

DIPLOMARBEIT

**Nekrotisierende Enterokolitis auf der neonatologischen
Intensivstation der Universitätsklinik für Kinder- und
Jugendheilkunde, Graz und die spezielle Rolle von ESBL-
(*extended spectrum beta lactamase*) bildenden
Enterobakterien**

eingereicht von

Tanja Schnabl

geboren am 09.02.1987

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Dr.ⁱⁿ med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde

unter Anleitung von

Univ. Ass. PD Dr. Volker Strenger

und

Univ. Prof. Dr. Berndt Urlesberger

Ort, Datum.....

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Eibiswald, am

Unterschrift

Für Ferli, Max, Heidi, Uwe und Carmen

VORWORT

Die Idee für diese Diplomarbeit entstand im Laufe einer bereits mehrjährigen Zusammenarbeit mit Univ. Ass. PD Dr. Volker Strenger.

Da mein besonderes fachliches Interesse schon seit Beginn meines Studiums der Pädiatrie gilt, habe ich an einigen Wahlfächern an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Graz teilgenommen. Im Rahmen der „Pädiatrischen Infektiologie“ ergab sich schließlich für mich die Mitarbeit an einem Projekt von Univ. Ass. PD Dr. Strenger.

Bereits 2009 beschäftigten wir uns erstmals mit der Bestandsaufnahme der ESBL-Problematik an der Grazer Kinderklinik. Es folgten Posterpräsentationen über die Inzidenz von ESBL-Bildnern bis zum intestinalen Keimspektrum Neugeborener, ein Artikel wurde im *Journal of Antimicrobial Agents* publiziert. Im Zuge der retrospektiven Datenanalyse für ein anderes Projekt, wurden wir auf das Jahr 2005 mit einer besonders hohen Zahl an detektierten ESBL-Bildnern und einer hohen Inzidenz der nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) aufmerksam. Da im Pathogenesemodell der NEC die bakterielle Kolonisation des kindlichen Darms eine wichtige Rolle spielt, untersuchten wir in Folge einen möglichen Zusammenhang dieser beiden Beobachtungen.

DANKE!

Zuerst möchte ich mich bei Univ. Ass. PD Dr. Volker Strenger für die tolle Zusammenarbeit in den letzten 3 Jahren bedanken. Er gab mir im Zuge seiner Projekte die Möglichkeit, erste Einblicke in die Funktions- und Arbeitsweisen der klinischen Forschung zu sammeln, sowie im Rahmen dieser Diplomarbeit eine eigene wissenschaftliche Arbeit anzufertigen. Vielen Dank für die Geduld und Ausdauer Zusammenhänge zu erklären, mir die wissenschaftliche Sprach- und Schreibweise näherzubringen und mir stets mit guten Ratschlägen und Ideen weiterzuhelfen. Ich kann nur für alle folgenden Studierenden hoffen, dass es demnächst eine Lehrveranstaltung von Univ. Ass. PD Dr. Strenger zum Thema „Einführung in die klinische Forschung – Systematik, Projektentwicklung und Realisation“ geben wird.

Hrn. Univ.Prof. Dr. Berndt Urlsberger möchte ich für seine kompetenten Hilfestellungen in allen Fragen der Neonatologie und seine Bereitschaft, diese Arbeit mit zu betreuen herzlich danken.

Vielen Dank auch an die MitarbeiterInnen des Instituts für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin, allen voran Ass. Prof. Dr. Gebhard Feierl, für die Durchführung der Analysen und Tests, Bereitstellung der Daten und Bilder sowie der stets äußerst fachkundigen und hilfreichen Erläuterungen zum Thema ESBL.

Frau Gober vom Institutssekretariat der Neonatologie gilt besonderer Dank für die Bereitstellung der patientenbezogenen Daten.

Ich danke meinem Mann Ferdinand, für die tagtägliche Unterstützung während meines Studiums. Du bist mein Ruhepol, hast mich motiviert und mich mit viel Geduld während anstrengender Phasen ertragen. Danke für deine zuverlässige Hilfe in IT-Fragen und als Kommunikationscoach. Ich liebe dich.

Meinen Eltern möchte ich für die Möglichkeit, mir meinen Berufswunsch zu erfüllen, herzlich danken. Ihr habt meine Pläne und Ideen stets unterstützt und mir Rückhalt gegeben. Ich danke auch Uwe und Carmen für den liebevollen Zusammenhalt.

Ich möchte mich außerdem bei meinen FreundInnen und KollegInnen bedanken. Euer kreativer Input, viele anregende Gespräche und Diskussionen sowie gemeinsame Erlebnisse haben meine Studienzeit einzigartig gemacht.

ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund

Intestinale (Fehl-) Besiedelung gilt neben anderen als Risikofaktor für die Entwicklung einer nekrotisierenden Enterokolitis (NEC). *Extended Spectrum Beta-Lactamase* bildende Enterobakterien (ESBL-E.) stellen zunehmend auch in der Neonatologie ein Problem dar. Mit dieser Studie möchten wir einen möglichen Zusammenhang zwischen einer Besiedelung mit ESBL-E. und der Entwicklung einer NEC untersuchen.

Methoden:

Nach dem ersten Auftreten von ESBL-E. an der neonatologischen Intensivstation (NICU) der Medizinischen Universität Graz 2004, wurde eine zweimal wöchentlich durchgeführte Analyse von Stuhlproben aller stationären Kinder etabliert. Die retrospektive Analyse der klinischen und mikrobiologischen Daten aller PatientInnen der NICU Graz von Jänner 2005 - September 2011, untersuchte eine mögliche Assoziation zwischen der Entwicklung einer NEC und einer ESBL-E. Besiedelung sowie anderer Risikofaktoren. Mit RepPCR (Diversilab®, bioMérieux) wurden Klonalität der Stämme sowie die ESBL-Enzyme mittels PCR bestimmt. Für die statistischen Analysen wurden MS Excel® und SPSS 18.0 for Windows® verwendet.

Ergebnisse:

Von **3897** PatientInnen wurden **146 (3,7%)** Früh- und Neugeborene mit ESBL-E. besiedelt. 16 entwickelten eine NEC, von diesen waren **7 (43,8%) mit ESBL-E. besiedelt**. ESBL-E. besiedelte Kinder entwickelten signifikant ($p < 0,001$) häufiger eine NEC im Vergleich zu Kindern ohne ESBL-E. Nachweis. Wir entdeckten 2 ESBL-bildende Spezies (*Klebsiella pneumoniae* und *Klebsiella oxytoca*) in den Kulturen der NEC-PatientInnen, 2 verschiedene Klone von ESBL-bildenden *Klebsiella pneumoniae* wurden identifiziert. 5x konnte das Enzym CTX-M-3 und 1x SHV12 identifiziert werden.

Diskussion:

Die Ergebnisse weisen auf einen möglichen Zusammenhang zwischen einer Besiedelung mit ESBL-Bildnern und der Entwicklung einer NEC hin. Da die NEC-Inzidenz in Graz – trotz des großen untersuchten Kollektivs – gering ist und sowohl NEC als auch Besiedelung mit ESBL-Bildnern i.e.L. Probleme Frühgeborener mit geringem Geburtsgewicht sind, wird die Aussagekraft der Studie möglicherweise dadurch limitiert.

ABSTRACT

Background:

Though the exact pathogenesis of necrotising enterocolitis (NEC) is not yet known in detail, bacteria seem to play a large role in initial gut injury mechanisms. Extended spectrum beta lactamase-producing *enterobacteriaceae* (ESBL-E.) are a growing problem, especially in intensive care units (ICU's), around Europe. The aim of this study was to describe a NEC collective concerning colonisation with ESBL-*enterobacteriaceae*.

Methods:

We retrospectively analysed **3897** newborns who attended the neonatal intensive care unit (NICU) of the University Hospital for Paediatrics and Adolescent Medicine Graz between January 2005 and September 2011. To identify the colonisation with ESBL-E., stool cultures were routinely taken twice a week. Clonality of the strains and ESBL- enzymes were detected by Diversilab© by bioMérieux and PCR, respectively. We performed descriptive statistic procedures with MS Excel© and SPSS 18.0 for Windows©.

Results:

We detected **146 (3,7%)** patients colonised with ESBL-E. 16 patients developed NEC, **7 (43,8%)** were found ESBL-E. positive. NEC was developed significantly ($p < 0.001$) more frequent in neonates who were colonised with ESBL-E. than in neonates without ESBL-E. colonisation. In NEC patients, we detected 2 different ESBL-producing species (*Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*), 2 different clones of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* were identified. Following ESBL-enzymes were found: CTX-M-3 (5x) and SHV-12 (1x).

Discussion:

This results show a possible association between colonisation with ESBL-E. and development of NEC. Although we analysed a large collective, the NEC incidence in Graz is low. As NEC and colonisation by ESBL-E. both are mainly problems of preterm children with low birth weight, those possible confounders may limitate the statement of this study.

INHALT

Eidesstattliche Erklärung	ii
Vorwort	iv
Danke!.....	v
Zusammenfassung.....	vi
Abstract	vii
Abkürzungsverzeichnis	x
Abbildungsverzeichnis	xiv
Tabellenverzeichnis	xvi
1. Einleitung.....	1
2. Nekrotisierende Enterokolitis.....	3
2.1 Epidemiologie	3
2.2 Ätiologie und Pathogenese	4
2.2.1 Frühgeburtlichkeit	5
2.2.2 Intestinale Unreife und Ernährung.....	8
2.2.3 Immunologie.....	11
2.2.4 bakterielle Besiedelung	21
2.3 Diagnostik.....	25
2.3.1 Klinische Symptome	25
2.3.2 Labor	27
2.3.2 Radiologische Befunde	28
2.4 Klassifizierung der NEC nach Bell	31
2.5 Differenzialdiagnosen der NEC und alternative Klassifizierung	33
2.5.1 Spontane Intestinale Perforation	33
2.5.2 Frühe virale Enteritiden	34
2.5.3 Kuhmilchproteinallergie.....	35
2.5.4 Andere Differentialdiagnosen	36
2.5.5 Alternative Klassifizierung der NEC	38
2.6 Therapie und Prävention.....	40
2.6.1 Konservative NEC-Therapie	41

2.6.2 Chirurgische NEC-Therapie.....	41
2.6.3 Präventive Faktoren	42
3. Bakteriologie	46
3.1 Enterobakterien	46
3.1.1 Antigene und Virulenzfaktoren	48
3.1.2 Genetik.....	49
3.2 Beta-Lactame und Beta-Lactamasen	51
3.2.1 ESBL.....	53
3.2.2 andere β -Lactamasen.....	58
3.3 Epidemiologie	59
3.4 ESBL Diagnostik.....	63
3.4.1 Methoden	63
3.5 Management	70
4. Zusammenhang zwischen einer Besiedelung mit ESBL-Bildnern und NEC.....	72
4.1 Einleitung	72
4.2 PatientInnen und Methoden.....	74
4.3.1 Daten und Definitionen	74
4.3.2 Testparameter	75
4.3.3 ESBL-Screening	77
4.3.4 Statistische Auswertung	78
4.4 Ergebnisse	79
4.4.1 ESBL.....	79
4.4.2 NEC	82
4.4.3 Zusammenhang.....	85
5. Diskussion.....	89
5.1 Einflussfaktoren	90
5.2 Zukunft	91
6. Literaturverzeichnis	92
7. Lebenslauf.....	98

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Arteria
AIS	Amnioninfektionssyndrom
APC	<i>antigen presenting cells</i> (Antigen-präsentierende Zellen)
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i> (akutes Atemnotsyndrom)
BW	<i>birth weight</i> (Geburtsgewicht)
CA	<i>clavulanic acid</i> (Clavulansäure)
CFA	<i>colonisation factor</i> (Kolonisationsfaktor)
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CO ²	Kohlenstoffdioxid
CPAP	<i>continuous positive airway pressure</i> (kontinuierlicher positiver Atemwegsdruck)
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CRP	C-reaktives Protein
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
EARSS	<i>European Active Resistance Surveillance System</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELBW	<i>extremely low birthweight</i> (extrem geringes Geburtsgewicht)
ESBL	<i>extended spectrum beta-lactamase</i> (Beta-Lactamase mit erweitertem Wirkspektrum)
ESCMID	<i>European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>

Fe ²⁺	zweiwertiges Eisen
FIP	<i>feeding intolerance of premature</i> (Intoleranz gegenüber enteraler Ernährung von Frühgeborenen)
g	Gramm
GA	Gestationsalter
GALT	<i>gut associated lymphatic tissue</i> (Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe)
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GG	Geburtsgewicht
GIT	Gastrointestinaltrakt
GT	errechneter Geburtstermin
h	<i>hour(s)</i> (Stunde/n)
IFN	Interferon
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
I/T ratio	<i>immature/total ratio</i> (unreife/Gesamtzahl ratio der Granulozyten im Differentialblutbild)
ICU	<i>intensive care unit</i> (Intensivstation)
I-FABP	<i>intestinal fatty acids binding protein</i>
IL	Interleukin
Ig	Immunglobulin
IS	Immunsystem
IVH	<i>intraventricular hemorrhage</i> (intraventrikuläre Blutung)
kal	Kalorie

kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lebenstag
Mb	Morbus
MBL	Metallo- β -Lactamase
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	mindestens/Minute(n)
ml	Mililiter
MM	Muttermilch
MMP	Matrix Metalloproteinase
MUG	Medizinische Universität Graz
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
NICU	<i>neonatal intensive care unit</i> (neonatologische Intensivstation)
Omp	<i>outer membrane proteine</i>
p.o.	per os
PAF	<i>platelet activating factor</i> (Plättchen aktivierender Faktor)
PbP	Penicillin-bindendes Protein
PCT	Procalcitonin
PMN	<i>polymorphonuclear leucocyte</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
repPCR	<i>repetitive poly chain reaction</i>

RNA	<i>ribonucleinic acid</i> (Ribonukleinsäure)
SAA	Serumamyloid A
SCFA	<i>short chain fatty acid</i> (kurzkettige Fettsäure)
SDD	<i>selective digestive decontamination</i> (selektive Darmdekontamination)
slg	sekretorisches Immunglobulin
SIP	<i>spontaneous intestinal perforation</i> (spontane Darmperforation)
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i> (Syndrom der systemischen Entzündungsreaktion)
sp	Spezies (Singular)
spp	Spezies (Plural)
SSW	Schwangerschaftswoche
TAZ	Tazobactam
TIMP	<i>tissue inhibiting metallo-proteinase</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
V	Vena
VEI	<i>viral enteritis of infancy</i> (frühe virale Enteritiden)
VLBW	<i>very low birthweight</i> (sehr geringes Geburtsgewicht)
ZVK	zentral venöser Katheter

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Frühgeborenes mit invasiver nasotrachealer Beatmung; aus (57)	7
Abbildung 2: Zusammenfassung der unreifen intestinalen Mechanismen; aus(14)	10
Abbildung 3: Pathogenesemodell der NEC; aus(18).....	20
Abbildung 5: Frühgeborenes (GA 27+1) mit 990g und NEC; zur Verfügung gestellt von Univ. Prof. Dr. Bernhard Resch	26
Abbildung 6: massiv ausgeprägte Pneumatosis intestinalis im Rahmen einer NEC; aus (30)	29
Abbildung 7: sonografischer Nachweis von perlschnurartig aneinander gereihten Gasbläschen im Rahmen einer NEC; aus (31)	30
Abbildung 8: subdiaphragmale Luftsichel in Folge einer Darmperforation bei NEC; aus (32)	30
Abbildung 9: intraoperativer Situs bei explorativer Laparotomie; aus (34)	42
Abbildung 10: Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>E.coli</i> ; aus (42)	46
Abbildung 11: Schematische Darstellung eines Bakteriums; aus (44)	49
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Konjugation zwischen Bakterien; aus (45)	50
Abbildung 13: Grundformeln der Beta-Lactam Antibiotika als Strukturformel; aus (47)	51
Abbildung 14: schematische Darstellung der Resistenz gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation 2004 in Europa, aus (51)	59
Abbildung 15: Übersicht über die Resistenzraten gegenüber Cephalosporine der 3. Generation 2008 in Europa; aus(52)	60
Abbildung 16: Resistenzraten von <i>E.coli</i> gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation der europäischen Länder 2010; <i>EARSS interactive database</i>	61
Abbildung 17: Vergleich der Resistenzentwicklung von <i>Klebsiella pneumoniae</i> zwischen 2008 und 2010; <i>EARSS interactive database</i>	61

Abbildung 18: Phänotyp eines Agardiffusionstests bei ESBL-Testung; aus (54).	65
Abbildung 19: Phänotyp eines ESBL-positiven <i>Citrobacter spp.</i> ; Bild zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Gebhard Feierl	69
Abbildung 20a+ 20b: Vitek 2 des Instituts für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin der MUG; Vitek- Resistenzbefund einer speziell zur Harndiagnostik zusammengestellten Antibiotika-Konstellation; Bilder zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Gebhard Feierl	66
Abbildung 21: E-test von <i>Ceftazidim</i> ; Bild zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Gebhard Feierl.....	67
Abbildung 22: ESBL-Screeningplatte mit integriertem Cephalosporin der 3. Generation; Bild zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Gebhard Feierl	77
Abbildung 23: Verteilung der ESBL-positiven Stuhlkulturen und Screeningtests auf den Beobachtungszeitraum.....	79
Abbildung 24a+b: Boxplot Diagramme..	81
Abbildung 25: Verteilung der NEC-Fälle von 2000-2011	82
Abbildung 26a+b: Boxplot Diagramme..	83
Abbildung 27: Dendrogramm.....	87
Abbildung 28: Verteilung der positiven ESBL-Tests und NEC-Fälle im Beobachtungszeitraum.....	85

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Definition der Frühgeburtlichkeit; aus (1)	1
Tabelle 2: Pathogene im Zusammenhang mit NEC; aus (16)	23
Tabelle 3: Klassifizierung der NEC nach Bell; aus (19),(13)	31
Tabelle 4: Übersicht über das Management bei NEC; aus (34)	40
Tabelle 5: Opportunistische Enterobakterien und deren wichtigste mikrobiologische Merkmale; aus (41)..	47
Tabelle 6: Überblick über die β -Lactam Antibiotika; aus (63)	52
Tabelle 7: Klassifikation der β -Lactamasen; aus (49).	55
Tabelle 8: Auswahl aus dem EUCAST <i>clinical breakpoint table</i> ; aus (56)	65
Tabelle 9: Auswahl aus dem EUCAST <i>clinical breakpoint table</i> ; aus (56)	67
Tabelle 10: GA und GG der PatientInnen mit und ohne positivem ESBL-Befund.	80
Tabelle 11: Deskriptive Statistik zum Gestationsalter (GA) und Geburtsgewicht (GG)..	83
Tabelle 12: ESBL-NEC 4-Feldertafel	85
Tabelle 13: Deskriptive Statistik des Alters bei NEC.....	86
Tabelle 14: Entzündungsparameter von NEC-PatientInnen mit und ohne ESBL-Bildner.	88

1. EINLEITUNG

Die nekrotisierende Enterokolitis (NEC) ist eine akut auftretende entzündliche Erkrankung des Dün- und Dickdarms. Im Verlauf kann sie zu einem septischen Krankheitsbild mit disseminierten Darmnekrosen und Darmperforation führen.

Die NEC ist die häufigste Ursache gastrointestinaler Notfälle Neugeborener, vor allem Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht unter 1500g sind gefährdet.

Definition Frühgeburtlichkeit:	Geburt vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche (SSW; <260 Tage)
Definition nach Geburtsgewicht (GG):	GG <2500g: <i>low birthweight infant</i> GG <1500g: <i>very low birthweight infant</i> GG <1000g: <i>extremely low birthweight infant</i>

Tabelle 1: Definition der Frühgeburtlichkeit(1)

Die NEC ist eine multifaktorielle Erkrankung, es spielen mehrere pathogenetische Faktoren eine Rolle(1,2):

- Unreife der intestinalen Mechanismen
- Bakterielle (Fehl-) Besiedelung des kindlichen Darms
- Orale Ernährung

Intestinale Fehlbesiedelung gilt neben geringem Gestationsalter und geringem Geburtsgewicht (in 90% der Fälle sind Frühgeborene betroffen) als Risikofaktor, eine nekrotisierende Enterokolitis zu entwickeln(3,4). Die NEC tritt sporadisch, aber auch epidemisch auf, weshalb ein infektiöses Geschehen als Ursache diskutiert wird. Ein einzelnes auslösendes Agens bzw. eine ursächliche Spezies konnte nicht identifiziert werden, jedoch wurden verschiedene Pathogene mit der Entwicklung einer NEC in Zusammenhang gebracht(1).

Internationale Überwachungsprogramme wie z.B. das europäische EARSS (*European Antimicrobial Resistance Surveillance Systems*) liefern in den letzten Jahren vermehrt Daten hinsichtlich einer Zunahme an Enterobakterien-Isolaten, welche mit der Fähigkeit *Extended Spectrum Beta Lactamasen* (ESBL) zu bilden ausgestattet sind und somit Resistenzen gegen fast alle Beta-Lactam Antibiotika aufweisen (siehe

Kapitel 3.3 Epidemiologie). In der Literatur existieren Berichte über nosokomiale Ausbrüche von ESBL-bildenden Enterobakterien, wo simultan auch die Inzidenz der NEC-Fälle stark anstieg(5,6).

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde versucht, einen möglichen Zusammenhang zwischen einer intestinalen Besiedelung mit ESBL-bildenden Enterobakterien (ESBL-E.) und der Entwicklung einer NEC in der neonatologischen Intensivstation (*neonatal intensive care unit*; NICU) der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Graz aufzuzeigen.

2. NEKROTISIERENDE ENTEROKOLITIS

2.1 EPIDEMIOLOGIE

Die Zahl der PatientInnen auf neonatalen Intensivstationen nahm in den letzten Jahrzehnten durch die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten, speziell für frühgeborene Kinder, konstant zu. Mit dem vermehrten Überleben auch der kleinsten Frühgeborenen (VLBW, ELBW) seit flächendeckender Einführung der *Surfactant*-Therapie in den 1980er Jahren, nahm auch die Inzidenz der NEC zunächst zu und lag bis zur Mitte der 1990er Jahre bei durchschnittlich 12% aller stationären PatientInnen einer NICU. Vor allem den verbesserten Hygienemaßnahmen, aber auch verschiedenen Präventionsstrategien ist es zu verdanken, dass die Inzidenz seither gesenkt werden konnte(7):

1-3 von 1000 lebend geborenen Kindern entwickeln eine NEC(8). Von allen PatientInnen, die stationär an einer NICU behandelt werden, erkranken zwischen 1% und 7,7% an einer NEC, in 90% sind Frühgeborene davon betroffen(9). 2-5% der Kinder mit VLBW erkranken an einer NEC(8).

Die Prävalenz der NEC variiert geografisch stark, die Erkrankung kann auch epidemisch auftreten(8).

Die Mortalität der NEC beträgt durchschnittlich 25-30%, im höchsten Stadium 3 mit Notwendigkeit zur chirurgischen Intervention bis zu 54% (für Kinder mit ELBW bzw. GA <28 Wochen auch noch höher)(8). 25-50% der NEC-PatientInnen benötigen eine chirurgische Therapie, die postoperative Morbidität ist mit durchschnittlich 47% ebenfalls hoch (9% entwickeln eine Sepsis, 6% haben Wundinfektionen und 2,3% der Kinder erfahren intraabdominelle Abszessbildungen)(10).

10% der Überlebenden Kinder entwickeln ein Rezidiv der Erkrankungen, 50% leiden unter Langzeitfolgen der NEC wie Ausbildung von Briden, Kurzdarmsyndrom und intrahepatische Cholestase(8).

2.2 ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE

Nach 50 Jahren intensiver Forschung gibt es verschiedene Theorien zur **Ätiologie** der nekrotisierenden Enterokolitis. Die NEC ist eine multifaktorielle Erkrankung und man untersucht seit den 1960er Jahren ihre komplexe **Pathogenese**. Die WissenschaftlerInnen befassten sich vor allem mit den „am wichtigsten empfundenen Risikofaktoren(9)“:

- Frühgeburtlichkeit
- enterale Ernährung
- Schädigung der intestinalen Mukosa
- intestinale Kolonisation mit Bakterien

Meilensteine der NEC-Ursachenforschung:

Von Interesse der ersten klinischen Studien war die Problematik der postnatalen **Ernährung** Frühgeborener(9,11).

Martin J. Bell hat Ende der 1970er Jahre die Bedeutung der **bakteriellen Besiedelung des kindlichen Darms** im Zusammenhang mit der NEC entdeckt(3,4,12). Zusätzlich hat er eine Klassifikation der NEC anhand klinischer Symptome entwickelt, die die Grundlage therapeutischer Entscheidungen darstellen sollte(13), sie ist in leicht modifizierter Weise bis heute im klinischen Einsatz.

Die Epidemiologie der NEC mit gehäuftem Auftreten der Erkrankung und das septische Krankheitsbild lassen an eine **Infektionskrankheit** denken(1). Bestrebungen, ein einzelnes infektiöses Agens als Ursache zu entdecken, sind fehlgeschlagen.

Auch fehlende oder nur sehr langsame Anpassung der intrauterinen Physiologie an die postnatalen Gegebenheiten (**Peristaltik, Ingestion, physikalische Barriere**) sowie die Mechanismen des **angeborenen und erworbenen Immunsystems** sind immer noch Gegenstand der Forschung(14-16).

Die Entwicklung der Molekularbiologie führte zur Entdeckung von neuen, ätiologisch interessanten, Faktoren: *platelet activated factor* (PAF), intestinale Toll-like-Rezeptoren (TLR), kurzkettige Fettsäuren (*short chain fatty acids*; SCFAs) und die Aktivierung der **Cytokin-induzierten Entzündungskaskade** seien hier zu nennen (9,17). Ihnen allen ist gemein, dass sie zu einer massiven Entzündungsreaktion des Körpers führen können (*systemic inflammatory response syndrome*; SIRS).

2.2.1 FRÜHGEBURTlichkeit

Die Frühgeburtlichkeit ist der wichtigste Risikofaktor eine NEC zu entwickeln, aber auch reifgeborene Kinder können an NEC (5-25% der Fälle(18)) erkranken.

Definition Frühgeburtlichkeit siehe Tabelle 1 auf Seite x.

Ursachen der Frühgeburt bzw. zusätzliche Risikofaktoren der NEC:

- Vorzeitige Wehen/ vorzeitiger Blasensprung
- Amnioninfektionssyndrom (AIS) und Chorioamnionitis (proinflammatorische Zytokine – systemische fetale Entzündungsreaktion)
- Mütterliche Erkrankungen wie Präeklampsie
- Akute Plazentalösung
- Mehrlingsschwangerschaften

Die Epidemiologie der NEC in den 1970er Jahren zeigt hauptsächlich Frühgeborene ≥ 30 SSW(19). Ohne Surfactantsubstitution war das Atemnotsyndrom (*acute respiratory distress syndrome*; ARDS) die häufigste Todesursache der Neonatalperiode (60% der Frühgeborenen <30 SSW entwickeln ein ARDS). Seit der Erstbeschreibung einer Surfactantsubstitutionsbehandlung 1980 durch Fujiwara et al. (1) und dem v.a. dadurch bedingten Überleben immer jüngerer Frühgeborener, zählen die VLBW- und ELBW-Kinder zur Hochrisikogruppe der NEC (siehe dazu auch Kapitel 2.3 Klassifizierung der NEC nach Bell).

2.2.1.1 ATEMNOTSYNDROM

Wesentliche Ursache des ARDS ist ein Mangel des pulmonalen oberflächenaktiven Stoffes **Surfactant** (*surface active agent*), welcher die Oberflächenspannung der Alveolen vermindert und dem expiratorischen Alveolarkollaps vorbeugt.

Bei einem Atemnotsyndrom entwickeln sich unmittelbar nach der Geburt Atelektasen in den Lungen Frühgeborener, die Minderbelüftung führt zu Hypoxie und Hypoxämie. Die Folge ist eine systemische Hypotension, der CO₂- Partialdruck steigt an und es entwickelt sich eine Azidose(1).

Eine **Hypoxie - Hypotonieperiode** kann zur Unterversorgung und Schädigung der Darmepithelien führen, die intestinale Barriere wird durchlässig und eine NEC kann entstehen (s.u.).

2.2.1.2 NEONATALE SEPSIS

Die Neugeborenenensepsis ist eine disseminierte mikrobielle Erkrankung, die durch die klinischen Symptome einer **systemischen Entzündungsreaktion** (*systemic inflammatory response syndrome*; SIRS) und die Bakteriämie charakterisiert ist.

Man unterscheidet 2 Verlaufsformen:

- *Early onset Sepsis* (früheinsetzende Sepsis): Auftreten der Symptome vor dem vollendeten 5. Lebenstag (LT), der Erreger entstammt meist dem Keimspektrum der Vagina, z.B.: Streptokokken der Gruppe B, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus sp.* u.a.
- *Late onset Sepsis* (späteinsetzende Sepsis, nosokomiale Sepsis): Auftreten der Symptome nach dem 5. LT, der Erreger ist meist ein nosokomialer (Hospitalismus-) Keim, z.B.: *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus sp.*, *Candida albicans* u.a.

