

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

**Untersuchungen zur klinischen Relevanz von
Staphylococcus aureus Small Colony Variants
bei Patienten mit Osteomyelitis**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Mönninghoff, Christoph

aus Aschaffenburg

2006

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
WESTFÄLISCHEN WILHELMS – UNIVERSITÄT MÜNSTER

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens
1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. C. von Eiff
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. H. Karch
Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.06

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Medizinische Mikrobiologie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. G. Peters

Referent: Prof. Dr. C. von Eiff

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. H. Karch

ZUSAMMENFASSUNG

Mönninghoff, Christoph

Untersuchungen zur klinischen Relevanz von *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants bei Patienten mit Osteomyelitis

Hämin- und Menadion-auxotrophe *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs) repräsentieren eine Elektronentransport-defiziente Subpopulation von *S. aureus*, die auf festen Kulturmedien ein langsames Wachstum von nadelspitzgroßen Kolonien zeigen. Ihre Fähigkeit zur intrazellulären Persistenz und ihre verminderte Antibiotikaempfindlichkeit sind für die Assoziation der SCVs mit chronisch rezidivierenden Infektionen wie der Osteomyelitis von besonderer Bedeutung. Um den Einfluss von *S. aureus* SCVs auf den Erkrankungsverlauf bei Patienten mit Osteomyelitis zu bestimmen, wurde eine 42-monatige Fall-Kontroll-Studie durchgeführt, bei der nur Patienten mit einem *S. aureus*-Nachweis unabhängig vom Phänotyp berücksichtigt wurden. *S. aureus* SCVs wurden bei 21 von 63 Patienten mit Osteomyelitis meistens gleichzeitig mit *S. aureus*-Stämmen des normalen Phänotyps isoliert. Mit SCVs kolonisierte Patienten hatten eine 2,7-fach längere mediane Erkrankungsdauer und signifikant mehr rekurrende Infektionen ein Jahr nach Primärdiagnose und Therapie der Osteomyelitis als solche Patienten, die nur den normalen Phänotyp beherbergten. Durch die Pulsfeldgelelektrophorese wurde für die Mehrzahl der SCVs und der zeitgleich isolierten Normaltyp-Stämme die klonale Identität demonstriert. In 26 von 34 SCV/Normaltyp-Paaren zeigten *S. aureus*-Isolate des SCV-Phänotyps eine bis zu 23-fach niedrigere Gentamicin-Empfindlichkeit als *S. aureus*-Isolate des normalen Phänotyps. Bei 19 von 21 Patienten wiesen die SCV-Isolate eine verlangsamte Kohlenhydratfermentation gegenüber dem Normaltyp auf. Die Auxotrophismus-Testung ergab Hämin- und/oder Menadion-Abhängigkeiten für einen Teil der SCV-Isolate. *In vitro* können SCVs durch subinhibitorische Konzentrationen des Aminoglykosids Gentamicin induziert werden, während *in vivo* in dieser Studienpopulation, bei Patienten mit Osteomyelitis, denen Gentamicin lokal verabreicht wurde, ein Trend, jedoch nicht eine signifikante Assoziation bezüglich des Auftretens von SCVs gezeigt werden konnte. Die Ergebnisse dieser Studie weisen *S. aureus* SCVs als bedeutende und Gentamicin-resistente Erreger chronisch rekurrender Verläufe der Osteomyelitis aus, deren Identifizierung und Therapie von Laboratoriumspersonal und klinisch tätigen Ärzten besondere Beachtung geschenkt werden sollte.

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.06

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	1
1.1	Klinische Relevanz von <i>S. aureus</i>	1
1.2	Klassische Resistenzmechanismen von <i>S. aureus</i> und infektionsbiologische Besonderheiten der Small Colony Variants (SCVs).....	2
1.3	Ein historischer Rückblick	3
1.4	Charakteristika von <i>S. aureus</i> SCVs.....	3
1.5	Herstellung und Beschreibung Elektronentransport-defekter Mutanten von <i>S. aureus</i> mit SCV-Phänotyp	5
1.6	Klinische Relevanz der SCVs von <i>S. aureus</i>	7
1.7	Osteomyelitis verursacht durch <i>S. aureus</i> SCVs	9
1.8	Identifizierung von SCVs im mikrobiologischen Labor	10
1.9	Resistenztestung bei <i>S. aureus</i> -SCVs	12
2	Bearbeitete Fragestellungen	14
2.1	<i>S. aureus</i> SCVs als Ursache der chronisch rekurreierenden Osteomyelitis.....	14
2.2	Induktion bzw. Selektion von <i>S. aureus</i> SCVs <i>in vivo</i> durch lokale Gentamicin-Applikation bei Patienten mit Osteomyelitis	14
2.3	Vergleich der Gentamicin-Empfindlichkeit, der Fermentation und des Auxotrophismus klonal identischer <i>S. aureus</i> -Isolate.....	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Material.....	16
3.1.1	Bakterienstämme	16
3.1.2	Geräte.....	16
3.1.3	Sonstige Materialien.....	17
3.1.4	Reagenzien	17
3.1.5	Medien zur Anzucht von <i>S. aureus</i>	18

3.2	Methoden.....	20
3.2.1	Gewinnung der Gewebeprobe.....	20
3.2.2	Bakterienstammhaltung.....	20
3.2.3	Identifizierung der <i>S. aureus</i> -Stämme.....	20
3.2.4	Fall-Kontroll-Studie bei Patienten mit <i>S. aureus</i> -Osteomyelitis	21
3.2.4.1	Definitionen	21
3.2.4.2	Studien-Design.....	21
3.2.4.3	Einschlusskriterien	21
3.2.4.4	Ausschlusskriterien	21
3.2.5	Einteilung der Studienpopulation	22
3.2.6	Methodik der Datenerhebung.....	22
3.2.6.1	Demographische Daten.....	22
3.2.6.2	Infektionsspezifische Daten	22
3.2.6.3	Osteomyelitis-bedingte Hospitalisationsdauer	23
3.2.6.4	Laborchemische Daten	23
3.2.6.5	Operationsspezifische Daten:	24
3.2.6.6	Medikamentöse Therapie vor der mikrobiologischen Materialentnahme	24
3.2.7	Methoden zur Charakterisierung der <i>S. aureus</i> -Isolate	24
3.2.7.1	Chromosomale DNA-Analyse durch Pulsfeldgelelektrophorese.....	24
3.2.7.2	Biochemische Charakterisierung der <i>S. aureus</i> -Stämme	28
3.2.7.3	Auxotrophismus-Testung	29
3.2.7.4	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration	30
3.2.8	Statistik und Auswertungsmodalitäten	31
4	Ergebnisse	32
4.1	Studienpopulation.....	32
4.1.1	Stichprobenumfang und Prävalenz von <i>S. aureus</i>	32
4.1.2	Patienten und Herkunft der <i>S. aureus</i> -Isolate	33
4.1.3	Ausgeschlossene Patienten	35
4.1.4	Demographische Daten.....	35
4.1.5	Infektionsspezifische Daten.....	37
4.1.5.1	Ossäre Lokalisation der Osteomyelitis.....	37
4.1.5.2	Ätiologie der Osteomyelitis.....	39
4.1.5.3	Prädispositionen für eine Infektion durch <i>S. aureus</i>	40
4.1.5.4	Bestätigung der Osteomyelitis durch Pathologiebefunde	41
4.1.5.5	Radiologischer Nachweis der Osteomyelitis	41
4.1.5.6	Lokalzeichen der Osteomyelitis	42
4.1.5.7	Laborchemische Daten am Tag der mikrobiologischen Materialentnahme.....	42
4.1.5.8	Dauer der Osteomyelitis.....	43
4.1.5.9	Exazerbationen der Osteomyelitis ein Jahr nach Primärdiagnose	46
4.1.6	Operationsspezifische Daten:	47
4.1.6.1	Anzahl der Osteomyelitis-bedingten Operationen	47
4.1.6.2	Arthrodesen und Amputationen von Gliedmaßen.....	48
4.1.6.3	Osteomyelitis-bedingte Hospitalisationsdauer	48

4.1.7	Assoziation von <i>S. aureus</i> SCVs und lokaler Gentamicin-Therapie	49
4.1.7.1	Eingesetzte Gentamicin-Präparate	50
4.1.7.2	Kumulative Gesamtdosis der lokalen Gentamicin-Gaben	53
4.2	Mikrobiologische Diagnostik.....	54
4.2.1	Genotypische Analyse der klinischen <i>S. aureus</i> -Stämme	54
4.2.2	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK).....	56
4.2.3	Vergleichende Biotypisierung der klonalen <i>S. aureus</i> -Stämme.....	58
4.2.4	Nachweis des Auxotrophismus der klinischen <i>S. aureus</i> SCV-Isolate	61
5	Diskussion	62
6	Zusammenfassung.....	70
7	Literatur	72
8	Anhang	I
8.1	Abkürzungen	I
8.2	Tabellen mit Ausgangsdaten.....	II
8.3	Danksagung	VII
8.4	Lebenslauf.....	VIII
8.5	Firmenverzeichnis	IX

1 Einleitung

1.1 Klinische Relevanz von *S. aureus*

S. aureus ist ein humanpathogenes Bakterium aus der Familie der *Staphylococcaceae*, der kugelförmige, gram- und katalasepositive sowie überwiegend fakultativ anaerobe Bakterien angehören, wobei im Bezug auf die Humanpathogenität und die klinische Relevanz die Gattung *Staphylococcus* dominiert (79, 113, 117).

Die koagulasepositive Spezies *S. aureus* ist als Bestandteil der Haut- und Schleimhautflora sowie als Erreger diverser Infektionen und Toxin-vermittelter Syndrome umfangreich erforscht und gehört zu den am häufigsten isolierten, pathogenen Erregern in der mikrobiologischen Routinediagnostik (6, 34, 39, 53, 55, 90, 103, 119, 125). Durch *S. aureus* verursachte Erkrankungen lassen sich in zwei Hauptgruppen unterteilen: der ersten werden invasive, pyogene Infektionen zugeordnet, der zweiten Hauptgruppe gehören die Toxin-vermittelten *S. aureus*-Erkrankungen an. Pyogene Infektionen bedingen eine lokal-oberflächliche Gewebsdestruktion oder eine tiefe invasive Entzündungsreaktion in Form von Furunkeln, Karbunkeln, Pyodermien, abszedierenden Weichteilprozessen, Gelenkempyemen und Organprozesse wie Osteomyelitis, Parotitis, Mastitis, Pneumonie, Endokarditis und Sepsis. Auf dem gemeinsamen pathogenetischen Prinzip einer systemischen Toxineinwirkung basieren das Staphylococcal Scaled Skin Syndrome und das Toxic Shock Syndrome. Diese Syndrome sind mit einer signifikanten Morbidität und zum Teil erheblichen Mortalität assoziiert. Der Verlauf akuter *S. aureus*-Infektionen wird jeweils durch die spezies- und stammtypische Ausstattung mit Virulenzfaktoren, aber auch durch die Prädisposition des Wirtes bestimmt (84, 124).

1.2 Klassische Resistenzmechanismen von *S. aureus* und infektionsbiologische Besonderheiten der Small Colony Variants (SCVs)

S. aureus ist in der Literatur primär als ein extrazellulär proliferierender Erreger mit hohem pathogenem Potential bekannt. Die klassischen Resistenzmechanismen, insbesondere die grundlegenden Prinzipien der Antibiotika-Resistenz von Staphylokokken, sind in der Vergangenheit im Rahmen einer Vielzahl von Publikationen erforscht und aufgeklärt worden (10, 21, 40, 48).

Die Resistenz von *S. aureus* basiert auf Resistenzmechanismen wie verminderter Permeabilität, reduzierter Ribosomenbindung, verändertem Penicillin-Bindungsprotein, β -Lactamasebildung (Resistenz gegenüber β -Lactam-Antibiotika), inaktivierenden Enzyme (Resistenz gegenüber Aminoglykosiden und Makroliden) oder DNA-Gyrase-Resistenz und aktivem Efflux (Resistenz gegenüber Gyrase-Hemmern) (22, 26, 72, 106, 118, 124).

Unabhängig von diesen bekannten, klassischen Resistenzmechanismen sind Staphylokokken offenbar durch zusätzliche Mechanismen in der Lage, das Versagen einer Antibiotikatherapie zu verursachen. Infektionen mit *S. aureus* können auch chronisch-persistierend und rezidivierend mit begrenzter Aggression und entsprechend eingeschränkter inflammatorischer Wirtsreaktion verlaufen, obwohl der betreffende *S. aureus*-Stamm alle Virulenzfaktoren für akut-aggressive Verläufe besitzt. Die Erkenntnis, dass bestimmte chronisch-persistierende *S. aureus*-Infektionen mit der Isolierung phänotypischer *S. aureus*-Varianten assoziiert sind, die die besondere Fähigkeit zur intrazellulären Persistenz besitzen und die aufgrund ihres winzigen Koloniewachstums auf soliden Nährmedien als „Small Colony Variants“ (SCVs) bezeichnet werden, erweiterte grundlegend das Verständnis dieser chronischen Erkrankungsverläufe.

1.3 Ein historischer Rückblick

Die frühesten Beschreibungen über das Auftreten von sog. „Zwergkolonien“ bei Staphylokokken, „...welche auch nach mehrtägigem Wachstum ganz geringe Dimensionen aufweisen...“, stammen aus einem Lehrbuch für Studierende, Ärzte und Medizinalbeamte aus dem Jahr 1906 (57).

Der erste Fallbericht über die Isolierung und Anzucht von Staphylokokken-SCVs in Reinkultur wurde im Jahr 1951 von Hale publiziert, welcher die SCVs aus einem Abszess und von der Nasenhöhle eines Patienten gewinnen konnte (31).

Die Morphologie und die biochemischen Eigenschaften dieser Mikrokolonien, die historisch auch als sog. „dissociants“, „dwarf“-, oder „gonidial (G)“-Varianten bezeichnet wurden (14, 30, 85, 94, 97, 100, 135, 136), konnte seit den 30- und 40-er Jahren des letzten Jahrhunderts auf ihre allgemein reduzierte Stoffwechselaktivität zurückgeführt werden (32). Proctor *et al.* stellten 1995 erstmals ein umfassendes Modell vor, welches die multiplen phänotypischen Veränderungen der *S. aureus* SCVs und ihre Assoziation mit persistierenden und rekurrierenden Infektionen auf Alterationen im Elektronentransport zurückführte (62, 70, 80, 81, 82).

Experimentelle Belege für Elektronentransportkettendefekte als Ursache für die veränderte Kolonimorphologie, die verminderte Antibiotikaempfindlichkeit und die intrazelluläre Persistenz der *S. aureus* SCVs konnten schließlich durch die Konstruktion Elektronentransport-defizienter, stabiler Mutanten von *S. aureus* gefunden werden, die nach artifizieller Unterbrechung der Elektronentransportkette die bekannten Charakteristika der klinischen SCVs zeigten (4, 56, 116).

1.4 Charakteristika von *S. aureus* SCVs

S. aureus SCVs stellen eine Subpopulation von *S. aureus* dar, die sich auf festen Kulturmedien durch ein langsames Wachstum von nadelspitzgroßen, nicht oder nur im Zentrum pigmentierten, meist nicht hämolysierenden Kolonien auszeichnen (3). Im Vergleich zu *S. aureus*-Stämmen des normalen Phänotyps ist ihre Generationszeit 6 bis 9-fach verlängert, so dass sie erst nach 48- bis 72-

stündiger Inkubation als 10-fach kleinere Kolonien auf Agarplatten sichtbar werden (54, 80, 83, 121). Weitere Charakteristika der SCVs sind eine reduzierte α -Hämolyse, eine verringerte Koagulaseaktivität sowie eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika (insbesondere gegenüber Aminoglykosiden und Trimethoprim/Sulfamethoxazol, TMP/SMX) (93). Diese Eigenschaft ermöglicht ihnen eine mehr als 100-fach höhere intrazelluläre Persistenz in Säugertierzellen im Vergleich zum normalen Phänotyp, der die Wirtszellen relativ schnell lysiert (4, 80, 110, 112, 116). Im intrazellulären Milieu von Epi- und Endothelzellen entziehen sich die SCVs der Wirkung von Antibiotika und körpereigenen Abwehrmechanismen des Wirtes (3, 116). Aus klinischen Untersuchungsmaterialien isolierte kleine Kolonievarianten von *S. aureus* weisen hohe Reversionsraten zur normal wachsenden Kolonieform auf. Insbesondere, wenn das Substrat mit Thymidin, Menadion und/oder Hämin supplementiert wird, wachsen die SCVs ähnlich wie ihre Elternstämme (80, 82, 83). Die Mehrzahl der klinischen Isolate zeigt für mindestens eine dieser Substanzen einen Auxotrophismus (3, 43, 61, 80, 83).

Menadion und Hämin sind essentielle Vorläufer in der Biosynthese der Elektronentransportkettenkomponenten Menaquinon und Cytochrom (70, 121). Menadion wird isoprenyliert, um Menaquinon zu generieren, das den Elektronenakzeptor von NADH/FADH in der Elektronentransportkette repräsentiert. Hämin wiederum ist für die Cytochrombiosynthese notwendig, welches die Elektronen von Menaquinon übernimmt und die Elektronentransportkette komplettiert (70, 81). Thiamin-auxotrophe Stämme sind immer auch Menadion-auxotroph, da Thiamin für die Menadionbiosynthese unabdingbar ist (9). Thymidin wird für die DNA-Replikation benötigt, weshalb Thymidin-auxotrophe SCVs bei reduzierter Verfügbarkeit von Thymidin nur kleine Kolonien ausbilden (43, 46). Thymidin-auxotrophe SCVs sind durch eine sehr hohe Heterogenität im Grampräparat charakterisiert. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass einzelne Zellen der makroskopisch durch winzige Kolonien charakterisierten SCVs eine bis zu neunfache Größe im Vergleich zu normalen Staphylokokken-Zellen aufweisen (44, 98).

Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen weisen in diesen vergrößerten Zellen mehrfach oder inkomplett angelegte Teilungsebenen als Zeichen einer irregulären Zellteilung nach. Die Fähigkeit Elektronentransport-defiziente Subpopulationen auszubilden, liefert *S. aureus* Überlebensvorteile, die weit über eine verminderte Antibiotikaempfindlichkeit hinausgehen. Folgende Charakteristika der SCVs sind ebenfalls auf Alterationen des Elektronentransports zurückzuführen: Reduzierte Adenosintriphosphat-(ATP)-Spiegel limitieren die Wachstumsrate der SCVs, da die Zellwandbiosynthese große Mengen ATP erfordert (94). Die erhöhte minimale Hemmkonzentration (MHK) gegenüber zellwandspezifischen Antibiotika ist an eine intakte Elektronentransportkette gebunden, denn nur ein hohes Membranpotential ermöglicht die Bindung positiv geladener antimikrobieller Substanzen (Aminoglykoside, kationische Peptide) an die Zellmembran. Eine negativ geladene Zellmembran des Bakteriums ist Voraussetzung für die Aufnahme dieser positiv geladenen Komponenten (24, 26, 28, 61, 69). Die Pigmentierung der bakteriellen Kolonien ist ebenfalls von einer intakten Elektronentransportkette abhängig, denn das katalysierende P_{450} -System bezieht von dieser die zur Karotinoidbiosynthese notwendigen Elektronen (70). Die Produktion der meisten (unter 1.2 genannten) Virulenzfaktoren von *S. aureus* ist energieabhängig, so dass sich die phänotypischen und infektionsbiologischen Unterschiede beider Erscheinungsformen dieses Bakteriums durch Abweichungen im Zellstoffwechsel erklären lassen.

1.5 Herstellung und Beschreibung Elektronentransport-defekter Mutanten von *S. aureus* mit SCV-Phänotyp

Um einen Zusammenhang der phänotypischen und biochemischen Charakteristika sowie der erhöhten intrazellulären Persistenz von klinischen *S. aureus*-SCVs mit Defekten im Elektronentransport zu beweisen, wurden durch Blockierung biosynthetischer Gene für die Hämin- und Menadionbiosynthese (*hemB*, *menD*) genetisch definierte Elektronentransport-Mutanten konstruiert (4, 56, 109, 112). Erwartungsgemäß zeigten die hergestellten Mutanten die phänotypischen Eigenschaften der aus klinischem Untersuchungs-

material isolierten *S. aureus* SCVs. Untersuchungen mit einer *hemB*-Mutante zeigten, dass nach 24 oder 48 h im Vergleich zum Elternstamm oder der komplementierten Mutante über 200-fach mehr Zellen der *hemB*-Mutante intrazellulär persistierten. Ferner ließ sich für diese Mutante in Western-Blots eine reduzierte bis fehlende α -Toxin-Produktion nachweisen und in Northern-Blots ein fehlendes Transkript von *hla*. Nach Phagozytose der *hemB*-Mutante durch Endothelzellen *in vitro*, ließ sich ihre erhöhte intrazelluläre Persistenz bei ausbleibender Lyse der Wirtszellen auf die mangelnde Produktion von α -Toxin zurückführen (112). Ferner zeigte sich auch die *hemB*-Mutante im Vergleich zum Elternstamm gegenüber Aminoglykosiden wie Gentamicin oder Kanamicin deutlich resistenter. Im Rahmen von Untersuchungen zur Aminoglykosid-Resistenz wurde für verschiedene klinische SCVs und Mutanten mit SCV-Phänotyp das Membranpotential bestimmt (5). Im Gegensatz zu den Stämmen mit normalem Phänotyp fiel das Membranpotential bei den SCV-Isolaten auf Werte unter -100 mV, wenn Glukose im Substrat verbraucht und andere Stoffe wie Acetat und Laktat kein weiteres Wachstum ermöglichten. Dementsprechend ließ sich auch eine um den Faktor 10 bis 30 verminderte Empfindlichkeit der SCVs gegenüber Aminoglykosiden nachweisen, deren Aufnahme in die Bakterienzelle aktiv und in Abhängigkeit von einem hohen elektrochemischen Membrangradienten erfolgt. In Studien zu Adhäsinen konnte für *hemB*-Mutanten mit unterschiedlichem genetischem Background im Vergleich zum isogenen Elternstamm mit normalem Phänotyp eine signifikant erhöhte Adhäsion zu Fibrinogen- und Fibronectin-beladenen „Coverslips“ nachgewiesen und durch die erhöhte Oberflächenpräsenz von Fibrinogen-/ Fibronectin-bindenden Molekülen begründet werden (109). Die Annahme von SCVs als Elektronentransport-defiziente Phänotypen von *S. aureus* konnte durch Charakterisierung der *hemB*-Mutante auf Transkriptions- und Proteomebene weiter gestützt werden. Da sich bei der Mutante eine erhöhte Expression von Enzymen der Fermentation, der Glykolyse und verwandter Stoffwechselwege zeigte, folgerte man, dass die *hemB*-Mutante ATP aus Glukose bzw. Fructose nur durch Substratphosphorylierung gewinnen konnte (56). Ein möglicher weiterer Weg der ATP-Gewinnung der SCVs scheint im Arginin-Desaminase-Stoffwechsel-

weg zu liegen, dessen Enzymkonzentration ebenfalls erhöht war. Im Mausmodell einer septischen Arthritis zeigten mit *hemB*-infizierte Mäuse gegenüber Mäusen, die mit dem normalen Phänotyp infiziert worden waren, eine höhere Frequenz und signifikant verstärkte Ausprägung der Arthritis (41). Die erhöhte Virulenz der SCVs wurde der verstärkten Produktion destruktiver Proteasen zugeschrieben. Im Rahmen eines zweiten Tiermodells (Kaninchen-Endokarditis-Modell) wurde die *hemB*-Mutante mit ihrem Elternstamm und mit der entsprechenden *menD*-Mutante verglichen (4). Die Infektiosität beider Mutanten war mit der des Elternstammes (8325-4) vergleichbar und die *hemB*-Mutante wurde wie der Elternstamm durch eine Oxacillin-Therapie bezüglich der Keimzahl in verschiedenen Geweben signifikant vermindert. Im Gegensatz zur *menD*-Mutante wurden jedoch keine persistierenden Bakterien in der Niere nachgewiesen, was durch den hohen Hämingehalt aufgrund embolischer Infarkte während der experimentellen Endokarditis und der damit konsekutiven physiologischen Supplementierung der *hemB*-Mutante durch Hämin begründet wurde. Somit erweist sich die erzeugte *menD*-Mutante auch *in vivo* als antibiotikaprotektiv.

