

Aus der Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten
(Univ.-Prof. Dr. med. Michael Jünger)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Luminometrische ATP- Messung
zum Nachweis bakterieller Kontaminationen**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)
der Universitätsmedizin
der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

2013

vorgelegt von

André Werner

geboren am 04.02.1985

in Schwedt/O.

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reiner Biffar

1. Gutachter: Prof. Dr. I. Steinmetz

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Jünger

3. Gutachter: Prof. Dr. A. Kramer

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum im FLI für Medizinische Mikrobiologie

Tag der Disputation: 01.07.2014

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Zielstellung	6
2.	Material und Methoden	7
2.1	Material	7
2.1.1	Chemikalien, Medien, Reagenzien	7
2.1.2	Verbrauchsmaterialien und Einmalartikel	7
2.1.3	Bakterien/Referenzstämme	8
2.1.4	Nährmedien, sonstige Lösungen	8
2.1.5	Kulturmedien	9
2.1.6	Geräte	9
2.2	Methoden	10
2.2.1	Gewinnung des <i>MSSA</i> - und <i>S.epidermidis</i> Teststammes	10
2.2.2	Herstellung einer Bakteriensuspension	10
2.2.3	Mikrobiologische Untersuchungen	11
2.2.4	ATP-Bestimmung	13
2.2.5	Untersuchung der Wirkung von Maresome auf der Haut	15
2.2.6	Biometrie und Statistik	17
3.	Ergebnisse	18
3.1	Quantitativer Nachweis einer Keimmenge mittels indirekter Bestimmung der ATP-Konzentration im Luminometer	18
3.1.1	Korrelationskurve mit <i>S.aureus</i>	18
3.1.2	Präzision	22
3.1.3	Wachstumskurve	23
3.1.4	Kitvergleich	23
3.2	Wiederfindung von <i>S.aureus</i> auf Oberflächen	24
3.2.1	Wiederfindung von <i>S.aureus</i> auf unbelebten Oberflächen	25
3.2.2	Wiederfindung von <i>S.aureus</i> auf belebten Oberflächen	26
3.2.3	Abstrichproben unterschiedlicher Haut- und Schleimhautbereiche	27
3.3	Maresome	28
3.3.1	Dekontaminationsversuch der Haut durch Maresome	28

3.3.2	Pilottest zur Eignung des ATP-Tests bei der Dekontamination der Haut durch Maresome	32
3.4	Fazit	33
4.	Diskussion	34
4.1	Korrelation der bioluminometrischen Messung und der Keimmenge	34
4.1.1	Korrelation der KBE- und RLU-Werte in Keimsuspensionen bzw. von Abstrichproben der Haut und unbelebten Oberflächen	34
4.1.2	Maresome	35
4.1.2.1	Adhäsionshemmung von <i>S.aureus</i> durch Maresome	35
4.1.2.2	Keimzahlbestimmung mit luminometrischer ATP-Messung während der Dekontamination mit Maresome	37
4.1.2.3	Zusammenfassung Maresome	37
4.1.3	Zusammenfassung der ATP-Technologie	38
4.2	Fehlerbetrachtung	40
4.3	Schlussfolgerung	43
5.	Zusammenfassung	44
6.	Literaturverzeichnis	45
7.	Anhang	52
7.1	Abkürzungsverzeichnis	52
7.2	Tabellenverzeichnis	54
7.3	Abkürzungsverzeichnis	55
7.4	Danksagung	56
7.5	Eidesstattliche Erklärung	57

1. Einleitung

Jährlich werden in Deutschland viele Millionen Menschen in medizinischen Einrichtungen voll-, teilstationär oder ambulant behandelt (Statistisches Bundesamt 2009). Trotz aller Fortschritte der Medizin sind sie immer noch oft einem deutlich erhöhten Infektionsrisiko und einem ca. siebenfach erhöhtem Sterberisiko ausgesetzt (Willis et al. 2007). Die Gesamtzahl schwerer Infektionen, die sich Patienten im Krankenhaus zugezogen haben, sog. nosokomialen Infektionen, wird in Deutschland auf 400.000 bis 600.000 pro Jahr geschätzt (Gastmeier et al. 2008). Davon sterben jedes Jahr zwischen 10.000 und 40.000 Menschen (ebd.).

Eine wesentliche Rolle für nosokomiale Infektionen bei den betroffenen Patienten spielt die erhöhte Disposition, z. B. durch Vorschädigungen von Organsystemen, iatrogen durch komplizierte Operationen oder die Abwehrkraft herabsetzende therapeutische Maßnahmen. Hinzu kommt der durch die demografische Entwicklung verursachte zunehmende Anteil älterer Patienten. Diese sind aufgrund vielfacher Leistungseinschränkungen, welche eine verminderte Reservekapazität und eingeschränkte immunologische Abwehr bedingen, vermehrt anfällig für Infektionen (Statistisches Bundesamt 2007).

Keime aus der körpereigenen mikrobiellen Flora des Patienten spielen die größte Rolle unter den Erregern nosokomialer Infektionen (Suttorp et al. 2004). Zu einem deutlich geringerem Anteil wird die Keimübertragung auch von Patient zu Patient bzw. unter Einbeziehung des Krankenhauspersonals oder über kontaminierte Medizinprodukte sowie Arzneimittel (ebd.) verursacht. Dabei hat vor allem in den letzten Jahrzehnten der vermehrte und nicht selten irrationale Antibiotikagebrauch bei der Behandlung von bakteriellen Infektionen zu einer starken Zunahme multiresistenter Problemerreger, wie *MRSA* (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*), *ESBL* (extended-spectrum beta-lactamase)-Bildnern oder *VRE* (Vancomycin-resistente Enterokokken) etc., geführt (ebd.). Diese Erreger können sich rasch im Krankenhaus verbreiten und zu Infektionsausbrüchen führen. Das Problem der multiresistenten Erreger liegt besonders in ihrer, im Vergleich zu ihren sensiblen Varianten, schwierigeren Therapierbarkeit, weil weniger Antibiotika zur Behandlung zur Verfügung stehen (López-Pueyo et al. 2011). Daher haben diese Erreger in der Bekämpfung der Krankenhausinfektionen einen zentralen Stellenwert.

Ziel krankenhaushygienischer Maßnahmen ist zunächst die Vermeidung der Übertragung der Erreger von Patient zu Patient (Kappstein 2006). Ein weiterer wesentlicher Anteil der Strategie zur Erregerbekämpfung ist die Erkennung einer Patienten-Besiedlung mit den genannten Problemerkern und die anschließende Sanierung.

Je nach Umweltverträglichkeit unterscheiden sich die Erreger durch ihren bevorzugten Standort. So sind Feuchtkeime wie *Pseudomonas aeruginosa* häufig im harnableitenden System nachweisbar und stellen z. B. in Rehabilitationskliniken eine sehr häufige Besiedlungsform gelähmter Patienten dar (Worlitzsch et al. 1989). Ein weiteres wichtiges Organ mit einer typischen Besiedlung von *MRSA* sowie *MSSA*, nicht selten aber auch vielen anderen Erregern wie gramnegativen Enterobakteriazen, stellt die Nase dar.

In der *MRSA*-Bekämpfung steht die Keimträgersuche mittels Screening im Mittelpunkt der Maßnahmen bei der Aufnahme von Risikopatienten (RKI 2004). Die Bedeutung der Nase als Reservoir für diese Erreger bedeutet ein ständiges Risiko für die Erreger-Verbreitung in die Umgebung und damit für die Entstehung von nosokomialen Infektionen. Die typischen nosokomialen Krankheitserreger, wie z. B. Staphylokokken, Streptokokken, aber auch gramnegative Bakterien (z. B. *E.coli*, *Pseud.aer.*, *Enterobacter spp.*), können unter anderem Wundinfektionen (15% aller nosokomialen Infektionen), eine Blutvergiftung (8%) oder respiratorische Infektionen (20%) wie Pneumonie, Bronchitis sowie Tracheobronchitis, und damit vermeidbare Gesundheitsschäden und Kosten verursachen (Popp et al. 2001).

Zur Normalflora der Nase bei gesunden Erwachsenen gehören vor allem coryneforme Bakterien, Streptokokken und koagulasenegative/-positive Staphylokokken (Rasmussen et al. 2000). Die Verteilung dieser Keime (prozentualer Anteil) unterscheidet sich in den verschiedenen Studien. So schwanken die Werte bei *S.aureus* zwischen 8% (Gordts et al. 2000) und 34% (Savolainen et al. 1986) in der normalen gesunden Bevölkerung.

Für *S.aureus* als Infektionserreger ist der Mensch das Hauptreservoir. Hier besiedelt er bevorzugt den Nasen-Rachen-Raum. Bei *S.aureus* wird eine *Methicillin-sensible* (*MSSA*) und eine *Methicillin-resistente* (*MRSA*) Form unterschieden. *MSSA* verursachen 20% aller nosokomialen Infektionen (Friedrich 2011). Bei Ärzten und Pflegepersonal wurde vereinzelt auch über eine *MSSA*-Prävalenz von über 90% berichtet (Gordts et al. 2000). In der Zusammenschau der Publikationen kann von einer mittleren *S.aureus*-Besiedlung von 30 % beim medizinischen Personal ausgegangen werden (Woltering et al. 2008). Die Trägerraten von *MRSA* im Vergleich zu *MSSA* liegen niedriger. Bei Untersuchungen in Krankenhäusern

wurden bis zu 8,5 % nachgewiesen, ohne dass dabei gleichzeitig *MRSA*-Ausbrüche vorkamen (Woltering et al. 2008). *MRSA* hat in Deutschland einen mittleren Anteil von 21% an allen aus klinisch relevantem Untersuchungsmaterial nachgewiesenen *S.aureus* (Siegmond-Schultze et al. 2009) und wird als wichtiger pathogener Krankenhauskeim weltweit angesehen und gefürchtet (Grundmann, Tiemersma 2006). Dieser schwerer zu therapierende Krankenhausinfektionserreger zeigt in den letzten Jahren und Jahrzehnten weltweit eine bedrohliche Zunahme der Inzidenz (RKI 2009).

Allerdings sind durch koordinierte Maßnahmen in einigen Ländern, vor allem in Europa, seit ein paar Jahren erste Erfolge in der *MRSA*-Bekämpfung feststellbar. Z. B. gibt es Netzwerke, die u. a. in den Niederlanden oder Deutschland durch gemeinsame Screeningsstrategien, Hygienemaßnahmen, Behandlungen sowie eine integrierte *MRSA*-Weiterbehandlung in Arztpraxen eine grenzüberschreitende Versorgung von Patienten fördern (z. B. EUREGIO *MRSA*-net Twente/Münsterland). Andererseits bestehen weiterhin hohe Prävalenzraten z. B. in Portugal und Italien mit bis zu 50 % (RKI). Auch in den USA ist *MRSA* nach wie vor sehr häufig und seine ambulante Variante (*community acquired MRSA, caMRSA*) z. T. stärker verbreitet als der im Krankenhaus erworbene *MRSA (hospital acquired MRSA, haMRSA)*. *CaMRSA* sind außerhalb des Krankenhauses erworbene *MRSA*-Stämme und unterscheiden sich in ihrer Herkunft und Epidemiologie vom *haMRSA*. Außerdem besitzen sie ein schmaleres Spektrum an Antibiotikaresistenzen (Schreff 2010).

Zudem lassen sich häufig weitere wichtige nosokomiale Keime nachweisen, die der Nase eine besondere Bedeutung als Reservoir für übertragbare Infektionserreger zukommen lassen.

Aly et. al. wiesen 1970 z. B. *Klebs. pneum.*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.* sowie *E. coli*, Polzehl et. al. 2005 den Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* und Niederman et al. 1983 *Pseud.aer.* als Bestandteil der Nasenflora nach. Ebenso machen Anaerobier wie Propionibakterien einen Teil der residenten Flora in der Nase aus (Josimies-Somern et al. 1984). Weitere Mikroorganismen, z. B. *Candida*, Mikrokokken und andere gramnegative Stäbchen, kommen bei Gesunden und bei nicht in medizinischen Bereichen tätigen Personen nur gelegentlich in der Nase vor (Heczko et al. 1981).

Anders sieht die Zusammensetzung der Nasenflora bei Kindern aus. Hier wurden typische Sinusitiserreger wie *Hämophilus influenzae* zu 40%, *Moraxella catharrhalis* zu 34% und *Streptococcus pneumoniae* sogar bis zu 50% nachgewiesen (Gordts et al. 2000).

Wirksame Maßnahmen zur Prävention nosokomialer Infektionen sind eine funktionierende Basishygiene (Barrieremanagement), Surveillance, optimale Behandlungs- und Pflorgetechniken, ein kontrollierter sowie adäquater Antibiotikaeinsatz, ebenso Maßnahmen zur Unterbrechung von Infektionsketten, wie z. B. die Patientenisolierung. Außerdem müssen Medizinprodukte sachgerecht aufbereitet, geeignete baulich-funktionale Voraussetzungen und betrieblich-organisatorische Maßnahmen geschaffen werden. Weiterhin ist das Personal kontinuierlich zu schulen und arbeitsmedizinisch zu überwachen (RKI 2009). Die Wirksamkeit dieser Maßnahmen wurde umfangreich publiziert (Kac et al. 2000, Lacey et al. 2001). Beispielsweise konnte in den Niederlanden durch kontinuierliches Screening eine deutliche Reduzierung der *MRSA*-Prävalenz erreicht werden (Wasserberg 2010). Simor et al. zeigten 2010 hingegen, dass ohne adäquate Prävention und Surveillance in Kanada die Inzidenz der *MRSA*-Kolonisation und -infektion im Zeitraum von 1995-2007 um das 17-fache anstieg. Der Nutzen der Prävention einer Übertragung und die Dekolonisation beinhalten somit ein vermindertes Risiko einer *S.aureus*-Infektion sowie endemischer Infektionsraten (Simor, Daneman 2009).

Es spielen sowohl die primäre Prävention, z. B. durch Aufklärung über alle Maßnahmen zur Vermeidung einer Kolonisation bzw. Infektion und deren konsequente Durchführung (Lacey et al. 2001), als auch die sekundäre Prävention in Form der Früherkennung der nosokomialen Infektion eine entscheidende Rolle. Eine zeitliche Verzögerung und eine inadäquate Therapie der Infektionskrankheit können lebensbedrohliche Folgeerscheinungen beim Patienten bedeuten, wie z. B. eine Sepsis, die Ausbildung von Antibiotika-Resistenzen sowie die Übertragung auf andere Patienten. Dabei kann ein Nasenabstrich bei der Reservoirsuche bei Verdacht auf eine nosokomiale Verbreitung z. B. hochresistenter Stämme wie *ESBL* oder *MRSA*, oder bereits in Rahmen eines Aufnahmescreenings wichtige Aussagen liefern. Viele Stationen mit hohen *MRSA*-Prävalenzraten, beispielsweise Intensivstationen, führen ein solches Screening durch. Weitere Empfehlungen zur Prävention und Kontrolle von *MRSA*-Stämmen in Krankenhäusern und anderen medizinischen Einrichtungen hat das RKI im Epidemiologischen Bulletin Nr. 42 von 08/2008 formuliert.

Für den Nachweis des Problemkeims *MRSA* stehen dabei mehrere Methoden zur Verfügung. Hierbei besteht die Schwierigkeit in der Balance zwischen Geschwindigkeit, Sensitivität, Spezifität und Kosten. Gegenwärtig werden zum Screening hauptsächlich kulturplattenbasierte Techniken durchgeführt, welche jedoch vergleichsweise zeitintensiv sind. Moderne Diagnoseverfahren, wie molekulare Analysen oder automatisierte Systeme,

gewinnen seit einigen Jahren allerdings mehr und mehr an Bedeutung. Besonders die auf Genanalyse basierende PCR ist in der Lage, relativ schnell und spezifisch, dafür aber deutlich kostenintensiver, relevante Erreger wie *MRSA* zuverlässig nachzuweisen (Reygaert 2009).

Einen anderen Ansatz zur Bestimmung der quantitativen Keimbelastung stellt ein luminometrisches Messverfahren dar, welches durch indirekte Bestimmung der bakteriellen ATP-Menge in einer Probe auf die Keimzahl schließen lässt.

Das Grundprinzip besteht hierbei darin, dass alle Zellen, so also auch die nachzuweisenden Keime, ATP (*Adenosintriphosphat*) für die Energieübertragung zwischen verschiedenen zellulären Prozessen enthalten. Die intrazelluläre ATP-Konzentration ist für die verschiedenen Zelltypen mehr oder weniger ähnlich reguliert. Die meisten gramnegativen Bakterienzellen enthalten etwa 2×10^{-18} mol ATP pro Zelle. Hingegen sind es bei grampositiven Bakterien und auch Pilzspezies, wie z. B. *Candida albicans*, aufgrund ihres größeren Volumens je nach Spezies zwischen zwei bis sechs mal so viele Moleküle ATP pro Zelle (La Duc et al. 2007).

Die luminometrische Bestimmung von organischen Verunreinigungen findet bereits beim Hygienemonitoring, also beim Nachweis von Keimbelastungen und -verunreinigungen bzw. der Biomasse (D'Eustachio, Johnston 1968), z. B. in der Lebensmittelverarbeitung (Fujikawa, Morozumi 2002), Anwendung. Zudem liefert sie direkt vor Ort, beispielsweise im Restaurant, Supermarkt oder in Gesundheitspflegeeinrichtungen, Hygiene-Informationen (QMTI, Anwendung Luminometer). Hierbei wird jedoch die gesamte Verunreinigung, also auch nicht-bakterielles ATP, gemessen.

Bereits seit vielen Jahrzehnten sind in mehreren Studien die Zuverlässigkeit und Schnelligkeit von auf Biolumineszenz beruhenden Untersuchungen zur Beurteilung einer Bakteriurie gezeigt worden (Thore et al. 1983). Bislang wurde der Einsatz dieser Messmethode in der Praxis im Hinblick auf die Untersuchung von Haut- und Nasenabstrichproben, z. B. bei der *MRSA*-Surveillance, jedoch noch nicht getestet.

Bei Nachweis relevanter Erreger auf der Haut oder in der Nase stellt sich die Frage der Sanierung dieser Keimquelle, um diese als Reservoir auszuschalten. Dies wird weltweit z. B. standardmäßig bei der *MRSA*-Decolonisation empfohlen (RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten). Manche Studien begründen auch den Einsatz einer nasalen Dekolonisation z. B. von *S.aureus* präoperativ (Ruef et al. 1996). Andere wiederum halten einen Benefit, z. B. bei der Behandlung einer Mukoviszidose (Ridder-Schaphorn et al. 2007) mit der Sanierung der kolonisierenden Pseudomonaden, für unwahrscheinlich.

Zur Dekolonisation der Nase als Erregerreservoir und Übertragungsmöglichkeit des *MRSA* durch die Hände gilt nach aktuellen Empfehlungen des Robert-Koch-Institutes das topische Antibiotikum Mupirocin. Dieses wird als Stoffwechselprodukt des Bakteriums *Pseudomonas fluorescens* gewonnen und ist lokal in Form einer Salbe 3 Mal täglich über 5 Tage zu applizieren (RKI, Sitzmann 2008).