Risikofaktoren der early onset Sepsis(1):

- Vorzeitiger Blasensprung und Amnioninfektionssyndrom
- Fieber/Bakteriämie der Mutter
- Frühgeburtlichkeit
- Vaginale und/oder rektale Kolonisation der Mutter mit pathogenen Erregern (Infektion auf dem Geburtsweg)

Risikofaktoren der nosokomialen/late onset Sepsis sind intensivmedizinische Maßnahmen (Intubation und Beatmung, zentrale Katheter, Lipidinfusionen), mangelhafte Hygiene (unzureichende Händedesinfektion) und Kontamination der Oberflächen mit Hospitalismuskeimen. Intensivmedizinisch behandelte Früh- und Neugeborene zählen zu den Risikopatienten für eine nosokomiale Sepsis(1).



Abbildung 1: Frühgeborenes mit invasiver nasotrachealer Beatmung; aus (57)

Klinische Symptome der neonatalen Sepsis(1):

- Temperaturinstabilität: Hyper-, Hypothermie
- Atemstörungen: Tachypnoe, Bradypnoe, Apnoe → Hypoxie/Hypoxämie
- Zirkulatorische Insuffizienz: periphere Mikrozirkulationsstörungen, Blässe, grau-marmoriertes Hautkolorit, septischer Schock, Multiorganversagen, disseminierte intravasale Gerinnung
- Gastrointestinale Symptome: Trinkschwäche, Erbrechen, abdominelle Distension → Intoleranz gegenüber enteraler Ernährung (FIP, siehe Kapitel Klassifizierung der NEC nach Bell)

Entzündungsindikatoren werden als Warn- und Verlaufsparemeter einer neonatalen Infektion gesehen. Dazu gehören die Gesamtzahl der Leukozyten am 1. LT, die Gesamtzahl aller neutrophilen Granulozyten, der unreifen Granulozyten und der I/T-Ratio (Quotient aus der Zahl der unreifen [*immature*] Zellen und der Gesamtzahl [*total*]). Eine Thrombozytopenie tritt bei ca. 30% im Verlauf der Erkrankung auf. Erhöhte Werte des C-reaktiven Proteins (CRP) und des Interleukins 6 (Il6) weisen auf eine Infektion hin (1).

Eine Infektion mit systemischer Entzündungsreaktion kann die intestinalen Epithelien schädigen (siehe gastrointestinale Symptome und Kapitel 2.2.3 Immunologie), die Barriere wird durchlässig und eine NEC kann entstehen(1).

2.2.2 INTESTINALE UNREIFE UND ERNÄHRUNG

2.2.2.1 INTOLERANZ ENTERALER ERNÄHRUNG

Bei der schrittweisen Etablierung der enteralen Ernährung Frühgeborener, muss sich das Resorptionsvolumen der Darmmukosa an die Nahrungsmenge anpassen. Ebenso muss sich der Plexus myentericus Auerbach an die Bolusgaben der Nahrung (>20 kal/kgKG/Tag) anpassen und die Peristaltik dementsprechend koordinieren, was zusammen mit einer effektiven Saug-Schluck-Koordination normalerweise mit einem Alter von 32-34 Gestationswochen entwickelt ist. Findet die Adaptation des Darms nicht in ausreichendem Maß statt, kommt es zur Stase unverdauter Nahrung – zumeist am jejunioilealen Übergang – und einer Fehlbesiedelung mit enteraler Flora(19).

Ein Ungleichgewicht zwischen zugeführter Nahrung und Verarbeitungskapazität im kindlichen Gastrointestinaltrakt führt zu den Symptomen der **Intoleranz enteraler Ernährung** (*feeding intolerance of prematurity*; FIP)(19):

- Vermehrtes Magenrestvolumen
- Gespanntes Abdomen
- Stuhlverhalt
- Apnoeoneigung

Tritt eine NEC auf, hat das Kind bereits fast immer Nahrung auf enteralem Weg erhalten. Oft beobachtet man erst Wochen nach Etablierung enteraler Ernährung erste Symptome der NEC, jedoch meist in zeitlichem Zusammenhang mit dem Erreichen der vollen Nahrungsmenge(9).

2.2.2.2 DIE PHYSIKALISCHE BARRIERE

Die intestinale physikalische Barrierefunktion besteht aus mehreren Ebenen. Frühgeborene verfügen noch über keine vollständig funktionierende intestinale Schranke(16)(14):

1. Das intestinale Epithel erhält durch *tight junctions* (Schlussleisten; *zonula occludentes*) ihre semipermeablen Eigenschaften. Sie limitieren das Eindringen von Bakterien und Makromolekülen, aber ermöglichen Transzytose und Absorption von Nährstoffen. Die wichtigsten Membranproteine der *tight*

junctions sind Occludine und Claudine, welche bei Frühgeborenen noch nicht vollständig miteinander interagieren – das gilt als der Hauptgrund für die **erhöhte Permeabilität** des Darmepithels.

2. Zwischen den Epithelzellen befinden sich schleimproduzierende Becherzellen. Der von ihnen produzierte Mukus enthält Glykoproteine wie Mucine und verschiedene Proteine wie z.B. den *trefoil factor*. Die Menge und Zusammensetzung des Mukus ändert sich postnatal nach Kontakt mit der mikrobiellen Flora und während der Heilungsphase nach einer Schädigung. Man geht davon aus, dass Defizite in der Produktion von Mukus sowie dessen Zusammensetzung bei Frühgeborenen die **Invasion von Bakterien** erleichtern – ein Schritt der Entstehung und Ausbreitung einer Infektion.
3. Die Säureproduktion der enterochromaffinen Zellen der Magenschleimhaut verhindert das Vorankommen von Bakterien in die proximalen Darmabschnitte. Bei Frühgeborenen ist der pH- Wert der Magensäure noch hoch und senkt sich erst mit ansteigendem Alter auf einen Wert <4.
4. Von Epithelien und Immunzellen produzierte Zytokine als Reaktion auf bakterielle Antigene wie Lipopolysaccharid (LPS) können möglicherweise die intestinale Barriere der *tight junctions* schwächen und die Invasion der Bakterien und ihrer Stoffwechselprodukte dadurch zu begünstigen. Mehr dazu im folgenden Kapitel Immunologie.

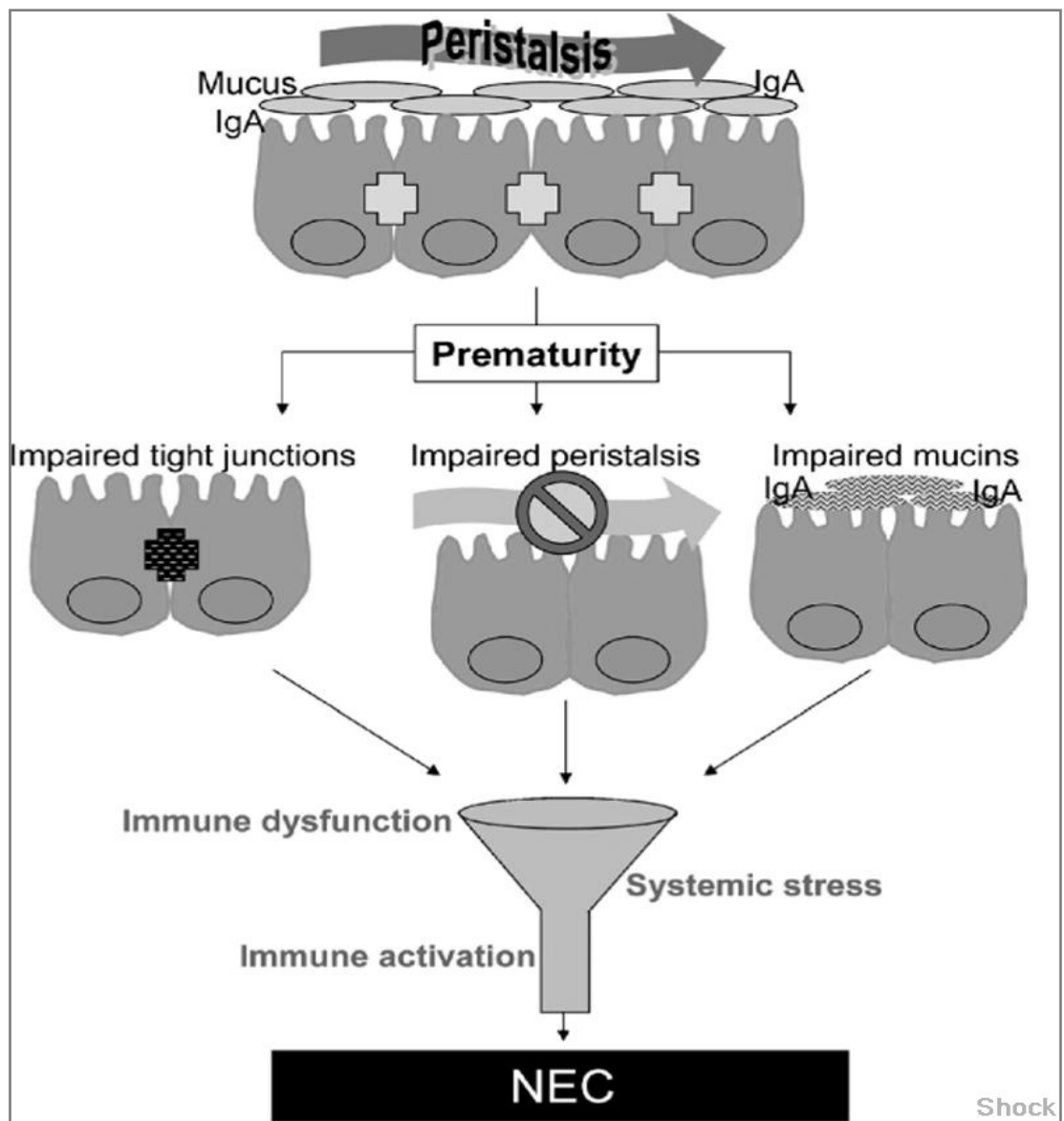


Abbildung 2: Zusammenfassung der unreifen intestinalen Mechanismen; aus(14)

2.2.3 IMMUNOLOGIE

Da Frühgeborene ein unreifes Immunsystem und herabgesetzte Abwehrfunktionen gegenüber Keimen haben, sind ein geschulter Umgang und spezielle Hygienerichtlinien erforderlich. Im Folgenden wird versucht, die Lücken der unreifen Abwehrmechanismen im Hinblick auf die Empfänglichkeit Frühgeborener für Infektionen, speziell des Intestinaltrakts, darzustellen.

2.2.3.1 ANGEBORENE UND ERWORBENE ABWEHRMECHANISMEN

Der Gastrointestinaltrakt verfügt über das größte lymphatische Gewebe des Körpers (*gut associated lymphatic tissue; GALT*), es ist zuständig für die Koordination von Immunreaktionen zwischen dem angeborenen und dem Erworbenen Immunsystem (IS). Das GALT besteht aus Lymphozyten (erworbenes IS), Gewebsmakrophagen, dendritischen Zellen, spezialisierten epithelialen Zellen genannt M-Zellen, die die Peyer-Plaques (Ansammlungen von Lymphozyten in allen Stadien) umhüllen und den Paneth'schen Körnerzellen in den Krypten des Darmepithels.

1.) Die Aufgabe von **Makrophagen und dendritischen Zellen** ist das Aufnehmen, Verarbeiten und Präsentieren von Antigenen (*antigen presenting cells; APC*) an Lymphozyten. Sie nehmen Antigene direkt aus dem Darmlumen auf oder übernehmen Antigene, die von M-Zellen prozessiert wurden und präsentieren sie(16). Durch die speziellen Rezeptoren dieser Zellen, die *pattern recognition receptors* (PRRs; z.B. Toll-like-Rezeptoren; TLR), können hochkonservierte Bakterienantigene (*pattern*) erkannt werden. Die wichtigsten TLR und ihre Liganden(20):

- TLR-1: Bakterielle Lipopeptide(16)
- TLR-2: Peptidoglykane der Bakterienhülle und Lipoteichonsäure (*lipoteichoic acid; LTA*)(16)
- TLR-3: Peptidoglykane und doppelsträngige virale RNA (16)
- **TLR-4:** Das Oberflächenprotein Lipopolysaccharid, das auf gramnegativen Bakterien exprimiert wird, bindet an den Rezeptor CD14 (*cluster of differentiation; CD*) einer Immunzelle und aktiviert dadurch TLR-4. Er induziert die Expression von Entzündungsmediatoren und Zytokinen. Auch Enterozyten tragen TLR-4 an ihrer Oberfläche. Wird er aktiviert, folgt eine verstärkte Haftung der Zelle im Verband (Zellmigration wird blockiert) und die Zellteilung

wird über Dysregulation des intestinalen wnt- β -Catenin Pathway direkt gestört (Hemmung der Proliferation und damit Störung von Reparationsprozessen). Die Dichte der TLR-4 im fetalen Darm nimmt physiologisch in der Spätschwangerschaft ab, die luminaire (gramnegative) Flora wird in Folge immunologisch toleriert. Bei Frühgeborenen mit NEC ist die Dichte der TLR-4 noch sehr hoch, was die inflammatorische Reaktion (gemeinsam mit anderen Faktoren, insbes. PAF [s.u.]) auf gramnegative Bakterien erklären kann(21).

- TLR-5: Flagellin (20)
- TLR-6: Di- und triacetylierte bakterielle Lipoproteine(16)
- TLR-7+8: Guanin- und Uracil- reiche einzelsträngige virale RNA(16)
- **TLR-9:** CpG-repeats (Cytosin-phosphatidyl-Guanin; die beiden Basen sind mittels Phosphodiesterbrücke miteinander verbunden und kennzeichnen oft eine Promoterregion bakterieller DNA). Studien konnten zeigen, dass eine Aktivierung von TLR-9 durch CpG-repeats die Expression von TLR-4 hemmt. Bei PatientInnen mit NEC ist die Dichte der TLR-4 erhöht und im Gegenzug die Dichte der TLR-9 herabgesetzt. Dieser Mechanismus könnte die beobachtete protektive Wirkung von probiotischen Präparaten erklären: sie enthalten sehr viel bakterielle DNA und hemmen über Erhöhung der TLR-9 Expression die Expression von TLR-4(21).

Binden bakterielle Antigene an die PRRs einer Immunzelle, wird sie dadurch aktiviert und sezerniert verschiedene Mediatoren und Zytokine, die andere Zellen des Immunsystems anlocken und aktivieren(22) (siehe dazu Kapitel 2.2.3.2 Zytokine). (16)(17)

Bei Neugeborenen sind diese Mechanismen noch nicht effizient und das Immunsystem hat nur eine beschränkte Kapazität pathogene Organismen zu erkennen und darauf adäquat zu reagieren(16).

2.) **Paneth'sche Körnerzellen** produzieren eine Vielzahl antibakterieller

Substanzen:

- Defensine
- Lysozym
- Sekretorisches Phospholipid A2
- Lektine

Die Sekretion der Paneth'schen Zellen wird durch Bestandteile der Bakterienwand wie z.B. das Oberflächenprotein Lipopolysaccharid (LPS) oder Lipoteichonsäure stimuliert. Eine Studie von Salzman *et al.* zeigt, dass α -Defensine bei Feten und Frühgeborenen in signifikant niedrigeren Levels vorliegen als bei reifen Neugeborenen und Erwachsenen. Unter anderen aus diesem Grund scheinen Frühgeborene empfänglicher für eine bakterielle Fehlbesiedelung zu sein, welche eine wichtige Rolle in der Entstehung der NEC spielt(16).

3.) Polymorphonukleäre Leukozyten (*polymorphonuclear leucocytes*; **PMN**)

kommen normalerweise im gesunden intestinalen Epithel nicht vor, aber in einer frühen Phase der NEC kann eine erhöhte Zahl im Intestinum gefunden werden. Die Produktion von PMNs im Knochenmark von Neugeborenen und ihre Funktion ist eingeschränkt, was als weiterer Triggerfaktor einer bakteriellen Fehlbesiedelung und Invasion interpretiert wird(16). Allerdings geht aus dieser Arbeit nicht hervor, ob die intestinalen PMNs Ursache oder Folge der Fehlbesiedelung sind.

4.) **B- und T- Lymphozyten** verteilen sich über die gesamte Darmwand und sind speziell in den Payer Plaques in großer Zahl vorhanden. Intraepitheliale Lymphozyten sind T-Lymphozyten und ordnen sich zwischen den Enterozyten an. Zwar werden B- und T-Lymphozyten schon während des fetalen Lebens gebildet, das gesamte Immunsystem (systemisch und intestinal) erreicht jedoch erst postpartal nach Kontakt mit z.B. kommensaler Flora des Intestinaltraktes volle Reife.

Der Dünndarm Erwachsener enthält 200-300 Peyer Plaques, mit vielen B- und T-Zell Keimzentren. Auch Neugeborene haben bereits Peyer Plaques, jedoch im Verhältnis eine deutlich geringere Anzahl und kaum Keimzentren.

Die *lamina propria* der Mukosa von Neugeborenen enthält kaum **slgA-**(sekretorisches Immunglobulin A) produzierende Plasmazellen. Das normalerweise in der intestinalen Mukosa produzierte slgA ist ein potenter Inhibitor der viralen und bakteriellen Zelladhäsion. Es erreicht physiologisch erst mit dem vollendeten 4. Lebensjahr die protektive Konzentration im Darmlumen, diese relative Defizienz ist ein Teil des Erklärungsmodells der

Empfindlichkeit von Neugeborenen gegenüber Infektionen an der intestinalen Mukosa.

Zusätzlich sind T-Zellen von Neugeborenen weniger empfänglich für Stimulationen mit Antigenen und antworten mit herabgesetzter proliferativer Antwort auf mitotische Reize(16).

2.2.3.2 ZYTOKINE

Der „**Pathway der Zytokine**“ spielt in der Entwicklung der NEC eine entscheidende Rolle. Aus einer Entzündungskaskade resultiert eine (kurz- oder längerfristige) Periode der Ischämie des Darm(-abschnitt)s, die gemeinsam mit dem darauf folgenden Reperfusionsschaden unmittelbar zu den Symptomen der NEC führt (siehe auch Kapitel 2.3 Klassifizierung der NEC nach Bell).(18)

Hsueh *et al.* vermuten, dass auf einen initialen Störfaktor (Hypoxie oder Infektion s.o.) hin, die Mukosa primär geschädigt wird. Nach der ersten enteralen Ernährung, haftet sich intestinale Flora an die unreifen Darmepithelien an, welche daraufhin mit Produktion von Zytokinen wie TNF α (Tumor Nekrose Faktor) oder PAF (Plättchen aktivierender Faktor) reagieren – die Entzündungskaskade beginnt(23).

Cetin *et al.* konnten zeigen, dass bakterielle Produkte wie LPS die Reparaturfunktion der Enterozyten sowie die Migration neuer Enterozyten zum Ort der Schädigung hemmen – es entsteht eine Lücke in der intestinalen Barriere, Bakterien können eindringen und triggern die Entzündungskaskade. Im Verlauf kommt es zur Vasokonstriktion, Ischämie und Darmwandnekrose (s.o. TLR-4)(24).

Bei der NEC beteiligte Zytokine können sowohl proinflammatorisch als auch antiinflammatorische Wirkungen zeigen, im Folgenden werden Wirkungen und Zusammenhänge genauer dargestellt(18):

1. TNF α

Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) wird von Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten und u.a. sezerniert, er erhöht die Freisetzung von Interleukin 1 (Il1), induziert Fieber, Leukozytenmigration und Angiogenese sowie die akute Phase Reaktion mit Produktion von akute Phase Proteinen wie z.B. CRP. TNF α ist auch in Vorgänge der Apoptose und die Schockentstehung involviert.

TNF α erhöht bei der NEC dramatisch die Freisetzung von Matrix Metalloproteinasen (MMP), proteolytischen Enzymen mit der Fähigkeit die extrazelluläre Matrix zu degradieren. TNF α reguliert die Expression der MMP9, MMP12 und Stromelysin 1 in Makrophagen sowie MMP18 in Epithelzellen hoch, was zum Zusammenbruch der extrazellulären Matrix und zur Zerstörung des Gewebes führt.

Die natürlichen Gegenspieler der MMPs sind die Gewebsinhibitoren der MMPs (*tissue inhibitors of MMP; TIMPs*), welche von denselben Zellen gebildet werden wie auch die MMPs. Pender *et al.* vermuten, dass die Zerstörung des Gewebes bei der NEC von einer Imbalance der zerstörenden (MMPs) und reparativen (TIMPs) lokalen Faktoren resultieren.

Lt. Ballace *et al.* zeigten 68% der in einem 10-Jahres Intervall chirurgisch therapierten NEC-PatientInnen reparative Veränderungen des Darms.

Im Vergleich zu anderen entzündlichen Darmerkrankungen liegt bei der NEC eine niedrigere Zahl an TNF α -Transkripts vor. Tatsache ist jedoch, dass TNF α die Transkription einer Vielzahl anderer Zytokine hochreguliert(16,18).

2. II1

Interleukin 1 (II1) wird von Makrophagen und anderen Antigen-präsentierenden Zellen sezerniert. Es besteht aus 2 Komponenten, dem zellständigen Teil II1 α und der sekretorischen Komponente II1 β . II1 wird von TNF α stimuliert, es unterstützt die Entzündungsreaktion, es ist beteiligt an der Entstehung von Fieber, vermehrter Adhäsion von Leukozyten, Phagozytenaktivierung und Leukozyten-Costimulation. II1 β induziert auch die Transkription des II8 Gens und dadurch die vermehrte Produktion von neutrophilen Granulozyten. II1 spielt eine wesentliche Rolle bei der Entstehung einer SIRS, welche zu Schock und Multiorganversagen führen kann.

Studien zeigten eine signifikante Reduktion der Gliazellen der intestinalen Nervenplexus in NEC-PatientInnen. Es konnte gezeigt werden, dass II1 β eine Rolle in der Integrität der Darmepithelien spielt. In Versuchen mit *knock-out* Mäusen erkannte man einen Zusammenhang zwischen dem Fehlen spezieller GFAP+ (*glial fibrillary acidic protein positive*-) Gliazellen und der Entwicklung einer hämorrhagischen Jejunoileitis. II1 β erhöht *in vitro* die Produktion von GFAP in

Gliazellen und hat dadurch einen protektiven Effekt auf die Darmepithelien hat(18).

3. PAF

Plättchen aktivierender Faktor (PAF) spielt ebenfalls eine zentrale Rolle in der Entstehung der NEC. Er ist ein von Entzündungszellen, Endothelzellen, Thrombozyten und Bakterien der intestinalen Flora produziertes Phospholipid, welches mit dem PAF-Rezeptor (PAF-R) an Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten interagiert. Wird der PAF-R aktiviert, reagieren Thrombozyten mit sofortiger Aggregation, Mediatoren werden ausgeschüttet und Eicosanoide werden gebildet. Systemische Applikation von PAF führt zu gefährlicher Hypotension und kann zum Schock führen.

Thrombozyten sezernieren nach Stimulation durch PAF II β aus Mikrovesikeln. Das so freigesetzte II β spielt eine Rolle bei der Adhäsion von Neutrophilen an der Endothelwand mittels Selektinen. Es unterstützt das „Rolling“ der Neutrophilen, ihre Emigration und unterhält dadurch die Entzündungsreaktion.

Das Ileum hat die höchste Dichte an PAF-R im Körper. Die große Anzahl an PAF-R deutet auf die wichtige Rolle von PAF bei der NEC hin – die meisten NEC PatientInnen zeigen eine Affektion der distalen Dünndarmsegmente.

Der natürliche Antagonist von PAF ist die PAF-Acetylhydrolase (PAF-AH), die das hochaktive Molekül in ein unwirksames lyso-PAF umformt. Neugeborene haben eine niedrige Aktivität von PAF-AH und sie zeigt eingeschränkte Funktionalität im Darm von NEC-PatientInnen. Muttermilch enthält im Vergleich zu Formula-Nahrung eine ungleich höhere PAF-AH Aktivität. Die unreife PAF-AH Regulation in Kombination mit der hohen Dichte an PAF-R im Ileum können zusätzliche Faktoren für die Entstehung des Entzündungsgeschehens darstellen(18).

4. Il6

Erhöhte Levels an Interleukin 6 (Il6) im Blut von Neugeborenen sind assoziiert mit einer erhöhten neonatalen Morbidität. Die Freisetzung von Il6 wird von proinflammatorischen Zytokinen wie TNFa und Il1 ausgelöst und resultiert in der Aktivierung von Lymphozyten, es induziert die Antikörperfreisetzung in B-Zellen und die Differenzierung von T-Zellen. Makrophagen, T-Helferzellen und intestinale

Endothelzellen besitzen Il6-Rezeptoren. Während einer Sepsis oder SIRS wird Il6 verstärkt von Enterozyten sezerniert, unterstützt durch Bakterien, Endotoxine wie LPS und andere Zytokine. Il6 aktiviert ebenfalls die Produktion von Akute Phase Proteinen wie CRP.

Harris *et al.* beobachteten, dass der Il6 Level in PatientInnen mit bakterieller Sepsis und NEC 5-10fach höher ist als bei PatientInnen mit Sepsis alleine, Kontrollen oder PatientInnen mit NEC ohne Keimnachweis. Verstorbene zeigten höhere Werte als Überlebende, daraus schloss man, dass ein erhöhter Il6 Level mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ist(18).

5. Il8

Interleukin 8 (Il8) unterstützt in der Entzündungskaskade die Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten durch Erhöhung der zellulären Aktivität im entzündeten Gewebe. Il8 wird von Fibroblasten, Monozyten und Endothelzellen sezerniert.

Il8 Protein wurde in der Serosa, Muskularis und im Epithel von NEC-PatientInnen gefunden. Dabei korreliert die Zahl an mRNA - Transkripts von Il8 transmural und in der Mukosa mit der Schwere der Entzündung – transmural erhöhte Werte korrelieren mit dem Vorhandensein einer Nekrose. Nur in betroffenen Darmabschnitten konnte Il8 nachgewiesen werden(18).

6. Il12, Il18 und IFN γ

Interleukin 12 (Il12) und Interleukin 18 (Il18) stehen im Zusammenhang mit Erkrankungen des Dünndarms und stimulieren die Sekretion von Interferon γ (IFN γ). Sie wirken synergistisch und erhöhen gemeinsam die IFN γ -Sekretion exponentiell, die intestinalen Epithelien werden in Folge durch die Bildung von Stickoxiden und Sauerstoffradikalen geschädigt. Peroxid z.B. ist direkt für die Apoptose von intestinalen Epithelzellen verantwortlich und hemmt zusätzlich die Proliferation und Migration der Epithelien.

Il12 wird von B-Lymphozyten und Makrophagen sezerniert, Il18 von Makrophagen und dem intestinalen Epithel. Zielzellen der beiden sind T-Helferzellen und Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen).

Halpern *et al.* zeigten durch Immunhistochemie, dass die Zahl II12 positiver intestinaler Monozyten mit dem Grad der Gewebeschädigung statistisch korreliert.

II18 findet sich in leichten NEC-Fällen hauptsächlich im intestinalen Epithel sowie in den *lamina propria* Zellen. Bei Fortschritt der Erkrankung erhöht sich nicht nur der Plasmaspiegel von II18, sondern die Transkription breitet sich auch transmural aus, was mit der Progression der Nekrose korreliert. Ist II12 vorhanden, induziert II18 die Produktion von IFN γ in NK-Zellen. Allerdings konnte kürzlich gezeigt werden, dass II18 auch die TH2-Linie und damit die Freisetzung von antiinflammatorischen Zytokinen (II4, II10, II13) aktiviert. II18 hat demzufolge eine destruktive und eine protektive Funktion im Entzündungsprozess.

IFN γ ist zwar im Darm der NEC-PatientInnen erhöht, allerdings fehlt der Beweis eines direkten Zusammenhangs mit der Entwicklung der Schädigungen.(18)

7. II4

Interleukin 4 (II4) ist ein antiinflammatorisches Zytokin, das bei der NEC eine Rolle zu spielen scheint. Es wird aufgrund seiner Funktionen oft als Immunmodulator bezeichnet: Es hemmt die Formung von Makrophagen Kolonien, die Peroxid-Produktion von Monozyten, die Freisetzung von bestimmten proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α und II1 β und es fördert einen Klassenwechsel (class switch) der Immunglobuline. TH2 – Zellen und das Stroma des Knochenmarks produzieren II4.

Genetische Polymorphismen haben Einfluss auf die NEC, im Vergleich zu Kontrollen exprimieren NEC-PatientInnen seltener eine mutante Variante der α -Kette des II4-Rezeptors (II4- α). Eventuell ist der Trägerstatus der mutanten Kette ein Schutzfaktor vor NEC. II4 ist beteiligt am Wechsel von TH1- auf TH2-Zellen, It. Treiszl *et al.* dreht die Mutante II4-Kette das Immunsystem in Richtung TH2 System, was die Entwicklung der NEC hemmt.

