

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der
Universität Tübingen
Lehrbereich: Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth

**Die Ausbildung genetischer und phänotypischer
Varianten von *Staphylococcus aureus* bei Patienten mit
Cystischer Fibrose**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Matthias Greßinger
aus
Ruit
2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatterin: Privatdozentin Dr. C. Wolz
2. Berichterstatterin: Privatdozentin Dr. B. Kahl

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Epidemiologie und Krankheitsbilder von <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.2	Resistenzen von <i>Staphylococcus aureus</i>	3
1.3	Virulenzfaktoren von <i>Staphylococcus aureus</i>	6
1.3.1	Protein A	6
1.3.2	Clumping Faktor A	7
1.3.3	α - und β -Hämolysin	8
1.4	Bakteriophagen	8
1.5	Cystische Fibrose	9
1.5.1	Therapieansätze	11
1.6	Typisierung von <i>Staphylococcus aureus</i>	12
1.6.1	Genomtypen und genetische Varianten von <i>Staphylococcus aureus</i>	12
1.6.2	Phänotypische Varianten von <i>Staphylococcus aureus</i>	13
1.7	Ziele dieser Studie	14
2	PATIENTEN, PROBEN UND METHODEN	17
2.1	Patienten und Probenmaterial	17
2.1.1	Profil der Patienten mit <i>Staphylococcus aureus</i> positiver Primärkultur	18
2.1.2	Antibiotikatherapie	18
2.1.3	Gesunde Kontrollpersonen	19
2.2	Anzucht, Isolierung und Dokumentation	20
2.2.1	Anzucht und Isolierung von <i>Staphylococcus aureus</i> aus Routinesputen	20
2.2.1.1	Anzucht und Isolierung von <i>Staphylococcus aureus</i> aus Routinesputen auf verschiedenen Nährböden	21
2.2.1.2	Einsatz von Acetylcystein bei zähen, nicht pipettierbaren Sputen	21
2.2.2	Anzucht und Isolierung von <i>Staphylococcus aureus</i> aus sofort schockgefrorenen Sputen	22
2.2.3	Anzucht und Isolierung von <i>Staphylococcus aureus</i> aus Nasen- und Rachenabstrichen	23
2.3	Typisierung von <i>Staphylococcus aureus</i> Isolaten mittels Pulsfeldgelelektrophorese	23
2.3.1	Isolierung der chromosomalen DNA	23
2.3.2	Restriktionsverdau	24
2.3.3	Elektrophorese	25
2.3.4	Dokumentation und Auswertung	25
2.3.5	Differenzierung von Varianten	26
2.4	Southern Analyse	28
2.4.1	Herstellung der Digoxigenin-markierten Sonden durch PCR	30
2.5	Antibiotikaresistenzbestimmung	30
2.6	In-situ-Hybridisierung und Immunfluoreszenz	31

2.6.1	Auftragen von Proben aus Nasen- und Rachenabstrichen auf Objektträger	31
2.6.2	Auftragen von Proben aus sofort schockgefrorenen Sputen auf Objektträger	31
2.6.3	In-situ-Hybridisierung	32
2.6.4	Immunfluoreszenz	32
2.6.4.1	Immunfluoreszenz zur Bestimmung von Protein A	32
2.6.4.2	Immunfluoreszenz zur Bestimmung von Clumping Faktor A	33
2.6.5	Auswertung durch Fluoreszenzmikroskopie	34
2.7	Mathematisches Modell zur Berechnung der Häufigkeiten von Subtypen einzelner Genomtypen bzw. von Varianten einzelner Subtypen	34
2.8	Chemikalien, Enzyme, Materialien, Geräte, Software	35
2.9	Medien, Puffer, Lösungen	37
3	ERGEBNISSE	40
3.1	<i>Staphylococcus aureus</i> in Primärkulturen	40
3.1.1	Primärkulturen von Proben, die mit Acetylcystein behandelt wurden	41
3.1.2	Prävalenz von <i>S. aureus</i> in Primärkulturen verschiedener Probenarten bei Probengewinnung am gleichen Tag	42
3.2	Morphologie von Primärkulturen	43
	Häufigkeit von homogenen und heterogenen Bildern der Primärkulturen verschiedener Probenarten	
3.2.1	Häufigkeit von homogenen und heterogenen Bildern der Primärkulturen verschiedener Probenarten	44
3.2.2	Abhängigkeit des Bildes der Primärkultur von der Bakterienkonzentration	45
3.2.3	Konstanz der Bilder der Primärkulturen in aufeinander folgenden Proben	47
3.3	Bearbeitung der Primärkulturen und Isoltypisierung	49
3.3.1	Isolierte Genomtypen und ihre Differenzierung in Subtypen und Varianten	51
3.3.1.1	Häufigkeit einzelner Genomtypen	51
3.3.1.2	Häufigkeit von Subtypen einzelner Genomtypen	53
3.3.1.3	Häufigkeit von Varianten einzelner Subtypen	54
3.4	Simultanes Auftreten von verschiedenen Genomtypen, Subtypen und Varianten in den einzelnen Probenarten	58
3.4.1	Häufigkeit von Subtypen in den einzelnen Probenarten	59
3.4.2	Häufigkeit von Varianten in den einzelnen Probenarten	60
3.4.2.1	Abstufung der Varianten nach Punktesystem	61
3.5	Einflussfaktoren auf die Bildung von Subtypen und Varianten in Primärkulturen	63
3.5.1	Einfluss von Antibiotikatherapie auf die Bildung von Subtypen und Varianten	64
3.5.1.1	Einfluss von Antibiotikatherapie auf die Bildung von Subtypen	65

3.5.1.2	Einfluss von Antibiotikatherapie auf die Bildung von Varianten	65
3.5.2	Einfluss von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> auf die Bildung von Subtypen und Varianten	66
3.5.2.1	Einfluss von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> auf die Bildung von Subtypen	66
3.5.2.2	Einfluss von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> auf die Bildung von Varianten	66
3.5.3	Ausbildung von ST und Varianten bei MRSA – Stämmen	67
3.5.3.1	Subtypen bei MRSA	67
3.5.3.2	Varianten bei MRSA	68
3.5.4	Einfluss von Lagerungsweise und Zeit bis zur Verarbeitung der Proben	69
3.5.5	Reproduzierbarkeit des morphologischen Bildes der Primärkultur	71
3.5.6	Reproduzierbarkeit des morphologischen Bildes der Primärkultur aus Nasenabstrichen bei gesunden Personen	72
3.6	Southern Analyse	73
3.7	Antibiotika- Resistenzbestimmung der Varianten	75
3.8	In-situ-Hybridisierung und Immunfluoreszenz	77
3.8.1	In-situ-Hybridisierung	77
3.8.1.1	Positiv- und Negativkontrollen	78
3.8.1.2	Nachweisgrenze und Morphologie von <i>S. aureus</i> in der In-situ-Hybridisierung	79
3.8.2	Immunfluoreszenz	80
3.8.2.1	Negativkontrollen	81
3.8.2.2	Immunfluoreszenz zur Bestimmung von Protein A	81
3.8.2.2.1	Immunfluoreszenz zur Bestimmung von Protein A in Nasenabstrichen	82
3.8.2.2.2	Immunfluoreszenz zur Bestimmung von Protein A in Rachenabstrichen	83
3.8.2.2.3	Immunfluoreszenz zur Bestimmung von Protein A in sofort schockgefrorenen Sputen	84
3.8.2.3	Immunfluoreszenz zur Bestimmung von Clumping Faktor A	85
4	DISKUSSION	86
4.1	Prävalenz von <i>Staphylococcus aureus</i> in Routinesputen, sofort schockgefrorenen Sputen, Nasenabstrichen und Rachenabstrichen	86
4.2	Genomtypen, Subtypen und Varianten von <i>S. aureus</i> in den einzelnen Probenarten	87
4.2.1	Morphologie der Primärkulturen	87
4.2.2	Konstanz der Bilder der Primärkulturen in aufeinander folgenden Proben	89
4.2.3	Häufigkeit von Genomtypen, Subtypen und Varianten	90
4.2.4	Einflussfaktoren auf die Bildung von Subtypen und Varianten	92
4.2.4.1	Einflussfaktor 1: Bakterienkonzentration	92
4.2.4.2	Einflussfaktor 2: Antibiotikatherapie	92

4.2.4.3	Einflussfaktor 3: Co-Kolonisation mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	93
4.2.4.4	Einflussfaktor 4: MRSA-Stämme	94
4.2.4.5	Einflussfaktor 5: Lagerungsweise und Zeit bis zur Verarbeitung der Probe	94
4.2.4.6	Einflussfaktor 6: Lokalisation in den tiefen Atemwegen	95
4.3	Methodische Kritik	96
4.3.1	Anzahl der Probenmengen	96
4.3.1	Reproduzierbarkeit des morphologischen Bildes der Primärkultur	97
4.4.	Phagenmobilisation	100
4.5	Unterschiede im Antibiotika- Resistenzmuster bei Varianten	101
4.6	In-situ-Hybridisierung und Immunfluoreszenz	102
4.6.1	In-situ-Hybridisierung	102
4.6.2	Immunfluoreszenz für Protein A	103
5	ZUSAMMENFASSUNG	104
	LITERATURVERZEICHNIS	106
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	114
	ANHANG	116
	DANKSAGUNG	151
	LEBENS LAUF	152

1 EINLEITUNG

1.1 Epidemiologie und Krankheitsbilder von *Staphylococcus aureus*

Staphylokokken sind gram-positive, unbewegliche, fakultativ anaerobe Kugelbakterien. Charakteristischerweise liegen sie in unebenen, traubenartigen Clustern vor. Typischerweise werden sie auf der Haut oder auf Schleimhäuten von Warmblütern gefunden. Aber auch in der Umwelt überleben Staphylokokken im Erdreich, Staub, in der Luft und im Wasser. Als weitere Eigenschaften zeigen sich Staphylokokken Katalase-positiv, und üblicherweise Oxidase-negativ [80]. *Staphylococcus aureus* ist die am besten bekannte und am weitreichendsten untersuchte Spezies. Sie ist Coagulase-positiv und hat aufgrund der goldgelben Farbe einiger Kolonien ihren Namen erhalten. Allerdings können auch weiß oder grau pigmentierte Kolonien beobachtet werden. *S. aureus* besitzt eine wesentliche human- pathogene Bedeutung mit einer großen Bandbreite an Erkrankungen, die von Abszess, Bakteriämie, Wundinfektion, Osteomyelitis und Pneumonie bis hin zu Endokarditis, Staphylococcal Scalded Skin Syndrom (SSSS) und zum Toxic Shock Syndrom (TSS) reicht [44].

Beim Menschen findet man *S. aureus* am häufigsten in der vorderen Nasenhöhle, am Perineum und an den Händen. Dabei unterscheidet man, ohne dass ein einheitlicher Konsens über Frequenz und Anzahl von Proben vorliegt, zwischen sog. persistierenden, intermittierenden und Nicht-Trägern [76]. Während es beim intermittierenden Träger immer wieder Intervalle gibt, in denen *S. aureus* nicht nachgewiesen werden kann, gelingt der Nachweis beim persistierenden Träger dauerhaft. Dabei weist man bei dauerbesiedelten Menschen meist den gleichen Stamm nach, während intermittierende Träger über die Zeit von verschiedenen Stämmen besiedelt werden können [73].

Sowohl persistierende als auch intermittierende Träger sind, obwohl de facto gesund, eine potenzielle Infektionsquelle nicht nur für sich selbst, sondern vor

allem auch für bestimmte Patientenklientel. Dazu gehören neben Patienten mit herabgesetzter Abwehrlage oder Wundpatienten vor allem auch Patienten mit der Erbkrankheit Cystische Fibrose. Daneben ist *S. aureus* einer der am häufigsten nachgewiesene Erreger von nosokomialen Infektionen, insbesondere Fremdkörper-assoziierten oder post-operativen Ursprungs. Die Übertragung erfolgt somit wahrscheinlich von medizinischem Personal auf den Patienten während der Durchführung von Routinearbeiten. Das größte Risiko für eine solche Infektion tragen dabei neben Patienten, die eine Hämodialyse oder eine Peritonealdialyse durchführen, HIV-Patienten [41]. Andererseits kann die Infektionsquelle auch einen endogenen Ursprung haben. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass bei Bakteriämien mit *S. aureus* zu 80% und mehr der identische Stamm in der Nase des jeweiligen Patienten lokalisiert war [19; 79], was die Annahme einer endogenen Infektionsquelle untermauert. Eine weitere Untersuchung konnte zeigen, dass Patienten, die vor einem Aufenthalt auf einer Intensivstation bereits Nasenträger von *S. aureus* waren, eine signifikant höhere Infektionsrate aufwiesen als Patienten, die zuvor nicht besiedelt waren. Durch molekularbiologische Methoden konnte auch hier nachgewiesen werden, dass in fast allen Fällen der Infektionen die Stämme der Nasenbesiedlung dem Infektionsstamm entsprachen [16]. Allerdings scheint eine Bakteriämie exogenen Ursprungs gefährlicher zu sein, als eine Bakteriämie endogener Herkunft, was durch eine signifikant höhere Mortalität bei Nicht-Trägern im Vergleich zu Trägern aufgezeigt wird. Dies wirft die beiden Schlussfolgerungen auf, dass Träger eine adäquatere Immunantwort als Nichtträger zeigen könnten oder aber exogene *S. aureus*- Stämme virulenter als endogene sein könnten [79].

Um endogene Infektionen zu verhindern, wurde bereits in der Vergangenheit versucht, *S. aureus* mittels Antibiotikatherapie vor allem bei persistierenden und intermittierenden Nasenträgern zu eradizieren. Dies gelingt aber über einen längeren Zeitraum anscheinend nur bei gesunden, persistierenden Nasenträgern. Am Perineum oder im Rachen kann offensichtlich keine dauerhafte Eradikation erreicht werden [77]. In einer Vorarbeit des Institutes

konnte gezeigt werden, dass bei CF-Patienten eine dauerhafte Eradikation von *S. aureus* aus der Nase und dem Rachen durch eine Therapie mit Cefaclor nicht möglich ist [55]. Bisher gibt es nur wenige Daten darüber, ob eine Dekolonisation der Nase eine Folgekrankheit durch *S. aureus* auch tatsächlich verhindern kann. Eine Therapie mit Mupirocin-Nasensalbe weist zwar gute Eradikationsraten auf und führt bei chirurgischen Patienten auch zu einer Reduktion von endogenen Infektionen, beeinflusst aber nicht die Rate der chirurgischen Nebeninfektionen [37]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Therapie mit Mupirocin-Nasensalbe bei nicht-chirurgischen Patienten keine effektive Prophylaxe gegen nosokomiale *S. aureus* –Infektionen darstellt [78]. Unter diesen Aspekten muss bedacht werden, dass durch Antibiotikatherapie langfristig die unerwünschte Entwicklung von Resistenzen gefördert wird und nach Eradikation eine Rekolonisation, häufig mit resistenten Organismen, möglich ist [1].

1.2 Resistenzen von *Staphylococcus aureus*

Durch ihre weitreichende Resistenz gegenüber vielen Antibiotika (AB) sind insbesondere sog. Methicillin- resistente Stämme von *S. aureus* (MRSA-Stämme) zu einem großen Problem geworden. Als eine von zahlreichen präventiven Maßnahmen gibt es zwar Empfehlungen zum kontrollierten Einsatz von AB, wie z.B. von Seiten der Paul-Ehrlich-Gesellschaft und der Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft, deren Umsetzung allerdings nicht in allen Einrichtungen mit der gleichen Fachkompetenz erfolgt. Hier besteht ein erhebliches noch auszuschöpfendes Präventionspotenzial [62]. Da die Resistenz von MRSA- Stämmen über die Gruppe aller β -Laktam- AB hinausreicht, steht für die systemische Therapie bei einer Infektion die Substanzgruppe der Glykopeptide mit dem vorrangigen Vertreter Vancomycin zur Verfügung, die allerdings aufgrund ihrer mangelnden Bakterizidie und der eingeschränkten Gewebegängigkeit möglichst in Kombination mit weiteren Staphylokokken wirksamen AB wie z.B. Rifampicin oder Fosfomycin zu applizieren sind [38]. Klinische Studien zur Eradikation von MRSA durch

systemische oder topische antimikrobielle Therapie gibt es noch wenig [62]. In diesem Zusammenhang konnte bisher gezeigt werden, dass eine Kombinationsbehandlung mit Co-Trimoxazol und Fusidic acid die Zahl von MRSA-Nasenträgern genau so effektiv reduzieren kann wie Mupirocin. Eine vollständige Eradikation des Keims über einen längeren Zeitraum (90 Tage) gelingt allerdings bei beiden Behandlungsarten nur in 71% bzw. 78% der Fälle [59]. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits früher durch eine Kombinationsbehandlung mit Rifampicin und TMP/SMX erzielt werden [20].

Die genetische Ursache der Methicillinresistenz ist weitgehend bekannt. Sie wird von dem bei allen MRSA- Stämmen zu findenden *mecA*- Gen verursacht, welches für das Penicillinbindeprotein PBP2a kodiert. Das *mecA*- Gen liegt gemeinsam mit anderen Genen auf einem mobilen genetischen Element, der „staphylococcal chromosomal cassette *mec*“ (*SCCmec*), deren Herkunft und Erwerb noch unbekannt sind [69]. Diese *SCCmec* zeigt einen Polymorphismus, dessen verschiedene Formen in unterschiedlichen Gegenden der Welt regionale Häufungen zeigen [58]. Die Ausbreitung von MRSA- Stämmen auf der Welt zeigt beträchtliche Unterschiede. So existiert z.B. in Europa ein deutliches Süd-Nord-Gefälle mit seltenem Vorkommen von MRSA- Stämmen in Skandinavien bei weitaus höherer Prävalenz in den Mittelmeerstaaten, was auf die Verbreitung von wenigen hoch epidemischen Klonen zurückgeht [69]. In Deutschland waren 2002 sieben regional gehäuft vorkommende MRSA-Epidemiestämme bekannt [61].

Seit den ersten Isolationen in Europa in den frühen 1960er Jahren hat sich MRSA zu einem führenden Grund für nosokomiale Infektionen weltweit entwickelt [58]. Daher sollten neben dem kontrollierten Einsatz von AB weitere präventive Maßnahmen inzwischen Standard geworden sein. Dazu zählen allgemeine hygienische Maßnahmen wie Isolation infizierter Patienten, Händedesinfektion oder Tragen von Schutzkleidung, wodurch eine weitere Ausbreitung von MRSA- Stämmen eingedämmt werden soll. Die Wichtigkeit solcher Maßnahmen zeigen beispielsweise Untersuchungen bei Patienten mit

Cystischer Fibrose, bei denen der Einsatz bestimmter AB wie Ciprofloxacin und/oder Cephalosporinen genau wie längere Krankenhausaufenthalte den Erwerb eines MRSA- Stammes fördern [51]. Um nosokomiale Infektionen mit *S. aureus*, und dabei vor allem mit MRSA-Stämmen, in Zukunft zu reduzieren, sollten idealerweise alle hospitalisierten Patienten auf eine MRSA-Nasenbesiedlung gescreent werden. Ferner sind bessere Eradikationsmethoden von Nöten. Diese könnten neue topische Agenzien wie lytische Enzyme, Peptide oder Antikörper enthalten [1].

Dennoch scheinen alle Maßnahmen nicht verhindern zu können, dass die allgemeine Resistenzentwicklung in eine alarmierende Richtung fortschreitet. Bereits Ende der 1990er Jahre konnte in einigen klinischen Isolaten eine verminderte Sensibilität von *S. aureus* gegenüber Vancomycin festgestellt werden. Da bei Enterokokken bereits Vancomycin- resistente Stämme mitsamt den dafür verantwortlichen Genen identifiziert sind, besteht die Gefahr von Gentransfers zwischen Enterokokken und *S. aureus*, wodurch letzterer die Resistenzgene erwerben könnte. Diese Gefahr wird z.B. durch einen klinischen Fall mit dem Auftreten eines VRSA- Stammes in den USA im Jahre 2002 belegt [11]. Andere Befürchtungen werden in der vermehrten Verabreichung von Vancomycin gesehen, wodurch die Empfindlichkeit gegenüber Glykopeptid- AB herabgesetzt werden könnte, was schließlich in MRSA- Stämmen, die gleichzeitig wenig empfindlich gegen Glykopeptid- AB wären, resultieren kann [21]. Zwar ist die Vancomycin- Resistenz bei *S. aureus* im Vergleich zu Enterokokken oder Coagulase-negativen Staphylokokken immer noch sehr selten, allerdings macht sich große Besorgnis darüber breit, dass VRSA- Stämme aufgrund der allgemeinen Virulenz von *S. aureus* bald das größte Risiko für Patienten darstellen könnten [68].

1.3 Virulenzfaktoren von *Staphylococcus aureus*

Bakterien können mit Hilfe von Virulenzfaktoren Gewebe durchdringen, das Abwehrsystem des Wirtes hemmen oder an Basalmembranen binden. Bei *S. aureus* sind viele Virulenzfaktoren bekannt, die für die Breite des Spektrums der *S. aureus* – assoziierten Erkrankungen verantwortlich sein könnten. Dazu gehören neben Protein A, Clumping Faktor A, Clumping Faktor B auch Leukozidin, Coagulase und eine Reihe von Hämolytinen.

Mit ihren Oberflächenproteinen adhären Bakterien an die extrazelluläre Matrix des Wirtsorganismus und initiieren so ihre Kolonisation [23]. In der Zellwand gram-positiver Bakterien vorkommende Oberflächenproteine können in drei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe bindet mit ihrer N-terminalen Region an die Zellmembran, die zweite ist über hydrophobische Interaktionen an die Zellwand gebunden und die dritte Gruppe ist mit ihrem C-terminalen Ende in der Zellwand verankert [22].

1.3.1 Protein A

Protein A (SpA) von *S. aureus* gehört zu der dritten Gruppe. Anfang der 1980er Jahre war es eines der ersten Oberflächenproteine gram-positiver Bakterien über das berichtet wurde. Seither kamen in dieser Gruppe über 65 weitere Proteine hinzu [22]. Obwohl SpA bei fast allen, speziell aus respiratorischen Isolaten gewonnenen, *S. aureus*- Stämmen vorkommt [26], ist seine Rolle während einer Staphylokokkeninfektion noch nicht vollständig geklärt. Bekannt ist, dass SpA an die Fc-Region des IgG von Säugetieren bindet. Es scheint, dass durch diese Bindung von IgG mit SpA die Phagozytose opsonierter Bakterien gestört wird. Dabei wären allerdings gelöste SpA- Fragmente effektiver als in der Zellwand verankerte. Solche Fragmente können zwar in Kulturmedien entdeckt werden, allerdings ist der Mechanismus einer solchen Ablösung bisher nicht bekannt [32]. Andere Untersuchungen zeigen eine

Interaktion von SpA und gC1qR, einem multifunktionellen, ubiquitär vorkommenden Zellprotein. Dadurch käme gC1qR von Thrombozyten als Zellbindungsstelle für SpA in Frage, was einen weiteren Mechanismus für bakterielle Zelladhäsion bei Gefäßverletzungen und Thrombose aufzeigen würde [52]. Neue Erkenntnisse zeigen, dass ein im Epithel der Luftwege weit verbreiteter Rezeptor für TNF- α , TNRF1, ein Rezeptor für SpA ist. Dadurch könnte die zentrale Stelle in der Pathogenese der Staphylokokken-Pneumonie erklärt sein. Durch die Bindung von TNRF1 und SpA wird offensichtlich die körpereigene Abwehr aktiviert, was im Lungengewebe Entzündungsprozesse hervorruft, die den Boden für eine Pneumonie bereiten könnten [31].

Aufgrund seiner guten Detektierbarkeit mittels Methoden der Fluoreszenz- oder Elektronenmikroskopie kann SpA dazu verwendet werden, *S. aureus* aufzuspüren. Es ist inzwischen gelungen dessen Lokalisation im vorgeschädigten Epithel von infizierten CF-Patienten herauszufinden. *S. aureus* wurde sowohl in vivo, als auch in vitro in der Lamina propria, unterhalb der Basalmembran und auf der Basalseite der basalen Epithelzellen entdeckt. Diese Lokalisationen konnten bei intakten Epithelien nicht gefunden werden [50].

1.3.2 Clumping Faktor A

Unter „Clumping Faktor“ (Clf) werden zwei unterschiedliche Proteine, ClfA und ClfB subsummiert, deren Gene keine allelische Varianten darstellen, sondern voneinander verschieden sind [23]. Bei ClfA handelt es sich wie bei SpA um ein Protein, das mit seinem C-terminalen Ende in der Zellwand verankert ist. Das *clfA*- Gen ist in beinahe allen klinischen *S. aureus*- Stämmen gefunden worden [81]. ClfA führt zu einer Verklumpung des Plasmas über die Bindung an Fibrinmonomere und ist ein eigenes, von Coagulase verschiedenes Fibrinogen-bindendes Protein [2] und nicht die zellgebundene Form der Coagulase [48]. Inzwischen ist ein monoklonaler AK entwickelt worden, der ClfA auf der

Oberfläche von *S. aureus* erkennt und der bisher in Tierversuchen vielversprechende Erfolge im Hinblick auf spätere Therapieverbesserungen beim Menschen zeigt [18].

1.3.3 α - und β -Hämolysin

Von den zahlreichen Hämolysinen sollen hier lediglich das α - und das β -Hämolysin kurz erwähnt werden. Beide Proteine besitzen die Fähigkeit der Zell-Hämolysen. Das *hla*-Gen, welches für das α -Toxin kodiert, konnte bisher in allen *S. aureus*-Isolaten nachgewiesen werden [7]. Allerdings synthetisieren offensichtlich nicht alle ein funktionsfähiges Toxin [56]. Dagegen findet man nur in wenigen humanen *S. aureus*-Isolaten β -Hämolysin. Dieses ist eine Sphingomyelinase, die Sphingomyelin zu Phosphorylcholin und Ceramid hydrolysiert [5]. Interessanterweise zeigen sich *S. aureus* Isolate von Menschen meistens β -Hämolysin negativ, was auf eine Phageninsertion im *hlyB*-Gen zurückgeführt wird [14].

1.4 Bakteriophagen

Bakteriophagen sind obligate Zellparasiten von Bakterien mit DNA oder RNA als Nukleinsäure. Sie befallen nur jeweils eine bestimmte Bakterienart und sind auf die Enzymsysteme der Wirtszelle angewiesen um sich zu vermehren. Dabei heftet sich der Phage an die Zelloberfläche des Bakteriums und injiziert seine Nukleinsäure, die durch ortsspezifische Rekombination in das Bakteriengenom integriert wird. Durch Synthese phagenspezifischer Proteine und anschließender Zusammensetzung entstehen neue Phagen, die nach Lyse der Wirtszelle freigesetzt werden. Ein Phage, der ein Bakterium lysogenisiert, kann auch Gene tragen die bakterielle Funktionen erfüllen. Man spricht dabei von lysogener Konversion [24]. Solche phagenkodierten Gene sind in der bakteriellen Pathogenese bedeutsam. Sie kodieren teilweise für Toxine,

teilweise aber auch für Regulatoren der Enzymexpression. Dadurch können Phagen Adhäsion, Kolonisation und Invasion von Bakterien beeinflussen [74].

Ein Phage kann zusätzliche Virulenzgene wie z. B. *sak* tragen oder bakterielle Virulenzgen wie z.B. *hly* unterbrechen und damit ausschalten. Die phagenkodierte Staphylokinase (Sak, kodiert durch *sak*) aktiviert indirekt Plasminogen zu Plasmin durch Bildung eines Plasminogen-Staphylokinase-Komplexes und induziert dadurch die Auflösung von Fibrin durch Plasmin, weshalb es zur Fibrinolyse kommt [15; 42]. Das *hly*-Gen vieler humaner *S. aureus*-Isolate ist aufgrund von Phageninsertion ausgeschaltet [14]. Da die Bindungsstelle des Bakteriums für die Phagen innerhalb des Gens für Hly liegt, ist dieses bei Insertion eines Phagen nicht mehr intakt [66]. Dadurch gilt die Hly-Aktivität als Marker für die Integration eines Phagen ins Bakteriengenom. Eine solche negative Konversion von Hly ist bei etlichen Phagen beobachtet worden [13; 14; 15]. Einige dieser sog. β -konvertierenden Phagen tragen zusätzliche Gene wie z.B. für Sak, welche durch Phageninduktion zur Expression kommen [15].

Durch Southern Analyse kann unter Verwendung spezieller Sonden festgestellt werden, ob die Abweichungen im Bandenmuster bei genetischen Varianten (Subtypen) auf einen bestimmten Phagen zurückzuführen sind.

1.5 Cystische Fibrose

Cystische Fibrose (CF) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselstörung mit einem genetischen Defekt am Chromosom 7 und einer Häufigkeit von 1:2000 Neugeborenen in Europa. Es kommt dabei zu einer generalisierten Dysfunktion exokriner Drüsen. Durch eine vermehrte Produktion und eine erhöhte Viskosität des Sekrets muköser Drüsen (z.B. in den Bronchien oder im Verdauungstrakt) kommt es zu den typischen Komplikationen. Diese stellen sich als permanente Atemwegsinfektionen, intestinale Maldigestion und

Malabsorption dar. Durch den ebenfalls charakteristisch erhöhten Elektrolytgehalt des Sekrets von Schweißdrüsen kann es zu Flüssigkeits- und Elektrolytverlusten kommen.

Die Ursache der Erkrankung besteht in dem defekten „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR) -Gen, das für einen in epithelialen Zellen liegenden Chloridkanal kodiert, der aktiv Chloridionen aus der Zelle transportiert. Dadurch ändert sich die Zusammensetzung der Sekrete, was zur vermehrten Sekretion und zur erhöhten Viskosität führt. Das extrem zähe Schleimsekret der exokrinen Drüsen im Bronchialsystem hat eine verminderte mukoziliäre Clearance zu Folge, die es Erregern erleichtert, sich im Schleim festzusetzen und zu vermehren. Das bei CF-Patienten ebenfalls veränderte Epithel der Luftwege ist bei der hohen NaCl- Konzentration des Oberflächenfilms nicht in der Lage Bakterien abzutöten [67]. Daher kommt es bei CF-Patienten bereits im Kindesalter zu rezidivierenden Bronchialinfekten vor allem mit den dabei am häufigsten vorkommenden Krankheitserregern *S. aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*. Der Nasen- Rachenraum gilt dabei als primäre Eintrittspforte von *S. aureus*, der so in die tiefen Atemwege gelangen und Bronchial- und Lungeninfektionen verursachen kann [27]. Klassischerweise wird *S. aureus* als der initiale Keim gesehen, dessen verursachte Schäden an den Lungen den Boden für weitere bakterielle Infektionen bereiten. Allerdings existiert auch die Ansicht, dass CF-Patienten allgemein von Geburt an empfänglicher für bakterielle Infektionen sind als gesunde Kinder. Dies wird durch CF-Patienten mit initialen *P. aeruginosa* Infektionen untermauert [46]. Trotz ständiger Antibiotikatherapie ist zwar immer noch eine erhöhte Morbidität und Mortalität der Patienten zu verzeichnen, dennoch hat sich in den letzten Jahren eine stetige Verbesserung der Lebensqualität und eine Verlängerung der Überlebenszeiten der Patienten eingestellt [45].

1.5.1 Therapieansätze

Für die Lungenerkrankung kommen therapeutisch zwei verschiedene Ansätze gemeinsam zur Anwendung. Zum einen werden physiotherapeutische Atem- und Hustentechniken gelehrt, die zusammen mit Ausdauersport die fortschreitende Obstruktion der Lungen verlangsamen sollen. Auf der anderen Seite steht die chemotherapeutische Behandlung. Der Versuch einer Eradikation von *S. aureus* gestaltet sich hierbei schwierig, da einerseits der Schweregrad der Lungenerkrankung einen ungünstigen Effekt aufweist und andererseits eine Reinfektion innerhalb eines halben Jahres sehr wahrscheinlich ist [64; 71]. Ein anderer Ansatz zur Eindämmung von *S. aureus* besteht in der Dauertherapie mit AB. Studienergebnisse zeigen, dass Säuglinge von einer Dauertherapie mit Flucloxacillin insofern profitieren, als bei kontinuierlicher Gabe ab der ersten Lebenswoche in den ersten zwei Lebensjahren eine signifikante Reduktion der Kolonisation mit *S. aureus* zu verzeichnen ist. Dadurch verringert sich die Infektionsrate und infolgedessen auch die Gabe zusätzlicher AB. Eine vermehrte Resistenzbildung gegen Flucloxacillin scheint dabei nicht stattzufinden [75]. Andere Untersuchungen zeigen, dass eine Dauertherapie mit Cephalexin zwar ebenfalls die Besiedlung durch *S. aureus* stark hemmt, allerdings auch das Auftreten von *P. aeruginosa* begünstigt [43; 70]. Dies ist problematisch, da *P. aeruginosa* als der gefährlichere Keim für CF-Patienten gilt. Daher scheint der Einsatz von Antistaphylokokken-AB ohne Wirkung auf *P. aeruginosa* bei fehlendem Nachweis von Staphylokokken aus mikrobiologischer Sicht bedenklich [4]. Ob und inwiefern allerdings prophylaktische oder intermittierende Therapien Faktoren wie Lungenfunktion, Resistenzentwicklung oder frühere Manifestation von *P. aeruginosa* beeinflussen, kann nur durch große, randomisierte klinische Studien über mehrere Jahre geklärt werden [47].

Weitere Therapieansätze versuchen das Lungensekret zu verflüssigen. Die im Sputum von CF-Patienten hoch konzentrierten neutrophilen Granulozyten setzen aufgrund von Autolyse DNA frei, wodurch die Viskosität des Sputums

gesteigert wird. Dies soll durch die Gabe von rekombinierter humaner DNase (rhDNase I) abgeschwächt werden. Aufgrund hoher Kosten ist diese Therapieform allerdings noch nicht etabliert.

1.6 Typisierung von *Staphylococcus aureus*

Um infektionshygienische Maßnahmen einleiten und koordinieren zu können, stellt die Genomtypisierung von Bakterien, insbesondere von nosokomialen Erregern wie MRSA, eine wichtige Stütze dar. Dadurch können beispielsweise Infektionsketten aufgedeckt oder Mutationen im Genom festgestellt werden. Für die Studie der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) zur molekularen Typisierung von *S. aureus* angewendet. Dabei wird die chromosomale DNA durch das Restriktionsenzym *Sma*I geschnitten und verdaut. In einem Agarosegel erfolgt danach die Auftrennung der Bruchstücke, die ein charakteristisches Bandenmuster nach sich zieht mit dem einzelne Genomtypen unterschieden werden können. Die DNA-Fragmentmuster bleiben dabei auch nach zahlreichen Präparationen und Subkultivierungen der Isolate konstant [63]. Daher ist die PFGE voll reproduzierbar, was einen sicheren Vergleich zwischen Stämmen aus unterschiedlichen Proben zu unterschiedlichen Zeiten zulässt.

1.6.1 Genomtypen und genetische Varianten von *Staphylococcus aureus*

Insgesamt ist das Bandenmuster von dutzenden verschiedenen Genomtypen (GT) von *S. aureus* bekannt. Punktuelle Unterschiede im Bandenmuster gleicher GT können allerdings z.B. mittels Gentransfer durch Bakteriophagen auftreten, sodass Isolate gleicher GT nicht notwendigerweise ein identisches Bandenmuster aufweisen. Die Typisierung einzelner Isolate durch PFGE und den computergestützten Vergleich der Bandenmuster mit Referenzstämmen einer Datenbank erlaubt die Zuordnung eines Isolates zu einem bestimmten GT. Weil durch PFGE auch kleine Unterschiede im Bandenmuster sicher

erkannt werden können [72], kann eine Einteilung der einzelnen GT in „genetische Varianten“ (im folgenden „Subtypen“ (ST) genannt) erfolgen. Dies kann mit anderen Mitteln, wie zum Beispiel der Methode der Phagentypisierung aufgrund des geringeren Diskriminierungspotenzials nicht erreicht werden [3]. Zur Definition der ST einzelner GT werden in verschiedenen Arbeiten zwei bis drei Fragmentabweichungen im Bandenmuster im Vergleich zum Muster eines Referenzstammes zugelassen [8; 60]. Andere Autoren sprechen, je nach Anzahl der Bandenabweichungen nicht von ST, sondern von einer nahen oder möglichen Verwandtschaft zum jeweiligen GT [72]. Einigung herrscht allerdings ab vier Bandenabweichungen, wonach alle der zuvor aufgeführten Autoren von verschiedenen GT ausgehen.

1.6.2 Phänotypische Varianten von *Staphylococcus aureus*

S. aureus- Isolate unterscheiden sich häufig hinsichtlich verschiedener phänotypischer Merkmale wie z.B. Koloniemorphologie, Koloniegröße, Farbe oder Hämolyse in ihrer Erscheinung auf Blutagarplatten [10; 60]. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass diese phänotypischen Merkmale häufig nicht mit genetischen Veränderungen, wie sie durch PFGE detektiert werden können, korrelieren [39]. So können sich identische ST z.B. in der Hämolyse-Expression stark unterscheiden. Diese Unterschiede beruhen wahrscheinlich auf Mutationen in Regulatorgenen. In der vorliegenden Arbeit werden solche „phänotypischen Varianten“, also ST mit identischem PFGE-Muster aber Unterschieden in phänotypischen Merkmalen, als „Varianten“ bezeichnet.

Neben den oben definierten Varianten wurden in anderen Arbeiten auch sog. Small-Colony Variants (SCV) beschrieben [35; 36]. Diese SCV erhielten ihren Namen aufgrund einer für *S. aureus* unüblichen Morphologie, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur Standortflora häufig fehldiagnostiziert oder übersehen werden [35]. *S. aureus* Stämme, die als SCV bezeichnet werden, sind bei CF häufig

abhängig von Thymidin [35] und wachsen daher auf konventionellen Nährböden nicht oder nur unzureichend. Allerdings ist eine Kultivierung auf Mannitol-Salzagar-Nährböden, auf denen ein gutes Wachstum Thymidin-abhängiger Stämme gewährleistet ist, möglich [25]. Auch die SCV weisen zu Referenzstämmen der gleichen Probe mit gängiger Morphologie ein identisches Bandenmuster auf [36].

1.7 Ziele dieser Studie

Im Laufe der persistierenden Lungeninfektion bei CF-Patienten kommt es, wahrscheinlich als Folge selektiver Anpassung an die Wirtsumgebung, zu spezifischen Veränderungen der Bakterien. Bei *P. aeruginosa* wird beispielsweise das Auftreten mukoider Phänotypen mit dem Beginn der chronischen Lungeninfektion und einer Verschlechterung der Lungenfunktion in Verbindung gebracht [45]. Bei *S. aureus* sind solche Anpassungsstrategien wenig untersucht.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte festgestellt werden, dass gerade bei CF-Patienten im Sputum häufig verschiedene *S. aureus*-Isolate, welche sich durch unterschiedliche Koloniausprägung bzw. Hämolyse auszeichneten, gleichzeitig nachweisbar waren. Dabei handelte es sich in einigen Fällen um Co-Kolonisationen verschiedener Stämme (unterschiedliche GT). In den meisten Fällen lagen jedoch entweder ST identischer GT (genetische Varianten) oder Varianten identischer ST (phänotypische Varianten) vor. Die Heterogenität der Isolate könnte im letztem Fall Ausdruck unterschiedlicher Aktivitäten der Regulatorgene innerhalb der Population sein.

CF-Patienten sind häufig nicht nur in den Lungen, sondern auch im Rachen und in der Nase besiedelt. Dabei ist unklar, ob die Besiedlung der oberen Luftwege (Nase und Rachen) als Marker für eine Lungeninfektion anzusehen ist. Weiterhin ist unklar, ob auch in den Proben der oberen Atemwege heterogene

S. aureus- Isolate auftreten. Daneben ist nicht bekannt, welche Virulenzfaktoren während der Besiedlung der oberen Atemwege bzw. der Lungen exprimiert werden und wie stark sich die Bakterien in den jeweiligen Milieus teilen.

Als erstes Ziel dieser Studie sollte das Vorkommen von *S. aureus* in der Nase und im Rachen bei CF-Patienten mit bekannter *S. aureus* Lungenbesiedlung erfasst werden. Insbesondere sollte das Auftreten heterogener Proben (Co-Kolonisation verschiedener Stämme, Vorkommen von ST und/ oder Varianten) systematisch sowohl in Sputumproben als auch in Abstrichproben von Nase und Rachen charakterisiert werden. Alle Isolate wurden durch PFGE typisiert. Dadurch sollte eine Differenzierung der heterogenen Isolate in verschiedene GT, ST und Varianten ermöglicht werden.

Weiter sollte untersucht werden, ob das Auftreten heterogener Proben, und damit auch die Existenz von ST und Varianten, mit den Faktoren Keimdichte, Co-Kolonisation mit *P. aeruginosa*, Lagerungsweise der Proben und Antibiotikatherapie korreliert. Ferner sollte geklärt werden, ob die Bildung von ST und/ oder Varianten bei MRSA- Stämmen oder bei MSSA- Stämmen häufiger auftritt.

Daneben sollte insbesondere für die Sputumproben herausgefunden werden, ob die gefundenen Keime bzw. ihre ST und Varianten über längere Zeiträume konstant nachzuweisen wären, oder ob sich das Besiedlungsprofil laufend ändert.

Darüber hinaus war von Interesse, ob sich Varianten eines Stammes von *S. aureus*, die in der gleichen Primärkultur auftreten, in ihrem AB- Resistenzmuster unterscheiden. Dies hätte für die Diagnostik eine besondere Bedeutung, da die für die Therapie entscheidende Resistenzbestimmung i.d.R. nur von einer einzelnen Kolonie durchgeführt wird und somit mögliche Unterschiede unentdeckt blieben.

