T J: Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in *fnb* genes and adhesion to human fibronectin. *J Infect* 41, 23-31 (2000)
53. Perez-Fontan M, Garcia-Falcon T, Rosales M, Rodriguez-Carmona A, Adeva M, Rodriguez-Lozano I, Moncalian J: Treatment of *Staphylococcus aureus* nasal carriers in continuous ambulatory peritoneal dialysis with mupirocin: long-term results. *Am J Kidney Dis* 22, 708-712 (1993)
54. Peters G, Locci R, Pulverer G: Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J Infect Dis* 146, 479-482 (1982)
55. Piraino B: A review of *Staphylococcus aureus* exit-site and tunnel infections in peritoneal dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 16, 89-95 (1990)
56. Piraino B, Bernardini J, Sorkin M: The influence of peritoneal catheter exit-site infections on peritonitis, tunnel infections, and catheter loss in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis* 8, 436-440 (1986)
57. Popovich R P, Moncrief J W, Dechard J F, Bomar J B, Pyle W K: The definition of a novel portable/wearable equilibrium peritoneal dialysis technique. *Abstr. Amer Soc Art Int Organs* 5, 64 (1976)
58. Popovich R P, Moncrief J W, Nolph K D, Ghods A J, Twardowski Z J, Pyle W K: Continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ann Intern Med* 88, 449-456 (1978)
59. Proctor R A: The staphylococcal fibronectin receptor: evidence for its importance in invasive infections. *Rev Infect Dis* 9 Suppl 4, S335-340 (1987)
60. Romero-Steiner S, Witek T, Balish E: Adherence of skin bacteria to human epithelial cells. *J Clin Microbiol* 28, 27-31 (1990)

61. Sachs L: *Angewandte Statistik, Statistische Methoden und ihre Auswertungen* . 8. Aufl., 181-186, Springer-Verlag, Berlin, 1992
62. Scalamogna A, Castelnovo C, De Vecchi A, Ponticelli C: Exit-site and tunnel infections in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 18, 674-677 (1991)
63. Sesso R, Draibe S, Castelo A, Sato I, Leme I, Barbosa D, Ramos O: Staphylococcus aureus skin carriage and development of peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Nephrol* 31, 264-268 (1989)
64. Sewell C M, Clarridge J, Lacke C, Weinman E J, Young E J: Staphylococcal nasal carriage and subsequent infection in peritoneal dialysis patients. *JAMA* 248, 1493-1495 (1982)
65. Shimoyama Y, Kubota T, Watanabe M, Ishibiki K, Abe O: Predictability of in vivo chemosensitivity by in vitro MTT assay with reference to the clonogenic assay. *J Surg Oncol* 41, 12-18 (1989)
66. Slater T F, Sawyer B, Straeuli U: Studies On Succinate-Tetrazolium Reductase Systems. Iii. Points Of Coupling Of Four Different Tetrazolium Salts. *Biochim Biophys Acta* 77, 383-393 (1963)
67. Sokal R R, Rohlf F J: *Biometry: The principals and practice in biological research*. 607-608, W.H. Freeman and Company, New York, 1969
68. Tenckhoff H, Schechter H: A bacteriologically safe peritoneal access device. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 14, 181-187 (1968)
69. Tompkins D C, Blackwell L J, Hatcher V B, Elliott D A, O'Hagan-Sotsky C, Lowy F D: Staphylococcus aureus proteins that bind to human endothelial cells. *Infect Immun* 60, 965-969 (1992)
70. Twardowski Z J: Exit-site-infections. In: La Greca G, Ronco C, Ferriani M: *Peritoneal Dialysis*. 241-245, Wichtig Editore, Milan, 1991
71. Van Belkum A, Kools-Sijmons M, Verbrugh H: Attachment of Staphylococcus aureus to eukaryotic cells and experimental pitfalls in staphylococcal adherence assays: a critical appraisal. *J Microbiol Methods* 48, 19-42 (2002)
72. Vaudaux P, Pittet D, Haeberli A, Lerch P G, Morgenthaler J J, Proctor R A, Waldvogel F A, Lew D P: Fibronectin is more active than fibrin or fibrinogen in promoting Staphylococcus aureus adherence to inserted intravascular catheters. *J Infect Dis* 167, 633-641 (1993)

