

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

**Die Biofilmbildung von *Staphylococcus aureus* während der
Langzeitpersistenz in den Atemwegen von Mukoviszidosepatienten**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität

vorgelegt von Daniel Frederik Köhler

aus Marburg

2015

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

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Barbara Kahl

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Thorsten Kuczius

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2015

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Medizinische Mikrobiologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Georg Peters -
Referentin: Prof. Dr. med. Barbara Kahl
Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Thorsten Kuczius

ZUSAMMENFASSUNG

Die Biofilmbildung von *Staphylococcus aureus* während der Langzeitpersistenz in den Atemwegen von Mukoviszidosepatienten

Köhler, Daniel Frederik

In dieser Arbeit wurde die Biofilmbildung langzeitpersistierender *Staphylococcus aureus*-Stämme in den Atemwegen von Mukoviszidosepatienten untersucht.

Zur Identifizierung persistierender *S. aureus*-Stämme untersuchten wir Isolate von Mukoviszidosepatienten, die im Rahmen einer Longitudinalstudie isoliert worden waren. Bei kontinuierlichem *S. aureus*-Nachweis über mehr als fünf Jahre erfolgte die Identifizierung klonaler Stämme am Anfang und Ende einer Nachweisperiode mittels PCR der *cap*-, *agr*- und *spa*-Region. Bei Übereinstimmung der *spa*-Typen wurde von klonalen Stämmen ausgegangen. Diese unterzogen wir einem Biofilmadhäsionsassay. Der Biofilm wurde anschließend photometrisch bei 655nm gemessen.

Unter den Isolaten aller Patienten stellten wir eine erhöhte Prävalenz des Kapseltyps 8 vor 5 (68,7% vs. 31,1%) fest. Des Weiteren ergab sich eine Verteilung der *agr*-Typen zugunsten der Ausprägung von *agr* I und III (46,4% & 29,4%). Wir ermittelten eine Mutationsrate der Region X des *spa*-Lokus von 211,8 Monaten je Mutation. Die Biofilmbildung von *S. aureus* reichte von geringer bis hin zu starker Produktion und war im Vergleich zu *Staphylococcus epidermidis* RP62A insgesamt schwach ausgeprägt (Mittelwert 0,3336, 95% KI 0,2897 - 0,3775). Faktoren wie Besiedlungsdauer, Ko-Besiedlung, *agr*- oder *cap*-Typ hatten keine Auswirkungen auf den Biofilm ($p > 0,05$).

S. aureus unterliegt multiplen Einflussgrößen in den Atemwegen von Mukoviszidosepatienten. Hierdurch kommt es zur phänotypischen Diversifizierung, die zu einer heterogenen Biofilmexpression führt. Es konnte keine Korrelation zwischen der Biofilmbildung und der Langzeitpersistenz von *S. aureus* festgestellt werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2015

ERKLÄRUNG

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

Die Biofilmbildung von *Staphylococcus aureus* während der
Langzeitpersistenz in den Atemwegen von Mukoviszidosepatienten

im:

Institut für Medizinische Mikrobiologie

unter der Anleitung von:

Prof. Dr. med. Barbara Kahl

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

Ort, Datum

Name/ Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	3
1.2	Akzessorischer Genregulator (<i>agr</i>)	4
1.3	Kapsuläres Polysaccharid (CAP).....	6
1.4	Biofilm.....	7
1.5	Protein A.....	10
1.5.1	Staphylococcal Protein A Gen (<i>spa</i>)	10
1.6	Zystische Fibrose (CF)/Mukoviszidose.....	12
1.6.1	Allgemeines	12
1.6.2	<i>S. aureus</i> und Zystische Fibrose.....	14
1.6.3	<i>P. aeruginosa</i> und Zystische Fibrose	15
1.6.4	<i>Burkholderia cepacia</i> complex. und Zystische Fibrose	16
2	Fragestellung	18
3	Experimentelle Untersuchungen: Material und Methoden.....	19
3.1	Bakterienstämme und Patienten	19
3.2	Lyse von Bakterien und Purifizierung genomischer DNA.....	20
3.3	Polymerasekettenreaktion und Agarosegel-Elektrophorese.....	20
3.4	<i>cap</i> -PCR	22
3.5	<i>agr</i> -PCR.....	24
3.6	<i>spa</i> -Typisierung.....	26
3.7	Biofilmmessung.....	26
4	Ergebnisse.....	28
4.1	<i>cap</i> - und <i>agr</i> -Bestimmung.....	28
4.2	<i>spa</i> -Typisierung	32
4.3	Biofilmmessungen.....	37
4.3.1	Allgemein	37
4.3.2	Patient 11	42
4.3.3	Patient 16	44
4.3.4	Patient 24	46
4.3.5	Statistische Auswertung der Biofilmmessung.....	48
4.4	Ko-Besiedlung mit <i>P. aeruginosa</i> und <i>B. cepacia</i>	49
5	Diskussion	50
5.1	Alter der Patientengruppe und durchschnittliche Nachweisdauer.....	50
5.2	<i>cap</i> - und <i>agr</i> -Bestimmung.....	51
5.3	<i>spa</i> -Typen und Mutationen des <i>spa</i> -Lokus	54
5.4	Biofilm-Veränderung.....	56
6	Index	60
6.1	Abbildungsverzeichnis	60
6.2	Tabellenverzeichnis	61
6.3	Abkürzungen	62
7	Literaturverzeichnis	63
8	Anhang	I

1 Einleitung

Staphylokokken wurden 1880 zum ersten Mal durch Sir Alexander Ogston als in Haufen vorkommende Mikroorganismen beschrieben und in seiner Abhandlung „Micrococcus Poisoning“ den von Theodor Billroth zuvor entdeckten in Ketten wachsenden Streptokokken gegenübergestellt [80].

Staphylococcus aureus zählt zur Familie der *Staphylococcaceae*, ist ein grampositiver, Katalase- sowie Koagulase-positiver Keim, der in der Lichtmikroskopie als 6-8µm großes Kugelbakterium zu erkennen ist. Der Erreger teilt sich in alle Richtungen des Raumes und ordnet sich auf Grund seiner Unbeweglichkeit in Haufen an.

Die Kolonien auf Blutagar können in äußerst unterschiedlicher Größe auftreten und sind meist weiß bis gold-gelb.

Der Mensch stellt ein natürliches Reservoir von *S. aureus* dar. Auch andere Lebewesen wie Haus- oder Masttiere können durch den Keim besiedelt sein und ihn auf den Menschen übertragen [7]. *S. aureus*-Stämme können sich jedoch in ihrer Wirtsspezifität, z.B. bedingt durch unterschiedliche Ausbildung von Hämoglobin-bindenden Proteinen, unterscheiden [62]. Dies stellt ein mögliches Hindernis für die Überlebensfähigkeit des Erregers in verschiedenen Organismen dar.

Eine Kolonisation durch *S. aureus* ist wesentlich häufiger als eine Infektion [61]. Die typischen Besiedlungsräume sind die Nasenvorhöfe und die Axillarregion [12], wobei *S. aureus* im Vestibulum nasi am häufigsten nachgewiesen werden kann und dort auch eher persistiert als an anderen Körperstellen. 10 bis 40% der Bevölkerung in Deutschland ist an diesem Ort besiedelt [23].

Die genannten Körperregionen teilen beim Menschen die histologische Gemeinsamkeit einer großen Anzahl apokriner Schweißdrüsen, wobei Staphylokokken direkt auf der Hautoberfläche oder in Poren gefunden werden können. Die Besiedlung der Haut geht allerdings häufig mit der Besiedlung der Nase einher. Der isolierte Keim ist in den meisten Fällen derselbe, sodass die Nase bei diesen Patienten die Quelle der Kolonisation darstellt [105]. Dies bestätigt sich durch die Tatsache, dass nach einer lokalen Mupi-

rocin-Therapie der Nase der Keim in der Regel an anderen Körperstellen auch nicht mehr nachgewiesen wird [53].

Man kann grundsätzlich zwei divergente Trägermuster beschreiben: Persistierende Träger (ca.20%) und nicht-persistierende Träger (ca.80%). Menschen mit einer dauerhaften Besiedlung durch *S. aureus* weisen ein anderes Antikörpermuster auf als nicht-Dauerträger und haben ein erhöhtes Risiko einer Infektion durch den Keim [8]. Es ist bemerkenswert, dass die Rate konstanter Träger unter Kindern höher ist als unter Erwachsenen [23].

Bis heute konnte nicht vollständig geklärt werden welche Merkmale zu diesen verschiedenen Trägertypen führen. Die Interaktion zwischen *S. aureus* und dem Menschen ist vielfältig und hängt genauso von Wirtsfaktoren ab wie von Faktoren des Mikroorganismus selbst. So konnte gefolgert werden, dass bestimmte genetische Varianten von Interleukin-4- und Glukokortikoidrezeptoren, die zu einer geringeren Immunabwehr führen, eine persistierende nasale Besiedlung bedingen können [7]. Im Gegensatz dazu ist nur wenig über die bakteriellen Faktoren der Besiedlung von Schleimhäuten bekannt [27].

S. aureus wird i.d.R. per Kontakt übertragen. Dies kann entweder die direkte Berührung zwischen einem Träger und einem Nicht-Träger sein oder indirekt über kontaminierte Gegenstände geschehen [38, 61]. Der Zeitpunkt einer Erstbesiedlung mit *S. aureus* ist häufig früh. Je länger ein Neugeborenes nach seiner Geburt im Krankenhaus verweilt, desto eher können Staphylokokken nachgewiesen werden [105]. Neugeborene, die bei der Entlassung noch nicht besiedelt waren, werden dies zu über 40% bereits innerhalb des ersten Monats, wobei die Mutter oft Ausgangspunkt der Kolonisation ist [81]. In mehr als 40% aller Haushalte sind einer oder mehrere Mitglieder Träger von *S. aureus* [73]. Neben diesen typischen Besiedlungsmechanismen darf nicht außer Acht gelassen werden, dass Staphylokokken unter bestimmten Bedingungen mehrere Tage auf Oberflächen überleben können und auch dann noch pathogen bleiben [71]. Somit kann auch der Kontakt mit der unbelebten Umwelt zur Übertragung führen.

1.1 *Staphylococcus aureus*

Die Pathogenität von *S. aureus* ist äußerst komplex und ergibt sich aus dem Zusammenspiel vieler Regelkreise sowie Umwelteinflüsse. Das Spektrum der Virulenzfaktoren umfasst eine weite Palette an zellgebundenen und extrazellulären Produkten, die während einer Infektion koordiniert exprimiert werden [13]. Mit Hilfe dieser Faktoren sichert das Bakterium sein Überleben im Wirtsorganismus. Mit ihnen heftet es sich an Zellen, wandelt Gewebe zu Nährstoffen um und entrinnt der Immunabwehr des Wirtes [21, 76].

Die Zusammensetzung der Virulenzfaktoren wird maßgeblich durch Zelldichte, verfügbare Energie und Umwelteinflüsse bestimmt. Sie werden nicht um jeden Preis gebildet, denn der Erhalt der Funktionsfähigkeit des Keims steht im Vordergrund. Wenn Energie und Nahrung nicht ausreichend zur Verfügung stehen, werden primär „house-keeping“ Proteine hergestellt und die Produktion von Virulenzfaktoren sinkt [75].

Anhand von Transkriptionsprofilen konnte gezeigt werden, dass *S. aureus* Adhäsine und oberflächengebundene Faktoren in der exponentiellen Wachstumsphase bildet, während post-exponentiell nach Zunahme der Keimdichte sezernierte Proteine das Bild bestimmen [14, 75]. Es bleibt aber zu beachten, dass dies nur ein grobes Schema darstellt. Man muss auf Grund der Komplexität regulatorischer Mechanismen und Einflüsse die Virulenz von Staphylokokken eher als ein Gesamtkonstrukt interagierender Mechanismen sehen, als einen stringenten Ablauf von Expressionen anzunehmen [13].

Obwohl sie sehr zahlreich sind, können die meisten der Virulenzfaktoren von *S. aureus* in eine der folgenden Gruppen eingeteilt werden:

1. Oberflächenproteine, die Adhäsion, Internalisierung und Kolonisation vermitteln
2. Toxine und Enzyme, die Gewebeschäden, Entzündung und Dissemination verursachen
3. Oberflächenfaktoren, die die Phagozytose beeinflussen
4. Faktoren, die das Überleben in Phagozyten verbessern
5. Superantigene und andere immunmodulatorische Moleküle [68]

Die genetische Information der Virulenz vermittelnden Produkte (Virulon) liegt einerseits auf mobilen Anteilen der DNA, wie z.B. „pathogenen Inseln“ (Toxic shock syndrome toxin-1), andererseits ist sie in das bakterielle Chromosom integriert (z.B. Staphylokinase) [7, 27]. Die Expression der einzelnen Produkte wird durch globale regulatorische Elemente koordiniert. Die beiden zentralen Gruppen sind die Proteine der SarA-Familie und die „two component regulatory systems“ (TCRS).

Die Proteine der SarA-Familie werden besonders während der exponentiellen Wachstumsphase gebildet. Entsprechend des oben erwähnten, vereinfachten Schemas, fördern sie die Expression von Adhäsinen. Außerdem ist *sarA* ein Aktivator des akzessorischen Genregulators (*agr*). *Agr* ist der bedeutendste Vertreter der TCRS. Er wird zu Beginn der post-exponentiellen Phase verstärkt induziert [14]. Auf diese Komponente wird im Folgenden genauer eingegangen.



Abb. 01: *S. aureus*-Kultur auf Blutagar nach 24h Inkubation bei 37°C

1.2 Akzessorischer Genregulator (*agr*)

agr, einer der wichtigsten Regulatoren der Virulenz von Staphylokokken, ist innerhalb des gesamten Genus stark konserviert. Das *agr*-Operon kodiert für ein Quorum-Sensing-System, sowie ein pleiotropes, regulatorisches RNA-Molekül [32, 88]. Das Operon hat eine ungefähre Gesamtgröße von 3 Kilobasen (kb) und enthält zwei divergente Promotoren (P2 & P3) [75]. Durch eine stetige basale Transkriptionsaktivität wird

gewährleistet, dass dieses System auf Veränderungen der Populationsdichte reagieren kann [88].

Das Transkript des P2-Promoters kodiert für das Quorum-Sensing-System, bestehend aus vier Proteinen (AgrA, AgrB, AgrC, AgrD). AgrD kodiert für ein Propeptid, das durch das membranständige AgrB zum autoinduzierenden Peptid (AIP) prozessiert und aus dem Organismus befördert wird. AgrC stellt den membrangebundenen Rezeptor des TCRS dar. Dieses phosphoryliert nach Bindung des passenden AIP das intrazelluläre AgrA, welches den Regulator des Zwei-Komponenten-Systems darstellt und in seiner phosphorylierten Form der Aktivator des Operons ist [88]. Das AIP fördert sowohl die Transkription am P2-, als auch am P3-Promotor. Somit schließt es einen selbstinduzierenden Regelkreis [76]. Die DNA-Abschnitte, die für AgrA, AgrC und AgrD kodieren, enthalten neben hoch konservierten Regionen auch variable Abschnitte. Dadurch konnten sich innerhalb der Art *S. aureus* vier verschiedene *agr*-Typen entwickeln (*agr* I – IV). Die AIP's der einzelnen Gruppen wirken nur auf Individuen derselben aktivierend und haben einen inhibitorischen oder nur minimal aktivierenden Effekt auf Mitglieder anderer *agr*-Gruppen. Für einen solchen Unterschied in ihrer Spezifität kann bereits der Austausch einer einzigen Aminosäure genügen [4, 32, 66, 75]. Durch diesen Mechanismus nehmen die Organismen maßgeblich Einfluss aufeinander. Denn mit der Aktivierung des *agr*-Operons wird ein für den einzelnen Keim äußerst energieaufwändiger Prozess begonnen oder durch seine Hemmung die Ausbreitung eingeschränkt [45, 47, 76].

Das Transkriptionsprodukt des P3-Promoters ist RNAIII, das als der *agr*-spezifische Effektor angesehen werden kann [77]. Durch seine Transkription am Übergang der exponentiellen zur post-exponentiellen Phase wird die Produktion von Proteinen wie Superantigenen (Enterotoxine, Toxic Shock Syndrome Toxin), Cytotoxinen (Hämolysine, Panton-Valentine-Leukozidin), Enzymen (Lipase, Nuclease, etc.) und auch kapsuläre Polysacchariden hochreguliert. Direkt oder indirekt wird die Herstellung zellwandgebundener Proteine wie Protein A herunterreguliert [4, 13, 75]. RNAIII dient allerdings nicht nur der Induktion der Transkription, sondern kodiert selbst für Hämolysin delta [77].

Die Produkte des *agr*-Operons spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Virulenz von *S. aureus*. Daher zeigen Stämme, bei denen dieser DNA-Abschnitt gestört ist,

eine wesentlich geringere Virulenz als vergleichbare Wildtypen. Somit ergibt sich die große Bedeutung dieses Regulators für die Symptomatik der Infektion [88]. Weiterhin ist die Untersuchung der *agr*-Typen auch von taxonomischem Belang. Im Vergleich der verschiedenen Gruppen mittels Analyse von amplifizierten Fragmentlängen-Polymorphismen (AFLP) und Multiloqussequenzierung (MLST) wurde erkannt, dass die *agr*-Gruppen i.d.R. mit bestimmten AFLP- und MLST-Typen übereinstimmen [75].

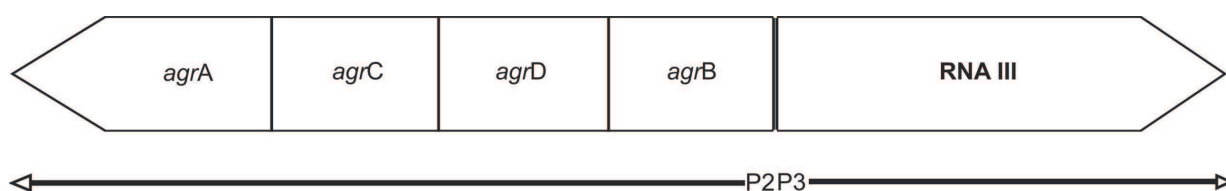


Abb. 02: Schematische Darstellung des *agr*-Operons

1.3 Kapsuläres Polysaccharid (CAP)

S. aureus bildet ein kapsuläres Polysaccharid (CAP), das die Resistenz des Mikroorganismus gegen das Immunsystem des Wirtes erhöht [2, 98, 104]. In der Literatur werden 11 verschiedene CAP's beschrieben, jedoch existieren nur gegen die Serotypen 1, 2, 5 und 8 Antikörper, wodurch diese identifiziert werden konnten. Ist die Zuordnung eines Stammes nicht durch diese Antikörper möglich, wird dieser klassischerweise als nicht-typisierbar bezeichnet [2, 51]. In klinischen Isolaten lassen sich zu über 70% die Typen 5 und 8 finden [34, 64, 72, 90]. Weitere 10 – 20% reagieren mit Typ 336 Polysaccharid-Antikörpern. Bei dem 336-Polysaccharid handelt es sich um eine Abwandlung der in Zellwänden grampositiver Bakterien vorkommenden Teichonsäure. Diese Stämme produzieren somit keine kapsulären Bestandteile [72, 98, 102]. Ein großer Teil dieser nicht-typisierbaren Isolate trägt die genetische Information für die Typen 5 oder 8. Diese werden jedoch auf Grund von Mutationen im Bereich der Gene selbst oder ihrer Promotoren nicht exprimiert [16]. Daher sind sie serologisch nicht typisierbar, jedoch kann die *cap*-Region mittels PCR leicht identifiziert werden. Im klinischen Kontext sind die Ty-

pen 1 und 2 von untergeordneter Bedeutung, weshalb auf sie im Weiteren nicht genauer eingegangen wird [90].

Die CAP-Typen 5 und 8 sind beide aus gleichen Trisaccharideinheiten aufgebaut. Sie unterscheiden sich lediglich in der Bindung der einzelnen Zucker untereinander [104]. Dies spiegelt sich auch in der Tatsache wider, dass es sich bei den kodierenden DNA-Sequenzen dieser Polysaccharide um allele Operons handelt. Von 16 Genen, aus denen diese Operons bestehen, sind 12 identisch [64]. Die Promotoren der beiden *cap*'s sind außerdem nahezu identisch. Der stärkste Aktivator dieser Regionen ist *agr* [65]. Die hohe strukturelle Übereinstimmung der beiden Zuckermoleküle bedingt ihre dementsprechend ähnlichen Eigenschaften. Die Kapselpolysaccharide ummanteln den Mikroorganismus im Ganzen. Dadurch verhindern sie zeitweilig die Bindung von Komplement und erschweren wahrscheinlich die Phagozytose durch Monozyten, indem der Kontakt zwischen gebundenem C3 auf der Bakterienoberfläche und den Immunzellen durch die Polysaccharidschicht erschwert wird [104]. In gleicher Form maskiert CAP auch bakterielle Oberflächenproteine, die die Adhärenz an Wirtszellen vermitteln. Entsprechend der *agr*-abhängigen Regulation sinkt die Bindungsfähigkeit der CAP-positiven Bakterien mit steigender Kapselproduktion in der postexponentiellen Wachstumsphase [83]. Zuletzt schützt der Polysaccharidmantel die Bakterien vor dem Abbau innerhalb der Immunzellen nach Phagozytose. Das intrazelluläre Überleben CAP-positiver Organismen übersteigt das kapselloser [104].

1.4 Biofilm

Ein Biofilm besteht aus einer sessilen Gemeinschaft mikrobiologischer Organismen, die direkt miteinander oder mit einem Substrat verbunden und in einer von ihnen produzierten Matrix aus Polymeren eingebettet sind [22]. Die Wachstumsrate und Transkriptionsmuster in diesem Verbund unterscheiden sich von denen anderer Klone, die nicht in einem Biofilm organisiert sind [22]. Der Biofilm ist eine poröse Masse, die aus einem Arrangement von „Türmen“ und sich zur Basis verjüngenden Gebilden besteht. Dadurch ergibt sich eine kanalisierte Struktur, die es ermöglicht, dass es auch in tief gele-

gen Schichten des Biofilms zum Austausch überlebenswichtiger Substrate (beispielsweise Sauerstoff) kommt [57, 99]. Die Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix des Biofilms von *S. aureus* sind Proteine, das Polysaccharid N-acetyl- β -(1-6)-glucosamin (poly-N-acetylglucosamin [PNAG] oder polysaccharidales interzelluläres Adhäsion [PIA]) und extrazelluläre DNA (eDNA) [101]. Der Anteil dieser Komponenten kann stark variieren.