Weiterhin sollte herausgefunden werden, ob die Bandenabweichungen bei unterschiedlichen ST auf die Integration von *hly*-konvertierende Phagen zurückzuführen sind.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob die Virulenzfaktoren SpA und ClfA in Sputumproben, sowie in Nasen- und Rachenabstrichen nachweisbar sind und ob dabei Expressionsunterschiede auftreten. Bei positivem Ausfall wäre weiter von Interesse, ob homogene oder heterogene Expressionsmuster zu erkennen wären. Hierfür sollte die Methode der indirekten Immunfluoreszenz gekoppelt mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) etabliert werden.

2 PATIENTEN, PROBEN UND METHODEN

2.1 Patienten und Probenmaterial

Im Zeitraum vom 19.5.03 bis 22.10.04 wurden von 30 Patienten mit cystischer Fibrose insgesamt 194 Proben gewonnen. Die für die Studie in Frage kommenden Patienten besuchen routinemäßig alle drei Monate die CF-Sprechstunde der Universitätsklinik Tübingen (Leitung: Prof. Dr. Stern). In die Studie aufgenommen wurden alle Patienten, die im Zeitraum vom 19.5.03 bis 20.8.04 mindestens einmal einen positiven *S. aureus*- Befund in einem Routinesputum aufwiesen.

Unter Routinesputum (RS) werden alle folgendermaßen gewonnenen Proben zusammengefasst:

- a. In der Sprechstunde abgegebenes Sputum.
- b. Zur Sprechstunde von zuhause mitgebrachtes Sputum.
- c. Zwischen den Sprechstundenterminen mit der Post direkt ins Institut für Mikrobiologie geschickte Sputen.
- d. Während eines stationären Aufenthaltes in der Universitätskinderklinik Tübingen gewonnene Sputen.

Nach erfülltem Aufnahmekriterium wurde versucht, bei den nächsten Sprechstundenterminen von diesen Patienten mindestens einmal folgende Proben zusätzlich zum RS zu gewinnen:

1. Sofort schockgefrorenes Sputum (SSS)
2. Nasenabstriche (NA)
3. Rachenabstriche (RA)

Zu allen Probenarten wurde außerdem retrospektiv anhand der Patientenakten eine eventuell vorliegende Antibiotikatherapie am Tag der Probengewinnung dokumentiert.

Bei Patienten, die kein RS produzieren können, wird am Sprechstundentermin routinemäßig ein Rachenabstrich vorgenommen. Diese Patienten wurden, auch bei *S. aureus* positivem Befund, für die Studie nicht berücksichtigt.

2.1.1 Profil der Patienten mit *Staphylococcus aureus* positiver Primärkultur

Alle CF-Patienten werden in der Tübinger Kinderklinik routinemäßig in dreimonatigen Abständen untersucht. Dabei wird immer versucht ein RS zu gewinnen.

Einschlusskriterium für die Studie war mindestens ein positiver *S. aureus*-Befund in einem RS. Dies traf bei 30 von 140 Patienten (= 21,4%) zu.

Profil der Patienten mit mindestens einem *S. aureus*- positiven RS:

<u>Alter zu Studienbeginn</u>		<u>Geschlechtsverteilung</u>	
Altersgrenzen	Durchschnitt	weiblich	männlich
8-35 Jahre	17,6 Jahre	15	15

2.1.2 Antibiotikatherapie

Die Antibiotikatherapie am Tag der Probenentnahme wurde anhand der Akten in der Kinderklinik retrospektiv dokumentiert. Zum Einsatz kamen sowohl Mono- wie auch Kombinationstherapien. Die Art der Verabreichung war oral, inhalativ oder intravenös. Die Dauer der Verabreichung war entweder intermittierend für

bis zu drei Wochen oder die Patienten erhielten eine Dauertherapie über mehrere Monate.

Eingesetzt wurden folgende AB:

Monotherapie

Azithromycin	Ciprofloxacin	Doxycyclin
Cefaclor	Clarythromycin	Flucloxacillin
Cefalexin	Clindamycin	Linezolid
Ceftazidim	Colistin	Metronidazol
Cefuroxim	Co-Trimoxazol	Tobramycin

Kombinationstherapie

Doxycyclin/ Clindamycin	Tobramycin/ Aztreonam
Ethambutol/ Rifampicin	Tobramycin/ Ceftazidim
Itraconazol/ Cefaclor	Tobramycin/ Ciprofloxacin
Teicoplanin/ Ceftazidim	Tobramycin/ Meropenem

2.1.3 Gesunde Kontrollpersonen

Von insgesamt elf Labormitarbeitern wurden teilweise wiederholt NA und RA zum Nachweis oder Ausschluss von *S. aureus* gemacht. Einige dieser Proben dienten zum Nachweis von Varianten in der Primärkultur, andere zur Negativkontrolle der In-situ-Hybridisierung.

2.2 Anzucht, Isolierung und Dokumentation

2.2.1 Anzucht und Isolierung von *Staphylococcus aureus* aus Routinesputen

Gemeinsames Merkmal aller Routinesputen ist der ungekühlte Transport zur mikrobiologischen Untersuchung ins Institut für Mikrobiologie. Dort werden die Sputen routinemäßig mikrobiologisch untersucht.

Nach erfolgter Untersuchung wurden die Sputen für den Zeitraum der Studie in einem Kühlraum bei 4°C bis zur Abholung ins Institut für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene aufbewahrt. Wiederholt untersucht wurden nur Sputen, die in der mikrobiologischen Untersuchung einen positiven *S. aureus* Befund aufwiesen. *S. aureus* negative Sputen wurden verworfen. Der Transport ins Institut für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene erfolgte ungekühlt nach 1 bis 30 Tagen. Bis zum Abschluss der Studie wurden die Sputen dort bei – 20°C gelagert und nur zu Untersuchungszwecken aufgetaut.

Im Institut für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene wurden die Proben auf phänotypisch unterscheidbare Kolonien in der Primärkultur untersucht. Dazu wurden 50µl der Probe in eine PBS-Verdünnungsreihe gegeben. Flüssige Sputen konnten dabei leicht pipettiert werden. Bei zähen, nicht pipettierbaren Sputen wurde mittels einer 50µl fassenden Öse eine entsprechende Menge der Probe gewonnen. Die Verdünnungsreihe beinhaltete sechs Verdünnungsstufen von 1:10 bis 1:10⁶, von denen je 100µl ausplattiert wurden. Nach 48h Kultivierung bei 37°C konnte die Bestimmung des Phänotyps und die Quantifizierung der Einzelkolonien durchgeführt werden.

Die phänotypischen Merkmale der einzelnen Kolonien wurden nach Größe, Farbe und Hämolyseverhalten und durch eine fotografische Aufnahme dokumentiert. Die somit unterschiedenen Kolonien in der Primärkultur wurden nach Dokumentation erneut selektiv mit einer Öse auf einer Schafsblutagarplatte ausgestrichen und nochmals für 24h bei 37°C kultiviert.

Die gewonnenen Reinkulturen konnten anschließend mittels des Agglutinationstest „Staphaurex“ auf *S. aureus* überprüft werden und wurden bei positivem Ausfall in einem Einfriermedium aus 25% Glycerin und 75% TSB bei -70°C eingefroren.

2.2.1.1 Anzucht und Isolierung von *Staphylococcus aureus* aus Routinesputen auf verschiedenen Nährböden

Zu Beginn wurden drei verschiedene Nährböden getestet. Zur Kultivierung der Bakterien wurden die verdünnten Proben auf diesen Nährböden ausgestrichen.

Erstens handelte es sich dabei um für *S. aureus* selektive Mannitol-Kochsalzplatten. Diese dienen zur Verifikation des in der Mikrobiologie festgestellten *S. aureus*-positiven Befundes.

Zweitens wurden Schafsblutagarplatten und drittens Schafsblutagarplatten mit eingegossenen AB (Colistin- Nalidixinsäure (CNA)-Platten; selektiv gegen gramnegative Erreger) verwendet. Da nach einer Reihe von Vergleichen zwischen diesen beiden Platten keinerlei auffallende Unterschiede bezüglich des Auftretens von *S. aureus* festzustellen waren, wurden für den Rest der Studie nur noch die normalen Schafsblutagarplatten zur Gewinnung der Primärkulturen benutzt.

Die Gewinnung der Reinkulturen erfolgte stets auf normalen Schafsblutagarplatten.

2.2.1.2 Einsatz von Acetylcystein bei zähen, nicht pipettierbaren Sputen

Zu Beginn der Verarbeitung der RS wurden sechs zähe Sputen mit einer gleichen Menge an 10% Acetylcystein (AC) versetzt. Damit wurden die Sputen

pipettierbar gemacht. Allerdings konnte danach nur noch bei zwei Proben ein geringes Wachstum von Bakterien verzeichnet werden. Die anderen vier Proben wiesen keinerlei Wachstum mehr auf. Daraufhin wurde eine Sputumprobe, von der reichlich Material vorhanden war, in drei Fraktionen getrennt. Die erste Fraktion wurde mit gleicher Menge 10% AC, die zweite mit gleicher Menge 2% AC versetzt. Die dritte Fraktion wurde nicht mit AC versetzt, sondern original belassen. Da beide mit AC versetzte Fraktionen keinerlei, die dritte Fraktion allerdings deutliches Bakterienwachstum in der Primärkultur aufwies, wurde danach nicht mehr auf AC zurückgegriffen, sondern mittels einer 50µl fassenden Öse eine entsprechende Menge der zähen Sputumproben in die Verdünnungsreihe gegeben.

2.2.2 Anzucht und Isolierung von *Staphylococcus aureus* aus sofort schockgefrorenen Sputen

Im Unterschied zu den RS wurden die sofort schockgefrorenen Sputen nicht zur mikrobiologischen Untersuchung gebracht, sondern direkt nach der Abgabe in einen Behälter mit Flüssigstickstoff gegeben. Im gefrorenen Zustand konnte somit der Transport ins Institut für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene gewährleistet werden, wo die Proben bei -70°C aufbewahrt wurden. Zur Untersuchung wurden die Proben im Gegensatz zu den RS nicht aufgetaut. Stattdessen wurde mit einer glühenden, 50µl fassenden Öse eine entsprechende Menge aus den gefrorenen Proben gewonnen und in eine zur Verarbeitung der RS identischen PBS-Verdünnungsreihe gegeben. Das anschließende Verfahren zum Gewinnen und Einfrieren der Reinkulturen entsprach dem für die RS durchgeführten.

2.2.3 Anzucht und Isolierung von *Staphylococcus aureus* aus Nasen- und Rachenabstrichen

Die NA und RA wurden mittels eines mit PBS befeuchteten Wattestäbchens durchgeführt. Die Verarbeitung dieser Proben erfolgte nach einer Aufbewahrungszeit von einer bis zehn Stunden in einem ungekühlten Plastikröhrchen, das mit 400µl PBS gefüllt war.

Zunächst wurden die Proben gevortext und danach 50µl in eine zur Verarbeitung der RS identischen PBS-Verdünnungsreihe gegeben. Das anschließende Verfahren zum Gewinnen und Einfrieren der Reinkulturen entsprach dem für die Sputen durchgeführten.

2.3 Typisierung von *Staphylococcus aureus* Isolaten mittels Pulsfeldgelelektrophorese

2.3.1 Isolierung der chromosomalen DNA

Um die chromosomale DNA zu isolieren, wurde mittels einer glühenden Öse ein Teil der gewonnenen Reinkulturen aus dem gefrorenen Zustand gelöst und in 5ml TSB als Übernachtskultur bei 37°C angezogen. Daraus wurden Bakterien entsprechend einer optischen Dichte (OD) von 0,5 bei 600nm entnommen. Diese Menge wurde dann bei 10.000 rpm für drei Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet mit 100µl Waschlösung versetzt. Nach erneutem Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes wurden noch einmal 100µl Waschlösung zugegeben. Dann konnten die Bakterien auf 55°C erwärmt werden. Gleichzeitig wurde 2% low melting point Agarose auf 100°C erwärmt. Je 100µl von Bakterien in Waschlösung und Agarose wurden nun vermischt und in vorgefertigte Gusskammern zum Aushärten pipettiert. Nach 30min Aushärtungszeit wurden die Agaroseblöckchen in 1ml Lysepuffer gegeben. Dazu wurden noch 5µl Lysostaphin (10mg/ml) pipettiert. Zur

Inkubation wurden die Blöckchen in einem Kühlschrank bei 4°C und leichtem Schütteln für 16h gelegt. Dann wurde der Lysepuffer durch 1ml Proteolysepuffer unter Zugabe von 50µl Proteinase K (10mg/ml) ersetzt. Die Agaroseblöckchen wurden damit in ein 55°C warmes Wasserbad für 24h unter leichtem Schütteln inkubiert. Dabei wurde nach der Hälfte der Zeit der Puffer erneuert. Zum Schluss wurden die Blöckchen fünfmal mindestens eine Stunde mit 1ml TE bei 4°C unter leichtem Schütteln gewaschen. Die Agaroseblöckchen wurden dann in 1ml TE bei 4°C bis zum weiteren Verfahren aufbewahrt.

2.3.2 Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau wurden 0,5cm x 0,2cm messende Fragmente aus den Agaroseblöckchen geschnitten und mit 100µl des folgenden Restriktionsansatzes versetzt.

	ca. 100µl Agaroseblöckchen +
<u>Restriktionsansatz:</u>	1µl BSA (20mg/ml)
	20µl 10 x Puffer
	78µl Aqua bidest (steril)
	1µl <i>Sma</i> I (10 U)

Bei *Sma*I handelt es sich um eine Restriktionsendonuklease, welche die DNA Sequenz ...CCC↓GGG... erkennt.

Nach einer Inkubationszeit von mindestens 2h bei Zimmertemperatur wurde der Verdau durch Absaugen des Restriktionsansatzes und Zugabe von 0,5ml TE gestoppt. Die Proben konnten nun entweder bei 4°C maximal einen Tag aufbewahrt oder gleich zur Elektrophorese eingesetzt werden.

2.3.3 Elektrophorese

Um die Elektrophorese durchführen zu können musste zunächst flüssiges, 1% Agarosegel in eine Kammer gegossen werden. In dieser waren die Blöckchenfragmente, die zuvor mit dem Restriktionsansatz versehen wurden, auf einem Kamm eingebracht. Als Molekulargewichtsstandard wurden auf dem Kamm drei Blöckchen des COL- Stammes je an beiden Enden und einmal in der Mitte des Kamms eingesetzt. Der Kamm wurde nach Aushärtung des die Blöckchen umfließenden Gels entfernt und die dadurch entstehenden Taschen wurden mit einem anfangs bei Seite geschafftem flüssigen Gelrest aufgefüllt. Die Elektrophorese erfolgte in dem so präparierten Gel mit 0,5 TBE als Laufpuffer, der auf 12°C gekühlt war. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 200V mit Pulszeiten von 1s - 45s für 24h. Im Anschluss wurde das Gel in 0,5 x TBE mit 0,5g/ml Ethidiumbromid für 30min gefärbt.

2.3.4 Dokumentation und Auswertung

Die aufgetrennten DNA Fragmente im durch Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel konnten unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe einer Digitalkamera wurden die Ergebnisse dokumentiert. Zur Bearbeitung der Bilder wurde das Computer Programm „Kodak 1D LE 35“ benutzt.

Das Computer Programm „WINCAM 2.2“ diente zur Analyse der fotografierten DNA Fragmente (Bandenmuster). Dabei konnte die Größe jeder Bande mittels des Molekulargewichtsstandards COL berechnet werden.

Über ein Densitometer (fotoelektrische Messung über Lichtintensität einer Bande) wurde das DNA-Bandenmuster in Peaks umgewandelt und konnte so als Fingerprint gespeichert werden. Somit war es möglich, einen Vergleich dieser Fingerprints mit Vergleichsstämmen einer Datenbank durchzuführen.

Diese Vergleiche basieren auf dem ungewichteten Peakvergleich über den sog. Dice-Koeffizienten (s). Dieser Koeffizient wird durch Auszählung von gleichen und ungleichen Banden innerhalb einer Irrtumswahrscheinlichkeit von gleichen und ungleichen Banden nach folgender Formel gebildet:

$$S = \frac{2a}{(2a+b+c)}$$

s = Ähnlichkeit bzw. Distanz zwischen beiden Fingerprints

a = Anzahl der Banden, die in beiden Fingerprints vorliegen

b = Anzahl der Banden im ersten Fingerprint, die nicht im zweiten Fingerprint vorliegen

c = Anzahl der Banden im zweiten Fingerprint, die nicht im ersten Fingerprint vorliegen

Zur Erstellung eines Dendrogramms wurde ein Vergleich aller Fingerprints einer Datenbank vorgenommen. Die Verwandtschaft der Fingerprints wurde mit Hilfe der Formel UPGMA (unweighted pair group method arithmetic averages) errechnet. Alle Isolate, die sich zu 87% bis 100% ähnlich waren, gehörten zu einem GT. Dies entspricht Abweichungen von bis zu drei Banden. Alle Befunde wurden zusätzlich noch visuell kontrolliert.

2.3.5 Differenzierung von Varianten

Die morphologische Beschreibung der Kolonien in der Primärkultur musste vor der Typisierung durch die PFGE stattfinden. Dabei wurden die Fotografien der bereits verarbeiteten Primärkolonien zum Vergleich herangezogen, um möglichst einheitliche Abgrenzungsstufen zu erreichen. Die Beschreibung wurde nach den drei Kriterien Größe, Farbe und Hämolyseverhalten mit jeweils mehreren Unterkriterien wie folgt vorgenommen:

	<u>Größe</u>	<u>Farbe</u>	<u>Hämolysverhalten</u>	
rund	groß	weiß	keine α - Hämolysen	keine β -Hämolysen
	mittel	grau	(+)	
		gelb	+	positive
eckig	klein	weiß/gelb	++	β -Hämolysen
		grau/gelb	+++	

Teilweise waren die Unterschiede zwischen den Kolonien gering. Konnten nach erfolgter PFGE zwei oder mehr Kolonien als Varianten identifiziert werden, wurde versucht über folgendes Punktesystem die Unterschiedlichkeit der Varianten zu skalieren:

rund vs eckig	1 Punkt
mittel vs klein	1 Punkt
mittel vs groß	1 Punkt
groß vs klein	2 Punkte
weiß vs grau	3 Punkte
weiß vs gelb	3 Punkte
grau vs gelb	3 Punkte
weiß vs grau/gelb	3 Punkte
grau vs weiß/gelb	3 Punkte
weiß/gelb vs grau/gelb	2 Punkte
grau/gelb vs gelb	1 Punkt
weiß/gelb vs gelb	1 Punkt
grau/gelb vs grau	1 Punkt
weiß/gelb vs weiß	1 Punkt
pro Abstufung in der Beschreibung der α -Hämolysen	1 Punkt
keine β -Hämolysen vs positive β -Hämolysen	3 Punkte

Dieses System ist in Eigenüberlegung entstanden und basiert nicht auf einer anerkannten wissenschaftlichen Grundlage. Durch die subjektive Beschreibung

der Kriterien ist die Gefahr von Beschreibungsfehlern gegeben, die ein Vorkommen von eher mehr als weniger Varianten aufzeigen würde. Mit diesem Punktesystem soll eine Skalierung der Unterschiedlichkeit von Varianten geschaffen werden, die es erlaubt die Wahrscheinlichkeit von Beschreibungsfehlern einzuordnen. Dabei sollte die Wahrscheinlichkeit eines Fehlers mit zunehmender Punktzahl abnehmen und ab 3 Punkten so gering sein, dass man von der Existenz der Variante mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit ausgehen kann. Diese Grenze basiert auf den leicht einzusehenden Kriterien der eindeutigen Farbunterschiede und der β -Hämolyse. Bei 2 Punkten soll ein Beschreibungsfehler nicht sicher ausgeschlossen werden können und bei 1 Punkt soll ein Beschreibungsfehler in Betracht gezogen werden können.

2.4 Southern Analyse

Bei Patienten, die im Laufe der Studie in ihren Proben zwei oder mehrere ST eines *S. aureus*-Stammes aufwiesen, sollte untersucht werden, ob die Ursache der Bandenveränderungen durch Phagenmobilisation erklärt werden kann. Dazu wurde nach obigem Protokoll ein separates Gel mit allen bei den einzelnen Patienten vorkommenden ST für eine anschließende Southern Analyse angefertigt. Durch diese sollten die Gene *sak* und *h1b* nachgewiesen werden.

Dabei wurde das Gel auf einer Verpackungsfolie „Saran“ zweimal pro Seite genickt. In einem GSG-Gen-Linker wurde durch eine UV-Behandlung ein Bruch der DNA herbeigeführt. Danach wurde das Gel 15min in 0,25M HCl und anschließend für zweimal 15min in Denaturierungspuffer geschwenkt.

Als Transfer-Station wurden mehrere Blottingpapierstreifen und eine positiv geladene Nylonmembran jeweils in Gelgröße zurechtgeschnitten. Ebenfalls aus Blottingpapier wurde ein Brückenteil gefertigt. In zwei Plastikschaalen wurde

Denaturierungspuffer gefüllt. Das im Denaturierungspuffer getränkte Brückenteil wurde auf einen Plastikbehälter gelegt, der zwischen den beiden mit Puffer gefüllten Schalen stand. Dabei ragten die Enden des Brückenteils jeweils in die Pufferlösung hinein. Auf die Brücke wurden zwei in Denaturierungspuffer getränkte Blottingpapiere gelegt, auf die das Gel mit der Unterseite nach oben gelegt wurde. Darauf wurde die Nylonmembran und auf diese eine wiederum ein in Denaturierungspuffer getränktes Blottingpapier gelegt. Mittels einer Einmalpipette wurden Luftblasen verrieben. Dann wurden trockene Blottingpapiere aufgelegt und darauf ein Stapel Einmaltücher. Zum Beschweren wurde ein Katalog aufgesetzt. Nach 24h war der DNA Transfer abgeschlossen und der Turm konnte abgebaut werden. Mit einem Bleistift wurden die korrespondierenden Stellen der Geldaschen auf der Membran markiert. Gelreste auf der Membran wurden vorsichtig entfernt.

Die Membran wurde danach 5min in 1x Phosphatpuffer gewaschen, bevor die Membran auf Blottingpapier 1x pro Seite im GSG-Gen-Linker bei 125mJ mit der DNA vernetzt wurde. Danach wurde die Membran zwischen zwei Blottern getrocknet. Anschließend wurde die Membran in einem Hybridisierungssofen bei 42°C für 30min in Ultrahyb-Lösung vorhybridisiert. Für die Hybridisierung wurde eine 5ng/ml Digoxigenin-markierte Gensonde in Ultrahyb-Lösung 5min auf 100°C erhitzt und durch sofortiges Abkühlen auf Eis denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C über Nacht. Danach wurde die Membran 2x 5min bei Raumtemperatur mit 2x SSC, 0,1% SDS und 2x 15min bei 42°C mit 0,2 SSC, 0,1% SDS gewaschen.

Die Detektion erfolgte nach Vorschrift des Herstellers des Digoxigenin-Systems (Böhringer) bei Raumtemperatur mit folgenden Lösungen: Maleinsäurepuffer, Waschpuffer, Blockierungs-Stammlösung (10x konz.), Blockierungslösung, Detektionspuffer.

Die Membran wurde für 1min in Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgte für 30min eine Inkubation in Blockierungslösung. Anti-DIG-AP-Konjugat wurde auf

75mU/ml (1:10.000) in Blockierungslösung verdünnt und 30min mit der Membran inkubiert. Nach 2x 15min waschen in Waschlösung wurde für 5min im Detektionspuffer äquibriert und anschließend mit CSPD® (1:100 verdünnt in Detektionspuffer) für 5min inkubiert. Die Membran wurde in „Saran“ eingeschlagen und bei 37°C für 15min präinkubiert. Die Exposition auf Röntgenfilm erfolgte bei Raumtemperatur für 1-3h.

2.4.1 Herstellung der Digoxigenin-markierten Gensonden durch PCR

Die Herstellung der Digoxigenin-markierten Gensonden durch PCR erfolgte nach Vorschrift des Herstellers (Roche) und diente dem anschließenden Nachweis von *sak* und *h1b* mittels Southern Blot.

Für die PCR wurden folgende Primer verwendet:

	<u>upper</u>	<u>lower</u>	<u>Produkt</u>
<i>sak</i>	5' GTGCATCAAG- TTCATTCGAC 3'	5' TAAGTTGAAT- CCAGGGTTTT 3'	386 bp
<i>h1b</i>	5' GCTATCATTA- TCGAATCCAC 3'	5'AGCTTCAAAC- TTAAATGTCA 3'	674 bp

2.5 Antibiotikaresistenzbestimmung

Alle gefundenen Varianten von *S. aureus*, die gleichzeitig in einer Primärkultur auftraten, wurden selektiv für eine Antibiotikaresistenzbestimmung auf einer Schafsblutagarplatte ausgestrichen und zur Untersuchung ins mikrobiologische Institut der Universität Tübingen (verantwortlich: Dr. M. Marschal) gebracht. Die Auswertung erfolgte teilweise manuell und teilweise mit den Programmen „Vitek 2“ und „Expert“.

Die Resistenzbestimmungen betrafen folgende AB:

Ampicillin/ Sulbactam	Fusidic Acid	Quinupristin/ Dalfopristin
Benzylpenicillin	Gentamicin	Rifampicin
Ciprofloxacin	Imipenem	Teicoplanin
Clindamycin	Linezolid	Tetracycline
Erythromycin	Moxifloxacin	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole
Fosfomycin	Oxacillin	Vancomycin

2.6 In-situ-Hybridisierung und Immunfluoreszenz

2.6.1 Auftragen von Proben aus Nasen- und Rachenabstrichen auf Objektträger

Nach der Entnahme von 50µl Probe aus dem mit 400µl PBS gefüllten Plastikröhrchen zur Anzucht und Isolierung von *S. aureus* wurden die verbleibenden ca. 150µl in ein Eppendorfcup gegeben. Ca. 200µl wurden vom Wattestäbchen aufgesaugt und konnten nicht verwendet werden.

Der Eppendorfcup mit dem Rest der Probe wurde bei 10.000 rpm für 3min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde dem Bakterienpellet erneut 50µl PBS zugegeben. Nach kräftigem Vortexen wurden 10µl auf ein Objektträgerfeld aufgetragen. Nach Hitzefixation konnten die Objektträger bis zur weiteren Analyse aufbewahrt werden.

2.6.2 Auftragen von Proben aus sofort schockgefrorenen Sputen auf Objektträger

Nach Verarbeitung der Verdünnungsreihe zur Anzucht und Isolierung von *S. aureus* wurde die erste Verdünnungsstufe bei 10.000 rpm für 3min zentrifugiert. Das restliche Vorgehen entsprach dem beim Auftragen der Proben aus den NA und RA.

2.6.3 In-situ-Hybridisierung

Alle hitzefixierten Objektträger wurden zunächst in einer Alkoholreihe mit 50% - 80% - 96% Ethanollösung für je 3min fixiert. Nach Lufttrocknung wurden 10µl einer Hybridisierungslösung aufgetropft. Diese bestand aus 9µl Hybridisationslösung, 0,9µl Ampuwa und 0,1µl PNA-Oligo. Dabei wurde das PNA-Oligonukleotid vorher 10min bei 50°C erwärmt. Die PNA- Sonde dringt aufgrund verschiedener Eigenschaften, vor allem ihrer Hydrophobie, ohne Vorbehandlung in die Zellen ein und bindet selektiv an die 16S rRNA von *S. aureus*. Durch Fluoreszenzmikroskopie kann *S. aureus* somit erkennbar gemacht werden [57].

Als Hybridisierungskammer wurden 50ml-Plastikröhrchen verwendet, in die ein mit 1ml Hybridisationslösung befeuchteter Blottingpapierstreifen gelegt wurde. Die betropften Objektträger wurden über dem Papierstreifen waagrecht in das Röhrchen gelegt und bei 55°C für 90min im Dunkeln inkubiert.

Danach wurde die Hybridisierungslösung auf den Objektträgerfeldern vorsichtig abgesaugt und pro Feld 10µl Waschpuffer aufgetropft. Nach weiteren 30min bei 55°C im Dunkeln wurde sofort die Immunfluoreszenz angeschlossen.

Für die Negativkontrolle wurde zum Vergleich der Methoden die In-situ-Hybridisierung zusätzlich mittels „*S. aureus*/CNS PNA FISH“ der Firma AdvanDx durchgeführt.

2.6.4 Immunfluoreszenz

2.6.4.1 Immunfluoreszenz zur Bestimmung von Protein A

Nach erfolgter In-situ-Hybridisierung wurden im nächsten Arbeitsgang erst die Waschlösung abgesaugt, um dann 10µl Kaninchenserum in der Verdünnung

1:100 in PBS Tween auftropfen zu können. Die Objektträger wurden nun für 90min bei Raumtemperatur in eine abgedunkelte, feuchte Kammer gelegt. Danach wurden die Objektträgerfelder dreimal für 5min mit 10 μ l PBS Tween gewaschen. Da es sich bei SpA um ein IgG Bindeprotein handelt, wurden anschließend 10 μ l eines Cy3-markierten Ziege-anti-Kaninchen AK in der Verdünnung 1:1500 in PBS Tween aufgetropft. Die Objektträger wurden erneut für 40min in der feuchten Kammer gelagert. Nach erneutem, dreimaligem Waschen mit 10 μ l PBS Tween wurden pro Feld 10 μ l „DAPI“ in der Verdünnung 1:500 in PBS Tween aufgetropft. Nach einer Inkubationszeit von 5min in der feuchten Kammer wurden die Objektträgerfelder schließlich noch dreimal für 5min mit 10 μ l Aqua bidest gewaschen.

Zum Schluss wurde unter einem Deckglas ein „Fluoreszenz Mounting Medium“ auf die Felder aufgebracht. Die Objektträger wurden danach bei 4°C im Dunkeln bis zur Auswertung gelagert.

2.6.4.2 Immunfluoreszenz zur Bestimmung von Clumping Faktor A

Nach erfolgter In-situ-Hybridisierung wurden im nächsten Arbeitsgang erst die Waschlösung abgesaugt, um danach das SpA in der Probe mit humanem IgG (1mg/ml) abzusättigen. Dieses IgG war mit 1:10 in PBS Tween verdünnt. Auf jedes Objektträgerfeld wurden 10 μ l getropft. Der Objektträger wurde anschließend für 30min in einer feuchten, abgedunkelten Kammer bei Raumtemperatur gelagert. Danach wurden die Objektträgerfelder dreimal für 5min mit 10 μ l PBS Tween gewaschen. Anschließend wurden 10 μ l eines Maus-anti-ClfA AK in der Verdünnung 1:200 in PBS Tween aufgetropft. Die Objektträger wurden erneut für 60min in der feuchten Kammer gelagert. Nach erneutem, dreimaligem Waschen mit 10 μ l PBS Tween wurden pro Feld 10 μ l eines CY3-markierten Kaninchen-anti-Maus AK in der Verdünnung 1:500 in PBS Tween aufgetropft. Wiederum nach dreimaligem Waschen mit 10 μ l PBS Tween wurden pro Feld 10 μ l „DAPI“ in der Verdünnung 1:500 in PBS Tween

aufgetropft. Nach einer Inkubationszeit von 5min in der feuchten Kammer wurden die Objektträgerfelder schließlich noch dreimal für 5min mit 10µl Aqua bidest gewaschen.

Zum Schluss wurde unter einem Deckglas ein „Fluoreszenz Mounting Medium“ auf die Felder aufgebracht. Die Objektträger wurden danach bei 4°C im Dunkeln bis zur Auswertung gelagert.

2.6.5 Auswertung durch Fluoreszenzmikroskopie

Mittels Fluoreszenzmikroskop konnte die Auswertung stattfinden. Mit Hilfe einer Digitalkamera und dem Computerprogramm „AxioVision 3.1“ wurden die Ergebnisse dokumentiert. Dabei wurden für die Aufnahmen der In-situ-Hybridisierung 8s Belichtungszeit unter Verwendung eines FITC- Filters, für die Aufnahmen der Immunfluoreszenz 2s Belichtungszeit unter Verwendung eines CY3- Filters und für die Aufnahmen der Kolonien Belichtungszeiten von 0,5s bis 1s unter Verwendung eines DAPI- Filters gewählt.

2.7 Mathematisches Modell zur Berechnung der Häufigkeiten von Subtypen einzelner Genomtypen bzw. von Varianten einzelner Subtypen

Die Berechnung der Häufigkeiten von ST einzelner GT wurde in Abhängigkeit von der Anzahl der Proben, die den jeweiligen GT beinhalten unter der Annahme einer um den Wert 0 gestutzten (zero-truncated) Poisson-Verteilung durchgeführt. Die hierfür zugrunde liegende Formel beschreibt die mittlere Anzahl von ST/GT wenn n Proben/GT beobachtet wurden:

$$m_{ST/GT}(n) = \frac{(1 - (1 - p)^{n(\text{Pr oben} / GT)}) \cdot m}{1 - e^{-(1 - (1 - p)^{n(\text{Pr oben} / GT)}) \cdot m}}$$

m = mittlere Zahl der ST/GT bei unendlich vielen Proben

p = Parameter der Verteilung (Wahrscheinlichkeit, dass ein ST in einer Probe entdeckt wird.)

$n(\text{Proben/GT})$ = Anzahl der Proben pro GT

Ebenso unter der Annahme einer gestutzten Poisson-Verteilung wurden auf die gleiche Weise die Berechnung der Häufigkeiten von Varianten einzelner ST in Abhängigkeit von den Proben, die den jeweiligen ST beinhalten, durchgeführt. Die hierfür zugrunde liegende Formel beschreibt die mittlere Anzahl von Varianten/ST, wenn n Proben/ST beobachtet wurden:

$$m_{Var/ST}(n) = \frac{(1 - (1 - p)^{n(Pr\ oben / ST)}) \cdot m}{1 - e^{-(1 - (1 - p)^{n(Pr\ oben / ST)}) \cdot m}}$$

m = Zahl der Varianten/ST bei unendlich vielen Proben

p = Parameter der Verteilung (Wahrscheinlichkeit Varianten/Probe)

$n(Proben/ST)$ = Anzahl der Proben pro ST

2.8 Chemikalien, Enzyme, Materialien, Geräte, Software

Chemikalien

Agarose, low melting point	Biorad, München
Agarose, Seakem GTG	FMC, Biozym, Hess. Oldenburg
Ampuwa	Apotheke
BSA	Roche Biochemicals, Mannheim
CSPD	Roche Biochemicals, Mannheim
DAPI	Sigma, München
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Fluoreszenz Mounting Medium	Dako, Hamburg
HCl	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
NaOH	AppliChem, Darmstadt
PBS	Serva, Heidelberg
SDS	Merck, Darmstadt

Staphaurex	Murex, Burgwedel
TSB	Oxoid, Wesel
Tris	Sigma, München
Tween 80	Serva, Heidelberg
Ultrahyb-Lösung	Ambion, Austin, TX

Enzyme, Antikörper und Oligonukleotide

Anti-DIG-AP-Konjugat	Roche Biochemicals, Mannheim
Humanes IgG	Sigma, München
Kaninchen-anti-Maus AK, CY3- markiert	Dako, Hamburg
Kaninchenserum	Dako, Hamburg
Lysostaphin (Ambicin L)	Ambi, Tarrytown, NY
Monoklonaler Maus-anti-ClfA AK	Dako, Hamburg
PNA Oligo	“Flu-Staph” (Flu-OO-GCT-TCT-CGT- CCG-TTC) Fluorescein markiert
Proteinase K	Appli Chen, Darmstadt
<i>SmaI</i>	Roche Biochemicals, Mannheim
Ziege-anti-Kaninchen AK, CY3- markiert	Dako, Hamburg

Materialien

Abstrichbesteck	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CNA- Platten	Heipha, München
Gusskammern	Biorad, München
Mannitol- Kochsalzplatten	Heipha, München
Positiv geladene Nylonmembran	Roche, Mannheim
<i>S. aureus</i> / CNS PNA FISH	AdvanDx, Vedbaek, DK
Schafsblutagarplatten	Heipha, München und Nährbodenküche Mikrobiologie Tübingen
Teflonbeschichtete Objektträger	Metco, München
Verpackungsfolie „Saran“	Dow Chemical Company, Midland, MI

Geräte

Chef Drll Elektrophorese	Biorad, München
Laborzentrifuge	Sigma, München

Software

AxioVision 3.1	Zeiss, Oberkochen
WINCAM 2.2	Cybertech, Berlin

2.9 Medien, Puffer, Lösungen

Blockierungs- Stammlösung (10x konz.)	10% (wt/vol) Blockierungsreagenz in Maleinsäurepuffer
Blockierungslösung	1:10 Verdünnung der Stammlösung in Maleinsäurepuffer
Denaturierungspuffer	175,32g 3M NaCl; 16,0g 0,4M NaOH
Detektionspuffer	0,1 M Tris-HCl; 0,1M NaCl; pH 9,5
Einfriermedium	TSB und Glycerin (3:1)
Hybridisationslösung [57]	10% (wt/vol) Dextransulfat; 10nM NaCl; 30%(vol/vol) Formamid; 0,1% (wt/vol) Na-Pyrophosphat; 0,2% (wt/vol) Polyvinylpyrrolidon; 0,2% (wt/vol) Ficoll; 5mM Na ₂ -EDTA; 1% (vol/vol) Triton-X-100; 50mM Tris-HCl, pH 7,5; 500nM fluorescein-markierte PNA

	(GCTTCTCGTCCGTTC) selektiv für <i>S. aureus</i> 16S rRNA
Lysepuffer	6mM Tris-HCl; 100mM EDTA; 1 M NaCl; 0,5% Brij 58; 0,2% Na-Desoxycholat; 0,5% Laurylsarcosin; pH 7,6
Maleinsäurepuffer	0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; pH 7,5
PBS Tween	1M PBS; 0,05% Tween 80
5x Phosphatpuffer	79,25g Na ₂ HPO ₄ ; 60,25g NaH ₂ PO ₄
PNA Waschpuffer	5mM Tris, pH 10; 15mM NaCl ; 0,1% (vol/vol) Triton-X
Proteolysepuffer	46,5g EDTA; 3,8g EGTA; 5g Laurylsarcosin (auf 500ml Aqua bidest); pH 9
20x SSC	3M NaCl ; 0,3M Na-Citrat ; pH 7,0
5 x TBE für PFGE	0,05 M Tris; 0,05 M Borsäure; 0,1mM Na ₂ EDTA; pH 8,2
10 x TE	10mM Tris-HCl;

	1mM EDTA;
	pH 8,0
TSB	30g TSB für 1l
Waschlösung	10mM Tris-HCl;
	10 mM EDTA;
	10mM EGTA;
	1M NaCl;
	pH 7,5
Waschpuffer	Maleinsäurepuffer mit 0,3% (vol/vol)
	Tween 20

3 ERGEBNISSE

3.1 *Staphylococcus aureus* in Primärkulturen

Von 30 CF-Patienten mit bekanntem *S. aureus*-Befund wurden NA, RA und Sputumproben auf *S. aureus* untersucht. Dabei wurde eine quantitative Keimzahlbestimmung durchgeführt und alle Proben wurden auf Variationen der Einzelkolonien hinsichtlich Koloniemorphologie, Farbe und Hämolyse untersucht.

Von diesen 30 Patienten konnten insgesamt 194 Proben gewonnen werden. Dabei wurde von jedem Patienten mindestens ein Routinesputum (RS) verwertet. Somit wurden 194 Primärkulturen auf das Vorhandensein von *S. aureus* hin untersucht. Der Nachweis erfolgte durch eine selektive Subkultivierung und einen daran anschließendem *S. aureus* spezifischen Agglutinationstest. Es handelte sich bei 100 Proben um RS, die zuvor im Mikrobiologischen Institut der Universität Tübingen einen positiven *S. aureus*-Befund aufwiesen. Dieser konnte für 94 Proben bestätigt werden (Tab. 1). Bei 26 Proben handelte es sich um sofort schockgefrorene Sputen (SSS), bei denen in 22 Fällen (84,6%) *S. aureus* nachgewiesen werden konnte. Bei je 34 Proben handelte es sich um Nasenabstriche (NA) und Rachenabstriche (RA). Dabei konnte in 10 Fällen der NA (29,4%) und in 19 Fällen der RA (55,9%) *S. aureus* nachgewiesen werden.

Da 2 Patienten während der Studie verstarben und sich ein Patient nicht routinemäßig in der Tübinger Kinderklinik vorstellt, konnten von diesen 3 Patienten keine NA und RA gemacht werden. Daher wurde nur von 27 Patienten mindestens ein NA und RA gewonnen. Des weiteren ist es für viele Patienten nicht immer möglich Sputum zu produzieren. Daher war es nur bei 23 Patienten möglich mindestens ein SSS zu erhalten.

3.1.1 Primärkulturen von Proben, die mit Acetylcystein behandelt wurden

Zu Beginn der Studie wurden 6 RS mit zäher Konsistenz mit einer gleichen Menge an 10% Acetylcystein (AC) versetzt, um sie exakt pipettierbar zu machen. Es konnte aber nur bei 2 dieser 6 Proben *S. aureus* bei einem sehr geringen Bakterienwachstum gezeigt werden. Die anderen 4 Proben wiesen keinerlei Wachstum auf (Tab. 1). Somit konnte in diesen Proben *S. aureus* nicht nachgewiesen werden.