II4 reguliert zusätzlich die Expression des Mannose-Glykoproteinrezeptors in Makrophagen hoch. Die Zelle wird dadurch autodeaktiviert, eine Immunantwort wird gebremst.(18)

8. IL10

TH2-Zellen produzieren Interleukin 10 (IL10), ein antiinflammatorisches Zytokin das die Produktion proinflammatorischer Zytokine und andere Zellfunktionen von Makrophagen, T-Zellen und NK-Zellen hemmt.

Hohe IL10-Spiegel wurden in PatientInnen mit schwerer NEC gefunden, im Tierversuch zeigen intraabdominale Infusionen mit IL10 einen Effekt auf die lokalen und systemischen Symptome der Erkrankung.

IL10 hemmt auch die Produktion von Metalloproteinasen, speziell Kollagenase und Stromelysin 1. All dies unterstreicht das mögliche Potenzial von IL10 in der Therapie der NEC.(18)

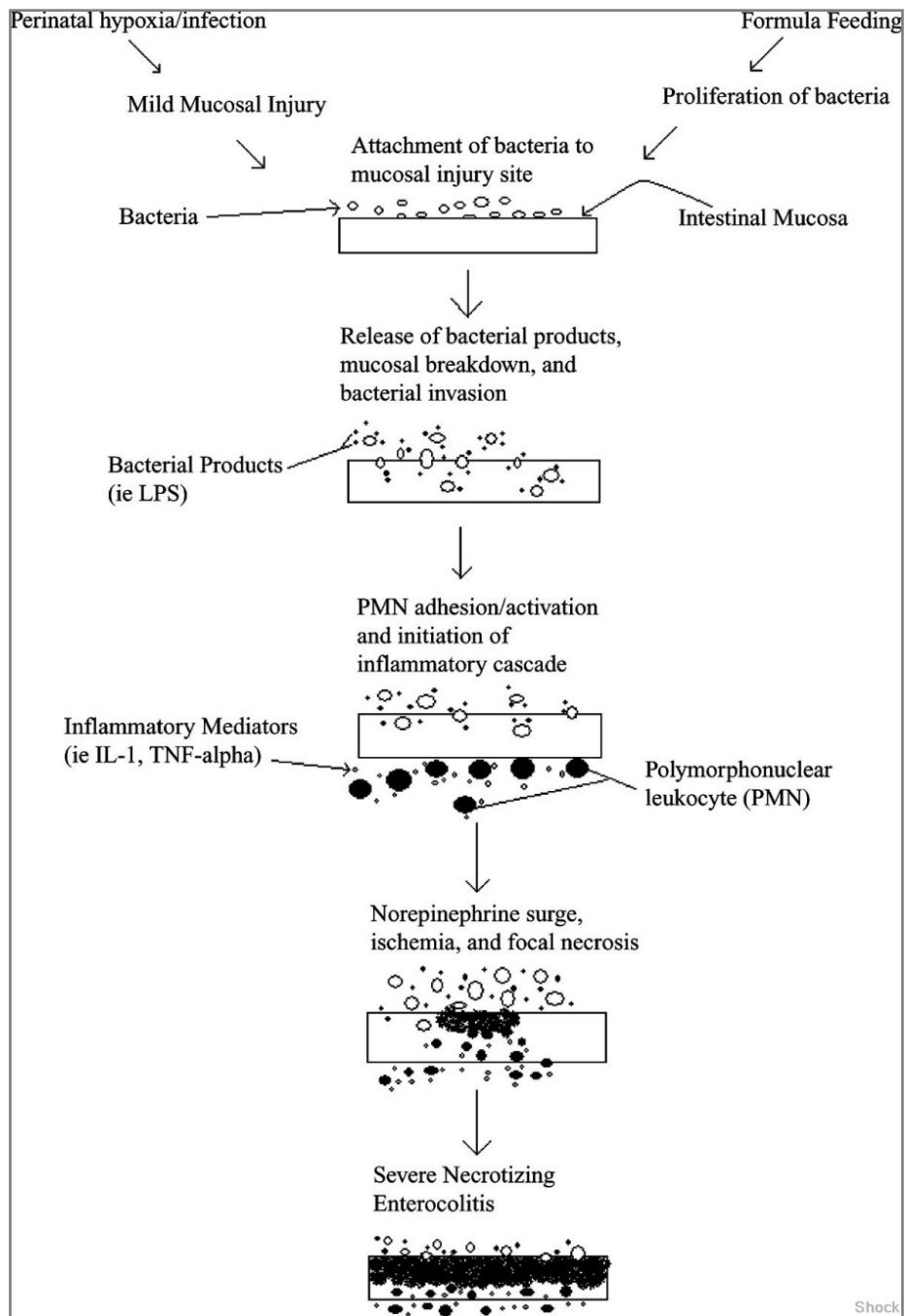


Abbildung 3: Pathogenesemodell der NEC; aus(18); Durch lokale Störfaktoren wie Hypoxieperioden oder Infektion kommt es zum Anhaften an die intestinalen Epithelien und Eindringen von Bakterien in den Organismus. Durch Aktivierung des Immunsystems kommt es zu einer systemischen Entzündungsreaktion (SIRS) und Sepsis mit ischämischen Schäden der Darmwand und Nekrose bis zur Perforation.

2.2.4 BAKTERIELLE BESIEDELUNG

Vor der Geburt ist der kindliche Darm nahezu steril, er wird 12-24 Stunden *postpartum* zuerst durch die mütterliche vaginale Flora (bei vaginaler Entbindung) sowie als nächstes von Umgebungskeimen besiedelt. Initial kolonisieren fakultative Anaerobier wie Enterobakterien (speziell *E. coli* und *Klebsiella pneumoniae*), Enterokokken, Streptokokken und Staphylokokken den Darm und erreichen einige Tage nach der Geburt Mengen von 10^8 bis 10^{10} Zellen/g im Stuhl. Sie reduzieren das initial sehr hohe intestinale Redox-Potential (Verhältnis von oxydierenden zu reduzierenden Stoffen), was die Besiedelung mit strikten Anaerobiern (Clostridien, Bacteroides, Bifidobakterien) erst ermöglicht (Anaerobier können an einem Ort mit hohem Redox-Potential nicht überleben, da sie über keine reduzierenden Enzyme verfügen, womit z.B. toxische Sauerstoffradikale beseitigt werden könnten)(15).

Die physiologische Flora, zu einem großen Teil bestehend aus anaeroben Lactobazillen und Bifidobakterien, entwickelt sich langsam im Laufe von Wochen abhängig davon:

- 1.) wie gut eine Bakterienspezies Nahrung und Adhäsionsmöglichkeiten für sich beansprucht und andere damit verdrängt,
- 2.) ob und welche Metabolite, Signalmoleküle oder antimikrobielle Komponenten sie produzieren kann und
- 3.) wie stark sie mit dem intestinalen Epithel interagieren kann(15).

Die intestinale Flora unterliegt großen individuellen und temporären Schwankungen, dies erklärt man sich durch zahlreiche extrinsische und intrinsische Einflussfaktoren(15):

Zu den extrinsischen Faktoren zählen:

- Geburtsmodus (vaginale Geburt vs. *sectio caesarea*)
- Umgebungskeime
- Gabe von Pro-, Prä- oder Antibiotika
- Typ und Modus der Ernährung (eigener Saug-Schluckmechanismus vs. parenterale oder Sondenernährung; Muttermilch vs. Formula-Nahrung; siehe dazu auch Kapitel Prävention)

Die intrinsischen Faktoren beinhalten:

- Struktur des Darms
- Genetik, Epigenetik
- Immunsystem
- Reife zum Zeitpunkt der Geburt; Gestationsalter

NEC-PatientInnen zeigen häufig eine geringe bakterielle Vielfalt, wahrscheinlich als Resultat der antibiotischen Therapie(n). Geringe bakterielle Vielfalt wird als unabhängiger Risikofaktor der NEC diskutiert, da sie das Risiko einer bakteriellen Fehlbesiedelung und Überwucherung erhöht. So wird *Clostridium perfringens* häufig in erhöhter Zahl in PatientInnen mit NEC detektiert, es wurde jedoch gezeigt, dass *C.perfringens* ein Opportunist ist, der von der bei NEC herrschenden veränderten Darmsituation profitiert. Nichtsdestotrotz kann die Anwesenheit von *C.perfringens* die Krankheitsprogression beschleunigen(15).

Neben der Aktivierung der inflammatorischen Signalkaskade über das LPS der gramnegativen Enterobakterien über den TLR-4 und den Zytokin-Pathway (s.o.) gibt es auch noch andere Thesen über den Einfluss von Bakterien:

Im anaeroben Colon werden bis dahin nicht resorbierte Kohlenhydrate von Bakterien zu Gasen und kurzkettigen Fettsäuren (SCFAs) verstoffwechselt. Frühgeborene haben eine Defizienz des Laktose-spaltenden Enzyms Laktase, sodass in Phasen der Nahrungsaufnahme vermehrt Laktose in das Colon gelangt. Können das Gas und die anfallenden SCFAs nicht absorbiert werden oder ist das Colon stark mit Bakterien überwuchert, erhöht sich der intraluminale SCFA-Level. Im terminalen Ileum wird ein erhöhter SCFA-Level durch einen eventuell vorhandenen Reflux durch die Ileocökalklappe oder durch pathologische bakterielle Besiedelung im Ileum erreicht. Lin *et al.* konnten zeigen, dass intraluminal applizierte SCFAs zur Schädigung des intestinalen Epithels in neugeborenen Ratten führten. Bei Applikation von Milchsäure, dem physiologischen Produkt von probiotischen Bakterien (Laktobazillen, z.B. auch therapeutisch und prophylaktisch verwendet), konnte man keine mukosale Schädigung feststellen. Dies lässt vermuten, dass ein erhöhter intraluminaler Level an SCFAs mit Ausnahme von Milchsäure im Colon und distalen Ileum eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der NEC spielt.(9)

Ob die bakterielle Fehlbesiedelung Ursache der Mukosaschädigung ist oder erst sekundär Bakterien durch bereits geschädigtes Epithel (Hypoxämieperioden) Möglichkeit zur Invasion bekommen, wird diskutiert (siehe auch Abb.4).(9) Durch die geschädigte Mukosa gelangt das von den Bakterien produzierte Gas in die Darmwand und über die Blutgefäße in das Pfortadersystem. Dieses Phänomen wird als **Pneumatosis intestinalis** bezeichnet und kann radiologisch im Abdomen leer Röntgen sowie sonografisch nachgewiesen werden.

2.2.4.1 NEC = INFEKTIONSERKRANKUNG?

NEC tritt in sporadischer und epidemischer Form auf - die Häufung von NEC-Fällen in neonatalen Intensivstationen lassen eine infektiöse Ursache der Erkrankung vermuten(5,6,25,26). Bislang konnte aber keine bakterielle oder virale Spezies als eindeutige Ursache der NEC identifiziert werden, jedoch wurden für zahlreiche Pathogene ein Zusammenhang mit der Entstehung einer NEC gezeigt (6).

Am häufigsten genannt werden Enterobakterien gefolgt von verschiedenen Staphylokokken-Spezies, Clostridien und Viren. In einer Cochrane Collaboration – basierten Analyse der englischsprachigen Literatur zum Thema ergaben sich folgende Daten(16):

Keim	Anzahl der dokumentierten Fälle
Enterobakterien: <i>Escherichia spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Salmonella spp.</i> und <i>Enterobacter spp.</i>	3808
<i>Staphylococcus spp.</i>	1441
<i>Clostridium spp.</i>	241
Viren:	
<i>Torovirus</i>	521
<i>Coronavirus</i>	91
<i>Rotavirus</i>	54
<i>Echovirus</i>	19
<i>Candida spp.</i>	22

Tabelle 2: Pathogene im Zusammenhang mit NEC; aus (16)

In Regionen mit geschädigtem intestinalem Epithel herrscht niedriges Redox-Potential, was das Wachstum von reinen Anaerobiern begünstigt. In der Studie von Cotton *et al.* wird auch die herausragende Rolle einiger Clostridien-Stämmen beschrieben, die durch die Produktion von Buttersäure schneller als andere Pathogene zu einer Gangrän des Darmes führen bzw. kommt es durch die starke Gasbildung zu einer besonders ausgeprägten Pneumatose. Jedenfalls konnten zahlreiche Studien zeigen, dass strikte Hygienevorschriften im Umgang mit Frühgeborenen die Inzidenz der NEC senken(3,9). Dies verdeutlicht die wichtige Rolle von bakteriellen Erregern in der Entstehung der NEC.

2.3 DIAGNOSTIK

2.3.1 KLINISCHE SYMPTOME

Die NEC zeigt neben allgemeinen Symptomen als Zeichen der massiven Belastung des Organismus durch die systemische Entzündungsreaktion auch spezielle gastrointestinale Symptome.

2.3.1.1 ALLGEMEINSYMPTOME

Die Allgemeinsymptome entsprechen einer neonatalen Sepsis. (Siehe dazu auch Kapitel 2.2.1.2 neonatale Sepsis) (1):

Atmung: Frühgeborene atmen häufig im Modus der sogenannten periodischen Atmung. Hier kommt es periodisch zur Zu- und Abnahme der Atemfrequenz. Bei der NEC werden vermehrt Bradypnoe- und Apnoephasen registriert, d.h. die Atemfrequenz sinkt unter 40/min bzw. treten Atempausen häufiger und länger (>10s) auf. Im Weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es durch Meteorismus, freie Flüssigkeit bzw. freie Luft im Abdomen (bei Perforation) zu einem Zwerchfellhochstand, der die Atemarbeit massiv erhöht. Die PatientInnen werden dadurch respiratorisch insuffizient und benötigen maschinelle Atemunterstützung.

Herz-Kreislauf: Durch Zentralisierung erscheint die Haut des Frühgeborenen grau und marmoriert, die Rekapillarierungszeit verlängert sich, Hypomotorik bis Lethargie fällt auf. Bei sehr schweren Verläufen kommt es auch zu einer Hypotonie, welche eine Minderdurchblutung des Organismus zur Folge hat, eine Konsequenz ist z.B. die Oligurie/Anurie.

Temperatur: Die Körpertemperatur kann zwischen Hypo- und Hyperthermie (Fieber) schwanken (Temperaturinstabilität).

Säure-Basenhaushalt: Bei schweren Verläufen kann es zum Sinken des pH-Wertes kommen (metabolische und/oder respiratorische Azidose).

Gerinnungssystem: Es kann eine Thrombozytopenie sowie bei schweren Verläufen eine disseminierte intravasale Gerinnung auftreten(1).

2.3.1.2 GASTROINTESTINALE SYMPTOME

Die gastrointestinalen Symptome sind typisch und teilweise pathognomonisch für die NEC(1):

Gespanntes Abdomen: Das Abdomen wirkt aufgetrieben/gebläht und gespannt, die PatientInnen reagieren sehr empfindlich auf Berührungen (z.B. mit Brady- oder Tachykardien).

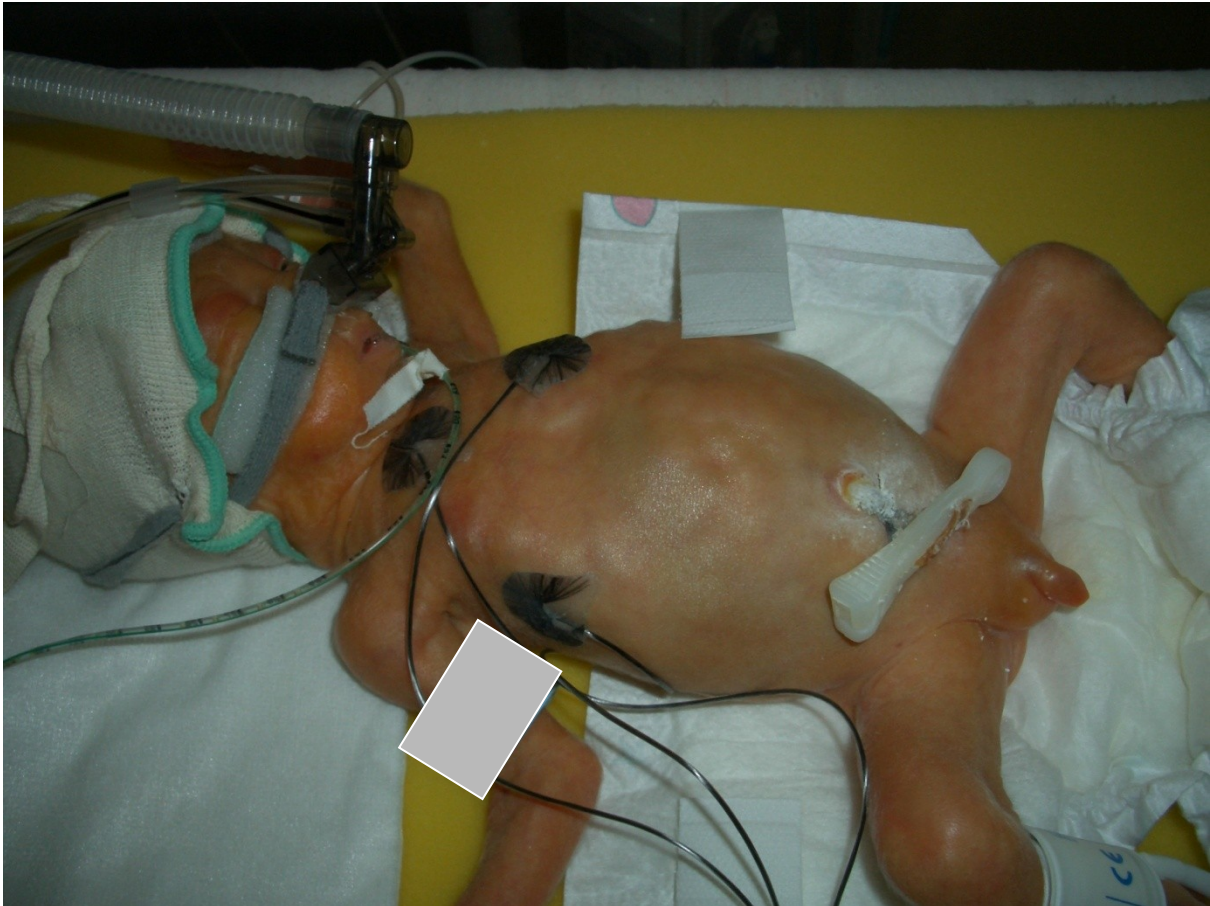


Abbildung 4: Frühgeborenes (GA 27+1) mit 990g und NEC: gespanntes Abdomen mit stehenden Darmschlingen und teilweise livider Verfärbung der Bauchhaut; zur Verfügung gestellt von Univ. Prof. Dr. Bernhard Resch

Ileus(-artige) Symptomatik: Erbrechen, Restvolumen im Magen (über die liegende Magensonde wird Nahrung appliziert, jedoch nicht [vollständig] weitertransportiert), Fehlen von Darmgeräuschen, Stuhl- und Windverhalt. Stehende Darmschlingen sind dringende Hinweise auf eine NEC: hier sieht man durch die dünne, rötlich livide verfärbte Bauchhaut hindurch eine oder mehrere aufgetriebene Darmschlingen, die sich auch als Resistenz tasten lassen.

Blutige Stühle: Bei entzündlichen Prozessen im Intestinum kommt es zu Schleimhautblutungen, diese sind nur bei einer NEC-Lokalisation im unteren GIT als Blutauflagerungen oder Stuhlbeimengungen mit freiem Auge zu erkennen. Ist der obere GIT betroffen, kann ein Test auf okkultes Blut im Stuhl einen Hinweis liefern. Als Differentialdiagnose müssen virale Enteritiden ausgeschlossen werden.

2.3.2 LABOR

Zur laborchemischen Diagnostik einer NEC gehören **aerobe und anaerobe Blutkulturen**. Es gestaltet sich allerdings aufgrund des geringen Blutvolumens Frühgeborener oft als schwierig, eine für die Analyse ausreichende Menge zu gewinnen weswegen häufig darauf verzichtet wird bzw. ein Keimnachweis nicht gelingt.

Für die Diagnostik einer NEC (bzw. der mit ihr einhergehenden Sepsis) werden verschiedene Indikatoren als Warn- und Verlaufsparemeter der Entzündungsreaktion bestimmt (die in der Routine wichtigsten sind fettgedruckt)(1):

- **Leukopenie:** Gesamtzahl der Leukozyten $<10.000/\mu\text{l}$
- **Gesamtzahl aller neutrophilen Granulozyten, der unreifen Granulozyten und die I/T-Ratio** (Quotient aus der Zahl der unreifen [*immature*] Zellen und der Gesamtzahl [*total*]): Eine Linksverschiebung im Sinne einer erhöhten Anzahl unreifer neutrophiler Granulozyten sowie eine I/T-Ratio von $>0,2$ sind Hinweise auf eine systemische Entzündungsreaktion.
- **Thrombozytopenie** $<100/\text{nl}$ tritt in ca. 30% im Verlauf einer NEC auf
- **C-reaktives Protein:** Das CRP wird als Reaktion auf Zytokinstimuli (TNF α , IL1, IL6) in der Leber produziert. Es steigt zeitverzögert um einige Stunden im Blut an und dient als idealer Verlaufsparemeter.
- IL6 ist ein Zytokin, das schon sehr früh in der Entzündungsreaktion ansteigt und deshalb einige Zeit vor dem CRP Hinweise auf eine beginnende Sepsis geben kann.
- Procalcitonin (PCT), dient besonders zur Differenzierung zwischen systemischer Entzündungsreaktion ohne Bakteriämie und systemischer Entzündungsreaktion mit Bakteriämie (=Sepsis). PCT steigt physiologisch postnatal an den ersten beiden Lebenstagen an und sinkt dann wieder ab. Ein Wert $>2 \mu\text{g/l}$ nach dem 2. Lebenstag gilt als erhöht – er kann bis auf $1000 \mu\text{g/l}$ ansteigen(27).

- Serumamyloid A (SAA) gehört zur Familie der Apolipoproteine und wird als akute Phase Protein von der Leber als Reaktion auf Il6 und TNF α gebildet (Induktion der Genexpression von SAA1 und SAA2 während Entzündungsreaktionen). SAA steigt besonders stark als Reaktion auf Lipopolysaccharide(28).

Abgesehen von Blutanalysen, werden zunehmend auch andere, nichtinvasive Parameter in der Diagnostik der NEC diskutiert:

Das im Harn messbare intestinale Fettsäuren-bindende Protein (*intestinal fatty acids binding proteine; I-FABP*), das von Enterozyten gebildet wird und bei intestinalen Schäden im Serum und Harn gefunden wird, ist bei PatientInnen mit NEC signifikant höher als bei Gesunden und bei NEC-PatientInnen mit der Notwendigkeit einer chirurgischen Intervention ebenfalls signifikant höher als bei konservativ therapierbaren NECs. In zwei Drittel der Fälle gelang es allerdings nicht, eine NEC vor dem ersten klinischen Verdacht zu diagnostizieren. (29)

Calprotectin ist in bis zu 60% der zytoplasmatischen Granula der neutrophilen Granulozyten enthalten. Es ist ein direkter Indikator für das Maß der chemotaktisch-getriggerten Migration der Leukozyten in das Darmlumen und somit ein semi-quantitativer Parameter für einen entzündlichen intestinalen Prozess. Thuijls *et al.* konnten zeigen, dass Calprotectin im Stuhl von NEC-PatientInnen erhöht ist. (29)

Claudin-3 ist ein transmembranöses Protein der Tight Junctions in Endo- und Epithelien und damit essentiell für deren Zelladhäsion. In geschädigtem Endothel wie bei NEC, lässt sich Claudin-3 als Zeichen des interzellulären Adhäsionsverlustes im Stuhl in signifikanter höherer Menge nachweisen.(29)

2.3.2 RADIOLOGISCHE BEFUNDE

Die radiologischen Befunde erstrecken sich von unspezifischen Gasverteilungsmustern, bei denen Dünn- und Dickdarm nicht mehr unterschieden werden können bis hin zu Zeichen des Ileus: Art und Grad der Dilatation einzelner Darmabschnitte (Entwicklung von generalisierter Dilatation zu asymmetrischer Dilatation, persistent trotz Therapie), eine fixierte Darmschlinge (in der Kontrollaufnahme befindet sie sich noch am selben Ort) oder Spiegelbildungen liefern bei einigen PatientInnen den einzigen Hinweis auf NEC(58).

Die **Pneumatosis intestinalis** ist ein pathognomonischer Befund der NEC höherer Stadien (s.u.). Sie wird definiert als in Röntgen und Sonografie sichtbare perlchnurartige Ansammlung von Gasbläschen in der Darmwand. Dehnt sich die Gasansammlung auch in die Mesenterialgefäße aus, kann radiologisch auch eine extra – und intrahepatische Pneumatose der V. portae und der Lebervenen nachgewiesen werden(1).



Abbildung 5: massiv ausgeprägte Pneumatosis intestinalis im Rahmen einer NEC; (30)



Abbildung 6: sonografischer Nachweis von perlschnurartig aneinander gereihten Gasbläschen im Rahmen einer NEC; aus (31)

Die Pneumatosis entsteht durch Stoffwechselprozesse der bakteriellen Flora des Colon: werden die Bakterien in einem unreifen Darm mit bis dahin nicht resorbierten Kohlenhydraten konfrontiert, nutzen sie diese für ihren Stoffwechsel. Die Abfallprodukte, kurzkettige Fettsäuren (SCFA, s. Kapitel 2.2.4 Bakterielle Besiedelung) und Gas verbleiben im Darmlumen. Ist das intestinale Epithel geschädigt, kommt es zum Eindringen von Bakterien in die Mukosa und das produzierte Gas wird als Pneumatosis intestinalis detektiert. Ist die Darmwand transmural geschädigt, kann es zur Perforation kommen. Dies stellt eine absolute Operationsindikation dar und kann als **Pneumoperitoneum** ebenfalls radiologisch diagnostiziert werden(9).

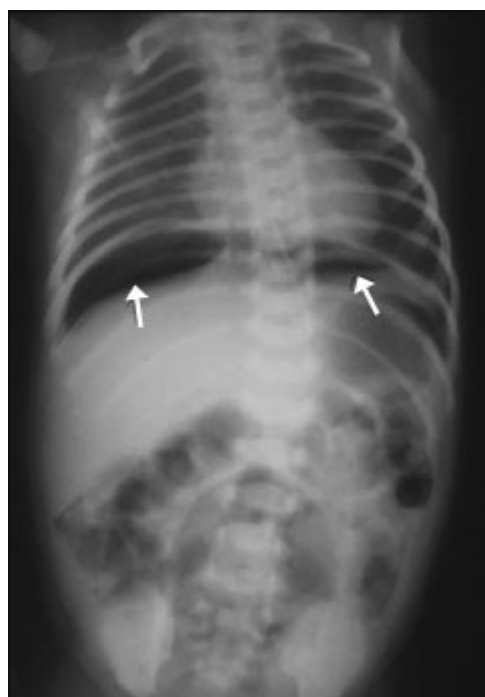


Abbildung 7: subdiaphragmale Luftsichel in Folge einer Darmperforation bei NEC; aus (32)

2.4 KLASSIFIZIERUNG DER NEC NACH BELL

Martin J. Bell hat im Jahr 1978 eine Klassifizierung der nekrotisierenden Enterokolitis anhand der klinischen Symptome und radiologischen Zeichen entwickelt, die abgewandelt von Kliegman *et al.* 1987, auch heute noch klinische Anwendung findet. Ziel der Arbeit Bells war, die Therapie der NEC mit Hilfe der klinischen Stadien zu objektivieren und zu optimieren.

Stadium 1: Verdacht auf NEC

Stadium 2: Definitive NEC

(nach Ausschluss der Differenzialdiagnosen)

Stadium 3: Fortgeschrittene NEC

} Symptomatik siehe Tabelle 2

Stadium	Allgemeinsymptome	Radiologie	Gastrointestinale Symptome
1	Apnoe, Bradykardien, Temperaturinstabilität	Normale Gasverteilung oder milder Ileus	Restvolumen, okkultes Blut im Stuhl, gespanntes Abdomen
2A	Apnoe, Bradykardien, Temperaturinstabilität	Gasverteilung wie bei Ileus, eine oder mehrere dilatierte Darmschlingen, fokale Pneumatose	Fehlende Darmgeräusche, blutige Stühle, stark gespanntes Abdomen
2B	Thrombozytopenie und milde metabolische Azidose	Weitreichende Pneumatose, Aszites, Gasbläschen in der V. portae	Darmwandödem mit tastbaren Darmschlingen und schmerzhafte abdominale Abwehrspannung
3A	Gemischte Azidose, Oligurie, Hypotension, Koagulopathie	Prominente Darmschlingen, zunehmend Aszites, keine freie Luft	Verschlechterung des Darmwandödems, Erythem und Verhärtung des Abdomens
3B	Schock, Verschlechterung der Laborparameter und Vitalzeichen	Pneumoperitoneum	Perforierte Darmschlingen

Tabelle 3: Klassifizierung der NEC nach Bell; aus(19),(13)

Die Unterscheidung zwischen Bell 3A und 3B (s.o.) besteht in einer Perforation, im Röntgenbild des Abdomens als freie Luft sichtbar. Es besteht jedoch keine Evidenz dafür, dass 3A weniger schwer verläuft als 3B – auch Kinder, deren Darm fast vollständig betroffen war, allerdings keine Perforation zeigten, verstarben an der schweren Erkrankung.

