

Aus dem
Department für Diagnostische Labormedizin
der Universität Tübingen
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

**Phänotypische und genetische Diversität
von *Staphylococcus aureus* bei der
langzeitigen Kolonisation von zystisch
fibrotischer Lunge**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Guillermin, Julie Lucie

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichtserstatter: Professor Dr. C. Wolz

2. Berichtserstatter: Professor C. Stein-Thoeringer

Tag der Disputation: 29.02.2024

Widmung

Meinem Mann, meinen Eltern und meiner Schwester

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis.....	8
1 Einleitung.....	10
1.1 Die zystische Fibrose	10
1.1.1 Genetik und Diagnostik	10
1.1.2 Pathophysiologie der zystisch fibrotischen Lunge.....	10
1.2 Therapiemöglichkeiten.....	12
1.3 Lungeninfektionen bei CF-Patienten.....	13
1.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	14
1.4.1 Der Erreger	14
1.4.2 <i>S. aureus</i> in der Bevölkerung.....	15
1.4.3 Antibiotikatherapie und Resistenzen bei <i>S. aureus</i>	16
1.5 <i>S. aureus</i> bei CF-Patienten	18
1.5.1 Klinische Relevanz von <i>S. aureus</i> in der CF-Lunge.....	18
1.5.2 Anpassung von <i>S. aureus</i> während der Infektion	19
1.6 Typisierung und Heterogenität von <i>S. aureus</i>	21
1.7 Fragestellung und Zielsetzung	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Materialien.....	23
2.1.1 Laborgeräte.....	23
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	25
2.1.3 Reagenzien und Reaktionskits.....	26
2.1.4 Anzuchtmedien, Puffer und Lösungen.....	28
2.1.5 Antibiotika	29
2.1.6 Verwendete Softwares	30
2.2 Methoden.....	30
2.2.1 Studiendesign	30
2.2.2 Ethikstatement	30
2.2.3 Patientenpopulation	30
2.2.4 Sammlung von Proben.....	31

Inhaltsverzeichnis	
2.2.5	Verdünnungsreihen und Einfrieren von reinen Kolonien 32
2.2.6	spa-Typisierung 32
2.2.7	PFGE und Bestimmungen von Varianten 34
2.2.8	Bestimmung der Agr-Aktivität..... 36
2.2.9	Resistenzbestimmung mit Agardiffusionstest 36
2.3	Erfassung von Patientendaten 37
2.4	Statistische Analyse..... 38
2.4.1	KBE-Analyse 38
2.4.2	Phänotypische Diversität 38
2.4.3	Genetische Diversität 39
2.4.4	Diversität der Agr-Aktivität 39
2.4.5	Antibiotikaresistenzen 39
3	Ergebnisse 41
3.1	Studiendesign 41
3.2	Persistierende Besiedlung mit <i>S. aureus</i> bei CF-Patienten 43
3.3	<i>S. aureus</i> Dichte in Sputum und Nasenabstrichen 43
3.4	Einfluss von der Modulatortherapie auf Krankheitsverlauf und <i>S. aureus</i> Keimzahl 44
3.5	Einfluss der Antibiotikatherapie auf <i>S. aureus</i> Keimzahl 46
3.6	Phänotypische Diversität 48
3.7	Korrelation zwischen phänotypischer Diversität und Bakteriendichte 48
3.8	Analyse der genetischen Diversität..... 49
3.8.1	spa-Typisierung 49
3.8.2	PFGE..... 53
3.8.3	Korrelation zwischen DNA-Fragmentprofil und spa-Typ..... 59
3.8.4	Korrelation zwischen genetischer Diversität und Bakteriendichte. 62
3.9	Analyse der Diversität des <i>Agr</i> Systems 62
3.10	Analyse der Antibiotikaresistenzen 64
3.10.1	Ciprofloxacin 65
3.10.2	Erythromycin 67
3.10.3	Korrelation zwischen phänotypischer Heterogenität und Diversität des Resistenzverhaltens..... 68
3.11	Zusammenfassung der Ergebnisse 68
4	Diskussion..... 70
4.1	Vor- und Nachteile des Studiendesigns..... 70
4.2	<i>S. aureus</i> Kolonisation und Dichte 71
4.3	Phänotypische Heterogenität 72

Inhaltsverzeichnis

4.4	Genetische Heterogenität	72
4.4.1	Methoden, um die genetische Heterogenität zu untersuchen.....	72
4.4.2	Genetische Diversität der CF-Proben.....	74
4.4.3	Korrelation zwischen spa-Typisierung und PFGE-Typisierung	75
4.4.4	Korrelation zwischen phänotypischer und genetischer Heterogenität 76	
4.4.5	Vergleich der Stämme aus der Lunge und der Nase	77
4.4.6	Genetische Heterogenität über die Zeit.....	77
4.5	Agr-Aktivität	77
4.6	Resistenzen.....	78
5	Zusammenfassung	80
6	Literaturverzeichnis	82
7	Erklärung zum Eigenanteil.....	90
8	Anhang	91
9	Danksagung.....	98

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: *S. aureus* Dichte in Sputa und Nasenabstrichen 44

Abbildung 2: Korrelation zwischen *S. aureus* Dichte im Sputum und
Modulatortherapie 45

Abbildung 3: Korrelation zwischen BMI und Modulatortherapie 45

Abbildung 4: Korrelation zwischen FEV1 und Modulatortherapie 46

Abbildung 5: Korrelation zwischen FVC und Modulatortherapie 46

Abbildung 6: Korrelation zwischen *S. aureus* Dichte im Sputum und Therapie
mit Ciprofloxacin im Jahr vor der Studie 47

Abbildung 7: Korrelation zwischen *S. aureus* Dichte im Sputum und Therapie
mit Cotrimoxazole im letzten Jahr 47

Abbildung 8: Phänotypische Diversität je nach Probenursprung..... 48

Abbildung 9: Korrelation zwischen *S. aureus* Dichte und phänotypische
Diversität..... 49

Abbildung 10: Diversität im *spa*-Typ je nach Probenursprung..... 51

Abbildung 11: DNA-Fragmentprofil von *S. aureus* (Proband 9) nach
Makrorestriktionsverdau mit *Sma*I und Trennung mittels PFGE..... 54

Abbildung 12: DNA-Fragmentprofil von *S. aureus* (Patient 6) nach
Makrorestriktionsverdau mit *Sma*I und Trennung mittels PFGE..... 55

Abbildung 13: DNA-Fragmentprofil von *S. aureus* (Patient 7) nach
Makrorestriktionsverdau mit *Sma*I und Trennung mittels PFGE..... 56

Abbildung 14: DNA-Fragmentprofil von *S. aureus* (Patient 8) nach
Makrorestriktionsverdau mit *Sma*I und Trennung mittels PFGE..... 57

Abbildung 15: DNA-Fragmentprofil von *S. aureus* (Patient 9) nach
Makrorestriktionsverdau mit *Sma*I und Trennung mittels PFGE 58

Abbildung 16: Diversität des DNA-Fragmentprofils je nach Probenursprung ... 59

Abbildung 17: Korrelation zwischen Bakteriendichte im Sputum und genetischer
Diversität des *spa*-Typs..... 62

Abbildung 18: Cross-Streak Untersuchung vom Isolat CF3-S1 63

Abbildung 19: Cross-Streak Untersuchung vom Isolat CF8-N2 63

Abbildung 20: Agr-Aktivität je nach Probenursprung..... 64

Abbildung 21: Resistenz gegen Ciprofloxacin je nach Probenursprung 66

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 22: Diversität des Resistenzverhaltens gegen Ciprofloxacin je nach Probenursprung.....	67
Abbildung 23: Resistenz gegen Erythromycin.....	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte, einschließlich Herstellerinformationen..... 23

Tabelle 2: Verwendete Geräte für die PFGE, einschließlich Herstellerinformationen..... 24

Tabelle 3: Verwendete Geräte für die PCR, einschließlich Herstellerinformationen..... 24

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien, einschließlich Herstellerinformationen..... 25

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien, einschließlich Herstellerinformationen ... 26

Tabelle 6: Verwendete Enzyme, einschließlich Herstellerinformationen..... 27

Tabelle 7: Verwendete Stämme für die PCR, PFGE und Cross-Streaks 27

Tabelle 8: Verwendete Primers für die Spa-PCR, einschließlich Herstellerinformationen..... 27

Tabelle 9: Verwendete Puffer, Anzuchtmedien und Lösungen mit Zusammensetzung..... 28

Tabelle 10: Verwendete Antibiotikaresistenztestblättchen, einschließlich Herstellerinformationen..... 29

Tabelle 11: Verwendete Softwares, einschließlich Herstellerinformationen 30

Tabelle 12: 25 µl Ansatz für Spa-PCR..... 33

Tabelle 13: 200 µl Ansatz für den Restriktionsverdau..... 35

Tabelle 14: Laufbedingungen der PFGE..... 36

Tabelle 15: Grenzwerte für Sensibilität nach EUCAST 2023..... 37

Tabelle 16: Untersuchte Sputen und Nasenabstriche bei CF-Patienten und gesunden Probanden 41

Tabelle 17: spa-Typ bei jedem Probanden 50

Tabelle 18: Korrelation zwischen phänotypischer und genetischer (nach spa-Typ) Heterogenität 52

Tabelle 19: spa-Typ und PFGE-DNA-Fragmentprofil..... 60

Tabelle 20: Resistenz gegen Ciprofloxacin über die Zeit 65

Tabelle 21: Genetik und Therapie zum Zeitpunkt der Studie 91

Tabelle 22: Geschlecht und Alter nach Gruppe 91

Tabelle 23: Merkmale der Patientengruppe..... 91

Tabelle 24: Antibiotikatherapie	92
Tabelle 25: Bakterien und Pilze im Sputum.....	96
Tabelle 26: Zusammenfassung der Tests auf Mittelwertsgleichheiten von log(KBE/ml)	96

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

AIP	Autoinducible Peptide
Agr	accessory gene regulator
SarA	staphylococcal accessory regulator
SigB	Sigmafactor B
<i>B. cepacia complex</i>	Burkholderia cepacia complex
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovines Serumalbumin
CC	Clonal Complex
CF	Cystic Fibrosis / zystische Fibrose
Clf	Verklumpungsfaktor
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DHFS	Dihydropteroatsynthase
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure
ENac	Epithelialen Natriumkanäle
FVC	Forcierte Vitalkapazität
FEV1	Forcierte Einsekundenkapazität
Fnbp A und B	Fibronectinbing Proteinen A und B
<i>H. influenzae</i>	Haemophilus influenzae
HIF-1	Hypoxia inducible Factor 1
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IgG	Immunglobulin G
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
IsdA	iron-regulated surface determinant A
KBE	Koloniebildende Einheit
LCI	Lung Clearance Index

Abkürzungsverzeichnis

MLST	Multi-Locus-Sequenztypisierung
MRSA	Multiresistente Staphylococcus aureus
NGS	Next Generation Sequencing
OD ₆₀₀	Optical Density / Extinktion
<i>P. aeruginosa</i>	Pseudomonas aeruginosa
PBP2	Penicillinbindungsprotein 2
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsed-Feld-Gelelektrophorese
PSM	Phenol Soluble Modulins
PVL	Panton-Valentine Leukozidin
rhDNase	rekombinante humane Deoxyribonuklease
SAK	Staphylokinase
<i>S. aureus</i>	Staphylococcus aureus
SCCmec	Staphylococcus cassette chromosome mec
SCV	Small colony variants
<i>S. maltophilia</i>	Stenotrophomonas maltophilia
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TSB	Tryptic-Soja-Bouillon
WGS	Whole-Genome-Sequencing
WTA	Wandtechoinsäure

1 Einleitung

1.1 Die zystische Fibrose

1.1.1 Genetik und Diagnostik

Die zystische Fibrose (CF) oder Mukoviszidose ist eine autosomale rezessive Erbkrankheit, die auf Mutationen im Gen des „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulators“ (CFTR), beruht. Das CFTR-Protein ist ein Chlorid-Kanal. Die bei CF-Patienten auftretenden Mutationen werden in fünf Klassen unterteilt: Die Klasse I beinhaltet alle Mutationen, die zur Störung der Proteinproduktion führen. Es sind unter anderem Nonsense Mutationen, breitere Deletionen oder Insertionen. Phe508del ist in Deutschland die häufigste Mutation (Nährlich L. (ed.), 2021) und gehört zur Klasse II. Sie ist für einen Defekt der Proteinprozessierung verantwortlich. Mutationen mit einem Defekt der Proteinregulation gehören zur Klasse III, mit einem Defekt der Leitfähigkeit des Kanals zur Klasse IV und mit einer erniedrigten Produktion von dem Kanal zur Klasse V. Es wurden mehr als 2000 Genvarianten beobachtet, nicht alle konnten klassifiziert werden (De Boeck et al., 2014b).

Der Trypsinogen-Test des Neugeborenenenscreeningstests kann einen ersten Hinweis auf eine CF geben. Andere diagnostische Hinweise einer Mukoviszidose sind Geschwister mit der Diagnose einer Mukoviszidose oder mindestens ein klinischer Hinweis auf Mukoviszidose. Für die Diagnose muss zusätzlich eine CFTR-Funktionsstörung nachgewiesen werden, d.h. erhöhte Schweißchloridwerte (≥ 60 mmol/l) oder der Nachweis zweier Mukoviszidose verursachenden CFTR-Mutationen oder der Nachweis einer Abnormalität der CFTR-Funktion mittels nasaler Potentialdifferenzmessung oder intestinaler Kurzschlussstrommessung (Nährlich, 2013).

1.1.2 Pathophysiologie der zystisch fibrotischen Lunge

Die Folgen von den CFTR-Mutationen für die Physiologie der Lungen wurden 2016 von Elborn et al. zusammengefasst. Der CFTR-Kanal ist nicht nur für den Austritt von Chlorid aus den Zellen wichtig, sondern lässt auch Bikarbonat durch. Eine Veränderung des Kanals kann damit den pH-Wert des Schleims erniedrigen (Pezzulo et al., 2012). Zusätzlich kommt es zur wechselseitigen Beeinflussung

Einleitung

von CFTR-Kanälen und verschiedenen Chlorid-Bikarbonat-Austauschern der SLC26 Familie, was die Konzentration von Bikarbonaten zusätzlich beeinträchtigt (Gray, 2004). Ein weiteres Ion spielt eine Rolle in der Pathophysiologie der CF-Lunge: die gestörte Wechselwirkung von CFTR-Kanälen und epithelialen Natriumkanälen (ENaC) kann zu einer veränderten Aktivität von ENaC und somit zur Hyperreabsorption von Natrium führen (Shei et al., 2018). Dieser Mechanismus ist verantwortlich für eine veränderte Zusammensetzung des Schleims. Die Hydratation des Schleims wird nicht gewährleistet, er wird visköser und die mukoziliäre Clearance wird damit beeinträchtigt, was zu chronischen Infektionen führen kann. Durch die erhöhte Anzahl von Pathogenen in den Atemwegen entsteht eine sekundäre Inflammation (Cantin et al., 2015).

Weitere Mechanismen beeinflussen die Kolonisation der Lunge mit Pathogenen und die folgende inflammatorische Antwort. Diese Mechanismen wurden von Cantin et al., 2015 erläutert. Einer dieser Prozesse ist die erniedrigte Sauerstoffkonzentration in dem dickflüssigen Schleim. Dies behindert den normalen Ablauf der antibakteriellen Abwehr und fördert das bakterielle Wachstum. Die Hypoxie führt zusätzlich zur Stabilisierung von HIF-1 (hypoxia inducible factor 1), was die Angiogenese, Inflammation und Fibrosen fördern kann. Niedrige pH-Werte können auch die Immunabwehr durch die Inaktivierung von antimikrobiellen Peptiden beeinflussen (Pezzulo et al., 2012). Wenn der Schleim saurer wird, kann im Gegenzug der pH-Wert intrazellulärer Organellen nicht genügend gesenkt werden (Barasch et al., 1991). Dies führt zu einer Akkumulation von Ceramiden in den Epithelzellen, was die inflammatorische Antwort, Zelltod und Infektionsanfälligkeit erhöht (Teichgräber et al., 2008).

Die sekundäre inflammatorische Antwort kann auch das Lungengewebe schädigen und zu Bronchiektasen führen. Die Neutrophilen sind die ersten Immunzellen, die bei einer Entzündung in die Lunge eintreten. Einerseits kämpfen sie gegen Pathogenen, andererseits schädigen sie das Gewebe durch die Freisetzung von Proteasen, insbesondere von Serinproteasen (Hartl et al., 2012, Le Gars et al., 2013).

Typische klinische Symptome der Mukoviszidose sind daher Obstruktion aufgrund des hyperviskösen Sputums und verminderter mukoziliärer Clearance,

sowie chronische respiratorische Infektionen und Bronchiektasen. Die daraus resultierende progrediente respiratorische Insuffizienz ist häufigste Todesursache von CF-Patienten (Nährlich L. (ed.), 2021).

Andere sezernierende Systeme, wie der gastrointestinale Trakt, der Pankreas oder das genitale System, sind auch von der CF betroffen, was zu unter anderem endokrine und exokrine Pankreasinsuffizienz oder Sterilität führen kann.

1.2 Therapiemöglichkeiten

Die Verschlechterung der Lungenfunktion und progrediente respiratorische Insuffizienz ist die häufigste Todesursache (Nährlich L. (ed.), 2021). Ich werde mich im Folgenden auf Therapien begrenzen, die den Verlauf dieser Insuffizienz positiv beeinflussen. Die Inhalation von rekombinanten humanen Deoxyribonukleasen (rhDNasen) kann die Viskosität vom Sputum vermindern und reduziert das Auftreten von Exazerbationen (Quan et al., 2001). Das Inhalieren hypertonischer Kochsalzlösung verflüssigt das Atemwegssekret, kann die Lungenfunktion verbessern und vermindert das Auftreten von Exazerbationen (Wark and McDonald, 2018). Die Inhalation von Mannitol wird nur als zweite Wahl bei Versagen der Therapie mit rhDNase und hypertonischer Kochsalzlösung genutzt (Nevitt et al., 2020). Die Inhalation von Salbutamol kann bei ausgewählten Patientengruppen die Lungenfunktion kurzfristig verbessern (Kieninger et al., 2022). Atemphysiotherapie und die regelmäßige Anwendung von Selbstreinigungstechniken helfen den Patienten den Mukus zu lösen (Warnock and Gates, 2023). Bewegung und sportliche Aktivität sollte auch bei den Patienten gefördert werden (Radtke et al., 2022). Niedrigdosiertes Azithromycin kann als antiinflammatorische Therapie, sogar vor einer ersten Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*, angewendet werden (Clement et al., 2006).

Frühe antibiotische Therapie ist wichtig bei pulmonalen Exazerbationen. Es ist zu beachten, dass sich die Pharmakokinetik bei CF-Patienten von Nicht-CF-Patienten unterscheidet, sodass die Dosierung angepasst werden muss, um eine suboptimale Konzentration in der Lunge zu verhindern (Magréault et al., 2021). Wichtig sind auch Präventionsmaßnahmen wie die jährliche Influenzaimpfung,

Einleitung

Pneumokokkenimpfung, oder Einhaltung von Hygienemaßnahmen (Lommatzsch, 2020).

Die Lungentransplantation ist eine therapeutische Option für geeignete Patienten. 2021 wurden neun Patienten in Deutschland Lungen transplantiert. 2020 waren es 27 (Nährlich L. (ed.), 2021). Welche Patienten sich für die Listung eignen, ist eine Entscheidung, die mit dem Patienten in spezialisierten CF-Zentren getroffen wird (Ramos et al., 2019).

2012 wurde Ivacaftor als erster CFTR-Modulator in Deutschland zugelassen. Es ist ein sogenannter Potentiator und aktiviert den vorhandenen jedoch fehlerhaften CFTR-Kanal. Der Salz-Wasser-Haushalt wird dadurch verbessert und es kommt zu weniger Organschäden (Ramsey et al., 2011). Es wird vor allem als Monotherapie bei Kindern vor dem zweiten Lebensjahr mit Gating-Mutationen (Klasse III) verwendet (Davies et al., 2021). Zusätzlich kommen Korrektoren bei älteren Kindern mit Phe508del-Mutation in Frage. Korrektoren wie Tezacaftor, Lumicaftor oder Elexacaftor helfen bei der Bildung des CFTR-Salzkanals. Sie werden als Zweifachkombination (Tezacaftor/Ivacaftor oder Lumicaftor/Ivacaftor) benutzt. Seit 2020 ist eine Triple-Therapie mit Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor ab einem Lebensalter von sechs Jahren und bei Vorhandensein von mindestens einer Ph508del-Mutation zugelassen (Southern et al., 2023).

1.3 Lungeninfektionen bei CF-Patienten

Die Lunge von CF-Patienten ist besonders anfällig für bakterielle Kolonisation und Infektion. Gemäß dem deutschen CF Register werden chronische Infektionen am häufigsten durch *Staphylococcus aureus* (50% aller Infektionen), *P. aeruginosa* (33% aller Infektionen), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xyloxidans* und *Burkholderia spp.* verursacht (Nährlich L. (ed.), 2021). *S. aureus* Infektionen treten vor allem bei Kindern und Jugendlichen auf, wohingegen *P. aeruginosa* Infektionen mit dem Alter häufiger werden (Registry, 2022). Es wurden bis zu 7,3% atypische Mykobakterien in untersuchten Sputen nachgewiesen (Nährlich L. (ed.), 2021).

Es gibt erste Hinweise, dass das mikrobiologische Umfeld von der Modulatortherapie beeinflusst wird. Die Triple-Therapie ELX/TEZ/IVA kann die

Dichte an *S. aureus* und *P. aeruginosa* in der Lunge von erwachsenen Patienten reduzieren (Pallenberg et al., 2022).

1.4 Staphylococcus aureus

1.4.1 Der Erreger

S. aureus sind grampositive, katalase- und coagulasepositive Kokken, die sich im Mikroskop als unregelmäßige Anhäufung beobachten lassen. Sie sind unbeweglich und bilden keine Sporen. Am besten wachsen sie bei Temperaturen zwischen 30°C und 37°C. Als fakultativ anaerobe Keime und Besitzer einer breiten pH-Toleranz besiedeln sie die Haut und die Schleimhäute des Oropharynx beim Menschen und Tieren.

Auf Blutagar-Nährmedien bilden sie meistens eine weiß bis gelblich glänzende Kolonie, die häufig von einer Hämolysezona umgeben sind. Für die gelbliche Farbe ist Staphyloxanthin verantwortlich, ein membrangebundenes Karotenoid, welches als Virulenzfaktor gilt (Clauditz et al., 2006).

Um in den Wirt einzudringen, Krankheiten auszulösen und das Immunsystem zu umgehen spielen Virulenzfaktoren eine große Rolle (Lowy, 1998). *S. aureus* besitzt eine breite Reihe von verschiedenen Virulenzfaktoren.

Zellwandverankerte Adhesine, wie zum Beispiel Fibronectinbindung Proteinen A und B (Fnbp A und B), Collagen Binding Protein, Verklumpungsfaktor (Clf) und das Protein A, erlauben die Anlagerung an Wirtsgewebe und initiieren die Kolonisierung. Der Verklumpungsfaktor bindet an Fibrinogen von eukaryontischem Gewebe. Das Protein A ist ebenfalls in der Zellwand verankert und bindet spezifisch an den Fc-Teil von IgG und wirkt dadurch antiphagozytotisch (Bien et al., 2011). Sowohl der Verklumpungsfaktor als auch das Protein A führen zur Agglutination mit Fibrinogen oder IgG, eine Reaktion, die für die Diagnostik von *S. aureus* genutzt wird (Wilkerson et al., 1997).

Exotoxine sind Virulenzfaktoren, die von dem Erreger sekretiert werden. Sie umfassen zum Beispiel Koagulase, hitzebeständige DNase, Hyaluronidase und Fibrinolysine. Zytolytische Exotoxine wie verschiedene Hämolsine, Leukozidine und Panton-Valentine Leukozidine (PVL) ermöglichen eine

Einleitung

Gewebeinvasion. β -Hämolyisin wird durch das Gen *hlyB* kodiert und ist durch eine durch Kälteinkubation verstärkte Hämolyse erkennbar. α -Hämolyisin wirkt besonders zytolytisch bei Monozyten und Thrombozyten (Menestrina et al., 2001) während γ -Hämolyisin bei Erythrozyten zytolytisch wirkt (Kaneko and Kamio, 2004).

Weitere spezifische Proteine erlauben *S. aureus* das Immunsystem zu umgehen. Beispielweise bindet die Staphylokinase SAK α -Defensine, um die bakteriziden Eigenschaften zu hemmen (Bokarewa et al., 2006). Die Synthese der verschiedenen Virulenzfaktoren wird durch verschiedene regulatorische Systeme wie z.B. Agr (accessory gene regulator), SarA (staphylococcal accessory regulator) oder SigB (Sigmafactor B) (Bien et al., 2011) gesteuert.

Das Agr System ist das am besten untersuchte Regulator System. Als „Quorum-sensing“ System kann es die Dichte der *S. aureus* Population erkennen. Es kontrolliert die Expression von mehreren Virulenzfaktoren wie α -, β - oder γ -Hämolyisin, Lipasen oder Phenol Soluble Modulins (PSM). Die Synthese von einigen Zellwand-gebundenen Proteinen wie Protein A, Koagulase oder FnbA und B wird jedoch durch Agr gehemmt (Bronner et al., 2004). Die Biofilm-Bildung wird ebenfalls durch Agr gehemmt (Vuong et al., 2000). Der agr Locus hat zwei divergente Transkripten RNAII und RNIII. RNAII ist ein Operon von vier Genen, agrBDCA, was für die Synthese von Autoinducing Peptide (AIP) zuständig ist und die regulatorische Kaskade aktiviert. RNIII ergibt eine regulatorische RNA-Moleküle, die als erster Effektor des Agr Systems extrazelluläre Virulenzfaktor hochreguliert und membrangebundene Proteine runterreguliert (Quave and Horswill, 2014).

Die Agr-Aktivität kann an dafür typischen Hämolyisine auf Blutagarplatte erkannt werden, da Stämme mit defektem Agr System Hämolyse-negativ sind. Das durch Agr kontrollierte Toxin δ -Hämoylsin sowie die PSMs sind allein nicht hämolytisch. Sie wirken jedoch synergistisch mit β -Hämolyisin.

1.4.2 *S. aureus* in der Bevölkerung

Obwohl *S. aureus* eine starke Pathopotenzt besitzt, gilt er als fakultativ pathogen. Er gilt als Kommensal auf der Haut und den Schleimhäuten. Am häufigsten wird

er bei Gesunden im Vestibulum nasi gefunden (Sivaraman et al., 2009). Drei Muster von *S. aureus* Kolonisation in der Nase werden beschrieben. 10 bis 30% der Bevölkerung trägt *S. aureus* permanent in der Nase, 10 bis 47% sind Nicht-Träger und der Rest ist intermittierender Träger (Sakr et al., 2018).

Mehrere *S. aureus* Gene sind wichtig für die Kolonisation. Der Clumping factor B (ClfB) und iron-regulated surface determinant A (IsdA) binden an verschiedenen Proteinen des Stratum corneum der Nase und ermöglichen die Kolonisation (Schaffer et al., 2006, Clarke et al., 2004). Weiterhin können *S. aureus* nicht nur die Nasenvorhöfe, sondern auch die Nasenhöhlen oder den Rachen besiedeln. Die Wandteichonsäure (WTA) scheint hier eine wichtige Rolle zu spielen (Kohler et al., 2009). Um das Immunsystem zu umgehen, kann *S. aureus* auch intrazellulär überleben (Clement et al., 2005, Hanssen et al., 2017).

