

Aus dem
Universitätsklinikum Münster
Institut für Medizinische Mikrobiologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Peters

**Real-time-PCR-basierte *in vitro*-Antibiotika-
Sensibilitätstestung des Small-Colony-Variant-Phänotyps
von *Staphylococcus aureus***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Gerdemann, Nora Christine, geb. Ochs
aus Gelsenkirchen

2015

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. K. Becker

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. T. Kuczius

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2015

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Medizinische Mikrobiologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Peters
Referent: Prof. Dr. med. K. Becker
Koreferent: Prof. Dr. med. T. Kuczius

ZUSAMMENFASSUNG

Real-time-PCR-basierte *in vitro*-Antibiotika-Sensibilitätstestung des Small-Colony-Variant-Phänotyps von *Staphylococcus aureus*

Gerdemann, Nora

Der Erreger *Staphylococcus aureus* ist in der Lage sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine phänotypische Variante, den Small Colony Variant (SCV), auszubilden, der aufgrund eines Elektronentransportdefektes eine im Vergleich zum Elternstamm veränderte Morphologie sowie veränderte metabolische Eigenschaften, v.a. ein verändertes Antibiotika-Empfindlichkeitsprofil aufweist und dadurch in Zusammenhang gebracht wird mit chronisch-rezidivierenden Infektionen.

Durch sein langsames Wachstum und die Ausbildung nadelspitzgroßer, schwer detektierbarer Kolonien, sind die konventionellen Methoden der Antibiotika-Sensibilitätstestung für den Einsatz bei SCVs nur bedingt geeignet.

In der vorliegenden Arbeit wurde mithilfe eines DNA-basierten Versuchsaufbaus eine geeignete Methode der Empfindlichkeitstestung etabliert, die es unabhängig von der phänotypischen Ausprägung eines *S. aureus*-Stammes erlaubt, das Wachstum in Anwesenheit von Antibiotika zu detektieren.

Dafür wurde eine Makrodilutionsreihe für den Elternstamm (normaler Phänotyp) und einer isogenen *hemB*-Mutante (stabile Ausprägung des SCV-Phänotyps) in Anwesenheit vier verschiedener Antibiotika erstellt, die bakterielle DNA isoliert, und Fragmente des bakterienspezifischen 16S-DNA-Gens in der real-time-PCR amplifiziert. Anhand der „Crossing-Point“ (CP)-Werte wurde eine sog. „molekulare MHK“ ermittelt.

Für die getesteten Antibiotika (Erythromycin, Gentamicin, Cefuroxim und Ceftobiprol) zeigte sich dieser Ansatz als brauchbare Alternative zur Ermittlung der *in vitro*-Empfindlichkeit. So konnte auch mit diesem Ansatz die verminderte Empfindlichkeit der *hemB*-Mutante gegenüber Gentamicin bestätigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte vergleichend zu phänotypischen Standard-Testmethoden ein molekularer Ansatz für die Sensibilitätstestung von Staphylokokken-SCVs gegenüber verschiedenen Antibiotika als objektiver Marker entwickelt werden. Die 16S-rDNA-basierte real-time-PCR im Anschluss an eine Antibiotika-Verdünnungsreihe erbrachte ein wachstumsgeschwindigkeitsunabhängiges, sensitives, schnelles und reproduzierbares Verfahren, um die Antibiotika-Sensibilität langsam-wachsender *S. aureus* SCVs zu bestimmen.

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2015

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

„Real-time-PCR-basierte in-vitro-Antibiotika-Sensibilitätstestung des Small-Colony-Variant-Phänotyps von *Staphylococcus aureus*“

im Institut für Medizinische Mikrobiologie unter der Anleitung von:

Prof. Dr. med. Karsten Becker

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Altenberge, den 24.10.2014 _____

Nora Gerdemann

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Staphylococcus aureus</i> und seine Rolle als nosokomialer Erreger.....	1
1.2	Das Phänomen „Small Colony Variants“	2
1.2.1	Metabolischer Hintergrund und klinische Relevanz der <i>S. aureus</i> SCVs.....	4
1.2.2	Sensibilität der <i>S. aureus</i> SCVs	8
1.3	Generierung der <i>hemB</i> -Mutante als stabile Elektronentransportmutante mit phänotypischen Eigenschaften des <i>S. aureus</i> SCVs für ... klinische Tests	11
1.4	Methoden der Empfindlichkeitstestung	13
1.4.1	konventionelle Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration, Definitionen und Normen	13
1.4.2	Problematik in der Anwendung der konventionellen MHK-Bestimmung bei SCVs	15
1.4.3	16S-rDNA-Methode: Entwicklung einer <i>in vitro</i> -Sensibilitätstestung auf molekularer Ebene	16
1.5	bearbeitete Fragestellung	17
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Material	18
2.1.1	Bakterienstämme	18
2.1.2	Antibiotikallösungen.....	18
2.1.3	Primer	20
2.1.4	Reagenzien.....	20
2.1.5	Nährmedien zur Anzucht von <i>S. aureus</i> und <i>hemB</i> -Mutante	22
2.1.6	Laboreinrichtungen und Geräte	23
2.2	Methoden	25
2.2.1	Bakterienstammhaltung	25
2.2.2	Anzucht der zu vergleichenden Bakterienstämme	25

2.2.3	konventionelle Bestimmung der MHK bei Wildtyp und seiner <i>hemB</i> -Mutante	25
2.2.4	Bestimmung der optimalen Primertemperatur.....	28
2.2.5	Makrodilutionstest und Antibiotikakonzentrationen	31
2.2.6	Extraktion chromosomaler DNA.....	33
2.2.7	photometrische Messung des DNA-Gehaltes	34
2.2.8	Light-Cycler-PCR.....	35
2.2.9	Vorbereitung und Erstellen eines quantitativen DNA-Eich- Standards	37
2.2.10	Durchführung der 16S-rDNA-real-time-PCR.....	37
2.2.11	Keimzahlbestimmung.....	39
2.2.12	Qualitätskontrolle	39
3	Ergebnisse	41
3.1	konventionelle MHK-Bestimmung für den Wildtyp und seine <i>hemB</i> - Mutante	42
3.2	photometrische Messung des bakteriellen Wachstums	47
3.3	DNA-Eich-Standard in der real-time-PCR.....	51
3.4	Bestimmung der „molekularen MHK“ anhand der CP- Werte	53
3.5	Induktion von <i>S. aureus</i> SCVs in Gegenwart von Aminoglykosiden ..	72
3.6	Keimzahlbestimmung.....	72
3.7	Qualitätskontrolle	73
4	Diskussion.....	76
5	Zusammenfassung.....	83
6	Literaturverzeichnis	85
7	Danksagung	94
8	Anhang.....	I
8.1	Abkürzungen	I
8.2	MHK-Grenzwerte	III

1 Einleitung

1.1 *Staphylococcus aureus* und seine Rolle als nosokomialer Erreger

Das humanpathogene Bakterium *Staphylococcus aureus* wird zur Familie der *Staphylococcaceae* gezählt, die sich aus kugelförmigen, gram- und katalasepositiven und in überwiegender Zahl fakultativ anaeroben Bakterien zusammensetzt (10,11,43). Durch die an Trauben erinnernde Form der Haufen, die die Bakterien bilden, gelangten sie zu ihrem Namen (griechisch: staphylé=Traube; kokkós= Kügelchen) (53). Die Gattung der *Staphylococcaceae* unterteilt sich weiter in zahlreiche Spezies, von denen sich der *S. aureus* als einziger, für die Humanmediziner wichtiger Koagulasebildner abgrenzt und eine bedeutsame Rolle hinsichtlich der klinischen Relevanz einnimmt (45,50,78,79). Andere koagulasepositive Spezies sind tieradaptiert und verursachen nur äußerst selten Infektionen beim Menschen. Die Unterscheidung zwischen koagulasepositiven und –negativen Staphylokokken ist von großer klinischer Bedeutung, da sich die Pathogenität von *S. aureus* und den koagulasenegativen Staphylokokken stark voneinander unterscheiden.

Bei etwa 20-30 % der Normalbevölkerung besiedelt *S. aureus* als fakultativ-pathogener Erreger die vordere Nasenhöhle und kann von hier auf weitere Areale der Haut und der Schleimhäute verbreitet werden. Die nasale Besiedlung stellt die Quelle und einen unabhängigen Risikofaktor für nachfolgende Infektionen dar (70,84). Somit besitzt dieser Erreger eine überaus wichtige Rolle in der klinischen Infektiologie und stellt einen der häufigsten bakteriellen Erreger sowohl von ambulant erworbenen als auch von nosokomialen Infektionen dar. Somit gehört er zu den am häufigsten isolierten pathogenen Erregern in der mikrobiologischen Routinediagnostik (7,20,23,33,62,77,83).

Im Großen und Ganzen unterscheidet man zwei Hauptgruppen an Erkrankungen, die von *S. aureus* verursacht werden können.

Zum einen sind dies pyogene Haut- und Weichgewebeeinfektionen, die sich als lokal-oberflächliche Entzündungen wie z.B. als Furunkel, Abszesse und

Karbunkel darstellen bis hin zu tiefen Abszessen, Mastitiden oder nekrotisierenden Faszitiden. Oft werden diese Infektionen durch ambulant erworbene, methicillinresistente *S. aureus* (CA-MRSA) ausgelöst, die als besonderen Pathogenitätsfaktor das Panton-Valentine-Leukozidin (PVL) aufweisen (29). Aber auch invasive, systemische Infektionen wie z.B. eine Osteomyelitis, eine Endokarditis oder eine Sepsis können von *S. aureus* verursacht werden.

Bei der zweiten Gruppe der durch *S. aureus* hervorgerufenen Erkrankungen handelt es sich um Toxin-vermittelte Krankheitsbilder, zu der das Toxic-Shock-Syndrom (TSS) wie auch das Staphylococcal-Skalded-Skin-Syndrom (SSSS) sowie die Staphylokokken-Lebensmittelvergiftung gezählt werden, wobei die ersten beiden oft mit einer signifikanten Morbidität und erheblicher Mortalität einhergehen.

Beeinflusst wird der Verlauf dieser akuten Infektionen zum einen durch die spezie- und stammtypische Ausstattung mit Virulenzfaktoren, zum anderen natürlich immer auch durch die individuelle Abwehrlage des Wirtsorganismus (80).

1.2 Das Phänomen „Small Colony Variants“

S. aureus galt lange Zeit als ein primär extrazellulär proliferierender Erreger mit hohem pathogenem Potential, dessen Resistenzmechanismen gegenüber antimikrobiellen Substanzen (verminderte Permeabilität, reduzierte Ribosomenbindung, verändertes Penicillinbindeprotein, β -Laktamasebildung, Produktion inaktivierender Enzyme, die DNA- Gyrase-Resistenz und der aktive Efflux) in zahlreichen Veröffentlichungen aufgedeckt wurden (13-15,24,51,66,74,80). Schließlich brachte die Beobachtung von chronisch-persistierenden und rezidivierenden Infektionen durch *S. aureus* trotz Vorhandenseins aller Virulenzfaktoren, die normalerweise akut-aggressive Verläufe verursachten, neue, wichtige Erkenntnisse in diesem Bereich.

Das Auftreten dieser untypischen Verläufe konnte schließlich mit der Isolierung besonderer phänotypischer *S. aureus*-Varianten assoziiert werden (1,19,28,31,55,58,71).

Diese wurden durch ihr im Vergleich zum „normalen“ *S. aureus*-Phänotyp winziges, nur nadelspitzgroßes Koloniewachstum auf soliden Nährböden als sog. „Small Colony Variants“ (SCV) bezeichnet (55,58,59). Trotz der identischen genetischen Voraussetzungen, zeigt der *S. aureus* SCV-Phänotyp im Gegensatz zum „normalen“ Phänotyp eine bis zu 6-bis 9-fach verlängerte Generationszeit, so dass er oft erst nach einer Inkubationszeit von 48-72 Std. makroskopisch sichtbar ist. Auch in der Größe unterscheidet sich der SCV-Phänotyp von seinem Elternstamm. So zeigt der SCV eine bis zu 10-fach verkleinerte Koloniegröße (32,55,57,70). Eine Pigmentierung der Kolonien kann beim SCV gänzlich fehlen (4,60).

Zudem lassen sich Unterschiede in den biochemischen Reaktionen der SCVs im Vergleich zum Wildtyp beobachten, die ihre Diagnostik zusätzlich erschweren. Die α -Hämolyse erscheint genauso wie die Koagulaseaktivität sehr reduziert, was den SCVs durch die dadurch verminderte Aggressivität eine bis zu 100-fach höhere intrazelluläre Persistenz erlaubt (4,71). Diese intrazelluläre Lokalisation ist oft Ursache für Komplikationen in der Therapie (1,4,47,55,58,75). Im Gegensatz dazu kommt es beim normalen Phänotyp insbesondere durch die Produktion von α -Toxin zu einer meist schnellen Lyse der Wirtszelle (5,55,69,75,76). Die intrazelluläre Persistenz in Endo- und Epithelzellen ermöglicht den SCVs zum einen Schutz vor den wirtseigenen Abwehrmechanismen (4,67,75), zum anderen sind sie dadurch auch schlechter zugänglich für antimikrobielle Therapeutika und ihre Empfindlichkeit diesen Substanzen gegenüber, besonders den Aminoglykosiden und Trimethoprim/Sulfamethoxazol ist deutlich reduziert (4,38,55,58,63). Dieses Phänomen wird von Proctor *et al.* als sog. „Phänotypische Resistenz“ bezeichnet, da die verminderte Empfindlichkeit auf keiner genetischen Codierung beruht (56).

Bei den meisten *S. aureus* SCVs kann ein Auxotrophismus für Hämin, Menadion oder Thymidin, bei einigen auch ein Auxotrophismus für Thiamin

beobachtet werden (4,26,40,55,57,58). Auxotrophismus bezeichnet die Unfähigkeit eines Organismus' in Abwesenheit bestimmter, für den Stoffwechsel notwendiger Substanzen zu wachsen. Die Thymidin-auxotrophen, aber auch andere SCVs zeigen im Vergleich zu den Hämin- und Menadion-auxotrophen Vertretern noch spezielle, zusätzliche Veränderungen in ihrer Morphologie. So fallen sie durch besonders große Heterogenität im Grampräparat auf. Im Elektronenmikroskop weisen die Zellen dieser SCVs im Vergleich zum Elternstamm eine sechs- bis neunfache Größe auf, transelektronenmikroskopisch können in diesen vergrößerten Zellen eine irreguläre Zellteilung in Form von inkomplett oder mehrfach angelegten Teilungsebenen beobachtet werden (27).

Durch Supplementierung der Nährböden mit dem entsprechenden Substrat (Hämin, Menadion, Thiamin oder Thymidin) erreichen die *S. aureus* SCVs wieder ein ihrem Elternstamm vergleichbares Wachstum und auch ihre hämolytische Aktivität wird gesteigert (4,55-57,75).

1.2.1 Metabolischer Hintergrund und klinische Relevanz der *S. aureus* SCVs

Proctor *et al.* konnten zeigen, dass Alterationen in der Elektronentransportkette der *S. aureus* SCVs für ihre veränderte Morphologie, den veränderten Metabolismus und ihre intrazelluläre Persistenz und den damit verbundenen chronisch-persistierenden Krankheitsverläufen verantwortlich sind (42,46,55,56,58). Nachfolgend konnten auf genomischer, transkriptomischer und Proteinebene die Ursachen und Auswirkungen des Phänotypwechsels näher charakterisiert werden (9,9,39,64,81). Auch kleine, nichtkodierende RNAs sind in den Phänotypwechsel involviert (2).

Es stellte sich heraus, dass die *S. aureus*-Varianten Defekte in Vorläufersubstraten der Elektronentransportkette aufweisen. Dabei kommt Hämin und Menadion essentielle Bedeutung zu. Sie beide stellen Vorläufer für notwendige Faktoren des Elektronentransportes dar, der zuletzt für die Bereitstellung von Energie für die Zelle in Form von Adenosintriphosphat (ATP)

verantwortlich ist und somit die meisten metabolischen Vorgänge beeinflusst. Hämin stellt das Vorläufersubstrat für das Cytochrom dar, Menadion wiederum ist essentiell bei der Biosynthese von Menaquinon, wie Cytochrom wesentlicher Bestandteil der Elektronentransportkette. Sind durch den Defekt in einem dieser Vorläufer die ATP-Generierung und damit die Bereitstellung von Energie in der Bakterienzelle gestört, hat dies Auswirkungen auf alle energieabhängigen metabolischen Prozesse.

Für die Generierung und Aufrechterhaltung eines elektrochemischen Gradienten zwischen extra- und intrazellulärem Raum beispielsweise ist ATP unabdingbar. Dieser elektrochemische Gradient (EG) setzt sich zusammen aus dem elektrischen Potential entlang der Zytoplasmamembran, das dem Membranpotential ($\Delta\Psi$) entspricht und der transmembranösen Differenz der H^+ -Ionen (ΔpH) entsprechend dem Verhältnis: $EG = \Delta\Psi - Z \Delta pH$ ($Z = 61,5$ bei $37^\circ C$). Bei einem pH von 7,5 ($\Delta pH = 0$) entspricht somit der elektrochemische Gradient dem Membranpotential ($\Delta\Psi$). Durch Verbrauch von Glucose und Produktion von Säure in Form von Lactat sinkt der extrazelluläre pH und folglich steigt ΔpH an, sodass auch $\Delta\Psi$ konsekutiv um den Betrag von ΔpH abfällt (6). Ein ausreichend hohes Membranpotential aber ist essentiell für die Aufnahme von wichtigen Nährstoffen in die Zelle wie essentielle Aminosäuren, die die Biosynthese wichtiger Proteine sichern. Bei erniedrigtem Membranpotential sinkt also dementsprechend auch das Angebot an essentiellen Aminosäuren; damit reduziert sich die Proteinsyntheserate, was ein verlangsamtes Wachstum der Zelle sowie gleichzeitig eine geringere Produktion an Wirtszellzerstörenden Exotoxinen zur Folge hat. Außerdem ist ein ausreichend negatives Membranpotential wichtig für die Empfindlichkeit des Bakteriums gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen wie z.B. Aminoglykoside, die erst nach aktiver Aufnahme in die Zelle wirksam sind.

Der aktive Transport dieser positivgeladenen Antibiotika kann nur dann vonstatten gehen, wenn der elektrochemische Gradient eine ausreichende Höhe aufweist. Verringert sich dieser Gradient durch Mangel an ATP, so sinkt auch die Aufnahmerate und somit die Effektivität dieser zellwandspezifischen Antibiotika (55). Zudem führt das erniedrigte Membranpotential zu einer

verminderten Wirksamkeit kationischer Abwehrpeptide des Wirtes (35,36) und einiger Lantibiotika (47).

Auch die verminderte Koloniepigmentierung konnten Proctor *et al.* auf die Veränderungen im Energiehaushalt durch Defekte in der Elektronentransportkette erklären, denn für die Karotinoid-Biosynthese stellt ATP ebenfalls einen essentiellen Faktor dar (46).

Die klinische Relevanz der *S. aureus* SCVs konnte in zahlreichen retro- und prospektiven Studien herausgestellt werden(3,47,52,58,60). Das Auftreten von „Small Colony Variants“ wurde zwar schon vor etwa 100 Jahren beobachtet, doch erst als die *S. aureus* SCVs im 20. Jahrhundert mit rekurrierenden und persistierenden Infektionen in Zusammenhang gebracht werden konnten, stieg das Interesse an dieser *S. aureus*-Subpopulation (55-58,61,65,69,70,82).

Nach Bekanntwerden der SCVs und unter Berücksichtigung ihrer speziellen morphologischen und metabolischen Besonderheiten und dadurch erschwerten mikrobiologischen Diagnostik, gelang es, SCVs bei Patienten mit Haut- und Weichteilinfektionen, mit Endokarditis, Sepsis, Osteomyelitis und auch in dem spezifischen Habitat der Lunge von Patienten mit Cystischer Fibrose (Mukoviszidose) zu isolieren (26,31,55,65,82). Bei der Isolation der SCVs aus klinischen Infektionsherden konnten neben SCV-Reinkulturen auch ein gemischtes Vorkommen mit dem normalen Phänotyp von *S. aureus* beobachtet werden (9), das die Detektion dieses Phänotyps zusätzlich behindern kann (28). Eine Assoziation des Auftretens von SCVs mit einer vorangegangenen, längeren Antibiotikatherapie konnte in einer prospektiven Fall-Kontroll-Studie mit Osteomyelitis-Patienten beobachtet werden, die aufgrund der zu geringen Fallzahl (n=14) noch nicht als repräsentativ gelten kann, aber den Verdacht nahe legt, dass bestimmte Antibiotika – in diesem Fall die Aminoglykoside - eine Selektion bzw. Generierung von SCVs bewirken können (79). Im Rahmen dieser Studie konnte bei vier Patienten mit Osteomyelitis, die einer vorherigen lokalen Therapie mit Polmethylmethacrylat-(PMMA)-Ketten mit Gentamicin und einer systemischen Antibiotika-Therapie ausgesetzt waren, das Auftreten von *S. aureus* SCVs nachgewiesen werden. Trotz einer nach den Leitlinien adäquaten systemischen Antibiose, trat die Osteomyelitis bei diesen Patienten

als rekurrende Infektion in Erscheinung (70). Bei den anderen zehn Patienten (ohne vorangegangene lokale Therapie mit Gentamicin-Ketten) wurden ausschließlich *S. aureus* mit normalem Phänotyp isoliert.

Die Induktion bzw. Selektion von *S. aureus* SCVs aus dem normalen Phänotyp durch subinhibitorische Dosen von Aminoglykosiden wie dem Gentamicin oder von Fluorchinolonen konnte schließlich durch einige *in vitro*-Experimente belegt werden (4,40,44,48,49,52,52,54,54,72).

Auch in einer prospektiven Studie mit Mukoviszidose-Patienten (n=78) konnte die Prävalenz von *S. aureus* SCVs bei etwa einem Drittel der Patienten über einen Zeitraum von 34 Monaten beobachtet werden (26). Das Auftreten der meist Thymidin-auxotrophen SCVs war in diesen Fällen assoziiert mit einer prolongierten Antibiotikatherapie mit TMP/SMX über mindestens 18 Monate und die gleichen Klone (mit Pulsfeldgelelektrophorese nachgewiesen) konnten zum Teil auch nach über vier Jahren nach Absetzen der Therapie noch nachgewiesen werden (28). Die durchschnittliche Persistenz der SCVs (49,5 Monate) war damit fast doppelt so hoch wie die des normalen *S. aureus*-Phänotypes (25 Monate), was für einen Überlebensvorteil des SCVs bei Patienten mit Mukoviszidose spricht.

Die bis zu 100-fach erhöhte intrazelluläre Persistenz der SCVs und die damit verbundene verlängerte Erkrankungszeit ließ sich durch *in vitro*-Experimente mit HaCaT-Zellen in einer Studie mit SCV-Isolaten von einem Patienten mit Keratitis follicularis belegen, bei der im Gegensatz zum normalen Phänotyp die SCVs aufgrund einer verringerten Virulenz (keine α -Toxin-Produktion) keine Lyse der Wirtszelle bewirkten und somit intrazellulär persistieren konnten (71). Auch Balwit *et al.* konnten in ihren Studien die erhöhte intrazelluläre Persistenz von SCVs in Endothelzellen nachweisen (4).

Durch eine weitere Studie konnte belegt werden, dass es auch schon durch das intrazelluläre Milieu endothelialer Zellen des Wirtsorganismus' nach Internalisierung der *S. aureus* zu einer Induktion bzw. Selektion seines SCV-Phänotyps kommen kann (69).

Die Verwendung von klinischen SCV-Isolaten bei *in vitro*-Experimenten gestaltete sich aufgrund der Instabilität der SCVs problematisch, sodass aus

diesem Grund stabile Elektronentransport-defiziente Mutanten mit ähnlichen phänotypischen und biochemischen Eigenschaften generiert wurden, die häufig für experimentelle Forschungsansätze Verwendung finden.

1.2.2 Sensibilität der *S. aureus* SCVs

Die Beobachtung, dass chronische und persistierende *S. aureus*-Infektionen, bei denen SCVs isoliert werden konnten, durch konventionelle Antibiotika-Therapien oft nicht in den Griff zu bekommen sind, legte die Vermutung nahe, dass *S. aureus* SCVs *in vivo* in der Lage sind, durch eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber antibakteriellen Wirkstoffen dem hohen antibiotischen Druck standzuhalten und so im Wirtsorganismus für längere Zeit zu persistieren.

In zahlreichen Studien mit *S. aureus*-Isolaten und generierten Elektronentransport-defizienten Mutanten mit SCV-Phänotyp als stabile Vertreter der klinischen SCVs konnten wichtige Erkenntnisse hinsichtlich des Resistenzverhaltens dieser *S. aureus*-Varianten im Vergleich zum normalen Phänotyp gewonnen werden (4,6,12,73).

Durch eine Studie mit einem klinischen *S. aureus*-Isolat aus einer Rindermastitis und der daraus generierten isogenen *hemB*-Mutante in einem Mausmodell konnten hinsichtlich der Sensibilität des Wildtyps und seiner *hemB*-Mutante gegenüber verschiedenen klinisch wichtigen Antibiotika bedeutende Beobachtungen gemacht werden. In der *in vitro*-Testung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) mittels Bouillon-Mikrodilution konnten für die Antibiotika Cephapirin, Ciprofloxacin, Lysostaphin, Oxacillin, Rifampicin und Vancomycin für beide Stämme die gleichen MHK-Werte ermittelt werden, wobei aber der antimikrobielle Effekt von Cephapirin gegen die *hemB*-Mutante *in vivo* deutlich geringer ausfiel und sie im Vergleich zum normalen Phänotyp nach 24 Std. antibiotischer Therapie *in vivo* häufiger Persistenz zeigte (12).

Eine sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtbare verminderte Empfindlichkeit des SCVs im Vergleich zum Wildtyp besteht gegenüber den Aminoglykosiden, wie dem Gentamicin (6,48). Diese ist zu erklären durch den Defekt in der

Elektronentransportkette und das damit verbundene für die aktive Aufnahme des intrazellulär wirksamen Gentamicins nicht ausreichend hohe Membranpotential.

Versuche, SCVs durch Zugabe von Glukose zur ATP-Generierung auf ein ähnliches Empfindlichkeitsniveau gegenüber Gentamicin zu bringen wie ihr Elternstamm, zeigten ein negatives Ergebnis. Zwar konnte ein initial ähnlich hohes Membranpotential bei beiden Stämmen gemessen werden, trotzdem konnte die Effektivität von Gentamicin gegen den SCV in der MHK-Testung *in vitro* nicht erhöht werden (6).

In vitro konnte ein besonders breites Wirkspektrum bei der Anwendung gegen *S. aureus*, einschließlich methicillinresistenten *S. aureus* (MRSA) und SCVs, für ein Cephalosporin der sog. 5. Generation (MRSA-wirksame Cephalosporine), Ceftobiprol, beobachtet werden (73). Während in der Studie Ceftobiprol gegen MRSA und ihre SCVs *in vitro* eine vergleichbare Wirksamkeit wie Linezolid bewies, zeigte sich bei Cefuroxim und Moxifloxacin keine oder eine nur sehr geringe Wirkung. Die methicillin- und penicillinsensiblen Stämmen (Wildtyp und SCV) waren deutlich empfindlicher gegenüber Ceftobiprol als gegenüber Cefuroxim und Linezolid, aber weniger sensibel als gegenüber Moxifloxacin. Bis auf wenige Ausnahmen wurden alle *S. aureus* SCVs, inklusive der methicillinresistenten Stämme, durch $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ Ceftobiprol in ihrem Wachstum gehemmt (73).