Unterschiede in der Pathophysiologie zwischen VLBW und reiferen Neugeborenen führen zu unterschiedlicher Symptomatik und erschweren die akkurate Anwendung der Bell Kriterien(19):

1. Die Symptome von Bell's Stadium 1 (s.o.) sind bei ELBW und VLBW sehr unspezifisch und können bei allen Formen von systemischen Erkrankungen oder Bakteriämien auftreten.
2. Blutige Stühle (wie in Bell 2A, s.o.) kommen bei Kindern <30 SSW als Präsentation ihrer NEC praktisch nicht vor. Das liegt daran, dass der Darm bei diesen Kindern oberhalb der Ileozäkalklappe betroffen ist und blutige Stühle bei einer Entwicklung zum Ileus, das Kolon nicht mehr passieren können.
3. Eine **Intoleranz gegenüber enteraler Ernährung** (*feeding intolerance of prematurity*; FIP) tritt bei jüngeren Frühgeborenen physiologisch auf (siehe auch Kapitel 2.2.2. Ernährung). Unreife Darmfunktionen führen zur Stase unverdauter Nahrung, was günstige Bedingungen für das Wachstum enteraler Bakterien schafft.

Die FIP selbst ist jedoch keine Erkrankung sondern ein physiologischer Adaptationsprozess. Kann man die Symptome mit konservativen Maßnahmen wie Nahrungskarenz, Glycerinspülungen und Magensonde (siehe auch Kapitel Therapie) nicht unter Kontrolle bringen, kann die FIP zur NEC führen.

2.5 DIFFERENZIALDIAGNOSEN DER NEC UND ALTERNATIVE KLASSIFIZIERUNG

Die wichtigsten Differentialdiagnosen der NEC werden in diesem Kapitel besprochen:

- spontane intestinale Perforation
- virale Enteritiden
- Kuhmilchproteinallergie
- Aganglionose
- Malrotation
- Volvulus

2.5.1 SPONTANE INTESTINALE PERFORATION (SIP)

Zu Perforation und Pneumoperitoneum in Bell 3B, welches als schwerste und wichtigste Symptome gelten, gibt es eine neue Differentialdiagnose: die **spontane intestinale Perforation (SIP)**.

Die SIP ist eine spontane Perforation, die meist in den ersten 2 Lebenswochen Frühgeborener unter 30 SSW im Ileum auftritt. SIP betrifft praktisch ausschließlich Kinder <1500g und tritt nicht vor Erreichen einer enteralen Nahrungsmenge von 40ml/kgKG/Tag auf.

Sind reife Neugeborene betroffen, handelt es sich meist um wachstumsretardierte Kinder mit LBW. Hier ist meist das Colon betroffen, was die Prognose positiv beeinflusst(19)(33).

Die **Inzidenz** der SIP wurde im Jahr 1998 mit 1.1% der VLBW-Kinder angegeben, im Jahr 2006 bereits mit 8.4%. Es gibt verschiedene Ursachen dieser Entwicklung:

- Eine größere Anzahl an VLBW Kindern überlebt die Perinatalphase.
- Die SIP als eigenständige Diagnose hat sich aus dem Diagnoseschema der NEC herausgebildet (33).

Jungen sind in einem Verhältnis von 3:1 häufiger betroffen als Mädchen(33).

Zur **Ätiologie**:

Pränatale Faktoren, die zur Frühgeburlichkeit führen, werden auch mit der SIP in Zusammenhang gebracht. Solche sind z.B.(33):

- Plazentainsuffizienz
- Schwangerschafts-Hypertonie und Präeklampsie
- Mangelernährung der Mutter
- Drogenabusus
- Infektionen

Zusätzlich zu perinatalen Insulten, welche im Zusammenhang mit SIP stehen, sind vor allem postnatale Risikofaktoren für die SIP verantwortlich(33):

- Einflüsse auf die Perfusion des unreifen GIT, damit verbunden Hypoxie und Ischämie
- Ausdünnung oder Fehlen der Tunica muscularis
- Erhöhter intraabdominaler Druck durch mechanische Beatmung
- Verschiedene Medikamente wie z.B. Indomethacin und Dexamethason
- Infektion mit Coagulase-negativen Staphylokokken und Candida

Histopathologisch unterscheidet sich die SIP von der NEC:

Bei der SIP ist die intestinale Mukosa stabil, nicht nekrotisch und man findet selten Zeichen einer Ischämie. Die Submukosa ist dünn oder fehlt fokal, gleichzeitig kann eine nicht-septische Nekrose der Muskularis an der perforierten Stelle vorliegen.

Bei der SIP wird keine Pneumatosis Intestinalis beobachtet, das spontan auftretende Pneumoperitoneum ist diagnoseweisend(19).

Oft liegt eine schwarzbläuliche Färbung des Abdomens vor, dies geht auf den Austritt von Mekonium in die freie Bauchhöhle zurück. Eine Peritonitis tritt nur selten auf(33).

2.5.2 FRÜHE VIRALE ENTERITIDEN

Gleichzeitiger Ausbruch von NEC bei mehreren Kindern einer NICU bekräftigen die Hypothese „NEC = Infektionskrankheit“. Zumeist ist damit eine bakterielle Genese gemeint, doch es gibt zunehmend Fallberichte über Ausbrüche von Enteroviren, Noroviren und Rotaviren in einer neonatalen Intensivstation, die sich als NEC oder mit NEC-ähnlicher Symptomatik präsentierten (*viral enteritis of infancy; VEI*)(26).

Bei ELBW Kindern führt eine virale Enteritis zu einer Störung der mukosalen Barrierefunktion, welche sekundär eine Sepsis durch Translokation der enteralen Flora in das Gefäßsystem verursachen kann.

Die klinische Differenzierung zwischen einer NEC und einer **virusassoziierten NEC** ist schwierig. Eine Blutkultur von gramnegativen Bakterien kann oft schon positiv sein, bevor ein positiver Virusnachweis im Stuhl vorliegt. Das kann zu einer Fehldiagnose im Sinne einer falschen Ursache der NEC führen (erst sekundäre Bakteriämie nach primärer viraler Enteritis mit Mukosaschädigung) (19).

Die PatientInnen mit virusassoziiierter NEC präsentieren sich mit blutigen Stühlen und Pneumatosis der linken Colonseite, die sich je nach Verlauf ausbreiten kann. Der zeitliche und quantitative Zusammenhang zwischen Gaben von Nahrung und Auftreten der Symptome wie bei der klassischen NEC, ist hier variabler, d.h. die VEI tritt zeitlich unabhängig vom Erreichen der voll enteral aufgebauten Nahrungsmenge auf. Wenn es zu einem gespannten Abdomen kommt, ist selten ein Ileus als Ursache zu identifizieren sondern eher Aszites.

Das Outcome der VEI ist besser als das der NEC, besonders hinsichtlich Notwendigkeit einer operativen Intervention und Mortalität. Dies rechtfertigt die Unterscheidung der Erkrankungen (19).

2.5.3 KUHMITLCHPROTEINALLERGIE

Eine Präsentation dieser Erkrankung ähnlich einer NEC mit Pneumatose, blutigen Stühlen und nekrotischen Darmabschnitten, ist äußerst selten. Ein Auftreten von Symptomen vor Erreichen der 6. Lebenswoche kommt kaum vor, daher sind Kinder mit einem Körpergewicht unter 2 kg praktisch nie davon betroffen.

Die typischen Symptome sind blutige Stühle und gespanntes Abdomen (Aszites und Meteorismus), sowie Irritabilität. Diese können sowohl nach Verzehr von Muttermilch, Soja-basierten Formulanahrungen (die Sojaproteinallergie ist jedoch extrem selten) und Kuhmilchprotein-basierten Formulanahrungen auftreten(19).

2.5.4 ANDERE DIFFERENTIALDIAGNOSEN

2.5.4.1 AGANGLIONOSE - MORBUS HIRSCHSPRUNG

Die Aganglionose entsteht durch einen kraniokaudalen Migrationsstopp von Ganglienzellen in unterschiedlicher Höhe des Gastrointestinaltraktes.

Durch das Fehlen der Ganglienzellen kommt es zu einer Hypertrophie der cholinergen Fasern. Diese führen zu einer dauernden Engstellung der Ringmuskulatur und dadurch zur Obstruktion im betroffenen Abschnitt (meist Rektum oder Colon sigmoideum). Sekundär kommt es durch massiven Kotstau zu einer prästenotischen Erweiterung (Megacolon)(1).

Die typische Klinik des Mb. Hirschsprung lässt ihn zu einer möglichen Differentialdiagnose der NEC werden(1):

- Geblähtes Abdomen
- Erbrechen
- Stuhl- und Windverhalt
- Ileussyptomatik

Die Diagnose Aganglionose kann mittels Manometrie des Enddarms und einer Rektumsaugbiopsie zur Untersuchung auf Ganglienzellen und für eine histochemische Analyse (Nachweis von erhöhtem Acetylcholin) gestellt werden(1).

2.5.4.2 MALROTATION

Eine unvollständige physiologische Darmdrehung birgt die Gefahr der Kompression von Darmanteilen und Gefäßen, dies führt zu ischämischen Darmabschnitten und folgenden Symptomen(1):

- Schmerz
- Erbrechen
- Stuhl- und Windverhalt
- Schocksymptomatik

Durch eine Sonografie des Abdomens kann die Lage des Darms festgestellt und die Indikation zu einer operativen Intervention (Herstellung einer Nonrotationslage des Darms= Dünndarm rechts, Dickdarm links) gestellt werden(1).

2.5.4.3 VOLVULUS

Beim Volvulus kommt es zu einer Drehung einer oder mehrerer Dünndarmschlingen um die Gefäßachse, wobei das versorgende Gefäß abgeschnürt wird und die Perfusion zum Erliegen kommt. Es kommt zum Ileus und durch die auftretende Ischämie zu einer Nekrose des betroffenen Darmabschnittes sowie zur Schocksymptomatik.

2.5.5 ALTERNATIVE KLASSIFIZIERUNG DER NEC

Bedenkt man die erwähnten Differentialdiagnosen ist die Anwendbarkeit der Bell Kriterien auf alle PatientInnen problematisch. Hierzu haben Forscher rund um Gordon 2007 neue Diagnosekriterien erstellt. Als Grenze zur Unterscheidung der unterschiedlichen Entitäten dient primär das Geburtsgewicht von 1250g(19):

<1250g:

Die **FIP** tritt in den ersten beiden Lebenswochen auf. Sie zeigt keine Auffälligkeiten im Abdomen Röntgen, es fallen gastrointestinale Symptome (siehe auch Kapitel 2.2.2.6 Intoleranz enteraler Ernährung) auf:

- vermehrtes Magenrestvolumen
- gespanntes Abdomen
- Stuhlverhalt

Die **preterm NEC** tritt nach den ersten beiden Lebenswochen auf. im Abdomen Röntgen erkennt man häufig eine Pneumatosis intestinalis, in 20-30% ein Pneumoperitoneum. Es treten keine blutigen Stühle auf, die Symptomatik entspricht der des Ileus.

Die **SIP** tritt in den ersten beiden Lebenswochen auf. Es ist keine Pneumatose detektierbar, jedoch ist ein Pneumoperitoneum obligat. Es treten keine blutigen Stühle auf, ev. Ileussyptomatik. Das Abdomen ist häufig bläulich-livide verfärbt.

Die **VEI** tritt erst nach den ersten beiden Lebenswochen auf. Eine Pneumatose kann auftreten, in 30-40% kommt es zum Pneumoperitoneum. Diagnostisch ist der Virusnachweis, es treten blutige Stühle und ev. Aszites auf.

>1250g:

Die **Ischemic NEC** tritt innerhalb des ersten Lebensmonats auf. Eine *Pneumatosis intestinalis* tritt häufig auf, selten kommt es zum Pneumoperitoneum. Von gastrointestinaler Seite fallen blutige Stühle und Ileussyptomatik auf.

Die **SIP** tritt in dieser PatientInnengruppe praktisch nicht auf. Wenn, dann innerhalb der ersten Lebenswoche, ein Pneumoperitoneum ist obligat und selten tritt eine Ileussyptomatik auf.

Die **Allergie auf das Kuhmilchprotein** tritt erst nach der 6. Lebenswoche auf. Selten kommt es zu einer *Pneumatosis intestinalis*. Gastrointestinale Symptome treten assoziiert mit dem Konsum von Kuhmilchprodukten aus: blutige Stühle und in seltenen Fällen Aszites.

Die **VEI** tritt nach den ersten beiden Lebenswochen auf. Diagnostisch ist der Virusnachweis, blutige Stühle, ev. Aszites und eine Pneumatose können auftreten.

2.6 THERAPIE UND PRÄVENTION

Je nach Ausprägung der Symptome und Stadium der NEC können unterschiedliche konservative und chirurgische therapeutische Maßnahmen notwendig werden(34):

	Symptome/Befunde	Maßnahmen/Therapie
Verdacht auf NEC, Stadium 1	gespanntes Abdomen ohne radiologische Zeichen für NEC	<ul style="list-style-type: none"> • engmaschige klinische Überwachung • kurzfristige Nahrungspause (24h), Setzen einer Magensonde • Abdomen Röntgen • Laborkontrollen (Leukozyten, Differentialblutbild und Thrombozyten) • Anlegen von Blutkulturen • kurzzeitig intravenöse Antibiotika
	unerwartetes Auftreten einer FIP	
Definitive NEC, konservativ behandelbar, Stadium 2	gespanntes Abdomen mit <i>Pneumatosis intestinalis</i> oder/und intrahepatische Pneumatose	<ul style="list-style-type: none"> • Magensonde und Ernährungskarenz für 7-10 Tage • enges Monitoring der Laborparameter • Blutkultur • Antibiotika i.v. für 7-10 Tage • häufige Röntgenkontrollen
	stehende, dilatierte Darmschlingen und Ileussyptomatik	
Definitive NEC, chirurgisch zu behandeln, Stadium 3	freie intraabdominelle Luft nach Initialsymptomen	<ul style="list-style-type: none"> • explorative Laparotomie mit Resektion betroffener Darmabschnitte • Drainage
	persistierende Ileussyptomatik, Verschlechterung der klinischen und laborchemischen Werte (v.a. Absinken der Neutrophilen und Thrombozyten)	

Tabelle 4: Übersicht über das Management bei NEC; aus(34)

2.6.1 KONSERVATIVE NEC-THERAPIE

Die konservative NEC-Therapie beinhaltet Entlastung des Darms via Magenablaufsonde, Pausierung enteraler Ernährung (auch keine oralen Medikamente) sowie eine breite antibiotische Therapie.

Durch die NEC kann es zu erheblichen Flüssigkeitsverlusten in den dritten Raum kommen (Aszites), weshalb die Überwachung des Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushaltes bzw. eine Elektrolyt-Substitution erforderlich sind.

Regelmäßige Kontrollen mittels bildgebender Verfahren sind zur Verlaufskontrolle wichtig – sie liefern Hinweise auf Progression der Erkrankung bzw. Operationsindikationen (Ileus, freie intraabdominelle Luft = Perforation).

Ab dem Stadium 2B ist ein(e) auf diesem Gebiet versierte ChirurgIn hinzuzuziehen. Um die Therapie optimieren und gegebenenfalls sofort eine chirurgische Intervention einleiten zu können, sollten die PatientInnen in regelmäßigen Abständen evaluiert werden(1).

2.6.2 CHIRURGISCHE NEC-THERAPIE

Eine chirurgische Therapie ist in der Regel bei Perforation sowie bei Verschlechterung der klinischen und laborchemischen Parameter, besonders bei Absinken der Neutrophilen und/oder Thrombozyten sowie bei Auftreten eines Schocks indiziert(34).

Die angewandten Methoden sind das am wenigsten invasive Anlegen einer Peritonealdrainage sowie die Explorativlaparotomie. Je nach Zustand der betroffenen Darmabschnitte müssen diese reseziert werden und die Anlage einer Enterostomie (*Anus praeaeater*) kann vorübergehend oder persistierend nötig werden(34).



Abbildung 8: intraoperativer Situs bei explorativer Laparotomie; Deutlich zu erkennen sind die betroffenen nekrotischen Darmabschnitte(34)

Studien konnten keinen signifikanten Vorteil einer Methode bzgl. des Outcome belegen, jedoch war bei Kindern mit einer Peritonealdrainage häufig eine sekundäre Laparotomie nötig. In anderen Studien wiederum lag die Mortalität bei Kindern mit Drainage um 50% höher als bei PatientInnen mit Laparotomie(34).

Die Notwendigkeit zur chirurgischen Intervention bei NEC ist die häufigste Ursache eines Kurzdarmsyndroms bei pädiatrischen PatientInnen(34).

In einer Studie wurde gezeigt, dass Frühgeborene mit chirurgischer NEC Therapie im Durchschnitt 60 Tage länger hospitalisiert waren als Frühgeborene ohne NEC. NEC-PatientInnen mit konservativer Therapie waren 20 Tage länger stationär(34).

Ist eine chirurgische Intervention indiziert, verschlechtert sich die Prognose hinsichtlich Morbidität und Mortalität. Umso wichtiger ist es, dieser Erkrankung erfolgreich vorzubeugen(34).

2.6.3 PRÄVENTIVE FAKTOREN

Aufgrund der Schwere der Erkrankung und der hohen Morbidität ist das eindeutige Ziel der NeonatologInnen, die Entstehung einer NEC zu verhindern.

2.6.3.1 MUTTERMILCH

Eine rein auf Muttermilch (MM) basierte Ernährung senkt die Inzidenz der NEC und die Notwendigkeit einer chirurgischen Intervention im Vergleich zu MM in Kombination mit auf Kuhmilch-basierten Formulanahrungen(9) (35).

Der hohe Gehalt der MM an Laktose, Casein und Oligosacchariden scheint das Wachstum einzelner Bakterienspezies zu bevorzugen, zusätzlich enthält MM auch viele bioaktive Komponenten wie sekretorisches Immunglobulin A (sIgA), Laktoferrin, β -Laktoglobulin und α -Laktalbumin, welche direkt oder indirekt die Darmflora beeinflussen. MM enthält pro Liter bis zu 10^9 lebende Bakterien, hauptsächlich Bifidobakterien.

Trotz dieser genannten Faktoren, ist die Evidenz für spezifische Effekte verschiedener MM- Ernährungsformen (MM, MM und zusätzliche Formulanahrung, MM oder Spenderinnenmilch aus der Flasche) auf die bakterielle Kolonisierung des kindlichen Darms schwach. Es gibt bisher keinen Konsens darüber, welche Bakterien von welcher Ernährungsform stimuliert oder gehemmt werden, z.B. stimuliert MM nach Cillieborg *et al.* nicht - wie das bis dahin geltende Dogma lautete - eine Bifidobakterien-dominierte Darmflora. Weiters wurde in dieser Studie eine geringere Zahl und Prävalenz von Clostridien im Stuhl mit MM ernährter Kinder entdeckt. Das Saugen selbst kann unabhängig von der Nahrung wichtige physiologische Prozesse in Gang bringen (z.B. Koordinierung der Peristaltik) (15).

2.6.3.2 PRO-, PRÄ- UND ANTIBIOTIKA

Teils in Zusammenarbeit mit der (Neugeborenen-/Säuglings-) Nahrungsmittelindustrie, beschäftigen sich zahlreiche Forschergruppen mit den Prä- und Probiotika und ihren Auswirkungen auf die Darmflora(9,36).

Probiotika sind Nahrungsergänzungsmittel, die lebende Mikroorganismen enthalten. Sie sollen die intestinale Permeabilität reduzieren, die Reaktion der Mukosa auf sIgA verstärken und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen erhöhen.

Verschiedene milchsäureproduzierende Anaerobier kommen in unterschiedlich hohen Dosierungen zum Einsatz, was die Reproduzierbarkeit der Studien erschwert und keine endgültige Aussage hinsichtlich der Evidenz machen lässt. Randomisierte Studien kommen ebenfalls zu gegensätzlichen Ergebnissen, einmal kann eine signifikante Senkung der Inzidenz bzw. NEC-assoziierten Mortalität gezeigt werden, einmal nicht(9). An der NICU Graz wird *Lactobacillus rhamnosus* GG einmal täglich eingesetzt (59), *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus infantis*, *Bifidobacteria bifidus*, *Streptococcus thermophilus*, und *Streptococcus boulardii* werden in der Literatur

ebenfalls in unterschiedlichen Dosierungen und Verabreichungsregimen (mit unterschiedlicher Limitierung hinsichtlich GA und Dauer) genannt(37).

Eine Meta-Analyse von 9 randomisierten Studien und 1425 Neugeborenen konnte zeigen, dass die Inzidenz der schweren NEC-Fälle und die Mortalität durch Einsatz von Probiotika signifikant gesenkt werden(61). Allerdings gibt es keine Daten zu kurz- und langfristiger Sicherheit. Einzelne Fälle einer Lactobacillus-Sepsis sind beschrieben(37).

Präbiotika sind Stoffe, die das Wachstum ausgewählter Mikroorganismen fördern sollen. Dazu zählen die Oligosaccharide Inulin, Galaktose, Fruktose, Laktulose. Neben deren Einfluß auf Stuhlkonsistenz und –frequenz stimulieren sie das Wachstum von Bifidobakterien. Dafür ist allerdings eine gute initiale Besiedelung des Darms nötig, welche jedoch bei VLBW-Kindern häufig fehlt. Neben den pflanzlichen und synthetischen Präbiotika stehen auch Oligosaccharide der MM zur Verfügung.

Ob Präbiotika eine NEC verhindern können ist noch unklar(34).

Antibiotika werden zur Darmdekontamination eingesetzt um das Wachstum potentiell pathogener Keime zu vermindern. In Graz wird dazu *Gentamicin*, das oral verabreicht nicht in den systemischen Kreislauf gelangt, eingesetzt(59).

Problematisch ist dies jedoch hinsichtlich der hohen Resistenzraten gegenüber Aminoglycosiden, die dadurch entstehen(38,60). Vorübergehend wurde an der Grazer NICU bei erstem Auftreten von *extended spectrum* Beta-Lactamase produzierenden Enterobakterien (mit zusätzlicher Aminoglycosid-Resistenz), *Gentamicin* gegen orales *Colistin* ausgetauscht um eine Besiedelung mit ESBL-E. zu verhindern. Strenger *et al.* konnten jedoch zeigen, dass *Colistin* dies nicht verhindern kann, weshalb diese Strategie wieder verlassen wurde(38).

2.6.3.3 ERNÄHRUNG

Bei Auftreten einer NEC, haben fast alle PatientInnen bereits mehrere Tage oder Wochen lang enterale Ernährung erhalten. Allerdings steht der Punkt an dem die für das Kind berechnete volle Nahrungsmenge erreicht wurde, oft im kurzfristigen, zeitlichen Zusammenhang mit dem Auftreten der NEC. Viele Kinder zeigen Symptome (siehe Kapitel 2.2.2.1 Intoleranz enteraler Ernährung) nach einer Steigerung der Nahrungsmenge oder bei einer Reinitiiierung der Nahrung nach einer Nahrungskarenz.

An NICUs werden daher verschiedene „*minimal enteral nutrition*“ Regime verfolgt. Ziel ist es, die Darmfunktionen durch langsame Steigerung der Nahrungsmenge nicht zu überfordern (9).

2.6.3.4 SONSTIGES

1. Kortikosteroide

Im Gegensatz zur spontanen intestinalen Perforation, wo eine Assoziation zwischen antenataler Gabe von Kortikosteroiden zur Induktion der Lungenreife und intestinaler Perforation nachgewiesen wurde(39), scheint eine antenatale Gabe von Kortikosteroiden (*Betamethason* und *Dexamethason*) ein protektiver Faktor für die Entwicklung einer NEC zu sein. Dieser Effekt konnte für postpartale Steroide nicht nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich eine geringere Morbidität der PatientInnen(40).

2. Indomethacin

Die frühe Gabe von *Indomethacin* zur Prävention einer ventrikulären Blutung Frühgeborener (*intraventricular hemorrhage, IVH*) ist assoziiert mit einem erhöhten Risiko eine SIP zu entwickeln. Eine späte Gabe von Indomethacin zum Schluss eines persistierenden Ductus arteriosus wird als möglicher protektiver Faktor von NEC diskutiert(40).

3. BAKTERIOLOGIE

3.1 ENTEROBAKTERIEN

Enterobakterien sind gramnegative, meist bewegliche, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien und gehören zur natürlichen Darmflora von Mensch und Tier. Zu Ihnen zählen sowohl die humanpathogenen Gattungen *Salmonella*, *Shigella* und *Yersinia*, als auch die Opportunisten wie *E.coli*,

Diese fakultativ pathogenen Opportunisten werden erst bei entsprechender Disposition der PatientInnen (IntensivpatientInnen, Immunschwäche) bzw. bei Dislokation aus dem Intestinaltrakt (Harnwegsinfekt, Pneumonie, Sepsis) zum Krankheitserreger. Zusätzlich besitzen opportunistischen Enterobakterien beruht auch die Eigenschaft, Resistenzen gegen Antibiotika zu entwickeln(41).

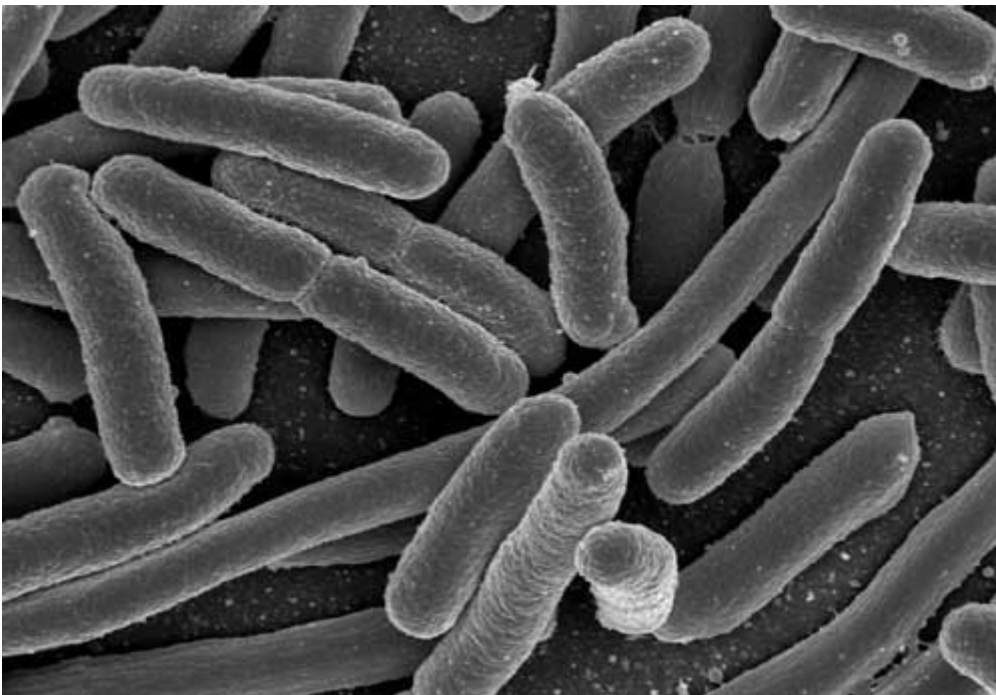


Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *E.coli*; aus(42)

Enterobakterien sind – wie bereits erwähnt – **fakultativ anaerobe** Bakterien, d.h. sie können sowohl in Anwesenheit von Sauerstoff als auch in dessen Abwesenheit überleben (Oxidation, Fermentation).

Sie nutzen zwei unterschiedliche anaerobe Stoffwechselprozesse, welche man auch zur Unterscheidung der einzelnen Spezies nutzen kann:

Die 2,3-Butandiolgärung metabolisiert Glukose in erster Linie unter massiver CO₂ – Produktion zum Alkohol 2,3-Butandiol. Ein Zwischenprodukt ist Acetoin, es wird im Voges-Proskauer-Test (Untersuchung von Bakterienkulturen auf die Bildung von Acetoin) nachgewiesen. Enterobacter, Serratia und Klebsiella verwenden diesen Metabolismus.

Bei der gemischten Säuregärung entstehen Milchsäure, Essigsäure und Essigsäure. Diesen Metabolismus verwenden E.coli, Salmonella und Proteus(41).