Neben Faktoren, die von dem Erreger abhängig sind, ist die Kolonisation von dem Wirtszustand abhängig. Eine HIV-Infektion, Adipositas, Diabetes mit Dialyse, einige rheumatologische Erkrankung oder atopische Dermatitis sind Risikofaktoren für eine Kolonisation der Nase (Sakr et al., 2018). Neben Erkrankungen scheinen einige Polymorphismen in Genen wie HLA (Kinsman et al., 1983), Genen, die für Glukokortikoidrezeptoren, Interleukin-4, C-reactive Proteinen oder Complement inhibitor protein kodieren (Ruimy et al., 2010), eine Rolle zu spielen. Weitere Faktoren wie hormonelle Verhütung (Zanger et al., 2012) oder Hämoglobin in Nasensekretionen (Pynnonen et al., 2011) können den Trägerstatus ebenfalls beeinflussen. Auch CF-Patienten sind signifikant häufiger mit *S. aureus* im Nasenrachenraum besiedelt (Ridder-Schaphorn et al., 2007, Stone et al., 2009).

1.4.3 Antibiotikatherapie und Resistenzen bei *S. aureus*

1.4.3.1 Beta-Lactam-Antibiotika

70 bis 80% aller *S. aureus* Isolate besitzen eine β -Laktamase, ein Enzym, das Penicillin inaktiviert. Dazu besitzen einige Stämme das *mecA* Gen, welches zur Resistenz gegen penicillinasefesten Penicillin-Derivaten (z.B. Methillin) und Cephalosporinen führt. *MecA* kodiert für ein zusätzliches Penicillinbindeprotein PBP2a, das nur geringe Affinität für β -Laktamantibiotika zeigt. Das aktive

Einleitung

Zentrum dieser Proteine besitzt eine Struktur, die die Zugänglichkeit für β -Laktam Antibiotika verringert (Lim and Strynadka, 2002). Während sich das Gen für β -Laktamase auf einem Plasmid befindet, ist *mecA* auf einer mobilen, chromosomalen Geninsel (Staphylococcus cassette chromosome *mec*, SCC*mec*) lokalisiert. Daneben kann die Methicillinresistenz auch durch ein ebenfalls auf einer SCC*mec*-Insel lokalisiertes *mecC*-Gen verursacht werden. Das *mecC*-Genprodukt zeigt etwas andere biochemische Eigenschaften als PBP2, führt aber ebenfalls zur Methicillinresistenz (Kim et al., 2012).

Cephalosporinen, Carbapanemen, Monobactam und Clavamen erweitern die Klasse von β -Laktam Antibiotika (Walsh and Wencewicz, 2016). Nur die fünfte Generation von Cephalosporinen (u.a. Ceftaroline Fosamil und Ceftriaxol) zeigt eine hemmende Wirkung gegen PBP2a von MRSA (Stein and Johnson, 2011).

1.4.3.2 Gentamicin

Aminoglykosiden greifen an der 30S Untereinheit des Ribosoms an und verursachen eine so hohe Anzahl an Translationsfehler, dass es bakterizid wirkt (Walsh and Wencewicz, 2016). Viele verschiedene Aminoglykosid-modifizierende Enzyme verleihen Resistenzen gegenüber Gentamicin und Aminoglykosiden. Sie verändern die Struktur der Antibiotika und verhindern damit eine Bindung an das Ribosom (Ramirez and Tolmasky, 2010).

1.4.3.3 Erythromycin

Erythromycin ist ein Makrolid und greift an der 50S Untereinheit des Ribosoms, sodass die Proteinsynthese von Bakterien verhindert wird. Es wirkt daher bakteriostatisch (Wilson, 2014). Es wird häufig bei *S. aureus* Infektionen eingesetzt. Kommensale *Staphylokokken* sind dann ebenfalls dem Antibiotikum ausgesetzt und können Resistenzen entwickeln (Foster, 2017). Die Veränderung des Ribosoms durch 23S rRNA Methylasen verursacht die Resistenz gegenüber Erythromycin (Champney et al., 2003).

1.4.3.4 Clindamycin

Clindamycin gehört der Gruppe der Lincosamiden, welche ebenso an dem 50S Untereinheit greifen (Walsh and Wencewicz, 2016). Es spielt eine große Rolle

bei der Behandlung von MSSA Infektionen im Fall einer Penicillinallergie (Rayner and Munckhof, 2005).

1.4.3.5 Trimethoprim und Sulfamethoxazol

Trimethoprim und Sulfamethoxazol werden als Kombinationspräparat Cotrimoxazol benutzt. Beide Antibiotika verhindern die Synthese von Tetrahydrofolsäure. Trimethoprim hemmt die Dihydrofolatreduktase (DHFR) und Sulfomethoxazol die Dihydropteroatsynthase (DHPS), sodass beide Antibiotika zusammen eine synergetische bakterizide Wirkung haben. Mutationen, die zur Änderung der DHFR oder DHFS führen, verursachen Resistenzen gegen Trimethoprim oder Sulfamethoxazol (Foster, 2017).

1.4.3.6 Ciprofloxacin

Ciprofloxacin gehört der Gruppe 2 der Fluorchinolone und inhibiert die bakterielle DNA Gyrase sowie die Topoisomerase IV, sodass die DNA-Synthese der Bakterien verringert wird. Mutationen der Gene, die für die Topoisomerasenbildung zuständig sind, sowie eine erhöhte Expression der Effluxpumpe *NorA* fördern *S. aureus* Resistenzen gegen Ciprofloxacin (Hooper and Jacoby, 2015).

1.5 S. aureus bei CF-Patienten

1.5.1 Klinische Relevanz von S. aureus in der CF-Lunge

Bei Kindern und jungen Erwachsenen bis zum dreißigsten Lebensjahr ist *S. aureus* der häufigste Keim der CF-Lunge (Nährlich L. (ed.), 2021).

S. aureus kolonisiert ab den ersten Lebensjahren langfristig die Atemwege und persistiert häufig als ein einziger Klon (Kahl, 2010). Ob eine prophylaktische Antibiotikatherapie in den ersten Lebensjahren langfristig eine Verbesserung der Lungenfunktion, des BMIs, weniger Krankenhausaufenthalte oder weniger zukünftige Antibiotikatherapie verursacht, konnte nicht nachgewiesen werden (Rosenfeld et al., 2020). Eine MRSA-Infektion ist assoziiert mit einer schlechteren Lungenfunktion und schwererem Krankheitsverlauf (Ren et al., 2007), sowie mit einer erhöhten Mortalität (Dasenbrook et al., 2010). Eine vollständige MRSA Eradikation ist schwierig und es gibt Hinweise, dass die antibiotische Eradikation

die Kolonisation mit *P. aeruginosa* fördern kann, ohne dass eine Verbesserung der Lungenfunktion stattfindet (Chalmers and Wylam, 2020).

Welche Patienten mit chronischer *S. aureus* Lungenkolonisation ein erhöhtes Risiko für eine Verschlechterung der Lungenfunktion haben, wurde 2016 von Junge et al. untersucht. Höhere Bakteriendichte im Rachen, Exazerbation, erhöhte IL-6-Spiegel oder Koinfektion mit *S. maltophilia* sind Faktoren, die den Krankheitsverlauf verschlechtern (Junge et al., 2016).

Die Schwere der Krankheit wird zusätzlich von Koinfektion mit *P. aeruginosa* bestimmt. Patienten mit *S. aureus* und *P. aeruginosa* Infektion erleiden schwerere Exazerbationen und haben eine schlechtere Lungenfunktion (Hubert et al., 2013, Ahlgren et al., 2015).

1.5.2 Anpassung von *S. aureus* während der Infektion

Während chronischer Infektionen kommt es häufig zu Anpassungen der Pathogenen an die Infektionsbedingungen. Untersuchungen von Folgeisolaten zeigen, dass es insbesondere bei CF-Patienten zum Auftreten angepasster Stämme von *Pseudomonas*, *Burkholderia* und *S. aureus* kommt. Dabei verlieren die Bakterien häufig ihre Virulenz, werden resistent gegen Antibiotika oder zeigen bessere Fähigkeit zur Biofilmbildung und/oder intrazellulärem Überleben (Hogardt and Heesemann, 2010, Eberl and Tümmler, 2004, Goerke and Wolz, 2010). Für *S. aureus* wurden verschiedene Anpassungsmechanismen diskutiert (Goerke and Wolz, 2010, Hirschhausen et al., 2013b, Rumpf et al., 2021).

Small colony variants (SCV) werden häufig bei älteren Patienten mit erhöhten Antibiotikaexposition nachgewiesen (Besier et al., 2007). SCV sind vor allem assoziiert mit häufigerer Therapie mit Trimethoprim-Sulfamethoxazol (Kahl et al., 1998). Sie unterscheiden sich vom normalen *S. aureus* durch ihre kleinere Koloniegröße, weniger Pigmentation und weniger Hämolyse. Eine intrazelluläre Persistenz wurde in einer in vitro Studie gezeigt (Proctor et al., 2006). SCV sind weniger virulent als normale *S. aureus* (Kahl et al., 2005a), sind aber besser an die CF-Lunge angepasst (Kahl et al., 2003) und zeigen eine höhere Antibiotikaresistenz als normale *S. aureus* (Besier et al., 2007).

Einleitung

Es gibt mehrere Hinweise, dass die Virulenz/Toxizität der Stämme im Laufe der Infektion abnimmt (Goerke and Wolz, 2010, Lange et al., 2020). Um das Immunsystem zu entgehen, können *S. aureus* Biofilm als multizelluläre Anhäufung innerhalb des Mukus bilden (Goerke and Wolz, 2010). Die Bildung von Biofilm ist für *S. aureus* am Anfang der Kolonisation vom Vorteil, um der Phagozytose und antibiotische Therapie zu entgehen, während sie für die langzeitige Persistenz vom Nachteil sein kann, um sich in der Lunge auszubreiten (Hirschhausen et al., 2013a). Verschiedene Mutationen und Änderung der Genexpression, u.a. die Aktivierung des Agr Systems, verhindern die Bildung von Biofilm in der CF-Lunge (Schilcher and Horswill, 2020).

Der Umweltstress dem *S. aureus* in der CF-Lunge exponiert ist, führt auch zu erhöhten genetischen Änderungen und hoher phänotypischen Heterogenität (Goerke et al., 2007). Diese phänotypische Heterogenität kann zum Beispiel durch Unterschiede in der Hämolyse beobachtet werden (Mossop et al., 2023).

Die erhöhte Heterogenität kann unter anderem durch eine Kolonisation mit verschiedenen Stämmen erklärt werden. Ein Stamm prädominiert langfristig aber während der chronischen Infektion können zusätzliche Stämme die Lunge kolonisieren (Rumpf et al., 2021). Phagenmobilisation kann auch zu erhöhter genetischer Variation führen (Goerke et al., 2004). Phagen können zum Beispiel Resistenzgene übertragen und damit zur unterschiedlichen Resistenzlage führen, was die Schwierigkeiten der antibiotischen *S. aureus* Eradikation erklären könnte (Goerke et al., 2007). Durch „Whole-Genome-Sequencing“ (WGS) konnte gezeigt werden, dass eine Kolonisation mit unterschiedlichen Stämmen häufig mit unterschiedlichen Resistenzen einhergeht (Long et al., 2021, Schwerdt et al., 2018).

Hypermutatoren sind Stämme, die eine erhöhte Mutationsfrequenz zeigen und sich damit besser und schneller an die Infektionsbedingungen anpassen können. Mutationen der *mutS* oder *mutL* können zur Störung des „Mismatch-Repair-Systems“ führen und diesen Hypermutator Phänotyp erklären (Goerke and Wolz, 2010, Besier et al., 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass das Agr-System während Infektionen häufig mutiert und Agr defekte Stämme bei vielen Infektionen selektiert werden (Goerke et al., 2000a, Suligoy et al., 2018). Sie können häufig gleichzeitig mit Agr-positiven Stämmen in klinischen Proben auftreten (Goerke et al., 2007, Traber et al., 2008a). Die Entwicklung von Agr-Mutanten wird durch verschiedene Umweltbedingungen gefördert. Agr-negative *S. aureus* Stämme können auch durch Antibiotikatherapie mit Fluorchinolonen selektiert werden (Paulander et al., 2013, Schröder et al., 2013, Butterfield et al., 2011). Agr defekte Stämme können unter aeroben Bedingungen selektiert werden, die Agr-Aktivität wird jedoch durch Hypoxie gefördert (George et al., 2019).

1.6 Typisierung und Heterogenität von *S. aureus*

Die Typisierung von *S. aureus* hilft bei der Unterscheidung unterschiedlicher Stämme und kann zum Beispiel bei nosokomialen MRSA-Ausbrüchen helfen, epidemiologische Zusammenhänge aufzudecken. Um die Anpassung von *S. aureus* an der CF-Lunge zu verstehen, sind ebenfalls zuverlässige Typisierungsmethoden notwendig.

Über Jahre wurde die Typisierung durch die Pulsed-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) als Goldstandard für die genetische Typisierung von *S. aureus* angesehen (Neoh et al., 2019). Nach DNA-Restriktionsverdau mittels des Enzyms *SmaI* werden die DNA-Fragmente durch ein periodisches elektrisches Feld getrennt, sodass ein DNA-Fragmentprofil entsteht. Insertion, Exzision oder Umlagerung von genetischen Elementen wie Phagen oder Mec-Kassetten, sowie Mutationen in der *SmaI* Erkennungsstellen führen zu Änderungen des DNA-Fragmentprofils (Goerke et al., 2004). Bei mehr als drei Unterschieden im DNA-Fragmentmuster werden Isolate als nicht genetisch verwandt interpretiert.

Die *spa*-Typisierung ist eine PCR-basierte Methode zur genetischen Typisierung von *S. aureus* Isolaten (Harmsen et al., 2003). Nach Amplifikation und Sequenzierung der „Repeat“-Region des Protein-A-Gens wird die DNA-Sequenz zu einem Staphylokokkentyp der Ridom-StaphType Datenbank zugeordnet. Das *spa*-Gen besitzt eine hochvariable Region in der kleine DNA-Abschnitte (Repeats) in Reihe vorliegen. Heterogenität des *spa*-Typs kann durch Gewinn

oder Verlust der „Repeats“ oder Punktmutationen erklärt werden (Kahl et al., 2005b).

1.7 Fragestellung und Zielsetzung

Die spezielle Physiologie der Atemwege von CF-Patienten begünstigt die Besiedlung mit *S. aureus*. Es gibt Hinweise darauf, dass es während der oft jahrelangen Lungeninfektion zu einer Anpassung und Diversifizierung der *S. aureus* Population kommt. So können Mutationen und strukturellen Varianten auftreten, die als spezifische Anpassung an die CF-Lunge interpretiert werden können. Die Besiedlung mit unterschiedlichen Varianten/Stämme könnte die dauerhafte Besiedlung mit *S. aureus* begünstigen und dadurch die Therapie erschweren.

Bislang ist es unklar, ob sich verschiedene *S. aureus* Stämme durch konvergente Evolution an die Lunge anpassen, wie dies bei *P. aeruginosa* gezeigt wurde. Bemerkenswert ist, dass die meisten Studien, die sich mit der Evolution von Bakterien während einer Infektion befassen, mit einzelnen Isolaten pro Probe durchgeführt wurden.

Ziel dieser Arbeit ist die Diversität der *S. aureus* Population bei CF-Patienten und gesunden Probanden zu bestimmen. Durch herkömmliche Diagnostik wird jeweils nur ein *S. aureus* Isolat charakterisiert. Das Auftreten von Varianten wird dabei übersehen. In der vorliegenden Arbeit sollte das Sputum und die Nase von CF-Patienten hinsichtlich Variation der *S. aureus* Population untersucht werden. Als Kontrolle sollten Nasenabstriche von gesunden *S. aureus* positiven Probanden untersucht werden. Einzelne Kolonien der *S. aureus* positiven Proben wurden getrennt phänotypisch und genotypisch charakterisiert. Damit sollte getestet werden, inwieweit es in der CF-Lunge zu einer höheren Diversifikation und oder erhöhten Antibiotikaresistenz im Vergleich zu der asymptomatischen Nasenkolonisation kommt. Damit sollte geklärt werden, ob CF-Patienten mit mehreren Stämmen gleichzeitig besiedelt sein können und ob CF-Patienten in der Nase mit den gleichen Stämmen wie in der Lunge besiedelt sind.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborgeräte

2.1.1.1 Laborgeräte-Grundausstattung

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte, einschließlich Herstellerinformationen.

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Analysewaage	Sartorius	Göttingen
Autoklaven Modell 500-800	Memmert GmbH + Co.KG	Schwabach
Centrifuge 5430R	Eppendorf	Hamburg
Feinwaage	Sartorius	Göttingen
Heratherm™ Refrigerated Incubator	Thermo Scientific	Karlsruhe
Kolonie-Zähler	Schütt	Göttingen
Kühlschrank -20°C und 4°C	Liebherr	Bulle, Schweiz
Küvettenständer	Brand GmbH	Wertheim
Mikroliterpipetten	Eppendorf	Hamburg
Mikrowellengerät	ECG	Klíčany, Tschechien
pH-Meter	Mettler Toledo	Columbus, USA
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH	Everstadt
Photometer Ultrospect 2100 pro	Amersham Bioscience	Uppsala, Schwerden
Reaktionsgefäßständer	Brand GmbH	Wertheim
Sensi-Disc™ BD Dispenser	Beckton Dickinson	Spark, USA
Sterilarbeitsbank	Thermo Fischer Scientific	Langenselbold
Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg
Tiefkühlgerät V86-7201 (-80°C)	Ewald Innivationstechnik GmbH	Rodenberg
Vortexgeräte Genie 2™	Bender & Hobein AG	Zürich, Schweiz
Vortex Reax Top	Heidolph	Schwabach
Wasserbad	Multimed Biotechnologiekontor GmbH	Kirchheim unter Teck

2.1.1.2 Geräte für die PFGE

Tabelle 2: Verwendete Geräte für die PFGE, einschließlich Herstellerinformationen.

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Bio-Rad Gel Doc™ XR+	Bio-Rad GmbH	München
CHEF-DR™ II Driver Modul	Bio-Rad GmbH	Richmond, USA
CHEF-DR™ II Electrophoresis Cell	Bio-Rad GmbH	München
Electrophoretic Field Switcher Pulswave™ 760	Bio-Rad GmbH	Richmond, USA
Gusskammer	Bio-Rad GmbH	Richmond, USA
Model 1000 Mini Chiller	Bio-Rad GmbH	Richmond, USA
Power Supply Model 200/2.0	Bio-Rad GmbH	Richmond, USA
Variable Speed Pump	Bio-Rad GmbH	Richmond, USA

2.1.1.3 Geräte für die PCR

Tabelle 3: Verwendete Geräte für die PCR, einschließlich Herstellerinformationen.

Bezeichnung	Hersteller	Ort
EasyPhor Medi Gelelektrophorese Kammer, 15x10 cm	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf
EasyPhor Midi Gelelektrophorese Kammer, 10x7 cm	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf
EasyPhor medi Kamm 14 Zähne	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf
Electrophoresis Power Supply	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf
Mitsubishi P95 Digital monochrome printer	Mitsubishi Electric Corporation	Tokyo, Japan
PCR T3000-Thermocycler	Biometra GmbH	Göttingen
GelDoc	Bio-Rad GmbH	München

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien, einschließlich Herstellerinformationen.

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Bemis™ Parafilm™	Thermo Fisher Scientific	Neenah, USA
Blutagar(TSA mit Schafblut)- Platte	Thermo Fischer Scientific	München
eSWAB	Copan Diagnostics Inc.	Murrieta, USA
Impföse	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
Impföse	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
Kunststoffküvetten	Sarstedt	Nürnbrecht
Mikro-Schraubröhre 2 ml	Starstedt	Nürnbrecht
Nitril puderfreie Handschuhe	ABENA	Zörbig
5 ml Pipetten: Costar®	Merck	Darmstadt
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
Pipettenspitzen Safeseal 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Biozym Diagnostik GmbH	Hessisch Oldendorf
Petrischalen	Sarstedt	Nürnbrecht
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf AG	Hamburg
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf AG	Hamburg
TSA-Platte	Sarstedt Nährbodenküche	Nürnbrecht Mikrobiologie Tübingen
THERMANOX Deckgläser 13 mm	Plano GmbH	Wetzlar
15 ml Tubes	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
Zirkinia Glasperlen 0,1 mm	Carl Roth	Karlsruhe

2.1.3 Reagenzien und Reaktionskits

2.1.3.1 Chemikalien

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien, einschließlich Herstellerinformationen.

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Agarose - Low melting point - Seakem® LE (PFGE)	Bio-Rad BMA	München Rockland, USA
Nuclease freies Wasser	Life Technologies Corp.	Austin, USA
Blue Juice™ Gel-Ladepuffer	Thermo Fischer Scientific	Vilnius, Litauen
Borsäure	Merck	Darmstadt
Brij 58	Serva	Heidelberg
BSA	Roche	Mannheim
dNTPs	Roche	Mannheim
DTT	Thermo Fischer Scientific	Vilnius, Litauen
EDTA	AppliChem GmbH	Darmstadt
EGTA	AppliChem GmbH	Darmstadt
Ethidiumbromid	AppliChem GmbH	Darmstadt
Glycerol	AppliChem GmbH	Darmstadt
100 bp Längenmarker	Thermo Scientific	Vilnius
NaCl	Merck	Darmstadt
Na-Desoxycholat	AppliChem GmbH	Darmstadt
N-Laurylsarcosin	SIGMA	Steinheim
PBS	Serva	Heidelberg
Tris-HCl	Life-Technologies	Paisley, Schottland
Trizma Base	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Tryptone soja broth (TSB)	Oxoid, Thermo Fischer Scientific	Wesel
Staphaurex™ Latex- Agglutinationstest	Thermo Fischer Scientific	
Sybr Safe	Thermo Fischer Scientific	Carlsbad, USA

2.1.3.2 Verwendete Enzyme

Tabelle 6: Verwendete Enzyme, einschließlich Herstellerinformationen.

Bezeichnung	Hersteller	Ort
DNA Polymerase HotStar Taq	Qiagen	Hilden
Exo-SAP-IT™	Thermo Fischer Scientific	Vilnius, Litauen
Lysostaphin	Ambi	Towbridge, USA
Proteinase K	Merck	Darmstadt
Smal	Roche	Mannheim
Xmal	Roche	Mannheim

2.1.3.3 Verwendete Kontrollstämme

Tabelle 7: Verwendete Stämme für die PCR, PFGE und Cross-Streaks.

Name	Beschreibung	Referenz
RN4220	Restriction deficient derived from NCTC8325	AG Wolz
HG001	Wildtyp	AG Wolz

2.1.3.4 Verwendete Primers

Tabelle 8: Verwendete Primers für die Spa-PCR, einschließlich Herstellerinformationen.

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller	Ort
Spa1534	5'-CAGCAGTAGTGTTTGC-3'	Biomers.net GmbH	Ulm
Spa1096	5'-GACGATCCTTGTGAGC-3'	Biomers.net GmbH	Ulm

2.1.4 Anzuchtmedien, Puffer und Lösungen

Tabelle 9: Verwendete Puffer, Anzuchtmedien und Lösungen mit Zusammensetzung.

Medium, Puffer	Zusammensetzung	Konzentration	Menge in g
Einfriermedium	Glycerin	10 ml	
	TSB	30 ml	
Laufpuffer für PFGE	TBEx 10	85 ml	
	Aqua bidest	1615 ml	
Lysepuffer 500 mL (pH 7,6)	Tris (Trizma Base)	6 mM	0,36
	Na ₂ -EDTA (Titriplex III)	100 Mm	18,61
	NaCl	1 M	29,22
	Brij 58	0,5%	2,
	Na-Desoxycholat	0,2%	1
	N-Laurylsarcosin	0,5%	2,5
Proteolysepuffer 500 mL (pH 9,0)	Na ₂ -EDTA (TitriplexIII)	0,25 M	46,5
	EGTA	20 mM	3,8
	N-Laurylsarcosin	1%	5
TBE Puffer 10x	Borsäure	0,9 M	
	EDTA	0,01 M	
	Tris	1 M	
	Aqua		
TE Puffer 10x 500 mL (pH 8,0)	Na ₂ -EDTA (TitriplexIII)	10 mM	1,86
	Tris-HCl	100 mM	6,05
TSB 1L	TSB	30 g	
	Aqua	1 L	
Waschlösung 500 mL (pH 8,0)	Tris (Trizma Base)	10 mM	0,605
	Na ₂ -EDTA (TitriplexIII)	10 mM	1,861
	EGTA	10 mM	1,9
	NaCl	1 M	29,22

2.1.5 Antibiotika

Tabelle 10: Verwendete Antibiotikaresistenztestblättchen, einschließlich Herstellerinformationen.

Bezeichnung	Hersteller	Ort
BD BBL™ Sensi-Disc™ Cefoxitin 30 µg	Beckton Dickinson	Spark, USA
BD BBL™ Sensi-Disc™ Ciprofloxacin 5 µg	Beckton Dickinson	Spark, USA
BD BBL™ Sensi-Disc™ Clindamycin 2 µg	Beckton Dickinson	Spark, USA
BD BBL™ Sensi-Disc™ Erytromycin 15 µg	Beckton Dickinson	Spark, USA
BD BBL™ Sensi-Disc™ Fusidinsäure 10 µg	Beckton Dickinson	Spark, USA
BD BBL™ Sensi-Disc™ Gentamicin 10 µg	Beckton Dickinson	Spark, USA
BD BBL™ Sensi-Disc™ Mupirocin 200 µg	Beckton Dickinson	Spark, USA
BD BBL™ Sensi-Disc™ Rifampicin 15 µg	Beckton Dickinson	Spark, USA
BD BBL™ Sensi-Disc™ Sulfamethoxazol/Trimethoprim 23,75/1,25 µg	Beckton Dickinson	Spark, USA
BD BBL™ Sensi-Disc™ Tetracyclin 30 µg	Beckton Dickinson	Spark, USA
BD BBL™ Sensi-Disc™ Tigecyclin 15 µg	Beckton Dickinson	Spark, USA
BD BBL™ Sensi-Disc™ Vancomycin 30 µg	Beckton Dickinson	Spark, USA

2.1.6 Verwendete Softwares

Tabelle 11: Verwendete Softwares, einschließlich Herstellerinformationen.

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Image Lab 5.2.1	Bio-Rad GmbH	Hercules, USA
GraphPad PRISM	GraphPad Software, Inc.	Boston, USA
Ridom StaphType	Ridom GmbH	Münster
SPSS	IBM	Armonk, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Studiendesign

Wir führten eine prospektive Beobachtungsstudie im Zeitraum vom 06.12.2018 bis zum 27.02.2020 durch. Hierbei wurden zwölf CF-Patienten, welche eine langzeitige Kolonisation von *S. aureus* in der Lunge nachwiesen, sowie neun gesunde und immunkompetente Probanden rekrutiert. Es wurde bei jedem Probanden mindestens einen Nasenabstrich und bei jedem Patienten mindestens ein Nasenabstrich und eine Sputumprobe untersucht. Um die langzeitige Kolonisation von *S. aureus* bei gesunden Probanden nachzuweisen, wurde pro Probanden mindestens ein zusätzlicher Nasenabstrich als Verlaufskontrolle nach mindestens zwei Monaten untersucht. Wenn möglich, wurden auch bei jedem Patienten zusätzliche Verlaufskontrolle mit Abstand von mindestens zwei Monaten untersucht.

2.2.2 Ethikstatement

Die Ethikkommission stimmte am 05.11.2018 der Studie unter der Projektnummer 723/2018BO2 zu. Die Studie hielt die Richtlinien der Deklaration von Helsinki (2004) ein und alle Patienten, bzw. und Erziehungsberechtigte, und Probanden wurden über den Inhalt und den Ablauf der Studie informiert und unterschrieben einen Aufklärungsbogen.

2.2.3 Patientenpopulation

Die Patienten wurden mit Hilfe der zertifizierten Mukoviszidose-Ambulanz in Tübingen rekrutiert. Einschlusskriterien waren Besiedelung von *S. aureus* in der Lunge in der letzten mikrobiologischen Untersuchung, diagnostizierte Mukoviszidose mit mindestens zwei positiven Schweißtest-Ergebnissen

und/oder zwei nachgewiesenen CF-Mutationen, die Möglichkeit Sputumprobe zu sammeln, sowie die Einwilligung zur Studienteilnahme durch die Patienten selbst und/oder die Erziehungsberechtigte.