In einer *in vitro*-Vergleichsstudie zur Antibiotikaempfindlichkeit von SCV- und Elternstammpaaren (MRSA und MSSA) gegenüber verschiedener Fluorquinolone bei unterschiedlichen pH-Werten konnten Idelevich *et al.* zeigen, dass unter sauren Bedingungen (pH=5,8) Finafloxacin die höchste Wirksamkeit gegenüber MSSA und MRSA aufwies ganz unabhängig von der Art des Phänotyps (SCV oder normaler Phänotyp).

Unter neutralen pH-Verhältnissen allerdings konnte für Moxifloxacin die höchste Wirksamkeit gegen MSSA, in abnehmender Reihenfolge für Finafloxacin, Levofloxacin und Ciprofloxacin festgestellt werden. Dabei gab es nochmal einen Unterschied in der Wirksamkeit von Ciprofloxacin in Abhängigkeit vom Phänotyp, wobei Ciprofloxacin weniger wirksam gegenüber dem SCV war. Alle

anderen getesteten Fluorquinolone zeigten gleiche Wirksamkeit gegenüber Normaltyp und SCV (22).

Zusammengefasst kann bei den klinischen SCVs eine verminderte Empfindlichkeit *in vivo* gegenüber vielen nach *in vitro*-Kriterien adäquaten Antibiotikatherapien beobachtet werden, die durch ihre Fähigkeit, verstärkt in nicht-phagozytierende Zellen zu invadieren (erhöhte Expression von Fibronectin- und Fibrinogen-Bindeproteinen) und dort zu persistieren (verminderte α -Toxin-Produktion) zu erklären ist. Denn durch diese intrazelluläre Persistenz können sie sich der Wirkung vieler Antibiotika entziehen, deren Effizienz in vielen Fällen extrazellulär viel größer ist als intrazellulär. Demgegenüber konnte zusätzlich bei *in vitro*-Empfindlichkeitstests insbesondere für Aminoglykoside eine verminderte Sensibilität der SCVs festgestellt werden, wobei sich im Rahmen von *in vitro*-Testungen gegenüber anderen Wirkstoffgruppen oft keine oder nur geringe Unterschiede in der Empfindlichkeit zwischen Wildtyp und SCV zeigen (71). Die reduzierte Empfindlichkeit der SCVs gegenüber Gentamicin kann aber je nach Auxotrophismus durch Supplementierung mit Hämin, Menadion oder Thymidin auf das Empfindlichkeitsniveau des Wildtypes angehoben werden (5). So fanden sich in einem Kaninchen-Endokarditis-Modell mit einer *hemB*- und einer *menD*-Mutante ausschließlich *menD*-Mutanten in der Niere. Durch embolische Infarkte während der experimentellen Endokarditis wurde Hämin freigesetzt und dadurch die *hemB*-Mutante supplementiert. Diese wuchs dann ähnlich dem Elternstamm und auch ihre Antibiotikaempfindlichkeit entsprach wieder der ihres Elternstammes (5).

Neuere Untersuchungen von Garcia *et al.* konnten allerdings zeigen, dass es durchaus Fälle gibt, in denen Antibiotika unter bestimmten Umständen eine höhere Wirksamkeit gegenüber SCVs als gegenüber dem normalen Phänotyp aufweisen.

Garcia *et al.* testeten dafür die Sensibilität des COL-Elternstammes (MRSA), seiner *hemB*-Mutante und der *menD*-Mutante gegenüber drei verschiedenen β -Lactam-Antibiotika (Cloxacillin, Meropenem und Doripenem). β -Lactame waren bis dato in der Empfindlichkeitstestung von MRSA und deren SCVs nicht

berücksichtigt worden aufgrund der bekannten Resistenzlage der MRSA. Dabei machten sie die überraschende Entdeckung, dass nach Phagozytose des MRSA-COL-Stammes durch THP-1-Makrophagen β -Lactam-Antibiotika plötzlich ihre volle Wirksamkeit auch gegen den MRSA entwickelten. Als Grund dieser plötzlichen Wirksamkeit der β -Lactame gegenüber dem COL-Elternstamm wurde der nach der Lyse der Bakterien auftretende saure pH und die damit verbundene konsekutive Umwandlung des Penicillin-bindenden Proteins PBP 2 α in eine aktive Form herangezogen.

Um nun den Beweis zu führen, dass dieses Phänomen auch für den SCV-Phänotyp gelte, wurden in den *in vitro*-Experimenten die o.g. Stämme nach Phagozytose der Bakterien durch THP1-Zellen in An- und Abwesenheit von N-acetylcystein (NAC) als Radikalfänger hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber den 3 β -Lactam-Antibiotika getestet.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass die phagozytierte *menD*-Mutante eine fast 100-900-fach erhöhte Empfindlichkeit gegenüber den β -Lactamen aufwies als ihr Elternstamm und die *hemB*-Mutante. Diesen Effekt führten Garcia *et al.* auf die Kombination des durch die Lyse entstandenen sauren pHs-Milieus und der Überempfindlichkeit der *men-D*-Mutante gegenüber Radikalen zurück.

Die Wirksamkeit der β -Lactame war gegenüber dem phagozytierten Elternstamm und seiner *hemB*-Mutante gleich (18).

1.3 Generierung der *hemB*-Mutante als stabile Elektronentransportmutante mit phänotypischen Eigenschaften des *S. aureus* SCVs für klinische Tests

Da die in der Klinik natürlich auftretenden Formen der „Small Colony Variants“ genetisch noch relativ undefiniert sind und zudem eine hohe Reversionsrate zum normalen Phänotyp aufweisen, eignen sie sich nur bedingt für weitergehende Versuche zum Studium ihrer Charakteristika. Durch Blockierung der Gene für die Hämin- und Menadion-Biosynthese (*hemB* und *menD*), die essentielle Vorläufersubstrate des Elektronentransportes darstellen, konnten genetisch definierte Mutanten hergestellt werden, die sich in klinischen Tests

als stabil erwiesen (5,34,68,75). In diesem Zusammenhang generierten von Eiff *et al.* 1997 eine stabile Elektronentransportdefekte Mutante, indem sie das Gen für die Hämin-Biosynthese *hemB* durch den Einbau einer *ermB*-Kassette in *S. aureus* 8325-4 ausschalteten und damit die Elektronentransportkette unterbrachen.

Die so entstandene *hemB*-Mutante zeigt die typischen Charakteristika der klinischen SCVs und ist in der Lage, in kultivierten Endothelzellen intrazellulär zu persistieren (75).

So gelang mithilfe dieser stabilen Mutante der Beweis, dass die morphologischen und biochemischen Charakteristika ebenso wie die erhöhte intrazelluläre Persistenz und die reduzierte antimikrobielle Empfindlichkeit der klinischen *S. aureus* SCVs in Zusammenhang stehen mit Defekten in der Elektronentransportkette (6).

Baumert *et al.* konnten anhand von Versuchen mit zwei normalen *S. aureus*-Phänotypen und ihren isogenen *hemB*-Mutanten weitere Erkenntnisse über die klinischen SCVs erlangen. So zeigten sich bei *in vitro*-Messung des Membranpotentials große Unterschiede im Metabolismus zwischen Wildtyp und *hemB*-Mutante. Wenn Glukose im Nährmedium verbraucht war, fiel das Membranpotential der SCVs im Gegensatz zum normalen Phänotypen auf Werte unter -100 mV ab, da sie nicht in der Lage sind, Lactat im anaeroben Stoffwechsel zur Energiegewinnung zu nutzen. Da die Aufnahme von Aminoglykosiden aber abhängig von einem ausreichend hohen Membranpotential erfolgt, zeigten sich die SCVs in diesem Fall um 10 bis 30-fach weniger empfindlich gegenüber den Aminoglykosiden (6).

Es konnte zudem von Kohler *et al.* eine erhöhte Expression von Enzymen der Glykolyse, der Fermentation und verwandter Stoffwechselwege nachgewiesen werden, so dass man daraus die Schlussfolgerung zog, dass die *hemB*-Mutante und damit die SCVs Energie in Form von ATP aus Glukose bzw. Fruktose nur durch Substratphosphorylierung gewinnen können (34). Eine erhöhte Adhäsion der *hemB*-Mutante zu Fibrinogen- und Fibronectin-beladenen „Coverclips“, konnte durch den Nachweis einer gesteigerten Oberflächenpräsenz von Fibrinogen- und Fibronectin-bindenden Molekülen erklärt werden (68).

Jedoch spiegeln genetisch definierte Mutanten, die den SCV-Phänotyp ausprägen, nicht in allen Facetten den SCV-Phänotyp von klinisch generierten SCVs wider (37).

1.4 Methoden der Empfindlichkeitstestung

1.4.1 konventionelle Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration, Definitionen und Normen

Um eine mikrobielle Infektion möglichst effizient therapieren zu können, ist es wichtig, gezielt ein Chemotherapeutikum in einer adäquaten Dosierung zu wählen, um den diagnostizierten Erreger selektiv eradizieren zu können, ohne den Wirtsorganismus zu schädigen. Um die Empfindlichkeit des Erregers und damit die erforderliche Dosis des Wirkstoffes zu ermitteln, stehen dem mikrobiologischen Routinelabor verschiedene Testmethoden zur Verfügung: der Vitek-Test, Bouillondilutionstest (Makro- und Mikrodilution), Agardilutionstest, Agardiffusionstest und der Epsilometer-Test.

Zur Beurteilung und Einordnung der Ergebnisse dieser Methoden sind einige Begriffsdefinitionen unerlässlich.

Minimale Hemmkonzentration (MHK) = niedrigste Konzentration eines Wirkstoffes (in $\mu\text{g/ml}$), bei der unter definierten *in vitro*-Bedingungen die Vermehrung von getesteten Mikroorganismen innerhalb einer festgelegten Zeitspanne verhindert wird.

Minimale bakterizide Konzentration = niedrigste Konzentration eines Wirkstoffes (in $\mu\text{g/ml}$), die unter definierten *in vitro*-Bedingungen ein definiertes Inokulum von getesteten Bakterien innerhalb einer festgelegten Zeitspanne um $\geq 99,9\%$ reduziert.

Grenzwert = MHK, anhand derer die Erreger nach den Empfindlichkeitsprädikaten/Bewertungsstufen „sensibel“, „intermediär“ oder „resistent“ voneinander getrennt werden.

Testmethoden der Empfindlichkeitsprüfung:

1.) Bouillon-Dilutionsmethode (DIN 58940-8): Bei dieser Methode werden mehrere Behältnisse mit gleichem Volumen einer Bouillon und gleichem Volumen einer Wirkstofflösung mit geometrisch abnehmender Wirkstoffkonzentration und definiertem Inokulum beschickt (gemischt). Ziel ist es, die niedrigste Wirkstoffkonzentration festzustellen, die das bakterielle Wachstum makroskopisch sichtbar hemmt (\triangleq MHK). Sie kann als Makrodilution (Testvolumen ≥ 2 ml) oder als Mikrodilution (Testvolumen ≤ 500 μ l) durchgeführt werden.

2.) Agardilutionstest (DIN 58940-6): Hierbei wird ein definiertes Inokulum auf ein festes Nährmedium aufgetragen, das bereits den Wirkstoff in geometrisch abgestuften Konzentrationen enthält. Die Auswertung erfolgt durch die Beurteilung des Wachstums und es wird ebenfalls die MHK bestimmt.

3.) Agardiffusionstest (DIN 58940-2): Auf feste mit dem getesteten Erreger beimpfte Nährmedien werden den Wirkstoff enthaltene Testplättchen aufgebracht. Durch Diffusion des Wirkstoffes in das Medium entsteht ein sog. Hemmhof (= wachstumsfreie Zone), dessen Durchmesser in mm angegeben wird. Dieser Hemmhofdurchmesser (HHD) ist dann mit der MHK des getesteten Erregers korrelierbar.

4.) Epsilometer-Test: Im Rahmen dieses Testes wird auf ein mit dem getesteten Erreger beimpftes festes Nährmedium ein sog. Etest-Streifen gelegt. Dieser enthält den zu testenden Wirkstoff in einem Konzentrationsgradienten. Während der Inkubationszeit diffundiert der Wirkstoff in die umgebende Matrix, so dass auch im Medium ein Konzentrationsgefälle entsteht. Durch Wachstumshemmung des Erregers entsteht so eine ellipsenförmige Aussparung und der Schnittpunkt der Ellipse mit dem Etest-Streifen kann als MHK abgelesen werden.

Nach Bestimmung der MHK-Werte durch die beschriebenen Methoden, können die Erreger anhand von MHK-Grenzwerten (siehe Anhang) in die drei Empfindlichkeitsstufen „sensibel“, „intermediär“ und „resistent“ für das getestete Antibiotikum eingeordnet werden.

„**sensibel**“ (auch: empfindlich) = Bewertungsstufe eines Erregers, wenn die für ein Chemotherapeutikum ermittelte MHK so gering ist (kleiner oder gleich einer geeignet gewählten Grenzkonzentration), dass bei einer Therapie mit der üblichen Dosierung und bei geeigneter Indikation im Allgemeinen ein Therapieerfolg zu erwarten ist (nach DIN 58940-1).

„**intermediär**“ (auch: mäßig empfindlich) = Bewertungsstufe eines Erregers, wenn die für ein Chemotherapeutikum ermittelte MHK in einem Bereich liegt (zwischen zwei Grenzkonzentrationen), für den ohne zusätzliche Berücksichtigung weiterer Kriterien keine Beurteilung des zu erwartenden Therapieerfolges möglich ist (nach DIN 58940-1).

„**resistent**“ (auch: unempfindlich) = Bewertungsstufe eines Erregers, wenn die für ein Chemotherapeutikum ermittelte MHK so hoch ist (über einer Grenzkonzentration liegt), dass auch bei Verwendung einer zugelassenen Höchstdosierung ein therapeutischer Erfolg nicht zu erwarten ist (nach DIN 58940-1).

1.4.2 Problematik in der Anwendung der konventionellen MHK-Bestimmung bei SCVs

Die in der Routinediagnostik etablierten, standardisierten *in vitro*-Empfindlichkeits-Testmethoden (s.o.) wurden für schnell wachsende, aerobe Mikroorganismen entwickelt, deren Wachstum nach einer Inkubationszeit von maximal 24 Std. an einem definitiven Endpunkt stagniert und durch eine Trübung des Flüssig-Kulturmediums objektiv sichtbar wird.

Im Gegensatz dazu stehen anspruchsvolle und/oder langsam wachsende Bakterien, für die die Anwendung der konventionellen Verfahren der *in vitro*-Sensibilitätstestung oft scheitert.

Dazu gehören unter anderem obligat anaerob oder intrazellulär wachsende Bakterien wie z.B. Chlamydien oder Rickettsien, aber auch langsam wachsende Mikroorganismen wie die *S. aureus* Small Colony Variants, die sogar unter optimalen Wachstumsbedingungen eine im Vergleich zum normalen *S. aureus*-Phänotyp 6- bis 9- fach verlängerte Generationszeit aufweisen und daher oft erst nach 48- bis 72-stündiger Bebrütung phänotypisch sichtbar werden.

Aus diesem Grund ist eine Verlängerung der Inkubationszeiten von normalerweise 12-24 Std. auf 48-72 Std. erforderlich.

Da SCVs die oben genannten veränderten biochemischen Reaktionen und die für *S. aureus* untypische Morphologie aufweisen, werden sie in der Routinediagnostik nicht selten übersehen oder durch die Wahl ungeeigneter Medien (z.B. Blutagar), auf denen sie supplementiert werden, fehlidentifiziert (1,30).

Auch durch kommerzielle (semi)automatisierte Identifizierungssysteme (z.B. VITEK-2) kommt es oft zu einer Fehlidentifizierung oder zur Einstufung als „nicht klassifizierbarer Keim“ aufgrund ungenügenden Wachstums oder veränderten biochemischen Reaktionen (8).

1.4.3 16S-rDNA-Methode: Entwicklung einer *in vitro*-Sensibilitätstestung auf molekularer Ebene

Im Gegensatz zu diesen altbewährten, konventionellen Verfahren der Empfindlichkeitstestung, deren Anwendung in der Diagnostik der SCVs problematisch ist, wurde nun im Rahmen dieser Arbeit mithilfe des für bakterielle Pathogene spezifischen 16S-rDNA-Gens ein molekulares Verfahren der MHK-Testung entwickelt.

Das 16S-rDNA-Gen wie bei Lohmann *et al.* beschrieben, kodiert für ribosomale Bestandteile der Bakterienzelle und ist damit beteiligt an seiner Proteinbiosynthese (8,21,31,41). Mithilfe von für das 16S-rDNA-Gen spezifischer Primer (16S-r und 16S-f) kann selektiv die Expression der Genprodukte dieses Gens (16SrRNA) detektiert werden und damit indirekt das Wachstum der Bakterien gemessen werden (21). Durch die gezielte

Amplifikation dieses pathogenspezifischen Gens in der real-time-PCR wird es möglich, bakterielles Wachstum quantitativ genau zu bestimmen. Durch die Messung der bakteriellen DNA aus einer seriellen Antibiotika-Verdünnungsreihe kann die minimale Hemmkonzentration auf molekularer Ebene bestimmt werden, die hier als sog. „**molekulare MHK**“ („mMHK“) bezeichnet wird.

1.5 bearbeitete Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein molekulares Verfahren auf der Grundlage einer 16S-rDNA-basierten real-time-PCR entwickelt, um eine Phänotyp-unabhängige, zuverlässige und gut standardisierte Methode zur *in vitro*-Empfindlichkeitstestung von Staphylokokken-SCVs zu etablieren, die den „klassischen“ MHK-Testmethoden gegenübergestellt wurde. Es wurde die Aktivität verschiedener antibiotischer Wirkstoffe gegenüber einem isogenen Stammpaar bestehend aus einem *S. aureus*-Stamm mit normalem Phänotyp und einer klonal identischen stabilen *hemB*-Mutante mit SCV-Phänotyp getestet.

Dafür wurde aus einer seriellen Bouillon-Makrodilution durch DNA-Isolation zu definierten Zeitpunkten das Wachstum der getesteten Stämme photometrisch gemessen, danach erfolgte die Amplifikation in der real-time-PCR. Im Anschluss wurde die Detektion der „molekularen MHK“ im neuen Verfahren den Ergebnisse der konventionellen Testmethoden gegenübergestellt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Bei dem hier verwendeten Bakterienstamm-Paar handelt es sich zum einen um den Wildtyp *S. aureus* A22223I als Vertreter des normalen Phänotyps, ein klinisches Isolat entnommen aus der Stammsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Münster und zum anderen um die genotypisch entsprechende, isogene *hemB*-Mutante.

Diese wurde durch Ausschaltung des biosynthetischen Gens für die Hämin-Synthese durch Einbau einer *ermB*-Kassette in ihrem Elektronentransport unterbrochen und stellt einen stabilen phänotypischen Vertreter des SCV-Phänotyps dar (5,25,75).

2.1.2 Antibiotikallösungen

Das Stammpaar bestehend aus *S. aureus* A22223I und seiner *hemB*-Mutante wurden im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich ihrer *in vitro*-Empfindlichkeit gegenüber vier verschiedenen Antibiotika untersucht: Erythromycin als Vertreter der Makrolide, Gentamicin stellvertretend für die Gruppe der Aminoglykoside, Cefuroxim als Cephalosporin der 2. Generation und Ceftobiprol als Cephalosporin der sog. 5. Generation und erstes Breitspektrumantibiotikum dieser Klasse mit guter Wirksamkeit gegen MRSA (73).

Antibiotika-Stammlösungen

- 1) Erythromycin: (USB™, Cleveland, USA)
Aktivität laut Hersteller 924 µg/mg (92,4%)
d.h. 10,82 mg/ml \triangleq 100% Aktivität
Stammlösung: 10,82 mg Erythromycin+
1 ml 70 % Ethanol = c= 10,0 mg/ml

- 2) Gentamicin: (Bio Chemica, AppliChem, Darmstadt)
Aktivität laut Hersteller 680 µg/mg (68,0%)
d.h. 14,69 mg/ml \triangleq 100% Aktivität
Stammlösung: 14,69 mg Gentamicin + 1 ml HPLC-
Wasser = c= 10,0 mg/ml

- 3) Cefuroxim: (GlaxoSmithKline, Deutschland)
Aktivität laut Hersteller 974 µg/mg (97,4%)
d.h. 10,27 mg/ml \triangleq 100% Aktivität
Stammlösung: 10,27 mg Cefuroxim + 1 ml HPLC-
Wasser = c= 10,0 mg/ml

- 4) Ceftobiprol: (Johnson&Johnson GmbH, Neuss, Deutschland)
Aktivität laut Hersteller 958 µg/mg (95,8%)
d.h. 10,44 mg/ml \triangleq 100% Aktivität
Lösungsmittel: HPLC-Wasser + DMSO/Eisessig
(9,9:1) im Verhältnis 1:1
Stammlösung: 10,44 mg Ceftobiprol + 1 ml Lösungs-
mittel = c= 10,0 mg/ml

Die serielle Antibiotikaverdünnung wurde in 1:2-Schritten durchgeführt und umfasste die Konzentrationen 64 µg/ml bis 0,032 µg/ml.

2.1.3 Primer

Die in den Versuchen verwendeten Primer stammen von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland.

Dargestellt sind sie in 5'-3'-Richtung. Bei dem mit „f“ endenden Primer handelt es sich um den Vorwärtsprimer, „r“ steht für den Rückwärtsprimer.

1) 16S-f: CGG TCT TGC TGT CAC TTA

2) 16S-r: TCT CAG GTC GGC TAT GC

Sie wurden jeweils in einer Verdünnung von 1:10 mit HPLC-Wasser mit der Konzentration von $c = 10 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ verwendet. Die optimale Annealingtemperatur wurde in nachfolgenden Experimenten mithilfe einer PCR ermittelt.

2.1.4 Reagenzien

Agarose Molecular biology Quality, AppliChem, Darmstadt

Aqua injectable; Braun, Melsungen

DNA-Längenstandards 1kb + 100 bp; MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Deutschland

DMSO; AppliChem, Darmstadt

dNTP-Mix; Roth, Kalsruhe

EDTA; Serva, Heidelberg

Essigsäure 96%; AppliChem, Darmstadt

Ethanol 70%; Merck, Darmstadt

High Pure PCR Template Preparation Kit Roche, Penzberg

Im Test enthalten:

Binding buffer; Proteinase K; Inhibitor Removal buffer; Wash buffer;

Elution buffer

HPLC-Wasser LiChrosolv®; Merck, Darmstadt

Isopropanol; Merck, Darmstadt

Lysostaphin 2 mg/ml; Ambi Products LLC, NY, USA

LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I; Roche, Penzberg

Im Test enthalten:

LightCycler FastStart Enzyme; LightCycler FastStart Reaction Mix SYBR Green I (10x conc.); MgCl₂ stock solution, 25mM; H₂O, PCR grade

NaCl; Honeywell, Burdick & Johnson

Taq-DNA-Polymerase 5U/μl; Applied Biosystems, Weiterstadt

Puffer und Lösungen:**TAE-Puffer (1x)**

Tris	4 mM
EDTA-Na ₂ -Salz	1 mM
Essigsäure	40 mM
pH 8,5 ± 0,2	

TBE-Puffer (10x)

Tris-Base (45 M)	108 g
Borsäure (45 M)	55 g
Na-EDTA (25 mM, pH 8,0)	9,35 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

PBS-Puffer

NaCl	8,5 g
Pufferlösung:	20,00 ml
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	12,5 g
KH ₂ PO ₄	2,88 g

in 1 l Aqua dest. unter Erwärmen lösen

in 1 l H₂O_{dest.} unter Erwärmen lösen

Ethidiumbromid-Färbegrad (1 μg/ml):

EtBr-Lösung (10 mg/ml)	25 μl
H ₂ O _{dest.}	ad 250 ml

Fixierer für Polaroid-Negative (Natrium-Sulfat-Lösung 18%-ig)

Natriumsulfit (wasserfrei)		440,00 g
warmes H ₂ O dest.	ad	2000,00 ml

2.1.5 Nährmedien zur Anzucht von *S. aureus* und *hemB*-Mutante

Zur Anzucht vom *S. aureus* A22223I-Elternstamm und seiner *hemB*-Mutante wurden folgende Medien benutzt:

Tryptic Soy Bouillon (TSB): **Fa. Becton Dickinson, Heidelberg**

Pankreatisch abgebautes Casein		17,0 g
Enzymatisch abgebautes Sojamehl		3,0 g
Dextrose		2,5 g
NaCl		5,0 g
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O		2,5 g
H ₂ O dest.	ad	1,0 l

pH 7,3 für Bouillon

für *hemB*-Mutante zusätzlich:

Erythromycin		5,0 µl
--------------	--	--------

Tryptic Soy Agar (TSA): **Fa. Becton Dickinson, Heidelberg**

Pankreatisch abgebautes Casein		15,0 g
Enzymatisch abgebautes Sojamehl		5,0 g
NaCl		5,0 g
Gelose		15,0 g
H ₂ O dest.	ad	1,0 l

pH 7,3 für Agar

für *hemB*-Mutante zusätzlich:

Erythromycin		2,5 µl
--------------	--	--------

Columbia-Blut-Agar: **Fa. Becton Dickinson, Heidelberg**

Casein		12,0 g
--------	--	--------

Peptisch abgebautes Tiergewebe	5,0 g
Rindfleischextrakt	3,0 g
Maisstärke	1,0 g
Agar	13,5 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1,0 l
pH 7,5 für Agar	

Müller-Hinton-Agar: **Fa. Mast Diagnostics, Merseyside, England**

Caseinhydrolysat	17,5 g
Agar	12,0 g
Maisstärke	1,5 g
Herzmuskelextrakt	5,0 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1,0 l
pH 7,3 für Agar	

2.1.6 Laboreinrichtungen und Geräte

Brutschrank; Heraeus, Langenselbold, Vilber Lourmat, Eberhardzell

Centrifuge 5417R; Eppendorf AG, Hamburg

Elektrophoresekammer horizontal sub-cell®GT; BioRad, München

Greiner Röhrchen (steril); Greiner bio-one, Solingen

Heizblock Dri-Block DB2P, DB3D; Techne AG, Jahnsdorf

High Pure filter tubes und collection tubes; Roche, Penzberg

Koloniezähler colony counter; Stuart Scientific, UK

Kühlzentrifuge Megafuge 1.0 R; Heraeus, Hanau

Küvetten; Sarstedt, Nümbrecht

LightCycler-PCR-Gerät; Roche, Penzberg

LightCycler Software 3.5; Roche, Penzberg

LightCycler Kapillaren; Roche, Penzberg

Mikrotitrationsplatten; Greiner bio-one, Solingen

Mikrowellengerät Pro II; Panasonic

Photometer Ultrospect®500/1100pro; Amersham Biosciences, Freiburg
Gene Quant II Photometer; Amersham Pharmacia Biotech,
Freiburg

Pipettenspitzen; Sarstedt, Nümbrecht

Schüttelinkubator Mutiron HAT; Infors, Übach-Patenberg

Schüttler KS 501 digital; IKA Labortechnik, Staufen

Sofortbildkamera Polaroid MP 4; Bachhofer, Reutlingen

Spannungsgerät Power Pac 300; Biorad, München

Standard-Probengefäße; Eppendorf AG, Hamburg

Sterilbank Hera Safe; Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf

Thermocycler Gene Amp R PCR System 9700; PE Applied Biosystems,
Darmstadt

Thermomixer comfort; Eppendorf AG, Hamburg

Tischzentrifuge; NeoLab, Heidelberg

Transferpipetten; Eppendorf AG, Hamburg

Vitek®2-Gerät; bioMérieux sa, Marcy l'Etoile, Frankreich

Vortex Vortex Mixer; neolab, Heidelberg

Waage; Sartorius, Göttingen

Wasserbad; Rieber Normset, Reutlingen

Zentrifuge Megafuge 1.0 R; Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterienstammhaltung

Die Bakterienstämme wurden den bei -80°C gelagerten glycerinhaltigen Stammkulturen entnommen und auf Agarplatten bei 37°C angezogen. Im Falle des Wildtyps wurden Coloumbia-Blut-Agarplatten verwendet, die *hemB*-Mutante hingegen wurde auf Tryptic Soy Agar (TSA), welcher $2,5\ \mu\text{l}$ Erythromycin enthielt, kultiviert. Die Platten wurden nach 24 h Bebrütung, bzw. 48 h im Fall der *hemB*-Mutante bei 4°C aufbewahrt und in regelmäßigen Abständen auf frische Platten überimpft.