1.6 Klinische Relevanz der SCVs von *S. aureus*

SCVs von *Staphylococcus aureus* sind seit über 90 Jahren bekannt (30, 31, 85, 135, 136). Doch erst in der letzten Dekade hat das Interesse an diesen sog. „Zwergkolonien“ von *S. aureus* deutlich zugenommen, seitdem ihre Rolle als Auslöser persistierender und rekurrierender Infektionen erkannt worden ist (80, 81, 82, 83, 86, 96, 101, 110, 120, 121). Bisher ließen sich diese kleinen Kolonievarianten in Reinkultur, zusammen mit dem *S. aureus*-Wildtyp oder in Mischkulturen mit anderen Spezies bei Patienten mit Haut- und Weichteilinfektionen, Osteomyelitis, Sepsis, Endokarditis und pulmonalen Infektionen isolieren (43, 49, 80, 96, 116, 120). Häufig waren die betroffenen Patienten vor der Isolation der SCVs einer prolongierten Antibiotikatherapie ausgesetzt. SCVs konnten aber auch ohne vorherige antimikrobielle Therapie isoliert werden (49, 80, 96, 115, 116, 120). In einer umfassenden Retrospektive der Literatur der vergan-

genen 60 Jahre finden sich 25 Arbeiten, die sich mit Infektionen durch *S. aureus* SCVs bei 103 verschiedenen Patienten befassen (s. Tabelle 1, Anhang).

In einer Studie, die erstmals die Prävalenz von *S. aureus* SCVs bei Mukoviszidose-Patienten (n = 78) prospektiv untersuchte, konnten über einen Zeitraum von 34 Monaten bei ca. 33 % der Patienten (insbesondere Thymidin-auxotrophe) *S. aureus* SCVs aus Atemwegsmaterialien isoliert werden (43). Das Auftreten von Thymidin-auxotrophen SCVs war mit einer Langzeittherapie der *S. aureus*-Infektion mit TMP/SMX für mindestens 18 Monate assoziiert. Möglicherweise liegt in extern verfügbarem Thymidin, welches reichlich in den Bronchialsekreten von Mukoviszidose-Patienten durch Zellerfall und freigesetzte DNA vorhanden ist, die Grundlage für das Überleben der Thymidin-auxotrophen SCVs. Auf diese Weise bedingt der Thymidin-Auxotrophismus der SCVs ihre TMP/SMX-Resistenz und bietet ihnen gegenüber dem normalen Phänotyp einen Überlebensvorteil unter der Antibiotika-Dauertherapie. Durch Anwendung der Pulsfeldgelelektrophorese konnte sowohl die klonale Identität der SCVs und der parallel von denselben Patienten isolierten, normalen *S. aureus*-Isolate wie auch die Stabilität der gleichen Klone über Monate und Jahre nachgewiesen werden. Über einen Zeitraum von über sechs Jahren konnte so eine große Anzahl von *S. aureus* SCVs untersucht werden (n = 212) (45). Thymidin-auxotrophe SCVs konnten bei einigen Patienten auch noch Jahre nach Absetzen der Dauertherapie mit TMP/SMX (> 4 Jahre) und Therapie mit anderen Antibiotika isoliert werden. Die mediane Persistenz der SCVs lag mit 49,5 Monaten fast doppelt so hoch wie für den normalen *S. aureus* mit 25 Monaten und deutet somit einen Überlebensvorteil der SCVs gegenüber dem normalen Phänotyp im Bronchialsystem der Mukoviszidose-Patienten an. *In vitro*-Experimente mit aus klinischen Untersuchungsmaterialien gewonnenen SCVs konnten eine verlängerte intrazelluläre Persistenz dieser Varianten in kultivierten Endothel- und Epithelzellen gegenüber den *S. aureus*-Isolaten vom normalen Phänotyp belegen (3, 43). Versuche mit Keratinozyten zeigten, dass SCVs nach Infektion vitaler HaCaT-Wirtszellen im Vergleich zu klonal identischen Isolaten mit normalem Phänotyp keine schwere lytische

Degeneration der HaCaT-Wirtszellen auslösten (116). Abgeschirmt von der Immunantwort des Wirtes und dem Einfluss der Antibiotika könnte die intrazelluläre Lage der SCVs eine Erklärung für ihre Assoziation mit chronischen, Antibiotika-refraktären Infektionen und für ihre monate- bis jahrelange Persistenz sein.

1.7 Osteomyelitis verursacht durch *S. aureus* SCVs

Bei der Osteomyelitis handelt es sich um eine primär-hämatogene, seltener lymphogene oder durch direkte Keimeinschleppung entstandene, akute oder chronische, abszedierende bis phlegmonöse Entzündung des Knochenmarks einschließlich des Knochengewebes und des Periostes (13). Die geläufigen Klassifikationssysteme der Osteomyelitis (20, 21, 59, 63, 127) unterscheiden im Wesentlichen drei Kategorien:

- die primär hämatogene Osteomyelitis
- die sekundär von einem Infektionsherd fortgeleitete Osteomyelitis und
- die mit vaskulärer Insuffizienz assoziierte Osteomyelitis.

Patienten mit Osteomyelitis, bei denen *S. aureus* als ursächliches Pathogen nachgewiesen wird, werden häufig neben einer systemischen Antibiotikatherapie lokal mit implantierten oder resorbierbaren Gentamicin-Trägern behandelt (25, 64, 65, 130, 131, 132, 133). Das Aminoglykosid-Antibiotikum Gentamicin wird aus dem jeweiligen Trägermaterial wie Polymethylmethacrylat-(PMMA)-Ketten, Kollagenschwämmen oder Knochenzement durch Diffusion in Abhängigkeit von einem Konzentrationsgradienten in den infizierten Knochen freigesetzt. Über einen Zeitraum von Wochen bis Monaten kann so ein lokaler Spiegel von Gentamicin messbar sein (25, 132, 134). Aufgrund seiner hohen Aktivität gegenüber den meisten nicht Methicillin-resistenten *S. aureus*-Stämmen findet Gentamicin in der Therapie der *S. aureus*-Osteomyelitis und in der Endoprothetik z. B. als Zusatz im PMMA-Knochenzement breiten Einsatz (39, 103).

In früheren *in vitro*-Experimenten konnte die Selektion der Elektronentransportdefizienten Varianten von *S. aureus* durch eine permanente Exposition normal großer *S. aureus*-Stämme gegenüber Gentamicin nachgewiesen werden (3, 73, 78, 111). Werden klinische *S. aureus*-Isolate des normalen Phänotyps auf Müller-Hinton-Agar mit einem Zusatz von 1 µg/ml Gentamicin kultiviert, können innerhalb von 72 Stunden regelmäßig SCVs isoliert werden (3, 61, 73). Um zu überprüfen, ob auch *in vivo* eine Selektion bzw. Induktion von SCVs durch eingelegte Gentamicin-Ketten möglich ist, wurde eine prospektive Fall-Kontroll-Studie durchgeführt, bei der die Prävalenz von *S. aureus* SCVs bei 14 Osteomyelitis-Patienten (mit und ohne vorausgegangener, lokaler Implantation von Gentamicin-Ketten) untersucht wurde (121). Bei vier Patienten mit chronisch-rezidivierender Osteomyelitis, die zuvor neben einer systemischen Antibiose mit implantierten Gentamicin-Ketten behandelt worden sind, konnten *S. aureus* SCVs isoliert werden. Diese vier Patienten wiesen rekurrende Infektionen auf, obwohl sie nach *in vitro*-Kriterien eine wirksame systemische Antibiose erhalten hatten. Demgegenüber konnten bei zehn anderen Patienten, die zuvor nicht mit Gentamicin-Ketten behandelt wurden, nur *S. aureus*-Stämme mit normalem Phänotyp isoliert werden. Diese Studie legt einen Zusammenhang des Therapieversagens mit der Anwesenheit von SCVs sowie deren Selektion bzw. Induktion durch eine lokale Gentamicin-Applikation nahe, ist jedoch aufgrund der kleinen Patientenzahl als Pilotstudie zu werten, der zur eindeutigen Klärung eines Zusammenhangs umfangreichere Studien folgen müssen.

1.8 Identifizierung von SCVs im mikrobiologischen Labor

Die sichere Erkennung von SCVs im mikrobiologischen Labor gestaltet sich aufgrund ihres verzögerten Wachstums und der reduzierten biochemischen Reaktionen schwierig. Wegen ihres abweichenden Phänotyps werden sie oft nicht als *S. aureus* erkannt bzw. nicht korrekt identifiziert (1). In der Sensibilitätstestung gegenüber Antibiotika erfordert ihr protrahiertes Wachstum eine Verlängerung der Inkubationszeiten auf 48 bis 72 Stunden. In Mischkulturen der normalen Haut- und Schleimhautflora werden SCVs schnell überwachsen und

nur in Anwesenheit des neunmal schneller wachsenden normalen Phänotyps von *S. aureus* können sie leicht übersehen werden. Da beide Phänotypen keine Unterschiede in der Gramfärbung zeigen, wird selten das gleichzeitige Vorliegen beider Formen in einer Mischkultur vermutet (81, 82). Nach 24- bis 72-stündiger Inkubation auf festen Nährmedien lassen sich SCVs meistens als nicht pigmentierte, nicht hämolysierende, nadelspitzgroße und langsam wachsende Kolonien identifizieren. Neben ihrer atypischen Koloniemorphologie, ihren ungewöhnlichen biochemischen Reaktionen und ihrer reduzierten Koagulaseaktivität sind in Tabelle 2 weitere typische Eigenschaften der SCVs denen des normalen Phänotyps gegenübergestellt. Auf Hämin-reichen Nährböden wie Schaedler's Agar erschwert die Reversion zum normalen Phänotyp die Identifizierung der SCVs und unter anaeroben Bedingungen kann ihr Wachstum auf Schaedler's Agar zu Verwechslungen mit Anaerobiern führen (43). Auch chromogene Agarnährböden zur Identifikation von *S. aureus* bzw. MRSA liefern aufgrund untypischer oder fehlender Farbreaktionen keine verlässlichen Ergebnisse (51).

S. aureus SCVs werden in den kommerziellen Identifizierungssystemen (z.B. ID 32 Staph) häufig als koagulasenegative Staphylokokken fehlidentifiziert oder als nicht identifizierbar klassifiziert (7). Der Bestimmung des SCV-Phänotyps dient ferner der Nachweis des Auxotrophismus gegenüber Hämin, Menadion bzw. Thymidin auf speziellen Nährböden (CDM, chemically defined medium) (108). Eine sichere Bestimmung der Artzugehörigkeit von vermuteten *S. aureus* SCVs gelingt durch die molekulare Testung auf das artspezifische Koagulase-Gen (*coa*) bzw. auf das für *S. aureus* und *S. intermedius* spezifische Thermo-nuclease-Gen (*nuc*) (8, 15, 91, 92). Nach Amplifikation mit sog. broad-range-Primern sind auch Techniken zur Sequenzierung taxonomisch verwertbarer Sequenzen z.B. ribosomaler Gene (insb. das 16S rDNA-Gen) (7, 88) oder die Beta-Untereinheit der RNA-Polymerase (*rpoB*) (23) zur eindeutigen Identifikation von *S. aureus* und zur Spezieszuordnung der SCVs einsetzbar.

1.9 Resistenztestung bei *S. aureus*-SCVs

Die verminderte Antibiotikaempfindlichkeit der SCVs (insbesondere gegenüber Aminoglykosiden und Trimethoprim/Sulfamethoxazol) kann zu Fehlidentifizierungen und zu einem möglichen Therapieversagen bei ungeeigneten Bedingungen in Resistenztestungen führen. Die langsame Proliferation der SCVs macht daher auch in der Sensibilitätstestung gegenüber Antibiotika eine Verlängerung der Inkubationszeiten auf 48-72 Stunden erforderlich.

Die Suszeptibilitätstestung der SCVs lässt sich anhand etablierter Methoden z.B. Agardiffusionstests wie dem Etest[®] (AB Biodisk, Solna, Schweden) für verschiedene Antibiotika durchführen (19, 43). Diese Testungen werden jedoch in Mischkulturen beider Phänotypen oft erschwert, da die SCVs mit einer Verdopplungszeit von 180 Minuten von normal wachsenden *S. aureus*-Kolonien mit einer Verdopplungszeit von 20 Minuten schnell überwuchert werden. Diagnostisch bedeutsam ist auch die mögliche Induktion oder Selektion von SCVs durch Antibiotika *in vitro*. So konnten *S. aureus* SCVs aus Flüssigkulturen isoliert werden, denen Aminoglykoside oder TMP/SMX hinzugefügt wurden (3, 44). Für eine zuverlässige und schnelle Identifizierung von Methicillin-resistenten SCVs haben sich in vergleichenden Studien nur der *mecA*-Gen-Nachweis mittels PCR sowie ein anti-PBP2a-Latex-Agglutinationstest (nur unter Einsatz eines erhöhten Inokulums) als geeignet herausgestellt (50).

Tabelle 2: Vergleich der typischen Eigenschaften des normalen Phänotyps und des SCV-Phänotyps von *S. aureus*

<u>Charakteristika:</u>	<u>Typische Eigenschaften:</u>	
	<u>Normaler Phänotyp</u>	<u>SCV-Phänotyp</u>
Koloniemorphologie		
- Größe	mittelgroß	winzig
- Pigmentierung	goldgelb	reduziert bis fehlend
- Hämolyse	β-Hämolyse	reduziert bis fehlend
Wachstumsgeschwindigkeit auf festen Substraten	normal (12-24 h)	verlangsamt (48-72 h)
Auxotrophismus	fehlend	Hämin, Menadion, Thymidin
Koagulase-, Katalase- Aktivität	normal	verzögert (> 18 h) bis fehlend
Fermentationsreaktionen	normal	verzögert bis fehlend
Antibiotika-Resistenz	isolatabhängig	erhöhte Resistenz gegenüber Aminogly- kosiden und TMP/SMX
Klinische Assoziation	akute Infektion	chronisch-persistierende, rekurrierende Infektionen

2 Bearbeitete Fragestellungen

2.1 *S. aureus* SCVs als Ursache der chronisch rekurrenden Osteomyelitis

Die vorliegende Studie soll erstmals anhand eines größeren Patientenkollektivs charakteristische Unterschiede des klinischen Verlaufs der Osteomyelitis, verursacht durch SCVs bzw. durch den normalen Phänotyp von *S. aureus*, aufzeigen. Um die klinische Relevanz von *S. aureus* SCVs bei Patienten mit Osteomyelitis zu beurteilen, sollen die Krankheitsverläufe in Abhängigkeit vom *S. aureus*-Phänotyp, insbesondere prädisponierende Faktoren, klinische, laborchemische, radiologische und histologische Befunde sowie die Anzahl rekurrender Infektionen, die Dauer der Hospitalisation und die Anzahl der Operationen verglichen werden.

2.2 Induktion bzw. Selektion von *S. aureus* SCVs *in vivo* durch lokale Gentamicin-Applikation bei Patienten mit Osteomyelitis

Da Gentamicin *in vitro* reproduzierbar Elektronentransport-defiziente SCVs von *S. aureus* selektionieren kann, erscheint auch *in vivo* eine Selektion von SCVs durch implantierte Gentamicin-Träger (PMMA-Ketten, Kollagenschwämme, Knochenzement) möglich. Um diese Fragestellung zu überprüfen, wurde bereits eine prospektive Fall-Kontroll-Studie mit 14 Osteomyelitis-Patienten durchgeführt, wobei bei vier Patienten mit vorausgegangener lokaler Gentamicin-Ketteneinlage SCVs nachgewiesen wurden. Diese umfangreichere Fall-Kontroll-Studie soll die Assoziation des Auftretens von *S. aureus* SCVs nach lokaler Gentamicin-Applikation analysieren.

2.3 Vergleich der Gentamicin-Empfindlichkeit, der Fermentation und des Auxotrophismus klonal identischer *S. aureus*-Isolate

Frühere Studien haben die reduzierte Stoffwechselaktivität und verminderte Antibiotikaempfindlichkeit der SCVs von *S. aureus* gegenüber dem normalen Phänotyp auf Defekte in der Elektronentransportkette zurückgeführt. Die vorliegende Arbeit soll charakteristische Unterschiede beider Phänotypen im Bezug auf die Gentamicin-Empfindlichkeit, die Fermentation und den Auxotrophismus anhand klonal identischer *S. aureus*-Isolate von 21 Patienten mit Osteomyelitis herausstellen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

In einem Zeitraum von 42 Monaten wurden bei insgesamt 211 Patienten, die unter dem Verdacht einer Osteomyelitis, einer Weichteilinfektion oder einer Fremdkörper-assoziierten Infektion in der Klinik und Poliklinik für Allgemeine Orthopädie (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Winkelmann) oder in der Klinik und Poliklinik für Technische Orthopädie und Rehabilitation (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Wetz) der Universität Münster behandelt wurden, intraoperativ insgesamt 636 Knochenproben, tiefe Wundabstriche oder Gewebsaspirate entnommen. Diese wurden zur mikrobiologischen Untersuchung in das Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Münster (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Peters) gesandt.

In dieser Studie wurden von 63 Patienten mit klinisch bestätigter Osteomyelitis insgesamt 297 *S. aureus*-Isolate, davon 45 *S. aureus*-SCVs und 252 *S. aureus* vom normalen Phänotyp, untersucht.

Da die durchgeführten Untersuchungen eine Erweiterung der routinemäßigen mikrobiologischen Diagnostik darstellten, war die Studie nicht genehmigungspflichtig durch die Ethikkommission und keine separate Patientenaufklärung außerhalb der Aufklärung für die orthopädische Operation notwendig.

3.1.2 Geräte

Brutschrank:	Heraeus, Hanau
Zentrifuge:	Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg
Thermocycler:	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg
Vortexer:	MS1 Minishaker, IKA, Staufen
Kolbenhubpipette:	Eppendorf Reference, Hamburg

Magnetrührer:	Heidolph MR3001, John Morris Scientific, Australien
Waage:	MC1 Laboratory LC 420, Satorius AG, Göttingen
Pulsfeldgelelektro- phoresesystem:	CHEF-DR [®] II BioRad, Richmond, Kalifornien, USA
Foto-Dokumentations- anlage:	Kaiser, Hitachi, Mitsubishi, Polaroid

3.1.3 Sonstige Materialien

Es wurden ferner Standard-Kunststoffmaterialien der Firmen Eppendorf (Hamburg), Vitlab (Landmark Scientific Inc., USA) und Heidolph (John Morris Scientific, Australien) verwendet.

3.1.4 Reagenzien

ID 32 STAPH [®] :	Bio-Mérieux, Marcy-l'Etoile, Frankreich
Etest [®] für Gentamicin:	AB Biodisk, Solna, Schweden
Agarose:	SeaPlaque, FMC/Biozym, USA, #50101 Seakem HGT Agarose, FMC/Biozym, USA, # 50041
Lysostaphin:	Ambicin L [®] recomb. Lysostaphin, Applied Microbiology/WAK-Chemie, USA, # 4931390
<i>Sma</i> I-Inkubationspuffer:	SuRE/Cut Buffer A, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, # 1417959
<i>Sma</i> I:	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, #220566
Proteinase K:	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, #1000144

Spezielle Reagenzien sind bei den jeweiligen Methoden aufgeführt.

3.1.5 Medien zur Anzucht von *S. aureus*

Zur Anzucht von *S. aureus* wurden folgende Medien verwendet:

Tryptic Soy Bouillon (TSB): Fa. Difco, 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 · 3 H ₂ O	2,5	g
H ₂ O _{dest.}	ad 1,0	l
pH 7,3 für Bouillon		

Tryptic Soy Agar: Fa. Difco, 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		

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		

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		

Schaedler Bouillon:

Fa. Becton Dickinson, Heidelberg

Pankreatisch abgebautes Casein	8,2	g
Peptisch abgebautes Tiergewebe	2,5	g
Sojamehl-Pepton	1,0	g
Glucose	5,8	g
Hefeextrakt	5,0	g
NaCl	1,7	g
K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O	0,8	g
Hämin	0,01	g
L-Cystin	0,4	g
Tris	3,0	g
H ₂ O _{dest.}	ad 1,0	l
pH 7,6 für Bouillon		

CDM-(chemisch definiertes Medium) Agar: Eigenherstellung nach Rezept (108).

3.2 Methoden

3.2.1 Gewinnung der Gewebeproben

Knochenproben sowie tiefe Gewebsaspirate von Patienten, bei denen klinisch der Verdacht auf eine Osteomyelitis bestand, wurden wie folgt aufgearbeitet: Spongiosa bzw. Gewebe wurde mit sterilen Glashomogenisatoren homogenisiert und nach Zugabe von 10 ml Schaedler-Bouillon für 30 min inkubiert. Nach Zentrifugation der Bouillon bei 6000 rpm für 15 min (RT) wurde der Überstand abgekippt und das Pellet in 400 µl Tryptic Soy Bouillon (TSB) aufgenommen. Zur Beimpfung fester Kulturmedien wurden jeweils 100 µl dieser Suspension auf Blut- und TSA-Agar ausgestrichen, zur Beimpfung flüssiger Kulturen wurden jeweils 100 µl in 5 ml Schaedler- bzw. in 9 ml Tryptic Soy Bouillon inokuliert. Aus letzterer Bouillon wurden erneut jeweils 100 µl entnommen und auf Blut-, TSA- und MH-Agar ausplattiert. Alle Platten und Flüssigkulturen wurden für 72 h bei 36°C bebrütet. Bei Trübung der Schaedlerbouillon innerhalb von 72 h wurde erneut auf Blut-, TSA- und MH-Agar ausgestrichen.

3.2.2 Bakterienstammhaltung

Die Bakterienstämme wurden auf Agarplatten als Verdünnungsausstrich bei 37°C angezogen und bei 4°C aufbewahrt. Nach jeweils 6-8 Wochen wurden die Stämme auf frische Platten überimpft. Um die Stämme länger zu konservieren, wurde 1 ml einer Flüssigkultur mit einem Volumen Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

3.2.3 Identifizierung der *S. aureus*-Stämme

S. aureus-Isolate wurden als SCVs erkannt, wenn sie als nadelspitzgroße, nicht pigmentierte, nicht hämolytische Kolonien auf festen Nährmedien wuchsen, und ggf. einen Auxotrophismus für Hämin, Menadion oder Thymidin zeigten. Alle Isolate, einschließlich der SCVs, wurden mit Gram-Färbung, Katalase-Test, biochemischen Untersuchungen (API-Staph, ATB 32 Staph, Marcy-L'Étoile, Frankreich) Objektträger-Agglutinations-Tests (Pastorex Staph Plus, Sanofi Diagnostics Pasteur, INC, Marnes-la-Coquette, Frankreich) und Röhren-Koagulase-Test als *S. aureus*-Stämme bestätigt. Da SCVs häufig eine verzö-

gerte Koagulase-Reaktion zeigen, wurde der Röhren-Koagulase-Test auf 30 h erweitert, bevor der Test als negativ bewertet wurde.

3.2.4 Fall-Kontroll-Studie bei Patienten mit *S. aureus*-Osteomyelitis

3.2.4.1 Definitionen

Als Osteomyelitis durch *S. aureus* wurden alle Veränderungen der Knochen und des Knochenmarks definiert, die klinisch und histologisch und/oder radiologisch bestätigt und auf diesen Krankheitserreger zurückgeführt werden konnten. Als Exazerbation der Osteomyelitis wurde jede Verschlimmerung der klinischen Symptomatik im Sinne einer rekurrenden Infektion gewertet, die eine Änderung des Therapieregimes z. B. eine operative Revision oder eine erneute stationäre Behandlung bedingte.

3.2.4.2 Studien-Design

3.2.4.3 Einschlusskriterien

- Patienten jeden Alters mit akuter oder chronischer Osteomyelitis, gesichert durch klinische und radiologische und/oder histologische Befunde
- Mikrobiologische Materialentnahme in Form von tiefen Wundabstrichen, Knochen- und Gewebsaspiraten vom Osteomyelitisherd im Rahmen einer orthopädischen Operation
- Mikrobiologischer Nachweis von *S. aureus* des normalen und/oder des SCV-Phänotyps am Osteomyelitisherd

3.2.4.4 Ausschlusskriterien

- Weichteil-, Gelenk- und Protheseninfektionen ohne Nachweis einer Osteomyelitis
- Kein mikrobiologischer Nachweis von *S. aureus*
- Fehlen von tiefen Knochen- oder Weichteilaspiraten als Untersuchungsmaterial

3.2.5 Einteilung der Studienpopulation

63 Patienten mit *S. aureus*-positiver Osteomyelitis wurden nach dem Vorhandensein von SCVs von *S. aureus* in eine Experimental- und in eine Kontrollgruppe eingeteilt. Die Experimentalgruppe besteht aus 21 Patienten mit dem Nachweis von mindestens einem SCV-Isolat und gegebenenfalls zusätzlichen Isolaten des normalen Phänotyps von *S. aureus*. Die Kontrollgruppe besteht aus 42 Patienten, bei denen nur *S. aureus*-Isolate des normalen Phänotyps gewonnen werden konnten.

