

**Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Untersuchung zum in vitro Wachstumsverhalten ausgesuchter MRSA-Stämme

Inaugural - Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät**

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Katrin Schmidt

aus Münster

Würzburg, Oktober 2010

Referent: Prof. Dr. med. U. Vogel

Koreferent: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. M. Abele-Horn

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

25.02.2011

Die Promovendin ist Ärztin

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Gattung <i>Staphylococcus</i>	1
1.2	Historie des <i>Staphylococcus aureus</i>	2
1.3	Vorkommen und Bedeutung	2
1.4	Historie des Methicillin resistenten <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	3
1.5	Typisierung von <i>S. aureus</i>	5
1.6	Pathogenitätsfaktoren von <i>S. aureus</i>	7
1.7	Ökologische Aspekte von <i>S. aureus</i>	8
1.8	Bakterienanzucht	9
1.9	Problemstellung und Ziele der Arbeit	12
2	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	13
2.1	Material	13
2.1.1	Geräte	13
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	14
2.1.3	Nährmedien	14
2.1.4	Selektivplatten	15
2.1.5	Bakterienstämme/Pilze	15
2.2	Methoden	16
2.2.1	Bakterienkultur	16
2.2.2	Wachstumsversuche	16
2.2.3	Auswertung	26
2.2.4	Statische Verfahren	28
3	ERGEBNISSE	29
3.1	Wachstumsversuch (tägliche Kontrollen) <i>S. epidermidis</i> gegen MRSA-Stämme	29
3.1.1	<i>S. epidermidis</i> gegen <i>S. aureus</i> (spa t148)	29
3.1.2	<i>S. epidermidis</i> gegen <i>S. aureus</i> (spa t005)	33
3.1.3	<i>S. epidermidis</i> gegen <i>S. aureus</i> (spa t003)	36
3.1.4	<i>S. epidermidis</i> gegen <i>S. aureus</i> (spa t008)	38
3.1.5	Vergleich der vier MRSA-Stämme	40

3.2	Wachstumsversuch (tägliche Kontrollen) <i>S. aureus</i> (spa t012) gegen MRSA-Stämme	41
3.2.1	<i>MSSA</i> (spa t012) gegen MRSA (spa t148)	41
3.2.2	<i>MSSA</i> (spa t012) gegen MRSA (spa t003)	45
3.2.3	<i>MSSA</i> (spa t012) gegen MRSA (spa t005)	47
3.3	Wachstumsversuch (tägliche Kontrollen) <i>S. cerevisiae</i> gegen MRSA-Stamm	49
3.3.1	<i>S. cerevisiae</i> gegen <i>S. aureus</i> (spa t003)	49
3.3.2	Vergleich von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Staphylococcus epidermidis</i>	52
3.4	Wachstumsversuch (stündliche Kontrollen) <i>S. epidermidis</i> gegen MRSA-Stämme	52
3.4.1	<i>S. epidermidis</i> gegen <i>S. aureus</i> (spa t148)	52
3.4.2	<i>S. epidermidis</i> gegen <i>S. aureus</i> (spa t005)	53
3.4.3	<i>S. epidermidis</i> gegen <i>S. aureus</i> (spa t003)	54
3.4.4	<i>S. epidermidis</i> gegen <i>S. aureus</i> (spa t008)	55
3.4.5	4.4.5 Vergleich der 4 MRSA-Stämme	55
3.5	Wachstumsversuch (stündliche Kontrollen) <i>MSSA</i> (spa t012) gegen MRSA-Stämme	59
3.5.1	<i>MSSA</i> (spa t012) gegen MRSA (spa t148)	60
3.5.2	<i>MSSA</i> (spa t012) gegen MRSA (spa t005)	61
3.5.3	<i>MSSA</i> (spa t012) gegen MRSA (spa t003)	62
3.5.4	<i>MSSA</i> (spa t012) gegen MRSA (spa t008)	63
3.5.5	Vergleich der 4 MRSA-Stämme	64
3.6	Wachstumsversuch (stündliche Kontrollen) <i>E. faecium</i> gegen MRSA-Stämme	67
3.6.1	<i>E. faecium</i> und <i>S. aureus</i> (spa t148)	67
3.6.2	<i>E. faecium</i> und <i>S. aureus</i> (spa t003)	68
3.6.3	Vergleich von <i>E. faecium</i> gegen verschiedene Stämme	69
3.7	Verdünnungsversuch <i>MSSA</i> (spa t012) gegen MRSA-Stämme	71
3.7.1	<i>MSSA</i> (spa t012) gegen MRSA (spa t148)	73
3.7.2	<i>MSSA</i> (spa t012) gegen MRSA (spa t005)	74
3.7.3	<i>MSSA</i> (spa t012) gegen MRSA (spa t003)	75
3.7.4	<i>MSSA</i> (spa t012) gegen MRSA (spa t008)	76
3.7.5	<i>MSSA</i> (spa t012) gegen 4 MRSA-Stämme	77
3.8	Verdünnungsversuch <i>E. faecium</i> gegen MRSA-Stamm	79
3.8.1	<i>E. faecium</i> gegen <i>S. aureus</i> (spa t148)	79
3.8.2	Vergleich des Wachstums des MRSA gegen den <i>MSSA</i> und gegen den <i>E. faecium</i> in den Verdünnungsversuchen	81
4	DISKUSSION	82
5	ZUSAMMENFASSUNG	89
6	LITERATUR	90
7	ANHANG	94
7.1	Abkürzungsverzeichnis	94
7.2	Abbildungen	95
7.3	Lebenslauf	1

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Staphylococcus*

Die Gattung der Staphylokokken gehört zur Familie der *Micrococcaceae* und umfasst gram-positive Kugelbakterien (0,5-1,5µm im Durchmesser), die einzeln, paarweise, in kurzen Ketten (drei oder vier Bakterien hintereinander) oder in großen traubenartigen Anordnungen auftreten [1].

Die Bezeichnung *Staphylococcus* wurde von Ogston [1, 2] (aus dem griechischen „σταφυλόκοκκος“, wörtlich in etwa die „Traubenkugel“) für eine Gruppe von Micrococen eingeführt, die für Infektionen und Eiterbildung verantwortlich sind.

Staphylokokken sind grampositive, nicht sporenbildende, unbewegliche, fakultativ anaerobe Kugelbakterien, die normalerweise unbekapselt sind oder nur eine limitierte Kapsel aufweisen und sich bei 37°C auf gewöhnlichen Nährböden gut kultivieren lassen. Auf handelsüblichen Blutagar bildet *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) nach 24-stündiger Bebrütung elfenbein- bis goldfarbene, relativ große, konvex gewölbte Kolonien, die oftmals eine Hämolysezone aufweisen.

Aus Gründen der klinischen Relevanz und Praktikabilität werden die Staphylokokken in plasmakoagulase-positive, zu denen *S. aureus* gehört, und plasmakoagulase-negative Staphylokokken unterteilt, zu denen *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. simulans*, *S. hominis*, *S. warneri* sowie 16 weitere Spezies gehören.

Die größte humanpathogene und damit klinisch-bakteriologische Bedeutung kommt dabei der koagulase-positiven Spezies *S. aureus* zu. Bei den koagulase-negativen Staphylokokken (KNS) sind vor allem *S. epidermidis* und *S. saprophyticus* von Bedeutung, die jedoch gegenüber *S. aureus* deutlich weniger Virulenzfaktoren aufweisen und zu den klassischen opportunistischen Erregern zählen.

Staphylokokken gehören zu den gewöhnlichen Umweltkeimen, die aber vor allem auf der Haut, in Hautdrüsen und auf Schleimhäuten von Säugetieren und Vögeln gefunden werden. Eine Besiedlung von Mund und Nasenvorhof, Gastrointestinaltrakt, Urogenital-

trakt oder der Brustdrüse kann mit einer Häufigkeit von 30% beim Menschen beobachtet werden. Da sie als opportunistisch pathogener Erreger für viele Erkrankungen beim Menschen verantwortlich gemacht werden können, stellt eine solche Besiedelung, vor allem für abwehrgeschwächte Patienten, eine große Gefahr dar.

1.2 Historie des *Staphylococcus aureus*

Zum ersten Mal in der Geschichte wurden Kokken im Jahre 1874 von T. Billroth beschrieben, von denen er annahm, sie seien Stadien bei der Entwicklung einer Pflanze (coccobacteria septica). Mit dem Wort coccus (griechisch für Saat/Same/Kern) beschrieb er kleinste beobachtbare Teilchen dieser Pflanze, die nach Größe und Anordnung in *Micrococcus*, *Monococcus*, *Diplococcus*, *Streptococcus*, *Gliacoccus* etc. unterteilt wurden.

Die ersten grundlegenden Arbeiten über Staphylokokken gehen auf den schottischen Chirurgen Ogston zurück [2]. Am 9. April 1880 hielt er seinen berühmten Vortrag „Über Abszesse“ auf dem 9. Kongress der Deutschen Chirurgischen Gesellschaft in Berlin. In verschiedenen Eiterungsprozessen konnte Ogston traubenförmig angeordnete Kokken nachweisen, denen er den Namen *Staphylococcus* gab. Erst 1884 klassifizierte dann der Göttinger Chirurg Rosenbach aufgrund der Pigmentierung der Kolonien auf den Selektivplatten die Staphylokokken in die gelbpigmentierte Spezies „*Staphylococcus pyogenes aureus*“ und die weißpigmentierte Spezies „*Staphylococcus pyogenes albus*“.

1.3 Vorkommen und Bedeutung

Die Staphylokokken gehören zu den ubiquitär vorkommenden Umweltkeimen, obwohl sie in der Regel auf lebendiger Haut, in Hautdrüsen und Schleimhäuten von Säugetieren und Vögeln gefunden werden [1]. Sie sind widerstandsfähig gegenüber Austrocknung, Sonnenlicht (UV-Resistenz), Hitze (60°C werden in der Regel für mindestens 15min toleriert), pH-Veränderungen und Salz. Auch sind sie gegenüber chemischen Desinfektionsmitteln (z.B. Chlor) widerstandsfähiger als andere Mikroorganismen. Zu ihrem natürlichen Reservoir gehört die Gruppe der Säugetiere und Vögel.

Auf der Haut oder den Schleimhäuten des Menschen ist *S. aureus* bei 10-40% der Menschen nachzuweisen. Besonders häufig findet man ihn im Bereich des Nasenvorhofs, der Kopfhaare, in der Achsel und der Rima ani. Seltener weist man ihn im Mund, Blut, Brustdrüse, im Intestinal-, Urogenital- und obere Respirationstrakt nach [1].

Dabei muss zwischen einer Kolonisation und Infektion unterschieden werden. Ersteres ist zwar die Voraussetzung für eine Infektion, muss aber nicht zwangsläufig dazu führen. 10-40% der „gesunden Normalbevölkerung“ sind Keimträger von *S. aureus*, während 45-65% des Krankenhauspersonals betroffen, d.h. kolonisiert sind. Staphylokokken haben im Allgemeinen ein gutartiges oder symbiotisches Verhältnis zu dem Wirt auf dem sie leben. Erst wenn die natürliche kutane Barriere durch ein Trauma oder Fremdkörper wie i.v.-Zugänge oder Eingriffe beim Zahnarzt beschädigt ist kann es ihm gelingen, in das Gewebe des Wirts einzudringen und zu einem pathogenen Keim zu werden.

1.4 Historie des Methicillin resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Sobald *S. aureus* als pathogener Keim auftritt entwickelt sich ein Wechselspiel zwischen körpereigener Infektabwehr und bakterieller Resistenzentwicklung. Dies bedeutet für den Menschen die Kontrolle der Bakterien mittels Antibiotika oder ähnlicher Substanzen und für die Bakterien die Entwicklung von Resistenzmechanismen [3, 4].

Die Entwicklung von MRSA-Stämmen und die Umstände und Faktoren, die eine solche Entwicklung begünstigen, zeigen starke Parallelen zu der Entwicklung von β -Laktamantibiotika resistenten *S. aureus*-Stämmen auf.

Als Anfang der 1940iger Jahre Penicillin zur Behandlung von Infektionen zur Verfügung stand, verbesserte sich die Behandlung staphylokokkeninduzierter Erkrankungen dramatisch. Die Freude darüber währte jedoch nicht lange, da 1944 von Kirby [5] erstmals über einen *S. aureus* berichtet wurde, der in der Lage war, Penicillinase zu bilden und dadurch ein Werkzeug entwickelt hatte, mit dem er sich vor dem Penicillin schützen konnte. Zuerst wurden diese *S. aureus* Stämme nur vereinzelt in Krankenhäusern gefunden. Nach dem Zweiten Weltkrieg, in dem Penicillin in großen Mengen genutzt

wurde, stieg die Zahl der Penicillinase bildenden Stämme rapide an. Nahezu jedes Isolat, vor allem nach vorangegangener Penicillin-Therapie war Penicillinase positiv [5].

Die Besiedlung von Krankenhausmitarbeitern und die Verbreitung über diese Personen spielte sicherlich eine bedeutende Rolle in der schnellen Ausbreitung dieser Stämme, die in zwei Wellen erfolgte. Erst konnten diese Stämme in Krankenhäusern und unter Penicillintherapie nachgewiesen werden, seit den späten 1960iger Jahren ließen sie sich auch in hohem Prozentsatz unter der Allgemeinbevölkerung nachweisen. Ein Unterschied bestand allerdings noch zwischen den Krankenhausisolaten und denen aus der Bevölkerung. Erstere waren in der Mehrzahl der Fälle multiresistent gegenüber β -Laktamantibiotika, die anderen Isolate waren hingegen zumeist nur gegenüber Penicillin resistent.

Eine sehr ähnliche Entwicklung lässt sich heute gegenüber Methicillin und anderen neuen Antibiotika, wie z.B. Vancomycin beobachten.

Innerhalb von zwei Jahren nach der Einführung des Methicillins wurde 1961 in Surrey, GB, erstmalig ein gegenüber diesem Antibiotikum resistenter *S. aureus* isoliert [6]. Die Methicillin-resistenten *S. aureus*-Stämme (MRSA) breiteten sich in den folgenden 30 Jahren weltweit mit regionalen Schwankungen aus [7]. Die ersten MRSA-Epidemien wurden Anfang der 60iger Jahre in Großbritannien und Ende der 60iger in Australien beobachtet [8]. Diese Entwicklung beobachtet man nicht nur in den Industrienationen sondern auch in Entwicklungsländern, wie H.K. Tiwari et al. [9] in ihrer Arbeit über Nepal darstellen.

S. aureus scheint die Fähigkeit zu besitzen, innerhalb kürzester Zeit Resistenzen gegen neu entwickelte Antibiotika auszubilden [10].

Bis vor Kurzem standen mit den Glykopeptiden Vancomycin und Teicoplanin noch sicher wirksame Therapeutika zur Verfügung. Vancomycin wurde im Jahre 1991 auf dem japanischen Markt zur i.v. Gabe zugelassen [11]. Schon im Jahre 1997 [12, 13] kam es erstmals zum Auftreten von Vancomycin resistenten *S. aureus* (VRSA) Stämmen in Japan und den USA [13], in 2001 in Brasilien, obwohl es schon seit der Markteinführung als Reserveantibiotikum für MRSA galt und deswegen gezielter eingesetzt wurde [13, 14]. Schlussfolgernd ist es nur noch eine Frage der Zeit, wann sich diese Stämme epidemisch ausbreiten werden.

Der Anteil der MRSA-Infektionen an allen *S. aureus* Infektionen, die außerhalb des Krankenhauses erworben wurden, dem so genannten community-acquired MRSA (CA-MRSA), liegt mittlerweile in einigen Regionen bei bis zu 50% mit steigender Tendenz [6, 15-18].

Der genetische Hintergrund für die Methicillin-Resistenz, d.h. eine Resistenz gegenüber allen β -Laktamantibiotika, ist das *mecA*-Gen, welches auf einem mobilen DNA-Element, dem Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) lokalisiert ist. Das Produkt dieses Gens ist ein Penicillin-bindendes Protein (PBP), das so genannte PBP2a. Entdeckt wurde es im Jahre 1981 von Hartmann und Mitarbeitern. Sie fanden heraus, dass es eine reduzierte Affinität gegenüber den β -Laktamantibiotika und trotzdem noch eine produktive Zellwandbiosynthese-Tendenz aufweist [6, 19].

Normalerweise produziert *S. aureus* vier verschiedenen PBPs. Dies sind membrangebundene Enzyme mit Carboxypeptidase-, Transpeptidase- oder Endopeptidase-Aktivität und regulieren dort die letzten Schritte der Zellwandbiosynthese, d.h. sie sind für die Bildung des Peptidoglykans verantwortlich.

β -Laktamantibiotika sind in der Lage, sich stabil an das aktive Zentrum der vier PBPs zu binden und auf diese Weise die Zellwandbiosynthese mit konsekutiver Hemmung des Bakterienwachstums zu unterbrechen. Die Folge ist ein durch Autolyse bedingter Zelltod [20].

Durch die Veränderungen im PBP2a weist es eine deutlich geringere Affinität gegenüber den β -Laktamantibiotika auf und kann darüber hinaus alle Funktionen der vier PBPs übernehmen [20]. Damit entsteht für den MRSA ein alternativer Stoffwechselweg zur Bildung einer intakten Zellwand, der durch β -Laktamantibiotika nicht mehr unterbrochen werden kann.

1.5 Typisierung von *S. aureus*

S. aureus, und insbesondere auch die Methicillin-resistenten Stämme, ist einer der führenden Verursacher nosokomialer Infektionen. Um die verschiedenen Stämme auseinander halten zu können und damit einen guten Überblick und Kontrolle über etwaige nosokomiale oder außerhalb des Krankenhaus erworbene Infektionen zu behalten, sind verschiedenen Methoden der klonalen Identifizierung entwickelt worden [21, 22]. Als

Goldstandard hat sich dabei die SmaI Makrorestriktionsanalyse (pulsed field gel electrophoresis [PFGE]) herausgestellt, welche eine hohe Diskriminierungsfähigkeit besitzt [22]. Mittlerweile geht man jedoch zur DNA Sequenzanalyse über, da die Ergebnisse der Sequenzanalyse gut beschrieben werden können und dadurch der Informationsaustausch leicht und schnell zu Stande kommen kann. Für diese Analysen und damit für eine zuverlässige Typisierung des *S. aureus* eignen sich vor allem die repetitiven Sequenzen des *coa* (coagulase) Genes und des *spa* Genes (Protein A). Die *spa*-Typisierung ist dabei besonders interessant für eine schnelle Bestimmung der einzelnen Stämme in Krankenhäusern, da sie genauere Ergebnisse als die *coa*-Typisierung liefert [23]. Zu begründen ist dies mit der höheren Variabilität der Region des *spa*-Genes. Obwohl es weniger repetitive Sequenzen besitzt als das *coa* Gen, ist seine Variabilität durch eine höhere Rate der Repeat Rekombinationen größer und somit auch die Diskriminierungsfähigkeit bei der Typisierung von MRSA-Stämmen [24].

Studien haben ergeben, dass die *spa*-Typisierung in der Lage ist, sowohl schnelle als auch langsam auftretende genetische Variationen aufzuspüren (Mikro- und Makrovariationen). Somit eignet sich die *spa*-Typisierung als Hilfsmittel für lokale und globale, langfristige epidemiologische Studien [25]. Ein weiterer Vorteil der Methode ist die langfristige Stabilität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* [26].

Das *spa* Gen, welches für das Oberflächenprotein Protein A codiert und für seine polymorphen Regionen bekannt ist, besteht aus ungefähr 2,150 Basenpaaren (bp) und beinhaltet eine Reihe von funktionell unterschiedlichen Regionen, eine Fc-Bindungs-Region, bestehend aus fünf 160 bp repeats, die so genannte X-Region, bestehend aus einer variierenden Nummer von 24 bp repeats, und einem Abschnitt am C-Ende für die Zellwandbefestigung.

Die X-Region mit ihren repetitiven Sequenzen weist einen hoch variablen Anteil auf, der durch Punktmutationen, Deletionen, Duplikationen und Insertionen entsteht, und sich daher zur Typisierung der Methicillin-resistenten *S. aureus* Stämme anbietet [27]. Dabei werden die verschiedenen Wiederholungen in einem alpha-numerischen Code sortiert und so die verschiedenen MRSA-Stämme anhand ihrer spezifischen X-Region in eine Reihenfolge gebracht. Zur Zeit gibt es zwei gültige Nomenklaturen zur Einteilung der verschiedenen *spa*-Typen [22].

Da das Mikrobiologische Institut der Universitätsklinik Würzburg schon seit langer Zeit mit der *spa*-Typisierung arbeitet, wurde auch in dieser Arbeit die *spa*-Typisierung verwendet.

Das Mikrobiologische Institut der Universitätsklinik Würzburg verwendet für die *spa*-Typisierung die Novel Software Ridom StaphType (Ridom GmbH) [23].

1.6 Pathogenitätsfaktoren von *S. aureus*

S. aureus bildet eine Vielzahl von extrazellulär abgegebenen Produkten, von denen einige als Toxine bezeichnet werden können, da sie pathologische Erscheinungen beim Menschen hervorrufen oder zumindest im Tierversuch toxisch wirken. Andere extrazelluläre Substanzen zeigen lediglich enzymatische Wirkungen.

Die Bildung von Plasmakoagulase durch *S. aureus* wird als das entscheidende Merkmal dieser Art zur Abgrenzung von den übrigen (koagulase-negativen) Staphylokokken angesehen. Die Koagulase, ein extrazelluläres Enzym, bindet im Serum an Prothrombin und aktiviert so die Entstehung von Fibrin aus Fibrinogen (Fibrinausfällung) [28].

Einen ähnlichen Effekt zeigt der Clumpingfaktor, ein an der Zelloberfläche gebundenes Enzym, das zur Ausfällung von Fibrin führt. Weitere an die Zellwand gebundene Virulenzfaktoren sind die Polysaccharidkapsel (Schutz vor Phagozytose), das Protein A und ein interzelluläres Adhäsion, welches Grundlage für die Bildung eines Biofilmes ist. Das Protein A ist in der Lage, sich an das Fc-Fragment der Immunglobuline zu binden und sich so vor der Phagozytose zu schützen [29].

Zu den extrazellulären Pathogenitätsfaktoren zählen neben der Plasmakoagulase und dem Clumpingfaktor auch das Fibrinolyse, mit dessen Hilfe *S. aureus* in der Lage ist, Fibringerinnsel wieder aufzulösen. Außerdem können einige Stämme Hyaluronidasen (Ausbreitung im Gewebe), Hämolysine und Leukocidine (Schädigung von Erythrozyten, Granulozyten und Makrophagen), Exfoliatine (epidermolytische Toxine), fünf verschiedene Enterotoxine(A-E) und das Toxic shock syndrome toxin (TSST-1) ausbilden.

Besondere Erwähnung findet die Fähigkeit Enzyme zu produzieren, die das Bakterium vor Antibiotika schützen. Das am längsten bekannte Enzym ist die Penicillinase (Beta-

laktamase), welches durch Spaltung des β -Laktamringes das Benzylpenicillin (Penicillin G), Ampicillin und Ureidopenicillin zerstört und so für die Therapie unwirksam macht.

Unter dem Selektionsdruck neuer Antibiotika haben die Staphylokokken weitere Enzyme entwickelt auf die im nächsten Absatz näher eingegangen wird.

1.7 Ökologische Aspekte von *S. aureus*

Die Mikroflora der Haut setzt sich aus sämtlichen Mikroorganismen zusammen, die im Milieu der Hautoberfläche siedeln. Mit diesem lebendigen Überzug und den Mikroorganismen, die andere Körperregionen besiedeln, wie z.B. Schleimhäute, Verdauungs-, Respirations- und Urogenitaltrakt, enthält der Mensch mehr Bakterien als Körperzellen einschließlich der etwa 10^{13} Gehirnzellen.

Unter dem Begriff der Normalflora werden zusammenfassend aerobe und anaerobe Bakterien, Pilze und Protozoen verstanden, die in bestimmten Mikrobiotopen, altersabhängig variierend regelmäßig anzutreffen sind und die der menschliche Organismus toleriert.

Den wichtigsten Anteil der normalen Hautflora liefern Bakterien, die ein Haftvermögen haben. Man findet sie vorwiegend im Stratum corneum und im oberen Teil der Haarfollikel, nur zu 20 % in tieferen Regionen. Die Keimzahlen liegen meist zwischen 100 und $1000/\text{cm}^2$ Haut, abhängig von der Entnahmestelle. Dabei überwiegen in der Regel die Anaerobier im Verhältnis 10:1. Die häufigsten Besiedler der Haut sind *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Micrococcus luteus*, Enterokokken und Peptokokken, sowie aerobe wie anaerobe diphteroide Stäbchen.

Die normale Darmflora setzt sich aus über 100 Keimarten zusammen und ist das größte Keimreservoir des Körpers (Keimzahlen von bis zu $10^{11}/\text{g}$ Stuhl). Während im oberen Darmabschnitt Laktobakterien und Enterokokken überwiegen, finden sich weiter unten bis zu 95% Anaerobier (Bacteroides-Arten, Laktobakterien, Clostridien und anaerobe Streptokokken). Die restlichen 5% aerobe Organismen setzen sich aus *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonadaceae* zusammen.

Die Normalbesiedlung (residente Flora) hängt von den physiologischen Gegebenheiten des Makroorganismus (unter anderem Allgemeinzustand, Alter, Schwangerschaft) und dem Milieu des jeweiligen Mikrobiotops mit seinen ihm eigenen Wuchsbedingungen

ab. Sie sind durch äußere Faktoren wie Ernährung, Körperpflege, bestimmte Lebensgewohnheiten und die Umwelt des Menschen beeinflusst. Änderungen dieser Besiedlung durch äußere Einwirkungen sind jedoch häufig nur passager. Die zur eigentlichen Normalflora hinzutretenden Mikroorganismen (transiente Flora) sind so lange für den Makroorganismus von untergeordneter Bedeutung, wie die Normalbesiedlung dabei erhalten bleibt. Erst bei starker Verdrängung der Normalbesiedlung können passagere Bakterien sich ungehindert vermehren und auch zu Krankheitssymptomen führen. Makro- und Mikroorganismus befinden sich dann nicht mehr in der Eubiose (Gleichgewicht), sondern es entsteht eine Dysbiose.

Ein solches Ungleichgewicht kann z.B. durch pathologische Veränderungen der Haut, die mit Vergrößerung der Oberfläche (Schuppen) und Erhöhung der Feuchtigkeit (nässende Dermatosen) einhergehen, hervorgerufen werden. Diese Veränderungen erlauben eine starke Proliferation der residenten Keimflora. Solche Personen werden auch häufig von pathogenen Mikroorganismen (hauptsächlich *S. aureus*) besiedelt, wobei diese klinisch meist unbemerkt bleiben.

1.8 Bakterienanzucht

Das Wachstum von Bakterien ist an das Vorhandensein geeigneter Nährstoffe gebunden. Bakterien benötigen, wie alle Lebewesen, Wasser, ferner Substanzen, die die Grundelemente C, O, H, N, S und P in assimilierbarer Form enthalten. Daneben werden in geringer Menge (10^{-3} bis 10^{-4} M) noch andere Elemente wie z.B. Kalium, Magnesium, Calcium, Eisen und Natrium (und in Spurenmengen [10^{-7} - 10^{-8} M] Kupfer, Zink, Mangan, Selen und andere) benötigt.

Die Vermehrung von Bakterien erfolgt durch Querteilung. Zunächst wird die DNA geteilt und danach eine Querwand gebildet. Es entstehen so aus einer Zelle zwei Tochterzellen. Die hierfür benötigte Zeit wird Generationszeit genannt. Die Generationszeit hängt nicht nur von äußeren Bedingungen ab, sondern auch von den Eigenschaften der Bakterien selbst. Unter optimalen Bedingungen beträgt sie bei *S. aureus* durchschnittlich 15 Minuten, aber bei züchtbaren Treponemen 4 bis 18 Stunden. Die Teilungsrate

ist, bezogen auf einzelne Bakterien nicht völlig übereinstimmend. Die Bakterien vermehren sich daher in einer Kultur asynchron.

Die Vermehrung der Bakterien findet ihre natürliche Begrenzung durch das Auftreten von hemmenden Faktoren, wie z.B. Erschöpfung des Nährbodens oder die Anhäufung schädlicher Stoffwechselprodukte, wie Alkohol, organische Säuren, oft verbunden mit drastischer pH-Verschiebung.

Unter definierten Bedingungen kann die Vermehrung von Bakterien in einer bestimmten Menge einer Nährlösung (statische Kultur) analysiert werden, indem in bestimmten Zeiten Proben entnommen werden und die Keimzahl festgestellt wird. Die Zahl der lebenden Zellen (koloniebildende Einheiten/ml [KBE/ml]) wird durch Ausimpfen einer definierten Menge Nährflüssigkeit auf die Oberfläche von Nährböden und Auszählen der entstandenen Bakterienkolonien nach Bebrütung ermittelt, wobei davon ausgegangen wird, dass jede Kolonie aus einer einzelnen Bakterienzelle hervorgegangen ist.

Die Gesamtzahl pro ml (lebende und tote Zellen) kann in einer Zählkammer, mit einem elektronischen Partikelzähler oder indirekt durch Bestimmen der optischen Dichte der Nährflüssigkeit ermittelt werden.

In einem flüssigen Nährmedium als statische Kultur ergeben sich nach Einimpfen einer bestimmten Bakterienzahl bestimmte Phasen der Vermehrung, da sich die Bedingungen für das Bakterienwachstum ständig ändern (siehe **Abbildung 1**).

Phasen des bakteriellen Wachstums in Kultur

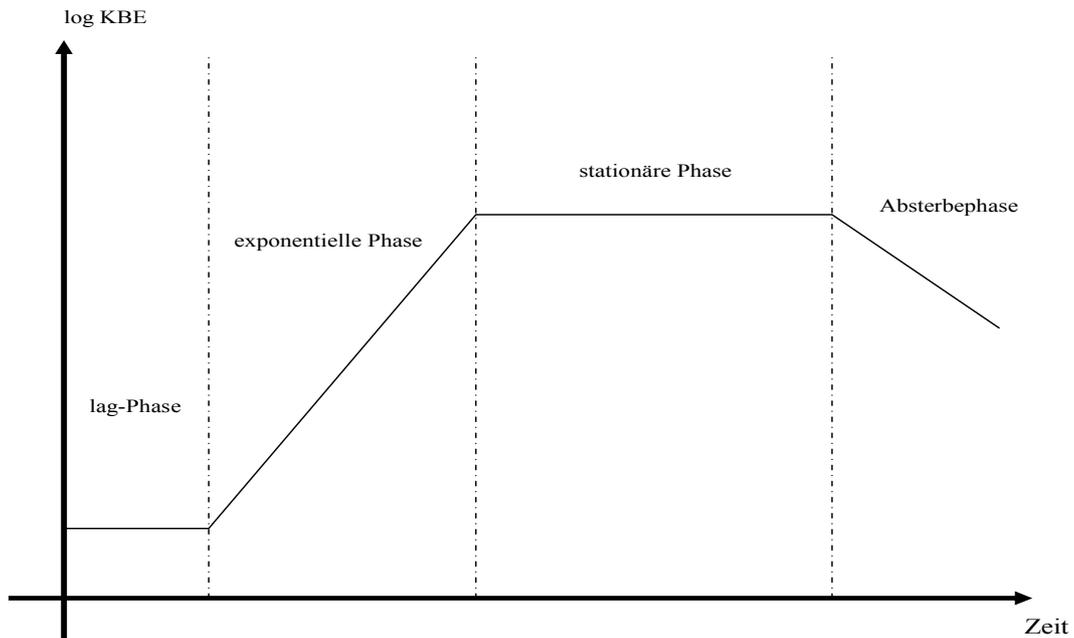


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Wachstumskurve einer Bakterien-Kultur in einer Nährflüssigkeit mit ihren vier charakteristischen Phasen.

Nach dem Einimpfen der Bakterien in eine Nährlösung kommt es zunächst zur Anpassung der Bakterien an das neue Milieu, die Bakterien vermehren sich nicht. Es kommt zu einer Latenzphase (lag-Phase). Danach kommt es zu einer Phase des exponentiellen Wachstums, der Logarithmus der Zellzahl nimmt hier linear mit der Zeit zu (exponentielle Phase). Durch Erschöpfung von Bestandteilen der Nährflüssigkeit und (oder) Auftreten von hemmenden Stoffwechselprodukten nimmt die Geschwindigkeit der Zellteilung wieder ab. Es sterben ebenso viele Bakterienzellen ab, wie durch Zellteilung neu entstehen (stationäre Phase). In der Absterbephase überwiegt die Zahl der absterbenden Bakterien, wobei jedoch durch die absterbenden und sich auflösenden Zellen neue Nährstoffe für die noch lebenden Zellen entstehen. Es wird schließlich ein Gleichgewichtszustand erreicht, bei dem nur noch wenige Zellen vorhanden sind.

1.9 Problemstellung und Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte nachfolgenden, aus klinischen Beobachtungen über das Verhalten Methicillin resistenter *S. aureus* Stämme entstandenen Aspekten nachgegangen werden.

In der Klinik akquirierte MRSA-Besiedlungen können in häuslicher Umgebung des Patienten wieder verschwinden [30]. Welche Mechanismen bewirken den Rückgang des MRSA?

In den epidemiologischen Studien über die Verbreitung der MRSA-Stämme wurden häufige und seltene Stämme gefunden [31]. Auch die am Universitätsklinikum Würzburg verwendete spa-Typisierung zeigt neben häufig auftretenden MRSA-Stämmen (spa t001, t003, t005, t008 und t023) seltenere (spa t049, t063, und t148) sowie nur sporadisch auftretende Typen (spa t038) [31].

Haben die häufigen Stämme Wachstumsvorteile gegenüber anderen Bakterien, zeigen sie eine schnellere Wachstumskinetik und/oder sind sie auf Mangelsituationen besser vorbereitet?

Die resistenten Stämme breiten sich stark aus und das nicht nur in der Umgebung von Krankenhäusern, wo ein besonders starker Selektionsvorteil durch den hohen Gebrauch von Antibiotika für diese Stämme herrscht, sondern auch in der Bevölkerung als „community-acquired“ MRSA [18]. Wir haben uns gefragt, ob es neben der Antibiotika-Resistenz andere Selektionsvorteile des MRSA gegenüber anderen Mikroorganismen gibt.

Nehmen Mikroorganismen der Standortflora Einfluss auf eine MRSA-Besiedlung? Gibt es ein Bakterium, das den MRSA quantitativ verdrängen kann? Wie verändern Mangelbedingungen, wie sie zum Teil auf Haut und Schleimhäuten vorherrschen, das Wachstumsverhalten dieser Mikroorganismen?

Wirkt sich die Resistenz des MRSA durch das zusätzliche Resistenz-Gen, welches bei jeder Teilung des Bakteriums eine zusätzliche Belastung darstellt, hemmend auf die Wachstumskinetik aus? Gibt es Unterschiede im Wachstum von einem MRSA zu einem MSSA (Methicillin sensiblen *S. aureus*)?

Aus klinischen Studien gibt es Berichte über das Verschwinden des MRSA unter adjuvanter Therapie mit probiotischen Mikroorganismen bei kausaler Behandlung mit Antibiotika [32]. Gibt es dabei einen direkten Zusammenhang? Sind probiotische Mikroorganismen oder Mikroorganismen der Standortflora in der Lage das Wachstum des MRSA zu reduzieren oder ihn sogar zu verdrängen?

2 Eigene Untersuchungen

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Für die Untersuchungen wurden folgende Geräte eingesetzt:

Flow (Gelaire Flow Laboratories BSB 4A)

Photometer 600 (Gene Quant pro, Firma: Biochrom Amersham Pharmacia Biotech ABSE 75184)

Vortexer (neoLab 7-20230 Vortex mixer)

Gasbrenner (Schütte Gasi)

Ausstrichösen

Pipette 250-1000 μ l, 20-100 μ l und 2,5-10 μ l (eppendorf reference)

Brutschrank 37°C (Heraeus Typ B 5060 E)

Kühlschrank 4°C (Liebherr FKS 5000 Typ 200071, Index1C)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Für die Wachstumsversuche wurden folgende Gefäße und Materialien verwendet:

15ml- und 50ml Greiner Röhrchen

1,5ml- und 2ml-Eppendorf Gefäße

Pipettenspitzen gelb (Sarstedt Nr. 70.760.002); weiß (Star Lab S1111-4000); blau (Scheller Larborbedarf Nr. 2100610)

Wattestäbchen, steril

Photometer-Küvetten

NaCl 0.9%ige

Parafilm (Parafilm Laboratory film 4in x 125 FT Roll)

2.1.3 Nährmedien

Für die Wachstumsversuche wurden folgende Nährmedien verwendet:

TSB (TrypticSoyBroth) (Difco)

Bacto™ Tryptic Soy Broth without Dextrose (Becton Dickison (BD) Lot 555795, Bestellnr. 286220) Zusammenfassung: Approximate Formula pro/l 17,0g; pancreatic Digest of casein 3,0g; Sodium Chlorid 5,0g; Dispotassium Phosphat 2,5g; ph-Wert 7,3+-0,2

2.1.4 Selektivplatten

Für die Wachstumsversuche wurden folgende Selektivplatten verwendet:

Blutplatten (Columbia Agar+5% Hammelblut)
Müller Hinton
Müller Hinton + 2µg/µl Oxacillin
Müller Hinton + 4µg/µl Oxacillin
Baird Parker
Baird Parker + 2µg/µl Oxacillin
Baird Parker + 4µg/µl Oxacillin
Bierwürzagar
ORSAB
Sabouraud Agar
Chromagar-Candida
Schaedler-Agar (Schaedler Agar with Vitamin K1 and 5% Sheep Blood)

2.1.5 Bakterienstämme/Pilze

<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ADH+
<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA)	spa t012
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	spa t003
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	spa t005
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	spa t008
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	spa t148

Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecium* und *Saccharomyces cerevisiae*

In der vorliegenden Arbeit wurden die obig aufgeführten Bakterienstämme und Pilze für die Wachstumsversuche/Konkurrenzversuche verwendet. Dabei wurden die vier MRSA-Stämme jeweils mit dem *S. epidermidis* und dem Methicillin-sensiblen *S. aureus* spa t012 (MSSA) in verschiedenen Konzentrationen zusammen in eine Nährbouillon gegeben und das konkurrierende Verhalten in Bezug auf Wachstumsgeschwindigkeit und eventuelle Dominanz untersucht. Es wurden weiterhin *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) und *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) im konkurrierenden Wachstum gegenüber den verschiedenen MRSA-Stämmen untersucht. Bei der Auswahl der Mikroorganismen habe ich mich für Stämme der Standortflora und probiotische/apathogene Mikroorganismen entschieden.