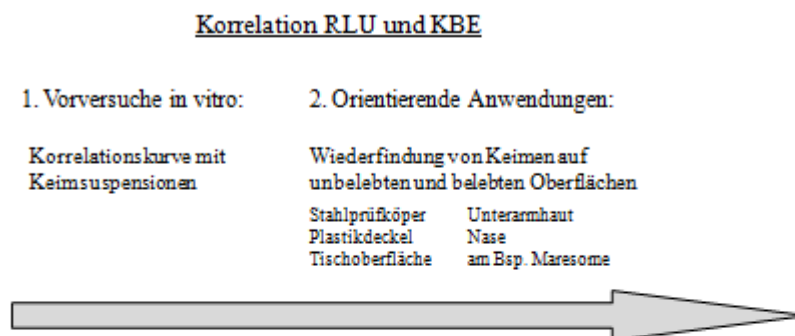
1.1 Zielstellung

Hauptgegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung und Bewertung der luminometrischen ATP-Messung als ein sensitives Nachweisverfahren zur Keimzahlbestimmung auch auf der Haut mit der Fragestellung einer geeigneten Korrelation zwischen ATP-Menge und Anzahl von Erregern.

Am Modell (unbelebte und belebte Oberflächen) soll gezeigt werden, inwieweit eine praktische Anwendung als Vorbereitung einer Testung auf der Haut sinnvoll erscheint.

Am Beispiel einer neuen Pflegecreme auf Algenextraktbasis mit adhäsionshemmenden Eigenschaften soll die Methode ebenfalls orientierend untersucht werden. Die schematische Darstellung des Untersuchungsablaufes ist in Abb. 1 gezeigt.

Abb. 1: Schematische Darstellung der durchgeführten Untersuchungen.



2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Medien, Reagenzien

- Alkohol, 70%ig (Desinfektionsmittel)
- Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen, Deutschland)
- Vitek Compact (Biomérieux, Nürtingen, Deutschland) zur Erreger- und Resistenzdiagnostik
- Katalase-Reagenz, 3-prozentige Wasserstoffperoxidlösung (Biomérieux, Nürtingen Deutschland) zur Unterscheidung von aeroben Gram-positiven Kokken in Katalase-positive [z. B. *S.aureus*] bzw. -negative Kokken [z. B. *Streptococcus*]
- KOH (OXOID) zur Unterscheidung von Gram-positiven und -negativen Bakterien im Schnelltestverfahren
- Mastalex-MRSA (MAST, Reinfeld, Deutschland) zum Nachweis vom Gen *mecA*, welches das Penicillin-bindende-Protein 2a, Pbp2a, kodiert und nur in *MRSA*-Stämmen vorkommt
- Identification Sticks (OXOID) zum Oxidasenachweis
- Strepto plus SLIDEX (Biomérieux) zum Nachweis der Lancefield-Gruppen bei β -hämolisierenden Streptokokken
- Gentamicin Salbe 0,1 % (Inhalt : Gentamicin, Methyl-4-hydroxybenzoat, Propyl-4-hydroxybenzoat)
- Maresome® (Heitland Prophylaxe Body) 100 ml (Inhalt : Algenbiomassegrundlage, Emulgator, Demineralisiertes Wasser, Ascorbinsäure)
- GL Prophylaxe Body (Maresome Salbe ohne Alge und Ascorbinsäure)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Einmalartikel

- Abstrichtupfer (Sterile Transport Swab, COPAN) mit Transportmedium (Zusammensetzung: Natriumchlorid 3 g, Kaliumchlorid 0,2 g, Calciumchlorid 0,1 g, Magnesiumchlorid 0,1 g, Kaliumphosphat 0,2 g, Natriumphosphat 1,15 g, Natrium-Thioglycolat 1,0 g, destilliertes Wasser 1l)

- ATP Biomass Kit HS (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland)
 - o ATP Reagent HS
 - o Diluent B
 - o Extractant B/S
 - o ATP Standard
- Impfösen (Nerbe Plus)
- Microbial ATP Kit HS (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland)
 - o ATP Reagent HS
 - o Diluent B
 - o Extractant B/S
 - o ATP Standard
 - o ATP Eliminating Reagent
 - o Cell Lysing Reagent
- Mikrotiterplatten, weiß, 96-well (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf)
- Plastebeutel zur Bebrütung der Kochblutplatten (Anaerocult® P von Merck)
- Plastespätel steril (VWR)
- Pipetten (Transferpipette, 1000 µl, 100 µl, Brand)
- Pipettenspitzen (1000 µl, 100 µl, Safe-Seal-Tips® professional, Biozym)
- Röhrchen 15 ml (SARSTEDT, Nümbrecht)
- Stahlprüfkörper (10 x 100 mm, rostfreier Stahl, Oberflächenkörnung 80, Fa. Cziotec, Greifswald)

2.1.3 Bakterien/Referenz-stämme

- *MSSA* (eigener Hautstamm)
- *S.epi.* (eigener Hautstamm)
- *E.coli* (Laborstamm K-12)

2.1.4 Nährmedien, sonstige Lösungen

- Thioglycolat-Medium (heipha) als Enthemmerlösung zur Anreicherung mikrobiellen Wachstums, entspricht in seiner Zusammensetzung den Empfehlungen der aktuellen (2008) European Pharmacopeia (EP) (100 ml enthalten Caseinpepton 15 g, Hefeextrakt 5 g, Natriumthioglycolat 0,5 g, Agar 0,2 g, Glucosemonohydrat 5,5 g, NaCl 2,5 g, L-Cystein 0,5 g, Resazurin 1 mg)
- „Inhibitor III“

2.1.5 Kulturmedien

Unter Tab. 2.1.5 sind die Nährböden für die zu untersuchenden Mikroorganismen aufgelistet.

Tab. 2.1.5: Kultivierung von Mikroorganismen aus den Hautabstrichproben. Aufgelistet sind die Medien (Agar: fest, Bouillon: flüssig) für die Kultivierung der in der Spalte ‚Wachstum‘ angegebenen Mikroorganismen. Die Medien wurden aerob oder anaerob bei einer Temperatur von 37 °C bebrütet, mit Ausnahme des Sabouraud-Agars, der bei 30 °C bebrütet wurde.

Medium (Hersteller)	Kultivierungsbedingungen		Bakterienwachstum
	aerob (+) / anaerob (-)	Temperatur	
CASO-Agar (heipha)	+	37 °C	alle medizinisch relevanten Haut- und Wundkeime
Cetrimid Agar (MERCK)	+	37 °C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Chromagar MRSA (MAST)	+	37 °C	MRSA
Columbia Blut Abklatschagar (heipha)	+	37 °C	medizinisch relevante Haut-, Wund- und Umgebungskeime
Columbia Schafblut-Agar (heipha)	+	37 °C	medizinisch relevante Haut-, Wund- und Umgebungskeime
MacConkey Agar (MERCK)	+	37 °C	Enterobacteriaceae
Mannit Kochsalz Phenolrot Agar (heipha)	+	37 °C	<i>S.aureus</i>
Mueller-Hinton Agar (heipha)	+	37 °C	Empfindlichkeitstestung
Sabouraud-Glucose-Agar (heipha)	+	30 °C	Pilze (Schimmelpilze, Hefen)
Thioglycolat Medium n.EP (heipha)	+	37 °C	Anreicherung

2.1.6 Geräte

- Solaris, Luminometer (Biothema)
- Aqua-Trace, Luminometer (Biotrace)
- Vitek (BioMérieux):
 - o vollautomatisiertes System zur Identifizierung und Empfindlichkeitsprüfung für unterschiedliche Bakteriengruppen (z.B. *S.aureus.*, *Enterobacteriaceae*)
 - o Sensitivität (94-99%), Spezifität (97-100 %) (KRISHNAN et al. 2002)
- Vortexer (Heidolph, Reax 2000)

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung des MSSA- und *S.epidermidis* (*S.epi.*) Teststammes

Mit einem in 0,9%-iger Natriumchlorid-Lösung angefeuchteten sterilen Tupfer wurde die Unterarmvorderseite des Probanden (Doktorand selbst) abgestrichen (etwa 5 s lang unter leichtem Druck und Drehbewegungen in jeweils 4 verschiedenen Richtungen). Anschließend ist der Tupfer auf Blutagar homogen ausgestrichen worden. Die Agarplatte wurde dann bei 37°C für 48h inkubiert. Mithilfe einer Impföse wurde jeweils eine visuell identifizierte Kolonie *S.epi* bzw. *S.aureus* in ein Röhrchen mit 1 ml 0,9%-iger Natriumchlorid-Lösung gegeben. Unter Bewegung der Öse und Vortexen des Röhrchens wurden die Bakterien in Lösung gebracht, anschließend mit einer Pipette auf je eine weitere Columbia Blutagar-Platte aufgetragen und mit einem Flächenspatel (nach Drigalski) homogen ausgestrichen. Nach weiterer Inkubation bei 37°C für 48h wurden die der MSSA- und *S.epi*-Stamm auf ihre Identität hin geprüft (Gramfärbung, Koagulase-Reaktion, Oxacillin und Biochemische Identifizierung im Vitek Compact) und waren Grundlage der folgenden Untersuchungen.

2.2.2 Herstellung einer Bakteriensuspension

Zunächst ist eine Kolonie, die aus etwa 10^6 Bakterien besteht, von einer mit einem Referenzstamm kultivierten Blutagarplatte mithilfe einer Impföse in ein Röhrchen gegeben worden, indem sich 1 ml 0,9% Natriumchlorid-Lösung befand. Unter Bewegung der Öse und Vortexen des Röhrchens wurden die Bakterien in Lösung gebracht. Ausgehend von dieser Konzentration von 1 Kolonie/ml wurden über mehrere Pipettierungsschritte weitere Verdünnungen der Keimsuspension hergestellt.

Bei den Versuchen mit Haut- und Abstrichproben der Nase (des Doktoranden) wurde nach dem Abstrich der sterile Abstrichtupfer in 1 ml steriler 0,9 %iger Natriumchlorid-Lösung über 30 sec gevortext und diese Suspension dann zur Keimzahl- und -speziesbestimmung genutzt.

Die Probenverarbeitung (Präanalytik) erfolgte im Labor unter konstanten Bedingungen bei Raumtemperatur (22°C, Kontrolle durch Thermometer).

2.2.3 Mikrobiologische Untersuchungen

2.2.3.1 Anlage

Von der Suspension aus 1 ml steriler 0,9 %iger Natriumchlorid-Lösung und den zu untersuchenden Bakterien wurden 100 µl auf eine Blut-Agar-Platte quantitativ mit einem Flächenspatel (nach Drigalski) homogen ausgestrichen. Die Agarplatten wurden dann bei 37°C und aerober Atmosphäre für 48h inkubiert. Die Inkubation der Kochblutplatten erfolgte bei 5% CO₂-Atmosphäre (Plastebeutel mit CO₂ generierendem Reagenz, Anaerocult® P von Merck) ebenfalls bei 37°C für 48h.

2.2.3.2 Erregeridentifikation

Im Anschluss an die Inkubation wurden die Agarplatten mit dem Koloniezählstift visuell ausgezählt. Die Keimzahl wurde in KBE (Kolonie bildende Einheiten) angegeben. Zur Differenzierung der Keime wurden Subkulturen auf den in *Tab. 2.1.5* dargestellten Agarplatten angefertigt und die Erreger nach Reinkultivierung biochemisch (Vitek Compact) identifiziert.

2.2.3.3 Resistenzbestimmung

Die angezüchteten Bakterien wurden im Vitek auf spezielle Antibiotikaresistenzen hin untersucht, z. B. *MRSA*, *ESBL*.

2.2.3.4 ATP-Bestimmung

Von der initialen Keimsuspension wurden 60 µl für die Messung mit dem Luminometer genutzt.

Prinzip: Alle Zellen enthalten ATP (Adenosintriphosphat) für die Energieübertragung zwischen verschiedenen zellulären Prozessen. Die intrazelluläre ATP-Konzentration ist für die verschiedenen Zelltypen ähnlich reguliert. Die meisten bakteriellen Zellen enthalten etwa 2×10^{-18} mol ATP pro Zelle (La Duc et al. 2007).

Durch Vorversuche wurde das untere Detektionslimit der gewählten Methodik von etwa 10 bakteriellen Zellen bestimmt (Daten nicht gezeigt).

Durchführung: Zunächst sind die Reagenzien vorbereitet worden. Nach dem Auftauen wurde das *Diluent B* steril in das *ATP Reagent HS* bzw. das *Cell Lysing Reagent* in das *ATP Eliminating Reagent* gegeben und gemischt.

Bei der Verarbeitung der zu messenden Proben wurden zunächst jeweils 20 µl der Bakteriensuspension mit einem gleichen Volumen an *Cell Lysing Reagent/ATP Eliminating Reagent* in 3 Vertiefungen (*well*) der Mikrotiterplatte pipettiert und vermischt. Anschließend ist die befüllte Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur im Dunkeln für 10 min inkubiert worden. Dadurch wurde das extrazellulär vorhandene und damit das Messergebnis verfälschende ATP abgebaut. Somit wurden im Gegensatz zu den Kulturverfahren nicht nur die lebenden, sondern auch abgetötete oder abgestorbene Keime ins Ergebnis integriert.

Danach wurden im Luminometer automatisch 20 µl des zelllysierenden *Extractants*, außer zum Leerwert, dazugegeben und damit sowohl das ATP-degradierende Enzymsystem des *Eliminating Reagents* inaktiviert, als auch das intrazelluläre ATP für die Messung freigesetzt. Hinzu kamen dann 160 µl *Diluent B/ATP Reagent*, welches das sehr spezifische Enzym Luciferase enthielt. Dieses ca. 60 kD große, in biolumineszenten Insekten vorkommende Enzym, katalysiert die oxidative Decarboxylierung eines D-Luciferins unter Verbrauch von Sauerstoff. Über ein instabiles Molekül, welches sofort zerfällt und dabei ein Photon emittiert, wird Oxyluciferin gebildet. Für diese Reaktion benötigt die Luciferase neben Magnesiumionen auch das aus den nachzuweisenden Bakterien freigesetzte ATP als Cofaktor (Abb. 2.2.3.4).

Abb. 2.2.3.4: Luciferin-Luciferase-System. Dargestellt ist die vereinfachte Gleichung der durch die Luciferase katalysierten Reaktion, bei der pro umgesetzten Molekül ATP ein Photon entsteht, welches quantitativ mit einem Luminometer registriert werden kann (Branchini 2008). ATP: Adenosintriphosphat; AMP: Adenosinmonophosphat; O₂: Sauerstoff; PPi: Diphosphat; CO₂: Kohlenmonoxid.



Die Lichtmenge/Photonenanzahl steht im direkten Verhältnis zur ATP-Menge in der Probe und wurde in RLU (relative Lichteinheiten) im Luminometer gemessen und angegeben.

Da das Ziel die Korrelation zwischen KBE und RLU war, wurde auf das *ATP-Standard*, mit welchem bei bestimmten Fragestellungen die absolute ATP-Menge einer Probe bestimmt werden kann, verzichtet. Um das Messergebnis nicht durch äußere Faktoren zu beeinflussen, wurde die gesamte Verarbeitung unter gleichen Bedingungen (Raumtemperatur, 22°C) durchgeführt. Außerdem wurde durch Benutzung eines Luxmeters auf eine einheitliche Beleuchtungsstärke von ca. 500 Lux geachtet (Messvorgang ist sehr lichtempfindlich).

Alle mit den RLU-Werten korrelierte KBE-Werte beziehen sich auf 20 µl der Bakteriensuspension aus den in den Abstrichtupfern vorhandenen Keimen und dem 1 ml 0,9%-iger Natriumchloridlösung. Dieses Volumen wurde ebenfalls zur Messung der RLU im Luminometer genutzt. Somit ließen sich die beiden Parameter KBE und RLU besser vergleichen. Um die absolute Keimzahl aller sich in den Abstrichtupfern befindlichen Keime in 1 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung zu bestimmen, mußten die angegebenen KBE mit 50 multipliziert werden. Jede Probe wurde in Dreifachbestimmung gemessen. Aus den sich ergebenden RLU-Werten wurden entsprechend der Geräteanweisung Mittelwert und Standardabweichung gebildet und diese für die Statistik benutzt.

2.2.4 ATP-Bestimmung

2.2.4.1 Erstellen einer Korrelationskurve für KBE vs. RLU mit *S.aureus*

Zunächst sollte überprüft werden, ob eine Korrelation zwischen den von der ATP-Menge abhängigen RLU und den kulturell ermittelten Keimzahlen nachzuweisen ist.

Dazu wurden Verdünnungsreihen eines in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelösten *MSSA*-Stammes (des Probanden) angefertigt (s. 2.2.2).

Dieser Keimdilution sind 2 mal 100 µl für die kulturelle und 3 mal 20 µl für die luminometrische Auswertung (s. 2.2.3.4) entnommen worden. Jede Probe wurde also in gleicher Menge auf 2 Kulturplatten bzw. in 3 Vertiefungen (*wells*) bearbeitet. Aus den sich ergebenden KBE- und RLU-Werten wurden zur Minimierung von Fehlern Mittelwert und Standardabweichung gebildet. Für die Statistik stand somit pro Keimdilution jeweils ein aus zwei Messungen gemittelter KBE- und ein aus 3 Messungen gemittelter RLU-Wert zur Verfügung.

Da bei diesem Versuch eine reine *S.aureus*-Suspension benutzt wurde, konnte dafür das *ATP-Biomass-Kit* verwendet werden. Dieses enthält im Unterschied zum *Mikrobial-ATP-Kit* kein *ATP Eliminating Reagent*.

2.2.4.2 Präzision

Mit diesem Versuch sollte die Präzision der Methode bestimmt werden. Es wurde eine identische *S.aureus*-Dilution (1 Kolonie/ml) dreimal unmittelbar hintereinander unter gleichen Bedingungen luminometrisch verarbeitet.

2.2.4.3 Wachstumskurve

Als weiterer Vorversuch zur Überprüfung der Korrelation zwischen RLU und KBE sowie zur Darstellung der Wachstumsdynamik von *S.aureus* im Nährmedium wurde eine Wachstumskurve erstellt.

Mit einer Impföse wurde eine geringe Menge einer Kolonie von *S.aureus* in 3 ml Thioglycolat-Bouillon gegeben und unter Vortexen aufgelöst. Anschließend wurde diese Suspension bei 37°C über 48h inkubiert. In regelmäßigen Zeitabständen wurden mit einer Pipette Proben entnommen und davon sowohl kulturell als auch luminometrisch die Bakterienbelastung bestimmt.

2.2.4.4 Kitvergleich

Sowohl mit dem *ATP-Biomass-Kit* als auch mit dem *Mikrobial-ATP-Kit* kann die bakterielle ATP-Menge aus Proben unbelebter Flächen nachgewiesen werden. Der Kitvergleich wurde durchgeführt um herauszufinden, ob sich das *Mikrobial-ATP-Kit* zudem auch zur Bestimmung der bakteriellen (intrazellulären) ATP-Menge von Proben belebter Flächen (Nase, Haut) eignet. Dies wäre Voraussetzung dafür, es für die Untersuchungen mit Haut- und Nasenabstrichproben weiter zu verwenden.