2.2.2 Anzucht der zu vergleichenden Bakterienstämme

Zur Herstellung von Übernachtskulturen (ÜNK) wurden 1 Kolonie (Wildtyp) bzw. 4-5 Kolonien (*hemB*-Mutante) in jeweils 20 ml TSB (Wildtyp) bzw. in 20 ml TSB + $5\ \mu\text{l}$ Erythromycin (*hemB*-Mutante) in 100 ml Schikanekolben eingimpft und ca. 18 h im Schüttelinkubator bei 37°C bebrütet.

2.2.3 konventionelle Bestimmung der MHK bei Wildtyp und seiner *hemB*-Mutante

Um die Antibiotikasensibilität der beiden Bakterienstämme auf konventionelle Art zu testen, wurde zunächst ein standardisierter **VITEK-Test** (VITEK 2-System; bioMerieux sa, Marcy l'Etoile, Frankreich) durchgeführt. Es handelt sich bei diesem Testverfahren um eine automatische Identifizierung und Resistenztestung klinisch relevanter Keime. Grundlage dieses Systems sind biochemische Testmethoden und eine spezifische Datenbank, die der Auswertung der Ergebnisse der biochemischen Reaktionen dient. Erfasst werden können also ausschließlich Mikroorganismen, deren Eigenschaften in dieser Datenbasis erfasst sind. Dafür wurden Suspensionen der Bakterienkolonien des Wildtyps und der Mutante in 3 ml einer sterilen NaCl-

Lösung (0,45-0,5% NaCl, pH 5,0-7,2) hergestellt, die mittels eines Densitometers auf eine Dichte von 0,5 nach McFarland eingestellt wurde. Die Auswertung der Testergebnisse erfolgte automatisch mithilfe der VITEK 2-Software.

Bei der Resistenztestung wurden Grenzwerte (sog. „breakpoints“) der Empfindlichkeit des Bakteriums gegenüber den Antibiotika ermittelt und die Stämme dadurch den Kategorien „sensibel“, „intermediär“ oder „resistent“ zugeordnet.

Zusätzlich wurde eine **MHK-Bestimmung mittels einer Bouillon-Mikrodilution** nach DIN 58940-81 angesetzt, wie sie standardmäßig für Keime mit normaler Wachstumsgeschwindigkeit (12-24 h) üblich ist.

Als Wachstumsmedium wurde für diese Versuche eine Müller-Hinton-Bouillon (MH-Bouillon) verwendet. Die beiden Stämme *S. aureus* A22223I und seine *hemB*-Mutante wurden hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Erythromycin, Gentamicin, und Cefuroxim für alle Versuche im Doppelansatz getestet, die Antibiotika wurden in einer geometrischen Verdünnungsreihe in 1:2-Schritten beginnend mit der höchsten Konzentration 1280 µg/ml bis zu einer Konzentration von 1,25 µg/ml verdünnt.

Um Standardbedingungen herzustellen, wurde die Dichte der Keimsuspension zunächst mithilfe eines Densitometers in der MH-Bouillon auf 0,5 nach McFarland eingestellt, danach in MH-Bouillon 1:100 verdünnt (3 ml Bouillon + 30 µl McFarland 0,5) und davon je 10 µl in jede Vertiefung der Mikrotitrationsplatte pipettiert. Das Antibiotikum wurde in den genannten Verdünnungen dazugegeben. Zusätzlich wurde bei jedem Durchlauf pro Platte je eine wirkstofffreie Wachstumskontrolle mitgeführt. Außerdem wurden drei Referenzstämme, deren MHK-Werte in den mittleren Konzentrationsbereichen der zu testenden Wirkstoffe anzusiedeln waren, gleichzeitig als Qualitätskontrolle mituntersucht. In diesem Versuchsansatz handelte es sich um die Stämme: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 und *S. aureus* ATCC 25923. Die Platten wurden nach Beimpfung zur Bebrütung für zunächst 24 h bei 37 °C in den Inkubator gestellt, nach der ersten optischen Kontrolle dann für weitere 24 h inkubiert und im Anschluss erneut optisch auf Trübung

und somit Wachstum in den Ansätzen untersucht, dies immer im Vergleich zu der mitgeführten Wachstumskontrolle.

Zur Bestimmung der Keimzahl wurde die auf eine 1:100-Verdünnung eingestellte Ausgangskultur in NaCl weiterverdünnt und aus den Verdünnungen 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5} je 100 μl auf BHI-Platten ausgestrichen.

In einem zweiten Schritt wurde ein sog. **E-Test** durchgeführt. Der dabei verwendete Etest-Streifen enthielt die gewünschte antimikrobielle Substanz in einem durch eine Skala optisch hinterlegten Konzentrationsgradienten, für Erythromycin, Cefuroxim und Gentamicin reichte der Konzentrationsgradient von 0,016-256 $\mu\text{g/ml}$ und für Ceftobiprol von 0,002-32 $\mu\text{g/ml}$. Es wurde zuerst eine Keimaufschwemmung der beiden Stämme hergestellt, die wiederum mithilfe des Densitometers auf einen Wert von 0,5 nach McFarland eingestellt wurde. Diese Keimsuspensionen wurden dann auf Müller-Hinton-Agarplatten ausgestrichen und je ein Etest-Streifen mit einem der zu testenden Wirkstoffe auf eine Platte gelegt und für zweimal 24 h bei 37 °C inkubiert. Das Prinzip dieses Testes besteht darin, dass während der Inkubation kontinuierlich durch gleichzeitige Diffusion und Dilution das Antibiotikum aus dem Plastikstreifen in die Umgebungsmatrix abgegeben wird und dadurch im Agar entlang des Streifens ein Konzentrationsgefälle des Wirkstoffes entsteht. Wachstum des Keimes kann folglich nur dort verzeichnet werden, wo die Antibiotikakonzentration in der Matrix unterhalb des MHK-Wertes liegt. So kann also nach 24-stündiger bzw. 48-stündiger Inkubation eine von bakteriellem Wachstum ausgelassene symmetrische Ellipse entlang des Teststreifens festgestellt werden, wobei der Schnittpunkt dieser Ellipse mit der Skala als MHK-Wert abzulesen ist.

Zur Kontaminations- und Wachstumskontrolle wurden die Keimsuspensionen zusätzlich auf Blutagarplatten ausgestrichen.

Zur Ergänzung wurde schließlich noch der sog. **Agardiffusionstest** nach DIN 58940-3 angesetzt. Dafür wurde die gleiche Keimsuspension benutzt wie für den E-Test. Diese wurde auf eine Müller-Hinton-Agarplatte ausgestrichen und auf diese die vier verschiedenen Wirkstoffträger (Testblättchen) so angeordnet aufgebracht, dass überschneidungsfreie Hemmhöfe entstehen konnten. Die

Plättchen wurden auf der beimpften Agaroberfläche leicht angedrückt, ohne die Oberfläche zu zerstören. Ihre Antibiotikakonzentrationen lagen für Erythromycin bei 15 µg, für Gentamicin bei 10 µg, für Cefuroxim und für Ceftobiprol bei 30 µg. Die Bebrütung erfolgte bei 36±1 °C für 18±2 Std.

Die nach der angegebenen Inkubationszeit entstandenen Hemmhöfe um die Wirkstoffplättchen wurden ausgemessen und in vollen Millimetern angegeben, wobei als Grenzen die Ränder der in ihrem Größenwachstum stark eingeschränkten Bakterienkolonien dienten.

2.2.4 Bestimmung der optimalen Primertemperatur

Vor Durchführung der real-time-PCR wurde für das Primer-Paar 16S-f und 16S-r die optimale Annealingtemperatur mittels einer konventionellen Multiplex-PCR mit einem Temperaturgradienten ermittelt. Als optimale Annealingtemperatur wird die Temperatur verstanden, bei der sich die Primer am besten an die Template-DNA anlagern können. Das Spektrum des Temperaturgradientens umfasste Temperaturen von 58 bis 64 °C und es wurden jeweils mit beiden Bakterienstämmen 30 PCR-Zyklen durchlaufen.

Durchführung der PCR:

50 µl Ansatz:

2 µl DNA-template (Wildtyp) bzw.
6 µl DNA-template (*hemB*-Mutante)
0,5 µl 16S-f-Primer
0,5 µl 16S-r-Primer
1 µl dNTPs
0,25 µl Taq-DNA-Polymerase
5 µl Puffer (10x)

ad 50 µl H₂O_{dest.}

Eine initiale Denaturierung für 5 min. bei 95 °C, der sog. „hotstart“ diente dem Aufschmelzen der Template-DNA und der Vermeidung von Fehlhybridisierungen des Primers.

Dieser Schritt gewährleistete, dass die PCR erst dann begann, als die nötige Reaktionstemperatur erreicht war, bei der der Primer spezifisch an die DNA bindet. Dann folgten 30 Zyklen des in der Tabelle erfassten PCR-Programmes.

Tab.1: Amplifikationsprogramm zur Ermittlung der Annealingtemperatur (30 Zyklen)

	Temperatur (°C)	Zeit (sek.)
Denaturierung	95	60
Hybridisierung	58 – 64	60
Extension	72	90

Nach dem letzten Zyklus wurde die Extensionszeit auf 10 min. verlängert, um unvollständig synthetisierte Amplifikationsprodukte noch zu vervollständigen, bevor die Proben dann bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurden.

Herstellung des 2 %-igen Agarosegels für die Elektrophorese:

Zunächst wurden 225 ml TAE-Puffer (einfach konzentriert) in einen 500 ml Kolben gegeben und mit 3,5 g Agarose gemischt.

Das Erhitzen dieses Gemisches erfolgte gleichmäßig in der Mikrowelle, wobei der Kolben gelegentlich geschwenkt werden musste.

Dabei musste das Gemisch für 30 sek. sprudelnd kochen, damit die Agarose in Lösung gehen konnte.

Um die optimale Konsistenz zum Gießen des Gels zu erreichen, ließ man die Lösung etwa 5 min abkühlen und goß sie dann in eine vorgefertigte Gelkammer, in der sie etwa 30 min auspolymerisieren musste. Zur Herstellung der Geltaschen wurde vor Eingießen der Lösung ein Kunststoffkamm in die Kammer eingesetzt.

Gelelektrophorese:

Das auspolymerisierte Gel wurde nun in eine Elektrophoresekammer gegeben und diese mit TBE-Puffer-Lösung aufgefüllt, so dass das Gel

gerade bedeckt war. 10 µl der aufgereinigten PCR-Produkte wurden mit 3 µl Probenpuffer gemischt und mit einer Pipette in je eine Geltasche überführt.

10 µl eines DNA-Standardmarkers (1 kb + 100 bp) dienten hier bei jedem Durchlauf als Kontrolle.

Nachdem alle DNA-Ansätze und der DNA-Längenstandard in das Gel eingebracht waren, wurde eine Spannung von 110 V für 40 min an die Kammer angelegt.

Anschließend wurde das Gel herausgenommen, 30 min. in einem Ethidiumbromid-Färbebad gefärbt, dann 30 min. in Aqua dest. gewässert, um dann unter UV-Licht fotografiert zu werden, wobei die DNA-Banden durch das UV-Licht sichtbar gemacht wurden.

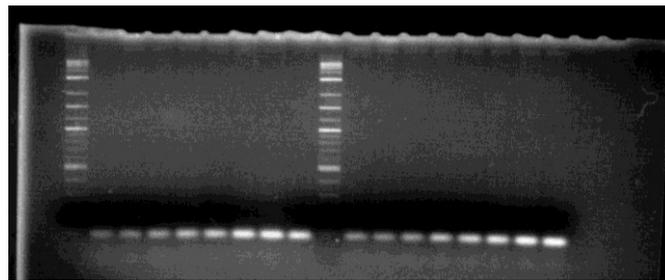


Abb.1: Agarosegel mit DNA-Banden

DNA-Banden von links nach rechts:

DNA-Längenstandard (1 kb+100 bp), Wildtyp+16S-f und 16S-r bei: 64°C, 63,6°C, 62,9°C, 61,7°C, 60,2°C, 59,2°C, 58,5°C, 58°C;

DNA-Längenstandard (1 kb+100 bp), *S. aureus*-SCV+16S-f und 16S-r bei: 64°C, 63,6°C, 62,9°C, 61,7°C, 60,2°C, 59,2°C, 58,5°C und 58°C.

Da die Signalstärke des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid, der in doppelsträngige DNA interkaliert und sie unter UV-Licht sichtbar machen kann, sowohl für den Wildtyp als auch für seinen SCV bei 58°C am größten war, d.h. bei dieser Temperatur die höchste Produktmenge erreicht wurde, wurde hier die optimale Annealingtemperatur der Primer angenommen und für alle weiteren Versuche angewandt.

2.2.5 Makrodilutionstest und Antibiotikakonzentrationen

Der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Bouillon-Makrodilutionstest mit seriellen Verdünnungsreihen der vier verschiedenen Antibiotika diente der Untersuchung der beiden Bakterienstämme auf ihre Empfindlichkeit gegenüber diesen Antibiotika *in vitro*. Dabei kam im Gegensatz zur konventionellen MHK-Bestimmung in diesem Fall der Detektion bakterieller DNA in den Versuchsansätzen zur Bestimmung der sog. „molekularen MHK“ die zentrale Bedeutung zu.

Es wurde zudem ein bakterienspezifisches Gen, das 16S-rDNA-Gen, genutzt, um mithilfe selektiver Oligonukleotide im Rahmen der real-time-PCR wie bei Hunfeld et al. beschrieben (21), gezielt bakterielle DNA zu amplifizieren.

Die zwei Bakterienstämme wurden den verschiedenen Verdünnungen der eingesetzten Antibiotika-Lösungen ausgesetzt und nach einem definierten Zeitraum durch photometrische Messung zum einen und mithilfe der 16S-rDNA-real-time-PCR zum anderen auf ihr Wachstum hin untersucht und damit wurde ihre Antibiotika-Empfindlichkeit in Form der „molekularen minimalen Hemmkonzentration“ bestimmt.

Anzucht der zu lysierenden Bakterienisolate:

1 Kolonie (Wildtyp) bzw. 4-5 Kolonien (*hemB*-Mutante) in 20 ml TSB (Wildtyp) bzw. in 20 ml TSB + 5 µl Erythromycin (*hemB*-Mutante) wurden in je einen 100 ml- Schikanekolben eingimpft und ca. 18 h im Schüttelinkubator bei 37 °C bebrütet.

Einstellung der optischen Dichte:

Mithilfe eines Photometers wurde bei einer Wellenlänge von 578 nm die optische Dichte (OD) der beiden Übernachtskulturen (ÜNK) gemessen. Im Falle des Wildtyps in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000, bei der *hemB*-Mutante zum einen unverdünnt, in den Verdünnungen 1:10 und 1:100.

Aus den jeweils drei gemessenen OD-Werten wurde für beide ÜNK je ein Mittelwert berechnet.

Um von beiden ÜNK eine Standard-Kultur mit einer OD=0,05 einzustellen, wurden in je 250 ml TSB die entsprechend errechnete Menge der ÜNK hinzugefügt und anschließend zur Kontrolle die optische Dichte erneut photometrisch ermittelt.

Antibiotika-Verdünnungsreihe

Alle Versuche wurden immer im Doppelansatz mit jeweils 5 ml-Ansätzen durchgeführt.

Zunächst wurden von jeder der beiden Standard-Kulturen (OD=0,05) 5 ml im Doppelansatz direkt nach ihrer Herstellung (\triangle Zeitpunkt $0=t_0$) in je einem Greiner Röhrchen als sog. **t_0 -Kontrolle** für spätere Versuche entnommen und bei -20°C aufbewahrt.

Je 5 ml der Standard-Kultur wurde in ein Reagenzglas mit Deckel überführt und dann eine Antibiotika-Verdünnungsreihe beginnend mit einer Konzentration von $64\ \mu\text{g/ml}$ bis zu einer Konzentration von $0,032\ \mu\text{g/ml}$ in 1:2- Verdünnungsschritten und im Doppelansatz für jedes Antibiotikum für beide Bakterienstämme durchgeführt.

Zusätzlich zu den mit Antibiotika versetzten Ansätzen wurden in jedem Versuch je 5 ml der Standard-Kultur ohne Zusatz des jeweiligen Antibiotikums als sog. Wachstumskontrolle im Doppelansatz mitinkubiert. Die 5-ml-Ansätze wurden dann für 24 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert, anschließend herausgenommen zum sog. Zeitpunkt t_{24} und aus jedem Ansatz jeweils 2 ml zur danach folgenden DNA-Extraktion entnommen.

Die nun um 2 ml reduzierten Ansätze wurden für weitere 24 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert, um nach diesen 24 h zum sog. Zeitpunkt t_{48} wiederum je 2 ml zur DNA-Extraktion aus den Ansätzen zu entnehmen.

Zusätzlich wurden zu beiden Zeitpunkten (t_{24} , t_{48}) aus jedem Versuchsansatz eine Blutagarplatte (Wildtyp) bzw. eine TSA-Platte mit

Zusatz von 2,5 µl Erythromycin (*hemB*-Mutante) zur Keimidentifizierung und somit zur Qualitätskontrolle im 3-Ösen-Ausstrich beimpft.

2.2.6 Extraktion chromosomaler DNA

Zur Extraktion der bakteriellen DNA aus den Antibiotika-Verdünnungsreihen kam in allen Versuchen das High Pure PCR Template Kit von Roche zur Anwendung.

Dabei wurden die aus den Antibiotika-Verdünnungsreihen entnommenen 2 ml-Proben in 2 ml-Eppendorf-Gefäße überführt und für 5 min. bei 3000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Zellüberstand in 200 µl PBS-Puffer resuspendiert. Zur Lyse der enthaltenen Bakterien wurde dieser Suspension nun 5 µl Lysostaphin zugegeben und für 15 min. bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Anschließend wurden 200 µl des im Kit enthaltenen Binding Buffers sowie 40 µl der Proteinase K für die Verdauung freigesetzter störender Proteine hinzugefügt und sofort mit dem Vortexer gemischt und wiederum für 10 min. bei 70 °C im Wasserbad inkubiert.

Nachdem das Gemisch nachfolgend mit 100 µl Isopropanol gut gevortext wurde, wurde es mit einer Transferpipette in das obere Reservoir der vorher miteinander kombinierten High Pure Filter- und Collection-Tubes gegeben.

Das Ganze wurde dann in einer Standard-Tischzentrifuge für 1 min. bei 8000 rpm zentrifugiert, der Überstand inklusive Collection-Tube wurden verworfen und der High Pure Filter-Tube mit einem neuen Collection-Tube kombiniert.

Nun folgte die Zugabe von 500 µl des im Kit enthaltenen Inhibitor Removal Buffers in das obere Reservoir des Filter-Tubes und das erneute Zentrifugieren für 1 min. bei 8000 rpm. Wiederum Verwerfen des Überstandes samt Collection-Tube und Kombination mit neuem Collection-Tube.

Anschließend wurden 500 µl des enthaltenen Wash Buffers in das obere Reservoir gefüllt und eine weitere min. bei 8000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand und das Collection-Tube wieder verworfen und ein neues Collection-Tube verwendet. Der Reinigungsschritt mit Zugabe des Wash

Buffers wurde ein zweites Mal durchgeführt, wobei nach dem Zentrifugieren diesmal nur der Überstand verworfen, aber mit dem gleichen Collection-Tube weitergearbeitet wurde. Um nun alle Reste des Wash Buffers zu entfernen wurde noch einmal zentrifugiert, für 10 sek. bei maximaler Geschwindigkeit (14000rpm).

Erneutes Verwerfen des Überstandes und Kombination des Filter-Tubes mit einem sterilen 1,5 ml Eppendorf-Gefäß. Nun folgte die Zugabe von 200 µl auf 70 °C erwärmten im Kit enthaltenen Elution Buffer in das Reservoir des Filter-Tubes und Zentrifugieren für 1 min. bei 8000 rpm.

Der nun im Eppendorf-Gefäß abzentrifugierte Überstand enthielt die aufgereinigte bakterielle DNA.

2.2.7 photometrische Messung des DNA-Gehaltes

Die Messung des DNA-Gehaltes und somit die Bestimmung des bakteriellen Wachstums in den verschiedenen Verdünnungen erfolgte mithilfe des Gene Quant II Photometers bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm.

Die extrahierte DNA wurde hierbei verdünnt mit HPLC-Wasser im Verhältnis 1:10, wobei zunächst 100 µl HPLC-Wasser zur Einstellung des Leerwertes dienen. 10 µl der extrahierten gereinigten DNA wurden dann mit 90 µl HPLC-Wasser in einer Messküvette verdünnt und der DNA-Gehalt erfasst. Dabei verhielt sich die DNA-Konzentration proportional zur gemessenen Absorption.

Folgende mathematische Formel gibt die DNA-Konzentration wieder:

$$c_{\text{DNA}}(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (A_{260\text{nm}} - A_{320\text{nm}}) \times \text{Multiplikationsfaktor} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

c_{DNA} = DNA-Konzentration

A_{260} = Absorption bei $\lambda=260$ nm

A_{320} = Absorption bei $\lambda=320$ nm

Multiplikationsfaktor = 50 µg/ml für dsDNA

Verdünnungsfaktor = 10

Zur Kontrolle der Reinheit der DNA diene der Quotient aus der OD_{260} und OD_{280} .

Da die enthaltenen Nukleinsäuren aufgrund ihrer Basen UV-Licht bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm absorbieren, während das Absorptionsmaximum von möglicherweise in der Probe verbliebenen verunreinigenden Proteinrückständen bei 280 nm liegt, gilt dieser Quotient als guter Marker für die DNA-Reinheit und sollte bei guter Qualität der Probe zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Falls der Wert außerhalb dieses definierten Spektrums lag, wurde der Versuch wiederholt und die DNA erneut extrahiert.

2.2.8 Light-Cycler-PCR

Die Light-Cycler- oder auch quantitative real-time-PCR oder deutsch „Echtzeit-PCR“ genannt, stellt eine moderne, sehr präzise Möglichkeit der Amplifikation von DNA-Fragmenten dar. Als „Echtzeit-PCR“ wird sie deshalb bezeichnet, weil der Fortschritt des PCR-Vorganges in Echtzeit am Computer mitverfolgt werden kann. Dies wird dadurch erreicht, dass den max. 32 Ansätzen eines Durchlaufes ein Fluoreszenzfarbstoff, z.B. SYBR Green I, zugesetzt wird, der unspezifisch in doppelsträngige DNA interkaliert und dessen Signal für jedes Probengefäß einmal pro durchlaufendem PCR-Zyklus bei einer bestimmten Wellenlänge (für SYBR Green I bei 530 nm) gemessen wird und dann sofort als Punkt in einer Amplifikationskurve am Computer sichtbar gemacht wird.

Dabei kann jedes DNA-Molekül mehrere Farbstoffmoleküle binden, was zur Verstärkung des Signales führt.

Wichtig dabei ist auch, dass hier als Reaktionsgefäße Glasskapillaren zur Anwendung kommen, die in ein „Probenkarussell“ gesetzt werden, da diese das Fluoreszenzsignal ähnlich wie Glasfasern konzentrieren und weiterleiten.

Man bezeichnet diese Art der PCR als quantitativ, nicht weil sie absolute Mengen an DNA misst, sondern vielmehr weil die PCR-Kinetik berücksichtigt wird. Zu Beginn jeder Amplifikation kommt es zunächst größtenteils zur exponentiellen Vermehrung der DNA, nach Anstieg der Produktzahl kommt es dann durch verschiedenste Faktoren, z.B. Verbrauch der Primer oder

Nukleotide, zum Übergang in die lineare Phase bis schließlich die DNA-Amplifikation ganz stagniert. Eine besondere Rolle fällt hierbei dem sog. „Crossing-Point“ (CP-Wert) zu, definiert als der Punkt in der Amplifikationskurve, an dem sich das Fluoreszenzsignal gerade vom Hintergrund, des sog. „thresholds“ abhebt und die Zykluszahl markiert, bei der der Vermehrungsprozess in die logarithmische Phase übergeht.

Gleichzeitig wird bei jedem Durchlauf eine Standard-Eichkurve mit bekannten DNA-Mengen als externer Standard mitamplifiziert und deren CP-Werte mit denen der Proben verglichen, sodass man auf diese Weise quantitativ auf die ursprünglich in den Ansätzen vorhandenen DNA-Mengen zurückschließen kann.

Das Besondere an der Light-Cycler-PCR ist also zum einen die Schnelligkeit der Amplifikation- denn es ist möglich 30-40 Zyklen in 20-30 min. durchlaufen zu lassen- zum anderen die direkte Nachvollziehbarkeit jedes Zyklus durch die Messung des emittierten Fluoreszenzsignals und zuletzt die direkte Identifizierung des spezifischen PCR-Produktes oder von nicht erwünschten Begleitprodukten wie z.B. von Primerdimeren durch eine Schmelzkurvenanalyse der entstandenen Produkte. Als Schmelztemperatur wird die Temperatur verstanden, bei der bereits 50 % der DNA als Einzelstrang-DNA vorliegt. Sie ist für jedes DNA-Molekül, unter anderem abhängig vom Gehalt an G- und C-Basen und von der Länge des Fragmentes, spezifisch und kann somit zur Differenzierung verschiedener PCR Produkte herangezogen werden. Bei Erreichen der spezifischen Schmelztemperatur (T_m) des Produktes während eines PCR-Zyklus kommt es beim Lösen der doppelsträngigen DNA-Fragmente gleichzeitig zum Lösen der Bindung an den Farbstoff, sodass dies in der Schmelzkurvenanalyse zum abrupten Abfall des Signales führt.

2.2.9 Vorbereitung und Erstellen eines quantitativen DNA-Eich-Standards

Zur Erstellung einer quantitativen DNA-Eich-Standardkurve wurde zunächst 1 Kolonie der Bakterienstammes *S. aureus* A22223I in 20 ml TSB-Medium eingimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator bebrütet.

Nach ca. 18 h wurden 2 ml der Erregersuspension in ein 2-ml- Biopur-Eppendorf-Gefäß überführt und mithilfe des High Pure Template Preparation Kits von Roche die bakterielle DNA extrahiert.

Anschließend folgte die photospektrometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes mit dem Gene Quant II Photometers bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm und einer Dreifachbestimmung in der Verdünnung 1:10 (die Verdünnung erfolgte mit HPLC-Wasser).

Aus den drei gemessenen Werten wurde der Mittelwert generiert. Das gewünschte Zielvolumen betrug 400 μ l mit der gewünschten Zielkonzentration von $c=100$ ng/ μ l, so dass nun das entsprechend errechnete Volumen HPLC-Wasser mit einer entsprechenden DNA-Menge gemischt wurde und im Anschluss erneut die optische Dichte in Dreifachbestimmung und der Verdünnung 1:10 gemessen wurde.

Aus der Dreifachbestimmung wurde schließlich wieder der Mittelwert berechnet. Von dieser auf $c=100$ ng/ μ l eingestellten Erregersuspension ausgehend wurde nun eine serielle Verdünnungsreihe mit HPLC-Wasser in den Verdünnungen 10^{-1} bis 10^{-15} in 1:10-Schritten durchgeführt, ein weiteres Mal in Dreifachbestimmung und 1:10-Verdünnung mit HPLC-Wasser die OD gemessen und jeweils der Mittelwert gebildet.