3.2.6 Methodik der Datenerhebung

Die Krankenakten von Patienten mit nachgewiesenem *S. aureus*-Isolat wurden auf das Vorhandensein einer Osteomyelitis sorgfältig studiert. Die Anamnese und der bisherige Krankheitsverlauf von Patienten mit *S. aureus*-positiver Osteomyelitis wurde, insbesondere im Hinblick auf frühere Operationen mit lokaler Gentamicin-Applikation, evaluiert. Durch telefonische Befragung der behandelnden Hausärzte und Orthopäden wurden Daten über die präoperative Therapie und den poststationären Verlauf ergänzt. Folgende Daten wurden auf diese Weise erhoben und tabellarisch für jeden Patienten erfasst:

3.2.6.1 Demographische Daten

- Alter des Patienten zum Zeitpunkt der mikrobiologischen Materialentnahme
- Geschlecht des Patienten

3.2.6.2 Infektionsspezifische Daten

- Lokalisation der Osteomyelitis
- Ursache der Osteomyelitis: postoperativ, hämatogen, posttraumatisch, fortgeleitet oder unbekannt
- Histologischer Nachweis der Osteomyelitis durch Pathologiebefunde

- Radiologischer Nachweis der Osteomyelitis durch: Nativ-Röntgen, Computertomographie, Magnetresonanztomographie, Szintigraphie, Sonographie
- Vorhandensein von Lokalzeichen der Osteomyelitis:
 - Calor = Überwärmung
 - Dolor = Schmerz
 - Rubor = Hautrötung
 - Tumor = Schwellung
 - Functio laesa = beeinträchtigte Funktion
 - Sezernierung
- Vorhandensein und Anzahl von Exazerbationen der Osteomyelitis ein Jahr nach Primärdiagnose und adäquater Therapie
- Dauer der Osteomyelitis in Tagen: Zeitspanne zwischen dem Datum der Erstdiagnose der Osteomyelitis und dem Datum der ersten klinischen Untersuchung ohne Infektionszeichen
- Vorhandensein und Art von prädisponierenden Nebendiagnosen für eine *S. aureus*-Infektion: Diabetes mellitus, Weichteilinfektionen, Frakturen, Sepsis, Implantate

3.2.6.3 Osteomyelitis-bedingte Hospitalisationsdauer

- Anzahl und kumulative Dauer der Osteomyelitis-bedingten stationären Aufenthalte in Tagen

3.2.6.4 Laborchemische Daten

- Laborwerte am Tag der mikrobiologischen Materialentnahme: Leukozyten im Serum (1000/ μ l), C-reaktives Protein (mg/dl), Blutsenkungsgeschwindigkeit nach Westergren nach 1 und 2 h (mm/h)

3.2.6.5 Operationsspezifische Daten:

- Anzahl, Art und Zeitpunkt Osteomyelitis-bedingter Operationen
- Anzahl von Arthrodesen und Amputationen im Therapieverlauf

3.2.6.6 Medikamentöse Therapie vor der mikrobiologischen Materialentnahme:

- Art, Dosis und Implantationsdauer lokaler Gentamicin-Träger

3.2.7 Methoden zur Charakterisierung der *S. aureus*-Isolate

Die *S. aureus*-Isolate von den 21 Patienten der Experimentalgruppe wurden ausführlich mikrobiologisch bezüglich ihrer biochemischen Eigenschaften, ihres Auxotrophismus, ihrer Gentamicin-Empfindlichkeit und ihrer klonalen Identität charakterisiert.

3.2.7.1 Chromosomale DNA-Analyse durch Pulsfeldgelelektrophorese

Um die klonale Identität der phänotypisch unterschiedlichen *S. aureus*-Isolate (normaler Phänotyp oder SCV-Phänotyp) von den 21 Patienten mit SCV-positiver Osteomyelitis zu untersuchen, wurden die Stämme mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese (Restriktion genomischer DNA mit dem Enzym *Sma*I) analysiert. Insgesamt 142 Stämme wurden anhand dieses chromosomalen DNA-Analyseverfahrens untersucht. Die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) wurde gemäß den Standardmethoden durchgeführt (35), mit Ausnahme, dass nicht TSB, sondern Brain Heart Infusion (BHI) aufgrund günstigerer Wachstumsbedingungen verwendet wurde (42). Lysostaphin wurde in einer höheren Konzentration (50 µg statt 25 µg) eingesetzt. Die Stämme wurden als klonal identisch betrachtet, wenn sich ihre Bandenmuster in weniger als zwei Banden unterschieden.

Puffer und Lösungen:**TEN – Puffer:**

Tris-Base	0,1 M (pH 7,5)	6,05 g
Na-EDTA	0,1 M (pH 7,5)	18,6 g
NaCl	0,15 M	4,35 g
H ₂ O _{dest.}		ad 500 ml

EC-Puffer:

Tris-HCl	6 mM (pH 7,5)	0,47 g
NaCl	1 M	29,0 g
Na-EDTA	100 mM (pH 7,5)	18,6 g
Brij-58	0,5 %	2,50 g
Na-Desoxycholat	0,2 %	1,00 g
Na-Lauroylsarcosin	0,5 %	2,50 g
H ₂ O _{dest.}		ad 500 ml

TE-Puffer:

Tris-HCl-Stammlösung	1 M (pH 7,6)	15,76 g
EDTA-Stammlösung	0,5 M (pH 8,0)	18,60 g
H ₂ O _{dest.}		jeweils ad 100 ml
Tris-HCl	10 mM	10 ml Tris-HCl-Stammlösung
EDTA	1 mM	2 ml EDTA-Stammlösung
H ₂ O _{dest.}		ad 988 ml

TBE-Puffer (10 x):

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

Waschpuffer (10 x):

Tris-Acetat	33 mM	29,87 g
K ⁺ -Acetat	66 mM	32,34 g
Mg ²⁺ -Acetat	10 mM	10,70 g
DTT	0,5 mM	0,385 g
H ₂ O _{dest.}		ad 500 ml

Lauf-Puffer (0,5 x):

TBE	100 ml
H ₂ O _{dest.}	1900 ml

Stopp-Mix:

BPB	0,25 %	0,125 g
SDS	0,1 %	0,05 g
H ₂ O _{dest.}		ad 50 ml

Lysereagenzien und Marker:

Proteinase K	20 mg/ml
Lysostaphin	2 mg/ml
<i>Sma</i> I	10 U/μl
Inkubationspuffer für <i>Sma</i> I:	SuRE/Cut Buffer A
Lambda Ladder PFG Marker	

Agarose:

SeaPlaque Agarose (2%)	0,2 g
EC-Puffer	10 ml
SeaKem HGT Agarose (1%)	1 g
TBE	5 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 95 ml

Ethidiumbromid-Färbegrad (1 µg/ml):

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

Durchführung:

Die chromosomale DNA wurde wie von Smith und Cantor beschrieben aufbereitet (99). Übernachtskulturen jeden Stammes wurden isoliert, zentrifugiert (5000 rpm für 10 min bei 4°C) und das Sediment in 1 ml TEN-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (13000 rpm für 1 min) wurde das Sediment in 500 µl EC-Puffer überführt und auf 55°C erwärmt. 500 µl der Suspension wurden zu einem gleichen Anteil 2%-iger Agarose (SeaPlaque, FMC/Biozym, USA) gegeben und 50 µl Lysostaphin (Ambicin L recomb. Lysostaphin, Applied Microbiology/WAK-Chemie, USA) zugefügt. Zur Aushärtung wurde die Mischung in 100 µl-Gießstände gefüllt. Die entstandenen Blöcke wurden in 10 µl Blöckchen geschnitten und in Röhrchen mit je 5 ml EC-Puffer überführt. Nach 2-3stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Blöckchen in 5 ml TE-Puffer und 10 µl RNAse (c = 10 mg/ml) eingelegt. Über Nacht wurden die Blöcke bei 50°C inkubiert, anschließend der TE-Puffer gewechselt, 25 µl Proteinase K hinzugefügt und über Nacht bei 50°C im Wasserbad inkubiert. In den folgenden 24 Stunden wurden die Blöckchen viermal in 500 µl 10-fach verdünntem TE-Puffer für je 30 min bei 4°C gewaschen. Am Folgetag wurden die Blöckchen jeweils für 30 Minuten bei 4 °C in 500 µl *Sma*I-Inkubationspuffer (SuRE/Cut Buffer A, Boehringer Mannheim GmbH, Deutschland) geschwenkt und anschließend mit je 200 µl des 10-fach verdünnten Inkubationspuffers und 1 µl *Sma*I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) für 4 Stunden bei 25 °C inkubiert. Die Restriktion wurde durch Zugabe von je 20 µl Stopp-Mix terminiert. Zur Herstellung des Laufgels wurde 1%iges Agarosegel (Seakem HGT Agarose, FMC/Biozym, USA) mit TBE (10x) in H₂O_{dest.} aufgekocht und in einem gereinigten Gießstand zur Aushärtung gebracht. Die hergestellten Blöckchen wurden in Geltaschen des Laufgels gesteckt und mit Agarose versiegelt. Schließlich erfolgte die eigentliche Pulsfeldgelelektrophorese im

Lauf-Puffer mit einer Laufzeit von 20 h, bei 200 V und 14°C unter Verwendung des clamped homogeneous electric field-Systems CHEF-DR®II (BioRad, Richmond, Kalifornien). Die Pulsation des elektrischen Feldes lag zwischen 5 und 50 Sekunden. Danach wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt, mit destilliertem Wasser gewaschen und unter UV-Licht zur Dokumentation fotografiert.

3.2.7.2 Biochemische Charakterisierung der *S. aureus*-Stämme

Zur Identifizierung und biochemischen Charakterisierung wurden alle *S. aureus* SCVs und jeweils ein klonal identischer Stamm des normalen Phänotyps von 20 Osteomyelitis-Patienten in einem kommerziellen Testkit (ID 32 STAPH-Identifizierungssystem für Staphylokokken, Bio-Mérieux, Marcy-l'Etoile, Frankreich) untersucht und miteinander verglichen. Der ID 32 STAPH-Streifen enthält in 26 Mikroröhrchen dehydrierte Reaktionsmedien, denen jeweils 55 µl einer densitometrisch auf 0,5 McFarland geeichten Bakteriensuspension zugesetzt werden. Die Teststreifen wurden anschließend in einer separaten, feuchten Kammer bei 37°C über 48 Stunden inkubiert. Der Test wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Identifizierung der Normaltyp-Stämme wurde nach 24 h Inkubationszeit und die Identifizierung der SCV-Stämme zusätzlich nach 48 h Inkubationszeit anhand des Musters der 26 Indikatorreaktionen visuell vorgenommen. Um Verfälschungen der Testergebnisse durch Reversionen der SCVs zum normalen Phänotyp auszuschließen, wurde der jeweilige Stamm im Doppelansatz auf Columbia-Agar ausgestrichen und nach 24 h Inkubationszeit phänotypisch beurteilt. Abweichend von den Herstellerangaben wurden die Testkits zusätzlich nach 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24 und 48 Stunden visuell beurteilt und der jeweilige Zeitpunkt des Umschlagens des Farbindikators für folgende Substrate im zeitlichen Verlauf tabellarisch erfasst: Urease, Arginin-Dehydrolase, Glukose, Fruktose, Mannose, Maltose, Lactose, Trehalose, Mannit, alkalische Phosphatase, Saccharose, N-Acetyl-Glucosamin und Turanose. Die verbleibenden 12 Reaktionen waren entweder negativ für *S. aureus* bzw. nicht im zeitlichen Verlauf beurteilbar, da sie nach 24 h den Zusatz weiterer Reaktionsmedien erforderten.

3.2.7.3 Auxotrophismus-Testung

Ein typisches Unterscheidungsmerkmal der Elektronentransport-defizienten SCVs gegenüber dem normalen Phänotyp von *S. aureus* ist ihre Abhängigkeit von den essentiellen Wuchsstoffen Hämin, Menadion und Thymidin. Diese Eigenschaft der SCVs wird als Auxotrophismus bezeichnet. Der Nachweis erfolgt auf speziellen Nährböden (CDM, chemically defined medium) (108), die sicher keine der zu testenden Substanzen enthalten. Vergleichbar mit einem Agardiffusionstest werden mit den Substanzen getränkte Plättchen und auf den flächig beimpften CDM-Nährboden aufgebracht. Die Abhängigkeit des jeweiligen Isolats von einem der drei Wuchsstoffe wird makroskopisch durch das Wachstum in der Diffusionszone um das jeweilige Plättchen bestimmt (74, 108). Der Auxotrophismus für Hämin wurde mittels Standardplättchen (Unipath, Basingstoke, England) getestet. Für Thymidin (Fluka Chemie, Buchs, Schweiz) und Menadion (Sigma Aldrich Chemie, Deisendorf, Deutschland) erfolgte die Testung durch Hinzufügen der Substanzen auf Leer-Plättchen (15 µl pro Plättchen, Konzentration jeweils 100 µg/ml). Um einen einzelnen Auxotrophismus zu bestimmen, wurden die zu testenden Isolate als Suspension in einer photometrisch bestimmten Konzentration von 0,5 nach McFarland auf CDM-Agar aufgebracht (Komponenten von Boehringer, Ingelheim und Merck, Darmstadt, Deutschland). Die drei präparierten Plättchen wurden jeweils in gleichem Abstand zueinander auf die Oberfläche des Nährbodens gelegt. Sofern die SCVs nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation in einer begrenzten Zone um die mit Hämin, Menadion oder Thymidin imprägnierten Plättchen normal große Kolonien bildeten und in der weiteren Peripherie als typische SCVs mit nadelspitzgroßen Kolonien wuchsen, wurde der Auxotrophismus als positiv gewertet. Darüber hinaus musste für das jeweilige SCV-Isolat auf mehr als 2 von 9 getesteten Kulturplatten ein Auxotrophismus für den Wuchsstoff nachweisbar sein, um als eindeutig beurteilt werden zu können. Um einen doppelten Auxotrophismus zu bestimmen, wurden die Plättchen in gleicher Weise auf CDM-Agar aufgebracht, dem zusätzlich 100 µg/ml Thymidin, 10 µg/ml Menadion oder 1 µg/ml Hämin zugesetzt wurde. Für die Bestimmung eines dreifachen Auxotrophismus wurden die Plättchen auf CDM-Agar aufge-

bracht, dem 100 µg/ml Thymidin plus 10 µg/ml Menadion, 100 µg/ml Thymidin plus 1 µg/ml Hämin oder 10 µg/ml Menadion plus 1 µg/ml Hämin zugesetzt wurden. Zur Bestimmung eines kombinierten Auxotrophismus wurden die Plättchen auf CDM-Agar aufgelegt, dem 100 µg/ml Thymidin, 10 µg/ml Menadion und 1 µg/ml Hämin zugesetzt wurden.

3.2.7.4 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration für Gentamicin wurde zunächst eine Keimsuspension hergestellt, indem 3-5 Kolonien des zu testenden Stammes in 4 ml TSB inokuliert wurden. Nach 2-3 Stunden Inkubation im 37°C-Wasserbad erfolgte die Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung auf eine Trübung von 0,5 nach McFarland. Diese Keimsuspension wurde auf Müller-Hinton-Agar mit einem Wattetupfer ausgestrichen. Auf den beimpften Agarnährboden wurde anschließend mit einer ausgeglühten Pinzette ein Etest[®]-Streifen gelegt. Dieser besteht aus einem 5 x 60 mm großen, skalierten Plastikstreifen, der nach dem Auflegen auf den Nährboden in einer Kombination aus Dilution und Diffusion einen kontinuierlichen, exponentiellen Gradienten von 0,016-256 µg/ml Gentamicin in die Agarmatrix freisetzt. Nach einer 24-stündigen oder längeren Inkubation bei 37°C zeigte sich entlang des Streifens eine symmetrische Inhibitionsellipse im Bakterienrasen. Der MHK-Wert (in µg/ml) konnte jeweils im Bereich des Schnittpunktes der Ellipse mit dem Teststreifen von der Skala abgelesen werden. Da *S. aureus* SCVs auf MH-Agar nur sehr langsam wachsen, wurden die Ergebnisse in Abweichung zu den Empfehlungen des National Committee for Laboratory Standards (NCCLS) (74) und den Herstellerangaben des Etests[®] (AB Biodisk, Solna, Schweden) zusätzlich nach 48-72stündiger Inkubation bei 37°C abgelesen. Der MHK-Wert für Gentamicin wurde für alle klonal identischen *S. aureus*-Stämme des normalen Phänotyps und des SCV-Phänotyps im Doppelansatz getestet und tabellarisch erfasst.

3.2.8 Statistik und Auswertungsmodalitäten

Für jeden Patienten wurden Tabellen angelegt, in welche alle erhobenen klinischen bzw. experimentellen Daten übertragen wurden.

Für die statistische Auswertung wurden die Daten standardisiert und mittels Microsoft Excel (Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA) und SPSS Version 11.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) ausgewertet. Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurden der Mittelwert (MW), die Standardabweichung, der Median (MD) sowie die Minimal- (Min) und Maximalwerte (Max) für die erfassten Parameter berechnet. Im Falle ordinaler oder kategorieller Merkmale wurden die Häufigkeiten in Kreuztabellen verglichen und mit Hilfe des χ^2 -Tests verglichen. Stetige Merkmale wurden mit Hilfe von Boxplots bzw. dem Mann-Whitney-Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben verglichen. *P*-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Studienpopulation

4.1.1 Stichprobenumfang und Prävalenz von *S. aureus*

Im Untersuchungszeitraum von 42 Monaten konnte bei 111 (53%) von 211 Patienten der orthopädischen Kliniken der Universität Münster, denen intraoperativ unter dem Verdacht einer Osteomyelitis Gewebeproben zur mikrobiologischen Untersuchung entnommen worden sind, eine Infektion mit *S. aureus* nachgewiesen werden. *S. aureus*-SCVs konnten bei 27 (24 %) von 111 Patienten mit einer *S. aureus*-Infektion isoliert werden.

Als Studienpopulation wurden 63 (57 %) von 111 Patienten mit einer *S. aureus*-Infektion zusammengefasst, bei denen eine Osteomyelitis klinisch, histologisch und/oder radiologisch bestätigt werden konnte. 21 (33 %) dieser Patienten waren von *S. aureus* SCVs kolonisiert. Nach dem Vorhandensein von SCVs von *S. aureus* wurden die 63 Osteomyelitis-Patienten in eine Experimentalgruppe bestehend aus 21 Patienten (SCVs und normaler Phänotyp) bzw. in eine Kontrollgruppe aus 42 Patienten (nur normaler Phänotyp von *S. aureus*) eingeteilt.

Die folgende Tabelle 3 liefert einen Überblick über die Anzahl und Art der *S. aureus*-Isolate, den Ursprung und die Art des Untersuchungsmaterials sowie über die Lokalisation und den Aktivitätsgrad der Entzündung zum Zeitpunkt der mikrobiologischen Materialentnahme.

4.1.2 Patienten und Herkunft der *S. aureus*-Isolate

Patient	Anzahl der <i>S. aureus</i> -Isolate (normaler Phänotyp)	Anzahl der <i>S. aureus</i> -Isolate (SCV-Phänotyp)	Untersuchungs-material (intraop. = intraoperativ gewonnen)	Lokalisation der Osteomyelitis (re. = rechts, li. = links)	Infektions-status der Osteomyelitis
1	10	4	Knochen	Femur rechts	chronisch
2	16	1	Abszess	Tibia links	akut
3	7	1	Gewebe	Sprunggelenk links	chronisch
4	10	1	Punktat	Femur li., Humerus li.	chronisch
5	2	1	Knochen	Radius links	akut
6	3	1	Kniegelenkpunktat	Tibia links	chronisch
7	10	5	Gewebe	Tibia links	chronisch
8	1	1	Gewebe intraop.	Brustwirbelkörper 6-7	chronisch
9	2	1	Abstrich ISG	Iliosakralgelenk rechts	chronisch
10	7	7	Gewebe	Femur links	chronisch
11	2	2	Gewebe	Tibia links	chronisch
12	2	4	Abstrich intraop.	Lendenwirbelkörper 1-3	chronisch
13	3	2	Gewebe intraop.	Lendenwirbelkörper 1-3	chronisch
14	0	2	Gewebe	Lendenwirbelkörper 1-2	chronisch
15	14	1	Abstrich Drainage	Sternum	chronisch
16	6	4	Abstrich Femur	Femur links	chronisch
17	1	1	Wundabstrich Fuß	Ossa metatarsalia I-V re., Sprunggelenk links	chronisch
18	2	1	Abstrich	Femur links	chronisch
19	2	1	Gewebe	Tibia rechts	chronisch
20	1	3	Bandscheibe	Brustwirbelkörper 11-12	chronisch
21	6	1	Wundabstrich	Sternum	chronisch
22	1	0	Gewebe	Humerus rechts	chronisch
23	1	0	Abstrich Knie	Femur rechts	chronisch
24	1	0	Punktat	Femur links	chronisch
25	1	0	Gewebe Femur	Femur links	akut
26	1	0	Abstrich	Calcaneus rechts	akut
27	1	0	Bandscheibe	Lendenwirbelkörper 1-2	akut
28	1	0	Punktat	Brustwirbelkörper 6	chronisch
29	8	0	Knochen	Tibia links	chronisch
30	4	0	Abstrich	Femur links	chronisch
31	3	0	Gewebe	Tibia links	akut
32	8	0	Punktat, Gewebe	Brustwirbelkörper 11-12	chronisch
33	2	0	Bandscheibe	Lendenwirbelkörper 1	chronisch
34	2	0	Knochen	Tibia rechts	chronisch

Patient	Anzahl der <i>S. aureus</i> -Isolate (normaler Phänotyp)	Anzahl der <i>S. aureus</i> -Isolate (SCV-Phänotyp)	Untersuchungs-material	Lokalisation der Osteomyelitis (re. = rechts, li. = links)	Infektions-status der Osteomyelitis
35	2	0	Markraumgewebe	Femur rechts	akut
36	6	0	Punktat, Knochen	Femur re., Tibia rechts	chronisch
37	1	0	Gewebe	Femur rechts	chronisch
38	1	0	Gewebe	Lendenwirbelkörper 1-2	akut
39	1	0	Gewebe Wunde	Ossa metatarsalia II-III li., Sprunggelenk links	chronisch
40	3	0	Abstrich	BWK 12-LWK 1	chronisch
41	9	0	Abstrich, Gewebe	Sternum rechts	chronisch
42	1	0	Punktat	LWK 1-SWK 1	chronisch
43	1	0	Gewebe	Os sacrum	chronisch
44	1	0	Gewebe	Patella rechts	chronisch
45	4	0	Knochen	Femur li., Tibia links	chronisch
46	2	0	Gewebe	Calcaneus beidseits	chronisch
47	2	0	Abstrich, Gewebe	Femur rechts	akut
48	6	0	Gewebe	Brustwirbelkörper 9	akut
49	1	0	Knochen	Tibia rechts	chronisch
50	2	0	Abstrich	Os metacarpale III links	chronisch
51	1	0	Bandscheibe	LWK 5-SWK 1	akut
52	1	0	Abstrich Femur	Femur rechts	akut
53	3	0	Gewebe, Knochen	Calcaneus links	chronisch
54	2	0	Knochen, Muskel	Femur rechts	chronisch
55	11	0	Abstrich Knochen	Ossa metatarsalia I-V re.	chronisch
56	3	0	Abstrich Tibia	Tibia beidseits	chronisch
57	1	0	Abstrich Calcaneus	Calcaneus links	chronisch
58	2	0	Abstrich Calcaneus	Calcaneus rechts	chronisch
59	1	0	Gewebe, Knochen	Ossa metatarsalia IV-V li.	chronisch
60	2	0	Wundabstrich	Ossa metatarsalia I re.	chronisch
61	1	0	Knochen	Ossa metatarsalia II re.	chronisch
62	35	0	Gewebe, Abstrich	Ossa metatarsalia I li.	chronisch
63	5	0	Abstrich Femur	Femur rechts	chronisch

Tab. 3: Auflistung der Anzahl der *S. aureus*-Isolate von 63 untersuchten Patienten getrennt nach Phänotyp, Herkunft des Probenmaterials, Lokalisation und Infektionsstatus der Osteomyelitis

4.1.3 Ausgeschlossene Patienten

48 (43,2%) von 111 Patienten mit einer *S. aureus*-Infektion wurden aufgrund des Fehlens einer Osteomyelitis nicht in die Studie aufgenommen. Das Durchschnittsalter dieser 29 Männer und 19 Frauen betrug zum Untersuchungszeitpunkt 53,7 Jahre, bei einem Minimalalter von einem Jahr und einem Maximalalter von 87 Jahren. Bei 32 (66,6%) von 48 Patienten lag eine Wund- oder Weichteilinfektion, bei 8 (16,7%) eine Prothesen-assoziierte Infektion, bei 1 (2,1%) Patient eine Endokarditis, bei 1 (2,1%) Patient der Verdacht auf ein Toxic Shock Syndrom und bei 6 (12,5%) Patienten keine bekannte Ursache für die Staphylokokkeninfektion vor. SCVs von *S. aureus* konnten bei 6 (12,5%) der 48 Patienten isoliert werden. Von diesen 3 Männern und 3 Frauen hatten 3 Patienten Infektionen von Hüft- oder Schultergelenkprothesen, ein Patient infizierte Cochlea-Implantate und 2 Patienten eine Weichteilinfektion im Bereich des Kniegelenks.