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterienkultur

Um mit den Bakterien arbeiten zu können, wurde eine Selektivplatte mit einer von der Stammpalte stammenden Einzelkolonie mittels Drei-Ösen-Ausstrich beimpft und diese bei 37°C für 24h bebrütet. Für die verschiedenen Bakterienstämme wurden jeweils verschiedene Selektivplatten verwendet. Blutagar für alle *S. aureus*-, *S. epidermidis*- und *E. faecium*-Stämme, VL-Agar für die Lactobacilli und Bierwürzagar für *S. cerevisiae*. Nach der 24h-Bebrütung wurden die Bakterien entweder direkt zum Ansatz eines Wachstumsversuches verwendet oder zum Zwecke der Aufbewahrung bei 4°C bis zu drei Wochen gelagert, um danach erneut auf einer neuen Selektivplatte ausgestrichen und aerob bebrütet zu werden.

2.2.2 Wachstumsversuche

Um das Konkurrenzverhalten der fakultativ pathogenen MRSA-Stämme gegenüber den fakultativ apathogenen Keimen der Standortflora zu untersuchen, wurden in den hier beschriebenen Konkurrenzversuchen die verschiedenen MRSA-Stämme (spa t003, spa t005, spa t008, spa t148) mit den Bakterienstämme *S. epidermidis*, *S. aureus* (spa t012), *L.casei*, *E. faecium* und der Hefe *S. cerevisiae* in unterschiedlichen Konzentrationsgemischen angesetzt. Das heißt, dass ein MRSA-Stamm in definierter Konzentration mit einem der genannten Bakterienstämme ebenfalls in definierter Konzentration zusammen in eine Nährbouillon gegeben wurde. Anschließend wurden durch Ausstriche aus der Nährbouillon auf geeigneten Selektivplatten die jeweiligen Konzentrationen zu diesem Zeitpunkt bestimmt und so Wachstumskurven für das Wachstum in den Konzentrationsgemischen ermittelt. Die Wahl der Selektivplatten wird im Kapitel „Auswahl der Selektivplatten“ dieser Arbeit näher erläutert.

2.2.2.1 Einstellung einer definierten Bakterienausgangskonzentration unter Verwendung der optischen Dichtemessung

Die genaue Einstellung der Bakterienausgangskonzentration ermöglicht es, Aussagen über das Wachstum unter Konkurrenzbedingungen zu machen. In dieser Arbeit wurden dabei Konzentrationen von 10^0 KBE/ml bis 10^4 KBE/ml verwendet und in den einzelnen Ansätzen miteinander variiert, so dass einmal der MRSA eine höhere Ausgangskonzentration hatte und das konkurrierende Bakterium in niedrigeren Konzentrationen dazu gesetzt wurde oder anders herum.

Dazu wurden die für diesen Ansatz benötigten Bakterien mittels eines Wattetupfers von der Selektivplatte in NaCl 0,9% in Lösung gebracht.

Mit dem Photometer konnte dann von der dabei entstandenen Bakterienlösung die optische Dichte (OD) bestimmt werden. Nach Messung bei einer Wellenlänge von 600nm wurde das Messergebnis mit dem Faktor von 1,5 multipliziert, welches der Zelloptischeinstellung des Photometers entspricht. Als Referenzwert diente dabei die spezifische Dichte von NaCl 0,9%.

In zuvor durchgeführten Probeversuchen wurde die spezifische Dichte für eine Konzentration von 10^7 KBE/ml beziehungsweise 10^8 KBE/ml ermittelt. Für jeden Bakterienstamm ergab sich dabei ein individueller Wert. Stellte sich dabei für die optische Dichte von 10^7 KBE/ml ein sehr niedriger Wert heraus, wie es z.B. beim spa t005 und spa t148 der Fall ist, wurde die optische Dichte für eine Konzentration von 10^8 KBE/ml als Ausgangskonzentration verwendet.

Stamm	OD für 10^7 KBE/ml	OD für 10^8 KBE/ml
<i>S. epidermidis</i>	0,14	
<i>S. aureus</i> (spa t012)	0,1	0,2
<i>S. aureus</i> (spa t003)	0,1	0,2
<i>S. aureus</i> (spa t005)	0,06	0,2
<i>S. aureus</i> (spa t008)	0,1	0,2
<i>S. aureus</i> (spa t148)	0,05	0,2
<i>L. casei</i>	0,2	
<i>S. cerevisiae</i>	1	
<i>E. faecium</i>	0,1	

Tabelle 1. Optische Dichte der einzelnen Bakterienstämme für eine Konzentration von 10^7 KBE/ml beziehungsweise 10^8 KBE/ml in 0,9% NaCl.

Die mit Hilfe der optischen Dichte eingestellte Ausgangskonzentration wurde jedes Mal durch Ausstrich auf einer geeigneten Selektivplatte überprüft.

2.2.2.2 *Anlegen der Konzentrationsgemische unter Zuhilfenahme von Verdünnungsreihen*

Nach Einstellung der Ausgangskonzentration der einzelnen Bakterien, wurde jeweils eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 10 angelegt. Dabei wurden 100µl aus der bestehenden Bakterienlösung in 900µl NaCl 0,9% gegeben. Aus der neu entstandenen Verdünnungsstufe wurden wiederum 100µl entnommen und erneut in 900µl NaCl 0,9% gegeben. Dieser Vorgang wurde bis zu einer Verdünnung von 10^2 KBE/ml fortgeführt. Die Verdünnungsstufen entsprachen dabei 10^8 KBE/ml, 10^7 KBE/ml, 10^6 KBE/ml, 10^5 KBE/ml, 10^4 KBE/ml, 10^3 KBE/ml und 10^2 KBE/ml.

Die Herstellung der Konzentrationsgemische erfolgte in 10ml und 50ml Greiner Röhrchen. Dabei wurden nur für die Ansätze mit einer Ausgangskonzentration von 10^0 KBE/ml 50 ml Röhrchen verwendet, da bei dieser niedrigen Konzentration für die Kontrolle des Wachstums größere Volumina benötigt wurden.

Um das Wachstum in den Konzentrationsgemischen bewerten zu können wurden jeweils bei jedem Ansatz von den benutzten Konzentrationen auch Reinkulturen angelegt. So konnte man sehen, in wie weit sich die Konkurrenz um die Nahrung und die Präsenz des anderen Bakteriums auf das Wachstum auswirkte.

2.2.2.3 *Versuchsaufbau*

Um die Auswirkungen der Konkurrenz auf das Wachstum im Bakteriengemisch gezielt darstellen zu können, wurden zwei Versuchsprotokolle angewendet. Mit dem ersten wurde die stationären Phase des Bakterienwachstums untersucht. Dieser Versuch ging deshalb über den Zeitraum von 4-7d, um auch Langzeitauswirkungen feststellen zu können. Das Bakterienwachstum in den Gemischen wurde täglich durch Ausstrich auf einer geeigneten Selektivplatte kontrolliert, da mit dem Ausstrich die Konzentration beider konkurrierender Bakterienstämme im Gemisch dargestellt werden kann. Im Wei-

teren wird dieser Versuch als „Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen“ bezeichnet.

Mit dem zweiten Versuchsansatz wurde das Anwachsen zur stationären Phase untersucht. Dabei wurden die ersten 8h des Wachstums untersucht, nachdem die Konzentrationsgemische angelegt worden waren, das heißt, dass stündlich das Wachstum durch einen Ausstrich bestimmt wurde. Eine Variation dieses Versuchsaufbaus wurde mit einer Auswahl an Verdünnungsstufen von TSB mit NaCl 0,9% und TSB ohne Dextrose durchgeführt. Dieser Versuchsaufbau wird im Folgendem „Verdünnungsversuch“ genannt. Mit diesen Verdünnungen sollte gezielt das Verhalten der Bakterien unter Ernährungsstress und gleichzeitiger Konkurrenz untersucht werden.

Die ersten Versuche wurden mit *S. epidermidis* und den verschiedenen MRSA-Stämmen mit dem Protokoll des Wachstumsversuchs mit täglichen Wachstumskontrollen durchgeführt. Dabei wurde durch das Anlegen einer großen Variationsbreite der Konzentrationsgemische untersucht, welche Gemische sich am besten zur genauen Darstellung des Konkurrenzverhaltens eignen. In den nachfolgenden Versuchen wurde die Anzahl der Gemische optimiert und auf die wirklich Aussagekräftigen reduziert.

Eine genaue Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationsgemische und Versuchsaufbaue gibt **Tabelle 2**.

Um einen Vergleich mit dem Wachstum in den Konzentrationsgemischen zu haben, wurden auch immer die verschiedenen Konzentrationen der Stämme, die in den Gemischen verwendet wurden, als Reinkultur angesetzt. So kann das isolierte Wachstum als Kontrolle benutzen werden.

Eine ausführliche Darstellung der Kombination der Bakteriengemische in den einzelnen Versuchen liefern die im Anhang aufgeführten **Tabellen 23-27**.

Versuch Nr.	Nährlösung	Konkurrenz-Stamm	MRSA	Anz.
Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen <i>Staphylococcus epidermidis</i> gegen MRSA-Stämme				
1	TSB	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i> (spa t148)	60
2	TSB	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i> (spa t005)	60
3	TSB	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i> (spa t003)	28
4	TSB	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i> (spa t008)	81
Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen MSSA (spa t012) gegen MRSA-Stämme				
21	TSB	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t148)	30
22	TSB	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t003)	30
23	TSB	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t005)	30
Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen <i>Saccharomyces cerevisiae</i> gegen spa t003				
17	TSB	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. aureus</i> (spa t003)	21
Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen <i>Staphylococcus epidermidis</i> gegen MRSA-Stämme				
5	TSB	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i> (spa t148)	12
6	TSB	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i> (spa t005)	12
7	TSB	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i> (spa t003)	12
8	TSB	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i> (spa t008)	12
Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen MSSA (spa t012) gegen MRSA-Stämme				
9	TSB	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t148)	12
10	TSB	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t005)	12
11	TSB	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t003)	12
12	TSB	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t008)	12
Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen <i>Enterococcus faecium</i> gegen spa t003/spa t148				
18	TSB	<i>E. faecium</i>	<i>S. aureus</i> (spa t148)	8
19	TSB	<i>E. faecium</i>	<i>S. aureus</i> (spa t003)	4
Verdünnungsversuch MSSA (spa t012) gegen MRSA-Stämme				
13	TSB 1:10 in NaCl	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t148)	8
13	TSB 1:5 in NaCl	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t148)	8
13	TSB ohne Dextrose	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t148)	8
14	TSB 1:10 in NaCl	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t005)	8
14	TSB 1:5 in NaCl	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t005)	8
14	TSB ohne Dextrose	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t005)	8
15	TSB 1:10 in NaCl	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t003)	8
15	TSB 1:5 in NaCl	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t003)	8
15	TSB ohne Dextrose	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t003)	8
16	TSB 1:10 in NaCl	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t008)	8
16	TSB 1:5 in NaCl	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t008)	8
16	TSB ohne Dextrose	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t008)	8
Verdünnungsversuch <i>Enterococcus faecium</i> gegen spa t148				
20	TSB 1:10 in NaCl	<i>E. faecium</i>	<i>S. aureus</i> (spa t148)	8
20	TSB 1:5 in NaCl	<i>E. faecium</i>	<i>S. aureus</i> (spa t148)	8
20	TSB ohne Dextrose	<i>E. faecium</i>	<i>S. aureus</i> (spa t148)	8

Tabelle 2. Liste der Versuche mit dem jeweiligen MRSA-Stamm, dem Konkurrenz-Stamm und der Art der Nährlösung.

2.2.2.4 Nährmedien

Als Nährmedium wurde Trypticase™ Soy Broth mit 0.15% Agar (TSB) verwendet, da es einer großen Auswahl an Mikroorganismen, den wichtigsten aeroben, anaeroben und fakultativ-anaeroben Bakterien als auch Pilzen, optimale Wachstumsvoraussetzungen liefert, so dass der Einfluss der Nahrungskonkurrenz auf das Wachstum ausgeschaltet wurde, wenn dieses Nährmedium benutzt wurde.

Dieser Faktor wurde dann in weiteren Versuchen untersucht, bei denen verschiedene Verdünnungsstufen von TSB mit NaCl 0,9% und TSB ohne Dextrose ausgetestet wurden. Damit wurde ein Wachstum unter Mangelbedingungen, welches der Situation auf Haut- und Schleimhäuten entspricht, simuliert.

Für den Ansatz der Konzentrationsgemische wurden 10ml und 50ml Greiner-Röhrchen benutzt, die mit dem Nährmedium gefüllt wurden. Dazu wurde bei den Wachstumsversuchen mit täglichen Wachstumskontrollen und auch bei den 8h-Versuchen 10ml TSB benutzt. Einzige Ausnahme bildeten hierbei die Ansätze mit einer Anfangsbakterienkonzentration von 10^0 KBE/ml, bei denen 50ml TSB verwendet wurden, da durch das häufige Ausstreichen von 500µl eine größere Ausgangsmenge benötigt wurde. Bei den Verdünnungsversuchen wurde TSB ohne Dextrose, TSB 1:5 mit NaCl 0,9% verdünnt, TSB 1:10 mit NaCl 0,9% verdünnt und TSB 1:100 mit NaCl 0,9% verdünnt verwendet. Da sich bei der Verdünnung 1:100 kein Wachstum mehr zeigte, wurde nach dem ersten Versuchsdurchlauf diese Verdünnungsstufe bei den weiteren Versuchen ausgelassen.

2.2.2.5 Erhebung des Bakterienwachstums unter Konkurrenzbedingungen

Zur Erhebung des Bakterienwachstums in den Konzentrationsgemischen wurde zu dem Zeitpunkt, an dem die Konzentrationsmessung durchgeführt werden sollte, ein Ausstrich auf einer geeigneten Selektivplatte durchgeführt. Mit dieser Methode ließ sich sicher, schnell und Kosten sparend die Konzentration beider Bakterienstämme im Gemisch bestimmen.

Die Kontrolle selbst wurde wie folgt durchgeführt. Zum jeweiligen Zeitpunkt der Wachstumserhebung wurden die Wachstumsgemische aus dem Brutschrank genommen und mit dem Vortexer so lange gemischt, bis ein homogenes Gemisch entstanden war. Unter dem Flow wurden dann 100µl entnommen und in ein 1,5ml Eppendorf Gefäß gegeben, in dem bereits 900µl NaCl 0,9% vorhanden waren. So wurden insgesamt 6 1:10 Verdünnungen angefertigt. Aus diesen Verdünnungen wurden Ausstriche vorgenommen mit denen es dann möglich war, die jeweiligen Konzentrationen zu erheben.

Exemplarisch für die Erhebung des Wachstums der Konzentrationsgemische soll hier das Gemisch von 10^3 KBE/ml zu 10^0 KBE/ml erläutert werden. Dabei sucht man die Konzentrationen jeweils in der Verdünnung, bei der sich die Konzentration in 10-99 KBE und 1-9 KBE darstellt. Das entspricht in diesem Fall der zweiten und dritten 1:10er Verdünnung für 10^3 KBE/ml. Um 10^0 KBE/ml nachzuweisen, wurden 2mal 500µl aus der Nährbouillon ausgestrichen.

Im Verlauf des Versuchs änderten sich natürlich die Konzentrationen bedingt durch das Bakterienwachstum. In vorangegangenen Probeversuchen ist die Wachstumskinetik der jeweiligen Bakterienstämme ermittelt worden, so dass ein Anhaltspunkt für das Wachstum in den Konkurrenzversuchen bestand. Es wurde jedoch immer ein breiteres Spektrum an Verdünnungsstufen ausgestrichen um etwaige Änderungen in der Wachstumskinetik erheben zu können. Wenn es trotz dieses Vorgehens dazu gekommen ist, das sich in den bebrüteten Ausstrichen keine Kolonien zeigten und damit eine Konzentrationsbestimmung nicht möglich war habe ich die Konzentration als kleiner der von mir ausgestrichenen Verdünnung festgelegt. Das heißt, wenn auf dem Ausstrich der Verdünnungsstufe, die eine Konzentration von 10^6 KBE/ml nachweist, keine Kolonie gezählt werden konnte wurde die Konzentration mit $< 10^6$ KBE/ml angegeben.

Die Selektivplatten wurden nach dem Ausstrich für 24h bei 37°C bebrütet danach die gewachsenen Kolonien auf den Platten ausgezählt und so die Konzentration im Wachstumsgemisch zum Zeitpunkt des Ausstrichs bestimmt.

Eine genaue Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Verdünnungsstufen liefern die im Anhang aufgeführten ***Tabelle 28-33***.

2.2.2.6 Auswahl der Selektivplatten

Abhängig von den Stämmen, wurden verschiedene Selektivplatten zur besseren optischen Unterscheidbarkeit der einzelnen Bakterienstämme benutzt. Welche Selektivplatte für den Versuch am besten geeignet war, wurde im Vorfeld jedes Versuchs ausgiebig getestet.

Dies war nötig, da das Wachstum in den Nährbouillons durch Ausstreichen auf Selektivplatten und anschließendes Auszählen bestimmt wurde. Die Kriterien für die Auswahl waren dabei eine genügende Differenz im Aussehen der Kolonien beider benutzten Stämme und eine ähnliche Wachstumsgeschwindigkeit, damit man sie beim Auszählen gut voneinander differenzieren konnte und nicht ein Stamm das Wachstum auf der Platte dominierte durch einen Vorteil auf der Selektivplatte.

2.2.2.6.1 *S. epidermidis* vs. MRSA

Bei den konkurrierenden Wachstumsversuchen mit *S. epidermidis* und den in dieser Arbeit getesteten MRSA-Stämmen wurden Baird Parker Selektivplatten benutzt, da auf diesen Platten die MRSA-Stämme mit einem gut sichtbaren Hof wachsen und *S. epidermidis* deutlich an Größe überlegen sind.

Blutplatten und auch ORSAB-Platten haben sich bei diesem Versuch als nicht geeignet herausgestellt, da die Unterscheidbarkeit der *S. epidermidis* Kolonien mit den MRSA-Kolonien nicht ausreichend gegeben war.

2.2.2.6.2 MSSA vs. MRSA

Bei den Versuchen mit den MRSA-Stämmen und dem sensiblen *S. aureus* (spa t012) wurde zusätzlich zur Erhebung der Bakterienkonzentrationen durch die visuelle Unterscheidung ein zweites Verfahren angewendet, das die Bakterienkonzentrationen anhand

von Subtraktionsverfahren bestimmt, da mit Bakterien der gleichen Art gearbeitet wurde.

Zur sicheren Erhebung des Bakterienwachstums wurden dabei die Ausstriche parallel auf zwei verschiedenen ORSAB-Platten durchgeführt. Der ersten Platte war Oxacillin in einer Konzentration von 2 mg/l zugesetzt (Wachstum nur des MRSA), die zweite ORSAB-Platte besaß keinen Zusatz von Oxacillin (Wachstum beider Stämme, MRSA und MSSA). Durch Subtraktion der Anzahl der KBE auf der ORSAB-Platte mit Oxacillin gegen die Anzahl der KBE der ORSAB-Platte ohne Zusatz wurde die Koloniezahl des MSSA bestimmt. Die Anzahl des MRSA war durch Auszählen der ORSAB-Platte mit Oxacillin bereits gegeben. Zur Kontrolle dieser Methode wurden die gesamten Wachstumskontrollen auf Blutplatten ausgestrichen und die beiden Stämme jeweils anhand der Hämolysezone voneinander unterschieden. Alle untersuchten MRSA-Stämme bildeten eine Hämolysezone, während der MSSA (spa t012) hämolysen negativ war.

2.2.2.6.3 *S. cerevisiae* vs. MRSA

Bei den Versuchen mit *Saccharomyces cerevisiae* und den MRSA-Stämmen fanden ebenfalls zwei verschiedene Platten Verwendung. Blutplatten, auf denen der *S. aureus* und Bierwürz-Agar-Platten (BW) auf denen *S. cerevisiae* ausgezählt wurden. Jeder Keim auf dem Medium, der ihm die optimalen Wachstumsbedingungen liefert.

Der Bierwürz-Agar wurde nach mehreren Probeversuchen mit verschiedenen Pilzselektivplatten (Chrom-Agar und Sabouraud-Agar) als optimal ausgewählt, da auf den anderen beiden Platten noch ein geringes Wachstum des *S. aureus* nachweisbar war im Gegensatz zum Bierwürz-Agar, auf dem der *S. aureus* nicht wächst. Damit standen zwei natürliche Selektivplatten für die Versuchsreihen zur Verfügung, mit denen die Erhebung der Bakterien-/Pilzkonzentrationen gut durchführbar waren.

2.2.2.6.4 *E. faecium* vs. MRSA

Die Wachstumsversuche mit *E. faecium* und den MRSA-Stämmen konnten auf Blutplatten durchgeführt werden, da sich die beiden Bakterien in Koloniegröße und -aussehen stark unterscheiden. *E. faecium* bildet viel kleinere und hellere Kolonien ohne Hämolysezone, während *S. aureus* in großen, elfenbeinfarbenen Kolonien mit Hämolysezone wächst.

2.2.2.6.5 *Lactobacilli* vs. MRSA

In den Versuchsreihen mit *Lactobacilli* stellten sich die Wachstumskontrollen als problematisch heraus. Verwendet wurden für die Versuchsansätze *Lactobacillus casei*, der aus der Bakterienstammsammlung des Mikrobiologischen Institutes der Universitätsklinik Würzburg verwendet wurde und *Lactobacillus acidophilus*, der aus einem handelsüblichen probiotischen Yoghurtgetränk isoliert wurde.

Aufgrund des sehr langsamen Wachstums der *Lactobacilli* - sie müssen mindestens 72h bei 37°C bebrütet werden, bevor sie zu einer auswertbaren Koloniegröße angewachsen waren - war ein Auszählen und Differenzieren der verschiedenen Bakterienstämme auf den Selektivplatten kaum möglich, da *S. aureus* in diesen 72h die Selektivplatte fast rasenartig bewachsen hatte.

Um dieses Problem zu beheben wurden unterschiedliche Selektivplatten, Ausstrichmethoden und Bebrütungsatmosphären ausgetestet. Dazu wurden Wachstumskontrollen auf Blutplatten und VL-Agar unter aeroben und anaeroben Bedingungen bebrütet. Weiterhin wurde das Ausstrichvolumen einer Wachstumskontrolle auf mehrere Selektivplatten verteilt, damit eine größere Fläche zur Verfügung steht.

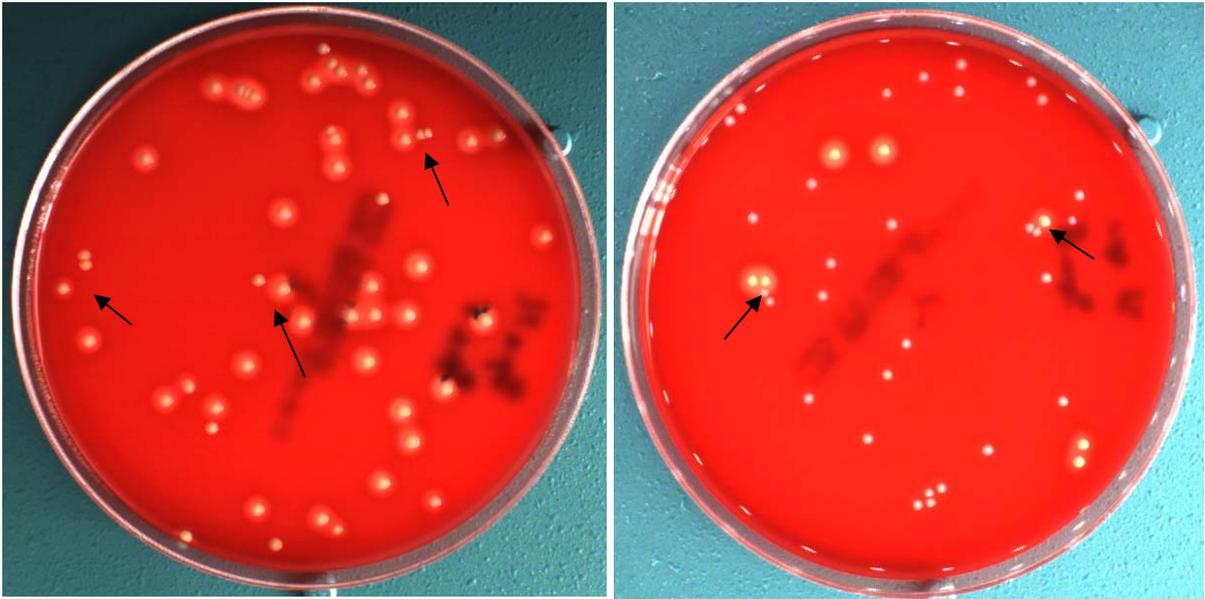
Leider war es nicht möglich, ein verwertbares Ergebnis zu erzielen. Daher wurde diese Versuchsreihe mit den *Lactobacilli* schon nach den Probeversuchen wieder abgebrochen.

2.2.3 Auswertung

Die Auswertung der Selektivplatten und somit die Bestimmung der Bakterienkonzentrationen zu den festgelegten Zeitpunkten erfolgte durch manuelles Auszählen. Dafür wurden nach einer Bebrütungszeit von im Mittel 24 Stunden die Selektivplatten einzeln mit einer manuellen Zählmaschine ausgezählt. Für das Auszählen der Mischkulturen musste natürlich bekannt sein, welcher Keim welche Kolonien bildet, damit sie voneinander unterschieden werden konnten. Als Vorlage diente bei jedem Versuch die jeweilige Reinkultur.

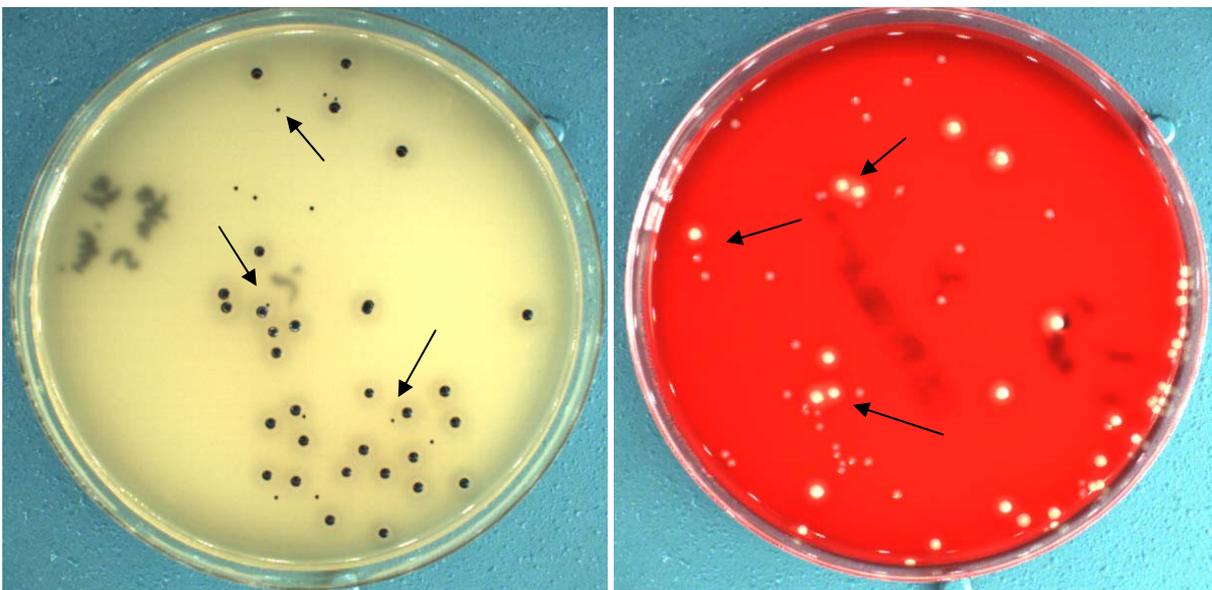
Wie auf den *Abbildung 2 a-d* deutlich zu erkennen ist, lassen sich die in dieser Arbeit gegeneinander getesteten Mikroorganismen optisch gut voneinander trennen. Die MRSA-Typen zeigten jeweils eine deutliche Hämolysezone wohingegen die anderen Mikroorganismen keine Hämolyse bildeten. Auch in Größe und Farbe der Kolonien gab es jeweils Unterschiede.

Bilder der verschiedenen Mischkulturen auf den Selektivplatten



a. Sensibler *S. aureus* (spa t012) zusammen mit MRSA spa t005 auf Blutagar

b. *S. epidermidis* zusammen mit MRSA spa t005 auf Blutagar



c. *S. epidermidis* zusammen mit MRSA spa t005 auf Baird Parker

d. *E. faecium* zusammen mit MRSA spa t005 auf Blutagar

Abbildung 2. Photographische Abbildung verschiedener Mischkulturen auf Blutagar und Baird Parker (Markiert wurden jeweils nebeneinander liegende Kolonien der verschiedenen Mikroorganismen)

2.2.4 Statistische Verfahren

Zur Ergebnisauswertung fanden in dieser Arbeit verschiedene statistische Verfahren Verwendung.

Zunächst erfolgte zur einfachen Darstellung der Wachstumsverläufe die graphische Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (\log_{10} KBE) (vgl. z.B. Abbildung 3). Dabei wurde die Zeit (je nach Versuch Stunden oder Tage) auf die x-Achse und die Mittelwerter der logarithmierten Erregerzahlen auf die y-Achse aufgetragen.

Zum Vergleich der Wachstumsverläufe der konkurrierenden Bakterienstämme untereinander wurde die zweifaktorielle Rangvarianzanalyse nach Puri und Sen verwendet, da mit diesem Verfahren ein Vergleich mehrere verbundener Stichproben (die beiden konkurrierenden Bakterienstämme zu den verschiedenen Zeitpunkten) möglich ist. Dabei habe ich mich auf drei Kernaussagen konzentriert, den Unterschied der Wachstumsverläufe von Gemisch und Reinkultur, den Unterschied der einzelnen Messtage zueinander und den Vergleich der Wachstumsverläufe der Bakterienstämme (Formunterschiede) (vgl. z.B. Tabelle 3).

In den Punktdiagrammen (vgl. z.B. Abbildung 4) erfolgte die Darstellung der Abhängigkeit des Wachstums vom eigenen Anfangswert des jeweiligen Bakterienstamms und dem des konkurrierenden Bakterienstamms am ersten Tag. Ergänzend zu diesen Abbildungen habe ich aufgrund der Abweichungen von einer Gaußschen Normalverteilung statt des Pearsonschen Maßkorrelationskoeffizienten die Spearmansche Rangkorrelation angegeben und somit die Korrelation der Anfangswerte der Bakterienkulturen mit denen nach Tag 1 berechnet (vgl. z.B. Tabelle 4).

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde das Wachstumsverhalten verschiedener MRSA-Stämme in Konkurrenz zu Bakterien der natürlichen Standortflora der Haut und Schleimhäute, der Darmflora sowie einem sensiblen *S. aureus* und einer Hefe untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden dabei gleichermaßen aus der graphischen Darstellung als auch aus der statistischen Auswertung der Messergebnisse ermittelt. In einfachen Wachstumskurven wurde das Wachstum in Rein- und Mischkulturen veranschaulicht, wobei die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE) für den jeweiligen Messzeitpunkt dargestellt wurden. In den Punktdiagrammen erfolgte die Darstellung der Abhängigkeit des Wachstums vom eigenen Anfangswert der jeweiligen Bakterien und dem des Konkurrenten am ersten Tag. Ergänzend zu diesen Abbildungen wurde aufgrund der Abweichungen von einer Gaußschen Normalverteilung statt des Pearsonschen Maßkorrelationskoeffizienten die Spearman'sche Rangkorrelation angegeben und somit die Korrelation der Anfangswerte der Bakterienkulturen mit denen nach Tag 1 berechnet.

Des Weiteren wurde die zweifaktorielle Rangvarianzanalyse nach Puri und Sen verwendet, mit der die Wachstumsverläufe der Rein- und Mischkulturen verglichen werden und somit eine Aussage über Unterschiede in den Wachstumsverläufen getroffen werden kann.

3.1 Wachstumsversuch (tägliche Kontrollen) *S. epidermidis* gegen MRSA-Stämme

3.1.1 *S. epidermidis* gegen *S. aureus* (spa t148)

In den ersten Versuchen wurde *S. epidermidis* gegen verschiedene MRSA-Stämme getestet. Bei der Ausarbeitung der Wachstumskurven beider Stämme und einem Vergleich zwischen der Reinkultur und dem Gemisch sind deutliche Unterschiede im Wachstum

festzustellen. Wie man anhand der **Abbildung 3** ersehen kann, hat *S. epidermidis* in der Mischkultur mit *S. aureus* (spa t148) ein deutliches Wachstumsdefizit gegenüber seinem Wachstum in Reinkultur.

Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen *S. epidermidis* vs. *S. aureus* (spa t148)

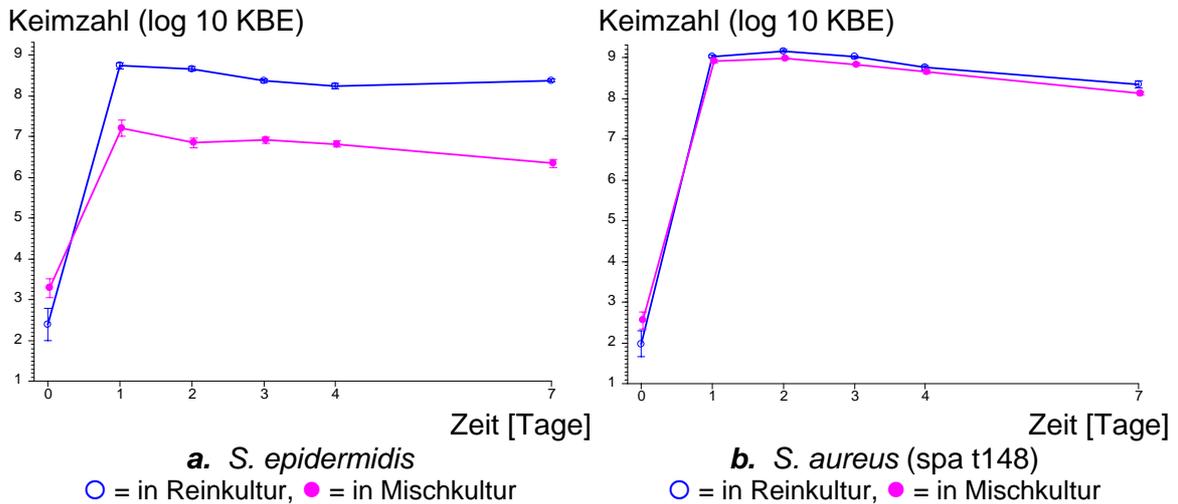


Abbildung 3. Wachstumsverläufe von *S. epidermidis* gegen *S. aureus* (spa t148) im Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen (Versuch Nr. 1). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE) und die Anzahl der Messwerte für den jeweiligen Tag, dabei sind die Messwerte für Reinkultur (Mischkultur) gemittelt aus 33 (15) Einzelmessungen.

Vergleicht man nun die Verläufe der Wachstumskurven, so kommt man zu folgendem Ergebnis. Die globale Analyse, eine zweifaktorielle Rangvarianzanalyse der Tage 1-4 und 7 nach Puri und Sen (siehe **Tabelle 3**) ergibt signifikante Unterschiede der Erregerkonzentrationen zwischen den Messtagen und für beide Erreger signifikante Unterschiede zwischen Rein- und Mischkultur. Für *S. epidermidis* waren die Verläufe der Wachstumskurven nicht parallel, entsprechend des signifikanten Formunterschiedes der Kurven. Für *S. aureus* besteht kein signifikanter Formunterschied zwischen den Wachstumskurven.

Bei dieser Betrachtungsweise muss beachtet werden, dass der Unterschied im Wachstum bei *S. epidermidis* im Durchschnitt 1,5-2 log₁₀ KBE beträgt, also einen großen Unterschied darstellt. Der Wachstumsunterschied beim *S. aureus* (spa t148) hingegen stellt zwar statistisch gesehen einen signifikanten Unterschied dar, doch bewegt sich dieser in einem Bereich von 0,1-0,2 log₁₀ KBE und ist daher klinisch gesehen nicht bedeutsam.

<i>S. epidermidis</i>	
Unterschied Gemisch-Reinkultur	p < 0.000005***
Unterschiede der Messtage	p < 0.000005***
Formunterschiede	p = 0.00034***
<i>S. aureus (spa t148)</i>	
Unterschied Gemisch-Reinkultur	p = 0.0028 **
Unterschiede der Messtage	p < 0.000005***
Formunterschiede	p = 0.11

Tabelle 3. Globaler Vergleich der Verläufe von *S. epidermidis* und *S. aureus (spa t148)*, gemessen nach 1, 2, 3, 4 und 7 Tagen. p aus der zweifaktoriellen Rangvarianzanalyse nach Puri und Sen.

Dieses Verhalten spiegelt sich auch im paarweisen Vergleich der Werte (siehe **Tabelle 4**) an den verschiedenen Tagen wider. Man erkennt, dass sich *S. epidermidis* in Rein- und Mischkultur mit dem MRSA stark unterschiedlich verhält. Der MRSA dagegen zeigt nur geringe oder keine Unterschiede in seinem Wachstumsverhalten.

	Korrelation von		n	rho	p
	Tag 0	Tag 1			
Reinkultur	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	15	0.2554	0.36
Gemisch	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	33	0.7921	<0.00005***
Reinkultur	<i>S. aureus (spa t148)</i>	<i>S. aureus (spa t148)</i>	12	-0.5884	0.044 *
Gemisch	<i>S. aureus (spa t148)</i>	<i>S. aureus (spa t148)</i>	29	-0.1966	0.31
Gemisch	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus (spa t148)</i>	30	-0.1558	0.41
Gemisch	<i>S. aureus (spa t148)</i>	<i>S. epidermidis</i>	29	-0.7283	<0.00005***

Tabelle 4. Korrelation der Anfangswerte von *S. epidermidis* und von *S. aureus (spa t148)* mit den Werten nach 1 Tag. Für den gemischten Ansatz konnte auch die Korrelation mit dem Anfangswert des jeweils anderen Erregerstammes berechnet werden. rho und p aus der Spearman'schen Rangkorrelation.