Je 20 μ l-Proben der verschiedenen Verdünnungsschritte wurden für spätere Versuche bei -20 °C eingefroren.

2.2.10 Durchführung der 16S-rDNA-real-time-PCR

Die 16S-rDNA-real-time-PCR dient in erster Linie der gezielten Amplifikation des spezifischen Gens, das für das 16S-rDNA-Molekül in bakteriellen

Pathogenen kodiert (8,21,31,41). Das Produkt dieses Gens ist Bestandteil von ribosomalen Strukturen der Bakterienzelle und als dieser beteiligt an der Proteinbiosynthese. Somit findet bei der Amplifikation dieses bakteriellen Gens eine Detektion des bakteriellen Wachstums auf molekularer Ebene statt und zeigt damit gerade bei langsam wachsenden Pathogenen, wie z.B. den SCVs, deren Wachstum nach üblicher Bebrütungszeit von 12-24 h phänotypisch evtl. noch nicht zu erkennen ist, große Überlegenheit gegenüber der konventionellen Wachstumsbestimmung (21).

Die real-time-PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt mithilfe des LightCycler Master SYBR Green Kits von Roche und die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der entsprechenden LightCycler software 3.5 von Roche.

Die einzelnen Durchläufe wurden mit 20 µl- Ansätzen bestehend aus 16 µl Master Mix (LightCycler Master SYBR Green, Roche), 1 µl 16S-f-Primer (Konzentration 10 pmol/µl), 1 µl 16S-r-Primer (Konzentration 10 pmol/µl) und 2 µl aufgereinigter DNA (in 10⁻²-Verdünnung) immer parallel im Doppelansatz, zusammen mit den t₀-Kontrollen, den Wachstumskontrollen und dem DNA-Eichstandard durchgeführt, wobei insgesamt 55 Zyklen durchlaufen wurden und jedem Durchlauf eine Präinkubationszeit von 10 min. bei 95 °C vorgeschaltet war.

Als Negativkontrollen dienten einerseits ein Ansatz, der nur das Primerpaar enthielt, andererseits ein nur die unverdünnte bakterielle DNA enthaltener Ansatz.

Tab.2: Amplifikationsprogramm bei der real-time-PCR

	Temperatur (°C)	Zeit (sek.)
Denaturierung	95	10
Hybridisierung	58	5
Extension	72	20

2.2.11 Keimzahlbestimmung

Zur quantitativen Bestimmung der Keimzahlen wurde vor Beginn der seriellen Antibiotika-Verdünnungen ein Teil der Standard-Erregersuspensionen von *S. aureus* A22223I und seiner *hemB*-Mutante mit einer auf einen Wert von 0,05 eingestellten optischen Dichte mit NaCl herunterverdünnt auf die Verdünnungen 10^{-3} bis 10^{-8} und je 100 μ l der 6 verschiedenen Verdünnungen immer im dreifachen Ansatz auf TSA-Platten, für die *hemB*-Mutante auf TSA-Platten mit Zusatz von 2,5 μ l Erythromycin im 10-Ösen-Ausstrich ausgestrichen, für ca. 24 Std., bzw 48 h für die *hemB*-Mutante im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und anschließend mithilfe des Koloniezählers die gewachsenen Kolonien gezählt.

Im Rahmen des konventionellen MHK-Tests mittels Mikrodilution wurden ebenfalls die Keimzahlen bestimmt. Dafür wurde die 10^{-2} -Verdünnung der dafür hergestellten Keimsuspension mit NaCl weiterverdünnt und aus den Verdünnungen 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5} je 100 μ l auf BHI-Platten ausgestrichen, 24 Std. bzw. im Fall der Mutante für 48 Std. bebrütet und danach die Koloniebildenden-Einheiten (KBE) ausgezählt.

2.2.12 Qualitätskontrolle

Zur Gewährleistung der Qualität der Versuche, v.a. der PCR und somit zum Kontaminationsschutz wurden die in den Laboratorien festgesetzten allgemeinen Kontaminationsschutzmaßnahmen für alle Versuche konsequent verfolgt und umgesetzt.

Das bedeutete zum einen die strikte räumliche Trennung von Versuchsbereich, in dem die Bakterien angezchtet und schließlich die bakterielle DNA isoliert wurde(n) und dem PCR-Bereich, indem es zur Amplifikation der DNA-Stränge kam. Dies wurde erreicht durch konsequentes Wechseln der Einmalhandschuhe und der Kittel sowie durch Verwendung von strikt voneinander getrennten Geräten, wie Probengefäßständern, Pipetten und Photometer.

Außerdem wurden bei der Arbeit mit Bakterien und deren DNA ausschließlich Biopur-Materialien und gestopfte Pipetten zum Kontaminationsschutz verwendet. Um bei der Anzucht der mit einer *ermB*-Kassette ausgestatteten *hemB*-Mutante das Wachstum anderer Keime zu unterdrücken und um den Keim identifizieren zu können, wurde diese ausschließlich in Nährmedien und auf Nährböden angezüchtet, denen Erythromycin zugesetzt wurde. Die in das Genom der Mutante integrierte Kassette verleiht ihr eine Resistenz gegenüber Erythromycin. Wenn in einem solchen Fall bakterielles Wachstum zu verzeichnen war, konnte mit großer Wahrscheinlichkeit die Funktionsfähigkeit der *ermB*-Kassette nachgewiesen und eine Kontamination mit anderen Bakterien verhindert werden.

Zur Kontrolle des Wachstums und einer möglichen Kontamination mit anderen Keimen wurden alle Versuchsansätze auf TSA-Platten, bzw. die *hemB*-Mutante auf TSA-Platten mit Erythromycinzusatz, ausplattiert.

Im Rahmen der konventionellen MHK-Testung wurden für die Testung der beiden Stämme in allen Versuchsansätzen die Referenzstämme *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 und *S. aureus* ATCC 25923 mitgeführt. Außerdem wurden alle Versuche im Doppelansatz durchgeführt.

3 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Sensibilität eines Stammpaares bestehend aus dem Elternstamm *S. aureus* A22223I und seiner generierten, mit einer *ermB*-Kassette ausgestatteten, aber klonal identischen *hemB*-Mutante gegenüber vier verschiedenen Antibiotika getestet.

Als Test-Methoden dienten zum einen die für schnell wachsende Mikroorganismen entwickelten konventionellen, standardisierten Sensibilitätstests wie der VITEK-Test, der Bouillon-Mikrodilutions-Test, der E-Test sowie der Agardiffusionstest, die definitionsgemäß nicht für SCVs konzipiert sind. Zum anderen wurde hier eine neue Testmethode, eine 16S-rDNA-basierte real-time-PCR angewandt (21), die im Gegensatz zu den konventionellen Verfahren bakterielles Wachstum auf molekularer Ebene detektiert und somit gegenüber den klassischen, phänotypischen Verfahren eine sehr spezifische und quantitativ genaue Alternative darstellt. Im Gegensatz zu den phänotypischen Methoden ist ihr Wirkungsprinzip unabhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der Mikroorganismen. Somit können *S. aureus* SCVs getestet werden, die ansonsten nach gängiger Inkubationszeit von 12-24 Std. möglicherweise phänotypisch noch nicht erkennbar wären und nicht den standardisierten Voraussetzungen der phänotypischen Verfahren entsprechen. Dieser 16S-rDNA-basierten real-time-PCR ging die photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes der Proben voraus.

Ziel war es, die Unterschiede des Elternstammes und seines SCVs hinsichtlich ihrer Antibiotika-Empfindlichkeit herauszustellen, wie es schon in früheren Studien – allerdings mit den Einschränkungen phänotypischer Methodik – versucht worden ist (6,12,56,71,73). Gleichzeitig soll gezeigt werden, dass die 16S-basierte real-time-PCR ein gutes, quantitativ genau arbeitendes Verfahren darstellt, das besonders für die Bestimmung des Wachstums von sog. „Problemkeimen“, wie den *S. aureus* SCVs geeignet ist.

3.1 konventionelle MHK-Bestimmung für den Wildtyp und seine *hemB*-Mutante

Um die *in vitro*-Sensibilität des *S. aureus* A222231-Elternstammes und seiner isogenen *hemB*-Mutante nach konventioneller Art zu bestimmen, wurde zunächst ein standardisierter **VITEK-Test** für die vier beschriebenen Antibiotika durchgeführt.

Tab.3: Minimale Hemmkonzentrationen im VITEK-Test

	Erythromycin (µg/ml)	Gentamicin (µg/ml)	Cefuroxim (µg/ml)	Ceftobiprol (µg/ml)
A222231 Wildtyp	s* ≤ 0,25	s* ≤ 0,5	s	N.D.*
A222231 <i>hemB</i>	N.D.*	N.D.*	N.D.*	N.D.*

s*= sensibel

r*= resistent

N.D.*= nicht erhobene Daten. Die Testergebnisse der *hemB*-Mutante im VITEK-Test konnten aufgrund mangelnden Wachstums und Identifizierung des Stammes nicht ausgewertet werden.

Die Testung von Ceftobiprol ist im VITEK noch nicht möglich, da der Wirkstoff für die VITEK-Testung nicht zur Verfügung steht.

Dabei zeigte sich auch der Wildtyp sowohl gegenüber Erythromycin (MHK ≤ 0,25 µg/ml) als auch gegenüber Gentamicin (MHK ≤ 0,5 µg/ml) sensibel.

Gegenüber Cefuroxim konnte er über die Ableitung seiner Oxacillinsensibilität (0,5 µg/ml=s) als „sensibel“ eingestuft werden.

In der VITEK-Testung der *hemB*-Mutante konnten leider keine auswertbaren Ergebnisse erzielt werden, da die Mutante aufgrund ihres langsamen Wachstums und ihrer veränderten biochemischen Eigenschaften vom VITEK-Gerät nicht erfasst werden konnte.

Zusätzlich wurde eine konventionelle **MHK-Testung** mittels einer Bouillon-Mikrodilution für beide *S. aureus*-Stämme angesetzt. Die eingesetzten MHK-Platten wurden nach Beimpfung mit den definierten Keimaufschwemmungen zuerst für 24 Std. inkubiert und nach optischer Kontrolle für weitere 24 Std. bei 37 °C bebrütet.

Tab.4: Ergebnisse der MHK-Testung nach 24 Std. und 48 Std. Inkubation

	Erythromycin (µg/ml)	Gentamicin (µg/ml)	Cefuroxim (µg/ml)	Ceftobiprol (µg/ml)
A22223I Wildtyp	< 1,25	< 1,25	< 1,25	N.D.
A22223I <i>hemB</i>	> 1280	2,5	< 1,25	N.D.

Nach 24 stündiger als auch nach 48 stündiger Bebrütung zeigte sich der Elternstamm sensibel gegenüber Erythromycin und Gentamicin (beide MHKs für t_{24} und t_{48} <1,25 µg/ml). Die Mutante war auch hier erythromycinresistent (MHK>1280 µg/ml) und mit einer MHK von 2,5 µg/ml deutlich weniger empfindlich gegenüber Gentamicin als ihr Elternstamm. Mit diesem MHK-Wert musste die *hemB*-Mutante der Gruppe „intermediär“ zugeordnet werden.

Gegenüber Cefuroxim zeigten sich sowohl der Wildtyp als auch seine *hemB*-Mutante mit einer MHK von < 1,25 nach 24 und 48 Stunden beide als sehr sensibel.

Beobachtungen: Bei der MHK- Bestimmung mit Erythromycin konnte in den ersten drei Vertiefungen der Mikrotitrationsplatten (entsprechen den drei höchsten Konzentrationen 1280 µg/ml, 640 µg/ml und 320 µg/ml) eine Trübung beobachtet werden. Um eine Kontamination mit anderen Keimen auszuschließen, wurden daraufhin jeweils 10 µl aus diesen Vertiefungen auf Blut-Agarplatten ausgestrichen.

Alle Kontrollausstriche beim Wildtyp erwiesen sich als steril, wobei eine mögliche Erklärung der Trübung das Lösen des Antibiotikums in 70 %-igem Alkohol darstellen könnte. Bei Weiterverdünnung von 70 %-igem Alkohol kommt es zunächst zur Trübung, die sich erst bei Erreichen einer bestimmten Verdünnung wieder auflöst.

Ein Wachstum aus den genannten Vertiefungen konnte nur bei der Testung der *hemB*-Mutante verzeichnet werden, das durch ihre Erythromycinresistenz infolge der integrierten *ermB*-Kassette (MHK > 1280 µg/ml) zu erklären ist.

Des Weiteren wurde wie beschrieben ein **E-Test** für beide Stämme mit allen vier antibiotischen Substanzen auf Müller-Hinton-Platten durchgeführt.

Der Kontrollausstrich auf Blut-Agarplatten der definierten Keimaufschwemmung, die zur Beimpfung der MH-Platten verwandt wurde, zeigte in allen Fällen ausschließlich Wachstum von *S. aureus* und keinerlei Kontamination.

Tab.6: Ergebnisse des E-Tests nach 24 und 48 Std. Inkubation

	Erythromycin (µg/ml)	Gentamicin (µg/ml)	Cefuroxim (µg/ml)	Ceftobiprol (µg/ml)
A22223I Wildtyp	0,047	0,094	0,75 (t ₂₄) 1 (t ₄₈)	0,38
A22223I <i>hemB</i>	> 256	1,5	0,75	0,25

Dem E-Test zufolge lag die MHK des Wildtyps für Erythromycin bei 0,047 µg/ml, für Gentamicin bei 0,094 µg/ml. Damit war der Elternstamm gegenüber beiden Substanzen sensibel. Gegenüber Erythromycin war die Mutante hier deutlich resistent (MHK>256 µg/ml) und ihre MHK für Gentamicin lag bei 1,5 µg/ml. Damit ist sie nach dem E-Test-Ergebnis gentamicinsensibel.

Bei der Testung mit Cefuroxim zeigten sich sowohl der Wildtyp als auch die Mutante sensibel gegenüber diesem Wirkstoff. Die MHK des Elternstammes lag hier bei 0,75 µg/ml nach 24 Std., bzw. bei 1 µg/ml nach 48 Std. Inkubation, die der *hemB*-Mutante bei 0,75 µg/ml zu beiden Zeitpunkten.

Gegenüber Ceftobiprol konnte bei der Mutante eine erhöhte Empfindlichkeit festgestellt werden (MHK=0,25 µg/ml). Aber auch der Wildtyp zeigte sich hier mit einer MHK=0,38 µg/ml sensibel.

Der **Agardiffusionstest** erbrachte ähnliche Ergebnisse wie der E-Test.

Tab.7: Ergebnisse des Agardiffusionstestes nach 24 und 48 Std. Bebrütung

Hemmhof-Durchmesser in mm					
		Erythromycin	Gentamicin	Cefuroxim	Ceftobiprol
A22223I Wildtyp	t₂₄	30 (s)*	29 (s)*	32	32
	t₄₈	30 (s)*	23 (s)*	32	32
A22223I <i>hemB</i>	t₂₄	r*	19 (i)*	38	38
	t₄₈	r*	19 (i)*	38	38

s*= sensibel

i*= intermediär

r*= resistent

Gegenüber Erythromycin zeigte sich die Mutante wie erwartet wiederum resistent (t_{24} und t_{48}), der Wildtyp dagegen mit einem Hemmhof von 30 mm im Durchmesser (t_{24} und t_{48}) sensibel. Im Vergleich zum Gentamicin-sensiblen Elternstamm (t_{24} = 29 mm, t_{48} = 23 mm) weniger empfindlich, aber immer noch der Gruppe „intermediär“ zuzuordnen, reagierte die *hemB*-Mutante gegenüber Gentamicin (t_{24} , t_{48} = 19 mm).

Die Testung mit Ceftobiprol ergab beim Wildtyp einen Hemmhofdurchmesser (HHD) von 32 mm nach 24 und 48 Std., bei der Mutante einen HHD von 38 mm für t_{24} und t_{48} . Gegenüber Cefuroxim konnte beim Elternstamm ein HHD von 32 mm nach 24 und 48 Std., bei der Mutante ein HHD von 38 mm für beide Zeitpunkte festgestellt werden, sodass sich die Mutante gegenüber beiden Cephalosporinen als empfindlicher darstellte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die konventionellen MHK-Testmethoden insgesamt weitestgehend übereinstimmende Ergebnisse bezüglich der Empfindlichkeit der beiden Stämme erbrachten.

So wurde der *S. aureus* A22223I-Elternstamm in allen vier Methoden gegenüber Erythromycin als sensibel getestet, die *hemB*-Mutante als resistent, erklärlich durch die eine Erythromycinresistenz vermittelnde *ermB*-Kassette.

Gegenüber Gentamicin zeigte sich der Elternstamm in allen Tests sensibel. Im Rahmen der Testung der Mutante konnten nur die Ergebnisse der Mikrodilution, des E-Testes sowie des Agardiffusionstestes verwendet werden, in denen die *hemB*-Mutante ein intermediäres Verhalten und somit eine reduzierte Empfindlichkeit hinsichtlich Gentamicin im Agardiffusions- und Mikrodilutionstest aufwies bzw. sich im E-Test Gentamicin-sensibel zeigte. Der VITEK-Test erbrachte keine Ergebnisse, da die Erregeridentifizierung durch das Gerät scheiterte und die Mutante ein zu geringes Wachstum zeigte.

In der Testung mit Cefuroxim wurde der *S. aureus*-Elternstamm sowohl im VITEK als auch in der Mikrodilution als sensibel ($MHK \leq 1,25 \mu\text{g/ml}$) getestet. Auch der E-Test und der Agardiffusionstest bestätigten seine Cefuroxim-Empfindlichkeit.

Die *hemB*-Mutante zeigte sich in der Mikrodilution mit einer $MHK < 1,25 \mu\text{g/ml}$ empfindlich gegenüber Cefuroxim.

Im E-Test und Agardiffusionstest konnte sie ebenfalls als sensibel gegenüber Cefuroxim getestet werden.

In Gegenwart von Ceftobiprol wurden sowohl Elternstamm als auch Mutante im E-Test und Agardiffusionstest als sensibel getestet, wobei die Mutante in beiden Tests eine höhere Empfindlichkeit aufwies.

Tab.8: Gesamtergebnisse der konventionellen MHK-Testung

		Erythromycin (µg/ml)	Gentamicin (µg/ml)	Cefuroxim (µg/ml)	Ceftobiprol (µg/ml)
VITEK	A22223I Wildtyp	s* ≤ 0,25	s* ≤ 0,5	s*	N.D.*
	A22223I <i>hemB</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MHK-Test (nach 24 und 48h)	A22223I Wildtyp	< 1,25	< 1,25	< 1,25	N.D.
	A22223I <i>hemB</i>	> 1280	2,5	< 1,25	N.D.*
E-Test (nach 24 und 48h)	A22223I Wildtyp	0,047	0,094	0,75 (nach 24h) 1 (nach 48h)	0,38
	A22223I <i>hemB</i>	> 256	1,5	0,75	0,25
Agar-Diffusions-test	A22223I Wildtyp	t24 30 (s)*	29 (s)*	32	32
		t48 30 (s)*	23 (s)*	32	32
	A22223I <i>hemB</i>	t24 r*	19 (i*)	38	38
		t48 r*	19 (i)*	38	38

s*= sensibel

i*= intermediär

r*= resistent

N.D.*= nicht erhobene Daten

3.2 photometrische Messung des bakteriellen Wachstums

Im Anschluss an die Extraktion und Aufreinigung der bakteriellen, chromosomalen DNA aus den Versuchsansätzen der seriellen Antibiotika-Verdünnungen im Bouillon-Makrodilutionstest, folgte schließlich die Bestimmung des bakteriellen Wachstums mithilfe des Photometers. Es wurden alle Messungen in Doppelbestimmung durchgeführt und in den Ergebnissen als berechneter Mittelwert angegeben.

Es wurde bei den Messungen zusätzlich anhand des 260/280-Quotienten auf die Reinheit der DNA geachtet, wobei alle gemessenen Ergebnisse im Bereich zwischen 1,8 und 2,0 lagen, somit die DNA-Reinheit gewährleistet war.

Ziel dieser photometrischen DNA-Bestimmung war es, anhand der gemessenen Werte bakterielles Wachstum zu detektieren und die minimale Hemmkonzentration auf molekularer Ebene, als sog. „molekulare MHK“ („mMHK“) bestimmen zu können.

Definiert wurde die „mMHK“ als die niedrigste Antibiotikakonzentration (C), bei der kein signifikantes mikrobielles Wachstum bestimmt als

$$C_{\text{Probe}} (t_{24} \text{ bzw. } t_{48}) < 2,5 \times C_{t_0\text{-Kontrolle}},$$

gemessen werden konnte.

Tab.8: Messung der DNA-Konzentration nach 24 Std. Inkubation

DNA-Konzentration in ng/ml								
<u>Antibiotikum</u>	<u>S. aureus-</u> <u>Stamm</u>	<u>Antibiotikakonzentration in µg/ml</u>						
		64	32	16	8	4	2	1
Erythromycin	A22223I Wildtyp	12,0	10,0	9,3	13,0	13,9	13,3	17,9
	A22223I <i>hemB</i> *	136,3	131,8	123,8	116,5	134,5	145,0	165,8
Gentamicin	A22223I Wildtyp	9,0	10,0	18,5	135,3	161,0	205,5	123,5
	A22223I <i>hemB</i>	18,0	16,0	88,8	106,8	114,0	122,3	121,5
Cefuroxim	A22223I Wildtyp	10,0	11,5	10,0	2,3	3,0	4,8	5,0
	A22223I <i>hemB</i>	8,8	7,0	7,0	8,0	8,3	11,8	11,8
Ceftobiprol	A22223I Wildtyp	15,0	14,3	12,3	12,0	11,5	12,8	9,5
	A22223I <i>hemB</i>	15,8	11,5	13,3	21,8	23,0	22,0	24,5
		0,5	0,25	0,125	0,064	0,032	WK*	t₀K*
Erythromycin	A22223I Wildtyp	194,5	232,1	329,3	415,5	308,5	236,5	10,3
	A22223I <i>hemB</i> *	117,0	134,3	139,8	164,3	121,3	90,0	8,5
Gentamicin	A22223I Wildtyp	176,0	181,0	176,0	185,3	173,0	221,3	10,3
	A22223I <i>hemB</i>	111,0	115,0	102,0	112,3	131,3	113,5	11,0
Cefuroxim	A22223I Wildtyp	193,8	252,8	292,0	328,5	290,3	425,5	10,3
	A22223I <i>hemB</i>	13,3	14,5	59,0	76,3	71,8	103,0	8,5
Ceftobiprol	A22223I Wildtyp	156,8	195,3	173,3	242,3	182,0	208,8	10,3
	A22223I <i>hemB</i>	24,8	30,5	108,3	116,3	116,5	104,5	10,0

Tab.9: Messung der DNA-Konzentration nach 48 Std. Inkubation

DNA-Konzentration in ng/ml								
Antibiotikum	<u>S. aureus-</u> <u>stamm</u>	Antibiotikakonzentration in µg/ml						
		64	32	16	8	4	2	1
Erythromycin	A22223I Wildtyp	3,3	4,3	6,3	11,5	9,0	14,3	112,5
	A22223I <i>hemB</i> *	125,5	117,0	119,3	121,5	222,3	184,3	146,3
Gentamicin	A22223I Wildtyp	10,3	11,5	114,8	97,0	115,0	127,0	137,5
	A22223I <i>hemB</i>	20,8	99,5	117,0	119,8	147,0	146,0	153,0
Cefuroxim	A22223I Wildtyp	9,5	8,5	10,0	8,3	7,5	9,5	129,0
	A22223I <i>hemB</i>	3,0	4,0	2,8	2,8	8,0	9,5	12,5
Ceftobiprol	A22223I Wildtyp	12,5	14,3	13,3	10,5	15,0	14,5	15,0
	A22223I <i>hemB</i>	15,0	12,8	12,3	15,3	15,3	14,3	13,5
		0,5	0,25	0,125	0,064	0,032	WK*	t₀K*
Erythromycin	A22223I Wildtyp	235,8	121,5	224,0	198,0	232,8	157,0	10,3
	A22223I <i>hemB</i> *	130,3	134,0	143,5	140,0	128,8	143,8	8,5
Gentamicin	A22223I Wildtyp	131,3	134,3	131,3	150,5	159,3	105,5	10,3
	A22223I <i>hemB</i>	125,0	141,8	163,0	146,0	121,0	129,5	11,0
Cefuroxim	A22223I Wildtyp	100,3	121,5	95,3	96,5	107,3	134,5	10,3
	A22223I <i>hemB</i>	15,8	32,5	53,5	112,8	115,8	110,3	8,5
Ceftobiprol	A22223I Wildtyp	171,8	187,3	169,3	191,0	168,5	222,0	10,3
	A22223I <i>hemB</i>	117,5	162,5	104,0	127,8	129,5	143,0	8,5

*WK= Wachstumskontrolle

*t₀K= t₀-Kontrolle (Kontrolle zum Zeitpunkt t₀)

* die Erythromycinresistenz der *hemB*-Mutante beruht auf Insertion einer *ermB*-Kassette
 die **fett-kursiv**-gedruckten Daten stellen die „mMHK“ („molekulare minimale Hemmkonzentration“) dar, bei der kein signifikantes Wachstum des *S. aureus* gemessen werden konnte, definiert als $c_{\text{Probe}}(t_{24}/t_{48}) < 2,5 \times c_{t_0\text{-Kontrolle}}$

Nach 24-stündiger, bzw. 48-stündiger Bebrütung konnten anhand der DNA-Konzentrationen in der photometrischen Messung folgende Werte für die „molekulare minimale Hemmkonzentration“ der beiden getesteten Stämme ermittelt werden:

Erythromycin: Für den Elternstamm lag die „mMHK“ nach 24 Std. bei 1 µg/ml, nach 48 Std. bei 2 µg/ml, während sich die *hemB*-Mutante zu beiden Zeitpunkten als resistent erwies.

Gentamicin: Die „mMHK“ des Elternstammes lag zum Zeitpunkt t_{24} bei 16 µg/ml, zum Zeitpunkt t_{48} bei 32 µg/ml. Die „mMHK“ der Mutante lag höher bei 32 µg/ml nach 24 Std. und bei 64 µg/ml nach 48 Std. Inkubation.

Cefuroxim: Der *S. aureus* A222231-Elternstamm zeigte sich in Gegenwart von Cefuroxim sensibel mit einer „mMHK“ von 1 µg/ml (t_{24}) und 2 µg/ml (t_{48}). In diesem Fall aber zeigte die Mutante eine erhöhte Empfindlichkeit, ihre „mMHK“ lag hier bei 0,25 µg/ml (t_{24}) und 0,5 µg/ml (t_{48}).

Ceftobiprol: Für Ceftobiprol konnte die „mMHK“ für den Wildtyp bei 1 µg/ml nach 24 Std. und 48 Std., für seine *hemB*-Mutante bei 0,5 µg/ml nach 24 Std. und bei 1 µg/ml nach 48 Std. beobachtet werden. Auch hier fiel eine erhöhte Sensibilität der Mutante im Vergleich zum Wildtyp auf.

Beobachtung: Makroskopisch erkennbares Wachstum anhand einer sichtbaren Trübung konnte in den Makrodilutionstests in folgender Weise beobachtet werden:

Erythromycin: Der Wildtyp zeigte eine Trübung bei $C \leq 0,5$ µg/ml, bei der Mutante wiesen alle Ansätze der Verdünnungsreihe eine Trübung auf.