4.1.4 Demographische Daten

Das Alter der 63 in die Studie aufgenommenen Patienten mit *S. aureus*-positiver Osteomyelitis lag zwischen 10 und 83 Jahren bei einem Durchschnittsalter von 47,2 Jahren bzw. einem Median von 52 Jahren. Die Standardabweichung betrug 20,4 Jahre. Das Durchschnittsalter der 21 Patienten mit *S. aureus* SCV-positiver Osteomyelitis ergab 42,5 Jahre (MD: 49,0 Jahre) gegenüber 49,5 Jahren (MD: 53,5 Jahre) bei den 42 Patienten mit *S. aureus*-positiver Osteomyelitis ohne Nachweis von SCVs. Das Geschlechterverhältnis belief sich mit 46 Männern und 17 Frauen auf 2,7:1. Die 21 Osteomyelitis-Patienten mit nachgewiesenen *S. aureus* SCVs teilten sich in 16 Männer und 5 Frauen auf (Verhältnis 3,2:1). Auch das Geschlechterverhältnis der 42 Patienten mit *S. aureus*-positiver Osteomyelitis ohne Nachweis von SCVs fiel mit 30 Männern und 12 Frauen (Verhältnis 2,5:1) deutlich zugunsten des männlichen Geschlechts aus. Zwischen der Experimental- und der Kontrollgruppe ergaben sich somit keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Altersstruktur und der Geschlechterverteilung.

Die folgenden Diagramme verdeutlichen, dass in der betrachteten Studienpopulation vor allem Männer im mittleren Lebensalter von der Osteomyelitis betroffen waren und dass die Bevorzugung der mittleren Altersklasse sowohl für die *S. aureus* SCV-positive Osteomyelitis wie auch für die *S. aureus* SCV-negative Osteomyelitis zutrifft.

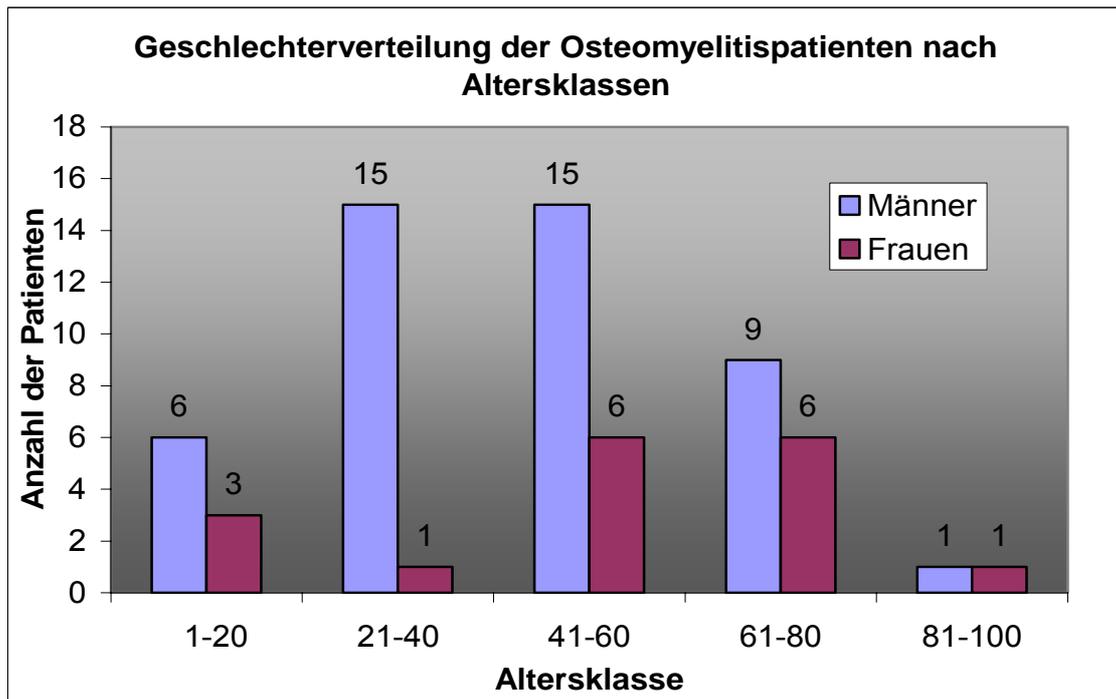


Abb. 1: Balkendiagramm zur Darstellung der Geschlechterverteilung der Osteomyelitis-Patienten nach Altersklassen (n = 63)

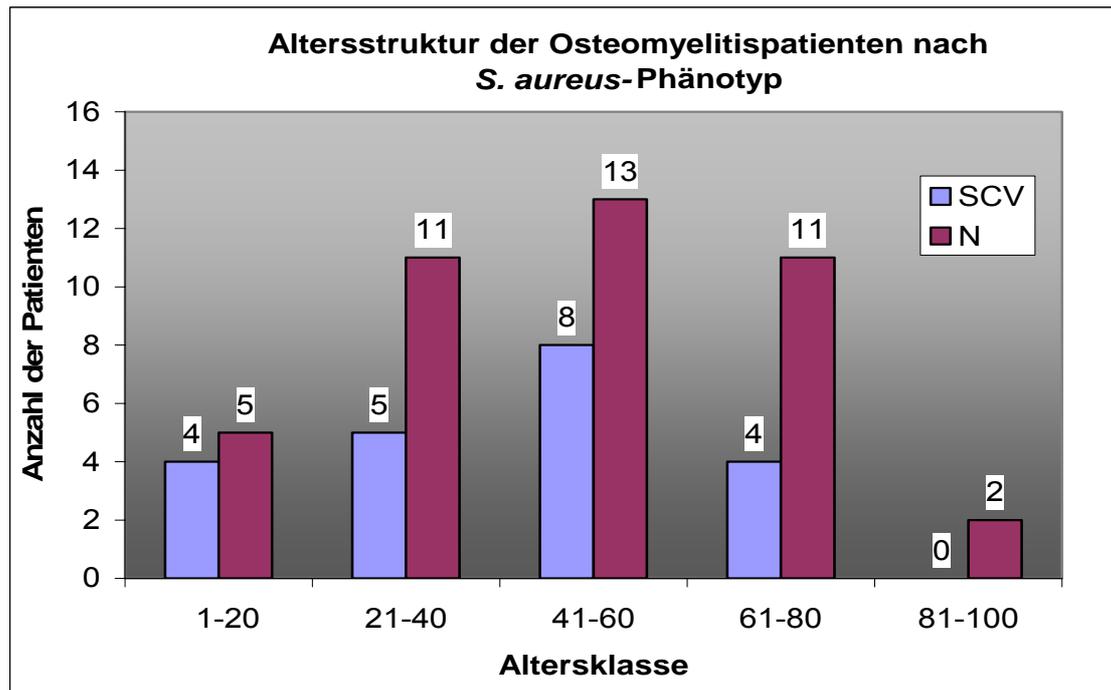


Abb. 2: Balkendiagramm zur Darstellung der Altersstruktur der Osteomyelitis-Patienten getrennt nach isoliertem *S. aureus*-Phänotyp (n = 63 Patienten, SCV = 21 Patienten mit Nachweis von *S. aureus* SCVs mit/ohne normalem *S. aureus*-Phänotyp, N = 42 Patienten mit Nachweis ausschließlich des normalen Phänotyps von *S. aureus*)

4.1.5 Infektionsspezifische Daten

4.1.5.1 Ossäre Lokalisation der Osteomyelitis

Um die Vergleichbarkeit der Experimental- und der Kontrollgruppe in Bezug auf die knöchernen Lokalisation der Osteomyelitis herauszustellen, wurde die Anzahl der Nennungen für beide Patientengruppen tabellarisch gegenübergestellt (siehe Tabelle 4). Am häufigsten waren die langen Röhrenknochen der unteren Extremität, insbesondere die Meta- und Diaphysen von Femur (24% aller Nennungen), Tibia (18 %) und Ossa metatarsalia (10%) betroffen. Ausschließlich Erwachsene hatten eine Osteomyelitis der Wirbelkörper, oft unter Beteiligung der Bandscheiben, die man als Spondylitis bzw. Spondylodiszitis bezeichnet. 10% der Nennungen entfielen auf den lumbosakralen und 8% auf

den thorakalen Bereich der Wirbelsäule. Das Sternum war in 6% der Nennungen jeweils im postoperativen Verlauf nach einer Thorakotomie osteomyelitisch verändert. In 8% der Nennungen war die Osteomyelitis im Bereich des Calcaneus lokalisiert und zudem ausschließlich von *S. aureus* des normalen Phänotyps verursacht. Die verbleibenden 16% aller Nennungen entfielen auf die langen Röhrenknochen der oberen Extremität, das Sprunggelenk und andere Lokalisationen wie das Os sacrum und die Patella.

Ossäre Lokalisation der Osteomyelitis:	21 Patienten mit <i>S. aureus</i> SCV +/- N		42 Patienten mit <i>S. aureus</i> N	
	Nennungen	Anteil in %	Nennungen	Anteil in %
Radius	1	4	0	0
Humerus	1*	4	1	2
Wirbelsäule thorakal	2	9	4	8
Wirbelsäule lumbosakral	3	13	4	8
Sternum	2	9	2	4
Femur	5	22	12*	25
Tibia	5	22	8**	17
Calcaneus	0	0	6*	13
Sprunggelenk	2	9	2*	4
Ossa metatarsalia	1*	4	6*	13
andere	1	4	3	6
Summe	23	100	48	100

Tab. 4: Knöchernen Lokalisation der Osteomyelitis bei 63 Patienten getrennt nach isoliertem *S. aureus*-Phänotyp (* = Anzahl der Mehrfachnennungen bei Patienten z. B. bei gelenknaher Beteiligung mehrerer Knochen; N = normaler Phänotyp von *S. aureus*, SCV = Small Colony Variants von *S. aureus*)

Zusammenfassend zeigten beide Patientengruppen unabhängig vom isolierten *S. aureus*-Phänotyp ein ähnliches Verteilungsmuster für die knöchernen

Lokalisation der Osteomyelitis. Eine unterschiedliche Häufigkeitsverteilung zugunsten der Kontrollgruppe bestand für die Osteomyelitis im Bereich der Ossa metatarsalia bzw. des Calcaneus. In Folge eines diabetischen Fußsyndroms hatten 8 Patienten der Kontrollgruppe und 1 Patient der Experimentalgruppe in diesen Lokalisationen eine Osteomyelitis entwickelt.

4.1.5.2 Ätiologie der Osteomyelitis

Bei 30% von 63 Patienten mit *S. aureus*-positiver Osteomyelitis trat die Knochenmarksentzündung im Verlauf nach einer Operation auf. 24% der Patienten erlitten eine Osteomyelitis in Folge eines Traumas. In Fortleitung von einer Weichteilinfektion z. B. einem Abszess oder einem diabetischen Ulkus trat die Osteomyelitis bei 19% der 63 Patienten auf. Eine hämatogene Ursache wurde bei 21% der Patienten dokumentiert und bei den verbleibenden 6% blieb die Genese der Osteomyelitis unbekannt.

Bei 9 (14%) von 63 Patienten konnte eine posttraumatische Osteomyelitis im Bereich des distalen Femurs und/oder der proximalen Tibia ermittelt werden. Eine fortgeleitete Osteomyelitis im Bereich der Ossa metatarsalia bzw. des Calcaneus trat bei 9 (14%) der Patienten in Folge eines Malum perforans bei Diabetes mellitus auf. Einer hämatogenen Erregeraussaat bzw. einer Sepsis zur Folge erlitten 5 (8%) von 63 Patienten eine Spondylodiszitis. Die Vergleichbarkeit der Experimental- und der Kontrollgruppe im Bezug auf die Ätiologie der Osteomyelitis verdeutlicht das folgende Balkendiagramm (siehe Abbildung 3).

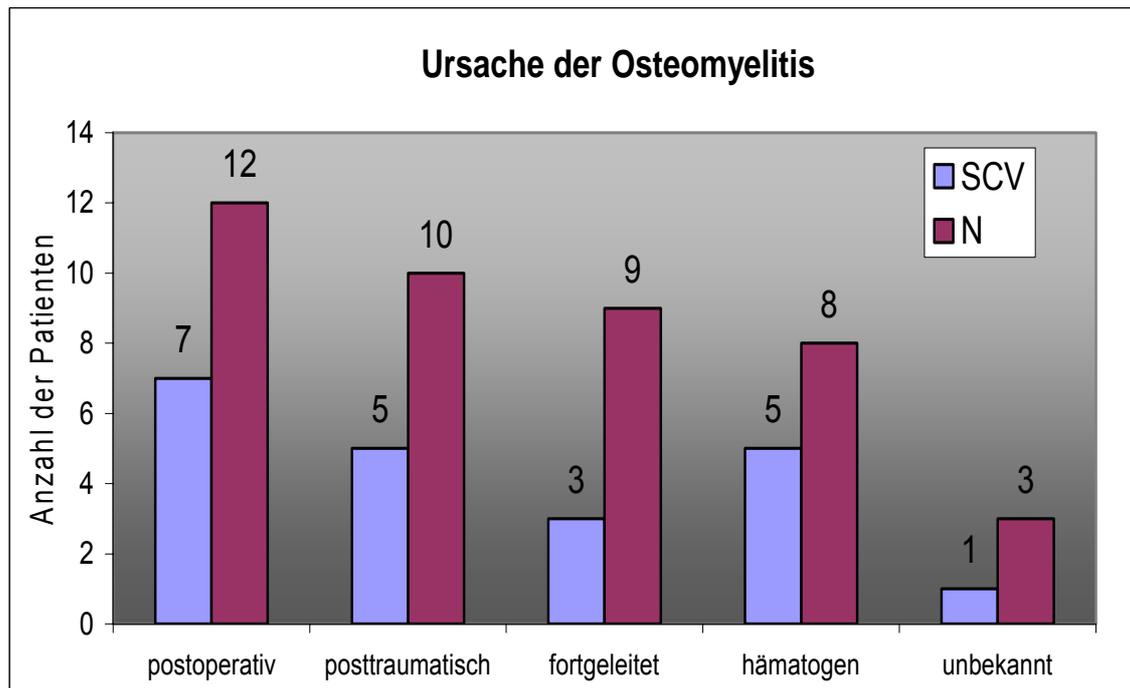


Abb. 3: Balkendiagramm zur Ursache der Osteomyelitis bei 63 Patienten getrennt nach isoliertem *S. aureus*-Phänotyp (N = Kontrollgruppe aus 42 Patienten mit normalem Phänotyp von *S. aureus*, SCV = Experimentalgruppe aus 21 Patienten mit SCVs von *S. aureus* und ggf. normalem Phänotyp von *S. aureus*).

4.1.5.3 Prädispositionen für eine Infektion durch *S. aureus*

Anhand der Krankenakten der 63 Patienten mit Osteomyelitis wurden Voraussetzungen, die eine *S. aureus*-Infektion und die Entstehung einer Osteomyelitis begünstigt haben könnten, erfasst. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen beiden Patientengruppen konnten bezüglich keines der untersuchten Merkmale festgestellt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

	Prädisposition	Diabetes mellitus	Weichteilinfektion	Fraktur	Sepsis	Implantat
Experimentalgruppe: <i>S. aureus</i>	Anzahl der Patienten (n = 21)	4	10	6	7	5
SCV +/- normaler Phänotyp	% der Experimentalgruppe	19,0%	47,6%	28,6%	33,3%	23,8%
Kontrollgruppe: nur normaler Phänotyp von <i>S. aureus</i>	Anzahl der Patienten (n = 42)	11	16	13	10	17
	% der Kontrollgruppe	26,2%	38,1%	31,0%	23,8%	40,5%
Gesamt	Anzahl der Patienten (n = 63)	15	26	19	17	22
	% der Experimental- und Kontrollgruppe	23,8%	41,3%	30,2%	27,0%	34,9%

Tab. 5: Kreuztabelle zu den Prädispositionen für eine *S. aureus*-Infektion vor Auftreten der Osteomyelitis

4.1.5.4 Bestätigung der Osteomyelitis durch Pathologiebefunde

Eine Osteomyelitis wurde bei 55 (87%) der 63 untersuchten Patienten im histologischen Befund diagnostiziert. Kein Pathologiebefund lag bei folgenden 8 (13%) Patienten vor: Patient 17, 19, 30, 33, 42, 56, 61 und 62. In diesen Fällen wurde die Diagnose durch klinische Untersuchungsbefunde, Operationsberichte und radiologische Befunde gesichert.

4.1.5.5 Radiologischer Nachweis der Osteomyelitis

Bei 59 (94%) von 63 Patienten konnten eindeutige radiologische Zeichen einer Osteomyelitis wie kortikale Knochendestruktionen bis hin zu Osteolysen, pathologischen Frakturen, periostalen Knochenappositionen, Sequestrationen, Sklerosierungen, begleitenden Weichteilschwellungen, Abszessformationen und Fistelkanälen festgestellt werden. Bei den Patienten 52, 54, 59 und 63 lagen in den gesichteten Akten keine radiologischen Befunde mit Hinweisen auf

eine Osteomyelitis vor. Jedoch lag in den genannten Fällen jeweils eine eindeutige histologische Diagnose im Pathologiebefund vor. Die konventionelle Röntgenuntersuchung ergab bei 45 (71%), die Magnetresonanztomographie bei 32 (51%), die Szintigraphie bei 31 (49%) und die Computertomographie bei 15 (24%) von 63 Patienten Hinweise auf die Osteomyelitis. Begleitende Weichteilveränderungen wie Abszesse wurden bei 8 (13%) der 63 Osteomyelitis-Patienten durch die Sonographie detektiert.

4.1.5.6 Lokalzeichen der Osteomyelitis

Das Krankheitsbild der Osteomyelitis wird oft von den klassischen Lokalzeichen der Entzündung begleitet: Calor (Überwärmung), Dolor (Schmerz), Tumor (Schwellung), Rubor (Rötung), Functio laesa (beeinträchtigte Funktion) und Sezernierung. Bei allen 63 (100%) Osteomyelitis-Patienten waren ein oder mehrere dieser Symptome feststellbar. 57 (90%) Patienten gaben während ihres stationären Aufenthaltes Schmerzen im Bereich des Osteomyelitisherdes an. 53 (84%) Patienten klagten über eine Funktionsbeeinträchtigung der beteiligten Extremität. Bei 47 (75%) Patienten wurde zum Untersuchungszeitpunkt eine lokale Überwärmung festgestellt. Eine Rötung trat bei 24 (38%), eine Schwellung bei 23 (37%) und eine Sezernierung bei 22 (35%) der 63 Patienten auf.

4.1.5.7 Laborchemische Daten am Tag der mikrobiologischen Materialentnahme

Das C-reaktive Protein (CRP), die Blutsenkungsgeschwindigkeit nach Westergren (BSG) und die Leukozytenzahl im Serum sind empfindliche Entzündungsparameter. Folgende Referenzwerte wurden aus den Laborberichten übernommen: CRP $\leq 0,5$ mg/dl, BSG ≤ 10 bzw. 20 mm nach 1 bzw. 2 Stunden Sedimentation und Leukozyten $\leq 10\ 000/\mu\text{l}$. Die Werte wurden für die Patienten der Experimental- und der Kontrollgruppe am Tag der mikrobio-

logischen Materialentnahme erfasst und tabellarisch verglichen (siehe Tabelle 6).

Experimental- oder Kontrollgruppe nach Kolonieform		CRP-Wert (mg/dl)	BSG nach Westergren (1 h-Wert, mm/h)	BSG nach Westergren (2 h-Wert, mm/h)	Leukozyten im Serum (1000/ μ l)
Experimentalgruppe, SCV +/- normaler Phänotyp	Mittelwert	6,7	58,9	90,1	8,8
	Median	4,8	52,0	89,0	8,5
	Minimum	0	10	30	3
	Maximum	27	121	130	14
	Standabw. Patienten	7,4 21	27,5 21	28,4 21	2,9 21
Kontrollgruppe, nur normaler Phänotyp	Mittelwert	7,9	50,8	82,5	9,4
	Median	4,6	42,5	80,0	8,3
	Minimum	0	4	10	4
	Maximum	33	125	131	32
	Standabw. Patienten	8,7 39	31,7 40	37,8 40	4,9 42

Tab. 6: Kreuztabelle der laborchemischen Entzündungsparameter am Tag der mikrobiologischen Materialentnahme (Standardabw. = Standardabweichung)

Nur die Patienten 31, 50 und 54 (5% von 63 Patienten) wiesen am Tag der Stichprobe normwertige Entzündungsparameter auf. Im χ^2 -Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede für die untersuchten Entzündungsparameter zwischen beiden Patientengruppen. Die zweiseitige Signifikanz im χ^2 -Test nach Pearson betrug für den CRP-Wert $p = 0,43$, für die BSG nach 1 Stunde $p = 0,58$, nach 2 Stunden $p = 0,59$ und für die Leukozyten $p = 0,37$.

4.1.5.8 Dauer der Osteomyelitis

Die Erkrankungsdauer der Patienten wurde anhand der Krankenblätter aus dem Datum der Erstdiagnose der Osteomyelitis und dem Datum der ersten klinischen Untersuchung ohne Infektionszeichen rekonstruiert. Da diese Zeitspanne bei zwei Patienten (Patient 18 bzw. 22) 26 Jahre bzw. 55 Jahre

betrug und keine Angaben über rezidivfreie Intervalle erhoben werden konnten, wurden diese Patienten nicht in die Wertung einbezogen. Der Median der Erkrankungsdauer betrug für die Patienten mit einem nachgewiesenen *S. aureus* SCV-Isolat (Experimentalgruppe) 436 Tage, bei einem Interquartilbereich von 1147 Tagen gegenüber 160 Tagen, bei einem Interquartilbereich von 393 Tagen für Patienten ohne SCV-Nachweis (Kontrollgruppe). Der Mittelwert betrug für die Experimentalgruppe 822 Tage und für die Kontrollgruppe 401 Tage. Die Minimalwerte lagen bei der Experimentalgruppe bei 73 und bei der Kontrollgruppe bei 18 Tagen, die Maximalwerte betragen 3862 Tage bzw. 2640 Tage. Patienten mit einer *S. aureus*-SCV-positiven Osteomyelitis hatten insgesamt einen längeren Erkrankungsverlauf als Osteomyelitis-Patienten, bei denen nur der normale Phänotyp von *S. aureus* isoliert werden konnte. Im Mann-Whitney-Wilcoxon-Test konnte eine zweiseitige Signifikanz von $p = 0,002$ ermittelt werden. Graphisch sind die Ergebnisse im folgenden Boxplotdiagramm (Abb. 4) dargestellt.