Weitere Wachstumsunterschiede fanden sich bei unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen der Erreger auf die Konzentration nach 24 Stunden. Während sich für die Reinkulturen kaum ein Einfluss des Anfangswertes auf die Erregerzahl an den nächsten Tagen nachweisen lässt und auch im gemischten Ansatz für *S. aureus (spa t148)* ebenfalls nur geringe Zusammenhänge mit den Anfangswerten beider Erregerarten zu sehen sind, sieht man für *S. epidermidis* im gemischten Ansatz eindeutige Bezüge zu den Anfangswerten (siehe **Abbildung 4b**).

Abhängigkeit vom Anfangswert

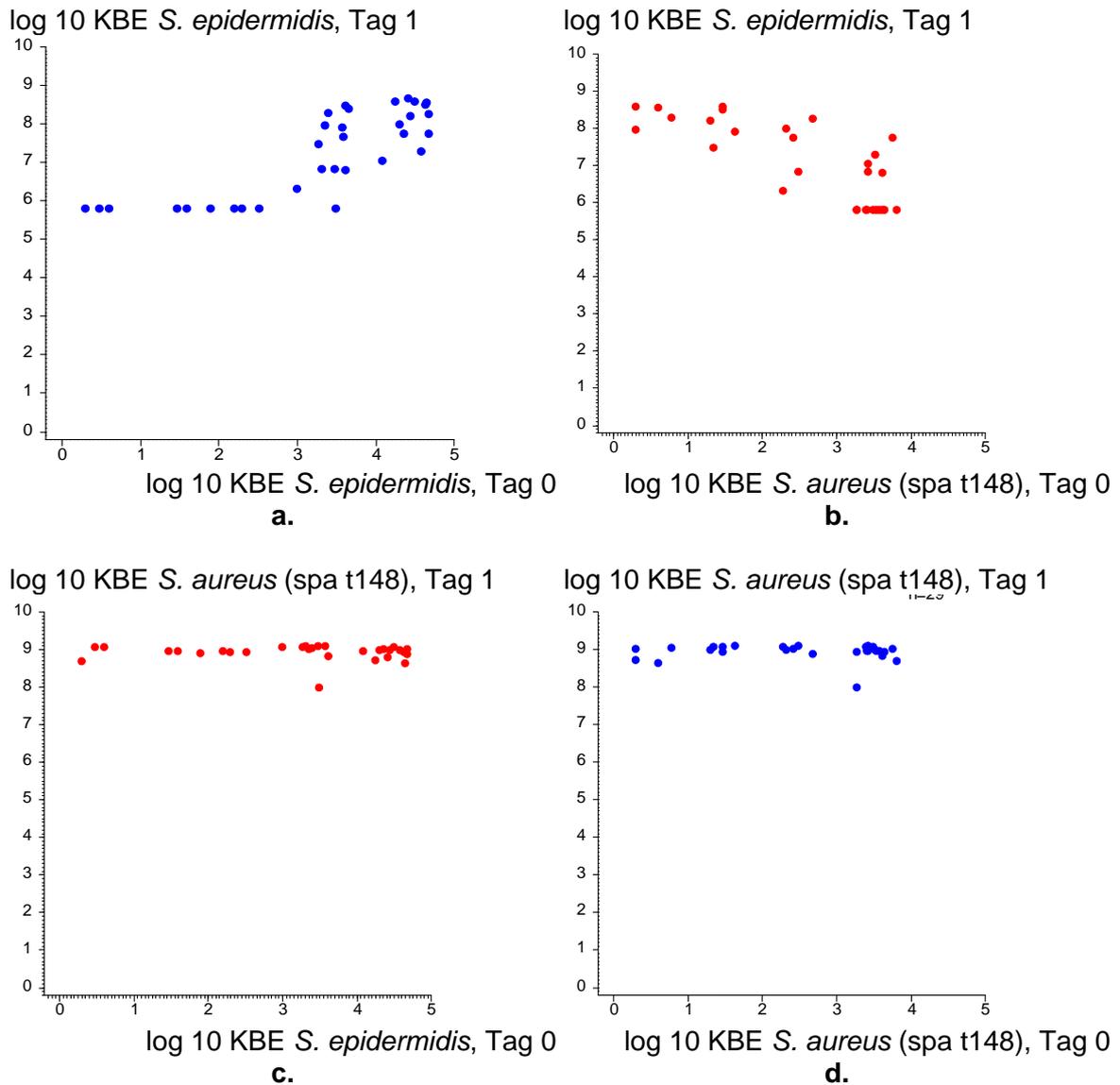


Abbildung 4. Abhängigkeit des Wertes am ersten Tag vom Anfangswert in den gemischten Ansätzen für *S. epidermidis* und *S. aureus* (spa t148). Jeder Punkt entspricht einer Messung. Die Punkte der Höhe 5.8 am Tag 1 stellen Werte $< 10^6$ dar (siehe Absatz 2.2.2.5). Reinkulturen sind blau und Mischkulturen rot dargestellt

Je höher die Anfangswerte des *S. aureus* sind, desto niedriger sind die Werte des *S. epidermidis* am nächsten Tag. Diese Darstellungsweise verdeutlicht noch einmal anschaulich die Hemmung des Wachstums von *S. epidermidis* unter Konkurrenz zum *S. aureus* (spa t148).

3.1.2 *S. epidermidis* gegen *S. aureus* (spa t005)

Bei den weiteren Versuchen *S. epidermidis* versus *S. aureus* (spa t005, spa t003, spa t008) ergeben sich mit marginalen Unterschieden entsprechende Ergebnisse wie bei den Versuchen versus *S. aureus* (spa t148). Die zugehörigen Grafiken und Tabellen (siehe Kapitel 4.1.2-4.1.4) sind im Folgenden aufgelistet.

Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen *S. epidermidis* vs. *S. aureus* (spa t005)

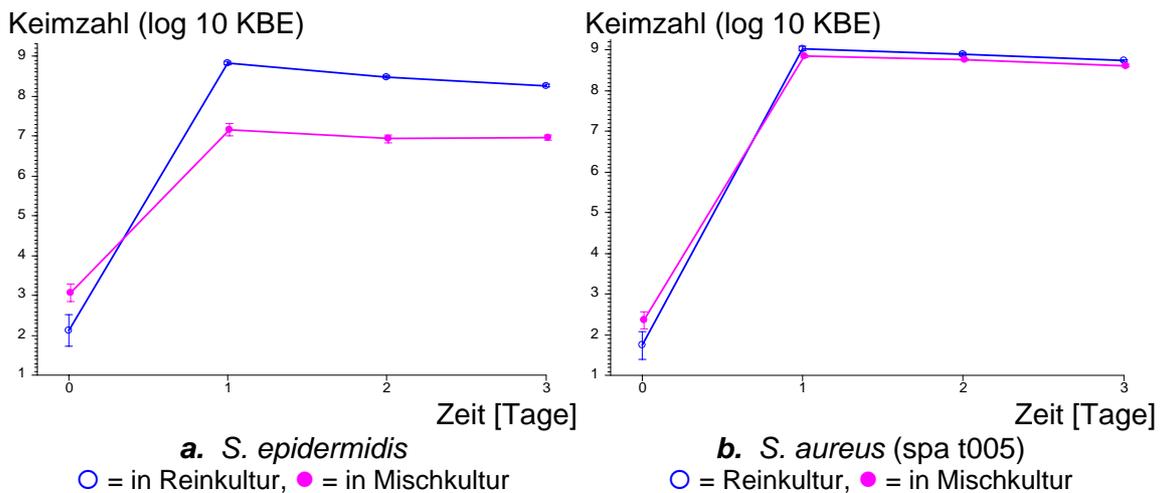


Abbildung 5. Verläufe von *S. epidermidis* und *S. aureus* (spa t005) im Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen (Versuch Nr. 2). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE) und die Anzahl der Messwerte für den jeweiligen Tag, dabei sind die Messwerte für Reinkultur (Mischkultur) gemittelt aus 33 (15) Einzelmessungen.

S. epidermidis

Unterschied Gemisch-Reinkultur	p < 0.000005***
Unterschiede der Messtage	p = 0.00004***
Formunterschiede	p = 0.028

S. aureus (spa t005)

Unterschied Gemisch-Reinkultur	p = 0.0034 **
Unterschiede der Messtage	p < 0.000005***
Formunterschiede	p = 0.62

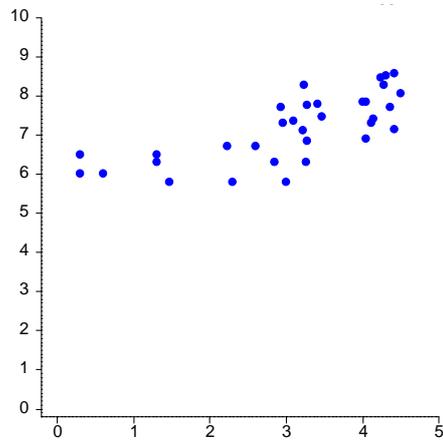
Tabelle 5. Globaler Vergleich der Verläufe von *S. epidermidis* und *S. aureus* (spa t005), gemessen nach 1 bis 3 Tagen. p aus der zweifaktoriellen Rangvarianzanalyse nach Puri und Sen.

	Korrelation von		n	rho	p
	Tag 0	Tag 1			
Reinkultur	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	15	0.5385	0.038 *
Gemisch	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	33	0.7634	<0.00005***
Reinkultur	<i>S. aureus</i> (spa t005)	<i>S. aureus</i> (spa t005)	11	-0.1276	0.71
Gemisch	<i>S. aureus</i> (spa t005)	<i>S. aureus</i> (spa t005)	32	0.4614	0.0079**
Gemisch	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i> (spa t005)	33	-0.1559	0.39
Gemisch	<i>S. aureus</i> (spa t005)	<i>S. epidermidis</i>	32	-0.7042	<0.00005***

Table 6. Korrelation der Anfangswerte von *S. epidermidis* und von *S. aureus* (spa t005) mit den Werten nach 1 Tag. Für den gemischten Ansatz konnte auch die Korrelation mit dem Anfangswert des jeweils anderen Erregerstammes berechnet werden. rho und p aus der Spearmanschen Rangkorrelation.

Abhängigkeit vom Anfangswert

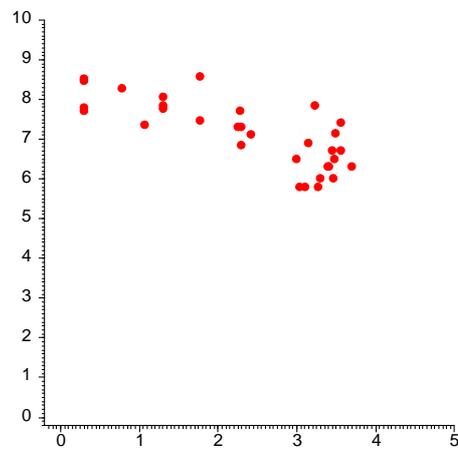
log 10 KBE *S. epidermidis*, Tag 1



log 10 KBE *S. epidermidis*, Tag 0

a.

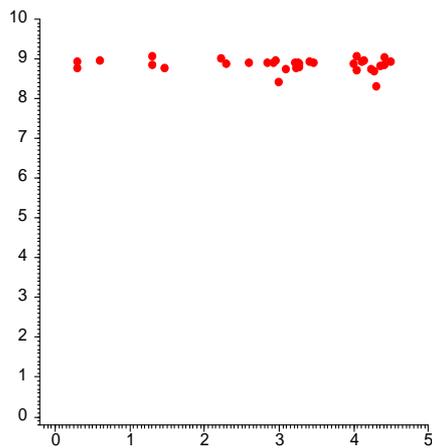
log 10 KBE *S. epidermidis*, Tag 1



log 10 KBE *S. aureus* (spa t005), Tag 0

b.

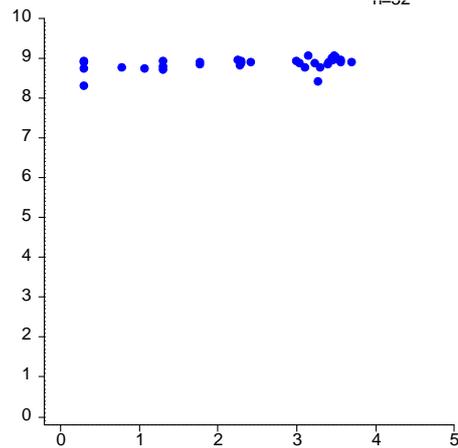
log 10 KBE *S. aureus* (spa t005), Tag 1



log 10 KBE *S. epidermidis*, Tag 0

c.

log 10 KBE *S. aureus* (spa t005), Tag 1



log 10 KBE *S. aureus* (spa t005), Tag 0

d.

Abbildung 6. Abhängigkeit des Wertes am ersten Tag vom Anfangswert in den gemischten Ansätzen für *S. epidermidis* und *S. aureus* (spa t005). Jeder Punkt entspricht einer Messung. Die Punkte der Höhe 5.8 am Tag 1 stellen Werte $< 10^6$ dar (siehe Absatz 2.2.2.5). Reinkulturen sind blau und Mischkulturen rot dargestellt

3.1.3 *S. epidermidis* gegen *S. aureus* (spa t003)

Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen *S. epidermidis* vs. *S. aureus* (spa t003)

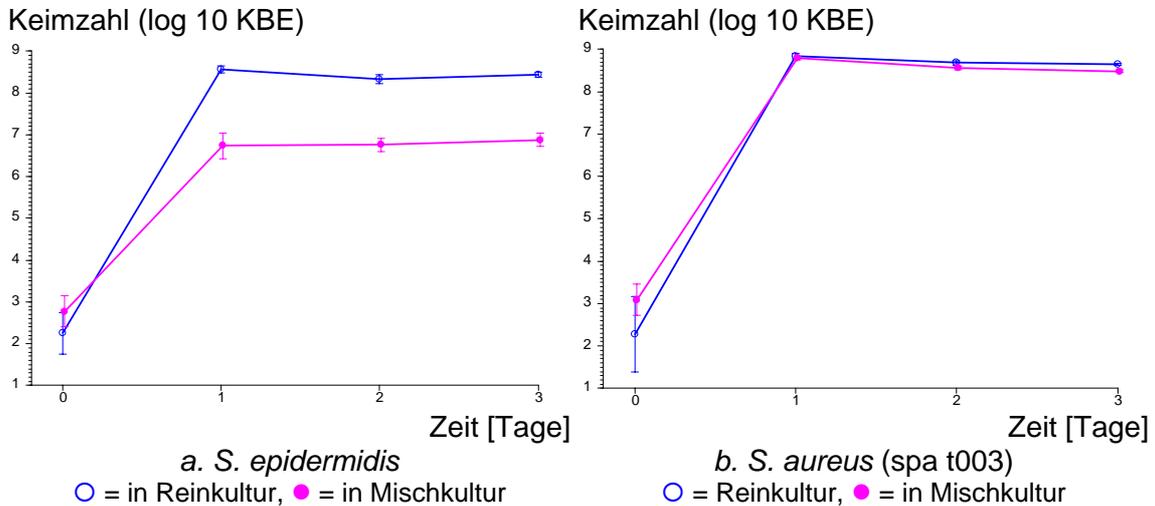


Abbildung 7. Verläufe von *S. epidermidis* und *S. aureus* (spa t003) im Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen (Versuch Nr. 3). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE) und die Anzahl der Messwerte für den jeweiligen Tag, dabei sind die Messwerte für Reinkultur (Mischkultur) gemittelt aus 13 (10) Einzelmessungen.

S. epidermidis

Unterschied Gemisch-Reinkultur	p = 0.00035***
Unterschiede der Messtage	p = 1.0
Formunterschiede	p = 0.48

***S. aureus* (spa t003)**

Unterschied Gemisch-Reinkultur	p = 0.087
Unterschiede der Messtage	p = 0.00001***
Formunterschiede	p = 0.21

Tabelle 7. Globaler Vergleich der Verläufe von *S. epidermidis* und *S. aureus* (spa t003), gemessen nach 1 bis 3 Tagen. p aus der zweifaktoriellen Rangvarianzanalyse nach Puri und Sen.

	Korrelation von		n	rho	p
	Tag 0	Tag 1			
Reinkultur	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	10	0.8788	0.0008***
Gemisch	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	14	0.8153	0.0004***
Reinkultur	<i>S. aureus</i> (spa t003)	<i>S. aureus</i> (spa t003)	4	0.0000	1.0
Gemisch	<i>S. aureus</i> (spa t003)	<i>S. aureus</i> (spa t003)	14	0.2332	0.49
Gemisch	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i> (spa t003)	13	0.5447	0.054
Gemisch	<i>S. aureus</i> (spa t003)	<i>S. epidermidis</i>	13	-0.5084	0.076

Tabelle 8. Korrelation der Anfangswerte von *S. epidermidis* und von *S. aureus* (spa t003) mit den Werten nach 1 Tag. Für den gemischten Ansatz konnte auch die Korrelation mit dem Anfangswert des jeweils anderen Erregerstammes berechnet werden. rho und p aus der Spearman'schen Rangkorrelation.

Abhängigkeit vom Anfangswert

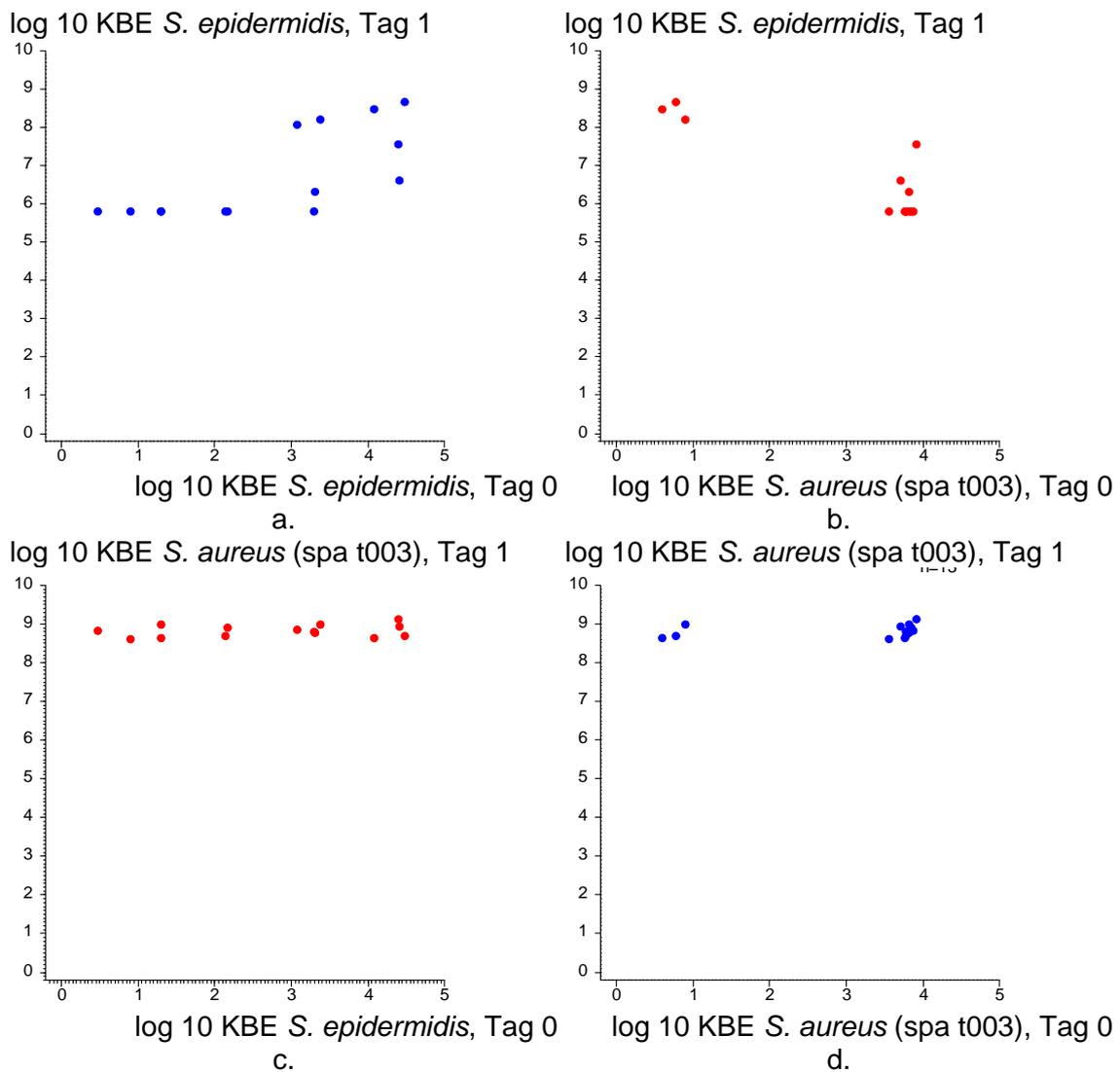


Abbildung 8. Abhängigkeit des Wertes am ersten Tag vom Anfangswert in den gemischten Ansätzen für *S. epidermidis* und *S. aureus* (spa t003). Jeder Punkt entspricht einer Messung. Die Punkte der Höhe 5.8 am Tag 1 stellen Werte $< 10^6$ dar (siehe Absatz 2.2.2.5). Reinkulturen sind blau und Mischkulturen rot dargestellt

3.1.4 *S. epidermidis* gegen *S. aureus* (spa t008)

Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen *S. epidermidis* vs. *S. aureus* (spa t008)

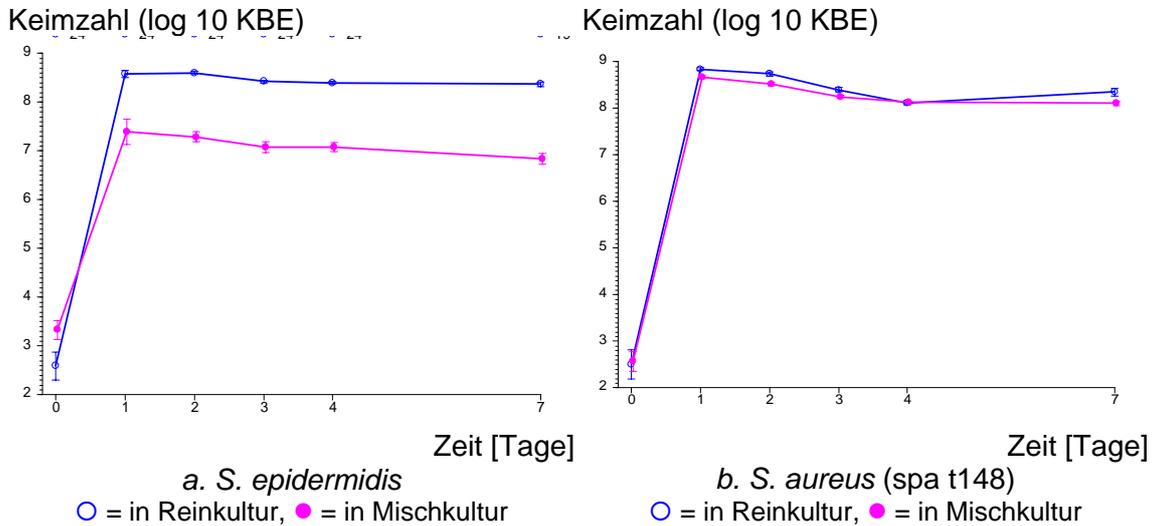


Abbildung 9. Verläufe von *S. epidermidis* und *S. aureus* (spa t008) im Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen (Versuch Nr. 4). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE) und die Anzahl der Messwerte für den jeweiligen Tag, dabei sind die Messwerte für Reinkultur (Mischkultur) gemittelt aus 41 (24) Einzelmessungen.

S. epidermidis

Unterschied Gemisch-Reinkultur	$p < 0.000005^{***}$
Unterschiede der Messtage	$p < 0.000005^{***}$
Formunterschiede	$p = 0.0050^{**}$

S. aureus (spa t148)

Unterschied Gemisch-Reinkultur	$p = 0.00075^{***}$
Unterschiede der Messtage	$p < 0.000005^{***}$
Formunterschiede	$p = 0.035^{*}$

Tabelle 9. Globaler Vergleich der Verläufe von *S. epidermidis* und *S. aureus* (spa t008), gemessen nach 1, 2, 3, 4 und 7 Tagen. p aus der zweifaktoriellen Rangvarianzanalyse nach Puri und Sen.

	Korrelation von		n	rho	p
	Tag 0	Tag 1			
Reinkultur	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	24	0.5916	0.0023**
Gemisch	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	41	0.7841	0.00005***
Reinkultur	<i>S. aureus</i> (spa t008)	<i>S. aureus</i> (spa t008)	15	-0.0268	0.92
Gemisch	<i>S. aureus</i> (spa t008)	<i>S. aureus</i> (spa t008)	41	0.2601	0.10
Gemisch	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i> (spa t008)	41	-0.1825	0.25
Gemisch	<i>S. aureus</i> (spa t008)	<i>S. epidermidis</i>	40	-0.8094	<0.00005***

Tabelle 10. Korrelation der Anfangswerte von *S. epidermidis* und von *S. aureus* (spa t008) mit den Werten nach 1 Tag. Für den gemischten Ansatz konnte auch die Korrelation mit dem Anfangswert des jeweils anderen Erregerstammes berechnet werden. rho und p aus der Spearman'schen Rangkorrelation.

Abhängigkeit vom Anfangswert

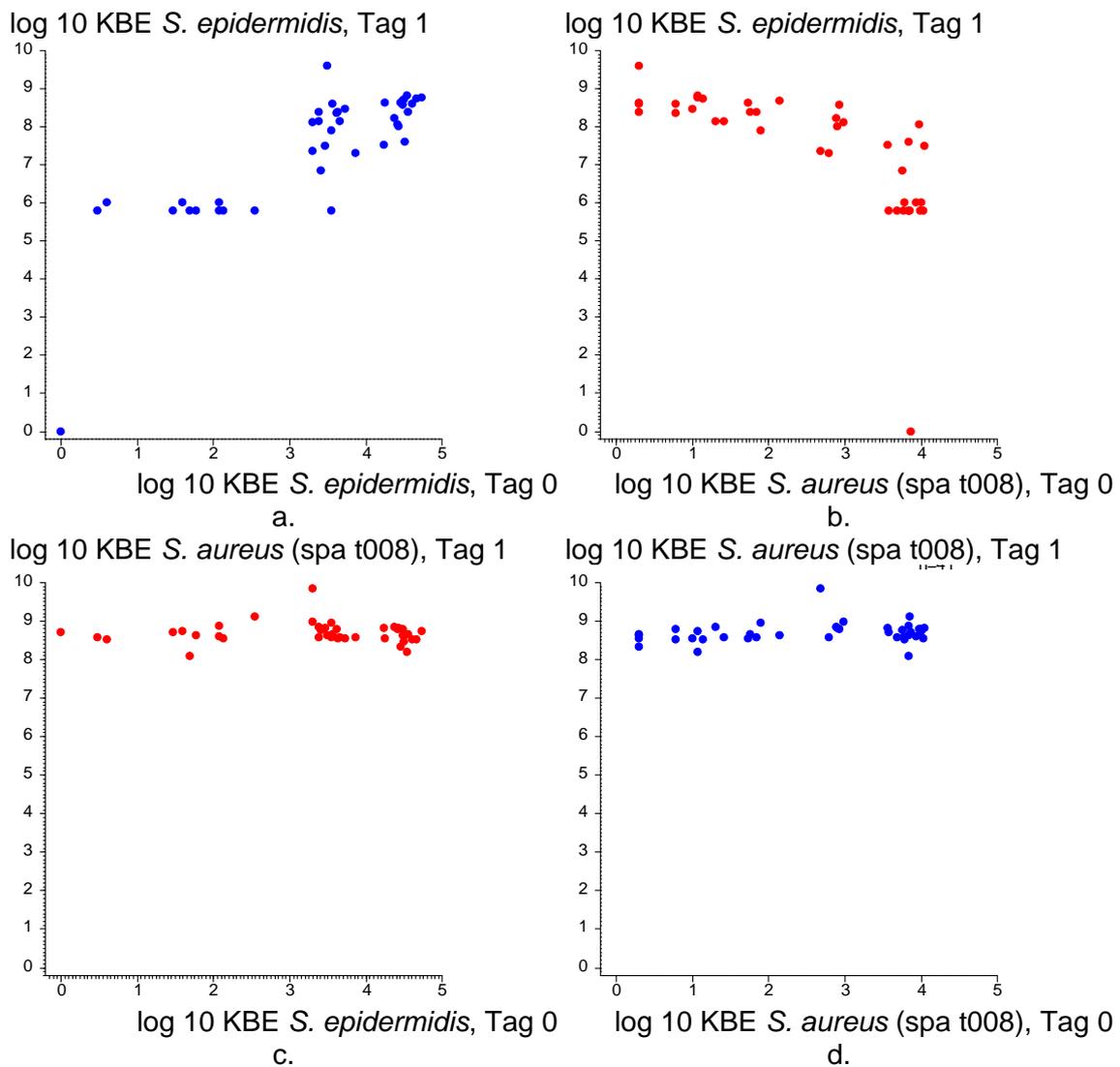


Abbildung 10. Abhängigkeit des Wertes am ersten Tag vom Anfangswert in den gemischten Ansätzen für *S. epidermidis* und *S. aureus* (spa t008). Jeder Punkt entspricht einer Messung. Die Punkte der Höhe 5.8 am Tag 1 stellen Werte $< 10^6$ dar (siehe Absatz 2.2.2.5). Reinkulturen sind blau und Mischkulturen rot dargestellt

3.1.5 Vergleich der vier MRSA-Stämme

Im allgemeinen Vergleich der verschiedenen MRSA-Stämme lässt sich die gravierende Dominanz des MRSA gegenüber dem *S. epidermidis* darstellen.

Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen 4 Stämme des *S. aureus* gegen *S. epidermidis*

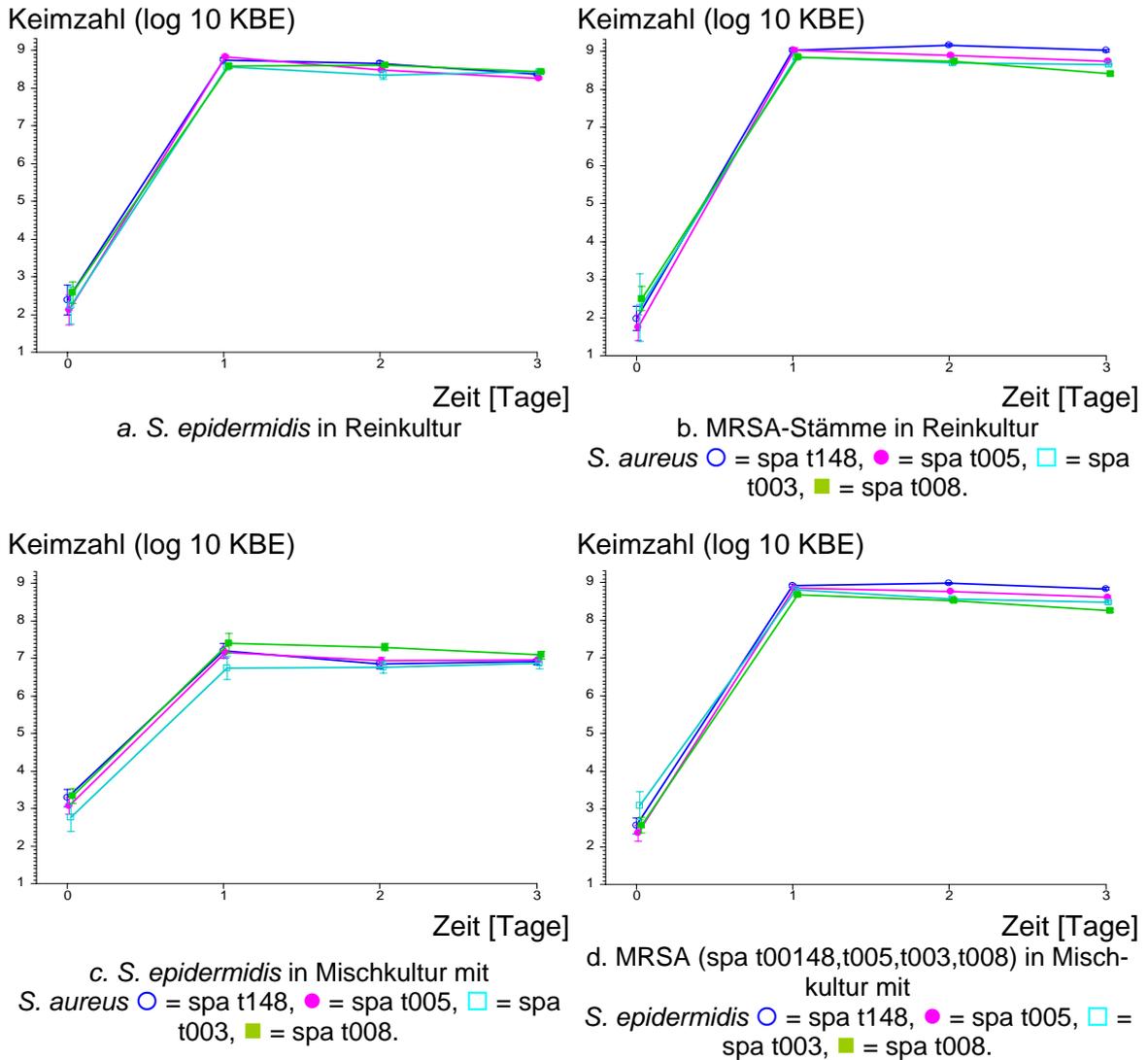


Abbildung 11. Verläufe von *S. epidermidis* und von vier resistenten Stämmen *S. aureus* im Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE) und die Anzahl der Messwerte für den jeweiligen Tag.

Wie aus **Abbildung 11 b.** und **d.** zu ersehen ist verhalten sich die einzelnen Stämme egal ob in Rein- oder Mischkultur gleichartig. Die Differenz zwischen Reinkultur und Gemisch beträgt nie mehr als 0,5 log 10 KBE. Im Gegensatz dazu kann man beim *S. epidermidis* eindeutig Unterschiede im Wachstum von Reinkultur zu Mischkultur erkennen (**Abbildung 11 a., c.**). Die Differenz beträgt im größten Fall ca. 2 log 10 KBE für den *S. epidermidis* in Konkurrenz zum spa t148 und im kleinsten Fall ca. 1 log 10 KBE in Konkurrenz zum spa t008.

3.2 Wachstumsversuch (tägliche Kontrollen) *S. aureus* (spa t012) gegen MRSA-Stämme

3.2.1 MSSA (spa t012) gegen MRSA (spa t148)

In weiteren Versuchen wurde bei gleichem Versuchsaufbau ein MSSA (spa t012) gegen die gleichen MRSA-Stämme getestet. Auch bei diesen Versuchen fällt auf, dass die verschiedenen MRSA-Stämme den MSSA dominieren und sein Wachstum gegenüber der Reinkultur hemmen, im Mittel um ca. 1-1,5 log 10 KBE. Im Vergleich zu den Versuchen mit dem *S. epidermidis* lässt sich eine stärkere Hemmung des Wachstums (siehe **Abbildung 12b.**) der MRSA-Stämme in Mischkultur erkennen. Im Durchschnitt weichen diese Wachstumskurven um 0,5 log 10 KBE von den Verläufen der Reinkulturen ab. Der MRSA dominiert auch in diesem Versuch das Wachstum der Mischkultur, wenn auch nicht ganz so überlegen wie im Gemisch mit dem *S. epidermidis*.

Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen MSSA (spa t012) vs. MRSA (spa t148)

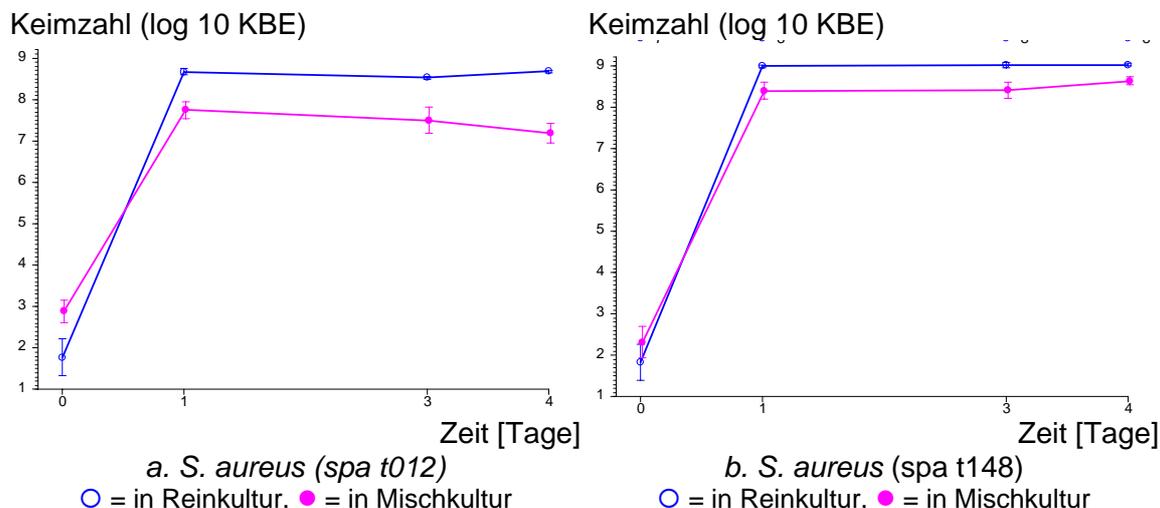


Abbildung 12. Wachstumsverläufe von *S. aureus* (spa t012) gegen *S. aureus* (spa t148) im Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen (Versuch Nr. 21). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE) und die Anzahl der Messwerte für den jeweiligen Tag, dabei sind die Messwerte für Reinkultur (Mischkultur) gemittelt aus 11 (8) Einzelmessungen.

Dieses Verhalten spiegelt sich sowohl in der globalen Analyse (siehe **Tabelle 11**), die bei beiden Erregern, dem MSSA und dem MRSA signifikante Unterschiede zwischen Rein- und Mischkultur erkennen lässt, als auch im paarweisen Vergleich der Werte (siehe **Tabelle 12**) in den ersten 24 Stunden wider.

MSSA (spa t012)

Unterschied Gemisch-Reinkultur	p = 0.0024**
Unterschiede der Messtage	p = 0.30
Formunterschiede	p = 0.14

MRSA (spa t148)

Unterschied Gemisch-Reinkultur	p = 0.0035 **
Unterschiede der Messtage	p = 0.42
Formunterschiede	p = 0.63

Tabelle 11. Globaler Vergleich der Verläufe von *S. aureus* (spa t012) und *S. aureus* (spa t148), gemessen nach 1, 3, und 4 Tagen. p aus der zweifaktoriellen Rangvarianzanalyse nach Puri und Sen.