Bei den gesunden Probanden handelte es sich um Medizinstudierende oder Mitarbeiter des Instituts für medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Tübingen. Einschlusskriterien waren Volljährigkeit, keine bekannte Lungenerkrankung, kein bekannter Immundefekt, sowie die Einwilligung zur Studienteilnahme durch die Probanden selbst.

2.2.4 Sammlung von Proben

2.2.4.1 Sputum und Nasenabstriche von CF-Patienten

Zwölf CF-Patienten mit langzeitiger Kolonisation von *S. aureus* in der Lunge wurden untersucht.

Alle Sputa und Nasenabstrichen wurden ungekühlt von der CF-Ambulanz zur mikrobiologischen Untersuchung ins Institut für Mikrobiologie transportiert und dort routinemäßig untersucht. Nach erfolgter Untersuchung wurden die Sputa für den Zeitraum der Studie in einem Kühlraum bei -80°C bis zur Abholung aufbewahrt.

Sputa und Nasenabstrichen wurden bei -80°C gelagert, nachdem sichergestellt wurde, dass die Lagerung bei -80°C die weiteren Experimente nicht beeinflusste. Mindestens eine Sputumprobe und ein Nasenabstrich wurden für die Arbeit eingefroren. Bei sieben Patienten wurden zusätzliche Proben mit einem Zeitabstand von mindestens zwei Monaten entnommen. Bei fünf Patienten wurde eine dritte Probe nach mindestens zwei Monaten entnommen.

2.2.4.2 Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe wurden immunkompetente Medizinstudierende oder MitarbeiterInnen des Instituts für Mikrobiologie nach den oben genannten Kriterien rekrutiert. Es wurde neun gesunde Probanden eingeschlossen, bei denen mindestens zwei *S. aureus* positive Nasenabstrichen im Zeitabstand von mindestens zwei Monaten nachgewiesen wurden. Bei vier Probanden wurde ein dritter Nasenabstrich mit einem Zeitabstand von mindestens zwei Monaten durchgeführt.

Die Nasenabstriche wurden mit eSWAB von COPAN durchgeführt. Beide Nasenvorhöfe wurden ca. fünf Sekunden mit rotierender Bewegung abgestrichen. Die Watte wurde im Labor abgetrennt und in Einfrierlösung nach Vortexen bei -80°C eingefroren.

2.2.5 Verdünnungsreihen und Einfrieren von reinen Kolonien

Für die weitere Verarbeitung der Nasenabstriche wurden Verdünnungsreihen (1:10, 1:100, 1:1000) durchgeführt und jeweils 100 µl der Verdünnung, sowie die unverdünnte Probe, auf einer Blutagar-Platte ausplattiert. Nach 16-20 Stunden bei 37°C Inkubation wurden die koloniebildenden Einheiten pro Milliliter (KBE/ml) gezählt. Die *S. aureus* Kolonien wurden nach Form, Farbe, Größe und Hämolyseverhalten beurteilt und einzelne Kolonien wurden auf einer neuen Blutagar-Platte ausgestrichen. Mit Staphaurex™ Latex-Agglutinationstest wurde *S. aureus* bestätigt. Die positiven Kolonien wurden von den neuen Blutagar-Platten nach 16-20 Stunden Inkubation bei 37°C in 2 ml Cups mit Einfriermedium bei -80°C eingefroren. Die Proben wurden mit Patientennummern fortlaufend nummeriert.

Proben aus Sputa wurden mit einer Lösung aus DTT 0,1% homogenisiert (Endkonzentration von DTT 50 µg/ml) und mit PBS die Verdünnungsreihe durchgeführt (1:10, 1:100, 1:1000). Jeweils 100 µl der Verdünnung, sowie die unverdünnte Probe, wurden auf einer Blutplatte ausplattiert. Nach 16-20 Stunden bei 37°C Inkubation wurden die KBE/ml gezählt. Die *S. aureus* Kolonien wurden nach Form, Farbe, Größe und Hämolyseverhalten beurteilt und eine reine Kultur wurde auf einer neuen Blutagar-Platte ausplattiert. Mit Staphaurex™ Latex-Agglutinationstest wurde *S. aureus* bestätigt. Die positiven Kolonien wurden aus dem neuen Blutagar-Platte nach 16-20 Stunden bei 37°C Inkubation in 2ml Cups mit Einfriermedium bei -80°C eingefroren. Die Proben wurden mit Patienten- oder Probandennummern fortlaufend nummeriert.

2.2.6 spa-Typisierung

2.2.6.1 DNA-Isolierung

Mithilfe einer sterilen Öse wurden eingefrorenen Kolonien auf einer TSA-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation

Material und Methoden

wurden die Bakterien mit einer Öse in 1 mL TE suspendiert und für drei Minuten, 10 000 rpm, bei 4°C abzentrifugiert. Der Pellet wurde in 100 µl TE resuspendiert, mit 3 µL Lysostaphin (5mg/ml) für zehn bis zwanzig Minuten bei 37°C inkubiert. 400 µL Proteolysepuffer (von PFGE) und 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) wurden hinzugefügt und für eine Stunde bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Die Proteinase K wurde für zehn Minuten bei 95°C auf Heizblock inaktiviert. Die DNA-Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.2.6.2 Spa-PCR

Für die PCR wurden 2 µL der DNA-Proben mit DNase freiem Wasser 1:100 verdünnt. Die PCR-Reagenzien (außer dNTPs) des PCR Kits wurden bei -20°C gelagert. Es wurde NTP-Mix aus den entsprechenden NTPs Stammlösungen hergestellt: 10 µL ATP, 10 µl TTP, 10 µl CTP und 10 µl GTP mit 360 µl PCR-grade H₂O.

Ein 25 µL Ansatz von Mastermix wurde vorbereitet (s. Tabelle 12).

Tabelle 12: 25 µl Ansatz für Spa-PCR.

H ₂ O	16,25 µl
10x PCR-Buffer	2,5 µl
NTP	2 µl
MgCl ₂	1 µl
Spa 1534	1 µl
Spa 1096	1 µl
Taq (vom Eisblock)	0,25 µl
DNA	1 1 µl

Für die negative Kontrolle wurde H₂O benutzt, für die positive Kontrolle der *S. aureus* Wildtyp HG001 der AG Wolz. Im PCR-Gerät läuft die PCR mit dem Programm SpaPCR. Die PCR-Produkte wurden bei -20°C eingefroren.

2.2.6.3 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde ein Gel für 14 Proben vorbereitet: 50 µl von TAE 1x Puffer mit 1% Agarose wurde in der Mikrowelle erwärmt und homogenisiert. 5 µl von Sybr Safe wurde nach Abkühlung hinzugefügt. Das Gel wurde in einer

kleinen Kammer für Gelelektrophorese gegossen und die Luftblase wurden entfernt. Das Gel wurde mit einem Zellstoff abgedeckt und für dreißig Minuten stehen gelassen. In der ersten und letzten Tasche vom Gel wurde 5 µl von 100 bp Längenmarker pipettiert. 5 µl von PCR-Produkten wurden mit 3 µl Blue juice gemischt und in den Taschen pipettiert. Das Gel wurde mit 90 V und 400 mA für 36 Minuten laufen gelassen.

2.2.6.4 Enzymatische Aufreinigung mit ExoSAP-IT™

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierung wurde 5 µl vom PCR-Produkt mit 2 µl von ExoSAP-IT™ gemischt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Durch 15 Minuten Inkubation bei 80°C wurde ExoSAP-IT™ inaktiviert. Die aufgereinigten PCR-Produkten wurden bei -20°C bis zur Sequenzierung gelagert.

Die Sequenzierung wurde von 4base lab AG durchgeführt und mittels StaphType von Ridom ausgewertet.

2.2.7 PFGE und Bestimmungen von Varianten

2.2.7.1 DNA-Isolierung

Mithilfe einer sterilen Öse wurden eingefrorene Kolonien auf einer Blutagar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von der Platte wurden Bakterien mit einer Öse in TSB suspendiert und die OD₆₀₀ bestimmt. Eine Bakterienmenge entsprechend einer OD₆₀₀ = 0,5 wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und drei Minuten bei 4°C mit 1000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl Waschlösung gewaschen, resuspendiert und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 90 µl Waschlösung resuspendiert und auf 55°C im Heizblock erwärmt. 2%-LMP-Agarose wurde bei 100°C aufgeschmolzen und auf 55°C im Heizblock abgekühlt. 100 µl Lmp-Agarose wurde zu 100 µl Bakteriensuspension gegeben und gemischt. Die Mischung wurde in Gusskammern pipettiert und dreißig Minuten in Kühlschrank (4°C) stehen gelassen.

In 2 ml Eppendorf-Cups wurde 1 ml Lysepuffer für PFGE mit 5 µl Lysostaphin (10 mg/ml) gemischt. Die abgekühlten Agaroseblöckchen wurden mit einem Spatel in den Cups überführt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Material und Methoden

Der Lysepuffer wurde abgezogen und durch 1 ml Proteolysepuffer mit 50 µl Proteinase K (10 mg/ml) ersetzt und für 5,5 Stunden im Wasserbad (55°C) erwärmt. Der Puffer wurde abgezogen und erneut durch 1 ml Proteolysepuffer mit 50 µl Proteinase K ersetzt und über Nacht im Wasserbad bei 55°C inkubiert. Der Proteolysepuffer wurde abgezogen und 5x mit 1 ml TE, pH 8,0 bei 4°C eine bis zwei Stunden gewaschen. Die Agaroseblöckchen wurden in 1x TE bei 4°C aufbewahrt.

2.2.7.2 Restriktionsverdau

100 µl der Probe wurde auf einer sterilen Petrischale mit einem Deckgläschen nach Vorlage abgeschnitten. Ein Ansatz wurde für den Restriktionsverdau vorbereitet (s. Tabelle 13).

Tabelle 13: 200 µl Ansatz für den Restriktionsverdau.

DNA freies Wasser	79 µl
10x TBE	20 µl
<i>Sma</i> I	1 µ
BSA (20 mg/ml)	1 µ
DNA-Gelprobe	100 µl

Der Ansatz wurde 30°C im Heizblock über Nacht, bzw. mindestens zwei Stunden erwärmt. Als Referenzstamm wurde HG001 verwendet. Der Restriktionsverdau wurde vor Elektrophorese durch Zugabe von 500 µl 1x TBE gestoppt.

In einigen Fällen wurden die Proben mit dem Restriktionsenzym *Xma*I statt *Sma*I verdaut.

2.2.7.3 Elektrophorese des Makrorestriktionsverdaus

Ein Gel mit 1% Agarose wurde mit 1,8 g Seakem Agarose, 171 ml Wasser und 9 ml 10x TBE in der Mikrowelle aufgekocht und auf 50° im Wasserbad abgekühlt. Die verdauten Proben wurden mit Hilfe von Spateln auf die Vorderseite des Kammes aufgebracht. Die Gelrahmen wurden zusammengeschraubt und der beladene Kamm eingesetzt. Die abgekühlte Agarose wurde vorsichtig eingegossen und ca. dreißig Minuten ausgehärtet. Während der Kamm herausgezogen wurde, blieben die Proben in den Taschen haften.

Währenddessen wurde der PFGE-Elektrophoresekammer mit zwei Litern destilliertem Wasser gespült (großes Modul an und Pumpe an). Der Laufpuffer wurde mit 85 ml 10x TBE und 1615 ml Aqua hergestellt. Das destillierte Wasser wurde durch den Puffer ersetzt und die Kühlung auf 12°C eingeschaltet. Das abgekühlte Gel wurde in Elektrophorese-Kammer gegeben.

Die Laufbedingungen der PFGE wurden wie in Tabelle 14 eingestellt.

Tabelle 14: Laufbedingungen der PFGE.

Pulsewave	Spannungsquelle
Initial time: 5 s	200 V
Final time:15 s	Timer: 23 h
Run time:10 h	Mode 11
Mode 10	
Initial time: 15 s	
Final time:60 s	
Run time:13 h	
Mode 0	

2.2.7.4 Färbung mit Ethidiumbromid

Das Agarosegel wurde in spezielle Färbewanne gegeben und die Färbelösung mit Ethidiumbromid in 0,5x TBE zugegeben und dreißig Minuten inkubiert. Die Färbelösung wurde in die Flasche zurückgegossen, da sie mehrfach verwendbar war. Mit destilliertem Wasser wurde das Gel zehn Minuten entfärbt und anschließend fotografiert.

2.2.8 Bestimmung der Agr-Aktivität

Auf einer Blutagar-Platte wurde der *S. aureus* Stamm RN4220 in der Mitte ausgestrichen. Senkrecht davon wurden vier gesammelte Stämme und HG001 als Kontrolle ausgestrichen. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Hämolyse und Agr-Aktivität wurden am darauffolgenden Tag beurteilt.

2.2.9 Resistenzbestimmung mit Agardiffusionstest

Eine Kolonie wurde in 2 ml NaCl 0,9% resuspendiert, homogenisiert und auf eine $OD_{600} = 0,1$ eingestellt. Mit Wattestäbchen wurden die Bakterien aus dem

Material und Methoden

Röhrchen in drei Richtungen auf einer Agar-Platte ausplattiert. Antibiotika-getränkte Plättchen wurden auf die Platte gestempelt. Die Platte wurde für 16-20 Stunden bei 37°C inkubiert. Die untersuchten Antibiotika und deren Grenzwerte für Sensibilität werden in Tabelle 12 dargestellt. Die Clindamycin und Erythromycin-Plättchen wurden nebeneinandergelegt, sodass eventuelle induzierte Resistenz gegen Clindamycin detektiert wird. Nach Inkubation wurde die Größe des Hemmhofs für jedes Antibiotikum gemessen und nach EUCAST Leitlinien die Resistenz bestimmt.

Tabelle 15: Grenzwerte für Sensibilität nach EUCAST 2023.

Antibiotikum	Resistent	Sensibel
Cefoxitin 30 µg	< 22 mm	≥ 22 mm
Ciprofloxacin 5 µg	< 21 mm	≥ 50 mm
Clindamycin 2 µg	< 22 mm	≥ 22 mm
Erythromycin 15 µg	< 21 mm	≥ 21 mm
Fusidinsäure 10 µg	< 24 mm	≥ 24 mm
Gentamicin 10 µg	< 18 mm	≥ 18 mm
Mupirocin 200 µg	< 18 mm	≥ 30 mm
Rifampicin 15 µg	< 26 mm	≥ 26 mm
Sulfamethoxazol/Trimethoprim 23,75/1,25 µg	< 14 mm	≥ 17 mm
Tetracyclin 30 µg	< 22 mm	≥ 22 mm
Tigecyclin 15 µg	< 19 mm	≥ 19 mm
Vancomycin 30 µg		
Sulfamethoxazol/Trimethoprim 23,75/1,25 µg	< 14 mm	≥ 17 mm

2.3 Erfassung von Patientendaten

Folgende Daten wurden pro Patienten mit Hilfe der Mukoviszidose-Ambulanz des Universitätsklinikums Tübingen erfasst: Geschlecht, Mutation, Bakteriennachweise der letzten Sputumuntersuchungen, Body Mass Index (BMI) mit und ohne Perzentile, Größe und Gewicht mit und ohne Perzentile, forcierte Einsekundenkapazität (FEV1) mit und ohne Vorhersagewert (%), forcierte Vitalkapazität (FVC) mit und ohne Vorhersagewert (%), Antibiotikatherapie

(soweit erfassbar) und Modulatortherapie. Der Lung Clearance Index (LCI-Wert) war nur für einige Patienten verfügbar.

2.4 Statistische Analyse

2.4.1 KBE-Analyse

Die KBE/ml folgt keine Gauß-Verteilung. Für die Analyse wurde die logarithmische Funktion von KBE benutzt.

Es sollte herausgefunden werden, ob der Anzahl an KBE/ml sich in der Nase von gesunden Probanden, im CF-Sputum und in der Nase von CF-Patienten sich unterscheidet.

Dafür wurden drei t-Tests für Mittelwertgleichheit durchgeführt (logKBE/ml in der Nase von gesunden Probanden vs. logKBE/ml im CF-Sputum, logKBE/ml in der Nase von gesunden Probanden vs. Nase von CF-Patienten). Um die Mittelwertgleichheit von logKBE/ml in der Nase von CF-Patienten und im Sputum zu vergleichen, wurde ein t-Test für gepaarte Stichproben benutzt.

Es wurden jeweils die ersten Proben von Patienten und gesunden Probanden untersucht. Die zweiten und dritten Proben wurden mit weiteren t-Tests getrennt untersucht.

Da mehrere t-Tests zum Vergleich durchgeführt wurden, wurde die Bonferroni Korrektur benutzt, um eine Alpha-Kumulierung-Fehler entgegenzuwirken.

2.4.2 Phänotypische Diversität

Es sollte herausgefunden werden, ob die phänotypische Diversität (auf einer Platte unterschiedlich aussehende Kolonien von einer Probe) abhängig von Ursprung der Probe ist.

Dafür wurde der exakte Test nach Fischer-Freeman-Halton drei Mal benutzt. Es wurden die ersten Proben zusammen verglichen. Die Proben, die an einem zweiten Zeitpunkt abgenommen wurden, wurden miteinander verglichen, sowie die Proben, die an einem dritten Zeitpunkt abgenommen wurden.

2.4.3 Genetische Diversität

2.4.3.1 spa-Typisierung

Es sollte herausgefunden werden, ob die genetische Diversität des *spa*-Typs abhängig von Ursprung der Probe ist. Der *spa*-Typ von mindestens fünf Kolonien einer Probe wurde untersucht.

Dafür wurde der exakte Test nach Fischer-Freeman-Halton drei Mal benutzt. Es wurden die ersten Proben miteinander verglichen. Die Proben, die an einem zweiten Zeitpunkt abgenommen wurden, wurden miteinander verglichen, sowie die Proben, die an einem dritten Zeitpunkt abgenommen wurden.

2.4.3.2 PFGE-Typisierung

Es sollte herausgefunden werden, ob die genetische Diversität des DNA-Fragmentprofils abhängig von Ursprung der Probe ist. Der DNA-Fragmentprofil von mindestens fünf Kolonien einer Probe wurde untersucht.

Dafür wurde der exakte Test nach Fischer-Freeman-Halton drei Mal benutzt. Es wurden die ersten Proben miteinander verglichen. Die Proben, die an einem zweiten Zeitpunkt abgenommen wurden, wurden miteinander verglichen, sowie die Proben, die an einem dritten Zeitpunkt abgenommen wurden.

2.4.4 Diversität der Agr-Aktivität

Es sollte herausgefunden werden, ob die Diversität der Agr-Aktivität abhängig von Ursprung der Probe ist. Die Agr-Aktivität von mindestens fünf Kolonien einer Probe wurde auf eine Blutagar-Platte untersucht. Für jede Probe wurde die Agr-Aktivität bestimmt und kategorisiert: alle Kolonien negativ, alle Kolonien positiv, oder Kolonien sowohl negativ und positiv.

Der exakte Test nach Fischer-Freeman-Halton wurde drei Mal benutzt. Es wurden die ersten Proben miteinander verglichen. Die Proben, die an einem zweiten Zeitpunkt abgenommen wurden, wurden miteinander verglichen, sowie die Proben, die an einem dritten Zeitpunkt abgenommen wurden.

2.4.5 Antibiotikaresistenzen

Es sollte herausgefunden werden, ob die Antibiotikaresistenzen von zwölf verschiedenen Antibiotika sowohl in der Lunge als auch in der Nase gleich sind. Dafür wurde der exakte Test nach Fisher für Antibiotika benutzt. Es wurden die

Material und Methoden

ersten Proben miteinander verglichen. Die Proben, die an einem zweiten Zeitpunkt abgenommen wurden, wurden miteinander verglichen, sowie die Proben, die an einem dritten Zeitpunkt abgenommen wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Studiendesign.

In die Studie wurden zwölf CF-Patienten mit bekannter *S. aureus* Lungenbesiedlung eingeschlossen. Von den Patienten wurden sowohl Sputa als auch Nasenabstriche auf *S. aureus* untersucht (s. Tabelle 16). Bei sieben Patienten wurde die Untersuchung nach mindestens zwei Monaten wiederholt. Eine dritte Sputumprobe wurde bei fünf Patienten nach weiteren zwei Monaten entnommen. Neun gesunde *S. aureus* positive Probanden wurden in die Studie eingeschlossen und nach zwei Monaten eine Folgeuntersuchung durchgeführt. Bei drei Probanden wurde ein dritter Abstrich nach weiteren zwei Monaten untersucht (s. Tabelle 16).

Tabelle 16: Untersuchte Sputen und Nasenabstriche bei CF-Patienten und gesunden Probanden.

Patient/Proband ¹	1. <i>S. aureus</i> Isolation		2. <i>S. aureus</i> Isolation		3. <i>S. aureus</i> Isolation	
	Proben ²	Isolaten ³	Proben	Isolaten	Proben	Isolaten
Patient 1	CF1-N1	5	x ⁴	x	x	x
	CF1-S1	8	x	x	x	x
Patient 2	CF2-N1	5	x	x	x	x
	CF2-S1	5	CF2-S2	5	CF2-S3	5
Patient 3	CF3-N1	5	x	x	x	x
	CF3-S1	9	CF3-S2	5	x	x
Patient 4	CF4-N1	5	CF4-N2	Negativ ⁵	x	x
	CF4-S1	10	CF4-S2	5	CF4-S3	5
Patient 5	CF5-N1	Negativ	x	x	x	x
	CF5-S1	6	x	x	x	x
Patient 6	CF6-N1	5	x	x	x	x
	CF6-S1	7	CF6-S2	6	x	x
Patient 7	CF7-N1	5	CF2-N2	5	x	x
	CF7-S1	9	CF2-S2	7	CF7-S3	5
Patient 8	CF8-N1	Negativ	CF8-N2	5	x	x
	CF8-S1	6	CF8-S2	5	CF8-S3	5
Patient 9 ⁶	CF9-N1	Negativ	x	x	x	x
	CF9-S1	6	CF9-S2	7	CF9-S3	6
Patient 10	CF10-N1	5	x	x	x	x
	CF10-S1	8	x	x	x	x

Ergebnisse

Patient 11	<i>CF11-S1</i>	7	x	x	x	x
Patient 12	<i>CF12-S2</i>	8	x	x	x	x
Proband 1	<i>K1-N1</i>	5	<i>K1-N2</i>	5	<i>K1-N3</i>	5
Proband 2	<i>K2-N1</i>	5	<i>K2-N2</i>	5	x	x
Proband 3	<i>K3-N1</i>	5	<i>K3-N2</i>	5	x	x
Proband 4	<i>K4-N1</i>	5	<i>K4-N2</i>	5	<i>K4-N3</i>	5
Proband 5	<i>K5-N1</i>	5	<i>K5-N2</i>	5	<i>K5-N3</i>	5
Proband 6	<i>K6-N1</i>	5	<i>K6-N2</i>	5	x	x
Proband 7	<i>K7-N1</i>	5	<i>K7-N2</i>	5	x	x
Proband 8	<i>K8-N1</i>	5	<i>K8-N2</i>	5	x	x
Proband 9	<i>K9-N1</i>	5	<i>K9-N2</i>	5	x	x

1: Die Patienten- und Probandendaten wurden bei Probeentnahme anonymisiert.

2: *S. aureus* Isolate wurden entsprechend der Patienten/Probandennummer und Probenahme bezeichnet. „CF“ steht für Cystic Fibrosis und somit als Kennzeichen für die Patientengruppe, „K“ für die Kontrollgruppe. „N“ steht für Probenahme aus der Nase und „S“ aus Sputum.

3: Anzahl an untersuchten Isolaten

4: Keine Probenahme

5: Kein *S. aureus* Nachweis

6: Zwei weitere Sputa wurden bei Patienten 9 untersucht und kein *S. aureus* wurde nachgewiesen

Bei allen Patienten zeigte sich mindestens eine Sputumprobe als *S. aureus* positiv. Alle Proben wurden quantitativ auf *S. aureus* untersucht. Hierzu wurden serielle Verdünnungen der Proben durchgeführt. *S. aureus* Kolonien wurden durch Staphaurex™ Latex-Agglutinationstest identifiziert. Es wurden pro Probe mindestens fünf Kolonien isoliert und für weitere Untersuchungen eingefroren. Es wurden insbesondere *S. aureus* Kolonien mit auffallend unterschiedlichem Phänotyp (Hämolyse, Farbe, Größe) isoliert. Wenn die Kolonien phänotypisch nicht unterschiedlich waren, wurden fünf Kolonien zufällig ausgesucht. Alle *S. aureus* Isolate wurden auf phänotypische und genetische Diversität, Antibiotikaresistenzen und Agr-Aktivität untersucht.

Von allen Patienten wurden folgende klinische Daten erhoben: Body Mass Index, Ergebnisse der Lungenfunktionsuntersuchung, Vorbehandlung mit Antibiotika, Modulatortherapie, Begleitflora im Sputum. (s. Anhang Tabelle 21 bis 25)

Die Begleitflora im Sputum wurde durch das Diagnostische Labor der Medizinische Mikrobiologie dokumentiert und präsentierte sich als sehr

heterogen (*Candida specien*, *Aspergillus fumigatus*, β -hämolyisierende *Streptokokken*, *Haemophilus influenzae*, *Achromobacter xylosoxidans* und *dentrificans*, *Escherescia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*). Nur in einer Sputumprobe von Patient 2 wurde *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen.

3.2 Persistierende Besiedlung mit *S. aureus* bei CF-Patienten

Alle Patienten hatten vor der ersten Probenahme mindestens eine Sputumprobe, in der *S. aureus* vom mikrobiologischen Institut des Universitätsklinikums Tübingen nachgewiesen wurde. Somit hatten alle Patienten mindestens zwei Sputumproben mit *S. aureus* Nachweis. Bei einem Patienten wurde im Verlauf kein *S. aureus* im Sputum nachgewiesen. Bei zwei von zehn Patienten wurde in der Nase kein *S. aureus* nachgewiesen. Patient 8 hatte bei der ersten Untersuchung kein *S. aureus* im Nasenabstrich, in der Folgeprobe war aber *S. aureus* nachweisbar. Bei Patienten 4 zeigte sich nur im ersten Nasenabstrich eine *S. aureus* Besiedlung.

Somit zeigte sich bei den meisten Patienten (8/10) zumindest im Rahmen einer Probenahme eine *S. aureus* Besiedlung in der Nase. Vorrübergehend war jedoch bei einigen Patienten der Nasenabstrich negativ.

3.3 *S. aureus* Dichte in Sputum und Nasenabstrichen

Die *S. aureus* Dichte der einzelnen Proben wurde durch Bestimmung der KBE/ml ermittelt. Der Mittelwert der *S. aureus* Dichte über alle Proben war nicht normalverteilt. Für die Analyse wurde daher im Folgenden die logarithmische Funktion von KBE/ml verwendet.

Abbildung 1 zeigt, dass die Bakteriendichte in Sputumproben signifikant höher als in Nasenabstrichen von Patienten oder gesunden Probanden war. Im Sputum wurden zwischen 3×10^3 und $9,225 \times 10^8$ Bakterien/ml (Median $5,1 \times 10^6$) nachgewiesen. In Nasenabstrichen der Patienten wurden zwischen 80 und 25×10^3 Bakterien/ml (Median $2,3 \times 10^3$ /ml) nachgewiesen. In Nasenabstrichen der gesunden Probanden wurden zwischen 60 und $5,3 \times 10^5$ Bakterien/ml (Median $11,2 \times 10^3$ /ml) nachgewiesen. Die Bakteriendichte in Nasenabstrichen von Patienten und gesunden Probanden zeigte keinen signifikanten Unterschied.

Ergebnisse

Eine Zusammenfassung der Tests auf Mittelwertsgleichheiten von $\log(\text{KBE/ml})$ findet sich im Anhang (s. Tabelle 26).