Die Entstehung eines Biofilms kann in verschiedene Phasen zerlegt werden. Zuerst bindet *S. aureus* mittels Oberflächenproteinen (z.B. fibrinogenbindendes Protein, Clumping Factor, fibronectinbindendes Protein, etc.) an eine Wirts- oder Fremdkörpermatrix. Weitere Bakterien werden dann durch Adhäsine aneinander gebunden. Sie sezernieren PNAG/PIA. Durch die Lyse von Wirts- sowie Bakterienzellen wird weiterhin DNA freigesetzt (eDNA) [3]. Die Entwicklung des in dieser Kaskade beschriebenen maturierten Biofilms unterliegt der Regulation komplexer genetischer Faktoren und Umwelteinflüsse, deren Zusammenspiel noch unvollständig verstanden ist. Zum Beispiel haben der Sauerstoff-, Glucose-, oder NaCl-Gehalt großen Einfluss auf die Ausbildung eines Biofilms [25, 58].

Von genetischer Seite sind wiederum die Genregulatoren *agr* und *sarA* für die Biofilmproduktion von großer Bedeutung. Während die Aktivierung des Quorum-Sensing-Systems von *agr* zu einer Inhibition führt [36], ist *sarA* mit seinem Einfluss auf zellwandgebundene und exkretorische Virulenzfaktoren ein wichtiger Induktor der Biofilmsynthese. Durch Mutationen des *sarA*-Regulators kommt es zur unregulierten Produktion von Nukleasen und Proteasen, die durch die Zersetzung extrazellulärer DNA und Proteine den Aufbau eines Biofilms erschweren [6, 100]. PNAG/PIA, das durch Enzyme des *ica*-Lokus synthetisiert wird, ist nicht unbedingt notwendig für den Aufbau eines Biofilms. In *ica*-negativen Mutanten kann trotz des Fehlens von Polyglykosiden durch Verbindung der Bakterien mittels Oberflächenproteinen ein Biofilm gebildet werden [3, 25, 78].

Durch die Ausbildung eines Biofilms kann sich *S. aureus* mit Hilfe folgender Mechanismen vor der Immunabwehr des Wirtes schützen:

- 1) Verzögerung der Penetration von antimikrobiellen Agenzien und Erschwerung der Clearance durch den Wirt
- 2) Veränderung der Wachstumsrate
- 3) Verbreitung von Mikrokolonien

Die extrazelluläre Matrix des Biofilms bildet eine Diffusionsbarriere, wodurch die Bindung humoraler Faktoren und damit auch die Phagozytose durch Wirtszellen erschwert werden. Genauso verzögert sich auch die Penetration durch antibiotische Substanzen, was die Problematik der Biofilmbildung hinsichtlich pharmakologischer Therapien erklärt [9, 22]. Weiterhin wird die antibakterielle Therapie durch ein Herabsetzen der Wachstumsrate innerhalb des Biofilms erschwert. Zwar können durch die strukturelle Auflockerung der Biofilmarchitektur und der damit einhergehenden Vergrößerung der Oberfläche mehr Organismen als in einer soliden (nicht kanalisierten) Organisation versorgt werden. Doch bei Expansion kommt es zwangsläufig zur Ausbreitung in alle Ebenen des Raumes, sodass randferne Schichten entstehen. Entsprechend abnehmender Sauerstoff- und Nährstoffgradienten entlang der Tiefe des Biofilms verringert sich die aerobe Energiegewinnung und damit auch die Proteinsyntheserate [84]. Somit kommt es zur Diversifizierung der im Biofilm vereinten Population. Dies kann mit der Ausbildung verschiedener phänotypischer Varianten geschehen, die wie Individuen eines Ökosystems unterschiedliche Nischen einnehmen. Durch die Ausbildung einer solchen Bandbreite kommt es zur erhöhten Flexibilität und Dynamik der Population, die die Kompensation von Umwelteinflüssen erleichtert und das Überleben sichert. Dieses Phänomen wurde als „insurance Hypothese“ beschrieben [9, 107].

Trotz eines reduzierten Gesamtumsatzes innerhalb eines Biofilms kann die Populationsdichte stetig zunehmen. Durch Quorum-Sensing-Systeme wird dann die Aufrechterhaltung einer sessilen Organisation durch Produktion einer extrazellulären Matrix zu Gunsten der Expressionen exkretorischer Proteine aufgegeben. Dadurch lösen sich Zellverbände aus dem Biofilm und eine metastasenartige Ausbreitung des Erregers ist möglich [3].

1.5 Protein A

Protein A ist ein zellgebundenes Protein, das den F_c-Teil des humanen Immunglobulins G (IgG) bindet [60]. Da dieser konstante Anteil des IgG den Phagozyten des Wirtes als Opsonin dient, erschwert die Bindung an Protein A die immunglobulinvermittelte Elimination des Erregers.

1.5.1 Staphylococcal Protein A Gen (*spa*)

Die für *spa* kodierende Genregion besteht aus ca. 2150 Basenpaaren und beinhaltet funktionell sich unterscheidende Abschnitte. Es beginnt mit einer Signalregion, die für das N-terminale Ende des Proteins kodiert, gefolgt von einem aus vier bis fünf Domänen bestehenden Abschnitt, welcher die IgG-bindenden Anteile definiert. Im nächsten DNA-Abschnitt, der sogenannten X-Region, können zwei Bereiche voneinander abgegrenzt werden:

- 1) Der Bereich X_R besteht aus tandem repeats mit einer Länge von 3 bis 15 Wiederholungen. Diese sind wiederum zumeist aus 24 Basenpaaren aufgebaut.
- 2) Die Region X_C beinhaltet einen hoch konservierten DNA-Abschnitt, der für den Zellmembrananker von Protein A kodiert [5, 31].

X_R zeichnet sich durch eine Langzeitvariabilität bei relativer Kurzzeitstabilität aus. Dies erklärt sich durch die Begebenheit, dass dieser Abschnitt des Genoms nicht für funktionelle Anteile des Proteins kodiert und somit keinem Selektionsdruck unterliegt. Diese Überlegung konnte durch *in vitro* und zum Teil auch *in vivo* Versuche nachgewiesen werden [30]. Allerdings zeigte sich in Langzeituntersuchungen von persistierenden *S. aureus*-Isolaten bei Patienten mit Zystischer Fibrose bisweilen eine recht hohe Mutationsrate (bis zu 10%). Dies wird jedoch auf die besonderen Umweltfaktoren, welche einen erhöhten Selektionsdruck für *S. aureus* in den Atemwegen von Mukoviszidosepatienten zur Folge haben, zurückgeführt [50]. Der größte Teil der Veränderungen der *spa*-Region ergibt sich durch Deletionen und Insertionen, die auf Grund des sogenann-

ten „slipped strand mispairing“ (SSM) häufiger auftreten als Punktmutationen [50, 95]. Dieser Zusammenhang mindert jedoch nicht die Diskriminierungsfähigkeit der *spa*-Typisierung, sondern verleiht dieser Region die Kombination aus oben genannter Langzeitvariabilität bei relativer Kurzzeitstabilität. Die unterscheidende Kraft von langsamen Änderungen der Repeatkomposition (Punktmutationen) ist höher als die der schneller auftretenden Ereignisse mit Änderungen der Repeatorganisation (Repeatdeletion/Insertion) [55].

Die Repeat-Analyse der für *spa* kodierenden DNA-Bereiche kann somit zur Differenzierung von *S. aureus*-Klonen herangezogen werden. Sie ist in ihrer Diskriminierungsfähigkeit mit anderen Sequenzanalysen wie der MLST- oder Makrorestriktionsanalysen wie der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) vergleichbar [35, 39, 55]. Die *spa*-Sequenzierung zeichnet sich vor allem durch eine äußerst zuverlässige Reproduzierbarkeit aus [10]. Die Sequenzanalyse der X_R -Region kann durch eine Software (Ridom StaphType™ [Ridom GmbH, Würzburg, Deutschland]) erleichtert werden. Aus sequenzierten Bereichen dieser Region erkennt das Programm durch Einlesen der Basenfolge automatisch die sich daraus ergebenden repeats und deren Anzahl. Weiterhin ordnet es dem Muster dann einem *spa*-Typen zu. Da die Software einer online-Plattform angeschlossen ist, können eigene Ergebnisse mit einer zentralen Datenbank verglichen werden. Es kommt so zu einer weltweit einheitlichen Zuordnung von repeats zu *spa*-Typen. Durch die schnelle und fehlerarme Durchführbarkeit der Analyse sowie die hohe Trennschärfe der Methode können mittels der *spa*-Typisierung sowohl Ausbrüche von *S. aureus*-Infektionen, als auch epidemiologische Untersuchungen durchgeführt werden [10]. Dabei ist es möglich, unter Berücksichtigung bekannter Mutationsraten mittels *spa*-Typisierung verwandtschaftliche Verhältnisse von Isolaten zu erkennen [48].

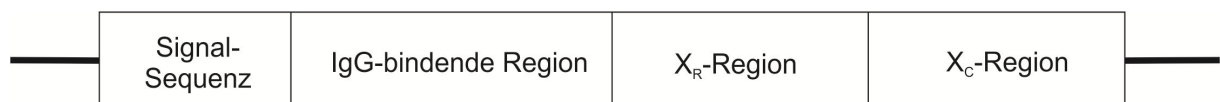


Abb. 03: Schematische Darstellung der *spa*-Region

1.6 Zystische Fibrose (CF)/Mukoviszidose

1.6.1 Allgemeines

Die Zystische Fibrose ist mit einer Inzidenz von 1:2500 bei Neugeborenen die häufigste rezessive Erbkrankheit der kaukasischen Bevölkerung [20]. Das betroffene Gen auf Chromosom 7 kodiert für den cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR), einen cAMP-regulierten Chloridkanal. Bis dato sind mehr als 1000 verschiedene Mutationen des betroffenen Gens bekannt. Diese werden wie folgt in sechs verschiedene Kategorien eingeteilt: fehlende Produktion von CFTR (I), fehlerhafte Maturation des Proteins (II), gestörte Regulation von CFTR (III), defekte Kanalfunktion (IV), verminderte Produktion von CFTR (V) und erhöhter Umsatz von CFTR (VI). Die häufigste Mutation ist eine Deletion eines Basentriplets, das an Position 508 für Phenylalanin kodiert (F508del). Sie kann bei ca. 70% aller defekten CFTR-Allele gefunden werden. Durch das Fehlen der Aminosäure kommt es zu einer Fehlfaltung des Proteins und einem sofortigen Abbau (Klasse-II-Mutation) [91].

Durch CF kommt es zu pathologischen Veränderungen in Organen, die CFTR exprimieren. Dazu zählen sekretorische Zellen, Reproduktionsorgane, das Pankreas, die Leber und der Atemtrakt. Durch eine fehlende/verminderte Rückresorption von Chlorid aus dem Lumen ekkriner Schweißdrüsen können bei CF-Patienten erhöhte Cl⁻-Werte im Schweiß festgestellt werden. Dieser Zusammenhang wird in der Frühdiagnostik beim Pilocarpin-Hauttest genutzt [20, 96]. Einen höheren Krankheitswert hat die pankreatische Insuffizienz, welche durch eine mangelhafte Flüssigkeits- und Hydrogenkarbonatanreicherung des Pankreassaftes zu einer Retention von Pankreasenzymen in der Bauchspeicheldrüse führt. Die nicht abtransportierten Enzyme werden teilweise im Pankreasgang spontan aktiviert. Hierdurch kommt es im Verlauf der Erkrankung über Jahre zu einer fortschreitenden Destruktion von Gewebe mit fibrotischem Umbau, welcher zum Ausfall sowohl der exokrinen als auch endokrinen Funktion des Organs führt. Durch das Fehlen physiologischer Verdauungsenzyme fallen bis zu 10% der Neugeborenen durch einen Mekoniumileus bei der Geburt auf. Die prekärsten Auswirkungen hat die CFTR-Mutation auf die Lunge. Bis heute stellt dieser Ort der Krankheitsmanifestation zumeist den lebensbegrenzenden Faktor dar. Physiologischerweise wird Chlo-

rid durch die Epithelien der Atemwege mittels CFTR sezerniert. Natrium und Wasser folgen, sodass sich auf der Zelloberfläche ein Flüssigkeitsfilm bildet. Durch diesen Schleim können Fremdkörper mit Hilfe einer auswärts gerichteten Bewegung der auf den Zellen befindlichen Zilien abtransportiert werden. Bei Patienten mit Zystischer Fibrose funktioniert diese „mukoziliäre Clearance“ nicht, da durch die fehlende/verminderte Sekretion von Cl^- dem Schleim keine Flüssigkeit zugeführt wird. Ganz im Gegenteil kann durch einen hohen zellulären Gehalt an Chlorid und funktionsfähige Na^+ -Kanäle noch Flüssigkeit entzogen werden. Die damit einhergehende Zunahme der Viskosität führt zu einer Abnahme der Zilienfunktion und begründet damit die reduzierte Clearance [85]. Der Schleim von CF-Patienten gleicht somit einem nahezu abgeschlossenen Raum, in dem Mikroorganismen persistieren, da sie nicht mechanisch beseitigt werden und der zellulären Immunabwehr kaum zugänglich sind. Bereits in den ersten Wochen nach der Geburt können bei Säuglingen mit Mukoviszidose Infektionen und Entzündungen im alveolären Sekret nachgewiesen werden. Der dauerhafte Einfluss von Bakterien und Inflammation führt zu strukturellen Veränderungen des Lungengewebes auf histologischer (Verdickung der Basalmembran, duktale Dilatation, etc.) und später auch makroskopischer Ebene (Bronchiektasien, Atelektasen, etc.). Es scheint bereits vor einem Kontakt zu Mikroorganismen zu Veränderungen des Lungenparenchyms zu kommen. Doch diese Einflüsse der CFTR-Mutation sind noch nicht abschließend erforscht [87].

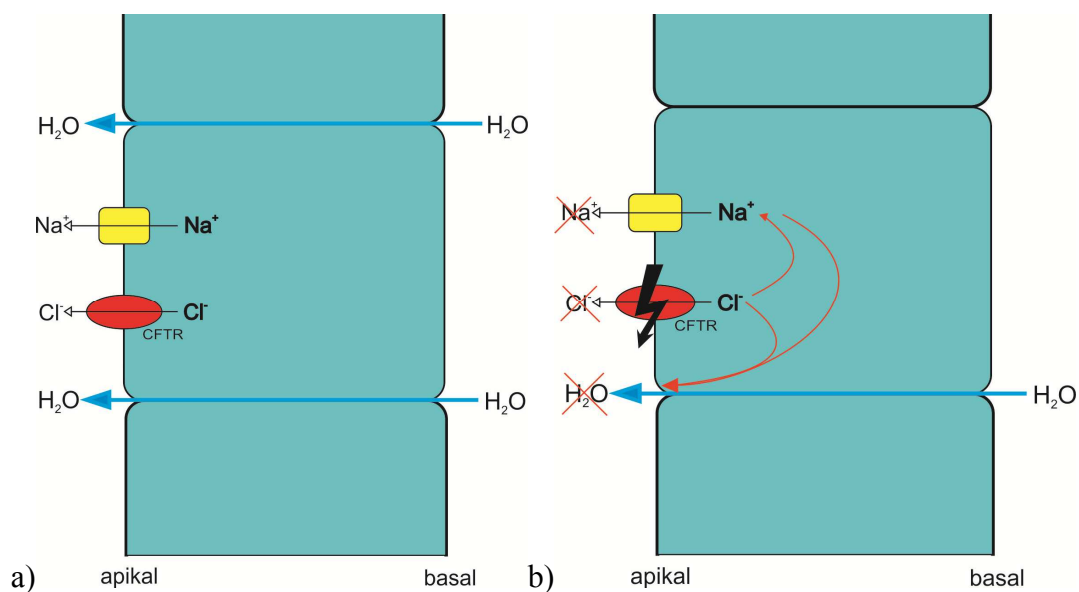


Abb. 04 a) physiologisches Lungenepithel b) Störung des CFTR-Kanals

1.6.2 *S. aureus* und Zystische Fibrose

In den vergangenen Jahrzehnten konnte die mediane Lebenserwartung von CF-Patienten durch konsequente antibiotische Therapie auf aktuell 35,9 Jahre gehoben werden [106]. Dies ist zu großen Anteilen der besseren Kontrolle von bakteriellen Infektionen zu verdanken, welche während der prä-antibiotischen Ära einer der häufigsten Gründe für die hohe Sterblichkeit von jungen Patienten war. In dieser Altersgruppe stellt *S. aureus* das am häufigsten isolierte Pathogen dar. Die Prävalenz des Mikroorganismus in den Atemwegen von CF-Patienten liegt höher als bei der gesunden Bevölkerung und zeigt außerdem bei Kindern eine höhere Prävalenz im Oropharynx als in den vorderen Nasenabschnitten [46]. Die Kolonisierung der unteren Atemwege folgt einer Besiedlung der oberen Atemwege [67]. Die Infektion der tiefen Lungenabschnitte verläuft meist schleichend und persistiert über lange Zeit. Der hohe Selektionsdruck durch Wirtsfaktoren, Umwelteinflüsse und Antibiotikatherapien in diesem Habitat führt zur Ausbildung multipler adaptiver Mechanismen von *S. aureus*. Hierzu zählen die Herabregulierung von Virulenzfaktoren, Bildung von Biofilm sowie Ausprägung phänotypisch und genetisch diverser Populationen [36]. In den meisten Fällen setzt sich dabei ein Klon durch, der dann über Jahre hinweg nachgewiesen werden kann. Weitere Stämme werden in der Regel nur temporär gefunden [48]. Im höheren Lebensalter der Patienten überwiegt der Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa*, der sich zumeist im Kampf um eine ökologische Nische gegen *S. aureus* durchsetzt [1].

Auch aus epidemiologischer Sicht besteht eine zentrale Rolle von *S. aureus* im Zusammenhang mit CF. Eine Auswertung der Daten der Cystic Fibrosis Foundation der Vereinigten Staaten (CFF) zeigte die Zunahme der Inzidenz und Prävalenz des Organismus in den Jahren zwischen 1995 und 2005. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass die Diagnostik im Rahmen der Versorgung von Mukoviszidosepatienten verbessert wurde und einen höheren Grad an Standardisierung erfahren hat [86].

S. aureus nimmt weiterhin eine bedeutende Stellung im entzündlichen Prozess der Zystischen Fibrose ein. Sagel et al. zeigten, dass Patienten mit positivem Kulturnachweis erhöhte serologische Inflammationswerte und eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage (BAL) im Vergleich zu Kontrollen aufwiesen [93]. Eine solche Erhöhung an Immunzellen konnte mit einer verminderten

Lungenfunktion bei Säuglingen mit CF assoziiert werden. Bei diesen Kindern zeigte sich ferner eine akzelerierte Abnahme der Lungenfunktion nach Isolierung von *S. aureus* aus den tiefen Atemwegen [82].

Der Einfluss von *S. aureus* auf die kurz-, bzw. mittelfristige Krankheitsentwicklung der Zystischen Fibrose und sein Status als Wegbereiter anderer Pathogene konnte in den vergangenen Jahren bereits deutlich gemacht werden. Allerdings fehlen noch immer Erkenntnisse über Langzeitauswirkungen des Organismus auf CF, welche nötig wären, um ein standardisiertes Vorgehen zu erarbeiten [46, 106].

1.6.3 *P. aeruginosa* und Zystische Fibrose

In dieser Arbeit wird unter anderem ein Zusammenhang zwischen der Ko-Kolonisierung von *Pseudomonas aeruginosa* und *S. aureus* im Bezug auf dessen Biofilmbildung untersucht.

P. aeruginosa spielt selbst eine bedeutende Rolle für Patienten mit Zystischer Fibrose. Es ist ein ubiquitär vorkommendes gramnegatives, stäbchenförmiges Bakterium dessen natürliches Habitat die unbelebte Umwelt wie Erde und Gewässer darstellen [94]. Es besiedelt unter anderem den Menschen, bei dem *P. aeruginosa* als opportunistischer Keim eine weite Bandbreite an Erkrankungen verursachen kann. Bei erwachsenen Patienten mit Zystischer Fibrose kann er zu 80% nachgewiesen werden [52]. Das Spektrum der Krankheiten reicht von lokalisierten Infektionen des Respirations-, Urogenital- und Magen-Darm-Traktes, Entzündungen der Augen sowie Gelenke bis hin zu systemischen Infektionen. Infizierte Individuen sind zumeist immunkompromittiert [94]. Im Rahmen von CF äußert sich eine Infektion mit *P. aeruginosa* besonders bei Kindern durch eine erhöhte Entzündungsaktivität in den tiefen Atemwegen und eine reduzierte Lungenfunktion [82, 93]. Die chronische Infektion mit *P. aeruginosa* ist für einen großen Anteil der Morbidität und den größten Teil der Mortalität bei CF-Patienten verantwortlich [41].

Die erfolgreiche Besiedlung äußerst verschiedener Lebensräume erklärt durch *P. aeruginosa* sich durch die ausgeprägte genetische Flexibilität des Mikroorganismus in Kombination mit geringen nutritiven Ansprüchen. Die Sinus stellen zumeist auf Grund geringerer Zugänglichkeit für Antibiotika sowie weniger ausgeprägter Immunreaktion ein

Reservoir für *P. aeruginosa* dar [26, 94]. Während der Besiedlung können nicht nur massive Veränderungen des Phänotyps, sondern auch des Genotyps auftreten. Die Stämme sind in der Lage, sich von motilen Phänotypen mit der Expression zahlreicher Exoproteine zu weniger virulenten Formen die Biofilme bilden, zu entwickeln. Hierbei begünstigt die Selektion Stämme, die durch eine Überproduktion von Alginaten einen mukoiden Phänotyp ausprägen. Dies erleichtert die weitere Entwicklung eines Biofilms. Der protektive Film besteht aus Mucin, DNA (z.B. von untergegangenen Neutrophilen) und Polysacchariden, die unter hypoxischen Umweltbedingungen vermehrt produziert werden. Die Wandlung zu diesen mukösen Formen bedeutet eine höhere antibiotische Resistenz und ist mit einer beschleunigten Abnahme der Lungenfunktion vergesellschaftet [37, 44].