Es wurden zwei reine *S.aureus*-Keimdilutionen und eine Haut- sowie eine Nasenabstrichprobe hergestellt. Die vier Proben wurden sowohl mit dem *Mikrobial-ATP-Kit* als auch mit dem *ATP-Biomass-Kit*, welches im Unterschied zum erstgenannten Kit kein *ATP Eliminating Reagent* enthält und bei der zur Probe gleich das Extraktionsmittel gegeben wird, luminometrisch ausgewertet. Das *ATP Eliminating Reagent* soll eine Eliminierung des extrazellulären ATPs, welches in Proben belebter Flächen zu erwarten wäre und das Ergebnis verfälschen würde, bewirken.

Als Kontrolle diente das kulturelle Ausplattierungsverfahren zur Keimzahlbestimmung mittels Caso-Agar-Platte mit Enthemmer. Von jeder Suspension wurden je 100 µl auf eine Blut-Agar-Platte pipettiert und quantitativ mit einem sterilen Plastespatel (s.o.) ausgestrichen. Die Agarplatten wurden dann bei 37°C für 48h inkubiert und im Anschluss an die Inkubation mit dem Koloniezähler visuell ausgezählt.

2.2.4.5 Wiederfindung von *S.aureus* auf Oberflächen (s. Tab. 2.2.4.5)

Als Oberflächen dienten ein Hautareal der Unterarmvorderseite des Probanden (Doktorand selbst), Stahlprüfkörper (100x10x1mm, rostfreier Stahl, Oberflächenkörnung 80), Platedeckel eines 50 ml Röhrchens von Sarstedt® (Durchmesser ca. 34 mm) sowie eine

kunststoffbeschichtete Labortischoberfläche. Sie waren in ihrer Fläche definiert (9 cm²) und wurden vor dem Versuch mit 70%igem Alkohol desinfiziert.

Nach 5 min Einwirkzeit des Desinfektionsmittels wurde eine definierte Keimmenge (772 KBE pro 100 µl als Mittelwert der visuell gezählten KBE von 3 Caso-Agar-Platten, auf denen jeweils 100 µl der gleichen Suspension gegeben und bebrütet wurden) als Bakteriensuspension (*S.aureus*, eigener Stamm des Probanden) auf die 9 cm² großen Flächen aufgetragen und verteilt. Nach ca. 10 min war die Oberfläche trocken.

Dann wurde versucht mittels Tupferabstrich (etwa 5 s lang unter leichtem Druck und Drehbewegungen in jeweils 4 verschiedenen Richtungen) die applizierte Keimmenge von der Oberfläche wiederzugewinnen.

Beim Abstrich der Nase (des Doktoranden) feuchtete der Untersucher einen sterilen Abstrichtupfer mit steriler 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung leicht an. Danach wurde mit dem Tupfer etwa 5 s lang unter leichtem Druck und Drehbewegungen der Nasenvorhof des vorgesehenen Nasenloches abgestrichen und der gleiche Vorgang mit einem zweitem Tupfer im anderen Nasenloch durchgeführt.

Zum Vergleich der quantitativen Methode zur Keimrückgewinnung wurde der Tupfer mittels Messung im Luminometer sowie parallel kulturell ausgewertet.

Tab. 2.2.4.5: Schema der Wiederfindung von *S.aureus* auf Oberflächen.

1) Definition der Testflächen (9 cm ²): Hautareal Unterarmvorderseite (des Doktoranden) Stahlprüfkörper Plastikdeckel Kunststoffoberfläche (Labortisch)
2) Auftragung der Testkeime (100 µl einer reinen <i>S.aureus</i> -Suspension)
3) Tupferabstrich (von den o.g. Oberflächen sowie der Nase des Doktoranden)
4) Luminometrische und kulturelle Auswertung

2.2.5 Untersuchung der Wirkung von Maresome auf der Haut

Zunächst wurde die Unterarmvorderseite des Probanden (Doktorand selbst) mit 70%igem Alkohol und 5 min Einwirkzeit wischdesinfiziert.

Anschließend wurden 5 (für die verschiedenen Expositionszeiten des Abklatsches bzw. Abstriches) quadratische Hautareale A₁₋₅ (jeweils a=5 cm, A=25cm²) mit MaresomeTM-Salbe (0,2 g, entsprechen ca. 0,4 cm Salbenstrang) mittels Spatel gleichmäßig eingesalbt.

Dann wurden jeweils nach 1, 10, 30, 60 und 120 min Einwirkzeit der Salbe alle Areale mit 50µl einer Bakterien-Suspension (2400 KBE/50 µl, entspricht 95 KBE/cm²) aus 0,9%iger NaCl-Lösung und *S.aureus*, der zuvor vom Spender (Doktorand) von gesunder Haut isoliert und in Kultur gehalten wurde, mit Hilfe eines sterilen Spatels kontaminiert. Nach 10 min Antrocknungszeit wurden A₁₋₅ abgeklatscht (mit Columbia – RODAC-Platten, A=19,6cm²) bzw. in einer zweiten Messreihe abgestrichen. Hierbei ist der Tupfer über das abzustreichende Areal unter Drehbewegungen jeweils vertikal, horizontal sowie zweimal diagonal in wechselnder Richtung abgerollt worden. Die Abstrichtupfer wurden unmittelbar nach Probenahme in 1 ml steriler NaCl - Lösung (0,9 %) über 30 sec gevortext.

Diese 1 ml - Suspension wurde auf CASO-Agarplatten (Casein-Sojamehl-Pepton-Agar, heipha) mit Enthemmer (Inaktivierung von Desinfektionsmittelrückständen) quantitativ ausgestrichen und diese sowie die Platten der Abklatschuntersuchung bei 37°C für 48 h inkubiert und anschließend visuell ausgezählt.

Als Vergleichskontrolle und Berechnungsgrundlage wurde MaresomeTM – freie Salbe (Grundlage) und Bepanthen-Salbe appliziert sowie eine Kontrolle mit unbehandelter Haut durchgeführt.

Der reine Wirkstoff wird als “Maresome“ bezeichnet und enthält dementsprechend keine Konservierungsstoffe oder sonstige Zusätze.

Tab. 2.2.5: Schema der Untersuchung der Wirkung von Maresome auf der Haut.

1) Desinfektion des Unterarms (des Doktoranden) mit Alkohol 70% (5 min Einwirkzeit)
2) Einsalbung von 5 Hautarealen A ₁₋₅ (je 25 cm ²) mit Maresome (als Vergleich in weiteren Messreihen mit Maresome-freier Salbe und Bepanthen, als Kontrolle unbehandeltes Hautareal)
3) Nach 1, 10, 30,60 und 120 min Einwirkzeit Kontamination mit reiner <i>S.aureus</i> -Suspension, 10 min Antrocknungszeit
4) Abklatsch mit Columbia-RODAC-Platten (in zweiter Messreihe Tupferabstrich)
5) Kulturelle und luminometrische Auswertung

2.2.6 *Biometrie und Statistik*

Alle aus den Proben im Luminometer gemessenen ATP-Werte wurden der aus der gleichen Probe ermittelten KBE-Menge aus den kulturellen Verfahren vergleichend gegenübergestellt. Die zusammengehörenden Werte wurden sowohl graphisch als auch tabellarisch ausgewertet.

Im Kolmogorov-Smirnov-Test ließ sich für die betrachteten Parameter RLU und KBE eine Normalverteilung nachweisen. Für die weitere statistische Auswertung der gemessenen Daten (KBE, RLU) hat sich die lokale Regressionsanalyse als das geeignetste Verfahren erwiesen. Die Regressionsanalyse soll eine Beziehung zwischen der abhängigen (RLU) und unabhängigen (KBE) Variablen feststellen. „Lokal“ bezieht sich darauf, aus einem bestimmten Wertebereich eine Funktion zu ermitteln. Dabei wurde für alle potentiellen KBE-Werte eine Regressionsfunktion an die Datenpunkte in der Umgebung des jeweiligen KBE-Wertes, die bezüglich ihrer Distanz zum Wert gewichtet sind, angepasst. Die statistisch ermittelten korrelierenden KBE- und RLU-Wertepaare sind in einer Wertetabelle (Tab. 3.1) eingetragen. Zur besseren Übersicht sind die Werte als natürlicher Logarithmus angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Quantitativer Nachweis einer Keimmenge mittels indirekter Bestimmung der ATP-Menge im Luminometer

Zielsetzung dieser Arbeit war es Beziehungen zwischen der Keimzahl (KBE) und dem ATP-Signal (RLU) herzustellen, welche eine klinische Anwendung sinnvoll erscheinen lassen. Dies wäre z. B. bei Verwendung als Screening-Schnelltest bzw. bei der Abschätzung einer erfolgreichen Dekontamination, z. B. nach *MRSA*-Besiedlung in der Nase, nützlich. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass sie in wenigen Minuten Ergebnisse ermöglicht im Vergleich zu mindestens 24 bzw. 48 h bei konventioneller bakteriologischer *MRSA*-Diagnostik.

Zunächst wurden Untersuchungen mit reinen Keimsuspensionen durchgeführt und anhand von Korrelationsberechnungen der Zusammenhang zwischen Keimzahl und ATP-Menge bzw. RLU dargestellt. Im Anschluss ist der ATP-Nachweis auf unbelebten (Teststreifen) und belebten (Haut) Flächen getestet worden. Schließlich wurde am Beispiel einer neuen Pflegecreme auf Algenextraktbasis mit adhäsionshemmenden Eigenschaften (Maresome) die luminometrische Methode orientierend untersucht.

Die folgenden Untersuchungen wurden mit einer *MSSA*- bzw. *S.epi.*-Suspension, d. h. einem in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelösten *MSSA*- bzw. *S.epi.*-Stamm des Probanden durchgeführt.

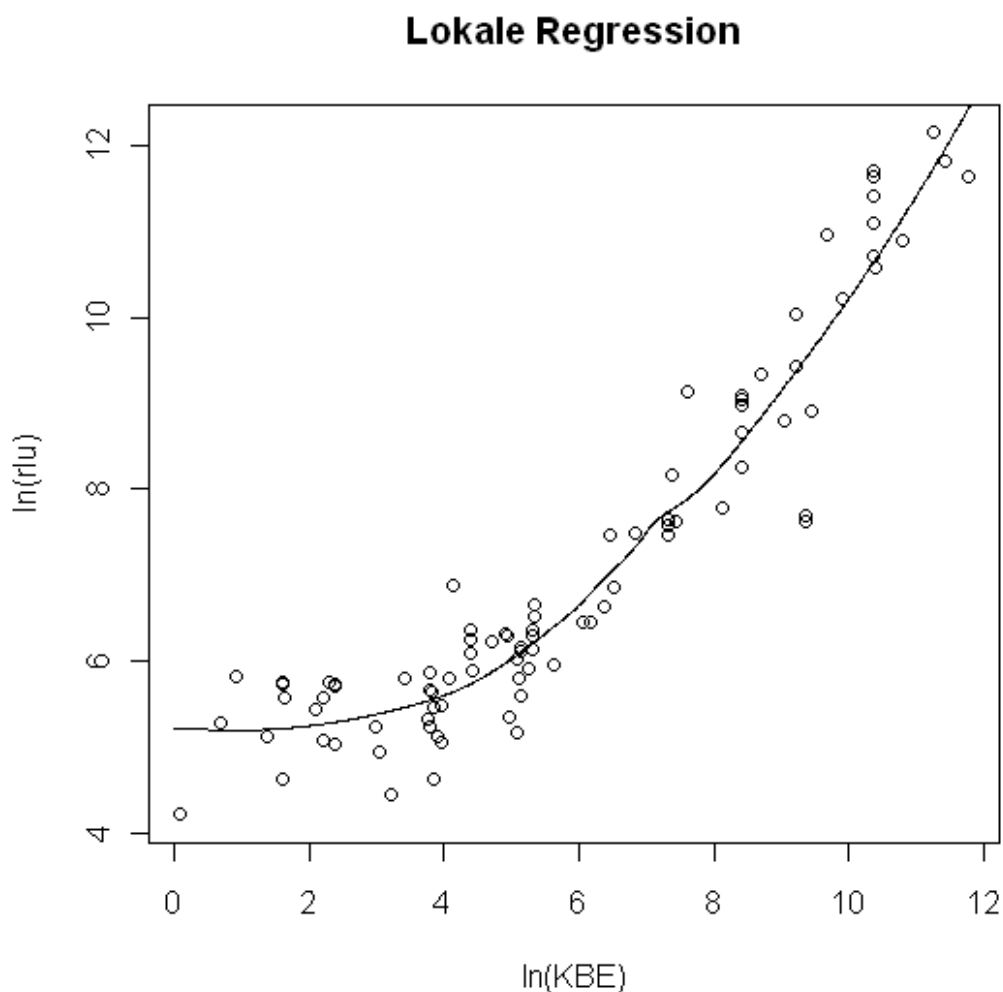
3.1.1 Korrelationskurve mit S.aureus

Es galt eine Korrelationskurve zu erstellen, von der mittels RLU-Messungen schnell und sensitiv indirekt auf die Keimbelastung der Proben geschlossen werden kann.

Dazu wurden in Eppendorfröhrchen mehrere reine Verdünnungsreihen mit *S.aureus* in steriler NaCl (0,9%) - Lösung hergestellt. Nach der luminometrischen und kulturellen Messung jeder verdünnten Probe wurden die Ergebnisse statistisch analysiert. Dafür wurde der t-Test genutzt. Hierbei ergab jede Testreihe für sich einen signifikanten Zusammenhang (p -Wert $< 0,05$) zwischen dem RLU- und KBE-Wert (Daten nicht gezeigt). Die gemittelte Korrelation lag bei etwa 94% und das 95%-Konfidenzintervall bewegte sich im Durchschnitt um circa 0,14.

Der Zusammenhang zwischen den RLU und den KBE war nicht linear, sodass als Methode der Auswertung die lokale Regressionsanalyse angewandt und Wertetabellen für jede einzelne Testreihe erstellt wurden. Die bei der Betrachtung aller Wertepaare erstellte Korrelationskurve, die schließlich zur Ablesung der absoluten Keimbelastung in KBE anhand der im Luminometer gemessenen RLU aus den Patientenproben dienen sollte, ist in Abbildung 3.1.1 dargestellt. Die dazugehörige Wertetabelle ist Tabelle 3.1.

Abb. 3.1.1: Graphische Darstellung der Korrelationskurve von RLU und KBE. Es sind sowohl die in den Testreihen gemessenen (*kleine Kreise*) als auch die aus der Wertetabelle entnommenen (*durchgezogene Strecke*) RLU-Werte in Abhängigkeit von den KBE (Kolonie bildende Einheiten)-Werten dargestellt. Dabei ist zur besseren Veranschaulichung jeweils der natürliche Logarithmus der Werte angegeben.



Tab. 3.1: Wertetabelle korrelierender KBE- und RLU-Werte. Dargestellt ist die Wertetabelle der lokalen Regressionsanalyse der im Luminometer gemessenen RLU-Werte in Abhängigkeit von den kulturell bestimmten dazugehörigen KBE-Werten. Dabei ist zur besseren Veranschaulichung jeweils der natürliche Logarithmus der Werte angegeben.