Als Kontrollversuch wurde eine Sputumprobe, von der reichlich Material vorhanden war, in drei Fraktionen getrennt. Die erste Fraktion wurde mit gleicher Menge 10% AC, die zweite mit gleicher Menge 2% AC versetzt. Die dritte Fraktion wurde nicht mit AC versetzt, sondern original belassen. Da beide mit AC versetzten Fraktionen keinerlei, die dritte Fraktion allerdings deutliches Bakterienwachstum in der Primärkultur zeigten, wurde künftig nicht mehr auf AC zurückgegriffen.

Tab. 1 Nachweishäufigkeit von *S. aureus* in den Primärkulturen der in der Studie verwendeten Proben (Routinesputen, sofort schockgefrorene Sputen, Nasenabstriche und Rachenabstriche) und Anzahl der *S. aureus* negativen Befunde nach Behandlung mit Acetylcystein.

Proben- material	Proben	<i>S. aureus</i> positive Kulturen (%)	Mit AC behandelte Proben	<i>S. aureus</i> negative Befunde nach AC Behandlung
RS	100	94 (94,0)	6	4
SSS	26	22 (84,6)	0	entf.
NA	34	10 (29,4)	0	entf.
RA	34	19 (55,9)	0	entf.
Gesamt	194	145 (74,7)	6	4

RS: Routinesputen
SSS: sofort schockgefrorene Sputen
NA: Nasenabstriche
RA: Rachenabstriche
AC: Acetylcystein
entf. : entfällt

Aus Tab. 1 geht hervor, dass in 6/100 RS der im mikrobiologischen Institut erhobene, positive *S. aureus* Befund nicht bestätigt werden konnte. Dies betrifft neben den 4 durch AC vorbehandelten RS auch 2 RS, die nicht mit AC versetzt wurden.

Ansonsten bleibt festzuhalten, dass die Prävalenz von *S. aureus* in den Sputumproben (84,6% der SSS) deutlich höher ist war als in den RA (55,9%). Dort gelang der Nachweis wiederum deutlich öfter als in den NA (29,4%).

3.1.2 Prävalenz von *S. aureus* in Primärkulturen verschiedener Probenarten bei Probengewinnung am gleichen Tag

Um zu sehen, ob Hinweise für eine endogene Übertragung von *S. aureus* ausgehend von den oberen Atemwegen vorliegen, wurde versucht, von jedem Patienten mindestens einmal gleichzeitig NA, RA und SSS zu gewinnen, was bei 20/30 Patienten einmal und bei 3/30 Patienten zweimal glückte. Insgesamt konnten je 34 NA und RA, sowie 26 SSS gewonnen werden. Dies liegt daran, dass die Abgabe eines SSS für einzelne Patienten nicht immer möglich ist, was hier bei 7 Patienten zutraf. Daher wurde versucht, von diesen 7 Patienten an einem zweiten Termin erneut Proben zu nehmen. Dabei konnten bei 3/7 Patienten am zweiten Termin alle drei Probenarten gesichert werden. Bei 1/7 Patienten konnte an beiden Terminen jeweils nur NA und RA abgenommen werden. Bei 3/7 Patienten konnte kein zweiter Termin gefunden werden, sodass hier lediglich einmal NA und RA vorliegen.

Auffällig war, dass in 9/10 *S. aureus* positiven NA-Befunden ein positiver RA-Befund und in 6/6 Fällen *S. aureus* positiver NA-Befunde ein positiver SSS-Befund vorlag (Abb. 1). Ferner gab es 9 Fälle mit negativem NA-Befund und gleichzeitig positivem Befund in RA und SSS. In 7 Fällen waren die Befunde der NA und RA negativ aber der SSS- Befund positiv. In 1 Fall konnte *S. aureus* nur im RA und nicht in NA und SSS nachgewiesen werden. In 4 Fällen waren bei

fehlendem SSS die Befunde NA und RA negativ und in 3 Fällen konnte in keiner Probe *S. aureus* nachgewiesen werden.

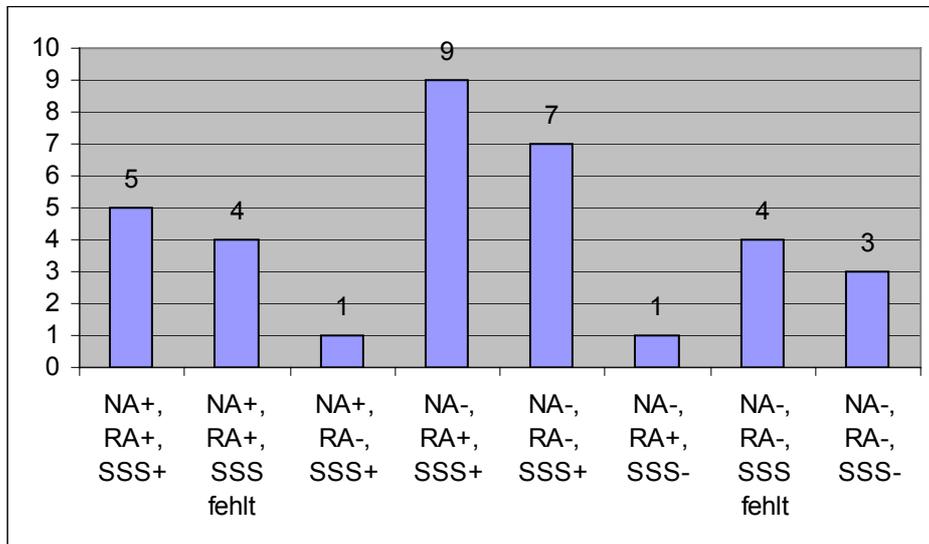


Abb. 1: Häufigkeiten der Befundkombinationen von *S. aureus* in Nasenabstrichen (NA), Rachenabstrichen (RA) und sofort schockgefrorenen Sputen (SSS) der einzelnen Patienten bei Probengewinnung am gleichen Tag.

Es lässt sich feststellen, dass ein Nachweis von *S. aureus* in der Nase zu 90 % (9/10) prädiktiv für eine Besiedlung des Rachens und zu 100 % (10/10) prädiktiv für ein positiven Sputumbefund war. Ebenso kann festgehalten werden, dass ein Nachweis von *S. aureus* im Rachen zu 93 % (14/15) prädiktiv für einen positiven Sputumbefund war. Umgekehrt zeigt sich allerdings, dass nur 6/23 positiven Sputumbefunden (26%) auch einen positiven Befund im NA und nur 14/23 (61%) auch einen positiven Befund im RA aufwiesen.

3.2 Morphologie von Primärkulturen

Alle Primärkulturen wurden auf Schafsblutagarplatten 48h angezchtet, um eine optische Inspektion der herangewachsenen Kolonien durchzuführen. Anschließend wurde zunächst untersucht, ob sich die Kolonien in Größe, Farbe und Hämolyseverhalten allesamt glichen (homogenes Bild) oder ob sich Unterschiede zeigten (heterogenes Bild) (vgl. Abb. 2).

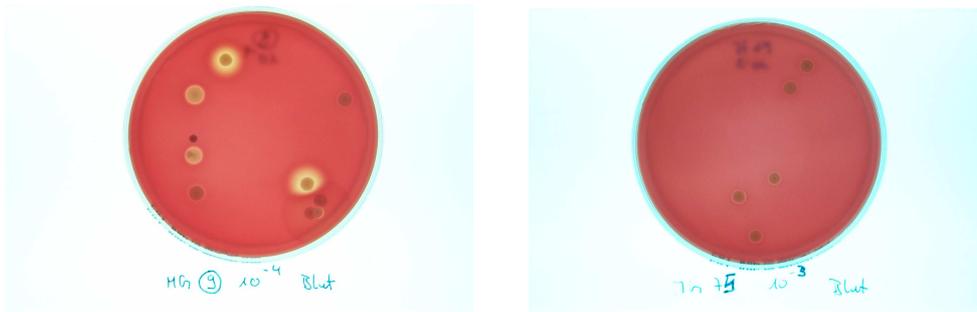


Abb. 2: Beispiel eines heterogenen (links) und eines homogenen Bildes (rechts) einer Primärkultur.

Es ergab sich, dass in 63/145 *S. aureus* positiven Proben (43,4%) in der Primärkultur ein homogenes Bild verzeichnet werden konnte. Dagegen zeigten 82/145 *S. aureus* positiven Proben (56,6%) in der Primärkultur ein heterogenes Bild.

3.2.1 Häufigkeit von homogenen und heterogenen Bildern der Primärkulturen verschiedener Probenarten

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit bestand darin, das Auftreten von homogenen und heterogenen Bildern der Primärkulturen der einzelnen Probenarten zu quantifizieren und herauszufinden, ob heterogene Bilder bei einer Probenart signifikant häufiger auftraten als bei einer anderen Probenart. Dabei war hauptsächlich der Vergleich zwischen den Proben der oberen Luftwege (NA und RA) einerseits und den Sputumproben (RS und SSS) andererseits von Interesse. Für diese Vergleiche wurden deshalb die Proben RS und SSS als „Sputum“ zusammengefasst.

Heterogene Bilder der Primärkultur traten bei „Sputum“ (67,8%) zwar häufiger auf als bei NA (40,0%), dies ist aufgrund der Anzahl der Beobachtungen nach Fisher's Exact Test ($p=0,0913$) allerdings nicht signifikant (Tab. 2).

Tab. 2 Häufigkeiten von heterogenen Bildern der Primärkulturen bei NA und „Sputum“

Heterogenes Bild der Primärkultur	NA	Sputum
ja	4 (40,0%)	78 (67,8%)
nein	6 (60,0%)	37 (32,2%)

NA: Nasenabstriche

Dagegen traten heterogene Bilder der Primärkultur bei „Sputum“ (67,8%) signifikant häufiger auf als bei RA (10,5%). Dies ergibt sich aufgrund der Anzahl der Beobachtungen nach Fisher's Exact Test ($p < 0,0001$) (Tab. 3).

Tab. 3 Häufigkeiten von heterogenen Bildern der Primärkulturen bei RA und „Sputum“

Heterogenes Bild der Primärkultur	RA	Sputum
ja	2 (10,5%)	78 (67,8%)
nein	17 (89,5%)	37 (32,2%)

RA: Rachenabstriche

3.2.2 Abhängigkeit des Bildes der Primärkultur von der Bakterienkonzentration

Untersucht wurde, ob bei Vorliegen eines heterogenen oder homogenen Bildes in der Primärkultur eine Abhängigkeit von der Bakterienkonzentration in der Probe festzustellen war. Dafür wurden die Probenarten NA und RA einzeln ausgewertet und die Probenarten RS und SSS als „Sputum“ zusammengefasst.

Die Primärkulturen von 4 NA zeigten heterogene Bilder. Dabei waren in den zugehörigen Proben Bakterienkonzentrationen zwischen $5,9 \times 10^3$ KBE/ml und $8,0 \times 10^4$ KBE/ml bei durchschnittlich $3,2 \times 10^4$ KBE/ml zu verzeichnen. Von 6 NA zeigten sich in den Primärkulturen homogene Bilder. Dabei waren in den zugehörigen Proben Bakterienkonzentrationen zwischen $1,0 \times 10^2$ KBE/ml und $4,2 \times 10^3$ KBE/ml bei durchschnittlich $1,7 \times 10^3$ KBE/ml festzustellen.

Die Primärkulturen von 2 RA zeigten heterogene Bilder. Dabei waren in den zugehörigen Proben Bakterienkonzentrationen von $6,0 \times 10^3$ KBE/ml und $1,1 \times 10^6$ KBE/ml zu verzeichnen. Dagegen zeigten sich von 17 RA in den Primärkulturen homogene Bilder. Dabei waren in den zugehörigen Proben Bakterienkonzentrationen zwischen $2,0 \times 10^3$ KBE/ml und $2,2 \times 10^6$ KBE/ml bei durchschnittlich $3,1 \times 10^5$ KBE/ml festzustellen.

Die Primärkulturen von 78 Sputen zeigten heterogene Bilder. Dabei waren in den zugehörigen Proben Bakterienkonzentrationen zwischen $5,2 \times 10^3$ KBE/ml und $7,4 \times 10^8$ KBE/ml bei durchschnittlich $3,9 \times 10^7$ KBE/ml zu verzeichnen. Von 37 Sputen zeigten sich in den Primärkulturen homogene Bilder. Dabei waren in den zugehörigen Proben Bakterienkonzentrationen zwischen $1,0 \times 10^2$ KBE/ml und $6,7 \times 10^7$ KBE/ml bei durchschnittlich $4,4 \times 10^6$ KBE/ml festzustellen.

Aus den obigen Daten ergibt sich, dass für NA und RA keine Bakterienkonzentration festgestellt werden kann, ab der von einer erhöhten Wahrscheinlichkeit gesprochen werden kann, ein homogenes oder heterogenes Bild der Primärkultur zu erwarten.

Für „Sputum“ ergab sich, dass in den Primärkulturen homogene Bilder (n=37) in 54,1% der Fälle bei einer Bakterienkonzentration von über 10^5 KBE/ml und heterogene Bilder (n=78) in 83,3% der Fälle bei einer Bakterienkonzentration von über 10^5 KBE/ml auftraten (Tab. 4). Daraus folgt, dass eine Bakterienkonzentration von mindestens 10^5 KBE/ml in der Probenart „Sputum“ die Häufigkeit des Vorkommens eines heterogenen Bildes der Primärkultur von 16,7% auf 83,3% erhöht. Dies ist aufgrund der Anzahl der Beobachtungen nach Fisher's Exact Test ($p=0,0014$) signifikant.

Tab. 4 Vorkommen eines heterogenen Bildes der Primärkultur in RS und SSS („Sputum“) abhängig von der Bakterienkonzentration in der Probe.

Probenart	$\geq 10^5$ KBE/ml	Homogenes Bild	Heterogenes Bild
		der Primärkultur	der Primärkultur
Sputum	ja	20 (54,1%)	65 (83,3%)
Sputum	nein	17 (45,9%)	13 (16,7%)

RS: Routinesputum

SSS: sofort schockgefrorenes Sputum

KBE: Kolonie bildende Einheiten

3.2.3 Konstanz der Bilder der Primärkulturen in aufeinander folgenden Proben

Die Frage, ob sich die Bilder der Primärkulturen der einzelnen Patienten in zeitlich aufeinander folgenden Proben gleichen, sollte im Hinblick auf das Vorliegen homogener oder heterogener Bilder geklärt werden.

Aufeinander folgende Proben konnten von 24 Patienten gewonnen werden. Dabei wurden minimal 2 und maximal 12 Proben gewonnen. Der zeitliche Abstand der Proben betrug minimal 13 Tage und maximal 15 Monate.

Bei 3 Patienten (Patienten 4, 8 und 27) konnte immer ein homogenes und bei 5 Patienten (Patienten 1, 5, 9, 12 und 26) immer ein heterogenes Bild verzeichnet werden (Tab. 5). Bei den Patienten 4 und 8 konnte in allen Proben ein identisches Bild gefunden werden. Bei allen anderen Patienten kamen mindestens zwei unterschiedliche Bilder vor. Tabelle 5 zeigt beispielsweise, dass bei Patient 1 in vier Proben nur heterogene Bilder entdeckt werden konnten, die alle verschieden waren. Weiterhin ist aus Tabelle 5 ersichtlich, dass bei Patient 11 in vier RS jeweils zwei homogene und zwei heterogene Bilder vorlagen. Dabei glichen sich die homogenen Bilder und unterschieden sich die heterogenen.

Tab. 5 Anzahl der homogenen und heterogenen Bilder in den Primärkulturen der RS aller Patienten, sowie die Anzahl der jeweils unterschiedlichen Bilder.

Patient	Anzahl RS	Homogene Primärkulturen (Anzahl verschiedener Bilder)	Heterogene Primärkulturen (Anzahl verschiedener Bilder)
1	4	0	4 (4)
2	3	1	2 (1)
4	2	2 (1)	0
5	4	0	4 (4)
6	3	2 (2)	1
7	2	1	1
8	2	2 (1)	0
9	7	0	7 (6)
10	4	2 (1)	2 (2)
11	4	2 (1)	2 (2)
12	2	0	2 (2)
13	12	1	11 (11)
14	2	1	1
16	3	1	2 (2)
20	7	6 (4)	1
21	2	1	1
23	2	1	1
25	3	2 (1)	1
26	3	0	3 (3)
27	2	2 (2)	0
28	4	1	3 (3)
30	8	3 (2)	5 (5)

RS: Routinesputum

Es konnte nur von 1 Patient zwei *S. aureus* positive NA gewonnen werden. In beiden Fällen ergaben sich heterogene Bilder in der Primärkultur, die sich nicht entsprachen.

Von 4 Patienten konnten zwei *S. aureus* positive RA gewonnen werden. Dabei fanden sich bei 3 Patienten immer homogene Bilder in der Primärkultur, die

allerdings in keinem Fall identisch waren, und bei 1 Patient zunächst ein heterogenes und dann ein homogenes Bild.

Von 2 Patienten konnten zwei *S. aureus* positive SSS gewonnen werden. Dabei fanden sich bei beiden Patienten immer heterogene Bilder in der Primärkultur, die sich aber in beiden Fällen nicht entsprachen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bei 16/24 Patienten sowohl homogene als auch heterogene Bilder in den Primärkulturen auftraten. Bei 8/24 Patienten kamen entweder nur homogene oder nur heterogene Bilder vor. Bei 2/24 Patienten waren die Bilder der Primärkulturen immer gleich, sodass insgesamt eine zeitliche Konstanz des Bildes der *S. aureus* Population in der Primärkultur nicht häufig erscheint.

3.3 Bearbeitung der Primärkulturen und Isolattypisierung

Bei vorliegendem homogenen Bild wurde davon ausgegangen, dass alle gewachsenen Kolonien von einem identischen Klon stammen. Daher wurde immer nur ein Isolat weiter untersucht. Entsprechend galten alle morphologisch gleichen Kolonien der heterogenen Primärkulturen ebenfalls als von einem identischen Klon herrührend. Dies hatte für die weiteren Untersuchungen zur Folge, dass die Anzahl der Isolate der heterogenen Primärkulturen der Anzahl der morphologisch verschiedenen Kolonien entsprach (vgl. Abb. 3).

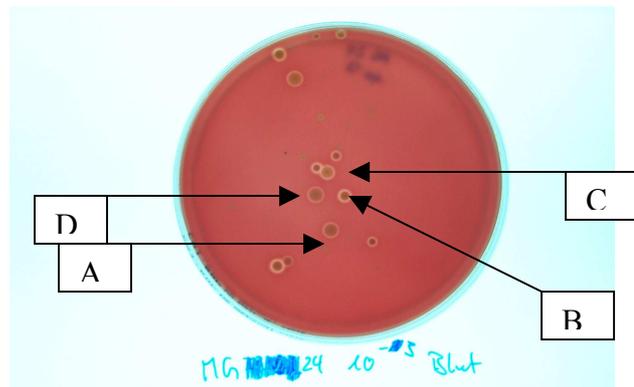


Abb. 3 Beispiel eines heterogenen Bildes einer Primärkultur. Kolonie A wurde mit „rund/ groß; gelb; ,+‘ keine β -Hämolyse“, Kolonie B mit „rund/ groß; grau/ gelb; ,++‘ keine β -Hämolyse“ und Kolonie C mit „rund/ groß; gelb; ,++‘ keine β -Hämolyse“ beschrieben. Kolonie D entspricht morphologisch exakt Kolonie A und galt somit als zu A identisch.

Alle Isolate, die sich im anschließenden *S. aureus* spezifischen Agglutinationstest als *S. aureus* erwiesen hatten, wurden mit Hilfe der PFGE typisiert (Abb. 4). Dann wurde nach Fertigung eines Dendrogramms ein Vergleich aller Fingerprints mit einer Datenbank vorgenommen. Daraus ergab sich für jedes Isolat der entsprechende Genomtyp (GT). Isolate, die mit bis zu drei Banden vom Referenzstamm der Datenbank abwichen, wurden als Subtypen (ST) des jeweiligen GT eingestuft. Ergab sich bei zwei morphologisch unterschiedlichen Kolonien ein identisches Bandenmuster, wurden diese als phänotypische Varianten eingestuft. Abb. 4 zeigt ein Beispiel für eine Auftrennung von DNA-Fragmente mittels PFGE. Die Bandensequenzen der in Abb. 3 gezeigten Kolonien sind markiert. Man erkennt, dass es sich bei A und B um ein identisches Bandenmuster, also um phänotypische Varianten handelt. Dagegen weicht das Bandenmuster von C in mehr als drei Banden vom Muster von A bzw. B ab. Daher handelt es sich bei C um einen von A und B verschiedenen *S. aureus*- Stamm (anderer GT).

A B C

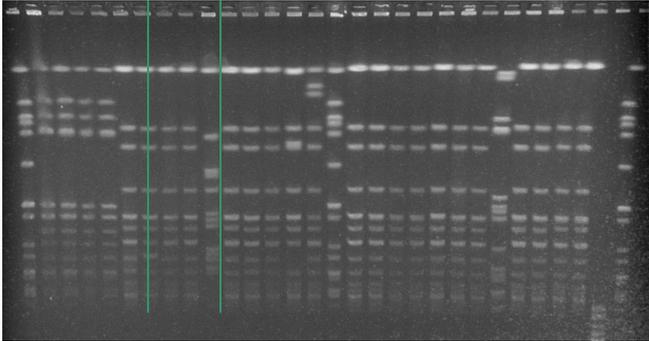


Abb. 4 Auftrennung der DNA-Fragmente mittels PFGE der in Abb. 3 als A, B und C markierten Kolonien.

3.3.1 Isolierte Genomtypen und ihre Differenzierung in Subtypen und Varianten

3.3.1.1 Häufigkeit einzelner Genomtypen

Von Interesse war, wie viele verschiedene GT von *S. aureus* innerhalb des Patientenkollektives zu finden sind und wie häufig die einzelnen GT auftreten. Dabei sollte untersucht werden, ob einzelne GT stets bei den gleichen Patienten zu finden sind.

Es konnte insgesamt das Auftreten von 20 verschiedenen GT über alle 30 Patienten verstreut verzeichnet werden (vgl. Anhang Tab. A1a, A1b). Dabei traten 14 GT nur bei einem einzelnen Patienten auf. 6 GT (GT 2, 7, 31, 36, 54, 109) waren dagegen bei mindestens 2 verschiedenen Patienten zu finden. Am häufigsten war dabei GT 2 vertreten, der bei 8 verschiedenen Patienten (Patienten 1, 8, 10, 11, 12, 14, 26, 29) festgestellt werden konnte.

Bei den meisten Patienten konnte ein ständig wiederkehrendes Auftreten eines bestimmten GT beobachtet werden. Beispielsweise trat bei Patient 1 in einem Zeitraum von 5 Monaten GT 19 in 8 *S. aureus* positiven Proben (4x RS, 1x SSS, 1x NA, 2x RA) auf (Abb. 5; (vgl. auch Anhang Tab. A1a, A1b)). Ein simultanes Auftreten von zwei oder mehr GT kam zwar vor, konnte in den meisten Fällen aber nicht über einen längeren Zeitraum bestätigt werden. Wie

aus Tab. 6 ersichtlich ist, wurde z.B. bei Patient 1, bei dem GT 19 immer gezeigt werden konnte, GT 2 nur in einer Probe gefunden. Dadurch wird deutlich, dass meist ein bestimmter GT bei einem Patienten vorherrscht.

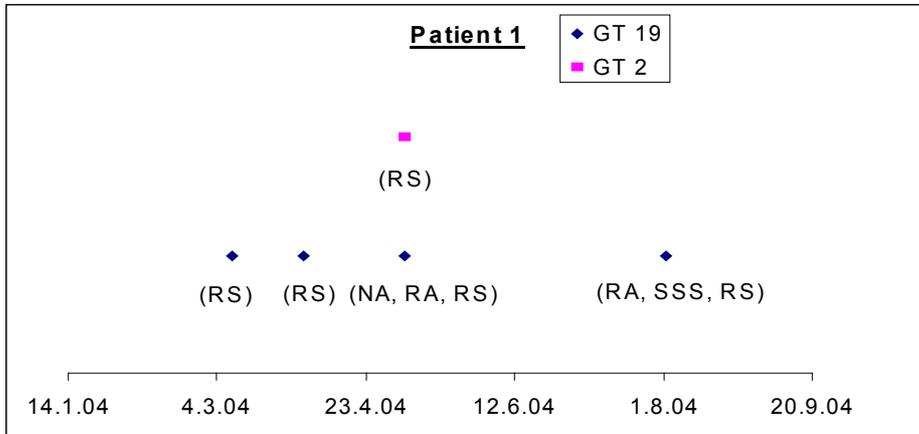


Abb. 5 Vorkommen verschiedener Genomtypen (GT) in allen Probenarten bei Patient 1 zu vier Entnahmedaten.

Interessant ist in diesem Zusammenhang Patient 30, von dem 10 verschiedene Proben gewonnen werden konnten. In einem Zeitraum von ca. einem Jahr wurde hier immer wieder ein sonst unübliches, simultanes Auftreten von zwei GT (GT 7 und GT 89) festgestellt (Abb. 6; (vgl. auch Anhang Tab. A1a, A1b)).

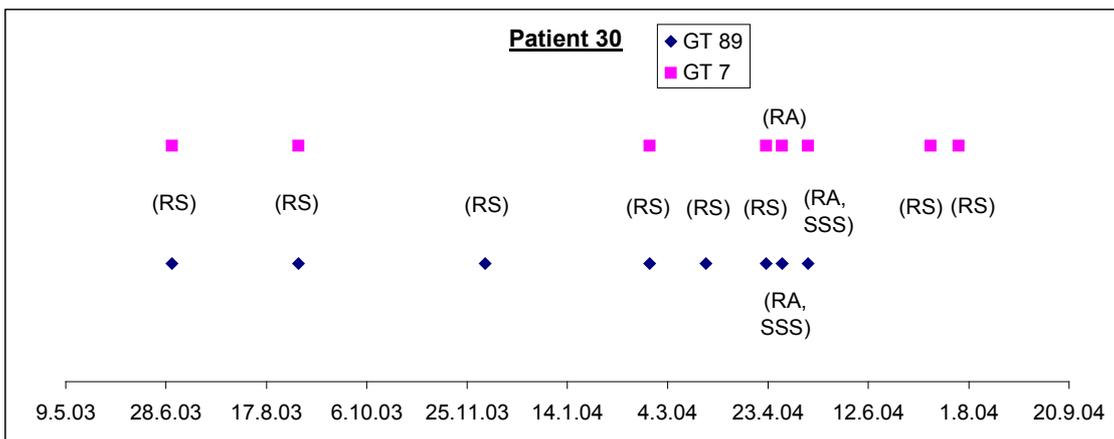


Abb. 6 Vorkommen verschiedener Genomtypen (GT) in allen Probenarten bei Patient 30 zu zehn Entnahmedaten.

3.3.1.2 Häufigkeit von Subtypen einzelner Genomtypen

Zunächst wurden alle innerhalb der Studie gefundenen ST einzelner GT durch eine Nummerierung eindeutig klassifiziert. Dann sollte herausgefunden werden, inwiefern die Anzahl der gefundenen ST einzelner GT in einem Zusammenhang mit der Anzahl der Proben, die diesen GT beinhalten, steht. Beispielsweise konnten von GT 2, der in 28 Proben entdeckt wurde, 5 ST gezählt werden (Tab. 6). Nun war von Interesse, ob die Anzahl der ST begrenzt oder unbegrenzt ist.

Aus den vorliegenden Daten (Tab. 6) konnte errechnet werden, dass die Anzahl der ST eines GT mit der Anzahl der gefundenen Proben, die diesen GT beinhalten, ansteigt. Aufgrund der kleinen Menge an Proben lässt sich allerdings nicht mit Sicherheit sagen, ob ein beschränktes Wachstum oder eine lineare Beziehung vorliegt. Das zugrunde liegende mathematische Modell zeigt für die vorliegende Menge an Proben ein beschränktes Wachstum mit einem mittleren Grenzwert von 10,8 ST pro GT an (Abb. 7). Allerdings lässt sich für bis zu 30 Proben diese Beziehung auch durch eine lineare Funktion beschreiben, die je 5,6 weiteren Proben einen zusätzlichen ST zuordnet.

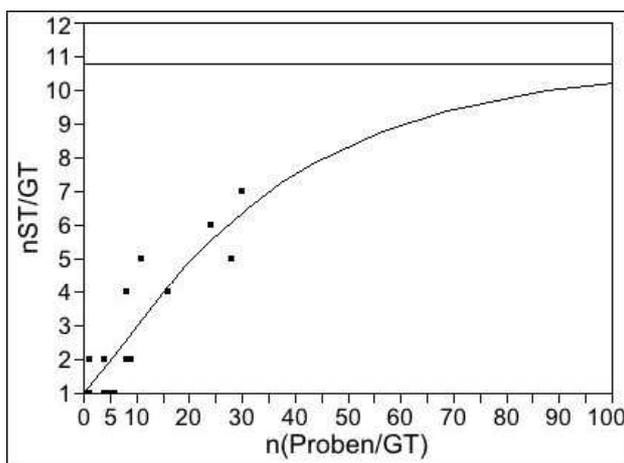


Abb. 7: Anzahl der ST pro GT in Abhängigkeit von der Anzahl der Proben, die den jeweiligen GT beinhalten.

Tab. 6 Anzahl der gefundenen ST der einzelnen GT in Abhängigkeit von der Anzahl der Proben, die den jeweiligen GT beinhalten.

GT	Anzahl Proben	Anzahl ST
2	28	5
7	24	6
16	4	2
17	16	4
19	8	4
31	30	7
36	11	5
54	6	1
89	8	2
108	5	1
109	9	2
165	1	2
166	1	1
169	1	1
170	1	2
171	1	2
172	1	1
173	1	2
174	5	1
175	4	1

GT: Genomtyp
ST: Subtypen

3.3.1.3 Häufigkeit von Varianten einzelner Subtypen

Zunächst wurden auch hier alle innerhalb der Studie gefundenen Varianten einzelner ST durch ihre morphologische Beschreibung eindeutig voneinander abgegrenzt. Somit konnten auch sie innerhalb der Studie eindeutig nummeriert werden. Dann sollte wiederum herausgefunden werden, inwiefern die Anzahl der gefundenen Varianten einzelner ST in einem Zusammenhang mit der Anzahl der Proben, die diesen ST beinhalten, steht. Beispielsweise konnten von

ST 1 des GT 2, der in 24 Proben entdeckt wurde, 13 Varianten gezählt werden (Tab. 7). Nun war wiederum von Interesse, ob die Anzahl der Varianten begrenzt oder unbegrenzt ist.

Aus den vorliegenden Daten (Tab. 7) konnte errechnet werden, dass die Anzahl der Varianten eines ST mit der Anzahl der gefundenen Proben, die diesen ST beinhalten, ansteigt. Aufgrund der kleinen Menge an Proben lässt sich allerdings auch hier nicht mit Sicherheit sagen, ob ein beschränktes Wachstum oder eine lineare Beziehung vorliegt. Das zugrunde liegende mathematische Modell zeigt für die vorliegende Menge an Proben ein beschränktes Wachstum mit einem mittleren Grenzwert von 46,7 Varianten pro ST an (Abb. 8). Allerdings lässt sich für bis zu zehn Proben diese Beziehung auch durch eine lineare Funktion beschreiben, die je drei weiteren Proben zwei zusätzliche Varianten zuordnet.

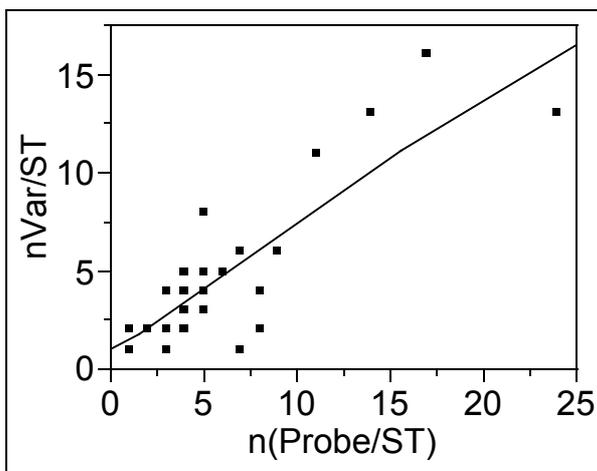


Abb. 8: Anzahl der Varianten der einzelnen ST in Abhängigkeit von der Anzahl der Proben, die den jeweiligen ST beinhalten.

Tab. 7 Anzahl der beschriebenen Varianten der einzelnen ST in Abhängigkeit von der Anzahl der Proben, die den jeweiligen ST beinhalten.

GT	ST-Nummer	Anzahl Proben	Anzahl Varianten
2	1	24	13
	2	1	1
	3	1	1

	4	1	1
	5	4	4
7	1	1	1
	2	2	2
	3	1	1
	4	17	16
	5	3	1
	6	1	1
16	1	4	2
	2	1	1
17	1	14	13
	2	7	6
	3	1	1
	4	5	5
19	1	4	5
	2	1	1
	3	1	1
	4	3	4
31	1	5	8
	2	1	1
	3	8	2
	4	11	11
	5	9	6
	6	3	2
	7	1	2
36	1	5	4
	2	1	1
	3	1	1
	4	4	3
	5	1	1
54	1	6	5
89	1	7	1
	2	1	1
108	1	5	3
109	1	8	4

	2	1	1
165	1	1	1
	2	1	1
166	1	1	1
169	1	1	2
170	1	1	1
	2	1	1
171	1	1	1
	2	1	1
172	1	1	1
173	1	1	1
	2	1	1
174	1	5	3
175	1	4	2

GT: Genomtyp
ST: Subtyp

Die bei Patient 30 zumeist gleichzeitig beobachteten GT 89 und 7 zeigten interessante Erscheinungsformen. Es fiel auf, dass GT 89 stets morphologisch identisch auftrat, also keinerlei Variantenreichtum zeigte. In allen Proben wurde dabei auch bis auf eine Ausnahme (ST 89;2) immer der gleiche ST (89;1) gefunden. Dagegen verhielt sich GT 7 anders. Es trat hier ausschließlich ein einzelner ST (ST 7;4) auf, und dieser war mit zehn verschiedenen Varianten allein bei Patient 30 der ST mit der größten morphologischen Vielfalt überhaupt.

Ebenfalls bemerkenswerte Ergebnisse zeigten sich bei Patient 9. In einem Zeitraum von über einem Jahr wurden in sieben von elf Proben gleichzeitig zwei ST des GT 31 (ST 31;3 und ST 31;4) gefunden. Dabei zeigte sich ST 31;4 mit acht verschiedenen Varianten sehr wandlungsfähig, während ST 31;3 bis auf eine Ausnahme morphologisch immer gleich beschrieben wurde.

3.4 Simultanes Auftreten von verschiedenen Genomtypen, Subtypen und Varianten in den einzelnen Probenarten

Die heterogenen Primärkulturen sollten genauer untersucht werden. Insbesondere sollte herausgefunden werden, ob das heterogene Bild überwiegend aus Co-Kolonisationen verschiedener GT, oder aus dem parallelen Vorkommen unterschiedlicher ST bzw. Varianten eines GT entstand.

Es konnte in allen vier Probenarten (RS, SSS, NA, RA) ein simultanes Vorkommen von Varianten des gleichen ST registriert werden. Ein gleichzeitiges Auftreten verschiedener ST eines GT konnte nur in den Probenarten RS und SSS nachgewiesen werden (Tab. 8). Eine Co-Kolonisation von 2 verschiedenen GT konnte in jeder Probenart mindestens einmal gezählt werden.

Nur in RS und SSS konnten gleichzeitig sowohl verschiedene GT, als auch ST dieser GT und sogar Varianten dieser ST festgestellt werden. Ebenso konnten nur in RS und SSS gleichzeitig sowohl ST eines GT als auch Varianten des ST nachgewiesen werden.

Tab. 8 Auftreten von verschiedenen GT, ST und Varianten, sowie einzelnen GT in allen *S. aureus* positiven Proben aller vier Probenarten (RS, SSS, NA, RA).

Proben- material	Anzahl S. aureus positiver Proben	<i>Heterogenes Bild in der Primärkultur</i>			<i>Homogenes Bild in der Primärkultur</i>
		2 verschiedene GT	2 oder mehr ST des gleichen GT	2 oder mehr Varianten eines ST	Einzelner GT
RS	94	13	23	41	31
SSS	22	6	6	8	7
NA	10	1	0	3	6
RA	19	1	0	1	17
Gesamt	145		82		63

RS: Routinesputen
 SSS: sofort schockgefrorene Sputen
 NA: Nasenabstriche
 RA: Rachenabstriche
 GT: Genomtyp/-en
 ST: Subtypen

Somit ergibt sich, dass die heterogenen Bilder der NA und RA, sofern nicht durch Co-Kolonisation verschiedener GT verursacht, durch Varianten bedingt sind. Bei den RS und SSS kann die Ursache eines heterogenen Bildes der Primärkultur sowohl in einer Co-Kolonisation mit verschiedenen GT, wie auch in ST oder Varianten begründet liegen.

3.4.1 Häufigkeit von Subtypen in den einzelnen Probenarten

Untersucht wurde, ob die Häufigkeit des simultanen Vorkommens von zwei ST eines GT in einer Probenart signifikant häufiger vorkam als in einer anderen Probenart (die Probenarten RS und SSS wurden als eine Einheit „Sputum“ zusammengefasst). Ein ST wurde immer dann gezählt, wenn der übergeordnete GT dieses ST nicht noch mit einem anderen ST in der Probe vertreten war (Tab. 9). Kamen in einer Probe mehrere GT vor, so ging diese Probe in die Berechnung so oft ein, wie viel verschiedene GT darin enthalten waren. (Beispiel: Probe 26n von Patient 14 enthielt neben dem GT 36 auch GT 7. Beide GT waren mit 1 ST darin vertreten. Daher wurde Probe 26n zweimal für „1 ST eines GT“ beim Probenmaterial NA gewertet.)

Tab. 9 Häufigkeit der Anzahl von ST in den einzelnen Probenarten (Sputen, NA, RA) und Größe der Konfidenzintervalle für die Anzahl an ST pro Probe der einzelnen Probenarten.

Probenmaterial	Anzahl ST eines GT			Gesamt	m	KI
	1	2	3			
Sputum	105	28	1	134	1,22	1,15 – 1,31
NA	11	0	0	11	1,00	1,00 – 1,34
RA	20	0	0	20	1,00	1,00 – 1,18

NA: Nasenabstriche

RA: Rachenabstriche
GT: Genomtyp
ST: Subtyp
m: Mittelwert
KI: Konfidenzintervall

Unter der Annahme einer Poisson-Verteilung kam das simultane Vorkommen von zwei oder mehr ST in der Probenart „Sputum“ im Vergleich zur Probenart RA signifikant häufiger vor. Für die Anzahl an ST pro Probe der einzelnen Probenarten ergaben sich folgende 95%- Konfidenzintervalle: NA: 1,00 – 1,34; RA: 1,00 – 1,18; Sputum: 1,15 – 1,31. Als Mittelwerte ergaben sich $m(\text{NA,ST}) = 1,00$; $m(\text{RA,ST}) = 1,00$; $m(\text{Sputum,ST}) = 1,22$. Da der Mittelwert für Sputum oberhalb des 95%- Konfidenzintervalles für RA, und der Mittelwert für RA unterhalb des 95%- Konfidenzintervalles für Sputum liegt, kann hier von einem signifikant häufigeren Vorkommen von ST im Sputum im Vergleich zu RA gesprochen werden. Für die Probenart NA ergab sich im Vergleich zu den anderen beiden Probenarten keine Signifikanz.

Ein gleichzeitiges Vorkommen von zwei oder mehr ST eines GT konnte bei 10/30 Patienten (33,3%) in mindestens einer Probe festgestellt werden. Ferner konnte ein nicht simultanes Vorkommen verschiedener ST eines GT, also ein Vorkommen in unterschiedlichen Proben, bei 4/30 Patienten beobachtet werden.

3.4.2 Häufigkeit von Varianten in den einzelnen Probenarten

Untersucht wurde, ob die Häufigkeit des simultanen Vorkommens von zwei oder mehr Varianten eines ST in einer Probenart signifikant häufiger vorkam als in einer anderen Probenart (die Probenarten RS und SSS wurden als eine Einheit „Sputum“ zusammengefasst). Eine Variante wurde immer dann gezählt, wenn der übergeordnete ST dieser Variante nicht noch mit einer anderen Variante in der Probe vertreten war (Tab. 10). Kamen in einer Probe mehrere ST vor, so ging diese Probe in die Berechnung so oft ein, wie viel verschiedene ST darin enthalten waren. (Beispiel: Probe 51 von Patient 13 enthielt neben

dem ST 17;1 auch ST 17;4. Dabei war ST 17;1 mit 2 Varianten und ST 17;4 mit 1 Variante vertreten. Daher wurde Probe 51 einmal für „1 Variante eines ST“ und einmal für „2 Varianten eines ST“ beim Probenmaterial Sputum gewertet.)

Tab. 10 Häufigkeit der Anzahl von Varianten in den einzelnen Probenarten (Sputen, NA, RA).