Durch frühe und radikale antibiotische Therapie konnte der durchschnittliche Beginn der Besiedlung durch *P. aeruginosa* vom frühen Schulalter in das junge Erwachsenenalter der Patienten verschoben werden. Dabei gehen einer chronischen Besiedlung/Infektion meist intermittierende Infektionen voraus [26].

Chronische Besiedlungen verlaufen prinzipiell benigner je älter die Patienten sind [18]. Jedoch konnte eine Zunahme der Morbidität und Variabilität der Lungenfunktion besonders durch muköse Formen von *P. aeruginosa* festgestellt werden [18, 44]. Unter konsequenter antibiotischer Therapie ist es allerdings möglich, die Lebensqualität der Patienten auch über längere Zeiträume von mehr als zehn Jahren zu halten. [19].

1.6.4 *Burkholderia cepacia* complex und Zystische Fibrose

Des Weiteren wurde der Zusammenhang zwischen einer Ko-Besiedlung von *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) und *S. aureus* in Hinsicht auf dessen Biofilmproduktion ausgewertet.

Bcc besteht aus einer Gruppe von 17 eng miteinander verwandter Stämme der Gattung *Burkholderia*. Es handelt sich um obligat aerobe, gramnegative Stäbchenbakterien, die für den Menschen opportunistische Erreger darstellen. Sie infizieren i.d.R. immundefiziente Patienten, bei denen sie zu schweren bis tödlichen Pneumonien, auch „Cepacia-syndrom“ genannt, führen können [97]. Bcc wurde in den 1980er Jahren als eine Ursache erhöhter Morbidität sowie Mortalität unter Mukoviszidosepatienten identifiziert und

der direkte Kontakt zwischen Erkrankten als maßgeblicher Übertragungsweg erkannt. Die präzise Bestimmung von Bakterienstämmen und strenge Isolierung der Patienten mit einer radikalen antibiotischen Therapie verhalf in den vergangenen Jahren Exazerbationen aus dieser Infektionsquelle zu minimieren [29].

Die Eradikation von Bcc bei CF-Patienten gestaltet sich äußerst schwierig, da innerhalb der Gattung intrinsische Resistenzmechanismen gegen verschiedene Antibiotikagruppen und Biozide vorkommen. Eine zentrale Rolle spielen hier Effluxpumpen und die Formierung von Biofilmen [92]. Momentan stützt sich die Therapie von Bcc auf multimodale Regime, die der Monotherapie signifikant überlegen waren. In der Akutbehandlung wurden wie oben angemerkt durch zusätzliche strikte Isolierung infizierter Patienten bereits große Erfolge erzielt. Doch im Rahmen von Erstmanifestationen konnten nur in wenigen Fällen vollständige Eradikationen bei einer hohen Rate an Spontanremissionen erreicht werden. Der Stellenwert einer antibiotischen Behandlung dieser Fälle ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar [43].

2 Fragestellung

Die Rolle von *S. aureus* in den Atemwegen von Mukoviszidosepatienten wird aktuell kritisch diskutiert. Im Zusammenhang mit dem Pathogen *P. aeruginosa* konnte eine ausgeprägte Biofilmbildung mit einer Verschlechterung des klinischen Status betroffener Patienten assoziiert werden und stellt einen der Gründe für die Indikation zur frühzeitigen Eradikationstherapie dar.

Im Bereich der *S. aureus*-Forschung wurden bisher nur geringe Erkenntnisse in diesem Feld gewonnen. Um einen ersten Schritt zum Verständnis des Einflusses von biofilmbildenden *S. aureus* auf den Krankheitsverlauf von CF-Patienten zu erhalten, sollten in unserer Arbeit daher folgende Fragen geklärt werden:

1. Ist *S. aureus*, der aus den Atemwegen von CF-Patienten untersucht wurde, in der Lage, Biofilm zu bilden?
2. Bilden klonale Stämme zum gleichen Zeitpunkt stets einen vergleichbaren Biofilm?
3. Haben Ko-Besiedlungen mit *P. aeruginosa* oder *B. cepacia* einen Einfluss auf die Biofilmproduktion?

Des Weiteren wollten wir mittels der uns zur Verfügung stehenden Stammsammlung erfahren, ob es einen zeitlichen Einflussfaktor im Bezug auf die Biofilmbildung gibt:

4. Gibt es Veränderungen des Biofilms nach einem Besiedlungszeitraum von über 5 Jahren?
5. Ist ein einheitlicher Trend der Veränderung einer Biofilmproduktion zu erkennen?

Weiterführend sollten diese Daten mit klinischen Angaben korreliert werden, um mögliche Auswirkungen des *S. aureus*-Biofilms auf den Krankheitsverlauf der Mukoviszidose zu erkennen. In folgenden Untersuchungen sollten auch Einflussgrößen wie antibiotische Therapien beurteilt werden.

3 Experimentelle Untersuchungen: Material und Methoden

3.1 Bakterienstämme und Patienten

Die untersuchten Bakterienstämme wurden im Rahmen einer Langzeitstudie zur Erörterung der pathogenetischen Bedeutung von *S. aureus* sowie der Unterscheidung von Kolonisation und Infektionen der Atemwege von CF-Patienten durch den Keim akquiriert. Der Beobachtungszeitraum hierfür erstreckte sich von 1994 bis 2011.

In dieser Arbeit wurden aus dem genannten Kollektiv Individuen ermittelt, bei denen über eine Zeitspanne von mindesten fünf Jahren derselbe *S. aureus*-Klon nachgewiesen werden konnte. Die untersuchten Stämme wurden stets per Rachenabstrich, Sputum oder BAL gewonnen. Zu den Ausschlusskriterien zählte ein fehlender Nachweis von *S. aureus* über mehr als zwölf Monate während des Beobachtungszeitraums. Weiterhin wurden keine Nasenabstriche verwendet.

Die Kohorte umfasste 204 Patienten, wovon bei 71 Probanden *S. aureus* kontinuierlich über einen Zeitraum von mindestens fünf Jahren aus Rachenabstrichen, Sputa oder BAL isoliert wurde. In dieser Gruppe konnte bei 36 Individuen derselbe Klon über eine Periode von mindestens fünf Jahren ermittelt werden.

Die untersuchten Stämme wurden zuerst morphologisch nach Koloniegröße und -farbe, Hämolyseverhalten sowie Vorhandensein von Betatoxin auf Blut- und Schaedleragar nach 24h bzw. 48h Inkubationszeit beurteilt. Um eine Zusammengehörigkeit von frühen mit späten Isolaten einzugrenzen, nutzten wir *agr*- und *cap*-Analysen zur Präselektion der Stammpaare. Bei Übereinstimmung der Ergebnisse von frühen mit späten Isolaten wurde eine *spa*-Typisierung zum Nachweis der Persistenz desselben Klons durchgeführt. Bei korrelierenden *spa*-Typen zu Anfang und Ende eines Besiedlungszeitraums folgte eine Analyse der Biofilmbildung des ermittelten klonalen Paares.

3.2 Lyse von Bakterien und Purifizierung genomischer DNA

Die genomische DNA der untersuchten Stämme wurde mittels Lyse und folgender Aufreinigung mit dem QIAmp DNA Mini Kit 250 (Qiagen, Hilden, Deutschland) dargestellt. Hierzu wurden jeweils drei Bakterienkolonien einer Kultur, die auf Blutagar über 24h bei 37°C inkubiert worden waren, mittels Öse aufgenommen und in 180µl TE-Puffer (pH 8,0; 20mM Tris; 2mM EDTA) mit 15µl Lysostaphin (WAK-Chemie, Medical GmbH, Steinbach, Deutschland) suspendiert sowie für 30min bei 37°C inkubiert. Danach wurden 200µl des Kit-eigenen AL-Puffers mit 20µl Proteinase K (QIAmp DNA Mini Kit 250) hinzugegeben. Das Gemisch wurde daraufhin für 30min auf 56°C und anschließend für 15min auf 95°C erhitzt. In einem weiteren Schritt wurden 200µl Ethanol (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt und nach Pulsvortexen auf QIAmp Filtersäulen aufgetragen. Bei 8000 Umdrehungen pro Minute (rpm) wurden diese für eine Minute zentrifugiert. Nach Auftragen von 500µl AW1-Puffer (QIAmp DNA Mini Kit 250) und erneutem Zentrifugieren bei 8000rpm für eine Minute wurden 500µl AW2-Puffer (QIAmp DNA Mini Kit 250) auf die Säule gegeben und anschließend für drei Minuten bei 14000rpm zentrifugiert. Die dabei entstandenen Filtrate wurden jeweils verworfen. In einem letzten Schritt wurden 200µl AE-Puffer (QIAmp DNA Mini Kit 250) auf die Säule aufgetragen und bei 56°C für eine Minute inkubiert. Abschließend wurde der Mix für drei Minuten bei 8000rpm zentrifugiert.

Zur Quantifizierung der DNA-Konzentration wurden Proben der gereinigten Lysate im Verhältnis 1:10 mit ddH₂O verdünnt und photometrisch bei 260nm, bzw. 280nm gemessen (Eppendorf BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Zu starke Verunreinigungen durch einen zu hohen Proteinrestgehalt wurden ab einem Quotienten von <1,5 OD 260nm/OD 280nm angenommen und verworfen.

3.3 Polymerasekettenreaktion und Agarosegel-Elektrophorese

Die Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction, PCR) ist der grundlegende Mechanismus zur Vervielfältigung von DNA. Die Methode wurde 1984 durch Kary Mullis entwickelt und mit ihr können anhand einer DNA-Matrize neue komplementäre Desoxyribonukleinsäurestränge synthetisiert werden. Entsprechend den in die-

ser Studie genutzten bakteriellen Nukleinsäuren wird in der Beschreibung der Methodik Bezug auf die PCR von Doppelstrang-DNA genommen [74].

Den zu vervielfältigenden Strängen werden Primer, DNA-Polymerase und freie Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) in einem Puffermedium zugesetzt. Im ersten Schritt der PCR, der Denaturierung, wird mittels Erhitzen des Probenansatzes auf 95°C die doppelhelikale Struktur der bakteriellen Nukleinsäure getrennt (Denaturierungsphase). Daraufhin wird die Temperatur schnellstmöglich gesenkt, sodass die Primer an komplementäre Abschnitte der Matrize binden können (Annealing-Phase). Die Länge der Primer beträgt in der Regel 18-30 Basen und bestimmt durch Länge und Zusammensetzung die optimale Annealing-Temperatur. Der Ansatz wird danach auf 68-72°C in Abhängigkeit des Temperaturoptimums der verwendeten Polymerase angehoben, wodurch dann eine Elongation vom Primer ausgehend in 3'-Richtung erfolgt (Elongationsphase). Der Primer verbleibt im neu gebildeten DNA-Abschnitt und kann im gleichen Ansatz somit nicht wieder verwendet werden.

Die beschriebenen Schritte der PCR können bei suffizientem Vorrat an Primern und dNTPs vielfach wiederholt werden. Durch jede erneute Repetition verdoppelt sich der Gehalt des gewünschten DNA-Abschnittes bis alle Primer oder dNTPs verbraucht wurden. Innerhalb kurzer Zeit kann so ein Bereich exponentiell vervielfältigt werden.

Zur weiteren Analyse des Amplifikats wurde ein Agarosegel aus 4,5mg Agarose (Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA) und 225ml Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TEA-Puffer) hergestellt. Die Mixtur wurde unter Rühren zum Kochen gebracht, darauf in eine Gelkammer gegossen und vor dem Erhärten ein Lamellenkamm eingehängt, sodass sich Vertiefungen bildeten.

Nach dem Erhärten wurden die äußersten Vertiefungen einer Reihe mit einem Marker (1000bp ladder; New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) befüllt. Die weiteren Kammern wurden mit Positivkontrollen/Proben-Amplifikaten und Negativkontrolle (8µl Probe + 8µl GEBS-Puffer) beimpft. Durch ein Elektrophoresegerät (BioRad Power Pac, Bio-Rad Laboratories GmbH, München Deutschland) wurde eine Spannung von 160mV bei 400mA für 30min bis 60min angelegt. Nach Ablauf der

Elektrophorese wurden die Gele in einem Ethidiumbromidbad gefärbt, in destilliertem Wasser gewaschen und unter UV-Licht fotografiert.

3.4 *cap*-PCR

Die Gene für das capsuläre Polysaccharid (CAP) wurden mittels PCR und folgender Gelelektrophorese nachgewiesen. Der verwendete Reaktionsmix bestand je Probe aus 20,38µl H₂O (Merck, Darmstadt), 2,5µl 10X Puffer inklusive 15mM MgCl₂, 0,5µl dNTPs (Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA), 0,25µl CAP 5 F (forward Primer), 0,25µl CAP 5 R (reverse Primer), 0,25µl CAP 8 F (forward Primer), 0,25µl CAP 8 R (reverse Primer) und 0,125µl Taq-Polymerase (HotStar Taq, segentic, Borken, Deutschland). Zu den 24,5µl dieses Gemischs wurden zuletzt 0,5µl Proben DNA, bzw. 0,25µl *cap* 5+ und 0,25µl *cap* 8+ Kontrollen (Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA) gegeben. Während der gesamten Zeit der Herstellung wurden alle Proben und Anteile des Reaktionsmixes stets gekühlt, um einem vorzeitigen Verfall der Substanzen vorzubeugen.

Der erhaltene Ansatz wurde darauf mittels Thermocycler (BioRad iCycler, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) in 30 Zyklen amplifiziert. Im verwendeten Protokoll wurde die DNA für initial 15min bei 95°C denaturiert. Dieser Schritt beschränkte sich in den folgenden 29 Durchläufen auf lediglich 30sec. In der Annealing-Phase wurde der Mix für 30sec auf 45°C herabgekühlt. In der Elongationsphase wurde der Ansatz für eine Minute auf 72°C erwärmt. An den letzten Zyklus schlossen sich weitere zehn Minuten bei 72°C an.

	Sequenz	Amplifikatlänge
CAP 5 F	GAAAGTGAACGATTAGTAGAA	
CAP 5 R	GTACGAAGCGTTTTGATAGTT	532bp
CAP 8 F	GTGGGATTTTTGTAGCTTTT	
CAP 8 R	CGCCTCGCTATATGAACTAT	437bp

Tab. 01: Primersequenzen der *cap*-PCR

Reaktionsmix	
H ₂ O	20,38µl
10x Puffer inkl. 15mM MgCl ₂	2,5µl
cNTP	0,5µl
CAP 5 F	0,25µl
CAP 5 R	0,25µl
CAP 8 F	0,25µl
CAP 8 R	0,25µl
HotStar Taq	0,25µl

Tab. 02: Reaktionsmix der *cap*-PCR

In der folgenden Gelelektrophorese wurden die Proben von einer 1000 Basenpaar (bp) ladder (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) flankiert, um eine bessere Identifizierung der *cap*-Typen zu ermöglichen. Die Amplifikate der Primer betragen 532bp (*cap* 5) und 437bp (*cap* 8).

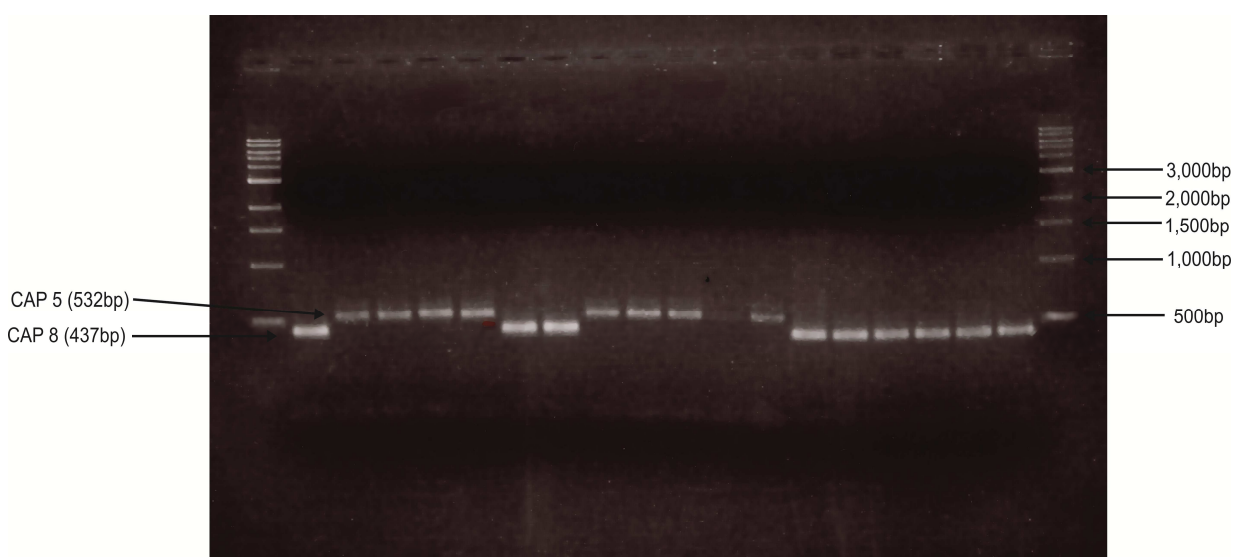


Abb. 05: Gelelektrophorese einer *cap*-PCR

3.5 *agr*-PCR

Für den Nachweis der *agr*-Typen wurde folgender PCR-Reaktionsmix verwandt. Je Ansatz wurden 20,25µl H₂O (Merck, Darmstadt), 2,5µl 10x Puffer inklusive MgCl₂ und 0,5µl dNTPs (Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA) eingesetzt. Als Primer wurden je 0,5µl AGRSA KON-1 und 0,125µl AGRSA 1-2, 2-2, 3-2, 4-2 (Eurofins MWG Synthesis GmbH, Ebersberg) verwendet [59]. Weiterhin wurde jedem Gemisch 0,25µl Taq DNA Polymerase (segenetic, Borken, Deutschland) zugesetzt. Dem Mix wurde zuletzt 0,5µl Proben-DNA, bzw. der Positivkontrolle je 0,17µl *agr* I- IV hinzugefügt.

Die Ansätze wurden danach mittels Thermocycler (BioRad iCycler, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) in 30 Zyklen amplifiziert. Vor Beginn der repetitiven Zyklen wurden die Proben für eine Minute auf 95°C erhitzt und nach Vollendung der Zyklen für zehn Minuten bei 72°C gehalten. Jeder Zyklus bestand aus einem Denaturierungsschritt bei 95°C für eine Minute, einer Annealing-Phase von einer Minute bei 55°C und einer Elongationsphase von zwei Minuten bei 72°C.

	Sequenz	Amplifikatlänge
AGRSA KON-1	ATGCACATGGTGACATGC	
AGRSA 1-2	GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT	439bp
AGRSA 2-2	TATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC	572bp
AGRSA 3-2	GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCAG	321bp
AGRSA 4-2	CGATAATGCCGTAATACCCG	657bp

[59]

Tab. 03: Primersequenzen für die *agr*-PCR

Reaktionsmix	
H ₂ O	20,38µl
10x Puffer inkl. 15mM MgCl ₂	2,5µl
cNTP	0,5µl
AGRSA KON-1	0,5µl
AGRSA 1-2	0,125µl
AGRSA 2-2	0,125µl
AGRSA 3-2	0,125µl
AGRSA 4-2	0,125µl
HotStar Taq	0,25µl

Tab. 04: Reaktionsmix der *agr*-PCR

In der anschließenden Gelelektrophorese wurden alle Proben von einer 1000bp ladder (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) und Positivkontrollen flankiert, um eine bessere Identifizierung der *agr*-Typen zu ermöglichen. Die Länge der Amplifikate der Primer beträgt 321bp für *agr III*, 439bp für *agr I*, 572bp für *agr II* und 657bp für *agr IV*.

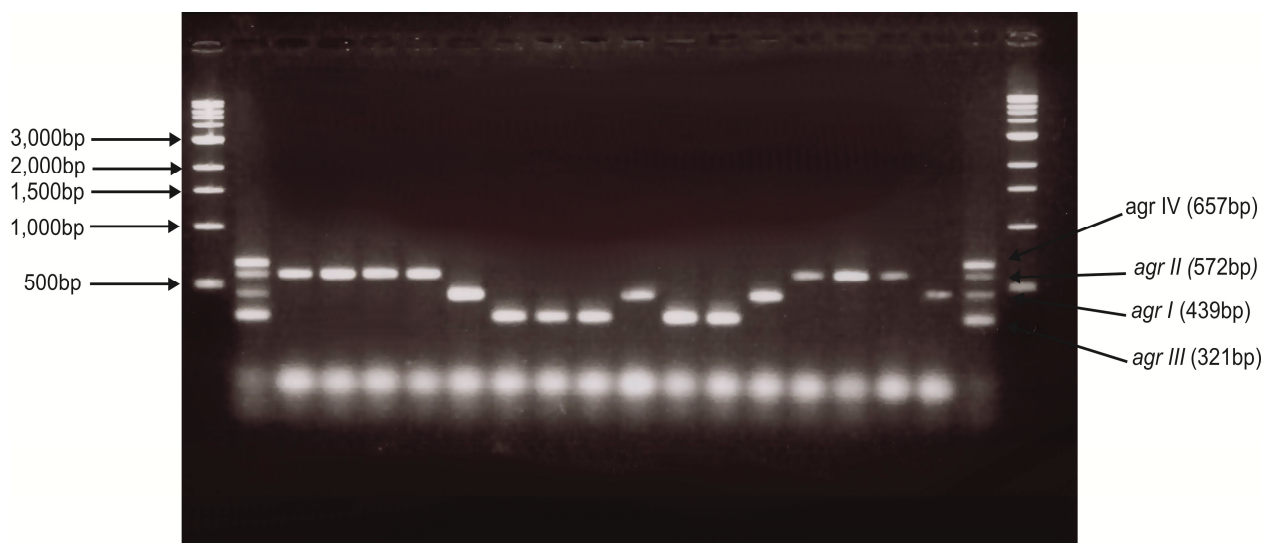


Abb. 06: Gelelektrophorese einer *agr*-PCR

3.6 *spa*-Typisierung

Die in der Einleitung beschriebene Region X_R wurde durch eine PCR mittels der Primer *spa*-1113 F (5'-TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC-3) und *spa*-1514 R (5'-CAGCAGTAGTGCC GTTTGCTT-3') [50] sowie der Polymerase Red Taq (sigma aldrich, St. Louis, USA) amplifiziert. Nach weiterer Aufreinigung des Amplifikats wurde es durch den ABI 3100 AVANT Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA) sequenziert. Die Analyse der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe der Ridom StaphTypeTM Software (Ridom GmbH, Würzburg, Deutschland). Diese ist in der Lage sowohl *spa*-Repeats zu erkennen, als auch diesen direkt *spa*-Typen zuzuordnen. Hierbei werden typische Sequenzmuster am 5'- und 3'-Ende untersucht, um zu gewährleisten, dass kein Repeat ausgelassen wird. Den einzelnen Basen werden Werte zugeordnet, welche einer Fehlerwahrscheinlichkeit entsprechen. Die Software erarbeitet aus der Zusammenstellung dieser Werte eine Konsensus-Sequenz, die in über 90% der Fälle keiner weiteren manuellen Zuordnung benötigt.