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die wichtigsten opportunistischen *Enterobacteriaceae*:

Enterobakterien	
Gattung	Eigenschaften
<i>Escherichia coli</i>	häufigster Erreger bakterieller Infektionen O- und A-Antigene begeißelt Laktose schnell metabolisiert (Laktose positiv)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>	ca. 10% aller nosokomialen Infektionen Polysaccharidkapsel Laktose positiv chromosomale β -Lactamase
<i>Citrobacter freundii</i> <i>Citrobacter amalonaticus</i>	kann Citrat als Kohlenstoffquelle verwenden Laktose wird verzögert abgebaut unbeweglich
<i>Serratia marescens</i>	β -Galaktosidase positiv beweglich häufig Mehrfachresistenz
<i>Proteus mirabilis</i>	Laktose negativ sehr beweglich (Schwärmphänomen)
<i>Enterobacter cloacae</i>	Laktose positiv beweglich häufig Mehrfachresistenz
<i>Morganella morganii</i>	Laktose negativ häufig Mehrfachresistenz

Tabelle 5: Opportunistische Enterobakterien und deren wichtigste mikrobiologische Merkmale. Die hier genannten Vertreter werden besonders häufig im klinischen Setting als Krankheitserreger identifiziert. (Es besteht kein Anspruch auf Vollständigkeit); aus (41)

3.1.1 ANTIGENE UND VIRULENZFAKTOREN

Die Antigenstruktur der Enterobakterien umfasst(41):

- O-Antigene: spezifische Polysaccharidketten des LPS-Komplexes der äußeren Membran → Aktivierung der Entzündungskaskade über Interaktion mit CD14 und TLR (siehe Kapitel 2.2.3 Immunologie)
- H-Antigene: Geißelantigene
- K-Antigene: lineare Polymere der äußeren Membran (Kapsel), bestehend aus repetitierenden Kohlenhydrateinheiten; Sie können die Zelle dicht bedecken und O-Inagglutinabilität bedingen.

Bei Enterobakterien sind verschiedene Faktoren (**Virulenzfaktoren**) bekannt, die in der Pathogenese von Infektionen eine Rolle spielen. Einzelne Spezies besitzen mehr oder weniger davon(41,43):

- Adhärenzfaktoren: Adhäsive Fimbrien, Haftpili, Kolonisationsfaktoren (CFA's), *outer membrane* Proteine (z.B. OmpA)
- Invasivitätsfaktoren: Invasine sind in der äußeren Membran lokalisiert und ermöglichen unter speziellen Voraussetzungen wie z.B. bei NEC das Durchdringen der Darmbarriere
- Endotoxine: Lipid A der LPS-Kapsel wird bei Lyse der Bakterien frei → Aktivierung der Entzündungskaskade s.o.
- Exotoxine:
 - Enterotoxine: verursachen massiven Wasser- und Elektrolytverlust über die Enterozyten (Hämolytine)
 - Zytotoxine: direkte, zytotoxische Wirkung auf Endothelzellen und Enterozyten (Toxin A, B)
- Serumresistenz: Resistenz gegenüber dem Membranangriffskomplex des Komplementsystems (C5b6789) durch Kapselbildung
- Phagozytenresistenz: Überleben wird durch Resistenz gegen Defensine und Sauerstoffradikale auch in Phagozyten möglich
- Kumulierung von Fe²⁺: aktiver Transport von Fe²⁺ durch Siderophore (Enterobactin, Aerobactin, Membranprotein TonB) in die Bakterienzelle
- ausgeprägte Persistenzfähigkeit: Bildung von Biofilmen bzw. selten auch kleiner Kolonien (*small colony forming*)

Enterobakterien sind häufig in der Lage **β -Lactamasen** (siehe Kapitel 3.2 Extended Spectrum β -Lactamasen) zu bilden. β -Lactamase-Gene entstehen in erster Linie unter Selektionsdruck als Reaktion auf Exposition gegenüber Antibiotika mit β -Lactam Ring. Diese können entweder chromosomal (z.B.: SHV- β -Lactamase der Klebsiellen) oder extrachromosomal, also in Plasmiden eingebaut sein. Da die bakterielle DNA sehr plastisch ist, entstehen laufend neue Resistenzgene, welche auch über verschiedene Mechanismen zwischen den Organismen übertragen werden können(41). Mehr dazu s.u.

3.1.2 GENETIK

Neben chromosomaler DNA weisen Bakterien auch autonome, im Zytoplasma lokalisierte DNA-Moleküle, die **Plasmide** auf. Sie sind meist in sich geschlossene DNA-Moleküle und enthalten keine essentiellen Gene. Aus medizinischer Sicht sind v.a. Virulenzplasmide (z.B. Hämolyzingene) sowie Resistenzplasmide (z.B. β -Lactamase-Gen) interessant. Plasmide können mehrere Virulenz- und/oder Resistenzgene enthalten(41).

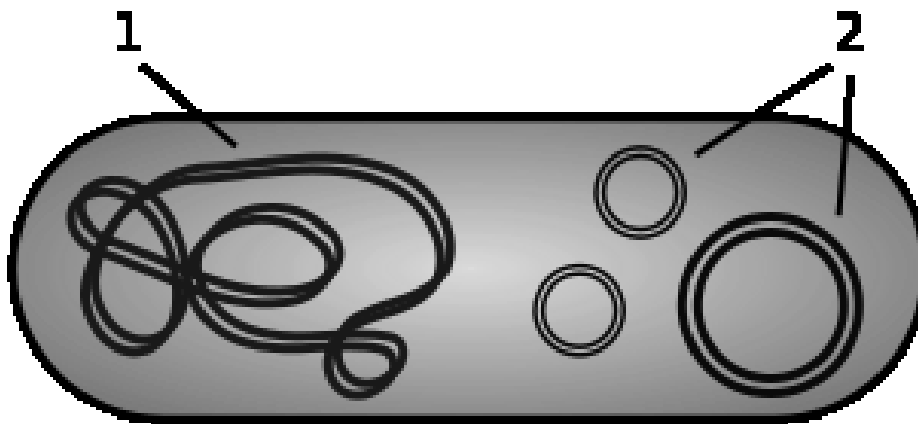


Abbildung 10: schematische Darstellung eines Bakteriums; Man erkennt die 2 verschiedenen Genträger: Chromosomale DNA (1) und Plasmide (2); aus (44)

Enterobakterien weisen eine enorme genetische Variabilität und Plastizität auf. Durch Spontanmutationen (v.a. Punktmutationen welche zum Austausch einer einzelnen Aminosäure in der Sequenz führen) und Rekombinationsprozesse entstehen laufend neue Gene oder Gen-Kombinationen. Die molekularen Mechanismen zur Rekombination umfassen homologe Rekombination, ortsspezifische Rekombination sowie Transposition (starke Mobilität vieler Gene) (41).

Bakterien nutzen 3 Mechanismen, ihr Erbgut anderen Bakterien zur Verfügung zu stellen (Parasexualität, horizontaler Transfer) (41):

- Transformation: Aufnahme von DNA aus der Umgebung des Bakteriums (z.B. in vitro Aufnahme von DNA aus dem Reagenz nach Hitzebehandlung)
- Transduktion: DNA wird mit Hilfe von Bakteriophagen transportiert
- **Konjugation:** Transfer von DNA durch Zell-Zell Kontakt. Hierzu sind konjugative Plasmide oder konjugative Transposons (nur bei gram-positiven Bakterien) notwendig. Dies kann in hoher Frequenz sowie zwischen unterschiedlichen Arten, Gattungen und Familien erfolgen (z.B. von Enterobakterien auf *Pseudomonas spp.*).



Abbildung 11: Schematische Darstellung der Konjugation zwischen Bakterien: Die DNA eines Plasmides wird über den Sexpilus auf das 2. Bakterium übertragen; aus (45)

Konjugative Plasmide enthalten eine sogenannte *tra*-Gensequenz (*tra* steht für „transfer“). Bei der Konjugation bildet das Donor-Bakterium einen Sexpilus zum Rezeptor-Bakterium aus. Danach nähern sie sich aneinander an bis ein direkter Zell-Zell-Kontakt entsteht.

Das konjugative Plasmid wird schließlich aufgebrochen, die beiden DNA-Stränge entrollt und währenddessen kopiert. Beide Bakterien enthalten somit ein vollständiges Plasmid und können wieder als Donor dienen.

3.2 BETA-LACTAME UND BETA-LACTAMASEN

β-Lactam Antibiotika hemmen die Zellwandsynthese der Bakterien durch Bindung an Penicillin-bindende Proteine (PbPs) wie z.B. die bakterielle Transpeptidase. Diese kann nach Bindung eines β-Lactams keine Quervernetzung der Peptidoglykanketten der Zellwand während der Synthese mehr vornehmen, die Zellwand bleibt löchrig und das Bakterium kann sich nicht vermehren(46).

Zur Gruppe der β-Lactam Antibiotika gehören Penicilline, Cephalosporine, Monobactame und Carbapeneme.

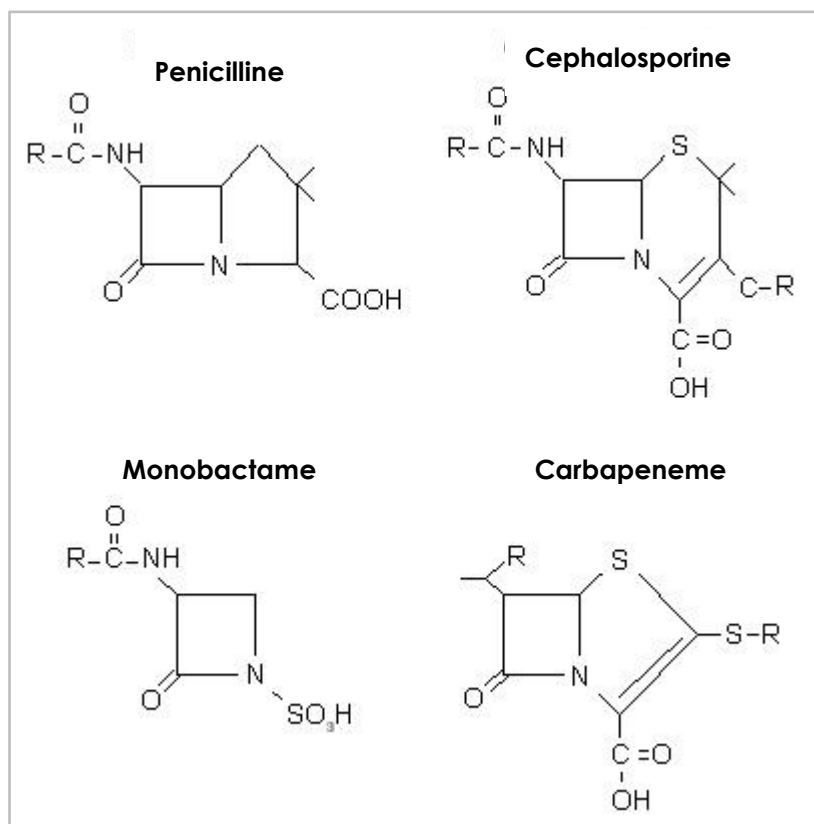


Abbildung 12: Die Grafik stellt die Grundformeln der Beta-Lactam Antibiotika als Strukturformel dar. Allen gemein ist der Beta-Lactam Ring, der Ansatzpunkt der Beta-Lactamase. Wird dieser Ring gespalten, ändert sich die Konformation des Moleküls und seine Wirkung auf die bakterielle Zellwandsynthese ist aufgehoben; aus (47)

β-Lactam Antibiotika		
Substanz	Anwendungsform	Kommentar
<i>Benzylpenicillin (Penicillin G)</i>	i.v.	erstes verfügbares β-Lactam Antibiotikum
<i>Procain-Benzylpenicillin</i> <i>Benzathin-Benzylpenicillin</i>	i.m.	Depotformen

<i>Phenoxymethylpenicillin (Penicillin V)</i>	p.o.	erste orale Anwendungsform der Penicilline
<i>Flucloxacillin</i>	p.o., i.v.	resistent gegen die Penicillinase der Staphylokokken
<i>Ampicillin</i>	i.v.	Aminopenicilline sind nicht β -Lactamase-fest. Deshalb werden sie häufig mit β -Lactamase-Inhibitoren kombiniert: Amoxicillin + Clavulansäure, Ampicillin + Sulbactam (nur i.v.) Piperacillin + Tazobactam
<i>Amoxicillin</i>	p.o.	
<i>Bacampicillin</i>	p.o.	
<i>Piperacillin</i>	i.v.	
<i>Mezlocillin</i>	i.v.	
<i>Cefazolin</i>	i.v.	Cephalosporine der 1. Generation – nicht β -Lactamase-fest
<i>Cefalexin, Cefaclor</i>	p.o.	
<i>Cefamandol, Cefuroxim, Cefotiam</i>	i.v.	Cephalosporine der 2. Generation, mäßig β -Lactamase-fest
<i>Cefuroxim-axetil</i>	p.o.	
<i>Cephamycin (Cefoxitin)</i>	p.o.	Anaerobier – Cephalosporin (zw. 2. u. 3. Generation)
<i>Cefotaxim, Ceftriaxon</i>	i.v.	Cephalosporine der 3.a Generation, hohe β -Lactamase-Stabilität
<i>Ceftazidim</i>	i.v.	Generation 3.b., hohe β -Lactamase – Stabilität
<i>Cefpodoxim-Proxetil, Cefixim</i>	p.o.	3. Generation, hohe β -Lactamase – Stabilität
<i>Cefepim</i>	i.v.	4. Generation, hohe β -Lactamase – Stabilität
<i>Imipenem, Ertapenem, Meropenem, Doripenem</i>	i.v.	Carbapeneme
<i>Aztreonam</i>	i.v.	Monobactam

Tabelle 6: Überblick über die β -Lactam Antibiotika, kein Anspruch auf Vollständigkeit. Die Einteilung der Cephalosporine variiert in der Literatur. Besonderes Interesse gilt im Folgenden den "extended spectrum Cephalosporinen", welche farblich markiert sind; aus (63)

β -Lactamasen sind Enzyme, die den β -Lactam Ring unter Abspaltung von CO₂ hydrolysieren können.

Es gibt 2 Systeme anhand derer sie eingeteilt werden können (48):

Das **Ambler Schema** teilt β -Lactamasen in 4 Hauptgruppen A-D ein, je nach Ähnlichkeit ihrer Aminosäuresequenz. Die β -Lactamasen der Gruppen A, C und D sind Serin- β -Lactamasen während die Gruppe B Metallo- β -Lactamasen enthält.

Dieses Schema sagt allerdings nichts über Phänotyp und Funktion der Enzyme aus, wobei gerade dies für ÄrztInnen und MikrobiologInnen von großer Relevanz ist. Aus diesem Grund wurde eine zweite Einteilung von **Bush und Jacoby** vorgenommen. Sie haben die β -Lactamasen hinsichtlich ihrer Substrate und Hemmer analysiert und eingeteilt (siehe Tabelle).

Die Einführung der 3. Generation der Cephalosporine in den 1980er Jahren war eine Reaktion auf die stetig zugenommene Resistenzrate der Enterobakterien gegen β -Lactame und die Ausbreitung der β -Lactamasen auch in andere Gattungen (z.B. *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*). Sie waren nicht nur effektiv gegen fast alle β -Lactamasen, sondern zeigten auch weniger Nephrotoxizität als Aminoglykoside und Polymyxine.

Bereits 1983 wurden erste β -Lactamasen entdeckt, die auch Cephalosporine der 3. Generation hydrolysieren konnten. Die molekularbiologische Analyse des Gens der neuen β -Lactamase entdeckte, dass eine einzelne Punktmutation im Vergleich zu einer bereits bekannten β -Lactamase das Resistenzspektrum extrem erweitert hatte. Alle β -Lactamasen, die auch die Cephalosporine der 3. Generation (*extended spectrum cephalosporines*) hydrolysieren können, werden **extended-spectrum β -Lactamasen (ESBL)** genannt.

3.2.1 ESBL

ESBL können Penicilline, Cephalosporine der 1., 2. und 3. Generation (in einigen Fällen auch das Cephalosporin der 4. Generation, Cefipim) sowie das Monobactam *Aztreonam* hydrolysieren. *Cephameycin* und Carbapeneme sind noch gegen ESBL-Bildner wirksam, außerdem sind ESBLs hemmbar durch β -Lactamase-Inhibitoren wie *Clavulansäure*, *Tazobactam* und *Sulbactam* (48).

Dieser einfachen und praktisch orientierten Definition, steht eine immer weiter zunehmende Zahl an ESBLs gegenüber (dzt. bereits über 600). Die Namen der einzelnen Enzyme werden von den ErstbeschreiberInnen vergeben und haben vielerlei Ursprung (Proteine, Substrate, PatientInnen der Erstisolate, etc.). Diese können nicht in jedem Fall nachvollzogen werden, auch in der medizinischen Fachliteratur werden hauptsächlich Abkürzungen verwendet. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die wichtigsten Enzymgruppen und Subtypen (inkl. anderer β -Lactamasen) sowie ihre Funktionsweise(48):

Klassifikation der β -Lactamasen						
Enzyme	Charakteristika	Substrat	Hemmung durch:		Klassifikation nach:	
			CA od. TAZ	EDTA	Bush & Jacoby	Ambler
E. coli AmpC, P99, ACT-1, CMY-2	hydrolysiert Cephalosporine besser als Benzylpenicillin, hydrolysiert Cephamycin	Cephalosporine	nein	nein	1	C
GC1, CMY-37	Hydrolyse von Ceftazidim und häufig anderer oxymino- β - Lactame	Cephalosporine	nein	nein	1e	C
PC1	bessere Hydrolyse von Benzylpenicillin als von Cephalosporinen	Penicilline	ja	nein	2a	A
TEM-1, TEM-2, SHV-1	Benzylpenicillin und Cephalosporine werden gleich stark hydrolysiert	Penicilline, Cephalosporine der 1. und 2. Generation	ja	nein	2b	A
TEM-3, SHV-2, CTX-M-15	hydrolysiert oxymino- β - Lactamasen (Cefotaxim, Ceftazidim, Cefipim, Aztreonam)	extended spectrum Cephalosporine und Monobactame	ja	nein	2be	A
TEM-30, SHV-10	kann von β - Lactamase-Inhibitoren nicht gehemmt werden	Penicilline	nein	nein	2br	A

TEM-50	hydrolysiert oxyminio- β -Lactamasen und ist resistent gegenüber β -Lactamase-Inhibitoren	<i>extended spectrum</i> Cephalosporine und Monobactame	nein	nein	2ber	A
PSE-1, CARB-3	hydrolysiert Carbenicillin	Carbenicillin	ja	nein	2c	A
RTG-4	hydrolysiert Carbenicillin, Cefipim und Cefpirom	Carbenicillin, Cefipim	ja	nein	2ce	A
OXA-1, OXA-10	hydrolysiert Cloxacillin und Oxacillin	Cloxacillin	variabel	nein	2d	D
OXA-11, OXA-15	hydrolysiert Cloxacillin und oxymino- β -Lactamasen	<i>extended spectrum</i> Cephalosporine	variabel	nein	2de	D
OXA-23, OXA-48	hydrolysiert neben Cloxacillin und Oxacillin auch Carbapeneme	Carbapeneme	variabel	nein	2df	D
Cep-A	hydrolysiert Cephalosporine, gehemmt von CA; Hydrolyse von Aztreonam kann durch CA nicht verhindert werden	<i>extended spectrum</i> Cephalosporine	ja	nein	2e	A
KPC-2, IMI-1, SME-1	hydrolysiert oxymino- β -Lactame, Cephamycin und Carbapeneme	Carbapeneme	nein	nein	2f	A
IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1	Breitspektrum-Hydrolyse inkl. Carbapenem, excl. Monobactame	Carbapeneme	nein	ja	3a	B
CphA, Sfh-1	bevorzugte Hydrolyse von Carbapenemen	Carbapeneme	nein	ja	3b	B

Tabelle 7: Klassifikation der β -Lactamasen. In dieser Liste scheinen nicht nur klassische ESBL (hellgrau markierte Zeilen) auf, sondern auch β -Lactamasen, die resistent gegenüber β -Lactamase-Inhibitoren sind sowie Carbapenemasen. CA: Clavulansäure (clavulanic acid), TZB: Tazobactam, EDTA: Ethyldiamintetraessigsäure, sie bindet 2-wertige Kationen (z.B. Fe²⁺), die für die Funktion vieler Enzyme essentiell sind; aus (49).

Im Folgenden werden die wichtigsten ESBL-Enzyme vorgestellt.

1.) SHV

Das Enzym mit Namen *sulphydryl variable* (SHV) ist die am häufigsten detektierte β -Lactamase. 1983 wurde in Deutschland erstmals eine β -Lactamase entdeckt, die *Cefotaxim* (ein *extended spectrum* Cephalosporin) effizient hydrolysieren konnte. Sie unterschied sich von der bereits bekannten β -Lactamase SHV-1 nur in einer einzigen Aminosäure an der Stelle 238 des Moleküls und wurde SHV-2 genannt. SHV-2 wurde in den folgenden 15 Jahren in allen Kontinenten gefunden, sie entstanden durch Selektionsdruck nach Einführung der 3. Generation der Cephalosporine.

SHV ESBL-Enzyme werden von vielen Enterobakterien produziert, aber auch Ausbrüche von SHV-produzierenden *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter* spp. sind beschrieben(48).

2.) TEM

Das erste TEM-Enzym wurde 1965 in einer Probe eines Patienten Namens *Temoneira* entdeckt. Wie bei den SHV-Enzymen, handelte es sich um eine β -Lactamase, die zuerst nur die Penicilline und Cephalosporine der 1. und 2. Generation hydrolysieren konnte. Erst 1982 wurde in Liverpool ein TEM-Enzym (TEM-12) mit der Fähigkeit *Ceftazidim* zu hydrolysieren beschrieben. Interessanterweise wurde das Enzym an einer neonatologischen Abteilung entdeckt, wo kurz zuvor ein Ausbruch von TEM-1 produzierenden *Klebsiella oxytoca* stattgefunden hatte. Alle infizierten Kinder wurden mit *Ceftazidim* behandelt - ein weiteres Beispiel für eine Antibiotika-induzierte Resistenzentwicklung.

Es gibt mittlerweile über 100 verschiedene TEM- β -Lactamasen, die meisten davon sind ESBL. Einige TEM-Enzyme haben eine Resistenz gegenüber β -Lactamase-Inhibitoren entwickelt, fast alle dieser Enzyme besitzen jedoch nur geringe Hydrolyse-Aktivität gegen *extended-spectrum* Cephalosporine. Denjenigen, die sowohl eine ESBL aufweisen, als auch resistent gegen β -Lactamase-Inhibitoren sind, entsprechen die TEM-Mutanten CMT-1 bis CMT-4(48).

3.) CTX-M und Toho β -Lactamasen

Cefotaxim wird von allen CTX-M-Enzymen hervorragend hydrolysiert (daher der Name). Die meisten CTX-M-Enzyme sind noch empfindlich für *Ceftazidim*, aber

natürlich gibt es auch hier bereits Resistenzentwicklungen. Der β -Lactamase-Inhibitor *Tazobactam* wirkt bei diesen Enzymen 10mal besser als *Clavulansäure*.

CTX-M β -Lactamasen haben sich aus einem einst geografisch begrenztem Gebiet (Südamerika, Ferner Osten, Osteuropa) weltweit verbreitet. Es könnte aufgrund zahlreicher Befunde in China und Indien inzwischen das am häufigsten diagnostizierte ESBL-Enzym sein(48).

Auch die Toho-1 und Toho-2 sind CTX-M β -Lactamasen strukturell sehr ähnlich. Sie wurden zuerst im Omori Hospital der Toho University School of Medicine in Japan aus einem *E.coli*- Stamm analysiert. Die Toho-Enzyme hydrolysieren *Cefotaxim* besser als *Ceftazidim*(48).

4.) OXA

Oxa- β -Lactamasen hydrolysieren *Oxacillin* besonders gut (daher der Name). Die meisten Oxa-Enzyme können Cephalosporine der 3. und 4. Generation nicht hydrolysieren. Die wichtigsten OXA-ESBLs sind OXA-11, -15 und -16. Manche Organismen produzieren simultan zu ESBL - OXA-Enzymen auch OXA-Carbapenemasen, wodurch alle β -Lactam Antibiotika wirkungslos werden(48).

5. PER

PER- β -Lactamasen stimmen genetisch in bis zu 27% mit TEM- und SHV-Enzymen überein. Sie wurden zuerst in *Pseudomonas aeruginosa* Stämmen in der Türkei entdeckt, später auch in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* und in *Acinetobacter*. PER-1 wurde mittlerweile in 46% aller nosokomialen *Acinetobacter* Isolate und in 11% der *Pseudomonas aeruginosa* Isolate in der Türkei nachgewiesen. PER-2 wurde bislang nur in Südamerika detektiert(48).

6. andere ESBLs

Zahlreiche Genom-integrierte bzw. Plasmid medierte Enzyme (Ambler Klasse A) wurden in letzter Zeit entdeckt. Z.B.: VEB-1 wird von einem Gen kodiert, das auf einem Plasmid liegt und ähnelt dem PER-1 Enzym. Andere Beispiele für nicht-TEM, nicht-SHV ESBLs sind GES, BES, TLA, SFO und IBC(48).

3.2.2 ANDERE β -LACTAMASEN

Die **AmpC β -Lactamasen** unterscheiden sich von den ESBLs in ihrer Stabilität gegenüber β -Lactamase-Inhibitoren. Gebildet v.a. von *Enterobacter cloacae*., werden durch antimikrobiellen Einsatz von 3. Generation Cephalosporinen bei Enterobacter-Infektionen, Organismen mit hochregulierter AmpC β -Lactamase selektiert. *Cefepim* kann gegen AmpC produzierende Organismen wirksam sein(48).

Metalloenzyme wie z.B. die von *Stenotrophomonas maltophilia* produzierte MBL (Metallo β -Lactamase), NDM oder VIM hydrolysieren Carbapeneme und 3. Generation Cephalosporine. Sie können von *Clavulansäure* nicht inhibiert werden, allerdings von EDTA.

Viele Carbapenemase-positiven Stämme können gleichzeitig auch weitere Breitspektrum- β -Lactamasen wie CTX-M-15 und andere ESBLs produzieren(48).

Die ***Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)** ist eine Serin-Carbapenemase und hydrolysiert Carbapeneme und Cephalosporine. Sie kann mit keinem β -Lactamase-Inhibitor oder EDTA gehemmt werden. Die Inaktivierung durch Borsäure liefert in der phänotypischen Methodik den Unterschied zwischen Metallo-Carbapenemasen und Serin-Carbapenemasen(50). Das KPC Gen liegt auf einem Plasmid, das auch ein Transposon enthält wodurch dieses Gen leicht auf andere Spezies übertragen werden kann(48).

3.3 EPIDEMIOLOGIE

Das *European Antimicrobial Resistance Surveillance Systems (EARSS)* ist ein internationales Netzwerk, welches aus nationalen Surveillance-Programmen vergleichbare und gültige Daten hinsichtlich der Resistenzentwicklung von Keimen sammelt(51):

Seit dem ersten Auftreten von ESBLs Anfang der 1980er Jahre haben sich diese rasch ausgebreitet. Die folgenden Abbildungen der EARSS sollen die Entwicklung grafisch darstellen:

Als im Jahr 2004 an der Abteilung für Neonatologie der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Graz erstmals ESBL produzierende Bakterien detektiert wurden, sah die Resistenzlage gegen Cephalosporine der 3. Generation bei *E.coli* in Europa so aus:

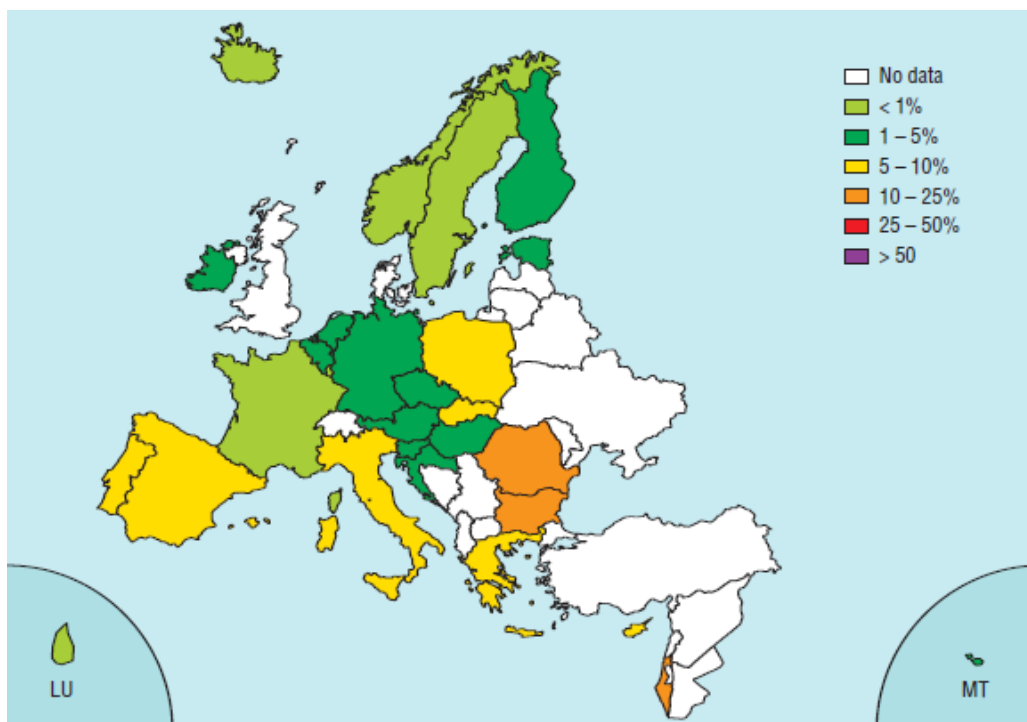


Abbildung 13: schematische Darstellung der Resistenz von *E.coli* gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation 2004 in Europa; aus (51)

Österreich lag mit einer Rate von 1-5% im Niedrig-Risiko-Bereich, fast alle Keime waren noch sensibel auf *Cefotaxim* und *Ceftazidim*. 2004 wurden 4 Spezies (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, *E.coli*) separat in der Analyse der EARSS dargestellt.