73. Vaudaux P E, Francois P, Proctor R A, McDevitt D, Foster T J, Albrecht R M, Lew D P, Wabers H, Cooper S L: Use of adhesion-defective mutants of *Staphylococcus aureus* to define the role of specific plasma proteins in promoting bacterial adhesion to canine arteriovenous shunts. *Infect Immun* 63, 585-590 (1995)
74. Vychytil A, Lorenz M, Schneider B, Horl W H, Haag-Weber M: New strategies to prevent *Staphylococcus aureus* infections in peritoneal dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 9, 669-676 (1998)
75. Wertheim H F, Melles D C, Vos M C, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh H A, Nouwen J L: The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 5, 751-762 (2005)
76. Williams R E: Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol Rev* 27, 56-71 (1963)
77. Yanagisawa N, Li D Q, Ljungh A: Protein adsorption on ex vivo catheters and polymers exposed to peritoneal dialysis effluent. *Perit Dial Int* 24, 264-273 (2004)
78. Yu V L, Goetz A, Wagener M, Smith P B, Rihs J D, Hanchett J, Zuravleff J J: *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on hemodialysis. Efficacy of antibiotic prophylaxis. *N Engl J Med* 315, 91-96 (1986)
79. Zimmerman S W, O'Brien M, Wiedenhoeft F A, Johnson C A: *Staphylococcus Aureus* Peritoneal Catheter-Related Infections: A Case of Catheter Loss and Peritonitis. *Perit Dial Int* 8, 191-194 (1988)

## **8. Danksagung**

Allen, die mich im Laufe der Zeit, in der diese Arbeit entstanden ist, begleitet haben, möchte ich an dieser Stelle Dank sagen.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. B. Kreft für die Möglichkeit in seinem Arbeitskreis meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen. Seine Anregungen und sein Engagement haben die Arbeit wesentlich bestimmt. Nicht zuletzt für seine Geduld und vor allem für seinen immerwährenden Optimismus möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Sack danke ich für die Überlassung des Themas und die stets interessierte Begleitung der Arbeit. Die anregenden Gespräche zu den aus der Arbeit hervorgegangenen Publikationen habe ich besonders geschätzt.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Lehnert und Herrn Prof. Dr. med. Fehm bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme an der Medizinischen Klinik 1 und die Unterstützung bei der vorliegenden Arbeit.

Für die Überlassung des Arbeitsplatzes danke ich der klinisch-experimentellen Forschungseinrichtung. Die Arbeitsatmosphäre war anregend und von gegenseitiger Hilfsbereitschaft geprägt.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Trautmann bedanke ich mich für die freundlicherweise zur Verfügung gestellten Daten und Isolate aus der von ihm initiierten Studie. Sowie für sein großes und hilfsbereites Interesse am Fortschreiten der Arbeit und seine Ratschläge zu mit der Studie verbundenen Publikationen.

Der Paul Ehrlich Gesellschaft für Chemotherapie, der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 367, B3 (B.K.)) und der Fresenius AG, Bad Homburg danke ich für die finanzielle Förderung.

Dem Institut für Biometrie und Statistik der Universität Lübeck möchte ich für die statistische Beratung danken.

Bei der Laborgemeinschaft von Haus 32, und insbesondere bei Dr. med. Sabine Krüger und Dr. med. Antje Leeker, möchte ich mich für die freundschaftliche, diskussionsfreudige und hilfsbereite Zusammenarbeit bedanken.

Frau Frederike Müller danke ich ganz besonders für die angenehme Arbeitsatmosphäre, ihre große Kompetenz in der medizinisch technischen Assistenz, den Teestunden und ihren Rezepten in allen Labor- u. Lebensfragen.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die meiner Arbeit Geduld und Verständnis entgegenbrachte. Meiner Mutter, die mein Leben mit viel Anteilnahme begleitet. Meiner Schwiegermutter für ihre frohe Zuversicht. Danke Paul und Max. Und meinen Freunden, die auch nach langen Jahren mir immer wieder Mut gemacht haben. Danke Nadege.

Mein tiefster Dank gilt meinem Mann, Jens, der mich während des Schreibens dieser Arbeit unermüdlich mit viel Optimismus und Konstruktivität unterstützt hat. Ich danke ihm für sein Verständnis und seine Geduld in diesen anstrengenden Zeiten der Vielfachbelastungen, aber auch für seine kritischen Anmerkungen, seine tatkräftige Hilfe am Computer und dem Zubereiten vieler Tassen Cappuccino. Ohne seine Begleitung und Stärkung wäre vieles nicht möglich gewesen.