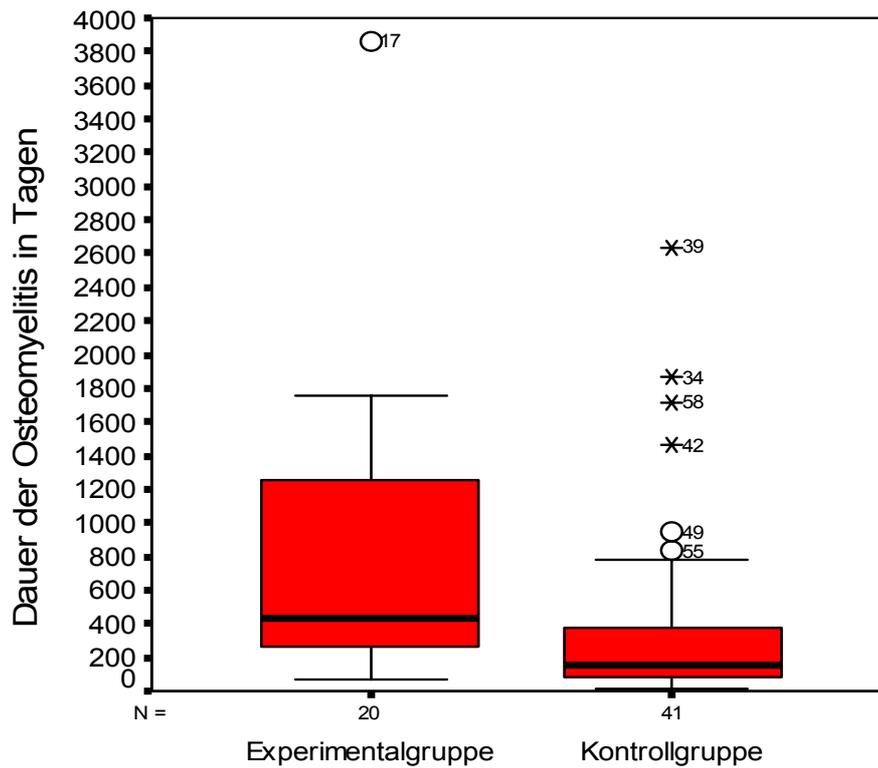


Abb. 4: Boxplotdiagramm zur Dauer der Osteomyelitis. Gezeigt wird die Dauer der Osteomyelitis in Tagen für die Experimental- und die Kontrollgruppe. Die Box stellt den Interquartilbereich mit 50% der Werte dar. Die quer über die Box gelegte Linie gibt die Lage des Medians wieder. Ausreißer sind mit der Nummer des jeweiligen Patienten angegeben.

4.1.5.9 Exazerbationen der Osteomyelitis ein Jahr nach Primärdiagnose

SCVs von *S. aureus* werden für chronische, rekurrende Infektionen verantwortlich gemacht (80, 81, 82, 83, 86, 96, 110, 120, 121). Ein Vergleich der Experimental- und der Kontrollgruppe im Bezug auf die Anzahl der Exazerbationen der Osteomyelitis ein Jahr nach Primärdiagnose und adäquater Therapie wird in Tabelle 7 zusammengefasst. Als Exazerbation wurde jede Verschlimmerung der klinischen Symptomatik der Osteomyelitis gewertet, die eine Änderung des Therapieregimes z. B. eine operative Revision oder eine erneute stationäre Behandlung bedingte.

Anzahl der Exazerbationen:		0	1-2	3-4	>5	gesamt
Experimental- gruppe: <i>S. aureus</i> SCV +/- normaler Phänotyp	Anzahl der Patienten	7	6	4	4	21
	% der Experimental - gruppe	33,3%	28,6%	19,0%	19,0%	100,0%
Kontrollgruppe: nur normaler Phänotyp von <i>S. aureus</i>	Anzahl der Patienten	26	12	3	1	42
	% der Kontrollgruppe	61,9%	28,6%	7,1%	2,4%	100,0%

Tab. 7: Kreuztabelle zur Anzahl der Exazerbationen der Osteomyelitis ein Jahr nach Primärdiagnose und Therapie

Zusammenfassend haben Patienten mit einer *S. aureus* SCV-positiven Osteomyelitis ein Jahr nach der Primärdiagnose und vergleichbarer Therapie mehr Exazerbationen der Erkrankung als Patienten, deren Osteomyelitis ausschließlich auf den normalen Phänotyp von *S. aureus* zurückzuführen ist. Anhand des χ^2 -Quadrat-Tests wurde eine zweiseitige Signifikanz von $p = 0,031$ festgestellt.

4.1.6 Operationsspezifische Daten:

4.1.6.1 Anzahl der Osteomyelitis-bedingten Operationen

Zwischen der Experimental- und der Kontrollgruppe konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl der Operationen im Therapieverlauf der Osteomyelitis festgestellt werden (χ^2 -Test nach Pearson: zweiseitiger p-Wert = 0,779). Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Anzahl der Operationen:		1-2	3-4	5-10	> 10	gesamt
Experimental- gruppe: <i>S. aureus</i>	Anzahl der Patienten	5	8	7	1	21
SCV +/- normaler Phänotyp	% der Experimental - gruppe	23,8%	38,1%	33,3%	4,8%	100,0%
Kontrollgruppe: nur normaler Phänotyp von <i>S. aureus</i>	Anzahl der Patienten	14	12	15	1	42
	% der Kontrollgruppe	33,3%	28,6%	35,7%	2,4%	100,0%

Tab. 8: Anzahl der Osteomyelitis-bedingten Operationen im Therapieverlauf

4.1.6.2 Arthrodesen und Amputationen von Gliedmaßen

Eine operative Gelenkversteifung (Arthrodesen) im Verlauf der operativen Behandlung der Osteomyelitis wurde bei 8 (38%) von 21 Patienten der Experimentalgruppe und bei 11 (26%) von 42 Patienten der Kontrollgruppe durchgeführt. Im χ^2 -Test ergab sich kein signifikanter Unterschied (zweiseitiger p-Wert = 0,332) zwischen beiden Patientengruppen. Die von der Knochenmarksentzündung betroffene Gliedmaße wurde bei 3 (14%) Patienten der Experimental- und 16 (38%) Patienten der Kontrollgruppe im Therapieverlauf amputiert. Die Anzahl der Osteomyelitis-Patienten, bei denen im Therapieverlauf eine Amputation durchgeführt wurde, ist in der Kontrollgruppe signifikant höher (zweiseitiger p-Wert = 0,052) als in der Experimentalgruppe.

4.1.6.3 Osteomyelitis-bedingte Hospitalisationsdauer

Für die 63 Patienten mit *S. aureus*-positiver Osteomyelitis wurde die kumulative Hospitalisationsdauer, die zur Behandlung der Knochenmarksentzündung notwendig war, ermittelt. Zwischen der Experimental- und der Kontrollgruppe konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Osteomyelitis-bedingten stationären Aufenthaltsdauer in Tagen ermittelt werden (zweiseitige Signifikanz $p = 0,63$). Eine Übersicht der ermittelten Ergebnisse liefert Tabelle 9 und das Boxplotdiagramm 4.

Experimental- oder Kontrollgruppe nach Kolonieform	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Interquartilbereich	Minimum	Maximum	Anzahl der Patienten
Experimentalgruppe, SCV +/- N	134,62	102,081	91,00	144,5	21	372	21
Kontrollgruppe, nur N	115,79	87,052	97,50	103,5	10	407	42

Tab. 9: Mittelwerte der Osteomyelitis-bedingten Hospitalisationsdauer

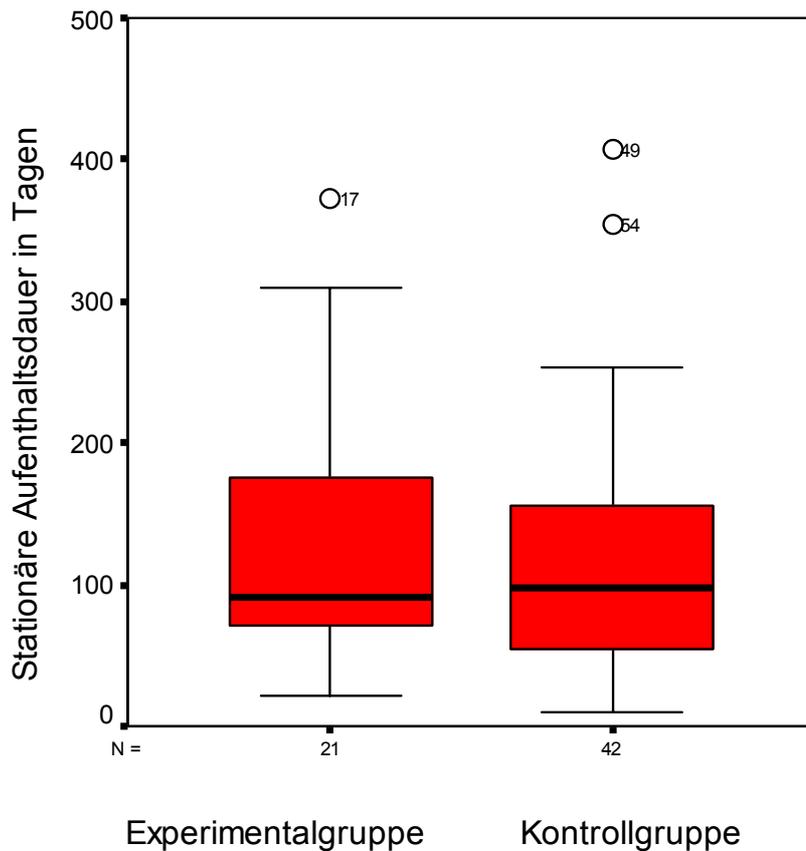


Abb. 4: Boxplotdiagramm zur Osteomyelitis-bedingten Hospitalisationsdauer. Gezeigt wird die Dauer der Osteomyelitis in Tagen für die Experimental- und die Kontrollgruppe. Die Box stellt den Interquartilbereich mit 50% der Werte dar. Die quer über die Box gelegte Linie gibt die Lage des Medians wieder. Ausreißer sind mit der Nummer des jeweiligen Patienten angegeben.

4.1.7 Assoziation von *S. aureus* SCVs und lokaler Gentamicin-Therapie

Durch eine kontinuierliche Exposition von *S. aureus* gegenüber subinhibitorischen Konzentrationen des Aminoglykosids Gentamicin konnte in *in vitro*-Experimenten die Entstehung von SCVs belegt werden (3, 73, 78). Auch *in vivo* erscheint eine Induktion bzw. Selektion von SCVs durch Gentamicin möglich. Zur Überprüfung dieser Fragestellung wurde das Auftreten der SCVs von *S. aureus* nach einer lokalen Gentamicin-Applikation bei 63 Patienten mit Osteomyelitis untersucht. Patienten mit oder ohne vorausgegangener, lokaler

Gentamicin-Gabe wurden in die Studie eingeschlossen. Insgesamt 30 (48%) von 63 Osteomyelitis-Patienten erhielten vor der mikrobiologischen Materialentnahme eine lokale Gentamicin-Therapie in Form von PMMA-Ketten, Kollagenschwämmen oder Knochenzement. 13 (62%) von 21 Patienten mit einem *S. aureus* SCV-Isolat erhielten vor der mikrobiologischen Probenentnahme eine lokale Gentamicin-Applikation. Bei den verbleibenden 8 (38%) Patienten konnte keine vorausgegangene Gentamicin-Gabe nachgewiesen werden, obwohl *S. aureus* SCVs isoliert wurden. Jedoch erhielten auch 17 (40%) von 42 Osteomyelitis-Patienten, bei denen nur *S. aureus* vom normalen Phänotyp isoliert wurde, im Verlauf der Therapie Gentamicin lokal. Insgesamt ergab sich in der Studienpopulation keine statistische Signifikanz (χ^2 -Test nach Pearson: $p = 0,108$) für das Auftreten von *S. aureus* SCVs nach einer vorausgegangenen lokalen Gentamicin-Therapie. Der prozentuale Anteil der Patienten mit einer lokalen Gentamicin-Applikation war jedoch in der Experimentalgruppe (SCV vorhanden) höher als in der Kontrollgruppe (nur normaler Phänotyp von *S. aureus* vorhanden), so dass in dieser Studienpopulation von einem Trend, jedoch nicht von einer signifikanten Assoziation zwischen Gentamicin-Gabe und nachfolgender SCV-Induktion/Selektion ausgegangen werden kann.

4.1.7.1 Eingesetzte Gentamicin-Präparate

Gentamicin-Polymethylmethacrylat (PMMA)-Ketten bestehen aus kugelförmigen Knochenzementkörpern, die an einem polyfilen chirurgischen Chrom-Nickel-Draht befestigt sind. Sie werden seit 1976 industriell (Septopal[®], Firma Merck, Darmstadt) hergestellt und in Form von 10er-, 30er- und 60er-Kugelketten zu je 4,5 mg Gentamicin-Base pro Kugel sowie 10er- und 20er-Miniketten zu je 1,7 mg Gentamicin-Base pro Kugel angeboten. Weitere Bestandteile der Gentamicin-Kugeln sind Zirconium-(IV)-oxid als Röntgenkontrastmittel und Glycin. 12 Patienten erhielten ausschließlich Polymethylmethacrylat-Ketten als lokale Gentamicin-Träger. In allen Fällen wurde das Präparat Septopal[®] verwendet. Bei 8 Patienten dienten ausschließlich Kollagenschwämme der lokalen Gentamicin-Applikation. Das verwendete Präparat

Sulmycin[®] Implant von Essex Pharma enthält 1,3 mg Gentamicin pro cm² Schwamm. 1 Patient erhielt nur Gentamicin-haltigen Knochenzement in Form des Präparats Refobacin[®]-Palacos[®] R der Firma Merck, welches in 20 g PMMA-Pulver 250 mg Gentamicin neben Zirconiumdioxid (Röntgenkontrastmittel) und Benzoylperoxid (Katalysator) als weitere Substanzen enthält. 6 von 30 Patienten wurde im Verlauf der Behandlung Septopal[®]-Ketten und Sulmycin[®]-Schwämme implantiert. 3 Patienten erhielten vor der mikrobiologischen Probenentnahme Gentamicin in allen drei genannten Applikationsformen. Die folgenden, statistischen Angaben vergleichen die Patientengruppe mit *S. aureus* SCV-Nachweis (Experimentalgruppe, n = 21 Patienten) und die Patientengruppe, bei der nur *S. aureus* des normalen Phänotyps nachgewiesen wurde (Kontrollgruppe, n = 42 Patienten) bezüglich der Gentamicin-Gesamtdosis getrennt nach den drei lokalen Applikationsformen, die die Patienten vor der mikrobiologischen Untersuchung erhalten haben (siehe Tabellen 10-12).

Gentamicin-Dosis in mg:	0	1-500	501-2000	>2000	gesamt
Anzahl der Patienten der Experimentalgruppe	12	4	3	2	21
% der Experimentalgruppe	57,1%	19,0%	14,3%	9,5%	100,0%
Anzahl der Patienten der Kontrollgruppe	30	8	4	0	42
% der Kontrollgruppe	71,4%	19,0%	9,5%	0%	100,0%

Tab. 10: Kumulative Gentamicin-Dosis aus PMMA-Ketten

Obwohl keine statistische Signifikanz vorliegt, deutet der im χ^2 -Test auf linearen Zusammenhang ermittelte, zweiseitige p-Wert von 0,082 eine mögliche Assoziation des Auftretens von *S. aureus* SCVs vor allem im Dosisbereich ab 500 mg Gentamicin-Base an.

Gentamicin-Dosis in mg:	0	1-500	501-2000	>2000	Gesamt
Anzahl der Patienten der Experimentalgruppe	14	5	1	1	21
% der Experimentalgruppe	66,7%	23,8%	4,8%	4,8%	100,0%
Anzahl der Patienten der Kontrollgruppe	32	9	1	0	42
% der Kontrollgruppe	76,2%	21,4%	2,4%	0%	100,0%

Tab. 11: Kumulative Gentamicin-Dosis aus Kollagenschwämmen

Der χ^2 -Test auf linearen Zusammenhang ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,198$) für die kumulative Gentamicin-Dosis aus Kollagenschwämmen zwischen beiden Patientengruppen.

Gentamicin-haltigen Knochenzement in Form des Präparats Refobacin[®]-Palacos[®] R erhielten insgesamt 4 Patienten. 2 Patienten der Experimentalgruppe erhielten 250 mg bzw. 500 mg und 2 Patienten der Kontrollgruppe erhielten 125 mg bzw. 750 mg.

4.1.7.2 Kumulative Gesamtdosis der lokalen Gentamicin-Gaben

Unabhängig von der Galenik der verschiedenen Gentamicin-Träger wurde die vor der mikrobiologischen Materialentnahme lokal verabreichte Gesamtdosis für Gentamicin summiert und für die Experimental- und die Kontrollgruppe verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 erfasst.

Gentamicin-Dosis in Milligramm:		0	1-250	251-500	>500	Gesamt
Experimental- gruppe: SCV +/- normaler Phänotyp von <i>S. aureus</i>	Anzahl der Patienten (n = 21)	8	3	5	5	21
	% der Experimental - gruppe	38,1%	14,3%	23,8%	23,8%	100,0%
Kontrollgruppe: nur normaler Phänotyp von <i>S. aureus</i>	Anzahl der Patienten (n = 42)	25	7	5	5	42
	% der Kontrollgruppe	59,5%	16,7%	11,9%	11,9%	100,0%

Tab. 12: Anzahl der Patienten der Experimental- bzw. der Kontrollgruppe im Bezug auf die vor der mikrobiologischen Materialentnahme lokal verabreichte Gentamicin-Dosis in mg

Zusammenfassend erhielten prozentual mehr Patienten der Experimental- (62%) als Patienten der Kontrollgruppe (40%) eine lokale Gentamicin-Therapie, jedoch war der absolute Anteil der Patienten, die eine lokale Gentamicin-Therapie erhielten in der Kontrollgruppe mit 17 Patienten größer als in der Experimentalgruppe mit 13 Patienten. Statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der Häufigkeit der verwendeten Gentamicin-Träger und der Anzahl der Gaben im Therapieverlauf konnten zwischen beiden Patientengruppen ebenfalls nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Der p-Wert im χ^2 -Test auf Lageunterschiede betrug für diesen Zusammenhang 0,064.

4.2 Mikrobiologische Diagnostik

4.2.1 Genotypische Analyse der klinischen *S. aureus*-Stämme

Bei 20 von 63 Osteomyelitis-Patienten konnten mehrere *S. aureus*-Stämme des normalen Phänotyps und des SCV-Phänotyps isoliert werden. Bei Patient 14 wurden nur 2 *S. aureus*-Stämme des SCV-Phänotyps gewonnen. Um die klonale Identität von insgesamt 142 *S. aureus*-Stämmen der 21 Osteomyelitis-Patienten festzustellen, wurden die Restriktionsfragmente der genomischen DNA nach Restriktion mit dem Enzym *Sma*I pulsfeldgelelektrophoretisch getrennt und die resultierenden Bandenmuster miteinander verglichen. Zwei *S. aureus*-Stämme wurden als klonal identisch eingestuft, wenn ihr Bandenmuster identisch war oder weniger als ein Zwei-Banden-Unterschied bestand. Wenn SCVs und *S. aureus*-Stämme mit normalem Phänotyp bei einem Patienten isoliert werden konnten, waren die jeweiligen Stämme bis auf die folgenden drei Ausnahmen klonal identisch. Bei Patient 18 ergab sich ein Unterschied von 3 Banden zwischen den zwei getesteten, phänotypisch unterschiedlichen *S. aureus*-Stämmen. Bei Patient 7 zeigten 5 von 15 getesteten *S. aureus*-Stämmen zwei zusätzliche Banden, ohne sich jedoch untereinander im Bandenmuster zu unterscheiden. 2 Banden Unterschied waren ebenfalls bei einem *S. aureus*-Wildtypstamm des normalen Phänotyps von Patient 21 zu den übrigen 5 getesteten Stämmen beider Phänotypen festzustellen. Insgesamt 6 *S. aureus*-Stämme von vier Patienten (Patienten 10, 15, 17 und 20) zeigten eine Bande Unterschied zu den übrigen, untereinander klonal identischen Stämmen des jeweiligen Patienten.

Zusammenfassend waren von den 142 in der PFGE untersuchten *S. aureus*-Stämmen von 21 Patienten mit *S. aureus*-SCV-positiver Osteomyelitis 134 (94%) Stämme jeweils klonal identisch und 8 Stämme (6%) von 3 der 21 Patienten nicht klonal identisch. Eine Klonalität von *S. aureus*-Stämmen verschiedener Patienten wurde nicht festgestellt.

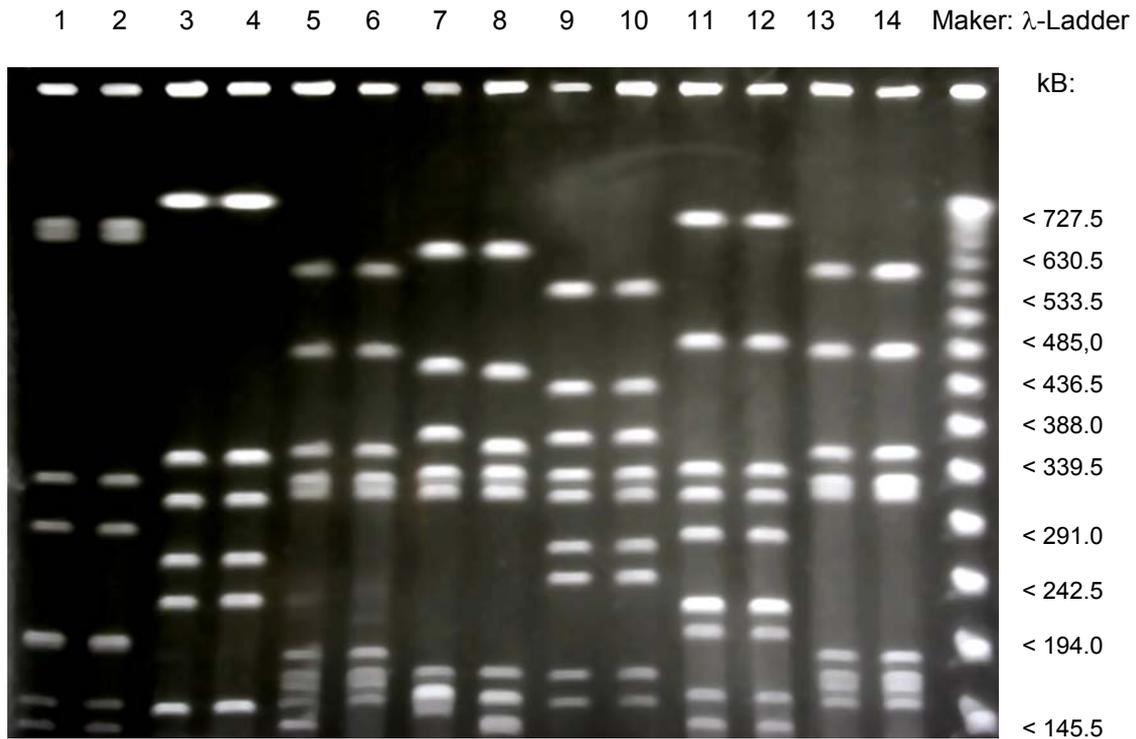


Abb. 5: Pulsfeldgelelektrophoretische Trennung der Restriktionsfragmente von *S. aureus* (SCVs und *S. aureus*-Stämme mit normalem Phänotyp) nach Restriktion mit *Sma*I. Dargestellt ist das Banden-Muster von sieben Patienten mit Osteomyelitis, bei denen *S. aureus*-Stämme (SCVs und/oder *S. aureus*-Stämme mit normalem Phänotyp) ein- oder mehrfach isoliert werden konnten. Wenn SCVs und *S. aureus*-Stämme mit normalem Phänotyp bei einem Patienten isoliert werden konnten, war die Mehrheit der Stämme jeweils klonal identisch. Zwei von acht nicht klonal identischen Stämmen mit einem Unterschied von mehr als einer Bande sind die in Spur 7 und 8 dargestellten Stämme von Patient 18.