- Gentamicin: Bei $C \leq 16 \mu\text{g/ml}$ waren die Verdünnungsansätze des Elternstammes als trüb zu werten (t_{24} und t_{48}). Im Fall der *hemB*-Mutante konnte nach 24 Std. bei $C \leq 16 \mu\text{g/ml}$, nach 48 Std. bei $C \leq 32 \mu\text{g/ml}$ eine Trübung festgestellt werden.
- Cefuroxim: Die Verdünnungsreihe des Wildtypes mit Cefuroxim zeigte phänotypisches Wachstum ab einer Konzentration $C \leq 0,5 \mu\text{g/ml}$ für t_{24} und t_{48} , die Mutante zeigte dagegen nach 24 und 48 Std. eine Trübung der Ansätze bei $C \leq 0,125 \mu\text{g/ml}$.
- Ceftobiprol: Bei der Testung des Wildtyp mit Ceftobiprol war eine Trübung bei $C \leq 0,5 \mu\text{g/ml}$ (t_{24} und t_{48}), bei der Mutante für t_{24} bei $C \leq 0,125 \mu\text{g/ml}$, für t_{48} bei $C \leq 0,5 \mu\text{g/ml}$ zu beobachten.

3.3 DNA-Eich-Standard in der real-time-PCR

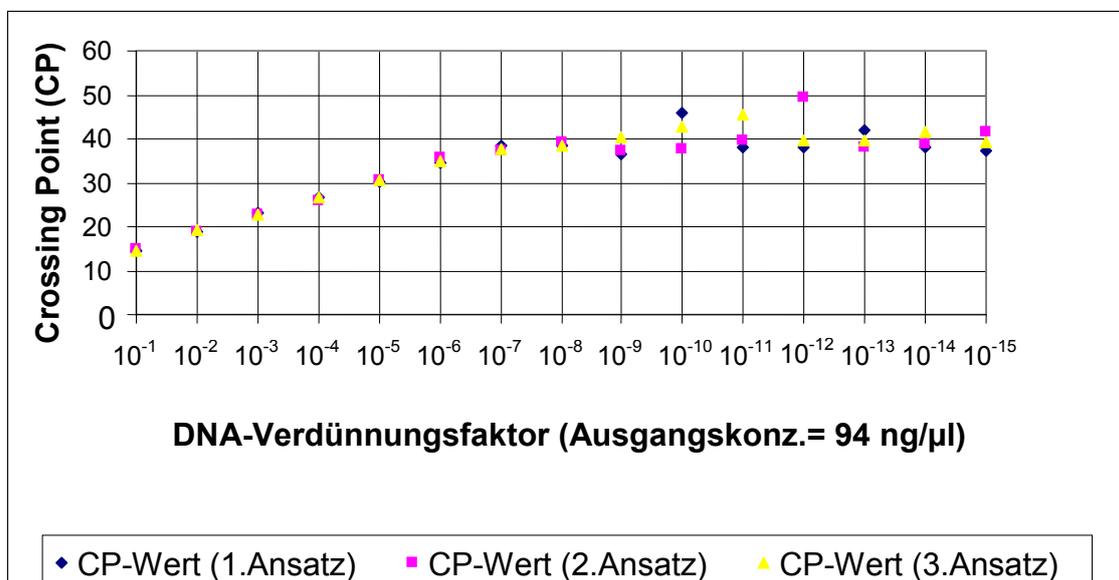
Als externer Standard wurde in jedem Zyklus der Light-Cycler-PCR ein DNA-Eich-Standard verwendet.

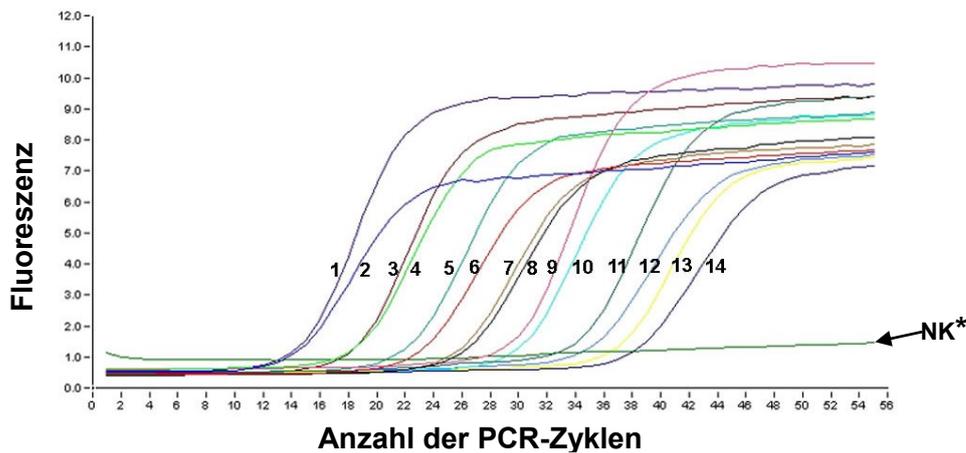
Eine auf eine Konzentration von $94 \text{ ng}/\mu\text{l}$ eingestellte Lösung mit extrahierter DNA von *S. aureus* A22223I wurde in 1:10-Schritten herunterverdünnt bis zu einer Konzentration von 10^{-15} . Der DNA-Gehalt dieser Verdünnungen wurde photometrisch gemessen und anschließend wurde zur Erstellung einer DNA-Eichstandard-Kurve mit allen Verdünnungen im Doppelansatz eine 16S-rDNA-basierte real-time-PCR durchgeführt.

Tab.10: Ergebnisse der DNA-Standard-Verdünnungen in der real-time-PCR

DNA-Verdünnung (Ausgangskonzentr.=94 ng/μl)	Crossing Point (1.Ansatz)	Crossing Point (2.Ansatz)	Crossing Point (3.Ansatz)	arithmetisches Mittel	Standard- abweichung
10^{-1}	14,46	14,96	14,56	14,66	0,2646
10^{-2}	18,93	18,7	19,19	18,94	0,2452
10^{-3}	23,28	22,62	22,83	22,91	0,3372
10^{-4}	26,59	25,96	26,48	26,34	0,3365
10^{-5}	30,24	30,48	30,67	30,46	0,2155
10^{-6}	34,68	35,55	34,82	35,01	0,4672
10^{-7}	38,54	37,15	37,54	37,74	0,7170
10^{-8}	38,54	39,3	38,57	38,80	0,4304

Ergebnis: Bis zu einer DNA-Verdünnung von 10^{-8} liegen die CP-Werte des Dreifachansatzes nahe beieinander (Standardabweichung < 0,8) und sind damit gut reproduzierbar. In allen weiteren Versuchen wurde in der real-time-PCR immer parallel der externe DNA-Standard in den Verdünnungen 10^{-1} bis 10^{-5} im Einfachansatz mitlaufen gelassen.

**Abb.2:** Crossing-Points des DNA-Eichstandards im Vergleich (Dreifachansatz)



1+2= DNA-Verdünnung 10^{-1} 9+10= DNA-Verdünnung 10^{-5}
 3+4= DNA-Verdünnung 10^{-2} 11+12= DNA-Verdünnung 10^{-6}
 5+6= DNA-Verdünnung 10^{-3} 13+14= DNA-Verdünnung 10^{-7}
 7+8= DNA-Verdünnung 10^{-4} * NK= Negativkontrolle nur mit DNA

Abb.3: DNA-Eichstandard im Doppelansatz in der real-time-PCR

Dargestellt in der oberen Light-Cycler-Graphik ist die serielle DNA-Verdünnungsreihe des DNA-Eichstandards in den Verdünnungen 10^{-1} in 10-er-Schritten bis zu einer Verdünnung von 10^{-7} . Der Doppeltansatz wurde parallel in der real-time-PCR amplifiziert.

3.4 Bestimmung der „molekularen MHK“ anhand der CP-Werte

Zur quantitativen Wachstumsbestimmung in der *in vitro*-Sensibilitätstestung des Bakterienstammpaares, bestehend aus dem Elternstamm *S. aureus* A22223I und seiner genetisch identischen *hemB*-Mutante als phänotypischer Vertreter des klinischen SCVs, wurde im Anschluss an die Antibiotika-Verdünnungsreihen und die photometrische Kontrolle des Wachstums, eine 16S-rDNA-basierte real-time-PCR durchgeführt.

Dabei wurde zusätzlich in jedem Versuch als externer Standard eine DNA-Eichstandardkurve mitamplifiziert (s.o.).

Für die Interpretation der Ergebnisse spielen in der real-time-PCR wie oben beschrieben die sog. „Crossing-Points“ (CP-Werte) die entscheidende Rolle.

Durch die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes an die amplifizierten DNA-Fragmente, besteht eine indirekte Proportionalität zwischen CP-Wert (Zahl der

Zyklen, nach denen die Amplifikation in die logarithmische Phase übergeht) und der Zahl der amplifizierten PCR-Produkte. Ist die Anfangsmenge an DNA in der Probe gering, so resultiert der Versuch in einem relativ hohen CP-Wert. Befindet sich allerdings schon zu Beginn viel DNA im Versuchsansatz, so tritt die Amplifikation hier auch schneller- innerhalb weniger PCR-Zyklen- in die exponentielle Phase ein und der CP-Wert fällt niedriger aus.

Um nun die gemessenen CP-Werte im Kontext einordnen zu können, wurden die CP-Werte der Proben und der Wachstumskontrollen verglichen mit denen der t_0 -Kontrollen (CP_{t_0}) und durch die errechnete Differenz wurde dann das bakterielle Wachstum in den Versuchsansätzen des Antibiotika-Makro - dilutionstestes bestimmt und so die „molekulare minimale Hemmkonzentration“ ermittelt.

Die „molekulare MHK“ wurde dabei folgendermaßen definiert: Sie wurde als die niedrigste Antibiotikakonzentration interpretiert, bei der kein signifikantes Wachstum, festgelegt als **CP (t_{24} bzw. t_{48}) < CP (t_0) – 1 PCR-Zyklus**, zu verzeichnen war.

Die von der Light-Cycler-Software gemessenen CP-Werte sind nun im Folgenden tabellarisch nach antibiotischer Substanz und nach dem Zeitpunkt der Messung (t_{24} und t_{48}) geordnet zusammengefasst worden, wobei die „molekulare MHK“ („mMHK“) jeweils durch fett- und *kursiv*-Kennzeichnung hervorgehoben wurde. Die Bezeichnung „N.D.“ steht für in den Versuchen nicht erhobene Daten.

Die dazugehörigen CP-Wert-Diagramme zeigen zu jeder angegebenen Antibiotikakonzentration aufgrund des Doppelansatzes jeweils zwei Crossing Points, die Konzentration, die der „mMHK“ entspricht ist zudem extra gekennzeichnet.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde in den verwendeten Light-Cycler-Graphen auf die Darstellung im Doppelansatz und des externen DNA-Standards verzichtet. Sie beschränken sich auf den einfachen Probenansatz, eine Wachstumskontrolle, eine t_0 -Kontrolle und die Negativkontrolle mit den Primern.

1.) Erythromycin:1.a) nach 24 Std. Inkubation (t_{24}):**Tab.11:** Ergebnisse der 16S-rDNA-basierten real-time-PCR nach 24Std. Inkubation

Crossing point (CP)							
<u>S. aureus-Stamm</u>	<u>Antibiotikakonzentration ($\mu\text{g/ml}$)</u>						
	64	32	16	8	4	2	1
A22223I Wildtyp	N.D.	N.D.	N.D.	26,4	25,9	25,6	25,4
A22223I <i>hemB</i>	N.D.	N.D.	N.D.	20,5	N.D.	19,5	N.D.
	0,5	0,25	0,125	0,064	0,032	WK*	OK*
A22223I Wildtyp	20,9	17,1	N.D.	N.D.	N.D.	17,0	25,5
A22223I <i>hemB</i>	19,5	N.D.	19,5	19,3	18,6	18,8	N.D.

Im Hinblick auf die Ergebnisse der Light-Cycler-PCR zeigte der *S. aureus* A22223I-Elternstamm seine Sensibilität gegenüber Erythromycin und seine „molekulare MHK“ konnte anhand der CP-Wert-Messung bestimmt werden bei einer Antibiotikakonzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$.

Die durch die in das Genom der *hemB*-Mutante eingesetzte *ermB*-Kassette zu erklärende Erythromycinresistenz zeigte sich hier deutlich im fehlenden CP-Wert-Anstieg. Da sich die CP-Werte konsequent auf Höhe des Wertes der Wachstumskontrolle befanden, war dies hinreichender Beweis für die fehlende Wachstumshemmung. Dies lässt sich gut im nachfolgenden Diagramm veranschaulichen. Es zeigt die CP-Werte der Light-Cycler-PCR mit der gegen Erythromycin getesteten *hemB*-Mutante (t_{24}) in den Antibiotikakonzentrationen 8 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 0,125 $\mu\text{g/ml}$, 0,064 $\mu\text{g/ml}$ und 0,032 $\mu\text{g/ml}$ jeweils im Doppelansatz. Der fehlende CP-Wert-Anstieg ist hier eindeutig zu erkennen.

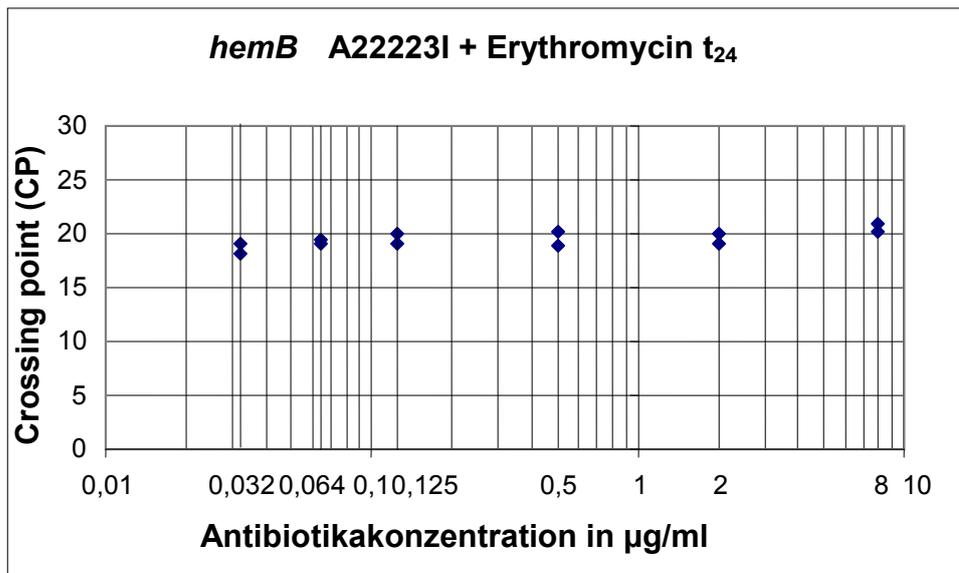
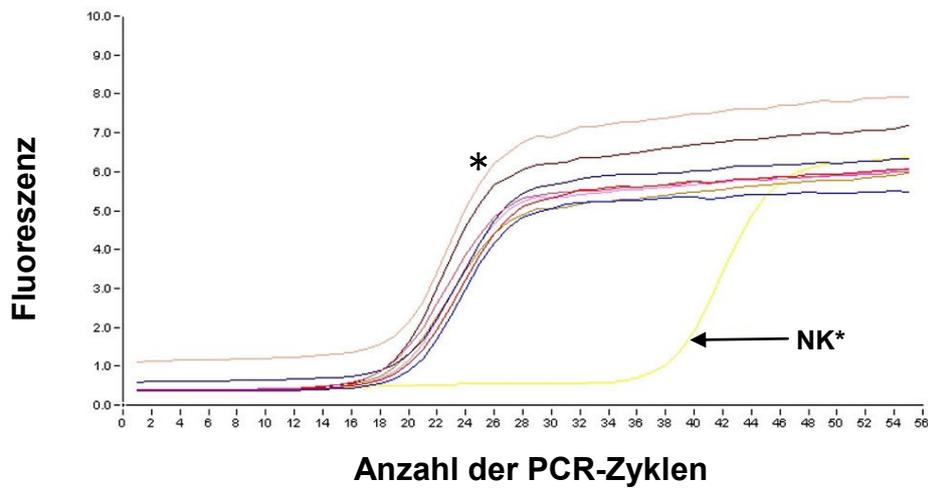


Abb.4: *hemB*-Mutante+Erythromycin: Crossing Points in der real-time-PCR nach 24 Std. Inkubation im Doppelansatz

Die folgende Light-Cycler-Graphik entspricht dem obigen Diagramm. Dargestellt ist das Ergebnis der Light-Cycler-PCR mit einem einfachen Ansatz der DNA der *hemB*-Mutante aus der Verdünnungsreihe mit Erythromycin nach 24 Std. Inkubation (t_{24}). Die PCR wurde durchgeführt mit DNA-Proben aus den Antibiotikaverdünnungen 8 µg/ml, 2 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,125 µg/ml, 0,064 µg/ml, 0,032 µg/ml und der Wachstumskontrolle. Auffällig und mit den Ergebnissen der CP-Wert-Messung übereinstimmend, ist der sehr ähnliche Eintritt der Amplifikationskurven in die logarithmische Phase, der Punkt, an dem sich das Fluoreszenzfarbstoffsignal von der Basislinie, dem sog. „treshhold“ abhebt. Die Kurve mit dem sehr späten Crossing-Point (CP=38,45) entspricht dem Ansatz, der nur das Primerpaar enthielt und der als Negativkontrolle in der PCR mitlief. Dass es hier ebenfalls zu einer Amplifikation kam, ist typisch für real time-PCR-Kinetiken negativer Proben, wenn sehr lange Zyklenzahlen gefahren werden. Da der Crossing Point dieses Kontrollansatzes sehr hoch ist und in einem großen Abstand zu den anderen CP-Werten auftritt, ist er somit typisch für Negativkontrollen von real-time PCR-Verfahren.



***Erythromycinkonzentrationen:** 8 µg/ml; 2 µg/ml; 0,5 µg/ml; 0,125 µg/ml; 0,064 µg/ml;
0,032 µg/ml; 0,016 µg/ml; t₀-Kontrolle; Wachstumskontrolle

* **NK**= Negativkontrolle mit Primern

Abb.5: *hemB*-Mutante+Erythromycin: Light-Cycler-Graph nach 24 Std. Inkubation

1.b) nach 48 Std. Inkubation (t₄₈):

Tab.12: Ergebnisse der 16S-rDNA-basierten real-time-PCR nach 48 Std. Inkubation

Crossing point (CP)							
<u><i>S. aureus</i>-Stamm</u>	Antibiotikakonzentration (µg/ml)						
	64	32	16	8	4	2	1
A22223I Wildtyp	N.D.	N.D.	N.D.	26,1	25,7	25,6	17,7
A22223I <i>hemB</i>	N.D.	N.D.	N.D.	19,7	N.D.	17,3	N.D.
	0,5	0,25	0,125	0,064	0,032	WK*	OK*
A22223I Wildtyp	16,7	16,9	N.D.	N.D.	N.D.	17,6	25,6
A22223I <i>hemB</i>	17,9	N.D.	17,9	17,7	18	16,9	N.D.

Die nach 48 Std. aus den Antibiotika-versetzten Proben extrahierte DNA wurde ebenfalls in der real-time-PCR amplifiziert. Dabei verschob sich die „molekulare MHK“ für den *S. aureus*-Elternstamm um einen Verdünnungsschritt auf eine Erythromycinkonzentration von 2 µg/ml.

Die *hemB*-Mutante zeigte weiterhin ihre Resistenz gegenüber Erythromycin.

In der unten gezeigten Graphik, in der die CP-Werte des *S. aureus*-Elternstammes in der Testung mit Erythromycin dargestellt sind, lässt sich die „molekulare MHK“ bei 2 µg/ml durch den nachfolgenden abrupten CP-Wert-Abfall optisch nachvollziehen. Mit einbezogen wurden die Erythromycinkonzentrationen 8 µg/ml; 4 µg/ml; 2 µg/ml; 1 µg/ml; 0,5 µg/ml und 0,25µg/ml. Auch die Light-Cycler-Graphik zeigt deutlich die DNA-Ansätze mit ungehemmtem Wachstum (linkes „Kurvenbündel“) im Gegensatz zu den im Wachstum gehemmten Ansätzen (rechtes „Kurvenbündel“).

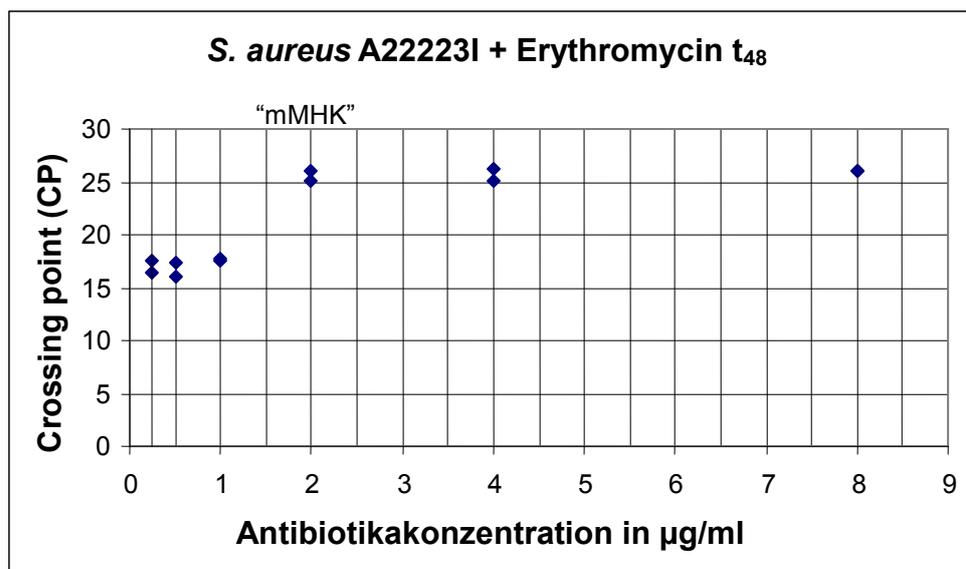
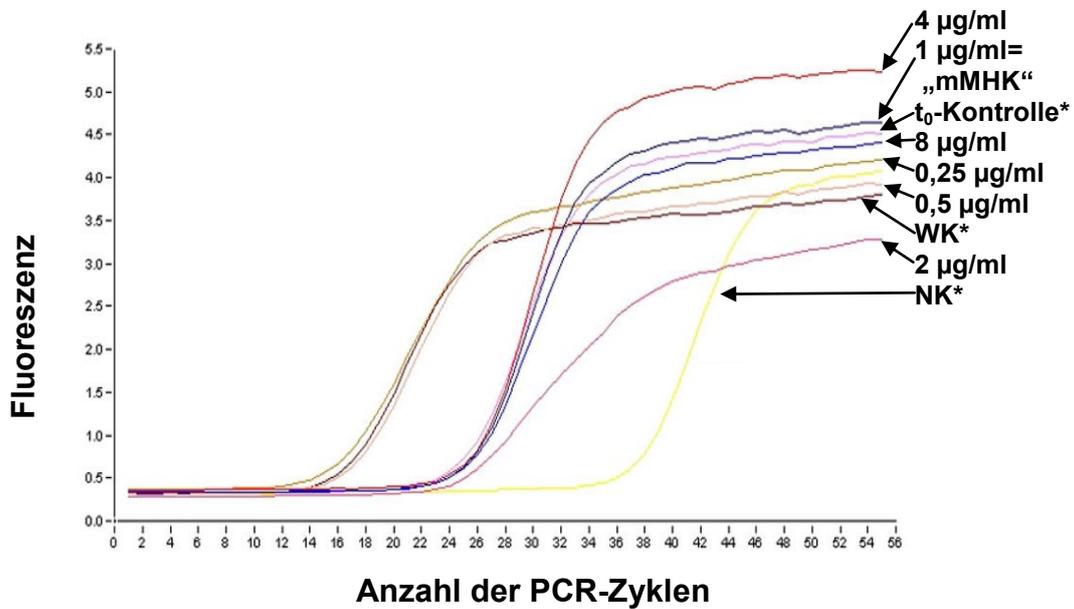


Abb.6: Wildtyp+Erythromycin: Crossing-Points in der real-time-PCR nach 48 Std. Inkubation im Doppelansatz



- * **NK**= Negativkontrolle mit Primern
- * **WK**= Wachstumskontrolle
- * **t₀-Kontrolle**= Kontrolle zum Zeitpunkt t₀

Abb.7: Wildtyp+Erythromycin: Light-Cycler-Graph nach 48 Std. Inkubation

2.) Gentamicin:

2.a) nach 24 Std. Inkubation (t₂₄):

Tab.13: Ergebnisse der 16S-rDNA-basierten real-time-PCR nach 24 Std. Inkubation

Crossing point (CP)							
<u>S. aureus-Stamm</u>	Antibiotikakonzentration (µg/ml)						
	64	32	16	8	4	2	1
A22223I Wildtyp	31,2	30,2	23,3	17,7	17,0	17,1	N.D.
A22223I hemB	24,0	23,2	18,6	17,7	17,9	17,3	N.D.
	0,5	0,25	0,125	0,064	0,032	WK*	OK*
A22223I Wildtyp	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	16,4	24,6
A22223I hemB	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	17,3	25,6

In der oben aufgeführten Tabelle wurden die Ergebnisse der CP-Werte der für 24 Std. mit Gentamicin versetzten Proben in der real-time-PCR zusammengefasst.

Dabei fällt auf, dass sowohl der *S. aureus*-A22223I-Elternstamm als auch seine *hemB*-Mutante gegenüber Gentamicin *in vitro* relativ wenig empfindlich sind, da ihre CP-Werte und damit gleichzusetzende „molekulare MHK“ relativ hoch liegen. Für den Elternstamm ergibt sich dabei eine „mMHK“ von 32 µg/ml, bei der *hemB*-Mutante kann sie in diesem Versuch bei Antibiotikakonzentrationen bis 64 µg/ml gar nicht detektiert werden, sodass ihre „mMHK“ noch bei einer Konzentration über 64 µg/ml liegen muss.

Dies visualisiert auch die Abbildung 8, die die CP-Werte der mit Gentamicin versetzten *hemB*-Mutante nach 24 Std. Bebrütung, beinhaltet.

Der dazu passende Light-Cycler-Graph ist darunter abgebildet.