ln(KBE)	ln(RLU)	ln(KBE)	ln(RLU)	ln(KBE)	ln(RLU)	ln(KBE)	ln(RLU)	ln(KBE)	ln(RLU)	ln(KBE)	ln(RLU)	ln(KBE)	ln(RLU)	ln(KBE)	ln(RLU)
0,00	5,22	0,76	5,20	1,52	5,21	2,28	5,28	3,04	5,39	3,80	5,55	4,56	5,81	5,32	6,21
0,01	5,22	0,77	5,20	1,53	5,21	2,29	5,28	3,05	5,39	3,81	5,55	4,57	5,81	5,33	6,21
0,02	5,22	0,78	5,20	1,54	5,21	2,30	5,28	3,06	5,39	3,82	5,55	4,58	5,81	5,34	6,22
0,03	5,22	0,79	5,20	1,55	5,21	2,31	5,28	3,07	5,39	3,83	5,55	4,59	5,82	5,35	6,23
0,04	5,22	0,80	5,20	1,56	5,21	2,32	5,28	3,08	5,40	3,84	5,56	4,60	5,82	5,36	6,23
0,05	5,22	0,81	5,20	1,57	5,21	2,33	5,28	3,09	5,40	3,85	5,56	4,61	5,83	5,37	6,24
0,06	5,22	0,82	5,20	1,58	5,21	2,34	5,28	3,10	5,40	3,86	5,56	4,62	5,83	5,38	6,24
0,07	5,22	0,83	5,20	1,59	5,21	2,35	5,28	3,11	5,40	3,87	5,56	4,63	5,84	5,39	6,25
0,08	5,22	0,84	5,20	1,60	5,21	2,36	5,28	3,12	5,40	3,88	5,57	4,64	5,84	5,40	6,26
0,09	5,22	0,85	5,20	1,61	5,22	2,37	5,29	3,13	5,41	3,89	5,57	4,65	5,85	5,41	6,26
0,10	5,22	0,86	5,20	1,62	5,22	2,38	5,29	3,14	5,41	3,90	5,57	4,66	5,85	5,42	6,27
0,11	5,22	0,87	5,20	1,63	5,22	2,39	5,29	3,15	5,41	3,91	5,57	4,67	5,86	5,43	6,28
0,12	5,22	0,88	5,20	1,64	5,22	2,40	5,29	3,16	5,41	3,92	5,58	4,68	5,86	5,44	6,28
0,13	5,22	0,89	5,20	1,65	5,22	2,41	5,29	3,17	5,41	3,93	5,58	4,69	5,86	5,45	6,29
0,14	5,22	0,90	5,20	1,66	5,22	2,42	5,29	3,18	5,42	3,94	5,58	4,70	5,87	5,46	6,29
0,15	5,21	0,91	5,20	1,67	5,22	2,43	5,29	3,19	5,42	3,95	5,59	4,71	5,87	5,47	6,30
0,16	5,21	0,92	5,20	1,68	5,22	2,44	5,30	3,20	5,42	3,96	5,59	4,72	5,88	5,48	6,31
0,17	5,21	0,93	5,20	1,69	5,22	2,45	5,30	3,21	5,42	3,97	5,59	4,73	5,88	5,49	6,31
0,18	5,21	0,94	5,20	1,70	5,22	2,46	5,30	3,22	5,42	3,98	5,59	4,74	5,89	5,50	6,32
0,19	5,21	0,95	5,20	1,71	5,22	2,47	5,30	3,23	5,42	3,99	5,60	4,75	5,89	5,51	6,33
0,20	5,21	0,96	5,20	1,72	5,22	2,48	5,30	3,24	5,43	4,00	5,60	4,76	5,90	5,52	6,33
0,21	5,21	0,97	5,20	1,73	5,22	2,49	5,30	3,25	5,43	4,01	5,60	4,77	5,90	5,53	6,34
0,22	5,21	0,98	5,20	1,74	5,22	2,50	5,30	3,26	5,43	4,02	5,60	4,78	5,91	5,54	6,35
0,23	5,21	0,99	5,20	1,75	5,22	2,51	5,30	3,27	5,43	4,03	5,61	4,79	5,91	5,55	6,35
0,24	5,21	1,00	5,20	1,76	5,23	2,52	5,31	3,28	5,43	4,04	5,61	4,80	5,92	5,56	6,36
0,25	5,21	1,01	5,20	1,77	5,23	2,53	5,31	3,29	5,44	4,05	5,61	4,81	5,92	5,57	6,36
0,26	5,21	1,02	5,20	1,78	5,23	2,54	5,31	3,30	5,44	4,06	5,62	4,82	5,93	5,58	6,37
0,27	5,21	1,03	5,20	1,79	5,23	2,55	5,31	3,31	5,44	4,07	5,62	4,83	5,94	5,59	6,38
0,28	5,21	1,04	5,20	1,80	5,23	2,56	5,31	3,32	5,44	4,08	5,62	4,84	5,94	5,60	6,38
0,29	5,21	1,05	5,20	1,81	5,23	2,57	5,31	3,33	5,44	4,09	5,63	4,85	5,95	5,61	6,39
0,30	5,21	1,06	5,20	1,82	5,23	2,58	5,31	3,34	5,45	4,10	5,63	4,86	5,95	5,62	6,40
0,31	5,21	1,07	5,20	1,83	5,23	2,59	5,32	3,35	5,45	4,11	5,63	4,87	5,96	5,63	6,40
0,32	5,21	1,08	5,20	1,84	5,23	2,60	5,32	3,36	5,45	4,12	5,64	4,88	5,96	5,64	6,41
0,33	5,21	1,09	5,20	1,85	5,23	2,61	5,32	3,37	5,45	4,13	5,64	4,89	5,97	5,65	6,42
0,34	5,21	1,10	5,20	1,86	5,23	2,62	5,32	3,38	5,45	4,14	5,64	4,90	5,97	5,66	6,42
0,35	5,21	1,11	5,20	1,87	5,23	2,63	5,32	3,39	5,46	4,15	5,65	4,91	5,98	5,67	6,43
0,36	5,21	1,12	5,20	1,88	5,23	2,64	5,32	3,40	5,46	4,16	5,65	4,92	5,98	5,68	6,44
0,37	5,21	1,13	5,20	1,89	5,24	2,65	5,32	3,41	5,46	4,17	5,65	4,93	5,99	5,69	6,44
0,38	5,21	1,14	5,20	1,90	5,24	2,66	5,33	3,42	5,46	4,18	5,66	4,94	5,99	5,70	6,45
0,39	5,20	1,15	5,20	1,91	5,24	2,67	5,33	3,43	5,46	4,19	5,66	4,95	6,00	5,71	6,45
0,40	5,20	1,16	5,20	1,92	5,24	2,68	5,33	3,44	5,47	4,20	5,66	4,96	6,00	5,72	6,46
0,41	5,20	1,17	5,20	1,93	5,24	2,69	5,33	3,45	5,47	4,21	5,67	4,97	6,01	5,73	6,47
0,42	5,20	1,18	5,20	1,94	5,24	2,70	5,33	3,46	5,47	4,22	5,67	4,98	6,01	5,74	6,47
0,43	5,20	1,19	5,20	1,95	5,24	2,71	5,33	3,47	5,47	4,23	5,67	4,99	6,02	5,75	6,48
0,44	5,20	1,20	5,20	1,96	5,24	2,72	5,34	3,48	5,47	4,24	5,68	5,00	6,02	5,76	6,48
0,45	5,20	1,21	5,20	1,97	5,24	2,73	5,34	3,49	5,48	4,25	5,68	5,01	6,03	5,77	6,49
0,46	5,20	1,22	5,20	1,98	5,24	2,74	5,34	3,50	5,48	4,26	5,68	5,02	6,03	5,78	6,50
0,47	5,20	1,23	5,20	1,99	5,24	2,75	5,34	3,51	5,48	4,27	5,69	5,03	6,04	5,79	6,50
0,48	5,20	1,24	5,20	2,00	5,25	2,76	5,34	3,52	5,48	4,28	5,69	5,04	6,05	5,80	6,51
0,49	5,20	1,25	5,20	2,01	5,25	2,77	5,34	3,53	5,49	4,29	5,70	5,05	6,05	5,81	6,52
0,50	5,20	1,26	5,20	2,02	5,25	2,78	5,35	3,54	5,49	4,30	5,70	5,06	6,06	5,82	6,52
0,51	5,20	1,27	5,20	2,03	5,25	2,79	5,35	3,55	5,49	4,31	5,70	5,07	6,06	5,83	6,53
0,52	5,20	1,28	5,20	2,04	5,25	2,80	5,35	3,56	5,49	4,32	5,71	5,08	6,07	5,84	6,54
0,53	5,20	1,29	5,20	2,05	5,25	2,81	5,35	3,57	5,49	4,33	5,71	5,09	6,07	5,85	6,54
0,54	5,20	1,30	5,20	2,06	5,25	2,82	5,35	3,58	5,50	4,34	5,71	5,10	6,08	5,86	6,55
0,55	5,20	1,31	5,20	2,07	5,25	2,83	5,35	3,59	5,50	4,35	5,72	5,11	6,09	5,87	6,55
0,56	5,20	1,32	5,20	2,08	5,25	2,84	5,35	3,60	5,50	4,36	5,72	5,12	6,09	5,88	6,56
0,57	5,20	1,33	5,20	2,09	5,25	2,85	5,36	3,61	5,50	4,37	5,73	5,13	6,10	5,89	6,57
0,58	5,20	1,34	5,20	2,10	5,26	2,86	5,36	3,62	5,50	4,38	5,73	5,14	6,10	5,90	6,58
0,59	5,20	1,35	5,20	2,11	5,26	2,87	5,36	3,63	5,51	4,39	5,73	5,15	6,11	5,91	6,58
0,60	5,20	1,36	5,20	2,12	5,26	2,88	5,36	3,64	5,51	4,40	5,74	5,16	6,12	5,92	6,59
0,61	5,20	1,37	5,20	2,13	5,26	2,89	5,36	3,65	5,51	4,41	5,74	5,17	6,12	5,93	6,60
0,62	5,20	1,38	5,20	2,14	5,26	2,90	5,36	3,66	5,51	4,42	5,75	5,18	6,13	5,94	6,61
0,63	5,20	1,39	5,20	2,15	5,26	2,91	5,37	3,67	5,52	4,43	5,75	5,19	6,13	5,95	6,61
0,64	5,20	1,40	5,20	2,16	5,26	2,92	5,37	3,68	5,52	4,44	5,75	5,20	6,14	5,96	6,62
0,65	5,20	1,41	5,21	2,17	5,26	2,93	5,37	3,69	5,52	4,45	5,76	5,21	6,14	5,97	6,63
0,66	5,20	1,42	5,21	2,18	5,26	2,94	5,37	3,70	5,52	4,46	5,76	5,22	6,15	5,98	6,64
0,67	5,20	1,43	5,21	2,19	5,26	2,95	5,37	3,71	5,53	4,47	5,77	5,23	6,16	5,99	6,65
0,68	5,20	1,44	5,21	2,20	5,27	2,96	5,38	3,72	5,53	4,48	5,77	5,24	6,16	6,00	6,65
0,69	5,20	1,45	5,21	2,21	5,27	2,97	5,38	3,73	5,53	4,49	5,77	5,25	6,17	6,01	6,66
0,70	5,20	1,46	5,21	2,22	5,27	2,98	5,38	3,74	5,53	4,50	5,78	5,26	6,17	6,02	6,66
0,71	5,20	1,47	5,21	2,23	5,27	2,99	5,38	3,75	5,53	4,51	5,78	5,27	6,18	6,03	6,67
0,72	5,20	1,48	5,21	2,24	5,27	3,00	5,38	3,76	5,54	4,52	5,79	5,28	6,19	6,04	6,68
0,73	5,20	1,49	5,21	2,25	5,27	3,01	5,38	3,77	5,54	4,53	5,79	5,29	6,19	6,05	6,69
0,74	5,20	1,50	5,21	2,26	5,27	3,02	5,39	3,78	5,54	4,54	5,80	5,30	6,20	6,06	6,70

ln(KBE)	ln(RLU)	ln(KBE)	ln(RLU)	ln(KBE)	ln(RLU)	ln(KBE)	ln(RLU)	ln(KBE)	ln(RLU)	ln(KBE)	ln(RLU)	ln(KBE)	ln(RLU)	ln(KBE)	ln(RLU)
0,75	5,20	1,51	5,21	2,27	5,27	3,03	5,39	3,79	5,54	4,55	5,80	5,31	6,20	6,07	6,70
6,08	6,71	6,84	7,34	7,60	7,88	8,36	8,50	9,12	9,27	9,88	10,08	10,64	10,96	11,40	11,93
6,09	6,72	6,85	7,34	7,61	7,89	8,37	8,51	9,13	9,28	9,89	10,10	10,65	10,98	11,41	11,94
6,10	6,73	6,86	7,35	7,62	7,89	8,38	8,52	9,14	9,29	9,90	10,11	10,66	10,99	11,42	11,95
6,11	6,74	6,87	7,36	7,63	7,90	8,39	8,53	9,15	9,30	9,91	10,12	10,67	11,00	11,43	11,97
6,12	6,75	6,88	7,37	7,64	7,91	8,40	8,54	9,16	9,31	9,92	10,13	10,68	11,01	11,44	11,98
6,13	6,76	6,89	7,38	7,65	7,91	8,41	8,55	9,17	9,32	9,93	10,14	10,69	11,03	11,45	11,99
6,14	6,76	6,90	7,39	7,66	7,92	8,42	8,56	9,18	9,33	9,94	10,15	10,70	11,04	11,46	12,00
6,15	6,77	6,91	7,40	7,67	7,93	8,43	8,57	9,19	9,34	9,95	10,16	10,71	11,05	11,47	12,02
6,16	6,78	6,92	7,41	7,68	7,93	8,44	8,58	9,20	9,35	9,96	10,17	10,72	11,06	11,48	12,03
6,17	6,79	6,93	7,42	7,69	7,94	8,45	8,59	9,21	9,36	9,97	10,18	10,73	11,07	11,49	12,04
6,18	6,80	6,94	7,43	7,70	7,95	8,46	8,60	9,22	9,38	9,98	10,20	10,74	11,09	11,50	12,06
6,19	6,81	6,95	7,44	7,71	7,95	8,47	8,61	9,23	9,39	9,99	10,21	10,75	11,10	11,51	12,07
6,20	6,82	6,96	7,46	7,72	7,96	8,48	8,62	9,24	9,40	10,00	10,22	10,76	11,11	11,52	12,08
6,21	6,82	6,97	7,47	7,73	7,97	8,49	8,63	9,25	9,41	10,01	10,23	10,77	11,12	11,53	12,10
6,22	6,83	6,98	7,48	7,74	7,97	8,50	8,64	9,26	9,42	10,02	10,24	10,78	11,14	11,54	12,11
6,23	6,84	6,99	7,49	7,75	7,98	8,51	8,65	9,27	9,43	10,03	10,25	10,79	11,15	11,55	12,12
6,24	6,85	7,00	7,50	7,76	7,99	8,52	8,66	9,28	9,44	10,04	10,26	10,80	11,16	11,56	12,14
6,25	6,86	7,01	7,51	7,77	7,99	8,53	8,67	9,29	9,45	10,05	10,27	10,81	11,17	11,57	12,15
6,26	6,87	7,02	7,52	7,78	8,00	8,54	8,68	9,30	9,46	10,06	10,29	10,82	11,18	11,58	12,16
6,27	6,87	7,03	7,53	7,79	8,01	8,55	8,69	9,31	9,47	10,07	10,30	10,83	11,20	11,59	12,18
6,28	6,88	7,04	7,54	7,80	8,02	8,56	8,70	9,32	9,48	10,08	10,31	10,84	11,21	11,60	12,19
6,29	6,89	7,05	7,55	7,81	8,02	8,57	8,71	9,33	9,49	10,09	10,32	10,85	11,22	11,61	12,21
6,30	6,90	7,06	7,56	7,82	8,03	8,58	8,72	9,34	9,50	10,10	10,33	10,86	11,23	11,62	12,22
6,31	6,91	7,07	7,57	7,83	8,04	8,59	8,73	9,35	9,51	10,11	10,34	10,87	11,25	11,63	12,23
6,32	6,92	7,08	7,58	7,84	8,04	8,60	8,74	9,36	9,52	10,12	10,35	10,88	11,26	11,64	12,25
6,33	6,92	7,09	7,59	7,85	8,05	8,61	8,75	9,37	9,53	10,13	10,37	10,89	11,27	11,65	12,26
6,34	6,93	7,10	7,60	7,86	8,06	8,62	8,76	9,38	9,54	10,14	10,38	10,90	11,28	11,66	12,27
6,35	6,94	7,11	7,61	7,87	8,07	8,63	8,77	9,39	9,55	10,15	10,39	10,91	11,30	11,67	12,29
6,36	6,95	7,12	7,61	7,88	8,08	8,64	8,78	9,40	9,56	10,16	10,40	10,92	11,31	11,68	12,30
6,37	6,96	7,13	7,62	7,89	8,08	8,65	8,79	9,41	9,58	10,17	10,41	10,93	11,32	11,69	12,31
6,38	6,97	7,14	7,63	7,90	8,09	8,66	8,80	9,42	9,59	10,18	10,42	10,94	11,33	11,70	12,33
6,39	6,97	7,15	7,64	7,91	8,10	8,67	8,81	9,43	9,60	10,19	10,43	10,95	11,35	11,71	12,34
6,40	6,98	7,16	7,64	7,92	8,11	8,68	8,82	9,44	9,61	10,20	10,45	10,96	11,36	11,72	12,35
6,41	6,99	7,17	7,65	7,93	8,11	8,69	8,83	9,45	9,62	10,21	10,46	10,97	11,37	11,73	12,37
6,42	6,99	7,18	7,66	7,94	8,12	8,70	8,84	9,46	9,63	10,22	10,47	10,98	11,38	11,74	12,38
6,43	7,00	7,19	7,66	7,95	8,13	8,71	8,85	9,47	9,64	10,23	10,48	10,99	11,40	11,75	12,39
6,44	7,01	7,20	7,67	7,96	8,14	8,72	8,86	9,48	9,65	10,24	10,49	11,00	11,41	11,76	12,41
6,45	7,02	7,21	7,68	7,97	8,15	8,73	8,87	9,49	9,66	10,25	10,50	11,01	11,42	11,77	12,42
6,46	7,02	7,22	7,68	7,98	8,16	8,74	8,88	9,50	9,67	10,26	10,51	11,02	11,43	11,78	12,44
6,47	7,03	7,23	7,69	7,99	8,16	8,75	8,89	9,51	9,68	10,27	10,53	11,03	11,45	11,79	12,45
6,48	7,04	7,24	7,69	8,00	8,17	8,76	8,90	9,52	9,69	10,28	10,54	11,04	11,46	11,80	12,46
6,49	7,04	7,25	7,70	8,01	8,18	8,77	8,91	9,53	9,70	10,29	10,55	11,05	11,47		
6,50	7,05	7,26	7,70	8,02	8,19	8,78	8,92	9,54	9,71	10,30	10,56	11,06	11,49		
6,51	7,06	7,27	7,71	8,03	8,20	8,79	8,93	9,55	9,72	10,31	10,57	11,07	11,50		
6,52	7,07	7,28	7,71	8,04	8,21	8,80	8,94	9,56	9,74	10,32	10,58	11,08	11,51		
6,53	7,07	7,29	7,72	8,05	8,22	8,81	8,95	9,57	9,75	10,33	10,60	11,09	11,52		
6,54	7,08	7,30	7,73	8,06	8,22	8,82	8,96	9,58	9,76	10,34	10,61	11,10	11,54		
6,55	7,09	7,31	7,74	8,07	8,23	8,83	8,97	9,59	9,77	10,35	10,62	11,11	11,55		
6,56	7,10	7,32	7,74	8,08	8,24	8,84	8,98	9,60	9,78	10,36	10,63	11,12	11,56		
6,57	7,11	7,33	7,74	8,09	8,25	8,85	8,99	9,61	9,79	10,37	10,64	11,13	11,57		
6,58	7,11	7,34	7,75	8,10	8,26	8,86	9,00	9,62	9,80	10,38	10,65	11,14	11,59		
6,59	7,12	7,35	7,75	8,11	8,27	8,87	9,01	9,63	9,81	10,39	10,67	11,15	11,60		
6,60	7,13	7,36	7,76	8,12	8,28	8,88	9,02	9,64	9,82	10,40	10,68	11,16	11,61		
6,61	7,14	7,37	7,76	8,13	8,29	8,89	9,03	9,65	9,83	10,41	10,69	11,17	11,63		
6,62	7,14	7,38	7,77	8,14	8,30	8,90	9,04	9,66	9,84	10,42	10,70	11,18	11,64		
6,63	7,15	7,39	7,77	8,15	8,31	8,91	9,05	9,67	9,85	10,43	10,71	11,19	11,65		
6,64	7,16	7,40	7,78	8,16	8,31	8,92	9,06	9,68	9,86	10,44	10,72	11,20	11,66		
6,65	7,17	7,41	7,78	8,17	8,32	8,93	9,07	9,69	9,88	10,45	10,74	11,21	11,68		
6,66	7,18	7,42	7,79	8,18	8,33	8,94	9,09	9,70	9,89	10,46	10,75	11,22	11,69		
6,67	7,18	7,43	7,79	8,19	8,34	8,95	9,10	9,71	9,90	10,47	10,76	11,23	11,70		
6,68	7,19	7,44	7,80	8,20	8,35	8,96	9,11	9,72	9,91	10,48	10,77	11,24	11,72		
6,69	7,20	7,45	7,80	8,21	8,36	8,97	9,12	9,73	9,92	10,49	10,78	11,25	11,73		
6,70	7,21	7,46	7,81	8,22	8,37	8,98	9,13	9,74	9,93	10,50	10,80	11,26	11,74		
6,71	7,22	7,47	7,81	8,23	8,38	8,99	9,14	9,75	9,94	10,51	10,81	11,27	11,76		
6,72	7,23	7,48	7,82	8,24	8,39	9,00	9,15	9,76	9,95	10,52	10,82	11,28	11,77		
6,73	7,24	7,49	7,82	8,25	8,40	9,01	9,16	9,77	9,96	10,53	10,83	11,29	11,78		
6,74	7,24	7,50	7,83	8,26	8,41	9,02	9,17	9,78	9,97	10,54	10,84	11,30	11,79		
6,75	7,25	7,51	7,83	8,27	8,42	9,03	9,18	9,79	9,98	10,55	10,86	11,31	11,81		
6,76	7,26	7,52	7,84	8,28	8,43	9,04	9,19	9,80	10,00	10,56	10,87	11,32	11,82		
6,77	7,27	7,53	7,84	8,29	8,44	9,05	9,20	9,81	10,01	10,57	10,88	11,33	11,83		
6,78	7,28	7,54	7,85	8,30	8,45	9,06	9,21	9,82	10,02	10,58	10,89	11,34	11,85		
6,79	7,29	7,55	7,85	8,31	8,46	9,07	9,22	9,83	10,03	10,59	10,90	11,35	11,86		
6,80	7,30	7,56	7,86	8,32	8,47	9,08	9,23	9,84	10,04	10,60	10,92	11,36	11,87		
6,81	7,31	7,57	7,86	8,33	8,48	9,09	9,24	9,85	10,05	10,61	10,93	11,37	11,89		
6,82	7,32	7,58	7,87	8,34	8,48	9,10	9,25	9,86	10,06	10,62	10,94	11,38	11,90		
6,83	7,33	7,59	7,88	8,35	8,49	9,11	9,26	9,87	10,07	10,63	10,95	11,39	11,91		

In Tab. 3.1.1 ist die statistische Analyse aller mit reinen Keimdilutionen („Valle“) durchgeführten Messungen aufgeführt. Bei der gemeinsamen Betrachtung aller 91 Wertepaare zeigte sich eine Korrelation von 0,92 bei einem Konfidenzintervall von 0,87 bis 0,94 und einem p-Wert von $2,2 \cdot 10^{-16}$. Ein p-Wert von $< 0,05$ bedeutet, dass die Hypothese der Unabhängigkeit (H_0) des RLU-Wertes vom KBE-Wert auf einem Niveau von 5% abgelehnt werden kann und deutet damit auf eine signifikante Korrelation (H_1) zwischen RLU- und KBE-Wert hin. Bei einem p-Wert von 1 sind die Beziehungen zufällig.