Über die online-Datenbank können jederzeit neue *spa*-Typen erkannt und epidemiologisch eingeordnet werden. Jede Repeatreihenfolge wird hier einem numerischen Code zugewiesen, der von da an frei via Internet zugänglich ist [39].

3.7 Biofilmmessung

Zur Quantifizierung der Biofilmproduktion der Bakterienstämme wurden diese nach Auftauen aus -80°C Kühlung auf Blutagar ausgestrichen und für 24h bei 37°C inkubiert. Danach verfahren wir gemäß dem Protokoll von Christensen et al. [15] mit im Folgenden erwähnten Abänderungen. Eine einzelne Kolonie wurde mittels Öse in 5ml Tryptic-Soja-Bouillon (TSB) mit einem Gehalt von 0,25% Glukose (Glc) gegeben und für weitere 24h bei 37°C bebrütet. Danach wurden die Kulturen im Verhältnis von 1:200 in TSB inklusive 0,25% Glc verdünnt, in 96-Well-Mikrotiterplatten pipettiert und für 24h bei 37°C inkubiert.

Nach insgesamt 48h Inkubation wurden die flüssigen Überstände der Mikrotiterplatten entleert und die Vertiefungen zweimalig mit 300µl PBS (phosphate buffered saline) pro

Vertiefung gewaschen. Anschließend wurden 100µl Kristallviolettlösung (einprozentig) pro Vertiefung aufgetragen. Nach 15min wurde die Lösung entleert und die Vertiefungen dreimal mit 300µl PBS erneut gewaschen. Zuletzt wurden 100µl eines Äthanol-Aceton-Gemischs (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) im Verhältnis 4:1 hinzugefügt und für fünf Minuten belassen.

PBS 1000ml	
Natriumchlorid	7g
Dinatriumphosphat	4,2g
Dikaliumphosphat	1,06g
ddH2O	1000ml

Tab.05: Inhaltsstoffe PBS

TSB 1000ml	
Kasein	17,0g
Soja	3,0g
Dextrose	2,5g
Natriumchlorid	5,0g
Dikaliumphosphat	2,5g
ddH2O	1000 ml

Tab. 06: Inhaltsstoffe TSB Puffer

Die abschließende Biofilmmessung wurde mit Hilfe eines Microplate Absorbance Readers (BioRad iMark microplate reader, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 655nm durchgeführt.

Als Referenz wurden auf jeder Mikrotiterplatte die Stämme RP62A (*S. epidermidis*) als Exempel für starke Biofilmproduktion (positive Kontrolle) und TM300 (*S. carnosus*) als Beispiel für geringe Biofilmproduktion (negative Kontrolle) mitgeführt.

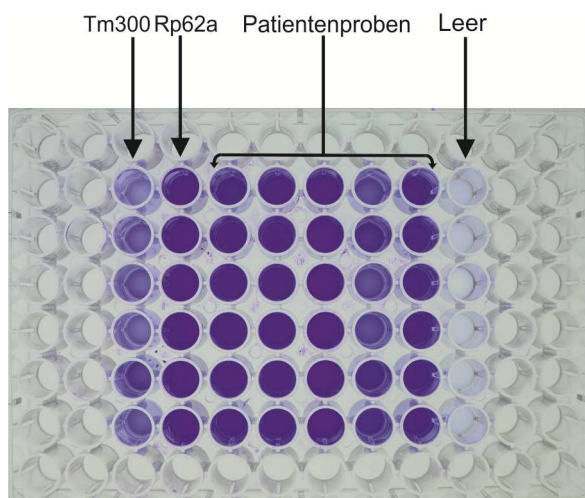


Abb. 07: Mikrotiterplatte zur Biofilmmessung mit Proben inkl. Kontrollen

4 Ergebnisse

4.1 *cap*- und *agr*-Bestimmung

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden die Daten von 204 Patienten ausgewertet. Bei 71 dieser Individuen konnte eine kontinuierliche Besiedlung mit *S. aureus* über fünf oder mehr Jahre angenommen werden. Dies begründeten wir durch den Keimnachweis aus mindestens jährlichem Rachenabstrich, Sputum oder BAL.

Zur weiteren Eingrenzung einer Besiedlung durch klonale Stämme wurden zunächst die *cap*-Typen der isolierten Keime der 71 Patienten zu Anfang und zum Ende eines kontinuierlichen Besiedlungszeitraumes bestimmt. Es wurden hierfür insgesamt 229 Isolate untersucht, wovon 141 *cap* 8 positiv und 88 *cap* 5 positiv waren. Davon waren 68 der ersten Isolate einer kontinuierlichen Besiedlungsperiode durch *S. aureus cap* 8 positiv (62%) und 41 *cap* 5 positiv (38%). Die untersuchten Stämme wiesen nach einem Zeitraum von mindestens fünf Jahren die folgende Verteilung auf: *cap* 8 73 (61%) vs. *cap* 5 47 (39%).

<i>cap</i> 8	
Erstes Isolat:	68 (48%)
Letztes Isolat:	73 (52%)
Gesamt:	141 (62%)

<i>cap</i> 5	
Erstes Isolat:	41 (46%)
Letztes Isolat:	47 (54%)
Gesamt:	88 (38%)

Tab. 07: Häufigkeit der *cap*-Typen von Isolaten am Anfang, bzw. Ende einer Besiedlungsperiode

Mit Hilfe dieser Daten konnten in Proben von 51 Patienten (170 Isolate) Übereinstimmungen der *cap* -Typen zwischen frühen und späten Isolaten festgestellt werden. Hier von zeigten sich in Isolaten von 38 Patienten der *cap* -Typ 8 (74,5%) und in 13 *cap* -Typ 5 (25,5%).

<i>cap</i> 8	38 (74,5%)
<i>cap</i> 5	13 (25,5%)

Tab. 08: Häufigkeit der übereinstimmenden *cap*-Typen nach Patienten

Zur weiteren Eingrenzung führten wir bei korrelierenden *cap*-Typen der Isolate eine *agr*-PCR derselben durch.

In diesem Arbeitsschritt wurden die insgesamt 170 Isolate einer *agr*-PCR unterzogen. Hiervon entsprachen 79 dem *agr*-Typ I (46,5%), 35 dem *agr*-Typ II (20,6%), 50 dem *agr*-Typ III (29,4%) und 6 dem *agr*-Typ IV (3,5%). 53 Isolate waren *cap*-5-positiv und 117 *cap*-8-positiv. Dabei konnte bei 40 Isolate der Kapseltyp 5 und *agr*-Typ I nachgewiesen werden. Dies entspricht 75,4% der *cap*-5-positiven und 23,5% aller 170 untersuchten Isolate. Die Kombination aus *cap*-5 und *agr*-Typ II konnte in 13 Fällen (24,5% der *cap*-5-Positiven, 7,7% von 170) festgestellt werden. Innerhalb der Gruppe der *cap*-5-positiven Isolate wurden weder *agr*-Typ III, noch IV, noch *agr*-negative Isolate gezeigt. Innerhalb der Gruppe der *cap*-8-positiven Isolate konnten 39 *agr* I- (33,3% *cap* 8, 22,9% von 170), 22 *agr* II- (18,8% *cap* 8, 12,9% von 170), 50 *agr* III- (42% *cap* 8, 29,4% von 170) und 6 *agr* IV- positive Isolate (5,1% *cap* 8, 3,5% von 171) nachgewiesen werden. Folgende Tabelle stellt die Verteilung der *agr*-Typen in Verbindung mit den zuvor bestimmten Kapseltypen dar:

	<i>agr</i> I	<i>agr</i> II	<i>agr</i> III	<i>agr</i> IV	Gesamt
<i>cap</i> 5	40 (23,5%)	13 (7,6%)	-	-	53 (31,1%)
<i>cap</i> 8	39 (22,9%)	22 (12,9%)	50 (29,4%)	6 (3,5%)	117 (68,7%)
Gesamt	79 (46,4%)	35 (20,5%)	50 (29,4%)	6 (3,5%)	170

Tab. 09: Verteilung von *agr*-Typen abhängig von *cap*

Für die Verteilung dieser Daten konnte mit Hilfe des Chi²-Tests ein p-Wert <0,05 ermittelt werden, sodass ein Zusammenhang zwischen Auftreten von Kapseltyp und *agr*-Typ äußerst wahrscheinlich ist.

In der weiteren Analyse zeigte sich bei Isolaten von 31 Patienten (117 Isolate), entsprechend 60,8% der vorangegangenen 51 Patienten (68,8% der Isolate), sowohl ein gleicher *cap*-Typ als auch ein identischer *agr*-Typ nach dem festgesetzten Beobachtungszeitraum von mindestens fünf Jahren.

Die Verteilung der *cap*- und *agr*-Typen der Isolate innerhalb dieser Gruppe wird in folgender Tabelle dargestellt:

	<i>agr</i> I	<i>agr</i> II	<i>agr</i> III	<i>agr</i> IV	Gesamt
<i>cap</i> 5	36 (30,8%)	8 (6,8%)	-	-	44 (37,6%)
<i>cap</i> 8	25 (21,4%)	10 (8,5%)	38 (32,5%)	-	73 (62,4%)
Gesamt	61 (52,2%)	18 (15,3%)	38 (32,5%)	-	117

Tab. 10: Verteilung übereinstimmender *agr*- und *cap*-Typen bei frühen und späten Isolaten

Auf Grund der geringen Anzahl der Stichprobe (n= 117) wurde Fisher's exakter Test zur Ermittlung einer möglichen Korrelation zwischen *cap*- und *agr*-Typen verwendet. Wie bereits in der zuvor betrachteten Gesamtheit wurde hier ebenfalls ein p-Wert < 0,05 errechnet, sodass weiterhin von einem überzufälligen gemeinsamen Auftreten der Merkmale ausgegangen werden kann.

Die Kohorte von 31 Patienten wurde darauf durch die Einbeziehung weiterer Studien des Institutes und dem Zugang zu aktualisierten Patientenlisten aus den zwei Kliniken, die die Mukoviszidosepatienten betreuen, um 6 Patienten erweitert.

Bei den Isolaten der 37 Patienten wurden daraufhin *spa*-Typisierungen durchgeführt, um weiterhin zu verifizieren, dass es sich um klonale Isolate am Anfang und Ende eines

Besiedlungszeitraums handelte. Es zeigte sich bei Isolaten von 35 Patienten (94,6%) neben den korrelierenden *cap*- und *agr*-Typen auch ein gleicher, bzw. minimal veränderter *spa*-Typ.

Die Verteilung der *cap*- und *agr*-Typen der Kohorte mit übereinstimmenden *spa*-Typen teilten sich nach Patienten wie folgt auf: Es konnten 16 *agr*-I-positive (45,7%), 7 *agr*-II-positive (20%), 11 *agr*-III-positive (31,4%) und 1 *agr*-negatives Paar (2,9%) nachgewiesen werden. Keines der untersuchten Isolate wies den *agr*-Typ IV auf.

Innerhalb der *agr*-Gruppen lag die prozentuale Verteilung bei 62,5% *cap*-5-positiver und 37,5% *cap*-8-positiver Isolate mit *agr*-I-Nachweis. 28,6% *cap*-5- und 71,4% *cap*-8-positiver Paare zeigten einen *agr*-II-Nachweis. Sowohl die Gruppe der *agr*-III, als auch die *agr*-negativen Isolate prägten zu 100% den Kapseltyp 8 aus.

Wiederum wurde auf Grund der geringen Zahl der Stichprobe (n = 36) Fisher's exakter Test zur Analyse der Daten herangezogen. Mit einem p-Wert <0,05 konnte ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Kapsel- und *agr*-Typen weiterhin als überzufällig angenommen werden.

	<i>agr</i> I	<i>agr</i> II	<i>agr</i> III	<i>agr</i> IV	negativ	Gesamt
<i>cap</i> 5	10 (28,6%)	2 (5,7%)	-	-	-	12 (34,3%)
<i>cap</i> 8	6 (17,1%)	5 (14,2%)	11 (31,5%)	-	1 (2,9%)	23 (65,7%)
Gesamt	16 (45,7%)	7 (19,9%)	11 (31,5%)	-	1 (2,9%)	35

Tab. 11: Verteilung der *cap*- und *agr*-Typen bei korrelierenden *spa*-Typen

4.2 *spa*-Typisierung

Dieser Untersuchung konnte ein weiteres Isolat aus einer anderen Studie des Institutes auf Grund übereinstimmender *spa*-Typen bei Erfüllung der Einschlusskriterien hinzugefügt werden (Patient 36). Die Isolate wurden im vorangegangenen Arbeitsschritt a.e. wegen einer Deletion im Promoterbereich von *agr* des späten Isolats ausgeschlossen, da aus diesem Grund eine Divergenz der *agr*-Typen resultierte. Mittels desselben *spa*-Typen ist allerdings von klonalen Stämmen auszugehen.

Somit konnten aus der Kohorte von 204 Patienten aus zwei Zentren eine Gruppe von 36 Personen ermittelt werden (17,6%), die einen regelmäßigen Nachweis von *S. aureus* über einen Zeitraum von mindestens fünf Jahren zeigte und in Isolaten, die am Anfang und Ende dieses Zeitfensters stehen, einen identischen, bzw. minimal veränderten *spa*-Typen aufwiesen. Es wurden insgesamt 33 verschiedene *spa*-Typen bei 36 Patienten differenziert.

Hier wurde der Typ t084 in neun Fällen nachgewiesen, während der nächst häufige *spa*-Typ mit fünf Nachweisen t012 war. Im Durchschnitt wiesen die *spa*-Typen eine Anzahl von 9,38 Repeats auf (Median: 10).

Patient	Zeitpunkt	<i>spa</i> -Typ	Frequenz	Repeats
1	Früh	t084	1,81%	07-23-12-34-34-12-12-23-02-12-23
	Spät	t084	1,81%	07-23-12-34-34-12-12-23-02-12-23
2	Früh	t012	1,67%	15-12-16-02-16-02-25-17-24-24
	Spät	t012	1,67%	15-12-16-02-16-02-25-17-24-24
3	Früh	t486	0,01%	15-12-16-02-16-02-25-17-24-24-24-24-24
	Spät	t804	<0,01%	15-12-16-02-16-02-25-17-24-24-24-24-24-24
4	Früh	t034	1,61%	08-16-02-25-02-25-34-24-25
	Spät	t034	1,61%	08-16-02-25-02-25-34-24-25
5	Früh	t078	0,32%	04-21-12-41-20-17-12-12-17
	Spät	t078	0,32%	04-21-12-41-20-17-12-12-17
6	Früh	t002	6,79%	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16
	Spät	t6338	<0,01%	26-23-17-34-17-20-17-12-307-16

Tab. 13 a: *spa*-Typen früher und später Isolate inklusive Frequenzen der Isolate laut Ridom Spa Server und Kennzeichnung von Mutationen der *spa*-Repeats [89]

Patient	Zeitpunkt	<i>spa</i> -Typ	Frequenz	Repeats
7	Früh	t127	2,17%	07-23-21-16-34-33-13
	Spät	t127	2,17%	07-23-21-16-34-33-13
8	Früh	t922	0,09%	07-23-21-16-33-13
	Spät	t922	0,09%	07-23-21-16-33-13
9	Früh	t489	0,01%	49-13-23-05-34-34-33-34
	Spät	t12809 t489	<0,01% 0,01%	49-13-23-34-33-34 49-13-23-05-34-34-33-34
10	Früh	t619	<0,01%	11-12-41-13-17
	Spät	t619	<0,01%	11-12-41-13-17
11	Früh	t084	1,81%	07-23-12-34-34-12-12-23-02-12-23
	Spät	t084	1,81%	07-23-12-34-34-12-12-23-02-12-23
12	Früh	t617	<0,01%	15-21-16-02-24-24
	Spät	t617	<0,01%	15-21-16-02-24-24
13	Früh	t034	1,61%	08-16-02-25-02-25-34-24-25
	Spät	t034	1,61%	08-16-02-25-02-25-34-24-25
14	Früh	t154	<0,01%	04-44-33-31-12-16-34-22-17-25-22-22-34
	Spät	t154	<0,01%	04-44-33-31-12-16-34-22-17-25-22-22-34
15	Früh	t346	0,30%	07-23-12-34-12-12-23-02-12-23
	Spät	t084	1,81%	07-23-12-34-34-12-12-23-02-12-23
16	Früh	t084	1,81%	07-23-12-34-34-12-12-23-02-12-23
	Spät	t084	1,81%	07-23-12-34-34-12-12-23-02-12-23
17	Früh	t056	0,26%	04-20-12-17-20-17-12-17-17
	Spät	t056	0,26%	04-20-12-17-20-17-12-17-17
18	Früh	t078	0,32%	04-21-12-41-20-17-12-12-17
	Spät	t078	0,32%	04-21-12-41-20-17-12-12-17
19	Früh	t084	1,81%	07-23-12-34-34-12-12-23-02-12-23
	Spät	t084	1,81%	07-23-12-34-34-12-12-23-02-12-23
20	Früh	t002	6,79%	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16
	Spät	t002	6,79%	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16
21	Früh	t118	0,01%	11-25
	Spät	t118	0,01%	11-25

Tab. 13 b: *spa*-Typen früher und später Isolate inklusive Frequenzen der Isolate laut Ridom Spa Server und Kennzeichnung von Mutationen der *spa*-Repeats [89]

Patient	Zeitpunkt	<i>spa</i> -Typ	Frequenz	Repeats
22	Früh	t091	0,90%	07-23-21-17-34-12-23-02-12-23
	Spät	t091	0,90%	07-23-21-17-34-12-23-02-12-23
23	Früh	t008	6,27%	11-19-12-21-17-34-24-34-22-25
		t121	0,15%	11-19-21-17-34-24-34-22-25
	Spät	t121	0,15%	11-19-21-17-34-24-34-22-25
24	Früh	t211	0,13%	11-19-12-12-21-17-34-24-34-22-25
	Spät	t211	0,13%	11-19-12-12-21-17-34-24-34-22-25
25	Früh	t012	1,67%	15-12-16-02-16-02-25-17-24-24
		t699	0,1%	15-12-16-02-23-16-02-25-17-24-24
	Spät	t012	1,67%	15-12-16-02-16-02-25-17-24-24
26	Früh	t623	<0,01%	04-20-20-12-17-20-17-12-17-17
	Spät	t623	<0,01%	04-20-20-12-17-20-17-12-17-17
		t056	0,26%	04-20-12-17-20-17-12-17
27	Früh	t012	1,67%	15-12-16-02-16-02-25-17-24-24
	Spät	t021	1,01%	15-12-16-02-16-02-25-17-24
28	Früh	t056	0,26%	04-20-12-17-20-17-12-17-17
	Spät	t2565	0,02%	04-20-12-17-12-17-17-17
29	Früh	t080	0,03%	09-02-16-34-42-17-16-34
	Spät	t080	0,03%	09-02-16-34-42-17-16-34
30	Früh	t091	0,90%	07-23-21-17-34-12-23-02-12-23
	Spät	t085	0,19%	07-23-12-34-34-12-23-02-12-23
31	Früh	t015	1,12%	08-16-02-16-34-13-17-34-16-34
	Spät	t015	1,12%	08-16-02-16-34-13-17-34-16-34
32	Früh	t127	2,17%	07-23-21-16-34-33-13
	Spät	t127	2,17%	07-23-21-16-34-33-13
33	Früh	t166	0,20%	04-44-33-31-12-16-34-16-12-25-22-34
	Spät	t166	0,20%	04-44-33-31-12-16-34-16-12-25-22-34
34	Früh	t709	0,02%	26-23-13-23-31-17-25-17-25-16-28
	Spät	t709	0,02%	26-23-13-23-31-17-25-17-25-16-28
35	Früh	t005	0,66%	26-23-13-23-31-05-17-25-17-25-16-28
	Spät	t005	0,66%	26-23-13-23-31-05-17-25-17-25-16-28
36	Früh	t009	0,10%	11-12-21-17-34-24-34-22-24-34-22-33-25
	Spät	t009	0,10%	11-12-21-17-34-24-34-22-24-34-22-33-25

Tab. 13 c: *spa*-Typen früher und später Isolate inklusive Frequenzen der Isolate laut Ridom Spa Server und Kennzeichnung von Mutationen der *spa*-Repeats [89]

Das durchschnittliche Alter der Patienten zu Beginn unserer Studie lag bei 13,2 Jahren mit einer Altersspanne von 1 bis zu 34,8 Jahren (Median: 10,3 Jahre). Die mittlere Besiedlungsdauer betrug 8,33 Jahre (Median 8,18 Jahre) wobei der kürzeste Zeitraum 5,10 Jahre und der längste 13,56 Jahre betrug. Die Geschlechterverteilung war nahezu ausgewogen mit Isolaten von 17 weiblichen und 19 männlichen Patienten.

	Alter bei frühen Isolat (in Jahren)	Besiedlungsdauer (in Jahren)
Streuung	1,0 – 34,8	5,10 – 13,56
Mittelwert	13,2	8,33
Median	10,3	8,18

Tab. 12: Altersverteilung und Besiedlungsdauer

In dieser Arbeit wurden Isolate mit divergierenden *spa*-Typen am Anfang und am Ende eines Besiedlungszeitraums aus der weiteren Beobachtung ausgeschlossen. Davon wurden Veränderungen der Repeatreihenfolge des *spa*-Lokus ausgenommen, sofern diese durch geringe Mutationen in Form von Deletion, Insertion oder Punktmutation nachzuvollziehen waren. Insgesamt wurden 17 genetische Ereignisse im Bereich des *spa*-Lokus bei Isolaten von zehn Patienten festgestellt. Bei den Patienten 9, 23, 25, 26, 27 und 28 wurden Deletionen und in den Fällen der Patienten 3 und 15 Insertion ganzer Repeats nachgewiesen. In den Analysen der Isolate der Patienten 6, 28 und 30 konnten sieben Punktmutationen festgestellt werden.