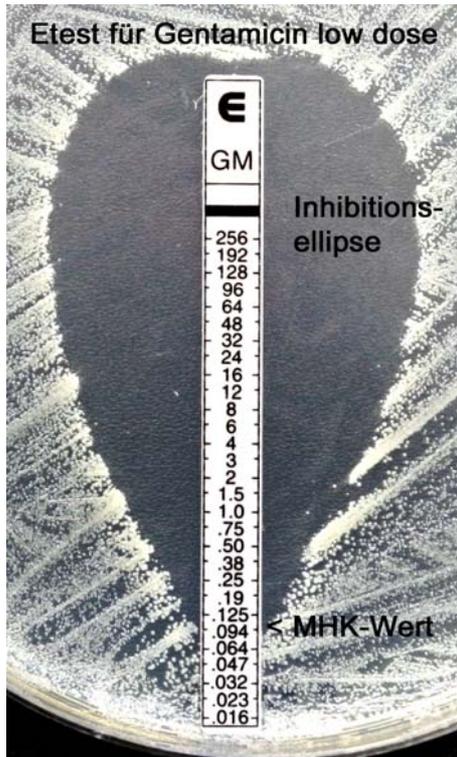
Patient 3: Spur 1-2, Patient 11: Spur 3-4, Patient 17: Spur 5-6, Patient 18: Spur 7-8, Patient 19: Spur 9-10, Patient 10: Spur 11-12, Patient 14: Spur 13-14, Marker: Lambda-Ladder (Referenzbereich von 50-1000 kB) Spur 15

4.2.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Bei der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration für das Aminoglykosid Gentamicin wurden insgesamt 56 *S. aureus*-Stämme von 21 Patienten mit SCV-positiver Osteomyelitis verglichen. Pro Patient wurde einem *S. aureus*-Stamm des normalen Phänotyps mindestens ein klonal identischer Stamm des SCV-Phänotyps gegenübergestellt. Von Patient 14 konnten in Ermangelung eines normalen Phänotyps nur die zwei vorliegenden SCV-Stämme untereinander verglichen werden. Obwohl die zwei phänotypisch unterschiedlichen *S. aureus*-Stämme von Patient 18 gemäß Pulsfeldgelelektrophorese nicht klonal identischen waren, wurde ihre MHK bestimmt und in die Wertung mit einbezogen.

Insgesamt wiesen die SCVs eine bis zu 23-fach höhere minimale Hemmkonzentration für Gentamicin auf (MHK: 1,5 µg/ml) im Vergleich zu den von den gleichen Patienten isolierten Elternstämmen (0,064 µg/ml). Die 35 getesteten SCV-Stämme zeigten im Mittel eine um den Faktor 7 erhöhte MHK für Gentamicin gegenüber den 21 betrachteten Elternstämmen. Sofern von den 20 vergleichbaren Patienten mit unterschiedlichen *S. aureus*-Phänotypen und mehreren, getesteten SCV-Isolaten nur die jeweils minimalen MHK-Werte in Betracht gezogen wurden, wiesen die SCVs eine 4-fach höhere MHK für Gentamicin gegenüber ihren Elternstämmen auf. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 16 im Anhang wiedergegeben.

S. aureus vom normalen Phänotyp



S. aureus SCV



Abb. 6: Vergleich der Gentamicin-Empfindlichkeit von zwei klonal identischen *S. aureus*-Stämmen des normalen bzw. des SCV-Phänotyps von Patient 5 mittels Etest®-Streifen (low dose: 0,016-256 µg/ml) auf Müller-Hinton-Agar. Der SCV-Stamm ist mit einem MHK-Wert von 2 µg/ml deutlich resistenter gegenüber Gentamicin als der entsprechende *S. aureus*-Stamm vom normalen Phänotyp mit dem MHK-Wert von 0,094 µg/ml (Faktor 21).

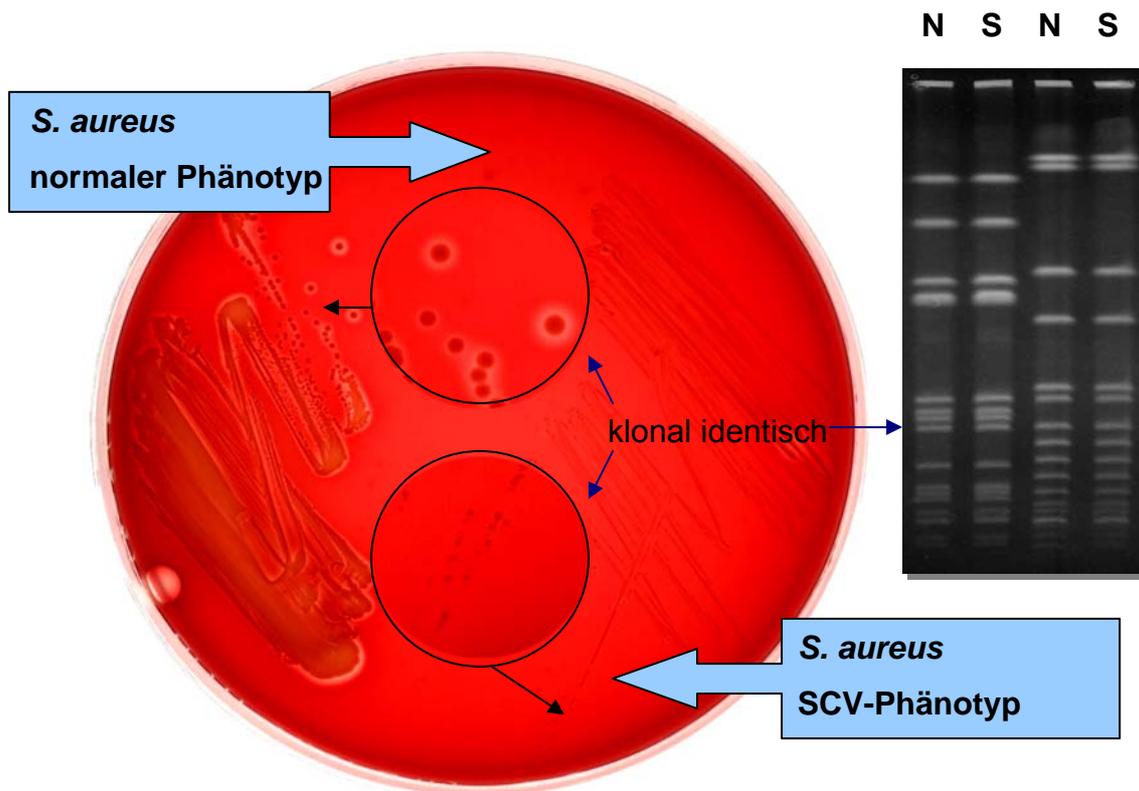


Abb. 7: Vergleich der Koloniemorphologie zweier phänotypisch unterschiedlicher *S. aureus*-Stämme auf Columbia-Agar, die aufgrund des korrespondierenden Bandenmusters der Pulfeldgelelektrophorese (rechts) klonal identisch sind. (N = normaler Phänotyp, S = SCV-Phänotyp)

4.2.3 Vergleichende Biotypisierung der klonalen *S. aureus*-Stämme

Von 20 Osteomyelitis-Patienten mit phänotypisch unterschiedlichen *S. aureus*-Stämmen wurden anhand des ID 32 STAPH-Identifizierungssystems für Staphylokokken (Bio-Mérieux, Marcy-l'Etoile, Frankreich) insgesamt 35 SCV-Stämme mit 20 klonal identischen Stämmen des normalen Phänotyps verglichen. Alle 55 getesteten Stämme wurden nach 24 Stunden Inkubation anhand des Farbindikatormusters in den Mikrotiterröhrchen und phänotypisch anhand der Koloniemorphologie auf den parallel angesetzten Columbia-Agar-Platten als *S. aureus* identifiziert. Die klonal identischen SCV-Stämme zeigten untereinander eine hohe Variabilität für den Zeitpunkt des Farbindikatorumschlags der getesteten Reaktionen. Deshalb wurde für jede Reaktion nur der

jeweilige Minimalwert der untersuchten SCV-Stämme mit dem Zeitpunkt des Farbindikatorschlags des klonal identischen *S. aureus*-Wildtypstamms verglichen. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 14 und 15 zusammengefasst.

Patient	Glucose	Fructose	Maltose	Trehalose	Saccharose	Mannit	Mannose	Turanose	Lactose	N-Acetyl-Glukosamin	Urease	Arginin-dehydrolase	alkalische Phosphatase
1	1	1	0	1	1	1	1	0	24	0	0	24	0
2	0	0	2	2	1	17	17	0	0	0	0	0	0
3	19	19	19	19	19	43	0	> 1	24	0	> 24	24	0
4	1	1	1	2	2	45	0	0	0	0	0	0	0
5	3	3	3	1	3	3	17	0	0	0	0	24	0
6	1	1	3	3	3	0	17	0	0	0	>1	0	0
7	21	21	21	21	21	> 45	17	24	24	17	2	> 24	0
8	3	2	3	2	2	20	18	24	24	24	0	> 24	24
9	3	3	3	1	1	44	41	24	41	24	0	24	0
10	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0
11	3	3	20	20	3	> 44	18	> 1	0	> 41	0	0	24
12	3	3	3	3	3	3	17	0	0	0	0	0	0
13	20	20	20	20	21	20	18	24	0	0	0	0	0
15	3	3	2	3	3	17	17	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	2	2	1	3	3	1	0	0	44	0	0	0	0
18	2	0	0	0	0	0	2	0	0	> 24	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	1	20	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0
21	3	3	3	3	3	3	> 41	0	0	0	0	> 1	0

Tab. 13: Minimalwerte der Latenz des Farbindikatorschlags (in Stunden) für alle isolierten *S. aureus* SCVs zu einem jeweils klonal identischen Wildtypstamm. Werte mit einem > -Zeichen implizieren, dass der SCV-Stamm im Gegensatz zum Wildtypstamm auch nach 48 Stunden noch keinen Umschlag des Farbindikators zeigte.

Latenz in Stunden:	Glucose	Fructose	Maltose	Trehalose	Saccharose	Mannit	Mannose	Turanose	Lactose	N-Acetyl-Glucosamin	Urease	Arginin-dehydrolase	alkalische Phosphatase
0	3	4	4	3	3	4	6	14	14	15	17	13	18
1	5	4	3	4	4	3	1	0	0	0	0	0	0
2	2	2	2	3	2	4	2	0	0	0	1	0	0
3	7	6	7	6	8	4	0	0	0	0	0	0	0
4-20	2	3	3	3	1	4	9	0	0	1	0	0	0
21-40	1	1	1	1	2	0	0	4	4	2	0	4	2
41-45	0	0	0	0	0	3	1	0	2	0	0	0	0
n. b.*	0	0	0	0	0	2	1	2	0	2	2	3	0

Tab. 14: Anzahl der Patienten im Bezug auf die Latenz des Farbindikatorumschlags von *S. aureus*-SCV-Isolaten zu klonal identischen *S. aureus*-Isolaten des normalen Phänotyp von 20 Patienten mit Osteomyelitis. (* n. b. = Latenz nicht beurteilbar, da für den SCV-Stamm nach 48 h noch kein Umschlag des Farbindikators eingetreten ist)

Abgesehen von Patient 16 und Patient 19, die keine zeitlichen Unterschiede bezüglich des Farbindikatorumschlags beider *S. aureus*-Phänotypen zeigten, wiesen die getesteten *S. aureus*-SCVs der übrigen 18 Patienten gleiche oder um Stunden verzögerte Reaktionsgeschwindigkeiten für die Umsetzung des jeweiligen Substrats auf. Die Fermentation der Zucker Glucose, Fructose, Maltose, Trehalose, Saccharose und Mannit erfolgte bei der Mehrheit der SCV-Stämme 0 bis 3 Stunden verzögert zu den klonal identischen *S. aureus*-Stämmen des normalen Phänotyps. Mannose wurde bei 9 Patienten von den SCV-Stämmen 4 bis 20 Stunden später fermentiert als vom entsprechenden klonal identischen Wildtypstamm, bei 6 weiteren Patienten ergaben sich zwischen beiden Phänotypen hingegen keine zeitlichen Unterschiede. Turanose, Lactose, N-Acetyl-Glucosamin, Urease, Arginin-Dehydrolase und alkalische Phosphatase wurden bei der Mehrzahl der Patienten von beiden *S. aureus*-Phänotypen ohne zeitliche Unterschiede umgesetzt.

4.2.4 Nachweis des Auxotrophismus der klinischen *S. aureus* SCV-Isolate

Insgesamt wurden 47 SCV-Stämme von 21 Patienten mit chronischer Osteomyelitis auf einen Auxotrophismus für Hämin und/oder Menadion und/oder Thymidin getestet. 22 (47%) der 47 SCV-Stämme zeigten einen eindeutigen Auxotrophismus, davon waren 21 (45%) Stämme Hämin-auxotroph und ein Stamm (2%) Menadion-auxotroph. Ein SCV-Stamm zeigte einen doppelten Auxotrophismus für Menadion und Hämin. Trotz wiederholter Testung konnte bei ungenügendem oder diffusem Koloniewachstum für die übrigen 25 (53%) SCV-Stämme kein eindeutiger Auxotrophismus nachgewiesen werden.

13 (62%) von 21 Patienten hatten mindestens einen nachweisbar auxotrophen SCV-Stamm. Bei 5 von 21 Patienten konnten nur einen Hämin-auxotrophen SCV-Stamm identifiziert werden. Bei 4 von 21 Patienten wurden 2 Hämin-auxotrophe Stämme nachgewiesen.

Patient 10 beherbergte 3 Hämin-auxotrophe Stämme, von Patient 12 konnten 4 verschiedene Hämin-auxotrophe Stämme isoliert werden, Patient 5 hatte einen für Hämin und Menadion doppelt auxotrophen Stamm und bei Patient 15 wurde ein nur für Menadion auxotropher SCV-Stamm nachgewiesen. Trotz wiederholter Testung ließ sich für *S. aureus* SCV-Stämme aus Isolaten der verbliebenen 8 von 21 Patienten kein eindeutiger Auxotrophismus nachweisen. In diesen Fällen waren die Nährböden mit chemisch definiertem Medium diffus von Kolonien unterschiedlicher Größe überwuchert, während auf Blutagar die typischen, nadelspitzgroßen Kolonien wuchsen.

5 Diskussion

SCVs sind als koloniemorphologische Subpopulation des normalen Phänotyps von *S. aureus* seit fast einem Jahrhundert bekannt (2, 30, 31, 85, 135, 136). Typische Charakteristika der Elektronentransport-defizienten, kleinen Kolonievarianten von *S. aureus* sind ein langsames Wachstum (ca. 6 bis 9-fach verlängerte Generationszeit) von nadelspitzgroßen, meist unpigmentierten und nicht hämolysierenden Kolonien, eine gegenüber dem normalen Phänotyp 10-fach geringere Koloniegröße und ein Auxotrophismus gegenüber Hämin und/oder Menadion bzw. gegenüber Thymidin. Ihre Rolle als Verursacher chronischer und rekurrierender Infektionen ist erst in den letzten 10 Jahren erkannt worden (80, 81, 82, 83, 110, 111, 120, 121). Belege hierfür liefern eine Vielzahl von Einzelfallberichten, aber nur wenige Studien mit größeren Patientenkollektiven (siehe Tabelle 1, Anhang).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine phänotypische, genotypische und biochemische Charakterisierung von klinischen *S. aureus* SCVs vorgenommen, die von Patienten mit Osteomyelitis isoliert worden sind. Nach der Identifizierung des Phänotyps von *S. aureus* wurden die Patienten in eine Experimental- (SCV und ggf. normaler Phänotyp) und in eine Kontrollgruppe (nur normaler Phänotyp) eingeteilt.

Ziel der Arbeit war es, im Rahmen einer retrospektiven Fall-Kontroll-Studie Unterschiede der Krankheitsverläufe beider Patientengruppen herauszustellen, um Rückschlüsse auf die klinische Relevanz von *S. aureus* SCVs bei rekurrierenden Osteomyelitiden zu ziehen. Ferner wurde die Hypothese, dass *S. aureus* SCVs auch *in vivo* durch die Implantation von Gentamicin-haltigen PMMA-Ketten, Kollagenschwämmen oder Knochenzement induziert bzw. selektioniert werden, untersucht.

In der vorliegenden Studie konnte erstmals die Prävalenz von *S. aureus* SCVs für eine definierte, umfangreiche Patientenpopulation mit Osteomyelitis demonstriert werden. Über einen Zeitraum von dreieinhalb Jahren wurden *S. aureus* SCVs bei 21 (33%) von insgesamt 63 Patienten mit Osteomyelitis intraoperativ isoliert. 45 (15%) von 297 untersuchten *S. aureus*-Stämmen waren SCVs.

In einer prospektiven Fall-Kontroll-Studie, die 14 Patienten mit chronischer und therapierefraktärer Osteomyelitis umfasste, waren 29% der Patienten, die zuvor Gentamicin-PMMA-Ketten erhalten hatten, mit SCVs infiziert (120). Bei Mukoviszidose-Patienten konnte eine Prävalenz der SCVs von 22% der *S. aureus*-Stämme (87) bzw. bei 49% der untersuchten Patienten festgestellt werden (43).

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die Experimental- und die Kontrollgruppe bezüglich der Demographie, der Ätiologie und der Lokalisation der Osteomyelitis verglichen sowie histologische, radiologische und klinische Zeichen der Knochenmarksentzündung für beide Gruppen statistisch erfasst. In Analogie zu früheren Studien über Osteomyelitis (60, 71, 76, 104, 126, 128, 129) waren Männer mittleren Alters (MD = 52 Jahre) bei einem Geschlechterverhältnis von 2,7:1 bevorzugt von der Erkrankung betroffen. *S. aureus* war bei allen untersuchten Patienten mit Osteomyelitis vorhanden und in Rein- oder Mischkultur der dominierende Erreger. Auch die bevorzugte Lokalisation der Osteomyelitis im Bereich der langen Röhrenknochen der unteren Extremität, insbesondere von Femur und Tibia - meist verursacht durch posttraumatische oder postoperative Infektionen - entspricht den Ergebnissen anderer Untersucher (38, 76, 129). Vor dem Auftreten der Osteomyelitis wurden zwischen der Experimental- und der Kontrollgruppe keine statistisch signifikanten Unterschiede im Bezug auf die Häufigkeit von prädisponierenden Faktoren für eine *S. aureus*-Infektion wie Diabetes mellitus, Weichteilinfektionen, Frakturen, septischen Krankheitsbildern und Fremdkörperimplantaten festgestellt. Radiologische, histologische bzw. laborchemische Zeichen der Osteomyelitis wurden für alle in die Studie eingeschlossenen Patienten nachgewiesen. Nachdem die Repräsentativität und Vergleichbarkeit beider Patientengruppen herausgestellt worden ist, wurde die Erkrankungsdauer, die Hospitalisationsdauer, die Anzahl der Operationen und der Einsatz lokaler Gentamicin-Träger für beide Gruppen verglichen, um Rückschlüsse auf den Einfluss der SCVs von *S. aureus* auf den Krankheitsverlauf zu ziehen. In der Vergangenheit ist die Assoziation von *S. aureus* SCVs mit chronisch persistierenden und rekurrierenden Infektionen mehrfach beschrieben worden (1, 28, 43, 58, 70, 121, 122).

S. aureus SCVs konnten besonders häufig von Patienten mit persistierender oder therapierefraktärer Osteomyelitis isoliert werden, deren Erkrankungsverläufe durch lange beschwerdefreie Intervalle zwischen Episoden der akuten Entzündung gekennzeichnet waren (2, 14, 27, 80, 83, 86, 111, 120). In dieser Arbeit zeigten Osteomyelitis-Patienten mit einer Kolonisation von *S. aureus* SCVs eine um den Faktor 2,7 verlängerte mediane Erkrankungsdauer gegenüber den Patienten, bei denen ausschließlich der normale Phänotyp von *S. aureus* isoliert werden konnte. Patienten, die von *S. aureus*-SCVs kolonisiert waren, hatten ein Jahr nach Primärdiagnose und vergleichbarer Therapie signifikant mehr Exazerbationen der Osteomyelitis. Dies konnte nicht durch Unterschiede im klinischen Profil zwischen beiden Patientengruppen erklärt werden. Ob jedoch ausschließlich die Präsenz von SCVs das Therapieversagen (rekurrierende Infektion) verursacht hat, konnte aufgrund der individuellen Therapieverläufe nicht eindeutig belegt werden. Zwischen beiden Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl der Operationen und der stationären Aufenthaltsdauer über den gesamten Therapieverlauf der Osteomyelitis ermittelt werden. Daher scheint der Therapieaufwand beider Patientengruppen vergleichbar zu sein. Die Behandlung der Osteomyelitis-Patienten, die von *S. aureus* SCVs kolonisiert waren, erforderte jedoch einen längeren Zeitraum als bei Patienten, die ausschließlich den normalen Phänotyp beherbergten. Eine Erklärung für die Beobachtung von *S. aureus* SCVs im Zusammenhang mit chronischen, Antibiotika-refraktären Infektionen und einer monate- bis jahrelangen Persistenz der Erreger lieferten mehrere *in vitro*-Studien mit klinischen und konstruierten SCV-Stämmen, die gegenüber dem Wildtypstamm von *S. aureus* eine deutlich erhöhte intrazelluläre Persistenz aufwiesen (3, 43, 116). Das intrazelluläre Überleben der SCVs als wahrscheinliche Ursache von rekurrierenden Infektionen basiert auf einer verminderten Produktion von Virulenzfaktoren wie α -Toxin, welche eukaryotische Zellen in Konzentrationen, die der Wildtypstamm freisetzt, normalerweise lysieren würden (11). Dadurch sind die SCVs vor der Immunantwort des Wirtes und vor der Wirkung der Antibiotika abgeschirmt (16).

Die signifikant niedrigere Anzahl von Amputationen in der Experimentalgruppe könnte auf eine verminderte lytische Degeneration der Wirtszellen in Anwesenheit des SCV-Phänotyps von *S. aureus* hindeuten, denn Gentamicin-induzierte *S. aureus* SCVs sind nachweislich genauso infektiös, aber weniger virulent als die entsprechenden Wildtypstämme des normalen Phänotyps (78). Neben einer systemischen Antibiotikatherapie stellt die Implantation von Gentamicin-PMMA-Ketten, -Kollagenschwämmen oder -Knochenzement im Anschluss an das operative Debridement eine etablierte Behandlungsmethode der Osteomyelitis dar (17, 42). Auch prophylaktisch finden Gentamicin-PMMA-Ketten, die seit 1976 bzw. Gentamicin-Kollagenschwämme, die seit 1990 kommerziell verfügbar sind, in der Endoprothetik eine breite Anwendung. Mehrere Studien belegen die Effizienz der lokalen Antibiotikatherapie bei Knochen- und Weichteilinfektionen (12, 18, 25, 33, 36, 38, 47, 52, 66, 75, 77, 132, 133), verweisen aber auch auf rekurrende Infektionen durch meist grampositive Erreger bei der Therapie der chronischen Osteomyelitis (47, 110, 114, 133). Da *S. aureus* SCVs *in vitro* durch eine ständige Exposition gegenüber subinhibitorischen Konzentrationen von Gentamicin induziert bzw. selektioniert werden können (3, 67, 73, 78, 83), erscheint ihr Auftreten in Abhängigkeit von einer lokalen Gentamicin-Applikation auch *in vivo* denkbar zu sein. Die Isolierung von *S. aureus* SCVs bei Patienten, die mit Gentamicin-PMMA-Ketten lokal therapiert wurden (111), lässt vermuten, dass die bei langsamer Freisetzung in die lokale Umgebung entstehenden subinhibitorischen Konzentrationen von Gentamicin ein Weg sein könnte, SCVs zu selektionieren. Durch die lokale Applikation entsteht über Wochen und Monate ein kontinuierlich abnehmender Gentamicin-Spiegel (37, 51, 132). Höchstwerte der Gentamicin-Konzentration werden sowohl aus PMMA-Ketten und Knochenzement als auch aus resorbierbaren Kollagenschwämmen am ersten Tag nach ihrer Implantation freigesetzt. Der Hauptteil des Gentamicins aus den resorbierbaren Kollagenschwämmen wird innerhalb von 4 Tagen bis 8 Wochen vollständig und in höheren Konzentrationen freigesetzt als aus PMMA-Ketten, die nur 25% des Wirkstoffanteils über einen Zeitraum von 4 Wochen an die Umgebung abgeben (47).