Ein Korrelationswert von 1 würde eine lineare Abhängigkeit des RLU-Wertes vom KBE-Wert bedeuten. Dazu müsste die Zielvariable (RLU) immer um den gleichen Betrag zu- oder abnehmen, wenn sich die unabhängige Variable (KBE) um eine Einheit ändert. Werte ab circa 0,90 aufwärts könnten dabei nur annähernd eine lineare Korrelation anzeigen, sodass hier die Erstellung einer Wertetabelle wie o.g. (Tab. 3.1) als die geeignete Methode zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen RLU- und KBE-Wert gilt. Die graphische Darstellung erfolgte bereits in Abb. 3.1.

Tab. 3.1.1: Statistische Auswertung der Messungen mit reinen Keimdilutionen. Es ist die aus allen RLU-KBE-Wertepaaren (Valle) erstellte Korrelations-Wertetabelle aufgeführt. Die Werte deuten auf eine signifikante Korrelation (p-Wert $< 0,05$) und annähernd lineare Korrelation (0,92) hin. t: Testwert des Korrelationstestes (auf Korrelation); df (FHG): Freiheitsgrade; KI[95%]=95%-Konfidenzintervall; n=Anzahl der Messergebnisse.

Versuch	t	df (FHG)	p-Wert	Korrelation	KI[95%]	n
Valle	21,88	84	0,00000025	0,92	0,88;0,95	91

3.1.2 Präzision

Die Präzision eines Verfahrens lässt sich durch oftmaliges Wiederholen der Messung unter gleichen Umständen mit demselben Messsystem quantifizieren. Ein sehr präzises Verfahren liefert für ein und dieselbe Aufgabe jeweils nahezu gleiche Ergebnisse. Sie macht keine Aussagen darüber, wie weit die einzelnen Messwerte jeweils von der realen Vorgabe entfernt sind, sondern beschreibt die Stabilität der Messung. Als Testkeim wurde *S.aureus* benutzt.

Beim Versuch nahm die absolute Standardabweichung zwar mit steigendem RLU-Wert zu (nicht dargestellt), jedoch ist sie prozentual gesehen kleiner als bei niedrigen RLU-Werten (Tab. 3.1.2). Das Messgerät liefert also bei größeren Keimmengen, die mit einem größeren

RLU-Wert über circa 520 RLU korrelieren, nahezu gleiche Ergebnisse. Mit abnehmender Keimzahl in der Probe nimmt also die Präzision ab.

Tab. 3.1.2: Präzision der Messungen mit dem Luminometer. Angegeben sind der Mittelwert (MW) von drei sofort aufeinanderfolgenden RLU-Messungen der gleichen Probe und die dazugehörige prozentuale Standardabweichung (SA). Dabei sind die SA den willkürlich bestimmten RLU-Wert-Bereichen zugeteilt.

RLU-Bereich	0-70	71-520	> 520
Standardabweichung [%]	7-30	2-9	1-3

3.1.3 Wachstumskurve

Eine KBE von *S.aureus* wurde in Thioglycolat-Bouillon für 48h bei 37°C bebrütet. Nach 60, 90, 120 und 180 min wurde je eine Probe entnommen und diese luminometrisch sowie kulturell ausgewertet.

Ab etwa 2 h Inkubationszeit ließ sich eine exponentielle Zunahme der RLU- im Luminometer als auch der KBE-Werte in der kulturellen Kontrolle nachweisen (Tab. 3.1.3).

Tab. 3.1.3: Wachstumskurve von *S.aureus* in Thioglycolat-Bouillon. Angegeben sind die korrelierenden KBE- und RLU-Werte der über die Zeit [t in min] entnommenen Suspensionsproben.

t in min	KBE	RLU
0	1160	1970
60	1250	2250
90	1320	2531
120	1380	2589
180	3100	4098

3.1.4 Kitvergleich

In den Vorversuchen wurde fast immer mit dem *ATP-Biomass-Kit* gearbeitet. Dieses enthält kein ATP Eliminating Reagent, welches extrazelluläres ATP abbauen würde. Das war auch nicht nötig, da in diesen Fällen mit reinen Bakteriendilutionen gearbeitet wurde. Da aus Haut- und Nasenabstrichen zwangsläufig neben den Keimen auch ATP-enthaltende Epithelzellen

und extrazelluläres ATP gewonnen wird, ist das *ATP-Biomass-Kit* mit dem *Microbial-ATP-Kit* verglichen worden.

Bei diesem Versuch sind zwei reine *S.aureus* – Keimdilutionen, eine Haut- und eine Nasenabstrichprobe mit beiden Kits gemessen worden. Als Kontrolle diente das kulturelle Verfahren zur Keimzahlbestimmung mittels Blutagarplatte.

Wie erwartet, glichen sich im Ergebnis in etwa die RLU-Werte der reinen *S.aureus* - Verdünnungen zwischen den beiden Kits. Bei der Messung der Abstrichproben mit dem *ATP-Biomass-Kit* wurde ein wesentlich höherer Wert erzielt (Tab. 3.1.4).

Tab. 3.1.4: Vergleich *ATP-Biomass-* mit *Microbial-ATP-Kit*. Angegeben sind die aus den Proben jeweils mit beiden Kits gemessenen RLU-Werte. *S.aureus*-Suspension 1: 1 Kolonie/ml NaCl (0,9%) - Lösung. *S.aureus*-Suspension 2: 1:10 - Verdünnung von *S.aureus*-Suspension 1.

Probe	<i>ATP-Biomass-Kit</i>	<i>Microbial-ATP-Kit</i>	KBE
<i>S.aureus</i> -Suspension 1	5491	4441	6680
<i>S.aureus</i> -Suspension 2	535	322	1188
Nasenabstrich	44084	768	402
Hautabstrich	1626	1052	1

3.2 Wiederfindung von *S.aureus* auf Oberflächen

Eine reine *S.aureus*-Suspension wurde auf vorher mit 70%igem Alkohol desinfizierten Oberflächen aufgebracht. Nach Antrocknungszeit von 10 min ließen sich mit dem Tupfer beim Abstrich bzw. in einer weiteren Versuchsreihe beim Abklatsch vom Stahlprüfkörper 5,5%/ 52%, vom Plastikdeckel 5,7%/ 24,2%, von der Tischoberfläche (Kunststoff) 67,2%/ 39,8% und von der Unterarmhaut 9,9%/ 15,2% der vorher aufgetragenen Keimzahl wiederfinden (Tab. 3.2).

Zusammenfassend wurden mit Ausnahme der Kunststoffoberfläche per Tupferabstrich nur ca. 5 bis 10% und beim Abklatsch etwa 15 bis 25% der Keime nachgewiesen. Da der Tupferabstrich die bewährtere Methode zur klinischen Probengewinnung darstellt, wurde dieser bei den folgenden Abreicherungsuntersuchungen genutzt.

Tab. 3.2: Wiederfindung von *S.aureus* auf Oberflächen. Eine reine *S.aureus*-Suspension (961 KBE/50µl) wurde 5 min nach Desinfektion mit 70%igem Alkohol auf eine definierte Fläche von 9 cm² der Oberflächen gegeben und nach 10 min Antrocknungszeit abgestrichen bzw. abgeklatscht. Angegeben ist die kulturell gemessene Keimzahl sowohl absolut (KBE) als auch prozentual (%).

	Stahlprüfkörper		Plastikdeckel		Kunststoff (Tischoberfläche)		Haut (Unterarm)	
	KBE	%	KBE	%	KBE	%	KBE	%
Abstrich	52	5,4	55	5,7	646	67,2	95	9,9
Abklatsch	219	22,8	233	24,2	382	39,8	146	15,2

3.2.1 Wiederfindung von *S.aureus* auf unbelebten Oberflächen (Plastikdeckel, Stahlkörper, Tischplatte)

Bei einer weiteren Versuchsreihe mit Abreicherung in Form vier nacheinander durchgeführter Abstriche auf derselben Oberfläche wurden wie erwartet nur noch wenige Bakterien gefunden. Nur beim Plastikdeckel und der Tischplatte zeigte sich eine geeignete Korrelation mit den ATP-Messungen. Diese war beim Stahlprüfkörper hingegen bis Probe 3 antiproportional.

Tab. 3.2.1: Wiederfindung von *S.aureus* auf unbelebten Oberflächen. Nach alkoholischer Desinfektion wurde eine definierte Keimmenge an *S.aureus* (961 KBE/50µl) auf eine definierte Fläche von 9 cm² aufgetragen und danach mittels sterilem Tupfer viermal hintereinander abgestrichen (Abreicherung 1-4). Diese wurden wie unter 2.2.2 beschrieben verarbeitet. Die Tabelle zeigt die kulturell sowie bioluminometrisch aus den jeweiligen Proben nachgewiesene Keimbelastung in KBE bzw. RLU (je Mittelwert aus 3 Werten).

Abreicherung	Stahlprüfkörper				Plastikdeckel				Tischplatte			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
KBE	82	42	11	0	67	11	4	1	73	43	7	1
RLU	777	1092	1114	502	2152	397	305	281	4300	2227	1451	1598

Zusammenfassend zeigte sich in den Untersuchungen auf unbelebten Oberflächen beim Plastikdeckel und der Tischplatte, nicht jedoch beim Stahlprüfkörper, eine Korrelation zwischen RLU- und KBE-Wert.

3.2.2 Wiederfindung von *S.aureus* auf belebten Oberflächen (Haut, Nase)

3.2.2.1 Haut (Unterarmvorderseite)

Bei der Abreicherung auf der Haut wurden beim zweiten Abstrich nur noch eine, anschließend 0 KBE nachgewiesen. Entsprechend der abnehmenden kulturell bestimmten Keimzahl nahm ebenfalls der RLU-Wert im Verlauf ab (Tab. 3.2.2.1).

Tab. 3.2.2.1: Wiederfindung von *S.aureus* auf der Haut (Unterarmvorderseite). Nach alkoholischer Desinfektion wurde eine definierte Keimmenge an *S.aureus* (961 KBE/50µl) auf eine definierte Fläche von 9 cm² der Unterarmhaut aufgetragen und danach mittels sterilem Tupfer viermal hintereinander abgestrichen (Abreicherung 1-4). Diese wurden wie unter 2.2.2 beschrieben verarbeitet. Die Tabelle zeigt die kulturell sowie bioluminometrisch aus den jeweiligen Proben nachgewiesene Keimbelastung in KBE bzw. RLU (je Mittelwert aus 3 Werten).

	Haut (Unterarm)			
Abreicherung	1	2	3	4
KBE	14	1	0	0
RLU	2649	807	103	139

3.2.2.2 Nasenvorhof

Bei dieser Untersuchung wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen 3 x täglich je beide Nasenlöcher des Doktoranden mit einem sterilen Tupfer abgestrichen und die insgesamt 12 Proben kulturell sowie luminometrisch ausgewertet.

Die kulturell nachgewiesenen Keimzahlen bewegten sich zwischen 99 und 346 KBE. Mit Werten zwischen 332 und 57428 RLU waren die luminometrischen Daten sehr viel breiter gestreut. Dabei ließ sich nur für wenige Wertepaare eine Korrelation zeigen (**fett**). Hingegen kann für die Mehrzahl der Wertepaare keine geeignete positive Korrelation abgeleitet werden (*kursiv*).

Tab. 3.2.2.2: Keimnachweis beim Nasenabstrich. An drei aufeinanderfolgenden Tagen wurden 3 x täglich je beide Nasenlöcher mit einem sterilen Tupfer abgestrichen. Die Tabelle zeigt die kulturell sowie bioluminometrisch aus den jeweiligen Proben nachgewiesene Keimbelastung in KBE bzw. RLU pro 20 µl Bakteriensuspension. *Kursiv:* Wertepaare als Beispiel für fehlende Korrelation. **Fett:** Wertepaare als Beispiel für wahrscheinliche Korrelation.

Uhrzeit	Tag							
	1				2			
	Na li		Na re		Na li		Na re	
	KBE	RLU	KBE	RLU	KBE	RLU	KBE	RLU
08:30	346	338	99	619	204	11770	<i>101</i>	<i>12146</i>
12:30	306	332	<i>244</i>	<i>7346</i>	230	57428	<i>101</i>	<i>57428</i>
16:30	203	4964	<i>242</i>	<i>1094</i>	226	47536	160	53431

Zusammenfassend zeigte sich in den Untersuchungen auf belebten Oberflächen beim Hautabstrich im orientierenden Versuch eine geeignete positive Korrelation zwischen RLU- und KBE-Wert. Diese ließ sich in der Nase allerdings nicht nachweisen.

3.2.3 Abstrichproben unterschiedlicher Haut- und Schleimhautbereiche

Es wurden kulturell und luminometrisch Abstrichproben von nicht vorbehandelter bzw. nicht desinfizierter Haut des Unterarms sowie Schleimhaut der Nase untersucht. Damit sollte verglichen werden, ob bei Proben an verschiedenen (Schleim-)Hautarealen gleiche Ergebnisse (RLU, KBE) zu erwarten sind.

Tab. 3.2.3: Haut und Nasenabstrichproben. Dargestellt sind die Ergebnisse (RLU, KBE) aus Abstrichproben von nicht vorbehandelten bzw. nicht desinfizierten Haut (Unterarm) sowie Schleimhaut (Nase).

Rechtes Nasenloch		linkes Nasenloch		Hautareal 1		Hautareal 2	
RLU	KBE	RLU	KBE	RLU	KBE	RLU	KBE
619	99	4963	203	1052	95	878	64

Hier zeigte sich, dass die Abweichungen zwischen den RLU- und KBE-Werten verschiedener Haut- bzw. Schleimhautareale größer waren als z. B. bei den reinen *S.aureus*-Suspensionen, wo sich eine Abweichung von maximal 1-3% ergab (s. Tab. 3.1.4).

3.3 Maresome

Als Praxistest werden in dieser Arbeit Untersuchungen zur praktischen Anwendung der ATP-Methode an einer neuartigen Substanz auf Algengrundlage (Maresome), die zur Hautpflege entwickelt wurde und bei der außerdem eine Adhäsionshemmung für *MRSA* beschrieben wurde, durchgeführt (Lukowski et al. 2008).

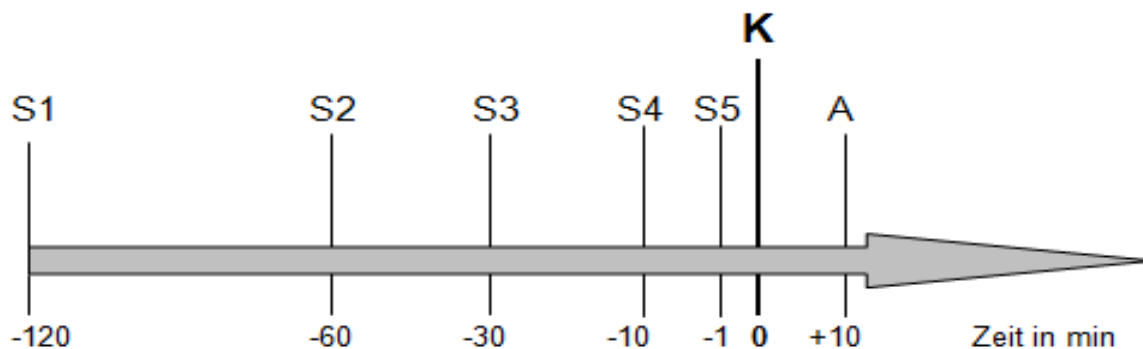
Der Nachweis einer antimikrobiellen Wirkung würde mit der ATP-Methode relativ schnell (ca. 20-30 min) zur Verfügung stehen, d. h. 24 h eher als durch die kulturelle Methode. Dies wäre von großen Nutzen für die Schnelldiagnostik.

Zunächst ist kulturell die adhäsionshemmende Wirkung der Algensubstanz weiter untersucht worden, um mögliche Interaktionen der Hautcreme mit der Hautflora zu bewerten. Anschließend wurde ergänzend zur kulturellen Methode die Messung mit dem Luminometer angewandt, um ein luminometrisches Monitoren der Adhäsionshemmung vergleichend zu beurteilen.

3.3.1 Dekontaminationsversuch der Haut durch Maresome

Dieser Versuch wurde als Praxistest mit Maresome genutzt, welches als Kosmetikum zugelassen ist und bei dem adhäsionshemmende Eigenschaften beschrieben wurden (kein bakterizider Effekt wie bei einem antimikrobiellen Wirkstoff). Das Ziel bestand im Nachweis der Hemmung der Adhäsion von *S.aureus* und anderen Keimen an der Hautoberfläche als Vorbereitung zum RLU-Vergleichstest. Dabei wurden Hautoberflächen nach alkoholischer Desinfektion mit Maresome vorbehandelt und nach verschiedenen Expositionszeiten der Salbe von 1 bis 120 min mit einer Bakteriensuspension (48000 KBE *S.aureus*/ml) kontaminiert (Schema s. Abb. 3.3.1). Mittels Abstrich oder Abklatsch ist anschließend untersucht worden, inwieweit sich die auf die Haut aufgebrachte definierte Keimmenge wiederfinden lässt. Als Kontrolle dienten Maresome-freie Grundlauge und Bepanthensalbe.

Abb. 3.3: Schema des Versuchsablaufes zur Dekontamination der Haut durch Maresome. Nach alkoholischer Desinfektion Besalbung von definierten Hautarealen der Unterarmvorderseite mit Maresome. Nach jeweils 120, 60, 30, 10 und 1 min Salbenexpositionszeit (S1-S5) Kontamination der vorbehandelten Hautareale mit einer Bakteriensuspension (48000 KBE *S.aureus*/ml). Nach 10 min Antrocknungszeit Abstrich bzw. in weiterer Versuchsreihe Abklatsch und kulturelle Auswertung. S=Salbe, K=Kontamination, A= Abstrich/ Abklatsch.



Das Ergebnis zeigte, dass bei Kontamination nach 1 min Salbenexposition kein *S.aureus* mittels Abstrich und Abklatsch mehr wiederfindbar war. Ebenso führte eine Exposition der Salbe von 10 und 30 min vor Kontamination zur kompletten Nichtnachweisbarkeit des Erregers (Tab. 3.3.1). Erst ab einer Kontamination 60 min nach Salbenapplikation ließ sich *S.aureus* wieder in sehr geringer Keimzahl nachweisen (0,675 KBE/cm²), d.h. der Salbeneffekt lässt nach >30 min nach.