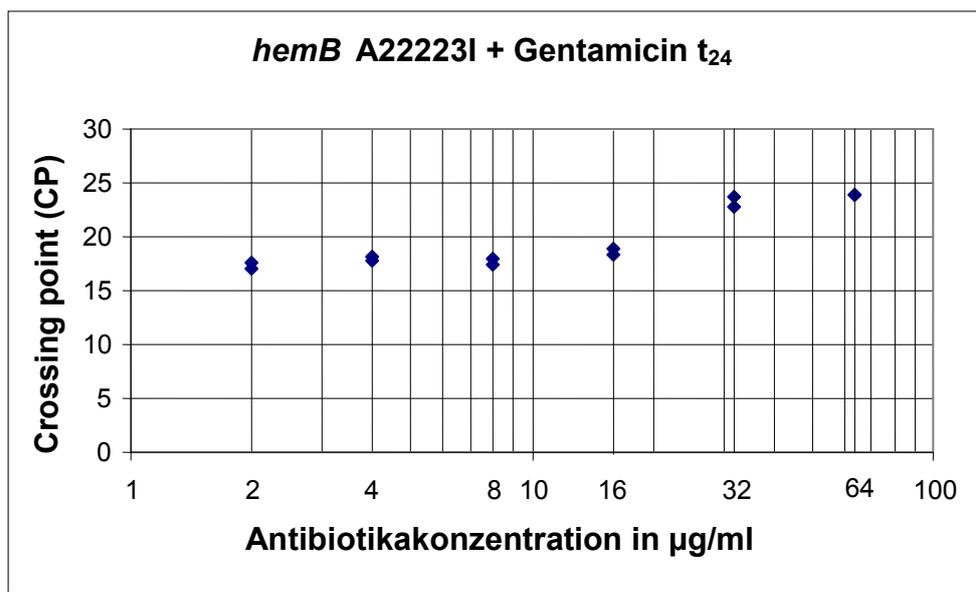
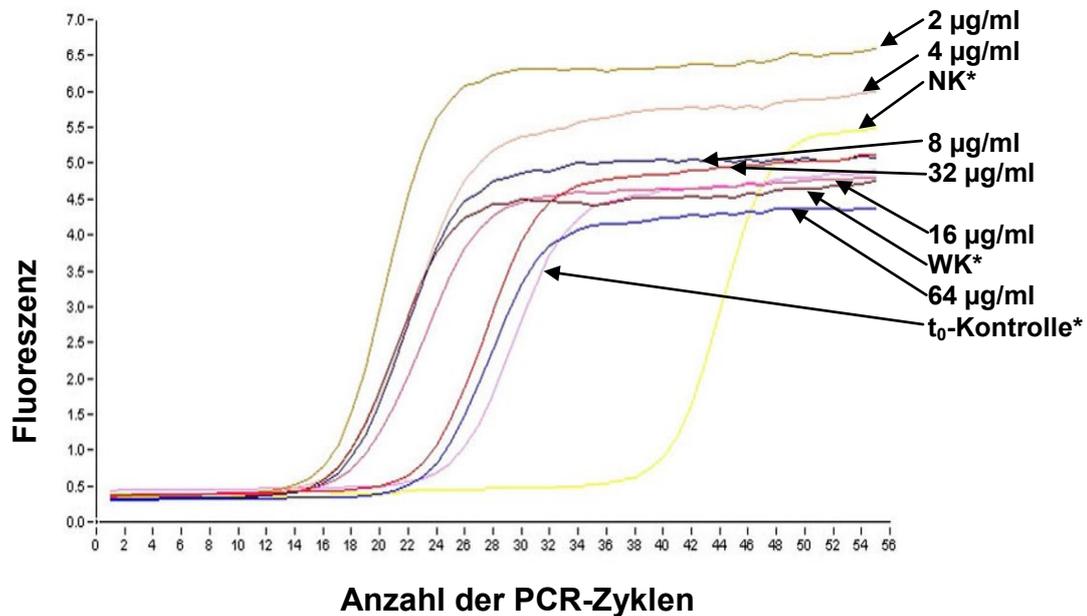


Abb.8: *hemB*-Mutante+Gentamicin: Crossing-Points in der real-time-PCR nach 24 Std. Inkubation im Doppelansatz



- * **NK**= Negativkontrolle mit Primern
- * **WK**= Wachstumskontrolle
- * **t₀-Kontrolle**= Kontrolle zum Zeitpunkt t₀

Abb.9: *hemB*-Mutante+Gentamicin: Light-Cycler-Graph nach 24 Std. Inkubation

2.b) nach 48 Std. Inkubation (t₄₈):

Tab.14: Ergebnisse der 16S-rDNA-basierten real-time-PCR nach 48 Std. Inkubation

Crossing point (CP)							
<u>S. aureus</u> -Stamm	Antibiotikakonzentration (µg/ml)						
	64	32	16	8	4	2	1
A22223I Wildtyp	29,5	28,6	17,2	17,3	17,3	17,1	N.D.
A22223I <i>hemB</i>	23,6	18,8	18,0	17,9	16,9	17,8	N.D.
	0,5	0,25	0,125	0,064	0,032	WK*	OK*
A22223I Wildtyp	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	17,6	24,8
A22223I <i>hemB</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	17,4	25,6

Nach 48-stündiger Bebrütung mit Gentamicin liegt die "molekulare MHK" anhand der gemessenen CP-Werte für den Wildtyp bei 32 µg/ml, für die *hemB*-Mutante gleich bleibend bei über 64 µg/ml.

In der Abb.10 sind die CP-Werte des Wildtyps in Gegenwart von Gentamicin zum Zeitpunkt t_{48} dargestellt. Optisch eindrücklich ist auch hier der CP-Wert-Sprung zwischen den Gentamicinkonzentrationen 16 µg/ml und 32 µg/ml, wobei Letztere die „mMHK“ darstellt.

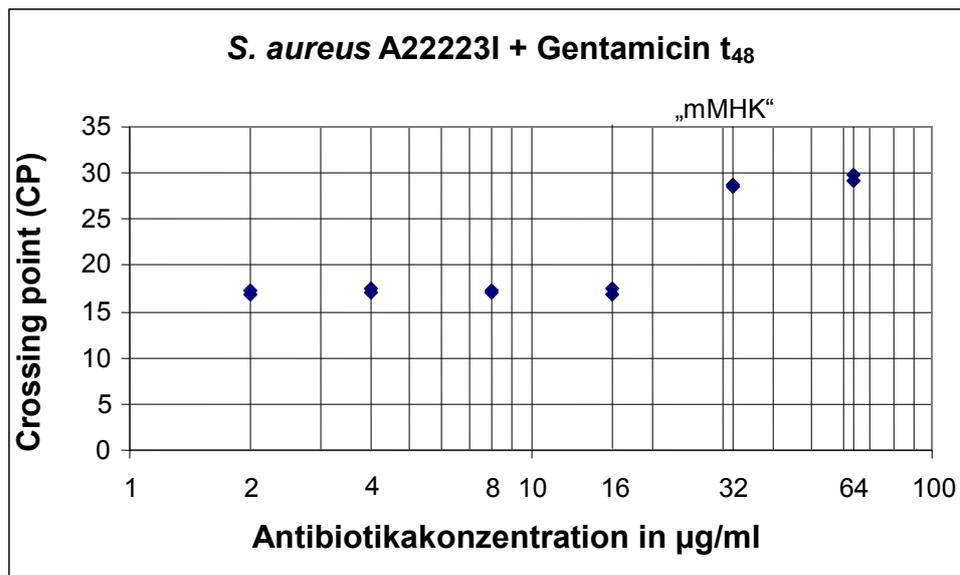
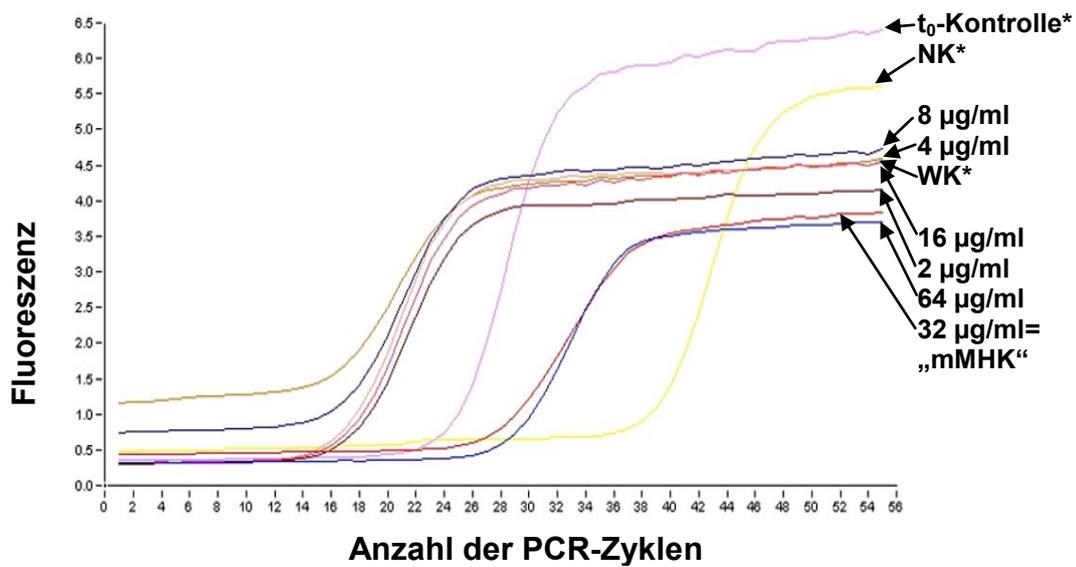


Abb.10: Wildtyp+Gentamicin: Crossing-Points in der real-time-PCR nach 48 Std. Inkubation im Doppelansatz



- * NK= Negativkontrolle mit Primern
- * WK= Wachstumskontrolle
- * t_0 -Kontrolle= Kontrolle zum Zeitpunkt t_0

Abb.11: Wildtyp+Gentamicin: Light-Cycler-Graph nach 48 Std. Inkubation

3.) Cefuroxim:

3.a) nach 24 Std. Inkubation (t_{24}):

Tab.15: Ergebnisse der 16S-rDNA-basierten real-time-PCR nach 24 Std. Inkubation

Crossing point (CP)							
<u>S. aureus-Stamm</u>	<u>Antibiotikakonzentration ($\mu\text{g/ml}$)</u>						
	64	32	16	8	4	2	1
A22223I Wildtyp	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	30,9	29,8	27,3
A22223I hemB	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	27,0
	0,5	0,25	0,125	0,064	0,032	WK*	OK*
A22223I Wildtyp	16,9	17,3	16,8	N.D.	N.D.	16,8	25,5
A22223I hemB	26,1	22,9	19,5	19,3	18,6	18,9	25,9

Laut der Ergebnisse der Light-Cycler-PCR der mit Cefuroxim versetzten Proben nach 24-stündiger Bebrütung wird die „molekulare MHK“ für den *S. aureus*-Elternstamm bei einer Cefuroximkonzentration von 1 µg/ml beobachtet. Die entsprechende *hemB*-Mutante weist in diesem Fall eine höhere Sensibilität auf. Ihre „molekulare MHK“ liegt hier bei 0,5 µg/ml.

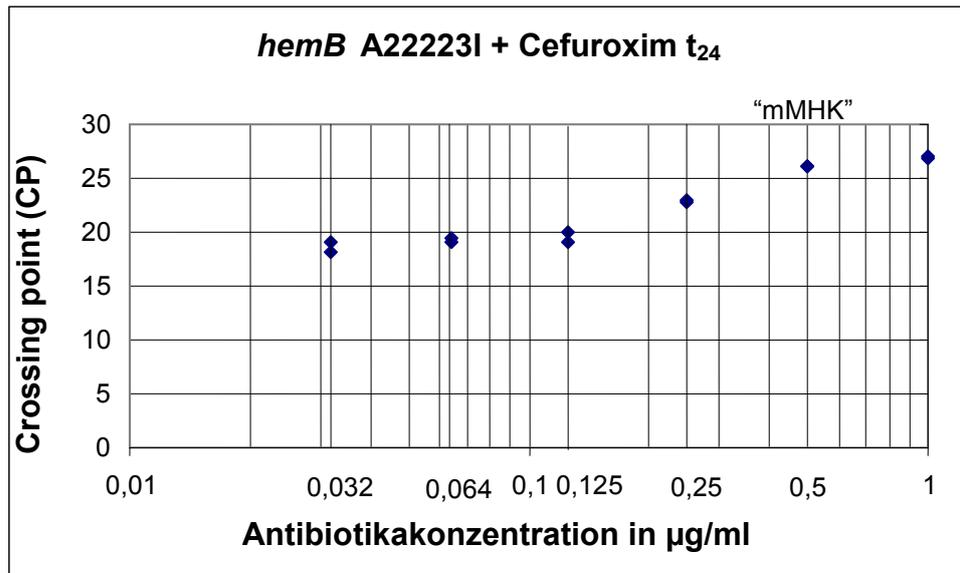
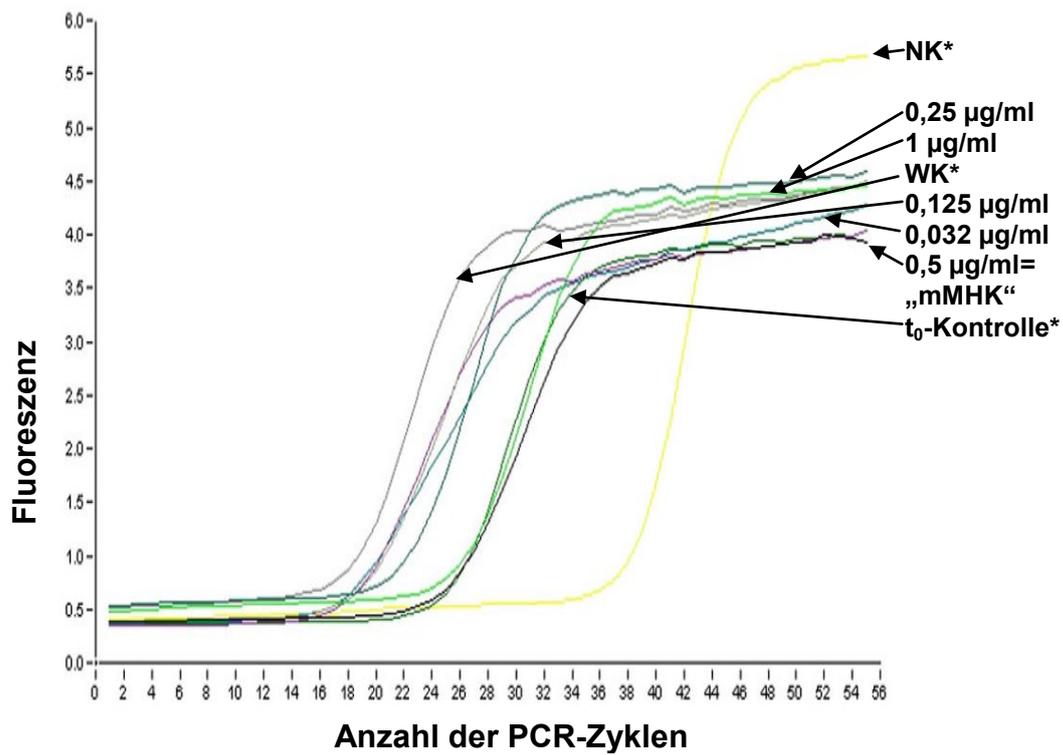


Abb.12: *hemB*-Mutante+Cefuroxim: Crossing-Points in der real-time-PCR nach 24 Std. Inkubation im Doppelansatz

In der Abb.12 erscheinen die CP-Werte der *hemB*-Mutante, nachdem sie 24 Std. mit Cefuroxim inkubiert wurde. Die „mMHK“ ist bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml auszumachen.

Im dazugehörigen Light-Cycler-Graphen (s.u.) sind die „molekulare MHK“, sowie die Wachstums- und t_0 -Kontrolle eingezeichnet.



- * **NK**= Negativkontrolle mit Primern
- * **WK**= Wachstumskontrolle
- * **t₀-Kontrolle**= Kontrolle zum Zeitpunkt t₀

Abb.13: *hemB*-Mutante+Cefuroxim: Light-Cycler-Graph nach 24 Std. Inkubation

3.b) nach 48 Std. Inkubation (_{t₄₈}):

Tab.16: Ergebnisse der 16S-rDNA-basierten real-time-PCR nach 48 Std. Inkubation

Crossing point (CP)							
<u><i>S. aureus</i>-Stamm</u>	<u>Antibiotikakonzentration (µg/ml)</u>						
	64	32	16	8	4	2	1
A22223I Wildtyp	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	30,2	29,7	17,7
A22223I <i>hemB</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	27,2
	0,5	0,25	0,125	0,064	0,032	WK*	OK*
A22223I Wildtyp	17,6	17,5	17,6	N.D.	N.D.	17,5	25,5
A22223I <i>hemB</i>	23,2	20,2	18,8	17,8	17,5	17,7	25,2

Aus der oben stehenden Tabelle 16 sind die „molekulare MHK“ des Wildtypes und der *hemB*-Mutante für Cefuroxim nach 48-stündiger Bebrütung zu entnehmen.

Dabei liegt sie für den Wildtyp bei 2 µg/ml, für die Mutante niedriger, nämlich bei 1 µg/ml, was bedeutet, dass sie sich gegenüber dem Cephalosporin empfindlicher darstellt als ihr Elternstamm.

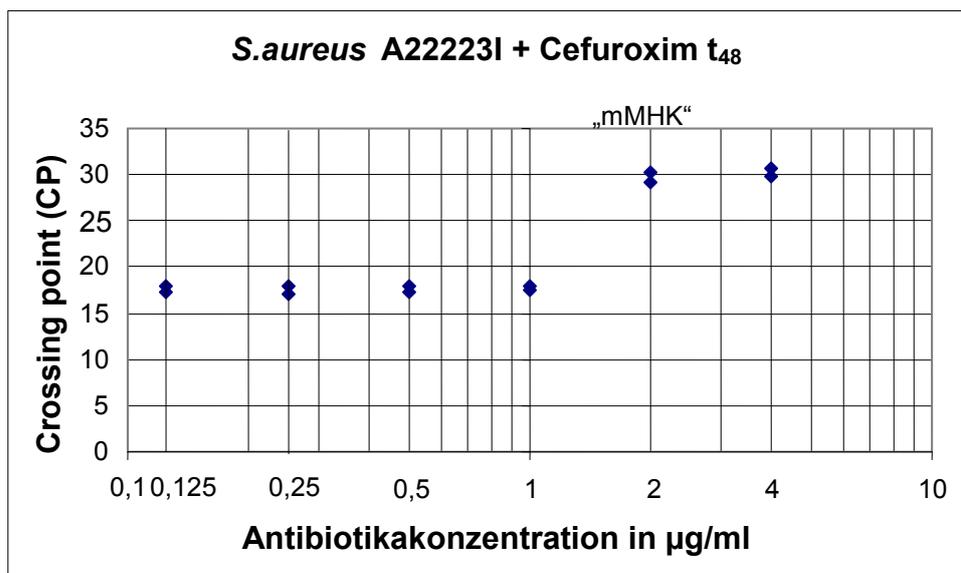
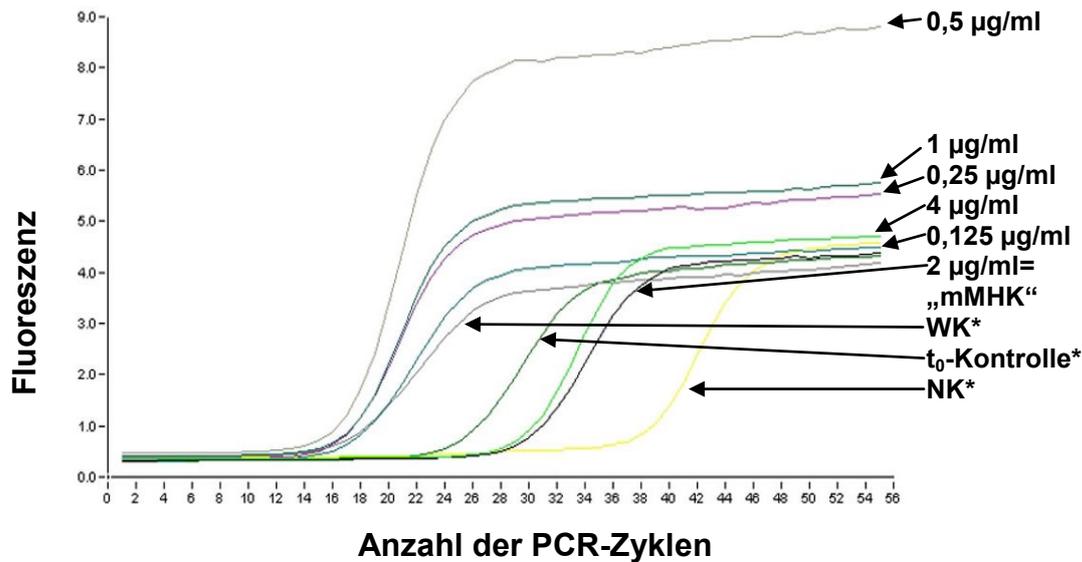


Abb.14: Wildtyp+Cefuroxim: Crossing-Points in der real-time-PCR nach 48 Std. Inkubation im Doppelansatz



- * **NK**= Negativkontrolle mit Primern
- * **WK**= Wachstumskontrolle
- * **t₀-Kontrolle**= Kontrolle zum Zeitpunkt t₀

Abb.15: Wildtyp+Cefuroxim: Light-Cycler-Graph nach 48 Std. Inkubation

4.) Ceftobiprol:

4.a) nach 24 Std. Inkubation (t₂₄):

Tab.17: Ergebnisse der 16S-rDNA-basierten real-time-PCR nach 24 Std. Inkubation

Crossing point (CP)							
<u>S. aureus-Stamm</u>	Antibiotikakonzentration (µg/ml)						
	64	32	16	8	4	2	1
A22223I Wildtyp	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	28,0	28,0	27,1
A22223I hemB	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	31,8
	0,5	0,25	0,125	0,064	0,032	WK*	OK*
A22223I Wildtyp	17,0	16,3	17,3	N.D.	N.D.	16,4	25,6
A22223I hemB	29,0	22,5	18,2	18,0	18,1	18,0	25,6

Die Tabelle 17 zeigt die „molekulare MHK“ für den Elternstamm und die Mutante bei Ceftobiprol nach einer Inkubationszeit von 24 Std. Die „mMHK“ des Wildtyps liegt dabei bei 1 µg/ml, die der Mutante bei 0,5 µg/ml. Auch bei diesem

Cephalosporin weist die *hemB*-Mutante eine höhere Sensibilität auf als ihr Elternstamm.

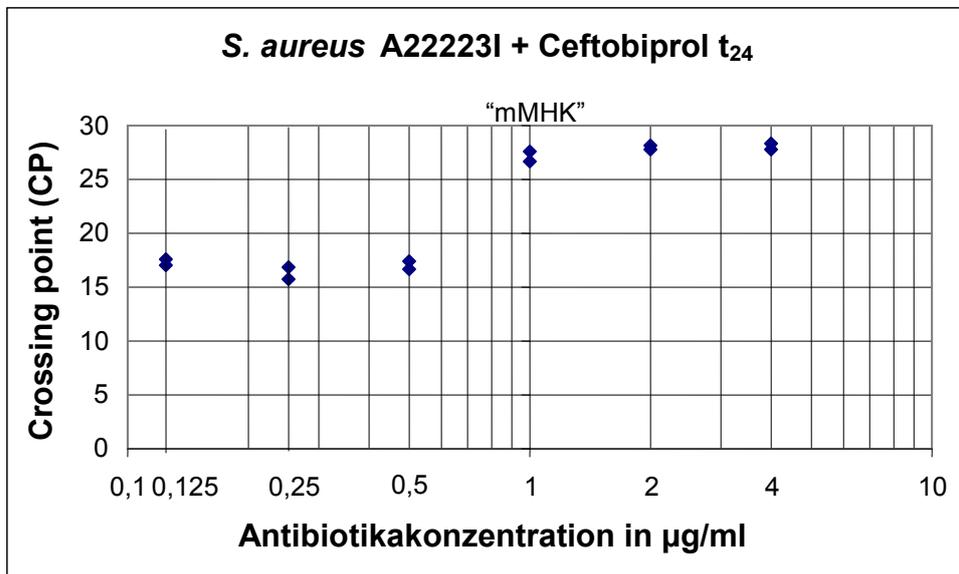
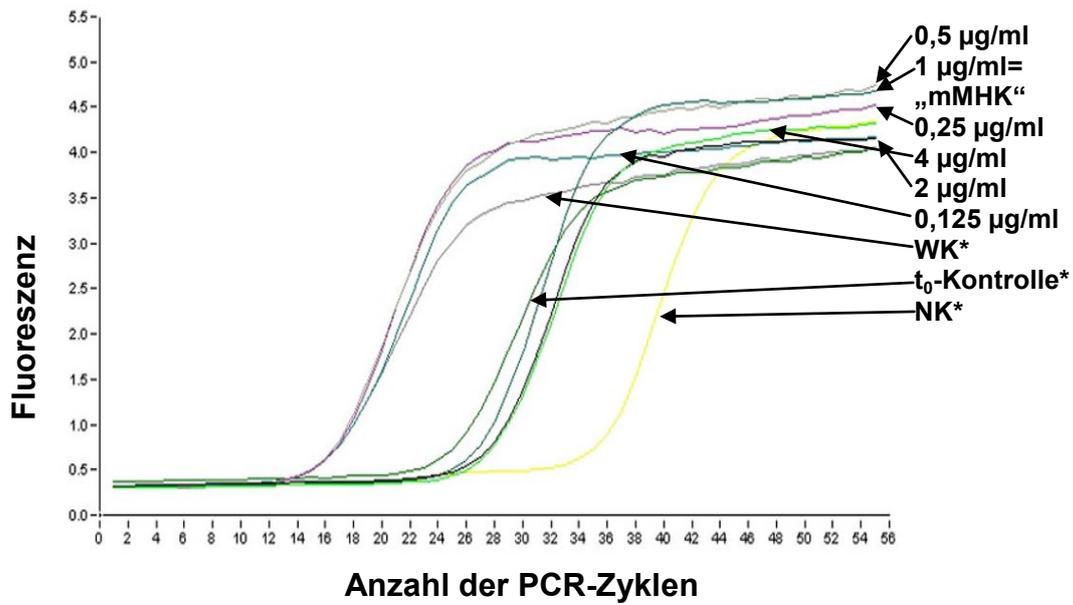


Abb.16: Wildtyp+Ceftobiprol: Crossing-Points in der real-time-PCR nach 24 Std. Inkubation im Doppelansatz



- * **NK**= Negativkontrolle mit Primern
- * **WK**= Wachstumskontrolle
- * **t₀-Kontrolle**= Kontrolle zum Zeitpunkt t₀

Abb.17: Wildtyp+Ceftobiprol: Light-Cycler-Graph nach 24 Std. Inkubation

4.b) nach 48 Std. Inkubation (t₄₈):

Tab.18: Ergebnisse der 16S-rDNA-basierten real-time-PCR nach 48 Std. Inkubation

Crossing point (CP)							
<u>S. aureus-Stamm</u>	Antibiotikakonzentration (µg/ml)						
	64	32	16	8	4	2	1
A22223I Wildtyp	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	32,8	32,8	30,3
A22223I hemB	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	33,2	33,9
	0,5	0,25	0,125	0,064	0,032	WK*	OK*
A22223I Wildtyp	17,2	17,4	17,5	N.D.	N.D.	16,7	26,8
A22223I hemB	18,1	18,2	17,8	17,7	N.D.	18,0	25,7

Nach 48 Std. Inkubation mit dem Antibiotikum Ceftobiprol ändert sich nur die „mMHK“ der Mutante. Sie steigt von 0,5 auf 1 µg/ml, wobei die „mMHK“ des Elternstammes weiterhin bei 1 µg/ml liegt.