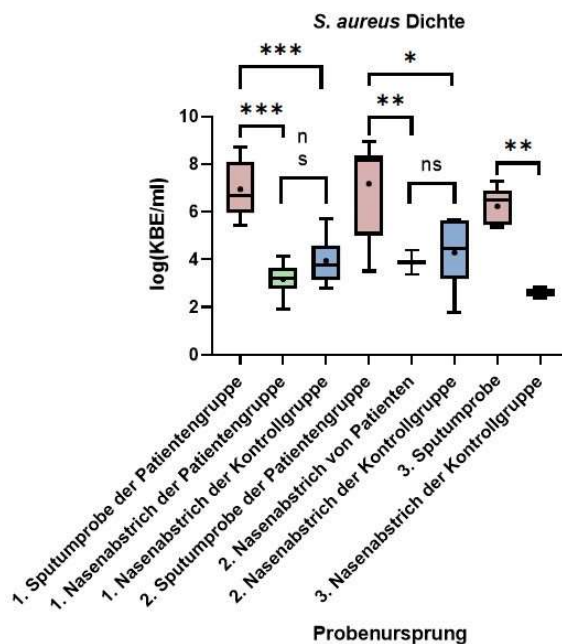


Abbildung 1: *S. aureus* Dichte in Sputa und Nasenabstrichen

Die Keimzahl/ml wurde durch serielle Verdünnungen der Proben und Anzucht auf Blutagarplatten ermittelt. Es wurde der t-test bei abhängigen und unabhängigen Proben und die Bonferroni-Korrektur angewendet. *: $p < 0,05$ **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.4 Einfluss von der Modulatortherapie auf Krankheitsverlauf und *S. aureus* Keimzahl

In einigen Studien wurde gezeigt, dass die Modulatortherapie einen positiven Einfluss auf die Lungeninfektion von CF-Patienten hat. Drei der Patienten erhielten während des Untersuchungszeitraums eine solche Therapie. Alle Patienten waren *S. aureus* positiv. Im Weiteren wurde untersucht, inwieweit die Therapie eventuell zu einer geringeren *S. aureus* Dichte führt.

In den 18 untersuchten Sputen von Patienten, die nicht mit Tezacaftor/Ivacaftor behandelt waren, wurden zwischen $3,2 \times 10^3$ und $5,18 \times 10^8$ Bakterien/ml (Median $3,475 \times 10^6$) nachgewiesen ($\log(\text{KBE/ml})$ zwischen 3,51 und 8,71, Median 6,54). In den sechs untersuchten Sputumproben von Patienten, die eine Behandlung mit Tezacaftor/Ivacaftor bekommen hatten, wurden zwischen $2,225 \times 10^5$ und $9,225 \times 10^8$ Bakterien/ml (Median $1,325 \times 10^8$) nachgewiesen ($\log(\text{KBE/ml})$

Ergebnisse

zwischen 5,35 und 8,96, Median 8) (s. Abbildung 2). Es war kein signifikanter Einfluss der Therapie auf die Bakteriendichte nachweisbar.

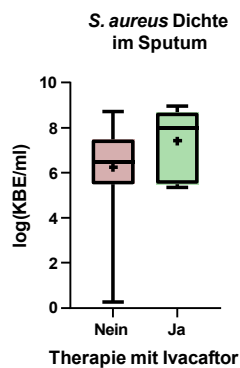


Abbildung 2: Korrelation zwischen *S. aureus* Dichte im Sputum und Modulatortherapie.

Die Analyse von klinischen Parametern konnte bestätigen, dass die Modulatortherapie den Krankheitsverlauf positiv beeinflusst. Die Abbildungen 3, 4 und 5 zeigen die Korrelation zwischen der Therapie mit Ivacaftor und den untersuchten klinischen Parameter (BMI, FVC und FEV1).

Der BMI bei Patienten mit Modulatortherapie war zwischen 38 und 77% (Median 73), wobei es bei Patienten ohne Modulatortherapie zwischen 1 und 59% (Median 36) war. Dieser Unterschied war signifikant ($p = 0,028$) (s. Abbildung 3). Die Lungenfunktion (FEV1 und FVC) war besser bei Patienten, die eine Therapie mit Tezacaftor/Ivacaftor bekommen haben. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (s. Abbildung 4 und 5).

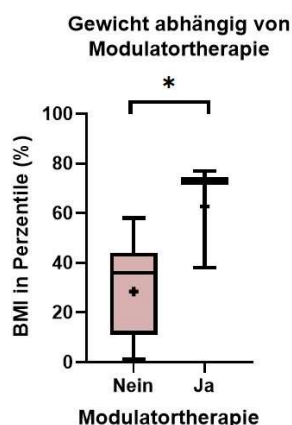


Abbildung 3: Korrelation zwischen BMI und Modulatortherapie.

* signifikant ($p < 0,05$). Es wurde der t-test bei unabhängigen Proben angewendet.

Ergebnisse

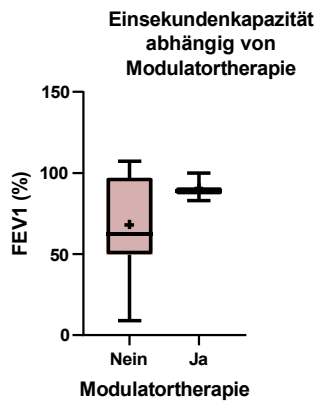


Abbildung 4: Korrelation zwischen FEV1 und Modulatortherapie.

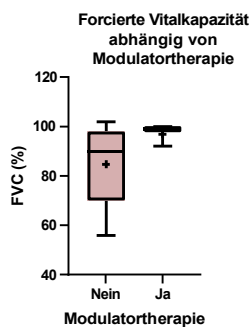


Abbildung 5: Korrelation zwischen FVC und Modulatortherapie.

3.5 Einfluss der Antibiotikatherapie auf *S. aureus* Keimzahl

Acht Patienten bekamen während der Studie oder kurz vor der Studie (bis ein Jahr vor der ersten Probenahme) eine Antibiotikatherapie. Ciprofloxacin wurde bei drei Patienten als Antibiotikum verwendet. Die Bakteriendichte aller Probenahmen von Patienten, die nicht mit Ciprofloxacin behandelt wurden, zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den Proben der Patienten, welche Ciprofloxacin erhielten.

In den 17 untersuchten Sputen von Patienten, die nicht mit Ciprofloxacin behandelt wurden, wurden zwischen $3,2 \times 10^3$ und $9,225 \times 10^8$ Bakterien/ml (Median $1,9 \times 10^7$) nachgewiesen (log(KBE/ml) zwischen 3,51 und 8,96, Median 7,28). In den sieben untersuchten Sputa von Patienten, die mit Ciprofloxacin behandelt wurden, wurden zwischen 10^5 und $3,86 \times 10^8$ Bakterien/ml (Median $9,8 \times 10^5$) nachgewiesen (log(KBE/ml) zwischen 5 und 8,59, Median 6) (s. Abbildung 6).

Ergebnisse

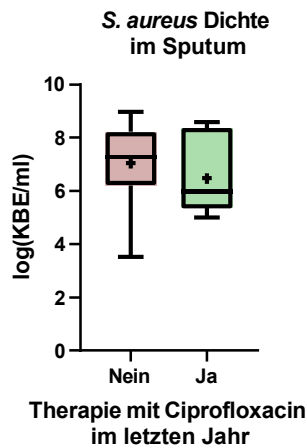


Abbildung 6: Korrelation zwischen *S. aureus* Dichte im Sputum und Therapie mit Ciprofloxacin im Jahr vor der Studie.

Sulfamethoxazol und Trimethoprim wurde bei vier Patienten verwendet. Die Bakteriendichte aller Probenahmen von Patienten, die nicht mit Cotrimoxazole behandelt wurden, zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den Proben der Patienten, welche Cotrimoxazole erhielten.

In den 19 untersuchten Sputen von Patienten, die nicht mit Cotrimoxazole behandelt wurden, wurden zwischen 10^5 und $9,225 \times 10^8$ Bakterien/ml (Median $6,45 \times 10^6$) nachgewiesen (log(KBE/ml) zwischen 5,00 und 8,96, Median 6,80). In den fünf untersuchten Sputa von Patienten, die Cotrimoxazole behandelt wurden, wurden zwischen $3,2 \times 10^3$ und $3,86 \times 10^8$ Bakterien/ml (Median $3,75 \times 10^6$) nachgewiesen (log(KBE/ml) zwischen 3,51 und 8,59, Median 6,57) (s. Abbildung 7).

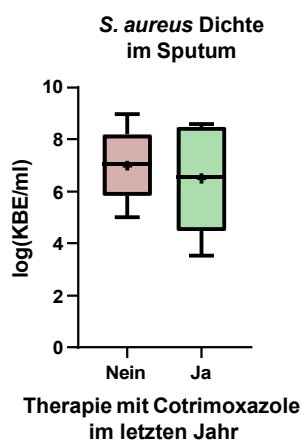


Abbildung 7: Korrelation zwischen *S. aureus* Dichte im Sputum und Therapie mit Cotrimoxazole im letzten Jahr.

3.6 Phänotypische Diversität

Alle Proben wurden auf phänotypische Diversität der *S. aureus* Kolonien untersucht. Es wurde untersucht, ob im Sputum mehr unterscheidbare *S. aureus* Kolonien im Vergleich zu Nasenabstrichen nachweisbar waren. Hierzu wurden das Aussehen (Hämolyseverhalten, Farbe und Größe) der Kolonien auf Blutagarplatten beschrieben. Es wurde bis zu drei verschiedenen Phänotypen pro Probe beobachtet. Im Sputum waren mehr phänotypisch unterschiedliche Kolonien als in den Nasenabstrichen der Kontroll- oder Patientengruppe beobachtbar (s. Abbildung 8).

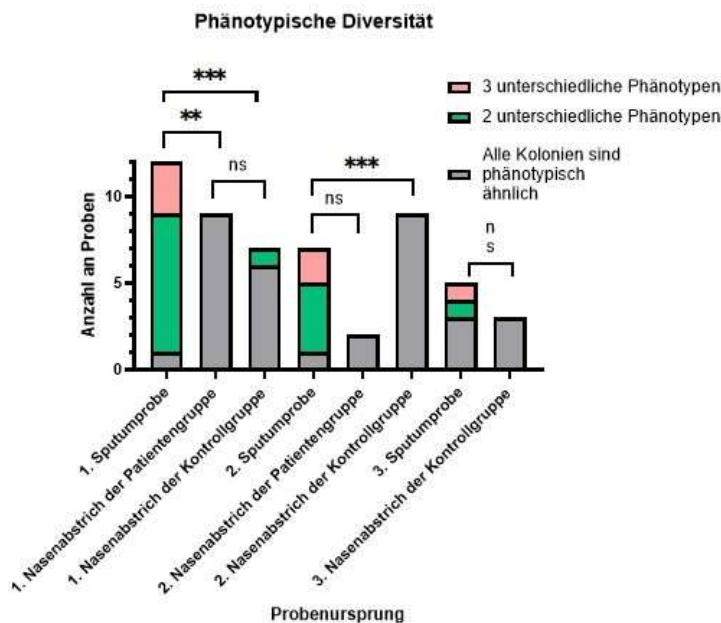


Abbildung 8: Phänotypische Diversität je nach Probenursprung.

Die Anzahl an unterschiedlichen Phänotypen ist abhängig vom Ursprung der ersten Proben (Nase der Kontrollgruppe, Nase der Patientengruppe oder Sputum) ($p < 0,001$), sowie der zweiten Proben (Nasen der Kontrollgruppe oder Sputum) ($p < 0,01$), aber nicht der dritten Proben.

* signifikant ($p < 0,05$); ** sehr signifikant ($p < 0,01$); *** hoch signifikant ($p < 0,001$). Es wurde der exakte Test nach Fischer angewendet.

3.7 Korrelation zwischen phänotypischer Diversität und Bakteriendichte

Es wurde untersucht, inwieweit die Diversität mit der Bakteriendichte korreliert. In den 24 untersuchten Sputen von Patienten, die eine phänotypische Heterogenität zeigten, wurden zwischen $3,2 \times 10^3$ und $9,225 \times 10^8$ Bakterien/ml (Median $2,12 \times 10^7$) nachgewiesen (log(KBE/ml) zwischen 3,51 und 8,96, Median

Ergebnisse

7,33). In den fünf untersuchten Sputa von Patienten, die keine phänotypische Heterogenität zeigte, wurden zwischen 10^5 und $1,9 \times 10^7$ Bakterien/ml (Median $3,25 \times 10^5$) nachgewiesen ($\log(\text{KBE/ml})$ zwischen 5 und 7,528, Median 5,51). Die folgende Abbildung zeigt, dass die Bakteriendichte höher war, wenn eine phänotypische Diversität vorhanden war. Dieser Unterschied war aber nicht signifikant ($p = 0,063$) (s. Abbildung 9).

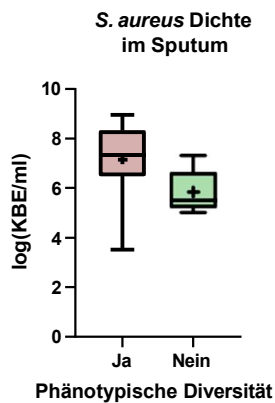


Abbildung 9: Korrelation zwischen *S. aureus* Dichte und phänotypische Diversität.

3.8 Analyse der genetischen Diversität

Da insbesondere in den CF-Sputumproben häufig phänotypisch unterscheidbare Kolonien vorhanden waren, sollte durch genetische Typisierung überprüft werden, inwieweit diese „Varianten“ klonal waren. Um zu untersuchen, ob phänotypisch ähnliche Kolonien genetisch unterscheidbar waren, wurden von jeder Probe bis zu fünf einzelnen Kolonien isoliert und mittels *spa* und PFGE separat typisiert.

3.8.1 *spa*-Typisierung

Tabelle 17 zeigt die Ergebnisse der *spa*-Typisierung. Die Anzahl in Klammern gibt an, wie viele Kolonien pro Probe typisiert wurden. Bei den meisten Patienten war im Sputum und Nasenabstrich der gleiche *spa*-Typ nachweisbar. Nur bei Patienten 7 waren die Isolate aus dem Nasenabstrich nicht mit den Sputumisolaten identisch. Während dieser Patient im Sputum kontinuierlich und ausschließlich mit *S. aureus spa*-Typ t6065 besiedelt war, wurden im Nasenabstrich die *spa*-Typen t1037 und t012 nachgewiesen.

Bei sieben Patienten kam es zumindest vorübergehend zur zusätzlichen Besiedlung im Sputum oder in der Nase mit anderen *spa*-Typen.

Ergebnisse

Die Patienten 7 und 8 sind Geschwister. Patient 8 war sowohl im Sputum als auch in der Nase mit dem *spa*-Typ t6065 besiedelt. Bei diesem Patienten kam es zur allerdings zur vorübergehenden Besiedlung der Lunge mit *S. aureus* anderer *spa*-Typen.

Die Probanden waren kontinuierlich mit dem gleichen *spa*-Typ besiedelt. Nur bei einem Probanden wurde bei der letzten Probenahme ein Stammwechsel (t005 nach t1451) nachgewiesen. Ein der fünf Isolate aus der letzten Probenahme wurde jedoch dem vorherig isolierten, dominanten *spa*-Typ t005 zugeordnet.

Table 17: *spa*-Typ bei jedem Probanden.

Fettschrift: häufigerer *spa*-Typ, Kursiv: andere *spa*-Typen. Orange unterlegt sind die Proben, die mehr als einen *spa*-Typ hatten. Die Anzahl in Klammer gibt an, wie viele Kolonien pro Probe typisiert wurden.

Patient/ Proband	Sputum/ Nase	1. Probe	2. Probe	3. Probe
Patient 1	Nase	t005 (5)		
Patient 2	Nase	t571 (5)		
	Sputum		t571 (5)	
Patient 3	Nase	t248 (4)		
	Sputum	t248 (8)	t248 (5)	
Patient 4	Nase	t706 (5)		
	Sputum	t706 (10)	t706 (4), t282 (1)	t706 (3)
Patient 5	Sputum	t10370 (4), t091 (2)		
Patient 6	Nase	t449 (5)		
	Sputum	t449 (6)	t449 (5)	
Patient 7	Nase	t1037 (3), t012 (2)	t012 (5)	
	Sputum	t6065 (9)	t6065 (6)	t6065 (4)
Patient 8	Nase		t6065 (4), t1531 (1)	
	Sputum	t6065 (3), t091 (1), t2402 (1)	t6065 (3), t1531 (1)	t6065 (5)

Ergebnisse

Patient 9	Sputum	t026 (3), t779 (2)	t026 (6), t779 (1)	t026 (5)
Patient 10	Nase	t026 (4), t5845 (1)		
	Sputum	t026 (8)		
Patient 11	Sputum	t10331 (2), t368 (1)		
Proband 2	Nase	t015 (5)	t015 (5)	
Proband 3	Nase	t189 (5)	t189 (5)	
Proband 4	Nase			t1451 (4), t005 (1)
		t005 (5)	t005 (5)	
Proband 5	Nase	t3077 (5)	t3077 (5)	t3077 (5)
Proband 7	Nase	t050 (5)	t050 (5)	
Proband 8	Nase	t1451 (5)	t1451 (5)	
Proband 9	Nase	t156 (5)	t156 (5)	

Wir untersuchten, ob es im Sputum häufig zur Besiedlung mit verschiedenen *spa*-Typen kam. Es gibt einen Trend, dass verschiedene *spa*-Typen häufiger bei Proben von CF-Patienten auftreten (s. Abbildung 10). Der Unterschied zu Nasenisolaten von gesunden Probanden blieb jedoch unter der Signifikanzgrenze ($p = 0.078$).

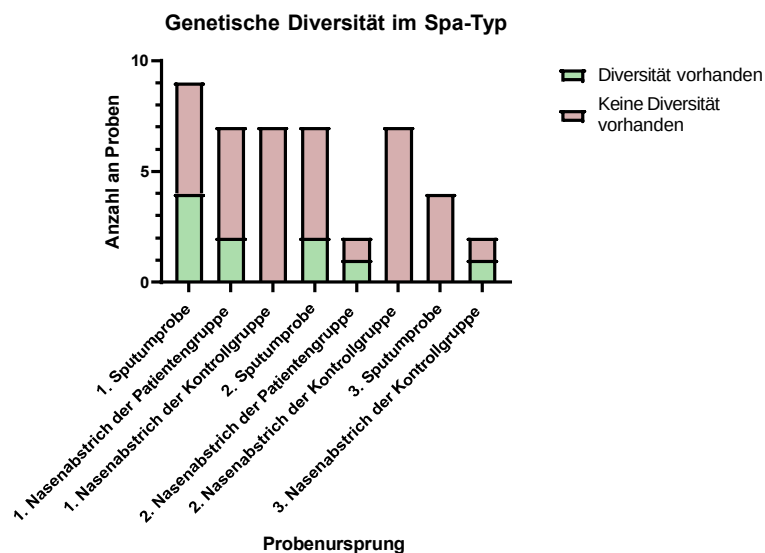


Abbildung 10: Diversität im *spa*-Typ je nach Probenursprung.

Die Diversität ist höher im Sputum als in der Nase von Probanden, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant (erste Proben: $p = 0,088$, zweite Proben: $p = 0,078$, dritte Proben $p = 1$). Der exakte Test nach Fischer wurde angewendet.

3.8.1.1 Korrelation zwischen phänotypischer Varianz und *spa*-Typisierung

Tabelle 18 zeigt, dass es keine Korrelation zwischen phänotypischer und genetischer Heterogenität gab. 62% der phänotypisch unterschiedlichen Sputumproben waren nach *spa*-Typisierung genetisch identisch. Zwölf Proben waren phänotypisch heterogen, die Isolate gehörten jedoch dem gleichen *spa*-Typ an (orange). Bei fünf Proben unterschieden sich die *spa*-Typen, ohne dass die Kolonien eine auffallende, phänotypische Variation auf der Blutagar-Platte zeigten (gelb). Bei drei Proben waren die Kolonien sowohl phänotypisch als auch genetisch unterscheidbar (grün).

Tabelle 18: Korrelation zwischen phänotypischer und genetischer (nach *spa*-Typ) Heterogenität.

Grün: phänotypische und genetische Heterogenität vorhanden. Rot: phänotypische aber keine genetische Heterogenität vorhanden. Gelb: genetische aber keine phänotypische Heterogenität vorhanden.

Probe	Phänotypische Heterogenität	Genetische Heterogenität
CF1-N1	Ja	Nein
CF1-S1	Ja	Nicht untersucht
CF2-N1	Nein	Nein
CF2-S1	Ja	Nicht untersucht
CF2-S2	Ja	Nein
CF2-S3	Nein	Nicht untersucht
CF3-N1	Nein	Nein
CF3-S1	Ja	Nein
CF3-S2	Ja	Nein
CF4-N1	Nein	Nein
CF4-S1	Ja	Nein
CF4-S2	Ja	Nein
CF4-S3	Nein	Nein
CF5-S1	Ja	Ja
CF6-N1	Nein	Nein
CF6-S1	Ja	Nein
CF6-S2	Ja	Nein
CF7-N1	Nein	Ja
CF7-S1	Ja	Nein

Ergebnisse

CF7-N2	Nein	Nein
CF7-S2	Nein	Nein
CF8-S1	Ja	Ja
CF8-N2	Nein	Ja
CF8-S2	Ja	Nein
CF8-S3	Nein	Nein
CF9-S1	Nein	Ja
CF9-S2	Nein	Ja
CF9-S3	Ja	Nein
CF10-N1	Nein	Ja
CF10-S1	Ja	Nein
CF11-S1	Ja	Ja
CF12-S1	Ja	Nicht untersucht

3.8.2 PFGE

Die Isolate wurden ebenfalls mittels PFGE typisiert. Abbildung 11 zeigt exemplarisch ein DNA-Fragmentprofil von *S. aureus* Isolaten von zwei Nasenabstrichen eines gesunden Probanden. Alle Isolate zeigten das identische DNA-Fragmentprofil. Dies war bei allen Isolaten von gesunden Probanden (79 Isolaten von sieben Probanden) der Fall. Die DNA-Fragmentprofile zwischen den Probanden waren unterschiedlich. Innerhalb eines Patienten wurden jedoch keine Fragmentänderungen beobachtet.

Ergebnisse

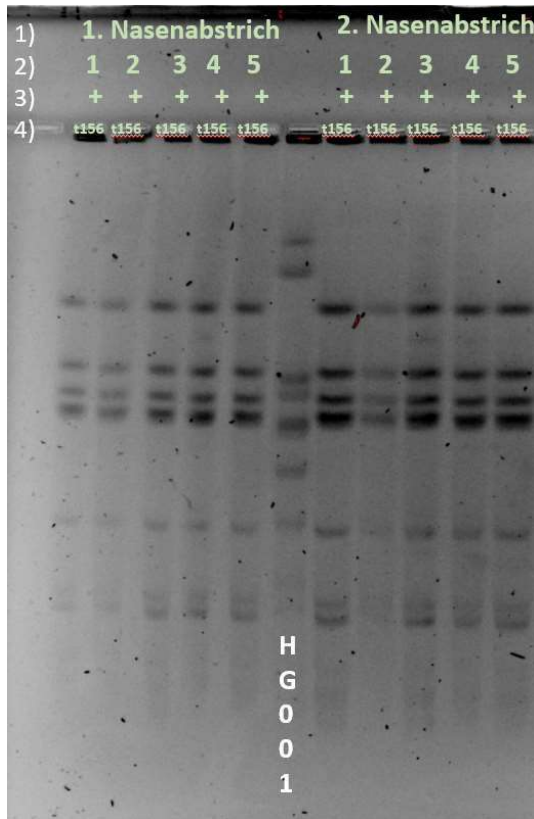


Abbildung 11: DNA-Fragmentprofil von *S. aureus* (Proband 9) nach Makrorestriktionsverdau mit *Sma*I und Trennung mittels PFGE.

Als *S. aureus* Referenzstamm wurde der HG001-Typ verwendet. Für jede Kolonie steht oben in der Abbildung folgende Informationen: 1) Probenursprung, 2) Kolonienummer 3) Agr-Aktivität, 4) *spa*-Typ

Die Abbildungen 12 bis 15 zeigen DNA-Fragmentprofile von *S. aureus* aus den Sputum- und Nasenabstrichen von vier Patienten, bei denen eine Diversität im DNA-Fragmentprofil zu sehen war. Die rot markierten Profile zeigen Veränderungen im Fragmentmuster im Vergleich zu anderen Isolaten des gleichen Patienten. Dabei handelt es sich um sogenannte „strukturelle Varianten“ (weniger als drei unterschiedliche Banden). Diese Varianten sind nicht durch *spa*-Typisierung oder Agr-Aktivität unterscheidbar. Die Proben der anderen Patienten zeigten keine Variation im DNA-Fragmentprofil für die Isolate einer Probe.

In den Abbildungen 13 und 14 ist erkennbar, dass das DNA-Fragmentprofil von Nasenisolaten z.T. unterschiedlich zu dem DNA-Fragmentprofil der Sputum-Proben des gleichen Patienten sein kann: Bei drei Patienten waren die DNA-Fragmentprofil aus den Nasenabstrichen unterschiedlich zu den Sputumproben;

Ergebnisse

bei vier Patienten waren die DNA-Fragmentprofile aus den Nasenabstrichen und aus den Sputumproben identisch.

Bei allen Patienten waren die DNA-Fragmentprofile über die Zeit unverändert.

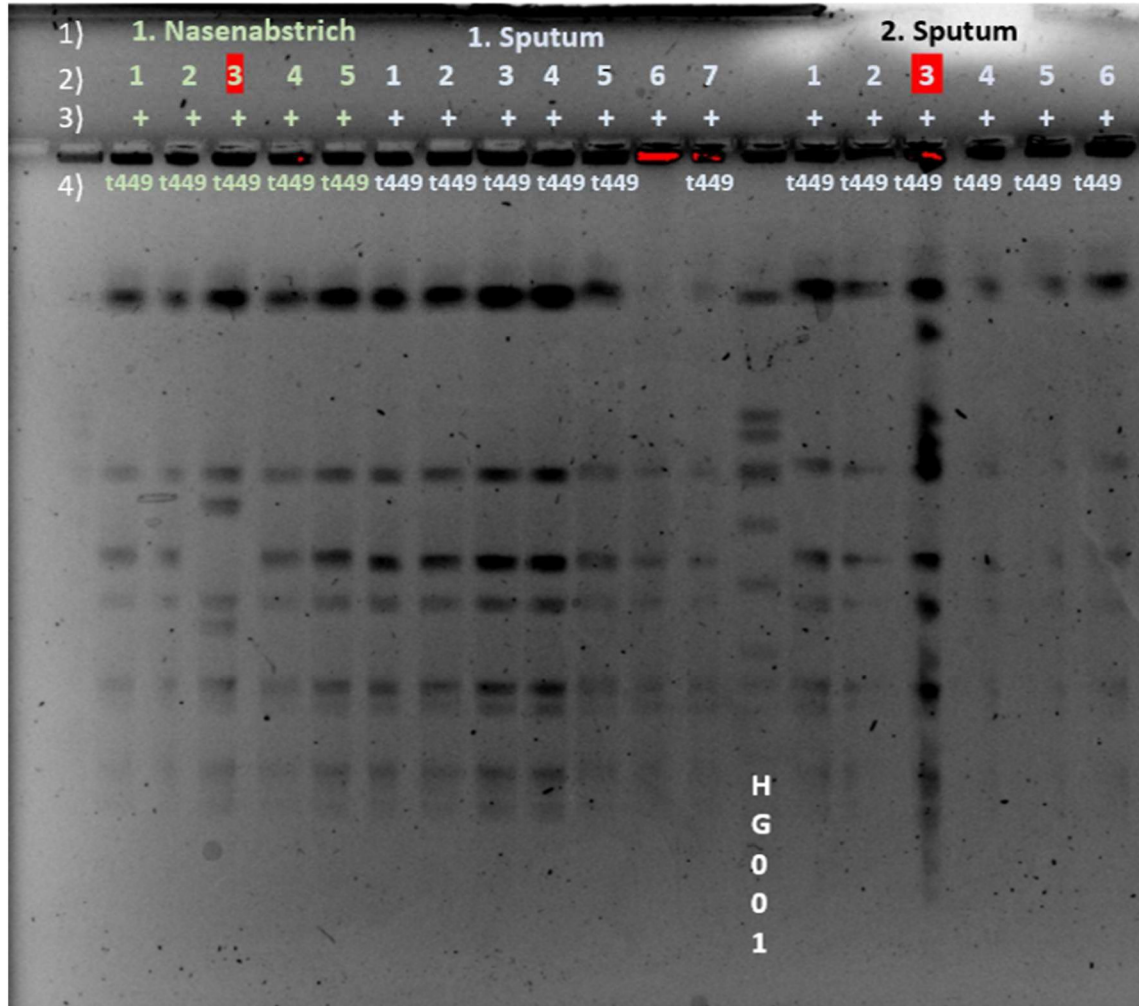


Abbildung 12: DNA-Fragmentprofil von *S. aureus* (Patient 6) nach Makrorestriktionsverdau mit *Sma*I und Trennung mittels PFGE.