	Korrelation von		n	rho	p
	Tag 0	Tag 1			
Reinkultur	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t012)	8	0.2036	0.64
Gemisch	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t012)	9	0.7731	0.015*
Reinkultur	<i>S. aureus</i> (spa t148)	<i>S. aureus</i> (spa t148)	7	0.3929	0.38
Gemisch	<i>S. aureus</i> (spa t148)	<i>S. aureus</i> (spa t148)	14	0.7775	0.0011*
Gemisch	<i>S. aureus</i> (spa t148)	<i>S. aureus</i> (spa t012)	9	-0.8186	0.0070*
Gemisch	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t148)	11	-0.8155	0.0022**

Table 12. Korrelation der Anfangswerte von *S. aureus* MSSA (spa t012) und von *S. aureus* MRSA (spa t148) mit den Werten nach Tag 1. Für den gemischten Ansatz konnte auch die Korrelation mit dem Anfangswert des jeweils anderen Erregerstammes berechnet werden. rho und p aus der Spearmanschen Rangkorrelation.

Der Einfluss der Ausgangskonzentrationen in den Wachstumsgemischen ist etwas ausgeglichener als bei den Versuchen mit dem *S. epidermidis*. Für die Reinkulturen zeigt sich kaum ein Einfluss des Anfangswertes auf die Erregerzahl an den nächsten Tagen. Betrachtet man die Wachstumsgemische so erkennt man eindeutig eine Korrelation der Werte am ersten Tag zu den Ausgangskonzentrationen. Je höher die Konzentration des MRSA (spa t148) am ersten Tag, desto geringer ist der Wert für den MSSA (spa t012) am Folgetag. Gleichfalls reduziert eine hohe Anfangskonzentration des MSSA das Wachstum des MRSA, jedoch in einem geringeren Grade als andersherum (vergleiche **Abbildung 13 b, c**).

Abhängigkeit vom Anfangswert

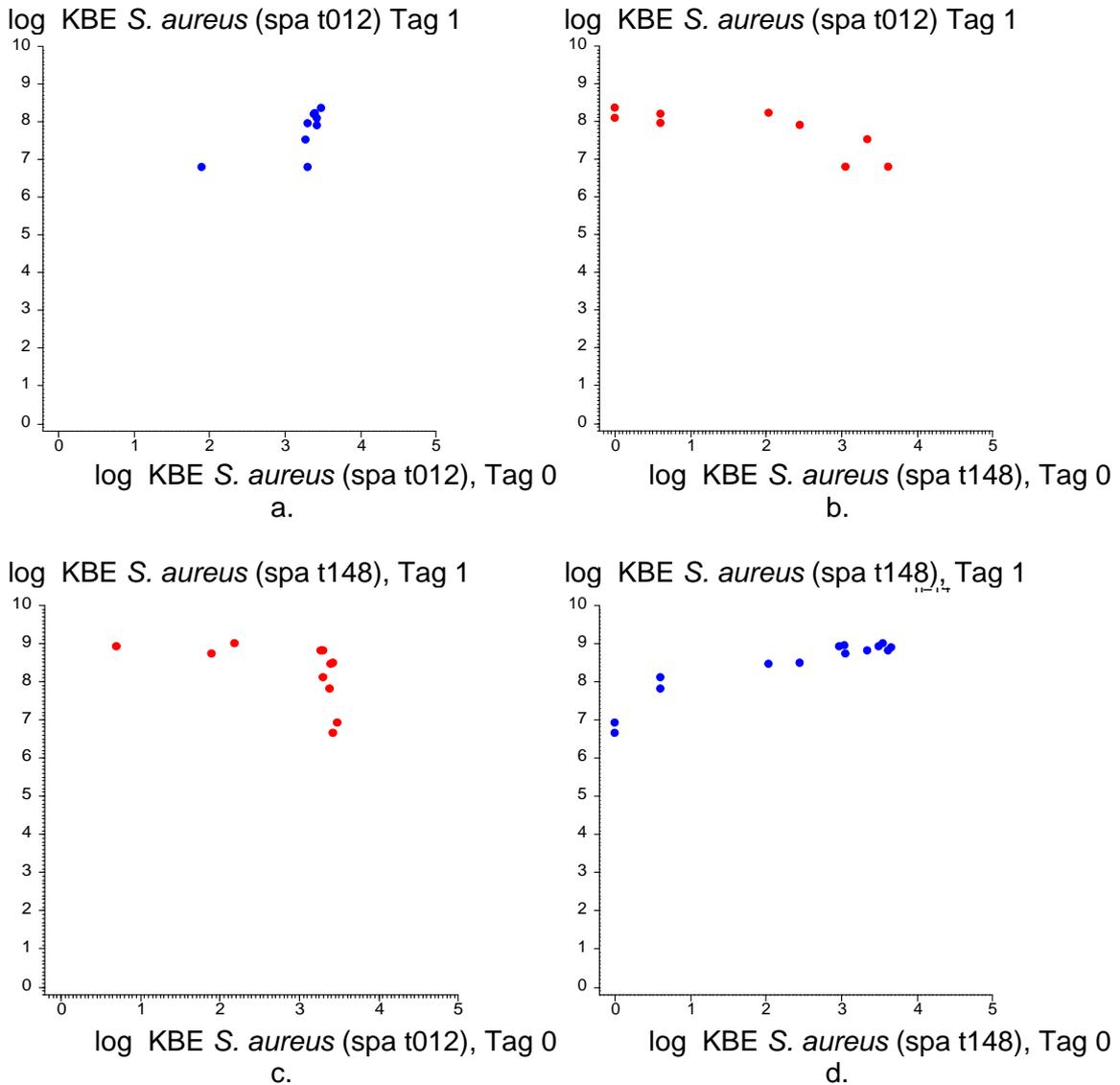


Abbildung 13. Abhängigkeit des Wertes am ersten Tag vom Anfangswert in den gemischten Ansätzen für *S. aureus* (spa t012) und *S. aureus* (spa t148). Jeder Punkt entspricht einer Messung. Reinkulturen sind blau und Mischkulturen rot dargestellt

3.2.2 MSSA (spa t012) gegen MRSA (spa t003)

Entsprechende Ergebnisse ergeben sich für die weiteren getesteten MRSA-Stämme, spa t003 und spa t005. Die zugehörigen Grafiken und Abbildungen werden im Folgenden aufgelistet (siehe **Kapitel 4.2.2-4.2.3**).

Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen MSSA (spa t012) vs. MRSA (spa t003)

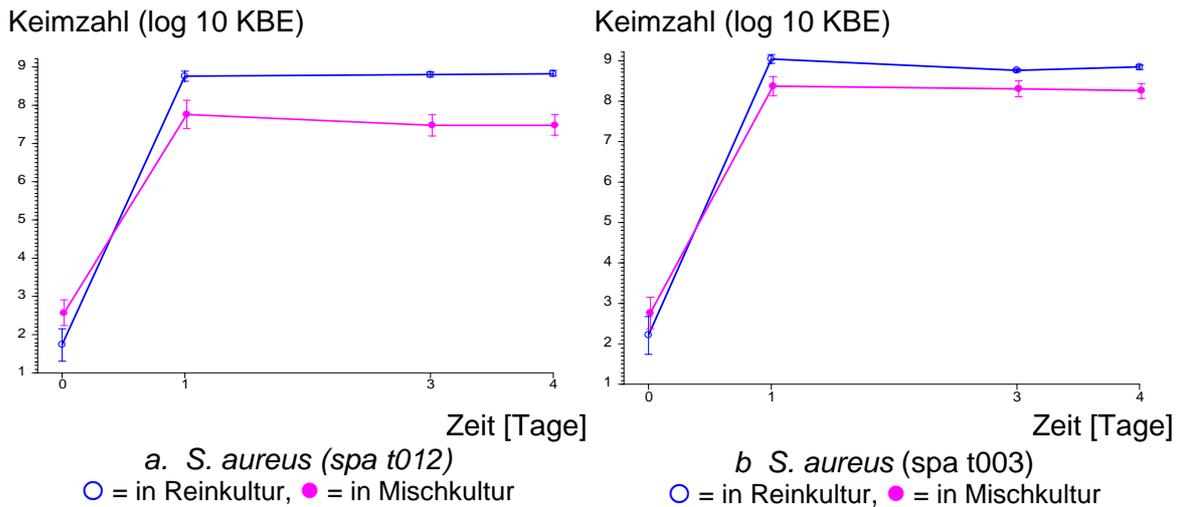


Abbildung 14. Wachstumsverläufe von *S. aureus* (spa t012) gegen *S. aureus* (spa t003) im Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen (Versuch Nr. 22). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE) und die Anzahl der Messwerte für den jeweiligen Tag, dabei sind die Messwerte für Reinkultur (Mischkultur) gemittelt aus 13 (8) Einzelmessungen.

MSSA (spa t012)	
Unterschied Gemisch-Reinkultur	p = 0.0060**
Unterschiede der Messtage	p = 0.77
Formunterschiede	p = 0.78
MRSA (spa t003)	
Unterschied Gemisch-Reinkultur	p = 0.027*
Unterschiede der Messtage	p = 0.0061**
Formunterschiede	p = 0.43

Tabelle 13. Globaler Vergleich der Verläufe von *S. aureus* (spa t012) und *S. aureus* (spa t003), gemessen nach den Tagen 1, 3, und 4. p aus der zweifaktoriellen Rangvarianzanalyse nach Puri und Sen.

	Korrelation von		n	rho	p
	Tag 0	Tag 1			
Reinkultur	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t012)	7	-0.2500	0.59
Gemisch	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t012)	10	0.6970	0.025*
Reinkultur	<i>S. aureus</i> (spa t003)	<i>S. aureus</i> (spa t003)	8	0.2381	0.58
Gemisch	<i>S. aureus</i> (spa t003)	<i>S. aureus</i> (spa t003)	14	0.7019	0.0051**
Gemisch	<i>S. aureus</i> (spa t003)	<i>S. aureus</i> (spa t012)	10	-0.5440	0.055
Gemisch	<i>S. aureus</i> (spa t012)	<i>S. aureus</i> (spa t003)	13	-0.8545	0.0016**

Tabelle 14. Korrelation der Anfangswerte von *S. aureus* MSSA (spa t012) und von *S. aureus* MRSA (spa t003) mit den Werten nach Tag 1. Für den gemischten Ansatz konnte auch die Korrelation mit dem Anfangswert des jeweils anderen Erregerstammes berechnet werden. rho und p aus der Spearmanschen Rangkorrelation.

Abhängigkeit vom Anfangswert

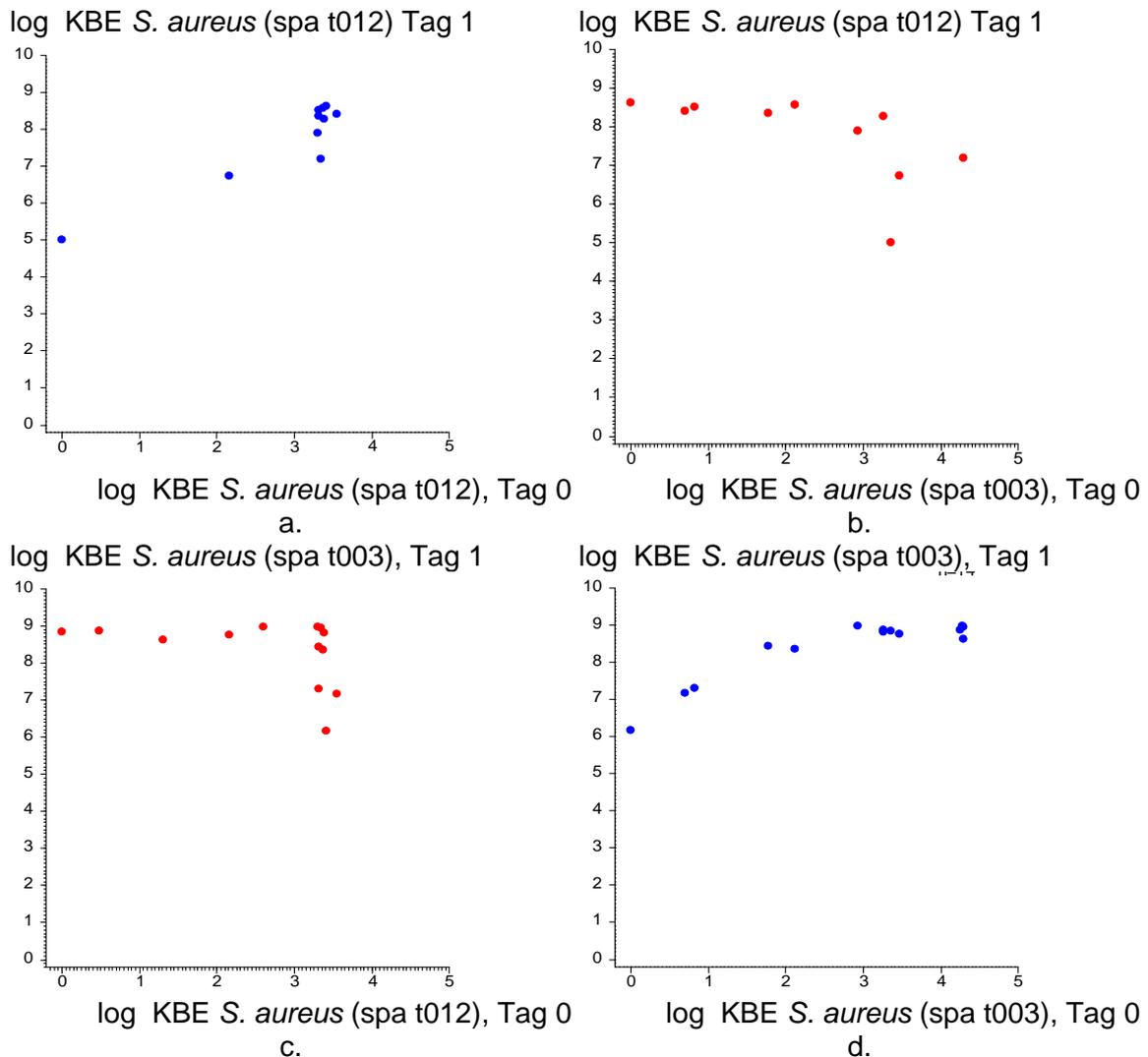


Abbildung 15. Abhängigkeit des Wertes am ersten Tag vom Anfangswert in den gemischten Ansätzen für *S. aureus* (spa t012) und *S. aureus* (spa t003). Jeder Punkt entspricht einer Messung. Reinkulturen sind blau und Mischkulturen rot dargestellt.

3.2.3 MSSA (spa t012) gegen MRSA (spa t005)

Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen *S. aureus* (spa t012) vs. *S. aureus* (spa t005)

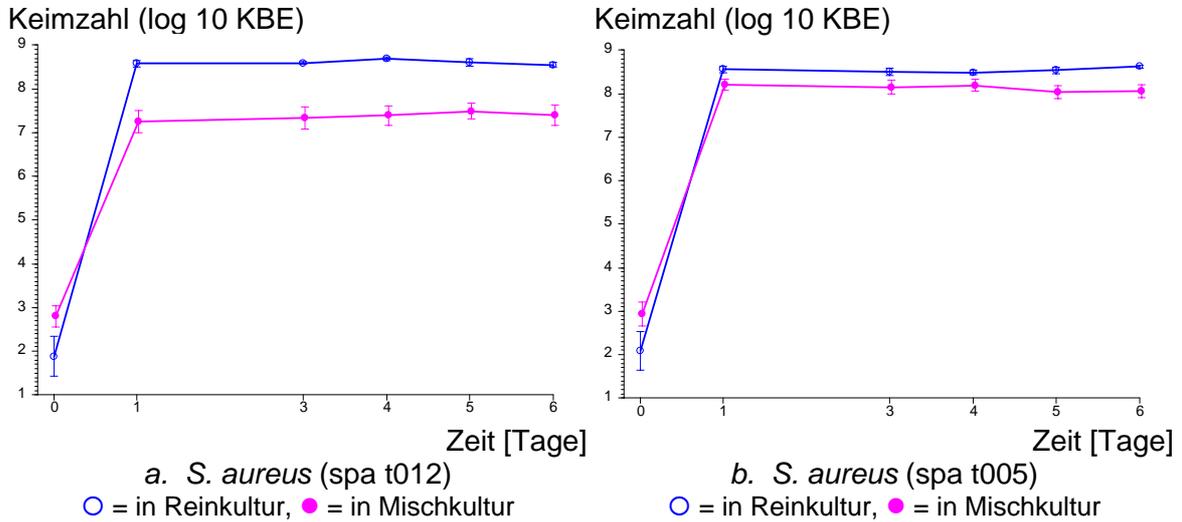


Abbildung 16. Wachstumsverläufe von *S. aureus* (spa t012) gegen *S. aureus* (spa t005) im Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen (Versuch Nr. 23). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE) und die Anzahl der Messwerte für den jeweiligen Tag, dabei sind die Messwerte für Reinkultur (Mischkultur) gemittelt aus 12 (8) Einzelmessungen.

***S.aureus* (spa 12)**

Unterschied Gemisch-Reinkultur	p = 0.0081**
Unterschiede der Messtage	p = 0.11
Formunterschiede	p = 0.76

***S.aureus* (spa 5)**

Unterschied Gemisch-Reinkultur	p = 0.047*
Unterschiede der Messtage	p = 0.32
Formunterschiede	p = 0.28

Tabelle 15. Globaler Vergleich der Verläufe von *S.aureus* (spa 12) und *S.aureus* (spa 5), gemessen nach 1, 3, und 4-7 Tagen. p aus der zweifaktoriellen Rangvarianzanalyse nach Puri und Sen.

	Korrelation von		n	rho	p
	Tag 0	Tag 1			
Reinkultur	<i>S.aureus</i> (spa 12)	<i>S.aureus</i> (spa 12)	7	0.3214	0.48
Gemisch	<i>S.aureus</i> (spa 12)	<i>S.aureus</i> (spa 12)	12	0.7123	0.0093**
Reinkultur	<i>S.aureus</i> (spa 5)	<i>S.aureus</i> (spa 5)	8	-0.1429	0.74
Gemisch	<i>S.aureus</i> (spa 5)	<i>S.aureus</i> (spa 5)	13	0.2503	0.41
Gemisch	<i>S.aureus</i> (spa 5)	<i>S.aureus</i> (spa 12)	12	-0.8105	0.0014**
Gemisch	<i>S.aureus</i> (spa 12)	<i>S.aureus</i> (spa 5)	12	-0.3783	0.30

Tabelle 16. Korrelation der Anfangswerte von *S.aureus* MSSA (spa 12) und von *S.aureus* MRSA (spa 5) mit den Werten nach 1 Tag. Für den gemischten Ansatz konnte auch die Korrelation mit dem Anfangswert des jeweils anderen Erregerstammes berechnet werden. rho und p aus der Spearmanschen Rangkorrelation.

Abhängigkeit vom Anfangswert

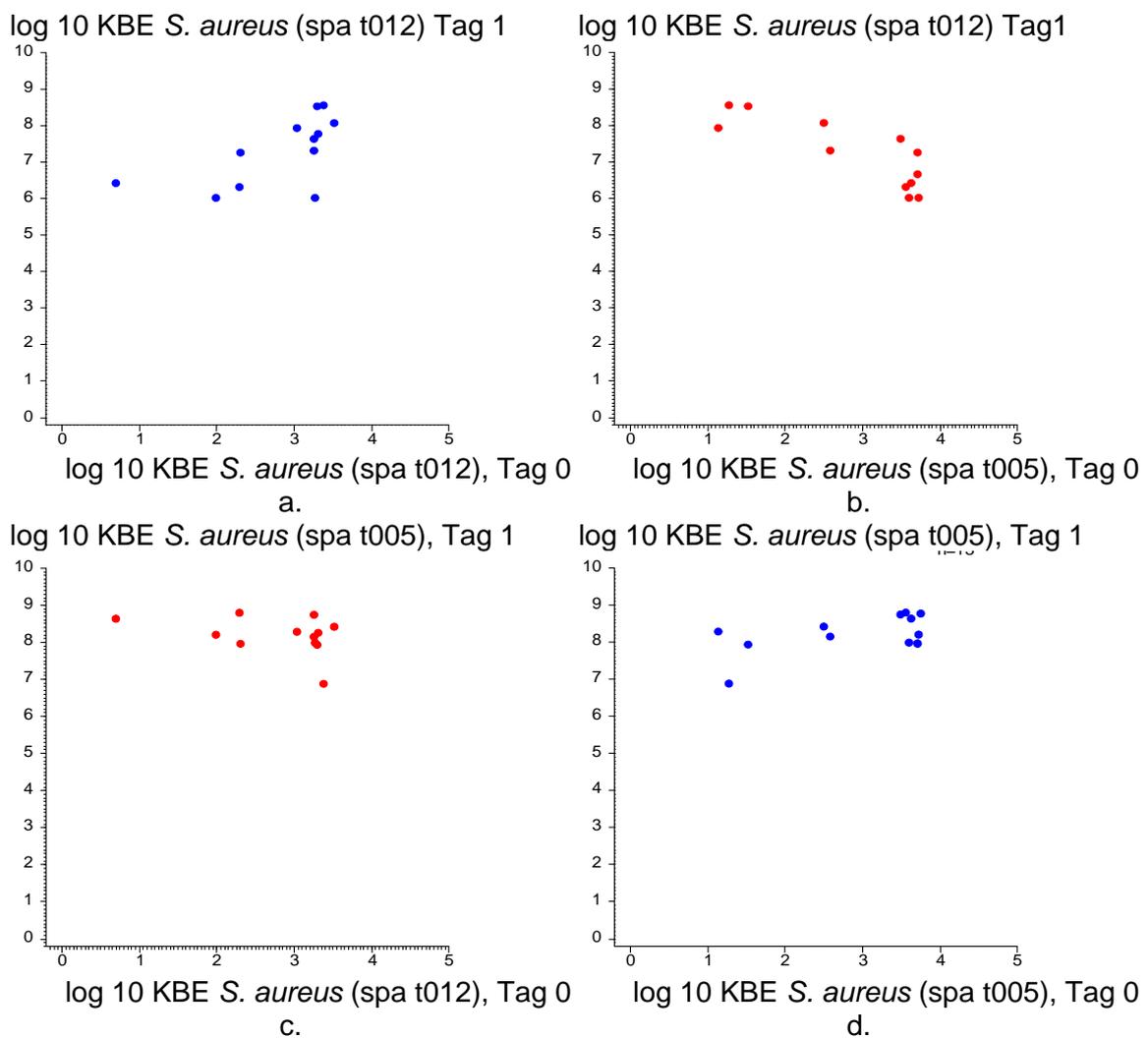


Abbildung 17. Abhängigkeit des Wertes am ersten Tag vom Anfangswert in den gemischten Ansätzen für *S. aureus* (spa t012) und *S. aureus* (spa t005). Jeder Punkt \neq einer Messung. Reinkulturen sind blau und Mischkulturen rot dargestellt

3.3 Wachstumsversuch (tägliche Kontrollen) *S. cerevisiae* gegen MRSA-Stamm

3.3.1 *S. cerevisiae* gegen *S. aureus* (spa t003)

Testet man die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gegen den MRSA, spa t003, erkennt man, dass die Hefe in ihrem Wachstum unter Konkurrenz zum *S. aureus* stark unterdrückt wird (nach 4 Tagen um 2,5 log₁₀ KBE), hingegen der MRSA-Stamm lediglich einen Rückgang in seinem Wachstum um ca. 0,5 log₁₀ KBE über den gesamten Zeitraum des Versuches zeigt (siehe **Abbildung 18** und **Tabelle 17**).

Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen *S. cerevisiae* vs. *S. aureus* (spa t003)

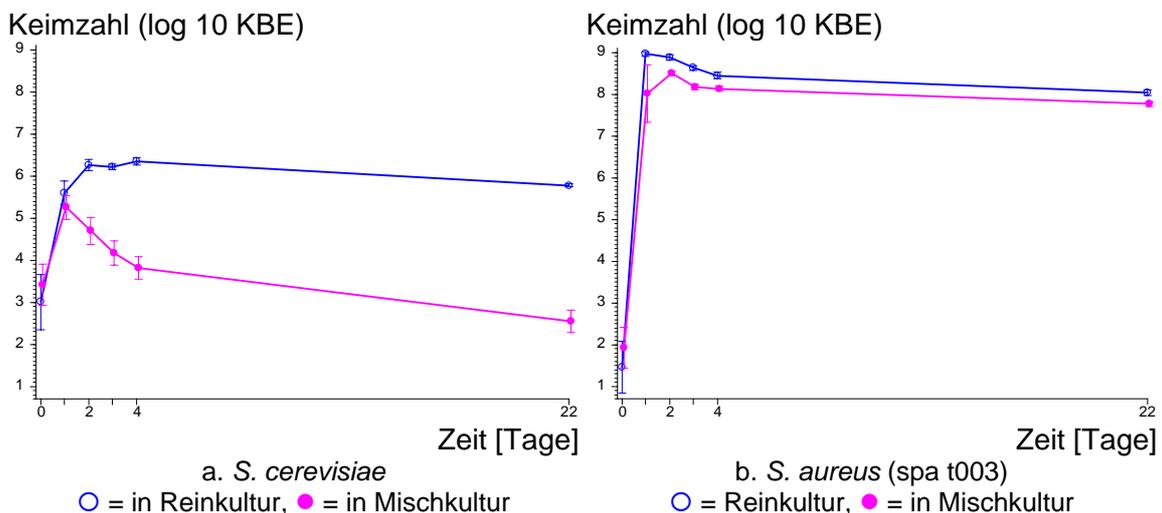


Abbildung 18. Wachstumsverläufe von *S. cerevisiae* und *S. aureus* (spa t003) im Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen (Versuch Nr. 17). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE).

Die Unterlegenheit der Hefe gegenüber dem spa t003 zeigt sich auch, wenn das Wachstum in Abhängigkeit von den Anfangskonzentrationen (siehe **Abbildung 19**) verglichen wird. Wie aus **Abbildung 19 e** zu ersehen ist, hat die Ausgangskonzentration vom *S. cerevisiae* keinerlei Einfluss auf das Wachstum vom *S. aureus* bis zum Tag 1. Andersherum allerdings hat die Konzentration von *S. aureus* an Tag 0 eine wachstumshemmende Rolle für das Wachstum der Hefe bis zum Tag 1 (siehe **Abbildung 19 d**), je höher der *S. aureus* an Tag 0 konzentriert ist, desto geringer ist das Wachstum der Hefe.

Saccharomyces cerevisiae	
Unterschied Gemisch-Reinkultur	p = 0.028*
Unterschiede der Messtage	p = 0.00009***
Formunterschiede	p = 0.011*
S. aureus (spa t003)	
Unterschied Gemisch-Reinkultur	p = 0.026*
Unterschiede der Messtage	p < 0.000005***
Formunterschiede	p = 0.36

Tabelle 17. Globaler Vergleich der Verläufe von *S. cerevisiae* und *S. aureus* (spa t003), gemessen nach 1 bis 4 und 22 Tagen. p aus der zweifaktoriellen Rangvarianzanalyse nach Puri und Sen.

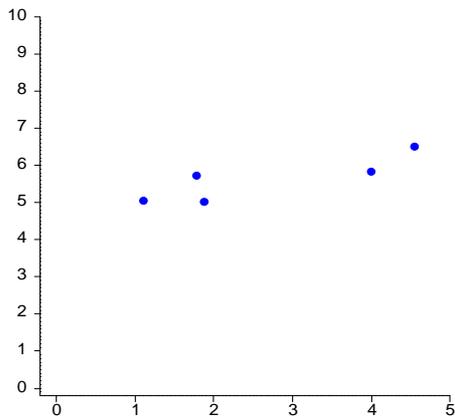
Bei den Reinkulturen waren Abhängigkeiten vom Anfangswert für *S. cerevisiae* vorhanden, für *S. aureus* nicht ($p > 0.15$ in der Spearmanschen Rangkorrelation (**Tabelle 18**)). In der Mischkultur hingen die Wachstumswerte des *S. cerevisiae* vom Anfangswert und noch mehr vom Anfangswert des beigemischten *S. aureus* (spa t003) ab. Das Wachstum vom *S. aureus* war in der Mischkultur unabhängig von der Ausgangskonzentration und unabhängig von der Konzentration der beigemischten Hefe.

	Korrelation von		n	rho	p
	Tag 0	Tag 1			
Reinkultur	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	5	0.7000	0.19
Gemisch	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	8	0.7785	0.023 *
Reinkultur	<i>S. aureus</i> (spa t003)	<i>S. aureus</i> (spa t003)	6	0.0000	1.0
Gemisch	<i>S. aureus</i> (spa 003)	<i>S. aureus</i> (spa t003)	9	-0.2821	0.46
Gemisch	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. aureus</i> (spa t003)	9	0.7667	0.016 *
Gemisch	<i>S. aureus</i> (spa t003)	<i>S. cerevisiae</i>	8	-0.5249	0.20

Tabelle 18. Korrelation der Anfangswerte von *S. cerevisiae* und von *S. aureus* (spa t003) mit den Werten nach Tag 1. Für den gemischten Ansatz konnte auch die Korrelation mit dem Anfangswert des jeweils anderen Erregerstammes berechnet werden. rho und p aus der Spearmanschen Rangkorrelation.

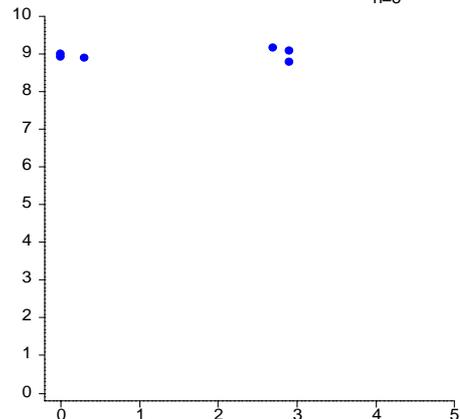
Abhängigkeit vom Anfangswert

log 10 KBE *S. cerevisiae*, Tag 1



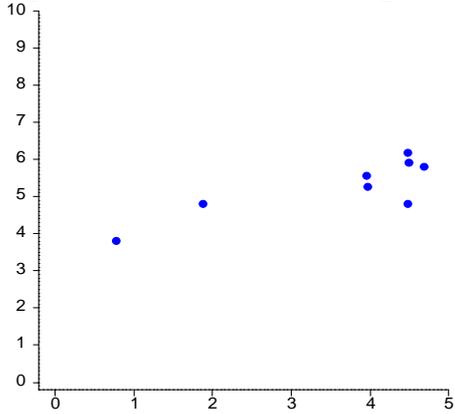
log 10 KBE *S. cerevisiae*, Tag 0
a. Reinkultur

log 10 KBE *S. aureus* (spa t003), Tag 1



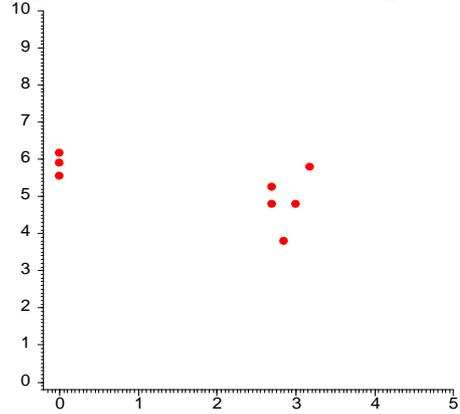
log 10 KBE *S. aureus* (spa t003), Tag 0
b. Reinkultur

log 10 KBE *S. cerevisiae*, Tag 1



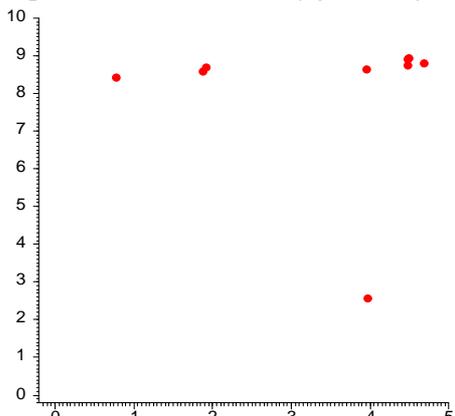
log 10 KBE *S. cerevisiae*, Tag 0
c. Gemisch

log 10 KBE *S. cerevisiae*, Tag 1



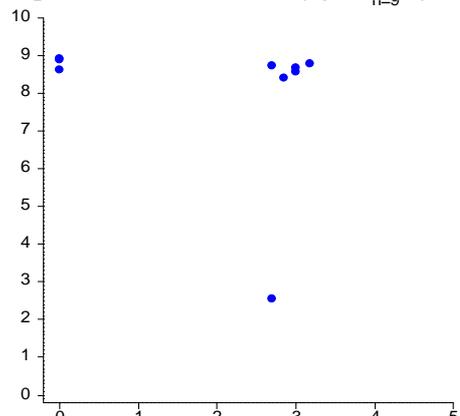
log 10 KBE *S. aureus* (spa t003), Tag 0
d. Gemisch

log 10 KBE *S. aureus* (spa t003), Tag 1



log 10 KBE *S. cerevisiae*, Tag 0
e. Gemisch

log 10 KBE *S. aureus* (spa t003), Tag 1



log 10 KBE *S. aureus* (spa t003), Tag 0
f. Gemisch

Abbildung 19. Abhängigkeit des Wertes am ersten Tag vom Anfangswert in den reinen und gemischten Ansätzen für *S. cerevisiae* und *S. aureus* (spa t003). Jeder Punkt \pm einer Messung.

3.3.2 Vergleich von *Saccharomyces cerevisiae* und *Staphylococcus epidermidis*

Vergleich der Wachstumsversuche mit täglichen Wachstumskontrollen *S. epidermidis* und *S. cerevisiae* jeweils vs. *S. aureus* (spa t003)

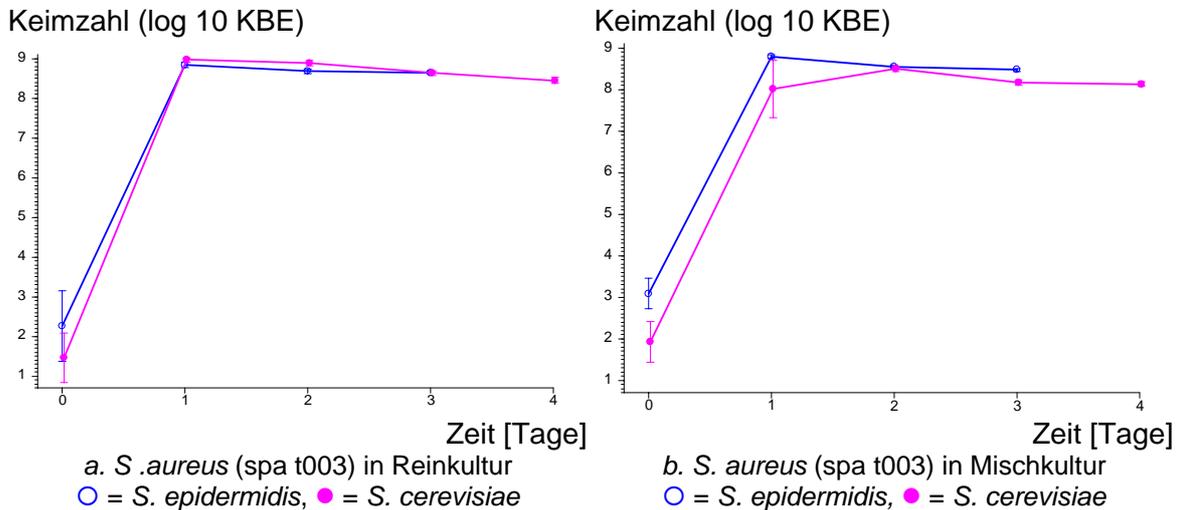


Abbildung 20. Wachstumsverläufe von *S. aureus* (spa t003) in Reinkultur und Mischkultur gegen den *S. epidermidis* und *S. cerevisiae* im Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE) und die Anzahl der Messwerte für den jeweiligen Tag, dabei sind die Messwerte für Reinkultur (Mischkultur) gemittelt aus 9 (13) Einzelmessungen.

Auch in diesem Wachstumsvergleich zeigt sich das unbeeinflusste Wachstum vom resistenten *S. aureus* in Mischkultur zur Reinkultur.

3.4 Wachstumsversuch (stündliche Kontrollen) *S. epidermidis* gegen MRSA-Stämme

3.4.1 *S. epidermidis* gegen *S. aureus* (spa t148)

Nachdem in den Wachstumsversuchen mit täglichen Wachstumskontrollen beobachtet wurde, dass die Bakterienkonzentrationen in den Nährbouillons innerhalb der ersten 24 Stunden auf ein stabiles Niveau anwachsen und keine größeren Schwankungen über die weiteren Versuchstage mehr auftreten, wurden in einer zweiten Versuchsreihe die ersten 8 Stunden, in denen die größte Wachstumsdynamik vermutet wurde, näher untersucht.

Betrachtet man die Wachstumskurven der Versuchsstämme in Rein- und Mischkultur (siehe **Abbildung 21 a.**) kann man erkennen, dass das Wachstumsdefizit, welches der *S.*

epidermidis in der Mischkultur schon in den Wachstumsversuchen mit täglichen Wachstumskontrollen aufgewiesen hat, sich nur durch eine Reduktion der Endkonzentration nach 24 Stunden zeigt und nicht durch eine Verlangsamung des Wachstums innerhalb der ersten Stunden. Die Kurven in den ersten 8 Stunden sind noch nahezu identisch und nur die Endpunkte nach einem Tag weichen voneinander ab.

Das Wachstum des *S. aureus*, spa t148, zeigt sowohl in Rein- als auch in Mischkultur den erwarteten exponentiellen Verlauf. Hierbei tritt kein Unterschied zwischen den einzelnen Kulturen auf und auch die Endpunkte zeigen die erwartete Kongruenz.

Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen *S. aureus* (spa t148) vs. *S. epidermidis*

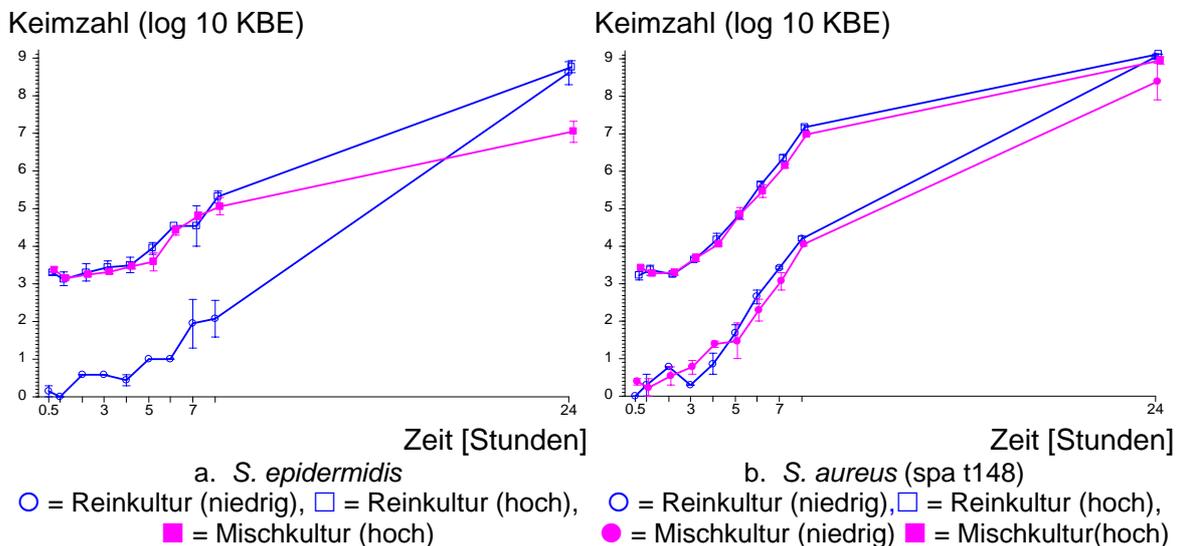


Abbildung 21. Wachstumsverläufe von *S. epidermidis* und *S. aureus* (spa t148) im Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen, im Vergleich von Reinkultur mit Mischkultur getrennt nach niedrigen und hohen Anfangszahlen (Versuch Nr. 5). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE).

3.4.2 *S. epidermidis* gegen *S. aureus* (spa t005)

Wie schon in den beschriebenen Wachstumsversuchen mit täglichen Wachstumskontrollen zeigten sich auch bei dieser Versuchsreihe nur marginale Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen den verschiedenen MRSA-Stämmen. Die entsprechenden Grafiken für die weiteren Versuchspaare mit den resistenten *S. aureus* Stämmen, spa t005, spa t003 und spa t008, werden im Folgenden aufgelistet (siehe **Kapitel 4.4.2-4.4.4**).

Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen *S. aureus* (spa t005) vs. *S. epidermidis*

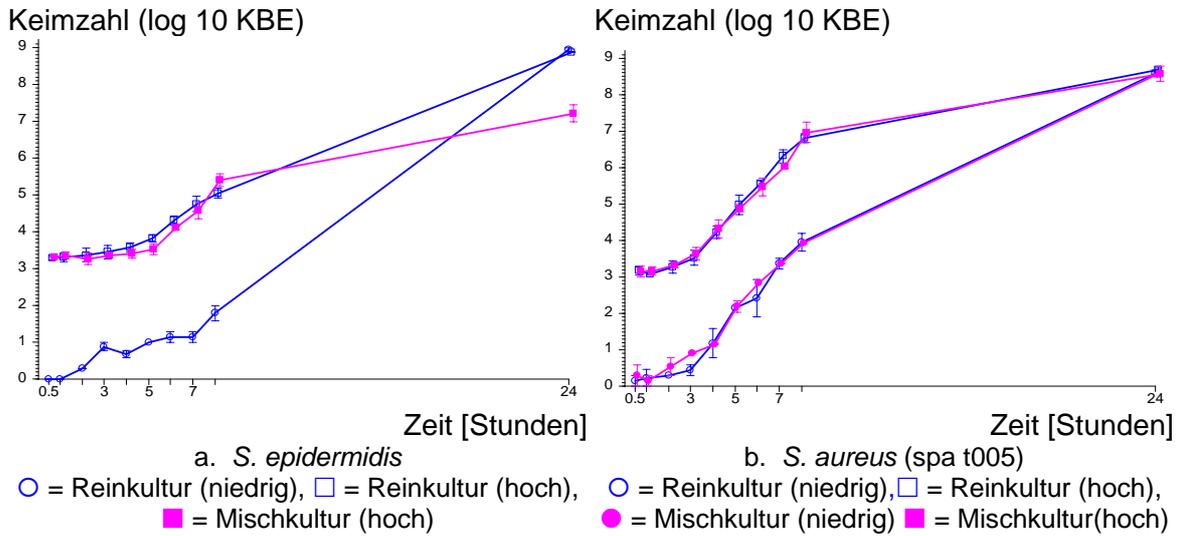


Abbildung 22. Wachstumsverläufe von *S. epidermidis* und *S. aureus* (spa t005) im Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen, im Vergleich von Reinkultur mit Mischkultur getrennt nach niedrigen und hohen Anfangszahlen. (Versuch Nr. 6). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE).

3.4.3 *S. epidermidis* gegen *S. aureus* (spa t003)

Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen *S. aureus* (spa t003) vs. *S. epidermidis*

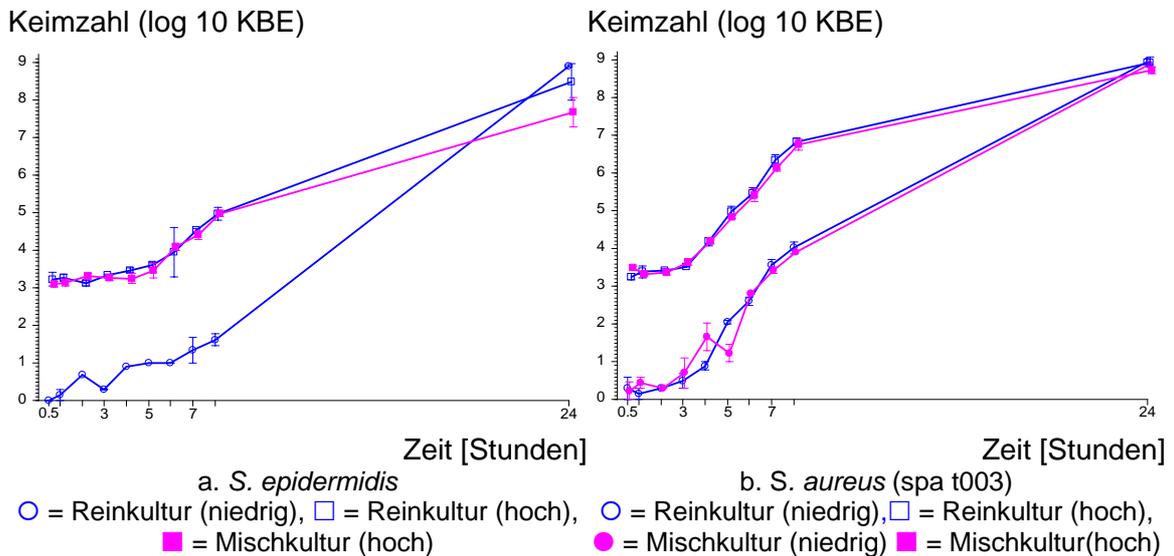


Abbildung 23. Wachstumsverläufe von *S. epidermidis* und *S. aureus* (spa t003) im Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen, im Vergleich von Reinkultur mit Mischkultur getrennt nach niedrigen und hohen Anfangszahlen. (Versuch Nr. 7). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE).

3.4.4 *S. epidermidis* gegen *S. aureus* (spa t008)

Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen *S. aureus* (spa t008) vs. *S. epidermidis*

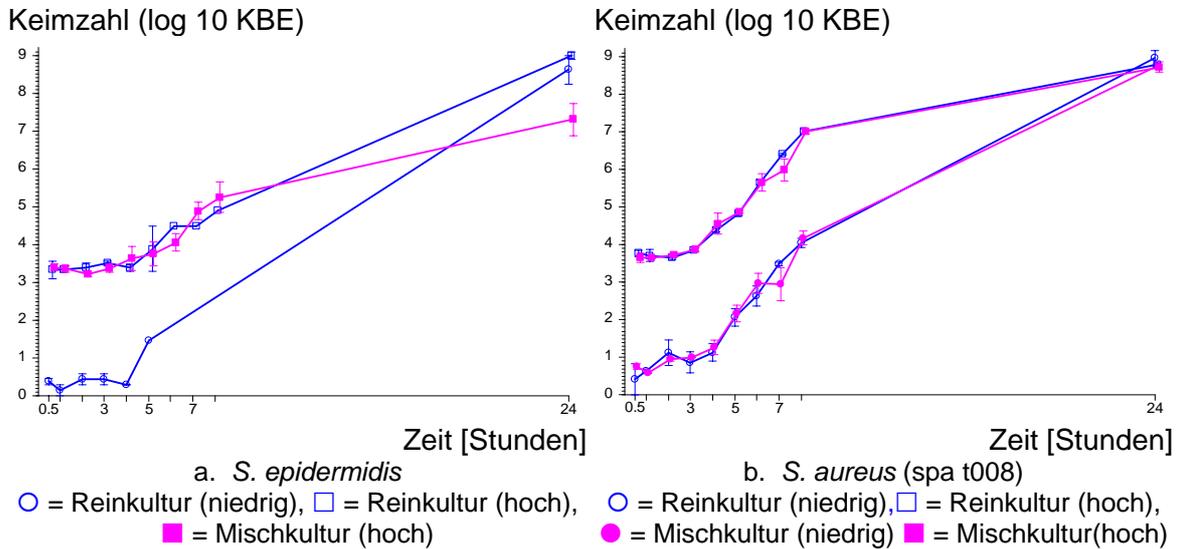


Abbildung 24. Wachstumsverläufe von *S. epidermidis* und *S. aureus* (spa t008) im Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen, im Vergleich von Reinkultur mit Mischkultur getrennt nach niedrigen und hohen Anfangszahlen. (Versuch Nr. 8). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE).

3.4.5 4.4.5 Vergleich der 4 MRSA-Stämme

3.4.5.1 Vergleich der 4 MRSA-Stämme miteinander

Durch den grafischen Vergleich der vier MRSA-Stämme untereinander, wird ersichtlich, dass es keinen bedeutenden Unterschied zwischen den einzelnen Subtypen gibt. Alle getesteten spa Typen hemmen das Wachstum von *S. epidermidis* in gleicher Weise.

Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen *S. epidermidis* vs. 4 resistente Stämme *S. aureus*

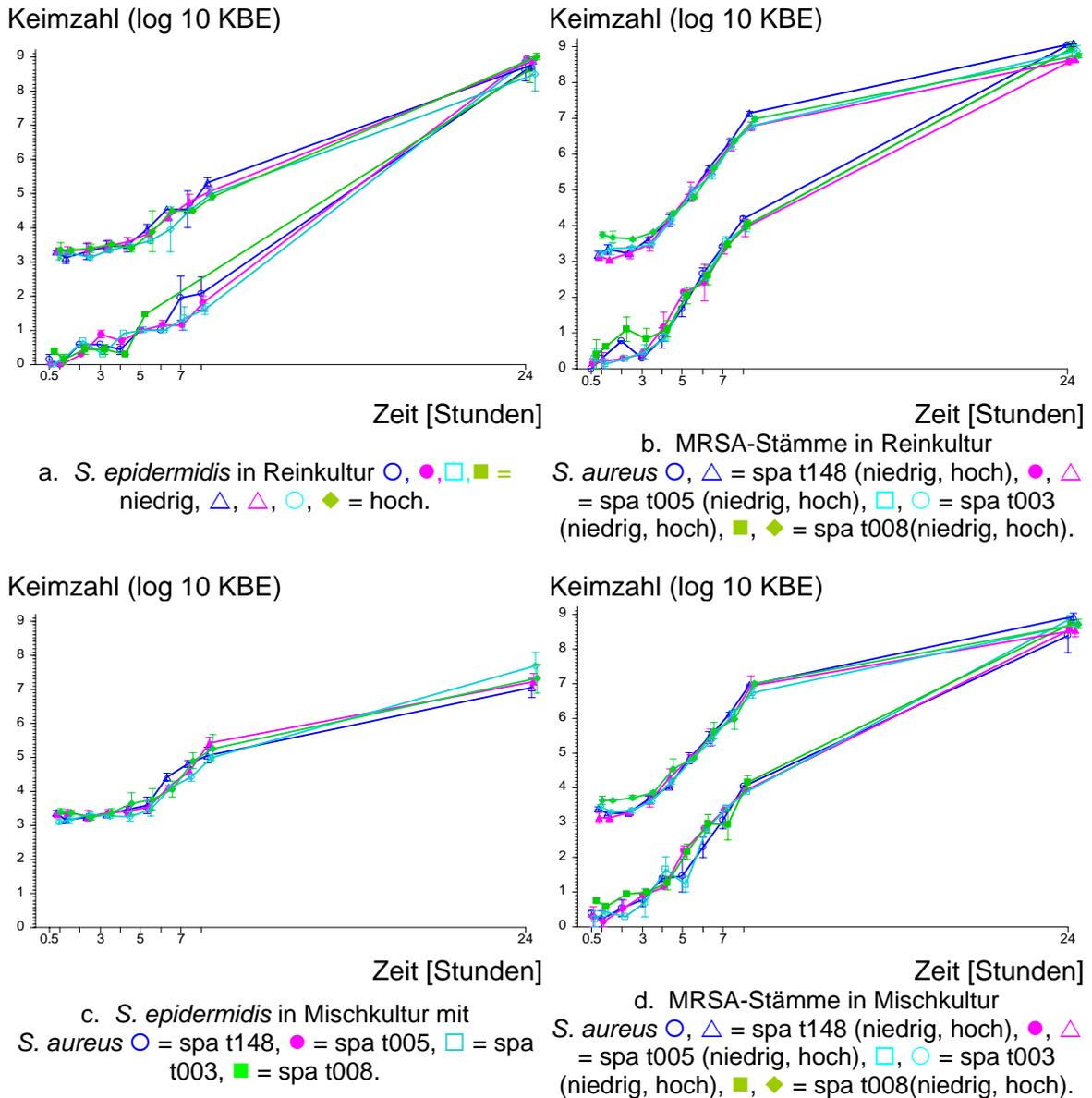


Abbildung 25. Wachstumsverläufe von *S. epidermidis* und 4 MRSA-Stämmen im Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen bei niedrigen Anfangswerten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE).

Auch in der Rangvarianzanalyse nach Puri und Sen (siehe **Tabelle 19**) ergeben sich keine signifikanten Unterschiede im Wachstum zwischen den 8 Reinkultur- und 16 Mischkultur-Messungen innerhalb der ersten 8 Stunden.

<i>S. epidermidis</i> aus allen 4 Versuchen, hohe Anfangswerte	
Unterschied Gemisch-Reinkultur	p = 0.68
Unterschiede der Messtage	p < 0.000005***
Formunterschiede	p = 0.57
<i>S. aureus</i> alle 4 MRSA-Stämme, niedrige Anfangswerte	
Unterschied Gemisch-Reinkultur	p = 0.22
Unterschiede der Messtage	p < 0.000005***
Formunterschiede	p = 0.33
<i>S. aureus</i> alle 4 MRSA-Stämme hohe Anfangswerte	
Unterschied Gemisch-Reinkultur	p = 0.38
Unterschiede der Messtage	p < 0.000005***
Formunterschiede	p = 0.42

Tabelle 19. Globaler Vergleich der Verläufe von *S. epidermidis* und 4 Stämmen *S. aureus* (MRSA), gemessen nach 1/2, 1 und, 3 - 8 Stunden. p aus der zweifaktoriellen Rangvarianzanalyse nach Puri und Sen.

3.4.5.2 Vergleich der 24h-Werte der Wachstumsversuche mit stündlichen und denen mit täglichen Wachstumskontrollen

In der folgenden Tabelle (**Tabelle 20**) sind die 24-Stunden-Werte aus den Wachstumsversuchen mit stündlichen und denen mit täglichen Wachstumskontrollen zusammengefasst.

Bei 8 Versuchen werden die 24-Stunden-Werte verglichen und es gibt nur beim spa t005 einen signifikanten Unterschied, wobei beachtet werden sollte, dass dieser Unterschied im größten Fall 0,402 log₁₀ KBE beträgt und damit aus klinischer Betrachtungsweise vernachlässigbar gering ist.

Insgesamt zeigt die Tabelle, dass die 24-Stunden-Werte aus verschiedensten Versuchsansätzen sehr ähnliche Werte liefern und somit das natürliche Wachstumsverhalten des Keims wiedergeben.

	VNr	Mess-Schritte	n	MW	sd	p
<i>S. epidermidis</i> 24h						
Reinkultur	1	Wochen	15	8.733	0.305	0.43 _x
	5	Stunden	4	8.673	0.303	
	2	Wochen	15	8.821	0.150	0.093 _x
	6	Stunden	4	8.915	0.057	
	3	Wochen	10	8.559	0.282	0.15 _x
	7	Stunden	4	8.685	0.459	
	4	Wochen	24	8.584	0.366	0.12
	8	Stunden	4	8.804	0.390	
Mischkultur	1	Wochen	33	7.204	1.102	0.66
	5	Stunden	4	7.033	0.581	
	2	Wochen	33	7.159	0.852	0.89
	6	Stunden	4	7.219	0.464	
	3	Wochen	14	6.740	1.155	0.079 _x
	7	Stunden	4	7.667	0.780	
	4	Wochen	41	7.396	1.663	0.53
	8	Stunden	4	7.307	0.852	
resistente <i>S. aureus</i> 24 h						
Reinkultur	1	Wochen spa t148	12	9.030	0.125	0.28 _x
	5	Stunden spa t148	4	9.076	0.056	
	2	Wochen spa t005	12	9.031	0.166	0.00055*** _x
	6	Stunden spa t005	4	8.629	0.091	
	3	Wochen spa t003	4	8.846	0.127	0.17 _x
	7	Stunden spa t003	4	8.934	0.124	
	4	Wochen spa t008	15	8.848	0.129	0.70 _x
	8	Stunden spa t008	4	8.876	0.195	
Mischkultur	1	Wochen spa t148	30	8.913	0.215	0.21
	5	Stunden spa t148	4	8.670	0.519	
	2	Wochen spa t005	33	8.838	0.158	0.0060**
	6	Stunden spa t005	4	8.560	0.173	
	3	Wochen spa t003	14	8.801	0.154	0.70 _x
	7	Stunden spa t003	4	8.792	0.118	
	4	Wochen spa t008	42	8.680	0.265	0.43
	8	Stunden spa t008	4	8.734	0.108	

Tabelle 20. 24-Stunden-Werte im Wochen- und im Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen für *S. epidermidis* und die vier resistenten *S. aureus*-Stämme (spa t148, t005, t003 und t008) in Reinkultur und in Mischkultur. MW = Mittelwert, sd = Standardabweichung der logarithmierten Erregerzahlen. p aus dem U-Test nach Mann und Whitney bzw. (_x) dem exakten U-Test nach Mann und Whitney.

3.5 Wachstumsversuch (stündliche Kontrollen) MSSA (spa t012) gegen MRSA-Stämme

Analog zu den vorangegangenen Wachstumsversuchen mit stündlichen Wachstumskontrollen wurde das Konkurrenzverhalten des MSSA (spa t012) zu den einzelnen MRSA-Stämmen innerhalb der ersten acht Stunden untersucht. Auch hier konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen MRSA-Stämmen festgestellt werden (siehe **Abbildung 30**) und so erfolgt die Auswertung zusammenfassend für alle 4 Stämme. Die entsprechenden Grafiken werden im folgenden aufgeführt (siehe **Kapitel 4.5.1-4.5.4**).

Es lassen sich deutliche Unterschiede zu den Versuchen mit dem *S. epidermidis* erkennen. Betrachtet man das Wachstum beider *S. aureus* Stämme mit einem hohem Ausgangswert, so lassen sich für den MRSA-Stamm keine wesentlichen Unterschiede zwischen Rein- und Mischkultur feststellen (**Abbildung 31 b.**). Für den MSSA-Keim fällt in den Mischkulturen ein Wachstumsdefizit nach 24 Stunden auf. Diese Hemmung im Wachstumsgemisch, das gegen eine hohe Anfangskonzentration von den MRSA-Stämmen angesetzt wird beträgt zwischen 1,07 log 10 KBE (spa t005) und 0,73 log 10 KBE (spa t148). Das Wachstumsdefizit tritt nicht auf, wenn der MSSA-Stamm mit einer hohen Ausgangskonzentration gegen eine niedrige Konzentration des MRSA-Stammes getestet wird. Die 24-Stunden-Werte sind dann nahezu identisch.

Betrachtet man nun die Wachstumskurven für den MRSA mit einer niedrigen Anfangskonzentration erkennt man gleichfalls ein Wachstumsdefizit nach 24 Stunden. Diese Differenz beträgt zwischen 1,18 log 10 KBE für den spa t005 und 1,66 log 10 KBE für spa t008.

Fasst man nun die Ergebnisse aus dem Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen und denen mit stündlichen Wachstumskontrollen zusammen, lässt sich feststellen, dass der MRSA auch diesen Versuch mit seinem Wachstumsverhalten dominiert, der MSSA jedoch einen größeren Einfluss als der *S. epidermidis* hat. Sobald der sensible *S. aureus* die bessere Startposition bekommt ist er in der Lage, das Wachstum des MRSA zu reduzieren.

3.5.1 MSSA (spa t012) gegen MRSA (spa t148)

Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen MSSA (spa t012) vs. MRSA (spa t148)

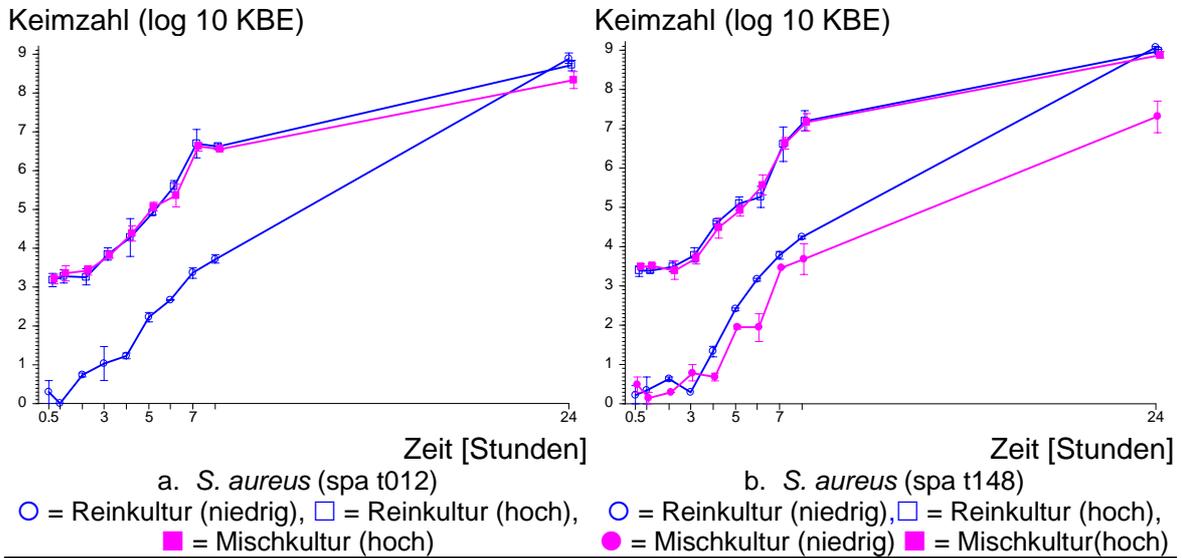


Abbildung 26. Wachstumsverläufe vom sensiblen *S. aureus* (spa t012) und resistenten *S. aureus* (spa t148) im Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen, im Vergleich von Reinkultur mit Mischkultur getrennt nach niedrigen und hohen Anfangswerten. (Versuch Nr. 9). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE).

3.5.2 MSSA (spa t012) gegen MRSA (spa t005)

Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen MSSA (spa t012) vs. MRSA (spa t005)

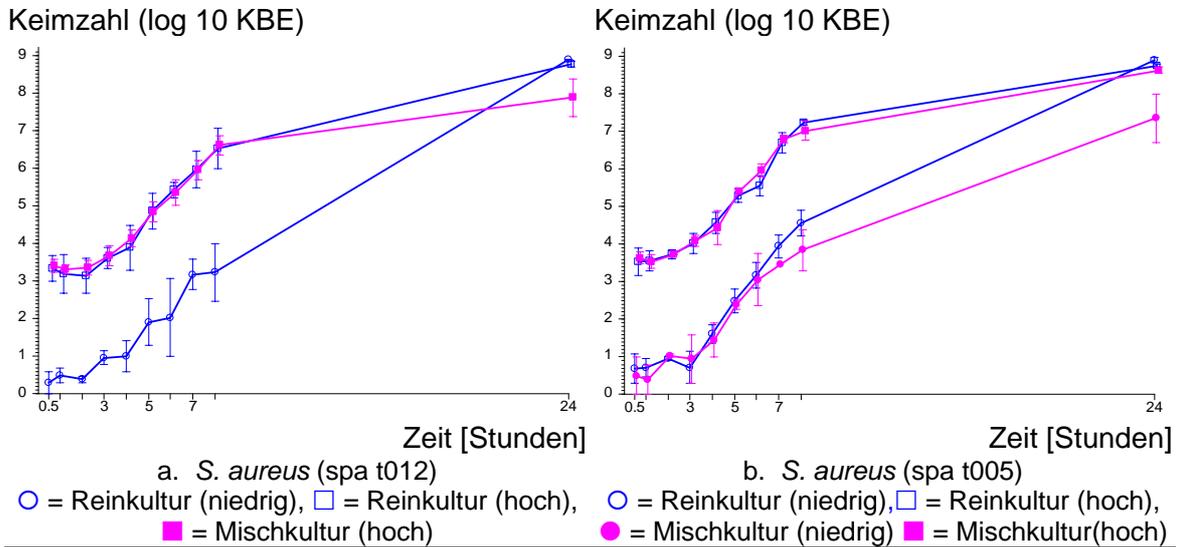


Abbildung 27. Wachstumsverläufe vom sensiblen *S. aureus* (spa t012) und resistenten *S. aureus* (spa t005) im Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen, im Vergleich von Reinkultur mit Mischkultur getrennt nach niedrigen und hohen Anfangswerten. (Versuch Nr. 10). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE).

3.5.3 MSSA (spa t012) gegen MRSA (spa t003)

Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen MSSA (spa t012) vs. MRSA (spa t003)

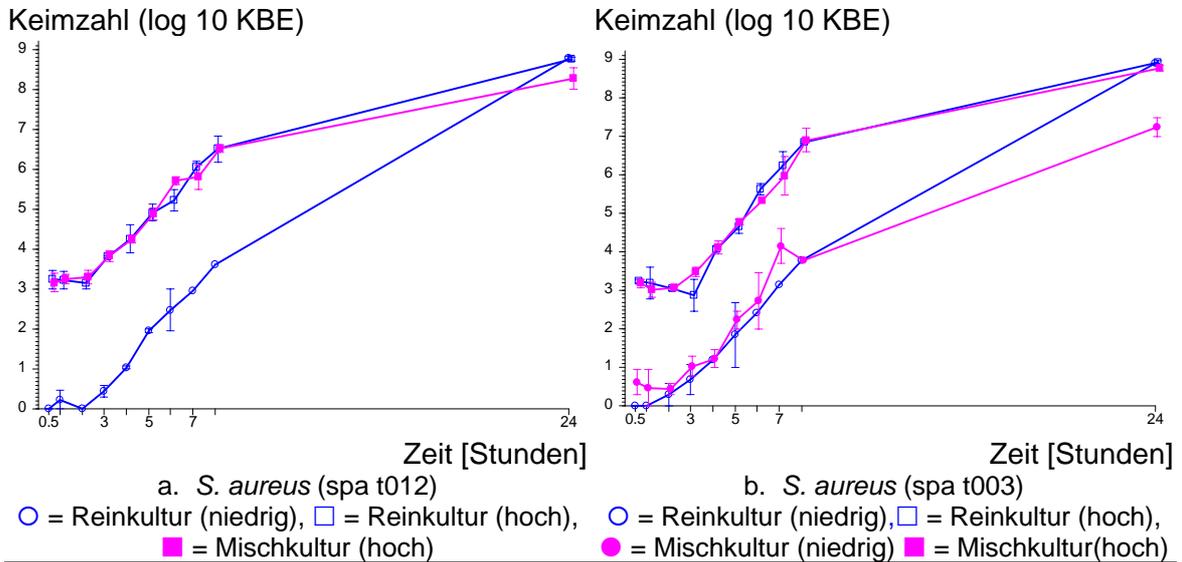


Abbildung 28. Wachstumsverläufe vom sensiblen *S. aureus* (spa t012) und resistenten *S. aureus* (spa t003) im Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen, im Vergleich von Reinkultur mit Mischkultur getrennt nach niedrigen und hohen Anfangswerten. (Versuch Nr. 11). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE).

3.5.4 MSSA (spa t012) gegen MRSA (spa t008)

Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen MSSA (spa t012) vs. MRSA (spa t008)

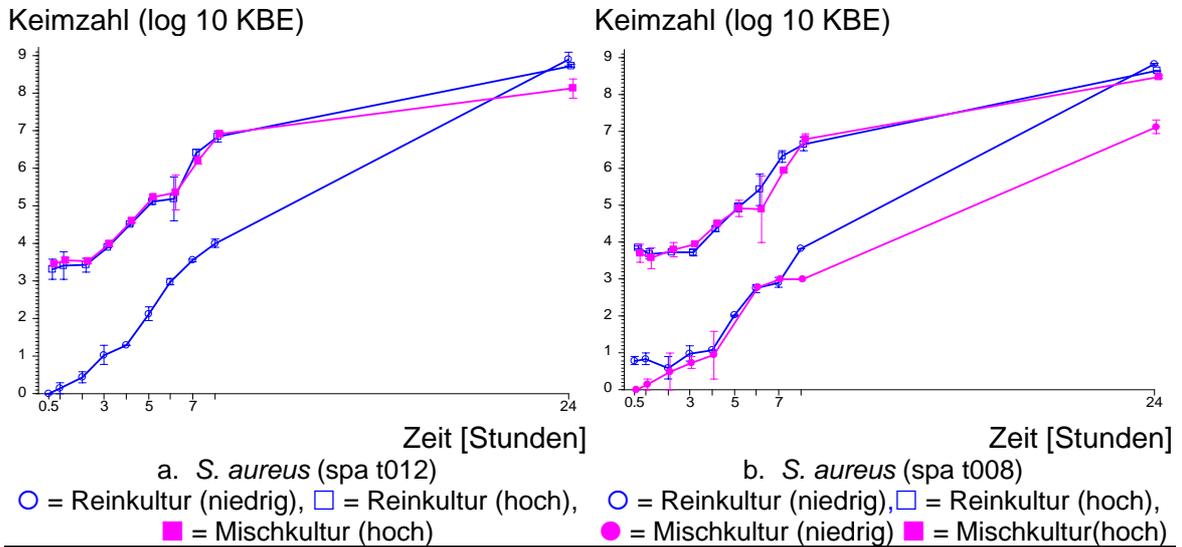


Abbildung 29. Wachstumsverläufe vom sensiblen *S. aureus* (spa t012) und resistenten *S. aureus* (spa t008) im Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen, im Vergleich von Reinkultur mit Mischkultur getrennt nach niedrigen und hohen Anfangswerten. (Versuch Nr. 12). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE).

3.5.5 Vergleich der 4 MRSA-Stämme

3.5.5.1 Vergleich der 4 Stämme miteinander

Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen MSSA (spa t012) vs. 4 MRSA-Stämme

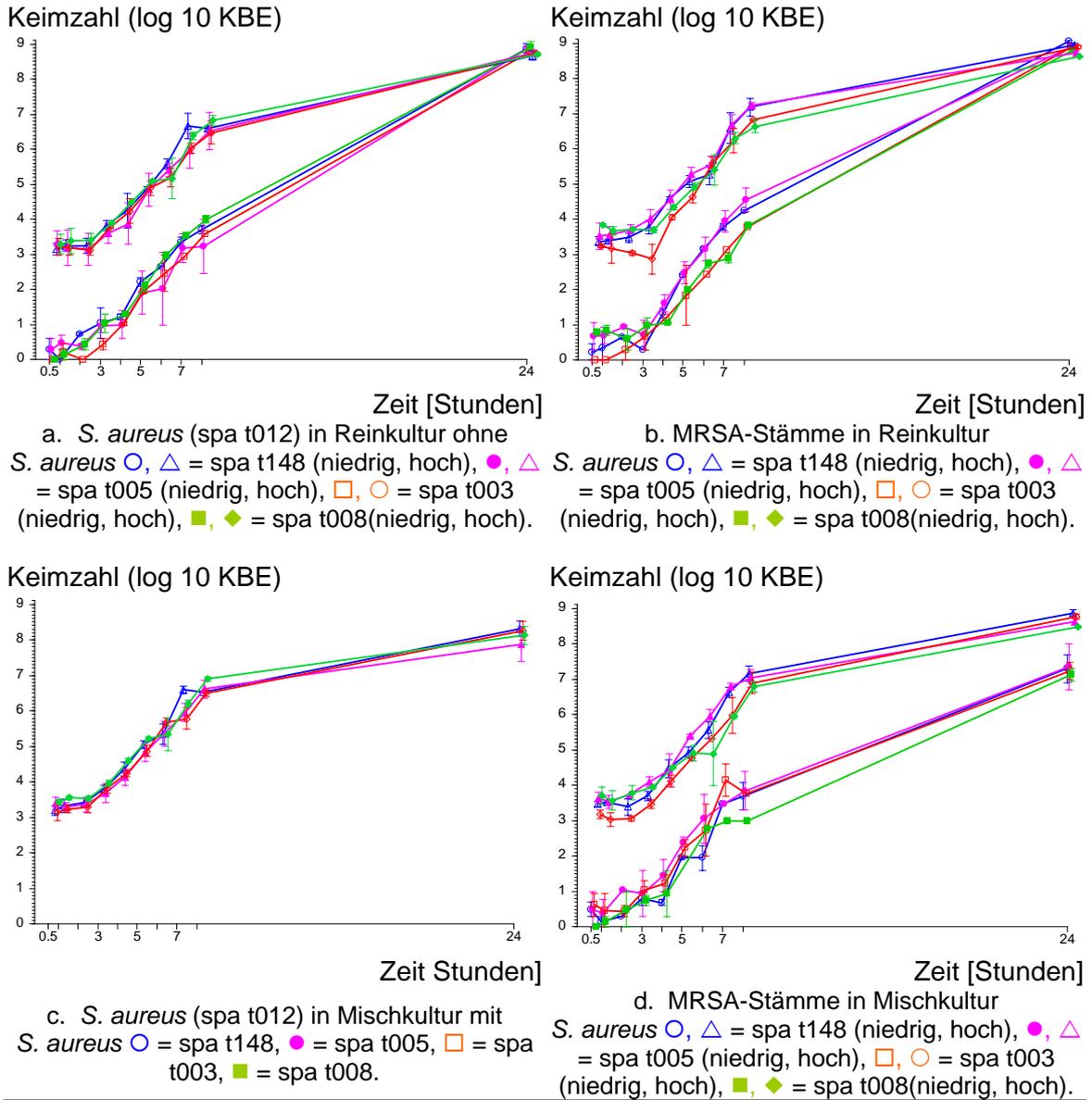


Abbildung 30. Wachstumsverläufe vom sensiblen *S. aureus* (spa t012) und 4 resistenten Stämmen von *S. aureus* im Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen. Die Verläufe mit niedrigen und mit höheren Startwerten sind getrennt eingezeichnet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE).

3.5.5.2 Auswertung mit den 4 Stämmen gepoolt

In der folgenden Darstellung sind die 4 vorherigen Grafiken in einer zusammengefasst. Die beschriebenen Ergebnisse stellen sich deutlich dar!

Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen MSSA (spa t012) vs. MRSA-Stämme

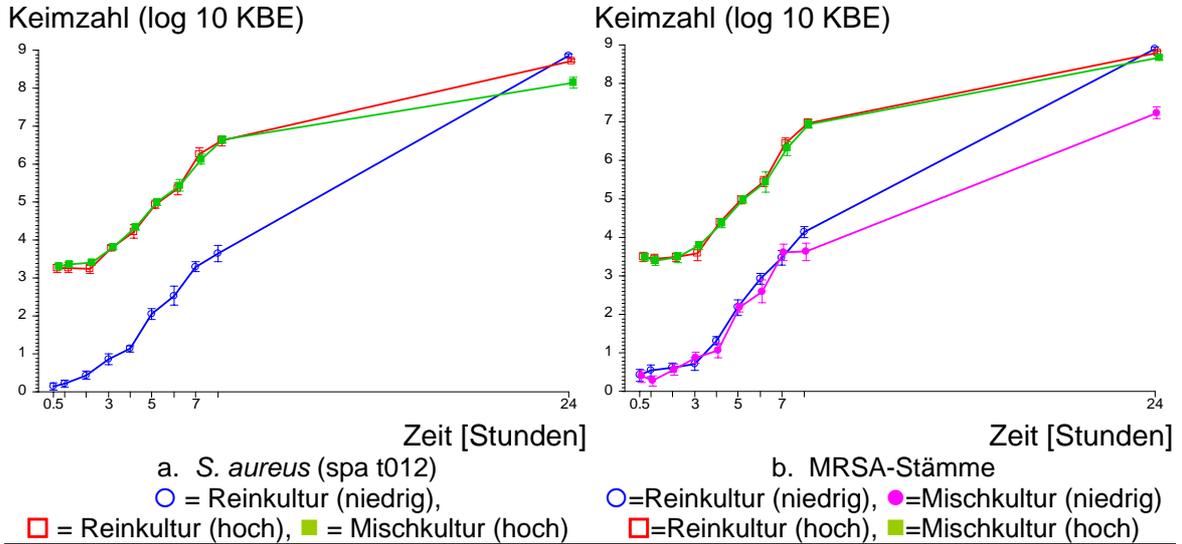


Abbildung 31. Wachstumsverläufe vom sensiblen *S. aureus* (spa t012) und den resistenten *S. aureus*-Stämmen (spa t148, t005, t003 und t008) im Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen. Die Verläufe mit niedrigen und mit höheren Anfangswerten sind getrennt gezeichnet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE).