Proben- material	Anzahl Varianten eines ST					Gesamt	m	KI
	1	2	3	4	5			
Sputum	115	36	9	3	1	164	1,41	1,32 - 1,51
NA	8	3	0	0	0	11	1,27	1,00 - 1,71
RA	19	1	0	0	0	20	1,05	1,00 - 1,22

NA: Nasenabstriche
 RA: Rachenabstriche
 ST: Subtyp
 m: Mittelwert
 KI: Konfidenzintervall

Unter der Annahme einer Poisson-Verteilung trat das simultane Vorkommen von zwei oder mehr Varianten in der Probenart „Sputum“ (die Probenarten RS und SSS wurden als eine Einheit „Sputum“ zusammengefasst) im Vergleich zur Probenart RA signifikant häufiger auf. Für die Anzahl an Varianten pro Probe der einzelnen Probenarten ergaben sich folgende 95%- Konfidenzintervalle: NA: 1,00 – 1,71; RA: 1,00 – 1,22; Sputum: 1,32 – 1,51. Als Mittelwerte ergaben sich $m(\text{NA,Var}) = 1,27$; $m(\text{RA,Var}) = 1,05$; $m(\text{Sputum,Var}) = 1,41$. Da der Mittelwert für Sputum oberhalb des 95%- Konfidenzintervalles für RA und der Mittelwert für RA unterhalb des 95%- Konfidenzintervalles für Sputum liegt, kann hier von einem signifikant häufigeren Vorkommen von Varianten im Sputum im Vergleich zu RA gesprochen werden. Für die Probenart NA ergab sich im Vergleich zu den anderen beiden Probenarten keine Signifikanz.

Bei 20/30 Patienten (66,7%) konnte in mindestens einer Probe das simultane Vorkommen von Varianten festgestellt werden. Ferner konnte ein nicht simultanes Vorkommen verschiedener Varianten eines ST, also ein

Vorkommen in unterschiedlichen Proben, bei 4/30 Patienten beobachtet werden.

Auffallend ist daneben noch, dass in allen Fällen mit Varianten in den NA und RA nur jeweils 2, in „Sputum“ aber bis zu 5 Varianten gezählt werden konnten (Tab. 10).

3.4.2.1 Abstufung von Varianten einer Primärkultur nach Punktesystem

Mittels des selbst entworfenen Punktesystems soll eine Abstufung der Variantenausprägung beschrieben werden. Der Vergleich von zwei unterschiedlichen Kolonien einer heterogenen Primärkultur durch das System soll helfen, eventuelle Beschreibungsfehler, die mehr Varianten ausweisen würden als tatsächlich vorhanden, als mehr oder weniger wahrscheinlich zu deklarieren. Ein Punkt soll dabei einen Beschreibungsfehler als möglich und zwei Punkte als unwahrscheinlich erscheinen lassen. Ab drei Punkten soll ein Beschreibungsfehler bereits als praktisch ausgeschlossen gelten.

In allen Primärkulturen, in denen Varianten gefunden werden konnten, wurden diese mittels des Punktesystems verglichen. Varianten von ST, die nicht in der gleichen Primärkultur auftraten wurden nicht miteinander verglichen. Aus insgesamt 95 Vergleichen ergaben sich die in Abb. 9 zu ersehenden Häufigkeiten der Punktwerte:

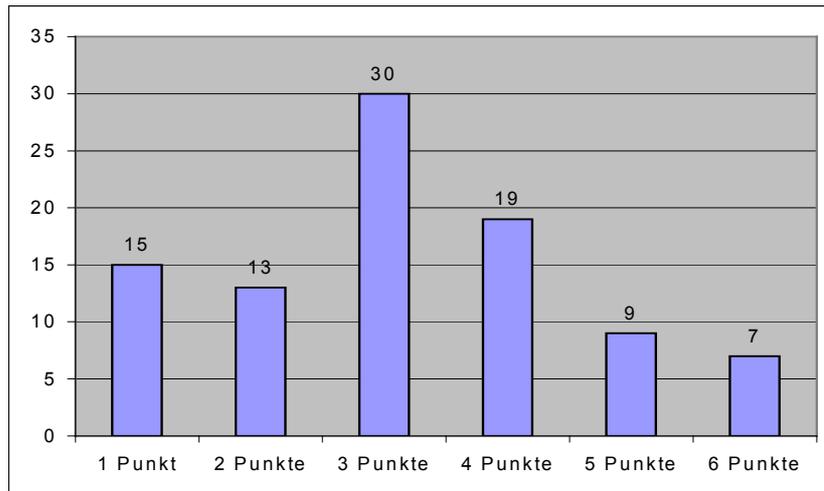


Abb. 9: Häufigkeiten der Punktwerte im Vergleich von Varianten, die in der gleichen Primärkultur auftraten.

Man erkennt, dass 67 Vergleiche (70,5%) 3 oder mehr Punkte ergaben, die einen Beschreibungsfehler als praktisch ausgeschlossen erscheinen lassen sollen. In 13 Fällen (13,7%) ergaben sich 2 Punkte, was einen Beschreibungsfehler nicht sicher ausschließen lassen soll. In 15 Fällen (15,8%) ergab sich 1 Punkt, was die Möglichkeit eines Beschreibungsfehlers erlauben soll.

Somit kann festgehalten werden, dass die überwiegende Mehrzahl der gefundenen Varianten als sicher existent angesehen werden kann.

3.5 Einflussfaktoren auf die Bildung von Subtypen und Varianten in Primärkulturen

Herausgefunden werden sollte, ob die Faktoren Antibiotikatherapie, Co-Kolonisation mit *P. aeruginosa* und MRSA-Stämme Einfluss auf die Bildung von ST und Varianten in Primärkulturen haben. Ebenso sollte dies für den Faktor „Lagerungsweise und Zeit bis zur Verarbeitung der Proben“ untersucht werden.

Diese Fragen wurden nur für die Probenarten RS und SSS geklärt, die jeweils als „Sputum“ zusammengefasst wurden. Für die Probenarten NA und RA lagen

jeweils nur geringe Fallzahlen vor, weshalb eine genauere Untersuchung nicht durchgeführt wurde. Im folgenden werden daher für die Probenarten NA und RA nur reine Fallzahlen ohne statistische Berechnung aufgeführt.

3.5.1.1 Einfluss von Antibiotikatherapie auf die Bildung von Subtypen und Varianten

Mittels der Klinikakten konnte retrospektiv dokumentiert werden, ob zum Zeitpunkt der Probenentnahme eine antibiotische Behandlung der Patienten vorlag (vgl. Anhang Tab. A2). Die meisten Patienten bekommen als Dauertherapie über Monate oder Jahre AB, entweder in inhalativer oder oraler Form, verabreicht. Keine antibiotische Behandlung ist eher selten der Fall. Berücksichtigt wurden bei Patienten, die keine Dauertherapie erhalten, auch zusätzliche, kurzzeitige Verabreichungen höherer Dosen von AB (intermittierende Therapie), wie etwa gegen vorliegende Infekte. Mit Ausnahme von 4 Proben konnte die Information über eine vorliegende AB-Therapie zum Zeitpunkt der Probenentnahme aus der Klinikakte entnommen werden.

3.5.1.1 Einfluss von Antibiotikatherapie auf die Bildung von Subtypen

Die Verabreichung von AB erhöht die Häufigkeit des gleichzeitigen Vorkommens von zwei oder mehr ST in einer Sputumprobe von 4,4% auf 24,3%. Dies ist aufgrund der Anzahl der Beobachtungen (n= 130) nach Fisher's Exact Test ($p=0,0442$) signifikant (Tab. 11).

Tab. 11 Auftreten von ST in Proben mit und ohne AB-Therapie.

Probenart	AB-Therapie	1 ST eines GT	2 oder mehr ST eines GT
Sputum	ja	81 (75,7%)	26 (24,3%)
Sputum	nein	22 (95,6%)	1 (4,4%)

AB: Antibiotika
 GT: Genomtyp
 ST: Subtyp

In der Probenart NA konnte ein gleichzeitiges Vorkommen von zwei ST in 0/10 Proben und in der Probenart RA in 0/19 Proben registriert werden. Mit Ausnahme von einem NA wurden diese Proben alle während einer antibiotischen Behandlung gewonnen.

3.5.1.2 Einfluss von Antibiotikatherapie auf die Bildung von Varianten

Die Verabreichung von AB erhöht die Häufigkeit des gleichzeitigen Vorkommens von zwei oder mehr Varianten in einer Sputumprobe von 29,2% auf 30,6%. Dies ist aufgrund der Anzahl der Beobachtungen (n= 158) nach Fisher's Exact Test ($p=1,0000$) nicht signifikant (Tab. 12).

Tab. 12 Auftreten von Varianten in Proben mit und ohne AB-Therapie.

Probenart	AB-Therapie	1 Variante eines ST	2 oder mehr Varianten eines ST
Sputum	ja	93 (69,4%)	41 (30,6%)
Sputum	nein	17 (70,8%)	7 (29,2%)

AB: Antibiotika
 ST: Subtyp

In der Probenart NA konnte ein gleichzeitiges Vorkommen von zwei Varianten in 3/10 Proben und in der Probenart RA in 1/19 Proben registriert werden. Mit Ausnahme von einem NA wurden diese Proben alle während einer antibiotischen Behandlung gewonnen.

3.5.2 Einfluss von *Pseudomonas aeruginosa* auf die Bildung von Subtypen und Varianten

Ebenfalls aus den Klinikakten konnte anhand des mikrobiologischen Befundes dokumentiert werden, ob in den Sputumproben eine Co-Kolonisation von *S. aureus* und *P. aeruginosa* vorlag. Untersucht wurde, ob das gleichzeitige Auftreten beider Keime Einfluss auf die Bildung von ST und/ oder Varianten bei *S. aureus* hat.

3.5.2.1 Einfluss von *Pseudomonas aeruginosa* auf die Bildung von Subtypen

Die Anwesenheit von *P. aeruginosa* erniedrigt die Häufigkeit des gleichzeitigen Vorkommens von zwei oder mehr ST in einer Sputumprobe von 25,8% auf 10,8%. Dies ist aufgrund der Anzahl der Beobachtungen (n= 134) nach Fisher's Exact Test (p=0,0649) nicht signifikant (Tab. 13).

Tab. 13 Auftreten von ST in Proben mit gleichzeitiger Besiedlung von *P. aeruginosa*.

Probenart	Gleichzeitiges Auftreten von <i>P. aeruginosa</i>	1 ST eines GT	2 oder mehr ST eines GT
Sputum	ja	33 (89,2%)	4 (10,8%)
Sputum	nein	72 (74,2%)	25 (25,8%)

GT: Genomtyp
ST: Subtyp

3.5.2.2 Einfluss von *Pseudomonas aeruginosa* auf die Bildung von Varianten

Die Anwesenheit von *P. aeruginosa* erniedrigt die Häufigkeit des gleichzeitigen Vorkommens von zwei oder mehr Varianten in einer Sputumprobe von 31,7% auf 24,4%. Dies ist aufgrund der Anzahl der Beobachtungen (n= 164) nach Fisher's Exact Test (p=0, 4347) nicht signifikant (Tab. 14).

Tab. 14 Auftreten von Varianten in Proben mit gleichzeitiger Besiedlung von *P. aeruginosa*.

Probenart	Gleichzeitiges Auftreten von <i>P. aeruginosa</i>	1 Variante eines ST	2 oder mehr Varianten eines ST
Sputum	ja	31 (75,6%)	10 (24,4%)
Sputum	nein	84 (68,3%)	39 (31,7%)

ST: Subtyp

3.5.3 Ausbildung von ST und Varianten bei MRSA - Stämmen

Aus dem mikrobiologischen Befund wurde ferner entnommen, ob in den einzelnen Sputumproben ein MRSA- Stamm vorlag. Beim Vorkommen von zwei verschiedenen GT in einer Probe wurde mittels PCR verifiziert, welcher GT als MRSA zu führen ist. Bei Proben mit zwei verschiedenen GT und MRSA-negativem mikrobiologischen Befund, wurde ebenfalls mittels PCR untersucht, ob nicht doch einer der beiden Stämme als MRSA zu deklarieren ist. Dies war nötig, da in der Routinetestung i.d.R. nur eine Kolonie untersucht wird. Herausgefunden werden sollte, ob MRSA- Stämme zur Bildung von ST und/oder Varianten neigen.

3.5.3.1 Subtypen bei MRSA

Die Ausbildung von gleichzeitig zwei oder mehr ST in einer Sputumprobe ist bei MSSA-Stämmen (13,7%) im Vergleich zu MRSA-Stämmen (50,0%) niedriger ausgeprägt. Dies ist aufgrund der Anzahl der Beobachtungen (n= 132) nach Fisher's Exact Test ($p < 0.0001$) signifikant (Tab. 15).

Tab. 15 Auftreten von ST in Proben von MRSA- Stämmen.

Probenart	MRSA- Stamm	1 ST eines GT	2 oder mehr ST eines GT
Sputum	ja	15 (50,0%)	15 (50,0%)
Sputum	nein	88 (86,3%)	14 (13,7%)

GT: Genomtyp
ST: Subtyp

In der obigen Berechnung sind die Proben 53 (Patient 23) und 91 (Patient 1) nicht eingerechnet, da dort isolierte, unterschiedliche Varianten eines ST einerseits als MRSA und andererseits als MSSA identifiziert wurden. Somit kann der zugrunde liegende ST nicht eindeutig zugeordnet werden.

3.5.3.2 Varianten bei MRSA

Die Ausbildung von gleichzeitig zwei oder mehr Varianten in einer Sputumprobe ist bei MSSA-Stämmen (23,9%) im Vergleich zu MRSA-Stämmen (42,3%) niedriger ausgeprägt. Dies ist aufgrund der Anzahl der Beobachtungen (n= 162) nach Fisher's Exact Test ($p= 0,0326$) signifikant (Tab. 16).

Tab. 16 Auftreten von Varianten in Proben von MRSA- Stämmen.

Probenart	MRSA- Stamm	1 Variante eines ST	2 oder mehr Varianten eines ST
Sputum	ja	26 (57,7%)	19 (42,3%)
Sputum	nein	89 (76,1%)	28 (23,9%)

ST: Subtyp

Auch hier gingen die Proben 53 (Patient 23) und 91 (Patient 1) nicht in die Berechnung ein, da die isolierten, unterschiedlichen Varianten eines ST einerseits als MRSA und andererseits als MSSA identifiziert wurden.

Ein interessantes Phänomen lieferten die Ergebnisse der Antibiotogramme von GT 17, der nur bei einem Patienten vorkam. In neun Proben wurde dieser Typ

als MRSA und in fünf Proben als MSSA ausgewiesen. Dabei waren weder eine strikte zeitliche Trennung, noch eindeutige Unterschiede bezüglich ST oder Varianten zu erkennen.

3.5.4 Einfluss von Lagerungsweise und Zeit bis zur Verarbeitung der Proben

Es wurde untersucht, inwiefern die Faktoren Lagerungsweise und Zeit bis zur Verarbeitung der Proben Einfluss auf das morphologische Bild in der Primärkultur nehmen. RS wurden erst nach mehrstündiger Lagerung bei Raumtemperatur und anschließend mehrtägiger Lagerung bei 4°C schließlich bei -20°C tiefgefroren, während SSS augenblicklich nach Abgabe bei -70°C eingefroren werden konnten.

Von 11 Patienten konnte am gleichen Tag sowohl ein RS wie auch ein SSS gewonnen werden. Insgesamt wurden in 3 Fällen in den Primärkulturen identische Bilder vorgefunden. In 8 Fällen lagen unterschiedliche Bilder vor. Tabelle 17 zeigt, dass in den 3 Fällen (Patienten 4, 17, 21) mit identischen Bildern jeweils homogene Bilder vorlagen, deren Entsprechung durch die Auswertung mittels PFGE auch als identische GT bestätigt werden konnte. Bei den anderen 8 Fällen ergaben sich in den Primärkulturen unterschiedliche Bilder. Dabei lagen bis auf zwei Proben (SSS der Patienten 7 und 10) nur heterogene Bilder vor. Diese morphologischen Unterschiede ließen sich durch PFGE-Typisierung genauer verifizieren. Aus Tabelle 17 ist ersichtlich, dass es sich hierbei keinesfalls nur um Varianten des gleichen GT handelt. Dies trifft gänzlich nur in 2 Fällen (Patienten 5 und 11) zu. Dagegen wurden in 4 Fällen ST eines GT nur in einem der beiden Sputen isoliert (Patienten 1, 7, 10, 13) und in 2 Fällen konnte ein GT, der im SSS gefunden wurde, im entsprechenden RS nicht entdeckt werden (Patienten 24 und 25).

Tab. 17 Übersicht über die gefundenen Isolate in RS und SSS vom gleichen Patienten, die am gleichen Tag gewonnen wurden

Patient	Proben-	Proben-	Gefundene Isolate im RS	Gefundene Isolate im SSS
	nummer RS	nummer SSS		
1	91	32s	19;1;2 / 19;1;3	19;1;5 / 19;4;3 / 19;4;4
4	94	28s	175;1;1	175;1;1
5	72	5s	31;1;5 / 31;1;3	31;1;6 / 31;1;3 / 31;1;1 / 31;1;7 / 31;1;2
7	78	11s	36;1;2 / 36;2;1	36;1;3
10	61	21s	2;1;5 / 2;1;3	2;3;1
11	76	6s	2;1;5 / 2;1;6	2;1;5 / 2;1;7
13	88	2s	17;1;1 / 17;1;11 / 17;2;4	17;4;2 / 17;1;12
17	89	1s	108;1;1	108;1;1
21	95	27s	31;5;4	31;5;4
24	63	19s	174;1;1 / 174;1;2	174;1;1 / 170;1;1 / 170;2;1
25	83	23s	2;5;2 / 2;1;12	2;5;4 / 2;1;7 / 166;1;1

Die durch Semikolon getrennte Zahlenfolge hat folgende Bedeutung: erste Zahl: GT, zweite Zahl: ST, dritte Zahl: Variante. Dabei entsprechen die Zahlen für die ST und Varianten keiner etablierten Nomenklatur. Sie sind innerhalb dieser Studie eindeutig definiert, aber in ihrer Bezifferung willkürlich gewählt.

RS: Routinesputum
 SSS: sofort schockgefrorenes Sputum
 GT: Genomtyp
 ST: Subtyp

Es folgt, dass die morphologischen Bilder in der Primärkultur von RS und SSS vom gleichen Patienten, die am gleichen Tag gewonnen wurden, sich nur in 3/11 Fällen exakt entsprechen (Tab. 17). In 8/11 Fällen sind unterschiedliche Bilder zu verzeichnen. Zwar konnten homogene Bilder bei SSS (n= 5) häufiger als bei RS (n= 3) verzeichnet werden, allerdings ist es keinesfalls so, dass die Bilder der RS generell mehr unterschiedliche Kolonien zeigen, als die Bilder der SSS.

3.5.5 Reproduzierbarkeit des morphologischen Bildes der Primärkultur

Es sollte herausgefunden werden, ob die phänotypischen Bilder in der Primärkultur reproduzierbar waren. Dazu wurden insgesamt 6 Proben von 6 verschiedenen Patienten ein zweites Mal verarbeitet (4 RS und 2 SSS) (Tab. 18). Die Proben waren zuvor bei -20°C (RS) oder bei -70°C (SSS) tiefgefroren. Es ergab sich, dass in keinem Fall ein identisches Ergebnis erzielt wurde. Durch PFGE wurden die gefundenen Unterschiede auch genetisch bestätigt. Tabelle 18 zeigt, dass in je einem Fall in der Kontrolle ein GT (Isolat 109;2;1 in K43) bzw. ein ST (Isolat 31;2;1 in K11), die aus den jeweiligen ersten Proben isoliert wurden, in der Kontrolle nicht gefunden werden konnten. Ansonsten wurden nur Abweichungen in Bezug auf Varianten festgestellt. Dabei wurden in einem Fall in der Kontrolle (K31s) eine Variante weniger und in einem Fall in der Kontrolle (K87) eine Variante mehr als in der Ausgangsprobe entdeckt. In den anderen 4 Fällen ergaben sich gleich viele Varianten der gefundenen ST. Auffällig war, dass in den Kontrollen insgesamt 6 „neue“ Varianten auftraten, die zuvor nirgends in der gesamten Studie, also auch nicht in Proben anderer Patienten, vorkamen.

Mittels Punktesystem ergaben sich im beim Vergleich der Varianten zwischen Probe und entsprechender Kontrolle 5x 0 Punkte, 3x 1 Punkt, 2x 2 Punkte, 1x 3 Punkte und 1x 5 Punkte (Tab. 18).

Tab. 18 Vergleich der durch PFGE identifizierten Isolate aus 6 für die Studie verwendeten Proben und den entsprechenden Isolaten aus den gleichen Proben bei einer späteren Kontrolle (K).

Probe	Proben-Nr.	Isolat	Kontrolle	Proben-Nr.	Isolat	Punktesystem
11	11a	31;1;2	K11	K11c	31;1;2	0
	11b	31;1;3		K11a	31;1;neu	3
	11c	31;2;1		nicht gefunden		
	11d	31;1;4		K11b	31;1;1	1
43	43a	36;1;4	K43	K43a	36;1;neu	1

	43c	109;2;1		nicht gefunden		
55	55a	7;4;1	K55	K55a	7;4;neu	5
	55b	7;4;2		K55b	7;4;2	0
87	87a	19;1;2	K87	K87a	19;1;2	0
	87b	19;1;4		K87c	19;1;4	0
	nicht gefunden			K87b	19;1;neu	
28s	28sa	175;1;1	K28s	K28sa	175;1;3	2
31s	31sa	31;4;5	K31s	nicht gefunden		
	31sb	31;4;6		K31sc	31;4;neu	2
	31sc	31;4;7		K31sb	31;4;7	0
	31sd	31;4;3		K31sa	31;4;neu	1

Die durch Semikolon getrennte Zahlenfolge hat folgende Bedeutung: erste Zahl: GT, zweite Zahl: ST, dritte Zahl: Variante. Dabei entsprechen die Zahlen für die ST und Varianten keiner etablierten Nomenklatur. Sie sind innerhalb dieser Studie eindeutig definiert, aber in ihrer Bezifferung willkürlich gewählt.

GT: Genomtyp

ST: Subtyp

Es ergibt sich, dass die morphologischen Bilder der Primärkultur nicht exakt reproduzierbar sind. Allerdings werden überwiegend geringe Abweichungen in Bezug auf Varianten festgestellt, die sich laut Punktesystem in der Mehrzahl der Fälle nur geringfügig unterscheiden. Dennoch ist leider auch nicht gewährleistet, dass alle GT oder ST erneut isoliert werden können bzw. bereits isoliert wurden.

3.5.6 Reproduzierbarkeit des morphologischen Bildes der Primärkultur aus Nasenabstrichen bei gesunden Personen

Weiterhin sollte herausgefunden werden, ob sich das morphologische Bild der Primärkultur aus NA bei gesunden Personen reproduzieren ließ. Dazu wurden in einem ersten Test bei 8 Labormitarbeitern ein NA gemacht. Nach Kultivierung konnte bei 4 Personen *S. aureus* festgestellt werden. In allen 4 Fällen war ein homogenes Bild in der Primärkultur zu verzeichnen. Die Typisierung ergab das

Auftreten von GT 2, GT 7 und zweimal GT 36. Drei Monate später wurde von 3 dieser 4 Mitarbeiter erneut ein NA und zusätzlich ein RA gemacht. Bei allen 3 Personen ergab sich in der Primärkultur der NA ein identisches Bild des ersten Abstrichs. In der Typisierung zeigten sich erneut die identischen GT wie beim ersten Test. Eine Abweichung bezüglich ST oder gar Varianten konnte also nicht festgehalten werden. Im RA eines Mitarbeiters konnte *S. aureus* festgestellt werden. Morphologisch entsprachen diese Kolonien denen des zugehörigen NA. In der Typisierung wurde anschließend ein identischer Stamm (GT 7) ohne Abweichung bezüglich ST oder Varianten nachgewiesen.

3.6 Southern Analyse

Bei allen Patienten, bei denen im Laufe der Studie zwei oder mehrere ST eines GT auftraten, wurde eine Southern Analyse dieser ST durch Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Gensonden durchgeführt. Es sollte herausgefunden werden, wie viele der entdeckten Fragmentveränderungen auf Mobilisation Hlb-konvertierender Phagen zurückzuführen sind. Insgesamt wurden bei 20 Patienten im Laufe der Studie zwei oder mehr unterschiedliche ST eines GT isoliert (Tab. 19). Der beim einzelnen Patienten am häufigsten vorkommende ST wurde als Referenzstamm gewählt, mit dem die anderen ST bezüglich der Anzahl der Bandenabweichungen verglichen wurden. In 13 Fällen konnten 1, in 7 Fällen 2 und in 2 Fällen 3 Bandenabweichungen registriert werden, sodass insgesamt 33 verschiedene Bandenabweichungen zu verzeichnen waren. Davon konnten 8 auf die Mobilisation eines Hlb-konvertierenden Phagen zurückgeführt werden. Die Ursache der restlichen Mutationen wurde nicht geklärt.

Tab. 19 Anzahl der Veränderungen von ST, die auf Mobilisation eines Hlb-konvertierenden Phagen zurückzuführen sind, im Vergleich mit dem beim einzelnen Patienten in dieser Studie am häufigsten vorkommenden ST.

Patient	GT;ST Referenz- stamm (Hlb-Phänotyp)	GT;ST Vergleich- stamm (Hlb-Phänotyp)	Anzahl unter- schiedlicher Banden	Durch einen Hlb-konvertierenden Phagen bedingte Veränderungen
1	19;1 (n)	19;2 (p)	3	1
	19;1 (n)	19;3 (p)	2	1
	19;1 (n)	19;4 (üw n)	1	0
3	171;1 (p)	171;2 (n)	1	1
5	31;1 (üw p)	31;2 (p)	1	0
7	36;1 (n)	36;2 (n)	1	0
9	31;4 (üw n)	31;3 (p)	3	1
10	2;1 (n)	2;2 (n)	2	0
	2;1 (n)	2;3 (n)	2	0
13	17;1 (üw p)	17;2 (p)	1	0
	17;1 (üw p)	17;3 (p)	2	0
	17;1 (üw p)	17;4 (p)	1	0
14	7;2 (n)	7;3 (n)	2	0
	2;1 (n)	2;4 (n)	1	0
15	165 ;1 (n)	165 ;2 (n)	1	0
20	7;5 (n)	7;6 (n)	2	1
	31;7 (n)	31;6 (n)	1	0
22	173;1 (n)	173;2 (n)	1	0
25	170;1 (p)	170;2 (n)	3	1
26	2;1 (üw p)	2;5 (üw p)	2	1
28	16;1 (n)	16;2 (p)	1	1
30	89;1 (p)	89;2 (p)	1	0

GT: Genomtyp

ST: Subtyp

Hlb: β -Hämolyisin, kodiert durch *hIb*

n: negativ

p: positiv

üw: überwiegend

Man erkennt, dass Hlb-konvertierende Phagen für einige Mutationen verantwortlich sind. Interessanterweise kann nicht in allen Fällen bestätigt werden, dass die Expressierung von β -Hämolysin bei ST, die Genomveränderungen aufweisen, welche auf Hlb-konvertierende Phagen zurückzuführen sind, stets ausgeschaltet ist (Tab. 19 (vgl. auch Anhang Tab. A1b)). So konnte z.B. bei Patient 3 eine intakte β -Hämolyse bei beiden ST gezeigt werden, obwohl der Nachweis einer durch einen Hlb-konvertierenden Phagen bedingten Veränderung gelang. Weiterhin fiel auf, dass verschiedene ST β -Hämolysin nicht konstant exprimieren. So konnten beispielsweise bei Patient 26 bei beiden dort isolierten ST sowohl Hlb-Phänotyp positive, wie negative Bilder gezeigt werden. Diese Erkenntnisse konnten bereits in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe gewonnen werden [39], und rechtfertigen somit erneut zukünftige, weiterführende Untersuchungen.

3.7 Antibiotika- Resistenzbestimmung der Varianten

Um herauszufinden, ob sich Varianten, die gleichzeitig in einer Probe auftraten, in ihrem AB-Resistenzmuster unterschieden, wurde von 53 Proben, in denen jeweils zwei oder mehr Varianten zu verzeichnen waren, eine AB-Resistenzbestimmung der einzelnen Isolate (n=124) durchgeführt. Die Resistenzmuster der Varianten einer Probe wurden anschließend verglichen. Des weiteren konnte anhand der Resistenzmuster festgehalten werden, ob ein MRSA- Stamm vorlag. Varianten eines Stammes, die nicht gemeinsam in einer Probe auftraten, wurden nicht explizit getestet.

Die Testung betraf mindestens 15 und höchstens 18 verschiedene AB. In 44 Proben (83,0%) war kein Unterschied festzustellen. Dagegen konnte in 9 Proben (17,0%) eine Abweichung im Vergleich der Resistenzmuster der Varianten entdeckt werden. Als Abweichung wurde dabei nur gewertet, wenn im Antibiotogramm „resistent vs sensibel“ auftrat. Abweichungen in Gestalt von „intermediär vs resistent“ und „intermediär vs sensibel“ wurden nicht gewertet

(vgl. auch Anhang Tab. A1c, A1d, A1e). Tabelle 20 zeigt die gefundenen Abweichungen, die in 8 Fällen ein AB und in 1 Fall drei AB betrafen.

Insgesamt wurden 18 Proben (33,9%) als MRSA- positiv beurteilt. Von diesen Proben waren 13 (72,2%) ohne und 5 (27,8%) mit Unterschied zu verzeichnen. Bemerkenswertes enthielt Probe 91 (Patient 1), in der Variante 19;1;2 als MSSA-Stamm und Variante 19;1;3 als MRSA-Stamm detektiert wurde. Diese Ergebnisse konnten in einer zweiten Kontrolltestung bestätigt werden.

Auffallend war, dass die Resistenzmusterabweichungen der Varianten einerseits bei 4 verschiedenen Patienten und dadurch auch bei 4 verschiedenen GT von *S. aureus* auftraten und andererseits 6 unterschiedliche AB betrafen.

Tab. 20 Alle gefundenen Unterschiede im AB-Resistenzmuster von Varianten, die gleichzeitig in einer Probe auftraten.

Patient	Isolat-Nummer	GT	ST; Variante	MRSA	Antibiotikum	Ergebnis
1	65a	19	1;1	ja	Gentamicin	resistent
	65b	19	1;2	ja	Gentamicin	sensibel
	65c	19	1;3	ja	Gentamicin	sensibel
1	87a	19	1;2	ja	Gentamicin	resistent
	87b	19	1;4	ja	Gentamicin	sensibel
	87a	19	1;2	ja	Erythromycin	resistent
	87b	19	1;4	ja	Erythromycin	sensibel
	87a	19	1;2	ja	Clindamycin	resistent
	87b	19	1;4	ja	Clindamycin	sensibel
1	91a	19	1;2	nein	Oxacillin	sensibel
	91b	19	1;3	ja	Oxacillin	resistent
5	72a	31	1;5	ja	Rifampicin	sensibel
	72c	31	1;3	ja	Rifampicin	resistent
13	30c	17	1;7	nein	Cotrimoxazol	resistent
	30d	17	1;4	nein	Cotrimoxazol	sensibel
13	57b	17	1;8	ja	Gentamicin	sensibel

	57c	17	1;6	ja	Gentamicin	resistent
13	51b	17	1;9	ja	Gentamicin	sensibel
	51c	17	1;8	ja	Gentamicin	resistent
16	55a	7	4;1	nein	Erythromycin	resistent
	55b	7	4;2	nein	Erythromycin	sensibel
16	58a	7	4;2	nein	Erythromycin	sensibel
	58d	7	4;3	nein	Erythromycin	resistent

GT: Genomtyp

Es bleibt festzuhalten, dass zwischen Varianten, die gleichzeitig in einer Probe auftraten in 9/53 Fällen (17%) Unterschiede im AB-Resistenzmuster entdeckt wurden. Vor dem Hintergrund der Anzahl der getesteten AB (n= 15-18) wird die zunächst als hoch erscheinende Prozentzahl allerdings relativiert, da die Unterschiede in 8/9 Fällen lediglich 1 AB und in 1/9 Fällen 3 AB betrafen. Insgesamt sollten umfangreichere Untersuchungen diesen Sachverhalt vertiefen, auch um herauszufinden, ob ein Zusammenhang mit bestimmten AB oder MRSA-Stämmen besteht. Dies kann aufgrund der geringen Anzahl der vorliegenden Daten noch nicht abgeleitet werden. Ein in diesem Kontext auffallendes Ergebnis zeigte sich in Probe 53 (Patient 23). Dort konnten 3 Varianten (31;4;9, 31;4;10, 31;4;11) (vgl. Anhang Tab. A1a) gefunden werden. Es zeigten sich zwar keine Unterschiede im Resistenzmuster, jedoch wurden in einer Kontroll-PCR zwei dieser Varianten als MRSA und eine als MSSA identifiziert. Somit sind auch von dieser Seite weitreichendere Studien gerechtfertigt.

3.8 In-situ-Hybridisierung und Immunfluoreszenz

3.8.1 In-situ-Hybridisierung

Mittels der durchgeführten In-situ-Hybridisierung gelingt ein selektiver Nachweis von *S. aureus*. Dazu dient einerseits eine DAPI- Färbung, mit der Bakterien bzw. Bakterienhaufen angefärbt und somit aufgesucht werden können, und ein

FITC- markiertes Oligo gegen 16S rRNA von *S. aureus*, das den selektiven Nachweis von *S. aureus* erlaubt. Dadurch kann in der folgenden Immunfluoreszenz zweifelsfrei geklärt werden, ob bestimmte Fluoreszenzreaktionen tatsächlich von *S. aureus* ausgehen. Ein Ziel der In-situ-Hybridisierung war es, herauszufinden wie hoch die Bakterienkonzentration von *S. aureus* in einer Probe sein muss, um in der Fluoreszenzmikroskopie Bakterienhaufen überhaupt entdecken zu können. Außerdem sollte festgestellt werden, ob die Bakterien eher in Clustern oder mehr vereinzelt vorkamen. Des weiteren war die Frage nach intrazellulärem oder zellassoziertem Vorkommen von Interesse.

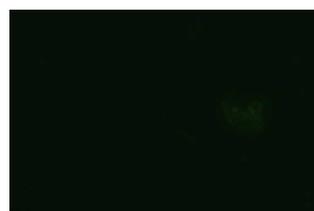
3.8.1.1 Positiv- und Negativkontrollen

Zur Negativkontrolle wurden Sputumproben auf einen Objektträger gebracht, die von Patienten stammten, bei denen *S. aureus* nicht gefunden werden konnte. Weiterhin wurde eine Probe eines Laborstamms von *S. epidermidis* aufgetropft, der keine Fluoreszenzreaktion zeigte und daher ebenfalls als Negativkontrolle diente. Ferner wurden Proben von RA von 7 Labormitarbeitern auf den Objektträger gebracht. Bei 3 dieser Personen konnte *S. aureus* nachgewiesen werden. Die entsprechenden Proben dienten als Positivkontrolle. Die Proben der anderen 4 Mitarbeiter wurden als weitere Negativkontrollen verwertet.

Beispiele: a.) Mitarbeiter 1 (RA) – negative Kontrolle

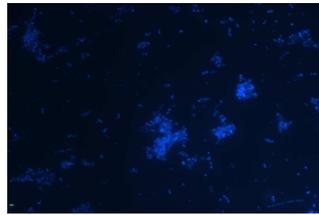


DAPI

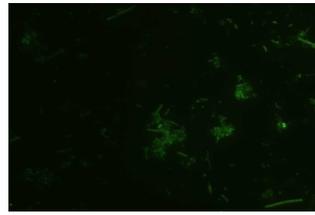


In-situ-Hybridisierung

b.) Mitarbeiter 4 (RA) – positive Kontrolle (mittelstarke Fluoreszenzreaktion)



DAPI



In-situ-Hybridisierung

3.8.1.2 Nachweisgrenze und Morphologie von *S. aureus* in der In-situ-Hybridisierung

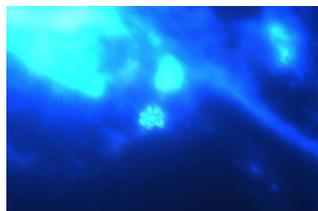
Durch die Primärkulturen und die anschließende PFGE war zuvor bekannt, welche Proben der NA, RA und SSS *S. aureus* enthalten mussten. Da die Konzentration von *S. aureus* in manchen Proben sehr gering war, gelang der Nachweis durch Fluoreszenzmikroskopie nicht in allen Fällen. Die geringste Konzentration, bei der es möglich war, *S. aureus* nachzuweisen betrug 1900 KBE/ml. In allen Proben mit geringerer Konzentration konnte *S. aureus* nicht gezeigt werden. Im einzelnen gelang der Nachweis in 6/10 Fällen der NA, in 17/19 Fällen der RA und in 21/22 Fällen der SSS. In 3 Fällen (Proben 1n, 1r und 4r) gelang der Nachweis aufgrund eines technischen Fehlers nicht.

Die aus Probe 19r isolierte Kolonie erwies sich durch PFGE nicht als *S. aureus*-Stamm. Da die Fluoreszenzreaktion in der In-situ-Hybridisierung allerdings stark auf *S. aureus* in dieser Probe hinweist, könnte bei der Isolierung aus der Primärkultur versehentlich eine falsche Kolonie gepickt worden sein. Träfe dies zu, würde sich die Zahl aller *S. aureus* positiven RA von 19 auf 20 erhöhen. Die Zahl der positiven Nachweise von *S. aureus* durch In-situ-Hybridisierung stiege dann von 17 auf 18.

Mittelstark bis stark fluoreszierende Bakterien wurden als *S. aureus* identifiziert. In allen Proben zeigten sich dabei hauptsächlich Cluster, deren

Fluoreszenzreaktionen in den meisten Fällen homogen waren. Auffällig waren in manchen Proben vorkommende, aufgebläht wirkende Formen, die häufig in tetradenartiger Formation zu finden waren. Die Lage von *S. aureus* innerhalb der Proben konnte nicht als einheitlich festgestellt werden. Teilweise wurden Cluster an Epithelzellen assoziiert, teilweise frei umherliegend gefunden. In manchen Fällen schien auch ein intrazelluläres Vorkommen wahrscheinlich zu sein.

Beispiele: a.) Probe 28s (Patient 4) – Cluster, homogen, zellassoziiert

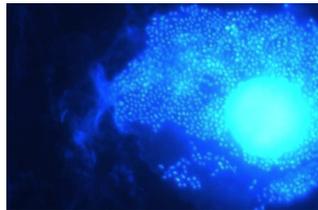


DAPI

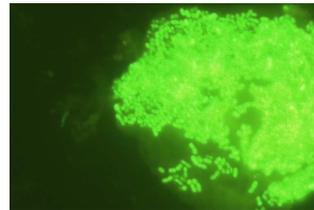


In-situ-Hybridisierung

b.) Probe 33s (Patient 14) – Cluster, homogen, intrazellulär

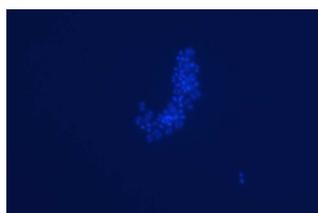


DAPI



In-situ-Hybridisierung

c.) Probe 25r (Patient 13) – Cluster, inhomogen, frei, aufgeblähte Formen



DAPI



In-situ-Hybridisierung

3.8.2 Immunfluoreszenz

Von allen Proben, bei denen *S. aureus* in der In-situ-Hybridisierung bestätigt werden konnte, sollte die Expressierung von Protein A (SpA) und Clumping Faktor A (ClfA) beurteilt werden. Dazu dienten wiederum die DAPI- Färbung,

mit der die angefärbten Bakterien bzw. Bakterienhaufen aufgesucht werden konnten, das FITC- Oligo, das den selektiven Nachweis von *S. aureus* erlaubte und ein CY3- Filter, mit dem die Expressierung von SpA und ClfA beurteilt werden konnte.

3.8.2.1 Negativkontrollen

Als Negativkontrollen dienten einerseits die SpA negative Mutante „DU 5723“, die nur eine sehr schwache Fluoreszenzreaktion zeigt und andererseits ein Laborstamm von *S. epidermidis*, der zwar kein SpA besitzt, jedoch trotzdem eine sehr schwache Fluoreszenzreaktion aufweist.

Beispiele:



S. epidermidis (SpA Nachweis negativ)



Mutante „DU“ (SpA Nachweis negativ)

3.8.2.2 Immunfluoreszenz zur Bestimmung von Protein A

In allen Proben, in denen es gelang *S. aureus* mittels In-situ-Hybridisierung zu lokalisieren, konnte in der Immunfluoreszenz kein einheitliches Bild bezüglich der Expression von SpA festgestellt werden. Sowohl in verschiedenen Bakterienhaufen in den einzelnen Proben, als auch innerhalb einzelner Cluster wurden unterschiedliche Stärken der Fluoreszenz registriert. Die Entscheidung über den Nachweis fiel nach dem Ausmaß der stärksten Fluoreszenzreaktion, die in der Probe entdeckt wurde. Als Vergleichsmaßstab wurden die Fluoreszenzreaktionen von drei Laborstämmen herangezogen. Dabei handelte es sich um den Wildtyp „8325-4“, der eine schwache bis mittelstarke Reaktion

zeigt, der agr-Mutante „RN 6911“, die eine starke Expressierung von SpA aufweist und der SpA negativen Mutante „DU 5723“, die eine sehr schwache Fluoreszenzreaktion zeigt.

3.8.2.2.1 Immunfluoreszenz zur Bestimmung von Protein A in Nasenabstrichen

In 6/10 NA gelang es in der In-situ-Hybridisierung *S. aureus* zu lokalisieren. Davon wurde 1 Probe als sicher SpA positiv, 2 Proben als fraglich positiv und 3 als negativ bewertet (Tab. 21). In 1 Probe (1n) gelang der Nachweis wegen eines technischen Fehlers nicht. In 3 Proben (10n, 13n, 27n) war die Konzentration von *S. aureus* zu gering.