Als *S. aureus* Referenzstamm wurde der HG001-Typ verwendet. Rot markierte Kolonien sind Structural Varianten. Für jede Kolonie steht oben in der Abbildung folgende Informationen: 1) Probenursprung, 2) Kolonienummer, 3) Agr-Aktivität, 4) *spa*-Typ

Ergebnisse

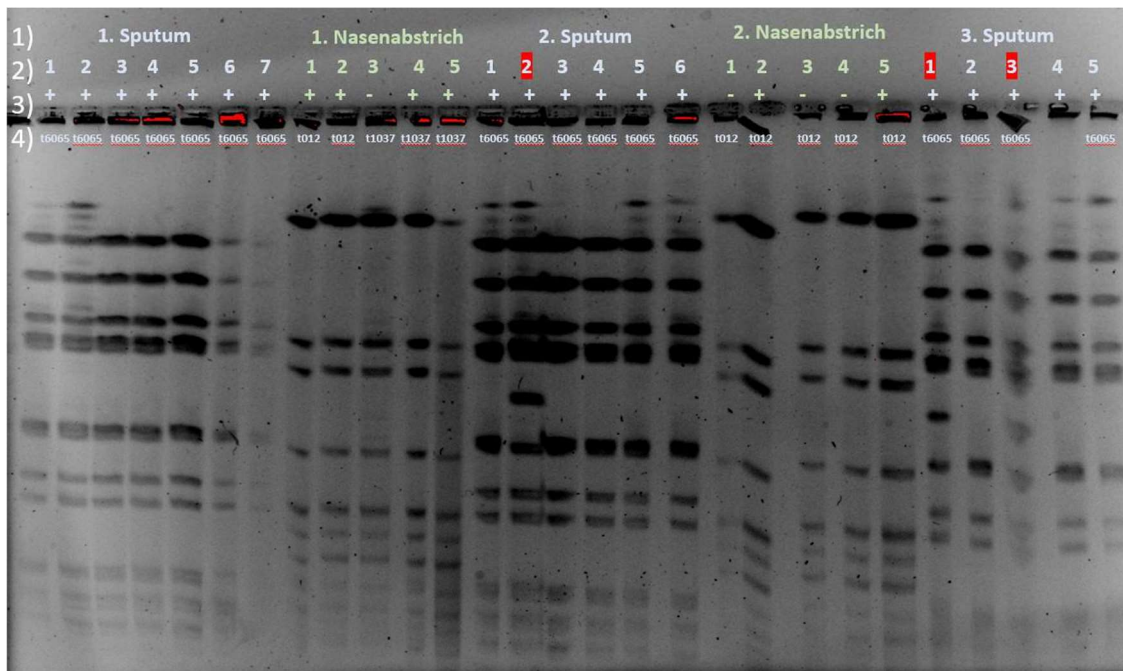


Abbildung 13: DNA-Fragmentprofil von *S. aureus* (Patient 7) nach Makrorestriktionsverdau mit *Smal* und Trennung mittels PFGE.

Als *S. aureus* Referenzstamm wurde der HG001-Typ verwendet. Rot markierte Kolonie sind Structural Varianten. Für jede Kolonie steht oben in der Abbildung folgende Informationen: 1) Probenursprung, 2) Kolonienummer 3) Agr-Aktivität, 4) *spa*-Typ

Ergebnisse

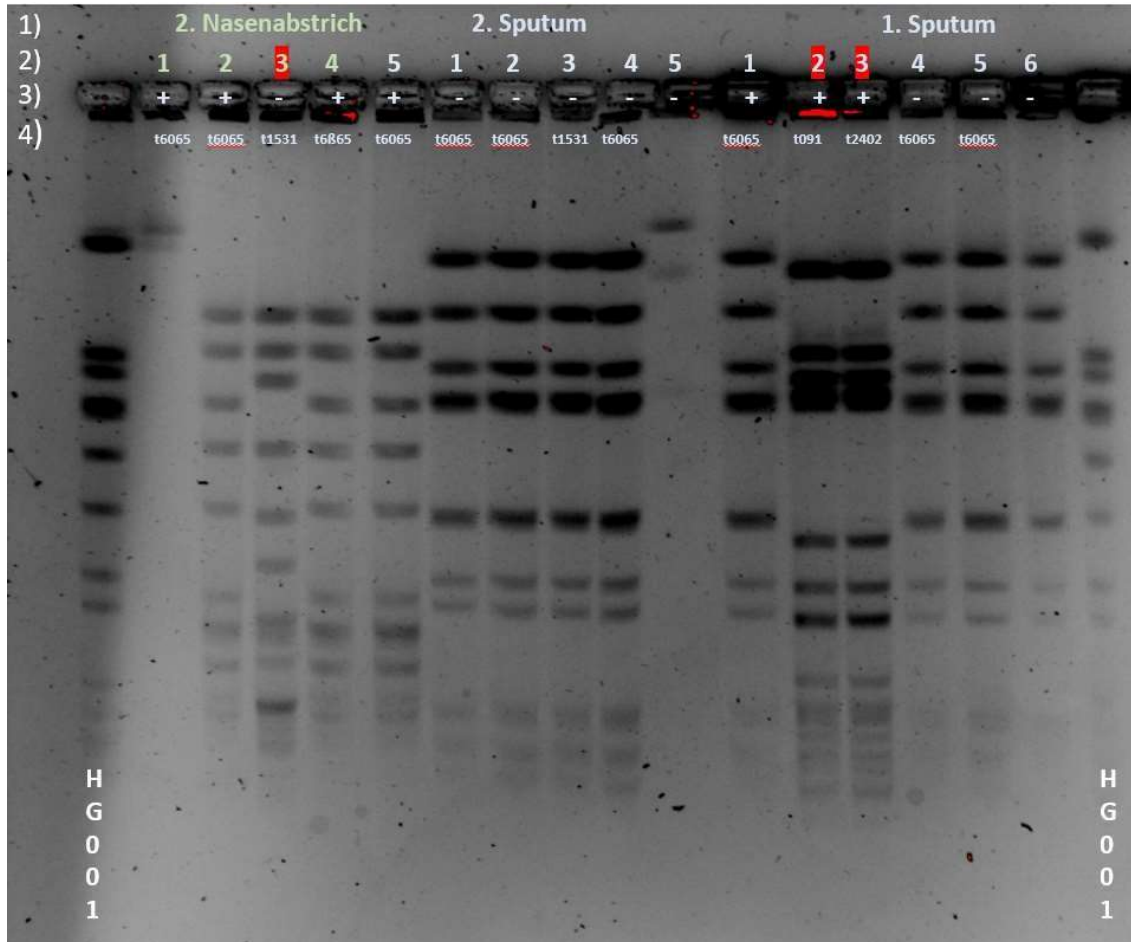


Abbildung 14: DNA-Fragmentprofil von *S. aureus* (Patient 8) nach Makrorestriktionsverdau mit *Sma*I und Trennung mittels PFGE.

Als *S. aureus* Referenzstamm wurde der HG001-Typ verwendet. Rot markierte Kolonie sind Structural Varianten. Für jede Kolonie steht oben in der Abbildung folgende Informationen: 1) Probenursprung, 2) Kolonienummer 3) Agr-Aktivität, 4) *spa*-Typ

Ergebnisse

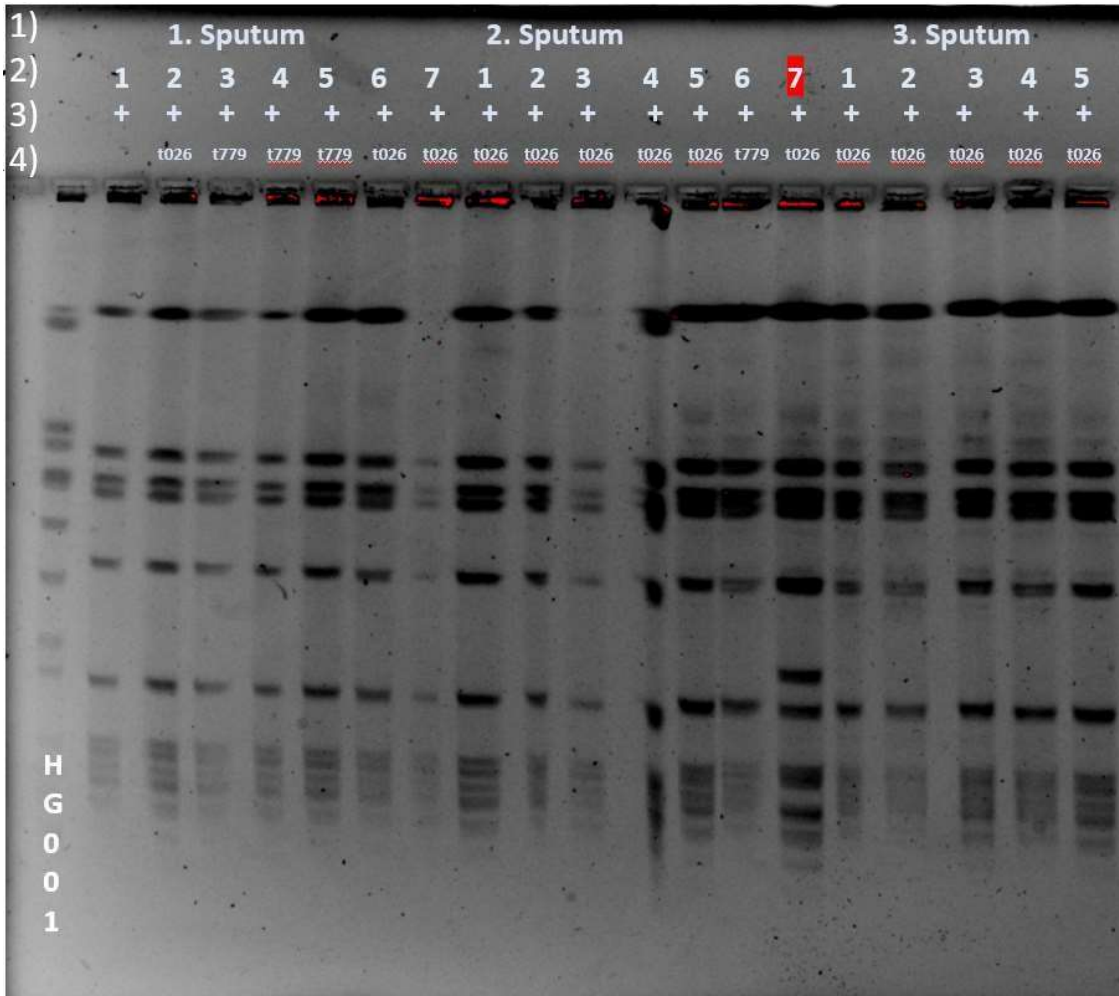


Abbildung 15: DNA-Fragmentprofil von *S. aureus* (Patient 9) nach Makrorestriktionsverdau mit *Sma*I und Trennung mittels PFGE.

Als *S. aureus* Referenzstamm wurde der HG001-Typ verwendet. Rot markierte Kolonien sind Structural Varianten. Für jede Kolonie steht oben in der Abbildung folgende Informationen: 1) Probenursprung, 2) Kolonienummer 3) Agr-Aktivität, 4) *spa*-Typ

Ergebnisse

Abbildung 16 zeigt die Diversität im DNA-Fragmentprofil je nach Probenursprung. Diversität war nur in den Proben von Patienten, vor allem im Sputum, zu beobachten.

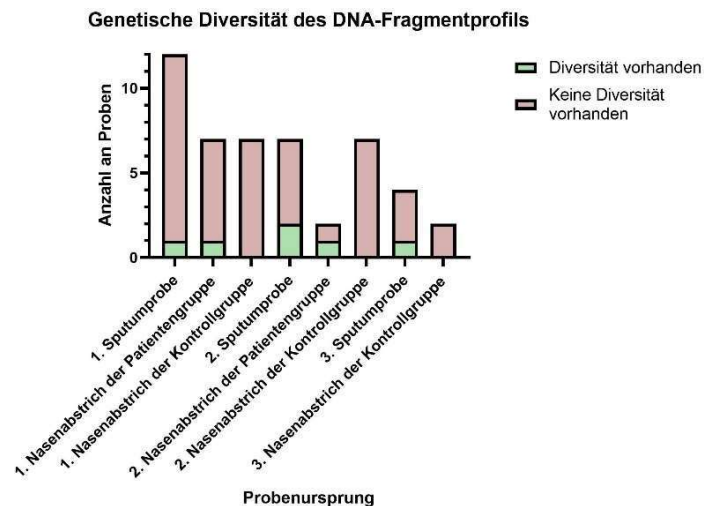


Abbildung 16: Diversität des DNA-Fragmentprofils je nach Probenursprung.

Nach Ausführung von Fischer-Test gab es keinen signifikanten Unterschied in der Diversität im DNA-Fragmentprofil zwischen den Proben von Sputum und Nasenabstrichen der Patientengruppe (erste Proben: $p=0,497$, zweiten Proben: $p=0,462$, dritte Proben: $p=1$).

3.8.3 Korrelation zwischen DNA-Fragmentprofil und spa-Typ

Die *spa*-Typisierung basiert auf Veränderungen in einem einzelnen Gen während durch die PFGE eher strukturelle Veränderungen im Genom detektiert werden. Durch beide Methoden wurden Variationen innerhalb der Bakterienpopulationen aus Sputumisolaten beobachtet. Hier wurde verglichen, inwieweit die Aussage beider Methoden miteinander korreliert.

Tabelle 19 fasst die Ergebnisse beider Typisierungsmethoden zusammen. Unterschiedliche DNA-Fragmentmuster wurden durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet, strukturelle Varianten (weniger als drei Bandendifferenz) durch zusätzliche Nummerierung.

Die PFGE-Ergebnisse zeigten, dass die Isolate einer Probe immer dem gleichen PFGE-Typ zugeordnet werden konnten. Es gibt keinen Hinweis auf gleichzeitige Besiedlung mit verschiedenen Stämmen. Bei fünf Patienten waren die Isolate aus dem Nasenabstrich und Sputum identisch.

Bei Patienten 7 und Patienten 8 handelt es sich um ein Geschwisterpaar. Beide besaßen in der Lunge aber nicht in der Nase den gleichen Klon. Der Haupt-*spa*-

Ergebnisse

Typ war t6065 und wurde sowohl in der Lunge beider Patienten als auch in der Nase von Patienten 8 gefunden. Beide Patienten zeigten in der Lunge innerhalb der Sputa strukturelle Varianten. Zwei weitere Patienten (Patienten 6 und Patienten 9) zeigten in der zweiten Sputumprobe Unterschied im DNA-Fragmentprofil. Patient 6 hatte in der Nase zwei strukturelle Varianten.

Acht Proben hatten trotz gleichem DNA-Fragmentprofil unterschiedliche *spa*-Typen. Vier Proben hatten trotz gleichem *spa*-Typ unterschiedliche DNA-Fragmentprofil.

Tabelle 19: *spa*-Typ und PFGE-DNA-Fragmentprofil.

Hellorange: Isolate mit unterschiedlichem *spa*-Typ und gleicher DNA-Fragmentprofil. Blau: strukturelle Variante. Rot: strukturelle Variante mit unterschiedlichem *spa*-Typ.

Probe	Isolate	<i>spa</i> -Typ	PFGE-DNA-Fragmentprofil ¹
CF1-N1	Alle Isolate	t005	A
CF1-S1	Alle Isolate	Unknown	A
CF2-N1	Alle Isolate	t571	B
CF2-S1	Alle Isolate	Unknown	B
CF2-S2	Alle Isolate	t571	B
CF3-N1	Alle Isolate	t248	C
CF3-S1	Alle Isolate	t248	C
CF3-S2	Alle Isolate	t248	C
CF4-N1	Alle Isolate	t706	D1
CF4-S1	Alle Isolate	t706	D2
CF4-S2	Isolate 1, 3, 4 und 5	t706	D2
	Isolate 2	t282	D2
CF4-S3	Alle Isolate	t706	D2
CF5-S1	Isolate 1, 3, 4 und 5	t10370	E
	Isolate 2 und 6	t091	E
CF6-N1	Isolate 1, 2, 4 und 5	t449	M1
	Isolate 3	t449	M2
CF6-S1	Isolate 1, 2, 4, 6, 5, 7	t449	M1
	Isolate 3	t449	M3
CF6-S2	Isolate 1 bis 3	t449	M1

Ergebnisse

CF7-N1	Isolate 3, 4 und 5	t1037	F
	Isolate 1 und 2	t012	F
CF7-N2	Alle Isolate	t012	F
CF7-S1	Alle Isolate	t6065	G1
CF7-S2	Isolate 1, 3, 4, 5, 6	t6065	G1
	Isolate 2	t6065	G2
CF7-S3	Isolate 2, 4 und 5	t6065	G1
	Isolate 1 und 3	t6065	G2
CF8-N2	Isolate 1, 2, 4 und 5	t6065	H1
	Isolate 3	t1531	H2
CF8-S1	Isolate 1, 4 und 5	t6065	G1
	Isolate 2	t091	G3
	Isolate 3	t2042	G3
CF8-S2	Isolate 1, 2 und 3	t6065	G1
	Isolate 4	t1531	G1
CF9-S1	Isolate 3, 4 und 5	t779	D3
	Isolate 2 und 6	t026	D3
CF9-S2	Isolate 1 bis 5	t026	D3
	Isolat 7	t026	D4
	Isolate 6	t779	D3
CF9-S3	Alle Isolate	t026	D3
CF10-N1	Isolate 2 bis 5	t026	J1
	Isolate 1	t5845	J1
CF10-S1	Alle Isolate	t026	J2
CF11-S1	Isolate 3 und 5	t10331	K
	Isolate 4	t368	K
CF12-S1	Alle Isolate	unknown	L

1: Ein Buchstabe steht für einen Klon im DNA-Fragmentprofil. Falls sich der DNA-Fragmentprofil innerhalb einer Probe mit weniger als drei Banden (strukturelle Variante) geändert hat, wird dies durch Zahlen gekennzeichnet.

3.8.4 Korrelation zwischen genetischer Diversität und Bakteriendichte

Abbildung 17 zeigt, dass die Bakteriendichte signifikant höher war, wenn keine genetische Diversität vorhanden war. In den vier untersuchten Sputa von Patienten, die eine genetische Heterogenität zeigten, wurden zwischen $2,75 \times 10^5$ und $2,12 \times 10^7$ Bakterien/ml (Median $9,15 \times 10^5$) nachgewiesen (log(KBE/ml) zwischen 5,44 und 7,33, Median 5,96). In den fünf untersuchten Sputa von Patienten, die keine genetische Heterogenität zeigte, wurden zwischen 3×10^6 und $5,18 \times 10^8$ Bakterien/ml (Median $4,5 \times 10^7$) nachgewiesen (log(KBE/ml) zwischen 6,48 und 8,71, Median 7,65).

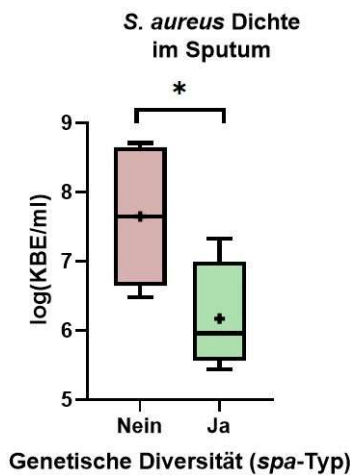


Abbildung 17: Korrelation zwischen Bakteriendichte im Sputum und genetischer Diversität des *spa*-Typs.

* signifikant ($p < 0,05$). Es wurde der *t*-test bei unabhängigen Proben angewendet.

3.9 Analyse der Diversität des Agr Systems

Das regulatorische Agr System kontrolliert die Synthese verschiedener Hämolsine. Die Hämolsinaktivität ist auf Blutagar-Platten durch typisches Hämolysemuster erkennbar (s. Abbildungen 18 und 19). Die Kolonien (fünf bis zehn pro Probe) wurden gepickt und senkrecht zu dem Indikatorstamm RN4220 ausgestrichen. Als Kontrolle für einen Agr-positiven *S. aureus* Stamm wurde der Wildtyp HG001 aufgetragen. Agr-positive Stämme zeichnen sich durch mehre Hämolysezonen aus. Das Agr kontrollierte Delta-Hämoylsin sowie die PSMs sind allein nicht hämolytisch. Sie wirken jedoch synergistisch mit dem vom Indikatorstamm RN4220 synthetisierten β -Hämolyisin. Die Synergie ist durch

Ergebnisse

verstärkte Hämolyse (weißer Pfeil) in der Nähe des Indikatorstammes RN4220 erkennbar.

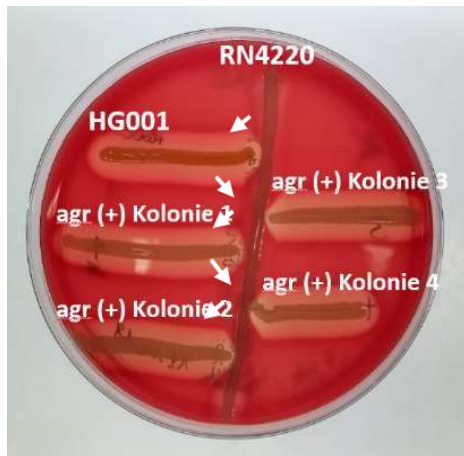


Abbildung 18: Cross-Streak Untersuchung vom Isolat CF3-S1.

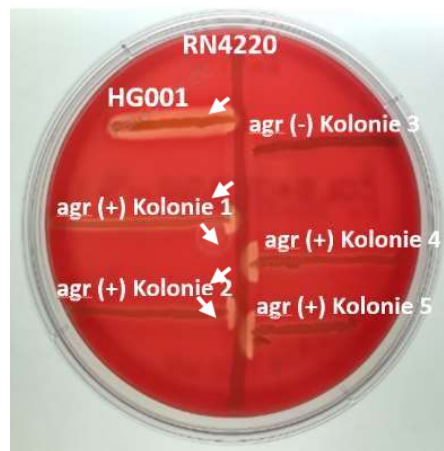


Abbildung 19: Cross-Streak Untersuchung vom Isolat CF8-N2.

Es wurde untersucht inwieweit sich einzelne Kolonien innerhalb einer Probe im Hämolysemuster (Agr-Aktivität) unterscheiden. Die Agr-Aktivität wurde als negativ oder positiv beschrieben. Bei einigen Proben unterschieden sich einzelne *S. aureus* Kolonien im Hämolysemuster. Dies wurde als Diversität in der Agr-Aktivität interpretiert.

Insgesamt war 28 der 155 untersuchten *S. aureus* Isolate von Sputumproben (12,7%), sieben der vierzig untersuchten Patientennasenabtriche (17,5%) und fünfzehn der achtzig untersuchten Probandennasenabtriche (18,75%) *agr* negativ. Es wurde weiterhin analysiert, wie häufig es zum gleichzeitigen Auftreten von Agr-positiven und Agr-negativen Isolaten innerhalb einer Probe kam (s. Abbildung 20).

Unterschiedliche Agr-Aktivitäten innerhalb einer Probe wurde bei den folgenden Proben von CF-Patienten beobachtet: CF4-N1, CF5-S1, CF7-N1 und CF7-N2, CF8-S1, CF8-N2. Die Kontrollgruppe zeigte keine Diversität der Agr-Aktivität.

Ergebnisse

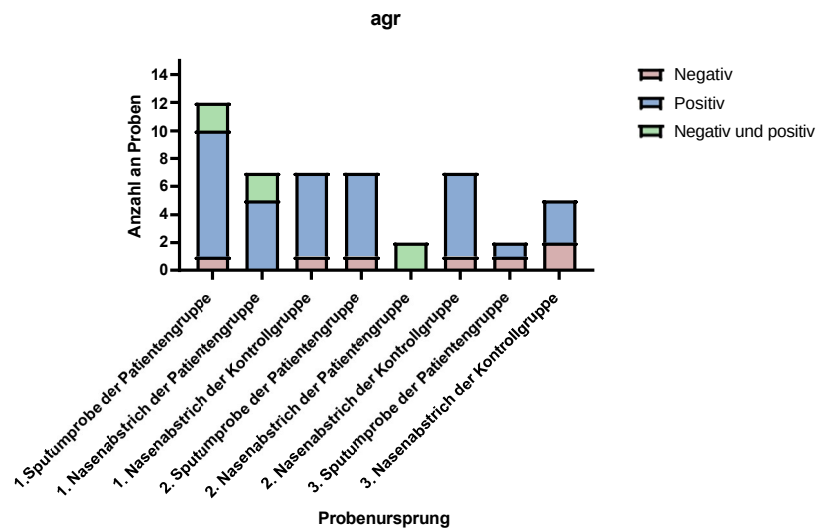


Abbildung 20: Agr-Aktivität je nach Probenursprung

Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Diversität der Agr-Aktivität zwischen den ersten Proben von Sputum und Proben der Kontrollgruppe ($p = 0,263$). Es wurde der exakte Test nach Fisher angewendet.

3.10 Analyse der Antibiotikaresistenzen

Es sollte herausgefunden werden, ob sich die Resistenzen gegen zwölf Antibiotika (Cefoxitin, Tetrazyklin, Rifampicin, Tigecyclin, Mupirocin, Vancomycin, Fusidinsäure, Sulfamethoxazole und Trimethoprim, Gentamicin, Erythromycin, Ciprofloxacin, Clindamycin) je nach Probenursprung unterscheiden.

Kolonien, die als intermediär gegen ein bestimmtes Antibiotikum getestet wurden, wurden für die Auswertung als sensibel bezeichnet, da ein Therapieerfolg nach Exposition mit höheren Konzentrationen wahrscheinlich ist. Um die Resistenz zu beurteilen, wurden Proben, die gleichzeitig sensible und resistente Isolate zeigten, als resistent bezeichnet.

Alle Isolate der gesunden Probanden waren sensibel gegen alle getesteten Antibiotika. Die Sputumisolate waren ebenfalls sensibel gegen Cefoxitin, Tetrazyklin, Rifampicin, Tigecyclin, Mupirocin, Fusidinsäure, Sulfamethoxazole und Trimethoprim und Vancomycin. Einige der Isolate von CF-Patienten waren jedoch resistent gegen andere Antibiotika. In der Probe CF8-N2 zeigten vier der fünf Isolate eine Resistenz gegen Clindamycin. Alle anderen Isolate waren gegen Clindamycin sensibel. In den Proben CF4-S1 und CF4-S2 wurden Isolate mit und ohne Gentamicin-Resistenz isoliert. Alle anderen Proben waren Gentamicin-

Ergebnisse

sensibel. Mehrere Patientenisolat waren resistent gegenüber Ciprofloxacin oder Erythromycin. Das Vorkommen dieser beiden Resistenzen wird im Folgenden näher beschrieben.

3.10.1 Ciprofloxacin

3.10.1.1 Resistenz

Acht Patienten wurden mindestens einmal mit Ciprofloxacin therapiert. Vier Patienten hatten trotz Ciprofloxacintherapie keine resistenten Isolate. Bei vier Patienten waren jedoch resistenten Isolate nachweisbar.