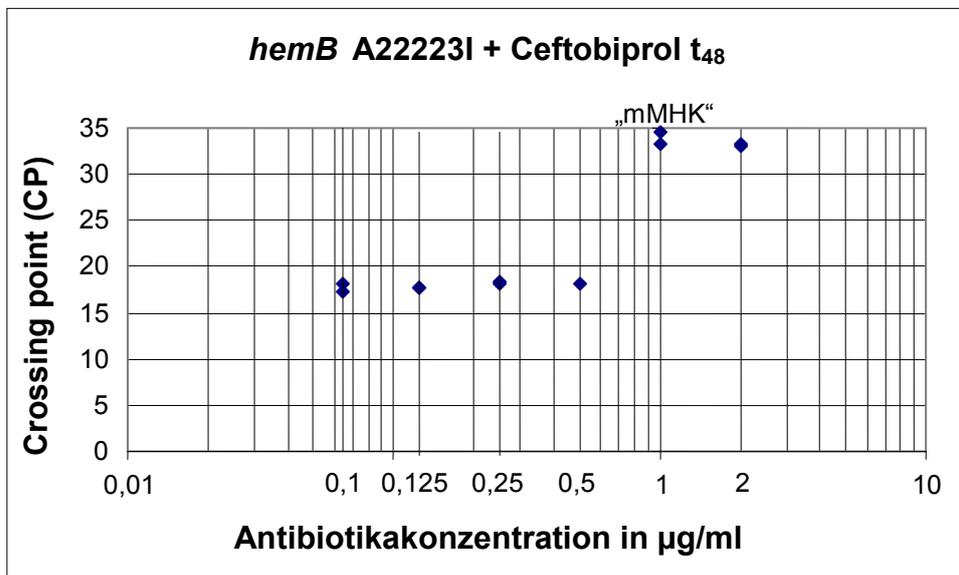
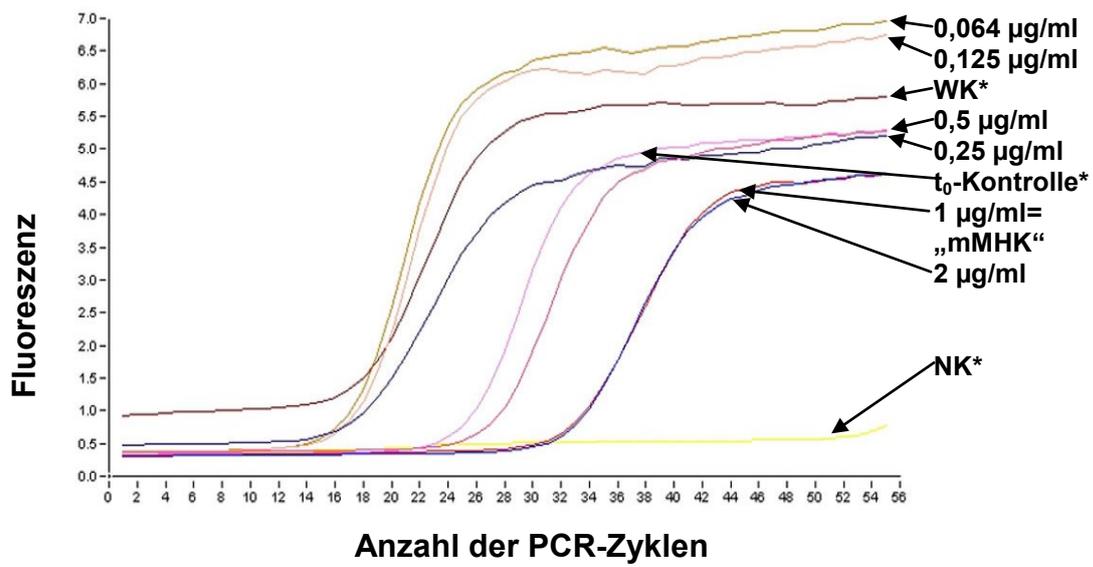


Abb.18: *hemB*-Mutante+Ceftobiprol: Crossing-Points in der real-time-PCR nach 48 Std. Inkubation im Doppelansatz



- * **NK**= Negativkontrolle mit Primern
- * **WK**= Wachstumskontrolle
- * **t₀-Kontrolle**= Kontrolle zum Zeitpunkt t₀

Abb.19: *hemB*-Mutante+Ceftobiprol: Light-Cycler-Graph nach 48 Std. Inkubation

3.5 Induktion von *S. aureus* SCVs in Gegenwart von Aminoglykosiden

Das Ausplattieren aller Wachstumsansätze in der seriellen Makrodilutionstestung diente der phänotypischen Identifizierung des Bakteriums und damit der Qualitätskontrolle. Dabei konnten in Bezug auf die Stabilität des *S. aureus*-Elternstammes *in vitro*-Beobachtungen gemacht werden, die auch schon in früheren Studien erhoben wurden (4,52,54,79).

So konnten bei der Kontrolle der Versuchsansätze mit dem Aminoglykosid Gentamicin in den Verdünnungen 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml und 0,064 µg/ml in jeweils beiden Ansätzen der Doppelbestimmung Mischpopulationen bestehend aus Kolonien des Wildtyps und des SCV-Phänotyps gewonnen werden. Nach Isolation der phänotypischen SCVs konnten immerhin noch bei den Kontrollausstrichen der Konzentrationen 4 µg/ml bzw. 2 µg/ml Wachstum von ausschließlich SCVs (C=4 µg/ml) bzw. von SCVs und Wildtyp (C=2 µg/ml) beobachtet werden. Die übrigen Kontrollausstriche zeigten nur noch Reinkulturen des Wildtyps. Beobachtungen aus einer vorausgegangenen prospektiven Fall-Kontroll-Studie bezüglich der Therapie an Osteomyelitis erkrankter Patienten mit in den Knochen eingebrachten Gentamicin-Polymethyl-Methacrylat-(PMMA)-Ketten, nach der es zu einer Induktion von *S. aureus* SCVs kam (70), konnten auch im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* bestätigt werden.

3.6 Keimzahlbestimmung

Die Keimzahlbestimmung im Rahmen des konventionellen MHK-Mikrodilutionstest mit der auf eine Dichte von 0,5 nach McFarland eingestellten Keimsuspension ergab für *S. aureus* A22223I eine Keimzahl von $8,5 \times 10^5$, für die *hemB*-Mutante eine Keimzahl von $1,9 \times 10^6$. Für die Kontrollstämme betragen die Keimzahlen $1,85 \times 10^6$ (*E. coli* ATCC 25922), $1,58 \times 10^6$ (*S. aureus* ATCC 25923) und $7,78 \times 10^5$ (*S. aureus* ATCC 29213).

Bei der Keimzahlbestimmung aus der Standardkultur für den Makrodilutionstest mit einer OD=0,05 konnten folgende Werte ermittelt werden:

$3,5 \times 10^7$ für den *S. aureus* A22223I-Elternstamm und $2,9 \times 10^6$ für die entsprechende *hemB*-Mutante.

3.7 Qualitätskontrolle

Der Qualitätskontrolle diene zum einen die in die *hemB*-Mutante eingebaute *ermB*-Kassette. Sie verschaffte der Mutante eine Resistenz gegenüber Erythromycin, die in den Versuchsreihen als guter Marker für die Qualität der Mutante genutzt werden konnte. Durch das Wachstum der *hemB*-Mutante auf und in allen erythromycinhaltigen Nährböden und Flüssigkulturmedien, wurde die *ermB*-Kassette in ihrer Funktionsfähigkeit bestätigt. Außerdem wurde durch den Erythromycinzusatz das Wachstum fremder Keime erfolgreich unterdrückt. Alle Kontrollausstriche der Wachstumsansätze der *hemB*-Mutante sowie des Elternstammes in der Makrodilution waren frei von Kontaminationen.

Im Rahmen der konventionellen MHK-Testung mittels Mikrodilution, E-Test und Agardiffusionstest wurden zur Qualitätskontrolle jeweils drei Kontrollstämme mituntersucht. Da ihre Ergebnisse in den vorgegebenen MHK-Grenzbereichen lagen, konnte von der guten Reproduzierbarkeit und Qualität der eingesetzten Methode ausgegangen werden.

Um eine Kontamination der Proben in der real-time-PCR auszuschließen, liefen in jedem PCR-Programm zwei Negativkontrollen mit (1. DNA-Template ohne Primer, 2. nur Primer). Die erste Negativkontrolle zeigte in keinem der Versuche ein Ergebnis in Form eines CP-Wertes, was für die Reinheit dieser Kontrolle sprach. Bei der Kontrolle, die ausschließlich die Primer enthalten sollte, kam es allerdings in den meisten PCR-Durchläufen zu einer Amplifikation mit einem CP-Wert, der bei ca. 35 Zyklen lag. Da in der Schmelzkurve aber kein zusätzlicher Peak enthalten war, kann es sich hierbei um Artefakte, wie z.B. Dimerbildung handeln.

Die Schmelzkurvenanalyse der real-time-PCR stellte einen zusätzlichen Marker für die Qualität des Versuches da, indem durch die Spezifität der

Schmelztemperatur der Produkte Kontaminationen mit Fremd-DNA oder das Auftreten von Primerdimeren hätte festgestellt werden können. Da in allen Versuchen jeweils nur ein einziger Peak („single peak“) in den Schmelzkurvenanalyse zu verzeichnen war, war davon auszugehen, dass ausschließlich die bakterielle DNA des *S. aureus* A22223I bzw. der *hemB*-Mutante A22223I amplifiziert wurde.

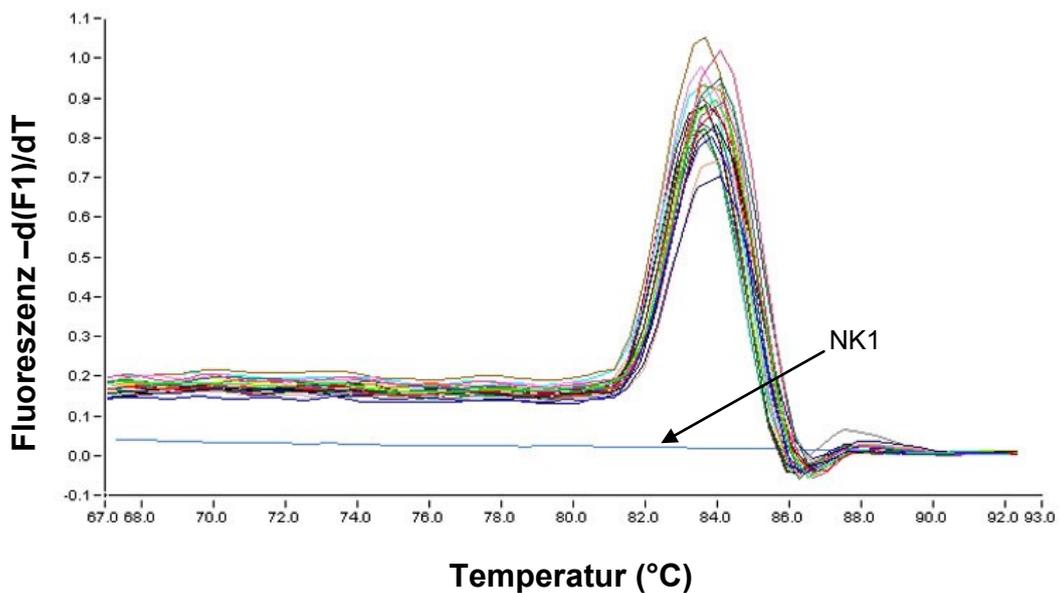


Abb.20: Schmelzkurve der real-time-PCR mit Wildtyp+Ceftobiprol nach 24 Std. Inkubation

In der Abb.20 dargestellt ist die Schmelzkurve des 16S-rDNA-basierten real-time-PCR-Durchlaufes mit DNA-Proben aus dem Makrodilutionstest von *S. aureus* A22223I mit Ceftobiprol in den Konzentrationen 4 µg/ml; 2 µg/ml; 1 µg/ml; 0,5 µg/ml; 0,25 µg/ml und 0,125 µg/ml, der Wachstumskontrolle sowie der t_0 -Kontrolle, dem DNA-Eichstandard in den Verdünnungen 10^{-1} bis 10^{-5} und den beiden Negativkontrollen (NK1= Wildtyp-DNA in der Verdünnung 1:10, NK2= nur Primer) nach 24-stündiger Inkubation. Die DNA-Proben aus dem Makrodilutionstest, die Wachstums- und die t_0 -Kontrollen sind jeweils im doppelten Ansatz aufgeführt.

Auch hier wird in der Negativkontrolle 2 mit den Primer (NK2) das Vorhandensein bakterieller DNA bestätigt, indem der Schmelzkurven-Peak der NK2 dem der anderen DNA-enthaltenden Ansätze entspricht.

Die Reinheit der bakteriellen DNA, vor allem die Abwesenheit von Proteinrückständen konnte in der photometrischen Messung anhand des OD_{260} – OD_{280} -Quotienten abgelesen werden. Dabei befanden sich die Werte in allen Konzentrationsbestimmungen in einem Bereich zwischen 1,8 und 2,0.

4 Diskussion

Die konventionelle Empfindlichkeitstestung von *S. aureus* SCVs wie auch anderer anspruchsvoller Bakterien (intrazelluläres oder langsames Wachstum, anaerobes Wachstum etc.) birgt viele methodische Schwierigkeiten und eine Standardisierung der Tests ist aufgrund der veränderten Wachstumsbedingungen dieser Mikroorganismen problematisch. Somit scheitert der Versuch, klinische SCVs in ihrem Resistenzverhalten in der Routinediagnostik zu untersuchen nicht selten an der Fehlbestimmung durch (semi-)automatisierte Testmethoden (z. B. VITEK2-Test) (8) oder durch ungeeignete Testbedingungen, wie einer ungenügend langen Inkubationszeit oder ungeeignete Medien (30). *S. aureus* SCVs benötigen aufgrund ihres langsamen Wachstums eine Inkubationszeit von 48 bis 72 Std. und nicht wie üblich 12 bis 24 Std. für normal schnell wachsende Keime (32,55,57,70).

Das Ziel des in dieser Arbeit entwickelten Versuchsaufbaus bestand darin, genau diese Grenzen und Beschränkungen der etablierten, standardisierten Empfindlichkeits-Testmethoden aufzudecken und durch eine innovative, zuverlässige Resistenztestung mit molekularem Ansatz zu überwinden, wie es auch Hunfeld *et al.* in ihren Studien für *Anaplasma phagocytophilum* beschreiben (21).

Im Rahmen dieses Versuchsaufbaus wurde die *in vitro*-Empfindlichkeit des Stammpaares *S. aureus* A22223I und seiner isogene *hemB*-Mutante mit SCV-Phänotyp gegenüber vier verschiedenen Antibiotika, Erythromycin, Gentamicin, Cefuroxim und Ceftobiprol, getestet. Die Testung umfasste auf der einen Seite die konventionellen, standardisierten Methoden wie den E-Test, die Bouillon-Mikrodilution, den Agardiffusionstest sowie den VITEK-Test. Auf der anderen Seite wurde ein Bouillon-Makrodilutionstest durchgeführt in Kombination mit der Detektion des bakteriellen Wachstums durch photometrische Messung sowie zusätzlich mit einer quantitativen 16S-rDNA basierten real-time-PCR.

Empfindlichkeit:

In der quantitativen real-time-PCR zeigte sich der Elternstamm Erythromycin-sensibel („mMHK“=1 µg/ml für t_{24} , bzw. 2 µg/ml für t_{48}), resistent gegenüber Gentamicin („mMHK“=32 µg/ml für t_{24} und t_{48}), Cefuroxim-sensibel („mMHK“=1 µg/ml für t_{24} und 2 µg/ml für t_{48}) sowie sensibel gegenüber Ceftobiprol („mMHK“=1 µg/ml für t_{24} und t_{48}).

Im Vergleich dazu konnte die *hemB*-Mutante aufgrund der eingebauten *ermB*-Kassette erwartungsgemäß als resistent gegenüber Erythromycin getestet werden („mMHK“>8 µg/ml für t_{24} und t_{48}) und diente somit als „proof of principle“. Gegenüber Gentamicin zeigte sie eine reduzierte Empfindlichkeit („mMHK“>64 µg/ml für t_{24} und t_{48}), gegenüber Cefuroxim dagegen war sie erhöht sensibel („mMHK“=0,25 µg/ml für t_{24} und 0,5 µg/ml für t_{48}), genauso bei Ceftobiprol („mMHK“=0,5 µg/ml für t_{24} und 1 µg/ml für t_{48}).

Die verminderte Sensitivität der *hemB*-Mutante gegenüber Gentamicin in der real-time-PCR konnte schon in früheren Studien belegt werden (4,6,38,55,56,58) und ist erklärbar durch ein bei *S. aureus* SCVs vorhandenes reduziertes Elektronenpotential entlang der Zytoplasmamembran ($\Delta\Psi$), das nicht ausreichend hoch ist, um die kationische Substanz aktiv in die Zelle aufzunehmen, wo sie ihre Wirkung zeigen könnte. Zwar wurde die *hemB*-Mutante in allen konventionellen Testmethoden als mäßig sensibel (Agardiffusionstest), bzw. als sensibel (Mikrodilution und E-Test) gegenüber Gentamicin getestet, doch zeigte sie im Vergleich zu ihrem Elternstamm vergleichsweise eine reduzierte Gentamicin-Empfindlichkeit. Die relativ verminderte Empfindlichkeit auch des Elternstammes gegenüber Gentamicin, die im molekularen Versuch getestet wurde, konnte in der konventionellen MHK-Testung nicht bestätigt werden. Dort zeigte er sich in allen Tests als Gentamicin-sensibel.

Ein möglicher Erklärungsansatz könnte in der unterschiedlichen Zusammensetzung der Nährmedien liegen. So wurde in der konventionellen MHK-Testung durchgängig ein Müller-Hinton-Medium (MH) verwendet, wohingegen im molekularen Versuch eine Tryptic-Soy-Bouillon (TSB) benutzt wurde. Das im TSB-Medium enthaltene Salz könnte Einfluss haben auf die

Aufnahme von Gentamicin in die Bakterienzelle, indem die monovalenten Kationen die kationische Bindung des Antibiotikums beeinträchtigten wie es auch schon bei Baumert *et al.* beschrieben wurde (6). Es könnte aber genauso durch Verbrauch von Glukose zu einer Azidifikation gekommen sein, durch die das Membranpotential ($\Delta\Psi$) reduziert wurde und damit Gentamicin schlechter aufgenommen werden konnte (6).

Das könnte die reduzierte Empfindlichkeit des Elternstammes in der real-time-PCR gegenüber Gentamicin erklären. Die Mutante war in den konventionellen Tests als mäßig sensibel, bzw. sensibel gegen Gentamicin getestet worden. Hier wurden Glukose-haltige MH-Nährmedien benutzt, wodurch der SCV in der Lage sein könnte, durch schnellen Glukoseverbrauch ein Membranpotential generieren zu können, das hoch genug ist, um Gentamicin zumindest in größerem Maße aufzunehmen als ohne Zusatz von Glukose (6). Trotzdem erreicht die *hemB*-Mutante auch in diesem Versuch nicht das Empfindlichkeitsniveau ihres Elternstammes.

Die Beobachtung der Induktion bzw. Selektion von *S. aureus* SCVs bei der Testung des Elternstammes mit Gentamicin stellt möglicherweise ebenfalls eine Erklärung für die zum Ergebnis der konventionellen Tests nicht kongruent erscheinende reduzierte Empfindlichkeit des Bakterienstammes gegenüber Gentamicin im molekularen Versuchsaufbau dar. Durch die Selektion des Elternstammes zum SCV in Anwesenheit des Aminoglykosides, zeigte der so entstandene SCV-Phänotyp nun ein verändertes Resistenzverhalten Gentamicin gegenüber durch Reduktion seines Membranpotentials (55).

Wie auch in früheren Studien gezeigt, wurde eine gute *in vitro*-Sensibilität der SCVs gegenüber Cephalosporinen beobachtet (73).

Wie schon bei von Eiff *et al.* beschrieben, zeigen die Cephalosporine eine gute Wirksamkeit gegenüber den *S. aureus* SCVs, eingeschlossen SCVs von methicillinresistenten Staphylokokken. Dabei konnte in der damaligen Studie - wie im Rahmen dieser Arbeit - eine besonders gute Wirksamkeit des Ceftobiprols gegen den SCV-Phänotyp bewiesen werden, vergleichbar mit der Wirksamkeit von Linezolid (73). Ebenfalls konnte damals schon die ähnlich große Wirksamkeit von Cefuroxim gegen Staphylokokken-SCVs beobachtet

werden. Die Effektivität von Cefuroxim zeigte sich nun auch in diesen Versuchen, bei denen die *hemB*-Mutante sowohl in den meisten konventionellen Testmethoden (E-Test und Agardiffusionstest) als auch in der molekularen Testmethode eine erhöhte Empfindlichkeit aufwies im Vergleich zum entsprechenden Elternstamm.

Neuere Studien von Garcia *et al.* (16-18), die die Wirksamkeit von Fluorchinolonen gegenüber den Staphylokokken-SCVs untersuchten, konnten nun allerdings auch die besonders hohe Wirksamkeit dieser Antibiotikagruppe belegen. Dabei war Ziel der Untersuchungen herauszufinden, welchen Effekt die Differenzierung von THP-1-Zellen durch die Proteinkinase A (PMA) in Makrophagen auf die intrazelluläre Persistenz von *S. aureus*, seiner *hemB*- und *menD*-Mutante bei Zugabe von Antibiotika und somit auf die Änderung der intrazellulären Aktivität der Fluorchinolone habe. Als Fluorchinolon mit der höchsten Wirksamkeit in nicht aktivierten THP-1-Zellen wurde Moxifloxacin, als Vertreter mit der geringsten Wirksamkeit Oritavancin eingesetzt. Gentamicin wurde hierbei als Kontroll-Antibiotikum mit geringer Wirksamkeit gegenüber intrazellulären und hoher Wirksamkeit gegenüber extrazellulären Bakterien mituntersucht.

Es zeigte sich nach Zellaktivierung durch PMA ein drastischer Abfall der Internalisierung der getesteten Bakterienstämme in die aktivierten Makrophagen, die Zahl der intrazellulären Bakterien sank um das bis zu 400-fache.

Ebenso zeigte sich eine bis zu 7-fach erhöhte Aktivität des Gentamicin gegenüber Elternstamm, seiner *hemB*-Mutante und der komplementierten *hemB*-Mutante sowie eine 5-fach erhöhte Aktivität von Moxifloxacin gegenüber fast allen Stämmen. Eine Ausnahme bildete hierbei die *menD*-Mutante, deren Empfindlichkeit gegenüber beiden o.g. Antibiotika unabhängig vom Aktivitätszustand der THP-1-Zellen war. Gleichmaßen war die Aktivität von Oritavancin gegenüber allen Stämmen gleich, unabhängig von der PMA-Aktivierung. Der Effekt der PMA-Aktivierung auf die Aktivität von Gentamicin und Moxifloxacin wurde durch Zugabe von N-acetylcystein (NAC) als

Radikalfänger wieder aufgehoben, die Aktivität von Oritavancin wurde auch dadurch nicht beeinflusst.

Es wurde zudem getestet, welchen Einfluss die vorherige Inkubation der THP-1-Zellen mit H_2O_2 auf die Wirksamkeit der Antibiotika habe, wobei sich herausstellte, dass die antibakterielle Wirksamkeit deutlich gesteigert werden konnte (17).

In einer weiteren Studie konnten Garcia *et al.* zeigen, dass die Staphylokokken-SCVs eine hohe Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Penicillinen (besonders Cloxacillin und Carbapeneme) nach Phagozytose der von ihnen befallenen THP-1-Zellen aufwiesen (18).

Zusammenfassend haben Garcia *et al.* herausgestellt, dass *in vitro* die Aktivierung der zelleigenen Abwehrmechanismen (Herstellung eines sauren intrazellulären Milieus durch Phagozytose, die Aktivierung von Sauerstoffradikalen, hier H_2O_2) das intrazelluläre Überleben sogar von MRSA-SCVs nach Antibiotikazugabe deutlich herabsetzten und die Aktivität verschiedener Antibiotika drastisch erhöhen kann. Dies aber gilt, wie in den Studien sichtbar geworden, nicht für alle Antibiotika einer Klasse gleichermaßen (17,18).

In diesem molekularen Versuchsaufbau wurde nun ein System entwickelt, das die Möglichkeit schafft, bakterielles Wachstum quantitativ zu erfassen, indem es ganz gezielt durch Amplifikation des bakterienspezifischen Zielgens, der 16S-rDNA, nur die bakterielle DNA detektiert. Dies ermöglicht über die Grenzen und Beschränkungen der konventionellen, standardisierten Routineverfahren hinaus eine genauere Testung der Antibiotika-Sensibilität von schwierig zu kultivierenden, anspruchsvollen Mikroorganismen, wie den *S. aureus* SCVs. Probleme der Identifikation und erschwerten Diagnostik der SCVs durch ihr verlangsamtes Wachstum können so umgangen werden.

Durch die Amplifikation in der real-time-PCR ist zudem im Gegensatz zu anderen PCR-Verfahren die schnelle, unmittelbare Analyse der Ergebnisse garantiert.

Die hier durchgeführten Versuche beschränken sich noch auf die *in vitro*-Sensibilitätstestung reiner Bakterienkulturen. Um eine bessere Aussage über

die Anwendbarkeit der 16S-rDNA-basierten real-time-PCR zur Empfindlichkeitstestung bei klinischem Infektionsmaterial treffen zu können, müssten weitere Studien mit durch *S. aureus* und der *hemB*-Mutante infizierten Zellkulturen folgen. In diesem Schritt könnte dann auch die für die SCVs charakteristische Eigenschaft der intrazellulären Persistenz berücksichtigt werden, sodass diese *in vitro*-Situation der Situation *in vivo* vergleichbarer wäre.

In zukünftig durchgeführten Versuchen müssten geeignete Zellkulturen, z.B. Endothelzellen in standardisierter, reproduzierbarer Weise mit der *hemB*-Mutante infiziert werden und diese Zellkulturen dann einem Makrodilutionstest zugeführt werden. Nach Inkubation würde die DNA (wirtszelleigene und erregereigene DNA) aus den Ansätzen isoliert, mithilfe der 16S-rDNA-basierten real-time-PCR selektiv nur bakterielle DNA amplifiziert und damit die Empfindlichkeit der intrazellulär wachsenden *hemB*-Mutante in Form der „molekularen minimalen Hemmkonzentration“ bestimmt werden.

Ein weiterer Vorteil der quantitativen real-time-PCR stellt die direkte Qualitätskontrolle durch die Schmelzkurvenanalyse der Produkte dar, die in jedem Zyklus durchgeführt wird und die Spezifität des amplifizierten Produktes widerspiegelt.

In Hinblick auf die Möglichkeit der Verunreinigung der Proben mit anderen Bakterien und bakterieller DNA, ist die Überlegung berechtigt, in zukünftigen Studien anstatt des in allen Bakterien ubiquitär vorkommenden 16S-rDNA-Gens spezies-spezifische Zielgene (z.B. *nuc*-Gene) mit spezifischen Oligonukleotiden zu amplifizieren, um eine noch größere Qualitätskontrolle zu garantieren. In weiteren größer angelegten Studien muss zudem die Frage geklärt werden, in wieweit diese Methode in der klinischen Praxis anwendbar ist. Dafür sollten zunächst *in vitro*-Untersuchungen in Hinblick auf die Empfindlichkeitstestung intrazellulär persistierender *S. aureus* SCVs in geeigneten Zellkulturen folgen.

Im Vergleich zu den standardisierten Routineverfahren in der Empfindlichkeitsdiagnostik stellt der molekulare Versuchsaufbau aus wirtschaftlicher Sicht einen derzeit noch größeren finanziellen Aufwand dar. Zur Durchführung muss im Labor ein LightCycler-Gerät vorhanden sein sowie die für die DNA-Isolation notwendigen Materialien. Auch der praktische Aufwand scheint auf den ersten Blick größer zu sein als bei der konventionellen Testung.

Doch in Abwägung der dadurch verbesserten Diagnostik und evtl. auftretenden Folgekosten in der Therapie, die durch eine fehlgeschlagene konventionelle Sensibilitätstestung entstehen könnten, wird sich diese molekulare Methode langfristig möglicherweise als kostengünstiger und effektiver herausstellen. Das müssten allerdings größer angelegte zukünftige Studien untersuchen.

5 Zusammenfassung

Der Erreger *Staphylococcus aureus* ist in der Lage sowohl *in vivo* als auch unter *in vitro*-Bedingungen eine phänotypische Variante, den Small Colony Variant (SCV)-Phänotyp, auszubilden, der aufgrund eines Elektronentransportdefektes eine im Vergleich zum Elternstamm veränderte Morphologie sowie veränderte metabolische Eigenschaften aufweist. Dieser Defekt in der Elektronentransportkette ist u.a. Ursache für sein langsames Wachstum und die Ausbildung von nadelspitzgroßen, schwer detektierbaren Kolonien auf festen Kulturmedien. Außerdem wird ihm dadurch die Fähigkeit verliehen, in den Wirtszellen intrazellulär für lange Zeit zu persistieren und dadurch chronisch-rezidivierende Infektionen zu verursachen. Von großer Bedeutung ist auch das veränderte Antibiotika-Empfindlichkeitsprofil des SCV-Phänotyps.