Tab. 21 Beurteilung des SpA Nachweises in NA

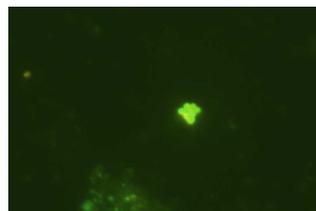
Patient	Proben- nummer	Isolat-Nummern	In-situ- Hybridisierung	SpA- Nachweis
9	4n	4n	mittel	negativ
10	21n	21n	stark	negativ
14	33n	33na, 33nb	stark	positiv
14	26n	26na, 26nb	mittel	fraglich positiv
25	19n	19na, 19nb	mittel	negativ
27	8n	8na, 8nb	stark	fraglich positiv

SpA: Protein A

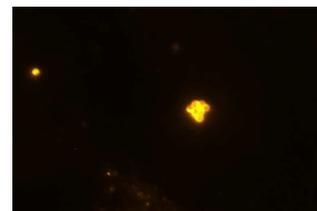
Beispiel: Probe 33n (Patient 14): SpA Nachweis positiv bei starker Fluoreszenzreaktion in der In-situ-Hybridisierung



DAPI



In-situ-Hybridisierung



SpA Nachweis

3.8.2.2.2 Immunfluoreszenz zur Bestimmung von Protein A in

Rachenabstrichen

In 17/19 RA gelang es in der In-situ-Hybridisierung *S. aureus* zu lokalisieren. Davon wurden 5 Proben als sicher SpA positiv, 7 Proben als fraglich positiv und 5 als negativ bewertet (Tab. 22). In 2 Proben (1r, 4r) gelang der Nachweis wegen eines technischen Fehlers nicht. Die nach PFGE *S. aureus* negative Probe 19r, deren Fluoreszenzreaktion in der In-situ-Hybridisierung aber eher für ein Vorkommen von *S. aureus* spricht, wurde als fraglich positiv für SpA eingestuft.

Tab. 22 Beurteilung des SpA Nachweises in RA

Patient	Proben- nummer	Isolat-Nummern	In-situ- Hybridisierung	SpA- Nachweis
1	10r	10r	stark	positiv
1	32r	32r	stark	fraglich positiv
4	28r	28r	stark	positiv
9	31r	31r	stark	negativ
10	21r	21r	stark	fraglich positiv
12	24r	24r	stark	negativ
13	2r	2r	mittel	negativ
13	25r	25r	stark	positiv
14	26r	26r	stark	positiv
14	33r	33r	stark	fraglich positiv
16	20r	20r	stark	fraglich positiv
17	17r	17r	stark	negativ
18	13r	13r	stark	fraglich positiv
21	27r	27r	stark	positiv
26	23r	23r	mittel	fraglich positiv
27	8r	8ra, 8rb	mittel	negativ
30	14r	14r	stark	fraglich positiv
25	19r	19r	stark	fraglich positiv

SpA: Protein A

3.8.2.2.3 Immunfluoreszenz zur Bestimmung von Protein A in sofort schockgefrorenen Sputen

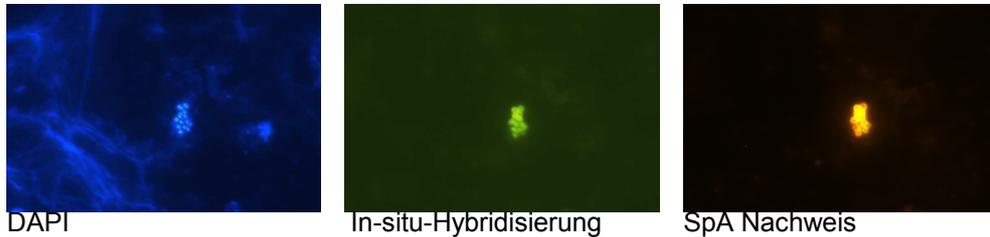
In 21/22 SSS gelang es in der In-situ-Hybridisierung *S. aureus* zu lokalisieren. Davon wurden 8 Proben als sicher SpA positiv, 3 Proben als fraglich positiv und 10 als negativ bewertet (Tab. 23). In 1 Probe (18s) war die Konzentration von *S. aureus* zu gering.

Tab. 23 Beurteilung des SpA Nachweises in SSS

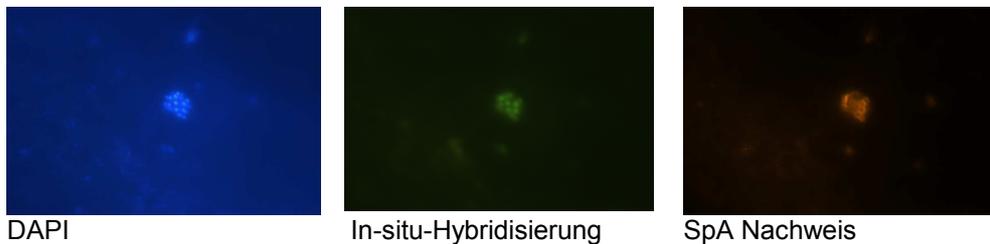
Patient	Proben-nummer	Isolat-Nummern	In-situ-Hybridisierung	SpA-Nachweis
1	32s	32sa, 32sb, 32sc	stark	positiv
2	3s	3sa, 3sb	mittel	negativ
4	28s	28s	stark	positiv
5	5s	5sa, 5sb, 5sc, 5sd, 5se	mittel	negativ
7	11s	11s	stark	fraglich positiv
9	31s	31sa, 31sb, 31sc, 31sd	stark	positiv
10	21s	21s	stark	positiv
11	6s	6sa, 6sb	stark	positiv
12	24s	24sa, 24sb	stark	positiv
13	2s	2sa, 2sb	stark	negativ
13	25s	25sa, 25sb	stark	negativ
14	33s	33sa, 33sb	stark	negativ
16	20s	20sb	stark	positiv
17	1s	1s	stark	fraglich positiv
20	34s	34sa, 34sb	stark	negativ
21	27s	27s	stark	positiv
25	19s	19sa, 19sb, 19sc	stark	negativ
26	23s	23sa, 23sb, 23sc	stark	negativ
27	8s	8sa, 8sb	mittel	negativ
30	9s	9sa, 9sb, 9sc, 9sd	mittel	negativ
30	14s	14sa, 14sb, 14sd, 14se, 14sf	mittel	fraglich positiv

SpA: Protein A

Beispiele: a.) Probe 31s (Patient 9): SpA Nachweis positiv bei starker Fluoreszenzreaktion in der In-situ-Hybridisierung



b.) Probe 14s (Patient 30): SpA Nachweis fraglich positiv bei mittelstarker Fluoreszenzreaktion in der In-situ-Hybridisierung



3.8.2.3 Immunfluoreszenz zur Bestimmung von Clumping Faktor A

Die Beurteilung der Expressierung von ClfA war aufgrund unzureichender Klarheit des mikroskopischen Bildes nicht möglich. Trotz zahlreicher Änderungen in der Verarbeitung war stets ein milchiger Schleier zu sehen, der eine sichere Beurteilung nicht zuließ. Die Vermutung, dieser Schleier könnte von einer Verunreinigung eines AK herrühren, konnte sicher ausgeschlossen werden, da im Laufe der Versuchsreihen jedes Agens gegen ein frisches ausgetauscht wurde. Da sich die restlichen zur Verarbeitung nötigen Materialien mit denen entsprachen, die bei der Verarbeitung der Objektträger zum Nachweis von SpA benutzt wurden, kann auch hier die Fehlerquelle ausgeschlossen werden. Wodurch dieser nebulöse Schleier entstanden ist, der eine sichere Bestimmung der Expressierung von ClfA verhinderte, bleibt rätselhaft.

4 DISKUSSION

4.1 Prävalenz von *Staphylococcus aureus* in Routinesputen, sofort schockgefrorenen Sputen, Nasenabstrichen und Rachenabstrichen

Der Nasen-Rachenraum gilt als allgemeine Eintrittspforte für Besiedlung und Infektion von *S. aureus* [9]. Daher sollte eine mindestens gleich hohe Prävalenz in NA und RA im Vergleich zu Sputumproben zu erwarten sein. In dieser Studie konnte allerdings bei Patienten, von denen ein NA, ein RA und ein SSS zum gleichen Zeitpunkt gewonnen wurde, eine zunehmende Prävalenz von *S. aureus* in anatomisch absteigender Richtung gezeigt werden. So war in 29,4% der NA, 55,6% der RA und 86,4% der SSS *S. aureus* nachzuweisen.

Die höhere Prävalenz von *S. aureus* in den tiefen Atemwegen erlaubt den Rückschluss auf ein dort günstigeres Milieu mit dadurch verbundener höherer Keimdichte und somit besserer Nachweisbarkeit. Zudem konnten Untersuchungen zeigen, dass die Eradizierung von *S. aureus* aus den tiefen Atemwegen von CF-Patienten langfristig nicht möglich ist [64; 71]. Da fast alle CF-Patienten dieser Studie häufig mit AB behandelt werden, sollte dadurch zumindest die Keimdichte im Nasen- und Rachenraum eingehend beeinflusst werden. Dies wird für die Besiedlung der Nase durch eine Untersuchung von Goerke et al. bestätigt, in welcher gezeigt werden konnte, dass die Prävalenz von *S. aureus* in NA bei CF- Patienten unter AB-Therapie signifikant niedriger ist, als bei CF- Patienten, die keine Antibiose erhalten [27]. Möglicherweise werden somit durch Dauerantibiose die Keimzahlen im Nasen- und Rachenraum unter die Nachweisgrenze gedrückt, während die Bakterien im Sputum stets nachweisbar sind. Dies wird durch die Ergebnisse dieser Studie unterstützt, welche zeigen, dass ein positiver Befund von *S. aureus* in den oberen Atemwegen in 15/16 Fällen mit einem positiven Befund in der Sputumprobe verknüpft ist. Andererseits kann weder von einer positiven Sputumprobe auf die oberen Atemwege, noch aus negativen Proben der oberen Atemwege auf das Sputum geschlossen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass zwar die Infektion und Besiedlung durch *S. aureus* von nasal/ oral ausgeht [27], allerdings zumindest bei CF-Patienten nur ein positiver Ausfall einer Probe aus den oberen Atemwegen einen Rückschluss auf eine Besiedlung der tiefen Atemwege zulässt. Ein negativer Ausfall eines NA oder RA ergibt keinen Hinweis auf die Besiedlung der tiefen Atemwege. Jene kann in diesem Fall nur mit Proben des dortigen Milieus beurteilt werden. Daher sollte die klinische Praxis, in der RA anstelle von Sputumproben zur Diagnostik herangezogen werden, wenn letztere nicht gewonnen werden können, überdacht werden.

4.2 Genotypen, Subtypen und Varianten von *S. aureus* in den einzelnen Probenarten

4.2.1 Morphologie der Primärkulturen

Dieser Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass es während der chronischen Lungeninfektion mit *S. aureus* bei CF-Patienten zu Veränderungen der Bakterienpopulation kommt. Nach Eindringen der Bakterien in die Lungen werden starke Immunreaktionen provoziert. Trotzdem kann *S. aureus* selbst durch regelmäßige AB-Therapie nicht dauerhaft eradiziert werden [64; 71]. Die Bakterien stehen daher unter steter Auseinandersetzung mit neuen, stressvollen Umweltbedingungen. Für *P. aeruginosa* ist seit langem bekannt, dass dies zur kontinuierlichen Veränderung der Bakterien führt [6; 45]. Als erster Ansatzpunkt solche postulierten Veränderungen bei *S. aureus* zu beobachten, wurde versucht über Veränderungen der Koloniemorphologie Aussagen über die Differenzierung innerhalb der Bakterienkultur zu erzielen. Es wurden daher alle visuell unterschiedlichen *S. aureus* Kolonien einer Primärkultur separat analysiert. Dabei wurde davon ausgegangen, dass eine Probe deren Primärkultur, in welcher sich alle *S. aureus*-Kolonien in Größe, Farbe und Hämolyseverhalten gleichen (homogenes Bild), auch genetisch identisch sind. Da aus heterogenen Proben alle unterschiedlichen Kolonien weiter untersucht

wurden, konnte nur hier zwischen dem Vorkommen von Co-Kolonisationen verschiedener GT, ST und Varianten differenziert werden. Daher war die Frage, ob homogene oder heterogene Bilder der Primärkultur in einer Probenart häufiger registriert wurden, für die weitere Untersuchung von Interesse. Herausgefunden wurde, dass heterogene Bilder in der Primärkultur von Sputen (67,8%) signifikant häufiger auftraten als in RA (10,5%), aber nicht signifikant häufiger als in NA (40,0%; allerdings muss hierbei die mit n=10 sehr geringe Anzahl an Proben bedacht werden, die eine weiterführende Diskussion eigentlich ausschließt). Dennoch lässt sich aus den vorliegenden Daten ablesen, dass aus Proben der tiefen Atemwege offensichtlich eher heterogene Koloniebilder zu verzeichnen sind, als aus Proben der oberen Atemwege. Der Grund hierfür könnte in der größeren Bakterienkonzentration und der damit verbundenen höheren Keimdichte in den tiefen Atemwegen liegen. Da herausgefunden wurde, dass eine Bakterienkonzentration von mindestens 10^5 KBE/ml in den Sputumproben die Häufigkeit des Vorkommens eines heterogenen Bildes der zugehörigen Primärkultur signifikant erhöht, stellt sich die Frage, ob diese Grenze universell, also auch für die anderen Probenarten gilt. Für die Probenarten NA und RA konnte diese Konzentrationsgrenze weder bestätigt, noch generell eine Konzentrationsgrenze gefunden werden. Daher drängt sich der Rückschluss auf, dass in dieser Studie mit lediglich 1/10 NA und 6/19 RA zu wenige Proben mit einer Konzentration von mindestens 10^5 KBE/ml vorhanden waren, um eine verlässliche Aussage treffen zu können.

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass die niedrigere Bakterienkonzentration in NA und RA der Grund für das dort vermehrte Vorkommen von homogenen Bildern in den Primärkulturen, und somit singulären Klonen in diesen Probenarten sein könnte. Allerdings sind Untersuchungen mit wesentlich mehr *S. aureus* positiven Proben notwendig, um diese Vermutung zu bestätigen. Anzumerken ist noch, dass in den meisten Fällen Nase und Rachen lediglich kolonisiert sind und dort kein optimales Milieu für eine massive Vermehrung, wie etwa in den Lungen von CF-Patienten vorliegt, was eine höhere Keimdichte dort erklärt. Hilfreich könnte somit sein,

die Konzentration von *S. aureus* in anderen Probenarten, wie z.B. Wundabstrichen von Patienten mit chronischen Wunden festzustellen, da auch in solchen Proben in der Vergangenheit heterogene Primärkulturen registriert werden konnten [39].

4.2.2 Konstanz der Bilder der Primärkulturen in aufeinander folgenden Proben

Zwar konnte nur bei 2/24 Patienten, von denen mindestens zwei Proben existieren, immer das exakt identische Bild in der Primärkultur dieser Proben gefunden werden, sodass zunächst eine zeitliche Konstanz des Bildes der *S. aureus* Population in der Primärkultur als selten erscheint. Allerdings basiert die Bezeichnung der Kolonien lediglich auf einer subjektiven Vergleichsskala, weshalb eine Kontinuität von exakt identischen Beschreibungen als eher unwahrscheinlich angesehen werden sollte, zumal auch Faktoren wie Lichtverhältnisse und Frische der Blutplatten nur schwer reproduzierbar sind. Daher ist es sinnvoller, die Kontinuität der Bilder der Primärkulturen im Hinblick auf homogene und heterogene Erscheinungen zu bewerten. Da 8/24 Patienten entweder stets homogene Bilder (3 Patienten) oder stets heterogene Bilder (5 Patienten) zeigten, und bei 16/24 Patienten sowohl homogene als auch heterogene Bilder in den Primärkulturen auftraten, muss aber auch unter diesem Aspekt festgestellt werden, dass eine zeitliche Konstanz des Bildes der *S. aureus* Population in der Primärkultur nicht häufig erscheint. Eine einleuchtende Erklärung hierfür wäre, dass in der Zeit zwischen den Probenentnahmen Faktoren wie zusätzliche AB oder Infekte durch andere Erreger die Bakterien in ihrem Metabolismus und Vermehrungszyklus beeinflusst haben.

Als kleiner, aber interessanter Nebenaspekt muss erwähnt werden, dass die morphologischen Bilder der Primärkulturen aus NA bei 3 gesunden Personen in zwei aufeinander folgenden Proben identische, homogene Bilder aufwiesen.

Zugegebenermaßen ist der Probenumfang sehr gering, sodass weiterführende Untersuchungen nötig sind, um diesen Aspekt besser zu untermauern.

4.2.3 Häufigkeit von Genotypen, Subtypen und Varianten

Im Gegensatz zum eher inkonstanten Bild der Primärkultur lässt sich allerdings eine zeitliche Konstanz einzelner GT bei den meisten Patienten feststellen. Bei 15/30 Patienten konnte stets der gleiche GT ohne Co-Kolonisation mit einem anderen GT gefunden werden. Bei 3/30 Patienten konnte zwar in jeder Probe immer nur ein einzelner GT gefunden werden, jedoch wurden bei diesen Patienten im Probenzeitraum jeweils insgesamt zwei verschiedene GT entdeckt. Daher muss hierfür ein Wechsel im Besiedlungsprofil als Ursache angesehen werden. 12/30 Patienten zeigten in mindestens einer Probe eine Co-Kolonisation von zwei verschiedenen GT. Allerdings konnte eine solche Polyklonalität nur bei 2 dieser 12 Patienten über einen längeren Zeitraum bestätigt werden. Daher ergibt sich, dass bei den meisten Patienten ein bestimmter GT verankert scheint, der in wenigen Fällen durch einen anderen GT abgelöst werden kann. Offensichtlich scheint das für CF-Patienten typische Milieu der tiefen Atemwege für *S. aureus* insofern optimale Bedingungen zu stellen, dass ein bestimmter GT, wenn einmal angesiedelt, kaum noch von dort zu verdrängen ist. Diese Beobachtung einer Dauerbesiedlung mit dem gleichen GT konnte bereits durch andere Autoren gemacht werden [8; 36]. Auch scheint unter den verschiedenen GT eher eine Konkurrenzsituation um den Verbleib als ein dauerhaft paralleles Vorkommen zu herrschen. Zwar konnten in der Vergangenheit in Sputen von CF-Patienten immer wieder zwei oder drei verschiedene *S. aureus*- Stämme parallel gefunden werden [28; 34], jedoch erscheint dieses Phänomen eher nicht als regelhaft. Noch seltener als in Sputen konnten bisher Co-Kolonisationen verschiedener *S. aureus*- Stämme in NA bei gesunden Personen nachgewiesen werden. War man früher davon ausgegangen, dass generell die meisten Infektionen monoklonal sind [60], so gibt es neuere Hinweise, dass die Häufigkeit von polyklonalen Besiedlungen in

der Nase größer sein könnte als bisher angenommen [10]. Dennoch werden solche Co-Kolonisationen insgesamt relativ selten beschrieben. Dafür sprechen auch Beobachtungen, dass in der Nase angesiedelte MSSA- Stämme einen protektiven Effekt vor einer Infektion durch MRSA- Stämme haben könnten [17]. Eine viel diskutierte Erklärung für das Vorkommen von Monobesiedlungen liegt in einer Form bakterieller Interferenz, wonach bereits etablierte Keime ein zentrales Element der Synthese von Virulenzfaktoren, das *agr*- (accessory gene regulator) System [54], von Invasoren inhibieren [33]. Dafür spricht auch, dass bisher nur in Einzelfällen nasale Co-Kolonisierungen gezeigt werden konnten, bei denen dann auch beide Stämme der gleichen *agr*-Interferenzgruppe angehörten [28]. Da ferner gezeigt werden konnte, dass das *agr*-System während einer Lungeninfektion bei CF-Patienten nicht aktiviert ist [30], spricht dies zwar einerseits für die häufigere Beobachtung von Co-Kolonisierungen in Sputen im Vergleich zu Proben aus der Nase. Andererseits stellt man Co-Kolonisierungen in Sputen von CF-Patienten aber immer noch viel zu selten fest, als dass dieser Fakt alleine als Erklärung genügen kann. Zu erwarten wäre demnach, dass andere Interferenzmechanismen für die zumeist beobachtete Kolonisation mit einem bestimmten Stamm verantwortlich sind.

Es scheint, dass diese Phänomene ST und Varianten Veränderungen während einer Infektion reflektieren, wofür das gehäufte Vorkommen bei CF-Patienten im Vergleich zu gesunden Personen spricht. Im Gegensatz zu den GT kann bei ST und deren Varianten allerdings nicht von bestimmten Typen gesprochen werden, die einem speziellen Patienten quasi zugeordnet werden können. Lediglich die Anzahl der ST und Varianten im Hinblick auf die Anzahl der Proben, die diese ST und Varianten enthalten, lässt sich aus den Daten dieser Studie diskutieren. Ob diese begrenzt oder nach oben offen sind, kann letztlich allerdings noch nicht abschließend beantwortet werden. Nach den Daten dieser Studie scheint eine Begrenzung jedenfalls nicht ausgeschlossen zu sein, was bedeuten würde, dass jedem GT nur eine bestimmte Anzahl von Mutationen, und damit an ST, zugeschrieben werden kann. Dies lässt sich durch die Konvention, dass ST eines GT durch höchstens drei Bandenabweichungen

vom Referenzmuster des GT charakterisiert sind, unterstreichen. Auch in Bezug auf Varianten kann eine begrenzte Anzahl durch die festgelegten Beschreibungskriterien und deren Abstufungen leicht eingesehen werden.

4.2.4 Einflussfaktoren auf die Bildung von Subtypen und Varianten

4.2.4.1 Einflussfaktor 1: Bakterienkonzentration

Wie bereits in Abschnitt 4.2.1 erwähnt, konnte entdeckt werden, dass eine Bakterienkonzentration von mindestens 10^5 KBE/ml in den Sputumproben die Häufigkeit des Vorkommens eines heterogenen Bildes der zugehörigen Primärkultur signifikant erhöht. Dadurch erklärt sich auch das in diesen Proben vermehrte Vorkommen von ST und Varianten. Daraus kann geschlossen werden, dass das Milieu der tiefen Atemwege gute Bedingungen für eine Vermehrung bereitstellt und damit hauptsächlich eine hohe Keimzahl, und daraus folgend auch vermehrt Mutationen und Unterschiede in der Genexpression, induziert. Dies kann daher als entscheidender Faktor für die Ausbildung von ST und Varianten angesehen werden. Dazu passende Ergebnisse wurden in der Arbeit von KLINGEBIEL, der direkten Vorarbeit dieser Studie, erzielt. Dort wurden Varianten von *S. aureus* hauptsächlich in CF-Sputen und in Trachealsekretproben intubierter Patienten gefunden [39].

4.2.4.2 Einflussfaktor 2: Antibiotikatherapie

Die Verabreichung von AB hat nach Ergebnissen dieser Studie in den tiefen Atemwegen Einfluss auf die Ausbildung von ST, nicht aber auf die Bildung von Varianten. Da durch AB möglicherweise Phagen mobilisiert werden, die für Genomveränderungen, wie sie bei ST gefunden werden, verantwortlich sein können [29], läge hierin eine Erklärung für die Entstehung von ST. Eine solche Genomveränderung ist beispielsweise die durch *h1b*-konvertierende Phagen

hervorgerufene, morphologisch sichtbare Nicht-Exprimierung der β -Hämolyse. Da allerdings auch bei Varianten, also genomisch identischen Klonen genau dieser Unterschied, wie auch schon in der Vorgängerarbeit [39], gefunden wurde, bleibt festzuhalten, dass offensichtlich bestimmte Merkmale nicht nur durch Genmutationen, die mittels PFGE und Southern Analyse objektiviert werden können, verursacht werden. Vielmehr scheint zumindest das Merkmal „ β -Hämolyse“ auch auf Regulatorebene gesteuert zu werden. Hierin könnte letztlich generell auch der Entstehungsmechanismus von Varianten zu finden sein. Ob dabei Mutationen in Regulatorgenen und/ oder an sich verändernde Milieus anpassende Regulationsmechanismen eine Rolle spielen, bleibt bisher allerdings Spekulation.

Erwähnt werden muss in obigem Zusammenhang, dass die Entstehung der Small-Colony Variants (SCV) möglicherweise auf den prophylaktischen Einsatz von Trimethoprin-Sulfamethoxazol (TMP-SMX) zurückgeht. SCV konnten bei CF- Patienten isoliert werden, die fast alle zuvor prophylaktisch mit TMP-SMX behandelt wurden [35]. Inwiefern diese Stämme Einfluss auf den Krankheitsverlauf der Patienten nehmen, bleibt aber ungewiss.

4.2.4.3 Einflussfaktor 3: Co-Kolonisation mit *Pseudomonas aeruginosa*

Die Co-Kolonisation mit *P. aeruginosa* in den tiefen Atemwegen scheint weder auf die Ausbildung von ST, noch von Varianten von *S. aureus* einen Einfluss zu haben. Zwar wurden bereits Interaktionen zwischen beiden Keimen beschrieben, wie etwa die allgemeine antistaphylogene Wirkung von *P. aeruginosa* oder dessen Beeinflussung des *agr*-Systems von *S. aureus* [49]. Ob dies jedoch mögliche Erklärungen für die Ausbildung von ST oder Varianten von *S. aureus* darstellen, ist äußerst fraglich.

In diesem Kontext muss erwähnt werden, dass in der Vorgängerarbeit zu dieser Studie ein signifikanter Zusammenhang zwischen Variantenbildung von *S.*

aureus und Co-Kolonisation mit *P. aeruginosa* gezeigt werden konnte ($p=0.0069$; Likelihood Ratio Test) [39]. Nur Untersuchungen mit größeren Fallzahlen können letztlich klären, ob ein Zusammenhang besteht oder nicht.

4.2.4.4 Einflussfaktor 4: MRSA- Stämme

Die Ergebnisse dieser Studie lassen erkennen, dass MRSA- Stämme sowohl eher zur Ausbildung von ST, als auch zur Ausbildung von Varianten neigen, als MSSA- Stämme. Dies könnte an der erhöhten Anpassungsfähigkeit solcher Stämme liegen, die bereits durch den Erwerb des *SCCmec*- Gens eine bessere Überlebensgrundlage erreicht haben. Somit könnten sich MRSA-Stämme unter Umständen schneller an veränderte Bedingungen anpassen. Dies wird durch eine Studie unterstrichen, bei der alle MRSA-Stämme, die zwischen 1971 und 2002 in Irland auftraten, hinsichtlich Variationen im *SCCmec*- Gen untersucht wurden. Dabei konnten 20 MRSA-Stämme identifiziert werden, wovon 19 bereits zuvor als MRSA bekannt waren. Überraschenderweise zeigte sich bei 9 dieser 19 Stämme eine bis dato unbekannte *SCCmec*- Variante [65]. Daher kann auf schnelle Genveränderungen mit in Folge höheren Überlebenschancen rückgeschlossen werden. Inwiefern die Ausbildung von ST und Varianten ein Marker für eine solche bessere Anpassungsfähigkeit ist, bleibt allerdings so lange Spekulation, bis diese in epidemiologischen Studien solchen Veränderungen im *SCCmec*- Gen exakt zugeordnet werden können.

4.2.4.5 Einflussfaktor 5: Lagerungsweise und Zeit bis zur Verarbeitung der Probe

Die Vermutung, dass Zeit und Lagerung der Sputen bis zu deren Verarbeitung einen Einfluss auf die Variantenbildung haben könnten, kann nicht bestätigt werden. Zwar wäre ein solcher Einfluss durch die Tatsache, dass RS erst nach mehrstündiger Lagerung bei Zimmertemperatur und anschließend mehrtägiger

Lagerung bei 4°C schließlich bei –20°C tiefgefroren wurden, während SSS augenblicklich nach Abgabe bei –70°C eingefroren werden konnten, denkbar. Allerdings wäre dann ein wesentlich größerer Unterschied bezüglich des Auftretens von Varianten in diesen Probenarten zu erwarten. Da 36,4% (8/22) der SSS Varianten aufwies und dagegen nur 43,6% (41/94) der RS, ist davon auszugehen, dass obige Faktoren keinen Einfluss auf die Variantenbildung haben. Dies wird ferner dadurch unterstrichen, dass nur in 1/11 Fällen, in denen RS und SSS am gleichen Tag gewonnen wurden, mehr Varianten im RS als im SSS gefunden werden konnten und in 1/11 Fällen sogar mehr Varianten im SSS als im RS entdeckt wurden (Tab. 17).

4.2.4.6 Einflussfaktor 6: Lokalisation in den tiefen Atemwegen

Die Lokalisation in den tiefen Atemwegen konnte in dieser Studie teilweise als begünstigender Faktor für die Ausbildung von ST und Varianten erkannt werden. Dies wird durch Vergleiche zwischen dem Vorkommen von Varianten in den oberen Atemwegen (NA und RA) und den tiefen Atemwegen (Sputum) aufgezeigt. Es konnte gezeigt werden, dass im Sputum sowohl die Ausbildung von gleichzeitig zwei oder mehr ST, als auch das Vorkommen von gleichzeitig zwei oder mehr Varianten, signifikant häufiger zu finden war als in RA. Auch hier verhinderte allerdings die geringe Anzahl an positiven Proben für NA (n=10) eine sichere Beurteilung des Vergleichs Sputum vs NA. Daher kann noch keine allgemeine Aussage über ein signifikant häufigeres Vorkommen von gleichzeitig zwei oder mehr ST und/ oder Varianten in den tiefen Atemwegen bei CF-Patienten getroffen werden. In diesem Zusammenhang muss auch erwähnt werden, dass künftig nicht nur weitere Untersuchungen von NA bei CF-Patienten, sondern auch von gesunden Personen durchgeführt werden sollten.

Die Vermutung, dass in den tiefen Atemwegen Einfluss auf die Ausbildung von ST und/ oder Varianten genommen wird, könnte mittels der verminderten Clearance der Patienten, bedingt durch den genetischen Defekt und der

dadurch veränderten Schleimzusammensetzung und –sekretion, erklärt werden. Durch eine solch verminderte Clearance wird das Milieu für die Kolonisation von Bakterien wesentlich verbessert. Diese These wird durch die Dissertationsarbeit von KLINGEBIEL unterstützt, die im Trachealsekret intubierter Patienten eine ähnlich hohe Quote von Varianten von *S. aureus* wie in CF-Sputen fand. Bei intubierten Patienten könnte der endotracheale Tubus für die Herabsetzung der Clearance verantwortlich sein [39]. Inwiefern diese Hypothesen zutreffen muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Insbesondere sollten Studien mit wesentlich mehr *S. aureus* positiven Proben aus NA und RA die Unterschiede zwischen oberen und tiefen Atemwegen genauer quantifizieren.

4.3 Methodische Kritik

4.3.1 Anzahl der Probenmengen

Die geringe Anzahl an *S. aureus* positiven RA (n=19) und vor allem NA (n=10) verhindert in vielen Vergleichen dieser Probenarten mit der Probenart Sputum eine sichere Aussage über signifikante Unterschiede. Dadurch wird hauptsächlich erschwert, Vergleiche zwischen den oberen und unteren Atemwegen zu ziehen. Wie bereits erwähnt kann dadurch ebenfalls nicht beurteilt werden, ob die für Sputum gefundene Konzentrationsgrenze von 10^5 KBE/ml, die eine signifikante Erhöhung des Vorkommens heterogener Bilder der Primärkulturen markiert, auch für die Probenarten NA und RA gilt.

Leider ist auch noch nicht restlos geklärt, ob die Phänomene ST und Varianten von *S. aureus* im Sputum vor allem aufgrund der in den tiefen Atemwegen höheren Bakterienkonzentration und/ oder aufgrund des dort günstigeren Milieus im Vergleich zum Nasen- und Rachenraum häufiger registriert werden. Nur Studien mit wesentlich mehr *S. aureus* positiven NA können hierfür Klarheit schaffen.

Um die in einigen Fällen nur knapp signifikanten Ergebnisse, ob ST und/ oder Varianten häufiger unter den aufgeführten Einflussfaktoren gebildet werden besser untermauern zu können, wären ebenfalls Studien mit einer größeren Anzahl an Proben nötig. Dies gilt ebenso für die Frage nach der Anzahl der ST und Varianten in Abhängigkeit von der Probenanzahl, die den jeweiligen ST bzw. die jeweilige Variante enthalten.

4.3.2 Reproduzierbarkeit des morphologischen Bildes der Primärkultur

Da sich die Primärkulturen von RS und SSS von einzelnen Patienten, die am gleichen Tag gewonnen wurden nicht immer exakt entsprachen, und sogar in 4/11 Fällen bestimmte GT oder ST nur in einer der beiden Proben gefunden wurden, sollte in 6 stichprobenartigen Kontrollen gezeigt werden, ob eine exakte Reproduzierbarkeit nicht nur der morphologischen Bilder in der Primärkultur, sondern auch der Isolierung aller vorkommenden GT und ST erreichbar ist. Da dies in vollem Umfang in 0/6 Stichproben gelang und außerdem generell die Morphen einzelner Kolonien sehr geringe Unterschiede zeigen können, wirft sich die Frage nach dem wahren Wert der Prävalenz von Varianten auf. Während ST einzelner GT durch PFGE eindeutig abgegrenzt werden können, basiert die Abgrenzung der Varianten einzelner ST auf einer rein subjektiv-visuellen Beschreibung des morphologischen Bildes der Primärkultur. Daher ist ein Quervergleich von Varianten einzelner ST, die zu unterschiedlichen Zeiten oder gar aus unterschiedlichen Primärkulturen gewonnen werden, schwierig. Hinzu kommt, dass auch die Frische der Blutagarplatten, sowie die Lichtverhältnisse während der Dokumentation leicht zu unterschiedlichen Beschreibungen führen können. Somit sind Zweifel bezüglich der tatsächlichen Größe der Variantenvielfalt von ST, die in unterschiedlichen Proben gefunden werden, durchaus angebracht. Auf eine genauere Verifizierung dieses Sachverhalts wurde im weiteren aber nicht eingegangen. Statt dessen sollte das Phänomen der Variantenbildung innerhalb

einer Primärkultur genauer beleuchtet werden. Um die Unterschiedlichkeit von Varianten eines ST in der gleichen Primärkultur deutlich zu machen, wurde mittels des selbst entworfenen Punktesystems versucht, ein Schema zu entwickeln, das die Möglichkeit von Beschreibungsfehlern in Betracht zieht. Dabei soll gelten, dass je weniger Punkte sich im Vergleich ergeben, desto wahrscheinlicher ein Beschreibungsfehler vorliegen könnte.

Das Punktesystem wurde auf alle Varianten von ST der gleichen Primärkulturen angewendet. Es ergab sich in 70,5% der Fälle ein Punktwert von drei oder mehr, was die Existenz dieser Varianten mit hoher Wahrscheinlichkeit bestätigen soll. In 13,7% der Fälle war eine Differenz von zwei und in 15,8% von nur einem Punkt zu verzeichnen. Bei zwei dieser Fälle handelt es sich um Varianten in NA und in einem weiteren Fall um die einzige gefundene Variante in den RA. Würde man diese dadurch als fraglich existente Varianten als Beschreibungsfehler ansehen, würde sich der prozentuale Anteil von Proben mit Varianten bei den NA aufgrund der kleinen Fallzahl drastisch verringern. Dies würde den für die These, dass Varianten hauptsächlich in den tiefen Atemwegen auftreten, hier eigentlich zu hohem prozentualen Anteil von Varianten in NA von 30%, entsprechend anpassen. Jedoch ist eine solche Interpretation mit erheblicher Vorsicht zu betrachten, wie am Beispiel von Abb. 3 (vgl. Seite 50) ersichtlich ist. Dort wurden die Kolonien A, B und C folgendermaßen beschrieben:

A: rund/ groß; gelb; ,+' / keine β -Hämolyse

B: rund/ groß; grau/ gelb; ,++' / keine β -Hämolyse

C: rund/ groß; gelb; ,++' / keine β -Hämolyse

Im vorliegenden Beispiel ergibt sich also für die nach erfolgter PFGE (siehe Abschnitt 3.3) als Varianten zu klassifizierende Kolonien A und B ein Punktwert von 2. Vergleiche der Kolonien A und B mit Kolonie C, die nach PFGE als anderer GT identifiziert werden konnte, ergäben allerdings jeweils nur 1 Punkt! Daraus erkennt man, dass Varianten eines Stammes deutlichere

morphologische Unterschiede aufweisen können als unterschiedliche GT! Daher verbietet sich eine pauschale Negierung von Varianten bei niedrigen Punktwerten. Es wird deutlich, dass das Punktesystem nur Aussagen über mehr oder weniger wahrscheinliche Beschreibungsfehler erlaubt.

Ebenso wird deutlich, dass die Differenzierung von Kolonien in der Primärkultur in unterschiedliche GT, ST und Varianten allein durch die morphologische Beschreibung nicht möglich ist. Im Hinblick auf AB- Resistenzbestimmungen bedeutet dies, dass durch Testung aller morphologisch unterschiedlichen Kolonien die Wahrscheinlichkeit alle vorkommenden GT der Probe erfassen zu können deutlich erhöht und so die Auswahl der AB optimiert werden kann. Verdeutlicht wird dies durch die Ergebnisse einer französischen Studie, worin aus Primärkulturen jeweils nur eine Kolonie detailliert untersucht wurde. Man beobachtete dabei in Folgeuntersuchungen des Sputums von CF-Patienten über einem Zeitraum von 12-28 Monaten in 11/25 Fällen ein Auftreten verschiedener ST einzelner GT. In 2/25 Fällen wurden in diesem Zeitraum zwei verschiedene GT beobachtet [8]. Inwiefern eine parallele Kolonisation unterschiedlicher ST oder GT bei diesen Patienten vorlag kann natürlich nicht beurteilt werden, zeigt aber die Notwendigkeit einer umfassenderen Resistenzbestimmung, welche andere Autoren bereits durchgeführt haben. So wurden in einer britischen Studie zur Identifikation von Co-Kolonisationen mit MSSA- und MRSA- Stämmen in der Nase aus jeder Probe 30 Kolonien isoliert. Es konnte hier bei 4/680 (0,6%) der Patienten eine solche Co-Kolonisation festgestellt werden [17]. In der vorliegenden Studie konnten neben den 8 Fällen von geringen Resistenzunterschieden bei Varianten einer Probe in 2 weiteren Fällen (Probe 91/Patient 1 und Probe 53/Patient 23) unterschiedliche Varianten einer Probe als einerseits MRSA und andererseits MSSA identifiziert werden. Dadurch wird deutlich, dass selbst auf der Stufe der Varianten schwer wiegende Resistenzunterschiede bestehen können. Der Aufwand solcher umfangreichen Untersuchungen muss dabei natürlich hinterfragt werden. Da allerdings die eminente Bedeutung der Frage, ob ein MSSA- oder ein MRSA-Stamm vorliegt, für weitere Maßnahmen wie z.B. Isolation im Falle eines

stationären Aufenthaltes nicht zu leugnen ist, sind neueste mathematische Verfahren, die je nach Probenmenge die Anzahl der zu untersuchenden Klone mit 5-20 relativ gering halten, zu begrüßen [12].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Vielfalt von Varianten wohl nicht exakt bestimmt werden kann. Die subjektiv-visuelle Beschreibung ist keine reproduzierbare Methode, die eine eindeutige Abgrenzung hervorbringt. Da zusätzlich auch die Isolierung sämtlicher in einer Probe vorkommenden GT und ST nicht in allen Fällen wiederholbar ist und sich obendrein völlig unterschiedliche GT wesentlich ähnlicher sehen können als Varianten, scheint die vollständige Identifikation aller in einer Probe vorkommenden GT, ST und Varianten wenn überhaupt nur durch mehrere, parallel angezogene Primärkulturen möglich zu sein. Dagegen zeigt ein Ausblick auf die Resultate der Nachfolgearbeit in der Arbeitsgruppe interessante Vorergebnisse. Es scheint, dass sich die morphologische Erscheinung der eingefrorenen Klone dieser Studie nach erneuter Kultivierung exakt reproduzieren lässt. Dies würde bedeuten, dass die Ursache der schlechten Reproduzierbarkeit der Probeninhalte im Milieu der Probe selbst bzw. in der Interaktion der dort ansässigen Keime zu finden ist.

4.4 Phagenmobilisation

Die Beobachtung, dass Genomveränderungen von *S. aureus* bei CF-Patienten im Vergleich zu gesunden *S. aureus*- Trägern signifikant häufiger sind, konnte auch auf die Mobilisierung von *h1b*-konvertierenden Phagen zurückgeführt werden. Es wird vermutet, dass diese in vivo Phagenmobilisation mit der regelmäßigen Antibiotikaexposition zu tun haben könnte, da CF-Patienten auch prophylaktisch mit AB therapiert werden [29]. Hier konnten 8/33 Bandenabweichungen, die sich als ST des sonst beim Patienten vorherrschenden GT zeigten, auf *h1b*-konvertierende Phagen, die Sak exprimieren, zurückgeführt werden. In 6 dieser 8 Fälle lag eine AB- Therapie

zum Zeitpunkt der Probenentnahme vor, und nur in 1 Fall wurde gerade nicht mit AB therapiert, was obige These untermauert. In 1 Fall gab die Akte keine Auskunft, ob eine AB-Therapie vorlag oder nicht. Da die restlichen 25 Bandenabweichungen nicht weiter untersucht wurden, kann über deren Ursachen, wie z.B. weitere Phagentypen keine Aussage getroffen werden .