Tabelle 20 zeigt, wie sich die Resistenzen im Sputum gegen Ciprofloxacin mit der Zeit veränderte. Es ist zu sehen, dass sich das Resistenzmuster zum Teil über die Zeit veränderte.

Tabelle 20: Resistenz gegen Ciprofloxacin über die Zeit.

Fettmarkierte Proben zeigen, bei welchen Patienten die Resistenz sich über die Zeit geändert hat.

Patienten	Sputum/Nase	1. Probe	2. Probe	3. Probe
1	Sputum	S ¹		
	Nase	S		
2	Sputum	S	R	S
	Nase	S		
3	Sputum	S	S	
	Nase	S		
4	Sputum	R	R	R
	Nase	S		
5	Sputum	R und S ³		
	Nase	S		
6	Sputum	R und S	S	
	Nase	R		
7	Sputum	R	R	R
	Nase	S		
8	Sputum	R	R	R
	Nase		R und S	
9	Sputum	S	R und S	S
10	Sputum	S		
	Nase	S		
11	Sputum	R		
12	Sputum	S		

1: Sensible Stämme gegen Ciprofloxacin

2: Resistente Stämme gegen Ciprofloxacin

3: Resistente und sensible Stämme gegen Ciprofloxacin

Ergebnisse

Abbildung 21 zeigt, dass mindestens 50% der Sputumproben resistent gegen Ciprofloxacin waren: sechs der zwölf Sputa der ersten Probenahme hatten Ciprofloxacin-resistente *S. aureus* Isolate. Bei der zweiten Probenahme waren fünf von sieben Proben resistent und bei der dritten Probenahme drei von fünf. Im Nasenabstrich der Patienten waren bei der ersten und zweiten Probenahme in jeweils einem von sieben und einem von zwei Proben Ciprofloxacin-resistente Isolate nachweisbar.

Die Resistenzrate war signifikant abhängig vom Ursprung der Probe (Abbildung 21). Ciprofloxacin-resistente Stämme waren sowohl bei der ersten als auch zweiten Probenahme signifikant häufiger bei CF-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden nachweisbar.

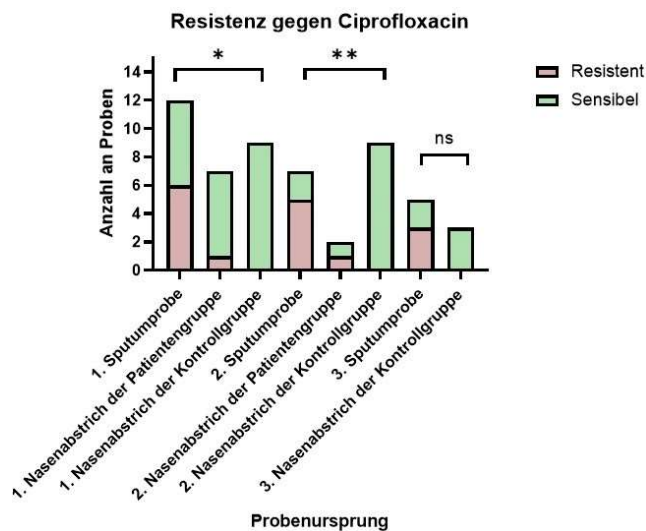


Abbildung 21: Resistenz gegen Ciprofloxacin je nach Probenursprung.

* signifikant ($p < 0,05$); ** sehr signifikant ($p < 0,01$). Es wurde der exakte Test nach Fischer angewendet.

3.10.1.2 Diversität im Resistenzverhalten

In Abbildung 22 ist erkennbar, dass es keine hohe Diversität im Resistenzverhalten gegen Ciprofloxacin gab. Nur in einzelnen Sputumproben waren resistente und sensible Isolate gleichzeitig nachzuweisen.

Ergebnisse

Diversität im Resistenzverhalten gegen Ciprofloxacin

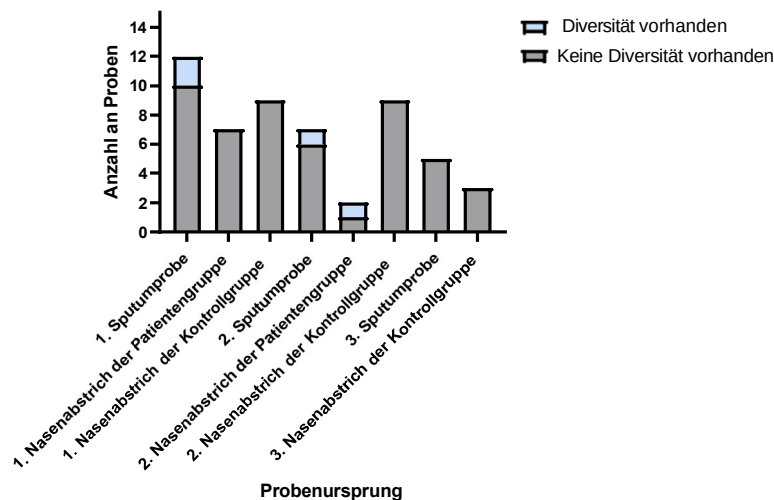


Abbildung 22: Diversität des Resistenzverhaltens gegen Ciprofloxacin je nach Probenursprung.

3.10.2 Erythromycin

Abbildung 23 zeigt, dass es Stämme von CF-Patienten teilweise resistent gegen Erythromycin waren. In folgenden Proben waren Erythromycin-resistente Stämme nachweisbar: CF2-N1, CF2-S1, CF2-S2, CF7-N1 und CF8-N2. Nur in Probe CF8-N2 wurden gleichzeitig resistente und sensible Isolate nachgewiesen. Patient 2 ist der einzige Patient, der in der Vergangenheit mit Azithromycin behandelt wurde.

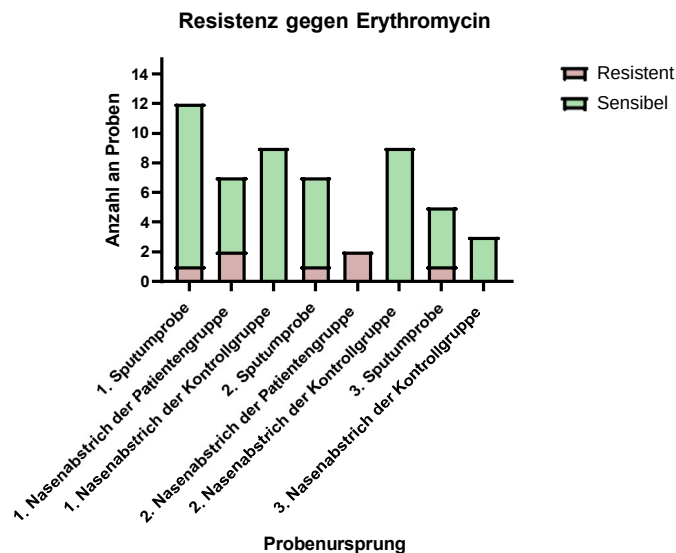


Abbildung 23: Resistenz gegen Erythromycin.

Der Resistenzverhalten ist nicht abhängig vom Ursprung der Probe.

3.10.3 Korrelation zwischen phänotypischer Heterogenität und Diversität des Resistenzverhaltens

Insgesamt waren in fünf Sputumproben Isolate mit unterschiedlichem Resistenzverhalten nachweisbar. Die Isolate von vier dieser Proben zeigten auch eine phänotypische Heterogenität. Die Isolate waren genotypisch nicht unterscheidbar.

3.11 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es wurde die Heterogenität von *S. aureus* im Sputum von CF-Patienten untersucht und mit Proben aus Nasenabstrichen derselben Patienten und gesunden Probanden verglichen.

Als erstes haben wir eine signifikante höhere *S. aureus* Dichte im Sputum als in der Nase von Patienten und gesunden Probanden beobachtet. Eine Therapie mit Ivacaftor hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Bakteriendichte. Patienten, die eine Therapie mit Ciprofloxacin oder Sulfamethoxazole und Trimethoprim im Jahr vor der Studie hatten, hatten eine geringere Bakteriendichte im Sputum. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Eine signifikant höhere phänotypische Heterogenität wurde im Sputum beobachtet. Die genetische Diversität wurde mittels Sequenzierung des *spa*-Gens und Anzahl von Varianten im PFGE-Gel nach Restriktionsverdau mit *Sma*I untersucht. Die Diversität des *spa*-Gens war höher im Sputum als in der Nase von gesunden Probanden, jedoch war der Unterschied nicht signifikant. Im PFGE waren strukturelle Variante nur in den Proben von Patienten, vor allem im Sputum, zu beobachten.

Zusätzlich wurde die Diversität des Agr Systems untersucht. In der Nase, sowohl von Patienten als auch von Probanden, wurden häufiger als im Sputum Agr-negative Stämme beobachtet, der Unterschied war aber nicht signifikant. Gleichzeitiges Auftreten von Agr-positiven und Agr-negativen Isolaten innerhalb einer Probe wurde im Sputum und in der Nase der Patientengruppe beobachtet. Die Kontrollgruppe zeigte keine Diversität der Agr-Aktivität.

Ergebnisse

Als letzte wurde die Resistenz gegen zwölf Antibiotika getestet. Alle untersuchten Probandenproben zeigten sich sensibel gegenüber allen getesteten Antibiotika. Gegen Ciprofloxacin wurde die höchste Resistenzrate im Sputum beobachtet. Die Resistenzrate gegen Ciprofloxacin war abhängig vom Ursprung der Probe (Sputum oder Nasenabstrich der Kontrollgruppe). Im Falle von Erythromycin waren sowohl in den Nasenabstrichen als auch im Sputum wenige resistente Stämme zu beobachten.

4 Diskussion

4.1 Vor- und Nachteile des Studiendesigns

In dieser Arbeit wurde die Heterogenität von *S. aureus* Populationen von CF-Patienten und von gesunden Probanden verglichen. Im Gegensatz zu anderen CF-Studien wurden für jede Probe mindestens fünf Kolonien getrennt analysiert. Dabei wurden die Isolate auf phänotypische Veränderungen und auf genetische Variationen untersucht. In einer Vorläuferstudie wurde die Heterogenität nur aufgrund der phänotypischen Veränderungen erfasst (Goerke et al., 2007). 2019 wurden die *spa*-Typen und die Agr-Aktivität von fünfzig CF-Patienten von Bernardy et al. beschrieben. Auch hier wurden nicht mehrere Isolate einer Probe untersucht.

In der Literatur fand sich keine Studie, in der die genetische Heterogenität des *spa*-Typs und des DNA-Fragmentprofils nach PFGE gleichzeitig untersucht wurden. In der Multizenterstudie von Goerke et al. 2007 wurden beide Methoden eingesetzt. Jedoch wurden nicht alle Proben mit beiden Methoden untersucht, sondern es wurde in Tübingen die PFGE und in Münster die *spa*-Typisierung durchgeführt. Hier wurden hingegen alle Isolate mit beiden Methoden typisiert und die Ergebnisse verglichen.

Kahl et al. 2005 haben in CF-Folgeisolaten Änderungen der variablen Region des *spa*-Gens beschrieben und mit Änderungen des PFGE-Musters verglichen. Ziel dieser Studie war es Änderungen in der polymorphen Region X des *spa*-Gens während langzeitigen Lungenentzündungen von CF-Patienten zu erklären. Es wurden jedoch pro Probe nur jeweils ein Isolat untersucht (Kahl et al., 2005b).

Ein Schwachpunkt dieser Studie ist, dass nicht bei allen Probanden Sputum und Nasenabstriche gewonnen werden konnten. Phänotypisch war eine Heterogenität bei keinem Nasenabstrich zu beobachten, sodass wir fünf zufällige Isolate aussuchten. Aufgrund der hohen phänotypischen Heterogenität im Sputum wurden durchschnittlich mehr Isolate/Proben als in Nasenabstrichen untersucht.

Ein anderer Schwachpunkt ist die niedrige Teilnehmerzahl. Mit fünfzehn Patienten und neun gesunden Probanden wurden insgesamt nur wenige

Teilnehmer in dieser Vorstudie untersucht. In einer Folgestudie sollten daher mehr CF-Patienten und Probanden eingeschlossen werden. Aufgrund der geringen Teilnehmerzahl war bei einigen Fragestellungen kein signifikanter Unterschied, sondern nur Tendenzen zu finden. Auch konnte nur begrenzt die Heterogenität über die Zeit untersucht werden, da nicht alle Patienten in der Lage waren bei allen Untersuchungen Sputum abzugeben.

4.2 *S. aureus* Kolonisation und Dichte

Es waren sieben CF-Patienten in der Nase positiv. Die *S. aureus* Nasenkolonisation ist bei CF-Patienten höher als bei Nicht-CF-Patienten (Stone et al, Ridder Schaphorn). Verschiedene Mechanismen, die diese höhere *S. aureus* Prävalenz erklären können, werden diskutiert (Goerke et al., 2000b). Veränderte Mukuszusammensetzung sowie gestörte Rezeptorexpression könnte zur erhöhten Adhäsion in der CF-Nase führen (vgl. Goerke et al., 2000b). Interessanterweise waren nicht alle Patienten trotz *S. aureus* positiven Sputums mit *S. aureus* in der Nase kolonisiert. Im Gegensatz zu gesunden Probanden scheint *S. aureus* bei CF-Patienten eher den Oropharynx als die Nase zu besiedeln (vgl. Ridder-Schaphorn et al., 2007). Ridder-Schaphorn et al. vermuten, dass der Oropharynx über Sputumauswurf kontaminiert wird. Bei zukünftigen Folgestudien sollten daher auch Rachenabstriche untersucht werden.

Wir haben gezeigt, dass die Bakteriendichte im Sputum signifikant höher als in der Nase von Patienten oder gesunden Probanden ist. Aufgrund von viskosem Mukus, gestörter mukoziliären Clearance und abgeschwächter lokaler Immunabwehr wird wahrscheinlich das Bakterienwachstum vor allem in der Lunge begünstigt. Der Einfluss verschiedener Therapien auf die Bakteriendichte wurde untersucht. Es wurde von anderen Autoren gezeigt, dass die Bakteriendichte nach Beginn einer Modulatortherapie signifikant reduziert wird (Nichols et al., 2023). Wir konnten jedoch keinen signifikanten Effekt der Modulatortherapie auf die *S. aureus* Dichte finden, was durch die niedrige Teilnehmerzahl begründet sein könnte. Die Modulatortherapie zeigte jedoch einen signifikanten Einfluss auf den BMI. Patienten mit Modulatortherapie hatten einen signifikanten höheren BMI als Patienten ohne Therapie. Eine signifikante

Erhöhung der Einsekundenkapazität konnte aber bei niedriger Teilnehmerzahl im Gegensatz zur KONNEKTION Studie (De Boeck et al., 2014a) nicht beobachtet werden.

Zusätzlich wurde die Korrelation einer Antibiotikatherapie und die *S. aureus* Dichte im Sputum untersucht. Die Dichte war niedriger in Proben, die mit Ciprofloxacin oder Cotrimoxazole behandelt worden sind. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Eine Studie, die die Bakteriendichte vor und nach der Antibiotikatherapie mit höherer Teilnehmerzahl untersuchte, könnte der Einfluss der Antibiotikatherapie auf der Dichte nachweisen.

4.3 Phänotypische Heterogenität

Wir konnten zeigen, dass die Heterogenität hoch signifikant abhängig von der Probenart war. Nach der ersten und zweiten Probenahme waren in den Sputa signifikant häufiger unterschiedliche Phänotypen zu beobachten als in den Nasenabstrichen von Patienten oder Probanden. Diese Ergebnisse bestätigen Ergebnisse von Goerke et al. 2007. Die phänotypische Heterogenität war nach der letzten Probenahme nicht signifikant unterschiedlich. Dies ist wahrscheinlich durch die geringere Probenanzahl begründet.

In Sputenproben mit phänotypischer Heterogenität war die Bakteriendichte tendenziell höher ($p = 0,063$). Möglicher Grund für die fehlende Signifikanz ist eine zu niedrige Teilnehmerzahl unserer Studie. Die Tendenz bestätigt allerdings die Ergebnisse von Goerke et al 2007. Die Autoren argumentierten, dass die Heterogenität einen Vorteil für die Gesamtpopulation darstellt (Goerke et al., 2007).

4.4 Genetische Heterogenität

4.4.1 Methoden, um die genetische Heterogenität zu untersuchen.

Zwei gängige Methoden zur genetischen Typisierung der Isolate benutzt. Unterschiede bei der *spa*-Typisierung beruhen auf Mutationen in einem einzelnen Gen (*spa*), während die PFGE-Typisierung das Auftreten von strukturellen Varianten erlaubt.

Diskussion

Die *spa*-Typisierung ist eine schnelle, einfache, kostengünstige und standardisierte Methode. Sie hat eine hohe Diskriminierungsfähigkeit, ist gut reproduzierbar (Aires-de-Sousa et al., 2006) und wird zum Beispiel für die Identifizierung von MRSA-Klustern häufig eingesetzt. Die *spa*-Typen bleiben über die Zeit stabil, wie es eine longitudinale Studie von *S. aureus* bei CF-Patienten zeigte (Kahl et al., 2005b).

Die PFGE ist der Goldstandard der genetischen Typisierung von *S. aureus* wegen ihrer hohen Diskriminierungsfähigkeit. Zusätzlich ist diese Methode kostengünstig, leicht reproduzierbar und einfach. Sie ist aber zeitintensiv, da ein Ergebnis erst nach fünf Tagen auswertbar ist. Außerdem ist die Stammdefinition nicht eindeutig. Die PFGE ermöglicht den DNA-Verdau durch das Restriktionsenzym *SmaI* innerhalb eines Agaroseblöckchens, sodass große DNA-Fragmente entstehen. Diese DNA-Fragmente werden durch ein periodisches elektrisches Feld getrennt und es entsteht ein DNA-Fragmentprofil, das einen Vergleich zwischen den Stämmen ermöglicht. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass strukturelle Varianten erkennbar sind. Dies ist durch sequenzbasierte Methoden in der Regel nicht möglich.

Im folgenden Abschnitt werden andere mögliche Typisierungsmethoden beschrieben und ihre Aussagekraft diskutiert. Die MLST (Multilocus Sequence Typing) löst inzwischen die PFGE als Goldstandard-Methode ab. Bei der MLST werden partielle DNA-Sequenzen von sieben Genen ermittelt. Mittels MLST können Clonal complex (CC) bestimmt werden und damit phylogenetische und epidemiologische Informationen geliefert werden (Enright et al., 2002). MLST ist sehr präzise und gut reproduzierbar, allerdings teuer und arbeitsaufwändig. Dazu ist die Diskriminierungsfähigkeit im Vergleich zu *spa*-Typisierung und PFGE niedriger. Die Ergebnisse der PFGE decken sich im Allgemeinen mit denen, die durch MLST gewonnen werden (Wertheim et al., 2005). Die PFGE wurde in unserer Studie bevorzugt, da sie den Nachweis von strukturellen Varianten erlaubt.

Die Agr-Typisierung ermöglicht die Unterteilung von *S. aureus* Stämmen in vier verschiedene Gruppen (agrI, agrII, agrIII und agrIV) (Shopsin et al., 2003). Diese

Unterteilung erfolgt nach der Sequenzierung von *agrC* und *agrD* Genen. Diese Gene sind zusammen mit *agrA* und *agrB* Genen Teil des *agr* Operons. Der *agr* Operon reguliert Virulenzgene, sodass Agr-positive Stämme pathogener als Agr-negative Stämme sind (Thompson and Brown, 2017). Mutationen in *agrA* und *agrC* Regionen sind verantwortlich für Agr-negative Phänotypen (Somerville et al., 2002). Es wurde gezeigt, dass Agr-negative Stämme eine bessere Anpassungsfähigkeit, vor allem gegen antibiotischen Stress, haben (Paulander et al., 2013). Da Goerke et al. schon gezeigt haben, dass die PFGE eine bessere Diskriminierungskapazität als die Agr-Typisierung hat (Goerke et al., 2005), haben wir die Agr-Aktivität nur auf der phänotypischen Ebene untersucht.

Die Gesamtgenomsequenzierung (WGS) ist ein molekulargenetisches Analyseverfahren, das auf Next Generation Sequencing (NGS) beruht, sodass das Genom vollständig sequenziert und analysiert werden kann. In der vorliegenden Studie wurden Mehrfachisolate zunächst durch PFGE und *spa*-Typisierung charakterisiert. Die WGS der Isolate sollte in nachfolgenden Arbeiten durchgeführt werden. Dadurch kann erfasst werden, in welchem Ausmaß es zu zusätzlichen Mutationen während der Infektion/Kolonisation kommt und wie weit bestimmte Mutationen gehäuft auftreten.

4.4.2 Genetische Diversität der CF-Proben

Die Diversität lässt sich auf der genetischen Ebene in der Lunge durch strukturelle Varianten im PFGE oder Variation des *spa*-Typs untersuchen. Wir haben strukturelle Varianten bei vier Patienten beobachtet und bei sieben Patienten wurde eine Besiedlung mit unterschiedlichen *spa*-Typen nachgewiesen.

Alle Isolate einer Probe konnten immer dem gleichen PFGE-Typ zugeordnet werden, sodass es keinen Hinweis auf gleichzeitige Besiedlung mit verschiedenen Stämmen gab. In einer größeren amerikanischen Studie wurde hingegen beobachtet, dass CF-Patienten häufig mit mehreren *S. aureus*-Stämmen besiedelt werden (Long et al., 2021). Weitere Studien sind notwendig, um zu klären, ob diese Diskrepanz durch das unterschiedliche Studiendesign,

die Studiengröße oder aufgrund unterschiedlicher Patientenkohorten erklärbar ist.

Stämme mit weniger als drei Veränderungen im DNA-Fragmentprofil wurden als klonale Stämme, bzw. als strukturelle Varianten interpretiert. Circa 25% der *S. aureus* Gene sind variabel meist auf „Mobile genetic elements“ (MGE) kodiert (Rumpf et al., 2021). Die Unterschiede im DNA-Fragmentprofil werden wahrscheinlich durch die Insertion, Deletion oder Umlagerung von MGEs verursacht. Die MGEs können die antibiotische Resistenz, Virulenz oder Wirtsanpassung beeinflussen (Lindsay, 2010). Vor allem Phage-Insertion oder Excision in das β -hemolysin Gen (Hlb) geht mit einer Modulation der Virulenz einher (Goerke et al., 2006, Goerke et al., 2004). Wir haben bei strukturellen Varianten jedoch keine Änderung der antibiotischen Resistenz beobachtet. Veränderungen der Virulenz wurden nicht untersucht. In zukünftigen Studien könnte die WGS die molekulare Grundlage der Variationen weiter aufklären; Tier- oder Zellkulturexperimente könnten klären, ob die Varianten die Virulenz beeinflussen.

Wir haben eine Tendenz beobachtet, dass es in der CF-Lunge mehr genetische Heterogenität als in der Nase von gesunden Probanden gibt. Strukturelle Varianten oder Mutation des *spa*-Gens sind Korrelat dieser Heterogenität. Eine zukünftige Studie mit höherer Teilnehmerzahl ist notwendig, um zu zeigen, dass es in der Lunge tatsächlich signifikant häufiger zur Diversifikation der Population kommt.

4.4.3 Korrelation zwischen *spa*-Typisierung und PFGE-Typisierung

Wir haben beobachtet, dass einige Stämme mit identischen DNA-Fragmentprofilen unterschiedliche *spa*-Typen besitzen und dass einige Stämme mit identischen *spa*-Typen strukturelle Varianten waren. Dass die Änderung des *spa*-Typs nicht mit einer Änderung des DNA-Fragmentprofils einhergeht, wurde von Kahl et al. 2005 bereits beobachtet. Trotz identischem DNA-Fragmentprofil haben einige Patienten unterschiedliche *spa*-Typen, die durch Gewinn oder Verlust von Repeat oder Punktmutationen erklärt werden können (Kahl et al., 2005b). Da die DNA-Fragmentprofile identisch sind, ist es wahrscheinlicher, dass

diese Stämme klonal sind und sich mit der Zeit durch Mutationen des *spa*-Gens diversifiziert haben. Eine genaue Analyse der *spa*-Sequenzen könnte diese Hypothese bestätigen. Diese Hypothese wird durch Ergebnisse von Westphal et al. 2020 unterstützt. Während der Kolonisation scheint es zur Akkumulation von *spa*-Mutationen zu kommen. Dies könnte mit einer Reduktion der Protein A abhängigen, proinflammatorischen Antwort korrelieren. Westphal et al. 2020 haben zusätzlich gezeigt, dass je mehr die Patienten mit Antibiotika vorbehandelt wurden, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein einziger *spa*-Typ in der Lunge prädominiert.

4.4.4 Korrelation zwischen phänotypischer und genetischer Heterogenität

Eine Korrelation zwischen phänotypischer und genetischer Heterogenität konnte in dieser Studie nicht gezeigt werden. Wir haben die genetische Heterogenität nur mittels *spa*-Typisierung und PFGE untersucht. Damit kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich diese phänotypischen Unterschiede durch Mutationen anderer wichtiger Gene erklären lassen. Phänotypische Varianten sind häufig abhängig von Mutationen von regulatorischen Systemen. Mutationen des Agr-Systems können zum Beispiel Änderung des Hämolyseverhaltens erklären (Goerke et al., 2007). Mutationen in anderen Regulatorsystemen wie *sigB* könnten ebenfalls zur phänotypischen Variation beitragen. Mutationen im *agr* und *sigB* Operon bei Isolaten von CF-Patienten wurden bereits beschrieben (Long et al., 2021, Goerke et al., 2005).

Fünf Proben (zwei Nasenabstriche und drei Sputa) zeigten keine phänotypische, sondern nur genetische Heterogenität. Veränderungen im *spa*-Gen oder des PFGE-Fragmentprofils führen nicht zu offensichtlichen Veränderungen in der Koloniemorphologie. Es ist daher wichtig, nicht nur phänotypische Varianten genetisch genauer zu untersuchen, sondern auch zufällig phänotypisch identische Kolonien zu typisieren. Damit kann ein genaueres Bild über das Ausmaß der Heterogenität gewonnen werden.

4.4.5 Vergleich der Stämme aus der Lunge und der Nase

Die Isolate von 71% der Patienten (fünf von sieben Patienten) aus der Nase hatten ein ähnliches DNA-Fragmentprofil als Isolate aus Sputa. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Goerke et al. überein (Goerke et al., 2000b). Zwei Patienten hatten in der Nase und im Sputum unterschiedliche *S. aureus* Stämme. Wir vermuten, dass es in der Nase zum Wechsel des Stammes nach Kolonisation der Lunge kam. Um diese Hypothese zu bestätigen, müsste eine retrospektive Studie mit früheren Nasenabstrichen durchgeführt werden.

4.4.6 Genetische Heterogenität über die Zeit

Trotz Heterogenität haben wir keinen Wechsel des Hauptstammes im Sputum beobachtet. 2003 haben Kahl et al. gezeigt, dass der gleiche *S. aureus* Klon für Monate oder Jahre bei den meisten Patienten überwiegt (Kahl et al., 2003).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Ritchie et al. (Ritchie et al., 2016) wurden auch wenige Wechsel der *S. aureus* Stämme in der Nase von gesunden Probanden beobachtet, da bei den meisten Probanden eine Beobachtungszeit von weniger als drei Monaten vorlag. Ein Wechsel des Stammes ist laut Ritchie et al. erst nach sechs bis neun Monaten persistierender Kolonisation zu sehen (Ritchie et al., 2016). Bei zwei gesunden Probanden wurde der *spa*-Typ nach acht Monaten neu untersucht und bei einem Probanden wurde eine Änderung des *spa*-Typs nach acht Monaten beobachtet.