Bereits 4 Jahre später war der Bericht von 136 Seiten 2004 auf 180 Seiten 2008 angewachsen und die Spezialanalyse der einzelnen Keime um *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa* erweitert.

V.a. im Süden Europas stiegen die Resistenzraten in 4 Jahren deutlich an, aber auch in Österreich lag die Resistenzrate gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation 2008 bereits bei 5-10% aller Enterobakterien(52):

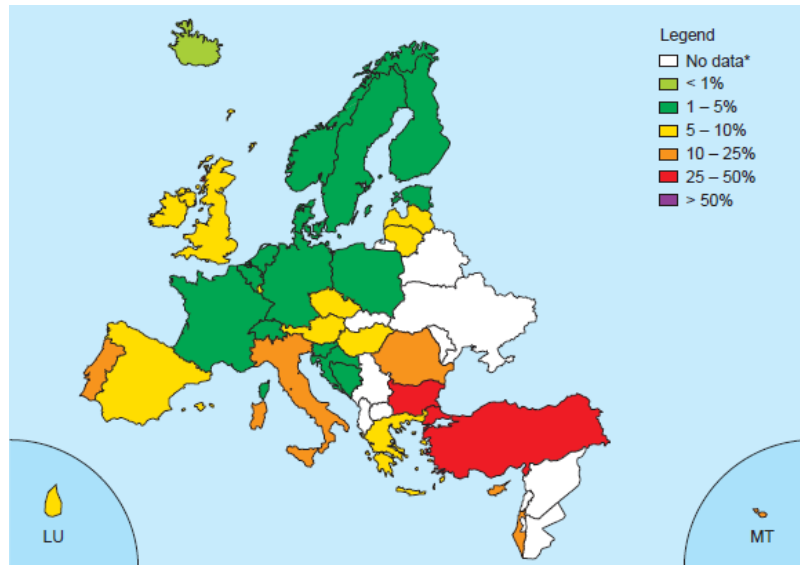


Abbildung 14: Übersicht über die Resistenzraten von *E.coli* gegenüber Cephalosporine der 3. Generation 2008 in Europa; aus(52)

Die EARSS bietet zusätzlich zu den jährlichen Resistenzberichten eine interaktive Webseite an, wo jederzeit die aktuellsten Daten zu den beobachteten Keimen eingesehen werden können: die *EARSS interactive database*

<http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARSNet/database/Pages/database.aspx>

Eine Landkarte Europas aus der interactive database des Jahres 2010 zeigt die Resistenzlage von *E.coli* gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation (53):

Percentage resistance

- < 1%
- 1 to < 5%
- 5 to < 10%
- 10 to < 25%
- 25 to < 50%
- ≥ 50%
- No data reported or less than 10 isolates
- Not included

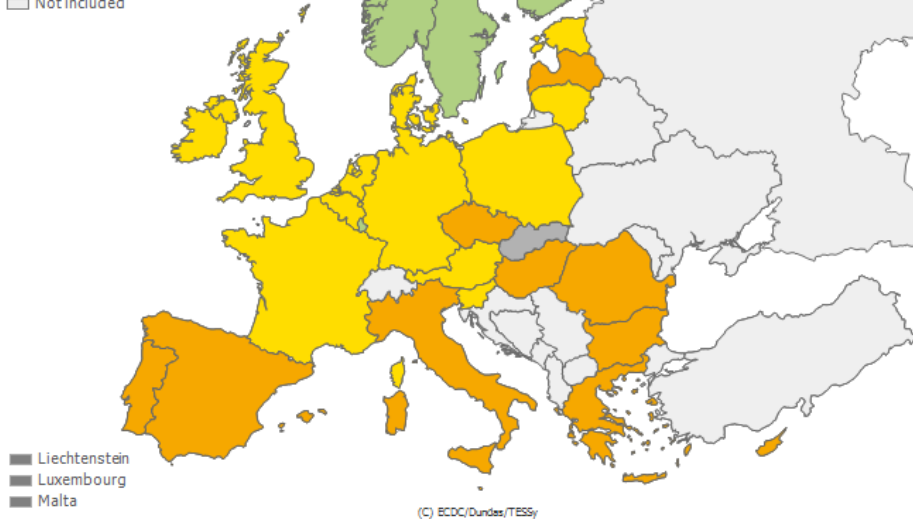


Abbildung 15: Resistenzraten von *E. coli* gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation der europäischen Länder 2010; EARSS interactive database

Im Vergleich zu 2008 hat sich die Resistenzlage in West- und Mitteleuropa sowie in Spanien und Griechenland deutlich verschlechtert. Einzig Bulgarien konnte die nationale Resistenzsituation verbessern.

Percentage resistance

- No report
- <1%
- 1-5%
- 5-10%
- 10-25%
- 25-50%
- > 50%
- Other Country (non EU/EEA)



Percentage resistance

- No report
- <1%
- 1-5%
- 5-10%
- 10-25%
- 25-50%
- > 50%
- Other Country (non EU/EEA)

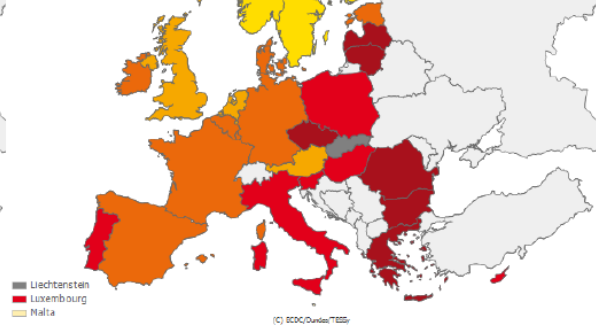


Abbildung 16: Vergleich der Resistenzentwicklung von *Klebsiella pneumoniae* zwischen 2008 und 2010; EARSS interactive database

Dramatisch ist die Situation bei der Resistenzrate von *Klebsiella pneumoniae*, welche sich zwischen 2008 und 2010 in großen Teilen Europas verschlechtert hat. Besonders betroffen sind die baltischen Staaten, aber auch der Ost-Balkan und die Mittelmeerländer.

Lokale ESBL-Situation in der Steiermark:

Im Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin der MUG wurden 2011 insgesamt in 814 Proben 838 ESBL bildende *E.coli* von 474 PatientInnen nachgewiesen. In 557 Proben von 135 PatientInnen wurde 583 ESBL produzierende *Klebsiella spp.* (343x *Klebsiella oxytoca* von 63 PatientInnen, 240x *Klebsiella pneumoniae* von 77 PatientInnen) detektiert(54).

Andere 2011 in Graz detektierte ESBL-Bildner(54):

- 77x *Proteus mirabilis*
- 55x *Citrobacter freundii*
- 12x *Citrobacter amalonaticus*
- 7x *Enterobacter cloacae*
- 6x *Morganella morganii*
- 1x *Proteus vulgaris*
- 1x *Enterobacter aerogenes*
- 1x *Citrobacter farmeri*.

Eine Studie von Eisner *et al.* aus dem Jahr 2006 beschreibt die Situation hinsichtlich der ESBL-Enzyme. Waren bis 1998 ausschließlich TEM-Enzyme in Graz identifiziert worden, stieg im Beobachtungszeitraum der Studie 1998 bis 2004 der Anteil an CTX-M-Enzymen von 0% auf 58% an(55).

Mehr dazu siehe Kapitel 4.3 Ergebnisse.

3.4 ESBL DIAGNOSTIK

Die Guidelines des **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)** der Vereinigten Staaten von Amerika sind in vielen Studien Grundlage der Interpretation von mikrobiologischen Befunden. Diese Standards, einschließlich der Grenzen („*breakpoints*“) der Hemmhof-Durchmesser (s.u.) und minimalen Hemmkonzentrationen (MHK; s.u.) hinsichtlich der Wirksamkeit antimikrobieller Substanzen, wurden in den 1980er Jahren, noch vor Auftreten der ersten ESBLs entwickelt(48).

Das **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)** der *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID)* hat in seinen aktuellsten Guidelines (1.1.2012) zur Beurteilung von Befunden wesentlich niedrigere *breakpoints* zur Festlegung von Sensibilität und Resistenz angesichts der zunehmend kritischen Resistenzsituation mancher Keime in einigen Ländern empfohlen(56) (vgl. dazu Abb.17: *Klebsiella pneumoniae* in Griechenland und im Ost-Balkan).

3.4.1 METHODEN

Von CLSI und EUCAST werden verschiedene Methoden zur ESBL-Diagnostik empfohlen. Häufig kommen für die einzelnen Anwendungen eigens entwickelte und käuflich erwerbbar -vorgefertigte Systeme (**Etest**®) oder Automaten (z.B.: Vitek®, MicroScan®, BD Phoenix Automated Microbiology System®) zum Einsatz(48):

Screening Methoden:

- **Plättchendiffusionstest** (auch Agardiffusionstest; disk diffusion methods) zur Bestimmung des Hemmhof-Durchmessers (s.u.)
- **Bouillon – Verdünnungsmethode** (Dilutionstest; *dilution antimicrobial susceptibility testing*) zur Bestimmung der MHK (s.u.)

andere Testmethoden:

- Cephalosporin/*Clavulansäure* Kombinationsplatten
- Bouillon-Mikroverdünnung (*broth microdilution*)
- *Double disk diffusion*
- Testagar mit *Clavulansäure*

- *Disk replacement method*
- *Three-dimensional test*

3.4.1.1 AGARDIFFUSIONSTEST

Die am häufigsten zum Screening angewandte Methode in der Mikrobiologie ist der Agardiffusionstest(48).

Hierzu wird ein Müller-Hinton Agar mit dem zu testenden Keim beimpft. Danach werden in gleichmäßigem Abstand verschiedene Antibiotikaplättchen aufgebracht. Die Agarplatten werden je nach Spezies bei ca. 35°C für 16-20h (je nach Labor-Workflow) inkubiert und anschließend die Größe der Zone gemessen und interpretiert, in der kein Bakterienwachstum stattgefunden hat. Diese Zone wird als Hemmhof bezeichnet.

Für das Screening auf ESBL werden *Cefpodoxim*, *Ceftazidim*, *Aztreonam*, *Cefotaxim*, *Ceftriaxon*, *Amoxicillin/Clavulansäure* u.a. getestet.

Als resistent gilt ein Keim, wenn es keinen Hemmhof gibt oder der Durchmesser des Hemmhofs unter einem empirisch festgestellten, definierten Wert liegt. Sensibel ist ein Keim auf das getestete Antibiotikum, wenn der Durchmesser des Hemmhofs über einem empirisch festgestellten, definierten Wert liegt. Bei einem Ergebnis dazwischen, gilt der Keim als intermediär und die Erfolgsaussicht einer Therapie als unsicher.

In der Interpretation der Hemmhof-Durchmesser unterscheiden sich die Empfehlungen von CLSI und EUCAST:

Während die CLSI Keime mit einem Hemmhof-Durchmesser von *Cefpodoxim* bereits bei 17mm als sensibel kennzeichnet, wird ein Keim vom EUCAST erst bei einem Hemmhof-Durchmesser von *Cefpodoxim* ≥ 21 mm als sensibel interpretiert(48,56).

EUCAST (nach dem sich die meisten europäischen Labors inzwischen orientieren) empfiehlt für die Interpretation der *extended spectrum* Cephalosporine(56):

Cephalosporin	Hemmhof-Durchmesser in mm	
	sensibel	resistent
<i>Cefepim</i>	>24mm	<21mm
<i>Cefotaxim</i>	>20mm	<17mm
<i>Ceftazidim</i>	>22mm	<19mm

Tabelle 8: Auswahl aus dem EUCAST *clinical breakpoint table*(56); Die Grenzen der Hemmhof-Durchmesser sind strenger als in den CLSI Guidelines.



Abbildung 17: Phänotyp eines Agardiffusionstests bei ESBL-Testung. Es zeigt sich ein Wachstum bei *Amoxicillin* (AM), *Cefalotin* (CF) und *Cefuroxim* (CXM). Der Hemmhof von *Cefotaxim* (CTX) ist vermindert, weshalb hier eine ESBL vermutet wird; aus [54].

3.4.1.2 DILUTIONSTEST

Beim Dilutionstest wird eine geometrische Verdünnungsreihe des zu testenden Antibiotikums hergestellt (oder fertige Präparate gekauft). Nach Beimpfung mit der Bakteriensuspension, wird die Lösung inkubiert. Dieser Bouillon – Verdünnungstest ermittelt schließlich die Konzentration des Antibiotikums, ab der kein Keimwachstum mehr stattfindet = minimale Hemmkonzentration (MHK), sie wird in mg/L ($\mu\text{g/ml}$) angegeben (48).

Als sensibel werden Keime bezeichnet, die bei einer empirisch festgestellten, definierten MHK (*breakpoint 1*) *in vitro* kein Wachstum zeigen.

Resistent ist ein Keim, wenn die MHK des getesteten Antibiotikums einen definierten Wert überschreitet (*breakpoint 2*).

Als intermediär wird, falls vorhanden, ein Keim mit MHK im Bereich zwischen den *breakpoints* bezeichnet. Für den Einsatz in der Therapie gilt, dass die Wirksamkeit des getesteten Antibiotikums bei diesem Keim unsicher ist.

Um eine MHK festzustellen, werden verschiedene Systeme angewendet:

Automatisierte Bebrütung und Interpretation von vorgefertigten Verdünnungsreihen, z.B. bietet Vitek© von bioMérieux verschiedene Karten mit Antibiotika-Konstellationen je nach Aufgabenprofil (Harnkeime vs. Rachenkeime etc.).



Infos zur Resistenz		Karte: AST-N130	Chargenbez: 440200320	Verfallsdatum: 08.06.2012 13:00 CEST	
		Beendet: 12.01.2012 20:24 CET	Status: Fertig	Analysen-Dauer: 9,25 Std.	
Antibiotikum	MHK	Interpretation	Antibiotikum	MHK	Interpretation
Ampicillin	>= 32	R	Piperacillin/Tazobactam	<= 4	S
Amoxicillin/Clavulansäure	4	S	Ceftazidim	<= 1	S
Cefuroxim	>= 64	R	Meropenem	<= 0,25	S
Cefuroxim-Axetil	>= 64	R	Ertapenem	<= 0,5	S
Cefotaxim	<= 1	S	Cefazolin	>= 64	R
Aztreonam	<= 1	S	Gentamicin	>= 16	R
Trimethoprim	<= 0,5	S	Fosfomycin	<= 16	S
Trimethoprim/Sulfamethoxazol	<= 20	S	Cefoxitin	<= 4	S
Ciprofloxacin	<= 0,25	S	ESBL	POS	+
Nitrofurantoin	<= 16	S	Nalidixinsäure	<= 2	S

*= Abgeleitete Antibiotika **= AES modifiziert ***= Anwender modifiziert

AES-Befunde:	Letzte Änderung: 21.12.2011 14:47 CET	Parameterset: Hygiene Institut Graz Global European+Nat.Res
Zuverlässigkeit-Ebene:	Inkonsistent	

Abbildung 18a+ 20b: Vitek 2 des Instituts für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin der MUG; Vitek- Resistenzbefund einer speziell zur Harndiagnostik zusammengestellten Antibiotika-Konstellation. Dieser Befund ist ein Beispiel dafür, dass phänotypische Bestimmung von ESBL nicht immer ganz leicht ist: Die Cephalosporine der 3. Generation und Aztreonam haben MHKs <1 und der Keim wird somit als sensibel beurteilt. Der ESBL Screeningtest (Vergleich des Wachstums bei Cephalosporin der 3. Generation alleine und in Kombination mit β -Lactamase-Inhibitor; Eine Verbesserung der Wirksamkeit in der Kombination ist ein Hinweis auf ESBL) liefert jedoch ein positives Ergebnis. Das Expertensystem der Zuverlässigkeits-Ebene meldet daher: Inkonsistenter Befund. In diesem Fall sind andere Bestätigungsmaßnahmen nötig. Bilder zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Gebhard Feierl

Der Epsilometertest (**Etest**® von AB Biodisk) besteht aus einem Teststreifen, auf dessen einer Seite ein Gradient von z.B. *Ceftazidim* (0,5 – 32 µg/ml) aufgebracht ist, und auf der anderen Seite ein Gradient desselben plus einer konstanten Konzentration von *Clavulansäure* (4 µg/ml). Ebenso gibt es einen analogen Teststreifen für *Cefotaxim*. Der Teststreifen wird auf einen beimpften Agar aufgebracht und nach Inkubation die Wirksamkeit an der markierten Hemmkonzentration abgelesen (siehe Abb. 21)(48).

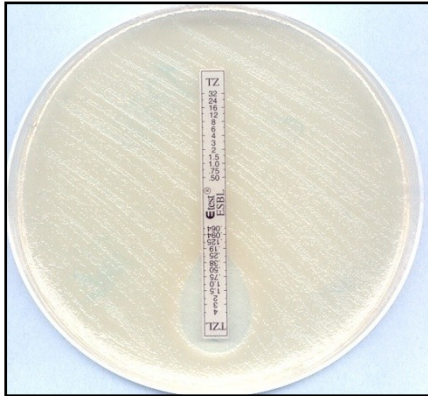


Abbildung 19: E-test von *Ceftazidim*. Am oberen Ende des Streifens ist *Ceftazidim* in verschiedenen Konzentrationen alleine aufgebracht, am unteren Ende in Kombination mit *Clavulansäure*. Es zeigt sich eine Resistenz der Keime gegenüber *Ceftazidim* alleine, allerdings kann es gemeinsam mit *Clavulansäure* das Keimwachstum hemmen. Dieser Befund spricht für das Vorliegen einer ESBL. Bild zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Gebhard Feierl

Die Interpretation der gemessenen MHK-Werte wird von der EUCAST wie folgt empfohlen(56):

Cephalosporin (Konzentration eines Plättchens)	MHKs in mg/L	
	sensibel ≤	resistent >
Cefepim (30µg)	1	4
Cefotaxim (5µg)	1	2
Ceftazidim (10µg)	1	4

Tabelle 9: Auswahl aus dem EUCAST *clinical breakpoint table* (56); Interpretation von MHKs der wichtigsten *extended spectrum Cephalosporine*

3.4.1.3 ANDERE TESTVERFAHREN

1.) Cephalosporin/Clavulansäure (Kombinations-) Platten können sowohl als Screening, als auch als Bestätigungstest verwendet werden.

Hierbei wird zur Kultur der Bakterien ein Agar verwendet, der bereits ein Cephalosporin (z.B. 30 µg *Cefotaxim* oder 30 µg *Ceftazidim*) mit oder ohne 10 µg *Clavulansäure* enthält. Findet auf diesen Platten ein Keimwachstum statt, handelt es sich sehr wahrscheinlich um einen ESBL-Bildner oder anderen Keim mit Resistenz gegen Cephalosporine der 3. Generation (z.B. Carbapenemase-Bildner) und es sind weitere Schritte zur Diagnostik angezeigt(48).

2.) Die Bouillon Mikrodilution verwendet dasselbe Prinzip der Verdünnungsreihe, allerdings auf ein eingeschränktes Antibiotikasppektrum: Nur *Cefotaxim* (0,25 - 64 µg/ml) mit und ohne 4 µg/ml *Clavulansäure* sowie *Ceftazidim* (0,25 - 128 µg/ml) mit und ohne *Clavulansäure* werden getestet. Der Test ist positiv, wenn sich die MHK in den Tests mit *Clavulansäure* in min. 3 aufeinanderfolgenden Testreihen um das Doppelte erhöht hat, als die MHK des Cephalosporins alleine ausmacht(48).

3.) Die double disk diffusion - Methode

Bei diesem Verfahren, wird in der Mitte des Agars ein *Amoxicillin/Clavulansäure* Plättchen aufgebracht, im Abstand von 30mm ringsherum die anderen Antibiotika mit je 30 µg Wirkstoff. Der Test ist positiv, wenn das getestete Antibiotikum selbst keinen oder einen zu kleinen Hemmhof aufweist, jedoch in einem Bereich in Diffusionsreichweite der *Clavulansäure* als Synergismus der beiden ein Hemmbereich entsteht, siehe Abb. 19 (48).

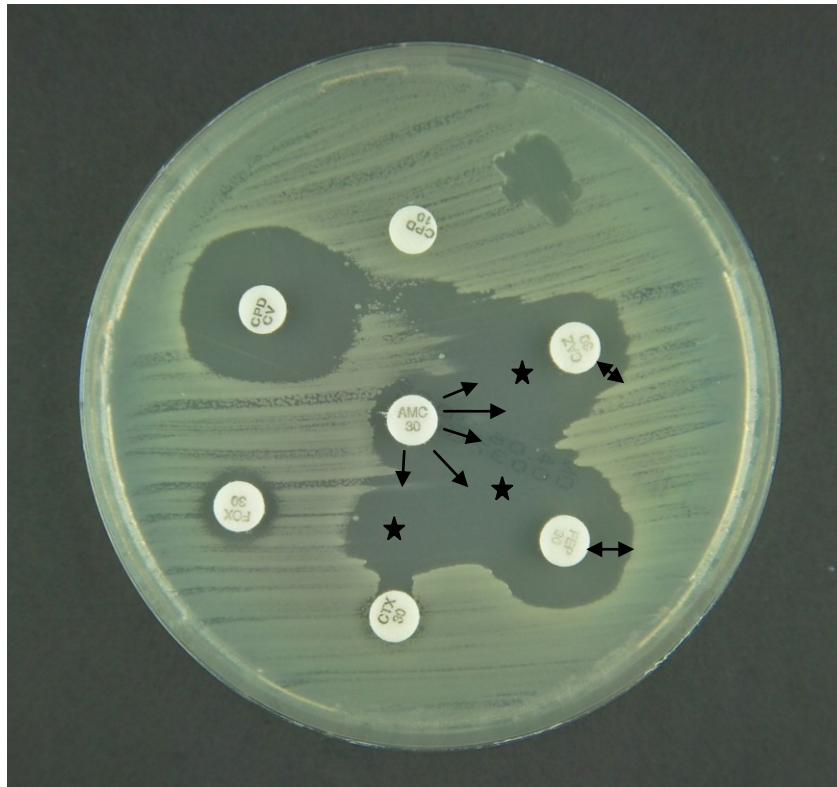


Abbildung 20: Phänotyp eines ESBL-positiven *Citrobacter* spp. Hier erkennt man Wachstum bei *Cefpodoxim* (CPO), *Cefoxitin* (FOX) und *Cefotaxim* (CTX). Der Hemmhof von *Ceftazidim* (CAZ) und *Cefepim* (FEP) ist deutlich verschmälert. Unter gemeinsamer Wirkung mit *Clavulansäure* (vom *Amoxicillin/Clavulansäure* (AMC) in der Mitte weg diffundierend) zeigen jedoch auch CAZ, CTX und FEP verstärkte Wirksamkeit. Das Kombinationspräparat aus CPO und *Clavulansäure* (CPO CV) hat einen gut ausgeprägten Hemmhof. Bild zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Gebhard Feierl

4.) Der Müller-Hinton Agar mit *Clavulansäure* wird gleichzeitig mit einem konventionellen Müller-Hinton Agar beimpft und inkubiert. Eine Differenz zwischen den Hemmhöfen im *Clavulansäure*-freien zum *Clavulansäure*-haltigen Agar von mehr als 10mm wird als positiv für ESBL gewertet. Ein Nachteil dieser Methode besteht in der abnehmenden Aktivität von *Clavulansäure* nach 72h, wonach der Test ein falsch-negatives Ergebnis liefern kann(48).

5.) Die disk replacement Methode lässt zuerst 3 Plättchen mit *Amoxicillin/Clavulansäure* auf einem beimpften Agar platzieren. Nach 1h Inkubation bei Raumtemperatur werden die 3 *Amoxicillin/Clavulansäure* Plättchen gegen je ein Plättchen mit *Cefotaxim*, *Ceftazidim* und *Aztreonam* ausgetauscht. Kontrollplättchen dieser 3 Antibiotika werden in einem Abstand von min. 30mm ebenfalls auf den Agar aufgebracht. Der Test wird als positiv beurteilt, wenn der Unterschied im Hemmhofdurchmesser zwischen den Kontrollen und den ausgetauschten Plättchen ≥ 5 mm ist(48).

3.5 MANAGEMENT

Das klinische Management von ESBL besteht in erster Linie aus 2 Säulen(48):

1.) Initiale Infektionskontrolle

- Durchführung routinemäßiger Kontrollen von Stuhlproben bzw. gegebenenfalls Harnproben oder Abstrichen zur Detektion von mit ESBL-Bildnern kolonisierten, aber nicht infizierten PatientInnen
- Regelmäßige Evaluierung der Oberflächen, des Wassers, von Nahrungsmitteln und von medizinischem Equipment (Fieberthermometer, Stethoskope, Sonografiegeräte, Endoskope, etc.)
- Forcierung der Einhaltung von Hygienemaßnahmen: Händedesinfektion, Isolierung bzw. Kohortierung sowie Mantel- und Handschuhpflege von Kolonisierten und Infizierten

2.) Antibiotika

Als wichtigste Maßnahme gilt es, die Entwicklung von ESBLs bzw. die Selektion von ESBL-Bildnern zu verhindern. Der empirische Einsatz von Antibiotika im klinischen, niedergelassenen und veterinärmedizinischen Bereich sollte kritisch abgewogen und *extended spectrum* Cephalosporine äußerst restriktiv verwendet werden.

Als Konsequenz auf einen signifikanten Prozentsatz von ESBL-positiven gram-negativen Bakterien auf einer Station sollte eine Umstellung des Antibiotika-Regimes erfolgen. Diesbezüglich ist die lokale Resistenzsituation zu berücksichtigen. Internationale Guidelines empfehlen den Umstieg auf Carbapeneme (Imipenem, Meropenem, Ertapenem), Chinolone oder β -Lactam/ β -Lactamase-Inhibitor Kombinationen.

Die selektive Dekontamination des Darms (*selective digestive decontamination*; SDD) wird kontrovers diskutiert. 3 Studien hatten mit ihrem Regime Erfolg, einen Ausbruch von ESBL-Bildnern zu unterbrechen. Folgende Antibiotika-Kombinationen kamen zum Einsatz: *Norfloxacin*, Polymyxin+Neomycin+Nalidixinsäure und *Colistin+Tobramycin*.

Plasmide, welche ein ESBL-Gen tragen, tragen häufig auch andere Resistenzgene z.B. gegenüber Aminoglykosiden und *Trimethoprim/Sulfmethoxazol*. 15-30% aller ESBL-Bildner sind zusätzlich resistent gegenüber Chinolonen. In diesen Fällen wäre eine *Norfloxacin*-gestützte Prophylaxe wirkungslos(48).

Auch durch SDD kann es zur Entwicklung von Resistenzen oder Selektion resistenter Stämme kommen(38). Regelmäßige Evaluierungen der lokalen Keimsituation mittels Stuhlkulturen können als Monitoring-Instrument hilfreich sein.

4. ZUSAMMENHANG ZWISCHEN EINER BESIEDELUNG MIT ESBL-BILDNERN UND NEC

4.1 EINLEITUNG

Wie bereits ausführlich erläutert wurde, hat eine intestinale Fehlbesiedelung eine essentielle Rolle in der Pathogenese der nekrotisierenden Enterokolitis. Die Darmflora beeinflusst über verschiedene immunologische Mechanismen (LPS – TLR4, Aktivieren der proinflammatorischen Zytokinkaskade, SCFAs, Hemmung der Reparationsprozesse von Enterozyten) die Entstehung der NEC. Außerdem sind Bakterien für das pathognomonische radiologische Zeichen der NEC, die *Pneumatosis intestinalis*, verantwortlich.

Nach dem ersten Auftreten von ESBL bildenden Enterobakterien an der NICU Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Ende 2004, wird seit dem Jahr 2005 zweimal wöchentlich routinemäßig Stuhl der stationären PatientInnen an das Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin geschickt und auf ESBL-Bildner untersucht um Besiedelungen rechtzeitig zu erkennen.

Eine große Zahl an Befunden steht zur Verfügung. Besonders aufgefallen ist dabei das Jahr 2005 mit einer großen Anzahl an ESBL- positiv getesteten Enterobakterien aus den Stuhlkulturen und der größten Inzidenz der NEC im Jahresvergleich 2000 - Mitte 2011.

