

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

**Die Prävalenz von Virulenzfaktoren bei *Staphylococcus aureus*-Stämmen einer
prospektiven multizentrischen Studie bei Mukoviszidose-Patienten**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Anne-Kathrin Maria Heidenreich, geb. Faß
aus Trier

2011

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

Dekan: Univ. Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

Referent: Univ. Prof. Dr. med. Barbara Kahl

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Dorothee Viemann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2011

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Medizinische Mikrobiologie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Georg Peters-
Referentin: Prof. Dr. med. Barbara Kahl
Koreferentin: Priv. Doz. Dr. med. Dorothee Viemann

Zusammenfassung

Die Prävalenz von Virulenzfaktoren bei *Staphylococcus aureus*-Stämmen einer prospektiven multizentrischen Studie bei Mukoviszidose Patienten

Anne-Kathrin Maria Heidenreich

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Prävalenz bestimmter Virulenzfaktoren in *S. aureus*-Isolaten, die aus den Atemwegen von Mukoviszidose-Patienten stammten, im Rahmen einer prospektiven, multizentrischen Langzeitstudie untersucht. Es zeigte sich kein charakteristisches Toxin-Profil im untersuchten Patientenkollektiv (n=134). *agr I* trat bei 50% der untersuchten Isolate auf, was deutlich häufiger als bei den Isolaten Gesunder aus anderen Studien war. *sec* war bei Isolaten der *agr*-Gruppe *I* signifikant häufiger nachzuweisen als bei Isolaten der *agr*-Gruppen *II – IV*. Ebenfalls fand sich eine signifikante Häufung von *sea*, *seh* und *tst* bei Isolaten der *agr*-Gruppe *III*. Die Vermutung, dass die Lokalisation (Nasenvorhof, Rachen, untere Atemwege) der Bakterien eine Auswirkung auf das Virulenz-Genprofil hat, konnte in dieser Arbeit nicht belegt werden. Es wurden einige Positivkorrelationen von Toxinen gefunden, die nur zum Teil in der Literatur beschrieben sind. So waren *sed*, *sej*, *seg* und *sei* stark mit der *agr*-Gruppe *I* korreliert. Im Verlauf konnte eine hohe Mobilität von Virulenz-Genen bei den Isolaten von 5 Patienten beobachtet werden, besonders für *seg*, *sei* und *tst*. Die am weitesten verbreiteten und am häufigsten auftretenden *spa*-Typen wiesen weniger Toxin-Gene auf als seltenere Stämme. Weiterhin konnten bei Isolaten desselben *spa*-Typs unterschiedliche Virulenz-Genprofile nachgewiesen werden. Bei der exemplarischen Betrachtung (n=4) der Virulenz-Genprofile bei Isolaten von Patienten mit klinisch manifester Infektion waren *sea-see* und *eta*, *etb* und *tst* bislang selten nachzuweisen.

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	4
1.2. Virulenzfaktoren.....	5
1.2.1. Enterotoxine	5
1.2.1.1. Staphylokokken Enterotoxin A (SEA).....	6
1.2.1.2. Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)	7
1.2.1.3. Staphylokokken Enterotoxin C (SEC)	7
1.2.1.4. Staphylokokken Enterotoxin D (SED).....	7
1.2.1.5. Staphylokokken Enterotoxin E (SEE).....	8
1.2.1.6. Staphylokokken Enterotoxin G (SEG).....	8
1.2.1.7. Staphylokokken Enterotoxin H (SEH).....	8
1.2.1.8. Staphylokokken Enterotoxin I (SEI)	8
1.2.1.9. Staphylokokken Enterotoxin J (SEJ).....	9
1.2.2. Exfoliativtoxine	9
1.2.2.1. Exfoliativtoxine A und B	9
1.2.2.2. Toxisches Schock-Syndrom Toxin (TSST-1).....	10
1.2.3. Accessory Gene Regulator (<i>agr</i>).....	11
1.2.4. Porenbildende Toxine.....	12
1.2.4.1. Panton-Valentine Leukozidin (PVL)	12
1.2.4.2. Gamma-Hämolyisin (Hlg).....	13
1.2.5. Extrazelluläres Adhärenzprotein (Eap)	13
1.2.6. Extrazelluläres Matrixprotein (Emp).....	13
1.3. Protein A.....	14
1.3.1. <i>spa</i>	14
1.3.2. <i>spa</i> -Typisierung	15
1.4. Mukoviszidose.....	15
1.5. Atemwegsinfektionen bei Mukoviszidose	17
2. Fragestellung	19
3. Experimentelle Untersuchungen: Material und Methoden	20
3.1. Bakterienstämme und Patienten	20