4.5 Unterschiede im Antibiotika- Resistenzmuster von Varianten

Es wurde untersucht, ob bei Varianten, die in der gleichen Probe gefunden wurden, signifikante Unterschiede im AB- Resistenzmuster auftraten. Gefunden wurden vereinzelte Abweichungen in 9/53 Proben. Getestet wurden jeweils 15 bis 18 verschiedene AB. Die einzelnen Unterschiede betrafen in 8 Fällen nur ein AB und in 1 Fall drei AB. Dadurch zeigt sich, dass Varianten nicht in allen Fällen identisch in ihren Resistenzmustern sind. Zwar sind die Unterschiede relativ gering und auch nicht sehr zahlreich, jedoch betreffen sie auch die in der Klinik häufig gewählten AB Erythromycin, Clindamycin und Co-Trimoxazol. Daher zeigt sich unter diesem Aspekt erneut, dass eine selektive Testung aller morphologisch unterschiedlicher Kolonien einer Probe wünschenswert ist. Dies sollte nicht zuletzt auch deshalb erfolgen, weil theoretisch eine parallele Kolonisation von MRSA- und MSSA- Stämmen vorliegen kann. Eine solche Co-Kolonisation konnte in dieser Studie in einem Fall gefunden werden, bei dem in zweimaliger Testung zwei Varianten einer Probe stets als MSSA und MRSA identifiziert wurden.

Da nach den Erkenntnissen dieser Studie allein die unterschiedliche Morphe nichts darüber aussagt, ob Varianten eines ST, verschiedene ST eines GT oder unterschiedliche GT vorliegen, und gezeigt werden konnte, dass quasi auf allen drei Ebenen Unterschiede im Resistenzmuster auftreten können, kann hier abschließend nur nochmals auf die Bedeutung einer umfassenden Resistenzprüfung hingewiesen werden.

Interessanterweise konnten KAHL et al. zeigen, dass sich bei SCV und klonal identischen „normalen“ Stämmen der gleichen Probe fast immer Unterschiede in der Sensibilität gegenüber Folsäureantagonisten- AB (z.B. Co-Trimoxazol) und Gentamicin zeigten. Hierbei scheinen die SCV eher resistent und die „normalen“ Stämme eher sensibel zu sein [36]. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie über Unterschiede im AB- Resistenzmuster bei Varianten sind zwar sehr gering, zeigen aber doch insofern einen interessanten Aspekt, als von den 9 festgestellten Abweichungen in den Resistenzmustern 4 Fälle Gentamicin und 1 Fall Co-Trimoxazol betreffen, auch wenn bezüglich der Koloniegröße die für SCV geforderten Entsprechungen nicht zu finden waren.

4.6 In-situ-Hybridisierung und Immunfluoreszenz

4.6.1 In-situ-Hybridisierung

Durch die selektive Bindung der verwendeten PNA- Sonde an die 16S rRNA von *S. aureus* kann mittels Fluoreszenzmikroskopie dieser eindeutig erkennbar gemacht werden [57]. Daher kann nicht nur das Auffinden von *S. aureus* in den Proben, sondern auch die hierdurch geschaffene Grundlage zur Beurteilung einer anschließenden Immunfluoreszenz als etabliert betrachtet werden.

In der Dissertationsarbeit von KNÜMANN konnte gezeigt werden, dass inhomogene Fluoreszenzmuster einzelner Bakterienhaufen wie auch von gesamten Proben in der In-situ-Hybridisierung dafür stehen, dass sich einzelne Bakterien in unterschiedlichen Phasen der Reproduktion befinden. Dabei ist die Intensität der Fluoreszenz an die Stärke der Teilungsrate gekoppelt [40]. In der vorliegenden Studie wurden in nahezu allen Proben, in denen *S. aureus* entdeckt wurde, teils homogene, teils inhomogene Fluoreszenzmuster einzelner Cluster aufgefunden. Auch innerhalb der Proben konnte häufig kein einheitliches Bild verzeichnet werden. Rückschlüsse auf ST oder gar Varianten als zu Grunde liegende Ursache sollten allerdings mit großer Vorsicht erwogen

werden, da auch in vielen Proben, die in der Primärkultur ein homogenes Bild zeigten, uneinheitliche Fluoreszenzmuster gefunden wurden.

4.6.2 Immunfluoreszenz für Protein A

Eine sichere Beurteilung über die Exprimierung von SpA durch Fluoreszenzmikroskopie ist schwierig, da allein die Leuchtstärke in einem visuellen Vergleich zu Negativkontrollen über die Befundung entscheidet. Da sowohl bei der SpA negativen Mutante „DU 5723“, wie auch bei der durchgeführten Negativkontrolle mit einem SpA negativen *S. epidermidis*-Stamm eine geringe Fluoreszenzreaktion zu verzeichnen war, liegt die Vermutung nahe, dass der verwendete AK in geringer Form auch noch mit anderen Oberflächenproteinen reagiert. Dazu kommt, dass mit zunehmender Größe der Cluster die Stärke der Fluoreszenz zuzunehmen scheint. Daher ist eine sichere Beurteilung schwierig. Hinzu kommt, dass bei intrazellulärer Lage der Bakterien der AK nicht zu diesen gelangen und somit auch keine Reaktion entstehen kann. In diesen Fällen ist eine Beurteilung gänzlich unmöglich. Da die Synthese von SpA in der frühen exponentiellen Phase schnell induziert wird, um später noch in dieser Phase rapide auf den Transkriptionslevel herunterreguliert zu werden [53], kann ein positiver Befund nur erhoben werden, wenn sich die Bakterien gerade in der frühen exponentiellen Phase befinden. Dabei hilft, dass eine starke Fluoreszenzintensität in der FISH als Marker für eine hohe Teilungsaktivität gilt. Zusammenfassend kann somit zumindest bei einer starken Fluoreszenzreaktion davon gesprochen werden, dass die Wahrscheinlichkeit einer gegenwärtigen Exprimierung von SpA gegeben ist. Gefunden wurden solch starke Reaktionen in 1/10 NA, in 5/19 RA und in 8/22 SSS, weshalb zu vermuten ist, dass SpA hauptsächlich in den tiefen Atemwegen exprimiert wird.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Staphylococcus aureus verursacht bei Patienten mit Cystischer Fibrose (CF) häufig eine persistierende Lungeninfektion. Hierbei kommt es, wahrscheinlich als Folge selektiver Anpassung an die veränderte Wirtsumgebung, zu spezifischen Veränderungen der Bakterien. Ziel dieser Arbeit war es, die Diversifikation der Bakterien während der Infektion zu erfassen. Hierzu wurde *S. aureus* aus Nasen- und Rachenabstrichen sowie aus Sputumproben von CF-Patienten untersucht. Das Auftreten heterogener Primärkulturen (Kulturen mit Kolonien verschiedener Morphologie, charakterisiert durch Unterschiede in Größe, Farbe und Hämolyseausprägung) wurde erfasst und alle unterschiedlichen Kolonien wurden durch Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) typisiert. Zusätzlich wurden die Proben ohne weitere Subkultivierung mikroskopisch analysiert.

In Sputumproben ist die Prävalenz von *S. aureus* deutlich höher als in Proben der oberen Atemwege. Ebenso ist die Prävalenz heterogener Primärkulturen in Sputumproben höher als in Proben der oberen Atemwege. Das Auftreten von heterogenen Proben korreliert mit der Keimdichte. Die Typisierung der Stämme heterogener Sputumproben zeigte, dass in 19/97 Fällen eine Co-Kolonisierung verschiedener Genomtypen (GT), in 29/97 Fällen eine Co-Kolonisierung von Subtypen (ST; ≤ 3 Bandenabweichungen im PFGE-Gel) und in 49/97 Fällen Varianten (Isolate genetisch ohne Unterschied) vorlagen. Meist herrscht bei einem Patienten ein bestimmter GT vor, der über längere Zeiträume nachweisbar ist. ST und Varianten treten bei Methicillin resistenten Stämmen häufiger auf als bei Methicillin sensiblen. Das parallele Auftreten verschiedener ST in Sputumproben korreliert mit einer vorhergehenden Antibiotikatherapie. Das Auftreten von ST konnte teilweise auf die Integration von *h1b*-konvertierenden Phagen zurückgeführt werden. Unterschiede im Antibiotika-Resistenzmuster von Varianten, die in der gleichen Primärkultur vorkamen, konnten in 9/53 Proben gefunden werden. In Immunfluoreszenzanalysen konnte gezeigt werden, dass die Protein A- (SpA) Expression stark

stammabhängig ist und innerhalb einer Probe stark variiert. Eine Korrelation zwischen SpA- Expression und Atemwegslokalisation konnte nicht gefunden werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es während der chronischen Lungeninfektion zu einer starken Diversifikation der *S. aureus* Population kommt. Dies kann als Anpassungsstrategie der Bakterien an die spezifischen Bedingungen in den Lungen von CF-Patienten interpretiert werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Archer G.L., Climo M.W. (2001) *Staphylococcus aureus* Bacteremia - Consider the Source. N Engl J Med 344 (1); 55-56. Editorials.
- [2] Arvidson S.: Extracellular Enzymes p.379. In Fischetti V.A., Novick R.P., Feretti J.J., Portnoy D:a., Rood J.I. (eds): Gram-Positive Pathogens. ASM Press, Washington D.C., 2000.
- [3] Bannerman T.L., Hancock G.A., Tenover F.C., Miller J. M. (1995) Pulsed-Field Gel Electrophoresis as a Replacement for Bacteriophage Typing of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 33; 551-555.
- [4] Bauernfeind A., Emminger G., Horl G., Lorbeer B., Przyklenk B., Weisslein Pfister C. (1987) Selective pressure of antistaphylococcal chemotherapeutics in favour of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Infection 15; 469-470.
- [5] Bohach G.A., Foster T.J.: *Staphylococcus aureus* Exotoxins p.368. In Fischetti V.A., Novick R.P., Feretti J.J., Portnoy D:a., Rood J.I. (eds): Gram-Positive Pathogens. ASM Press, Washington D.C., 2000.
- [6] Boles B.R., Thoendel M., Singh P.K. (2004) Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. PNAS 101(47); 16630-16635.
- [7] Booth M.C., Pence L.M., Mahasreshti P., Callegan M.C., Gilmore M.S. (2001) Clonal associations among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infection. Infect Immun 69; 345-352.
- [8] Branger C., Gardye C., Lambert-Zechovsky N. (1996) Persistence of *Staphylococcus aureus* strains among cystic fibrosis patients over extended periods of time. J Med Microbiol 45; 294-301.
- [9] Casewell M.W. (1998) The nose: an underestimated source of *Staphylococcus aureus* causing wound infections. J Hosp Infect 40; 3-11.
- [10] Cespedes C., Battouli S.S., Miller M., Lo S.H., Kreiswirth B.N., Gordon R.J., Vavagiakis P., Klein R.S., Lowy F.D. (2005) The Clonality of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage. J Infect Dis 191; 444-452.
- [11] Chang S., Sievert D.M., Hageman J.C., Boulton M.L., Tenover F.C., Downes F.P., Shah S., Rudrik J.T., Pupp G.R., Brown W.J., Cardo D., Fridkin S.K. (2003) Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the *vanA* Resistance Gene. N Engl J Med 348; 1342-1347.
- [12] Coen P.G., Wilks M., Dall'Antonia M., Millar M. (2005) Detection of multiple-strain carriers: The value of re-sampling. J Theo Biol article in press (uncorrected proof); available online at www.sciencedirect.com.

- [13] Coleman D., Arbuthnott J., Pomeroy H., Birbeck T. (1986) Cloning and expression in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* of the beta-lysin determinant from *Staphylococcus aureus*: evidence that bacteriophage conversion of beta-lysin activity is caused by insertional inactivation of the beta-lysin determinant. *Microb Pathog* 1; 549-564.
- [14] Coleman D., Knights J., Russell R., Shanley D., Birbeck T.H., Dougan G., Charles I. (1991) Insertional inactivation of the *Staphylococcus aureus* β -toxin by bacteriophage Φ 13 occurs by site- and orientation-specific integration of the Φ 13 genome. *Mol Microbiol* 5; 933-939.
- [15] Coleman D., Sullivan D.J., Russell R., Arbuthnott J.P., Carey B.F., Pomeroy H.M. (1989). *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of β -Lysin, staphylokinase and enterotoxin a: molecular mechanism of triple conversion. *J Gen Microbiol* 135; 1679-1697.
- [16] Corbella X., Dominguez M.A., Pujol M., Ayats J., Sendra M., Pallares R., Ariza J., Gudiol F. (1997) *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage as a Marker for Subsequent Staphylococcal Infections in Intensive Care Unit Patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16; 351-357.
- [17] Dall'Antonia M., Coen P.G., Wilks M., Whiley A., Millar M. (2005) Competition between methicillin-sensitive and -resistant *Staphylococcus aureus* in the anterior nares. *J Hosp Infect* 61; 62-67.
- [18] Domanski P.J., Patel P.R., Bayer A.S., Zhang L., Hall A.E., Syribeys P.J., Gorovits E.L., Bryant D., Vernachio J.H., Hutchins J.T., Patti J.M. (2005) Characterization of a Humanized Monoclonal Antibody Recognizing Clumping Factor A Expressed by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 73 (8); 5229-5232.
- [19] von Eiff C., Becker K., Machka K., Stammer H., Peters G. (2001) Nasal Carriage as a Source of *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *N Engl J Med* 344 (1); 11-16.
- [20] Ellison III R.T., Judson F. N., Peterson L.C., Cohn D.L., Ehret J.M. (1984) Oral Rifampin and Trimethoprim/Sulfamethoxazole Therapy in Asymptomatic Carriers of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. *West J Med* 140(5); 735-740.
- [21] Enright M.C., Robinson D.A., Randle G., Feil E.J., Grundmann H. Sprat B.G. (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PNAS* 99 (11); 7687-7692.
- [22] Fischetti V.A.: Surface Proteins on Gram-Positive Bacteria p.11. In Fischetti V.A., Novick R.P., Feretti J.J., Portnoy D.a., Rood J.I. (eds): *Gram-Positive Pathogens*. ASM Press, Washington D.C., 2000.

- [23] Foster T.J., Höök M. (1998) Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol 6 (12); 484-488.
- [24] Gentry-Weeks C., Coburn P., Gilmore M.S. (2002) Phages and other mobile virulence elements in gram-positive pathogens. Curr Top Microbiol Immunol 264; 79-94.
- [25] Gilligan P.H., Gage P.A., Welch D.F., Muszynski M.J., Wait K.R. (1987) Prevalence of thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 25; 1258-1261.
- [26] Goerke C., Campana S., Bayer M.G., Döring G., Botzenhart K., Wolz C. (2000) Direct quantitative transcript analysis of the *agr* regulon of *Staphylococcus aureus* during human infection in comparison to the expression profil *in vitro*. Infect Immun 68; 1304-1311.
- [27] Goerke C., Kraning K., Stern M., Döring G., Botzenhart K., Wolz C. (2000) Molecular epidemiology of community-acquired *Staphylococcus aureus* in families with and without Cystic Fibrosis patients. J Infect Dis 181; 984-989.
- [28] Goerke C., Kümmel M., Dietz K., Wolz C. (2003) Evaluation of intra-species interference due to *agr* polymorphism in *Staphylococcus aureus* during infection and colonization. J Infect Dis 188; 250-256.
- [29] Goerke C., Matias y Papenber S., Dasbach S., Dietz K., Ziebach R., Kahl B.C., Wolz C. (2004) Increased Frequency of Genomic Alterations in *Staphylococcus aureus* during Chronic Infection is in Part due to Phage Mobilization. J Infect Dis 189; 724-734.
- [30] Goerke C., Wolz C. (2004) Der Virulenzregulator *agr* von *Staphylococcus aureus*: Bedeutung in Pathogenese und Epidemiologie. Hyg Mikrobiol 8; 75-80.
- [31] Gomez M.I., Lee A., Reddy B., Muir A., Soong G., Pit A., Cheung A., Prince A. (2004) *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. Nature Med 10 (8); 842-848.
- [32] Höök M., Foster T.J.: Staphylococcal Surface Proteins p.386. In Fischetti V.A., Novick R.P., Feretti J.J., Portnoy D.a., Rood J.I. (eds): Gram-Positive Pathogens. ASM Press, Washington D.C., 2000.
- [33] Ji G., Beavis R., Novick R.P. (1997) Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. Science 276; 2027-2030.
- [34] Kahl B.C., Becker K., Clasen J., Sinha B., von Eiff C., Peters G. (2003) *agr*-dependent bacterial Interference has no Impact on long-term Colonization of *Staphylococcus aureus* during persistent Airway Infection of Cystic Fibrosis. J Clin Microbiol 41; 5199-5201.

- [35] Kahl B.C., Belling G., Reichelt R., Herrmann M., Proctor R.A., Peters G. (2003) Thymidine-Dependent Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus* Exhibit Gross Morphological and Ultrastructural Changes Consistent with Impaired Cell Separation. *J Clin Microbiol* 41; 410-413.
- [36] Kahl B.C., Herrmann M., Everding A.S., Koch H.G., Becker K., Harms E., Proctor R.A., Peters G. (1998) Persistent infection with small colony variants strains of *Staphylococcus aureus* in patients with Cystic fibrosis. *J Infect Dis* 177; 1023-1029.
- [37] Kalmeijer M.D., Coertjens H., van Nieuwland-Bollen P.M. (2002) Surgical site infections in orthopedic surgery: the effect of mupirocin nasal ointment in a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Clin Infect Dis* 35; 353-358.
- [38] Kipp F., Friedrich A.W., Becker K., von Eiff C. (2004) Bedrohliche Zunahme Methicillin-resistenter *Staphylococcus-aureus*-Stämme. *Dtsch Arztebl* 2004; 101: A 2045-2050 (Heft 28-29).
- [39] Klingebiel S.S. (2003) Phänotypisch unterscheidbare *Staphylococcus aureus* Varianten in Primärkulturen von CF-Patienten, intubierten Patienten und Wundpatienten. Dissertation Tübingen.
- [40] Knümann K.H. (2004) rRNA Regulatormechanismen bei *Staphylococcus aureus* in vitro et in vivo. Dissertation Tübingen.
- [41] Laupland K.B., Church D.L., Mucenski M., Sutherland L.R., Davies H.D. (2003) Population-Based Study of the Epidemiology of and Risk Factors for Invasive *Staphylococcus aureus* Infections. *J Infect Dis* 187; 1452-1459.
- [42] Lijnen H.R., van Hoef B., de Cock F., Okada K., Ueshima S. Matsuo O. Collen D. (1991) On the mechanism of fibrin-specific plasminogen activation by staphylokinase. *J Biol Chem* 266; 11826-11832.
- [43] Loening-Baucke V.A., Mischler E., Myers M.G. (1979) A placebo-controlled trial of cephalexin therapy in the ambulatory management of patients with cystic fibrosis. *J Pediatr* 95; 630-637.
- [44] Lowy F.D. (1998) *Staphylococcus aureus* Infections. *N Engl J Med* 339 (8) ; 520-532.
- [45] Lyczak J. B., Cannon C.L., Pier G.B. (2002) Lung Infections associated with Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 15 (2); 194-222.
- [46] May J.R., Herrick N.C., Thompson D. (1972) Bacterial Infection in Cystic Fibrosis. *Arch Dis Child* 47; 908-913.

- [47] McCaffery K., Olver R.E., Franklin M., Mukhopadhyay S. (1999) Systematic review of antistaphylococcal antibiotic therapy in Cystic fibrosis. *Thorax* 54; 380-383.
- [48] McDevitt D, Vaudaux P, Foster T.J. (1992) Genetic evidence that bound coagulase of *Staphylococcus aureus* is not clumping factor. *Infect Immun.* Apr 60(4);1514-1523.
- [49] Middleton B.J., Qazi S., Hardman A., Hill P., Càmara M., Williams P. (2001) N-acylhomoserine lactones produced by *Pseudomonas aeruginosa* modulate *agr*-dependent virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. American Society for Microbiology conference: Cell-cell communication in bacteria, Utah; 29.
- [50] Mongodin E., Bajolet O., Hinnrasky J., Puchelle E., de Bentzmann S. (2000) Cell Wall-associated Protein A as a Tool for Immunolocalization of *Staphylococcus aureus* in Infected Human Airway Epithelium. *J Histochem Cytochem* 48; 523-533.
- [51] Nadesalingam K., Conway S.P., Denton M., (2005) Risk factors for acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by patients with cystic fibrosis. *J Cystic Fibros* 4; 49-52.
- [52] Nguyen T., Ghebrehiwet B., Peerschke E.I.B. (2000) *Staphylococcus aureus* Protein A Recognizes Platelet gC1qR/p33: a Novel Mechanism for Staphylococcal Interactions with Platelets. *Infect. Immun* 68(4); 2061-2068.
- [53] Novick R.P.: Pathogenicity Factors and Their Regulation p.392. In Fischetti V.A., Novick R.P., Feretti J.J., Portnoy D.a., Rood J.I. (eds): *Gram-Positive Pathogens*. ASM Press, Washington D.C., 2000.
- [54] Novick R.P. (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* 48; 1429-1449.
- [55] Obeth M. (2004) Staphylokokken-wirksame Antibiotika bei Mukoviszidose. Dissertation Tübingen.
- [56] Ohlsen K., Ziebuhr W., Koller K.P., Hell W., Wichelhaus T.A., Hacker J. (1998) Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-Toxin (*hla*) Gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 42; 2817-2823.
- [57] Oliveira K., Procop G.W., Wilson D., Coull J., Stender H. (2001) Rapid Identification of *Staphylococcus aureus* Directly from Blood Cultures by Fluorescence In Situ Hybridisation with Peptide Nucleic Acid Probes. *J Clin Microbiol* 40 (1); 247-251.

- [58] Oliveira D.C., Tomasz A., de Lencastre H. (2002) Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2; 180-189.
- [59] Parras F., Guerrero M.C., Bouza E., Blázquez M.J., Moreno S., Menarguez M.C., Cercenado E. (1995) Comparative study of mupirocin and oral cotrimoxazole plus topical fusidic acid in eradication of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 39(1); 175–179.
- [60] Relman D.A., Falkow S.: A molecular prospective of microbial pathogenicity p. 2-13. In Mandell G. L., Bennett J. E., Dolin R. (ed.): *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases*, 5th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia, Pa., 1999.
- [61] Robert Koch Institut (2003) Staphylokokken- Infektionen in Deutschland im Jahr 2002. *Epidemiologisches Bulletin* 35; 277-280.
- [62] Robert Koch Institut (2005) Fachtagung der AG Nosokomiale Infektion am RKI zur Intensivierung der Umsetzung von Präventionsstrategien bei MRSA. *Epidemiologisches Bulletin* 5; 31-38.
- [63] Schlichting C., Branger C, Fournier J.M., Witte W., Boutonnier A., Wolz C., Goulet P., Döring G. (1993) Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing, and phage typing: resolution of clonal relationships. *J Clin Microbiol* 31; 227-232.
- [64] Shapera R.M., Warwick, W.J., Matsen J.M. (1981) Clindamycin therapy of staphylococcal pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *J Pediatr* 99; 647-650.
- [65] Shore A., Rossney A.S., Keane C.T., Enright M.C., Coleman D.C. (2005) Seven Novel Variants of the Staphylococcal Chromosomal Cassette mec in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Ireland. *Antimicrob Agents Chemother* 49(5); 2070-2083.
- [66] Smeltzer M.S., Hart M., Iandolo J. (1994) The effect of lysogeny on the genomic organization of *Staphylococcus aureus*. *Gene* 138; 51-57.
- [67] Smith J.J., Travis S.M., Greenberg E.P., Welsh M.J. (1996) Cystic Fibrosis Airway Epithelia Fail to Kill Bacteria Because of Abnormal Airway Surface Fluid. *Cell* 85; 229-236.
- [68] Srinivasan A., Dick J.D., Perl T.M. (2002) Vancomycin Resistance in Staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 15 (3); 430-438.
- [69] Stefani S., Varaldo P.E. (2003) Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. *Clin Microbiol Inf* 9(12);1179-1186.

[70] Stutman H.R., Lieberman J.M., Nussbaum E., Marks M.I., Antibiotic Prophylaxis in Cystic Fibrosis Study Group (2002) Antibiotic prophylaxis in infant and young children with cystic fibrosis: A randomized controlled trial. *J Pediatr* 140; 299-305.

[71] Szaff M., Hoiby N. (1982) Antibiotic treatment of *Staphylococcus aureus* infection in cystic fibrosis. *Acta Paediatr Scand* 71; 821-826.

[72] Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H., Swaminathan B. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33; 2233-2239.

[73] VandenBergh M.F., Yzerman E.P., van Belkum A., Boelens H.A., Sijmons M., Verbrugh H.A. (1999) Follow-Up of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage after 8 Years: Redefining the Persistent Carrier State. *J Clin Microbiol* 37(10); 3133-3140.

[74] Wagner P., Waldor M. (2002) Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infect Immun* 70; 3985-3993.

[75] Weaver L.T., Green M.R., Nicholson K., Mills J., Heeley M.E., Kuzemko J.A., Austin S., Gregory G.A., Dux A.E., Davis J.A. (1994) Prognosis in Cystic fibrosis treated with continuous flucloxacillin from the neonatal period. *Arch Dis Child* 70; 84-89.

[76] Wertheim H.F.L., Melles D.C., Vos M.C., van Leeuwen W., van Belkum A., Verbrugh H.A., Nouwen J.L. (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet* 5; 751-762.

[77] Wertheim H.F.L., Verveer J., Boelens H.A.M., van Belkum A., Verbrugh H.A., Vos M.C. (2005) Effect of Mupirocin Treatment on Nasal, Pharyngeal, and Perineal Carriage of *Staphylococcus aureus* in Healthy Adults. *Antimicrob Agents Chemother* 49 (4); 1465-1467.

[78] Wertheim H.F.L., Vos M.C., Ott A. (2004) Mupirocin prophylaxis against nosocomial *Staphylococcus aureus* infections in nonsurgical patients: a randomized study. *Ann Intern Med* 140; 419-425.

[79] Wertheim H.F.L., Vos M.C., Ott A., van Belkum A., Voss A., Kluytmans J.A.J.W., van Keulen P.H.J., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E., Meester M.H.M., Verbrugh H.A. (2004) Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet* 364; 703-705.

[80] Wilkinson B.J.: Biology p.1. In Archer G.L., Crossley K.B. (eds): *The Staphylococci in Human Disease*. Curchill Livingstone, New York, 1997.

[81] Wolz C., Goerke C., Landmann R., Zimmerli W., Fluckinger U. (2002) Transcription of clumping factor A in attached and unattached *Staphylococcus aureus* in vitro and during device-related infection. *Infect Immun* 70; 2758-2762.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AB	Antibiotika/-um
AC	Acetylcystein
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Anti-DIG-AP	Anti-Digoxigenin-alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CF	Cystische Fibrose
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CifA	Clumping Faktor A
cm	Zentimeter
CNA	Colistin- Nalidixinsäure
CY	Indocarbocyanin
DAPI	4',6'-diamidino-2-phenylindole
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonukleasen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylendioxybisethylennitrioltetraacetat
entf.	entfällt
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
g	Gramm
GT	Genomtyp
h	Stunde
HCl	Salzsäure
Hlb	β-Hämolysin, kodiert durch <i>hly</i>
IgG	Immunglobulin G
i.d.R.	in der Regel
KBE	Kolonie bildende Einheiten
M	Mol
min	Minute
mJ	Millijoule
ml	Milliliter
mM	Millimol
MSSA	Methicillin-sensitiver Staphylococcus aureus
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
mU	Milliunit
NA	Nasenabstriche
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm

nM	Nanomol
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
P.	Pseudomonas
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
PNA	Peptide Nucleinacid
RA	Rachenabstriche
RNA	ribonucleic acid
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
RS	Routinesputum
rpm	rotations per minute
rhDNase	rekombinierte humane DNase
S.	Staphylococcus
s	Sekunde
Sak	Staphylokinase, kodiert durch <i>sak</i>
SCV	Small-Colony Variants
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sog.	sogenannte
SpA	Protein A
SSC	Natrium-Citrat
SSS	Sofort schockgefrorenes Sputum/-en
ST	Subtyp(en)
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA-Puffer
TMP-SMX	Trimethoprin-Sulfamethoxazol
TNF- α	Tumor-Nekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSB	Tryptonsojabouillon
UV	Ultraviolett
V	Volt
vs	versus
VRSA	Vancomycin-resistenter MRSA
z.B.	zum Beispiel
zus.	zusätzlich
μ l	Mikroliter

ANHANG

Tab. A1a: Mastertabelle (Teil a)

Patient	Probe	Isolat	Quelle	Datum	Acetyl- cystein	Anzucht- medium	MRSA	<i>P. ae.</i>
1	65	65a	Sputum	09.03.2004	nein	Blut	ja	ja
1	65	65b	Sputum	09.03.2004	nein	Blut	ja	ja
1	65	65c	Sputum	09.03.2004	nein	Blut	ja	ja
1	87	87a	Sputum	02.04.2004	nein	Blut	ja	ja
1	87	87b	Sputum	02.04.2004	nein	Blut	ja	ja
1	80	80a	Sputum	06.05.2004	nein	Blut	ja	ja
1	80	80c	Sputum	06.05.2004	nein	Blut	ja	ja
1	10n	10n	Nase	06.05.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
1	10r	10r	Rachen	06.05.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
1	91	91a	Sputum	02.08.2004	nein	Blut	nein	ja
1	91	91b	Sputum	02.08.2004	nein	Blut	ja	ja
1	32n	k.Staph	Nase	02.08.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
1	32r	32r	Rachen	02.08.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
1	32s	32sa	Sputum	02.08.2004	nein	Blut	ja	ja
1	32s	32sb	Sputum	02.08.2004	nein	Blut	ja	ja
1	32s	32sc	Sputum	02.08.2004	nein	Blut	ja	ja
2	14	14a	Sputum	15.01.2004	nein	Blut	nein	nein
2	3n	k.Staph	Nase	20.04.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
2	3r	k.Staph	Rachen	20.04.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
2	3s	3sa	Sputum	20.04.2004	nein	Blut	nein	nein
2	3s	3sb	Sputum	20.04.2004	nein	Blut	nein	nein
2	92	92a	Sputum	16.07.2004	nein	Blut	nein	nein
2	92	92b	Sputum	16.07.2004	nein	Blut	nein	nein
2	98	98a	Sputum	20.07.2004	nein	Blut	nein	nein
2	98	98b	Sputum	20.07.2004	nein	Blut	nein	nein
3	47	47a	Sputum	28.11.2003	nein	CNA	nein	nein
3	47	47b	Sputum	28.11.2003	nein	CNA	nein	nein
3	12n	k.Staph	Nase	10.05.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
3	12r	k.Staph	Rachen	10.05.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
3	12s	k.Staph	Sputum	10.05.2004	nein	Blut	nein	nein
4	35	35a	Sputum	21.11.2003	nein	CNA	nein	ja
4	94	94a	Sputum	23.07.2004	nein	Blut	ja	ja
4	28n	k.Staph	Nase	23.07.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
4	28r	28r	Rachen	23.07.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
4	28s	28s	Sputum	23.07.2004	nein	Blut	ja	ja
5	15	15a	Sputum	09.10.2003	nein	Blut	nein	ja
5	15	15b	Sputum	09.10.2003	nein	Blut	ja	ja
5	15	15d	Sputum	09.10.2003	nein	Blut	ja	ja
5	11	11a	Sputum	04.12.2003	nein	Blut	ja	nein
5	11	11b	Sputum	04.12.2003	nein	Blut	ja	nein
5	11	11c	Sputum	04.12.2003	nein	Blut	ja	nein
5	11	11d	Sputum	04.12.2003	nein	Blut	ja	nein
5	62	62a	Sputum	23.01.2004	nein	Blut	ja	nein
5	62	62b	Sputum	23.01.2004	nein	Blut	ja	nein
5	62	62c	Sputum	23.01.2004	nein	Blut	ja	nein

5	72	72a	Sputum	22.04.2004	nein	Blut	ja	nein
5	72	72c	Sputum	22.04.2004	nein	Blut	ja	nein
5	5n	k.Staph	Nase	22.04.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
5	5r	k.Staph	Rachen	22.04.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
5	5s	5sa	Sputum	22.04.2004	nein	Blut	ja	nein
5	5s	5sb	Sputum	22.04.2004	nein	Blut	ja	nein
5	5s	5sc	Sputum	22.04.2004	nein	Blut	ja	nein
5	5s	5sd	Sputum	22.04.2004	nein	Blut	ja	nein
5	5s	5se	Sputum	22.04.2004	nein	Blut	ja	nein
6	20	20a	Sputum	03.07.2003	nein	Blut	nein	nein
6	50	50a	Sputum	13.10.2003	nein	CNA	nein	nein
6	50	50b	Sputum	13.10.2003	nein	CNA	nein	nein
6	4	k.Staph	Sputum	16.01.2004	ja	Blut	nein	nein
6	74	74a	Sputum	26.04.2004	nein	Blut	nein	nein
6	74	k.Staph	Sputum	26.04.2004	nein	Blut	nein	nein
6	29n	k.Staph	Nase	23.07.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
6	29r	k.Staph	Rachen	23.07.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
6	29s	k.Staph	Sputum	23.07.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
7	3	k.Staph	Sputum	16.10.2003	ja	Blut	nein	nein
7	42	42a	Sputum	02.12.2003	nein	CNA	nein	nein
7	68	k.Staph	Sputum	22.01.2004	nein	Blut	nein	nein
7	78	78a	Sputum	06.05.2004	nein	Blut	nein	nein
7	78	78b	Sputum	06.05.2004	nein	Blut	nein	nein
7	11n	k.Staph	Nase	06.05.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
7	11r	k.Staph	Rachen	06.05.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
7	11s	11sa	Sputum	06.05.2004	nein	Blut	nein	nein
8	73	73a	Sputum	22.04.2004	nein	Blut	nein	nein
8	79	79a	Sputum	04.05.2004	nein	Blut	nein	nein
8	79	k.Staph	Sputum	04.05.2004	nein	Blut	nein	nein
8	30n	k.Staph	Nase	27.07.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
8	30r	k.Staph	Rachen	27.07.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
8	30s	k.Staph	Sputum	27.07.2004	nein	Blut	nein	nein
9	1	1a	Sputum	24.07.2003	nein	Blut	ja	nein
9	1	1b	Sputum	24.07.2003	nein	Blut	ja	nein
9	32	32a	Sputum	01.10.2003	nein	CNA	ja	nein
9	32	32b	Sputum	01.10.2003	nein	CNA	ja	nein
9	32	32c	Sputum	01.10.2003	nein	CNA	ja	nein
9	23	23a	Sputum	11.12.2003	nein	CNA	ja	nein
9	23	23b	Sputum	11.12.2003	nein	CNA	ja	nein
9	7	k.Staph	Sputum	14.01.2004	ja	Blut	ja	nein
9	56	56a	Sputum	04.03.2004	nein	Blut	ja	nein
9	56	56b	Sputum	04.03.2004	nein	Blut	ja	nein
9	56	56c	Sputum	04.03.2004	nein	Blut	ja	nein
9	56	56d	Sputum	04.03.2004	nein	Blut	ja	nein
9	70	70a	Sputum	21.04.2004	nein	Blut	ja	nein
9	70	70b	Sputum	21.04.2004	nein	Blut	ja	nein
9	70	70c	Sputum	21.04.2004	nein	Blut	ja	nein
9	70	70d	Sputum	21.04.2004	nein	Blut	ja	nein
9	4n	4n	Nase	21.04.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
9	4r	4r	Rachen	21.04.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
9	85	85a	Sputum	18.06.2004	nein	Blut	ja	nein
9	85	85b	Sputum	18.06.2004	nein	Blut	ja	nein

9	85	85c	Sputum	18.06.2004	nein	Blut	ja	nein
9	31n	k.Staph	Nase	27.07.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
9	31r	31r	Rachen	27.07.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
9	31s	31sa	Sputum	27.07.2004	nein	Blut	ja	nein
9	31s	31sb	Sputum	27.07.2004	nein	Blut	ja	nein
9	31s	31sc	Sputum	27.07.2004	nein	Blut	ja	nein
9	31s	31sd	Sputum	27.07.2004	nein	Blut	ja	nein
9	82	82a	Sputum	20.08.2004	nein	Blut	ja	nein
9	82	82b	Sputum	20.08.2004	nein	Blut	ja	nein
10	16	16a	Sputum	07.07.2003	nein	Blut	nein	nein
10	2	2a	Sputum	07.08.2003	nein	Blut	nein	nein
10	24	24a	Sputum	13.11.2003	nein	Blut	nein	nein
10	24	24b	Sputum	13.11.2003	nein	Blut	nein	nein
10	24	24c	Sputum	13.11.2003	nein	Blut	nein	nein
10	61	61a	Sputum	04.06.2004	nein	Blut	nein	nein
10	61	61b	Sputum	04.06.2004	nein	Blut	nein	nein
10	21n	21n	Nase	04.06.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
10	21r	21r	Rachen	04.06.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
10	21s	21s	Sputum	04.06.2004	nein	Blut	nein	nein
11	31	31b	Sputum	22.09.2003	nein	CNA	nein	nein
11	48	48a	Sputum	05.12.2003	nein	CNA	nein	nein
11	76	76a	Sputum	26.04.2004	nein	Blut	nein	nein
11	76	76b	Sputum	26.04.2004	nein	Blut	nein	nein
11	6n	k.Staph	Nase	26.04.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
11	6r	k.Staph	Rachen	26.04.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
11	6s	6sa	Sputum	26.04.2004	nein	Blut	nein	nein
11	6s	6sb	Sputum	26.04.2004	nein	Blut	nein	nein
11	90	90a	Sputum	26.07.2004	nein	Blut	nein	nein
11	90	90b	Sputum	26.07.2004	nein	Blut	nein	nein
11	90	90d	Sputum	26.07.2004	nein	Blut	nein	nein
12	19	19a	Sputum	05.12.2003	nein	Blut	nein	nein
12	19	19b	Sputum	05.12.2003	nein	Blut	nein	nein
12	54	54a	Sputum	08.03.2004	nein	Blut	nein	nein
12	54	54b	Sputum	08.03.2004	nein	Blut	nein	nein
12	54	54d	Sputum	08.03.2004	nein	Blut	nein	nein
12	24n	k.Staph	Nase	25.06.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
12	24r	24r	Rachen	25.06.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
12	24s	24sa	Sputum	25.06.2004	nein	Blut	nein	nein
12	24s	24sb	Sputum	25.06.2004	nein	Blut	nein	nein
13	12	12a	Sputum	04.07.2003	nein	Blut	nein	nein
13	12	12b	Sputum	04.07.2003	nein	Blut	nein	nein
13	12	12c	Sputum	04.07.2003	nein	Blut	nein	nein
13	12	k.Staph	Sputum	04.07.2003	nein	Blut	nein	nein
13	12	k.Staph	Sputum	04.07.2003	nein	Blut	nein	nein
13	22	22a	Sputum	19.08.2003	nein	Blut	nein	nein
13	22	22c	Sputum	19.08.2003	nein	Blut	nein	nein
13	27	27a	Sputum	09.10.2003	nein	CNA	nein	nein
13	27	27b	Sputum	09.10.2003	nein	CNA	nein	nein
13	5	5	Sputum	16.10.2003	ja	Blut	nein	nein
13	30	30b	Sputum	04.11.2003	nein	CNA	nein	nein
13	30	30c	Sputum	04.11.2003	nein	CNA	nein	nein
13	30	30d	Sputum	04.11.2003	nein	CNA	nein	nein

13	57	57a	Sputum	20.01.2004	nein	Blut	ja	nein
13	57	57b	Sputum	20.01.2004	nein	Blut	ja	nein
13	57	57c	Sputum	20.01.2004	nein	Blut	ja	nein
13	51	51a	Sputum	06.02.2004	nein	Blut	ja	nein
13	51	51b	Sputum	06.02.2004	nein	Blut	ja	nein
13	51	51c	Sputum	06.02.2004	nein	Blut	ja	nein
13	69	69a	Sputum	18.02.2004	nein	Blut	nein	nein
13	69	69b	Sputum	18.02.2004	nein	Blut	nein	nein
13	67	67a	Sputum	24.03.2004	nein	Blut	ja	nein
13	67	67b	Sputum	24.03.2004	nein	Blut	ja	nein
13	88	88a	Sputum	08.04.2004	nein	Blut	ja	nein
13	88	88b	Sputum	08.04.2004	nein	Blut	ja	nein
13	88	88c	Sputum	08.04.2004	nein	Blut	ja	nein
13	2n	k.Staph	Nase	08.04.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
13	2r	2r	Rachen	08.04.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
13	2s	2sa	Sputum	08.04.2004	nein	Blut	ja	nein
13	2s	2sb	Sputum	08.04.2004	nein	Blut	ja	nein
13	84	84a	Sputum	16.06.2004	nein	Blut	nein	nein
13	84	84b	Sputum	16.06.2004	nein	Blut	nein	nein
13	84	84c	Sputum	16.06.2004	nein	Blut	nein	nein
13	25n	k.Staph	Nase	01.07.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
13	25r	25r	Rachen	01.07.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
13	25s	25sa	Sputum	01.07.2004	nein	Blut	nein	nein
13	25s	25sb	Sputum	01.07.2004	nein	Blut	nein	nein
13	81	81a	Sputum	06.07.2004	nein	Blut	ja	nein
13	81	81b	Sputum	06.07.2004	nein	Blut	ja	nein
13	81	81c	Sputum	06.07.2004	nein	Blut	ja	nein
14	25	25a	Sputum	08.08.2003	nein	CNA	nein	nein
14	39	k.Staph	Sputum	20.11.2003	nein	CNA	nein	nein
14	39	39b	Sputum	20.11.2003	nein	CNA	nein	nein
14	39	39c	Sputum	20.11.2003	nein	CNA	nein	nein
14	26n	26na	Nase	01.07.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
14	26n	26nb	Nase	01.07.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
14	26r	26ra	Rachen	01.07.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
14	26r	26rb	Rachen	01.07.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
14	33n	33na	Nase	07.10.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
14	33n	33nb	Nase	07.10.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
14	33r	33r	Rachen	07.10.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
14	33s	33sa	Sputum	07.10.2004	nein	Blut	nein	nein
14	33s	33sb	Sputum	07.10.2004	nein	Blut	nein	nein
15	37	37a	Sputum	08.07.2003	nein	CNA	nein	ja
15	37	37c	Sputum	08.07.2003	nein	CNA	nein	ja
16	26	26a	Sputum	20.11.2003	nein	CNA	nein	nein
16	58	58a	Sputum	27.01.2004	nein	Blut	nein	ja
16	58	58d	Sputum	27.01.2004	nein	Blut	nein	ja
16	55	55a	Sputum	20.02.2004	nein	Blut	nein	ja
16	55	55b	Sputum	20.02.2004	nein	Blut	nein	ja
16	20n	k.Staph	Nase	02.06.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
16	20r	20r	Rachen	02.06.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
16	20s	20sb	Sputum	02.06.2004	nein	Blut	nein	ja
17	89	89a	Sputum	06.04.2004	nein	Blut	nein	ja
17	1n	1n	Nase	06.04.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.