Da die in der Routinediagnostik angewandten konventionellen, phänotypischen Verfahren der Sensibilitätstestung vorwiegend für die Untersuchung schnell wachsender Mikroorganismen mit einer Inkubationszeit von 12-24 Std. angelegt sind, sind sie für ihren Einsatz bei SCVs nur bedingt geeignet.

In dieser Studie konnte mithilfe eines molekularen Versuchsaufbaus eine geeignete Methode etabliert werden, die die Grenzen der konventionellen phänotypischen Empfindlichkeitstestung bei Staphylokokken-SCVs überwindet. Da SCVs, die aus klinischem Untersuchungsgut isoliert worden sind, in der Regel *in vitro* nur instabil ihren Phänotyp aufweisen, wurde für die Experimente eine *hemB*-Mutante mit SCV-Phänotyp verwendet.

Durch die in ihr Genom eingebaute *ermB*-Kassette, die zur Unterbrechung des Elektronentransports führt, wurde gleichzeitig eine Erythromycin-Resistenz etabliert, die gleichzeitig als Kontrollreaktion bei den Empfindlichkeitsprüfungen diente.

Mit der selektiven Amplifikation bakterieller DNA aus einer Bouillon-Makrodilution mit vier verschiedenen antimikrobiellen Substanzen durch eine 16S-rDNA-basierte real-time-PCR gelang es, eine quantitative Messung des Bakterienwachstums durchzuführen. Auch in Proben, in denen phänotypisch

noch kein Wachstum sichtbar war, konnte für die *hemB*-Mutante mittels molekularer Methodik noch Wachstum gemessen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein molekularer Ansatz für die Sensibilitätstestung von Staphylokokken-SCVs gegenüber verschiedenen antibiotischen Substanzen als objektiver Marker im Vergleich zu den phänotypischen Testmethoden entwickelt werden. Die 16S-rDNA-basierte real-time-PCR im Anschluss an eine Antibiotika-Verdünnungsreihe erbrachte ein wachstumsgeschwindigkeitsunabhängiges, sensibles, schnelles und reproduzierbares Verfahren, um die Antibiotika-Sensibilität langsamwachsender *S. aureus* SCVs zu bestimmen.

6 Literaturverzeichnis

1. **Abele-Horn, M., B. Schupfner, P. Emmerling, H. Waldner, and H. Goring.** 2000. Persistent wound infection after herniotomy associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Infection* **28**:53-54.
2. **Abu-Qatouseh, L. F., S. V. Chinni, J. Seggewiss, R. A. Proctor, J. Brosius, T. S. Rozhdestvensky, G. Peters, C. von Eiff, and K. Becker.** 2010. Identification of differentially expressed small non-protein-coding RNAs in *Staphylococcus aureus* displaying both the normal and the small-colony variant phenotype
2. *J. Mol. Med. (Berl)* **88**:565-575.
3. **Acar, J. F., F. W. Goldstein, and P. Lagrange.** 1978. Human infections caused by thiamine- or menadione-requiring *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **8**:142-147.
4. **Balwit, J. M., P. van Langevelde, J. M. Vann, and R. A. Proctor.** 1994. Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells
1. *J. Infect. Dis.* **170**:1033-1037.
5. **Bates, D. M., C. von Eiff, P. J. McNamara, G. Peters, M. R. Yeaman, A. S. Bayer, and R. A. Proctor.** 2003. *Staphylococcus aureus menD* and *hemB* mutants are as infective as the parent strains, but the menadione biosynthetic mutant persists within the kidney
2. *J. Infect. Dis.* **187**:1654-1661.
6. **Baumert, N., C. von Eiff, F. Schaaff, G. Peters, R. A. Proctor, and H. G. Sahl.** 2002. Physiology and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* small colony variants
2. *Microb. Drug Resist.* **8**:253-260.
7. **Becker, K., A. W. Friedrich, G. Lubritz, M. Weilert, G. Peters, and C. von Eiff.** 2003. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. *J. Clin. Microbiol.* **41**:1434-1439.
8. **Becker, K., D. Harmsen, A. Mellmann, C. Meier, P. Schumann, G. Peters, and C. von Eiff.** 2004. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* **42**:4988-4995.
9. **Becker, K., N. A. Laham, W. Fegeler, R. A. Proctor, G. Peters, and C. von Eiff.** 2006. Fourier-transform infrared spectroscopic analysis is a

- powerful tool for studying the dynamic changes in *Staphylococcus aureus* small-colony variants
1. J. Clin. Microbiol. **44**:3274-3278.
10. **Becker, K. and G. Peters.** 2009. "Staphylococcaceae", Micrococcaceae und Dermacoccaceae, *In* B. Neumeister, H. K. Geiss, R. W. Braun, and P. Kimmig (ed.), Mikrobiologische Diagnostik. Bakteriologie-Mykologie-Virologie-Parasitologie, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart New York.
 11. **Becker, K. and C. von Eiff.** 2011. Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci. Manual of Clinical Microbiology, ASM press, Washington DC, 10th Edition .
 12. **Brouillette, E., A. Martinez, B. J. Boyll, N. E. Allen, and F. Malouin.** 2004. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure in vivo. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **41**:35-41.
 13. **Cormican, M. G. and R. N. Jones.** 1996. Emerging resistance to antimicrobial agents in gram-positive bacteria. Enterococci, staphylococci and nonpneumococcal streptococci
13. Drugs **51 Suppl 1**:6-12.
 14. **Dowson, C. G., T. J. Coffey, and B. G. Spratt.** 1994. Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding-protein-mediated resistance to beta-lactam antibiotics. Trends Microbiol. **2**:361-366.
 15. **Faber, C., H. P. Stallmann, D. M. Lyaruu, U. Joosten, C. von Eiff, A. van Nieuw Amerongen, and P. I. Wuisman.** 2005. Comparable efficacies of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 and gentamicin in a chronic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis model
5. Antimicrob. Agents Chemother. **49**:2438-2444.
 16. **Garcia, L. G., S. Lemaire, B. Kahl, K. Becker, R. Proctor, Denis O., P. M. Tulkens, and F. Van Bambeke.** 2013. Antibiotic activity against small-colony variants of *Staphylococcus aureus*: review of *in vitro*, animal and clinical data. Antimicrob. Agents Chemother. 1455-1464.
 17. **Garcia, L. G., S. Lemaire, B. C. Kahl, K. Becker, R. A. Proctor, P. M. Tulkens, and F. Van Bambeke.** 2012. Influence of the protein kinase C activator phorbol myristate acetate on the intracellular activity of antibiotics against hemin- and menadione-auxotrophic small-colony variant mutants of *Staphylococcus aureus* and their wild-type parental strain in human THP-1 cells
9. Antimicrob. Agents Chemother. **56**:6166-6174.
 18. **Garcia, L. G., S. Lemaire, B. C. Kahl, K. Becker, R. A. Proctor, P. M. Tulkens, and F. Van Bambeke.** 2012. Intracellular forms of menadione-

- dependent small-colony variants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* are hypersusceptible to beta-lactams in a THP-1 cell model due to cooperation between vacuolar acidic pH and oxidant species
8. J. Antimicrob. Chemother. **67**:2873-2881.
19. **GOUDIE, J. G. and R. B. GOUDIE.** 1955. Recurrent infections by a stable dwarf-colony variant of *Staphylococcus aureus*
1. J. Clin. Pathol. **8**:284-287.
20. **Hollis, R. J., J. L. Barr, B. N. Doebbeling, M. A. Pfaller, and R. P. Wenzel.** 1995. Familial carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and subsequent infection in a premature neonate
1. Clin. Infect. Dis. **21**:328-332.
21. **Hunfeld, K. P., T. Bittner, R. Rodel, V. Brade, and J. Cinatl.** 2004. New real-time PCR-based method for in vitro susceptibility testing of *Anaplasma phagocytophilum* against antimicrobial agents. Int. J. Antimicrob. Agents **23**:563-571.
22. **Idelevich, E. A., A. Kriegeskorte, W. Stubbings, B. C. Kahl, G. Peters, and K. Becker.** 2011. Comparative in vitro activity of finafloxacin against staphylococci displaying normal and small colony variant phenotypes
5. J. Antimicrob. Chemother. **66**:2809-2813.
23. **Jones, R. N., A. L. Barry, R. V. Gardiner, and R. R. Packer.** 1989. The prevalence of staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins. A retrospective and prospective national surveillance trial of isolates from 40 medical centers
1. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **12**:385-394.
24. **Jones, R. N., E. N. Kehrberg, M. E. Erwin, and S. C. Anderson.** 1994. Prevalence of important pathogens and antimicrobial activity of parenteral drugs at numerous medical centers in the United States, I. Study on the threat of emerging resistances: real or perceived? Fluoroquinolone Resistance Surveillance Group
2. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **19**:203-215.
25. **Jonsson, I. M., C. von Eiff, R. A. Proctor, G. Peters, C. Ryden, and A. Tarkowski.** 2003. Virulence of a *hemB* mutant displaying the phenotype of a *Staphylococcus aureus* small colony variant in a murine model of septic arthritis. Microb. Pathog. **34**:73-79.
26. **Kahl, B., M. Herrmann, A. S. Everding, H. G. Koch, K. Becker, E. Harms, R. A. Proctor, and G. Peters.** 1998. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. J. Infect. Dis. **177**:1023-1029.

27. **Kahl, B. C., G. Belling, R. Reichelt, M. Herrmann, R. A. Proctor, and G. Peters.** 2003. Thymidine-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus* exhibit gross morphological and ultrastructural changes consistent with impaired cell separation
6. J. Clin. Microbiol. **41**:410-413.
28. **Kahl, B. C., A. Duebbers, G. Lubritz, J. Haeberle, H. G. Koch, B. Ritzerfeld, M. Reilly, E. Harms, R. A. Proctor, M. Herrmann, and G. Peters.** 2003. Population dynamics of persistent *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study
5. J. Clin. Microbiol. **41**:4424-4427.
29. **King, M. D., B. J. Humphrey, Y. F. Wang, E. V. Kourbatova, S. M. Ray, and H. M. Blumberg.** 2006. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as the predominant cause of skin and soft-tissue infections
1. Ann. Intern. Med. **144**:309-317.
30. **Kipp, F., B. C. Kahl, K. Becker, E. J. Baron, R. A. Proctor, G. Peters, and C. von Eiff.** 2005. Evaluation of two chromogenic agar media for recovery and identification of *Staphylococcus aureus* small-colony variants
10. J. Clin. Microbiol. **43**:1956-1959.
31. **Kipp, F., W. Ziebuhr, K. Becker, V. Krimmer, N. Hobeta, G. Peters, and C. von Eiff.** 2003. Detection of *Staphylococcus aureus* by 16S rRNA directed in situ hybridisation in a patient with a brain abscess caused by small colony variants
1. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry **74**:1000-1002.
32. **Kloos, W. E. and T. L. Bannerman.** 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. Clin. Microbiol. Rev. **7**:117-140.
33. **Kluytmans, J. A., J. W. Mouton, E. P. Ijzerman, C. M. Vandembroucke-Grauls, A. W. Maat, J. H. Wagenvoort, and H. A. Verbrugh.** 1995. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as a major risk factor for wound infections after cardiac surgery
8. J. Infect. Dis. **171**:216-219.
34. **Kohler, C., C. von Eiff, G. Peters, R. A. Proctor, M. Hecker, and S. Engelmann.** 2003. Physiological characterization of a heme-deficient mutant of *Staphylococcus aureus* by a proteomic approach
1. J. Bacteriol. **185**:6928-6937.
35. **Koo, S. P., A. S. Bayer, H. G. Sahl, R. A. Proctor, and M. R. Yeaman.** 1996. Staphylocidal action of thrombin-induced platelet microbicidal

- protein is not solely dependent on transmembrane potential
7. *Infect. Immun.* **64**:1070-1074.
36. **Koo, S. P., M. R. Yeaman, and A. S. Bayer.** 1996. Staphylocidal action of thrombin-induced platelet microbicidal protein is influenced by microenvironment and target cell growth phase
6. *Infect. Immun.* **64**:3758-3764.
37. **Kriegeskorte, A., S. Konig, G. Sander, A. Pirkl, E. Mahabir, R. A. Proctor, C. von Eiff, G. Peters, and K. Becker.** 2011. Small colony variants of *Staphylococcus aureus* reveal distinct protein profiles
9. *Proteomics.* **11**:2476-2490.
38. **Krut, O., H. Sommer, and M. Kronke.** 2004. Antibiotic-induced persistence of cytotoxic *Staphylococcus aureus* in non-phagocytic cells
16. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**:167-173.
39. **Lannergard, J., C. von Eiff, G. Sander, T. Cordes, J. Seggewiss, G. Peters, R. A. Proctor, K. Becker, and D. Hughes.** 2008. Identification of the genetic basis for clinical menadione-auxotrophic small-colony variant isolates of *Staphylococcus aureus*
4. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:4017-4022.
40. **Lewis, L. A., K. Li, M. Bharosay, M. Cannella, V. Jorgenson, R. Thomas, D. Pena, M. Velez, B. Pereira, and A. Sassine.** 1990. Characterization of gentamicin-resistant respiratory-deficient (res-) variant strains of *Staphylococcus aureus*
2. *Microbiol. Immunol.* **34**:587-605.
41. **Lohmann, C. P., H. J. Linde, and U. Reischl.** 2000. Improved detection of microorganisms by polymerase chain reaction in delayed endophthalmitis after cataract surgery. *Ophthalmology* **107**:1047-1051.
42. **Looney, W. J.** 2000. Small-colony variants of *Staphylococcus aureus*
3. *Br. J. Biomed. Sci.* **57**:317-322.
43. **Lowy, F. D.** 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* **339**:520-532.
44. **Massey, R. C., A. Buckling, and S. J. Peacock.** 2001. Phenotypic switching of antibiotic resistance circumvents permanent costs in *Staphylococcus aureus*
8. *Curr. Biol.* **11**:1810-1814.
45. **McDevitt, D., P. Vaudaux, and T. J. Foster.** 1992. Genetic evidence that bound coagulase of *Staphylococcus aureus* is not clumping factor. *Infect. Immun.* **60**:1514-1523.
46. **McNamara, P. J., K. C. Milligan-Monroe, S. Khalili, and R. A. Proctor.** 2000. Identification, cloning, and initial characterization of rot, a locus

- encoding a regulator of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus*
1. J. Bacteriol. **182**:3197-3203.
47. **McNamara, P. J. and R. A. Proctor.** 2000. *Staphylococcus aureus* small colony variants, electron transport and persistent infections. Int. J. Antimicrob. Agents **14**:117-122.
48. **Miller, M. H., S. C. Edberg, L. J. Mandel, C. F. Behar, and N. H. Steigbigel.** 1980. Gentamicin uptake in wild-type and aminoglycoside-resistant small-colony mutants of *Staphylococcus aureus*
125. Antimicrob. Agents Chemother. **18**:722-729.
49. **Mitsuyama, J., H. Yamada, J. Maehana, Y. Fukuda, S. Kurose, S. Minami, Y. Todo, Y. Watanabe, and H. Narita.** 1997. Characteristics of quinolone-induced small colony variants in *Staphylococcus aureus*
4. J. Antimicrob. Chemother. **39**:697-705.
50. **Moreillon, P., J. M. Entenza, P. Francioli, D. McDevitt, T. J. Foster, P. Francois, and P. Vaudaux.** 1995. Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. Infect. Immun. **63**:4738-4743.
51. **Mulligan, M. E., K. A. Murray-Leisure, B. S. Ribner, H. C. Standiford, J. F. John, J. A. Korvick, C. A. Kauffman, and V. L. Yu.** 1993. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management
1. Am. J. Med. **94**:313-328.
52. **Musher, D. M., R. E. Baughn, G. B. Templeton, and J. N. Minuth.** 1977. Emergence of variant forms of *Staphylococcus aureus* after exposure to gentamicin and infectivity of the variants in experimental animals. J. Infect. Dis. **136**:360-369.
53. **Ogston, A.** 1882. Micrococcus Poisoning. J. Anat. Physiol **17**:24-58.
54. **Pelletier, L. L. Jr., M. Richardson, and M. Feist.** 1979. Virulent gentamicin-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus*
1. J. Lab Clin. Med. **94**:324-334.
55. **Proctor, R. A., J. M. Balwit, and O. Vesga.** 1994. Variant subpopulations of *Staphylococcus aureus* as cause of persistent and recurrent infections
1. Infect. Agents Dis. **3**:302-312.
56. **Proctor, R. A., B. Kahl, C. von Eiff, P. E. Vaudaux, D. P. Lew, and G. Peters.** 1998. Staphylococcal small colony variants have novel

- mechanisms for antibiotic resistance
12. Clin. Infect. Dis. **27 Suppl 1**:S68-S74.
57. **Proctor, R. A. and G. Peters.** 1998. Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implications. Clin. Infect. Dis. **27**:419-422.
58. **Proctor, R. A., P. van Langevelde, M. Kristjansson, J. N. Maslow, and R. D. Arbeit.** 1995. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*
1. Clin. Infect. Dis. **20**:95-102.
59. **Proctor, R. A., C. von Eiff, B. C. Kahl, K. Becker, P. McNamara, M. Herrmann, and G. Peters.** 2006. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. Nat. Rev. Microbiol. **4**:295-305.
60. **Quie, P. G.** 1969. Microcolonies (G-variants) of *Staphylococcus aureus*. Yale J. Biol. Med. **41**:394-403.
61. **Rolauffs, B., T. M. Bernhardt, C. von Eiff, M. L. Hart, and D. Bettin.** 2002. Osteopetrosis, femoral fracture, and chronic osteomyelitis caused by *Staphylococcus aureus* small colony variants (SCV) treated by girdlestone resection--6-year follow-up. Arch. Orthop. Trauma Surg. **122**:547-550.
62. **Schaberg, D. R., D. H. Culver, and R. P. Gaynes.** 1991. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection
1. Am. J. Med. **91**:72S-75S.
63. **Schmitz, F. J., A. C. Fluit, D. Hafner, A. Beeck, M. Perdikouli, M. Boos, S. Scheuring, J. Verhoef, K. Kohrer, and C. von Eiff.** 2000. Development of resistance to ciprofloxacin, rifampin, and mupirocin in methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* isolates
6. Antimicrob. Agents Chemother. **44**:3229-3231.
64. **Seggewiss, J., K. Becker, O. Kotte, M. Eisenacher, M. R. Yazdi, A. Fischer, P. McNamara, N. Al Laham, R. Proctor, G. Peters, M. Heinemann, and C. von Eiff.** 2006. Reporter metabolite analysis of transcriptional profiles of a *Staphylococcus aureus* strain with normal phenotype and its isogenic *hemB* mutant displaying the small-colony-variant phenotype
5. J. Bacteriol. **188**:7765-7777.
65. **Seifert, H., H. Wisplinghoff, P. Schnabel, and C. von Eiff.** 2003. Small colony variants of *Staphylococcus aureus* and pacemaker-related infection
4. Emerg. Infect. Dis. **9**:1316-1318.

66. **Tomasz, A.** 1994. Multiple-antibiotic-resistant pathogenic bacteria. A report on the Rockefeller University Workshop
8. N. Engl. J. Med. **330**:1247-1251.
67. **Tuchscher, L., E. Medina, M. Hussain, W. Volker, V. Heitmann, S. Niemann, D. Holzinger, J. Roth, R. A. Proctor, K. Becker, G. Peters, and B. Loffler.** 2011. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection
6. EMBO Mol. Med. **3**:129-141.
68. **Vaudaux, P., P. Francois, C. Bisognano, W. L. Kelley, D. P. Lew, J. Schrenzel, R. A. Proctor, P. J. McNamara, G. Peters, and C. von Eiff.** 2002. Increased expression of clumping factor and fibronectin-binding proteins by *hemB* mutants of *Staphylococcus aureus* expressing small colony variant phenotypes. Infect. Immun. **70**:5428-5437.
69. **Vesga, O., M. C. Groeschel, M. F. Otten, D. W. Brar, J. M. Vann, and R. A. Proctor.** 1996. *Staphylococcus aureus* small colony variants are induced by the endothelial cell intracellular milieu
1. J. Infect. Dis. **173**:739-742.
70. **von Eiff, C., K. Becker, K. Machka, H. Stammer, and G. Peters.** 2001. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. N. Engl. J. Med. **344**:11-16.
71. **von Eiff, C., K. Becker, D. Metze, G. Lubritz, J. Hockmann, T. Schwarz, and G. Peters.** 2001. Intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants within keratinocytes: a cause for antibiotic treatment failure in a patient with darier's disease. Clin. Infect. Dis. **32**:1643-1647.
72. **von Eiff, C., D. Bettin, R. A. Proctor, B. Rolauffs, N. Lindner, W. Winkelmann, and G. Peters.** 1997. Recovery of small colony variants of *Staphylococcus aureus* following gentamicin bead placement for osteomyelitis
3. Clin. Infect. Dis. **25**:1250-1251.
73. **von Eiff, C., A. W. Friedrich, K. Becker, and G. Peters.** 2005. Comparative in vitro activity of ceftobiprole against staphylococci displaying normal and small-colony variant phenotypes. Antimicrob. Agents Chemother. **49**:4372-4374.
74. **von Eiff, C., C. Heilmann, M. Herrmann, and G. Peters.** 1999. Basic aspects of the pathogenesis of staphylococcal polymer-associated infections
5. Infection **27 Suppl 1**:S7-10.

75. **von Eiff, C., C. Heilmann, R. A. Proctor, C. Woltz, G. Peters, and F. Gotz.** 1997. A site-directed *Staphylococcus aureus hemB* mutant is a small-colony variant which persists intracellularly. *J. Bacteriol.* **179**:4706-4712.
76. **von Eiff, C., M. Herrmann, and G. Peters.** 1995. Antimicrobial susceptibilities of *Stomatococcus mucilaginosus* and of *Micrococcus spp* 10. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:268-270.
77. **von Eiff, C., B. Jansen, W. Kohnen, and K. Becker.** 2005. Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis
2. *Drugs* **65**:179-214.
78. **von Eiff, C., N. Kuhn, M. Herrmann, S. Weber, and G. Peters.** 1996. *Micrococcus luteus* as a cause of recurrent bacteremia. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **15**:711-713.
79. **von Eiff, C., N. Lindner, R. A. Proctor, W. Winkelmann, and G. Peters.** 1998. [Development of gentamicin-resistant Small Colony Variants of *S. aureus* after implantation of gentamicin chains in osteomyelitis as a possible cause of recurrence]
1. *Z. Orthop. Ihre Grenzgeb.* **136**:268-271.
80. **von Eiff, C., G. Lubritz, C. Heese, G. Peters, and K. Becker.** 2004. Effect of trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis in AIDS patients on the formation of the small colony variant phenotype of *Staphylococcus aureus*
1. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **48**:191-194.
81. **von Eiff, C., P. McNamara, K. Becker, D. Bates, X. H. Lei, M. Ziman, B. R. Bochner, G. Peters, and R. A. Proctor.** 2006. Phenotype microarray profiling of *Staphylococcus aureus menD* and *hemB* mutants with the small-colony-variant phenotype. *J. Bacteriol.* **188**:687-693.
82. **von Eiff, C., R. A. Proctor, and G. Peters.** 2000. Small colony variants of *Staphylococci*: a link to persistent infections. *Berl Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **113**:321-325.
83. **von Eiff, C., R. A. Proctor, and G. Peters.** 2000. *Staphylococcus aureus* small colony variants: formation and clinical impact. *Int. J. Clin. Pract. Suppl* 44-49.
84. **Wertheim, H. F., D. C. Melles, M. C. Vos, W. van Leeuwen, A. van Belkum, H. A. Verbrugh, and J. L. Nouwen.** 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* **5**:751-762.

7 Danksagung

Ich danke Prof. Dr. med. Karsten Becker und Prof. Dr. med. Christof von Eiff für die Bereitstellung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung während der gesamten Zeit dieser Arbeit.

Prof. Dr. med. Peters kommt ebenfalls großer Dank zu, dafür dass er mir die Möglichkeit gab, diese Dissertation an seinem Institut anfertigen zu können.

Für die stets freundliche und geduldige Einarbeitung und praktische Anleitung danke ich allen medizinisch-technischen Assistentinnen des Institutes, insbesondere bedanke ich mich bei Daniela Kuhn, Katrin Schröder, Julia Decking und Susanne Weber, die mich in allen Situationen hilfreich unterstützten.

Ein besonderer Dank geht an Jochen Seggewiß, dessen wichtige theoretische und praktische Ratschläge mich in der Entwicklung dieser Arbeit immer wieder weiterbrachten.

Ebenso bedanke ich mich sehr herzlich bei den Mitarbeitern des ZMBE der WWU Münster, die mir freundlicherweise die Arbeit am Institutseigenen Light-Cycler-Gerät ermöglichten und die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonders zu erwähnen sind Gerhard Heusipp, Stefan Fälker sowie Christoph Zyron. Danke für die stets nette und geduldige Hilfestellung!

Für die gute emotionale Unterstützung während meines gesamten Studiums und während der Arbeit an dieser Dissertation danke ich von Herzen meinen Eltern Hartmut und Sylvi, meinen Schwestern Eva und Johanna, meinem Onkel Olaf Nordhaus, meinen Freunden Elisabeth und Christian, meinem Mann Daniel Gerdemann sowie seinen Eltern Ludger und Ida.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	einfach destilliertes Wasser
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
C	Celsius
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleotide
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
et al.	et alii (lt.)= und andere
Fa.	Firma
g	Gramm
i.v.	intravenös
kb	Kilo-Basenpaare
l	Liter
M	Molar
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MH-Agar	Müller-Hinton-Agar
MHK	minimale Hemmkonzentration
ml	Milliliter
mM	millimolar (mmol/l)
„mMHK“	„molekulare minimale Hemmkonzentration“

min	Minuten
µl	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
n	Stichprobenumfang
ng	Nanogramm
o.	oral
OD	optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMMA	Polymethylmethacrylat
rpm	rounds per minute (Geschwindigkeitsangabe bei der Zentrifuge)
RNA	Ribonukleinsäure
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCV	Small Colony Variants
SMX	Sulfamethoxazol
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Natriumacetat/EDTA
TBS	Tris-gepufferte Saline
TE	Tris/EDTA
TMP	Trimethoprim
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Bouillon
ÜNK	Übernachtkultur
z.B.	zum Beispiel

8.2 MHK-Grenzwerte

Tab. 1: MHK-Grenzwerte bei der Bouillon-Mikrodilution (nach DIN 58940-4)

Antibiotikum	Bewertungsstufe (MHK in µg/ml)		
	sensibel (s)	intermediär (i)	resistent (r)
Erythromycin o./i.v.	≤1	>1-≤4	>4
Gentamicin	≤1	>1-≤4	>4
Cefuroxim	≤4	>4-≤8	>8
Ceftobiprol	N.D.	N.D.	N.D.

Tab. 2: MHK-Grenzwerte beim E-Test

Antibiotikum	Bewertungsstufe (MHK in µg/ml)		
	sensibel (s)	intermediär (i)	resistent (r)
Erythromycin o./i.v.	≤0,5	1-4	≥8
Gentamicin	≤4	8	≥16
Cefuroxim	≤8	16	≥32
Ceftobiprol	N.D.	N.D.	N.D.

Tab. 3: Hemmhofdurchmesser (HHD) im Agardiffusionstest

Antibiotikum	Bewertungsstufe (HHD in mm)		
	sensibel (s)	intermediär (i)	resistent (r)
Erythromycin o./i.v. (15 µg)	≥21	17-21	≤16
Gentamicin (30 µg)	≥21	15-20	≤14
Cefuroxim (30 µg)	N.D.	N.D.	N.D.
Ceftobiprol (30 µg)	N.D.	N.D.	N.D.