Unter Beachtung der Gesamtbesiedlungszeit aller Stämme errechnet sich eine mittlere Dauer von 211,8 Monaten je Mutation (Persistenz aller Stämme in Monaten/ Anzahl genetischer Ereignisse = $3600,12/17 = 211,8$). Je Deletion wurden 450 Monate, je Punktmutation (Substitution) 514,3 Monate und je Insertion 1800 Monate berechnet.

Die bei den Patienten 6, 28 und 30 gefundenen Punktmutationen sind in der folgenden Liste genauer dargestellt:

Patient	Zeitpunkt	<i>spa</i> -Typ	Repeat	Repeatsequenz	Aminosäure
6	Früh	t002	17	AAAGAAGACGGCAACAA GCCTGGT	Phenylalanin
	Spät	t6338	307	AAAGAAGACGGCAACAA CCCTGGT	Leucin
28	Früh	t056	20	AAAGAAGACAACAACAA ACCTGGC	Phenylalanin, Prolin
	Spät	t2565	12	AAAGAAGACAACAACAA GCCTGGT	Phenylalanin, Prolin
30	Früh	t091	21	AAAGAAGACAACAACAAG CCTGGC	Prolin
	Spät	t085	12	AAAGAAGACAACAACAAG CCTGGT	Prolin
	Früh	t091	17	AAAGAAGAC GG CAACAA GCCTGGT	Prolin, Phenylalanin
	Spät	t085	34	AAAGAAGAC AA CAACAA ACCTGGT	Leucin, Phenylalanin

Tab. 14: Veränderung der *spa*-Repeatsequenz bei den Patienten 6, 28 und 30

Weiterhin ist aus den Tabellen 13a bis c ersichtlich, dass es sich bei nur drei der Isolate mit Mutationen im *spa*-Lokus um Veränderungen von mehr als einem Repeat in der *spa*-Region handelt. Maximal haben sich bei den ermittelten Mutationen zwei Repeats geändert. Sie wiesen stets eine Länge von 24bp auf.

Die durchschnittliche Besiedlungsdauer bei Patienten mit Isolaten mit Mutationen im *spa*-Lokus betrug 8,69 Jahre und überschritt damit nur geringfügig den Wert von 8,33 Jahren in der Gesamtgruppe. Streuung (5,10 – 13,19 Jahre) und Median (7,92 Jahre) liegen ebenfalls den Bereichen der Grundgesamtheit sehr nahe (Streuung 5,10 – 13,56 Jahre; Median 8,18 Jahre) und sprechen somit für eine ähnliche Struktur der beiden Gruppen.

4.3 Biofilmmessungen

4.3.1 Allgemein

Alle Isolate wurden, wie in Abschnitt 2.1 beschrieben, nach Koloniegröße und -farbe, Hämolyseverhalten sowie Ausprägung von Betatoxin auf Blut- und Schaedleragar nach 24, bzw. 48h Inkubation beurteilt. Die so differenzierten Isolate der 36 Patienten wurden zur Biofilmmessung nach oben genanntem Protokoll herangezogen. Somit wurde diese Bestimmung bei insgesamt 111 Isolaten (57 frühe und 54 späte Isolate) in jeweils drei Durchgängen á 6 Messungen durchgeführt, sodass die Biofilmmessung eines jeden Isolats durch mindestens 18 Werte repräsentiert wurde. Bei Anzeichen für Kontamination wurden Messungen erneut durchgeführt und den zuvor korrekt gemessenen Werten hinzugefügt.

Weiterhin wurden je Mikrotiterplatte eine Positivkontrolle mit dem Stamm *S. epidermidis* RP62A sowie eine Negativkontrolle mit dem Stamm *S. carnosus* TM300 mitgeführt. Außerdem wurden stets Leerkontrollen, in denen dieselben Färbungen wie bei den zu messenden Isolaten durchgeführt worden waren, sowie Leerkontrollen ohne jegliche Form von Färbung mitbestimmt. Der Mittelwert der bei 655nm bestimmten Extinktion des Stamms RP62A lag bei 1,234 (Median 1,202) mit einem 95%-Konfidenzintervall (KI) von 1,217 bis 1,251. Im Falle von TM300 wurde eine durchschnittliche Extinktion von 0,1501 (Median 0,145) mit einem KI von 0,145 bis 0,155 ermittelt.

Leerkontrollen, in denen Nährmedien ohne Keimzugabe inkubiert und ebenfalls Färbungen mit Kristallviolett vorgenommen wurden, hatten eine durchschnittliche Extinktion von 0,134 (Median 0,129) mit einem 95%-KI von 0,127 und 0,142. Leerkontrollen, in denen keine Flüssigkeiten mitgeführt wurden, ergaben im Mittel eine Extinktion von 0,037 (Median 0,036) mit einem 95%-KI von 0,037 bis 0,038.

Graphisch stellt sich dies wie folgt dar:

	RP62A	TM300	Leerkontrolle inkl. Färbung	Leerkontrolle ohne Färbung
Mittelwert	1,234	0,150	0,135	0,038
Median	1,202	0,145	0,129	0,037
untere Grenze des 95% KI	1,217	0,145	0,127	0,037
obere Grenze des 95% KI	1,251	0,155	0,142	0,038

Tab. 15: Mittelwerte, Mediane und Konfidenzintervall von Pos.- & Neg.-Kontrollen

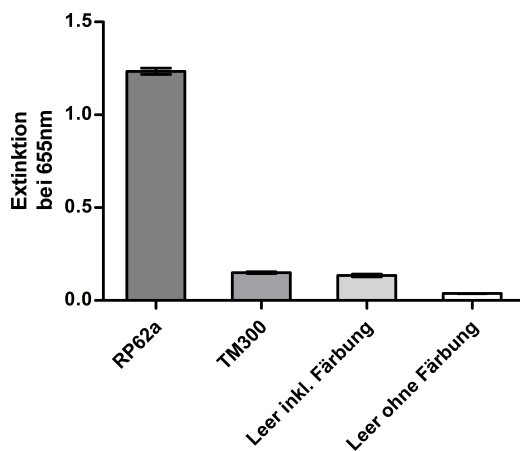


Abb. 08: Extinktion der Kontrollen bei 655n

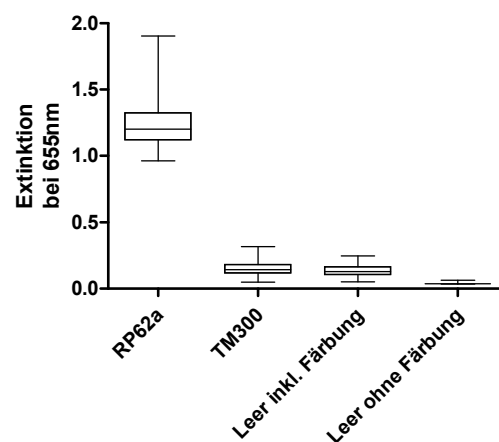


Abb. 09: Boxplot der Extinktionen bei 655nm

Wie anhand der Boxplots in Abbildung 09 erkenntlich, kann es auch zwischen Individuen derselben Bakterienstämme zu äußerst unterschiedlichen Messwerten kommen. Das Minimum unter den Proben des Stamms RP62A lag bei einer Extinktion von 0,965, wobei das Maximum bei einem Wert von 1,904 gemessen wurde. Unter den Isolaten des Stamms TM300 lag der geringste Messwert bei einer Extinktion von 0,049 und der höchste Wert bei 0,317. Innerhalb der Gruppe der ebenfalls mit Kristallviolett gefärbten Leerproben wurde ein Minimum von 0,052 und ein Maximum bei 0,246 ermittelt. Die Leerproben ohne weitere färberische Veränderungen zeigten Werte zwischen 0,034 und 0,063.

Die Konfidenzintervalle aller Mittelwerte der Kontrollen überschneiden sich nicht und mit einem p-Wert von $<0,05$ kann ein überzufälliger Unterschied zwischen allen Ergebnissen angenommen werden.

In ähnlicher Weise unterscheiden sich die Werte auch in der Kohorte der untersuchten Isolate. Das hier gemessene Minimum lag bei einer Extinktion von 0,051 (Isolat Früh 1, Patient 20). Im Gegensatz dazu wurde die maximale Extinktion bei dem Isolat „Spät 1“ des Patienten 24 mit einer Extinktion von 1,578 festgestellt. Der größte intraindividuelle Unterschied zwischen zwei Messergebnissen einer Messreihe wurde bei den Isolaten „Spät“ des Patienten 17 mit einer Differenz von 0,573 in der Extinktion bei 655nm gemessen. Mikroorganismen mit einer geringeren Biofilmproduktion wiesen entsprechend dieser geringeren Ausprägung auch kleinere absolute Differenzen zwischen den einzelnen Messungen auf.

Auf Grund der großen Anzahl an Messungen wird an dieser Stelle lediglich eine graphische Übersicht der Mittelwerte dieser Untersuchung illustriert. Die Isolate zu Beginn der Beobachtungseinheit sind in blau und die zum Ende des Beobachtungszeitraums in rot dargestellt. Diesen folgen in den Kapiteln 3.3.2 bis 3.3.4 Einzelbeispiele der Patienten 11, 16 und 24 mit genauerer Beleuchtung der ermittelten Werte, um eine exemplarische Darstellung für zunehmende, abnehmende und gleichbleibende Biofilmproduktion zu geben.

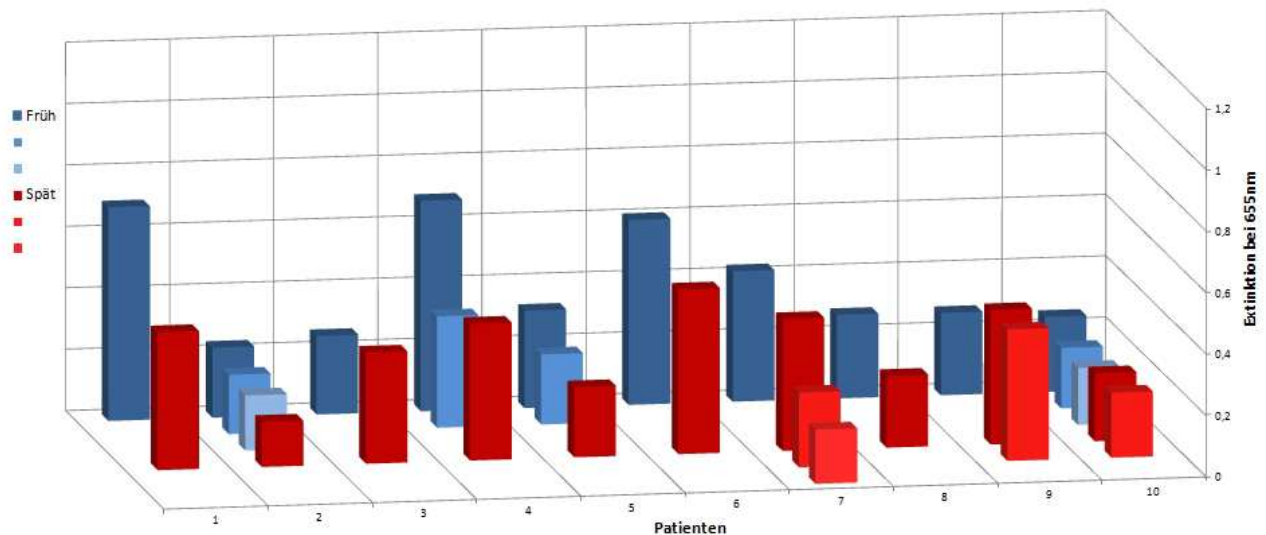


Abb. 10: Biofilmproduktion der Isolate zu Beginn der Beobachtung und nach min. 5 Jahren, Patienten 1- 10

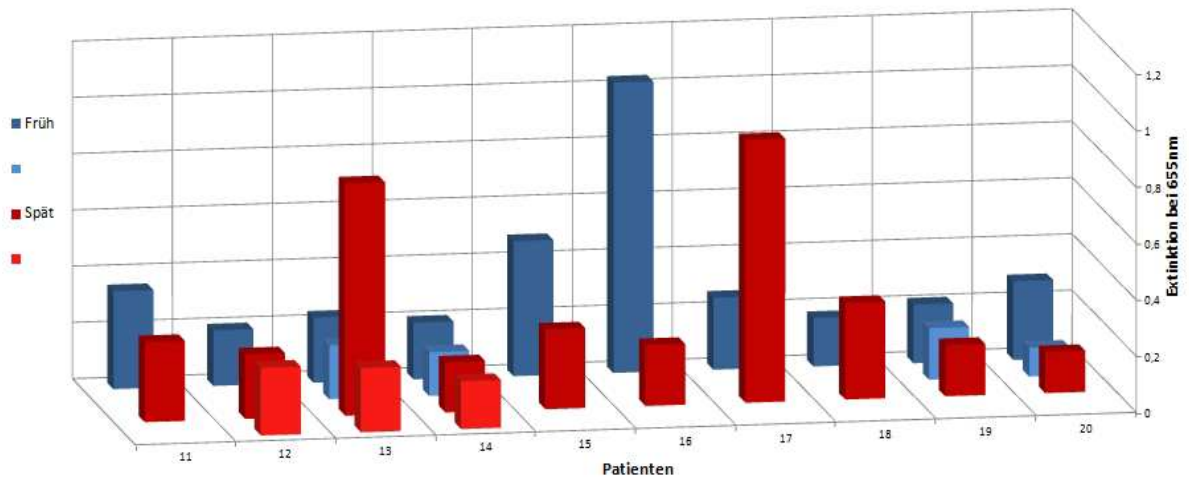


Abb. 11: Biofilmproduktion der Isolate zu Beginn der Beobachtung und nach min. 5 Jahren, Patienten 11-20

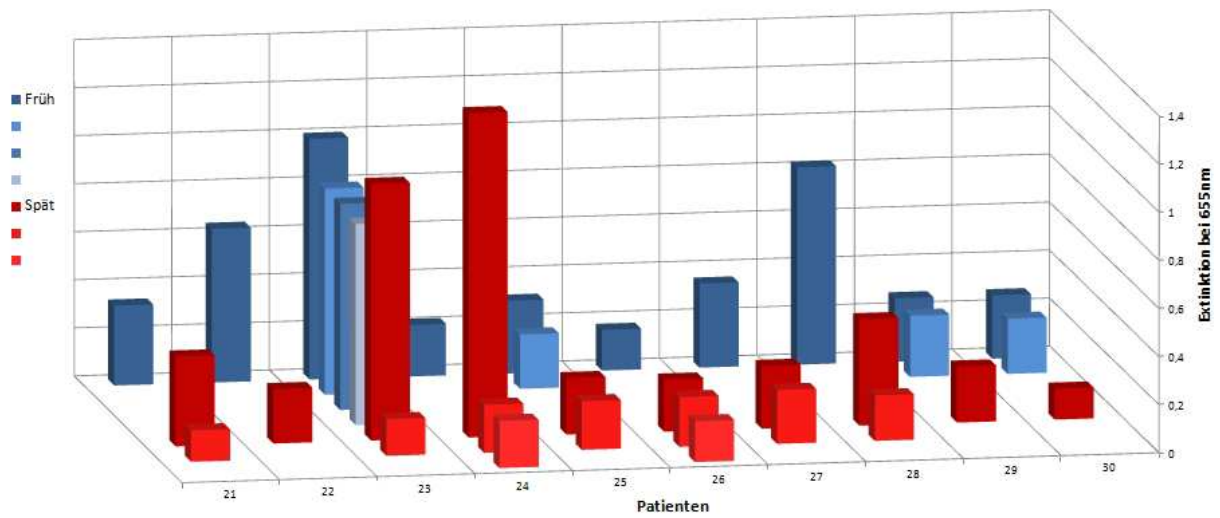


Abb. 12: Biofilmproduktion der Isolate zu Beginn der Beobachtung und nach min. 5 Jahren, Patienten 21 -30

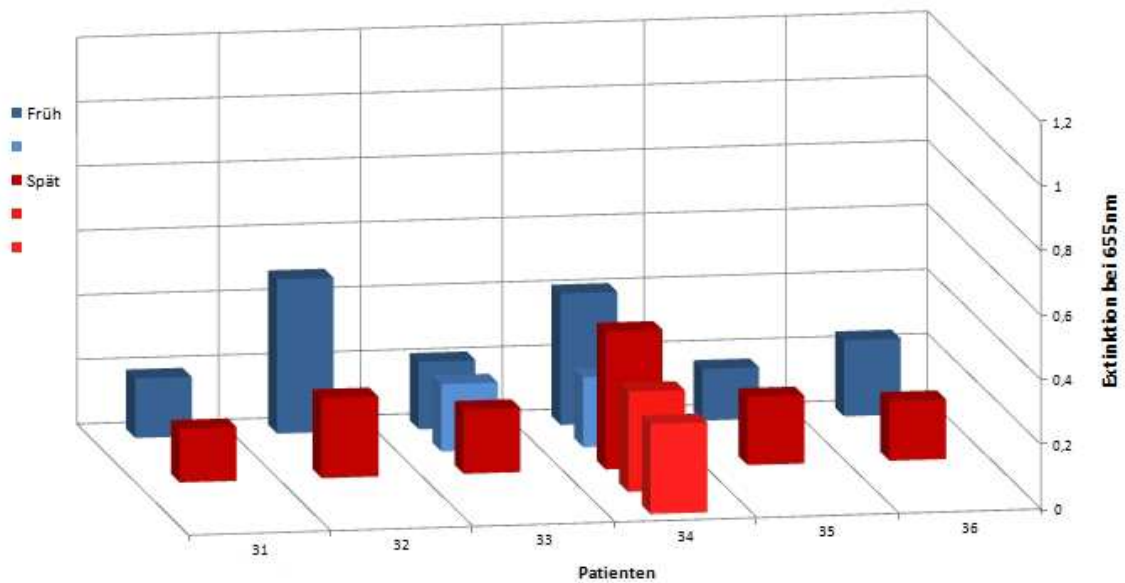


Abb.13: Biofilmproduktion der Isolate zu Beginn der Beobachtung und nach min. 5 Jahren, Patienten 31 -36

In dieser semiquantitativen Analyse zeigte sich, dass die wenigsten *S. aureus*-Stämme unserer Kohorte in der Lage waren, einen ähnlich ausgeprägten Biofilm wie die Positivkontrolle RP62A zu bilden. Von den 111 gemessenen Isolaten zeigten lediglich 4 Isolate eine Extinktion, die >1 lag (Isolate „Früh“ Patient 16; „Früh 5“ Pat. 23; „Spät 1“ Pat. 23; „Spät 1“ Pat. 24). Im Mittel aller Isolate konnte ein Wert von 0,3336 (95% KI 0,2897 – 0,3775) nachgewiesen werden. Der MW der Extinktion aller frühen Isolate liegt bei 0,3530 (95% KI 0,2907 – 0,4153) und aller späten Isolate bei 0,3139 (95% KI 0,2504 – 0,3774). Mittels Grubb's Test konnten keine signifikanten Ausreißer ermittelt werden.

In der Reihe der Biofilmmessungen konnten auf Grund der Verteilung der Isolate 87 Vergleiche zwischen frühen und späten Isolaten gezogen werden. Die Messergebnisse verändert sich in 86 Fällen signifikant. In insgesamt 56 Vergleichen kam es zu einer absoluten Änderung der Extinktion von weniger als 0,2. In 31 Fällen lag die absolute Differenz größer oder gleich 0,2. In 18 dieser Ergebnisse wurde eine Ab- und in 13 eine Zunahme des Biofilms gezeigt. Der Mittelwert der Differenz zwischen frühen und späten Isolaten lag bei -0,041 mit einem Median von -0,015 (95% KI -0,011 – 0,026).

4.3.2 Patient 11

Wie in der oben dargestellten Abbildung 11 wurde bei Patient 11 ein Isolat zu Beginn und eines am Ende des Beobachtungszeitraums untersucht. Der Patient war zum Zeitpunkt der Isolierung der ersten Probe 17,2 Jahre alt und bei Entnahme der späteren 24,3 Jahre (Besiedlungszeitraum: 6,97 Jahre). Die *spa*-Typen entsprechen zu beiden Zeitpunkten dem Typ t084 (07-23-12-34-34-12-12-23-02-12-23).

Bei 655nm wurden je Probe 18 Werte der Biofilmproduktion mit einer durchschnittlichen Extinktion von 0,3478 („Früh“, 95% KI 0,3328 – 0,3628) und 0,2842 („Spät“, 95% KI 0,2622 – 0,3061) ermittelt.

Bei dem *S. aureus*-Stamm, der zu Beginn des Beobachtungszeitraums von 6,97 Jahren isoliert wurde, lag das gemessene Minimum der Biofilmproduktion bei 0,286 und das Maximum bei 0,4150 (Differenz: 0,129). Die im Boxplot ersichtlichen 25%- und 75%-Perzentilen wurden bei 0,3265 und 0,3655 mit einem Median bei 0,349 ermittelt. Eine Standardabweichung von 0,0301 konnte errechnet werden.