13 (62%) Patienten der Experimentalgruppe (*S. aureus* SCVs vorhanden), aber auch 17 (40%) Patienten der Kontrollgruppe (ausschließlich normaler Phänotyp von *S. aureus* vorhanden), haben vor der mikrobiologischen Materialentnahme eine lokale Gentamicin-Therapie erhalten. Im Bezug auf die kumulative Gesamtdosis des lokal verabreichten Gentamicins waren zwischen beiden Patientengruppen keine signifikanten Unterschiede feststellbar, obwohl innerhalb der Experimentalgruppe prozentual mehr Patienten eine Gentamicin-Dosis über 250 mg erhalten haben. Demnach sind die Ursachen für das Auftreten von *S. aureus* SCVs bei Patienten mit Osteomyelitis weitaus komplexer als vermutet und eine lokale Gentamicin-Applikation scheint nur ein möglicher Auslöser unter vielen für das Auftreten von SCVs zu sein. Wie beschrieben, sind *S. aureus* SCVs bei 8 Patienten der Experimentalgruppe auch ohne vorausgegangene lokale Antibiotika-Applikation aufgetreten. Für die Entstehung von SCVs *in vivo* müssen folglich weitere Einflussfaktoren wie z. B. Mutationen der *S. aureus*-Stämme, Faktoren der Wirtsabwehr, die systemische Antibiose oder das intrazelluläre Milieu (3, 98, 105, 110) verantwortlich sein. Ob lokale Gentamicin-Träger zur Behandlung der Osteomyelitis weiterhin eingesetzt oder vermieden werden sollen und wie häufig SCVs durch diese *in vivo* induziert bzw. selektiert werden, konnte durch diese Arbeit nicht zweifelsfrei geklärt werden. Hierzu sind weitere Studien bzw. tierexperimentelle Arbeiten notwendig, die die Induktion der SCVs nach lokalen Gentamicin-Gaben im zeitlichen Verlauf untersuchen. Kürzlich wurde bei Gentamicin-induzierten SCVs im *hemH*-Gen, welches an der Hämin-Biosynthese beteiligt ist, eine Deletion entdeckt (89). Ferner konnte die Entstehung der SCVs durch Inaktivierung des DNA-Reparaturenzyms MutS auf eine hohe Mutationsrate zurückgeführt werden (89). SCVs weisen untereinander und im Vergleich zur schnell wachsenden Subpopulation in der Pulsfeldgelelektrophorese - wie auch in dieser Arbeit dokumentiert - leichte Veränderungen des PFGE-Musters auf (43, 66, 80). Diese Beobachtungen deuten möglicherweise auf genetische Mechanismen als primäre Ursache für das Auftreten der SCVs hin. Von klinischen *S. aureus* SCVs sind nach ein- oder mehrfacher Subkultur hohe Reversionsraten zum normalen Phänotyp bekannt (73, 123).

Mögliche phänotypische Veränderungen der *S. aureus*-Stämme im zeitlichen Verlauf konnten in dieser Studie nicht erfasst werden, da der Zeitpunkt der mikrobiologischen Materialentnahme durch die operative Therapie determiniert wurde und unabhängig von der lokalen Gentamicin-Therapie war. Aufgrund einer herabgesetzten Aufnahme in die Zelle sind SCVs gegenüber Aminoglykosiden wie Gentamicin resistenter als der normale Phänotyp von *S. aureus*. Die untersuchten SCV-Stämme der Osteomyelitis-Patienten zeigten eine bis zu 23-fach verminderte Gentamicin-Empfindlichkeit gegenüber klonal identischen Stämmen des normalen Phänotyps. Die herabgesetzte Empfindlichkeit für Aminoglykoside und andere positiv geladene Antibiotika konnte inzwischen auf ein herabgesetztes Membranpotential der SCVs zurückgeführt werden, welches wiederum auf einem erniedrigten Elektronentransport beruht (5, 29, 61, 68, 83). Die meisten phänotypischen und metabolischen Charakteristika der *S. aureus* SCVs basieren auf Veränderungen der Elektronentransportkette (70, 81, 112, 121). Der reduzierte Metabolismus der Elektronentransport-defizienten kleinen Kolonievvarianten spiegelt sich im Vergleich zu den klonal identischen Stämmen vom normalen Phänotyp in einem verzögerten bis fehlenden Umsatz von Kohlenhydraten wider. Die Fermentation von Glukose, Fruktose, Mannose, Mannit, Maltose, Trehalose und Saccharose war bei den untersuchten SCVs deutlich verzögert, während Turanose, Laktose, alkalische Phosphatase, N-Acetyl-Glucosamin und andere Reaktionsmedien annähernd gleich schnell von den SCVs wie vom normalen Phänotyp umgesetzt wurden. SCVs sind häufig auxotroph für Menadion, Hämin oder Thymidin, Komponenten, die für die Biosynthese der Elektronentransportkette benötigt werden. Nach Supplementierung dieser Komponenten können SCVs in die normale Koloniform revertieren und zeigen wieder die biochemischen Charakteristika und die erhöhte Empfindlichkeit für Antibiotika der Wildtypstämme von *S. aureus* (3, 61, 80, 83, 110, 111). Annähernd die Hälfte der getesteten SCV-Stämme wies einen eindeutigen Auxotrophismus für Hämin und/oder Menadion auf, während ein Auxotrophismus für Thymidin nicht belegt werden konnte. Obwohl die übrigen Stämme phänotypisch und biochemisch als SCVs identifiziert wurden, zeigten sie auf CDM-Agar im wiederholten Versuchsansatz ein diffuses

Wachstum von unpigmentierten Kolonien unterschiedlicher Größe. Die beobachteten Unterschiede des Auxotrophismus, der Gentamicin-Empfindlichkeit und der biochemischen Reaktionen von klonal identischen SCVs untereinander könnten auf eine unterschiedliche Funktionalität der Elektronentransportkette und damit auf eine individuelle Reversionsrate der klinischen Stämme zurückzuführen sein. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die Prävalenz des SCV-Phänotyps und seine Assoziation mit chronischen Verläufen der Osteomyelitis verdeutlicht werden. Im Vergleich zu klonal identischen Stämmen des normalen Phänotyps wiesen die klinischen SCV-Isolate eine deutlich verminderte Fermentation der Kohlenhydrate und verminderte Gentamicin-Empfindlichkeit auf, die auf Defekte der Elektronentransportkette und damit auf ein herabgesetztes Membranpotential zurückzuführen sind. Klonal identische SCV-Stämme zeigten untereinander eine deutliche Heterogenität bezüglich der Gentamicin-Empfindlichkeit, der Kohlenhydratfermentation und des Auxotrophismus, die vermutlich auf unterschiedlichen Aktivitätsgraden der Elektronentransportkette beruhen.

Statistisch konnte das Auftreten der SCVs von *S. aureus* *in vivo* nicht allein auf eine lokale Gentamicin-Applikation aus PMMA-Ketten, Knochenzement und Kollagenschwämmen als etablierte Therapiemethode der Osteomyelitis zurückgeführt werden, obwohl *in vitro*-Experimente und eine Vorläuferstudie diese Verbindung nahe legen. Die Wandlungsfähigkeit von *S. aureus* scheint damit auf komplexen genetischen Mechanismen und Alterationen der Elektronentransportkette zu beruhen, die aktuell weiter entschlüsselt werden.

S. aureus nutzt als extrazellulärer Erreger von akut-aggressiven Infektionsverläufen durch die Ausbildung von SCVs als intrazelluläre Subpopulation eine potente Strategie gegen die Wirtsabwehr und die Antibiotikatherapie. Das Vorhandensein von SCVs stellt damit sowohl für das Laboratoriumspersonal als auch für den klinisch tätigen Arzt eine besondere Herausforderung dar. Die Detektion der nadel-spitzgroßen Kolonien erfordert eine mindestens 48-72-stündige Inkubation auf festen Nährmedien. Zudem sind die reduzierten bis fehlenden Stoffwechselleistungen bzw. Enzymaktivitäten bei ihrer Differenzierung zu beachten. Ferner kann die atypische Koloniemorphologie der SCVs bei

gleichzeitigem Vorhandensein der Wildtypform zur fälschlichen Annahme einer Mischkultur führen (82, 83). Ein Therapieversagen - insbesondere bei chronisch-persistierenden Verläufen der Osteomyelitis - kann auch auf eine unerkannte Infektion mit *S. aureus* SCVs zurückzuführen sein, da sie im Vergleich zum Wildtypstamm des normalen Phänotyps resistenter gegenüber Aminoglykosiden und anderen Antibiotika sein können (3, 5, 73, 78, 83, 107, 120).

6 Zusammenfassung

Staphylococcus aureus Small Colony Variants (SCVs) repräsentieren eine Elektronentransport-defiziente Subpopulation von *S. aureus*, die auf festen Kulturmedien ein langsames Wachstum von nadelspitzgroßen Kolonien zeigen. Ihre Fähigkeit zur intrazellulären Persistenz und ihre verminderte Antibiotikaempfindlichkeit sind für die Assoziation der SCVs mit chronisch rezidivierenden Infektionen von besonderer Bedeutung. In dieser Studie konnten insbesondere Hämin- und Menadion-auxotrophe SCVs als Erreger der chronisch rekurrenden Osteomyelitis identifiziert werden.

Um den Einfluss von *S. aureus* SCVs auf den Erkrankungsverlauf bei Patienten mit Osteomyelitis zu bestimmen, wurde eine 42-monatige Fall-Kontroll-Studie durchgeführt, bei der nur Patienten mit einem *S. aureus*-Nachweis unabhängig vom Phänotyp berücksichtigt wurden. *S. aureus* SCVs wurden bei 21 von 63 Patienten mit Osteomyelitis meistens gleichzeitig mit *S. aureus*-Stämmen des normalen Phänotyps isoliert. Mit SCVs kolonisierte Patienten hatten eine 2,7-fach längere mediane Erkrankungsdauer und signifikant mehr rekurrende Infektionen ein Jahr nach Primärdiagnose und Therapie der Osteomyelitis als solche Patienten, die nur den normalen Phänotyp beherbergten.

Durch die Pulsfeldgelelektrophorese wurde für die Mehrzahl der SCVs und der zeitgleich isolierten Normaltyp-Stämme die klonale Identität demonstriert. In 26 von 34 SCV/Normaltyp-Paaren zeigten *S. aureus*-Isolate des SCV-Phänotyps eine bis zu 23-fach niedrigere Gentamicin-Empfindlichkeit als *S. aureus*-Isolate des normalen Phänotyps. Bei 19 von 21 Patienten wiesen die SCV-Isolate eine verlangsamte Kohlenhydratfermentation gegenüber dem Normaltyp auf. Die Auxotrophismus-Testung ergab Hämin- und/oder Menadion-Abhängigkeiten für einen Teil der SCV-Isolate.

In vitro können SCVs durch subinhibitorische Konzentrationen des Aminoglykosids Gentamicin induziert werden, während *in vivo* in dieser Studienpopulation, bei Patienten mit Osteomyelitis, denen Gentamicin lokal verabreicht wurde, ein Trend, jedoch nicht eine signifikante Assoziation bezüglich des Auftretens von SCVs gezeigt werden konnte. Die Ergebnisse

dieser Studie weisen *S. aureus* SCVs als bedeutende und Gentamicin-resistente Erreger chronisch rekurrierender Verläufe der Osteomyelitis aus. Daher sollte das Laboratoriumspersonal speziell nach diesen kleinen Kolonievarianten suchen und der klinisch tätige Arzt gegebenenfalls die Therapie anpassen, wenn sie isoliert werden konnten.

7 Literatur

1. Abele-Horn M, Schupfner B, Emmerling P, Waldner H, Goring H (2000) Persistent wound infection after herniotomy associated with small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Infection* 28: 53-54.
2. Acar JF, Goldstein FW, Lagrange P (1978) Human infections caused by thiamine- or menadione-requiring *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 8: 142-147.
3. Balwit JM, van Langevelde P, Vann JM, Proctor RA (1994) Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. *J Infect Dis* 170: 1033-1037.
4. Bates DM, Von Eiff C, McNamara PJ *et al.* (2003) *Staphylococcus aureus* *menD* and *hemB* mutants are as infective as the parent strains, but the menadione biosynthetic mutant persists within the kidney. *J Infect Dis* 187: 1654-1661.
5. Baumert N, Von Eiff C, Schaaff F, Peters G, Proctor RA, Sahl HG (2002) Physiology and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* small colony variants. *Microb Drug Resist* 8: 253-260.
6. Becker K, Friedrich AW, Lubritz G, Weilert M, Peters G, Von Eiff C (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.

7. Becker K, Harmsen D, Mellmann A *et al.* (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.
8. Becker K, Von Eiff C, Keller B, Bruck M, Etienne J, Peters G (2005) Thermonuclease gene as a target for specific identification of *Staphylococcus intermedius* isolates: use of a PCR-DNA enzyme immunoassay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 51: 237-244.
9. Bentley R, Meganathan R (1982) Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiol Rev* 46: 241-280.
10. Berger-Bächi B (1996) Update on methicillin resistance mechanisms in *staphylococci*. *Chemother* 42: 19-26.
11. Bhakdi S, Tranum-Jensen J (1991) Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev* 55: 733-751.
12. Blaha JD, Calhoun JH, Nelson CL *et al.* (1993) Comparison of the clinical efficacy and tolerance of gentamicin PMMA beads on surgical wire versus combined and systemic therapy for osteomyelitis. *Clin Orthop* 295: 8-12.
13. Bogensberger S BN, Büttner M (1999) Osteomyelitis. In: Hoffmann-La Roche AG, Urban & Fischer (eds) Roche-Lexikon Medizin. Urban & Fischer, München Stuttgart Jena Lübeck Ulm. 4. Aufl. S 1250-1251
14. Borderon E, Horodniceanu T (1976) [Dwarf colony mutants of "*staphylococcus*": study of three strains isolated from patients with osteosynthesis (author's transl)]. *Ann Microbiol (Paris)* 127: 503-514.

15. Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA (1992) Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *J Clin Microbiol* 30: 1654-1660.
16. Brouillette E, Martinez A, Boyll BJ, Allen NE, Malouin F (2004) Persistence of a *Staphylococcus aureus* small colony variant under antibiotic pressure *in vivo*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 41: 35-41.
17. Calhoun JH, Mader JT (1997) Treatment of osteomyelitis with a biodegradable antibiotic implant. *Clin Orthop* 341: 206-214.
18. Callegan MC, Engel LS, Hill JM, O'Callaghan RJ (1994) Corneal virulence of *Staphylococcus aureus*: roles of alpha-toxin and protein A in pathogenesis. *Infect Immun* 62: 2478-2482.
19. Chuard C, Vaudaux P, Proctor RA, Lew DP (1997) Decreased susceptibility to antibiotic killing of a stable small colony variant of *Staphylococcus aureus* in fluid phase and on fibronectin-coated surfaces. *J Antimicrob Chemother* 39: 603-608.
20. Cierny G, Mader JT, Penninck JJ (2003) A clinical staging system for adult osteomyelitis. *Clin Orthop* 414: 7-24.
21. Cormican MG, Jones RN (1996) Emerging resistance to antimicrobial agents in gram-positive bacteria. *Enterococci, staphylococci* and nonpneumococcal *streptococci*. *Drugs* 51 Suppl 1: 6-12.
22. Dowson CG, Coffey TJ, Spratt BG (1994) Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding-protein-mediated resistance to beta-lactam antibiotics. *Trends Microbiol* 2: 361-366.
23. Drancourt M, Raoult D (2002) *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol* 40: 1333-1338.

24. Eisenberg ES, Mandel LJ, Kaback HR, Miller MH (1984) Quantitative association between electrical potential across the cytoplasmic membrane and early gentamicin uptake and killing in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 157: 863-867.
25. Evans RP, Nelson CL (1993) Gentamicin-impregnated polymethylmethacrylate beads compared with systemic antibiotic therapy in the treatment of chronic osteomyelitis. *Clin Orthop* 295: 37-42.
26. Faber C, Stallmann HP, Lyaruu DM *et al.* (2005) Comparable efficacies of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 and gentamicin in a chronic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis model. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 2438-2444.
27. Gallie WE (1951) First recurrence of osteomyelitis eighty years after infection. *J Bone Joint Surg Br* 33: 110-111.
28. Gilman S, Saunders VA (1986) Uptake of gentamicin by *Staphylococcus aureus* possessing gentamicin-modifying enzymes: enhancement of uptake by puromycin and N,N'-dicyclohexylcarbodiimide. *J Antimicrob Chemother* 18: 301-306.
29. Gilman S, Saunders VA (1986) Accumulation of gentamicin by *Staphylococcus aureus*: the role of the transmembrane electrical potential. *J Antimicrob Chemother* 17: 37-44.
30. Goudie JG, Goudie RB (1955) Recurrent infections by a stable dwarf-colony variant of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Pathol* 8: 284-287.
31. Hale JH (1949) Studies on *Staphylococcus* mutation; an investigation of the growth requirements of a G (gonidial) variant. *Br J Exp Pathol* 30: 297-301.

32. Hale JH (1951) Studies on *staphylococcus* mutation: a naturally occurring "G" gonidial variant and its carbon dioxide requirements. *Br J Exp Pathol* 32: 307-313.
33. Henry SL, Hood GA, Seligson D (1993) Long-term implantation of gentamicin-polymethylmethacrylate antibiotic beads. *Clin Orthop* 295: 47-53.
34. Hollis RJ, Barr JL, Doebbeling BN, Pfaller MA, Wenzel RP (1995) Familial carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and subsequent infection in a premature neonate. *Clin Infect Dis* 21: 328-332.
35. Ichiyama S, Ohta M, Shimokata K, Kato N, Takeuchi J (1991) Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 29: 2690-2695.
36. Ipsen T, Jorgensen PS, Damholt V, Torholm C (1991) Gentamicin-collagen sponge for local applications. 10 cases of chronic osteomyelitis followed for 1 year. *Acta Orthop Scand* 62: 592-594.
37. Jenny JY, Jenny G, Lambert J, Gaudias J, Kempf I (1995) Utility of measurement of gentamicin release from PMMA beads in wound drainage fluid after in-vivo implantation. *Acta Orthop Belg* 61: 10-13.
38. Jerosch J, Lindner N, Fuchs S (1995) [Results of long-term therapy of chronic, post-traumatic osteomyelitis with gentamicin PMMA chains]. *Unfallchirurg* 98: 338-343.

39. Jones RN, Barry AL, Gardiner RV, Packer RR (1989) The prevalence of staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins. A retrospective and prospective national surveillance trial of isolates from 40 medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 12: 385-394.
40. Jones RN, Kehrberg EN, Erwin ME, Anderson SC (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. *Diagn Microbiol Infect Dis* 19: 203-215.
41. Jonsson IM, Von Eiff C, Proctor RA, Peters G, Ryden C, Tarkowski A (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.
42. Joosten U, Joist A, Gosheger G, Liljenqvist U, Brandt B, Von Eiff C (2005) Effectiveness of hydroxyapatite-vancomycin bone cement in the treatment of *Staphylococcus aureus* induced chronic osteomyelitis. *Biomaterials* 26: 5251-5258.
43. Kahl B, Herrmann M, Everding AS *et al.* (1998) Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 177: 1023-1029.
44. Kahl BC, Belling G, Reichelt R, Herrmann M, Proctor RA, Peters G (2003) Thymidine-dependent small colony variants of *Staphylococcus aureus* exhibit gross morphological and ultrastructural changes consistent with impaired cell separation. *J Clin Microbiol* 41: 410-413.

45. Kahl BC, Belling G, Reichelt R, Herrmann M, Proctor RA, Peters G (2003) Thymidine-dependent small colony variants of *Staphylococcus aureus* exhibit gross morphological and ultrastructural changes consistent with impaired cell separation. *J Clin Microbiol* 41: 410-413.
46. Kahl BC, Duebbers A, Lubritz G *et al.* (2003) Population dynamics of persistent *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. *J Clin Microbiol* 41: 4424-4427.
47. Kanellakopoulou K, Giamarellos-Bourboulis EJ (2000) Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections. *Drugs* 59: 1223-1232.
48. Kayser FH (1996) Basic aspects of antibiotic resistance in the multiresistant *Staphylococcus*: An overview. *Chemother* 42: 2-12.
49. Kipp F, Ziebuhr W, Becker K *et al.* (2003) Detection of *Staphylococcus aureus* by 16S rRNA directed in situ hybridisation in a patient with a brain abscess caused by small colony variants. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74: 1000-1002.
50. Kipp F, Becker K, Peters G, Von Eiff C (2004) Evaluation of different methods to detect methicillin resistance in small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 42: 1277-1279.
51. Kipp F, Kahl BC, Becker K *et al.* (2005) Evaluation of two chromogenic agar media for recovery and identification of *Staphylococcus aureus* small colony variants. *J Clin Microbiol* 43: 1956-1959.
52. Klemm KW (1993) Antibiotic bead chains. *Clin Orthop* 295: 63-76.

53. Kloos W (1997) Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. In: Crossley KB, Archer GL (Hrsg) The staphylococci in human disease. Churchill Livingstone, New York 1. Aufl. S 113-138.
54. Kloos WE, Bannerman TL (1994) Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 7: 117-140.
55. Kluytmans JA, Mouton JW, Ijzerman EP *et al.* (1995) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as a major risk factor for wound infections after cardiac surgery. *J Infect Dis* 171: 216-219.
56. Kohler C, Von Eiff C, Peters G, Proctor RA, Hecker M, Engelmann S (2003) Physiological characterization of a heme-deficient mutant of *Staphylococcus aureus* by a proteomic approach. *J Bacteriol* 185: 6928-6937.
57. Kolle W, Hetsch H (1906) Die experimentelle Bakteriologie und die Infektionskrankheiten mit besonderer Berücksichtigung der Immunitätslehre. Ein Lehrbuch für Studierende, Ärzte und Medizinalbeamte. Urban & Schwarzenberg, Berlin
58. Korovessis P, Fortis AP, Spastris P, Droutsas P (1991) Acute osteomyelitis of the patella 50 years after a knee fusion for septic arthritis. A case report. *Clin Orthop Relat Res* 272: 205-207.
59. Levine SE, Esterhai JL, Jr., Heppenstall RB, Calhoun J, Mader JT (1993) Diagnoses and staging. Osteomyelitis and prosthetic joint infections. *Clin Orthop* 295: 77-86.
60. Lew DP, Waldvogel FA (1997) Osteomyelitis. *N Engl J Med* 336: 999-1007.

61. Lewis LA, Li K, Bharosay M *et al.* (1990) Characterization of gentamicin-resistant respiratory-deficient (res-) variant strains of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol* 34: 587-605.
62. Looney WJ (2000) Small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Br J Biomed Sci* 57: 317-322.
63. Mader JT, Shirliff M, Calhoun JH. Staging and staging application in Osteomyelitis (1997) *Clin Infect Dis* 25: 1303-1309.
64. Mader JT, Cripps MW, Calhoun JH (1999) Adult posttraumatic osteomyelitis of the tibia. *Clin Orthop* 360: 14-21.
65. Mader JT, Shirliff ME, Bergquist SC, Calhoun J (1999) Antimicrobial treatment of chronic osteomyelitis. *Clin Orthop* 360: 47-65.
66. Mangeney N, Drollee K, Cloitre V, Bordes M, Faubert E, Dupeyron C (2002) Comparative pulsed-field gel electrophoresis typing of gentamicin-resistant and -susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in France between 1991 and 1998. Changes in antibiotic susceptibility. *J Hosp Infect* 51: 262-268.
67. Massey RC, Buckling A, Peacock SJ (2001) Phenotypic switching of antibiotic resistance circumvents permanent costs in *Staphylococcus aureus*. *Curr Biol* 11: 1810-1814.
68. Mates SM, Eisenberg ES, Mandel LJ, Patel L, Kaback HR, Miller MH (1982) Membrane potential and gentamicin uptake in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 6693-6697.
69. McNamara PJ, Proctor RA (2000) *Staphylococcus aureus* small colony variants, electron transport and persistent infections. *Int J Antimicrob Agents* 14: 117-122.

70. McNamara PJ, Milligan-Monroe KC, Khalili S, Proctor RA (2000) Identification, cloning, and initial characterization of rot, a locus encoding a regulator of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 182: 3197-3203.
71. Morrison IS (1983) Osteomyelitis in adults. *Med J Aust* 1: 255.
72. Mulligan ME, Murray-Leisure KA, Ribner BS (1993) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. *Am J Med* 94: 313-328.
73. Musher DM, Baughn RE, Templeton GB, Minuth JN (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.
74. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1993) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M 2-A 5. PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova
75. Nelson CL, Evans RP, Blaha JD, Calhoun J, Henry SL, Patzakis MJ (1993) A comparison of gentamicin-impregnated polymethylmethacrylate bead implantation to conventional parenteral antibiotic therapy in infected total hip and knee arthroplasty. *Clin Orthop* 295: 96-101.
76. Norden CW (2000) Acute and chronic osteomyelitis. In: Armstrong D, Cohen J (Hrsg) Infectious diseases. Mosby, London Philadelphia St. Louis Sydney Tokyo

77. Patzakis MJ, Mazur K, Wilkins J, Sherman R, Holtom P (1993) Septopal beads and autogenous bone grafting for bone defects in patients with chronic osteomyelitis. *Clin Orthop* 295: 112-118.
78. Pelletier LL, Jr., Richardson M, Feist M (1979) Virulent gentamicin-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *J Lab Clin Med* 94: 324-334.
79. Peters G, Pulverer G (1994) Die Familie der *Micrococcaceae*. In: Brandis H, Eggers HJ, Köhler W, Pulverer G (Hrsg) Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart Jena New York, 1. Aufl. S 350-360.
80. Proctor RA, Balwit JM, Vesga O (1994) Variant subpopulations of *Staphylococcus aureus* as cause of persistent and recurrent infections. *Infect Agents Dis* 3: 302-312.
81. Proctor RA, van Langevelde P, Kristjansson M, Maslow JN, Arbeit RD (1995) Persistent and relapsing infections associated with small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 20: 95-102.
82. Proctor RA, Kahl B, Von Eiff C, Vaudaux PE, Lew DP, Peters G (1998) *Staphylococcal* small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. *Clin Infect Dis* 27 Suppl 1: 68-S74.
83. Proctor RA, Peters G (1998) Small colony variants in *staphylococcal* infections: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Infect Dis* 27: 419-422.
84. Projan SJ, Novick RP (1997) The molecular basis of pathogenicity. In: Crossley KB, Archer GL (Hrsg) The *staphylococci* in human disease. Churchill Livingstone, New York 1. Aufl. S 55-82.