4.5 Agr-Aktivität

15 der 80 untersuchten Nasenabstrichen von gesunden Probanden waren Agr-negativ. Shopsin et al. haben 2008 beobachtet, dass Agr-negative Stämme auch in der Nase gesunder Probanden zu isolieren sind (Shopsin et al., 2008) und es vereinzelt auch zur Ko-Kolonisation von Agr-positiven und Agr-negativen Stämmen kommen kann. In dieser Studie war dies jedoch in keinem der Nasenabstriche von gesunden Probanden nachzuweisen. Agr-Heterogenität wurde aber sowohl im Sputum als auch in Nasenabstrichen von CF-Patienten beobachtet. Agr-negative Stämme sind weniger virulent und es ist wahrscheinlich, dass der Verlust der Agr-Aktivität die langzeitige Kolonisation

begünstigen kann (Goerke et al., 2005, Long et al., 2021). So sind in der Regel Agr defekte Stämme bessere Biofilmbildner (Kong et al., 2006).

Die Agr-Aktivität korrelierte nicht mit Veränderungen im DNA-Fragmentprofil oder *spa*-Typ: Stämme mit gleichen DNA-Fragmentprofilen oder gleichen *spa*-Typen waren sowohl Agr-negativ als Agr-positiv. Mutationen im *agr* Operon sind für die Veränderungen der Aktivität wahrscheinlich. Falsch negative Stämme sind aber mit der Cross-Streak Methode nicht auszuschließen (Traber et al., 2008b). Eine Sequenzierung des *agr* Operons bei Isolaten mit unterschiedlicher Agr-Aktivität wäre hier sinnvoll. Die *agrD* Sequenz erlaubt zusätzlich die Zuordnung zu einem bestimmten Agr-Typ. Dadurch könnte geklärt werden, ob der Agr-Typ mit dem *spa*-Typ korreliert. 2020 haben Lange et al. gezeigt, dass der Haupt-*spa*-Typ einem Agr-Typ zugeordnet werden kann (Lange et al., 2020).

4.6 Resistenzen

Trotz häufiger antibiotischer Therapie waren die meisten Isolate sensibel für die zwölf untersuchten Antibiotika. Es wurde kein MRSA nachgewiesen. Der jährliche Report des deutschen CF Registers hat 2021 eine MRSA Prävalenz von 4% bei CF-Patienten angegeben (Nährlich L. (ed.), 2021), sodass der Nachweis ein MRSA bei unseren niedrigen Teilnehmerzahl unwahrscheinlich wäre.

Mindestens 50% der Sputenproben waren aber resistent gegen Ciprofloxacin. Diese hohe Resistenzrate war nicht in der Nase von Patienten oder gesunde Probanden nachweisbar. Wir vermuten, dass die hohe Resistenzrate mit einer früheren Therapie mit Ciprofloxacin korreliert. Nicht alle therapierten Patienten hatten resistente Isolate in der Lunge. Vier Patienten hatten trotz Ciprofloxacintherapie keine resistenten Isolate. Zwei Patienten wurden nicht mit Ciprofloxacin therapiert und es wurde in deren Sputenprobe keinen resistenten Isolaten nachgewiesen.

Wie Resistenz gegen Ciprofloxacin entsteht, wurde von Hooper et al. beschrieben. Mutationen der Topoisomerase oder erhöhte Produktion der endogenen Effluxpumpe *NorA* verursachen Resistenzen gegen Ciprofloxacin (Hooper and Jacoby, 2015). Wir haben zusätzlich beobachtet, dass sich die Resistenz über die Zeit veränderte. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von

Diskussion

Schwerdt et al. überein, die auch eine Fluktuation der Resistenzlage über Jahre beobachtet haben und somit vermuten, dass diese Fluktuation Gewinn oder Verlust von Resistenzgenen zeigt (Schwerdt et al., 2018). Es wurde in dieser Arbeit diese Fluktuation über eine kurze Zeit beobachtet, sodass wir vermuten, dass der Gewinn oder Verlust von Resistenzgenen häufig und schnell stattfindet.

Es waren wenige resistente Isolate gegen Erythromycin sowohl im Sputum als auch in der Nase von CF-Patienten. Ein Patient hatte sowohl in der Nase als auch im Sputum nur resistente Isolate und wurde 2010 mit Azithromycin behandelt. Pfaff et al. haben gezeigt, dass eine langzeitige Therapie mit Azithromycin erhöhte Resistenzen gegen Makroliden fördert (Phaff et al., 2006). Unser Patient wurde sieben Monate lang mit Azithromycin therapiert und zeigt neun Jahre nach der Therapie resistente Stämme. Pfaff et al. haben drei Mechanismen beschrieben, die diese erhöhte Makrolidresistenz verursachen könnten. Nach Azithromycingabe werden sensible Isolate eradiziert und es überleben nur Isolate mit intrinsischer Resistenz gegen Makrolide. Eine zweite Möglichkeit ist, dass die Resistenz nach verschiedenen Mutationen entstanden ist. Als letzte könnten die resistenten Isolate von anderen Patienten übertragen worden sein (Phaff et al., 2006).

Goerke et al. haben eine Heterogenität der Resistenzlage gegen Antibiotika beobachtet. Unterschiedliche Resistenzlage war in vielen Antibiotikaklassen zu sehen (Goerke et al., 2007). Wir haben hingegen eine hohe Heterogenität nur gegen Ciprofloxacin und in wenigen Proben gegen Gentamicin und Erythromycin beobachtet. Wobei Goerke et al. die Heterogenität der Resistenzlage nur in phänotypisch unterschiedlichen Isolaten untersucht haben, wurden in dieser Arbeit für alle Isolate untersucht. Eine Probe, in der alle Isolate phänotypisch identisch waren, zeigte unterschiedliche Resistenzen. Da nur wenig Patienten an der Studie teilgenommen haben, sollte eine Studie mit höherer Teilnehmeranzahl die Resistenz auch für phänotypisch identische Isolate untersuchen, um die klinische Relevanz dieses Ergebnisses zu beurteilen.

5 Zusammenfassung

Die zystische Fibrose ist eine genetische Stoffwechselerkrankung, die aufgrund einer Mutation des CFTR-Gens zu einer gestörten Funktion des CFTR-Anionkanals führt. In der Lunge kommt es unter anderem zu einer erhöhten Viskosität des Schleims. Diese modifizierte Physiologie der Atemwege begünstigt die Besiedlung mit Pathogenen.

Staphylococcus aureus ist einer der häufigsten Keime, die mit der zystischen Fibrose assoziiert sind. Besonders bei jungen Patienten ist es eine Ursache für chronische Infektionen, wiederholte Antibiotikatherapie und Verminderung der Lungenfunktion. Dabei kommt es zur Anpassung der Bakterienpopulationen an die spezifischen Bedingungen. Verschiedene Studie haben gezeigt, dass es in der CF-Lunge zu einer erhöhten phänotypischen sowie genetischen Diversität von *S. aureus* kommt. Die genetische Diversität wurde bis jetzt nur zwischen phänotypischen Varianten untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu untersuchen, ob phänotypisch identische *S. aureus* Kolonien genetische Heterogenität zeigen und ob sich die Diversifikation in der Antibiotikaresistenz und Agr-Aktivität widerspiegelt. Es wurden Sputen und Nasenabstriche von zwölf CF-Patienten sowie Nasenabstrichen von neun gesunden Probanden über zwei Jahre gesammelt. Zwei bis drei Folgeuntersuchungen pro Probanden wurden durchgeführt. Pro Probe wurden mindestens fünf Kolonien isoliert und für weitere Untersuchungen eingefroren. Es wurden besonders *S. aureus* Kolonien mit auffallend unterschiedlichem Phänotyp (Hämolyse, Farbe, Größe) isoliert. Die *S. aureus* Isolate wurden auf phänotypische und genetische Diversität mittels PFGE und *spa*-Typisierung, Agr-Aktivität und Antibiotikaresistenzen untersucht. Von allen Patienten wurden dazu klinische Daten erhoben.

Eine höchste phänotypische Diversität wurde in der Lunge von CF-Patienten beobachtet. Mit Hilfe von PFGE und *spa*-Typisierung könnte nachgewiesen werden, dass diese Diversität auch auf genetischer Ebene zu beobachten ist. Jedoch konnten wir keine Korrelation zwischen phänotypischer und genetischer Diversität nachweisen.

Zusammenfassung

Trotz häufiger antibiotischer Therapie waren die meistens Isolate sensibel für die zwölf untersuchten Antibiotika. 50% der Sputumproben waren resistent gegen Ciprofloxacin. Wir haben eine Fluktuation der Resistenzlage über die Zeit beobachtet, sodass wir vermuten, dass es zu schnellem Gewinn oder Verlust von Resistenzgenen kommt. Heterogenität des Resistenzverhaltens haben wir vor allem gegen Ciprofloxacin und in wenigen Proben gegen Gentamicin und Erythromycin beobachtet. Ob eine genauere Resistenztestung von phänotypisch identischen Isolaten eine klinische Relevanz hat, sollte eine Studie mit höherer Teilnehmeranzahl untersuchen.

Es ist daher wichtig, nicht nur phänotypische Varianten genetisch genauer zu untersuchen, sondern auch zufällig phänotypisch identische Kolonien zu typisieren, um ein genaueres Bild der Heterogenität zu bekommen. Durch „long-read und short-read Next Generation Sequencing“ sollte in weiteren Arbeiten geklärt werden, welche genetischen Veränderungen in den *S. aureus* Populationen auftreten.

6 Literaturverzeichnis

- AHLGREN, H. G., BENEDETTI, A., LANDRY, J. S., BERNIER, J., MATOUK, E., RADZIOCH, D., LANDS, L. C., ROUSSEAU, S. & NGUYEN, D. 2015. Clinical outcomes associated with *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* airway infections in adult cystic fibrosis patients. *BMC Pulm Med*, 15, 67.
- AIRES-DE-SOUSA, M., BOYE, K., DE LENCATRE, H., DEPLANO, A., ENRIGHT, M. C., ETIENNE, J., FRIEDRICH, A., HARMSSEN, D., HOLMES, A., HUIJSDENS, X. W., KEARNS, A. M., MELLMANN, A., MEUGNIER, H., RASHEED, J. K., SPALBURG, E., STROMMENGER, B., STRUELENS, M. J., TENOVER, F. C., THOMAS, J., VOGEL, U., WESTH, H., XU, J. & WITTE, W. 2006. High interlaboratory reproducibility of DNA sequence-based typing of bacteria in a multicenter study. *J Clin Microbiol*, 44, 619-21.
- BARASCH, J., KISS, B., PRINCE, A., SAIMAN, L., GRUENERT, D. & AI-AWQATI, Q. 1991. Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature*, 352, 70-73.
- BERNARDY, E. E., PETIT, R. A., RAGHURAM, V., ALEXANDER, A. M., READ, T. D. & GOLDBERG, J. B. 2019. Genotypic and phenotypic diversity of *Staphylococcus aureus* from cystic fibrosis lung infections and their interactions with *Pseudomonas aeruginosa*. *bioRxiv*, 814152.
- BESIER, S., SMACZNY, C., VON MALLINCKRODT, C., KRAHL, A., ACKERMANN, H., BRADE, V. & WICHELHAUS, T. A. 2007. Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Microbiol*, 45, 168-72.
- BESIER, S., ZANDER, J., KAHL, B. C., KRAICZY, P., BRADE, V. & WICHELHAUS, T. A. 2008. The thymidine-dependent small-colony-variant phenotype is associated with hypermutability and antibiotic resistance in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 2183-9.
- BIEN, J., SOKOLOVA, O. & BOZKO, P. 2011. Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *Journal of pathogens*, 2011, 601905-601905.
- BOKAREWA, M. I., JIN, T. & TARKOWSKI, A. 2006. *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38, 504-509.
- BRONNER, S., MONTEIL, H. & PRÉVOST, G. 2004. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS microbiology reviews*, 28, 183-200.
- BUTTERFIELD, J. M., TSUJI, B. T., BROWN, J., ASHLEY, E. D., HARDY, D., BROWN, K., FORREST, A. & LODISE, T. P. 2011. Predictors of agr dysfunction in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates among patients with MRSA bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 5433-7.
- CANTIN, A. M., HARTL, D., KONSTAN, M. W. & CHMIEL, J. F. 2015. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *Journal of Cystic Fibrosis*, 14, 419-430.
- CHALMERS, S. J. & WYLAM, M. E. 2020. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection and Treatment Options. *Methods Mol Biol*, 2069, 229-251.
- CHAMPNEY, W. S., CHITTUM, H. S. & TOBER, C. L. 2003. A 50S Ribosomal Subunit Precursor Particle Is a Substrate for the ErmC Methyltransferase in *Staphylococcus aureus* Cells. *Current Microbiology*, 46, 0453-0460.
- CLARKE, S. R., WILTSHIRE, M. D. & FOSTER, S. J. 2004. IsdA of *Staphylococcus aureus* is a broad spectrum, iron-regulated adhesin. *Molecular microbiology*, 51, 1509-1519.
- CLAUDITZ, A., RESCH, A., WIELAND, K.-P., PESCHEL, A. & GÖTZ, F. 2006. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. *Infection and immunity*, 74, 4950-4953.

Literaturverzeichnis

- CLEMENT, A., TAMALET, A., LEROUX, E., RAVILLY, S., FAUROUX, B. & JAIS, J. P. 2006. Long term effects of azithromycin in patients with cystic fibrosis: A double blind, placebo controlled trial. *Thorax*, 61, 895-902.
- CLEMENT, S., VAUDAUX, P., FRANCOIS, P., SCHRENZEL, J., HUGGLER, E., KAMPF, S., CHAPONNIER, C., LEW, D. & LACROIX, J.-S. 2005. Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *The Journal of infectious diseases*, 192, 1023-1028.
- DASENBROOK, E. C., CHECKLEY, W., MERLO, C. A., KONSTAN, M. W., LECHTZIN, N. & BOYLE, M. P. 2010. Association between respiratory tract methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and survival in cystic fibrosis. *Jama*, 303, 2386-92.
- DAVIES, J. C., WAINWRIGHT, C. E., SAWICKI, G. S., HIGGINS, M. N., CAMPBELL, D., HARRIS, C., PANORCHAN, P., HASELTINE, E., TIAN, S. & ROSENFELD, M. 2021. Ivacaftor in Infants Aged 4 to <12 Months with Cystic Fibrosis and a Gating Mutation. Results of a Two-Part Phase 3 Clinical Trial. *Am J Respir Crit Care Med*, 203, 585-593.
- DE BOECK, K., MUNCK, A., WALKER, S., FARO, A., HIATT, P., GILMARTIN, G. & HIGGINS, M. 2014a. Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis and a non-G551D gating mutation. *Journal of Cystic Fibrosis*, 13, 674-680.
- DE BOECK, K., ZOLIN, A., CUPPENS, H., OLESEN, H. V. & VIVIANI, L. 2014b. The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 13, 403-409.
- EBERL, L. & TÜMMLER, B. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation. *Int J Med Microbiol*, 294, 123-31.
- ELBORN, J. S. 2016. Cystic fibrosis. *The Lancet*, 388, 2519-2531.
- ENRIGHT, M. C., ROBINSON, D. A., RANDLE, G., FEIL, E. J., GRUNDMANN, H. & SPRATT, B. G. 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 7687-7692.
- FOSTER, T. J. 2017. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiology Reviews*, 41, 430-449.
- GEORGE, S. E., HRUBESCH, J., BREUING, I., VETTER, N., KORN, N., HENNEMANN, K., BLEUL, L., WILLMANN, M., EBNER, P., GOTZ, F. & WOLZ, C. 2019. Oxidative stress drives the selection of quorum sensing mutants in the *Staphylococcus aureus* population. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 19145-19154.
- GOERKE, C., CAMPANA, S., BAYER, M. G., DORING, G., BOTZENHART, K. & WOLZ, C. 2000a. Direct quantitative transcript analysis of the *agr* regulon of *Staphylococcus aureus* during human infection in comparison to the expression profile in vitro. *Infect Immun*, 68, 1304-11.
- GOERKE, C., ESSER, S., KÜMMEL, M. & WOLZ, C. 2005. *Staphylococcus aureus* strain designation by *agr* and *cap* polymorphism typing and delineation of *agr* diversification by sequence analysis. *Int J Med Microbiol*, 295, 67-75.
- GOERKE, C., GRESSINGER, M., ENDLER, K., BREITKOPF, C., WARDECKI, K., STERN, M., WOLZ, C. & KAHL, B. C. 2007. High phenotypic diversity in infecting but not in colonizing *Staphylococcus aureus* populations. *Environmental Microbiology*, 9, 3134-3142.
- GOERKE, C., KRANING, K., STERN, M., DÖRING, G., BOTZENHART, K. & WOLZ, C. 2000b. Molecular Epidemiology of Community-Acquired *Staphylococcus aureus* in Families with and without Cystic Fibrosis Patients. *The Journal of Infectious Diseases*, 181, 984-989.
- GOERKE, C., MATIAS Y PAPERBERG, S., DASBACH, S., DIETZ, K., ZIEBACH, R., KAHL, B. C. & WOLZ, C. 2004. Increased frequency of genomic alterations in *Staphylococcus aureus* during chronic infection is in part due to phage mobilization. *J Infect Dis*, 189, 724-34.

Literaturverzeichnis

- GOERKE, C., WIRTZ, C., FLUCKIGER, U. & WOLZ, C. 2006. Extensive phage dynamics in *Staphylococcus aureus* contributes to adaptation to the human host during infection. *Mol Microbiol*, 61, 1673-85.
- GOERKE, C. & WOLZ, C. 2010. Adaptation of *Staphylococcus aureus* to the cystic fibrosis lung. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 300, 520-525.
- GRAY, M. A. 2004. Bicarbonate secretion: it takes two to tango. *Nature Cell Biology*, 6, 292-294.
- HANSSEN, A.-M., KINDLUND, B., STENKLEV, N. C., FURBERG, A.-S., FISMEN, S., OLSEN, R. S., JOHANNESSEN, M. & SOLLID, J. U. E. 2017. Localization of *Staphylococcus aureus* in tissue from the nasal vestibule in healthy carriers. *BMC microbiology*, 17, 89-89.
- HARMSSEN, D., CLAUS, H., WITTE, W., ROTHGÄNGER, J., CLAUS, H., TURNWALD, D. & VOGEL, U. 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *J Clin Microbiol*, 41, 5442-8.
- HARTL, D., GAGGAR, A., BRUSCIA, E., HECTOR, A., MARCOS, V., JUNG, A., GREENE, C., MCELVANEY, G., MALL, M. & DÖRING, G. 2012. Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. *Journal of Cystic Fibrosis*, 11, 363-382.
- HIRSCHHAUSEN, N., BLOCK, D., BIANCONI, I., BRAGONZI, A., BIRTEL, J., LEE, J. C., DÜBBERS, A., KÜSTER, P., KAHL, J., PETERS, G. & KAHL, B. C. 2013a. Extended *Staphylococcus aureus* persistence in cystic fibrosis is associated with bacterial adaptation. *Int J Med Microbiol*, 303, 685-92.
- HIRSCHHAUSEN, N., BLOCK, D., BIANCONI, I., BRAGONZI, A., BIRTEL, J., LEE, J. C., DÜBBERS, A., KÜSTER, P., KAHL, J., PETERS, G. & KAHL, B. C. 2013b. Extended *Staphylococcus aureus* persistence in cystic fibrosis is associated with bacterial adaptation. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 303, 685-692.
- HOGARDT, M. & HEESEMANN, J. 2010. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol*, 300, 557-62.
- HOOPER, D. C. & JACOBY, G. A. 2015. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci*, 1354, 12-31.
- HUBERT, D., RÉGLIER-POUPET, H., SERMET-GAUDELUS, I., FERRONI, A., LE BOURGEOIS, M., BURGEL, P.-R., SERREAU, R., DUSSEY, D., POYART, C. & COSTE, J. 2013. Association between *Staphylococcus aureus* alone or combined with *Pseudomonas aeruginosa* and the clinical condition of patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 12, 497-503.
- JUNGE, S., GÖRLICH, D., DEN REIJER, M., WIEDEMANN, B., TÜMMLER, B., ELLEMUNTER, H., DÜBBERS, A., KÜSTER, P., BALLMANN, M., KOERNER-RETTBERG, C., GROßE-ONNEBRINK, J., HEUER, E., SEXTRO, W., MAINZ, J. G., HAMMERMANN, J., RIETHMÜLLER, J., GRAEPLER-MAINKA, U., STAAB, D., WOLLSCHLÄGER, B., SZCZEPANSKI, R., SCHUSTER, A., TEGTMEYER, F. K., SUTHARSAN, S., WALD, A., NOFER, J. R., VAN WAMEL, W., BECKER, K., PETERS, G. & KAHL, B. C. 2016. Factors Associated with Worse Lung Function in Cystic Fibrosis Patients with Persistent *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 11, e0166220.
- KAHL, B., HERRMANN, M., EVERDING, A. S., KOCH, H. G., BECKER, K., HARMS, E., PROCTOR, R. A. & PETERS, G. 1998. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis*, 177, 1023-9.
- KAHL, B. C. 2010. Impact of *Staphylococcus aureus* on the pathogenesis of chronic cystic fibrosis lung disease. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 514-519.
- KAHL, B. C., BELLING, G., BECKER, P., CHATTERJEE, I., WARDECKI, K., HILGERT, K., CHEUNG, A. L., PETERS, G. & HERRMANN, M. 2005a. Thymidine-dependent *Staphylococcus aureus*

Literaturverzeichnis

- small-colony variants are associated with extensive alterations in regulator and virulence gene expression profiles. *Infect Immun*, 73, 4119-26.
- KAHL, B. C., DUEBBERS, A., LUBRITZ, G., HAEBERLE, J., KOCH, H. G., RITZERFELD, B., REILLY, M., HARMS, E., PROCTOR, R. A., HERRMANN, M. & PETERS, G. 2003. Population dynamics of persistent *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. *J Clin Microbiol*, 41, 4424-7.
- KAHL, B. C., MELLMANN, A., DEIWICK, S., PETERS, G. & HARMSEN, D. 2005b. Variation of the polymorphic region X of the protein A gene during persistent airway infection of cystic fibrosis patients reflects two independent mechanisms of genetic change in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 43, 502-5.
- KANEKO, J. & KAMIO, Y. 2004. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 68, 981-1003.
- KIENINGER, E., WILLERS, C., RÖTHLISBERGER, K., YAMMINE, S., PUSTERLA, O., BAUMAN, G., STRANZINGER, E., BIERI, O., LATZIN, P. & CASALTA, C. 2022. Effect of Salbutamol on Lung Ventilation in Children with Cystic Fibrosis: Comprehensive Assessment Using Spirometry, Multiple-Breath Washout, and Functional Lung Magnetic Resonance Imaging. *Respiration*, 101, 281-290.
- KIM, C., MILHEIRIÇO, C., GARDETE, S., HOLMES, M. A., HOLDEN, M. T. G., DE LENCASTRE, H. & TOMASZ, A. 2012. Properties of a novel PBP2A protein homolog from *Staphylococcus aureus* strain LGA251 and its contribution to the β -lactam-resistant phenotype. *The Journal of biological chemistry*, 287, 36854-36863.
- KINSMAN, O. S., MCKENNA, R. & NOBLE, W. C. 1983. Association between histocompatibility antigens (HLA) and nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *Journal of medical microbiology*, 16, 215-220.
- KOHLER, T., WEIDENMAIER, C. & PESCHEL, A. 2009. Wall teichoic acid protects *Staphylococcus aureus* against antimicrobial fatty acids from human skin. *Journal of bacteriology*, 191, 4482-4484.
- KONG, K. F., VUONG, C. & OTTO, M. 2006. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol*, 296, 133-9.
- LANGE, J., HEIDENREICH, K., HIGELIN, K., DYCK, K., MARX, V., REICHEL, C., WAMEL, W. V., REIJER, M. D., GORLICH, D. & KAHL, B. C. 2020. *Staphylococcus aureus* Pathogenicity in Cystic Fibrosis Patients-Results from an Observational Prospective Multicenter Study Concerning Virulence Genes, Phylogeny, and Gene Plasticity. *Toxins (Basel)*, 12.
- LE GARS, M., DESCAMPS, D., ROUSSEL, D., SAUSSEREAU, E., GUILLOT, L., RUFFIN, M., TABARY, O., HONG, S.-S., BOULANGER, P. & PAULAIS, M. 2013. Neutrophil elastase degrades cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via calpains and disables channel function in vitro and in vivo. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 187, 170-179.
- LIM, D. & STRYNADKA, N. C. J. 2002. Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature structural biology*, 9, 870-876.
- LINDSAY, J. A. 2010. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 98-103.
- LOMMATZSCH, S. T. 2020. Infection prevention and chronic disease management in cystic fibrosis and noncystic fibrosis bronchiectasis. *Ther Adv Respir Dis*, 14, 1753466620905272.
- LONG, D. R., WOLTER, D. J., LEE, M., PRECIT, M., MCLEAN, K., HOLMES, E., PENEWIT, K., WAALKES, A., HOFFMAN, L. R. & SALIPANTE, S. J. 2021. Polyclonality, Shared Strains,

- and Convergent Evolution in Chronic Cystic Fibrosis Staphylococcus aureus Airway Infection. *Am J Respir Crit Care Med*, 203, 1127-1137.
- LOWY, F. D. 1998. Staphylococcus aureus infections. *The New England journal of medicine*, 339, 520-532.
- MAGRÉAULT, S., ROY, C., LAUNAY, M., SERMET-GAUDELUS, I. & JULLIEN, V. 2021. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Optimization of Antibiotic Therapy in Cystic Fibrosis Patients: Current Evidences, Gaps in Knowledge and Future Directions. *Clinical Pharmacokinetics*, 60, 409-445.
- MENESTRINA, G., SERRA, M. D. & PRÉVOST, G. 2001. Mode of action of beta-barrel pore-forming toxins of the staphylococcal alpha-hemolysin family. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 39, 1661-1672.
- MOSSOP, M., ROBINSON, L., JIANG, J.-H., PELEG, A. Y., BLAKEWAY, L. V., MACESIC, N., PERRY, A., BOURKE, S., ULHUQ, F. R. & PALMER, T. 2023. Characterisation of key genotypic and phenotypic traits of clinical cystic fibrosis Staphylococcus aureus isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 72.
- NÄHRlich, L., STUHRMANN-SPANGENBERG, M., BARBEN, J., BARGON, J., BLANKENSTEIND, O., BREMER, W., BRUNSMANN, F., BUCHHOLZ, T., ELLEMUNTER, H., FUSCH, C., GEMBRUCH, U., HAMMERMANN, J., JACOBEIT, J., JUNG, A., KEIM, V., LOFF, S., MAYR, S., PFEIFFER-AULER, S., ROSSI, R., SITTER, S., STERN, M., STRAßBURG, C., DERICHS, N. 2013. S2-Konsensus-Leitlinie „Diagnose der Mukoviszidose“ (AWMF 026-023) unter Federführung der Gesellschaft für Pädiatrischen Pneumologie. *AWMF online Das Portal der wissenschaftlichen Medizin*, 026/023.
- NÄHRlich L. (ED.), B. M., WOSNIOK J. 2021. German Cystic Fibrosis Registry Annual Report. *Mukoviszidose e.V.*
- NEOH, H. M., TAN, X. E., SAPRI, H. F. & TAN, T. L. 2019. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives. *Infect Genet Evol*, 74, 103935.
- NEVITT, S. J., THORNTON, J., MURRAY, C. S. & DWYER, T. 2020. Inhaled mannitol for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 5, Cd008649.
- NICHOLS, D. P., MORGAN, S. J., SKALLAND, M., VO, A. T., VAN DALFSEN, J. M., SINGH, S. B., NI, W., HOFFMAN, L. R., MCGEER, K., HELTSHE, S. L., CLANCY, J. P., ROWE, S. M., JORTH, P. & SINGH, P. K. 2023. Pharmacologic improvement of CFTR function rapidly decreases sputum pathogen density, but lung infections generally persist. *J Clin Invest*, 133.
- PALLENBERG, S. T., PUST, M. M., ROSENBOOM, I., HANSEN, G., WIEHLMANN, L., DITTRICH, A. M. & TÜMMLER, B. 2022. Impact of Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor Therapy on the Cystic Fibrosis Airway Microbial Metagenome. *Microbiol Spectr*, 10, e0145422.
- PAULANDER, W., NISSEN VARMING, A., BÆK, K. T., HAABER, J., FREES, D. & INGMER, H. 2013. Antibiotic-mediated selection of quorum-sensing-negative Staphylococcus aureus. *mBio*, 3, e00459.
- PEZZULO, A. A., TANG, X. X., HOEGGER, M. J., ALAIWA, M. H. A., RAMACHANDRAN, S., MONINGER, T. O., KARP, P. H., WOHLFORD-LENANE, C. L., HAAGSMAN, H. P. & VAN EIJK, M. 2012. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature*, 487, 109-113.
- PHAFF, S. J., TIDDENS, H. A. W. M., VERBRUGH, H. A. & OTT, A. 2006. Macrolide resistance of Staphylococcus aureus and Haemophilus species associated with long-term azithromycin use in cystic fibrosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, 741-746.
- PROCTOR, R. A., VON EIFF, C., KAHL, B. C., BECKER, K., MCNAMARA, P., HERRMANN, M. & PETERS, G. 2006. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol*, 4, 295-305.