17	1r	1r	Rachen	06.04.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
17	1s	1s	Sputum	06.04.2004	nein	Blut	nein	ja
17	17n	k.Staph	Nase	25.05.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
17	17r	17r	Rachen	25.05.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
17	17s	k.Staph	Sputum	25.05.2004	nein	Blut	nein	ja
18	29	29a	Sputum	08.12.2003	nein	CNA	nein	ja
18	29	29b	Sputum	08.12.2003	nein	CNA	nein	ja
18	13n	13n	Nase	12.05.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
18	13r	13r	Rachen	12.05.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
19	36	36a	Sputum	07.10.2003	nein	CNA	nein	nein
19	36	36d	Sputum	07.10.2003	nein	CNA	nein	nein
19	7n	k.Staph	Nase	27.04.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
19	7r	k.Staph	Rachen	27.04.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
19	16n	k.Staph	Nase	24.05.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
19	16r	k.Staph	Rachen	24.05.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
20	41	k.Staph	Sputum	19.05.2003	nein	CNA	nein	nein
20	41	41b	Sputum	19.05.2003	nein	CNA	nein	nein
20	34	34a	Sputum	23.05.2003	nein	CNA	ja	nein
20	34	34b	Sputum	23.05.2003	nein	CNA	ja	nein
20	17	17a	Sputum	08.12.2003	nein	Blut	nein	ja
20	17	k.Staph	Sputum	08.12.2003	nein	Blut	nein	ja
20	66	66a	Sputum	25.03.2004	nein	Blut	ja	nein
20	77	77c	Sputum	30.04.2004	nein	Blut	ja	ja
20	86	86a	Sputum	08.06.2004	nein	Blut	nein	nein
20	96	96b	Sputum	02.08.2004	nein	Blut	nein	nein
20	34n	k.Staph	Nase	07.10.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
20	34r	k.Staph	Rachen	07.10.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
20	34s	34sa	Sputum	07.10.2004	nein	Blut	nein	nein
20	34s	34sb	Sputum	07.10.2004	nein	Blut	nein	nein
21	43	43a	Sputum	27.11.2003	nein	CNA	nein	ja
21	43	43c	Sputum	27.11.2003	nein	CNA	nein	ja
21	95	95a	Sputum	12.07.2004	nein	Blut	nein	ja
21	27n	27n	Nase	12.07.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
21	27r	27r	Rachen	12.07.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
21	27s	27s	Sputum	12.07.2004	nein	Blut	nein	ja
22	46	46a	Sputum	25.08.2003	nein	CNA	ja	nein
22	46	46c	Sputum	25.08.2003	nein	CNA	ja	nein
23	44	44a	Sputum	05.12.2003	nein	CNA	nein	nein
23	53	53a	Sputum	05.03.2004	nein	Blut	ja	nein
23	53	53b	Sputum	05.03.2004	nein	Blut	ja	nein
23	53	53c	Sputum	05.03.2004	nein	Blut	nein	nein
23	35n	k.Staph	Nase	22.10.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
23	35r	k.Staph	Rachen	22.10.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
24	10	10a	Sputum	17.09.2003	nein	Blut	ja	ja
24	18n	k.Staph	Nase	25.05.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
24	18r	k.Staph	Rachen	25.05.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
24	18s	18s	Sputum	25.05.2004	nein	Mannitol	nein	ja
25	45	45a	Sputum	02.12.2003	nein	CNA	nein	ja
25	59	59a	Sputum	02.03.2004	nein	Blut	nein	ja
25	63	63a	Sputum	27.05.2004	nein	Blut	nein	ja
25	63	63b	Sputum	27.05.2004	nein	Blut	nein	ja
25	19n	19na	Nase	27.05.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.

25	19n	19nb	Nase	27.05.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
25	19r	k.Staph	Rachen	27.05.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
25	19s	19sa	Sputum	27.05.2004	nein	Blut	nein	ja
25	19s	19sb	Sputum	27.05.2004	nein	Blut	nein	ja
25	19s	19sc	Sputum	27.05.2004	nein	Blut	nein	ja
26	9	9a	Sputum	28.07.2003	nein	Blut	nein	nein
26	9	9c	Sputum	28.07.2003	nein	Blut	nein	nein
26	52	52a	Sputum	11.03.2004	nein	Blut	nein	nein
26	52	52b	Sputum	11.03.2004	nein	Blut	nein	nein
26	83	83a	Sputum	18.06.2004	nein	Blut	nein	nein
26	83	83b	Sputum	18.06.2004	nein	Blut	nein	nein
26	23n	k.Staph	Nase	18.06.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
26	23r	23r	Rachen	18.06.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
26	23s	23sa	Sputum	18.06.2004	nein	Blut	nein	nein
26	23s	23sb	Sputum	18.06.2004	nein	Blut	nein	nein
26	23s	23sc	Sputum	18.06.2004	nein	Blut	nein	nein
27	49	49a	Sputum	18.11.2003	nein	Blut	nein	nein
27	28	28a	Sputum	17.12.2003	nein	CNA	nein	nein
27	8n	8na	Nase	28.04.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
27	8n	8nb	Nase	28.04.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
27	8r	8ra	Rachen	28.04.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
27	8r	8rb	Rachen	28.04.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
27	8s	8sa	Sputum	28.04.2004	nein	Blut	nein	nein
27	8s	8sb	Sputum	28.04.2004	nein	Blut	nein	nein
28	13	13a	Sputum	25.07.2003	nein	Blut	nein	ja
28	13	13b	Sputum	25.07.2003	nein	Blut	nein	ja
28	6	6b	Sputum	15.08.2003	ja	Blut	nein	ja
28	6	6c	Sputum	15.08.2003	ja	Blut	nein	ja
28	8	k.Staph	Sputum	01.10.2003	ja	Blut	nein	ja
28	38	38a	Sputum	07.10.2003	nein	CNA	nein	ja
28	18	18a	Sputum	29.12.2003	nein	Blut	nein	ja
28	18	18b	Sputum	29.12.2003	nein	Blut	nein	ja
29	75	75a	Sputum	20.04.2004	nein	Blut	nein	ja
29	22n	k.Staph	Nase	11.06.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
29	22r	k.Staph	Rachen	11.06.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
30	40	40a	Sputum	01.07.2003	nein	CNA	nein	nein
30	40	40b	Sputum	01.07.2003	nein	CNA	nein	nein
30	40	40c	Sputum	01.07.2003	nein	CNA	nein	nein
30	33	33a	Sputum	02.09.2003	nein	CNA	nein	nein
30	33	33b	Sputum	02.09.2003	nein	CNA	nein	nein
30	33	33c	Sputum	02.09.2003	nein	CNA	nein	nein
30	33	33d	Sputum	02.09.2003	nein	CNA	nein	nein
30	21	21b	Sputum	04.12.2003	nein	Blut	nein	nein
30	64	64a	Sputum	24.02.2004	nein	Blut	nein	nein
30	64	64b	Sputum	24.02.2004	nein	Blut	nein	nein
30	64	64c	Sputum	24.02.2004	nein	Blut	nein	nein
30	60	60b	Sputum	23.03.2004	nein	Blut	nein	nein
30	71	71a	Sputum	22.04.2004	nein	Blut	nein	nein
30	71	71b	Sputum	22.04.2004	nein	Blut	nein	nein
30	71	71c	Sputum	22.04.2004	nein	Blut	nein	nein
30	9n	k.Staph	Nase	30.04.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
30	9r	k.Staph	Rachen	30.04.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.

30	9s	9sa	Sputum	30.04.2004	nein	Blut	nein	nein
30	9s	9sb	Sputum	30.04.2004	nein	Blut	nein	nein
30	9s	9sc	Sputum	30.04.2004	nein	Blut	nein	nein
30	9s	9se	Sputum	30.04.2004	nein	Blut	nein	nein
30	14n	k.Staph	Nase	13.05.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
30	14r	14r	Rachen	13.05.2004	nein	Blut	unbek.	unbek.
30	14s	14sa	Sputum	13.05.2004	nein	Blut	nein	nein
30	14s	14sb	Sputum	13.05.2004	nein	Blut	nein	nein
30	14s	14sd	Sputum	13.05.2004	nein	Blut	nein	nein
30	14s	14se	Sputum	13.05.2004	nein	Blut	nein	nein
30	14s	14sf	Sputum	13.05.2004	nein	Blut	nein	nein
30	93	93a	Sputum	13.07.2004	nein	Blut	nein	nein
30	93	93b	Sputum	13.07.2004	nein	Blut	nein	nein
30	93	93c	Sputum	13.07.2004	nein	Blut	nein	nein
30	93	93d	Sputum	13.07.2004	nein	Blut	nein	nein
30	97	97a	Sputum	27.07.2004	nein	Blut	nein	nein

unbek.: unbekannt

k.Staph: kein *S. aureus*

P.ae.: Co-Kolonisation mit *P. aeruginosa*

Tab. A1b: Mastertabelle (Teil b)

Patient	Probe	Isolat	GT	Subtyp	Variante	KBE	Morphologie	Hämolysen	Farbe
1	65	65a	19	19;1	19;1;1	4	mittel, rund	++'	gelb
1	65	65b	19	19;1	19;1;2	25	groß, rund	+'	grau/gelb
1	65	65c	19	19;1	19;1;3	49	groß, rund	(+)'	weiß/gelb
1	87	87a	19	19;1	19;1;2	53	groß, rund	++'	gelb
1	87	87b	19	19;1	19;1;4	31	groß, rund	+'	weiß/gelb
1	80	80a	19	19;2	19;2;1	33	mittel, eckig	+', beta	gelb
1	80	80c	2	2;1	2;1;1	3	mittel, rund	(+)'	gelb
1	10n	10n	19	19;3	19;3;1	10	groß, rund	++, beta'	gelb
1	10r	10r	19	19;4	19;4;1	4	groß, rund	+'	gelb
1	91	91a	19	19;1	19;1;2	11	groß, rund	++'	gelb
1	91	91b	19	19;1	19;1;3	2	groß, rund	(+)'	weiß/gelb
1	32n	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
1	32r	32r	19	19;4	19;4;2	4	mittel, rund	++'	gelb
1	32s	32sa	19	19;4	19;4;3	5	groß, rund	++'	gelb
1	32s	32sb	19	19;1	19;1;5	2	groß, rund	+++'	weiß
1	32s	32sc	19	19;4	19;4;4	1	groß, rund	+', beta	weiß/gelb
2	14	14a	109	109;1	109;1;1	12	groß, rund	++'	weiß/gelb
2	3n	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
2	3r	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
2	3s	3sa	109	109;1	109;1;1	20	groß, rund	++'	weiß/gelb
2	3s	3sb	109	109;1	109;1;2	63	groß, rund	+'	grau/gelb
2	92	92a	109	109;1	109;1;1	59	groß, rund	++'	weiß/gelb
2	92	92b	109	109;1	109;1;2	9	groß, rund	+'	grau/gelb
2	98	98a	109	109;1	109;1;1	63	groß, rund	++'	weiß/gelb
2	98	98b	109	109;1	109;1;2	5	groß, rund	+'	grau/gelb
3	47	47a	171	171;1	171;1;1	66	klein, rund	+', beta	grau
3	47	47b	171	171;2	171;2;1	5	klein, rund	(+)', beta	weiß

3	12n	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
3	12r	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
3	12s	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
4	35	35a	175	175;1	175;1;1	22	mittel, rund	+', beta	gelb
4	94	94a	175	175;1	175;1;1	66	mittel, rund	+', beta	gelb
4	28n	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
4	28r	28r	175	175;1	175;1;2	15	groß, rund	+', beta	weiß/gelb
4	28s	28s	175	175;1	175;1;1	12	groß, rund	+', beta	gelb
5	15	15a	7	7;1	7;1;1	3	groß, rund	++'	weiß/gelb
5	15	15b	31	31;1	31;1;1	7	groß, rund	+', beta	weiß/gelb
5	15	15d	31	31;1	31;1;2	63	groß, rund	(+)'	grau/gelb
5	11	11a	31	31;1	31;1;2	49	groß, rund	(+)'	grau/gelb
5	11	11b	31	31;1	31;1;3	4	groß, rund	+'	weiß/gelb
5	11	11c	31	31;2	31;2;1	6	mittel, rund	+', beta	weiß/gelb
5	11	11d	31	31;1	31;1;4	7	groß, rund	(+)', beta	weiß/gelb
5	62	62a	31	31;1	31;1;5	6	groß, rund	+', beta	gelb
5	62	62b	31	31;1	31;1;2	6	mittel, rund	(+)'	grau/gelb
5	62	62c	31	31;1	31;1;2	31	groß, rund	(+)'	grau/gelb
5	72	72a	31	31;1	31;1;5	1	groß, rund	+', beta	gelb
5	72	72c	31	31;1	31;1;3	2	groß, rund	+'	weiß/gelb
5	5n	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
5	5r	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
5	5s	5sa	31	31;1	31;1;6	8	groß, rund	+', beta	grau/gelb
5	5s	5sb	31	31;1	31;1;1	8	groß, rund	+', beta	weiß/gelb
5	5s	5sc	31	31;1	31;1;3	7	groß, rund	+'	weiß/gelb
5	5s	5sd	31	31;1	31;1;7	1	groß, rund	beta	weiß/gelb
5	5s	5se	31	31;1	31;1;2	43	groß, rund	(+)'	grau/gelb
6	20	20a	172	172;1	172;1;1	14	groß, rund	+', beta	weiß/gelb
6	50	50a	109	109;1	109;1;3	2	groß, rund	(+)'	weiß/gelb
6	50	50b	109	109;1	109;1;4	6	groß, rund	- , -	weiß/gelb
6	4	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
6	74	74a	109	109;1	109;1;3	1	groß, rund	(+)'	weiß/gelb
6	74	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
6	29n	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
6	29r	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
6	29s	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
7	3	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
7	42	42a	36	36;1	36;1;1	17	groß, rund	++'	weiß/gelb
7	68	k.Staph	entf.	entf.	entf.	1	mittel, rund	- , -	grau
7	78	78a	36	36;1	36;1;2	1	klein, rund	++'	gelb
7	78	78b	36	36;2	36;2;1	1	klein, rund	++'	weiß/gelb
7	11n	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
7	11r	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
7	11s	11sa	36	36;1	36;1;3	9	groß, rund	+'	gelb
8	73	73a	2	2;1	2;1;2	5	groß, rund	+'	weiß/gelb
8	79	79a	2	2;1	2;1;2	9	groß, rund	+'	weiß/gelb
8	79	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
8	30n	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
8	30r	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
8	30s	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
9	1	1a	31	31;3	31;3;1	98	groß, rund	++', beta	grau/gelb
9	1	1b	31	31;4	31;4;1	33	groß, rund	+'	weiß/gelb

9	32	32a	31	31;3	31;3;1	5	groß, rund	++', beta	grau/gelb
9	32	32b	31	31;4	31;4;2	13	groß, rund	-, -	grau/gelb
9	32	32c	31	31;4	31;4;1	1	groß, rund	+'	weiß/gelb
9	23	23a	31	31;4	31;4;1	44	groß, rund	+'	weiß/gelb
9	23	23b	31	31;3	31;3;1	63	groß, rund	++', beta	grau/gelb
9	7	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
9	56	56a	31	31;3	31;3;2	47	groß, rund	++', beta	gelb
9	56	56b	31	31;4	31;4;2	6	groß, rund	-, -	grau/gelb
9	56	56c	31	31;4	31;4;3	4	groß, rund	+++'	grau/gelb
9	56	56d	31	31;4	31;4;1	9	groß, rund	+'	weiß/gelb
9	70	70a	31	31;3	31;3;1	12	groß, rund	++', beta	grau/gelb
9	70	70b	31	31;4	31;4;3	23	groß, rund	+++'	grau/gelb
9	70	70c	31	31;4	31;4;4	1	groß, rund	+'	gelb
9	70	70d	31	31;4	31;4;1	6	groß, rund	+'	weiß/gelb
9	4n	4n	31	31;3	31;3;1	19	groß, rund	++', beta	grau/gelb
9	4r	4r	31	31;4	31;4;4	17	groß, rund	+'	gelb
9	85	85a	31	31;3	31;3;1	50	groß, rund	++', beta	grau/gelb
9	85	85b	31	31;4	31;4;4	1	groß, rund	+'	gelb
9	85	85c	31	31;4	31;4;5	19	groß, rund	++'	grau/gelb
9	31n	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
9	31r	31r	31	31;4	31;4;5	2	groß, rund	++'	grau/gelb
9	31s	31sa	31	31;4	31;4;5	2	groß, rund	++'	grau/gelb
9	31s	31sb	31	31;4	31;4;6	2	groß, rund	(+)'	gelb
9	31s	31sc	31	31;4	31;4;7	8	mittel, rund	++'	gelb
9	31s	31sd	31	31;4	31;4;3	5	groß, rund	+++'	grau/gelb
9	82	82a	31	31;3	31;3;1	21	groß, rund	++', beta	grau/gelb
9	82	82b	31	31;4	31;4;8	2	groß, rund	+', beta	gelb
10	16	16a	2	2;1	2;1;3	5	groß, rund	+'	gelb
10	2	2a	2	2;1	2;1;3	125	groß, rund	+'	gelb
10	24	24a	2	2;1	2;1;3	5	groß, rund	+'	gelb
10	24	24b	2	2;1	2;1;4	1	groß, rund	++'	grau/gelb
10	24	24c	54	54;1	54;1;1	5	groß, rund	++'	gelb
10	61	61a	2	2;1	2;1;5	14	groß, rund	(+)'	gelb
10	61	61b	2	2;1	2;1;3	1	groß, rund	+'	gelb
10	21n	21n	2	2;1	2;1;5	28	groß, rund	(+)'	gelb
10	21r	21r	2	2;2	2;2;1	22	groß, rund	(+)'	gelb
10	21s	21s	2	2;3	2;3;1	2	groß, rund	+'	gelb
11	31	31b	2	2;1	2;1;5	52	groß, rund	(+)'	gelb
11	48	48a	2	2;1	2;1;5	9	groß, rund	(+)'	gelb
11	76	76a	2	2;1	2;1;5	8	groß, rund	(+)'	gelb
11	76	76b	2	2;1	2;1;6	2	mittel, rund	-, -	grau/gelb
11	6n	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
11	6r	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
11	6s	6sa	2	2;1	2;1;7	2	groß, rund	+'	grau/gelb
11	6s	6sb	2	2;1	2;1;5	22	groß, rund	(+)'	gelb
11	90	90a	2	2;1	2;1;7	4	groß, rund	+'	grau/gelb
11	90	90b	2	2;1	2;1;2	13	groß, rund	+'	weiß/gelb
11	90	90d	36	36;3	36;3;1	4	groß, rund	++'	grau/gelb
12	19	19a	31	31;5	31;5;1	20	groß, rund	++'	grau/gelb
12	19	19b	2	2;1	2;1;2	79	groß, rund	+'	weiß/gelb
12	54	54a	31	31;5	31;5;2	2	groß, rund	+'	weiß/gelb
12	54	54b	2	2;1	2;1;8	19	groß, rund	-, -	grau

12	54	54d	2	2;1	2;1;5	2	groß, rund	(+)'	gelb
12	24n	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
12	24r	24r	31	31;5	31;5;1	2	groß, rund	++'	grau/gelb
12	24s	24sa	31	31;5	31;5;3	9	groß, rund	+++'	grau/gelb
12	24s	24sb	2	2;1	2;1;9	2	groß, rund	(+)'	weiß/gelb
13	12	12a	17	17;1	17;1;1	45	mittel, rund	++', beta	weiß/gelb
13	12	12b	17	17;1	17;1;2	37	mittel, rund	+'	grau
13	12	12c	17	17;1	17;1;3	22	klein, rund	(+)'	weiß
13	12	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
13	12	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
13	22	22a	17	17;2	17;2;1	35	klein, rund	+', beta	grau
13	22	22c	17	17;1	17;1;4	54	groß, rund	+', beta	grau/gelb
13	27	27a	17	17;1	17;1;5	18	groß, eckig	+', beta	grau/gelb
13	27	27b	17	17;2	17;2;2	13	groß, rund	++', beta	weiß/gelb
13	5	5	17	17;1	17;1;6	0	mittel, rund	+', beta	grau/gelb
13	30	30b	17	17;2	17;2;3	12	mittel, rund	++', beta	weiß
13	30	30c	17	17;1	17;1;7	10	groß, eckig	++', beta	weiß/gelb
13	30	30d	17	17;1	17;1;4	10	groß, rund	+', beta	grau/gelb
13	57	57a	17	17;3	17;3;1	137	mittel, rund	++', beta	weiß
13	57	57b	17	17;1	17;1;8	25	mittel, rund	(+)', beta	weiß
13	57	57c	17	17;1	17;1;6	111	mittel, rund	+', beta	grau/gelb
13	51	51a	17	17;4	17;4;1	169	groß, rund	++', beta	weiß
13	51	51b	17	17;1	17;1;9	5	klein, rund	(+)', beta	grau
13	51	51c	17	17;1	17;1;8	5	mittel, rund	(+)', beta	weiß
13	69	69a	17	17;1	17;1;1	49	mittel, rund	++', beta	weiß/gelb
13	69	69b	17	17;1	17;1;8	5	mittel, rund	(+)', beta	weiß
13	67	67a	17	17;1	17;1;1	9	mittel, rund	++', beta	weiß/gelb
13	67	67b	17	17;1	17;1;10	220	mittel, eckig	(+)', beta	weiß
13	88	88a	17	17;1	17;1;1	3	mittel, rund	++', beta	weiß/gelb
13	88	88b	17	17;1	17;1;11	19	groß, rund	++', beta	grau/gelb
13	88	88c	17	17;2	17;2;4	6	groß, rund	+', beta	grau/gelb
13	2n	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
13	2r	2r	17	17;2	17;2;5	7	mittel, rund	+', beta	gelb
13	2s	2sa	17	17;4	17;4;2	7	mittel, eckig	+', beta	weiß/gelb
13	2s	2sb	17	17;1	17;1;12	8	groß, rund	++', beta	weiß/gelb
13	84	84a	17	17;4	17;4;3	50	mittel, eckig	++', beta	weiß/gelb
13	84	84b	17	17;2	17;2;6	1	mittel, rund	++', beta	grau
13	84	84c	17	17;1	17;1;10	3	mittel, eckig	(+)', beta	weiß
13	25n	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
13	25r	25r	17	17;4	17;4;4	3	groß, rund	(+)', beta	weiß/gelb
13	25s	25sa	17	17;1	17;1;12	9	groß, rund	++', beta	weiß/gelb
13	25s	25sb	17	17;4	17;4;5	81	groß, eckig	++', beta	weiß/gelb
13	81	81a	17	17;1	17;1;7	9	groß, eckig	++', beta	weiß/gelb
13	81	81b	17	17;2	17;2;4	2	groß, rund	+', beta	grau/gelb
13	81	81c	17	17;1	17;1;13	3	klein, rund	++', beta	weiß
14	25	25a	2	2;1	2;1;10	18	mittel, rund	+'	gelb
14	39	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
14	39	39b	7	7;2	7;2;1	31	mittel, rund	(+)'	weiß
14	39	39c	2	2;1	2;1;10	6	mittel, rund	+'	gelb
14	26n	26na	36	36;4	36;4;1	5	groß, rund	++'	gelb
14	26n	26nb	7	7;2	7;2;2	3	groß, rund	+'	weiß/gelb
14	26r	26ra	36	36;4	36;4;1	1	groß, rund	++'	gelb

14	26r	26rb	7	7;3	7;3;1	5	groß, rund	+'	weiß/gelb
14	33n	33na	36	36;4	36;4;2	14	groß, rund	+'	gelb
14	33n	33nb	36	36;4	36;4;3	9	groß, rund	+'	grau/gelb
14	33r	33r	2	2;1	2;1;11	1	mittel, rund	++'	grau/gelb
14	33s	33sa	36	36;4	36;4;2	2	groß, rund	+'	gelb
14	33s	33sb	2	2;4	2;4;1	2	mittel, rund	++'	grau/gelb
15	37	37a	165	165;1	165;1;1	10	groß, rund	++'	weiß/gelb
15	37	37c	165	165;2	165;2;1	4	groß, rund	-, -	weiß/gelb
16	26	26a	7	7;4	7;4;1	2	mittel, rund	++'	weiß
16	58	58a	7	7;4	7;4;2	18	mittel, rund	-, -	weiß
16	58	58d	7	7;4	7;4;3	2	klein, rund	+'	weiß
16	55	55a	7	7;4	7;4;1	3	mittel, rund	++'	weiß
16	55	55b	7	7;4	7;4;2	66	mittel, rund	-, -	weiß
16	20n	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
16	20r	20r	7	7;4	7;4;2	2	mittel, rund	-, -	weiß
16	20s	20sb	7	7;4	7;4;2	14	mittel, rund	-, -	weiß
17	89	89a	108	108;1	108;1;1	18	groß, rund	(+)'	weiß/gelb
17	1n	1n	108	108;1	108;1;2	42	groß, rund	(+)'	weiß
17	1r	1r	108	108;1	108;1;2	22	groß, rund	(+)'	weiß
17	1s	1s	108	108;1	108;1;1	5	groß, rund	(+)'	weiß/gelb
17	17n	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
17	17r	17r	108	108;1	108;1;3	1	groß, rund	beta'	weiß
17	17s	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
18	29	29a	7	7;4	7;4;4	113	mittel, rund	+'	weiß
18	29	29b	7	7;4	7;4;5	17	mittel, rund	(+)'	grau
18	13n	13n	7	7;4	7;4;6	1	groß, rund	+'	weiß/gelb
18	13r	13r	7	7;4	7;4;6	2	groß, rund	+'	weiß/gelb
19	36	36a	169	169;1	169;1;1	5	groß, rund	++'	weiß/gelb
19	36	36d	169	169;1	169;1;2	2	groß, rund	-, -	weiß
19	7n	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
19	7r	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
19	16n	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
19	16r	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
20	41	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
20	41	41b	31	31;6	31;6;1	4	klein, rund	(+)'	grau
20	34	34a	31	31;7	31;7;1	137	klein, rund	(+)'	grau
20	34	34b	31	31;7	31;7;2	113	klein, rund	-, -	grau
20	17	17a	36	36;5	36;5;1	1	groß, rund	+'	weiß/gelb
20	17	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
20	66	66a	31	31;6	31;6;2	43	mittel, rund	(+)'	grau/gelb
20	77	77c	31	31;6	31;6;2	23	mittel, rund	(+)'	grau/gelb
20	86	86a	7	7;5	7;5;1	8	groß, rund	++'	grau
20	96	96b	7	7;5	7;5;1	1	groß, rund	++'	grau
20	34n	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
20	34r	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
20	34s	34sa	7	7;5	7;5;1	9	groß, rund	++'	grau
20	34s	34sb	7	7;6	7;6;1	1	groß, rund	+'	grau
21	43	43a	36	36;1	36;1;4	2	groß, rund	++'	gelb
21	43	43c	109	109;2	109;2;1	2	groß, rund	++', beta	weiß
21	95	95a	31	31;5	31;5;4	1	groß, rund	++'	gelb
21	27n	27n	31	31;5	31;5;5	1	groß, rund	+, (beta)'	weiß/gelb
21	27r	27r	31	31;5	31;5;5	9	groß, rund	+, (beta)'	weiß/gelb

21	27s	27s	31	31;5	31;5;4	4	groß, rund	++'	gelb
22	46	46a	173	173;1	173;1;1	4	groß, rund	+++'	weiß/gelb
22	46	46c	173	173;2	173;2;1	37	groß, rund	+'	gelb
23	44	44a	109	109;1	109;1;1	67	groß, rund	++'	weiß/gelb
23	53	53a	31	31;4	31;4;9	11	groß, rund	++'	gelb
23	53	53b	31	31;4	31;4;10	26	groß, rund	++'	weiß/gelb
23	53	53c	31	31;4	31;4;11	1	groß, rund	-, -	weiß/gelb
23	35n	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
23	35r	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
24	10	10a	31	31;5	31;5;6	4	groß, rund	beta	weiß
24	18n	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
24	18r	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
24	18s	18s	109	109;1	109;1;1	14	groß, rund	++'	weiß/gelb
25	45	45a	174	174;1	174;1;1	3	groß, rund	++'	gelb
25	59	59a	174	174;1	174;1;1	3	groß, rund	++'	gelb
25	63	63a	174	174;1	174;1;1	32	groß, rund	++'	gelb
25	63	63b	174	174;1	174;1;2	10	groß, rund	++'	grau/gelb
25	19n	19na	174	174;1	174;1;1	16	groß, rund	++'	gelb
25	19n	19nb	174	174;1	174;1;3	43	groß, rund	++'	weiß/gelb
25	19r	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
25	19s	19sa	170	170;1	170;1;1	1	groß, rund	beta	grau/gelb
25	19s	19sb	170	170;2	170;2;1	3	groß, rund	++'	grau/gelb
25	19s	19sc	174	174;1	174;1;1	2	groß, rund	++'	gelb
26	9	9a	2	2;1	2;1;11	32	groß, rund	+', beta	weiß/gelb
26	9	9c	2	2;1	2;1;12	25	groß, rund	(+) ', beta	grau/gelb
26	52	52a	2	2;5	2;5;1	25	groß, rund	+'	weiß/gelb
26	52	52b	2	2;1	2;1;13	9	groß, rund	(+)'	grau/gelb
26	83	83a	2	2;5	2;5;2	10	groß, rund	+', beta	weiß/gelb
26	83	83b	2	2;1	2;1;12	4	groß, rund	(+) ', beta	grau/gelb
26	23n	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
26	23r	23r	2	2;5	2;5;3	48	mittel, rund	+'	gelb
26	23s	23sa	2	2;5	2;5;4	15	groß, rund	(+) ', beta	grau/gelb
26	23s	23sb	166	166;1	166;1;1	1	groß, rund	++'	weiß/gelb
26	23s	23sc	2	2;1	2;1;7	3	groß, rund	+'	grau/gelb
27	49	49a	54	54;1	54;1;2	1	klein, rund	++'	weiß/gelb
27	28	28a	54	54;1	54;1;3	25	groß, rund	++'	weiß/gelb
27	8n	8na	54	54;1	54;1;3	120	groß, rund	++'	weiß/gelb
27	8n	8nb	54	54;1	54;1;4	82	groß, rund	+'	weiß/gelb
27	8r	8ra	54	54;1	54;1;3	51	groß, rund	++'	weiß/gelb
27	8r	8rb	54	54;1	54;1;4	58	groß, rund	+'	weiß/gelb
27	8s	8sa	54	54;1	54;1;3	1	groß, rund	++'	weiß/gelb
27	8s	8sb	54	54;1	54;1;5	1	klein, rund	+++'	gelb
28	13	13a	16	16;1	16;1;1	27	mittel, rund	++'	gelb
28	13	13b	36	36;1	36;1;4	3	groß, rund	(+)'	grau/gelb
28	6	6b	16	16;1	16;1;2	1	mittel, rund	+'	gelb
28	6	6c	16	16;1	16;1;1	13	mittel, rund	++'	gelb
28	8	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
28	38	38a	16	16;1	16;1;1	74	mittel, rund	++'	gelb
28	18	18a	16	16;1	16;1;1	64	mittel, rund	++'	gelb
28	18	18b	16	16;2	16;2;1	1	mittel, rund	+', beta	gelb
29	75	75a	2	2;1	2;1;3	5	groß, rund	+'	gelb
29	22n	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.

29	22r	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
30	40	40a	89	89;1	89;1;1	1	groß, rund	+', beta	grau/gelb
30	40	40b	7	7;4	7;4;7	16	groß, rund	(+)'	grau/gelb
30	40	40c	7	7;4	7;4;8	12	groß, rund	(+)'	weiß/gelb
30	33	33a	89	89;1	89;1;1	1	groß, rund	+', beta	grau/gelb
30	33	33b	7	7;4	7;4;8	4	groß, rund	(+)'	weiß/gelb
30	33	33c	7	7;4	7;4;9	3	groß, rund	+'	grau/gelb
30	33	33d	7	7;4	7;4;10	5	groß, rund	(+)'	weiß
30	21	21b	89	89;1	89;1;1	4	groß, rund	+', beta	grau/gelb
30	64	64a	89	89;2	89;2;1	2	groß, rund	+', beta	grau/gelb
30	64	64b	7	7;4	7;4;9	17	groß, rund	+'	grau/gelb
30	64	64c	7	7;4	7;4;8	4	groß, rund	(+)'	weiß/gelb
30	60	60b	89	89;1	89;1;1	6	groß, rund	+', beta	grau/gelb
30	71	71a	89	89;1	89;1;1	1	groß, rund	+', beta	grau/gelb
30	71	71b	7	7;4	7;4;11	66	groß, rund	++'	grau/gelb
30	71	71c	7	7;4	7;4;6	5	groß, rund	+'	weiß/gelb
30	9n	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
30	9r	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
30	9s	9sa	89	89;1	89;1;1	1	groß, rund	+', beta	grau/gelb
30	9s	9sb	7	7;4	7;4;9	2	groß, rund	+'	grau/gelb
30	9s	9sc	7	7;4	7;4;6	2	groß, rund	+'	weiß/gelb
30	9s	9se	7	7;4	7;4;11	2	groß, rund	++'	grau/gelb
30	14n	k.Staph	entf.	entf.	entf.	0	entf.	entf.	entf.
30	14r	14r	7	7;4	7;4;12	42	klein, rund	-, -	grau/gelb
30	14s	14sa	7	7;4	7;4;9	7	groß, rund	+'	grau/gelb
30	14s	14sb	89	89;1	89;1;1	3	groß, rund	+', beta	grau/gelb
30	14s	14sd	7	7;4	7;4;13	2	mittel, rund	'(+), -	weiß
30	14s	14se	7	7;4	7;4;14	3	mittel, eckig	++'	grau/gelb
30	14s	14sf	7	7;4	7;4;15	2	mittel, eckig	'(+), -	weiß/gelb
30	93	93a	7	7;4	7;4;9	22	groß, rund	+'	grau/gelb
30	93	93b	7	7;4	7;4;8	5	groß, rund	(+)'	weiß/gelb
30	93	93c	7	7;4	7;4;2	6	mittel, rund	-, -	weiß
30	93	93d	7	7;4	7;4;16	2	groß, rund	-, -	grau/gelb
30	97	97a	7	7;4	7;4;9	1	groß, rund	+'	grau/gelb

k.Staph: kein *S. aureus*

entf.: entfällt

Tab. A1c: Mastertabelle (Teil c)

Patient	Probe	Isolat	AB-Th.	BP	Oxa-cillin	Tetra-cyline	T/S	Erythro-mycin	Clinda-mycin	Cipro-floxacin
1	65	65a	unbek.	r	r	s	s	s	s	r
1	65	65b	unbek.	r	r	s	s	s	s	r
1	65	65c	unbek.	r	r	s	s	s	s	r
1	87	87a	ja	r	r	s	i	r	r	r
1	87	87b	ja	r	r	s	s	s	s	r
1	80	80a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
1	80	80c	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
1	10n	10n	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
1	10r	10r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
1	91	91a	ja	r	s	s	s	s	s	r

1	91	91b	ja	r	r	s	s	s	s	r
1	32n	k.Staph	ja	unbek.						
1	32r	32r	ja	unbek.						
1	32s	32sa	ja	r	r	s	s	s	s	r
1	32s	32sb	ja	unbek.						
1	32s	32sc	ja	r	r	s	s	s	s	r
2	14	14a	ja	unbek.						
2	3n	k.Staph	ja	unbek.						
2	3r	k.Staph	ja	unbek.						
2	3s	3sa	ja	r	s	s	s	s	s	s
2	3s	3sb	ja	r	s	s	s	s	s	s
2	92	92a	ja	r	s	s	s	s	s	s
2	92	92b	ja	r	s	s	s	s	s	s
2	98	98a	ja	r	s	s	s	s	s	s
2	98	98b	ja	r	s	s	s	s	s	s
3	47	47a	unbek.							
3	47	47b	unbek.							
3	12n	k.Staph	ja	unbek.						
3	12r	k.Staph	ja	unbek.						
3	12s	k.Staph	ja	unbek.						
4	35	35a	ja	unbek.						
4	94	94a	ja	unbek.						
4	28n	k.Staph	ja	unbek.						
4	28r	28r	ja	unbek.						
4	28s	28s	ja	unbek.						
5	15	15a	nein	unbek.						
5	15	15b	nein	r	r	s	s	r	r	r
5	15	15d	nein	r	r	i	s	r	r	r
5	11	11a	ja	r	r	i	s	r	r	r
5	11	11b	ja	r	r	i	s	r	r	r
5	11	11c	ja	unbek.						
5	11	11d	ja	r	r	i	s	r	r	r
5	62	62a	ja	r	r	s	s	r	r	r
5	62	62b	ja	r	r	i	s	r	r	r
5	62	62c	ja	r	r	s	s	r	r	r
5	72	72a	ja	r	r	s	s	r	r	r
5	72	72c	ja	r	r	s	s	r	r	r
5	5n	k.Staph	ja	unbek.						
5	5r	k.Staph	ja	unbek.						
5	5s	5sa	ja	r	r	i	s	r	r	r
5	5s	5sb	ja	r	r	i	s	r	r	r
5	5s	5sc	ja	r	r	s	s	r	r	r
5	5s	5sd	ja	r	r	s	s	r	r	r
5	5s	5se	ja	r	r	i	s	r	r	r
6	20	20a	nein	unbek.						
6	50	50a	nein	r	s	s	s	s	s	s
6	50	50b	nein	r	s	s	s	s	s	s
6	4	k.Staph	ja	unbek.						
6	74	74a	ja	unbek.						
6	74	k.Staph	ja	unbek.						
6	29n	k.Staph	ja	unbek.						
6	29r	k.Staph	ja	unbek.						

6	29s	k.Staph	ja	unbek.						
7	3	k.Staph	ja	unbek.						
7	42	42a	ja	unbek.						
7	68	k.Staph	ja	unbek.						
7	78	78a	ja	unbek.						
7	78	78b	ja	unbek.						
7	11n	k.Staph	ja	unbek.						
7	11r	k.Staph	ja	unbek.						
7	11s	11sa	ja	unbek.						
8	73	73a	ja	unbek.						
8	79	79a	ja	unbek.						
8	79	k.Staph	ja	unbek.						
8	30n	k.Staph	ja	unbek.						
8	30r	k.Staph	ja	unbek.						
8	30s	k.Staph	ja	unbek.						
9	1	1a	ja	unbek.						
9	1	1b	ja	unbek.						
9	32	32a	ja	unbek.						
9	32	32b	ja	r	r	s	s	r	r	r
9	32	32c	ja	r	r	s	s	r	r	r
9	23	23a	ja	unbek.						
9	23	23b	ja	unbek.						
9	7	k.Staph	ja	unbek.						
9	56	56a	ja	unbek.						
9	56	56b	ja	r	r	s	s	r	r	r
9	56	56c	ja	r	r	s	s	r	r	r
9	56	56d	ja	r	r	s	s	r	r	r
9	70	70a	ja	unbek.						
9	70	70b	ja	r	r	s	s	r	r	r
9	70	70c	ja	r	r	s	s	r	r	r
9	70	70d	ja	r	r	s	s	r	r	r
9	4n	4n	ja	unbek.						
9	4r	4r	ja	unbek.						
9	85	85a	ja	unbek.						
9	85	85b	ja	r	r	s	s	r	r	r
9	85	85c	ja	r	r	s	s	r	r	r
9	31n	k.Staph	ja	unbek.						
9	31r	31r	ja	unbek.						
9	31s	31sa	ja	r	r	s	s	r	r	r
9	31s	31sb	ja	r	r	s	s	r	r	r
9	31s	31sc	ja	r	r	s	s	r	r	r
9	31s	31sd	ja	r	r	s	s	r	r	r
9	82	82a	ja	unbek.						
9	82	82b	ja	unbek.						
10	16	16a	ja	unbek.						
10	2	2a	ja	unbek.						
10	24	24a	ja	r	s	s	s	s	s	s
10	24	24b	ja	r	s	s	i	s	s	s
10	24	24c	ja	unbek.						
10	61	61a	ja	r	s	s	s	s	s	s
10	61	61b	ja	r	s	s	s	s	s	s
10	21n	21n	ja	unbek.						