Hingegen ließen sich bei 1 und 10 min Expositionszeit von Bepanthen-Salbe vor Kontamination mehr Keime als bei der unvorbehandelten Kontrolle nachweisen. Nach 30, 60 und 120 min war hier die Keimmenge um ca. 75, 30 bzw. 60% reduziert.

Die adhäsionshemmende Wirkung vom Wirkstoff Maresome ist über die Zeit nach Applikation nicht konstant und beträgt anfangs (Keimauftragung 1 min nach Maresomeapplikation) rund 83% an der Gesamtwirkung des Gesamtproduktes „Maresome-Salbe“ (Maresome-Wirkstoff plus Salbengrundlage), bei Keimauftragung 30 min nach Salbenapplikation 28% und nach 120 min 62% (Abb. 3.3.1/2). Im Folgenden ist die

Berechnung der prozentualen Wirkanteile beispielhaft an den Ergebnissen (Tab. 3.1.1) der Kontamination 1 min nach Salbenapplikation gezeigt:

Unbehandelt/ Kontrolle:	14,8 KBE/cm ² wiedergefunden		
Maresome-Salbe:	0 KBE/cm ²	→ 100% Reduktion der Keimzahl	
Maresome-freie Salbe:	12,3 KBE/cm ²	→ 17% Reduktion der Keimzahl	
Maresome-Salbe	–	Maresome-freie Salbe	= Maresome-Wirkstoff
100%	-	17%	= 83% Wirkanteil

Die Maresomewirkung ließ sich auch bei *E.coli* (Laborstamm K-12) in etwa gleicher und bei *S.epi.* (Isolat des Untersuchers) in geringfügig geringerer Ausprägung durch kulturelle Auswertung orientierend nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend wurde eine adhäsionshemmende Wirkung vom Wirkstoff Maresome bzw. der Maresome-Salbe nachgewiesen. Diese beträgt bis mindestens 30 min nach Applikation 100%. Danach scheint die Wirkung leicht nachzulassen.

Tab. 3.3.1: Abklatsch- und Abstrichuntersuchung zur Rückgewinnung von *S.aureus*. Applikation von Maresome-Salbe, Maresome-freier Salbe (Grundlage) und Bepanthen-Salbe je auf gesundes Hautareal (25 cm²). Als Kontrolle unbehandeltes Hautareal. 1, 10, 30, 60 und 120 min nach Applikation jeweils Auftragung von 50µl einer *S.aureus*-Suspension mit 48000 KBE/ml bzw. 960 KBE/50µl auf entsprechende Hautareale. Nach jeweils 10 min Antrocknungszeit und Abklatsch bzw. Abstrich. Auswertung mittels Auszählverfahren.

Salbenexposition (min) vor Kontamination	Wiederfindung von <i>S.aureus</i> in KBE/cm ² bei			
	Maresome TM - Salbe	Maresome TM – freie Salbe (Grundlage)	Bepanthen- Salbe	Unvorbehandelt/ Ausgangswert
1	0	12,3	22,65	14,15
10	0	6,5	17,05	12,85
30	0	5,5	5,25	19,6
60	0,675	10,6	10,3	15,55
120	0,48	11,85	6,85	18,35

Abb. 3.3.1: Abklatsch- und Abstrichuntersuchung zur Rückgewinnung von *S.aureus* [Mittelwerte der KBE/cm²]: Applikation von Maresome-Salbe, Maresome-freier Salbe (Grundlage), Bepanthen-Salbe auf gesundes Hautareal (25 cm²). Als Kontrolle unbehandeltes Hautareal. 1, 10, 30, 60 und 120 min nach Applikation jeweils Auftragung von 50µl einer *S.aureus*-Suspension mit 48000 KBE/ml auf entsprechende Hautareale. Nach jeweils 10 min Antrocknungszeit und Abklatsch. Auswertung mittels Auszählverfahren.

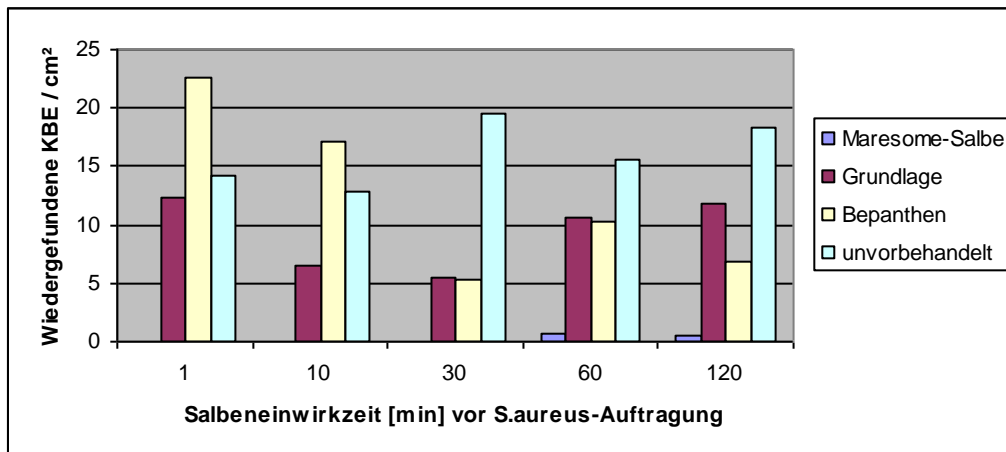
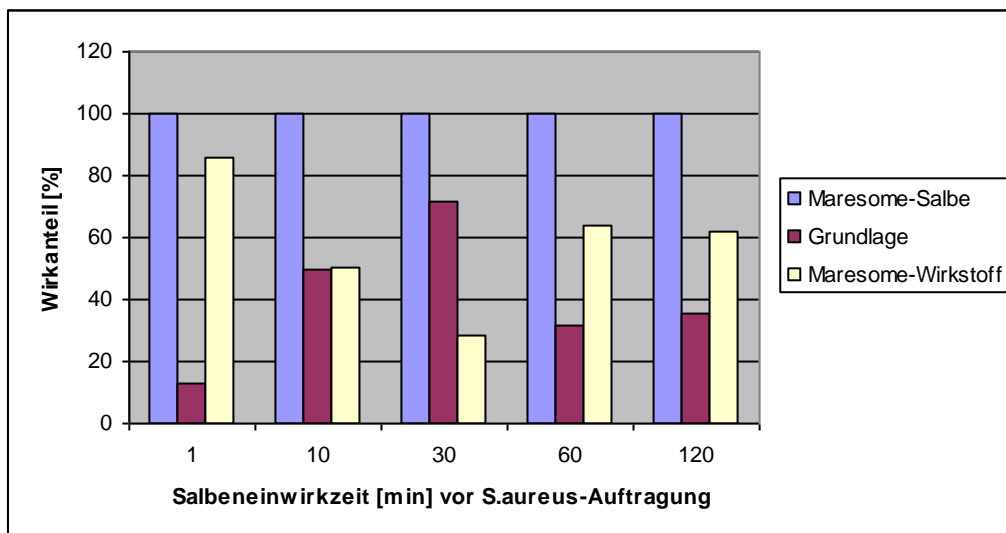


Abb. 3.3.2: Abklatsch- und Abstrichuntersuchung zur Rückgewinnung von *S.aureus*: Anteil des spezifischen Wirkstoffs an der adhäsionshemmenden Gesamtwirkung der Maresome-Salbe.



3.3.2 Pilottest zur Eignung des ATP-Tests bei der Dekontamination der Haut durch Maresome

Nachdem die adhäsionshemmende Wirkung von Maresome qualitativ mittels konventioneller Kulturmethode nachgewiesen wurde (3.3.1), sollte nun die Eignung der ATP-Methode beurteilt werden.

Um zu überprüfen, inwieweit die RLU-Werte der ATP-Technologie mit der kulturplattenbasiert bestimmten Keimzahlveränderung korrelieren, wurde in einer Untersuchung auf ein Unterarmhautareal nach alkoholischer Desinfektion Maresome (0,4 cm Salbenstrang) appliziert. 30 min später erfolgte eine Kontamination mit einer *S.aureus*- bzw. *E.coli*-Suspension (je 20'000 KBE / ml). Nach weiteren 10 min wurde mittels Tupfer ein Abstrich genommen und die wiedergefundene Keimmenge sowohl kulturplattenbasiert als auch luminometrisch ausgewertet. Als Kontrolle dienten Hautareale, auf denen vor der Keimapplikation Salbengrundlage aufgetragen wurden sowie keine Vorbehandlung mit einem Wirkstoff erfolgte.

Wie in den Tabellen 3.3.2.1/2 zu sehen, führte die Vorbehandlung mit Maresome sowohl bei *S.aureus*, als auch *E.coli* zur vollständigen Adhäsionshemmung 30 min nach Salbenapplikation, was den Vorversuchen (3.3.1) entspricht.

Tab. 3.3.2.1: Abstrichuntersuchung zur Rückgewinnung von *S.aureus*: Applikation von Maresome-Salbe (PROPHYLAXE body) und Maresome-freier Salbe (Grundlage, GL Prophylaxe Body ohne Algenextrakt und Ascorbinsäure) auf alkoholisch desinfiziertes gesundes Hautareal (25 cm²). Als Kontrolle unbehandeltes Hautareal. 30 und 120 min nach Applikation jeweils Auftragung von 50µl einer *S.aureus*-Suspension mit 20000 KBE/ml (400 KBE/50µl) auf entsprechende Hautareale. Nach jeweils 10 min Antrocknungszeit Tupferabstrich. Auswertung mittels Auszählverfahren und luminometrisch.

Einwirkdauer in min vor Kontamination	Wiederfindung von <i>S.aureus</i> in KBE nach Applikation von					
	Maresome		Grundlage		Unbehandelt=Vorwert	
	KBE	RLU	KBE	RLU	KBE	RLU
30	0	4761	128	4163	208	2211
120	13	3502	113	2253	217	2431
Tendenz	KBE ↓	RLU ↑	KBE =/↑	RLU ↑	KBE =/↓	RLU =/↓

Tab. 3.3.2.2: Abstrichuntersuchung zur Rückgewinnung von *E.coli*: Applikation von Maresome-Salbe (PROPHYLAXE body) und Maresome-freier Salbe (Grundlage, GL Prophylaxe Body ohne Algenextract und Ascorbinsäure) auf gesundes Hautareal (25 cm²). Als Kontrolle unbehandeltes Hautareal. 30 und 120 min nach Applikation jeweils Auftragung von 50µl einer *E.coli*-Suspension mit 20000 KBE/ml (400 KBE/50µl) auf entsprechende Hautareale. Nach jeweils 10 min Antrocknungszeit Tupferabstrich. Auswertung mittels Auszählverfahren und luminometrisch.

Einwirkdauer in min vor Kontamination	Wiederfindung von <i>E.coli</i> in KBE nach Applikation von					
	Maresome		Grundlage		Unbehandelt=Vorwert	
	KBE	RLU	KBE	RLU	KBE	RLU
30	0	7829	152	6495	200	4563
120	68	4941	160	3317	210	4580
Tendenz	KBE ↓	RLU ↑	KBE =/↑	RLU ↑	KBE =/↓	RLU =/↓

Erst nach 120 min Einwirkzeit konnten *S.aureus* mit einer Keimzahl von 13 KBE (6% der Keimzahl auf unbehandeltem Areal) und *E.coli* mit 68 KBE (32,4%) wiedergefunden werden. Dabei ließ die adhäsionshemmende Wirkung gegenüber *E.coli* stärker nach.

Zwar wurden mit der ATP-Methode auch bei fehlendem kulturellen Keimnachweis erhöhte RLU-Werte gemessen. Beim *S.aureus* ergaben sich bei Maresome parallel zu abfallenden KBE-Werten aber steigende RLU-Werte. Bei *E.coli* ebenso. Grundsätzlich zeigte sich in diesem Test keine geeignete Korrelation zwischen den gemessenen RLU- Werten und den gezählten KBE-Mengen.

3.4 Fazit

Die ATP-Technologie ist anwendbar bei reinen Bakteriensuspensionen, aber nur teilweise auf unbelebten Flächen und eher nicht auf der Haut.

Die bei Maresome gezeigte adhäsionshemmende Wirkung des Wirkstoffes konnte mittels ATP-Technologie nicht nachvollzogen werden.

4. Diskussion

4.1 Korrelation der bioluminometrischen Messung und der Keimmenge

ATP ist ein essentieller Baustein des Lebens für alle Lebensformen. Er spielt im Metabolismus aller Organismen als Energieträger eine zentrale Rolle. Die drei Hauptaufgaben erfüllt ATP bei der Muskelkontraktion, der Proteinsynthese und der für die Aufrechterhaltung des elektrischen Potentials aller Zellmembranen fungierenden Natrium-Kalium-ATPase. Es wird aber auch bei vielen anderen zellulären ATPasen benötigt (Brown et al. 1992).

Bereits seit langem erschien eine auf dem ATP-Gehalt basierende quantitative Erfassung von Bakterien als eine einfache und schnelle Technik. Der auf luminometrische ATP-Messung basierenden Methode sprachen schon Chappelle et al 1968 eine mit den mehr klassischen und langsameren Methoden, wie Platten- oder direkte mikroskopische Zählung, vergleichbare Genauigkeit zu. Kuzikow et al. stellten 2003 die Sensitivität der Biolumineszenzmethode auf eine Stufe mit der der PCR. Die hingegen geringe Spezifität hob bereits Stanley 1989 hervor.

4.1.1 Korrelation der KBE- und RLU-Werte in Keimsuspensionen bzw. von Abstrichproben der Haut und unbelebten Oberflächen

In dieser Arbeit ergab sich für jede Testreihe in vitro (reine Keimsuspension) ein signifikanter Zusammenhang zwischen den RLU- und den entsprechenden KBE-Werten bei einer mittleren Korrelation von 92% bzw. 94%.

Ebenso gelang es Eydal und Pedersen 2007 eine Korrelation zwischen ATP-Konzentration und absoluter Zellzahl bei der Bestimmung der Bakterienkontamination im Grundwasser nachzuweisen. Dies bestätigten ein Jahr später auch Fajardo-Cavazos et al. bei der Detektion von *Acinetobacter radioresistens*, *Bacillus pumilus* und *B.subtilis*.

Der Zusammenhang zwischen den RLU- und KBE- Werten war in dieser Arbeit bei den Testreihen nur annähernd linear, sodass als Methode der Auswertung die lokale Regressionsanalyse angewandt und eine Wertetabelle erstellt wurde. Anhand einer solchen Tabelle können dann die entsprechenden KBE-Werte (über die RLU) abgelesen werden. In der Literatur ist die am besten passende statistische Darstellung bei Chappelle und Levin 1968 ebenfalls durch eine lineare Regressionskurve beschrieben.

Eine sehr gute Reproduzierbarkeit bzw. Präzision der bioluminometrischen Keimmengenbestimmung konnte in dieser Arbeit beim Versuch mit Keimsuspensionen

(*S.aureus*) bestätigt werden. Dabei war die Präzision des Messgerätes bei größeren Keimmengen, die mit einem größeren RLU-Wert über circa 520 RLU korrelieren, am besten. Eine Zunahme der Präzision mit steigender Keimzahl ist durch Venkateswaran et al. 2003 gleichfalls berichtet worden.

Das Mindestmaß an ATP zum Nachweis von Bakterien betrug 1975 noch 100'000 Zellen pro Milliliter (Conn et al. 1975). Heutzutage sind schon 10 Zellen in einer Probe detektierbar (Fan et al. 2007). Dieses untere Detektionslimit wurde auch in unserer Untersuchung erreicht.

Mittlerweile sind verschiedene kommerzielle bioluminometrische Nachweisverfahren auf dem Markt. Da je nach verwendetem System die Korrelation zwischen den ATP-Messwerten und den gezählten Keimmengen stark variiert (Mueller et al. 2009), gilt das Verfahren als halbquantitativ und wird bereits zum unspezifischen Schnelldachweis mikrobieller Belastungen, z. B. in OP-Räumen und im Lebensmittelbereich, angewandt (Venkateswaran et al. 2003, Willis et al. 2007, Mueller et al. 2009, Corbit et al. 2000). Diesbezüglich ist allerdings nach den Daten dieser Arbeit eine Anwendung der Messmethode nicht auf Stahloberflächen, sondern lediglich auf Plastikoberflächen geeignet, weil sich nur hier eine geeignete positive Korrelation zwischen RLU- und KBE-Wert ergab.

Zu den in unseren Untersuchungen initial angedeutete, in weiteren Versuchen aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse jedoch fragliche Korrelation der KBE- und RLU-Werte auf der Haut bzw. die Nichtanwendbarkeit in der Nase, finden sich keine Literaturstellen.

4.1.2 Maresome

Zum Nachweis der praktischen Durchführbarkeit der ATP-Methode wurde als moderne Testsubstanz das Pflegeprodukt Maresome untersucht.

Damit sollte die Grundlage geschaffen werden, ein Verfahren zum Monitoring von Keimzahlveränderungen auf der Haut, z. B. nach Einsatz von bakterienhemmenden Stoffen (Pflegecremes *etc.*), bzw. einen orientierenden Schnelltest zur Überprüfung einer effektiven Dekontamination zu entwickeln.

4.1.2.1 Adhäsionshemmung von *S.aureus* durch Maresome

In der von Lukowski et. al. 2007 veröffentlichten Arbeit war Maresome in der Lage, die Kolonisation von *MRSA* und anderen multiresistenten Keimen zu inhibieren. Dabei wurde ein Mausohr 1 x täglich für 3 Tage mit Maresomesalbe (ca. 4mg) behandelt. In einem weiteren Versuch ist ein Kuheuter 2 h nach Desinfektion mit Maresome eingesalbt worden. Anschließend wurde eine *MRSA*-Suspension auf die jeweiligen Oberflächen gegeben wurde.

Dies erfolgte im Kuheuterversuch 30 min nach der Maresome-Applikation. Nach 90 minütiger Inkubation bei 30°C ist das Mausehr bzw. Kuheuter über eine Müller-Hinton-Agarplatte abgeklatscht worden. Diese Platte wurde über 48 h bei 30°C inkubiert und schließlich die Keimzahl (KBE) visuell ausgezählt. Ebenso ist ein mit *MRSA* kontaminiertes Mausohr bzw. Kuheuter in engen Kontakt mit einem mit Maresome vorbehandelten Ohr/Euter gebracht und die Übertragung der Keime analysiert worden.

Mittels dieser Versuche konnte Lukowski eine Kontaktinhibition von *MRSA* durch Maresome nachweisen. Im Gegensatz dazu wurden apathogene Spezies wie *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus xylois*, *Micrococcus lylae*, *Bacillus pumilus* und *Bacillus licheniformis* nur wenig inhibiert.