Literaturverzeichnis

- PYNNONEN, M., STEPHENSON, R. E., SCHWARTZ, K., HERNANDEZ, M. & BOLES, B. R. 2011. Hemoglobin promotes *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *PLoS pathogens*, 7, e1002104-e1002104.
- QUAN, J. M., TIDDENS, H. A., SY, J. P., MCKENZIE, S. G., MONTGOMERY, M. D., ROBINSON, P. J., WOHL, M. E. & KONSTAN, M. W. 2001. A two-year randomized, placebo-controlled trial of dornase alfa in young patients with cystic fibrosis with mild lung function abnormalities. *J Pediatr*, 139, 813-20.
- QUAVE, C. L. & HORSWILL, A. R. 2014. Flipping the switch: tools for detecting small molecule inhibitors of staphylococcal virulence. *Front Microbiol*, 5, 706.
- RADTKE, T., SMITH, S., NEVITT, S. J., HEBESTREIT, H. & KRIEMLER, S. 2022. Physical activity and exercise training in cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 8, Cd002768.
- RAMIREZ, M. S. & TOLMASKY, M. E. 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, 13, 151-171.
- RAMOS, K. J., SMITH, P. J., MCKONE, E. F., PILEWSKI, J. M., LUCY, A., HEMPSTEAD, S. E., TALLARICO, E., FARO, A., ROSENBLUTH, D. B., GRAY, A. L. & DUNITZ, J. M. 2019. Lung transplant referral for individuals with cystic fibrosis: Cystic Fibrosis Foundation consensus guidelines. *J Cyst Fibros*, 18, 321-333.
- RAMSEY, B. W., DAVIES, J., MCELVANEY, N. G., TULLIS, E., BELL, S. C., DŘEVÍNEK, P., GRIESE, M., MCKONE, E. F., WAINWRIGHT, C. E., KONSTAN, M. W., MOSS, R., RATJEN, F., SERMET-GAUDELUS, I., ROWE, S. M., DONG, Q., RODRIGUEZ, S., YEN, K., ORDOÑEZ, C. & ELBORN, J. S. 2011. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med*, 365, 1663-72.
- RAYNER, C. & MUNCKHOF, W. 2005. Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Internal medicine journal*, 35, S3-16.
- REGISTRY, C. F. F. P. 2022. 2021 Annual Data Report. Bethesda, Maryland, @2022 Cystic Fibrosis Foundation.
- REN, C. L., MORGAN, W. J., KONSTAN, M. W., SCHECHTER, M. S., WAGENER, J. S., FISHER, K. A. & REGELMANN, W. E. 2007. Presence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in respiratory cultures from cystic fibrosis patients is associated with lower lung function. *Pediatr Pulmonol*, 42, 513-8.
- RIDDER-SCHAPHORN, S., RATJEN, F., DÜBBERS, A., HÄBERLE, J., FALK, S., KÜSTER, P., SCHUSTER, A., MELLIES, U., LÖWE, B., REINTJES, R., PETERS, G. & KAHL, B. C. 2007. Nasal *Staphylococcus aureus* carriage is not a risk factor for lower-airway infection in young cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*, 45, 2979-84.
- RITCHIE, S. R., ISDALE, E., PRIEST, P., RAINEY, P. B. & THOMAS, M. G. 2016. The turnover of strains in intermittent and persistent nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Infection*, 72, 295-301.
- ROSENFELD, M., RAYNER, O. & SMYTH, A. R. 2020. Prophylactic anti-staphylococcal antibiotics for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 9, Cd001912.
- RUIMY, R., ANGEBAULT, C., DJOSSOU, F., DUPONT, C., EPELBOIN, L., JARRAUD, S., LEFEVRE, L. A., BES, M., LIXANDRU, B. E., BERTINE, M., EL MINIAI, A., RENARD, M., BETTINGER, R. M., LESCAT, M., CLERMONT, O., PEROZ, G., LINA, G., TAVAKOL, M., VANDENESCH, F., VAN BELKUM, A., ROUSSET, F. & ANDREMONT, A. 2010. Are host genetics the predominant determinant of persistent nasal *Staphylococcus aureus* carriage in humans? *The Journal of infectious diseases*, 202, 924-934.
- RUMPF, C., LANGE, J., SCHWARTBECK, B. & KAHL, B. C. 2021. *Staphylococcus aureus* and Cystic Fibrosis-A Close Relationship. What Can We Learn from Sequencing Studies? *Pathogens*, 10.

Literaturverzeichnis

- SAKR, A., BRÉGEON, F., MÈGE, J.-L., ROLAIN, J.-M. & BLIN, O. 2018. Staphylococcus aureus Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. *Frontiers in microbiology*, 9, 2419-2419.
- SCHAFFER, A. C., SOLINGA, R. M., COCCHIARO, J., PORTOLES, M., KISER, K. B., RISLEY, A., RANDALL, S. M., VALTULINA, V., SPEZIALE, P., WALSH, E., FOSTER, T. & LEE, J. C. 2006. Immunization with Staphylococcus aureus clumping factor B, a major determinant in nasal carriage, reduces nasal colonization in a murine model. *Infection and immunity*, 74, 2145-2153.
- SCHILCHER, K. & HORSWILL, A. R. 2020. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiol Mol Biol Rev*, 84.
- SCHRÖDER, W., GOERKE, C. & WOLZ, C. 2013. Opposing effects of aminocoumarins and fluoroquinolones on the SOS response and adaptability in Staphylococcus aureus. *J Antimicrob Chemother*, 68, 529-38.
- SCHWERDT, M., NEUMANN, C., SCHWARTBECK, B., KAMPMEIER, S., HERZOG, S., GÖRLICH, D., DÜBBERS, A., GROÙE-ONNEBRINK, J., KESSLER, C., KÜSTER, P., SCHÜLTINGKEMPER, H., TREFFON, J., PETERS, G. & KAHL, B. C. 2018. Staphylococcus aureus in the airways of cystic fibrosis patients - A retrospective long-term study. *International Journal of Medical Microbiology*, 308, 631-639.
- SHEI, R.-J., PEABODY, J. E., KAZA, N. & ROWE, S. M. 2018. The epithelial sodium channel (ENaC) as a therapeutic target for cystic fibrosis. *Current opinion in pharmacology*, 43, 152-165.
- SHOPSIN, B., DRLICA-WAGNER, A., MATHEMA, B., ADHIKARI, R. P., KREISWIRTH, B. N. & NOVICK, R. 2008. Prevalence of agr Dysfunction among Colonizing Staphylococcus aureus Strains. *The Journal of Infectious Diseases*, 198, 1171-1174.
- SHOPSIN, B., MATHEMA, B., ALCABES, P., SAID-SALIM, B., LINA, G., MATSUKA, A., MARTINEZ, J. & KREISWIRTH, B. N. 2003. Prevalence of agr specificity groups among Staphylococcus aureus strains colonizing children and their guardians. *J Clin Microbiol*, 41, 456-9.
- SIVARAMAN, K., VENKATARAMAN, N. & COLE, A. M. 2009. Staphylococcus aureus nasal carriage and its contributing factors. *Future microbiology*, 4, 999-1008.
- SOMERVILLE, G. A., BERES, S. B., FITZGERALD, J. R., DELEO, F. R., COLE, R. L., HOFF, J. S. & MUSSER, J. M. 2002. In vitro serial passage of Staphylococcus aureus: changes in physiology, virulence factor production, and agr nucleotide sequence. *J Bacteriol*, 184, 1430-7.
- SOUTHERN, K. W., CASTELLANI, C., LAMMERTYN, E., SMYTH, A., VANDEVANTER, D., VAN KONINGSBRUGGEN-RIETSCHER, S., BARBEN, J., BEVAN, A., BROKAAR, E., COLLINS, S., CONNETT, G. J., DANIELS, T. W. V., DAVIES, J., DECLERCQ, D., GARTNER, S., GRAMEGNA, A., HAMILTON, N., HAUSER, J., KASHIRSKAYA, N., KESSLER, L., LOWDON, J., MAKUKH, H., MARTIN, C., MORRISON, L., NAZARETH, D., NOORDHOEK, J., O'NEILL, C., OWEN, E., OXLEY, H., RARAIGH, K. S., RAYNAL, C., ROBINSON, K., ROEHMEL, J., SCHWARZ, C., SERMET, I., SHTEINBERG, M., SINHA, I., TAKAWIRA, C., VAN MOURIK, P., VERKLEIJ, M., WALLER, M. D. & DUFF, A. 2023. Standards of care for CFTR variant-specific therapy (including modulators) for people with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 22, 17-30.
- STEIN, G. E. & JOHNSON, L. B. 2011. Ceftaroline: A Novel Cephalosporin with Activity against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Clinical Infectious Diseases*, 52, 1156-1163.
- STONE, A., QUITTELL, L., ZHOU, J., ALBA, L., BHAT, M., DECELIE-GERMANA, J., RAJAN, S., BONITZ, L., WELTER, J. J., DOZOR, A. J., GHERSON, I., LOWY, F. D. & SAIMAN, L. 2009. Staphylococcus aureus nasal colonization among pediatric cystic fibrosis patients and their household contacts. *Pediatr Infect Dis J*, 28, 895-9.

- SULIGOY, C. M., LATTAR, S. M., NOTO LLANA, M., GONZÁLEZ, C. D., ALVAREZ, L. P., ROBINSON, D. A., GÓMEZ, M. I., BUZZOLA, F. R. & SORDELLI, D. O. 2018. Mutation of Agr Is Associated with the Adaptation of *Staphylococcus aureus* to the Host during Chronic Osteomyelitis. *Front Cell Infect Microbiol*, 8, 18.
- TEICHGRÄBER, V., ULRICH, M., ENDLICH, N., RIETHMÜLLER, J., WILKER, B., DE OLIVEIRA-MUNDING, C. C., VAN HEECKEREN, A. M., BARR, M. L., VON KÜRTHY, G., SCHMID, K. W., WELLER, M., TÜMMLER, B., LANG, F., GRASSME, H., DÖRING, G. & GULBINS, E. 2008. Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nature Medicine*, 14, 382-391.
- THOMPSON, T. A. & BROWN, P. D. 2017. Association between the agr locus and the presence of virulence genes and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* using a *Caenorhabditis elegans* model. *Int J Infect Dis*, 54, 72-76.
- TRABER, K. E., LEE, E., BENSON, S., CORRIGAN, R., CANTERA, M., SHOPSIN, B. & NOVICK, R. P. 2008a. agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology (Reading)*, 154, 2265-2274.
- TRABER, K. E., LEE, E., BENSON, S., CORRIGAN, R., CANTERA, M., SHOPSIN, B. & NOVICK, R. P. 2008b. agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology (Reading, England)*, 154, 2265-2274.
- VUONG, C., SAENZ, H. L., GÖTZ, F. & OTTO, M. 2000. Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of infectious diseases*, 182, 1688-1693.
- WALSH, C. & WENCEWICZ, T. 2016. *Antibiotics: challenges, mechanisms, opportunities*, John Wiley & Sons.
- WARK, P. & MCDONALD, V. M. 2018. Nebulised hypertonic saline for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 9, Cd001506.
- WARNOCK, L. & GATES, A. 2023. Airway clearance techniques compared to no airway clearance techniques for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 4, Cd001401.
- WERTHEIM, H. F., MELLES, D. C., VOS, M. C., VAN LEEUWEN, W., VAN BELKUM, A., VERBRUGH, H. A. & NOUWEN, J. L. 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*, 5, 751-62.
- WILKERSON, M., MCALLISTER, S., MILLER, J. M., HEITER, B. J. & BOURBEAU, P. P. 1997. Comparison of five agglutination tests for identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 35, 148-51.
- WILSON, D. N. 2014. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 12, 35-48.
- ZANGER, P., NURJADI, D., GAILE, M., GABRYSCH, S. & KREMSNER, P. G. 2012. Hormonal contraceptive use and persistent *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 55, 1625-1632.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene unter der Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. Christiane Wolz durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch ebendiese.

Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch das Labormitglied Natalya Korn) von mir eigenständig durchgeführt. Die Bereitstellung der Proben zur Gewinnung *S. aureus* Isolate von zystisch fibrotischen Patienten erfolgte durch die zertifizierte Mukoviszidose-Ambulanz der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

8 Anhang

Tabelle 21: Genetik und Therapie zum Zeitpunkt der Studie.

Patient	Genetik	Modulator
Patient 1	F508del und N1303K	Keine
Patient 2	F508del und R347P	Keine
Patient 3	2 F508del	Tezacaftor/Ivacaftor
Patient 4	2 F508del	Tezacaftor/Ivacaftor
Patient 5	2 F508del	Keine
Patient 6	405+1G->A und c.4111G>T, p.E1371*	Keine
Patient 7	F508del und G5551D	Keine
Patient 8	F508del und G5551D	Keine
Patient 9	F508del und M1101K	Keine
Patient 10	F508del und R1066c	Keine
Patient 11	F508del und N1303K	Keine
Patient 12	2 F508del	Tezacaftor/Ivacaftor

Tabelle 22: Geschlecht und Alter nach Gruppe.

Merkmal		Patientengruppe	Kontrollgruppe
Geschlecht (Anzahl)	<i>Weiblich</i>	10	6
	<i>Männlich</i>	2	3
Alter (in Jahren)	<i>Mittelwert</i>	13,75	28
	<i>Median</i>	14	25
	<i>Spannweite</i>	9 – 20	21 - 53

Tabelle 23: Merkmale der Patientengruppe.

Merkmal		Patientengruppe
BMI (kg/m²)	<i>Mittelwert</i>	18,6
	<i>Median</i>	18,35
	<i>Spannweite</i>	15 – 22,8
BMI in Perzentile (%)	<i>Mittelwert</i>	37
	<i>Median</i>	37,5
	<i>Spannweite</i>	1 – 77
FEV1 (%)	<i>Mittelwert</i>	73,83
	<i>Median</i>	82,50
	<i>Spannweite</i>	9 – 107
FVC (%)	<i>Mittelwert</i>	89
	<i>Median</i>	92
	<i>Spannweite</i>	56 – 116
Modulatortherapie (Anzahl)	<i>Keine</i>	9
	<i>Modulatortherapie</i>	3
Mutation (Anzahl)	<i>F508del</i>	5
	<i>Andere</i>	1
	<i>F508del und andere Mutation</i>	6

Anhang

Tabelle 24: Antibiotikatherapie

Patient	Antibiotikum	Anfang	Ende
Patient 1	Azithromycin	11.01.10	11.07.10
	Aztreonam	25.02.13	24.03.13
	Cefaclor	11.01.10	24.01.10
	Ceftazidim	11.01.10	24.01.10
		19.04.10	22.04.10
		19.04.10	22.04.10
	Ciprofloxacin	15.05.10	12.06.10
		23.08.10	20.09.10
		28.02.12	19.03.12
		26.05.17	08.06.17
	Colistin	01.07.10	28.07.10
		27.09.10	28.02.14
		08.05.14	17.02.17
	Meropenem	22.04.10	03.05.10
		22.04.10	03.05.10
		01.09.17	28.09.17
	Tobramycin	11.01.10	25.01.10
		19.04.10	03.05.10
		19.04.10	02.05.10
		01.07.10	28.07.10
16.05.11		28.02.14	
Patient 2	Amikacin	18.02.10	03.03.10
	Amoxicillin und Beta-Lactamase-Inhibitoren	26.01.12	10.04.13
	Azithromycin	06.12.18	06.02.20
	Aztreonam	12.12.15	13.10.16
	Cefaclor	13.03.12	15.10.12
		11.04.13	01.07.13
		21.09.17	06.12.18
	Ceftazidim	06.12.18	bis mind. 05.03.20
		06.06.10	19.06.10
		11.09.10	24.09.10
		03.01.11	16.01.11
	Ciprofloxacin	02.05.11	15.05.11
		20.10.11	16.11.11
	Colistin	24.07.14	16.01.16
	Meropenem	18.02.10	03.03.10
	Sulfamethoxazol und Trimethoprim	15.07.13	22.03.14
		11.11.15	06.12.18
Tobramycin	11.02.10	18.02.10	
	11.02.10	01.07.11	
	04.03.10	25.03.10	

Anhang

		06.06.10	19.06.10
		11.09.10	24.09.10
		03.01.11	16.01.11
		02.05.11	15.05.11
		24.07.14	21.08.14
		11.05.15	02.11.17
		02.11.17	22.02.18
Patient 3	Amoxicillin	30.01.20	bis mind. 05.03.20
	Cefaclor	17.12.11	15.03.12
		11.03.13	18.03.13
	Cefuroxim	20.10.10	01.12.11
		01.12.11	01.03.12
		17.07.12	31.07.12
		17.06.13	01.07.13
		21.09.13	22.11.13
		15.03.14	29.04.14
		08.02.16	01.04.16
Clarithromycin	09.01.15	22.01.15	
Patient 4	Cefpodoxim	20.06.17	17.07.17
		08.07.19	29.07.19
	Cefuroxim	22.01.18	05.02.18
		14.11.18	27.11.18
	Ciprofloxacin	06.12.18	19.12.18
	Colistin	29.09.16	24.01.17
	Sulfamethoxazol und Trimethoprim	18.08.16	29.09.16
		24.11.16	17.01.17
		19.04.18	02.05.18
		01.06.18	10.07.18
		28.11.18	05.12.18
		24.01.19	17.03.19
Patient 5	Cefalexin	20.07.19	17.08.19
	Cefuroxim	23.02.18	bis mind. 05.03.20
	Ciprofloxacin	10.01.19	06.02.19
	Colistin	30.07.18	30.08.19
	Meropenem	06.04.18	19.04.18
		16.07.18	29.07.18
		05.11.18	18.11.18
		05.03.19	16.03.19
		06.04.18	19.04.18
	Piperacillin und Beta-Lactamase-Inhibitoren	16.07.18	29.07.18
		05.11.18	18.11.18
05.03.19		16.03.19	
Sulfamethoxazol und Trimethoprim	12.01.18	bis mind. 05.03.20	
Patient 6	Amoxicillin	21.03.14	04.04.14

Anhang

	Amoxicillin und Beta-Lactamase-Inhibitoren	08.11.18	21.11.18
Patient 9	Cefaclor	25.08.11	02.09.11
		10.01.20	bis mind. 05.03.20
	Ceftazidim	10.09.12	24.09.12
	Ciprofloxacin	08.04.11	15.04.11
		20.03.15	12.05.17
		15.05.18	bis mind. 05.03.20
	Colistin	23.10.12	19.12.14
		15.05.18	18.01.19
	Minocyclin	11.06.19	21.06.19
	Meropenem	06.07.18	19.07.18
		01.08.19	28.08.19
	Piperacillin und Beta-Lactamase-Inhibitoren	06.07.18	19.07.18
		17.12.18	30.12.18
	Sulfamethoxazol und Trimethoprim	02.09.11	23.09.11
		02.09.11	02.09.11
		23.09.11	20.10.11
		02.03.18	15.03.18
Tobramycin	10.09.12	24.09.12	
	12.06.18	18.01.19	
	17.12.18	30.12.18	
	01.08.19	28.08.19	
Patient 10	Amoxicillin und Beta-Lactamase-Inhibitoren	07.07.12	20.07.12
	Cefaclor	16.02.10	01.03.10
		11.03.16	14.04.16
		04.12.18	17.12.18
		23.12.18	06.01.19
	Cefuroxim	18.06.13	01.07.13
		27.05.19	13.08.19
	Clarithromycin	01.10.10	14.10.10
Erythromycin	06.12.12	01.03.15	
Patient 11	Amikacin	29.03.10	11.04.10
	Amoxicillin und Beta-Lactamase-Inhibitoren	27.01.11	15.02.11
		30.09.13	13.11.13
		08.12.17	28.12.17
		28.02.18	13.03.18
		03.06.19	16.06.19
	Cefaclor	22.07.10	11.08.10
		01.10.15	17.11.15
	Cefuroxim	27.08.12	08.08.13
		08.08.13	30.09.13
12.12.16		30.01.17	

Anhang

	Ceftazidim	24.07.17	04.08.17
		16.02.18	28.02.18
		25.05.18	07.06.18
		24.09.18	05.10.18
		22.01.19	04.02.19
	Ciprofloxacin	02.02.17	01.03.17
	Clarithromycin	24.06.19	07.07.19
	Colistin	27.03.17	08.02.18
	Meropenem	28.11.13	11.12.13
	Sulfamethoxazol und Trimethoprim	12.04.10	30.04.10
		08.11.12	04.02.13
		04.02.13	05.02.13
		12.12.13	13.03.14
		14.10.14	09.11.14
	Tobramycin	28.11.13	11.12.13
		02.02.17	01.03.17
		24.07.17	04.08.17
		16.02.18	28.02.18
		25.05.18	07.06.18
		24.09.18	05.10.18
22.01.19		04.02.19	
Patient 12	Aztreonam	21.01.14	13.02.15
	Cefaclor	07.06.12	18.09.15
		18.09.15	29.09.17
	Ceftazidim	25.03.13	07.04.13
		29.07.13	11.08.13
		14.04.14	27.04.14
		04.08.14	17.08.14
		13.02.15	27.02.15
	Cefuroxim	26.03.11	05.05.11
		27.11.19	bis mind. 05.03.20
	Ciprofloxacin	10.09.12	07.10.12
	Colistin	10.09.12	17.06.13
		17.06.13	13.02.15
		01.05.15	23.06.16
	Meropenem	28.10.13	10.11.13
	Tobramycin	25.03.13	07.04.13
		17.06.13	29.07.13
		29.07.13	11.08.13
		30.07.13	28.10.13
		28.10.13	10.11.13
28.10.13		21.01.14	
14.04.14		27.04.14	
14.04.14	27.04.14		

Anhang

		04.08.14	17.08.14
		13.02.15	27.02.15

Tabelle 25: Bakterien und Pilze im Sputum

Patient	Probe	Bakterien/Pilze
Patient 1	CF1-S1	Candida parapsilosis
		Candida albicans
Patient 2	CF2-S1	Pseudomonas aeruginosa
	CF2-S2	Aspergillus fumigatus
		Candida albicans
Patient 3	CF3-S1	β-häm. Streptokokken (Gruppe B)
Patient 4	CF4-S1	Candida albicans
	CF4-S2	Aspergillus fumigatus
Patient 5	CF5-S1	Achromobacter xylooxidans/denitrificans
Patient 6	CF6-S1	keine zusätzliche Bakterien
Patient 7	CF7-S1	Candida albicans
Patient 8	CF8-S1	Haemophilus influenzae
Patient 9	CF9-S1	Achromobacter xylooxidans/denitrificans
	CF9-S2	Achromobacter xylooxidans/denitrificans
Patient 10	CF10-S1	keine zusätzliche Bakterien
Patient 11	CF11-S1	Aspergillus fumigatus
		Escherichia coli
		Stenotrophomonas maltophilia

Tabelle 26: Zusammenfassung der Tests auf Mittelwertsgleichheiten von $\log(\text{KBE/ml})$

Gruppen mit verglichenen Mittelwerten an $\log(\text{KBE/ml})$	t-test nach Bonferroni-Korrektur	Mittlere Differenz	95%-Konfidenzintervall	Signifikanz
1. Nasenabstrich der Kontrollgruppe vs. 1. Sputum der Patientengruppe	Unabhängige Proben: $t(18) = 6,060$ $p = 0,00003$	$M_{\text{Kontrolle}} - M_{\text{Sputum}}$ Patienten = -3,00	[-4,05 ; -1,97]	Ja
1. Nasenabstrich der Kontrollgruppe vs. 1. Nasenabstrich der Patientengruppe	Unabhängige Proben: $t(15) = 1,462$ $p = 0,492$	$M_{\text{Kontrolle}} - M_{\text{Nasen}}$ Patienten = 0,61	[-2,78 ; 1,49]	Nein
1. Nasenabstrich der Patientengruppe vs. 1. Sputum der Kontrollgruppe	Abhängige Proben: $t(18) = 5,419$ $p = 0,000114$	$M_{\text{Nase Patienten}} - M_{\text{Sputum Patienten}}$ = -3,19	[-4,42 ; -1,95]	Ja

2. Nasenabstrich der Kontrollgruppe vs. 2. Sputum der Patientengruppe	Unabhängige Proben: t(14) = 3,322 p = 0,015	$M_{\text{Kontrolle}} - M_{\text{Sputum Patienten}} = -2,89$	[-4,75 ; -1,02]	Ja
2. Nasenabstrich der Kontrollgruppe vs. 2. Nasenabstrich der Patientengruppe	Unabhängige Proben: t(9) = 0,383 p = 2,13	$M_{\text{Kontrolle}} - M_{\text{Nase Patienten}} = 0,41$	[-1,99 ; 2,81]	Nein
2. Nasenabstrich der Patientengruppe vs. 2. Sputum der Patientengruppe	Abhängige Proben: t(8) = 4,835 p = 0,003	$M_{\text{Nase Patienten}} - M_{\text{Sputum Patienten}} = -4,22$	[-6,23 ; -2,20]	Ja
3. Nasenabstrich der Kontrollgruppe vs. 3. Sputum der Patientengruppe	Unabhängige Proben: t(5) = 5,993 p = 0,006	$M_{\text{Kontrolle}} - M_{\text{Sputum Patienten}} = -3,63$	[- 5,19 ; - 2,07]	Ja

9 Danksagung

Mein erster Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Christiane Wolz für die großartige Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Bei jedem Schritt der Arbeit konnte ich mit ihrer Unterstützung rechnen und die regelmäßigen Gespräche haben mich persönlich und fachlich stets positiv beeinflusst.

Frau Natalya Korn danke ich für die Betreuung im Labor und für Ihre Bereitschaft, ihr Wissen geduldig weiterzugeben. Ohne Ihre Hilfe wäre ich nicht in der Lage gewesen, alle Experimente durchzuführen.

Herrn Dr. med. Andreas Hector danke ich für die Hilfe bei der Patientenrekrutierung und –aufklärung. Ohne seine Mitarbeit wäre die Sammlung von Proben nicht möglich gewesen. Vielen Dank auch an Herrn Dr. med. Philipp Utz, der als Prüfarzt ab 2020 mitgeholfen hat und die Patientendaten übermittelt hat. Beiden möchte ich auch besonders für die interessanten Austäusche danken, die mir beim Verständnis der Erkrankung geholfen haben. Alle Mitarbeiter der CF-Ambulanz danke ich für die Hilfe bei der Sammlung der Proben.

Vielen Dank an Frau Dr. rer. nat. Annika Schmidt vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, die die Bereitstellung und Einfrieren der Proben im Institut organisiert hat. Vielen Dank auch für die fachliche Unterstützung.

Für die statistische Beratung danke ich Frau Lina Maria Serna Higuera vom Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen.

Vielen Dank an das Deutschen Zentrum für Infektionsforschung für die finanzielle und fachliche Unterstützung.

Meinen Mann, meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich ganz besonders danken für die uneingeschränkte Unterstützung während meines Studiums und Anfertigung dieser Arbeit.

Darüber danke ich allen Verwandten, Freunden und Kollegen der AG Wolz, die mich immer unterstützt und ermutigt haben, mein Studium und meine Dissertation erfolgreich zu beenden.