10	21r	21r	ja	unbek.						
10	21s	21s	ja	unbek.						
11	31	31b	ja	unbek.						
11	48	48a	ja	unbek.						
11	76	76a	ja	r	s	s	s	s	s	s
11	76	76b	ja	r	s	s	s	s	s	s
11	6n	k.Staph	ja	unbek.						
11	6r	k.Staph	ja	unbek.						
11	6s	6sa	ja	r	s	s	s	s	s	s
11	6s	6sb	ja	r	s	s	s	s	s	s
11	90	90a	ja	r	s	s	s	s	s	s
11	90	90b	ja	r	s	s	s	s	s	s
11	90	90d	ja	unbek.						
12	19	19a	ja	unbek.						
12	19	19b	ja	unbek.						
12	54	54a	ja	unbek.						
12	54	54b	ja	r	s	s	s	s	s	s
12	54	54d	ja	r	s	s	s	s	s	s
12	24n	k.Staph	ja	unbek.						
12	24r	24r	ja	unbek.						
12	24s	24sa	ja	unbek.						
12	24s	24sb	ja	unbek.						
13	12	12a	ja	r	s	s	i	r	r	s
13	12	12b	ja	r	s	r	s	r	i	i
13	12	12c	ja	r	s	r	s	r	r	s
13	12	k.Staph	ja	unbek.						
13	12	k.Staph	ja	unbek.						
13	22	22a	ja	unbek.						
13	22	22c	ja	unbek.						
13	27	27a	ja	unbek.						
13	27	27b	ja	unbek.						
13	5	5	ja	unbek.						
13	30	30b	ja	unbek.						
13	30	30c	ja	r	s	r	r	r	s	i
13	30	30d	ja	r	s	r	s	r	i	s
13	57	57a	ja	unbek.						
13	57	57b	ja	r	s	r	s	r	s	s
13	57	57c	ja	r	s	r	i	r	i	s
13	51	51a	ja	unbek.						
13	51	51b	ja	r	unbek.	r	r	r	r	r
13	51	51c	ja	r	s	r	r	r	unbek.	i
13	69	69a	ja	r	i	r	r	r	r	s
13	69	69b	ja	r	s	i	r	r	r	i
13	67	67a	ja	r	s	r	r	r	r	i
13	67	67b	ja	r	s	r	r	r	r	i
13	88	88a	ja	r	s	r	r	r	r	i
13	88	88b	ja	r	s	r	r	r	r	i
13	88	88c	ja	unbek.						
13	2n	k.Staph	ja	unbek.						
13	2r	2r	ja	unbek.						
13	2s	2sa	ja	unbek.						
13	2s	2sb	ja	unbek.						

13	84	84a	ja	unbek.						
13	84	84b	ja	unbek.						
13	84	84c	ja	unbek.						
13	25n	k.Staph	ja	unbek.						
13	25r	25r	ja	unbek.						
13	25s	25sa	ja	unbek.						
13	25s	25sb	ja	unbek.						
13	81	81a	ja	r	s	r	r	r	r	i
13	81	81b	ja	unbek.						
13	81	81c	ja	r	s	r	r	r	r	i
14	25	25a	ja	unbek.						
14	39	k.Staph	ja	unbek.						
14	39	39b	ja	unbek.						
14	39	39c	ja	unbek.						
14	26n	26na	ja	unbek.						
14	26n	26nb	ja	unbek.						
14	26r	26ra	ja	unbek.						
14	26r	26rb	ja	unbek.						
14	33n	33na	ja	unbek.						
14	33n	33nb	ja	r	s	r	s	r	s	s
14	33r	33r	ja	unbek.						
14	33s	33sa	ja	unbek.						
14	33s	33sb	ja	unbek.						
15	37	37a	unbek.							
15	37	37c	unbek.							
16	26	26a	ja	unbek.						
16	58	58a	ja	r	s	s	s	s	s	i
16	58	58d	ja	r	s	s	s	r	s	s
16	55	55a	ja	r	s	s	s	r	s	s
16	55	55b	ja	r	s	s	s	s	s	i
16	20n	k.Staph	ja	unbek.						
16	20r	20r	ja	unbek.						
16	20s	20sb	ja	unbek.						
17	89	89a	ja	unbek.						
17	1n	1n	ja	unbek.						
17	1r	1r	ja	unbek.						
17	1s	1s	ja	unbek.						
17	17n	k.Staph	ja	unbek.						
17	17r	17r	ja	unbek.						
17	17s	k.Staph	ja	unbek.						
18	29	29a	ja	r	s	s	s	s	s	s
18	29	29b	ja	r	s	s	i	s	s	s
18	13n	13n	ja	unbek.						
18	13r	13r	ja	unbek.						
19	36	36a	ja	r	s	s	s	s	s	s
19	36	36d	ja	r	s	s	s	s	s	s
19	7n	k.Staph	ja	unbek.						
19	7r	k.Staph	ja	unbek.						
19	16n	k.Staph	ja	unbek.						
19	16r	k.Staph	ja	unbek.						
20	41	k.Staph	nein	unbek.						
20	41	41b	nein	unbek.						

20	34	34a	nein	r	s	s	s	r	i	r
20	34	34b	nein	unbek.						
20	17	17a	nein	unbek.						
20	17	k.Staph	nein	unbek.						
20	66	66a	nein	unbek.						
20	77	77c	ja	unbek.						
20	86	86a	ja	unbek.						
20	96	96b	ja	unbek.						
20	34n	k.Staph	ja	unbek.						
20	34r	k.Staph	ja	unbek.						
20	34s	34sa	ja	unbek.						
20	34s	34sb	ja	unbek.						
21	43	43a	ja	unbek.						
21	43	43c	ja	unbek.						
21	95	95a	ja	unbek.						
21	27n	27n	ja	unbek.						
21	27r	27r	ja	unbek.						
21	27s	27s	ja	unbek.						
22	46	46a	ja	unbek.						
22	46	46c	ja	unbek.						
23	44	44a	ja	unbek.						
23	53	53a	nein	r	r	s	s	r	r	r
23	53	53b	nein	r	r	s	s	r	r	r
23	53	53c	nein	r	r	s	s	r	r	r
23	35n	k.Staph	nein	unbek.						
23	35r	k.Staph	nein	unbek.						
24	10	10a	nein	unbek.						
24	18n	k.Staph	nein	unbek.						
24	18r	k.Staph	nein	unbek.						
24	18s	18s	nein	unbek.						
25	45	45a	nein	unbek.						
25	59	59a	nein	unbek.						
25	63	63a	nein	r	s	s	s	s	s	s
25	63	63b	nein	r	s	s	s	s	s	s
25	19n	19na	nein	r	s	s	s	s	s	s
25	19n	19nb	nein	r	s	s	s	s	s	s
25	19r	k.Staph	nein	unbek.						
25	19s	19sa	nein	unbek.						
25	19s	19sb	nein	unbek.						
25	19s	19sc	nein	unbek.						
26	9	9a	ja	r	s	s	s	s	s	s
26	9	9c	ja	r	s	s	s	s	s	i
26	52	52a	ja	unbek.						
26	52	52b	ja	unbek.						
26	83	83a	ja	unbek.						
26	83	83b	ja	unbek.						
26	23n	k.Staph	ja	unbek.						
26	23r	23r	ja	unbek.						
26	23s	23sa	ja	unbek.						
26	23s	23sb	ja	unbek.						
26	23s	23sc	ja	unbek.						
27	49	49a	unbek.							

27	28	28a	ja	unbek.						
27	8n	8na	ja	r	s	s	s	s	s	s
27	8n	8nb	ja	r	s	s	s	s	s	s
27	8r	8ra	ja	r	s	s	s	s	s	s
27	8r	8rb	ja	r	s	s	s	s	s	s
27	8s	8sa	ja	r	s	s	s	s	s	s
27	8s	8sb	ja	r	s	s	s	s	s	s
28	13	13a	ja	unbek.						
28	13	13b	ja	unbek.						
28	6	6b	ja	r	s	s	i	r	i	s
28	6	6c	ja	r	s	s	i	r	i	s
28	8	k.Staph	ja	unbek.						
28	38	38a	ja	unbek.						
28	18	18a	ja	unbek.						
28	18	18b	ja	unbek.						
29	75	75a	ja	unbek.						
29	22n	k.Staph	ja	unbek.						
29	22r	k.Staph	ja	unbek.						
30	40	40a	ja	unbek.						
30	40	40b	ja	r	s	s	s	s	s	s
30	40	40c	ja	r	s	s	s	s	s	s
30	33	33a	nein	unbek.						
30	33	33b	nein	r	s	s	s	s	s	s
30	33	33c	nein	r	s	s	s	s	s	s
30	33	33d	nein	r	s	s	s	s	s	s
30	21	21b	nein	unbek.						
30	64	64a	ja	unbek.						
30	64	64b	ja	r	s	s	s	s	s	s
30	64	64c	ja	r	s	s	s	s	s	s
30	60	60b	nein	unbek.						
30	71	71a	nein	unbek.						
30	71	71b	nein	r	s	s	s	s	s	s
30	71	71c	nein	r	s	s	s	s	s	i
30	9n	k.Staph	ja	unbek.						
30	9r	k.Staph	ja	unbek.						
30	9s	9sa	ja	unbek.						
30	9s	9sb	ja	r	s	s	s	s	s	s
30	9s	9sc	ja	r	s	s	s	s	s	s
30	9s	9se	ja	r	s	s	s	s	s	s
30	14n	k.Staph	ja	unbek.						
30	14r	14r	ja	unbek.						
30	14s	14sa	ja	r	s	s	s	s	s	s
30	14s	14sb	ja	unbek.						
30	14s	14sd	ja	r	s	s	s	s	s	s
30	14s	14se	ja	r	s	s	s	s	s	s
30	14s	14sf	ja	r	s	s	s	s	s	s
30	93	93a	ja	r	s	s	s	s	s	s
30	93	93b	ja	r	s	s	s	s	s	s
30	93	93c	ja	r	s	s	s	s	s	s
30	93	93d	ja	r	s	s	s	s	s	i
30	97	97a	nein	unbek.						

AB-Th: Antibiotikatherapie

BP: Benzylpenicillin
T/S: Trimethoprim/ Sulfamethoxazole
k.Staph: kein *S. aureus*
r: resistent
i: intermediär
s: sensibel
unbek.: unbekannt

Tab. A1d: Mastertabelle (Teil d)

Patient	Probe	Isolat	AB-Th.	Fosfo- mycin	Rifam- picin	Fusidic Acid	Genta- micin	A/S	Moxi- floxacin
1	65	65a	unbek.	s	s	s	r	r	i
1	65	65b	unbek.	s	s	s	s	r	r
1	65	65c	unbek.	s	s	s	s	r	i
1	87	87a	ja	s	s	s	r	r	r
1	87	87b	ja	s	s	s	s	r	r
1	80	80a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
1	80	80c	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
1	10n	10n	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
1	10r	10r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
1	91	91a	ja	s	s	s	s	s	r
1	91	91b	ja	s	s	s	s	s	r
1	32n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
1	32r	32r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
1	32s	32sa	ja	s	s	s	s	r	i
1	32s	32sb	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
1	32s	32sc	ja	s	s	s	s	r	i
2	14	14a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
2	3n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
2	3r	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
2	3s	3sa	ja	s	s	s	s	i	s
2	3s	3sb	ja	s	s	s	s	s	s
2	92	92a	ja	s	s	s	s	i	s
2	92	92b	ja	s	s	s	s	s	s
2	98	98a	ja	s	s	s	s	i	s
2	98	98b	ja	s	s	s	s	s	s
3	47	47a	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
3	47	47b	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
3	12n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
3	12r	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
3	12s	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
4	35	35a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
4	94	94a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
4	28n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
4	28r	28r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
4	28s	28s	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
5	15	15a	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
5	15	15b	nein	s	s	s	s	r	i
5	15	15d	nein	s	s	s	s	r	i
5	11	11a	ja	s	s	s	s	r	s

5	11	11b	ja	s	s	s	s	r	i
5	11	11c	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
5	11	11d	ja	s	s	s	s	r	i
5	62	62a	ja	s	s	s	s	r	s
5	62	62b	ja	s	s	s	s	r	s
5	62	62c	ja	s	s	s	s	r	s
5	72	72a	ja	s	s	s	s	r	s
5	72	72c	ja	s	r	s	s	r	s
5	5n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
5	5r	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
5	5s	5sa	ja	s	s	s	s	r	i
5	5s	5sb	ja	s	s	s	s	r	i
5	5s	5sc	ja	s	s	s	s	r	s
5	5s	5sd	ja	s	s	s	s	r	i
5	5s	5se	ja	s	s	s	s	r	s
6	20	20a	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
6	50	50a	nein	s	s	s	s	s	s
6	50	50b	nein	s	s	s	s	s	s
6	4	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
6	74	74a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
6	74	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
6	29n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
6	29r	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
6	29s	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
7	3	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
7	42	42a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
7	68	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
7	78	78a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
7	78	78b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
7	11n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
7	11r	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
7	11s	11sa	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
8	73	73a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
8	79	79a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
8	79	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
8	30n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
8	30r	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
8	30s	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	1	1a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	1	1b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	32	32a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	32	32b	ja	s	s	s	s	r	r
9	32	32c	ja	s	s	s	s	r	r
9	23	23a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	23	23b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	7	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	56	56a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	56	56b	ja	s	s	s	s	r	i
9	56	56c	ja	s	s	s	s	r	i
9	56	56d	ja	s	s	s	s	r	i
9	70	70a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	70	70b	ja	s	s	s	s	r	i

9	70	70c	ja	s	s	s	s	r	i
9	70	70d	ja	s	s	s	s	r	i
9	4n	4n	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	4r	4r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	85	85a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	85	85b	ja	s	s	s	s	r	r
9	85	85c	ja	s	s	s	s	r	r
9	31n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	31r	31r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	31s	31sa	ja	s	s	s	s	r	i
9	31s	31sb	ja	s	s	s	s	r	i
9	31s	31sc	ja	s	s	s	s	r	i
9	31s	31sd	ja	s	s	s	s	r	r
9	82	82a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	82	82b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
10	16	16a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
10	2	2a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
10	24	24a	ja	s	s	s	r	s	s
10	24	24b	ja	s	s	s	r	s	s
10	24	24c	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
10	61	61a	ja	s	s	s	r	s	s
10	61	61b	ja	s	s	s	r	s	s
10	21n	21n	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
10	21r	21r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
10	21s	21s	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
11	31	31b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
11	48	48a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
11	76	76a	ja	s	s	s	s	s	s
11	76	76b	ja	s	s	s	s	s	s
11	6n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
11	6r	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
11	6s	6sa	ja	s	s	s	s	s	s
11	6s	6sb	ja	s	s	s	s	s	s
11	90	90a	ja	s	s	s	s	s	s
11	90	90b	ja	s	s	s	s	s	s
11	90	90d	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
12	19	19a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
12	19	19b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
12	54	54a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
12	54	54b	ja	s	s	s	s	s	s
12	54	54d	ja	s	s	s	s	s	s
12	24n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
12	24r	24r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
12	24s	24sa	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
12	24s	24sb	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	12	12a	ja	s	r	r	s	unbek.	unbek.
13	12	12b	ja	s	r	r	s	unbek.	unbek.
13	12	12c	ja	s	r	i	s	s	s
13	12	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	12	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	22	22a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	22	22c	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.

13	27	27a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	27	27b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	5	5	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	30	30b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	30	30c	ja	s	r	r	r	unbek.	unbek.
13	30	30d	ja	s	r	i	r	s	s
13	57	57a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	57	57b	ja	s	r	i	s	r	s
13	57	57c	ja	s	r	r	r	unbek.	unbek.
13	51	51a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	51	51b	ja	s	r	r	s	unbek.	unbek.
13	51	51c	ja	s	r	r	r	s	s
13	69	69a	ja	s	r	r	r	unbek.	unbek.
13	69	69b	ja	s	r	i	r	s	s
13	67	67a	ja	s	r	r	r	unbek.	unbek.
13	67	67b	ja	s	r	r	r	s	s
13	88	88a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	r	unbek.	unbek.
13	88	88b	ja	s	r	r	r	s	s
13	88	88c	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	2n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	2r	2r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	2s	2sa	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	2s	2sb	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	84	84a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	84	84b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	84	84c	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	25n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	25r	25r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	25s	25sa	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	25s	25sb	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	81	81a	ja	s	r	r	r	s	s
13	81	81b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	81	81c	ja	unbek.	unbek.	unbek.	r	unbek.	unbek.
14	25	25a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
14	39	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
14	39	39b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
14	39	39c	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
14	26n	26na	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
14	26n	26nb	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
14	26r	26ra	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
14	26r	26rb	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
14	33n	33na	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
14	33n	33nb	ja	s	s	s	s	s	s
14	33r	33r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
14	33s	33sa	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
14	33s	33sb	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
15	37	37a	unbek.						
15	37	37c	unbek.						
16	26	26a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
16	58	58a	ja	s	s	s	s	s	s
16	58	58d	ja	s	s	s	s	s	s
16	55	55a	ja	s	s	s	s	s	s

16	55	55b	ja	s	s	s	s	s	s
16	20n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
16	20r	20r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
16	20s	20sb	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
17	89	89a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
17	1n	1n	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
17	1r	1r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
17	1s	1s	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
17	17n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
17	17r	17r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
17	17s	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
18	29	29a	ja	s	s	s	r	s	s
18	29	29b	ja	s	s	s	r	s	s
18	13n	13n	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
18	13r	13r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
19	36	36a	ja	s	s	s	s	s	s
19	36	36d	ja	s	s	s	s	s	s
19	7n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
19	7r	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
19	16n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
19	16r	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	41	k.Staph	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	41	41b	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	34	34a	nein	s	i	r	s	unbek.	unbek.
20	34	34b	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	17	17a	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	17	k.Staph	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	66	66a	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	77	77c	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	86	86a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	96	96b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	34n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	34r	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	34s	34sa	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	34s	34sb	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
21	43	43a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
21	43	43c	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
21	95	95a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
21	27n	27n	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
21	27r	27r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
21	27s	27s	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
22	46	46a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
22	46	46c	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
23	44	44a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
23	53	53a	nein	s	s	s	s	r	i
23	53	53b	nein	s	s	s	s	r	i
23	53	53c	nein	s	s	s	s	r	i
23	35n	k.Staph	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
23	35r	k.Staph	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
24	10	10a	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
24	18n	k.Staph	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
24	18r	k.Staph	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.

24	18s	18s	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
25	45	45a	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
25	59	59a	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
25	63	63a	nein	s	s	s	s	i	s
25	63	63b	nein	s	s	s	s	i	s
25	19n	19na	nein	s	s	s	s	i	s
25	19n	19nb	nein	s	s	s	s	i	s
25	19r	k.Staph	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
25	19s	19sa	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
25	19s	19sb	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
25	19s	19sc	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
26	9	9a	ja	s	s	s	s	s	s
26	9	9c	ja	s	s	s	s	s	s
26	52	52a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
26	52	52b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
26	83	83a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
26	83	83b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
26	23n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
26	23r	23r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
26	23s	23sa	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
26	23s	23sb	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
26	23s	23sc	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
27	49	49a	unbek.						
27	28	28a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
27	8n	8na	ja	s	s	s	s	s	s
27	8n	8nb	ja	s	s	s	s	s	s
27	8r	8ra	ja	s	s	s	s	s	s
27	8r	8rb	ja	s	s	s	s	s	s
27	8s	8sa	ja	s	s	s	s	s	s
27	8s	8sb	ja	s	s	s	s	s	s
28	13	13a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
28	13	13b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
28	6	6b	ja	s	s	s	r	s	s
28	6	6c	ja	s	s	s	r	s	s
28	8	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
28	38	38a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
28	18	18a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
28	18	18b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
29	75	75a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
29	22n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
29	22r	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	40	40a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	40	40b	ja	s	s	s	s	s	s
30	40	40c	ja	s	s	s	s	s	s
30	33	33a	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	33	33b	nein	s	s	s	s	s	s
30	33	33c	nein	s	s	s	s	s	s
30	33	33d	nein	s	s	s	s	s	s
30	21	21b	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	64	64a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	64	64b	ja	s	s	s	s	s	s
30	64	64c	ja	s	s	s	s	s	s

30	60	60b	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	71	71a	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	71	71b	nein	s	s	s	s	s	s
30	71	71c	nein	s	s	s	s	s	s
30	9n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	9r	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	9s	9sa	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	9s	9sb	ja	s	s	s	s	s	s
30	9s	9sc	ja	s	s	s	s	s	s
30	9s	9se	ja	s	s	s	s	s	s
30	14n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	14r	14r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	14s	14sa	ja	s	s	s	s	s	s
30	14s	14sb	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	14s	14sd	ja	s	s	s	s	s	s
30	14s	14se	ja	s	s	s	s	s	s
30	14s	14sf	ja	s	s	s	s	s	s
30	93	93a	ja	s	s	s	s	s	s
30	93	93b	ja	s	s	s	s	s	s
30	93	93c	ja	s	s	i	s	s	s
30	93	93d	ja	s	s	s	s	s	s
30	97	97a	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.

A/S: Ampicillin/ Sulbactam

k.Staph: kein *S. aureus*

r: resistent

i: intermediär

s: sensibel

unbek.: unbekannt

Tab. A1e: Mastertabelle (Teil e)

Patient	Probe	Isolat	AB-Th.	Imipenem	Vanco- mycin	Q/D	Linezolid	Teico- planin
1	65	65a	unbek.	r	s	s	s	s
1	65	65b	unbek.	r	s	s	s	s
1	65	65c	unbek.	r	s	s	s	s
1	87	87a	ja	r	s	s	s	s
1	87	87b	ja	r	s	s	s	s
1	80	80a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
1	80	80c	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
1	10n	10n	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
1	10r	10r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
1	91	91a	ja	s	s	s	s	s
1	91	91b	ja	s	s	s	s	s
1	32n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
1	32r	32r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
1	32s	32sa	ja	r	s	s	s	s
1	32s	32sb	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
1	32s	32sc	ja	r	s	s	s	s
2	14	14a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
2	3n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.

2	3r	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
2	3s	3sa	ja	s	s	s	s	s
2	3s	3sb	ja	s	s	s	s	s
2	92	92a	ja	s	s	s	s	s
2	92	92b	ja	s	s	s	s	s
2	98	98a	ja	s	s	s	s	s
2	98	98b	ja	s	s	s	s	s
3	47	47a	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
3	47	47b	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
3	12n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
3	12r	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
3	12s	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
4	35	35a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
4	94	94a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
4	28n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
4	28r	28r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
4	28s	28s	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
5	15	15a	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
5	15	15b	nein	r	s	s	s	s
5	15	15d	nein	r	s	s	s	s
5	11	11a	ja	r	s	s	s	s
5	11	11b	ja	r	s	s	s	s
5	11	11c	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
5	11	11d	ja	r	s	s	s	s
5	62	62a	ja	r	s	s	s	s
5	62	62b	ja	r	s	s	s	s
5	62	62c	ja	r	s	s	s	s
5	72	72a	ja	r	s	s	s	s
5	72	72c	ja	r	s	s	s	s
5	5n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
5	5r	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
5	5s	5sa	ja	r	s	s	s	s
5	5s	5sb	ja	r	s	s	s	s
5	5s	5sc	ja	r	s	s	s	s
5	5s	5sd	ja	r	s	s	s	s
5	5s	5se	ja	r	s	s	s	s
6	20	20a	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
6	50	50a	nein	s	s	s	s	s
6	50	50b	nein	s	s	s	s	s
6	4	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
6	74	74a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
6	74	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
6	29n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
6	29r	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
6	29s	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
7	3	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
7	42	42a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
7	68	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
7	78	78a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
7	78	78b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
7	11n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
7	11r	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.

7	11s	11sa	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
8	73	73a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
8	79	79a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
8	79	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
8	30n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
8	30r	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
8	30s	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	1	1a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	1	1b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	32	32a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	32	32b	ja	r	s	s	s	s
9	32	32c	ja	r	s	s	s	s
9	23	23a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	23	23b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	7	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	56	56a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	56	56b	ja	r	s	s	s	s
9	56	56c	ja	r	s	s	s	s
9	56	56d	ja	r	s	s	s	s
9	70	70a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	70	70b	ja	r	s	s	s	s
9	70	70c	ja	r	s	s	s	s
9	70	70d	ja	r	s	s	s	s
9	4n	4n	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	4r	4r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	85	85a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	85	85b	ja	r	s	s	s	s
9	85	85c	ja	r	s	s	s	s
9	31n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	31r	31r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	31s	31sa	ja	r	s	s	s	s
9	31s	31sb	ja	r	s	s	s	s
9	31s	31sc	ja	r	s	s	s	s
9	31s	31sd	ja	r	s	s	s	s
9	82	82a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
9	82	82b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
10	16	16a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
10	2	2a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
10	24	24a	ja	s	s	s	s	s
10	24	24b	ja	s	s	s	s	s
10	24	24c	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
10	61	61a	ja	s	s	s	s	s
10	61	61b	ja	s	s	s	s	s
10	21n	21n	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
10	21r	21r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
10	21s	21s	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
11	31	31b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
11	48	48a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
11	76	76a	ja	s	s	s	s	s
11	76	76b	ja	s	s	s	s	s
11	6n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
11	6r	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.

11	6s	6sa	ja	s	s	s	s	s
11	6s	6sb	ja	s	s	s	s	s
11	90	90a	ja	s	s	s	s	s
11	90	90b	ja	s	s	s	s	s
11	90	90d	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
12	19	19a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
12	19	19b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
12	54	54a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
12	54	54b	ja	s	s	s	s	s
12	54	54d	ja	s	s	s	s	s
12	24n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
12	24r	24r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
12	24s	24sa	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
12	24s	24sb	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	12	12a	ja	unbek.	s	s	s	unbek.
13	12	12b	ja	unbek.	s	s	s	unbek.
13	12	12c	ja	s	s	s	s	s
13	12	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	12	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	22	22a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	22	22c	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	27	27a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	27	27b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	5	5	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	30	30b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	30	30c	ja	unbek.	s	s	s	unbek.
13	30	30d	ja	s	s	s	s	s
13	57	57a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	57	57b	ja	r	s	s	s	s
13	57	57c	ja	unbek.	s	s	s	unbek.
13	51	51a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	51	51b	ja	unbek.	s	s	s	unbek.
13	51	51c	ja	s	s	s	s	s
13	69	69a	ja	unbek.	s	s	s	unbek.
13	69	69b	ja	s	s	s	s	s
13	67	67a	ja	unbek.	s	s	s	unbek.
13	67	67b	ja	s	s	s	s	s
13	88	88a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	88	88b	ja	s	s	s	s	s
13	88	88c	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	2n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	2r	2r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	2s	2sa	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	2s	2sb	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	84	84a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	84	84b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	84	84c	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	25n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	25r	25r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	25s	25sa	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	25s	25sb	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	81	81a	ja	s	s	s	s	s

13	81	81b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
13	81	81c	ja	unbek.	s	unbek.	unbek.	unbek.
14	25	25a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
14	39	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
14	39	39b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
14	39	39c	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
14	26n	26na	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
14	26n	26nb	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
14	26r	26ra	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
14	26r	26rb	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
14	33n	33na	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
14	33n	33nb	ja	s	s	s	s	s
14	33r	33r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
14	33s	33sa	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
14	33s	33sb	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
15	37	37a	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
15	37	37c	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
16	26	26a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
16	58	58a	ja	s	s	s	s	s
16	58	58d	ja	s	s	s	s	s
16	55	55a	ja	s	s	s	s	s
16	55	55b	ja	s	s	s	s	s
16	20n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
16	20r	20r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
16	20s	20sb	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
17	89	89a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
17	1n	1n	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
17	1r	1r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
17	1s	1s	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
17	17n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
17	17r	17r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
17	17s	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
18	29	29a	ja	s	s	s	s	s
18	29	29b	ja	s	s	s	s	s
18	13n	13n	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
18	13r	13r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
19	36	36a	ja	s	s	s	s	s
19	36	36d	ja	s	s	s	s	s
19	7n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
19	7r	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
19	16n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
19	16r	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	41	k.Staph	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	41	41b	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	34	34a	nein	unbek.	s	s	s	unbek.
20	34	34b	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	17	17a	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	17	k.Staph	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	66	66a	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	77	77c	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	86	86a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	96	96b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.

20	34n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	34r	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	34s	34sa	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
20	34s	34sb	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
21	43	43a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
21	43	43c	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
21	95	95a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
21	27n	27n	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
21	27r	27r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
21	27s	27s	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
22	46	46a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
22	46	46c	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
23	44	44a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
23	53	53a	nein	r	s	s	s	s
23	53	53b	nein	r	s	s	s	s
23	53	53c	nein	r	s	s	s	s
23	35n	k.Staph	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
23	35r	k.Staph	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
24	10	10a	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
24	18n	k.Staph	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
24	18r	k.Staph	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
24	18s	18s	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
25	45	45a	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
25	59	59a	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
25	63	63a	nein	s	s	s	s	s
25	63	63b	nein	s	s	s	s	s
25	19n	19na	nein	s	s	s	s	s
25	19n	19nb	nein	s	s	s	s	s
25	19r	k.Staph	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
25	19s	19sa	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
25	19s	19sb	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
25	19s	19sc	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
26	9	9a	ja	s	s	s	s	s
26	9	9c	ja	s	s	s	s	s
26	52	52a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
26	52	52b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
26	83	83a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
26	83	83b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
26	23n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
26	23r	23r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
26	23s	23sa	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
26	23s	23sb	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
26	23s	23sc	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
27	49	49a	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
27	28	28a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
27	8n	8na	ja	s	s	s	s	s
27	8n	8nb	ja	s	s	s	s	s
27	8r	8ra	ja	s	s	s	s	s
27	8r	8rb	ja	s	s	s	s	s
27	8s	8sa	ja	s	s	s	s	s
27	8s	8sb	ja	s	s	s	s	s
28	13	13a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.

28	13	13b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
28	6	6b	ja	s	s	s	s	s
28	6	6c	ja	s	s	s	s	s
28	8	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
28	38	38a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
28	18	18a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
28	18	18b	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
29	75	75a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
29	22n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
29	22r	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	40	40a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	40	40b	ja	s	s	s	s	s
30	40	40c	ja	s	s	s	s	s
30	33	33a	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	33	33b	nein	s	s	s	s	s
30	33	33c	nein	s	s	s	s	s
30	33	33d	nein	s	s	s	s	s
30	21	21b	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	64	64a	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	64	64b	ja	s	s	s	s	s
30	64	64c	ja	s	s	s	s	s
30	60	60b	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	71	71a	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	71	71b	nein	s	s	s	s	s
30	71	71c	nein	s	s	s	s	s
30	9n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	9r	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	9s	9sa	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	9s	9sb	ja	s	s	s	s	s
30	9s	9sc	ja	s	s	s	s	s
30	9s	9se	ja	s	s	s	s	s
30	14n	k.Staph	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	14r	14r	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	14s	14sa	ja	s	s	s	s	s
30	14s	14sb	ja	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
30	14s	14sd	ja	s	s	s	s	s
30	14s	14se	ja	s	s	s	s	s
30	14s	14sf	ja	s	s	s	s	s
30	93	93a	ja	s	s	s	s	s
30	93	93b	ja	s	s	s	s	s
30	93	93c	ja	s	s	s	s	s
30	93	93d	ja	s	s	s	s	s
30	97	97a	nein	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.

Q/D: Quinupristin/Dalfopristin

k.Staph: kein *S. aureus*

r: resistent

i: intermediär

s: sensibel

unbek.: unbekannt

Tab. A2: Antibiotikatherapie zum Zeitpunkt der Probengewinnung

Patient	Geburtstag	Proben- termine	Antibiotika (Verabreichungsform)	Verabreichungs- zeit
1	3.3.89	09.03.2004	keine Ang.	keine Ang.
		02.04.2004	Q(3); F(2)	9.3-23.3; DT
		06.05.2004	F(2)	DT
		02.08.2004	F(2)	DT
2	21.3.81	15.01.2004	N(2); X(1); W(1)	DT; DT; DT
		20.04.2004	N(2); X(1); W(1)	DT; DT; DT
		16.07.2004	N(2); X(1); D(1)	DT; DT; DT
		20.07.2004	N(2); X(1); D(1)	DT; DT; DT
3	24.6.85	28.11.2003	keine Ang.	keine Ang.
		10.05.2004	A(1)	DT
4	23.2.75	21.11.2003	Q(3); N(2)	17.7-31-7; DT
		23.07.2004	Q(3); N(2)	4.5.-18.5; DT
5	22.2.86	09.10.2003	nein (H(1))	(ab 9.10.)
		04.12.2003	H(1)	DT
		23.01.2004	H(1)	DT
		22.04.2004	H(1);G(1); T(3)	DT; ab 7.2.; ab 22.4
6	24.5.73	03.07.2003	nein	nein
		13.10.2003	nein	nein
		16.01.2004	B(1)	20.10-10.11
		26.04.2004	B(1)	1.3.-13.3
7	19.5.93	16.10.2003	D(1)	DT
		02.12.2003	D(1); Aa(1)	DT; 23.11-2.1
		06.05.2004	D(1)	DT
		22.04.2004	B(1)	DT
8	18.4.86	04.05.2004	B(1)	DT
		27.07.2004	P(3)	13.7.-27-7
		24.07.2003	F(2)	DT
		01.10.2003	F(2)	DT
9	10.4.80	11.12.2003	F(2)	DT
		14.01.2004	F(2)	DT
		04.03.2004	F(2)	DT
		18.06.2004	F(2)	DT
		27.07.2004	F(2); U(3)	DT; ab 20.6
		20.08.2004	F(2)	DT
		07.07.2003	Q(3);F(2); E(1)	29.4-13.5, DT; 16.5-30.5
		07.08.2003	F(2); E(1)	DT; 25.6-14.8
13.11.2003	L(3);F(2)	16.9-30.9, DT		
11	19.3.93	04.06.2004	F(2)	DT
		22.09.2003	R(1);F(2)	DT;DT
		05.12.2003	R(1);F(2);C(1)	DT;DT;ab 3.12
		26.04.2004	R(1); F(2)	DT;DT
12	13.11.93	26.07.2004	R(1)	DT
		05.12.2003	E(1)	DT
		08.03.2004	E(1)	DT
		25.06.2004	E(1)	DT
13	5.11.84	04.07.2003	J(1)	DT
		19.08.2003	(M(1);I(1);G(1)); D(1)	(14.7-28.7); DT

		09.10.2003	H(1);F(2)	DT;DT
		16.10.2003	H(1)	DT;DT
		04.11.2003	H(1)	DT;DT
		20.01.2004	I(1); J(1)	DT;DT
		06.02.2004	I(1); J(1)	DT;DT
		18.02.2004	I(1); J(1)	DT;DT
		24.03.2004	I(1); J(1)	DT;DT
		08.04.2004	I(1); J(1)	DT;DT
		16.06.2004	J(1)	DT
		01.07.2004	J(1)	DT
		06.07.2004	J(1)	DT
14	2.8.88	08.08.2003	E(1)	DT
		20.11.2003	E(1)	DT
		01.07.2004	E(1)	DT
		07.10.2004	E(1)	DT
15	30.3.75	08.07.2003	keine Ang.	keine Ang.
16	30.11.82	20.11.2003	N(2)	DT
		27.01.2004	N(2)	DT
		20.02.2004	N(2)	DT
		02.06.2004	N(2)	DT
17	18.1.94	06.04.2004	N(2)	DT
		25.05.2004	N(2)	DT
18	29.4.94	08.12.2003	N(2)	DT
		12.05.2004	N(2)	DT
19	8.2.93	07.10.2003	N(2)	DT
		27.04.2004	F(2);D(2);Aa(1)	DT;DT;DT
		24.05.2004	F(2);Q(3);Aa(1)	DT; 27.4-11.3; DT
20	9.9.94	19.05.2003	nein	nein
		23.05.2003	nein (D(1))	(23.5-8.7)
		08.12.2003	nein (D(1))	(20.12-16.2)
		25.03.2004	nein (D(1))	(25.3-5.10)
		30.04.2004	D(1)	25.3-5.10
		08.06.2004	D(1);F(2)	25.3-5.10; DT
		02.08.2004	D(1)	25.3-5.10
		07.10.2004	B(1)	5.10-27.10
21	17.11.71	27.11.2003	N(2)	DT
		12.07.2004	N(2)	DT
22	2.12.91	25.08.2003	K(1); Aa(1); S(3)	DT;DT;22.8-4.9
	Gest.:			
	9.11.03			
23	20.9.85	05.12.2003	B(1)	DT
		05.03.2004	nein	nein
		22.10.2004	nein	nein
24	10.9.68	17.09.2003	nein	nein (int.Q3 4x/Jahr))
		25.05.2004	nein	nein
25	1.3.68	02.12.2003	nein	nein
		02.03.2004	nein	nein
		27.05.2004	nein	nein

26	22.7.83	28.07.2003	N(2);M(1)	DT; 1.6-20.6
		11.03.2004	N(2)	DT
		18.06.2004	N(2)	DT
27	11.1.93	18.11.2003	keine Ang.	keine Ang.
		17.12.2003	E(1)	DT
28	21.4.91	28.04.2004	D(1),E(1)	(28.4-1.7); DT
		25.07.2003	M(1),I(1);N(2)	Int,int;DT
		15.08.2003	M(1),I(1)	Int,int
		Gest.: 01.10.2003	M(1),I(1)	Int,int
		12.3.04 07.10.2003	M(1),I(1)	Int,int
		29.12.2003	M(1),I(1)	Int,int
29	1.6.93	20.04.2004	F(2)	DT
		11.06.2004	F(2)	DT
30	6.9.78	01.07.2003	M(1)	1.5-16.5
		02.09.2003	nein	nein
		04.12.2003	nein	nein
		24.02.2004	M(1)	4.1-18.1
		23.03.2004	nein	nein
		22.04.2004	nein	nein
		30.04.2004	E(1)	28.4-11.5.
		13.05.2004	E(1)	28.4-11.5.
		13.07.2004	F(2)	27.5-27.6
27.07.2004	nein	nein		

Ang.: Angabe

1: oral

2: inhalativ

3: intravenös

A: Cefuroxim

B: Cefalexin

C: Flucloxacillin

D: Co-Trimoxazol

E: Cefaclor

F: Tobramycin

G : Metronidazol

H : Azithromycin

I: Clindamycin

J: Doxycyclin

K: Linezolid

L: Ceftazidim

M: Ciprofloxacin

N: Colistin

O: Doxycyclin/ Clindamycin

P : Tobramycin/ Meropenem

Q: Ceftazidim/ Tobramycin

R: Itraconazol/ Cefaclor

S : Tobramycin/ Aztreonam

T: Ciprofloxacin/ Tobramycin

U : Teicoplanin/ Ceftazidim

V : Doxycyclin/ Clindamycin

W : Ethambutol/ Rifampicin

X: Clarithromycin

Aa: Itraconazol

DT: Dauertherapie

Int.: Intermittierend

Gest.: gestorben

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt vor allem meiner Doktormutter, Frau PD Dr. C. Wolz, für die Vergabe des Themas und die Korrektur der schriftlichen Zusammenstellung. Weiterhin war ihre Unterstützung in fachlichen Fragen, sowie in der Literatursuche für das Gelingen dieser Arbeit eine große Hilfe. Für ihr stets offenes Ohr, sowie für die schnelle und unkomplizierte Kommunikation möchte ich mich bei ihr sehr herzlich bedanken.

Bedanken muss ich mich auch in besonderem Maße bei Frau Dr. C. Goerke, die mir in vielen Fragen des wissenschaftlichen Arbeitens zur Seite gestanden und bei der Durchführung zahlreicher technischer Verfahren geholfen hat. Sie war immer erreichbar und hat vor allem bei der statistischen Auswertung einen wesentlichen Teil zur Fertigung dieser Arbeit beigetragen.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen der Arbeitsgruppe, Vittoria Bisanzio und Simone Esser möchte ich ein herzliches Dankeschön für die große Unterstützung und die immer fröhliche Arbeitsatmosphäre aussprechen.

Bei Herrn Prof. Dr. M. Stern, Frau Dr. R. Ziebach, Herrn Dr. A. Busch und bei allen helfenden Pflegekräften der Universitätskinderklinik Tübingen möchte ich mich für das Sammeln und Überlassen der Patientenproben bedanken.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. M. Marschal, der mir nicht nur bei der Datensuche eine große Hilfe war, sondern auch die Resistenzbestimmungen für diese Studie zusätzlich zu seiner normalen Alltagsarbeit durchgeführt hat.

Zuletzt gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. K. Dietz, der mich in allen statistischen Fragen geduldig und mit großem Eifer unterstützt und beraten hat.

LEBENS LAUF

Matthias Greßinger

Persönliche Daten:

Geburtstag	10.06.1973
Geburtsort	Ruit auf den Fildern (heute: Ostfildern)
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	seit 26.07.2002 verheiratet mit Christiane Greßinger, geb. Zwerschina
Kinder	Cora (geb. 10.09.2004)
Eltern	Kurt Greßinger (gest. 23.05.2001) und Brigitte Greßinger
Geschwister	Tobias Greßinger

Schulbildung:

1979 - 1983	Grundschule Bruckenackerschule, Filderstadt
1983 - 1992	Gymnasium am Bildungszentrum Reutlingen-Nord mit Abschluss Abitur

07/1992 - 07/1993	Wehrdienst
-------------------	------------

Berufliche Ausbildungen:

10/1993 - 09/1996	Studium der Mathematik an der Universität Stuttgart; Abbruch des Studiums nach bestandenem Vordiplom
11/1996 - 10/1999	Ausbildung zum Physiotherapeuten
11/1999 - 03/2000	Tätigkeit als Physiotherapeut
04/2000	Beginn des Studiums der Humanmedizin, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
05.04.2002	Ärztliche Vorprüfung
16.04.2003	Erstes Staatsexamen
14.05.2005	Zweites Staatsexamen
10.11.2006	Drittes Staatsexamen
03/2004 - 09/2006	Dissertation am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Tübingen
10/2005 - 09/2006	Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Tübingen