Als Prophylaxe einer NEC wird an der Abteilung für Neonatologie der Grazer Kinderklinik eine *selective digestive decontamination* mittels Antimykotikum und Antibiotikum durchgeführt, sowie ein Probiotikum verwendet(59):

- *Lactobacillus rhamnosus* GG (1g=1x10⁹ cfu/Tag, aufgeteilt in 2 Einzeldosen)
- *Nystatin* (10.000 IU/kg alle 6h per os)
- *Gentamicin* (7mg/kg alle 12h per os)

In den Jahren 2005 und 2006 wurde bei Detektion von ESBL-besiedelten PatientInnen, wegen der hohen Rate an zusätzlicher Gentamicin-Resistenz der ESBL-Bildner, *Colistin* (8mg/kg einmal täglich per os) statt Gentamicin als Teil der NEC-Prophylaxe verwendet. Eine Kolonisation der noch nicht betroffenen PatientInnen sollte verhindert werden. Strenger et al. konnten jedoch zeigen, dass Besiedelungen auch unter *Colistin* vorkommen und diese Strategie wurde wieder verlassen(38).

Die Prophylaxe mit dem Aminoglykosid *Gentamicin* (s.o.) und nach der neuen Studie auch mit *Colistin* kann also eine NEC durch ESBL-bildende Enterobakterien nicht verhindern.

Da die Inzidenz der NEC in Graz im internationalen Vergleich sehr niedrig ist, gilt es nun den Zusammenhang mit dem Auftreten der ESBL-Bildner und der zeitlichen Zunahme der NEC-Inzidenz genauer zu betrachten.

4.2 PATIENTINNEN UND METHODEN

Alle PatientInnen der NICU Graz vom Zeitpunkt der Einführung der routinemäßigen Stuhltestung auf ESBL-bildende Enterobakterien (Jänner 2005) bis zum festgelegten Endzeitpunkt der Studie (einschließlich September 2011) wurden eingeschlossen.

Ausgeschlossen wurden sehr kleine Frühgeborene (geboren in der 23. SSW), die ihre ersten Lebensstunden nicht überlebt haben und demnach nur sehr kurz (<1 Tag) PatientIn der NICU waren.

Insgesamt wurden **3987 PatientInnen** im Beobachtungszeitraum auf der NICU Graz betreut und in die Studie eingeschlossen.

Für diese Studie liegt ein gültiges positives Votum der Ethikkommission der MUG vor.
EK-Nummer: 24-286 ex 11/12

4.3.1 DATEN UND DEFINITIONEN

Die Daten der PatientInnen stammen aus der Abteilungs- internen Datenbank der NICU Graz. Dort werden nach Entlassung der Kinder alle relevanten Daten (GA, GG, Geburtsmodus, Geburtsort, Apgar, Diagnosecodes, Beatmungsform und –zeitraum, und die Dauer eines ggf. angelegten ZVK) von einem/r OberärztIn der Abteilung erfasst. Zusätzlich wurde eine Suche im Krankenhausinformationssystem MeDocs® durchgeführt um die Diagnose NEC noch einmal anhand der Krankengeschichte zu überprüfen und falsch positive auszuschließen (in 18 Fällen wurde eine SIP diagnostiziert).

Für die **Definition von NEC** wurde die in der Kinderklinik gebräuchliche Klassifikation nach Bell in der von Kliegman et al. überarbeiteten Version verwendet. Ab dem Stadium 2A (definitive NEC) wurde die Erkrankung als NEC bezeichnet.

Die Diagnose NEC bedeutet eine gefürchtete (hohe Awareness des Personals) und häufig fulminant verlaufende Erkrankung, welche interdisziplinär gestellt (Neonatologie, Kinderradiologie, Kinderchirurgie) und therapiert wird. Auf Grund der hohen Awareness des Personals sind falsch negativ diagnostizierte PatientInnen praktisch auszuschließen.

Frühgeburtlichkeit wurde nach internationalen Standards als Geburt vor der vollendeten 37. SSW definiert. Zudem wurden Gruppen nach GG getrennt betrachtet: VLBW wurde definiert als $GG \leq 1500g$ und ELBW als $GG \leq 1000g$.

Der mikrobiologische Status **ESBL positiv** wurde nach einmaligem Eintreffen eines dementsprechenden Befundes des Instituts für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin der MUG vergeben. In dieser Studie wurde die Besiedelung mit ESBL-Bildnern untersucht, die *per se* noch nicht pathologisch bzw. eine Infektion ist. ESBL-Bildner können wie andere Bakterien auch Barrieren durchbrechen und invasiv werden. Bewiesene Bakteriämien mit ESBL-Bildnern wurden im Untersuchungszeitraum nicht beobachtet. Jedoch werden Blutkulturen bei Frühgeborenen aufgrund der schwierigen Gefäßsituation, der geringen Blutmengen und der dadurch mangelhaften Sensitivität selten angelegt. Etwaige Resektate einer chirurgischen Therapie werden nicht routinemäßig mikrobiologisch analysiert.

4.3.2 TESTPARAMETER

Da besonders junge und kleine (=unreife) Neugeborene häufiger an NEC erkranken als reife, wurden das **Gestationsalter** und das **Geburtsgewicht** als wichtigste Testparameter gewählt.

Der Geburtsmodus spielt eine wesentliche Rolle in der initialen Darmbesiedelung (Keime der vaginalen Flora vs. Umgebungskeime bei *sectio caesarea*; siehe Kapitel 2.2.4 Bakterielle Besiedelung). Aus diesem Grund wurde der **Geburtsmodus** als weiterer Testparameter ausgewählt.

Das Apgar Schema wird zur Beurteilung von Neugeborenen nach der Geburt angewendet. Nach 1, 5 und 10 Minuten wird das Kind hinsichtlich Atmung, Herzfrequenz, Hautfarbe, Reflexe und Muskeltonus beurteilt. Eine geringe Punktzahl nach 5 und 10 Minuten spricht für eine schlechte Adaptation – die Gründe hierfür sind vielfältig. Kinder mit niedrigen **Apgar-Werten** sind in der Regel in einer schlechteren Verfassung und benötigen eher die stationäre Aufnahme an einer NICU und invasivere maschinelle Überwachung bzw. Unterstützung der Vitalfunktionen. Für diese Studie wurden die Apgar-Werte nach 5 Minuten verglichen.

Jede Form **invasiver Therapie** (Beatmung, zentrale oder periphere Venenkatheter, arterielle Katheter, Magensonde, chirurgischer Eingriff) erhöht durch den schlechten

zugrundeliegenden Gesundheitszustand, den länger dauernden stationären Aufenthalt sowie die iatrogene Schädigung von Barrieren das Risiko einer Besiedelung oder Infektion mit ESBL-Bildnern.

Ob eine Besiedelung mit einem ESBL-Bildner bereits vor Anwendung der invasiven Maßnahme erfolgt ist und diese erforderlich gemacht hat, oder als Folge der Maßnahme zu erklären ist, kann im Zuge der retrospektiven Analyse nicht festgestellt werden.

4.3.3 ESBL-SCREENING

Das Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin untersucht 2x wöchentlich den eingesandten Stuhl von allen stationären PatientInnen der NICU Graz routinemäßig auf ESBL-Bildner.

Ab 2005 wurden hierzu eine Stuhlkultur angelegt und die einzelnen Stämme einem Agar-Diffusionstest unterzogen.

Seit Jänner 2011 werden Antibiotika-haltige (*Ceftazidim* oder *Cefotaxim*) ESBL-Screening Platten von bioMérieux© verwendet. Findet sich hier ein Keimwachstum, ist von einem ESBL-Bildner oder anderen resistenten Keimen auszugehen und ein Bestätigungstest durchzuführen. Letzte Sicherheit liefert aber nur eine genetische Analyse.



Abbildung 21: ESBL-Screeningplatte mit integriertem Cephalosporin der 3. Generation; Wachstum von *Klebsiella oxyfoca*. Bild zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Gebhard Feierl

Die genetische Klonalität der einzelnen Bakterienstämme wird im Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin der MUG mittels Diversilab System™ von bioMérieux (*repPCR; repetitive poly chain reactions*) getestet(62).

Um die einzelnen Enzyme genauer zu identifizieren werden bei ausgewählten Stämmen PCRs auf die häufigsten ESBL-Enzyme und gegebenenfalls auch die Sequenzierung der Gene durchgeführt.

Alle ESBL-Bildner wurden und werden kryokonserviert, um ev. spätere Analysen zu ermöglichen.

4.3.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung der gesammelten Daten erfolgte mittels SPSS for Windows® Version 18.0.

Durchgeführt wurde eine deskriptive Statistik aller relevanten Parameter.

Zusätzlich wurden Kreuztabellen mit Fisher's Exact Tests sowie Mann-Whitney-U-Tests zur Feststellung der Signifikanz berechnet und Boxplot Diagramme erstellt.

4.4 ERGEBNISSE

4.4.1 ESBL

Im Beobachtungszeitraum von Jänner 2005 bis einschließlich September 2011 wurden bei **146 von 3987** Kindern (**3,7%** aller stationären PatientInnen der NICU) ESBL-Bildner entdeckt.

Die meisten wurden nach der ersten Detektion von ESBLs an der NICU (2004) im Jahr 2005 entdeckt. Durch die Einführung von Screeningmaßnahmen (2x wöchentliche Analyse von Stuhlproben aller stationären PatientInnen), sowie Kohortierung und Verbesserung der Hygienemaßnahmen, waren die Zahlen danach bis 2009 stets rückläufig, seit 2010 steigen sie wieder an. Ob sich der erneute Anstieg mit der Neueinführung der ESBL-Screeningplatten im Jänner 2011 (mit evtl. höherer Sensitivität) allein erklären lässt, muss bezweifelt werden. Viel eher ist das zunehmende Problem mit ESBL-Bildnern in Europa und auch der Steiermark als Ursache zu sehen, sowie einzelne nosokomiale Ausbrüche (*Klebsiella oxytoca* im Jahr 2011)(54).

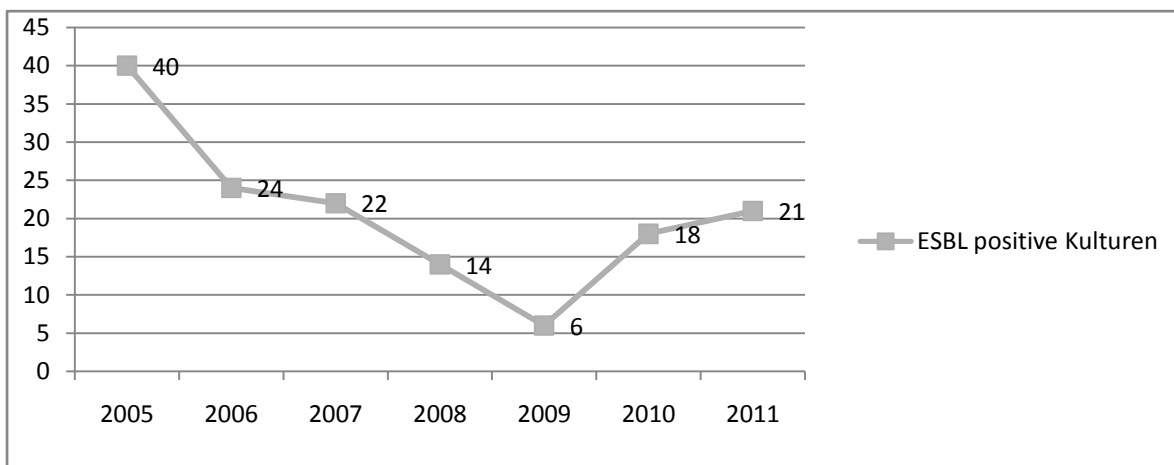


Abbildung 22: Verteilung der ESBL-positiven Stuhlkulturen auf den Beobachtungszeitraum

Folgende ESBL-bildende Keime konnten identifiziert werden:

- *Klebsiella pneumoniae* (78)
- *Klebsiella oxytoca* (39)
- *Escherichia coli* (8)
- *Serratia marescens* (6)

- *Citrobacter freundii* (6)
- *Citrobacter amalonaticus* (2)

5 Kinder wurden von 2 ESBL-Bildnern (3x *E.coli* + *Klebsiella pneumoniae*, 2x *Citrobacter freundii* + *Klebsiella pneumoniae*), 2 Kinder von 3 ESBL-Bildnern (*Klebsiella pneumoniae*, *E.coli*, *Citrobacter freundii*) simultan kolonisiert.

Die Erstbesiedelung erfolgte im Median am 23. Lebenstag (range 1.-123. LT) und 32 Tage (median; range 98 vor GT – 36 nach GT) vor dem errechneten Geburtstermin (korrigiertes Alter).

GA und GG der Kinder mit bzw. ohne positivem ESBL-Screening:

		nicht ESBL-positiv	ESBL-positiv
GA in Wochen	Anzahl Befunde	3839	146
	25. Perzentile	33	27
	Median	36	30
	75. Perzentile	39	34
	Minimum	23	24
	Maximum	43	41
GG in Gramm	Anzahl Befunde	3837	146
	25. Perzentile	1880	976
	Median	2550	1370
	75. Perzentile	3250	2015
	Minimum	400	355
	Maximum	5400	4000

Tabelle 10: GA und GG der PatientInnen mit und ohne positivem ESBL-Befund. Kinder mit positivem ESBL-Befund haben signifikant niedrigeres GA und GG als Kinder ohne positivem ESBL-Befund (graue Markierung).

Das GA und GG der Kinder mit intestinaler Besiedelung mit ESBL-Bildnern lag statistisch signifikant unter dem der nicht mit ESBL-Bildnern besiedelten: Die statistischen Berechnungen mittels Mann-Whitney-U-Test ergaben **p≤0,001**.

Mit ESBL-Bildnern besiedelte Kinder zeigten ebenfalls signifikant (p≤0,001) häufiger VLBW (und ELBW als nicht ESBL-besiedelte Kinder. Mit VLBW wurden 304 PatientInnen (7,6%) ohne Nachweis von ESBL-Bildnern und 42 PatientInnen (12,1%) mit ESBL-Nachweis geboren. 181 NICU PatientInnen ohne positiven ESBL-Screeningtest (4,5%)

wurden im Gegensatz zu 42 PatientInnen mit positivem ESBL-Befund (18,8%) mit ELBW geboren (siehe Abb. 24).

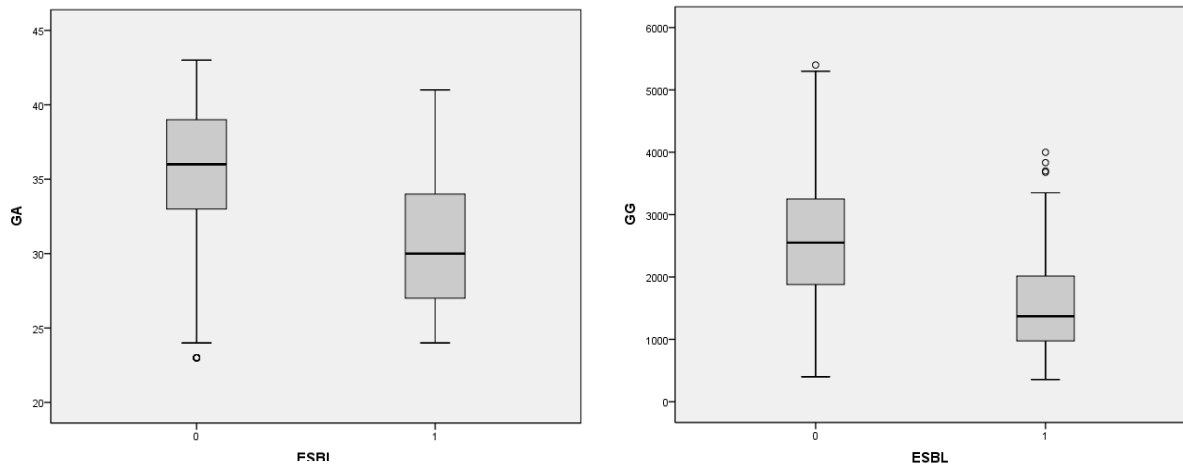


Abbildung 23a+b: Boxplot Diagramme. Deutlich zu erkennen ist das signifikant geringere GA und GG der Kinder mit Besiedelung durch ESBL-Bildner.

Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (mit ESBL-Bildnern besiedelt vs. keine Besiedelung) zeigten sich auch bei den gemessenen Apgar-Werten.

18,5% der Kinder mit positivem Screeningtest hatten einen 5-Minuten Apgar Wert von unter 8, während nur 8,1% der Kinder mit negativem Screeningtest einen 5-Minuten Apgar Wert von unter 8 aufwiesen ($p \leq 0,001$, Fisher's Exact Test).

Kinder, die später von ESBL-Bildnern besiedelt wurden, hatten auch statistisch signifikant niedrigere 5-Minuten Apgar-Werte als Kinder ohne positiven ESBL-Screeningtest (median 7 vs. 9): $p \leq 0,001$, Mann-Whitney-U-Test

4.4.2 NEC

Die Zahl der NEC-Fälle an der Universitätsklinik für Kinder - und Jugendheilkunde Graz lag von Jänner 2000 – einschl. September 2011 bei **27 (0,34%) von insgesamt 7853** stationär an der NICU behandelten Kindern. Im Beobachtungszeitraum seit 2005 (Einführung des ESBL-Screenings) erkrankten **16** von 3987 (0,4%) Kindern an einer nekrotisierenden Enterokolitis.

Aufgefallen ist – auch im Vergleich mit den Jahren davor – besonders das Jahr 2005 mit einer ungewöhnlich hohen NEC Inzidenz. 2005 wurde auch – wie im Kapitel 4.4.3 näher ausgeführt – eine hohe Zahl an Besiedelungen mit ESBL-Bildnern nachgewiesen, nachdem diese erstmals im Jahr 2004 an der NICU Graz detektiert worden waren(40; s.o.).

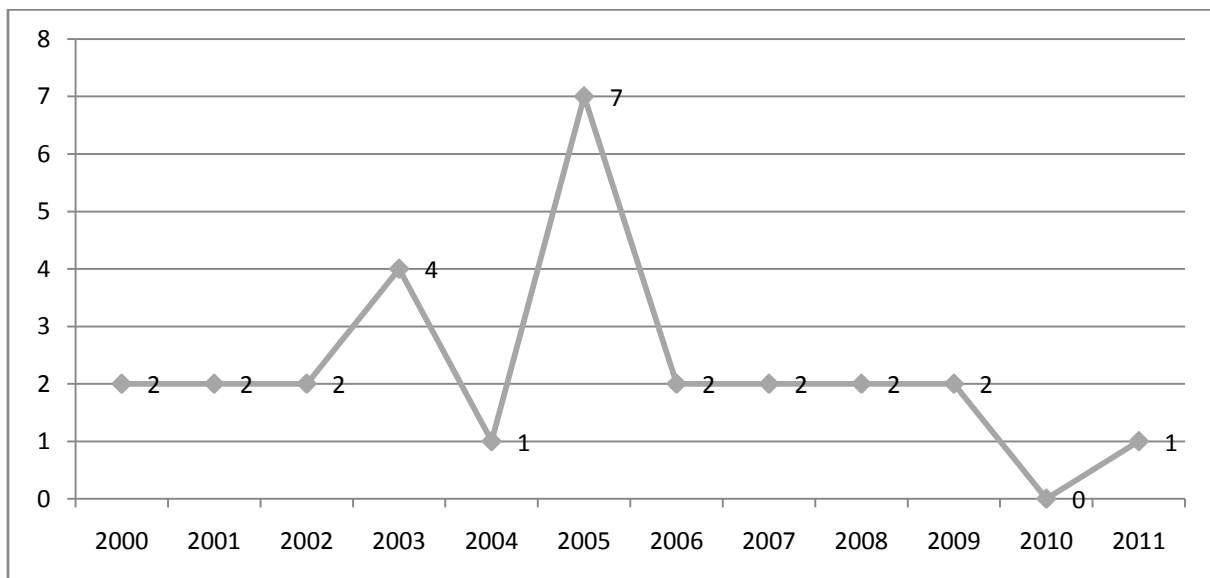


Abbildung 24: Verteilung der NEC-Fälle von 2000-2011. Im Jahr der größten Zahl an detektierten ESBL-Befunden (2005) wurden auch die meisten NEC-Fälle beobachtet.

NEC PatientInnen hatten signifikant ($p \leq 0,001$, Mann-Whitney-U-Test) geringeres Gestationsalter und Geburtsgewicht als nicht an NEC erkrankte PatientInnen der NICU (siehe Tabelle 11, Abbildung 26).

Das GG war signifikant häufiger **VLBW und ELBW** als bei PatientInnen, die nicht an NEC erkrankt waren ($p \leq 0,001$). 6 (37,5%) von 16 NEC-PatientInnen hatten VLBW und ebenfalls 6 (37,5%) von 16 NEC-PatientInnen hatten ELBW.

		keine NEC	NEC
GA in Wochen	Anzahl	3969	16
	25. Perzentile	33	27
	Median	36	28
	75. Perzentile	39	30
	Maximum	43	39
	Minimum	23	25
GG in Gramm	Gültige N	3967	16
	25. Perzentile	1850	917
	Median	2515	1088
	75. Perzentile	3230	1515
	Maximum	5400	3530
	Minimum	355	500

Tabelle 11: Deskriptive Statistik zum Gestationsalter (GA) und Geburtsgewicht (GG). Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (NEC vs. keine NEC) sind für GA und GG signifikant (graue Markierung).

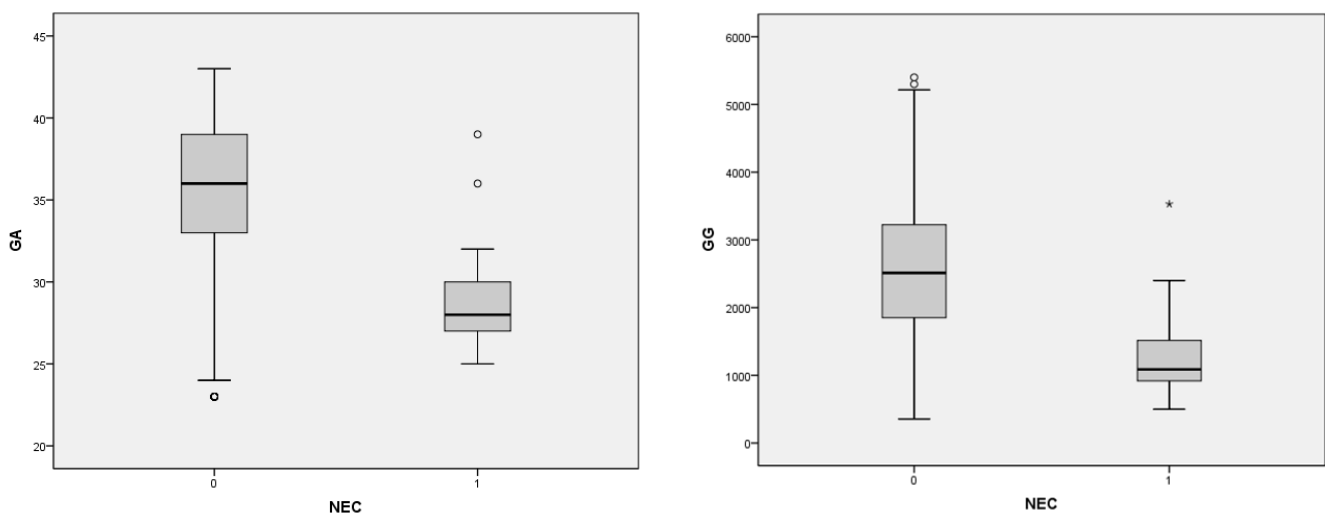


Abbildung 25a+b: Boxplot Diagramme. Es ist deutlich zu erkennen, dass die NEC PatientInnen (1) im Vergleich zu den nicht an NEC erkrankten Kindern (0) ein signifikant niedrigeres Gestationsalter und Geburtsgewicht aufweisen.

NEC-PatientInnen unterschieden sich hinsichtlich der Apgar-Werte nicht signifikant von nicht an NEC erkrankten PatientInnen der NICU.

11 (68,8%) von 16 NEC-PatientInnen wurden mittels *sectio caesarea* geboren. Der Prozentsatz ist zwar höher als in der Kontrollgruppe (58,8%), jedoch nicht signifikant ($p=0,429$).

Die Kinder zeigten im Median am 15. Lebenstag (range 1-39) und 50,5 (median; range -86 - +1) Tage vor dem errechneten Geburtstermin (korrigiertes Alter) zur Diagnose führende Symptome der NEC.

Bei 9 (56,3%) von 16 Kindern wurde radiologisch eine Pneumatosis intestinalis diagnostiziert, in 2 Fällen wurde zusätzlich freie Luft diagnostiziert.

In 10 (62,5%) von 16 Fällen wurde eine chirurgische Intervention notwendig, in 7 Fällen mussten Darmabschnitte reseziert werden.

12 (75%) von 16 Kindern wurden im Laufe ihres stationären Aufenthaltes invasiv beatmet (median 8,5 Tage; range 1-27), 10 Kinder benötigten im Verlauf eine Nasen-CPAP Beatmung (median 9,5 Tage; range 2-86). 9 Kinder benötigten einen zentralvenösen Katheter.

15 (93,8%) von 16 PatientInnen wurden nach Diagnosestellung (13 Kinder) oder bereits vorher (2 Kinder) mit Carbapenemen (Imipenem und Meropenem) behandelt. Bei 1 Kind fehlt die diesbezügliche Dokumentation.

Mortalität:

1 Kind (6,25%) verstarb an einer besonders fulminanten NEC. Das Kind hatte ein GA von 28 Wochen und ein GG von 780g. Am Abend des vierten Lebenstages zeigten sich stehende Darmschlingen und eine Pneumatosis intestinalis im Röntgen, laborchemisch zeigte sich eine Leuko- und Thrombopenie. Im Laufe der Nacht war die Erkrankung rasch progredient, die antibiotische Therapie wurde auf Imipenem umgestellt und die Indikation zur chirurgischen Intervention gestellt. Bei der Laparotomie zeigte sich der gesamte Darm distal des Duodenums gangränös, eine doppelläufige Jejunostomie wurde angelegt. Nach der OP war das Kind zunächst stabil, zeigte aber zunehmende Kreislaufinstabilität, eingeschränkte Diurese und massive Koagulopathie. Das Kind verstarb am ersten postoperativen Tag an einem Multiorganversagen. Ein positiver Befund des ESBL-Screenings traf 2 Tage später ein.

4.4.3 ZUSAMMENHANG

Insgesamt wurden bei **3,5%** der 3987 untersuchten PatientInnen der NICU Graz ESBL-Bildner in den Stuhlkulturen gefunden. **0,2%** aller stationären PatientInnen waren mit ESBL-bildenden Enterobakterien besiedelt und entwickelten gleichzeitig eine NEC.

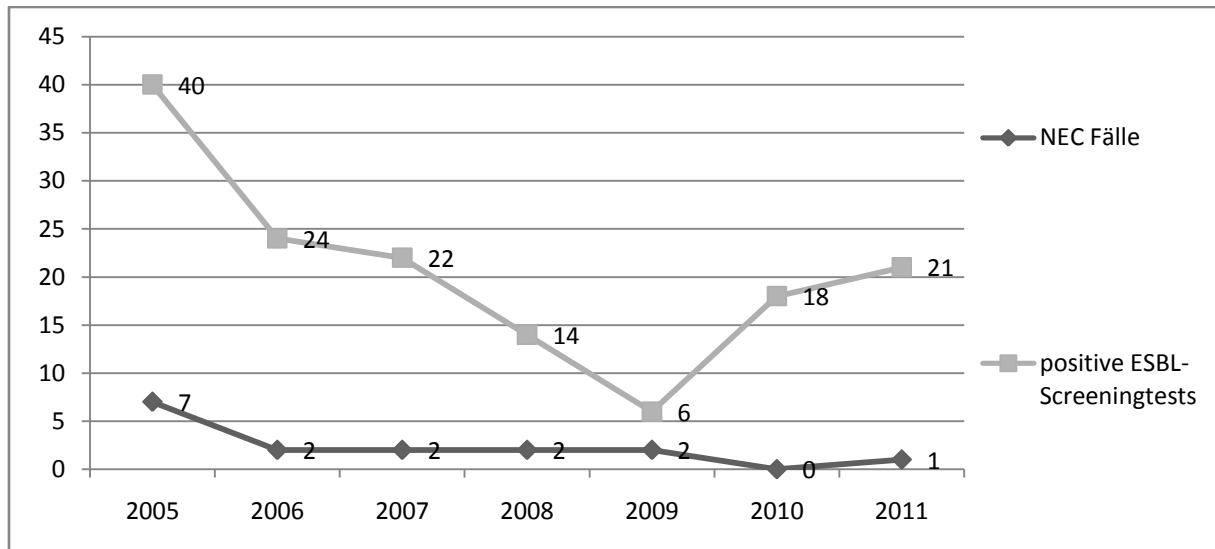


Abbildung 26: Verteilung der positiven ESBL-Tests und NEC-Fälle im Beobachtungszeitraum. Besonders hoch sind die Zahlen für das Jahr 2005.