Die entsprechenden Werte für das Isolat „Spät“ wurden mit einem Minimum von 0,2240, einem Maximum von 0,3560, einer 25%-Perzentile von 0,2398, einer 75%-Perzentile von 0,3235 und einem Median von 0,288 gemessen. Die Standardabweichung betrug 0,0441. Dies stellt sich graphisch wie folgt dar:

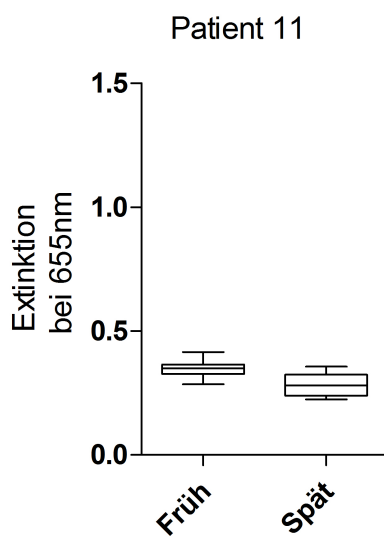


Abb. 14: Boxplot Patient 11

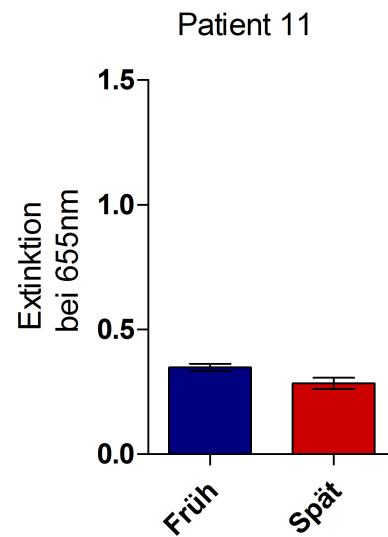


Abb. 15: Säulendiagramm Patient 11

Wert	Früh	Spät
1	0,329	0,224
2	0,353	0,232
3	0,415	0,244
4	0,358	0,241
5	0,353	0,236
6	0,344	0,226
7	0,319	0,275
8	0,308	0,270
9	0,364	0,279
10	0,370	0,318
11	0,345	0,290
12	0,318	0,281
13	0,332	0,351
14	0,286	0,322
15	0,343	0,328
16	0,376	0,356
17	0,364	0,336
18	0,383	0,306
Mittelwert	0,3478	0,2842
Median	0,3490	0,2800
Minimum	0,2860	0,2240
Maximum	0,4150	0,3560
25%-Perzentile	0,3265	0,2398
75%-Perzentile	0,3655	0,3235
Standardabweichung	0,03019	0,04417

Tab. 16: Messwerte und statistische Auswertung der Isolate „Früh“ und „Spät“ des Pat. 11

Der errechnete p-Wert von <0.05 spricht dafür, dass sich diese beiden Messreihen überzufällig voneinander unterscheiden. In diesem Beispiel kam es zu einer Abnahme der Biofilmproduktion.

Bei Patient 11 lag zu keinem der beiden Entnahmekzeitpunkte oder in den vorhergegangenen 6 Monaten ein Nachweis von *P. aeruginosa* oder *B. cepacia* vor.

4.3.3 Patient 16

Zum Zeitpunkt der Isolierung der Probe „Früh“ war der Patient 8,3 Jahre alt und 18,6 Jahre bei Isolat „Spät“ (Besiedlungsdauer: 10,3 Jahre). Beide wiesen den *spa*-Typ t084 (07-23-12-34-34-12-12-23-02-12-23) auf.

Bei 655nm wurden je Probe 18 Werte der Biofilmproduktion mit einer durchschnittlichen Extinktion von 1,0323 („Früh“, 95% KI 0,9796 – 1,085) und 0,2161 („Spät“, 95% KI 0,1983 – 0,2338) ermittelt.

Bei dem *S. aureus*-Stamm, der zu Beginn des Zeitraums von 10,31 Jahren isoliert wurde, lag das gemessene Minimum der Biofilmproduktion bei 0,914 und das Maximum bei 1,229 (Differenz: 0,415). Die im Boxplot ersichtlichen 25%- und 75%-Perzentilen wurden bei 0,9360 und 1,106 mit einem Median bei 1,016 ermittelt. Eine Standardabweichung von 0,1061 konnte errechnet werden.

Das Minimum für das Isolat „Spät“ lag bei einer Extinktion von 0,1590, das Maximum bei 0,2770, die 25%-Perzentile bei 0,1895, die 75%-Perzentile bei 0,2348 und der Median bei 0,214. Die Standardabweichung betrug 0,0356. In den folgenden Graphiken werden diese Ergebnisse zusammengefasst.

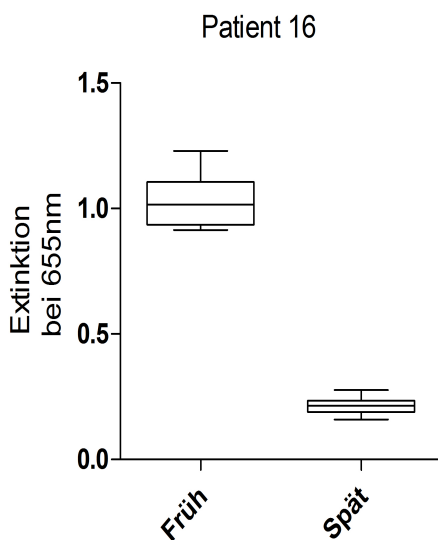


Abb. 16: Boxplot Patient 16

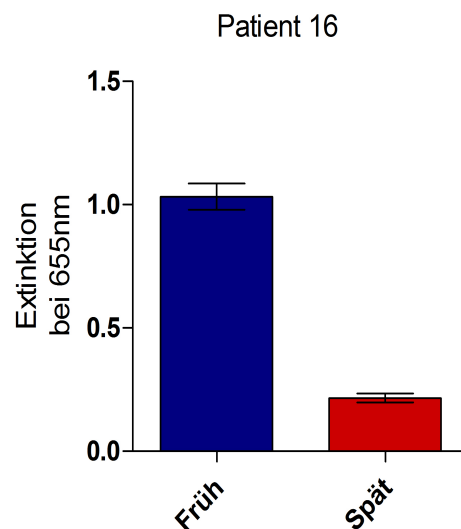


Abb. 17: Säulendiagramm Patient 16

Wert	Früh	Spät
1	0.916	0.215
2	0.949	0.161
3	0.948	0.188
4	1.060	0.199
5	0.967	0.159
6	0.937	0.170
7	1.101	0.233
8	1.228	0.224
9	1.072	0.190
10	1.177	0.232
11	1.229	0.267
12	0.914	0.212
13	0.929	0.240
14	1.041	0.204
15	1.120	0.229
16	0.991	0.213
17	1.070	0.277
18	0.933	0.276
Mittelwert	1,032	0,216
Median	1,016	0,214
Minimum	0,914	0,159
Maximum	1,229	0,277
25%-Perzentile	0,936	0,189
75%-Perzentile	1,106	0,234
Standardabweichung	0,106	0,035

Tab. 17: Messwerte und statistische Auswertung der Isolate „Früh“ und „Spät“ des Pat. 16

Der errechnete p-Wert von <0.05 spricht dafür, dass sich diese beiden Messreihen überzufällig voneinander unterscheiden.

Bei diesem Patient konnte zum Zeitpunkt der Isolierung der frühen Probe keine Ko-Besiedlung mit den Keimen *P. aeruginosa* oder *B. cepacia* festgestellt werden. Jedoch wurden seit ca. drei Jahren vor Ende des Beobachtungszeitraums mehrmals jährlich Isolate mit normalen, sowie schleimigen Isolaten von *P. aeruginosa* nachgewiesen. *B. cepacia* wurde zum Ende der Beobachtung nicht isoliert.

4.3.4 Patient 24

Bei Patient 24 wurden vier Isolate differenziert, wovon eines zu Beginn des Beobachtungszeitraumes und drei danach unterschieden wurden. Zum Zeitpunkt der Isolierung der Probe „Früh“ war der Patient 29 Jahre alt und 37,4 Jahre bei Isolat „Spät“ (Besiedlungsdauer: 8,45 Jahre). Bei allen Isolaten wurde der *spa*-Typ t211 (11-19-12-12-21-17-34-24-34-22-25) nachgewiesen. Bei 655nm wurden je Probe 18 Werte der Biofilmproduktion ermittelt, die eine durchschnittliche Extinktion von 0,2145 („Früh“, 95% KI 0,1959 – 0,2331) und 1,3485 („Spät 1“, 95% KI 1,295 – 1,402), 0,1962 („Spät 2“ 95% KI 0,1649 – 0,2275) sowie 0,1996 („Spät3“, 95% KI 0,1696 – 0,2295) zeigten. Bei dem *S. aureus*-Stamm, der zu Beginn des Zeitraums von 8,45 Jahren isoliert wurde, lag das gemessene Minimum der Biofilmproduktion bei 0,1530 und das Maximum bei 0,2960 (Differenz: 0,143). Die 25%- und 75%-Perzentilen wurden bei 0,1870 und 0,2440 mit einem Median bei 0,2090 ermittelt. Eine Standardabweichung von 0,0374 konnte errechnet werden. Bei dem Isolat „Spät 1“ konnte ein Minimum von 1,187, ein Maximum von 1,578, eine 25%- und 75%-Perzentile bei 1,281 sowie 1,422 und ein Median von 1,309 bestimmt werden. Die Standardabweichung beträgt 0,1068. Für die Probe „Spät 2“ lag der geringste gemessene Wert bei 0,108, der höchste bei 0,3380, die 25%-Perzentile bei 0,1565 und die 75%-Perzentile bei 0,2360. Der Median wurde mit einer Extinktion von 0,1720 ermittelt und die Standardabweichung von 0,0629 errechnet. Das Minimum der Probe „Spät 3“ wurde bei 0,11, das Maximum bei 0,305, die 25%-Perzentile bei 0,1543, die 75%-Perzentile bei 0,2633 und der Median bei einem Wert von 0,1855 ermittelt. Die Standardabweichung beträgt 0,0601.

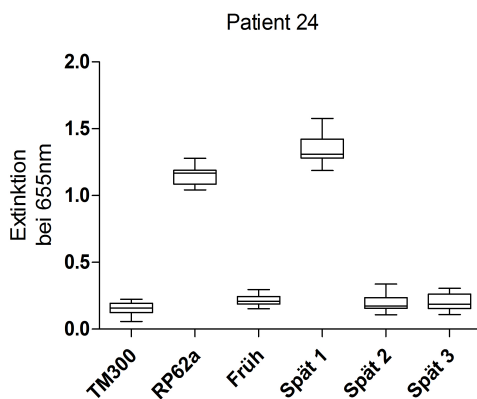


Abb. 18: Boxplot Patient 24

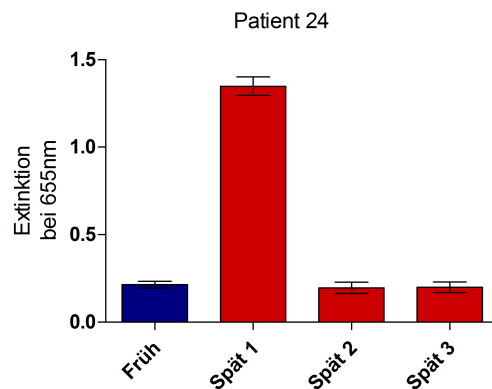


Abb. 19: Säulendiagramm Patient 24

Wert	Früh	Spät 1	Spät 2	Spät 3
1	0.153	1.282	0.155	0.110
2	0.179	1.305	0.149	0.116
3	0.162	1.313	0.186	0.143
4	0.233	1.390	0.177	0.173
5	0.240	1.256	0.158	0.208
6	0.296	1.187	0.158	0.245
7	0.181	1.456	0.108	0.163
8	0.229	1.416	0.142	0.170
9	0.211	1.398	0.167	0.170
10	0.205	1.285	0.225	0.131
11	0.256	1.425	0.184	0.198
12	0.256	1.421	0.160	0.158
13	0.189	1.276	0.157	0.271
14	0.259	1.578	0.269	0.229
15	0.216	1.511	0.218	0.305
16	0.191	1.300	0.269	0.261
17	0.198	1.188	0.312	0.270
18	0.207	1.286	0.338	0.271
Mittelwert	0,2145	1,349	0,1962	0,1996
Median	0,2090	1,309	0,1720	0,1855
Minimum	0,1530	1,187	0,1080	0,1100
Maximum	0,2960	1,578	0,3380	0,3050
25%-Perzentile	0,1870	1,281	0,1565	0,1543
75%-Perzentile	0,2440	1,422	0,2360	0,2633
Standardabweichung	0,0374	0,1068	0,0629	0,0601

Tab. 18: Messwerte und statistische Auswertung der Isolate „Früh“ und „Spät“ des Pat. 24

Der errechnete p-Wert von <0.05 zwischen den Messreihen „Früh“ und „Spät 1“ spricht dafür, dass sich diese beiden überzufällig voneinander unterscheiden. Der p-Wert zwischen den Isolaten „Früh“ und „Spät 2“ liegt bei 0,305 und spricht daher nicht für einen signifikanten Unterschied zwischen den Ergebnissen. Der t-Test zwischen „Früh“ und „Spät 3“ ergab 0,3124 und trifft damit die gleiche Aussage. Zwischen den Isolaten „Spät 1“ und „Spät 2“ sowie „Spät 3“ kann von einem überzufälligen Unterschied gesprochen werden (jeweils $p < 0,05$). Die Isolate „Spät 2“ und „Spät 3“ unterscheiden sich nicht signifikant ($p = 0,8719$).

Bei dem Patient konnte zu keinem Zeitpunkt der Isolierung eine Ko-Besiedlung mit *P. aeruginosa* oder *B. cepacia* festgestellt werden.

4.3.5 Statistische Auswertung der Biofilmmessung

Die oben dargestellten Ergebnisse der Biofilmmessung wurden auf Korrelationen mit ermittelten Merkmalen der Stämme untersucht. Der Einfluss von Geschlecht der Probanden, *cap*- und *agr*-Typen, sowie Besiedlungsdauer auf den Biofilm wird in folgender Tabelle gezeigt:

Parameter	Differenz der Biofilmmessung	Konfidenzintervall Untergrenze	Konfidenzintervall Obergrenze	p-Wert
Geschlecht männlich	-0,06998	-0,124350	0,110355	0,904
Geschlecht weiblich	0	0	0	0
<i>cap</i> 5	-0,13147	-0,152782	0,126488	0,849
<i>cap</i> 8	0	0	0	0
<i>agr</i> negativ	-0,54649	-0,310760	0,201462	0,669
<i>agr</i> I	0,092788	-0,65121	0,250696	0,24
<i>agr</i> II	0,124154	-0,022962	0,271290	0,95
<i>agr</i> III	0	0	0	0
Besiedlungsdauer	-0,10735	-0,039114	0,017644	0,452

Tab. 19: Korrelation zwischen Biofilmergebnissen & Geschlecht/*cap*/*agr*/Besiedlungsdauer

Die hier aufgeführten Werte zeigen die statistische Differenz der Biofilmmessung bei Ausprägung der verschiedenen Merkmale. Dabei wird immer eine der Merkmalsausprägungen als Referenz 0 angegeben. Die bei dem/den anderen Merkmal angegebene Zahl stellt die Differenz der Biofilmwerte unter Variation des betrachteten Merkmals bei gleichbleibenden restlichen Merkmalen dar.

Die Differenz der Biofilmmessung zwischen Isolaten männlicher und weiblicher Patienten liegt bei -0,06998 (95% Konfidenzintervall -0,124350 bis 0,110355) und zeigt mit einem p-Wert von 0,904, dass dieser Unterschied mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf Grund verschiedener Geschlechter bedingt ist. Die gleiche Aussage kann im Bezug auf die Ausprägung des Biofilms bei verschiedenen Kapseltypen mit einem p-Wert von 0,849 getroffen werden. Es konnte weiterhin keine signifikante Differenz der Biofilm-

produktion zwischen den Ausprägungen der *agr*-Typen festgestellt werden (p-Wert 0,669, 0,24 und 0,95)

Anhand eines p-Wertes von 0,452 kann mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass weder die Besiedlungsdauer noch die anderen analysierten Merkmale einen Einfluss auf die Produktion des Biofilms von *S. aureus* bei CF-Patienten aufweisen.

4.4 Ko-Besiedlung mit *P. aeruginosa* und *B. cepacia*

Neben den in dieser Gruppe isolierten *S. aureus*-Stämmen wurden die verwendeten Rachenabstriche und Sputa ebenfalls standardmäßig auf das Vorkommen weiterer Keime untersucht. Wir erfassten die Ko-Besiedlung durch *P. aeruginosa* und *B. cepacia* sofern diese gleichzeitig zum Zeitpunkt der Isolierung der untersuchten Proben oder in den davorliegenden sechs Monaten vorkamen. Aus der Kohorte von 36 Patienten konnten gleichzeitige Nachweise der beiden oder einer der beiden Bakterienstämme bei 14 Patienten dokumentiert werden. Davon wurde bei lediglich fünf Probanden zum Anfang des Besiedlungszeitraums eine Ko-Besiedlung nachgewiesen. Hier wurde ausschließlich *P. aeruginosa* isoliert. Dahingegen konnte bei insgesamt 13 Patienten mindestens einer der beiden Keime nach dem Intervall von mindestens fünf Jahren gezeigt werden. In neun Fällen lag ausschließlich *P. aeruginosa*, in einem nur *B. cepacia* vor und in drei Fällen konnten beide isoliert werden.

Durch die Biofilmdaten wurde eine statistische Differenz zwischen *P. aeruginosa*-positiven und -negativen Patienten mit einem Unterschied der Extinktion von lediglich -0,06467 (95% Konfidenzintervall von -0,193375 bis 0,064035) ermittelt. Durch den errechneten p-Wert von 0,2715 kann ein Einfluss durch die Ko-Besiedlung mit *P. aeruginosa* auf die Biofilmproduktion mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Bei einer Differenz der Extinktion von -0,047298 in der Biofilmmessung (Konfidenzintervall -0,176717 bis 0,271513) zwischen Isolaten von Patienten mit einer zusätzlichen Besiedlung durch *B. cepacia* spp. und einem p-Wert von 0,452 liegt mit großer Wahrscheinlichkeit kein Einfluss auf die Biofilmproduktion durch eine Ko-Besiedlung mit diesen Stämmen vor.

5 Diskussion

S. aureus war in Zeiten der prä-antibiotischen Ära ein häufiger Grund für den Tod von CF-Patienten. Nach wie vor stellt dieser Mikroorganismus das am häufigsten nachgewiesene Pathogen junger Mukoviszidosepatienten dar. Obwohl es mit fortschreitendem Lebensalter immer mehr durch *P. aeruginosa* verdrängt wird, kann es bei bis zu 40% der Erwachsenen in Form einer Kolonisierung oder Infektion nachgewiesen werden [28, 46, 106].

Bis jetzt fehlen jedoch besonders Studien, die Eigenschaften von *S. aureus*-Stämmen und deren Veränderungen über größere Nachweiszeiträume beschreiben. Während lange Zeit angenommen wurde, dass die isolierten Stämme meist nur intermittierend auftraten, konnte u.a. in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich ein *S. aureus*-Klon gegen andere durchsetzt und trotz antibiotischer Interventionen über Jahre persistiert [48].

Veränderungen des Phänotyps und des Genotyps von *S. aureus* während Längzeitbesiedlung/-infektion bei Mukoviszidosepatienten sind noch kaum aufgeklärt. Die Forschung im Bereich anderer CF-relevanter Organismen wie *P. aeruginosa* zeigte jedoch gravierende Einflüsse starker Biofilmbildner auf die Patientengesundheit und begründet damit den hohen Stellenwert der Aufklärung ähnlicher Mechanismen bei *S. aureus*.

5.1 Alter der Patientengruppe und durchschnittliche Nachweisdauer

Mit Hilfe der äußerst großen Patientendatenbank aus zwei Zentren gelang es uns, die in dieser Studie untersuchte Gruppe unter der Voraussetzung eines jährlichen *S. aureus*-Nachweises über mindestens fünf Jahre zu identifizieren. Aus den zur Verfügung stehenden Daten von 204 Patienten konnten wir 71 Individuen (34,8%) ermitteln, die diesen Kriterien gerecht wurden und somit zumindest einen dauerhaften Nachweis von *S.*

aureus in den tiefen Atemwegen aufwiesen, was die kontinuierliche Natur der Interaktion zwischen Wirt und Bakterienstamm verdeutlicht [33].

Die weite Altersspanne der Probanden (1 – 34,8 Jahre) mit einem Mittelwert von 13,2 Jahren (Median 10,3 Jahren) wurde bereits in anderen Untersuchungen zum Langzeitnachweis von *S. aureus* bei CF-Patienten in ähnlicher Form vorgefunden [48, 49] und spiegelt die bekannten Nachweiszeitpunkte des Erregers bei Mukoviszidose im Allgemeinen wider [28]. Mit Hilfe der oben diskutierten PCR-Arbeitsschritte waren wir außerdem in der Lage zu demonstrieren, dass mindestens 50% der Patienten mit einem chronischen *S. aureus*-Nachweis nur von einem Klon kolonisiert waren. Weiterhin gelang es, eine mittlere Persistenz klonaler oder eng verwandter Stämme von über acht Jahren zu dokumentieren, während andere Studien i.d.R. weit niedrigere durchschnittliche Nachweisperioden verzeichneten [48, 50]. Dabei ist besonders interessant, dass unsere Ergebnisse deutlich über den als Einschlusskriterium formulierten fünf Jahren liegen (Streuung 5,1 – 13,56 Jahre, MW 8,33 Jahre, Median 8,18 Jahre). Wir nehmen an, dass langzeitpersistierende Stämme besondere adaptive Fähigkeiten oder womöglich präformierte Eigenschaften besitzen, die diese lange Interaktion ermöglichen.

Leider konnten wir unsere Daten nur retrospektiv erheben. Für die Ermittlung möglicher Einflussfaktoren, die Langzeitnachweise begünstigen, wären in Zukunft prospektive Ansätze von Vorteil.

5.2 *cap*- und *agr*-Bestimmung

Wie von Goerke et al. vorgeschlagen [34], verwandten wir die Bestimmung der Kapsel- und *agr*-Typen als praktikable Methode der Präselektionierung der großen Gruppe an frühen und späten Isolaten aller 71 Patienten. Wie im Methoden- und Ergebnisteil erwähnt, beschränkten wir uns allerdings auf die Bestimmung der *agr*-Typen I-IV ohne Identifizierung weiterer Subgruppen. In einem vorhergegangenen Schritt ermittelten wir den *cap* -Typ von insgesamt 229 Isolaten (inkl. Früh und Spät). Hiermit konnte eine erste Vorauswahl getroffen werden, da Kapseltypen stets mit einem durch PFGE bestimmten Genomtypen (GT) übereinstimmen [34, 56]. Im Umkehrschluss folgerten wir daher, dass divergierende *cap*-Typen am Anfang und Ende eines Besiedlungszeitraums

nicht klonal, bzw. nicht vom selben *spa*-Typen (Klon) stammen würden. Das Verhältnis von 141 *cap* 8 positiven (62%) zu 88 *cap* 5 positiven (38%) Isolaten zeigte sich im weiteren Verlauf der Studie weitestgehend stabil. Nach Korrelation übereinstimmender *agr*-Typen konnte eine Ratio von 73:44 *cap* 8- zu *cap* 5-positiven Isolaten (63% zu 37%) ermittelt werden. Innerhalb der Patientengruppe mit Isolaten des gleichen *spa*-Typen zu Beginn und am Ende der Beobachtungszeit wiesen Isolate von 23 Patienten den Kapseltyp 8 und von 12 den Typ 5 (64% zu 36%) auf. Hiermit demonstrieren wir mittels PCR der *cap*-Region, dass das Verhältnis der verschiedenen Kapseltypen von *S. aureus* bei Mukoviszidosepatienten auch über große Besiedlungszeiträume konstant ist. In der einleitend genannten Studie von Goerke et al. zeigte sich bei den *S. aureus*-Isolaten einer inhomogenen Gruppe (CF-Patienten, Wundinfektionspatienten, intubierte Patienten und gesunde Kontrollen) ebenfalls ein ähnliches Verhältnis (*cap* 8-positiv: 137 Isolate [60%] und *cap* 5-positiv: 82 Isolate [40%]) [34]. Vergleichbare Resultate wurden auch bei *S. aureus*-Isolaten von Osteomyelitispatienten bestätigt (*cap* 8-positiv 59,7% und *cap* 5-positiv 40,3%) [63]. Daher kann aus der Zusammenschau der Ergebnisse angenommen werden, dass die Verteilung dieser genetischen Information innerhalb der bei Menschen nachgewiesenen *S. aureus*-Stämme typisch ist.