Die Vorbehandlung mit Maresome auf gesunder menschlicher Haut führte in den Untersuchungen dieser Arbeit über einen Zeitraum von bis zu 120 min nach Salbenapplikation zur vollständigen Verhinderung einer Kontamination nach direktem Erregerkontakt mit *S.aureus* (*MSSA*). *E.coli* ließ sich bis mindestens 30 min nach Salbenexposition nicht mehr nachweisen. Die getestete Kontaminationsmenge übertrifft mit fast 100 KBE/cm² vermutlich bei Weitem die Erregermenge, die bei *MRSA*-Kontakten mit Patienten bzw. *MRSA*-positiven Personal bei den üblichen Übertragungskontakten, wie z. B. durch Hände, zu erwarten wäre. Hier beschrieben Shigeharu Oie et al. 2007 eine durchschnittliche Kontamination der Handfläche durch *MRSA* von 67,4 KBE/cm². Daher ist die Testkonzentration als „worst case“ zu betrachten, bei dem durch die Salbe noch eine sichere Prävention der Übertragung gelingt. Allerdings gelten die Aussagen der hier dargestellten Untersuchung zur sicheren Wirkung der Verhinderung einer Kontamination nur für den untersuchten Bereich der Zeitspanne von 1 bis 120 Minuten. Dies bedeutet, dass die Salbe dann wirksam eingesetzt werden kann, wenn es um die Verhinderung einer Kontamination bei zeitlich berechenbaren Kontakten, z. B. beim bekannt oder vermutet *MRSA*-positiven Patienten mit der zu schützenden Person, z. B. das Pflegepersonal, kommt.

Es zeigte sich, dass diese hemmende Wirkung des Gesamtprodukts „Maresome-Salbe“ zum überwiegenden Anteil durch das eigentliche Algenprodukt, aber auch zu 13 bis 72% durch die Salbengrundlage mit allen Hilfs- und Inhaltsstoffen, bedingt ist. Salbengrundlagen ohne antibakterielle Wirkstoffe mit adhäsionshemmender Wirkung könnten hierfür verantwortlich sein. Dies ist in der Literatur nicht vorgeschrieben.

4.1.2.2 Keimzahlbestimmung mit luminometrischer ATP-Messung während der Dekontamination mit Maresome

Die Versuche zur Korrelation von KBE und RLU bei Dekontaminationsversuchen zeigten die Untauglichkeit der Methode zum Monitoren der Keimzahlveränderung unter der Behandlung mit Maresome. Denn obwohl durch Vorbehandlung mit Maresome bei Kontamination mit *S.aureus* und *E.coli* eine bis zu 120 bzw. 30 min anhaltende vollständige Adhäsionshemmung gelang, wurden aus dem Abstrich von den vorbehandelten Hautarealen viel höhere RLU-Werte gemessen als nach Kontamination auf unbehandelter Haut. Die Veränderung des RLU-Wertes ist dabei nicht konstant. Deshalb ist auch die Berücksichtigung eines Korrekturfaktors nicht gegeben. Im Gegenteil waren bei der Vorbehandlung mit Maresome die RLU-Werte umso größer, je kleiner der KBE-Wert, was einer antiproportionalen und damit irrationalen Korrelation von RLU- und KBE-Wert entsprechen würde. Maresome hätte damit einen möglicherweise störenden Effekt auf die ATP-Menge.

Zudem fiel auf, dass trotz doppelter KBE-Anzahl der RLU-Wert bei *E.coli* dem Zehnfachen der RLU-Messung bei *S.aureus* entsprach. Da in einer Zelle *S.aureus* (0,64 µg ATP/Zelle [10^{-10}]) nur etwa $\frac{1}{3}$ weniger ATP enthalten ist als in *E.coli* (1 µg ATP/Zelle [10^{-10}]) (Chappelle E.W. 1968), wäre ein nur etwa 3 Mal so hoher Wert zu erwarten.

Da es sich bei den Untersuchungen um orientierende Tests handelt, wären ergänzende Forschungen zur adhäsionshemmenden Wirkdauer von Maresome an der Haut bzw. Schleimhaut notwendig. Ebenso wäre im größeren Ausmaß zu untersuchen, ob Maresome, evtl. abhängig von der Dauer seit der letzten Applikation, nicht doch zu einer konstanten Auslenkung der RLU-Werte führt und durch Einbringen eines nicht linearen Korrekturfaktors die ATP-Technologie doch ein geeignetes Verfahren zum Monitoren der Adhäsionshemmung mit Maresome darstellen würde.

4.1.2.3 Zusammenfassung Maresome

Als Fazit für die Praxis lässt sich sagen, dass es bei der Substanz Maresome nach Auftragen von *S.aureus* und in geringerer Ausprägung bei *E.coli* zu einem verminderten Keimnachweis kommt. Damit sind die Reproduzierbarkeit der adhäsionshemmenden Effekte von Maresome in einer orientierenden klinischen Untersuchung und damit scheinbar die Vermutungen von Lukowski et al. 2008 bestätigt worden. Die Maresomewirkung ist dabei nicht bakterizid oder -statisch, sondern führt wahrscheinlich über eine Adhäsionshemmung zu einem Nichtanhaften von Bakterien an einer Zieloberfläche.

Der Maresome-Effekt wurde konventionell bakteriologisch bestimmt, konnte aber nicht durch die ATP-Technologie gezeigt werden. Im Gegenteil störte Maresome offensichtlich die Reaktion. Hier sollten weitere Untersuchungen zur Klärung dieses Phänomens sowie grundsätzlich zum ATP-Nachweis auf der Haut durchgeführt werden. Insbesondere um zu prüfen, inwieweit sich die ATP-Technologie bei anderen Fragestellungen ggf. eignet, z. B. als Schnelltest einer effektiven alkoholischen Händedesinfektion.

4.1.3 Zusammenfassung der ATP-Technologie

Für alle aus reinen Keimdilutionen gewonnenen KBE- und RLU-Wertepaare wurde eine signifikante Korrelation nachgewiesen. Dabei war die Korrelation bei den reinen Keimdilutionen annähernd linear. In den Untersuchungen auf unbelebten Oberflächen zeigte sich beim Plastikdeckel und der Tischplatte, nicht jedoch beim Stahlprüfkörper, eine Korrelation. Auf belebten Oberflächen ließ sich eine geeignete Korrelation bei Nasenabstrichproben nicht nachweisen. Bei den Hautabstrichproben ergaben sich widersprüchliche Ergebnisse. Denn es ließ sich einmal eine geeignete positive Korrelation zwischen RLU- und KBE-Wert andeuten, in einer weiteren Versuchsreihe gelang dies jedoch nicht.

Zusammenfassend kann nach den Untersuchungen dieser Arbeit die bioluminometrische ATP-Messung als unspezifischer Schnellnachweis mikrobieller Belastungen auf Plastikoberflächen weiterverfolgt werden. Dies wäre für Hygieneuntersuchungen in z. B. medizinischen Einrichtungen wichtig und findet bereits in der Praxis Anwendung (s. Einleitung). Zum Keimnachweis auf der (Unterarm-)Haut ließ sich im orientierenden Versuch eine Korrelation von kulturell und luminometrisch gemessener Keimmenge nur andeuten.

Somit ist dieses Verfahren zurzeit für das Monitoring von Keimzahlveränderungen auf der Haut, z. B. nach Einsatz von bakterienhemmenden Stoffen (z. B. Pflegecremes), sowie als orientierender Schnelltest zum Keimnachweis noch nicht zu empfehlen. Dies hat seine Ursache wahrscheinlich in den diversen unter '4.3 Fehlerbetrachtung' zusammengefassten Störfaktoren. Zudem war die Wiederfindung mittels Tupferabstrich der vorher in definierter Menge aufgetragenden Bakterien inkonsistent, was sich durch die sich ergebende große Streuung der Werte ebenfalls ergebnisverfälschend auswirkt. Hier ist zu prüfen, inwieweit sich diesbezüglich durch verfeinerte Technik Abhilfe schaffen lässt (z.B. mittels Spülverfahren). Außerdem ist die zusätzliche Messung von toten Bakterien (und Pilzen) bei

der ATP-Luminometrie im Gegensatz zur kulturellen Methode als ein weiterer Störfaktor bei der Betrachtung der Korrelation zwischen KBE und RLU anzusehen.

Zweifel an der Zuverlässigkeit der Methode kamen bereits in der Studie von Selan et al. 1992 auf. Sie wiesen der Methode die Unfähigkeit der korrekten Detektion von Bakterien, wie z. B. *Proteus*, sowohl in vitro als auch in Urin-Kulturen zu. Die Hintergründe waren nicht übermittelt.

La Duc et al. berechneten 2007 den intrazellulären ATP-Gehalt einzelner Bakteriengattungen. Dabei ließen sich beim Vergleich der Keime zum Teil sehr unterschiedliche Mengen messen. Das bedeutet, dass die Verteilung der bakteriellen Genera in einer Probe den durchschnittlichen ATP-Gehalt signifikant beeinflussen kann. Dies würde beim Vergleich zweier Proben, auch wenn sie die gleiche Anzahl an Keimen beinhalten, einen deutlichen ATP-Wert-Unterschied bewirken.

Willis et al. evaluierten im gleichen Jahr das Monitoring der Krankenhausreinigung mittels ATP-Biolumineszenz. Auch hier wurde eine nur geringe Korrelation zwischen den ATP-Werten und dem visuellen Koloniezählen beschrieben. Die Methode konnte schließlich nur als guter Indikator dafür ausgewiesen werden, ob eine Fläche grob orientierend hygienisch zu beanstanden ist oder nicht. Bei dieser sog. halbquantitativen Analyse steht das Ergebnis dafür fast sofort zur Verfügung, sodass sich doch ein wertvoller Schnelltest für die Belastung mit Erregern (und ATP-haltigen Kontaminationen) ergibt. Für quantitative Angaben wäre die Kombination mit einer visuellen Methode vonnöten. Als Ursache kommt ATP aus nichtbakteriellen Kontaminationen in Betracht, z. B. Hautschuppen oder anderes organisches Material.

In einer Studie von Alfa et al. 2013 war die ATP-Technologie zur Beurteilung der manuellen Reinigung von Endoskopen geeignet. Eine ATP-Menge von unter 200 RLU erbrachte in 96% eine ausreichend geringe Keimzahl um als „sauber“ akzeptiert zu werden.

Ivancic et al. ermittelten bei der Untersuchung von Uro-Pathogenen aus Urinproben 2008 einen signifikanten log-log-Zusammenhang, der sich als linear herausstellte. Dieser erstreckte sich über einen 7 log-Bereich zwischen der Lichtemission und der Anzahl an KBE, obwohl elf verschiedene Spezies, sowohl grampositive als auch –negative, vorhanden waren. Die Autoren leiteten eine Formel zur Berechnung der KBE aus den gemessenen RLU ab ($CFU = 43.45 \times RLU^{1,12}$). Sie propagierten, dass die Methode für die Bestimmung der Keimzahl in Urinproben geeignet sei. Untersuchungen zur bioluminometrischen Keimzahlbestimmung aus Haut- oder Nasenabstrichproben finden sich in der Literatur nicht. In zukünftigen Arbeiten

sollten die Zusammenhänge vertieft werden, um mögliche weitere Störfaktoren zu erfassen, deren Behebung die Methode möglicherweise aufwerten würde. Ein Vorteil dieses Verfahrens läge in der Schnelligkeit. Innerhalb von wenigen Minuten nach Probennahme würde ein Ergebnis zur Keimbelastung, z. B. bei massenhafter *MRSA* bzw. *MSSA*-Besiedlung in der Nase oder auf der Haut (z. B. Axilla), vorliegen. Hierfür werden bei der konventionellen Technik mindestens 24 h benötigt.

4.2 Fehlerbetrachtung

Schwachstellen für eine Repräsentativität der hier als orientierende Beobachtung geplanten Untersuchung an der Haut sind das weder doppelblinde, noch randomisierte Design sowie das in seiner Anzahl geringe, nur aus einer Person (Doktorand selbst) bestehende Probandenkollektiv.

Die Proben sind ansonsten *lege artis* unter konstanten Rand-, Umwelt- und Umgebungsbedingungen, wie z. B. Temperatur, Leuchtstärke oder Dauer der Verarbeitung, bearbeitet worden. Auch wurden die Reagenzien nach Vorschrift frisch zubereitet und unmittelbar verbraucht. Mögliche Fehler durch eine schlechte Probandencompliance hinsichtlich Probenentnahme sowie –lagerung sind weitestgehend auszuschließen.

Bei der Betrachtung der luminometrischen Ergebnisse ist zu beachten, dass in den Voruntersuchungen dieser Arbeit nur ca. 40% der Keime mittels Tupferabstrich von der Haut nachzuweisen waren. Zudem werden in der lumimometrischen Messung im Gegensatz zu den kulturellen Verfahren auch die sich vor der Autolyse befindlichen „toten“ Keime gemessen.

Beim Vergleich der Abstrichproben von verschiedenen Haut- bzw. Schleimhautarealen zeigte sich, dass die Abweichungen zwischen den RLU- und KBE-Werten in vivo (Haut, Nase) größer waren als bei den reinen *S.aureus*-Suspensionen. Dies spricht entweder für eine Unsicherheit der Messung oder eine unterschiedliche Verschmutzung in unterschiedlichen (Schleim-)Hautbereichen. Dies würde bei Abstrichproben von Haut bzw. Schleimhaut das Ergebnis weniger aussagekräftig machen.

4.2.1 Beeinflussung des intrazellulären ATP-Levels

Obwohl durch geeignete Transportmedien, Lagerung und Aufbereitung, was bei längeren Untersuchungen vonnöten war, die Beeinflussung der Bakterienkonzentration minimiert wurde, gibt es eine Reihe von Faktoren, die ihre Zellzahl bzw. die ATP-Menge verändern hätten können. Diese sind im Folgenden dargestellt.

4.2.1.1 Intrinsische Faktoren

4.2.1.1.1 Kontaktinhibition

Bereits 1999 gaben Barer und Harwood zu bedenken, dass physiologische Prozesse, wie z.B. durch Zell-Zell-Kommunikation ausgelöste metabolische „Selbsterstörung“, das Resultat von bakteriologischen kulturellen Tests beeinflussen können. Basler und Losick beschrieben 2006 die dazugehörigen molekularen Mechanismen der Kommunikation von Bakterien. Bei der Untersuchung von *E.coli* konnten Aoki et al. 2008 eine kontaktabhängige Wachstumsinhibition bzw. eine Herabregulation metabolischer Parameter inklusive ATP feststellen. Dadurch wäre durch die indirekte Messung des ATP im Luminometer, im Vergleich zum Plattenverfahren, die Keimzahl geringer ausgefallen.

4.2.1.1.2 Abhängigkeit von Wachstumsphase

Karl fasste 1980 die bis zu diesem Zeitpunkt erhobenen Ergebnisse zur Messung zellulärer Nukleotide zusammen. Er legte dar, dass die statische Messung des ATP-Pools für eine Charakterisierung des Zustandes vom zellulären Metabolismus unzureichend ist. Z.B. wäre er abhängig von der Wachstumsphase des Bakteriums. Zu bedenken ist dabei, dass die als chemische Energie repräsentierte intrazelluläre ATP-Menge nur einen geringen Prozentanteil des potentiellen Energieflusses durch die Zelle ausmacht (Venkateswaran et al. 2003). Trotzdem bestünde unter stabilen Bedingungen eine straffe Regulation zwischen ATP-Verbrauch und –regeneration (ebd.). Die Reaktion von Bakterien auf Stress, wie er speziell in dieser Arbeit zwischen Probeentnahme und –verarbeitung auftritt, ist laut Dodd et al. (2007) auch abhängig von der Wachstumsphase, in der sich die Keime befinden. Somit hätte es abhängig von der Wachstumsphase der Bakterien in den verschiedenen Proben ebenfalls zu unterschiedlichen Korrelationen zwischen plattenkultureller KBE-Zahl und luminometrisch bestimmter ATP-Menge kommen können.

4.2.1.2 Extrinsische Faktoren

4.2.1.2.1 Nahrungsangebot

Dieser Faktor ist bei reinen Keimdilutionen sowie den Hautabstrichen zu vernachlässigen und hier nur zur Vervollständigung erwähnt. Die intrazellulären ATP-Konzentrationen sind abhängig vom Glucoseangebot der Umgebung (Hara et al. 2006). Da beim selben Probanden Abstriche vom Unterarm genommen wurden, ist hierin kein relevanter Störfaktor zu erwarten.

4.2.1.2.2 Einfluss von Licht

2006 beschrieben Berney et al. den durch Licht induzierten signifikanten Abfall der intrazellulären ATP-Konzentration auf bis zu 5% des anfänglichen Wertes bei *E.coli*. Selbst wenn dieser Effekt bei allen Keimen auftreten würde, hätte dies bei unserer Messung keinen Einfluss, da alle Messschritte im abgeschlossen dunklen Inneren des Luminometers ablaufen.

4.2.1.2.3 Umgebungstemperatur

Temperaturveränderungen im Bereich von 21 bis 27°C bewirken kleine Veränderungen in der ATP-Antwort, wobei das Optimum bei 23°C liegt (Chappelle, Levin 1968). Da unsere Messungen bei nahezu konstanter Raumtemperatur von 22°C durchgeführt wurden, ist wohl auch dieser Einflussfaktor vernachlässigbar.

4.2.2 Beeinflussung durch andere Determinanten

4.2.2.1 Sonstige chemische Substanzen

Willis et al. wiesen 2007 darauf hin, dass chemische Substanzen, die z.B. in Putzmitteln oder auch Kosmetika vorhanden sind, die Korrelation von ATP-Lumineszenz und mikrobiologischen Ergebnissen beeinflussen können. Zur Minimierung dieses Effektes wurden die Injektoren zur Reinigung nach jedem Messvorgang mit steriler 0,9%iger Natriumchloridlösung gespült sowie für jeden Messvorgang neue sterile Mikrotiter-Platten benutzt. Zudem wurden alle Oberflächen vor der Untersuchung mit Alkohol desinfiziert.

4.2.2.2 Phosphoreszenz der Mikrotiterplatten

Die natürliche Phosphoreszenz der für die ATP-Messung benötigten Kunststoffmikrotiterplatten hat einen sehr geringen Einfluss auf das Ergebnis. Um selbst diesen Einfluss zu eliminieren erfolgt zunächst die Messung des Leerwertes, d.h. nur die Mikrotiterplatte ohne Inhalt. Dieser Wert wird jeweils vom Messwert mit den entsprechenden Proben bzw. Reagenzien abgezogen.

4.3 Schlussfolgerung

Bei reinen Keimsuspensionen und auf unbelebten Flächen (Plastik) hat es in den Untersuchungen dieser Arbeit eine für die Praxis nutzbare Korrelation zwischen RLU und KBE gegeben. Somit konnte unter diesen Bedingungen sensitiv die mit einer KBE-Reduktion einhergehende RLU-Reduktion nachgewiesen bzw. von der RLU-Bestimmung auf die Keimzahl (0 bis ca. 2×10^6 KBE/ml) geschlossen werden.

Zwar wurde auf der Haut das Vorhandensein von Keimen abgeleitet. Jedoch ist die ATP-Methode wegen der nur fraglich gegebenen in vivo-Korrelation zwischen RLU und KBE sowie der widersprüchlichen bisherigen Studienergebnisse hinsichtlich der Zuverlässigkeit nicht als quantitativer Test für z. B. eine erfolgreiche Sanierung der Haut oder ggf. der Nase, insbesondere durch Maresome, geeignet. Dies ist am ehesten durch die Vielzahl an Störfaktoren bedingt.