3.5.5.3 Vergleich *S. epidermidis* mit *S. aureus* (spa t012)

Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen *S. aureus* (spa t012) mit *S. epidermidis*

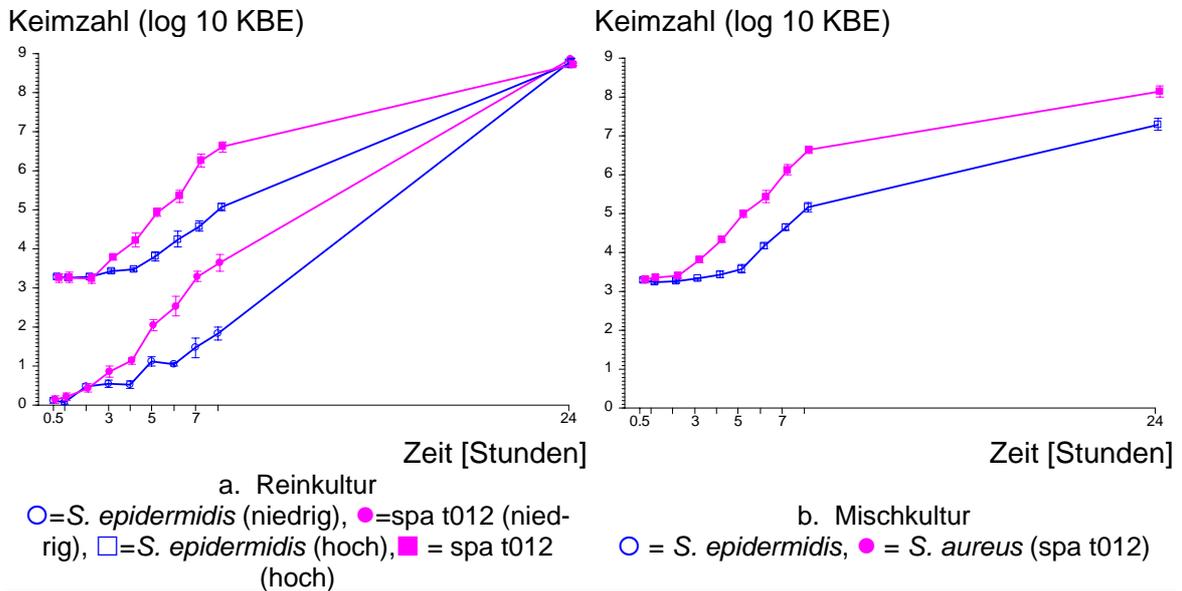


Abbildung 32. Wachstumsverläufe der beiden sensiblen Stämme *S. epidermidis* und *S. aureus* (spa t012) im Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE).

Bei diesem Vergleich kann man die unterschiedliche Wachstumsdynamik zwischen dem *S. aureus* und *S. epidermidis* erkennen. Der *S. epidermidis* braucht zwei bis drei Stunden länger bis zum Beginn der Vermehrung. Auch erreicht der *S. epidermidis* in Mischkultur mit resistenten *S. aureus*-Stämmen, noch weniger als der sensible *S. aureus*, seine Erregerzahlen aus der Reinkultur. Er wird also noch stärker durch die Konkurrenz des resistenten *S. aureus* gehemmt.

3.6 Wachstumsversuch (stündliche Kontrollen) *E. faecium* gegen MRSA-Stämme

3.6.1 *E. faecium* und *S. aureus* (spa t148)

Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen *E. faecium* vs. *S. aureus* (spa t148)

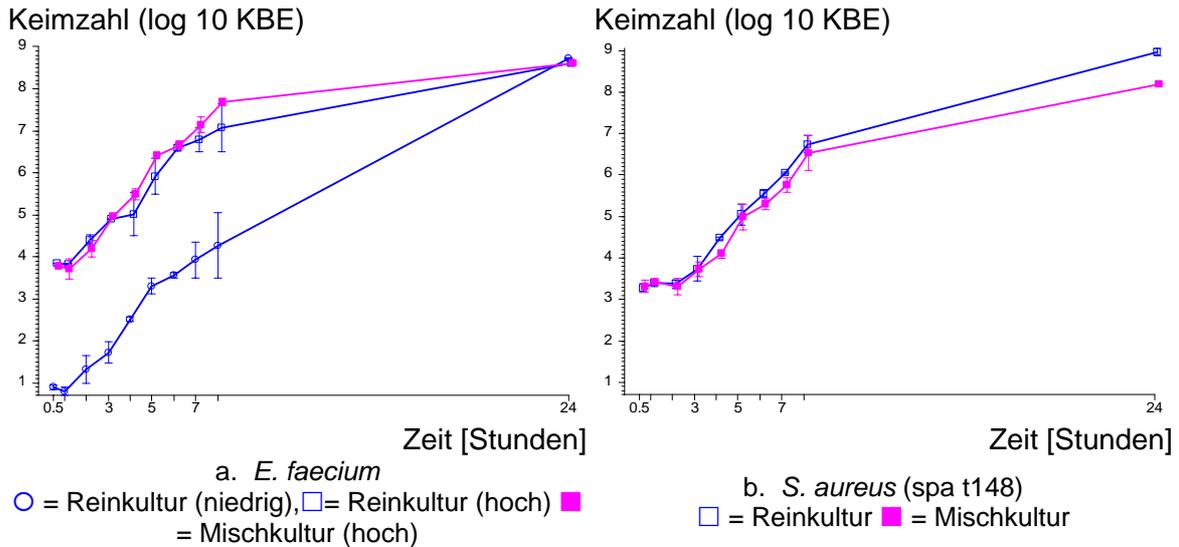


Abbildung 33. Wachstumsverläufe von *E. faecium* und *S. aureus* (spa t148) im Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen, im Vergleich von Reinkultur und Mischkultur (Versuch Nr. 18). Die Messreihen mit niedrigen mit hohen Anfangszahlen sind getrennt eingezeichnet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE).

In einem neuen Ansatz wurde ein Keim der natürlichen Darmflora gegen einen MRSA-Stamm, spa t148, getestet. Wie in **Abbildung 33** dargestellt, ist *E. faecium* bislang der einzige getestete Keim, dem es möglich ist, in Mischkultur mit dem resistenten *S. aureus* die Erregerkonzentration aus seiner Reinkultur zu erreichen. Außerdem zeigt der spa t148 unter Konkurrenz vom *E. faecium* ein Wachstumsdefizit von 0,34 log 10 KBE, womit er jedoch immer noch eine Erregerkonzentration von $6,4 \cdot 10^7$ erreicht. Dies bedeutet klinisch gesehen keine erhebliche Keimreduktion.

3.6.2 *E. faecium* und *S. aureus* (spa t003)

Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen *E. faecium* vs. *S. aureus* (spa t003)

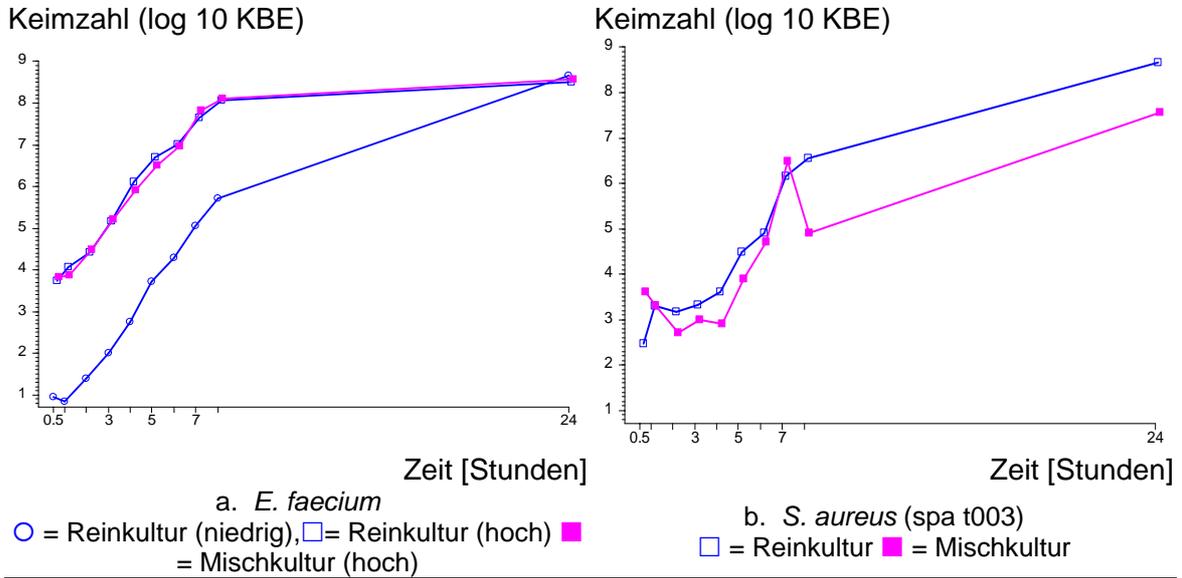


Abbildung 34. Wachstumsverläufe von *E. faecium* und *S. aureus* (spa t003) im Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen, im Vergleich von Reinkultur und Mischkultur (Versuch Nr. 19). Die Messreihen mit niedrigen mit hohen Anfangszahlen sind getrennt eingezeichnet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE).

In Konkurrenz zum spa t003 zeigt der *E. faecium* das gleiche Verhalten wie schon im Versuch gegen den spa t148. Für ihn macht es keinen Unterschied ob er in Rein- oder Mischkultur wächst. In seiner Anwesenheit wird das Wachstum des *S. aureus* um ca. 0,3 lg KBE gehemmt.

3.6.3 Vergleich von *E. faecium* gegen verschiedene Stämme

3.6.3.1 *E. faecium* gegen resistente *S. aureus* (spa t148 und spa t003) gepoolt

Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen *E. faecium* vs. *S. aureus* (spa t148 und spa t003)

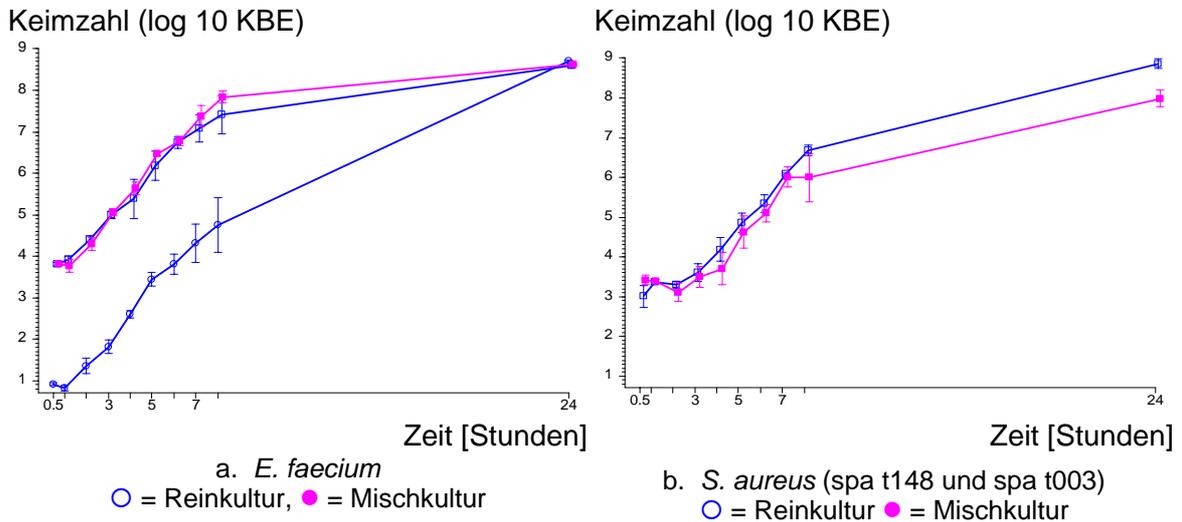


Abbildung 35. Wachstumsverläufe von *E. faecium* und *S. aureus* (spa t148 und spa t003) im Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen, im Vergleich von Reinkultur und Mischkultur. Die Messreihen mit niedrigen mit hohen Anfangszahlen sind getrennt eingezeichnet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE).

Graphische Darstellung der zusammengefassten Werte von spa t003 und spa t148 aus beiden Versuchen gegen den *E. faecium*.

3.6.3.2 *E. faecium* und andere sensible Stämme

Vergleich der Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen dreier sensibler Stämme

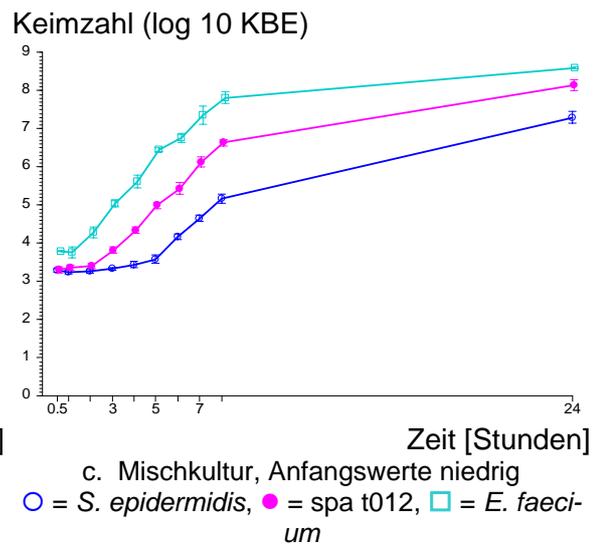
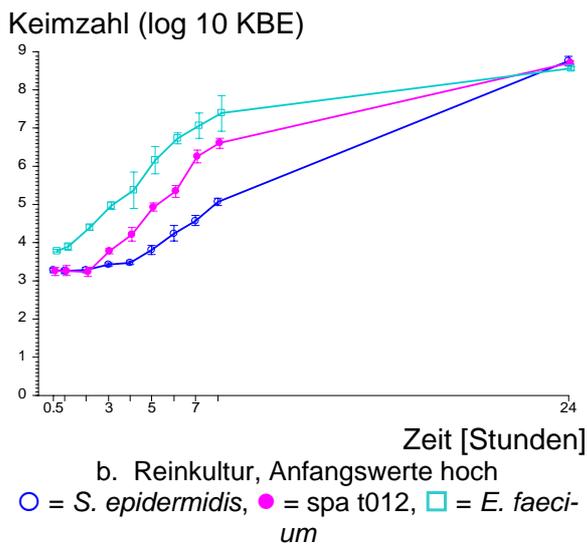
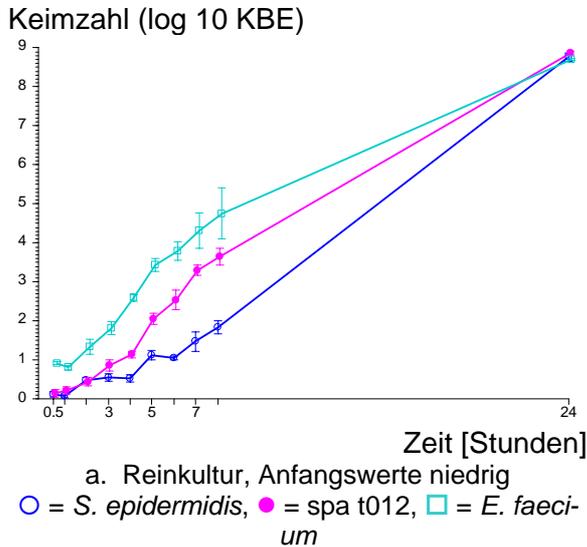


Abbildung 36. Wachstumsverläufe der drei sensiblen Stämme (*S. epidermidis*, *S. aureus* (spa t012) und *E. faecium*) im Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen, im Vergleich von niedrigen mit hohen Anfangszahlen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE).

Zur besseren Vergleichbarkeit werden hier noch einmal die drei sensiblen Stämme, *S. epidermidis*, *S. aureus* (spa t012) und *E. faecium* zusammen dargestellt. Man erkennt gut, dass das Wachstum in Reinkultur unabhängig von der Anfangskonzentration ist. Nach 24 Stunden wird von allen ihre maximale Konzentration erreicht.

Bei der Mischkultur dagegen kann man eindeutig die Hemmung im Wachstum beim *S. aureus* und *S. epidermidis* erkennen, wohingegen der *E. faecium* eine gleichwertige Konzentration wie in Reinkultur erreicht.

3.7 Verdünnungsversuch MSSA (spa t012) gegen MRSA-Stämme

Um das Wachstumsverhalten der untersuchten Mikroorganismen unter verschiedenen Ernährungssituationen zu beobachten, wurden die Versuche noch einmal mit verschiedenen verdünnten Nährlösungen durchgeführt.

Dabei wurde die schon verwendete Nährlösung TSB, in zwei Verdünnungsstufen - 1:5 und 1:10 mit NaCl – und eine dextrosefreie Version von TSB verwendet.

Betrachtet man nun zuerst die Darstellungen der Reinkulturen (siehe **Abbildung 37-40** jeweils **a.**, **b.** und **c.**) so erkennt man, dass der MSSA (spa t012) im Vergleich zur TSB Nährlösung das geringste Wachstumsdefizit in der dextrosefreien Lösung zeigt, im Mittel 0,825 log 10 KBE zur Reinkultur in TSB. Danach folgt dann die 1:5er (Defizit im Mittel von 0,93 log 10 KBE) und 1:10er Verdünnung (Defizit im Mittel von 1,68 log 10 KBE).

Wachstumsdifferenzen der MRSA-Stämme in den Mangelmedien zu TSB in Reinkultur

	niedrige Ausgangskonzentration			hohe Ausgangskonzentration			
	ohne Dextrose	1:5	1:10	ohne Dextrose	1:5	1:10	
spa t003	0,89	0,95		spa t003	0,43	1,01	1,63
spa t005	0,86	0,88	1,37	spa t005	0,43	0,6	1,28
spa t008	0,72	0,95	1,77	spa t008	0,43	0,76	1,59
spa t148	0,78	0,8	1,21	spa t148	-0,13	0,94	1,33

Tabelle 21. Wachstumsdifferenz nach 24 Stunden der beiden echten Verdünnungen und dem TSB ohne Dextrose im Vergleich mit dem Wachstum in reiner TSB. In der linken Tabelle stehen die Werte für die Reinkulturen mit niedriger Anfangskonzentration und in der rechten Tabelle die Reinkulturen für die hohen Ausgangskonzentrationen.

Die Wachstumskurven fallen in den ersten Stunden deutlich flacher aus, d.h. die Wachstumsgeschwindigkeit hat vor allem am Anfang des Versuches abgenommen. Dieser Trend ist bei den Verdünnungen stärker ausgeprägt, als bei der dextrosefreien Lösung. Auch besteht ein Unterschied zwischen MSSA- und MRSA-Stämmen. Der MSSA

wächst in den ersten 8 Stunden merklich langsamer als der MRSA, allerdings werden nach 24 Stunden ähnliche Werte erreicht.

In der Mischkultur stellt sich dieser Unterschied ausgeprägter dar. Das Wachstum des MSSA verlangsamt sich noch einmal gegenüber der Reinkultur und die Werte nach 24 Stunden weisen in den Mangelmedien eine Differenz zur Mischkultur in TSB von im Mittel 2,075 log 10 KBE für die 1:10er Verdünnung, 1,785 log 10 KBE für die 1:5er und 0,65 log 10 KBE für die dextrosefreie Lösung auf.

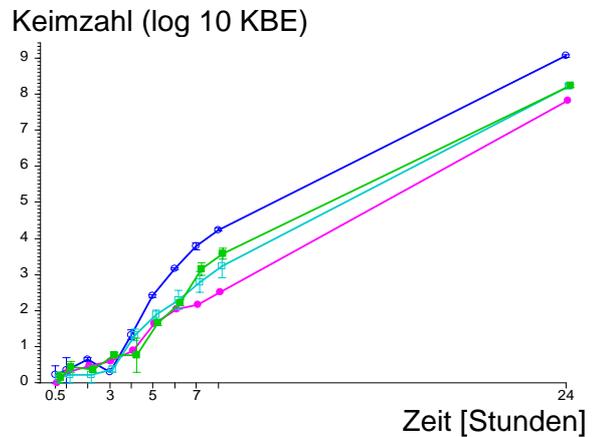
Wachstumsdifferenzen der MRSA-Stämme in den Mangelmedien zu TSB in Mischkultur

	hohe Ausgangskonzentration		
	ohne Dextrose	1:5	1:10
spa t003	0,5	0,69	1,21
spa t005	0,34	0,52	1,17
spa t008	0,61	0,53	1,68
spa t148	0,59	0,8	1,25

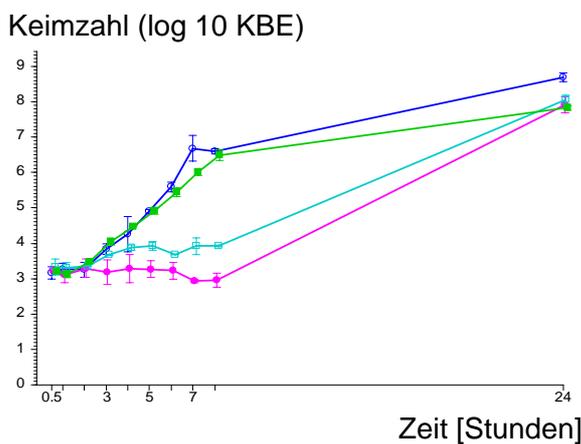
Table 22. Wachstumsdifferenz nach 24 Stunden der beiden echten Verdünnungen und dem TSB ohne Dextrose im Vergleich mit dem Wachstum in reiner TSB.

3.7.1 MSSA (spa t012) gegen MRSA (spa t148)

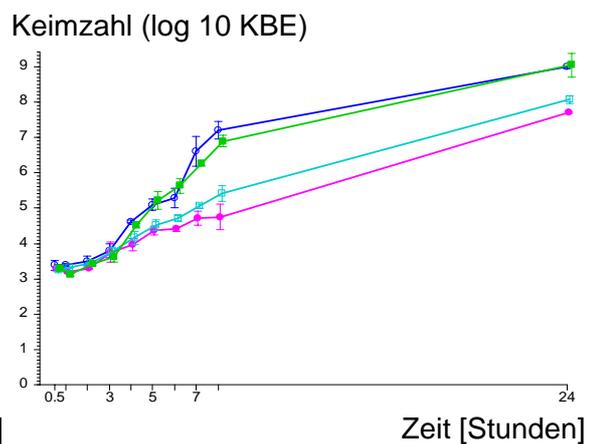
Verdünnungen (stündliche Kontrollen) MSSA (spa t012) vs. MRSA (spa t148)



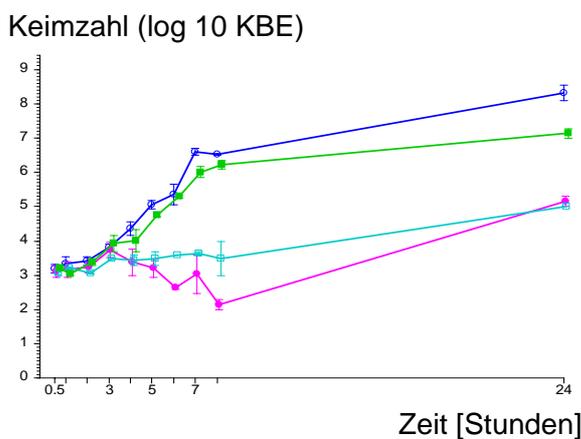
a. *S. aureus* (spa t148) in Reinkultur, niedrig TSB ○ = 1:1, ● = 1:10, □ = 1:5, ■ o.Dextrose



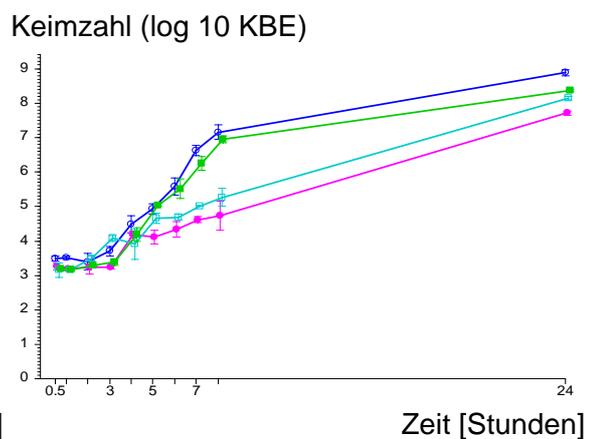
b. *S. aureus* (spa t012) in Reinkultur, hoch TSB ○ = 1:1, ● = 1:10, □ = 1:5, ■ o.Dextrose



c. *S. aureus* (spa t148) in Reinkultur, hoch TSB ○ = 1:1, ● = 1:10, □ = 1:5, ■ o.Dextrose



d. *S. aureus* (spa t012) in Mischkultur, hoch TSB ○ = 1:1, ● = 1:10, □ = 1:5, ■ o.Dextrose



e. *S. aureus* (spa t148) in Mischkultur, hoch TSB ○ = 1:1, ● = 1:10, □ = 1:5, ■ o.Dextrose

Abbildung 37. Wachstumsverläufe von *S. aureus* (spa t012) und *S. aureus* (spa t148) im Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen (Versuch Nr. 13). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE).

3.7.2 MSSA (spa t012) gegen MRSA (spa t005)

Verdünnungen (stündliche Kontrollen) MSSA (spa t012) vs. MRSA (spa t005)

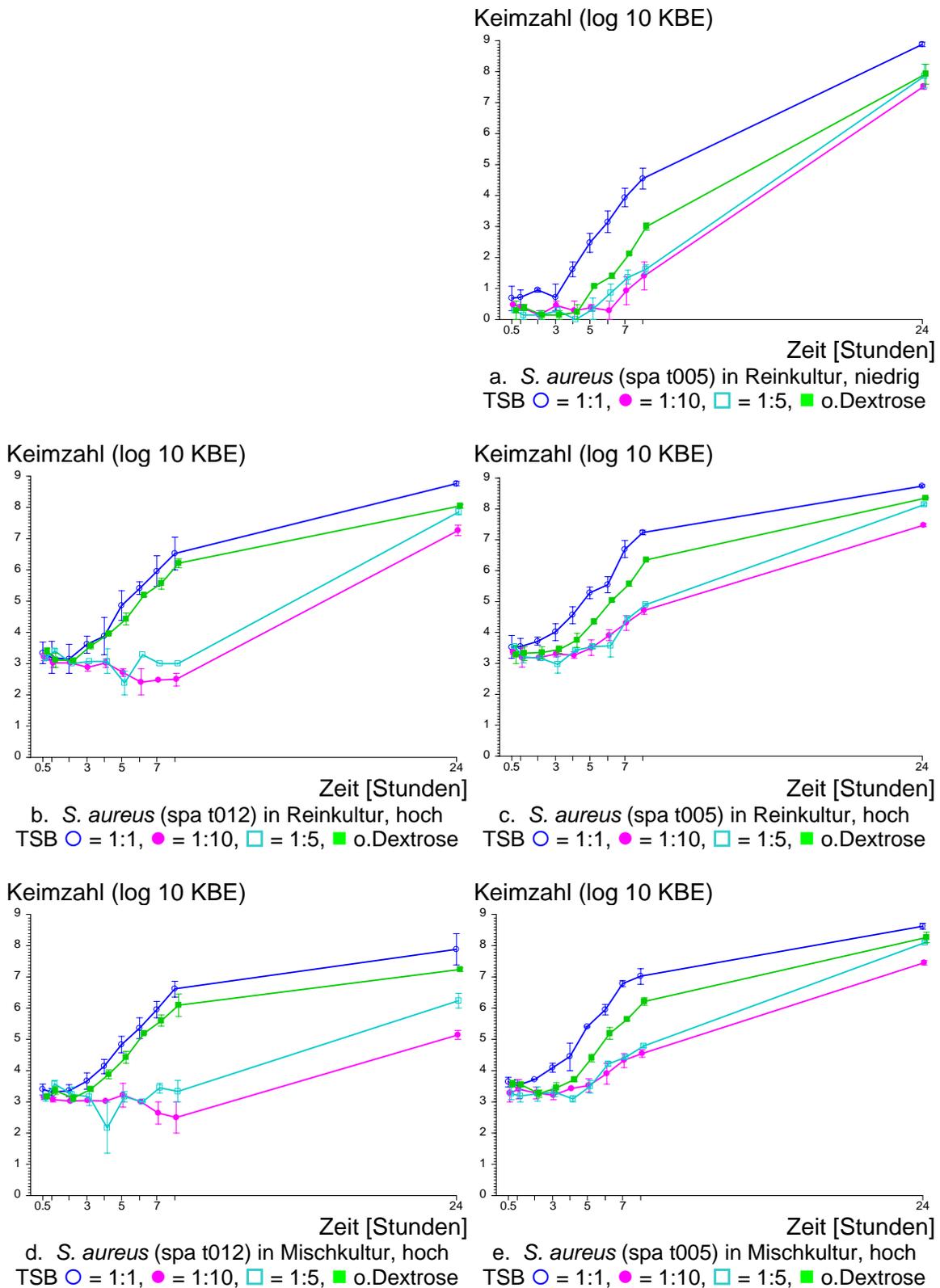


Abbildung 38. Wachstumsverläufe von *S. aureus* (spa t012) und *S. aureus* (spa t005) im Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen (Versuch Nr. 14). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE).

3.7.3 MSSA (spa t012) gegen MRSA (spa t003)

Verdünnungen (stündliche Kontrollen) MSSA (spa t012) vs. MRSA (spa t003)

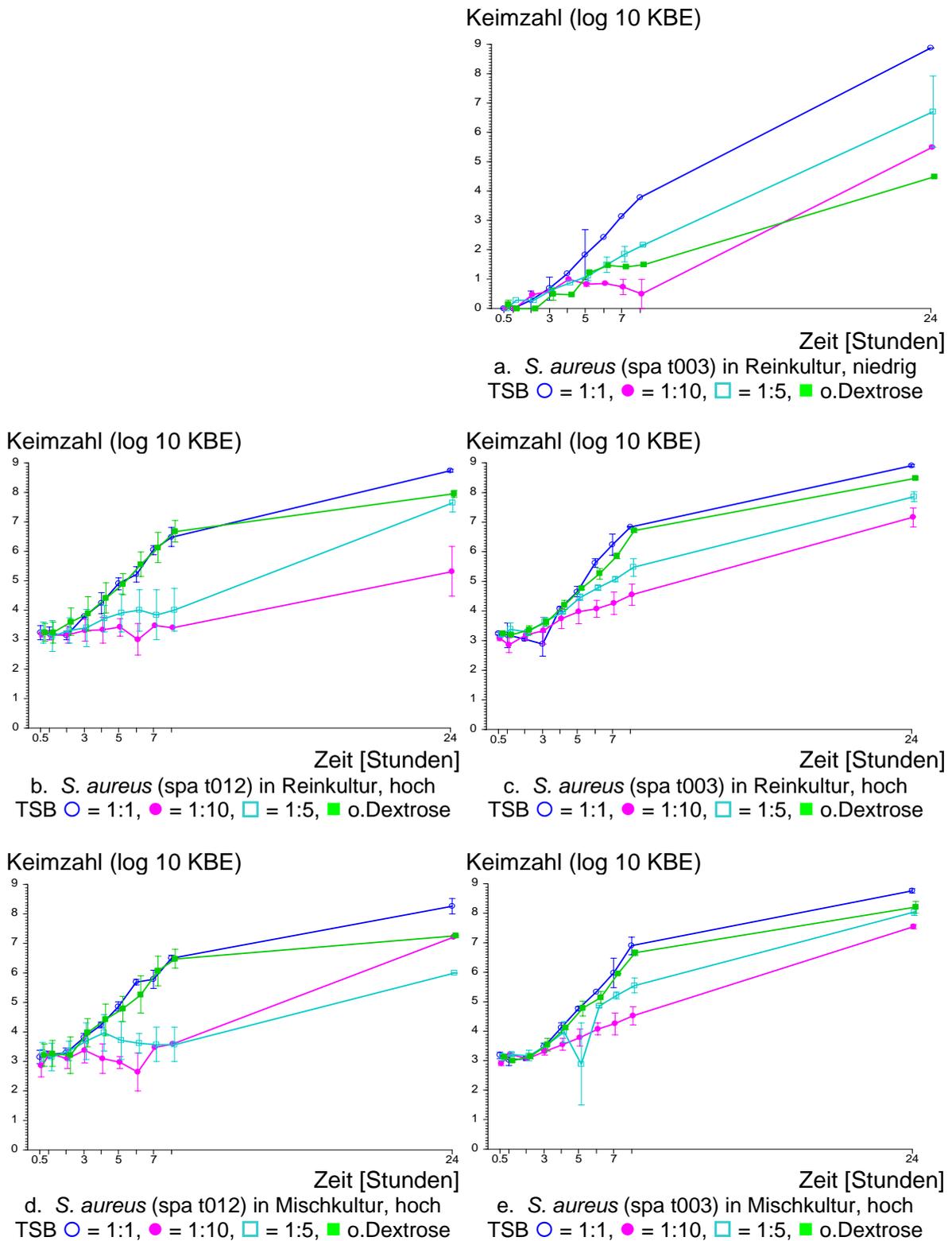


Abbildung 39. Wachstumsverläufe von *S. aureus* (spa t012) und *S. aureus* (spa t003) im Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen (Versuch Nr. 15). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE).

3.7.4 MSSA (spa t012) gegen MRSA (spa t008)

Verdünnungen (stündliche Kontrollen) MSSA (spa t012) vs. MRSA (spa t008)

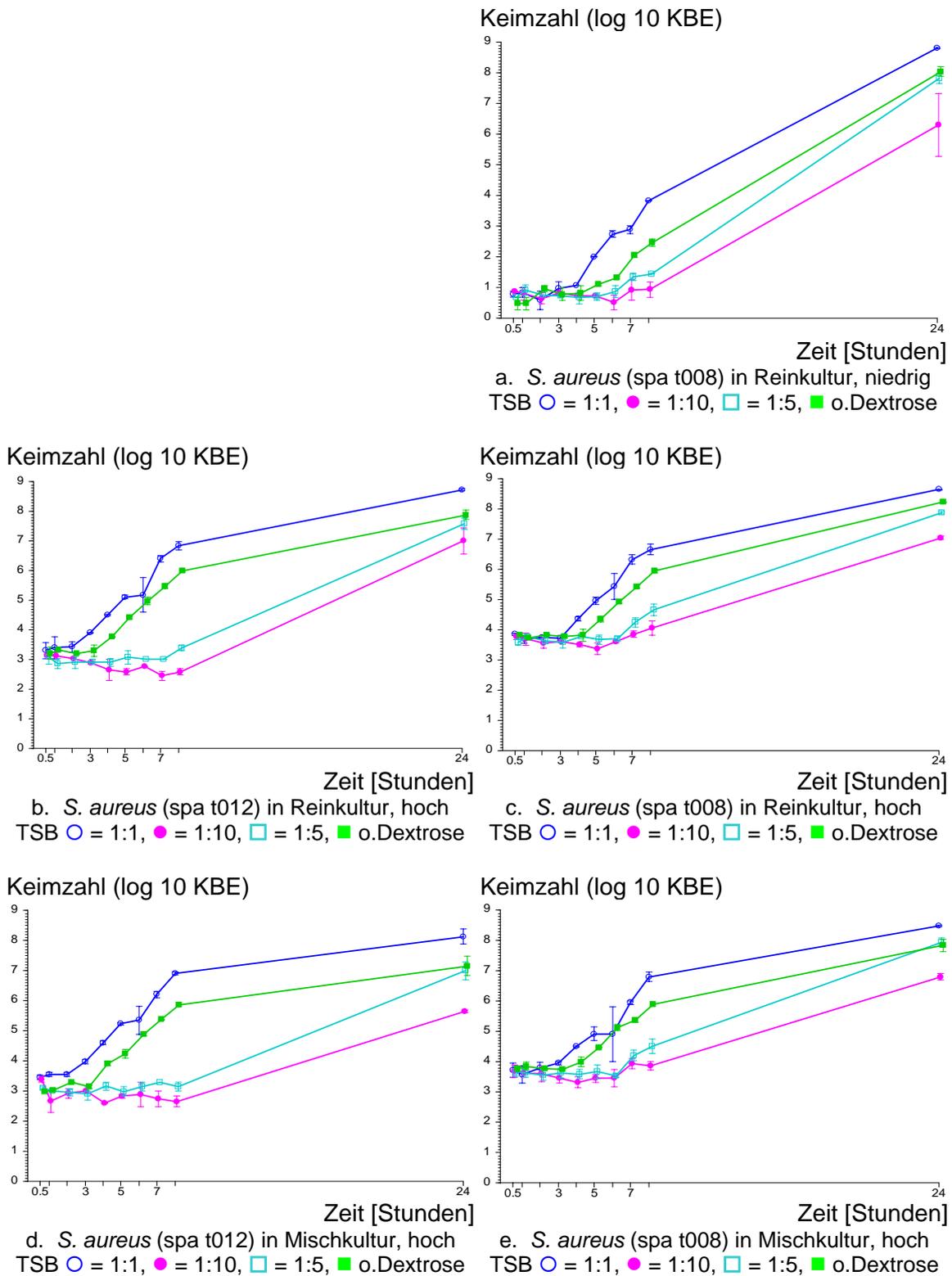


Abbildung 40. Wachstumsverläufe von *S. aureus* (spa t012) und *S. aureus* (spa t008) im Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen (Versuch Nr. 16). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE).