Die in unserem zweiten Arbeitsschritt angewandte *agr*-Analyse zeigte einen besonders häufigen Nachweis von *agr*-Typ I (79 von 170 $\hat{=}$ 46,5%) sowie *agr*-Typ III (50 von 170 $\hat{=}$ 29,4%). Dieser Trend bestätigte sich im Folgenden weiterhin, sodass bei der Korrelation übereinstimmender früher und später *agr*-Typen die Gruppe I bei 61 von 117 (52,1%) und III bei 38 von 117 Isolate (32,5%) nachweisbar waren. Innerhalb der Isolate des gleichen *spa*-Typs ermittelten wir 16 *agr* I- (45,7%) und 11 *agr* III-positiv Isolate (31,5%). Eine solch starke Ausprägung wurde bisher nicht in anderen uns bekannten Arbeiten beschrieben. Doch bleibt zu diskutieren, ob es sich hier wirklich um ein spezifisches Merkmal langzeitnachweisbarer *S. aureus*-Stämme oder womöglich um eine Besonderheit CF-besiedelnder Staphylokokken handelt. Der seltenere Nachweis der *agr*-Typen II und IV stellt hingegen eine in den meisten Ergebnissen anderer Studien wiederzufindende Konstante dar [17, 32, 34]. Weitere Erkenntnisse im Bereiche der CF-Forschung könnten einen Aufschluss über diesen Sachverhalt bieten.

Sowohl *cap*- als auch *agr*-Analysen bestätigten für sich genommen am ehesten bekannte Verteilungsmuster dieser Merkmale. Wir konnten ein überzufälliges gemeinsames

Auftreten mit Hilfe des χ^2 -Tests ($p < 0,05$) der *cap*- und *agr*-Typen nachweisen. Die Ergebnisse von Goerke et al., die Isolate verschiedener Patientengruppen und Kontrollen (s.o.) isolierten, wurden hier zur besseren Veranschaulichung tabellarisch erfasst und unseren Ergebnissen gegenübergestellt [34]:

	<i>agr</i> I	<i>agr</i> II	<i>agr</i> III	<i>agr</i> IV	Gesamt
<i>cap</i> 5	40 (23,5%)	13 (7,6%)	-	-	53 (31,1%)
<i>cap</i> 8	39 (22,9%)	22 (12,9%)	50 (29,4%)	6 (3,5%)	117 (68,7%)
Gesamt	79 (46,4%)	35 (20,5%)	50 (29,4%)	6 (3,5%)	170

Tab. 20: Häufigkeiten von *cap*- und *agr*-Typen vor Korrelation übereinstimmender früher & später Ergebnisse

	<i>agr</i> I	<i>agr</i> II	<i>agr</i> III	<i>agr</i> IV	Gesamt
<i>cap</i> 5	30 (15,3%)	37 (18,9%)	-	-	67 (34,2%)
<i>cap</i> 8	45 (23%)	34 (17,3%)	36 (18,4%)	14 (7,1%)	129 (65,8%)
Gesamt	75 (38,3%)	71 (36,2%)	36 (18,4%)	14 (7,1%)	196

Tab. 21: Zusammenfassung von Goerke et al. [34]

Im Vergleich der Ergebnisse erkennt man in beiden Fällen die Dominanz des Nachweises von *cap* 8 in Verbindung mit *agr* III, wobei unsere Arbeit auch eine stärkere Asymmetrie zu Gunsten der *agr*-Typen I und III im Allgemeinen aufweist. Nach Korrelation übereinstimmender *agr*-Typen von Isolaten am Anfang und Ende des Besiedlungszeitraums bildet sich dieser Effekt noch deutlicher aus und wird besonders durch

die Kombinationen aus *cap* 5 + *agr* I (36/117 $\hat{=}$ 30,8%) und *cap* 8 + *agr* III (38/117 $\hat{=}$ 32,5%) getragen. Dies zeigte sich in ähnlicher Weise in der Analyse von Isolaten chronischer Osteomyelitis [56]. Somit kann aus unseren Daten geschlossen werden, dass ein gemeinsames Auftreten der Gene für Kapseltyp 5 + *agr* I sowie Kapseltyp 8 + *agr* III innerhalb der *S. aureus*-Population gehäuft vorliegt. Im Besonderen scheinen Stämme, die über ausgedehnte Zeiträume nachweisbar sind, dieser Verteilung zu entsprechen.

5.3 *spa*-Typen und Mutationen des *spa*-Lokus

Die Atemwege von CF-Patienten stellen ein Habitat mit selektionierenden Faktoren wie Sauerstoffmangel, einem beschränkten Nährstoffangebot, eingeschränkter Clearance, etc. dar. Diese Voraussetzungen unterscheidet die Lunge eines Menschen mit Zystischer Fibrose maßgeblich von der eines gesunden Individuums. Die genetische Variabilität von *S. aureus*-Stämmen der Lunge von Mukoviszidosepatienten übersteigt die von Stämmen gesunder Patienten bei Weitem [35]. Diese Vielfalt ergibt sich unter anderem aus akkumulierenden Mutationen über lange Besiedlungsperioden, was wir auch in dieser Arbeit darstellen konnten.

In mehreren Studien war es möglich nachzuweisen, dass bei CF-Patienten über mehrjährige Besiedlungszeiträume am ehesten klonale Stämme isoliert werden, wobei geringfügige genetische Veränderungen bestehen können. Andere Klone werden in der Regel nur intermittierend gefunden [11, 48, 103]. Daher leiteten wir die Annahme ab, dass Stämme des gleichen oder nur minimal veränderten *spa*-Typen am Anfang und Ende eines Besiedlungszeitraums eine Persistenz des Organismus über diese Periode bedeuten.

Die genetischen Veränderungen von *S. aureus* über kontinuierliche Nachweiszeiträume zeigten stets ähnliche Mutationsmechanismen. In einer Querschnittsstudie von Goerke et al. wurden Deletionen häufiger als Insertionen oder Substitutionen gefunden [35]. 2005 machten Kahl et al. eine ähnliche Beobachtung und leiteten eine Mutationsrate der *spa*-Region von 70 Monaten je Mutation ab. Nach 93 Monaten findet laut ihrer Veröffentlichung durchschnittlich eine Deletion oder Duplikation und alle 280 Monate eine Punktmutation statt [50]. Dieses Verhältnis der Genveränderungen zueinander erklärt

sich durch „slipped strand mispairing“ (SSM) und ist mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls der Grund für das gehäufte Auftreten von Deletion/Insertionen im Verhältnis zu Punktmutationen in unseren Ergebnissen. Wir ermittelten jedoch wesentlich größere Zeiträume je Mutation (211,8 Monate pro Mutation, 450 Monate pro Deletion, 514,3 Monate je Substitution und 1800 Monate je Insertion). Diese sind nicht durch größere Besiedlungszeiträume der Isolate mit Mutationen im *spa*-Lokus erklärbar. Sie betragen im Mittel 8,69 Jahre (Median: 7,92 Jahre) im Vergleich zu 8,33 Jahren (Mittelwert: 8,18 Jahre) aller untersuchten Stämme, sodass wir damit von einer repräsentativen Mutationsrate ausgehen können. Mit unseren Daten kann eine Lücke zwischen Erkenntnissen anderer Studien, die auch bei längeren Beobachtungen keine Mutation der *spa*-Region feststellten [30, 95] und der oben genannten Ergebnisse geschlossen werden. Unsere Resultate entsprechen am ehesten den bekannten Qualitäten der *spa*-Typisierung, die sich durch eine starke Diskriminierungsfähigkeit wegen hoher Kurzzeitstabilität der *spa*-Region bei gegebener Langzeitvariabilität auszeichnet. Es muss einschränkend erwähnt werden, dass in dieser Untersuchung weitere Einflussfaktoren wie zum Beispiel Antibiotikatherapien nicht analysiert wurden. Außerdem untersuchten wir ausschließlich Isolate am Anfang und am Ende eines Beobachtungszeitraums. Wir konnten so zwar das Ergebnis der Mutationen der sich durchsetzenden Stämme sehen, jedoch ist es nicht möglich, eine Aussage über gegebenenfalls zwischenzeitliche genetische Veränderungen zu treffen. Parallel auftretende und über längere Zeit nicht überlebende Stämme konnten daher nicht identifiziert werden. Diese Unterrepräsentation kann durch die geringe Anzahl an untersuchten Isolationszeitpunkten verstärkt werden. Aus diesen Gründen sollte die von uns ermittelte Mutationsrate als ein Minimum an Mutationen innerhalb der Region X des Protein A angesehen werden. Im Bezug auf andere Abschnitte des *S. aureus*-Genoms soll hier darauf aufmerksam gemacht werden, dass der analysierte Genabschnitt für keine funktionellen Anteile von SpA kodiert. Es ist daher anzunehmen, dass andere Bereiche des Genoms unter höherem Selektionsdruck stehen und deswegen höhere Mutationsraten aufweisen. Wiederum können die von uns ermittelten Ergebnisse daher am ehesten als basale Mutationsrate angesehen werden.

Die seltener vorkommenden Punktmutationen waren in unserer Studie immer Substitutionen. Die Länge der betroffenen Repeats lag stets bei 24bp und Veränderungen dieser Sequenzen führte in allen Fällen zu Mutationen ohne Änderung der Polarität der kodier-

ten Aminosäuren. Der Großteil dieser Mutationen war synonym. Damit bestätigen unsere Ergebnisse jene anderer Arbeitsgruppen, welche am ehesten eine neutrale Evolution feststellten. Es ist damit ein weiteres Indiz für den geringen Selektionsdruck dieses Locus [50, 55] und steht im Kontrast zu den wesentlich mutationsträchtigeren Bereichen virulenzkodierender Gene [70].

Wir konnten in dieser Arbeit keinen Zusammenhang zwischen *spa*-Typen oder Veränderungen des *spa*-Locus mit einer Ko-Besiedlung durch *P. aeruginosa* oder *B. cepacia* ermitteln. Bei dieser Aussage ist zu beachten, dass auch eine bestehende statistische Korrelation auf Grund der großen Anzahl verschiedener *spa*-Typen bei verhältnismäßig geringer Anzahl der Beobachtungseinheit (n=36) nur sehr unwahrscheinlich zu erkennen wäre. Allerdings konnte bisher in anderen Langzeitstudien ebenfalls kein Einfluss anderer Merkmale wie Gesundheitszustand der Patienten, phänotypische Varianten oder Antibioigrammergebnisse auf die Ausprägung einzelner *spa*-Typen gefunden werden [50]. Wir nehmen daher unter oben genannter Einschränkung an, dass auch die gleichzeitige Besiedlung durch *P. aeruginosa* und *B. cepacia* keinen Selektionsdruck auf die Stabilität des *spa*-Typs hat.

5.4 Biofilm-Veränderung

Während der Chronifizierung einer Infektion/Besiedlung müssen Bakterien sich im Verhältnis zur akuten Infektion dem Wirt stets anpassen, um dem Immunsystem oder externen Einflüssen zu entkommen. Während anfangs die Ausbildung aggressiver Virulenzfaktoren von großer Bedeutung ist, um die Wirtsbarrieren zu durchbrechen, stehen im Verlauf der Langzeitbesiedlung Schutzmechanismen gegen Phagozytose und Opsonierung im Vordergrund. Ein Biofilm erfüllt diese Anforderungen und wie bereits anhand von Studien mit *P. aeruginosa* gezeigt werden konnte, ziehen starke Biofilmbildner dort schwerere klinische Belastungen bei CF-Patienten nach sich als normale Klone [42, 93]. *S. aureus* ist ebenfalls in der Lage, Biofilm zu bilden, wobei sich die Forschung der vergangenen Jahre hauptsächlich auf fremdkörperassoziierte Infektionsmodelle beschränkte. Genauere Mechanismen, Einflussfaktoren und Auswirkungen biofilmbildender *S. aureus*-Stämme auf das Patientenwohl von Mukoviszidosekranken

sind noch weitestgehend unbekannt [36] und stellen eine bedeutende Lücke in unserem Verständnis dieses Pathogens dar.

Die Bestimmung der Biofilmproduktion und ihre Veränderungen im Verlauf langer Nachweiszeiträume eines Klons war das Ziel unserer Untersuchung. Wir nahmen auf Grund der Beobachtungen des Modellkeims *P. aeruginosa* an, dass Isolate mit besonders langer Persistenz phänotypische Variationen hervorbringen, die vermehrt Defensivmechanismen wie beispielsweise eine verstärkte Biofilmproduktion entwickeln würden.

Die Biofilmmessungen der Isolate von 36 Mukoviszidosepatienten bilden ein weites Spektrum der möglichen Ausprägungsgrade dieses Merkmals ab. Das von uns verwendete Biofilmadhäsionsassay erwies sich als gut reproduzierbar und zeigte keine statistisch erfassbaren Ausreißer. Jedoch muss eine niedrige Trennschärfe im Bereich geringer Biofilmproduktion anerkannt werden, da bereits Leerproben, die lediglich mit Kristallviolett gefärbt wurden, zu deutlichen Verunreinigungen und damit Veränderungen der Extinktion führten. Bei einer durchschnittlichen Extinktion von 0,1501 (95%-KI 0,1451 – 0,1552) bei 655nm für Proben des Stamms TM300, der keinen Biofilm bildet, versus 0,1346 (95%-KI 0,1273 – 0,1420) für Leerproben inklusive einer Färbung unterscheiden sich die Messreihen zwar signifikant voneinander, doch es ist klar ersichtlich, dass der Großteil dieser Abschwächung der Messstrahlung sicherlich durch färberische Verunreinigung erklärbar ist. Die Differenz der Mittelwerte ergibt sich am ehesten durch zusätzliche Zellrückstände in den Proben von TM300. Der Einfluss dieser Unschärfe auf starke Biofilmbildner ist gemäß der verhältnismäßig hohen Extinktionswerte, wie z.B. des Stammes RP62A (MW 1,2343; 95% KI 1,217 – 1,251), relativ gering.

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse der frühen und späten Isolate aller 36 Patienten zeigt, dass die Biofilmproduktion über eine Nachweisdauer von mehr als fünf Jahren gleich bleibt. Der Median der Biofilmdifferenz beträgt lediglich -0,015 bei 655nm und liegt damit deutlich unter den durchschnittlichen Extinktionen der analysierten Leerproben. Der größte Teil aller frühen und späten Isolate unterscheidet sich um weniger als 0,2 in der photometrischen Messung bei 655nm. Zum Teil kommt es jedoch auch zu massiven Differenzen zwischen den Isolaten. Dieser Sachverhalt spiegelt sich in den genauer aufgeführten Messreihen der Patienten 11, 16 und 24 wider. Sie stehen exemplarisch für die in der gesamten Gruppe wiederzufindenden Variationen der Entwick-

lung der Biofilmproduktion von *S. aureus* bei Mukoviszidosepatienten. Es konnten Zunahmen, genauso wie Abnahmen nachgewiesen werden. Sowohl späte als auch frühe Isolate bildeten bisweilen starke Biofilme, wobei die Biofilmproduktion von *S. aureus* im Vergleich zur Positivkontrolle RP62A insgesamt nur gering ausfiel. Dies wird durch die durchschnittlichen Extinktionen aller Isolate (MW 0,3336; 95% KI 0,2897 – 0,3775) sowie der frühen (MW 0,3530; 95% KI 0,2907 – 0,4153) und der späten Isolate (MW 0,3139; 95% KI 0,2504 – 0,3774) gezeigt. So können wir die Resultate einer vorangegangenen Studie an einem kleineren Patientenkollektiv bestätigen [40]. Die wenigen hohen Extinktionswerte sehen wir als Ausnahmen an, die am Anfang und am Ende der Besiedlungszeiträume vorkamen und somit wahrscheinlich keinen Bezug zur Dauer der Besiedlung haben. Allerdings wäre eine weitere Analyse dieser Klone im Bezug auf beeinflussende Umweltfaktoren und besonders ihre Wirkung auf die Patientengesundheit im Anbetracht des Stellenwertes schleimiger *P. aeruginosa*-Stämme interessant.

In dieser Studie wurden zwischen zeitgleich auftretenden Isolaten häufig deutliche Differenzen in der Biofilmbildung erfasst (Patienten 4, 5, 7, 13, 21, 23, 24, 28, 34). Alle Messungen des Biofilms in unserer Untersuchung erwiesen sich als intraindividuell konstant. Hiermit beweisen wir somit das Bestehen phänotypischer Varianten klonaler Stämme, die parallel in den tiefen Atemwegen von CF-Patienten existieren und in unterschiedlichem Maße Biofilm exprimieren. Diese Beobachtung ist kongruent zu Funden anderer Arbeitsgruppen, die eine Diversifizierung des Phänotyps besonders in Entzündungsmodellen fanden [35]. Entsprechend der „insurance Hypothese“ bildet der Organismus unter erhöhtem Selektionsdruck (hier: Wirtsabwehr, Antibiotikatherapien, etc.) vermehrte phänotypische Varianten mit dem Nutzen einer größeren Flexibilität gegenüber Abwehrmechanismen der Wirtes, um so die Überlebenswahrscheinlichkeit des Stammes insgesamt zu vergrößern [107]. Sollten diese Ergebnisse mittels der Analyse von Isolaten an weiteren Isolationszeitpunkten während des Langzeitnachweises bei CF-Patienten bestätigt werden, spräche dies für ein Infektionsmodell an Stelle einer einfachen Besiedlung durch *S. aureus* bei Mukoviszidosepatienten und würde den wichtigen Stellenwert dieses Pathogens im Rahmen der Zystischen Fibrose unterstreichen.

Die zum Teil immense Ausprägung der Differenz der Messwerte verdeutlicht, dass die Produktion von Biofilm genetisch gleicher Individuen starken Schwankungen unterliegen kann. Dabei ist es nicht möglich, automatisch von einer *in vitro*-Versuchsreihe auf

das *in vivo*-Verhalten des Stammes zu schließen. In vergleichenden Studien konnten für verschiedene Messmethoden der Biofilmbildung von *S. aureus* massive Unterschiede in Ergebnissen durch Variation der Untersuchungsprotokolle festgestellt werden. Die in unserem Fall angewandte Methode der Adhäsionsmessung war am sensitivsten, um die Fähigkeit der Biofilmproduktion eines Klons zu detektieren [54, 69]. Es handelt sich hierbei sicherlich nicht um ein repräsentatives Modell der Lunge von Mukoviszidosepatienten. Doch an dieser Stelle steht die Feststellung der Fähigkeit des Pathogens zu spätem, genauso wie zu frühen Zeitpunkten im Rahmen einer Infektion oder Besiedlung einen Biofilm zu formieren im Vordergrund. Die Ausprägung der Defensivmechanismen von *S. aureus* ist somit nicht schlichtweg durch den Augenblick seiner Interaktion mit dem Wirt zu erklären. Viel mehr muss das Zusammenspiel diverser Elemente der Lunge von CF-Patienten wie Mangelversorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff, Wirtsabwehr und multiplen antibiotischen Therapien als Palette an Einflussgrößen erkannt werden. Daher versuchten wir mit den uns zur Verfügung stehenden retrospektiven Daten Faktoren im Bezug auf die Biofilmproduktion, bzw. -veränderung zu identifizieren. Wie in Kapitel 3.3.5 genauer aufgeführt, stellten wir mittels statistischer Analyse keine signifikanten Unterschiede der Biofilmbildung in Abhängigkeit von Patientengeschlecht, Kapsel- oder *agr*-Typen und Besiedlungsdauer fest. Diese Erkenntnis unterstützt die Annahme, dass zu jedem Zeitpunkt der Interaktion des Mikroorganismus mit dem Menschen multiple Einflüsse die phänotypische Entwicklung steuern und nur wenige solitäre Faktoren einen großen Einfluss auf die Biofilmformierung haben. In unserer Arbeit wurden die untersuchten Stämme nicht nach ihrer Antibiotikaempfindlichkeit differenziert. Es zeigten sich allerdings bereits Unterschiede der Biofilmbildung in Abhängigkeit einzelner Umweltgrößen, sodass dieses Merkmal in kommenden Arbeiten eingeschlossen werden sollte [24, 79].

Ein nur schwer zu quantifizierender Umstand bleibt sicherlich immer das Milieu „CF-Mucus“. Es gilt, die Simulation seiner mannigfaltigen Eigenschaften zu erreichen, um die Rahmenbedingungen der Entstehung eines *S. aureus*-Biofilms in den tiefen Atemwegen von Patienten mit Zystischer Fibrose zu verstehen. Somit sollten nächste Experimente mit den typischen Charakteristika dieses Habitats wie Substratmangel, Hypoxie, etc. erstellt werden, um auch mittels *in vitro*-Versuchen auf *in vivo*-Eigenschaften von *S. aureus* in den tiefen Atemwegen von Mukoviszidosepatienten schließen zu können.