3.2.	<i>spa</i> -Typisierung	22
3.3.	PCR und Agarosegel-Elektrophorese	23
3.3.1.	<i>sea-see</i>	25
3.3.2.	<i>eta, etb</i> und <i>tst</i>	26
3.3.3.	<i>seg-sej</i>	27
3.3.4.	<i>agr</i>	28
3.3.5.	<i>pvl</i> und <i>hlg</i>	29
3.3.6.	<i>eap</i>	30
3.3.7.	<i>emp</i>	31
4.	Ergebnisse	32
4.1.	Häufigkeiten und Verteilungsmuster der Virulenzfaktoren bei Erstuntersuchung	32
4.1.1.	Allgemeine Häufigkeiten.....	32
4.1.2.	Verteilung der Virulenzfaktoren nach Materialien.....	33
4.1.3.	Verteilung der Virulenzfaktoren nach <i>agr</i> -Typen.....	34
4.1.4.	Korrelationen zwischen verschiedenen Toxinen.....	36
4.2.	Betrachtung der Virulenzfaktoren im Verlauf.....	38
4.2.1.	Patient 1	38
4.2.1.1.	<i>S. aureus</i> -Isolate des <i>spa</i> -Typs t078.....	39
4.2.1.2.	<i>S. aureus</i> -Isolate des <i>spa</i> -Typs t5430.....	39
4.2.2.	Patient 2, <i>spa</i> -Typ t012.....	40
4.2.3.	Patient 3	41
4.2.4.	Patient 4	41
4.2.5.	Patient 5	42
4.2.6.	Patient 6	43
4.2.7.	Patient 7, <i>spa</i> -Typ t1577.....	43
4.2.8.	Patient 8	44
4.2.9.	Patient 9, <i>spa</i> -Typ t211.....	45
4.2.10.	Patient 10, <i>spa</i> -Typ t338.....	46
4.3.	Toxin-Ausstattung der Isolate mit den häufigsten <i>spa</i> -Typen	48
4.3.1.	Isolate des <i>spa</i> -Typs t002	48
4.3.2.	Isolate des <i>spa</i> -Typs t008	49

4.3.3.	Isolate des <i>spa</i> -Typs t015	49
4.3.4.	Isolate des <i>spa</i> -Typs t084	50
4.3.5.	Isolate des <i>spa</i> -Typs t091	52
4.4.	Assoziation der Toxinprofile mit dem klinischen Zustand	53
5.	Diskussion	55
5.1.	Prävalenz und Verteilungsmuster der Virulenzfaktoren	55
5.2.	Analyse der Virulenzfaktoren im Verlauf	61
5.3.	Prävalenz der Virulenz-Gene häufiger <i>spa</i> -Typen	63
5.4.	Virulenz-Genprofile bei klinisch manifester Infektion	66
6.	Zusammenfassung.....	68
7.	Index	69
7.1.	Verwendete Abkürzungen & Maßeinheiten	69
7.2.	Abbildungsverzeichnis	71
7.3.	Tabellenverzeichnis	72
8.	Literaturverzeichnis.....	73
	Lebenslauf	I
	Widmung und Danksagung	II

1. Einleitung

1.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus ist ein koagulase-positives, grampositives, nicht-sporenbildendes, nicht-bewegliches Kugelbakterium, das sich in allen Ebenen des Raumes teilt und aufgrund seiner Unbeweglichkeit in dichten Haufen anordnet. Die Kolonien sind 6-8µm groß und weiß bis gold-gelblich.