3.7.5 MSSA (spa t012) gegen 4 MRSA-Stämme

Verdünnungen (stündliche Kontrollen) MSSA (spa t012) vs. 4 MRSA-Stämme (ge-poolt)

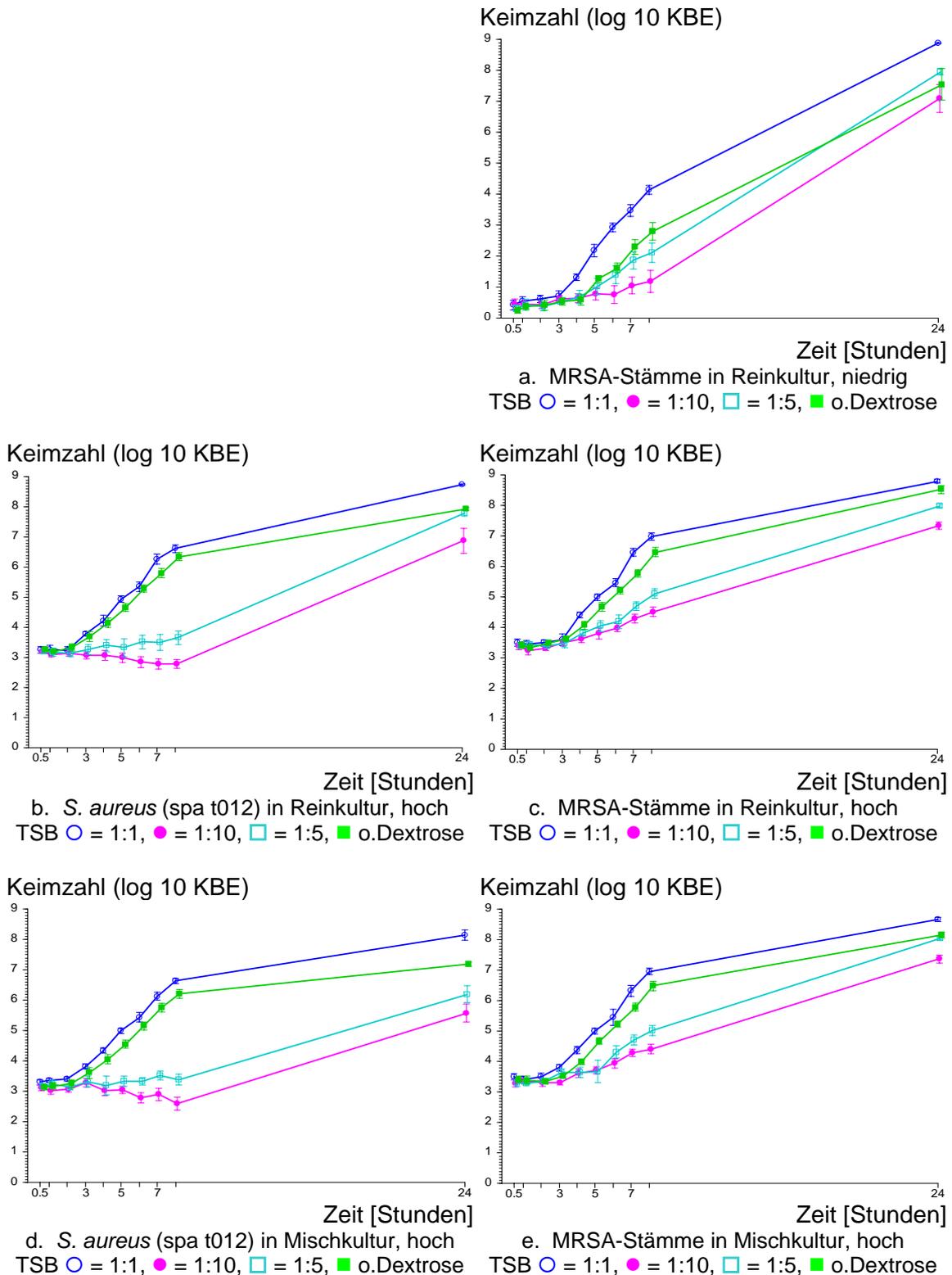


Abbildung 41. Wachstumsverläufe von *S. aureus* (spa t012) und MRSA-Stämme (spa t148, t005, t003 und t008) im Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE).

Sowohl in Reinkultur als auch in Mischkultur sieht man bei dem sensiblen Stamm eine stärkere Reaktion auf die Verdünnung des Mediums TSB, als bei den 4 MRSA-Stämmen.

In dieser Arbeit konnte ein gravierender Unterschied zwischen der reinen TSB-Lösung und den Verdünnungen beobachtet werden. Es zeigt sich eine Wachstumsverzögerung in den Verdünnungen im Vergleich zum ungehinderten Wachstum in reiner TSB-Lösung, die sich nach 3-4 Stunden bei allen Versuchen stark ausgeprägt hat. Allerdings ist der Unterschied zwischen den beiden Verdünnungen (p 1:10-1:5) nicht so prägnant, ein signifikanter Unterschied ergibt sich erst zum Ende des Versuchs hin. Nach 6 Stunden zeigen sich signifikante Unterschiede im Wachstum vom MSSA (spa t012) in Misch- und Reinkultur, nach 8 Stunden im Wachstum vom MRSA (spa t003, t005, t008, t148) in Rein- und Mischkultur mit hohen Anfangswerten und nach 24 Stunden im Wachstum vom MRSA (spa t003, t005, t008, t148) in Reinkultur mit niedrigen Anfangswerten. Ein ähnliches Bild ergibt sich bei dem Vergleich von reiner TSB zu dextrosefreier TSB mit einer Ausnahme. Bei MRSA-Stämmen in Reinkultur mit niedrigen Anfangswerten (siehe **Tabelle 36**) lassen sich schon nach 4 Stunden signifikante Unterschiede im Wachstum darstellen.

In den im Anhang aufgelisteten **Tabellen 34-38** werden die drei verschiedenen Mangelmedien mit der unverdünnten TSB-Lösung zu den unterschiedlichen Zeitpunkten des Versuches miteinander verglichen. In den drei letzten Spalten der Tabellen erkennt man jeweils an der grauen Farbhinterlegung, welche Medien in dieser Spalte miteinander verglichen werden.

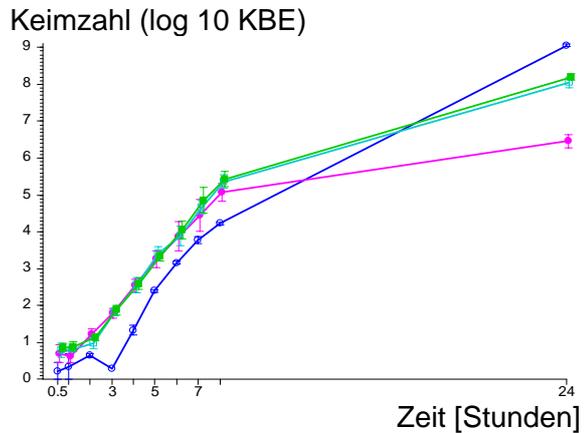
3.8 Verdünnungsversuch *E. faecium* gegen MRSA-Stamm

3.8.1 *E. faecium* gegen *S. aureus* (spa t148)

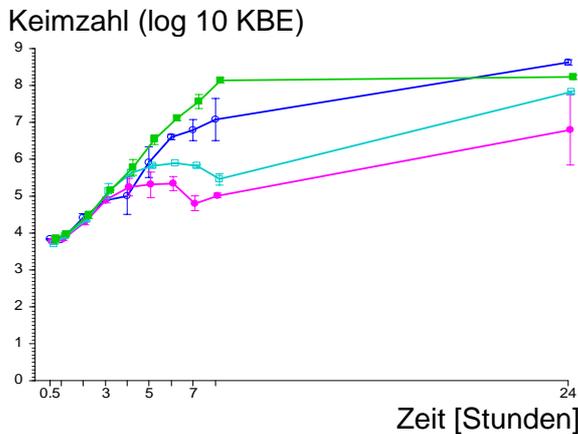
Bei der Durchführung des Verdünnungsversuches mit dem *E. faecium* und einem MRSA-Stamm (spa t148) lassen sich für beide Stämme gleich Einflüsse der Mangelmedien auf das Wachstum in Rein- und Mischkultur beobachten.

Zwischen normaler Nährlösung und TSB ohne Dextrose fanden sich im exakten U-Test nach Mann und Whitney keinerlei Unterschiede. Der Wert ohne Dextrose lag sogar meist höher ($p > 0.17$).

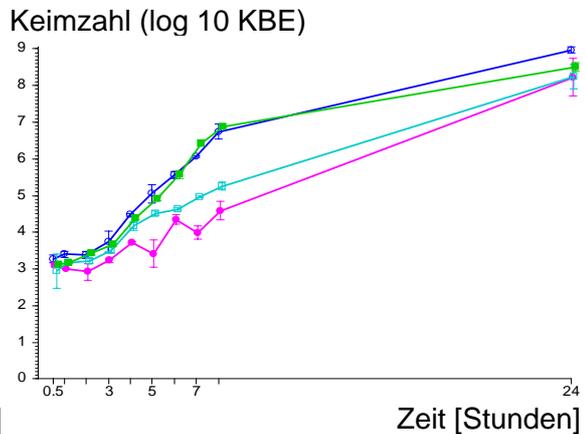
Verdünnungen Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen *E. faecium* vs. *S. aureus* (spa t148)



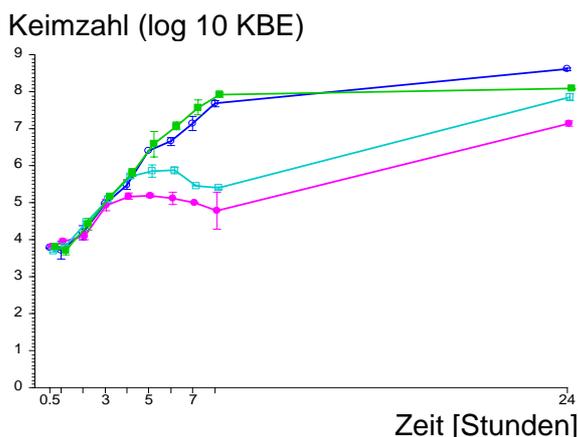
a. *S. aureus* (spa t148) in Reinkultur, niedrig TSB ○ = 1:1, ● = 1:10, □ = 1:5, ■ o.Dextrose



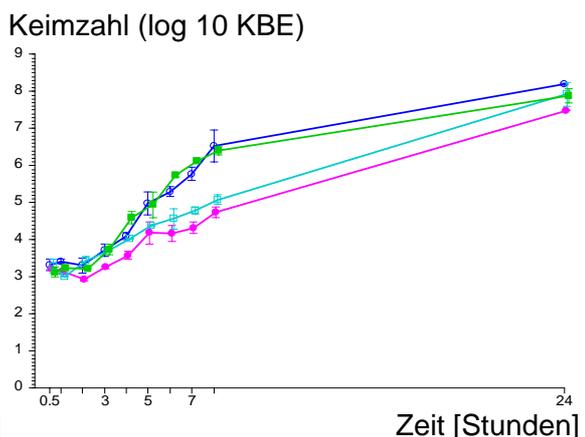
b. *E. faecium* in Reinkultur, hoch TSB ○ = 1:1, ● = 1:10, □ = 1:5, ■ o.Dextrose



c. *S. aureus* (spa t148) in Reinkultur, hoch TSB ○ = 1:1, ● = 1:10, □ = 1:5, ■ o.Dextrose



d. *E. faecium* in Mischkultur, hoch TSB ○ = 1:1, ● = 1:10, □ = 1:5, ■ o.Dextrose



e. *S. aureus* (spa t148) in Mischkultur, hoch TSB ○ = 1:1, ● = 1:10, □ = 1:5, ■ o.Dextrose

Abbildung 42. Wachstumsverläufe von *E. faecium* und *S. aureus* (spa t148) im Verdünnungsversuch, im Vergleich von Reinkultur und Mischkultur (Versuch Nr. 20). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE).

3.8.2 Vergleich des Wachstums des MRSA gegen den MSSA und gegen den *E. faecium* in den Verdünnungsversuchen

Vergleicht man das Wachstum des resistenten *S. aureus* spa t148 in Mischkultur mit dem sensiblen *S. aureus* und dem *E. faecium*, so erkennt man keine bedeutenden Unterschiede zwischen den Wachstumsverläufen, d.h. der Einfluss der beiden Bakterien auf den MRSA ist gleich bei allen getesteten Wachstumsmedien.

Verdünnungen Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen *S. aureus* (spa t148) in zwei Mischkulturen

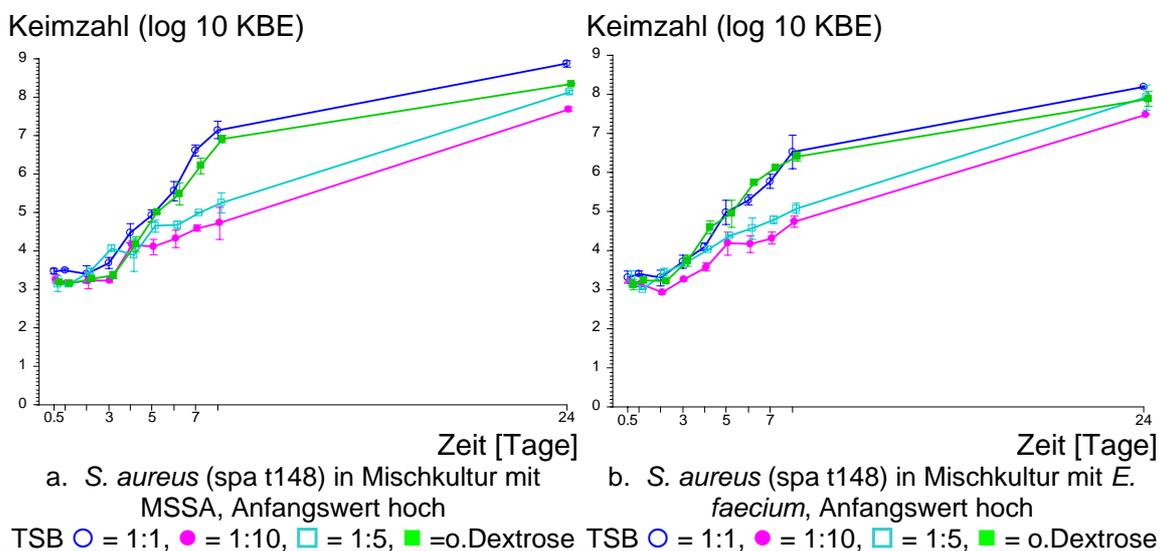


Abbildung 43. Wachstumsverläufe von *S. aureus* (spa t148) in Mischkultur mit den sensiblen Stämmen *S. aureus* (spa t012) und *E. faecium* im Wachstumsversuch mit stündlichen Wachstumskontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes der logarithmierten Erregerzahlen (KBE).

Dies zeigt sich auch im exakten U-Test nach Mann und Whitney, bei dem weder zwischen den Mischkulturen mit den beiden sensiblen Stämmen, noch aufgeteilt nach der Art des Mangels in der Nährlösung signifikante Unterschiede zu erkennen sind ($p > 0.17$).

4 Diskussion

Die Fragestellungen dieser Arbeit entwickelten sich aus folgenden Beobachtungen des Klinikalltages.

Die resistenten *S. aureus*-Stämme breiten sich stark aus, wie von verschiedenen Autoren beschrieben [17, 33]. Dies geschieht nicht nur in Krankenhäusern, wo ein besonders starker Selektionsvorteil durch den hohen Gebrauch von Antibiotika für diese Stämme herrscht, sondern auch in der Bevölkerung [34].

M.W. Ellis et al. beschreiben, dass in der Klinik akquirierte MRSA-Besiedlungen in häuslicher Umgebung wieder verschwinden können [30]. Welche Mechanismen bewirken den Rückgang des MRSA?

In den epidemiologischen Studien von U. Vogel et al. und M. Ehmke et al. [31, 35] über die Verbreitung der MRSA-Stämme wurden häufige und seltene Stämme gefunden, ohne dass ein Grund für die unterschiedliche Verteilung bekannt wäre.

Aus diesen Beobachtungen ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Haben die häufigen Stämme Wachstumsvorteile gegenüber anderen Mikroorganismen; zeigen sie eine schnellere Wachstumskinetik und/oder sind sie gegenüber Mangel-situationen weniger empfindlich?
2. Gibt es neben der Antibiotika-Resistenz andere Selektionsvorteile des MRSA?
 - 2.a. Kann sich der MRSA gegenüber der Standortflora z.B. der Haut und Schleimhäute stärker durchsetzen, indem er andere Mikroorganismen quantitativ verdrängt?
 - 2.b. Hat der MRSA unter Mangelbedingungen einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Bakterien?
3. Wirkt sich die Resistenz des MRSA durch das zusätzliche Resistenz-Gen hemmend auf die Wachstumskinetik aus? Gibt es also Unterschiede im Wachstum von einem MRSA zu einem MSSA (methicillin sensiblen *Staphylococcus aureus*)?
4. Sind probiotische Mikroorganismen in der Lage, das Wachstum des MRSA zu reduzieren oder ihn sogar ganz zu verdrängen?

Vor dem Hintergrund dieser Fragestellungen wurden die einzelnen Versuche dieser Arbeit angelegt. Folgende Aussagen können nunmehr getroffen werden:

Es wurden vier MRSA Typen (spa t003, t005, t008 und t148) untersucht. Nach L. Fenner et al. [36], D. Harmsen et al. [23] und M. Ehmke et al. [31] sind spa t003 und t008 häufig auftretende MRSA-Typen, spa t005 und t148 sind dagegen seltene Typen.

Es lassen sich bei den Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen den Typen feststellen. Die häufigen Stämme, spa t003 und t008, können sich nicht besser gegenüber Konkurrenten durchsetzen und zeigen auch keinen Überlebensvorteil in Mangelmedien. In der Literatur konnte bisher keine Untersuchungen zum Wachstums- und Konkurrenzverhalten häufiger und seltener spa-Typen gefunden werden.

Die Untersuchungen zum Wachstum aller in dieser Arbeit verwendeten MRSA-Typen in Konkurrenz zu MSSA und *S. epidermidis*, als Vertretern der Standortflora, ergaben, dass der MRSA zusätzlich zu seiner Antibiotika-Resistenz weitere Selektionsvorteile durch eine schnellere und dominantere Wachstumskinetik besitzt (Versuch-Nr. 1-8, 13-17, 21-23). Davon abweichende Ergebnisse brachten nur die Versuche MRSA gegen *E. faecium* (Versuch-Nr.: 18-20).

Die Versuche mit *S. epidermidis* zeigen, dass bei nahezu uneingeschränktem Wachstum des MRSA in der Mischkultur die Konzentration des *S. epidermidis* um 1-2 log₁₀ KBE reduziert wird. Die Hemmung des Wachstums setzt dabei nicht direkt ab der ersten Stunde ein, sondern prägt sich nach den ersten acht Stunden aus. Diese Ergebnisse sind unabhängig von der Ausgangskonzentration des MRSA und *S. epidermidis*. Der MRSA setzt sich unter allen Startvoraussetzungen durch und hemmt den *S. epidermidis* (Versuch-Nr. 1-8).

Im Wachstumsvergleich des MRSA in Konkurrenz zum MSSA (als weiteres Bakterium der Standortflora getestet) lässt sich zusammenfassend sagen, dass das Wachstum beider Mikroorganismen von der eigenen Ausgangskonzentration und der des Konkurrenten in Mischkultur abhängig ist. Je niedriger die Ausgangskonzentration, desto niedriger ist auch die Konzentration nach 24 Stunden, je höher die Ausgangskonzentration eines der beiden Bakterien ist, desto stärker ist die Reduktion des mitwachsenden Bakteriums. Es zeigt sich somit ein nahezu identisches Wachstumsverhalten der beiden Stämme.

Zum gleichen Ergebnis kommen Chlebowicz et al. in ihrer Arbeit über die in vivo Umwandlung eines MRSA zum MSSA bei community-acquired Infektionen (Pneumonie beziehungsweise umbilicale Phlegmone) einer Mutter und ihrer Adoptivtochter [37]. Auch hier zeigt sich beim Wachstumsvergleich des MRSA zum MSSA, dass das zusätzliche Resistenz-Gen keinen negativen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien in Abwesenheit von Antibiotika hat.

In den Versuchen von MRSA und *E. faecium* konnte ein umgekehrter Trend erkannt werden. *E. faecium* gelingt es in Mischkultur ein genauso starkes Wachstum zu zeigen wie in Reinkultur. Die Werte der Mischkultur liegen sogar höher. Beim MRSA lässt sich eine minimale Wachstumsreduktion beobachten, die jedoch nach klinischen Gesichtspunkten unerheblich ist, da die Differenz lediglich 0,34 log 10 KBE beträgt.

Zusammenfassend ergibt sich in den Untersuchungen für den MRSA ein supprimierender Einfluss gegen *S. epidermidis*, einen von der Konzentration abhängigen Einfluss auf den MSSA und kein Einfluss auf *E. faecium* unter optimalen Wachstumsbedingungen (hoch nährstoffreiches Kulturmedium).

Die größte Dominanz bringt der MRSA dem *S. cerevisiae*, einem probiotischen Mikroorganismus, entgegen. Während er selbst fast unbeeinflusst in der Mischkultur wächst, kann er die Konzentration des *S. cerevisiae* um bis zu 2,5 log 10 KBE reduzieren. Die Hefe wächst in der Mischkultur bis zum ersten Tag noch ungestört. Ab dem zweiten Messtag fällt eine zunehmende Reduktion ihrer Konzentration in der Mischkultur auf.

Die Versuche mit *Lactobacillus casei*, einem weiteren probiotischen Bakterium, konnten auch trotz mehrmaliger Anpassung des Versuchsaufbaus nicht ausgewertet werden.

In dem Case-report von Y. Kanamori et al. [32] wird beschrieben, wie eine Darmbesiedlung mit probiotischen Mikroorganismen (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus* und *Enterococcus*) bei der Therapie einer MRSA-Enteritis hilft, nachdem der MRSA mit Vancomycin eradiziert wurde. Bei den Versuchen dieser Arbeit ging es um die Frage des verdrängenden Wachstums von Enterokokken gegenüber MRSA-Stämmen. Eine relevante Wachstumshemmung des MRSA konnte nicht beobachtet werden. Die vorliegenden Versuche bestätigen, dass die alleinige probiotische Behandlung eines MRSA mit *S. cerevisiae* aussichtslos sein dürfte.

Somit bleibt die Frage nach dem Einfluss der probiotischen Mikroorganismen auf eine MRSA-Besiedlung ungeklärt. Vielleicht liegt die Stärke der probiotischen Mikroorganismen in einer günstigen Beeinflussung der Standortflora, wie sie jedoch in den Versuchen dieser Arbeit nicht simuliert werden konnte.

Eine andere Überlegung wird in der Arbeit von Voravuthikunchai et al. diskutiert, die einen möglichen Einfluss der probiotischen Bakterien in der Nahrungskonkurrenz, einer Inhibition der Oberflächenhaftung von Pathogenen und der Stimulation des Immunsystems sehen [38]. Zu einem ähnlichen Ergebnis sind N.J. Pultz et al. gekommen, die in ihren Wachstumsversuchen zwei verschiedene MRSA-Stämme gegen menschliche Stuhl-Standortflora getestet haben und zeigen konnten, dass nach wenigen Tagen und abhängig von seiner Ausgangskonzentration der MRSA eliminiert wurde. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen aeroben und anaeroben Kulturen. Einen Unterschied machte es allerdings, wenn der Kultur Glucose zugesetzt wurde. Mit der Glucose konnte keine Eliminierung des MRSA gezeigt werden, weshalb die Autoren schlussfolgerten, dass die Nahrungskonkurrenz eine Hauptursache der Verdrängung ist [39].

Wie verhalten sich die Mikroorganismen unter Mangelbedingungen? Zur Beantwortung dieser Frage führten wir die Versuche mit Verdünnungen der TSB-Lösung und einer dextrosefreien TSB-Lösung durch, wodurch.

Beim Vergleich zum ungehinderten Wachstum in reiner TSB-Lösung zeigen alle getesteten Bakterien in den verschiedenen Mangelmedien eindeutige Wachstumsverzögerungen und reduzierte Keimkonzentrationen in der stationären Phase.

Sowohl das Wachstum des MSSA, als auch das des MRSA zeigt in der dextrosefreien TSB Nährlösung eine Verlangsamung, die Wachstumskurve ist flacher. Die Endpunkte nach 24 Stunden sind deutlich verringert. Sehr viel stärker ist dieser Trend in den Verdünnungen 1:5 und 1:10 ausgeprägt. In diesen Mangelmedien zeigt der resistente Stamm ein deutlich geringeres Wachstumsproblem. Er überwindet schon nach 3-4 Stunden die anfängliche Depression; der MSSA braucht häufig über acht Stunden. Es werden erst ab der 24-Stundenmessung vom MSSA Wachstumserfolge verzeichnet.

Betrachtet man die Werte zur 8ten und 24ten Stunde der Messungen für die dextrosefreie TSB-Lösung und die Verdünnung 1:5, so ergibt sich übereinstimmend folgende Beobachtung: Beim 8-Stunden-Wert liegen die erreichten Konzentrationen in der dext-

rosefreien Lösung deutlich über den Werten der Verdünnungen, beim 24-Stunden-Wert nähern sich die Konzentrationen einstimmig an. In der Verdünnung besteht also in den ersten 8 Stunden eine stärkere Hemmung des Wachstums und in der zweiten Phase wird diese Hemmung überwunden und das Wachstumsdefizit wieder ausgeglichen. Im Vergleich zum Wachstum in reinem TSB beträgt die Wachstumsdifferenz zu diesen beiden Mangelmedien 0,5-1 log₁₀ KBE, in der 1:10er Verdünnung 1,3 log₁₀ KBE.

Bei den Versuchen mit *E. faecium* gegen MRSA wird ein besseres Wachstum des *E. faecium* in der dextrosefreien Lösung gegenüber der reinen TSB innerhalb der ersten 8 Stunden beobachtet. Nach 24 Stunden ist das Wachstum jedoch in der TSB-Lösung besser. Die Wachstumskurven von *E. faecium* in den Verdünnungen (1:5 und 1:10) beschreiben nach ca. 5 Stunden einen leichten Stillstand bis Rückschritt im Wachstum. Dieser negative Trend hält bis zur achten Stunde an, ist aber nach 24 Stunden überwunden und erreicht dann ähnliche Werte wie in der dextrosefreien Lösung. Diese Beobachtung gilt für die Rein- und Mischkultur.

Bei den Versuchen mit der niedrigen Anfangskonzentration für den MRSA zeigt *E. faecium* einen stärkeren Einfluss auf das Wachstum des MRSA als der sensible *S. aureus* (spa t012) ihn zeigt. Der Wachstumsvorteil von *E. faecium* führt aber nicht zu einer klinisch relevanten Reduktion des MRSA.

In der Literatur wurden bisher keine Vergleiche von *E. faecium* und MRSA sowie MSSA und MRSA unter Mangelbedingungen angestellt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen den Wachstumsvorteil, der sich in reiner TSB-Lösung findet, auch für die Mangelmedien mit der Ausnahme, dass *E. faecium* wieder schneller und stärker wächst, vor allem in den ersten Stunden der Versuche, als der MRSA, ohne diesen jedoch im Wachstum zu reduzieren. MRSA und *E. faecium* verhalten sich nicht als Konkurrenten, sondern wachsen nahezu unbeeinflusst von der Anwesenheit des jeweils anderen Bakteriums.

In durchgeführten Untersuchungen sind keine Nachteile für den MRSA durch das zusätzliche Genmaterial zu erkennen. Der resistente *S. aureus* weist in der Reinkultur weder eine abgeflachte Wachstumskurve noch eine verminderte Endkonzentrationen auf. Dies entspricht den Ergebnissen von M.-L. Foucault et al. [40], die eine Reduktion der Fitness nur unter der Gegenwart von Vancomycin beobachten konnten, während ohne

das Antibiotikum der resistente und sensible Stamm nahezu identische Wachstumskurven zeigten und sich somit das Resistenz-Gen in Abwesenheit des Vancomycin nicht als Wachstumsnachteil zeigt. Die Arbeit von F. Gómez-Aguado et al. beschäftigt sich mit der Wachstumsstruktur und -dynamik von MRSA-Kolonien; auch hier werden makroskopisch keine signifikanten Unterschiede im Wachstum von MRSA und MSSA in den ersten 24 Stunden beobachtet [41].

Der resistente *S. aureus* wächst in den Prüfansätzen umso dominanter, je höher die Ausgangskonzentration für ihn ist und umso niedriger die Konzentration des Sensiblen in der Mischkultur ist. Dreht man das Verhältnis um, also eine niedrige Konzentration für den MRSA und eine hohe für den sensiblen *S. aureus*, so kann hier eine geringe Reduktion im Wachstum des MRSA beobachtet werden. Es werden aber immer noch Konzentrationen von ca. $10^8 \log 10$ KBE anstelle von $10^9 \log 10$ KBE in Reinkultur erreicht. Somit hat diese Reduktion wohl keine klinisch Relevanz. Die beiden *S. aureus* Typen haben einen ähnlichen Einfluss aufeinander, wobei der Resistente jeweils die größere Wirkung auf den Konkurrenten erzielt.

Im internationalen Sprachgebrauch versteht man unter bakterieller Fitness die Fähigkeit eines Organismus, den Stoffwechsel Umweltbedingungen anzupassen mit dem Ziel des Überlebens und Wachstums. Die Fitness ist somit eine führende Bestimmungsgröße in der Physiologie dieser Organismen.

C. Kusuma et al. [42] beschreiben das in vitro und in vivo Verhalten eines Lysostaphin resistenten *S. aureus*. Die resistenten Stämme haben eine 5-fach reduzierte Virulenz gegenüber dem Wildtyp in vivo und eine reduzierte logarithmische Wachstumsrate in vitro. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass während des 14-tägigen Beobachtungszeitraumes die Lysostaphin resistenten Stämme es versäumten, kompensatorische Mutationen zu entwickeln, um ihre Fitness wiederherzustellen. Das Lysostaphin-Resistenz-Gen bleibt ein Wachstums-/Virulenznachteil für den *S. aureus*.

S. Besier et al. [43] beschreiben, dass die Fuzidine-Resistenz eines *S. aureus* auf einem Aminosäure-Austausch des Elongations Faktors (EF-G) beruht. Dieser genetisch kodierte Austausch führt zu einer reduzierten Fitness. Sie beschreiben weiter, dass der Fitnessnachteil wieder aufgehoben wird, ohne dass die Resistenz beeinflusst wäre, wenn bei dem *S. aureus* eine „Second-Site-Mutation“ des EF-G auftritt.

F. Laurent et al. [44] haben in ihrer Arbeit die Fitness von Gentamycin-resistenten MRSA-Stämmen (GR-MRSA) und einem Gentamycin-sensiblen MRSA-Stamm (GS-MRSA) gegenüber einem MSSA untersucht. Dabei zeigt der MRSA ein verlangsamtes Wachstum gegenüber dem MSSA. Bei dem GS-MRSA wird zwischen 2 Gruppen unterschieden, einer mehrheitlich Erythromycin sensiblen (GS-MRSA-B) und einer mehrheitlich Erythromycin resistenten (GS-MRSA-A1) Gruppe. Hier zeigt GS-MRSA-B wider Erwarten eine dem MSSA entsprechende Generationszeit. Führt die Methicillin-Resistenz noch zu einem Wachstumsnachteil, so hebt die zusätzliche Erythromycin-Resistenz den Nachteil wieder auf. Die Autoren schlussfolgern, dass ein Zusammenhang zwischen dem genetischen Muster der Bakterienstämme, dem Resistenzprofil und dem physiologischen Verhalten der Stämme besteht. Der beobachtete Wachstumsvorteil des GS-MRSA-A1 muss berücksichtigt werden, um die Ausbreitung neuer MRSA-Typen zu verstehen.

Zwei weitere Arbeiten, die sich mit den verschiedenen Typen der SCCmec-Elemente beschäftigen, zeigen ähnliche Ergebnisse. B.A. Diep et al. und J. Collins et al. schlussfolgern, dass es ganz wesentlich von der genetische Grundlage der Resistenz abhängt, wie sich die Resistenz dann auf die Fitness des Bakteriums auswirkt [45, 46].

In den Versuchen dieser Arbeit hab ich verschiedene MRSA-Typen untersucht, konnte aber keinen Unterschied bezüglich der Fitness der einzelnen Typen beobachten. Bei den in dieser Arbeit untersuchten MRSA-Stämmen (spa t003, t005, t008, t148) - es handelt sich um Isolate von Hospitalkeimen, - gibt es durch die Methicillin-Resistenz keine Wachstumsnachteile. Es liegt daher die Vermutung nahe, das bei den klinisch relevanten MRSA-Stämmen eine die Fitness wiederherstellende zusätzliche Mutation vorliegt, oder die Methicillin-Resistenz von sich aus nicht zu einer Reduktion der Fitness führt. Eine genaue Bestimmung des Resistenz-Gens und weiterer genetischer Veränderungen bleibt zukünftigen genetisch orientierten Untersuchungen vorbehalten. Hierbei könnten sich Hinweise ergeben welche Mutationen die Fitness wiederherstellen bzw. welche Mutationen keinen Einfluss auf die Fitness haben.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden aus dem Universitätsklinikum Würzburg isolierte MRSA-Stämme auf ihr Wachstumsverhalten gegenüber anderen Mikroorganismen und verschiedenen Mangelbedingungen untersucht.

Es lässt sich für alle getesteten MRSA-Stämme zusammenfassend sagen, dass ihre klinische Prävalenz nicht mit dem Wachstum *in vitro* korreliert, d.h. das häufige Spä-Typen nicht besser unter unseren Versuchbedingungen gewachsen sind als seltene.

In vitro konnte kein verdrängendes Wachstum des Methicillin sensiblen *S. aureus* gegenüber den resistenten Stämme beobachtet werden. Vielmehr gelingt es den MRSA-Stämmen, ein Wachstumsgemisch zu ihrem Vorteil zu beeinflussen, indem sie die getesteten anderen Mikroorganismen (*S. epidermidis*, *S. cerivisiae*) im Wachstum hemmen, mit Ausnahme von *E. faecium*.

Die Arbeit beleuchtet die Schwierigkeiten der Identifizierung von probiotischen Arten zur Verdrängung eines MRSA. In Zukunft sollte vielleicht an der Optimierung von *in vitro* Systemen gearbeitet werden (*in vitro* Organkulturen) oder Tiermodelle verwendet werden. Den Transmissionsunterschieden und der Tenazität sind weiterhin Aufmerksamkeit zu widmen.

Wie in der Literatur beschrieben [38-40] ist es zum Verständnis des Wachstumsverhaltens der resistenten Stämme wichtig zu wissen, auf welchen molekularbiologischen Grundlagen die Resistenz beruht, da eine einzelne Site-Mutation zusätzliche Resistenzen bedeuten und einen eventuellen Wachstumsnachteil wieder ausgleichen kann [44]. Im Klinikalltag scheinen sich die MRSA-Stämme auszubreiten, die den Wachstumsnachteil bereits ausgeglichen haben, beziehungsweise deren Methicillinresistenz keinen Wachstumsnachteil bedeutet.

6 Literatur

1. E. Kloos und T.L. Bannerman, *Staphylococcus and Micrococcus*. Manual of Clinical Microbiology, 1999. **7th Ed.**: S. 264-282.
2. A. Ogston, *Report upon microorganisms in surgical diseases*. The British Medical Journal, 1881: S. 369-75.
3. F. C. Tenover, *Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria*. The American Journal of Medicine, 2006. **119**: S. S3-S10.
4. M.C. Enright, D.A. Robison, G. Randle, E.J. Feil, H. Grundmann und B.G. Spratt, *The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. PNAS, 2002. **99**: S. 7687-7692.
5. H.F. Chambers, *The changing epidemiology of Staphylococcus aureus?* Emerging Infectious Diseases, 2001. **7**: S. 178-182.
6. L. Wijaya, L.-Y. Hsu, A. Kurup, *Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: Overview and local situation*. Annals Academy of Medicine, 2006. **35**: S. 479-86.
7. D.J. Diekema, M.A. Pfaller, F.J. Schmitz, J. Smayevsky, J.Bell, R.N., Jones und M. Beach, *Survey of infections due to Staphylococcus species; Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe and the Western Pacific Region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999*. Clinical Infectious Diseases, 2001. **32**: S. 114-32.
8. Rountree, Vickery, *Further observations on methicillin-resistant Staphylococci*. The Medical Journal of Australia, 1973. **1**: S. 1030-4.
9. H.K. Tiwari, A.K. Das, D. Sapkota, K. Sivarajan, V.K. Pahwa, *Methicillin resistant Staphylococcus aureus: prevalence and antibiogram in a tertiary care hospital in western Nepal*. Journal of Infection in Developing Countries, 2009. **3**: S. 681-684.
10. W. Witte, C. Bräulke, C. Cuny, D. Heuck und M. Kresken, *Changing pattern of antibiotic resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus from German Hospitals*. Infection Control and Hospital Epidemiology, 2001. **22**: S. 683-686.
11. K. Hiramatsu, N. Aritaka, H. Hanaki, S. Kawasaki, Y. Hosaoda, S. Hori, Y. Fukuchi und I. Kobayashi, *Dissemination in Japanese hospitals of strains of Staphylococcus aureus heterogeneously resistant to vancomycin*. The Lancet Infectious Diseases, 1997. **350**: S. 1670-73.
12. G.A. Oliveira, A.M. Dell'Aquila, R.L. Masiero, C.E. Levy, M.S. Gomes, L. Cui, K. Hiramatsu, E.M. Mamizuka, *Isolation in Brazil of nosocomial Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to Vancomycin*. Infection Control and Hospital Epidemiology, 2001. **22**: S. 443-448.
13. K. Hiramatsu, *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus: a new model of antibiotic resistance*. Lancet Infect Dis, 2001. **1**(3): S. 147-55.