Nach Maresomeapplikation konnte auf der Haut ein adhäsionshemmender Effekt auf *S.aureus* gefunden werden. Damit eignet sich diese Pflegesalbe prinzipiell als Testmodell auf der Haut für die Untersuchungen zur Korrelation von RLU und KBE. Dies konnte wie gesagt in dieser Arbeit nicht gezeigt werden.

Inwieweit sich die ATP-Methode im praktischen Einsatz, insbesondere zur Detektion von Keimbelastungen auf der Haut sowie Schleimhaut (z. B. Nase) als hilfreich gestalten würde, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Zudem wären Art und Ausmaß von Störfaktoren, u. a. andere ATP-Quellen (z. B. Epithelien) als die zu messenden Keime, vertieft zu analysieren.

5. Zusammenfassung

In Deutschland sterben jedes Jahr rund 10.000 Menschen (Gastmeier 2010) aufgrund nosokomialer Infektionen, wobei die größte Rolle unter den Infektionserregern Keime aus der körpereigenen mikrobiellen Flora des Patienten spielen. Zur Prävention dieser Infektionen ist es wichtig, diese Erreger schnell und sicher nachzuweisen, um beispielsweise - soweit sinnvoll - eine effektive Bekämpfung, z. B. durch Dekontamination, einleiten zu können.

In dieser Arbeit wurde die luminometrische Adenosintriphosphat (ATP) – Messung auf ihre Eignung als Schnelltest zur Bestimmung einer veränderten Keimlast, u. a. auf der Haut, untersucht. Dabei wird über die in einer Probe bestimmten ATP-Menge indirekt auf die Keimzahl geschlossen. Als Praxistest für die ATP-Methode ist die Wirkung eines neuartigen Wirkstoffes aus Algen (Maresome) beurteilt worden. Dessen in Tierversuchen vorbeschriebenen adhäsionshemmenden Eigenschaften auf *S.aureus* als häufiger Vertreter der Normalflora der Haut und Nasenschleimhaut konnten in dieser Arbeit auch auf gesunder humaner Haut gezeigt werden. Eine Erregerreduktion durch den Wirkstoff sollte über die ATP-Messung als Schnelltest nachgewiesen und soweit möglich quantitativ analysiert werden.

Initial ist geprüft worden, ob die ATP-Menge in einer Probe eine signifikante Korrelation zur Erregermenge in Keimsuspensionen, in Abklatsch- bzw. Abstrichuntersuchungen von unbelebten Flächen und auf der Haut zeigt. Dies konnte zunächst für reine Keimsuspensionen, aber nur bedingt bei den Abstrichen von unbelebten und belebten Oberflächen bestätigt werden, wobei prinzipiell die sehr sensitive ATP-Nachweisteknik bestätigt werden konnte.

Die luminometrische Methode zeigte sich für die praktische Anwendung als Schnelltest bei Hautabstrichproben im Gegensatz zur sensitiveren, aber viel länger dauernden kulturellen Keimzahlbestimmung als nicht geeignet, da die Ergebnisse nicht zuverlässig reproduzierbar waren. Daher kann diese derzeit nicht für den klinischen Einsatz, z. B. zur Effizienzüberwachung der Hautantiseptik oder zum Monitoren einer Adhäsionshemmung durch Maresome empfohlen werden. Bevor ein ATP-Test als Produkt für den Einsatz auf belebten Oberflächen (Haut, Schleimhaut, Wunden) denkbar ist, bedarf es weiterer Forschungen.

6. Literaturverzeichnis

Aepfelbacher M.; Are we being threatened by multiresistant strains of *Staphylococcus aureus*? *MMW Fortschr Med.* 2005 Jan 27;147(4):33-5, 37

Aiello A.E., Cimiotti J., Della-Latta P., Larson E.L.; A comparison of the bacteria found on the hands of 'homemakers' and neonatal intensive care unit nurses. *J Hosp Infect.* 2003 August ; 54(4): 310–315

Albrich W.C., Harbarth S.; Health-care workers: source, vector, or victim of MRSA? *The Lancet Infectious Diseases*, Volume 8, Issue 5, Pages 289 - 301, May 2008

Alfa MJ, Fatima I, Olson N.; The adenosine triphosphate test is a rapid and reliable audit tool to assess manual cleaning adequacy of flexible endoscope channels. *Am J Infect Control.* 2013 Mar;41(3):249-53.

Alghaithy A.A., Bilal N.E., Gedebo M., Weily A.H.; Nasal carriage and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from hospital and non-hospital personnel in Abha, Saudi Arabia. *Tropical Medicine and Hygiene*, Volume 94, Issue 5, Pages 504-507 (September 2000)

Aly R. et al.; Effects of a Systemic Antibiotic on Nasal Bacterial Ecology in Man. *Applied Microbiology*, Aug. 1970, p. 240-244

Aoki S.K. et al.; Contact-Dependent Growth Inhibition Causes Reversible Metabolic Downregulation in *Escherichia coli*; Department of Molecular, Cellular, and Developmental Biology, University of California, Santa Barbara, California 93106; 2008

Barer M.R., Harwood C.R.; Bacterial viability and culturability. *Adv Microb Physiol* 41, 93–137, 1999

Bassler B.L., Losick R.; Bacterially speaking. *Cell* 125:237-46, 2006

Berney M., Weilenmann H.U., Egli, T.; Flow-cytometric study of vital cellular functions in *Escherichia coli* during solar disinfection (SODIS). *Microbiology* 152 , 1719–1729 (2006)

Branchini B.R.; Firefly Biolumineszenz. Department of Chemistry, Connecticut College, New London, 2008

Brown, G. C. et al.; Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochem J*, 1992, 284 (Pt 1):1-13

Chappelle E.W., Levin G.V.; Use of the firefly bioluminescent reaction for rapid detection and counting of bacteria. *Biochem.Med.*2:41-52,1968

Conn R.B., Charache P., Chappelle E.W.; Limits of applicability of the firefly luminescence ATP assay for the detection of bacteria in clinical specimens. *Am J Clin Pathol*, April 1, 1975; 63(4): 493-501

Corbitt AJ, Bennion N, Forsythe SJ; Adenylate kinase amplification of ATP bioluminescence for hygiene monitoring in the food and beverage industry. *Lett Appl Microbiol.* 2000 Jun;30(6):443-7

D'Eustachio A.J., Johnston D. R. Adenosine triphosphate content of bacteria. *Federal Proceedings* 21,16,1968

Dodd CE, Richards PJ, Aldsworth TG.(2007). Suicide through stress: a bacterial response to sub-lethal injury in the food environment. *Int J Food Microbiol.* 2007 Nov 30;120(1-2):46-50. Epub 2007 Jun 13

Eydal HS, Pedersen K.; Use of an ATP assay to determine viable microbial biomass in Fennoscandian Shield groundwater from depths of 3-1000 m. *J Microbiol Methods.* 2007 Aug;70(2):363-73. Epub 2007 May 29

Fajardo-Cavazos P., Schuerger A.C., Nicholson W.L.; Persistence of Biomarker ATP and ATP-Generating Capability in Bacterial Cells and Spores Contaminating Spacecraft Materials under Earth Conditions and in a Simulated Martian Environment. *Applied And Environmental Microbiology*, Aug. 2008, p. 5159–5167

Fan F., Wood K.V.; Bioluminescent Assays for High-Throughput Screening. ASSAY and Drug Development Technologies. Volume 5, Number 1, 2007

Friedrich; Nosokomiale Infektionen; Klinikum, Uni-Münster, 2011

Fujikawa H., Morozumi S. ; Estimation of Bacterial Concentrations in Commercial Foods by Measuring ATP Changes during Incubation. Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health. J.Food Hyg.Soc.Japan Vol.44,No.2:83-88,2002

Gastmeier P., Geffers C.; Nosokomiale Infektionen in Deutschland: Wie viele gibt es wirklich? Eine Schätzung für das Jahr 2006; Deutsche Medizinische Wochenschrift. Bd. 133, Nr. 21, 2008

Gordts F. et al.; Microbiology of the middle meatus: a comparison between normal adults and children. Journal of Laryngology & Otology (2000), 114:3:184-188

Grundmann H., Tiemersma E. Global prevalence of meticillin-resistant Staphylococcus aureus — Authors' reply. The Lancet, Volume 368, Issue 9550, Pages 1866 - 1867, 25 November 2006

Hara K.Y., H.Mori; An Efficient Method for Quantitative Determination of Cellular ATP Synthetic Activity. Journal of biomolecular screening : the official journal of the Society for Biomolecular Screening 11(3):310-7,2006 Apr

Heczko P.B. et al.; Quantitative Studies Of The Flora Of The Nasal Vestibule In Relation To Nasal Carriage. J Med Microbiol-Vol. 14 (1981) 233-241

Ivancic V. et al.; Rapid Antimicrobial Susceptibility Determination of Uropathogens in Clinical Urine Specimens by Use of ATP Bioluminescence. J Clin Microbiol, Apr. 2008, p. 1213–1219

Jousimies Somer H.J. et al.; Comparison of the Nasal Bacterial Floras in Two Groups of Healthy Subjects and in Patients with Acute Maxillary Sinusitis. J Clin Microbiol, Dec. 1989, p. 2736-2743

Kac et al.; Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial acquisition and carrier state in a wound care center. *Archives of Dermatology* 2000;136(6):735-9

Kaminski A. et al.; Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among hospital staff in a German trauma centre. *Journal of Bone and Joint Surgery - British Volume*, Vol 89-B, Issue 5, 642-645

Kappstein I.; Current issues of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology, diagnostics, prevention, and therapy. *Chirurg.* 2006 Jun;77(6):499-500, 502-505

Karl, D. 1980. Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microbiol. Rev.* 44:739–796

Krishnan et al.; MRSA Hochprävalenz-Situation, 2002

Kuzikow A.N, Bondarenko V.M., Latkin A.T.; Use of the bioluminescent method for the determination of bacterial adenosinetriphosphate (ATP-metry) in microbiology

La Duc M.T. et al.; Isolation and Characterization of Bacteria Capable of Tolerating the Extreme Conditions of Clean Room Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, April 2007, p. 2600-2611, Vol. 73, No. 8

Lacey S. et al.; The usefulness of masks in preventing transient carriage of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by healthcare workers. *J Hosp Inf* 2001;48:308-311

López-Pueyo M.J. et.al.; Antibiotic multiresistance in critical care units. *Med Intensiva.* 2011 January - February;35(1):41-53. Epub 2011 Jan 6

Lukowski G. et al.; Inhibition of dermal MRSA colonization by microalgal micro- and nanoparticles. Institute of Marine Biotechnology e. V., Greifswald, Germany, 2007

Lukowski G et al.; *Skin Pharmacol Physiol*, 2008;21:98-105

Mueller S.A., Anderson J.E., Kim B.R., Ball J.C.; Comparison of plate counts, Petrifilm, dipslides, and adenosine triphosphate bioluminescence for monitoring bacteria in cooling-tower waters. *Water Environ Res*, April 1, 2009; 81(4): 401-6

Niederman M.S. et al.; Comparison of bacterial adherence to ciliated and squamous epithelial cells obtained from the human respiratory tract. *Am Rev Respir Dis*. 1983 Jan;127(1):85-90

Polzehl D. et al.; Fungus culture and PCR in nasal lavage samples of patients with chronic rhinosinusitis. *Journal of Medical Microbiology* (2005), 54, 31–37

Popp W.; *Nosokomiale Infektionen (Krankenhausinfektionen)*; 2001

QMTI, Anwendung Luminometer; www.qmti.de/produktseite/anwendung_luminometer.htm

Rasmussen T.T. et al.; Resident aerobic microbiota of the adult human nasal cavity. *Apmis*, Volume 108, Number 10, October 2000 , pp. 663-675(13)

Reygaert W.; Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): identification and susceptibility testing techniques. *Clin Lab Sci*. 2009 Spring;22(2):120-4

Ridder-Schaphorn S. et al.; Nasal *Staphylococcus aureus* Carriage Is Not a Risk Factor for Lower-Airway Infection in Young Cystic Fibrosis Patients. *J Clin Microbiol*, Sept. 2007, p. 2979–2984

RKI; *Staphylokokken-Erkrankungen, insbesondere Infektionen durch MRSA*; RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten; 2009

RKI; *Epidemiologisches Bulletin*; 2004

Ruef C., Fanconi S., Nadal D.; Sternal Wound Infection After Heart Operation In Paediatric Patients Associated With Nasal Carriage Of *Staphylococcus aureus*. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;112:681-686

Savolainen S. et al.; The bacterial flora of the nasal cavity in healthy young men. *Rhinology*. 1986 Dec;24(4):249-55

Schreff A.M.; cMRSA bei Bewohnern und Personal in Altenpflegeheimen. Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit 2010

Selan L. et al.; Reliability of a Bioluminescence ATP Assay for Detection of Bacteria. *J Clin Microbiol*, July 1992, p. 1739-1742

Siegmund-Schultze N.; Meldepflicht für MRSA-Infektionen. *Dtsch Arztebl* 2009; 106(25)

Simor A.E., Daneman N.; Staphylococcus aureus decolonization as a prevention strategy. *Infect Dis Clin North Am*. 2009 Mar;23(1):133-51

Sitzmann F.; Hygiene in der Intensivpflege. *Intensiv* 2008;1:9-17

Stanley P.E.; A review of bioluminescent ATP techniques in rapid microbiology. *J Biolumin Chemilumin*. 1989 Jul;4(1):375-80

Suttorp N. et al.; Nosokomiale Infektionen; Thieme; 2004

Thore A. et al.; Firefly Luciferase ATP Assay as a Screening Method for Bacteriuria. *J Clin Microbiol*, Feb. 1983, p. 218-224

Tiller F.-W., Stein B.; Das klinische Labor. Ausgabe 2, Hüthig Jehle Rehm, 2005

Venkateswaran K. et al.; ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean-room facilities. *J.Microbiol.Methods* 52:367-377,2003

Wasserberg W.M.W.; Costs and effects of MRSA control in Dutch hospitals. *Geneeskunde Proefschriften* (2010)

Willis C. et al.; Evaluation of ATP bioluminescence swabbing as a monitoring and training tool for effective hospital cleaning. Department of Health. *Journal of Infection Prevention* November 2007 vol. 8 no. 5 17-21

Woltering R. et al.; Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in patients in long-term care in hospitals, rehabilitation centers and nursing homes of a rural district in Germany. *Dtsch med Wochenschr* 2008; 133(19): 999-1003

Worlitzsch D. et al.; Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*--urinary tract infections in paraplegic patients. *Zentralbl Hyg Umweltmed.* 1989 Nov;189(2):175-84

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
bes.	besonders
bzw.	beziehungsweise
CA-MRSA/ cMRSA	<i>Community acquired MRSA</i>
Cand.spp.	<i>Candida species pluralis</i>
Cand.alb.	<i>Candida albicans</i>
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
ebd.	ebenda
Enterobacter spp.	<i>Enterobacter species pluralis</i>
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
ESBL	Extended-spectrum beta-lactamase-Bildner
evtl.	eventuell
FHG	Freiheitsgrade
(m)g	(Milli-)Gramm
h(a)MRSA	<i>hospital-acquired MRSA</i>
KBE	Kolonie bildende Einheit
Klebs.pneum.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
(n, µ)m	(Nano-, Mikro-)Meter
min	Minuten
ml	Milliliter
MRSA	<i>Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus</i>
MSSA	<i>Methicillin-sensitiver Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Natriumchlorid
o.g.	oben genannt
PCR	Polymerasekettenreaktion
Proteus spp.	<i>Proteus species pluralis</i>

Pseud.aer.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RKI	Robert-Koch-Institut
S.aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>
S.epi.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1.5:	Kultivierung von Mikroorganismen aus den Hautabstrichproben	9
Tab. 2.2.4.5:	Schema der Wiederfindung von <i>S.aureus</i> auf Oberflächen	15
Tab. 2.2.5:	Schema der Untersuchung der Wirkung von Maresome auf der Haut	16
Tab. 3.1:	Wertetabelle korrelierender KBE- und RLU-Werte	20
Tab. 3.1.1:	Statistische Auswertung der Messungen mit reinen Keimdilutionen	22
Tab. 3.1.2:	Präzision der Messungen mit dem Luminometer	23
Tab. 3.1.3:	Wachstumskurve von <i>S.aureus</i> in Thioglycolat-Bouillon	23
Tab. 3.1.4:	Vergleich ATP Biomass – Kit mit Microbial ATP – Kit	24
Tab. 3.2:	Wiederfindung von <i>S.aureus</i> auf Oberflächen	25
Tab. 3.2.1:	Wiederfindung von <i>S.aureus</i> auf unbelebten Oberflächen	25
Tab. 3.2.2.1:	Wiederfindung von <i>S.aureus</i> auf der Haut (Unterarmvorderseite)	26
Tab. 3.2.2.2:	Keimnachweis beim Nasenabstrich	27
Tab. 3.3.1:	Abklatsch- und Abstrichuntersuchung zur Rückgewinnung von <i>S.aureus</i>	30
Tab. 3.3.2.1:	Abstrichuntersuchung zur Rückgewinnung von <i>S.aureus</i> (Maresome)	32
Tab. 3.3.2.2:	Abstrichuntersuchung zur Rückgewinnung von <i>E.coli</i> (Maresome)	33

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung der durchgeführten Untersuchungen	6
Abb. 2.2.3.4:	Luciferin-Luciferase-System	12
Abb. 3.1.1:	Graphische Darstellung der Korrelationskurve von RLU und KBE	19
Abb. 3.3:	Schema des Versuchsablaufes zur Dekontamination der Haut durch Maresome	29
Abb. 3.3.1:	Abklatsch- und Abstrichuntersuchung zur Rückgewinnung von <i>S.aureus</i> (Maresome vs. Grundlage vs. Bepanthen)	31
Abb. 3.3.2:	Abklatsch- und Abstrichuntersuchung zur Rückgewinnung von <i>S.aureus</i> (Wirkungsanteil Maresome vs. Grundlage)	32

7.4 Danksagung

Ein herzliches Dankeschön geht an Herrn **Prof. Dr. med. M. Jünger** für die Überlassung des Themas und das erbrachte Vertrauen. Ganz besonders danke ich für die tatkräftige Unterstützung und Zuverlässigkeit bei der Problembewältigung jeglicher Art, durch die eine zügige Fertigstellung der Arbeit ermöglicht wurde.

Meinem Betreuer **PD Dr. med. habil. G. Däschlein** danke ich sehr herzlich für die stets sehr gute Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit, die vielen Tipps und die tatkräftige Unterstützung bei theoretischen und experimentellen Problemen.

Ganz herzlich danken möchte ich auch den Mitarbeiterinnen des Labors, insbesondere **Frau Hinckfoth** und **Frau Niggemeier**, die mir als Laborneuling bei Fragen und Problemen immer freundlich, geduldig, hilfsbereit und tatkräftig zur Seite standen.

Ganz besonders danke ich meiner Liebsten **Anja**, die maßgebend zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen hat.

Zum anderen geht ein riesengroßes Dankeschön an meine **Familie** und **Freunde**, insbesondere an meine **Eltern**, für den mir gebotenen Rückhalt zu jeder Zeit.

Was würde ich bloß ohne Euch machen! Vielen lieben Dank!

7.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, André Werner, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Ort, Datum

Unterschrift