Das natürliche Habitat von *S. aureus* ist der Nasenvorhof. 20-25% der Bevölkerung sind permanente Träger, bei weiteren 55-60% kommt *S. aureus* intermittierend vor [52] und bei etwa 20-25% lässt sich *S. aureus* nie im Nasenvorhof nachweisen. Es wurde gezeigt, dass *S. aureus*-Träger ein erhöhtes Risiko haben, eine Bakteriämie zu entwickeln [102], jedoch die Mortalität aufgrund einer *S. aureus*-Sepsis vermindert ist [106]. Die Prävalenz des nasalen *S. aureus*-Trägertums ist zwischen verschiedenen Bevölkerungsgruppen variabel. So sind Kinder, Männer, Diabetiker [97], hospitalisierte und dialysepflichtige Patienten [51] und Patienten mit chronischen Hauterkrankungen häufiger betroffen, um nur einige Beispiele zu nennen [99]. *S. aureus* lässt sich bei Gesunden zusätzlich regelmäßig in den Axillae und am Perineum nachweisen [107], gelegentlich kommt der Erreger auch als Teil der Flora des Verdauungstraktes [63, 80] und der Vagina vor [89].

Bei *S. aureus* handelt es sich um einen wichtigen human-pathogenen Keim, der sowohl für ambulant erworbene als auch nosokomiale Infektionen verantwortlich sein kann [24]. Nosokomiale Infektionen stehen oft im Zusammenhang mit Verletzungen der Haut oder Schleimhaut bei immungeschwächten Patienten [45] oder sind katheter-assoziiert [52]. Weiterhin ist *S. aureus* einer der häufigsten Erreger nosokomialer Pneumonien [7]. Das Spektrum der durch dieses Bakterium verursachten Erkrankungen reicht von Furunkeln und kleineren Hautabszessen [104] bis hin zu schweren invasiven Infektionen wie Osteomyelitiden und Endokarditiden [60]. Grundsätzlich können verschiedene *S. aureus*-induzierte Erkrankungen unterschieden werden: Invasive Staphylokokken-Erkrankungen, toxin-vermittelte Erkrankungen und Übergangsformen.

Desweiteren ist *S. aureus*, neben *Pseudomonas aeruginosa*, einer der am häufigsten isolierten Keime aus den Atemwegen von Patienten mit Mukoviszidose. Hiervon besonders betroffen sind Kinder und Jugendliche [91].

Seine pathogene Potenz lässt sich auf eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, deren kodierende Gene meist von Elementen wie Prophagen, Transposons oder Plasmiden getragen werden, zurückführen, von denen einige Gegenstand dieser Arbeit sind und im Nachfolgenden erläutert werden.

1.2. Virulenzfaktoren

S. aureus ist in der Lage zahlreiche Virulenzfaktoren zu produzieren, welche an der Pathogenese vieler *S. aureus*-assoziierter Erkrankungen beteiligt sind [15]. Durch eine direkte Schädigung von Zellen des Immunsystems [20] und Toxin-spezifische Wirkungen [60], z.B. als gastrointestinale Toxine, ist die Fähigkeit des Bakteriums, Toxine zu exprimieren ein entscheidender Schritt in der Entstehung von Infektionen mit *S. aureus*.

1.2.1. Enterotoxine

Die Enterotoxine von *S. aureus* (SEs) sind eine Gruppe von hitzestabilen Toxinen, welche die Hauptursache für Gastroenteritiden im Zusammenhang mit dem Konsum von mit *S. aureus*-kontaminierter Nahrung sind. Mengen von weniger als 1µg reichen aus, um Symptome hervorzurufen. Häufige Quellen für *S. aureus* sind Fleisch und Geflügel, aber auch Fisch und Milchprodukte. Die Inkubationszeit ist typischerweise sehr kurz: 2-6h nach Nahrungsaufnahme treten abdominelle Schmerzen und Krämpfe, Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoen auf [3, 76].