Danke!

## 9. Lebenslauf

- 05.03.1971 geboren in Freiburg im Breisgau (geb. Ilic)
- 1977-1981 Besuch der Turnseegrundschule in Freiburg im Breisgau
- 1981-1990 Besuch der Staudinger-Gesamtschule in Freiburg im Breisgau, Beendigung mit dem Abitur
- 1991-1994 Studium der Humanmedizin an der Albert-Ludwig Universität Freiburg,
- 1993 Physikum
- 1994 1. Staatsexamen
- 1994-1998 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität zu Lübeck
- 1995-1996 Experimenteller Teil der Dissertation
- 1997 2. Staatsexamen
- 1997-1998 Praktisches Jahr: Innere Medizin (Medizinische Universität zu Lübeck), Pädiatrie (Tulane University, New Orleans, USA) und Chirurgie (Kantonsspital Basel, Basel, Schweiz)
- 1998 3. Staatsexamen
- 1998-2000 ÄiP an der Universitätsklinik zu Lübeck, Klinik für Innere Medizin, Med.I
- 2000-2001 Assistenzärztin an der Universitätsklinik zu Lübeck, Klinik für Innere Medizin, Med. I
- 2002-2004 Assistenzärztin am Kantonsspital Basel, Klinik für Innere Medizin, Klinik B, Basel, Schweiz
- 2003 schriftliches und mündliches Examen, FMH Innere Medizin, Schweiz

seit 2004 in Erziehungszeit, Geburt der Kinder 2004 und 2006

seit 2006 Zusatz- Weiterbildung Palliativmedizin an der Mildred Scheel Akademie, Köln

Die experimentellen Untersuchungen für die vorliegende Dissertation wurden 1995-1996 durchgeführt und abgeschlossen. Es folgten Publikationen aus der Dissertation 1996, 1997, 1998, 2000 und 2001. Mit Beginn der klinischen Assistenz Tätigkeit wurde das Verfassen der Arbeit, unterbrochen. Durch beruflich und familiär bedingte Auslandsaufenthalte in der Schweiz und den Niederlanden wurde die Fertigstellung der vorliegenden Arbeit bis 2007 verzögert. Nach Rücksprache mit dem Vorsitzenden des Promotionsausschusses Prof. Dr. med. K.-F. Klotz, wurde das Verfassen der Arbeit wieder aufgenommen und 2008 abgeschlossen.

## Publikationsliste

1. Ilic S, Kreft B, Kahl A, Frei U, Sack K, Trautmann M: Nasale Staphylococcus aureus-Besiedlung und Exit-Site Infektion (ESI) bei kontinuierlicher ambulanter Peritonealdialyse (CAPD): Eine klinische und experimentelle Studie. 48. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Bonn (1996)
2. Ilic S, Leeker A, Kahl A, Gahl GM, Becker H, Frei U, Trautmann M, Sack K, Kreft B: Nasale Staphylococcus aureus-Besiedlung und Exit-Site Infektion (ESI) bei kontinuierlicher ambulanter Peritonealdialyse (CAPD): Eine klinische und experimentelle Studie. Aktuelle Nephrologie 30,495-502 (1997)
3. Kreft B, Ilic S, Leeker A, Frei U, Trautmann M, Sack K: Eine klinische und experimentelle Studie zur nasalen Besiedlung mit Staphylococcus aureus und ihrer Bedeutung für Exit-Site Infektionen bei kontinuierlicher ambulanter Peritonealdialyse. Focus MUL 14,82-87 (1997)
4. Kreft B, Ilic S, Ziebuhr W, Kahl A, Frei U, Sack K, Trautmann M: Adherence of Staphylococcus aureus isolated in peritoneal dialysis-related exit-site infections to HEp-2 cells and silicone peritoneal catheter materials. Nephrol Dial Transplant 13,3160-3164 (1998)
5. Trautmann M, Moericke A, Kahl A, Ziebuhr W, Ilic S, Kreft B: In-vitro-Aktivität von Quinupristin-Dalfopristin im Vergleich mit anderen Antibiotika gegenüber S. aureus-Stämmen von Patienten unter CAPD. Chemotherapie Journal 9,27-32 (2000)
6. Kreft B, Eckstein S, Kahl A, Frei U, Witte W, Trautmann M: Clinical and genetic analysis of Staphylococcus aureus nasal colonisation and exit-site infection in patients undergoing peritoneal dialysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 20,734-737 (2001)