85. Quie PG (1969) Microcolonies (G-variants) of *Staphylococcus aureus*. *Yale J Biol Med* 41: 394-403.
86. Rolauuffs B, Bernhardt TM, Von Eiff C, Hart ML, Bettin D (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.
87. Sadowska B, Bonar A, Von Eiff C *et al.* (2002) Characteristics of *Staphylococcus aureus*, isolated from airways of cystic fibrosis patients, and their small colony variants. *FEMS Immunol Med Microbiol* 32: 191-197.
88. Saruta K, Hoshina S, Machida K (1995) Genetic identification of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction using single-base-pair mismatch in 16S ribosomal RNA gene. *Microbiol Immunol* 39: 839-844.
89. Schaaff F, Bierbaum G, Baumert N *et al.* (2003) Mutations are involved in emergence of aminoglycoside-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*. 293: 427-435.
90. Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP (1991) Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med* 91: 72-75.
91. Schmitz FJ, Mackenzie CR, Hofmann B *et al.* (1997) Specific information concerning taxonomy, pathogenicity and methicillin resistance of *staphylococci* obtained by a multiplex PCR. *J Med Microbiol* 46: 773-778.

92. Schmitz FJ, Von Eiff C, Gondolf M *et al.* (1999) *Staphylococcus aureus* small colony variants: rate of selection and MIC values compared to wild-type strains, using ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin. *Clin Microbiol Infect* 5: 376-378.
93. Schmitz FJ, Fluit AC, Hafner D *et al.* (2000) Development of resistance to ciprofloxacin, rifampin, and mupirocin in methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 3229-3231.
94. Schnitzer RJ, Camagni LJ, Buck M (1943) Resistance of small colony variants (G forms) of a *staphylococcus* toward the bacteriostatic activity of penicillin. *Proc Soc Exp Biol Med* 53: 74-89.
95. Seifert H, Von Eiff C, Fatkenheuer G (1999) Fatal case due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* small colony variants in an AIDS patient. *Emerg Infect Dis* 5: 450-453.
96. Seifert H, Wisplinghoff H, Schnabel P, Von Eiff C (2003) Small colony variants of *Staphylococcus aureus* and pacemaker-related infection. *Emerg Infect Dis* 9: 1316-1318.
97. Sherris JC (1952) Two small colony variants of *Staph. aureus* isolated in pure culture from closed infected lesions and their carbon dioxide requirements. *J Clin Pathol* 5: 354-355.
98. Slifkin M, Merkow LP, Kreuzberger SA, Engwall C, Pardo M (1971) Characterization of CO₂ dependent microcolony variants of *Staphylococcus aureus*. *Am J Clin Pathol* 56: 584-592.
99. Smith CL, Econome JG, Schutt AKS, Cantor CR (1987) A physical map of the *Escherichia coli* K 12 genome. *Science* 236: 1448-1453.

100. Sompolinsky D, Schwartz D, Samra Z, Steinmetz J, Siegman-Igra Y (1985) Septicemia with two distinct strains of *Staphylococcus aureus* and dwarf variants of both. *Isr J Med Sci* 21: 434-440.
101. Spagna VA, Fass RJ, Prior RB, Slama TG (1978) Report of a case of bacterial sepsis caused by a naturally occurring variant form of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 138: 277-278.
102. Spearman P, Lakey D, Jotte S, Chernowitz A, Claycomb S, Stratton C (1996) Sternoclavicular joint septic arthritis with small colony variant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 26: 13-15.
103. Spencer RC (1996) Predominant pathogens found in the European Prevalence of Infection in Intensive Care Study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15: 281-285.
104. Tauchnitz C, Miksits K (1999) Osteomyelitis. In: Hahn H, Falke D, Kaufmann SH, Ullmann U (Hrsg) Medizinische Mikrobiologie. Springer, Berlin Heidelberg New York, S 985-989.
105. Thomas ME (1955) Studies on a CO₂-dependent *staphylococcus*. *J Clin Pathol* 8: 288-291.
106. Tomasz A (1994) Multiple-antibiotic-resistant pathogenic bacteria. A report on the Rockefeller University Workshop. *N Engl J Med* 330: 1247-1251.
107. Townsend DE, Grubb WB, Ashdown N (1983) Gentamicin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pathology* 15: 169-174.
108. van de Rijn I, Kessler RE (1980) Growth characteristics of group A streptococci in a new chemically defined medium. *Infect Immun* 27: 444-448.

109. Vaudaux P, Francois P, Bisognano C *et al.* (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.
110. Vesga O, Groeschel MC, Otten MF, Brar DW, Vann JM, Proctor RA (1996) *Staphylococcus aureus* small colony variants are induced by the endothelial cell intracellular milieu. *J Infect Dis* 173: 739-742.
111. von Eiff C, Kaufbold A, Peters G (1993) Klinik und Pathogenese von Infektionen durch Staphylokokken und Streptokokken. In: Macher E, Kolde G, Bröcker EB (Hrsg) Infektion und Haut. Biermann Verlag, Zülpich, S 63-86.
112. von Eiff C, Herrmann M, Peters G (1995) Antimicrobial susceptibilities of *Stomatococcus mucilaginosus* and of *Micrococcus spp.* *Antimicrob Agents Chemother* 39: 268-270.
113. von Eiff C, Kuhn N, Herrmann M, Weber S, Peters G (1996) *Micrococcus luteus* as a cause of recurrent bacteremia. *Pediatr Infect Dis J* 15: 711-713.
114. von Eiff C, Bettin D, Proctor RA *et al.* (1997) Recovery of small colony variants of *Staphylococcus aureus* following gentamicin bead placement for osteomyelitis. *Clin Infect Dis* 25: 1250-1251.
115. von Eiff C, Becker K, Peters G (1997) Multiresistenz bei klinisch relevanten grampositiven Kokken. *Intensivmed* 34: 655-663.
116. von Eiff C, Heilmann C, Proctor RA, Woltz C, Peters G, Gotz F (1997) A site-directed *Staphylococcus aureus hemB* mutant is a small colony variant which persists intracellularly. *J Bacteriol* 179: 4706-4712.

117. von Eiff C, Lindner N, Proctor RA, Winkelmann W, Peters G (1998) [Development of gentamicin-resistant Small Colony Variants of *S. aureus* after implantation of gentamicin chains in osteomyelitis as a possible cause of recurrence]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 136: 268-271
118. von Eiff C, Heilmann C, Herrmann M, Peters G (1999) Basic aspects of the pathogenesis of staphylococcal polymer-associated infections. *Infection* 27 Suppl 1: S 7-10
119. von Eiff C, Proctor RA, Peters G (2000) *Staphylococcus aureus* small colony variants: formation and clinical impact. *Int J Clin Pract Suppl* 115: 44-49.
120. von Eiff C, Proctor RA, Peters G (2000) Small colony variants of *Staphylococci*: a link to persistent infections. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 113: 321-325.
121. von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G (2001) Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med* 344: 11-16.
122. von Eiff C, Becker K, Metze D *et al.* (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.
123. von Eiff C, Becker K (2003) Small colony variants: another mechanism by which *Staphylococcus aureus* can evade the immune response and antimicrobial therapie. In: Fluit AC, Schmitz FJ (Hrsg) MRSA: Current perspectives. Caister Academic Press, Wymondham 1. Aufl. S 253-273

124. von Eiff C, Lubritz G, Heese C, Peters G, Becker K (2004) Effect of trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis in AIDS patients on the formation of the small colony variant phenotype of *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 48: 191-194.
125. von Eiff C, Jansen B, Kohnen W, Becker K (2005) Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis. *Drugs* 65: 179-214.
126. Voss A, Kresken M (1996) Antibiotic resistance in *staphylococci* in Europe. *Chemother* 42: 13-18.
127. Waldvogel FA, Medoff G, Swartz MN (1970) Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects. 3. Osteomyelitis associated with vascular insufficiency. *N Engl J Med* 282: 316-322.
128. Waldvogel FA, Medoff G, Swartz MN (1970) Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects. *N Engl J Med* 282: 198-206.
129. Waldvogel FA, Medoff G, Swartz MN (1970) Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects (second of three parts). *N Engl J Med* 282: 260-266.
130. Walenkamp GH, van Rens TJ (1982) [Chains of gentamicin-PMMA beads: a new method for the local treatment of osteomyelitis]. *Ned Tijdschr Geneeskd* 126: 2136-2142.
131. Walenkamp GH, Vree TB, van Rens TJ (1986) Gentamicin-PMMA beads. Pharmacokinetic and nephrotoxicological study. *Clin Orthop* 205: 171-183.

132. Walenkamp GH, Vree TB, Guelen PJ, Jongman-Nix B, Huygen PL (1987) [Side effects of gentamicin following implantation of PMMA containing gentamicin in the form of bead chains]. *Aktuelle Probl Chir Orthop* 31: 254-256.
133. Walenkamp GH, Kleijn LL, de Leeuw M (1998) Osteomyelitis treated with gentamicin-PMMA beads: 100 patients followed for 1-12 years. *Acta Orthop Scand* 69: 518-522.
134. Wang J, Calhoun JH, Mader JT (2002) The application of bioimplants in the management of chronic osteomyelitis. *Orthopedics* 25: 1247-1252.
135. Wise RI, Spink WW (1954) The influence of antibiotics on the origin of small colonies (G variants) of *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*. *J Clin Invest* 33: 1611-1622.
136. Wise RI (1956) Small colonies (G variants) of *staphylococci*: isolation from cultures and infections. *Ann N Y Acad Sci* 65: 169-174.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung	SCVs	Small Colony Variants
ATP	Adenosintriphosphat	Tab.	Tabelle
BHI	Brain Heart Infusion	TEM	Transmissionselektronen- mikroskop
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit nach Westergren	TMP	Trimethoprim
C	Celsius	SMX	Sulfamethoxazol
CDM	chemisch definiertes Medium	TSA	Tryptic Soy Agar
CRP	C-reaktives Protein	TSB	Tryptic Soy Bouillon
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Tsd.	Tausend
dl	Deziliter		
Fa.	Firma		
g	Gramm		
h	hora (Stunde)		
kd	Kilodalton		
M	molar, mol/l		
mg	Milligramm		
µg	Mikrogramm		
MH-Agar	Müller-Hinton-Agar		
MHK	minimale Hemmkonzentration		
min	Minuten		
Mio.	Millionen		
µl	Mikroliter		
ml	Milliliter		
N	normaler Phänotyp von <i>S. aureus</i>		
n	Stichprobenumfang		
NCCLS	National Committee of Laboratory Standards		
p	Signifikanzniveau		
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese		
PMMA	Polymethylmethacrylat		
rpm	rounds per minute (Zentrifuge)		
RNA	Ribonukleinsäure		
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>		

8.2 Tabellen mit Ausgangsdaten

Tabelle 1: Publierte Fallberichte und Studien mit Isolierung von *S. aureus* SCVs (modifiziert und erweitert nach⁸⁰⁾)

Jahr ^(Referenz)	Patienten- zahl	Infektion und/oder Untersuchungsmaterial (Anzahl der Patienten)	Kommentar
1951 ⁽³¹⁾	1	Abszess	SCVs wurden auch aus Nasenabstrichen isoliert
1952 ⁽⁹⁷⁾	2	Hautabszess, Wundinfektion mit Cellulitis	unter Penicillin-Therapie
1954 ⁽¹³⁶⁾	8	Urin (5), Rachen (1), Blut (1), Pleuraflüssigkeit (1)	unter Erythromycin-Therapie in prospektiver Urinstudie
1955 ⁽³⁰⁾	1	Handabszess	Nachweis über 7 Monate aus mehreren separaten Eitermaterialien und Nasenabstrichen
1955 ⁽¹⁰⁵⁾	2	Hordeolum (1), Palmarabszess (1)	Nachweis bei einem Patienten auch aus Nasenabstrichen, der zweite Patient war Kontaktperson aus dem gleichen Haushalt
1956 ⁽¹³⁵⁾	2	Verbrennungswunde (1), Sputum (1)	nekrotische Infektion nach Paronychie-Hitzetherapie; Emphysem mit chronischer Bronchitis
1969 ⁽⁸⁵⁾	5	Bakteriämien (4), Endokarditis nach Herzklappenersatz (1)	Nachweis auch in der vorderen Nasenhöhle bei einem Patienten
1971 ⁽⁹⁸⁾	2	Hautabszess	unter Penicillin-Therapie
1976 ⁽¹³⁾	3	chronische Osteomyelitis	Patient mit Osteosynthese
1978 ⁽²⁾	8	Osteomyelitis (3), Blut (3), Hautabszess (1), Liquor (1)	7 weitere Isolate mit instabilen SCVs

Jahr^(Referenz)	Patienten- zahl	Infektion und/oder Untersuchungsmaterial (Anzahl der Patienten)	Kommentar
1978 ⁽¹⁰⁰⁾	1	Pneumonie	nach Brusttrauma
1985 ⁽⁹⁹⁾	1	Bakteriämische Cellulitis	Patient mit Erythema multiforme und Sepsis
1995 ⁽⁸⁰⁾	5	chronische Osteomyelitis, septische Arthritis, Muskelabszess, Sinusitis	persistierende und rekurrierende Infektionen über mehrere Monate bis maximal 54 Jahre
1996 ⁽¹⁰²⁾	1	septische Arthritis des Sternoclaviculargelenks	invasive SCV-Infektion bei einem 11-jährigen Jungen
1997 ⁽¹²⁰⁾	4	chronische Osteomyelitis	prospektive Fall-Kontroll- Studie, SCV-Nachweis nach lokaler Applikation von Gentamicin-PMMA- Ketten
1998 ⁽⁴³⁾	26	Mukoviszidose; Bronchial- sekret, Rachenabstrich	Langzeittherapie mit TMP / SMX
1998 ⁽¹¹¹⁾	1	chronische Osteomyelitis	nach Einlage von Gentamicin-Ketten
1999 ⁽⁹⁵⁾	1	Hüftabszess, Blut	Methicillin-resistenter SCV nach Langzeittherapie eines AIDS-Patienten mit TMP/ SMX
2000 ⁽¹⁾	1	Abszess, Fistel	Persistierende Wundinfektion 13 Monate nach Herniotomie
2001 ⁽¹¹⁶⁾	1	Dyskeratosis follicularis, Morbus Darier	Isolate von infizierter Haut und aus den Nasenvorhöfen einschl. MRSA-SCV über eine 28-monatige Studiendauer

Jahr^(Referenz)	Patienten- zahl	Infektion und/oder Untersuchungsmaterial (Anzahl der Patienten)	Kommentar
2002 ⁽⁸⁶⁾	1	chronische Osteomyelitis	Therapie mit Gentamicin-Ketten, Femurfraktur bei Osteopetrose
2003 ⁽⁹⁶⁾	1	Herzschrittmacher-Infektion, Blut	Schrittmacher-assoziierte Bakteriämie über einen Zeitraum von 7 Monaten
2003 ⁽⁵⁰⁾	1	Hirnabszess	Langzeittherapie mit Rifampicin, Vancomycin, Teicoplanin
2003 ⁽⁴⁶⁾	24	Sputum, tiefer Rachenabstrich	Mukoviszidose-Patienten
2004 ⁽¹¹⁶⁾	3	Nasenabstriche	Studie mit 125 AIDS-Patienten unter TMP/SMX-Prophylaxe

Tab. 15: Gentamicin-Empfindlichkeit, Auxotrophismus und klonale Identität der *S. aureus*-Stämme vom normalen und SCV-Phänotyp von 21 Patienten mit Osteomyelitis

Patienten - name	Isolat - nummer	Phänotyp	Gentamicin-Empfindlichkeit in µg/ml	Empfindlichkeitsfaktor SCV/N	Auxotrophismus	Klonale Identität
Patient 1	OM 40/III	N	0,047	1	n. b. Hämin fraglich Hämin	ja
	OM 39/IV	SCV	0,047			ja
	OM 40/I	SCV	0,047			ja
	14801	SCV	0,094			ja
Patient 2	4652/I	N	0,064	2,97	n. b.	ja
	4652/II	SCV	0,19			ja
Patient 3	OM 56/II a	N	1,5	1	Hämin	ja
	OM 56/II b	SCV	1,5			ja
Patient 4	4459/II	N	0,094	5,32	n. b.	ja
	4459/I	SCV	0,5			ja
Patient 5	OM 184/I	N	0,094	21,28	Hämin + Menadion	ja
	OM 184/II	SCV	2			ja
Patient 6	K8294/I	N	0,064	1,95	n. b.	ja
	K8294/II	SCV	0,125			ja
Patient 7	OM 211/II	N	0,38	3,95	n. b. fraglich Hämin n. b.	ja
	OM 209/IV	SCV	1,5			ja
	OM 211/VI	SCV	2			ja
	OM 210/IV	SCV	2			ja
	OM 211/III	N	0,094			ja
	OM 211/V	SCV	0,38			4,04
Patient 8	10304/I	N	8	2	Hämin	ja
	10304/II	SCV	16			ja
Patient 9	10770	N	0,047	2	n. b.	ja
	10769	SCV	0,094			ja
Patient 10	OM 373/I	N	0,064	23,44	n. b. n. b. n. b. Hämin Hämin Hämin	ja
	OM 373/II	N	0,064			ja + 1 Bande
	OM 372/II	SCV	1,5			ja
	OM 372/III	SCV	1,5			ja + 1 Bande
	OM 373/IV	SCV	1			ja
	OM 372/V	SCV	1,5			ja
	OM 372/IV	SCV	0,75			ja
	OM 373/VI	SCV	1			ja + 1 Bande
Patient 11	OM 420/I	N	0,25	6	n. b. n. b.	ja
	OM 420/II	SCV	1,5			ja
	OM 420/III	SCV	1,5			ja
Patient 12	A9381/I	N	0,094	1	Hämin Hämin	ja
	A9379/I	SCV	0,094			ja
	A9379/II	SCV	0,094			ja

Patienten - name	Isolat - nummer	Phänotyp	Gentamicin- Empfindlichkeit in µg/ml	Empfindlich- keitsfaktor SCV/N	Auxotrophismus	Klonale Identität
Patient 13	A22756/II	N	0,047	1,36	Hämin	ja
	A22756/III	SCV	0,064			ja
Patient 14	A22891	SCV	0,047		Hämin	ja
	A22892	SCV	0,047			ja
Patient 15	A24695/V	N	0,064	15,63	Menadion	ja
	A24695/VII	SCV	1			ja
Patient 16	A26027/IV	N	0,064	23,44	n. b.	ja
	A26026/I	SCV	1,5			ja
	A26026/IV	SCV	0,064			ja
Patient 17	A24117/I	N	1,5	4	n. b.	ja
	A24117/II	SCV	6			ja + 1 Bande
Patient 18	A24549/I	N	0,094	1	n. b.	nein
	A24549/III	SCV	0,094			nein
Patient 19	A25237/I	N	4	2	Hämin	ja
	A25237/II	SCV	8			ja
Patient 20	A16880/I	N	0,064	1,47	n. b.	ja
	A16880/II	SCV	0,094			ja
	A16880/IV	SCV	0,064			ja + 1 Bande
Patient 21	A25198/II	N	0,023	1,39	n. b.	ja
	A25198/VI	SCV	0,032			ja

8.3 Danksagung

Ich danke Prof. Dr. med. Christof von Eiff für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie für die exzellente Betreuung und Hilfestellung zu allen Zeiten dieser Arbeit. Ich bedanke mich auch bei Prof. Dr. med. Peters, dass ich diese Doktorarbeit an seinem Institut anfertigen konnte.

Weiterhin möchte ich mich bei allen medizinisch-technischen Assistenten des Instituts für die praktische Anleitung und stete Unterstützung bedanken.

Joachim Gehrs vom Institut für medizinische Statistik und Biomathematik gilt mein Dank für die hilfreichen Anregungen zur statistischen Aufarbeitung der ermittelten Daten.

Für ihre emotionale Unterstützung und ihr geduldiges Verständnis in der Begleitung meines Studiums und dieser Doktorarbeit gilt mein herzlicher Dank meinen Eltern Helmut und Beatrix, meinen Schwestern Martina und Elvira, meinen Großeltern Annemarie und Alfred Lachner, meinem Onkel Reinhard Mönninghoff, meiner Freundin Maria Jasper sowie meinen Freunden Florian Fritzsche, Sven Kerr, Mustafa Saidi, Eva Maria Weskamp, Jan Sackarnd und Arne Streitbürger.

8.4 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Münster, den 24.04.06

Name, Vorname: Mönninghoff, Christoph

Geburtsdatum: 01.06.1977

Geburtsort: Aschaffenburg

Familienstand: ledig

Konfession: römisch-katholisch

Schulbildung:

1983 – 1987 Katholische Grundschule, Ottmarsbocholt

1987 – 1996 Gymnasium Paulinum, Münster

06/1996 Abitur

1996 – 1997 Grundwehrdienst, Sanitäts- und Kraftfahrzeugausbildung der Bundeswehr, Itzehoe, Perleberg, Dülmen

Studium:

09/1997 – 09/2003 Humanmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster

09/1999 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)

09/2000 Erstes Staatsexamen

09/2002 Zweites Staatsexamen

11/2003 Drittes Staatsexamen

Praktisches Jahr:

11/2002 - 02/2003 Chirurgie, Klinikum Lippe-Detmold

02/2003 - 06/2003 Radiologie, Klinikum Lippe-Detmold

06/2003 -09/2003 Innere Medizin, Spital Limmattal, Zürich

Ärztliche Tätigkeit:

02/2004 - 07/2005 AiP/Assistenzarzt Neurochirurgie, Clemenshospital Münster

10/2005 – heute Assistenzarzt Radiologie, Universitätsklinikum Essen

8.5 Firmenverzeichnis

AB BIODISK Dalvägen 10 S-171 36 Solna, Schweden Tel.: 0046/87300760	Haereus Kulzer GmbH & Co. KG Philipp-Reis-Str. 8 - 13 D-61273 Wehrheim Tel.: 0049/6081/9590
Becton Dickinson GmbH Tullastr. 8-12 D-69126 Heidelberg Tel.: 0049/6221/3050	IKA GmbH & Co. KG Janke & Kunkel-Str. 10 D-79219 Staufen Tel.: 0049/7633/8310
Bio-Mérieux s a au capital de 77 421 420 F 673 620 399 RCS Lyon 69280 Marcy-l'Étoile, France Tel. : 0033/0478872000	Merck KG Frankfurter Str. 250 D-64293 Darmstadt Tel.: 0049/6151/720
BIORAD Life Science Group 2000 Alfred Nobel Drive Hercules, California 94547, USA Tel.: 001/510/7411000	Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Str. 110 D-68305 Mannheim Tel.: 0049/6217/590
Boehringer Ingelheim Pharma Binger Str. 173 D-55216 Ingelheim am Rhein Tel.: 0049/6132/770	Satorius AG Weender Landstr. 94-108 D-37075 Göttingen Tel.: 0049/551/3080
FMC Corporation 1735 Market Street Philadelphia, PA 19103, USA Tel.: 001/215/2996000	Sigma Aldrich Chemie GmbH Eschenstr. 5 D-82024 Traufkirchen Tel.: 0049/8965/130

Unipath

Priory Business Park

Bedford, MK 443UP, U. K.

Tel.: 0044/1234/835000

WAK Chemie Medical GmbH

Siemensstr. 9

D-61449 Steinbach

Tel.: 0049/6171/28430