14. D.O. de Melo, M. Sasaki und R. Satovschi Grinbaum, *Vancomycin use in a hospital with high prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus- comparison with Hospital Infection Control Practices Advisory Committee Guidelines (HICPAC)*. BJID, 2007. **11**.
15. A.-M. Hanssen, A. Fossum, J. Mikalsen, D.S. Halvorsen, G. Bukholm und J.U. Ericson Sollid, *Dissemination of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in northern Norway: Sequence types 8 and 80 predominate*. Journal of Clinical Microbiology, 2005. **43**: S. 2118-2124.
16. K. Okuma, K. Iwakawa, J.D. Turnidge, W.B. Grubb, J.M. Bell, F.G. O'Brien, G.W. Pearman, F.C. Tenover, M. Kapi, C. Tiensasitorn, T. Ito und K. Hiramatsu, *Dissemination of new methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in the community*. Journal of Clinical Microbiology, 2002. **40**: S. 4289-4294.
17. M.D. Zilberberg, A.F. Shorr und M.H. Kollef, *Growth and geographic variation in hospitalizations with resistant infections, United States, 2000-2005*. Emerging Infectious Diseases, 2008. **14**: S. 1756-1758.
18. M. Miller, H.A. Cook, E.Y. Furuya, M. Bhat, M.-H. Lee, P. Vavagiaks, P. Visintainer, G. Vasquez, E. Larson, F.D. Lowy, *Staphylococcus aureus in the community: Colonization versus infection*. PLoS ONE, 2009. **4**: S. e6708-e6708.
19. P.E. Reynolds und D.F.J. Brown, *Penicillin-binding proteins of β -lactam-resistant strains of Staphylococcus aureus: Effect of growth conditions*. FEBS Letters, 1985. **192**: S. 28-32.
20. C. Fuda, M. Suvoroy, S.B. Vakulenko und S. Mobashery, *The basis for resistance to β -Lactam antibiotics by Penicillin-binding Protein 2a of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. The Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**: S. 40802-40806.
21. W.W. Karakawa, J.M. Fournier, W.F. Vann, R. Arbeit, R.S. Schneerson und J.B. Robbins, *Method for the serological typing of the capsular polysaccharides of Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology, 1985. **22**: S. 445-447.
22. B. Strommenger, C. Kettlitz, T. Weniger, D. Harmsen, A.W. Friedrich und W. Witte, *Assignment of Staphylococcus Isolates to group spa typing, SmaI Macrorestriction Analysis, and Multilocus Sequence Typing*. Journal of Clinical Microbiology, 2006. **44**: S. 2533-2540.
23. D. Harmsen, H. Claus, W. Witte, J. Rothgänger, H. Claus, D. Turnwald und U. Vogel, *Typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a university hospital setting by using Novel Software for spa repeat determination and database management*. Journal of Clinical Microbiology, 2003. **41**: S. 5442-5448.
24. B. Shopsin, M. Gomez, M. Waddington, M. Riehman und B. N. Kreiswirth, *Use of coagulas gene (coa) repeat region nucleotide sequences for typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains*. Journal of Clinical Microbiology, 2000. **38**: S. 3453-3456.
25. A. Mellmann, A.W. Friedrich, F. Kipp, F. Hinder, U. Keckevoet und D. Harmsen, *Evidenced-based infection-control decisions for nosocomial MRSA based on spa typing*. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 2005. **130**: S. 1364-1368.
26. L. Koreen, S.V. Ramaswamy, E.A. Graviss, S. Naidich, J.M. Musser und B.N. Kreiswirth, *spa typing method for discriminating among Staphylococcus aureus isolates; Implications for use of a single marker to detect genetic micro- and*

- macrovariation*. Journal of Clinical Microbiology, 2004. **42**: S. 792-799.
27. H. M. E. Frenay, J.P.G. Theelen, L. M. Schouls, C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, J. Verhoef, W. J. van Leeuwen und F. R. Mooi, *Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains on the basis of Protein A Gene Polymorphism*. Journal of Clinical Microbiology, 1994. **32**: S. 846-847.
 28. S. Watanabe, T. Ito, T. Sasaki, S. Li, I. Uchiyama, K. Kishii, K. Kikuchi, R.L. Skov und K. Hiramatsu, *Genetic diversity of staphylocoagulase genes (coa): Insight into the evolution of variable chromosomal virulence factors in Staphylococcus aureus*, in *PLoS ONE*. 2009. S. e5714.
 29. R.M Corrigan, H. Miajlovic und T.J. Foster, *Surface proteins that promote adherence of Staphylococcus aureus to human desquamated nasal epithelial cells*. BMC Microbiology, 2009.
 30. M.W. Ellis, D.R Hospenthal, D.P. Dooley, P.J. Gray und C.K. Murray, *Natural history of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization and infection in soldiers*. Clinical Infectious Diseases, 2004. **39**: S. 971-979.
 31. M. Ehmke, H. Karch, *Untersuchung zum Polymorphismus des Protein A kodierenden Gens in klinischen Staphylococcus aureus Isolaten*. 2006, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
 32. Y. Kanamori, K. Hashizume, Y. Kitano, Y. Tanaka, M. Morotomi, N. Yuki und R. Tanaka, *Anaerobic dominant flora was reconstructed by synbiotics in an infant with MRSA enteritis*. Pediatrics International, 2003. **45**: S. 359-362.
 33. M. Thouverez, A. Muller, D. Hocquet, D. Talon und X. Bertrand, *Relationship between molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in a French teaching hospital*. Journal of Medical Microbiology, 2003. **52**: S. 801-806.
 34. A.R. Larsen, S. Böcher, M. Stegger, R. Goering, L.V. Pallesen und R. Skov, *Epidemiology of european community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus clonal complex 80 type IV strains isolated in Denmark from 1993 to 2004*. Journal of Clinical Microbiology, 2008. **46**: S. 62-68.
 35. U. Vogel, O.Kurzai, H. Claus, A. Knaust und F.-A. Pitten, *Spa-Typisierung von Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus Stämmen am Universitätsklinikum Würzburg*. Der Mikrobiologe, 2005. **4**: S. 131-135.
 36. L. Fenner, A.F.Widmer, M. Dangel und R. Frei, *Distribution of spa types among methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates during a 6 year period at a low-prevalence university hospital*. Journal of Medical Microbiology, 2008. **57**: S. 612-616.
 37. M.A. Chlebowicz, K. Nganou, S. Kozytska, J.P. Arends, S. Engelmann, H. Grundmann, K. Ohlsen, J.M. van Dijl und G. Buist, *Recombination between ccrC Genes in a Type V (5C2&5) Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SSCmec) of Staphylococcus aureus ST398 leads to conversion from methicillin resistance to methicillin susceptibility in vivo*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010. **54**: S. 783-791.
 38. S.P. Voravuthikunchai, S. Bilasoï und O. Supamala, *Antagonistic activity against pathogenic bacteria by human vaginal lactobacilli*. Anaerobe, 2006. **12**: S. 221-226.
 39. N.J. Pultz, C.K. Hoyen und C.J. Donskey, *Inhibition of methicillin-resistant*

- Staphylococcus aureus* by an *in vitro* continuous-flow culture containing human stool microflora. FEMS Microbiology Letters, 2004. **241**: S. 201-205.
40. M.-L. Foucault, P. Courvalin und C.Grillot-Courvalin, *Fitness cost of VanA-type vancomycin resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009. **53**: S. 2354-2359.
 41. F. Gómez-Aguado, M.L.Gómez-Lus, M.T. Corcuera, L. Alou, M.J. Alonso, D. Sevillano, D. Val, A. Palmeiro, *Colonial architecture and growth dynamics of Staphylococcus aureus resistant to methicillin*. Rev Esp Quimioter, 2009. **22**: S. 224-227.
 42. C. Kusuma, A. Jadanova, T. Chanturiya und J.F. Kokai-Kun, *Lysostaphin-resistant variants of Staphylococcus aureus demonstrate reduced fitness in vitro and in vivo*. Antimicrob Agents Chemotherapy, 2007. **51**(2): S. 475-482.
 43. S. Besier, A. Ludwig, V. Brade und T. A. Wichelhaus, *Compensatory adaptation to the loss of biological fitness associated with acquisition of fusidic acid resistance in Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemotherapy, 2005. **49**(4): S. 1426-31.
 44. F. Laurent, H. Lelièvre, M. Cornu, F. Vandenesch, G. Carret, J. Etienne und J.-P. Flandrois, *Fitness and competitive growth and advantage of new Gentamicin-susceptible MRSA clones spreading in French hospitals*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001. **47**: S. 277-283.
 45. B.A. Diep, G.G. Stone, L. Basuino, C.J. Graber, A. Miller, S.A. des Etages, A. Jones, A.M. Ballance, F. Perdreau-Remington, G.F. Sensabaugh, F.R. DeLeo und H.F. Chambers, *The arginine catabolic mobile element and staphylococcal chromosomal cassette mec linkage: convergence of virulence and resistance in the USA300 clone of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Journal of Infectious Disease, 2008. **197**: S. 1523-30.
 46. J. Collins, R. Rudkin, M. Recker, C. Pozzi, J.P. O’Gara und R.C. Massey, *Offsetting virulence and antibiotic resistance costs by MRSA*. ISME J., 2010: Epub ahead of print.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ADH	Adhärenz
BJID	Brazilian Journal of Infectious Diseases
Blut	Kochblutagar
bp	Basenpaare
BW	Bierwürzagar
CA-MRSA	community-acquired MRSA
COA-Gen	koagulase-Gen
d	Tag
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
Epi	1,5 ml- und 2 ml-Eppendorf Gefäße
h	Stunde
ISME	International Society for Microbial Ecology
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
KNS	koagulase negative Staphylokokken
<i>L. casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
MRSA	Methicillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin sensible <i>Staphylococcus aureus</i>
MW	Mittelwert
NaCl	Natrium Chlorid 0,9 %
OD	optische Dichte
ORSAB-Platten	Agar mit Oxacillin
PBP	Penicillin-bindendes Protein
PNAS	Proceedings of the National Academy of Sciences
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
sd	Standardabweichung
TSB	Tryptic-Soy Broth
vs.	versus (gegen)
VL-Agar	Viande-Levure agar
VRSA	Vancomycin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>

7.2 Abbildungen

MRSA vs. <i>S. epidermidis</i>	10^X vs. 10⁴ KBE/ml	10³ vs. 10^X KBE/ml	10^X vs. 10³ KBE/ml
spa t003 vs. <i>S. epidermidis</i>			
8h-Versuch		10 ³ vs. 10 ³	10 ⁰ vs. 10 ³
Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen	10 ³ vs. 10 ⁴ 10 ² vs. 10 ⁴ 10 ¹ vs. 10 ⁴ 10 ⁴ vs. 10 ⁴	10 ³ vs. 10 ³ 10 ³ vs. 10 ² 10 ³ vs. 10 ¹ 10 ³ vs. 10 ⁰	10 ² vs. 10 ³ 10 ¹ vs. 10 ³ 10 ⁰ vs. 10 ³
spa t005 vs. <i>S. epidermidis</i>			
8h-Versuch		10 ³ vs. 10 ³	10 ⁰ vs. 10 ³
Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen	10 ³ vs. 10 ⁴ 10 ² vs. 10 ⁴ 10 ¹ vs. 10 ⁴ 10 ⁴ vs. 10 ⁴	10 ³ vs. 10 ³ 10 ³ vs. 10 ² 10 ³ vs. 10 ¹ 10 ³ vs. 10 ⁰	10 ² vs. 10 ³ 10 ¹ vs. 10 ³ 10 ⁰ vs. 10 ³
spa t008 vs. <i>S. epidermidis</i>			
8h-Versuch		10 ³ vs. 10 ³	10 ⁰ vs. 10 ³
Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen	10 ³ vs. 10 ⁴ 10 ² vs. 10 ⁴ 10 ¹ vs. 10 ⁴ 10 ⁴ vs. 10 ⁴	10 ³ vs. 10 ³ 10 ³ vs. 10 ² 10 ³ vs. 10 ¹ 10 ³ vs. 10 ⁰	10 ² vs. 10 ³ 10 ¹ vs. 10 ³ 10 ⁰ vs. 10 ³
spa t148 vs. <i>S. epidermidis</i>			
8h-Versuch		10 ³ vs. 10 ³	10 ⁰ vs. 10 ³
Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen	10 ³ vs. 10 ⁴ 10 ² vs. 10 ⁴ 10 ¹ vs. 10 ⁴ 10 ⁴ vs. 10 ⁴	10 ³ vs. 10 ³ 10 ³ vs. 10 ² 10 ³ vs. 10 ¹ 10 ³ vs. 10 ⁰	10 ² vs. 10 ³ 10 ¹ vs. 10 ³ 10 ⁰ vs. 10 ³

Table 23. Konzentrationen der Mischkulturen bei den verschiedenen Versuchsaufstellungen mit dem resistenten *S. aureus* (spa t003, spa t005, spa t008 und spa t148) und dem *S. epidermidis*. Dabei wurde bei den 8h-Versuchen auf die Konzentrationsgemische 10¹ bis 10⁴ vs. 10⁴ verzichtet, da sie sich in den Wachstumsversuchen mit täglichen Wachstumskontrollen als nicht aussagekräftig erwiesen haben.

MRSA vs. MSSA	10³ vs. 10^X KBE/ml	10^X vs. 10³ KBE/ml
spa t003 vs. spa t012		
8h-Versuch	10 ³ vs. 10 ³	10 ⁰ vs. 10 ³
Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen	10 ³ vs. 10 ³ 10 ³ vs. 10 ² 10 ³ vs. 10 ¹ 10 ³ vs. 10 ⁰	10 ² vs. 10 ³ 10 ¹ vs. 10 ³ 10 ⁰ vs. 10 ³
Verdünnungsversuch	10 ³ vs. 10 ³	
spa t005 vs. spa t012		
8h-Versuch	10 ³ vs. 10 ³	10 ⁰ vs. 10 ³
Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen	10 ³ vs. 10 ³ 10 ³ vs. 10 ² 10 ³ vs. 10 ¹ 10 ³ vs. 10 ⁰	10 ² vs. 10 ³ 10 ¹ vs. 10 ³ 10 ⁰ vs. 10 ³
Verdünnungsversuch	10 ³ vs. 10 ³	
spa t008 vs. spa t012		
8h-Versuch	10 ³ vs. 10 ³	10 ⁰ vs. 10 ³
Verdünnungsversuch	10 ³ vs. 10 ³	
spa t148 vs. spa t012		
8h-Versuch	10 ³ vs. 10 ³	10 ⁰ vs. 10 ³
Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen	10 ³ vs. 10 ³ 10 ³ vs. 10 ² 10 ³ vs. 10 ¹ 10 ³ vs. 10 ⁰	10 ² vs. 10 ³ 10 ¹ vs. 10 ³ 10 ⁰ vs. 10 ³
Verdünnungsversuch	10 ³ vs. 10 ³	

Tabelle 24. Konzentrationen der Mischkulturen bei den verschiedenen Versuchsaufstellungen mit dem resistenten *S. aureus* (spa t003, spa t005, spa t008 und spa t148) und dem sensiblen *S. aureus* (spa t012).

MRSA vs. <i>E. faecium</i>	10³ vs. 10^X KBE/ml
spa t003 vs. <i>E. faecium</i>	
8h-Versuch	10 ³ vs. 10 ³
spa t148 vs. <i>E. faecium</i>	
8h-Versuch	10 ³ vs. 10 ³
Verdünnungsversuch	10 ³ vs. 10 ³

Tabelle 25. Konzentrationen der Mischkulturen bei den verschiedenen Versuchsaufstellungen mit dem resistenten *S. aureus* (spa t003 und spa t148) und dem *E. faecium*.

MRSA vs. <i>S. cerevisiae</i>	10³ vs. 10^X KBE/ml	10^X vs. 10³ KBE/ml
spa t003 vs. <i>S. cerevisiae</i>		
Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen	10 ³ vs. 10 ³ 10 ³ vs. 10 ⁰	10 ⁰ vs. 10 ³

Tabelle 26. Konzentrationen der Mischkulturen beim Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen mit dem resistenten *S. aureus* (spa t003) und dem *S. cerevisiae*.

MRSA vs. <i>L.casei</i>	10³ vs. 10^X KBE/ml	10^X vs. 10³ KBE/ml
spa t003 vs. <i>L.casei</i>		
Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen	10 ³ vs. 10 ³ 10 ³ vs. 10 ⁰	10 ⁰ vs. 10 ³

Tabelle 27. Konzentrationen der Mischkulturen beim Wachstumsversuch mit täglichen Wachstumskontrollen mit dem resistenten *S. aureus* (spa t003) und dem *L. casei*.

MRSA/MSSA in KBE/ml	0h	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	24h
In TSB										
10 ³ vs. 10 ³	-2	-2	-2	-2	-2	-3	-3	-4	-4	-6
	-3	-3	-3	-3	-3	-4	-4	-5	-5	-7
In TSB 1:5 mit NaCl 0,9% verdünnt										
10 ³ vs. 10 ³	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-3	-3	-3	-5
	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-4	-4	-4	-6
In TSB 1:10 mit NaCl 0,9% verdünnt										
10 ³ vs. 10 ³	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-3	-3	-5
	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-4	-4	-6
In TSB ohne Dextrose										
10 ³ vs. 10 ³	-2	-2	-2	-2	-2	-3	-3	-4	-4	-6
	-3	-3	-3	-3	-3	-4	-4	-5	-5	-7

Tabelle 28. Verwendete Verdünnungsstufen zur Erhebung des Bakterienwachstums in den Konzentrationsgemischen zu Beginn und dann stündlich bis zur 8ten Stunde. Die verwendeten Ziffern stehen jeweils für die Verdünnungsstufe, aus der dann eine Menge von 100µl heraus pipettiert wurde und auf einer geeigneten Selektivplatte ausgestrichen.

MRSA/MSSA in KBE/ml	0h	1d	2d	3d	4d
In TSB					
10 ³ vs. 10 ³	-2 -3	-6 -7	-6 -7	-6 -7	-6 -7
10 ² vs. 10 ³	-1 -2	-6 -7	-6 -7	-6 -7	-6 -7
10 ¹ vs. 10 ³	-1;-2 2*250µl	-6 -7	-6 -7	-6 -7	-6 -7
10 ⁰ vs. 10 ³	-2 4*250µl	-6 -7	-6 -7	-6 -7	-6 -7
10 ³ vs. 10 ²	-1 -2	-6 -7	-6 -7	-6 -7	-6 -7
10 ³ vs. 10 ¹	-1 -2	-6 -7	-6 -7	-6 -7	-6 -7
10 ³ vs. 10 ⁰	-2;-3 4*250µl	-6 -7	-6 -7	-6 -7	-6 -7

Tabelle 29. *Verwendete Verdünnungsstufen zur Erhebung des Bakterienwachstums in den Konzentrationsgemischen zu Beginn und dann täglich bis zum 4ten Tag. Die verwendeten Ziffern stehen jeweils für die Verdünnungsstufe, aus der dann eine Menge von 100µl heraus pipettiert wurde und auf einer geeigneten Selektivplatte ausgestrichen. 250µl = Ausstrich von 250µl dass aus dem Ausgangsröhrchen.*

MRSA/S. epidermidis in KBE/ml	0h	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	24h
In TSB										
10 ³ vs. 10 ³	-2 -3	-2 -3	-2 -3	-2 -3	-2 -3	-2 -3	-3 -4	-3 -4	-4 -5	-6 -7
10 ⁰ vs. 10 ³	-2 -3 2*500µl	-1; -2 -3 2*500µl	-1; -2 -3 2*500µl	-1; -2 -3 2*500µl	-1; -2 -3 2*500µl	-1 -2 -3	-2 -3 -4	-2 -3 -4	-2 -3	-6 -7

Tabelle 30. *Verwendete Verdünnungsstufen zur Erhebung des Bakterienwachstums in den Konzentrationsgemischen zu Beginn und dann stündlich bis zur 8ten Stunde. Die verwendeten Ziffern stehen jeweils für die Verdünnungsstufe, aus der dann eine Menge von 100µl heraus pipettiert wurde und auf einer geeigneten Selektivplatte ausgestrichen. 500µl = Ausstrich von 500µl aus dem Ausgangsröhrchen.*

MRSA/S. epidermidis in KBE/ml	0h	1d	2d	3d	4d
In TSB					
10 ³ vs. 10 ⁴	-2;-3	-6;-7	-6;-7	-6;-7	-6;-7
10 ² vs. 10 ⁴	-1;-2;-3	-6;-7	-6;-7	-6;-7	-6;-7
10 ¹ vs. 10 ⁴	-1;-3; 2*250µl aus -1	-6;-7	-6;-7	-6;-7	-6;-7
10 ⁰ vs. 10 ⁴	-3; 2*250µl	-6;-7	-6;-7	-6;-7	-6;-7
10 ³ vs. 10 ³	-2;-3	-6;-7	-6;-7	-6;-7	-6;-7
10 ² vs. 10 ³	-1;-3	-6;-7	-6;-7	-6;-7	-6;-7
10 ¹ vs. 10 ³	-1;-2; 2*250µl	-6;-7	-6;-7	-6;-7	-6;-7
10 ⁰ vs. 10 ³	-2;-3; 2*500µl	-6;-7	-6;-7	-6;-7	-6;-7
10 ³ vs. 10 ²	-1;-2; 2*250µl aus -1	-6;-7	-6;-7	-6;-7	-6;-7
10 ³ vs. 10 ¹	-1;-2; 2*250µl aus -1	-6;-7	-6;-7	-6;-7	-6;-7
10 ³ vs. 10 ⁰	-2; 4*250µl	-6;-7	-6;-7	-6;-7	-6;-7

Tabelle 31. *Verwendete Verdünnungsstufen zur Erhebung des Bakterienwachstums in den Konzentrationsgemischen zu Beginn und dann täglich bis zum 4ten Tag. Die verwendeten Ziffern stehen jeweils für die Verdünnungsstufe, aus der dann eine Menge von 100µl heraus pipettiert wurde und auf einer geeigneten Selektivplatte ausgestrichen. 250µl = Ausstrich von 250µl dass aus dem Ausgangsröhrchen (250µl aus -1 = Ausstrich von 250µl aus der Verdünnungsstufe -1). 500µl = Ausstrich von 500µl aus dem Ausgangsröhrchen.*

MRSA/ <i>E.faecium</i> in KBE/ml	0h	1d	2d	3d	4d
In TSB					
10^3 vs. 10^3	Blut: -2;-3 BW: -2;-3	Blut: -6;-7 BW: -3;-4 -5	Blut: -6;-7 BW: -3;-4 -5	Blut: -6;-7 BW: -3;-4 -5	Blut: -6;-7 BW: -2;-3 -4
10^0 vs. 10^3	Blut: 2*500 μ l BW: -2;-3	Blut: -6;-7 BW: -3;-4 -5	Blut: -6;-7 BW: -3;-4 -5	Blut: -6;-7 BW: -3;-4 -5	Blut: -6;-7 BW: -2;-3 -4
10^3 vs. 10^0	Blut: -2;-3 BW: 2*500 μ l	Blut: -6;-7 BW: -2;-3; -4;-5	Blut: -6;-7 BW: -2;-3; -4;-5	Blut: -6;-7 BW: -2;-3; -4;-5	Blut: -6;-7 BW: -2;-3 -4

Tabelle 32. *Verwendete Verdünnungsstufen zur Erhebung des Bakterienwachstums in den Konzentrationsgemischen zu Beginn und dann täglich bis zum 4ten Tag. Die verwendeten Ziffern stehen jeweils für die Verdünnungsstufe, aus der dann eine Menge von 100 μ l heraus pipettiert wurde und auf einer geeigneten Selektivplatte ausgestrichen. 500 μ l = Ausstrich von 500 μ l aus dem Ausgangsröhrchen.*

MRSA/S. cerevisiae in KBE/ml	0h	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	24h
in TSB										
10 ³ vs. 10 ³	-2 -3	-2 -3	-2 -3	-3 -4	-3 -4	-4 -5	-4 -5	-5 -6	-5 -6	-6 -7
in TSB 1:5 mit NaCl 0,9% verdünnt										
10 ³ vs. 10 ³	-2 -3	-2 -3	-2 -3	-2 -3	-3 -4	-3 -4	-4 -5	-4 -5	-4 -5	-6 -7
in TSB 1:10 mit NaCl 0,9% verdünnt										
10 ³ vs. 10 ³	-2 -3	-2 -3	-2 -3	-2 -3	-2 -3	-3 -4	-3 -4	-3 -4	-4 -5	-6 -7
In TSB ohne Dextrose										
10 ³ vs. 10 ³	-2 -3	-2 -3	-2 -3	-3 -4	-3 -4	-4 -5	-4 -5	-5 -6	-5 -6	-6 -7

Tabelle 33. *Verwendete Verdünnungsstufen zur Erhebung des Bakterienwachstums in den Konzentrationsgemischen zu Beginn und dann stündlich bis zur 8ten Stunde. Die verwendeten Ziffern stehen jeweils für die Verdünnungsstufe, aus der dann eine Menge von 100µl heraus pipettiert wurde und auf einer geeigneten Selektivplatte ausgestrichen.*

log <i>S.aureus</i> (spa t012) Reinkultur, hoher Anfangswert							
	Nährlösung TSB	n	MW	ST	p Verdünn.	p 1:10-1:5	p Dextrose
½ h	unverdünnt	8	3.268	0.292			
	1:10	8	3.206	0.092			
	1:5	8	3.218	0.279	0.98	1.0	
	ohne Dextrose	8	3.277	0.220			0.96
1 h	unverdünnt	8	3.278	0.374			
	1:10	8	3.108	0.174			
	1:5	8	3.182	0.382	0.48	0.36	
	ohne Dextrose	8	3.206	0.242			0.52
2 h	unverdünnt	8	3.251	0.324			
	1:10	8	3.142	0.239			
	1:5	8	3.158	0.330	0.69	1.0	
	ohne Dextrose	8	3.353	0.335			0.96
3 h	unverdünnt	8	3.794	0.205			
	1:10	8	3.076	0.344			
	1:5	8	3.273	0.463	0.0044 **	0.24	
	ohne Dextrose	8	3.704	0.454			0.52
4 h	unverdünnt	8	4.233	0.510			
	1:10	8	3.076	0.471			
	1:5	8	3.404	0.551	0.0030 **	0.20	
	ohne Dextrose	8	4.164	0.428			0.71
5 h	unverdünnt	8	4.949	0.294			
	1:10	8	3.005	0.440			
	1:5	8	3.332	0.812	0.00043 ***	0.24	
	ohne Dextrose	8	4.665	0.342			0.062
6 h	unverdünnt	8	5.356	0.407			
	1:10	8	2.864	0.505			
	1:5	7	3.528	0.590	0.00023 ***	0.015 *	
	ohne Dextrose	8	5.300	0.349			0.52
7 h	unverdünnt	8	6.279	0.457			
	1:10	6	2.793	0.425			
	1:5	7	3.511	0.699	0.00030 ***	0.017 *	
	ohne Dextrose	8	5.801	0.425			0.036 *
8 h	unverdünnt	8	6.620	0.373			
	1:10	7	2.792	0.386			
	1:5	7	3.668	0.583	0.00016 ***	0.0035 **	
	ohne Dextrose	8	6.352	0.360			0.10
24 h	unverdünnt	7	8.734	0.093			
	1:10	8	6.881	1.154			
	1:5	8	7.797	0.295	0.00019 ***	0.027 *	
	ohne Dextrose	8	7.932	0.145			0.00007 ***

Tabelle 34. Vergleich des Wachstum in den verschiedenen Nährlösung zu verschiedenen Zeitpunkten im Stundenversuch für sensiblen *S.aureus* (spa t012) in Reinkultur mit hohen Anfangswerten. MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung, p-Verdünnung für die drei Verdünnungen (inklusive Standard) aus der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis, p-1:10-1:5 für die beiden echten Verdünnungen, p-Dextrose für Standard-TSB und TSB ohne Dextrose, beides aus dem exakten U-Test nach Mann und Whitney.

log <i>S.aureus</i> (spa t012) in Mischkultur, hoher Anfangswert							
	Nährlösung TSB	n	MW	ST	p Verdünn.	p 1:10-1:5	p Dextrose
½ h	unverdünnt	16	3.308	0.316			
	1:10	8	3.134	0.309			
	1:5	8	3.175	0.217	0.20	0.71	
	ohne Dextrose	8	3.152	0.237			0.13
1 h	unverdünnt	16	3.367	0.263			
	1:10	8	3.046	0.338			
	1:5	8	3.243	0.337	0.11	0.24	
	ohne Dextrose	8	3.186	0.286			0.15
2 h	unverdünnt	16	3.412	0.281			
	1:10	8	3.076	0.240			
	1:5	8	3.162	0.281	0.032 *	0.61	
	ohne Dextrose	8	3.262	0.354			0.24
3 h	unverdünnt	16	3.832	0.303			
	1:10	8	3.297	0.413			
	1:5	8	3.324	0.497	0.0043 **	1.0	
	ohne Dextrose	8	3.620	0.478			0.18
4 h	unverdünnt	16	4.345	0.338			
	1:10	8	3.033	0.454			
	1:5	8	3.198	0.898	0.00009 ***	0.24	
	ohne Dextrose	8	4.066	0.415			0.070
5 h	unverdünnt	16	5.005	0.340			
	1:10	8	3.064	0.321			
	1:5	8	3.347	0.484	0.00001 ***	0.10	
	ohne Dextrose	8	4.564	0.362			0.0067 **
6 h	unverdünnt	16	5.445	0.607			
	1:10	8	2.798	0.443			
	1:5	8	3.345	0.351	0.00001 ***	0.015 *	
	ohne Dextrose	8	5.168	0.386			0.11
7 h	unverdünnt	16	6.141	0.489			
	1:10	7	2.905	0.510			
	1:5	7	3.526	0.375	0.00001 ***	0.019 *	
	ohne Dextrose	8	5.771	0.427			0.060
8 h	unverdünnt	16	6.642	0.300			
	1:10	7	2.604	0.584			
	1:5	8	3.397	0.493	0.00001 ***	0.0070 **	
	ohne Dextrose	7	6.222	0.364			0.012 *
24 h	unverdünnt	14	8.154	0.610			
	1:10	7	5.591	0.771			
	1:5	7	6.211	0.718	0.00003 ***	0.053	
	ohne Dextrose	8	7.201	0.197			0.00001 ***

Tabelle 35. Vergleich des Wachstum in den verschiedenen Nährlösung zu verschiedenen Zeitpunkten im Stundenversuch für sensiblen *S.aureus* (spa t012) in Mischkultur mit vier resistenten Stämmen mit hohen Anfangswerten. MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung, p-Verdünnung für die drei Verdünnungen (inklusive Standard) aus der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis, p-1:10-1:5 für die beiden echten Verdünnungen und p-Dextrose für Standard-TSB und TSB ohne Dextrose aus dem U-Test nach Mann und Whitney.

4 resistente Stämme log <i>S.aureus</i>, Reinkultur, niedriger Anfangswert							
Nährlösung	TSB	n	MW	ST	p Verdünn.	p 1:10-1:5	p Dextrose
½ h	unverdünnt	8	0.432	0.429			
	1:10	6	0.460	0.404			
	1:5	7	0.329	0.287	0.79	0.36	
	ohne Dextrose	8	0.276	0.271			0.52
1 h	unverdünnt	7	0.547	0.412			
	1:10	6	0.400	0.339			
	1:5	6	0.424	0.407	0.73	1.00	
	ohne Dextrose	7	0.383	0.232			0.27
2 h	unverdünnt	8	0.626	0.338			
	1:10	6	0.430	0.276			
	1:5	6	0.389	0.352	0.23	0.45	
	ohne Dextrose	7	0.437	0.418			0.28
3 h	unverdünnt	7	0.730	0.423			
	1:10	6	0.550	0.280			
	1:5	6	0.551	0.195	0.67	0.97	
	ohne Dextrose	8	0.556	0.330			0.28
4 h	unverdünnt	7	1.326	0.277			
	1:10	6	0.680	0.327			
	1:5	7	0.707	0.572	0.0077 **	0.73	
	ohne Dextrose	7	0.599	0.436			0.014 *
5 h	unverdünnt	8	2.194	0.563			
	1:10	6	0.812	0.399			
	1:5	7	1.026	0.657	0.0012 **	0.36	
	ohne Dextrose	7	1.291	0.281			0.00081 ***
6 h	unverdünnt	7	2.944	0.363			
	1:10	6	0.824	0.609			
	1:5	7	1.396	0.680	0.00053 ***	0.062	
	ohne Dextrose	7	1.640	0.412			0.00018 ***
7 h	unverdünnt	7	3.491	0.521			
	1:10	6	1.123	0.601			
	1:5	7	1.853	0.674	0.00050 ***	0.027 *	
	ohne Dextrose	7	2.318	0.636			0.00027 ***
8 h	unverdünnt	7	4.152	0.388			
	1:10	6	1.240	0.772			
	1:5	7	2.131	0.772	0.00034 ***	0.027 *	
	ohne Dextrose	7	2.814	0.742			0.00009 ***
24 h	unverdünnt	7	8.916	0.104			
	1:10	5	6.787	1.033			
	1:5	7	7.661	0.916	0.00018 ***	0.010 *	
	ohne Dextrose	7	7.568	1.375			0.00014 ***

Tabelle 36. Vergleich des Wachstum in den verschiedenen Nährlösung zu verschiedenen Zeitpunkten im Stundenversuch für 4 resistente Stämme von *S.aureus* (*spa* t148, t005, t003, t008) in Reinkultur mit niedrigen Anfangswerten. MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung, p-Verdünnung für die drei Verdünnungen (inklusive Standard) aus der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis, p-1:10-1:5 für die beiden echten Verdünnungen, p-Dextrose für Standard-TSB und TSB ohne Dextrose, beides aus dem exakten U-Test nach Mann und Whitney.

4 resistente Stämme log <i>S.aureus</i> , Reinkultur, hoher Anfangswert							
Nährlösung	TSB	n	MW	ST	p Verdünn.	p 1:10-1:5	p Dextrose
½ h	unverdünnt	8	3.511	0.321			
	1:10	8	3.380	0.283			
	1:5	8	3.404	0.204	0.69	0.71	
	ohne Dextrose	8	3.420	0.301			0.61
1 h	unverdünnt	8	3.461	0.339			
	1:10	8	3.240	0.397			
	1:5	8	3.428	0.274	0.38	0.30	
	ohne Dextrose	8	3.342	0.277			0.20
2 h	unverdünnt	8	3.506	0.314			
	1:10	8	3.313	0.208			
	1:5	8	3.381	0.202	0.37	0.36	
	ohne Dextrose	8	3.495	0.248			0.96
3 h	unverdünnt	8	3.609	0.542			
	1:10	8	3.510	0.346			
	1:5	8	3.494	0.392	0.62	0.96	
	ohne Dextrose	8	3.621	0.169			0.5
4 h	unverdünnt	8	4.410	0.279			
	1:10	8	3.623	0.348			
	1:5	8	3.831	0.299	0.0015 **	0.24	
	ohne Dextrose	8	4.073	0.374			0.062
5 h	unverdünnt	8	5.004	0.307			
	1:10	8	3.809	0.502			
	1:5	8	4.053	0.494	0.00074 ***	0.30	
	ohne Dextrose	8	4.675	0.405			0.027 *
6 h	unverdünnt	8	5.472	0.347			
	1:10	8	3.998	0.362			
	1:5	8	4.194	0.629	0.00039 ***	0.36	
	ohne Dextrose	8	5.217	0.323			0.13
7 h	unverdünnt	8	6.473	0.395			
	1:10	8	4.292	0.422			
	1:5	8	4.704	0.405	0.00025 ***	0.062	
	ohne Dextrose	8	5.781	0.344			0.0023 **
8 h	unverdünnt	8	6.988	0.311			
	1:10	8	4.520	0.423			
	1:5	8	5.115	0.426	0.00012 ***	0.0075 **	
	ohne Dextrose	8	6.474	0.406			0.0052 **
24 h	unverdünnt	7	8.822	0.145			
	1:10	8	7.345	0.324			
	1:5	8	7.993	0.174	0.00004 ***	0.00016 ***	
	ohne Dextrose	8	8.525	0.377			0.015 *

Tabelle 37. Vergleich des Wachstum in den verschiedenen Nährlösung zu verschiedenen Zeitpunkten im Stundenversuch für 4 resistente Stämme von *S.aureus* (*spa* t148,t005, t003, t008) in Reinkultur mit hohen Anfangswerten. MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung, p-Verdünnung für die drei Verdünnungen (inklusive Standard) aus der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis, p-1:10-1:5 für die beiden echten Verdünnungen, p-Dextrose für Standard-TSB und TSB ohne Dextrose, beides aus dem exakten U-Test nach Mann und Whitney.

4 resistente Stämme log <i>S.aureus</i> , Mischkultur, hoher Anfangswert							
Nährlösung	TSB	n	MW	ST	p Verdünn.	p 1:10-1:5	p Dextrose
½ h	unverdünnt	8	3.511	0.277			
	1:10	8	3.299	0.359			
	1:5	8	3.311	0.300	0.29	1.0	
	ohne Dextrose	8	3.421	0.294			0.52
1 h	unverdünnt	8	3.419	0.314			
	1:10	8	3.366	0.268			
	1:5	8	3.304	0.245	0.50	0.71	
	ohne Dextrose	8	3.402	0.362			0.83
2 h	unverdünnt	8	3.502	0.351			
	1:10	8	3.310	0.290			
	1:5	8	3.370	0.244	0.37	0.71	
	ohne Dextrose	8	3.374	0.262			0.71
3 h	unverdünnt	8	3.811	0.285			
	1:10	8	3.311	0.164			
	1:5	8	3.647	0.326	0.0077 **	0.015 *	
	ohne Dextrose	8	3.545	0.210			0.027 *
4 h	unverdünnt	8	4.391	0.335			
	1:10	8	3.628	0.385			
	1:5	8	3.648	0.488	0.0074 **	0.96	
	ohne Dextrose	8	4.009	0.235			0.020 *
5 h	unverdünnt	8	5.009	0.299			
	1:10	8	3.728	0.360			
	1:5	8	3.686	1.025	0.00090 ***	0.96	
	ohne Dextrose	8	4.681	0.307			0.020 *
6 h	unverdünnt	7	5.461	0.706			
	1:10	8	3.954	0.447			
	1:5	8	4.330	0.554	0.0046 **	0.10	
	ohne Dextrose	8	5.253	0.273			0.088
7 h	unverdünnt	8	6.339	0.496			
	1:10	8	4.293	0.357			
	1:5	8	4.722	0.456	0.00028 ***	0.10	
	ohne Dextrose	8	5.807	0.369			0.020 *
8 h	unverdünnt	8	6.974	0.291			
	1:10	8	4.425	0.458			
	1:5	8	5.036	0.494	0.00015 ***	0.015 *	
	ohne Dextrose	7	6.509	0.412			0.021 *
24 h	unverdünnt	7	8.692	0.173			
	1:10	8	7.382	0.380			
	1:5	8	8.067	0.141	0.00004 ***	0.00008 ***	
	ohne Dextrose	8	8.176	0.279			0.00016 ***

Tabelle 38. Vergleich des Wachstum in den verschiedenen Nährlösung zu verschiedenen Zeitpunkten im Stundenversuch für 4 resistente Stämme von *S.aureus* (spa t148, t005, t003, t008) in Mischkultur mit dem sensiblen Stamm *S.aureus* (spa t012) mit hohen Anfangswerten. *p*-Verdünnung für die drei Verdünnungen (inklusive Standard) aus der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis, *p*-1:10-1:5 für die beiden echten Verdünnungen, *p*-Dextrose für Standard-TSB und TSB ohne Dextrose, beides aus dem exakten U-Test nach Mann und Whitney.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. F.-A. Pitten und Herrn Professor Dr. M. Frosch für die Möglichkeit danken, im Labor des Institutes für Hygiene und Mikrobiologie die für diese Arbeit notwendigen Versuche durchführen zu können.

Für die geduldige Betreuung und Anregung im praktischen und schriftlichen Teil dieser Arbeit gilt mein besonderer Dank Herrn Priv.-Doz. Dr. F.-A. Pitten und meiner Betreuerin Frau Dr. Dr. I. Otto-Karg sowie Frau Dr. Imme R. Haubitz für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Herrn Professor Dr. Vogel danke ich für die Übernahme des Referates und Frau Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. M. Abele-Horn für die Übernahme des Koreferates.

Ganz besonders möchte ich mich noch bei Beate Stirzel bedanken die mich tatkräftig bei der praktischen Arbeit im Labor unterstützt hat.

„Last, but not least“ möchte ich mich bei meinen Eltern, Geschwistern, dem Rest der Familie und meinen Freunden bedanken, die mich stets unterstützt haben.