Wie oben bereits erwähnt, wurden bei **43,8%** (7 von 16) der NEC-PatientInnen ESBL-Bildner im Stuhl (1x zusätzlich im Peritonealabstrich, Befunde von Blutkulturen liegen bei keinem dieser Fälle vor)detektiert, während im Gesamtkollektiv nur 3,6% (146 von 3987) mit ESBL-Bidnern besiedelt war.

Während **4,8%** (7 von 146)der ESBL-besiedelten PatientInnen der NICU an einer NEC erkrankt sind, haben nur **0,2%** (9 von 3841) der nicht ESBL-besiedelten PatientInnen eine NEC entwickelt (siehe Tabelle 12). Dieses Ergebnis ist statistisch höchst signifikant ($p \leq 0,001$).

	NEC	keine NEC	Gesamt	p-Wert
ESBL	7 (4,8%)	139	146	≤0,001
kein ESBL	9 (0,2%)	3832	3841	
Gesamt	16	3971	3987	

Tabelle 12: ESBL-NEC 4-Feldertafel

Zwischen dem Gestationsalter der NEC-PatientInnen mit und ohne ESBL-Bildnern und gab es keinen Unterschied (Median 28).

Das Geburtsgewicht lag in der Gruppe der mit ESBL-Bildnern besiedelten NEC-PatientInnen unter dem der Vergleichsgruppe (1000g vs. 1420g im Median), jedoch statistisch nicht signifikant ($p=0,427$).

Der Altersunterschied zwischen NEC-PatientInnen mit und ohne ESBL-Besiedelung war weder für das chronologische (66 vs. 26 Tage, $p=0,223$) noch für das korrigierte Alter (-59 vs. -56 Tage; $p=0,314$) statistisch signifikant, siehe auch Tabelle 13.

	ESBL		keine ESBL	
	median	range	median	range
chronologisches Alter bei NEC	66	0 -183	26	2-203
korrigiertes Alter bei NEC	-59	-80 - 1	-56	-86 - -49

Tabelle 13: Deskriptive Statistik des Alters in Tagen bei NEC. Die beiden Vergleichsgruppen (mit und ohne Besiedelung mit ESBL-Bildnern) unterscheiden sich im chronologischen Alter bei Diagnosestellung.

ESBL-Befunde der NEC-PatientInnen:

Folgende ESBL-Bildner wurden bei den 7 (43,8%) von 16 Kindern mit NEC gefunden:

- 6x *Klebsiella pneumoniae*
- 1x *Klebsiella oxytoca* (in dieser Stuhlkultur wurde auch ein *Klebsiella pneumoniae* Stamm detektiert, der jedoch kein ESBL-Bildner war).

Es konnten bei 3 von den 6 *Klebsiella pneumoniae* Funden eine Klonalitätstestung durchgeführt werden, wobei 2 verschiedene Klone gefunden wurden.

Die molekularbiologischen Analysen indentifizierten folgende ESBL-Enzyme:

Klebsiella oxytoca:

- CTX-M-3 (+ die β -Lactamase TEM-1; nicht ESBL)

Klebsiella pneumoniae:

- CTX-M-3 (+ TEM-1, SHV-2)
- CTX-M-3 (+ TEM-1, SHV-1); Diese Kombination wurde bei 3 Kindern isoliert.
- SHV-12 (+ TEM-1)

Die Probe von einem Kind stand nicht mehr für die molekularbiologischen Untersuchungen zur Verfügung.

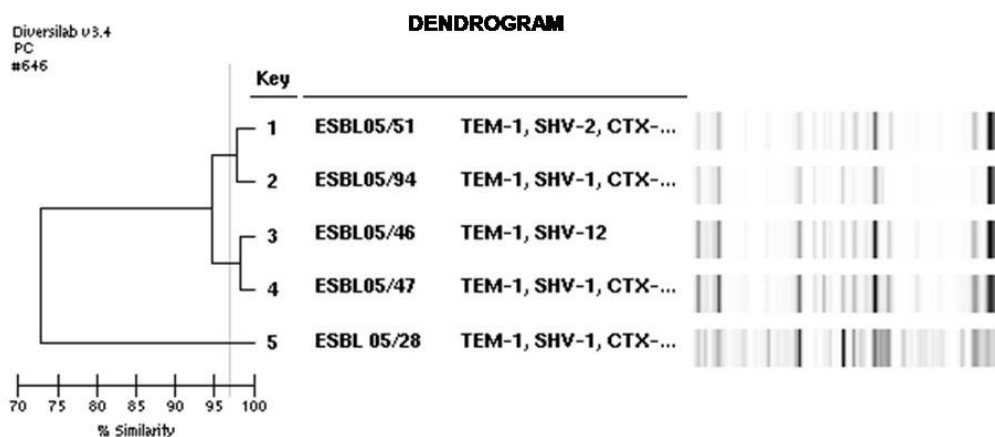


Abbildung 27: Dendrogramm der molekularbiologischen Analyse der ESBL-bildenden *Klebsiella pneumoniae* Stämme der NEC-PatientInnen. Das vom Insitut für Hygiene verwendete Diversilab-System der Firma bioMérieux zeigt jeweils 2 Stämme mit einer großen genetischen Ähnlichkeit (1+2, 3+4) sowie einen Stamm, der sich genetisch deutlich von den anderen unterscheidet. Alle CTX-Enzyme sind CTX-M-3 Enzyme.

Antibiotische Therapie:

Vor dem Hintergrund, dass der Einsatz von (*extended spectrum*) Cephalosporinen möglicherweise das Entstehen bzw. die Selektion von ESBL-Bildnern begünstigen kann, ist es interessant, dass zumindest 6 von 7 NEC-PatientInnen mit positivem ESBL-Screening Test vor dem ersten Befund mit *Cefuroxim* (einem Cephalosporin der 2. Generation) behandelt wurden (vom 7. NEC Patient konnten keine diesbezüglichen Daten erhoben werden).

Sechs der 7 NEC-PatientInnen mit ESBL-Besiedelung wurden erst nach definitiver Diagnose einer NEC auf eine gegen ESBL-Bildner wirksame Therapie mit einem Carbapenem umgestellt. Auch 7 der 9 NEC-PatientInnen ohne ESBL-Besiedelung erhielten erst bei Diagnosestellung eine antibiotische Therapie, welche zwar nicht gegen ESBL-Bildner sehr wohl aber gegen sensible Keime wirksam ist. Ein(e) PatientIn wurde bereits vor NEC-Diagnose antibiotisch behandelt, bei einem Kind liegen keine Daten dazu vor.

Morbidität:

Bezüglich der Morbidität, konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen ESBL positiven und ESBL negativen NEC-PatientInnen beobachtet werden:

- 5 von 7 NEC-PatientInnen mit positivem ESBL-Befund erhielten im Gegensatz zu 3 von 9 NEC-PatientInnen ohne ESBL-Befund einen zentralvenösen Katheter ($p=0,235$), mit ESBL-Bildnern besiedelte im Median für 10 Tage, ohne Besiedelung im Median für 8 Tage.
- Alle (7 von 7) NEC-PatientInnen mit ESBL-Befund benötigten invasive Beatmung, im Gegensatz dazu nur 5 von den 9 NEC-PatientInnen ohne Besiedelung ($p=0,422$).
- 5 von 7 NEC-PatientInnen mit ESBL-Befund wurden zusätzlich auch CPAP-beatmet. Von den nicht mit ESBL-Bildnern besiedelten PatientInnen benötigten 5 von 9 CPAP-Beatmung.
- Eine chirurgische Intervention war bei 5 von 7 mit ESBL-Bildnern besiedelte NEC-PatientInnen indiziert. Im Gegensatz dazu benötigten 5 von 9 NEC-PatientInnen ohne Besiedelung mit ESBL-Bildnern eine Operation ($p=0,515$).

Auch die laborchemischen Parameter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung unterschieden sich in den beiden Gruppen nicht signifikant:

	ESBL		keine ESBL	
	median	range	median	range
Leukozyten	7600/ml	3550-9510/ml	11300/ml	1300-27700/ml
CRP	73,6 mg/L	10-126,2 mg/L	38 mg/L	0-207mg/L

Tabelle 14: Entzündungsparameter von NEC-PatientInnen mit und ohne ESBL-Bildner. Bei den besiedelten Kindern sind niedrigere Leukozytenwerte und höhere CRP-Werte gemessen worden als bei der Vergleichsgruppe. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Eine mit ESBL-Bildnern besiedelte NEC-PatientIn verstarb an der Erkrankung (s.o.).

5. DISKUSSION

Die Ergebnisse der Studie legen nahe, dass eine intestinale Besiedelung mit ESBL-bildenden Enterobakterien ein möglicher Risikofaktor für die Entwicklung einer nekrotisierenden Enterokolitis ist.

43,8% (7 von 16) der NEC PatientInnen waren mit ESBL-Bildnern besiedelt, das sind **3,4% aller ESBL-besiedelten Kinder** im Untersuchungszeitraum. Im Gegensatz dazu, erkrankten nur **0,2% der nicht ESBL-besiedelten Kinder** an NEC ($p \leq 0,001$).

In der Literatur wurden bisher nur einzelne nosokomiale Ausbrüche von ESBL-Bildnern mit NEC assoziiert. Es wurde immer *Klebsiella pneumoniae* identifiziert, eine Klonalitätsanalyse wurde nur in einer Studie durchgeführt (2 Klone). In der Studie dieser Diplomarbeit liegt ein anderes Bild vor:

Es konnten über einen **Zeitraum von 5 ½ Jahren** bei den NEC-PatientInnen sowohl verschiedene ESBL-bildende Spezies (*Klebsiella pneumoniae* und *Klebsiella oxytoca*) entdeckt werden, als auch molekularbiologisch verschiedene Klone von *Klebsiella pneumoniae* nachgewiesen werden.

Zudem scheint es, dass NEC-Erkrankungen mit Nachweis von ESBL-Bildnern eine tendenziell höhere Morbidität und Mortalität aufweisen als NECs, wo kein ESBL-Bildner beteiligt ist. Dies ist statistisch jedoch nicht signifikant – die Gruppengrößen (7 bzw. 9 Fälle) sind klein.

Die infektiöse Komponente der NEC-Pathogenese könnte einen größeren Stellenwert einnehmen, als bisher gezeigt wurde. Als Erklärungsmodell hierfür werden folgende Thesen vorgestellt:

1.) Bei Verdacht auf Infektion, welche sich primär oft nur unspezifisch z.B. nur durch klinische Verschlechterung („Instabilität“) zeigt, wird häufig eine empirische antibiotische Therapie begonnen. Während sensible Keime dadurch eliminiert werden, werden ESBL-Bildner möglicherweise **durch den Einsatz dieser Antibiotika selektiert**. Da die Besiedelung des Darms bereits einige Zeit vor dem Nachweis der einzelnen Keime im Stuhl erfolgt, werden resistente Keime oft bis zur mikrobiologischen Diagnose und einer evtl. Therapieumstellung nicht (richtig) behandelt. So erhielten 6 der NEC-PatientInnen mit ESBL-Besiedelung vor Auftreten der NEC ein Cephalosporin und wurden erst nach definitiver Diagnose einer NEC auf

eine gegen ESBL-Bildner wirksame Therapie mit einem Carbapenem umgestellt. Der Zeitfaktor erlaubt die Produktion von pathologischen Mengen an SCFAs, Gas und Induktion einer Entzündungsreaktion durch Zytokine und LPS.

2.) Selbst auf die adäquate Therapie mit Carbapenemen könnten ESBL-Bildner möglicherweise ein **schlechteres bzw. langsames Ansprechen** aufweisen, als Enterobakterien ohne ESBL auf die Standardtherapie, was möglicherweise zum Versagen der konservativen Therapie und zur vollen Ausprägung von NEC führt.

3.) Auf manchen Plasmiden, die ein ESBL-Gen tragen, liegt möglicherweise auch ein bisher unbekannter **Virulenzfaktor**, der z.B. das Durchdringen der intestinalen Barriere erleichtert. Zur Steigerung der Virulenz bei falscher Initialtherapie von Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA) existieren bereits Theorien, eine diesbezügliche Studie vom Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin der MUG ist bereits geplant. Analog wäre eine Prüfung der Virulenz - Zunahme auch für ESBL-Bildner anzudenken.

5.1. EINFLUSSFAKTOREN

Da die NEC-Inzidenz an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Graz im internationalen Vergleich sehr gering ist, ist die Zahl der NEC-Fälle in der Studie – trotz des großen untersuchten Kollektivs – allerdings recht klein, was die Aussagekraft schmälert.

Möglicherweise haben auch andere Faktoren Einfluss auf den Zusammenhang:

Da sowohl NEC als auch Besiedelung mit ESBL-Bildnern hauptsächlich ein Problem Frühgeborener und unreifer Neugeborener (vgl. GA und GG) darstellen, kann dies einen - statistisch gesehen - systematischen Fehler verursachen. Es ist daher nötig, den Zusammenhang zwischen NEC und ESBL-Bildnern ohne Einfluss der möglichen Störvariablen GA und GG herzustellen.

Für eine geplante Publikation wird zur Zeit vom Institut für Medizinische Statistik und Informatik der MUG eine logistische Regression adjustiert nach GA und GG gerechnet, um den Einfluss dieser beiden Variablen auf ein statistisches Minimum zu verringern. Die korrekte Durchführung dieser Berechnungen erfordert ein Maß an statistischen Fertigkeiten, das sich anzueignen für diese Diplomarbeit zu komplex wäre.

5.2 ZUKUNFT

Der unkritische Einsatz von Antibiotikatherapie und -prophylaxe – im Fall der ESBL-Bildner v.a. von Cephalosporinen – im humanmedizinischen und veterinärmedizinischen Bereich, muss in Zukunft deutlich eingeschränkt werden, um einen weiteren Anstieg multiresistenter Keime zu verhindern.

Bestätigt sich der in dieser Arbeit aufgezeigte Zusammenhang zwischen ESBL-Besiedlung und Entwicklung einer NEC, ist – bei weiterem Anstieg ESBL-bildender Keime – eine Zunahme der NEC-Inzidenz zu erwarten.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Speer Ch.P. GM. Pädiatrie. 3. Auflage ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2009.
- (2) Brook I. Microbiology and management of neonatal necrotizing enterocolitis. *Am J Perinatol* 2008 Feb;25(2):111-118.
- (3) Bell MJ, Shackelford P, Feigin RD, Ternberg JL, Brotherton T. Epidemiologic and bacteriologic evaluation of neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 1979 Feb;14(1):1-4.
- (4) Bell MJ, Feigin RD, Ternberg JL, Brotherton T. Evaluation of gastrointestinal microflora in necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1978 Apr;92(4):589-592.
- (5) Gregersen N, Van Nierop W, Von Gottberg A, Duse A, Davies V, Cooper P. Klebsiella pneumoniae with extended spectrum beta-lactamase activity associated with a necrotizing enterocolitis outbreak. *Pediatr Infect Dis J* 1999 Nov;18(11):963-967.
- (6) Cotton MF, Pieper CH, Kirsten GF, Orth H, Theron DC. Necrotising enterocolitis as an infectious disease--evidence from an outbreak of invasive disease due to extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae. *S Afr Med J* 2001 Feb;91(2):133-135.
- (7) Luig M, Lui K, NSW & ACT NICUS Group. Epidemiology of necrotizing enterocolitis--Part I: Changing regional trends in extremely preterm infants over 14 years. *J Paediatr Child Health* 2005 Apr;41(4):169-173.
- (8) Tudehope DI. The epidemiology and pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis. *J Paediatr Child Health* 2005 Apr;41(4):167-168.
- (9) Gibbs K, Lin J, Holzman IR. Necrotising enterocolitis: the state of the science. *Indian J Pediatr* 2007 Jan;74(1):67-72.
- (10) Pietz J, Achanti B, Lilien L, Stepka EC, Mehta SK. Prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants: a 20-year experience. *Pediatrics* 2007 Jan;119(1):e164-70.
- (11) Thompson AM, Bizzarro MJ. Necrotizing enterocolitis in newborns: pathogenesis, prevention and management. *Drugs* 2008;68(9):1227-1238.

(12) Bell MJ, Feigin RD, Ternberg JL. Changes in the incidence of necrotizing enterocolitis associated with variation of the gastrointestinal microflora in neonates. *Am J Surg* 1979 Nov;138(5):629-631.

(13) Bell MJ, Ternberg JL, Feigin RD, Keating JP, Marshall R, Barton L, et al. Neonatal necrotizing enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging. *Ann Surg* 1978 Jan;187(1):1-7.

(14) Anand RJ, Leaphart CL, Mollen KP, Hackam DJ. The role of the intestinal barrier in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Shock* 2007 Feb;27(2):124-133.

(15) Ciliborg MS, Boye M, Sangild PT. Bacterial colonization and gut development in preterm neonates. *Early Hum Dev* 2012 Jan 25.

(16) Hunter CJ, Upperman JS, Ford HR, Camerini V. Understanding the susceptibility of the premature infant to necrotizing enterocolitis (NEC). *Pediatr Res* 2008 Feb;63(2):117-123.

(17) Claud EC. Neonatal Necrotizing Enterocolitis -Inflammation and Intestinal Immaturity. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* 2009 Sep;8(3):248-259.

(18) Markel TA, Crisostomo PR, Wairiuko GM, Pitcher J, Tsai BM, Meldrum DR. Cytokines in necrotizing enterocolitis. *Shock* 2006 Apr;25(4):329-337.

(19) Gordon PV, Swanson JR, Attridge JT, Clark R. Emerging trends in acquired neonatal intestinal disease: is it time to abandon Bell's criteria? *J Perinatol* 2007 Nov;27(11):661-671.

(20) Schütt C, Bröker B. *Grundlagen der Immunologie*. 1. ed. München: Elsevier GmbH; 2006.

(21) Afrazi A, Sodhi CP, Richardson W, Neal M, Good M, Siggers R, et al. New insights into the pathogenesis and treatment of necrotizing enterocolitis: Toll-like receptors and beyond. *Pediatr Res* 2011 Mar;69(3):183-188.

(22) Schmidt RF(), Lang F(). *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 30. ed. Heidelberg: Springer Medizinverlag; 2007.

(23) Hsueh W, Caplan MS, Qu XW, Tan XD, De Plaen IG, Gonzalez-Crussi F. Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical considerations and pathogenetic concepts. *Pediatr Dev Pathol* 2003 Jan-Feb;6(1):6-23.

- (24) Cetin S, Ford HR, Sysko LR, Agarwal C, Wang J, Neal MD, et al. Endotoxin inhibits intestinal epithelial restitution through activation of Rho-GTPase and increased focal adhesions. *J Biol Chem* 2004 Jun 4;279(23):24592-24600.
- (25) Hill HR, Hunt CE, Matsen JM. Nosocomial colonization with *Klebsiella*, type 26, in a neonatal intensive-care unit associated with an outbreak of sepsis, meningitis, and necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1974 Sep;85(3):415-419.
- (26) Stuart RL, Tan K, Mahar JE, Kirkwood CD, Andrew Ramsden C, Andrianopoulos N, et al. An outbreak of necrotizing enterocolitis associated with norovirus genotype GII.3. *Pediatr Infect Dis J* 2010 Jul;29(7):644-647.
- (27) AK für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin. Richtlinien zur Infektionsdiagnostik des Arbeitskreises für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin Sachsen-Anhalt. 2012; Available at: <http://www.anpisa.de/pdf/infektionsdiagnostik.pdf>. Accessed Februar/ 21.02.2012, 2012.
- (28) Zhang N, Ahsan MH, Purchio AF, West DB. Serum amyloid A-luciferase transgenic mice: response to sepsis, acute arthritis, and contact hypersensitivity and the effects of proteasome inhibition. *J Immunol* 2005 Jun 15;174(12):8125-8134.
- (29) Thuijls G, Derikx JP, van Wijck K, Zimmermann LJ, Degraeuwe PL, Mulder TL, et al. Non-invasive markers for early diagnosis and determination of the severity of necrotizing enterocolitis. *Ann Surg* 2010 Jun;251(6):1174-1180.
- (30) Vasileiadis G, Wardle S. When clinical course contradicts images: necrotising enterocolitis. 2009; Available at: <http://casereports.bmj.com/content/2009/bcr.06.2008.0145.full>. Accessed 05/2012.
- (31) Antony J. Ultrasound image gallery. 2009; Available at: http://www.ultrasound-images.com/images/nec-1b_small.jpg. Accessed 05/12.
- (32) Alvaresl B, Martinsll D, Romalll R, Minniti Rodrigues Pereira I. Relevant radiological findings for the diagnosis of necrotizing enterocolitis and its complications. 2007; Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-39842007000200012&script=sci_arttext&tlng=en. Accessed 05/12.
- (33) Donahue L. Spontaneous intestinal perforation. *Neonatal Netw* 2007 Sep-Oct;26(5):335-351.

(34) Neu J, Walker WA. Necrotizing enterocolitis. *N Engl J Med* 2011 Jan 20;364(3):255-264.

(35) Sullivan S, Schanler RJ, Kim JH, Patel AL, Trawogger R, Kiechl-Kohlendorfer U, et al. An exclusively human milk-based diet is associated with a lower rate of necrotizing enterocolitis than a diet of human milk and bovine milk-based products. *J Pediatr* 2010 Apr;156(4):562-7.e1.

(36) Panigrahi P. Necrotizing enterocolitis: a practical guide to its prevention and management. *Paediatr Drugs* 2006;8(3):151-165.

(37) Barclay AR, Stenson B, Simpson JH, Weaver LT, Wilson DC. Probiotics for necrotizing enterocolitis: a systematic review. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007 Nov;45(5):569-576.

(38) Strenger V, Gschliesser T, Grisold A, Zarfel G, Feierl G, Masoud L, et al. Orally administered colistin leads to colistin-resistant intestinal flora and fails to prevent faecal colonisation with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteria in hospitalised newborns. *Int J Antimicrob Agents* 2011 Jan;37(1):67-69.

(39) De Laet MH, Dassonville M, Johansson A, Lermينياux C, Seghers V, Van den Eijnden S, et al. Small-bowel perforation in very low birth weight neonates treated with high-dose dexamethasone. *Eur J Pediatr Surg* 2000 Oct;10(5):323-327.

(40) Halac E, Halac J, Begue EF, Casanas JM, Indiveri DR, Petit JF, et al. Prenatal and postnatal corticosteroid therapy to prevent neonatal necrotizing enterocolitis: a controlled trial. *J Pediatr* 1990 Jul;117(1 Pt 1):132-138.

(41) Versalovic, Carroll, Funke, Jorgensen, Landry, Warnock. *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed.: asm press; 2011.

(42) Rocky Mountain Laboratories, NIAID, NIH. *Escherichia coli*. 2006; Available at: http://www.niaid.nih.gov/SiteCollectionImages/topics/biodefenserelated/e_coli.jpg. Accessed 05/2012.

(43) Uni Rostock. *Enterobakterien*. Available at: http://www.imikro.uni-rostock.de/Doku/Lehre/VMikro/V_Enterobakterien.pdf, 2012.

(44) Willig H-. *Plasmide*. 2009; Available at: <http://www.chemie-schule.de/KnowHow/Plasmid>. Accessed 05/12.

(45) S&P Media AG. vcell. die virtuelle Zelle. 2012; Available at: <http://www.vcell.de/wp-content/uploads/2007/02/bakteriensex.gif>. Accessed 05/2012.

(46) Vögli A, Dür A. pharma Wiki - Beta-Lactam Antibiotika. 2012; Available at: http://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=Beta_Lactam_Antibiotika. Accessed 01.05.2012, 2012.

(47) Challis G, Rourke J, Crout DHG. Beta-Lactam Antibiotics. 2001; Available at: http://homepage.ntlworld.com/diamonddove/03_Blactams/Blactam_Antibiotics.htm. Accessed 05/2012.

(48) Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005 Oct;18(4):657-686.

(49) Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2010 Mar;54(3):969-976.

(50) Zeitschrift für Chemotherapie. Carbapenemase bei Erregern der Familie Enterobacteriaceae - Teil 1. 2012; Available at: <http://www.zct-berlin.de/klinik.praxis/Carbapenemase-Teil1.html>. Accessed 25.5.2012, 2012.

(51) EARSS. Annual Report 2004. 2004;1.

(52) EARSS. Annual Report 2008. 1st ed. Bilthoven, Niederlande; 2008.

(53) ECDC. EARSS-NET Database. 2012; Available at: <http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/database/Pages/database.aspx>. Accessed 25.5.2012, 2012.

(54) Feierl G, Buzina W, Masoud-Landgraf L. Resistenzbericht 2011. 1st ed. Graz: Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin; Medizinische Universität Graz; 2012.

(55) Eisner A, Fagan EJ, Feierl G, Kessler HH, Marth E, Livermore DM, et al. Emergence of Enterobacteriaceae isolates producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamase in Austria. Antimicrob Agents Chemother 2006 Feb;50(2):785-787.

(56) European Committee on Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters 2012;Version 2.0.

(57) Schmid, Roland. Kinderzentrum.2012; Available at:
<http://www.kinderzentrum.de/images/abb-04-08.jpg>. Accessed 05/2012.

(58) Epelman M, Daneman A, Navarro O, Morag I, Moore A, Kim JH, Faingold R, Taylor G, Gerstle JT. Necrotizing Enterocolitis: Review of state-of-the-art imaging findings with pathologic correlation. *RadioGraphics* 2007; 27:285–305.

(59) Schmölzer G, Urlesberger B, Haim M, Kutschera J, Pichler G, Ritschl E, Resch B, Reiterer F, Müller W. Multi-modal approach to prophylaxis of necrotizing enterocolitis: clinical report and review of literature. *Ped Surgery Int* (2006) 22:573–580

(60) Fallagas M, Karageorgopoulos D, Nordman P. Therapeutic Options for Infections with *Enterobacteriaceae* Producing Carbapenem-hydrolyzing Enzymes. *Future Microbiol.* 2011;6(6):653-666

(61) AlFaleh KM, Bassler D. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants (Review). *The Cochrane Collaboration*. JohnWiley & Sons, Ltd. 2009

(62) Grisold AJ, Zarfel G, Strenger V, Feierl G, Leitner E, Masoud L, Hoenigl M, Raggam RB, Dosch V, Marth E. Use of automated repetitive-sequence-based PCR for rapid laboratory confirmation of nosocomial outbreaks. *J Infect.* 2010 Jan;60(1):44-51.

(63) Holzer, U. Antiinfektive Therapie 1-4: Antibakterielle Pharmaka. Skriptum aus Modul 12. Moodle, MUG. 2011

7. LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

- Tanja Schnabl, geb. Gschliesser
- geboren am 09.02.1987 in Deutschlandsberg
- Österreichische Staatsbürgerin
- verheiratet mit Ferdinand Schnabl
- Vater: Maximilian Gschliesser
- Mutter: Adelheid Gschliesser, geb. Lojnik
- Geschwister: Uwe und Carmen

Schulbildung:

- Volksschule in St. Peter i/S von 1993 - 1997
- Hauptschule in Schwanberg von 1997 - 2001
- Musikgymnasium Dreihackengasse Graz von 2001 - 2006
- seit Oktober 2006 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität Graz

Wissenschaftliche Mitarbeit an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Graz seit 2009, Schwerpunkt pädiatrische Infektiologie

Publikationen:

Originalarbeit:

International Journal of Antimicrobial Agents 01/2011: Strenger, Gschliesser (Schnabl) *et al.* Orally administered colistin does not prevent colonisation with extended-spectrum beta-lactamase-producing (ESBL) enterobacteria in newborns hospitalised at the Neonatal Intensive Care Unit; 37(1):67-69.

Poster:

- 47. Jahrestagung der ÖGKJ 2009: Kolonisationen und Infektionen mit Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL-) bildenden Enterobakterien an der Grazer Kinderklinik in den Jahren 2005-2008
- 20. *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2010 in Wien: Differences in intestinal colonisation of term and preterm born neonates hospitalised at a Neonatal Intensive Care Unit (NICU)*

- 28th annual meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID) 2010 in Nizza, Frankreich: *Development of intestinal flora in newborns hospitalised at a Neonatal Intensive Care Unit (NICU)*
- Österreichischen Infektionskongress 2011 in Saalfelden: Assoziation zwischen Nekrotisierender Enterokolitis (NEC) und der intestinalen Kolonisation mit *Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) bildenden Enterobakterien*
- 29th annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID) 2011 in Den Haag, Niederlande: *Association between Necrotising Enterocolitis (NEC) and intestinal colonisation with extended spectrum beta lactamase- (ESBL-) producing enterobacteriaceae*
- Österreichischen Infektionskongress 2012 in Saalfelden: Unterschiede in der Analyse von Spontanharn und Katheterharn zur Diagnose einer Harnwegsinfektion bei pädiatrischen PatientInnen
- 30th annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID) in Thessaloniki, Griechenland: *Urinalysis from voided vs. catheterized urine for the diagnosis of urinary tract infections in paediatric patients*

Sprachkenntnisse:

- Englisch Stufe C inkl. 2 Semester Basic Medical English
- Italienisch Stufe B
- Tschechisch Grundstufe A2
- Österreichische Gebärdensprache Grundstufe A2