6 Index

6.1 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 01: *S. aureus*-Kultur auf Blutagar nach 24h Inkubation bei 37°C
- Abb. 02: Schematische Darstellung des *agr*-Operons
- Abb. 03: Schematische Darstellung der *spa*-Region
- Abb. 04 a) physiologisches Lungenepithel b) Störung des CFTR-Kanals
- Abb. 05: Gelelektrophorese einer *cap*-PCR
- Abb. 06: Gelelektrophorese einer *agr*-PCR
- Abb. 07: Mikrotiterplatte zur Biofilmmessung mit Proben inkl. Kontrollen
- Abb. 08: Extinktion der Kontrollen bei 655nm
- Abb. 09: Boxplot der Extinktionen bei 655nm
- Abb. 10: Biofilmproduktion der Isolate zu Beginn der Beobachtung und nach min. 5 Jahren, Patienten 1 – 10
- Abb. 11: Biofilmproduktion der Isolate zu Beginn der Beobachtung und nach min. 5 Jahren, Patienten 11 – 20
- Abb. 12: Biofilmproduktion der Isolate zu Beginn der Beobachtung und nach min. 5 Jahren, Patienten 21 – 30
- Abb.13: Biofilmproduktion der Isolate zu Beginn der Beobachtung und nach min. 5 Jahren, Patienten 31 – 36
- Abb. 14: Boxplot Patient 11
- Abb. 15: Säulendiagramm Patient 11
- Abb. 16: Boxplot Patient 16
- Abb. 17: Säulendiagramm Patient 16
- Abb. 18: Boxplot Patient 24
- Abb. 19: Säulendiagramm Patient 24

6.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 01: Primersequenzen der *cap*-PCR

Tab. 02: Reaktionsmix der *cap*-PCR

Tab. 03: Primersequenzen für die *agr*-PCR

Tab. 04: Reaktionsmix der *agr*-PCR

Tab.05: Inhaltsstoffe PBS

Tab. 06: Inhaltsstoffe TSB

Tab. 07: Häufigkeit der *cap*-Typen von Isolaten am Anfang, bzw. Ende einer Besiedlungsperiode

Tab. 08: Häufigkeit der übereinstimmenden *cap*-Typen nach Patienten

Tab. 09: Verteilung von *agr*-Typen abhängig von *cap*

Tab. 10: Verteilung übereinstimmender *agr*- und *cap*-Typen bei frühen und späten Isolaten

Tab. 11: Verteilung der *cap*- und *agr*-Typen bei korrelierenden *spa*-Typen

Tab. 12: Altersverteilung und Besiedlungsdauer

Tab. 13 a - c: *spa*-Typen früher und später Isolate inklusive Frequenzen der Isolate laut Ridom Spa Server und Kennzeichnung von Mutationen der *spa*-Repeats [89]

Tab. 14: Veränderung der *spa*-Repeatsequenz bei den Patienten 6, 28 und 30

Tab. 15: Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen von Pos.- & Neg.-Kontrollen

Tab. 16: Messwerte und statistische Auswertung der Isolate „Früh“ und „Spät“ des Pat. 11

Tab 17: Messwerte und statistische Auswertung der Isolate „Früh“ und „Spät“ des Pat. 16

Tab. 18: Messwerte und statistische Auswertung der Isolate „Früh“ und „Spät“ des Pat. 24

Tab. 19: Korrelation zwischen Biofilmergebnissen & Geschlecht/*cap/agr*/Besiedlungsdauer

Tab. 20: Häufigkeiten von *cap*- und *agr*-Typen vor Korrelation übereinstimmender früher & später Ergebnisse

Tab. 21: Zusammenfassung von Goerke et al. [34]

6.3 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
AFLP	Amplifizierte Fragmentlängen-Polymorphismen
<i>agr</i>	Accessory Gene Regulator
AIP	Autoinducing Peptide
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
Bcc.	<i>Burkholderia cepacia</i> complex
bp	Basenpaare
<i>cap</i>	Gen des capsular polysaccharide
CAP	Capsular polysaccharide
CF	Cystische Fibrosis, Zystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate
Glc	Glukose
KI	Konfidenzintervall
mA	Milli Ampere
MLST	Multilocus Sequenz Typisierung
mV	Milli Volt
MW	Mittelwert
nm	Nanometer
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	Polymerase chain reaction
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
pA	Staphylococcal Protein A
<i>spa</i>	Gen des Staphylococcal Protein A
TCRS	Two Component Receptor System
TSB	Tryptic Soja Bouillon

7 Literaturverzeichnis

1. Andersen C, Kahl BC, Olesen H V (2013) Intravenous antibiotics given for 2 weeks do not eradicate persistent *Staphylococcus aureus* clones in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect* 1–7
2. Arbeit RD, Karakawa WW, Vann WF, Robbins JB (1984) Predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2(2):85–91
3. Archer N, Mazaitis M, Costerton J (2011) *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* 2(5):445–459
4. Arvidson S, Tegmark K (2001) Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 291(2):159–170
5. Baum C, Haslinger-Löffler B, Westh H, Boye K, Peters G, Neumann C, Kahl BC (2009) Non-spa-typeable clinical *Staphylococcus aureus* strains are naturally occurring protein A mutants. *J Clin Microbiol* 47(11):3624–3629
6. Beenken K, Dunman P (2004) Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 186(14):4665–4684
7. Van Belkum A, Melles DC, Nouwen J, van Leeuwen WB, van Wamel W, Vos MC, Wertheim HFL, Verbrugh H a. (2009) Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 9(1):32–47
8. Van Belkum A, Verkaik NJ, de Vogel CP, Boelens H a, Verveer J, Nouwen JL, Verbrugh H a, Wertheim HFL (2009) Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. *J Infect Dis* 199(12):1820–1826
9. Boles BR, Thoendel M, Singh PK (2004) Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(47):16630–16635
10. Boye K, Lencastre H De, Deplano A, et al (2006) High Interlaboratory Reproducibility of DNA Sequence-Based Typing of Bacteria in a Multicenter Study. *J Clin Microbiol* 44(2):619–621
11. Branger C, Gardye C, Lambert-Zechovsky N (1996) Persistence of *Staphylococcus aureus* strains among cystic fibrosis patients over extended periods of time. *J Med Microbiol* 45(4):294–301
12. Chambers HF (2001) The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis* 7(2):178–82

13. Cheung AL, Bayer AS, Zhang G, Gresham H, Xiong Y-Q (2004) Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 40(1):1–9
14. Cheung AL, Nishina K a, Trotonda MP, Tamber S (2008) The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. *Int J Biochem Cell Biol* 40(3):355–361
15. Christensen GD, Simpson W a, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH (1985) Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 22(6):996–1006
16. Cocchiari JL, Gomez MI, Risley A, Solinga R, Sordelli DO, Lee JC (2006) Molecular characterization of the capsule locus from non-typeable *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 59(3):948–960
17. Collery MM, Smyth DS, Twohig JM, Shore AC, Coleman DC, Smyth CJ (2008) Molecular typing of nasal carriage isolates of *Staphylococcus aureus* from an Irish university student population based on toxin gene PCR, *agr* locus types and multiple locus, variable number tandem repeat analysis. *J Med Microbiol* 57(Pt 3):348–358
18. Cramer N, Wiehlmann L, Tümmler B (2010) Clonal epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Int J Med Microbiol* 300(8):526–533
19. Davidson a GF, Chilvers M a, Lillquist YP (2012) Effects of a *Pseudomonas aeruginosa* eradication policy in a cystic fibrosis clinic. *Curr Opin Pulm Med* 18(6):615–621
20. Davies JC, Alton EFWF, Bush A (2007) Cystic fibrosis. *BMJ* 335(7632):1255–1259
21. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 13(1):16–34
22. Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms : Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15(2):167–193
23. Von Eiff, Becker GP (2001) Nasal Carriage As A Source Of *Staphylococcus Aureus* Bacteremia. *N Engl J Med* 344(1):11–16
24. Fitzpatrick F, Humphreys H, Gara JPO (2005) Evidence for icaADBC - Independent Biofilm Development Mechanism in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. *J Clin Microbiol* 43(4):1973–1976
25. Fitzpatrick F, Humphreys H, O’Gara JP (2005) The genetics of staphylococcal biofilm formation—will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection? *Clin Microbiol Infect* 11(12):967 – 973

26. Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Høiby N, Molin S (2012) Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* 10(12):841–851
27. Foster T (2004) The *Staphylococcus aureus* “superbug.” *J Clin Invest* 114(12):1693–1696
28. Foundation CF (2011) Cystic Fibrosis Foundation - 2011 Patient Registry Annual Data Report.
29. France MW, Dodd ME, Govan JR, Doherty CJ, Webb a K, Jones AM (2008) The changing epidemiology of Burkholderia species infection at an adult cystic fibrosis centre. *J Cyst Fibros* 7(5):368–372
30. Frénay HM, Bunschoten a E, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, Mooi FR (1996) Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15(1):60–64
31. Frénay HM, Theelen JP, Schouls LM, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, van Leeuwen WJ, Mooi FR (1994) Discrimination of epidemic and non-epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. *J Clin Microbiol* 32(3):846–847
32. Geisinger E, George E a, Muir TW, Novick RP (2008) Identification of ligand specificity determinants in AgrC, the *Staphylococcus aureus* quorum-sensing receptor. *J Biol Chem* 283(14):8930–8
33. Goerke C, Campana S, Bayer M (2000) Direct Quantitative Transcript Analysis of the *agr* Regulon of *Staphylococcus aureus* during Human Infection in Comparison to the Expression Profile In Vitro. *Infect Immun* 68(3):1304–1311
34. Goerke C, Esser S, Kuemmer M, Wolz C (2005) *Staphylococcus aureus* strain designation by *agr* and *cap* polymorphism typing and delineation of *agr* diversification by sequence analysis. *Int J Med Microbiol* 295(2):67–75
35. Goerke C, Gressinger M, Endler K, Breitkopf C, Wardecki K, Stern M, Wolz C, Kahl BC (2007) High phenotypic diversity in infecting but not in colonizing *Staphylococcus aureus* populations. *Environ Microbiol* 9(12):3134–42
36. Goerke C, Wolz C (2010) Adaptation of *Staphylococcus aureus* to the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol* 300(8):520–5
37. Gómez MI, Prince A (2007) Opportunistic infections in lung disease: Pseudomonas infections in cystic fibrosis. *Curr Opin Pharmacol* 7(3):244–251
38. Hare R, Thomas CG (1956) The transmission of *Staphylococcus aureus*. *Br Med J* 2:840–844

39. Harmsen D, Claus H, Witte W, Claus H, Turnwald D, Vogel U (2003) Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital Setting by Using Novel Software for spa Repeat Determination and Database Management. *J Clin Microbiol* 41(12):5442–5448
40. Hirschhausen N, Block D, Bianconi I, et al (2013) Extended *Staphylococcus aureus* persistence in cystic fibrosis is associated with bacterial adaptation. *Int J Med Microbiol*. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.09.012
41. Høiby N (2011) Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *BMC Med* 9(1):32–39
42. Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song Z, Moser C, Jensen PØ, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T, Bjarnsholt T (2011) The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* 3(2):55–65
43. Horsley A, Webb K, Bright-Thomas R, Govan J, Jones A (2011) Can early *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis be eradicated with antibiotic therapy? *Front Cell Infect Microbiol* 1(12):1 – 7
44. Hurley MN, Cámara M, Smyth AR (2012) Novel approaches to the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 40(4):1014–1023
45. Ji G (1997) Bacterial Interference Caused by Autoinducing Peptide Variants. *Science* (80-) 276(5321):2027–2030
46. Kahl BC (2010) Impact of *Staphylococcus aureus* on the pathogenesis of chronic cystic fibrosis lung disease. *Int J Med Microbiol* 300(8):514–519
47. Kahl BC, Becker K, Friedrich AW, Clasen J, Sinha B, Eiff C Von, Peters G (2003) *agr*-Dependent Bacterial Interference Has No Impact on Long-Term Colonization of *Staphylococcus aureus* during Persistent Airway Infection of Cystic Fibrosis Patients. *J Clin Microbiol* 41(11):5199–5201
48. Kahl B, Duebbers A, Lubritz G, et al (2003) Population Dynamics of Persistent *Staphylococcus aureus* Isolated from the Airways of Cystic Fibrosis Patients during a 6-Year Prospective Study. *J Clin Microbiol* 41(9):4424–4427
49. Kahl B, Herrmann M, Everding a S, Koch HG, Becker K, Harms E, Proctor R a, Peters G (1998) Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 177(4):1023–9
50. Kahl B, Mellmann A, Deiwick S (2005) Variation of the Polymorphic Region X of the Protein A Gene during Persistent Airway Infection of Cystic Fibrosis Patients Reflects Two Independent Mechanisms of Genetic Change in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 43(1):502–505

51. Karakawa WW, Fournier JM, Vann WF, Arbeit R, Robbins JB (1985) Method for the serological typing of the capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 22(3):445–447
52. Kent B (2013) Cystic Fibrosis Trust Annual data report 2011.
53. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H (1997) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 10(3):505–520
54. Knobloch JK-M, Horstkotte M a, Rohde H, Mack D (2002) Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol* 191(2):101–106
55. Koreen L, Ramaswamy S V, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN (2004) *spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *J Clin Microbiol* 42(2):792–799
56. Lattar SM, Tuchscherer LPN, Centrón D, Becker K, Predari C, Buzzola FR, Robinson DA, Sordelli DO (2013) Molecular fingerprinting of *Staphylococcus aureus* isolated from patients with osteomyelitis in Argentina and clonal distribution of the *cap5(8)* genes and of other selected virulence genes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31(10):2559–2566
57. Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE (1991) Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* 173(20):6558–6567
58. Lim Y, Jana M, Luong T, Lee C (2004) Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 186(3):722–729
59. Lina G, Boutite F, Tristan A, Bes M, Etienne J, Vandenesch F (2003) Bacterial Competition for Human Nasal Cavity Colonization : Role of Staphylococcal *agr* Alleles. *Appl Environ Microbiol* 69(1):18–23
60. Löfdahl S, Guss B, Uhlén M, Philipson L, Lindberg M (1983) Gene for staphylococcal protein A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(3):697–701
61. Lowy FD (1998) *Staphylococcus aureus* Infections. *N Engl J Med* 339(8):520 – 532
62. Lowy FD (2011) How *Staphylococcus aureus* Adapts to Its Host. *N Engl J Med* 364(21):1987– 1990
63. Luedicke C, Slickers P, Ehricht R, Monecke S (2010) Molecular fingerprinting of *Staphylococcus aureus* from bone and joint infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29(4):457–463

64. Luong TT, Lee CY (2002) Overproduction of Type 8 Capsular Polysaccharide Augments *Staphylococcus aureus* Virulence Overproduction of Type 8 Capsular Polysaccharide Augments *Staphylococcus aureus* Virulence. Society. doi: 10.1128/IAI.70.7.3389
65. Luong T, Sau S, Gomez M, Lee JC, Lee CY (2002) Regulation of *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharide Expression by *agr* and *sarA* Regulation of *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharide Expression by *agr* and *sarA*. Infect Immun. doi: 10.1128/IAI.70.2.444
66. Lyon GJ, Wright JS, Christopoulos A, Novick RP, Muir TW (2002) Reversible and specific extracellular antagonism of receptor-histidine kinase signaling. J Biol Chem 277(8):6247–53
67. Mainz JG, Naehrlich L, Schien M, et al (2009) Concordant genotype of upper and lower airways *P aeruginosa* and *S aureus* isolates in cystic fibrosis. Thorax 64(6):535–40
68. Malachowa N, Kohler PL, Schlievert PM, Chuang ON, Dunny GM, Kobayashi SD, Miedzobrodzki J, Bohach G a, Seo KS (2011) Characterization of a *Staphylococcus aureus* surface virulence factor that promotes resistance to oxidative killing and infectious endocarditis. Infect Immun 79(1):342–352
69. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A (2006) Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evaluation of three different screening methods. Indian J Med Microbiol 24(1):25–29
70. McAdam PR, Holmes A, Templeton KE, Fitzgerald JR (2011) Adaptive evolution of *Staphylococcus aureus* during chronic endobronchial infection of a cystic fibrosis patient. PLoS One 6(9):e24301
71. Mcdade JJ, Hall LB (1963) Survival of *Staphylococcus aureus* in the environment. Am J Trop Med Hyg 78:330–337
72. Melles DC, Taylor KL, Fattom AI, van Belkum A (2008) Serotyping of Dutch *Staphylococcus aureus* strains from carriage and infection. FEMS Immunol Med Microbiol 52(2):287–292
73. Miller M, Cook H a, Furuya EY, Bhat M, Lee M-H, Vavagiakis P, Visintainer P, Vasquez G, Larson E, Lowy FD (2009) *Staphylococcus aureus* in the community: colonization versus infection. PLoS One 4(8):e6708
74. Mullis KB, Faloona F a, Scharf S, Saiki R, Horn G, Ehrlich H (1986) Specific Enzymatic Amplification of DNA in vitro: The Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51:263–273
75. Novick RP (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. Mol Microbiol 48(6):1429–1449

76. Novick RP, Geisinger E (2008) Quorum sensing in staphylococci. *Annu Rev Genet* 42:541–564
77. Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S (1993) Synthesis of staphylococcal factors is controlled by regulatory RNA molecule. *EMBO J* 12(10):3967–3975
78. O’Gara JP (2007) *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 270(2):179–188
79. O’Neill E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson DA, O’Gara JP (2007) Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J Clin Microbiol* 45(5):1379–1388
80. Ogston A (1881) MICRO-ORGANISMS IN SURGICAL DISEASES. *Br Med J* 369 – 375
81. Payne MC, Wood HF, Karakawa W, Gluck L (1965) A prospective study of staphylococcal colonization and infections in newborns and their families. *Am J Epidemiol* 82(3):305–316
82. Pillarisetti N, Williamson E, Linnane B, et al (2011) Infection, inflammation, and lung function decline in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 184(1):75–81
83. Pöhlmann-dietze P, Ulrich M, Kiser KB, Lee JC, Fournier J, Wolz C, Do G (2000) Adherence of *Staphylococcus aureus* to Endothelial Cells : Influence of Capsular Polysaccharide , Global Regulator *agr* , and Bacterial Growth Phase. *Infect Immun* 68(9):4856–4871
84. Rani SA, Pitts B, Beyenal H, Veluchamy RA, Lewandowski Z, Davison WM, Buckingham-Meyer K, Stewart PS (2007) Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *J Bacteriol* 189(11):4223–4233
85. Ratjen F, Döring G (2003) Cystic fibrosis. *Lancet* 361(9358):681 – 689
86. Razvi S, Quittell L, Sewall A, Quinton H, Marshall B, Saiman L (2009) Respiratory microbiology of patients with cystic fibrosis in the United States, 1995 to 2005. *Chest* 136(6):1554–1560
87. Regamey N, Jeffery PK, Alton EFWF, Bush A, Davies JC (2011) Airway remodelling and its relationship to inflammation in cystic fibrosis. *Thorax* 66(7):624–629

88. Reynolds J, Wigneshweraraj S (2011) Molecular Insights into the Control of Transcription Initiation at the *Staphylococcus aureus agr* operon. *J Mol Biol* 412(5):862–881
89. Ridom GmbH, SeqNet.org (<http://www.SeqNet.org/>) Ridom SpaServer - Frequencies. <http://spa.ridom.de/frequencies.shtml>. Accessed 10 Jan 2015
90. Riordan KO, Lee JC (2004) *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. *Am Soc Microbiol* 17(1):218–234
91. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ (2005) Cystic fibrosis. *N Engl J Med* 352(19):1992–2001
92. Rushton L, Sass A, Baldwin A, Dowson CG, Donoghue D, Mahenthiralingam E (2013) Key role for efflux in the preservative susceptibility and adaptive resistance of *Burkholderia cepacia* complex bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 57(7):2972–2980
93. Sagel SD, Gibson RL, Emerson J, McNamara S, Burns JL, Wagener JS, Ramsey BW (2009) Impact of *Pseudomonas* and *Staphylococcus* infection on inflammation and clinical status in young children with cystic fibrosis. *J Pediatr* 154(2):183–188
94. Sharma A, Krause A, Worgall S (2011) Recent developments for *Pseudomonas* vaccines. *Hum Vaccin* 7(10):999–1011
95. Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, Bost D a, Riehman M, Naidich S, Kreiswirth BN (1999) Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 37(11):3556–3563
96. Southern KW, Munck A, Pollitt R, Travert G, Zanolla L, Dankert-Roelse J, Castellani C (2007) A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe. *J Cyst Fibros* 6(1):57–65
97. Suppiger A, Schmid N, Aguilar C, Pessi G, Eberl L (2013) Two quorum sensing systems control biofilm formation and virulence in members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Virulence* 4(5):400–409
98. Sutter DE, Summers AM, Keys CE, Taylor KL, Frasci CE, Braun LE, Fattom AI, Bash MC (2011) Capsular serotype of *Staphylococcus aureus* in the era of community-acquired MRSA. *FEMS Immunol Med Microbiol* 63(1):16–24
99. Taylor P, Stewart PS (2012) Biofouling : The Journal of Bioadhesion and Biofilm Mini-review : Convection around biofilms Mini-review : Convection around biofilms. *Biofouling J Bioadhesion Biofilm Mini-review Convection around biofilms* 28(2):187–198

100. Tsang LH, Cassat JE, Shaw LN, Beenken KE, Smeltzer MS (2008) Factors contributing to the biofilm-deficient phenotype of *Staphylococcus aureus sarA* mutants. PLoS One 3(10):e3361
101. Valle J, Latasa C, Gil C, Toledo-Arana A, Solano C, Penadés JR, Lasa I (2012) Bap, a Biofilm Matrix Protein of *Staphylococcus aureus* Prevents Cellular Internalization through Binding to GP96 Host Receptor. PLoS Pathog 8(8):e1002843
102. Verdier I, Durand G, Bes M, Taylor KL, Lina G, Vandenesch F, Fattom AI, Etienne J (2007) Identification of the capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR and agglutination tests. J Clin Microbiol 45(3):725–729
103. Vu-Thien H, Hormigos K, Corbineau G, Fauroux B, Corvol H, Moissenet D, Vergnaud G, Pourcel C (2010) Longitudinal survey of *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis patients using a multiple-locus variable-number of tandem-repeats analysis method. BMC Microbiol 10(24):10:24
104. Watts A, Ke D, Wang Q, Pillay A, Lee JC, Nicholson-weller A (2005) *Staphylococcus aureus* Strains That Express Serotype 5 or Serotype 8 Capsular Polysaccharides Differ in Virulence. Infect Immun 73(6):3502 – 3511
105. Williams R (1963) Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. Microbiol Mol Biol Rev 27(1):56 – 67
106. Wong JK, Ranganathan SC, Hart E (2013) *Staphylococcus aureus* in early cystic fibrosis lung disease. Pediatr Pulmonol 1159(August):1151–1159
107. Yachi S, Loreau M (1999) Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: the insurance hypothesis. Proc Natl Acad Sci U S A 96(February):1463–1468

8 Anhang

Curriculum Vitae