Neben ihrer Funktion als potente gastrointestinale Toxine sind SEs auch effektive Superantigene (SAGs), die die Proliferation unspezifischer T-Zellen anregen. SAGs, vor allem jene, deren Bindungsstelle ein Zinkatom enthält [25], gehen eine extrem stabile Bindung mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II) ein, der von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) exprimiert wird, und binden anschließend über die vari-

able Region der β -Kette an den T-Zell-Rezeptor (TcR). Dies führt zu einer massiven Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine, wie Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) sowie T-Zell-Mediatoren, wie IL-2, was zu Fieber und Schock führen kann [76].

SEs gehören zur großen Familie der pyrogenen Exotoxine (PTs), zu welcher neben den Serotypen SEA bis SEE und SEG bis SEJ das Toxic Shock Toxin-1 (TSST-1) und eine Gruppe von Streptokokken-Exotoxinen zählen. Die phylogenetischen Verwandtschaftsgrade der PTs (SEA – SEE) wurden 1993 von Van den Bussche et al. untersucht [100] und später um weitere SEs ergänzt: Es wurden zwei Linien gefunden, wovon eine die Toxine SEA, SEE und SED mit 51-81% gleichen Aminosäuren (AS) enthält, und die andere SEC und SEB (und das Streptokokkentoxin SPEA) mit 42-67% identischen Sequenzen [100]. SEJ scheint mit 52-66% Übereinstimmungen mit der ersten Linie nah verwandt zu sein, wohingegen SEI und SEH etwas weniger Ähnlichkeit mit der zweiten Linie aufweisen (31-38%) [3].

Es konnte gezeigt werden, dass viele der beschriebenen SAGs auf sogenannten Pathogenitätsinseln lokalisiert sind [71]. Hierbei handelt es sich um Elemente im Chromosom mit einem Molekulargewicht von 15-20 kDa, die typische Eigenschaften von Phagen besitzen, zu denen Gene für Integrasen und Helikasen sowie angrenzende Repeats zu zählen sind. Diese Gen-Abschnitte können durch bestimmte Phagen exzidiert und repliziert werden. Hieraus resultieren Phagen-artige infektiöse Partikel, welche eine sehr hohe Transferrate bedingen und die Verbreitung dieser Elemente erklären [71].

1.2.1.1. Staphylokokken Enterotoxin A (SEA)

SEA ist das häufigste Toxin im Zusammenhang mit durch Staphylokokken verursachten Lebensmittelvergiftungen. Das SEA-Gen (*sea*) besteht aus 771 Basenpaaren (bp), wird von temperenten Bakteriophagen getragen und kodiert für ein Vorläuferprotein mit 257 AS [8, 36]. Das reife Protein hat ein Molekulargewicht von 27,1kDa. Im Gegensatz zu anderen Enterotoxinen (SEB, SEC, SED) wird *sea* nicht durch den zusätzlichen Gen-Regulator *agr* (s. 1.2.3) reguliert [96], sondern von allen Stämmen, die dieses Gen tragen, konstitutiv exprimiert [25].

1.2.1.2. Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)

Die kodierende Region für SEB enthält ungefähr 900 Nukleotide, das Vorläuferprotein besteht aus 267 AS. Das Molekulargewicht des reifen Proteins beträgt 28,4kDa [3]. In der Regel wird *seb* von einem Plasmid getragen, es wurden aber auch chromosomal lokalisierte Gene isoliert [85, 86]. *seb* konnte zusammen mit zwei weiteren Enterotoxin-Genen (*sek* und *sel*) der Pathogenitätsinsel SaPI3 zugeordnet werden [71].

1.2.1.3. Staphylokokken Enterotoxin C (SEC)

SEC besteht aus drei Subtypen: SEC1, SEC2 und SEC3. Ähnlichkeiten in der Gensequenz legen die Vermutung nahe, dass *sec1* aus einer Kombination von *sec3* und *seb* hervorgegangen ist [17]. Die für *sec2* und *sec3* kodierenden Regionen enthalten jeweils 801bp und kodieren für Vorläuferproteine bestehend aus 267 AS [35]. SEC3 unterscheidet sich von C2 und C1 in vier bzw. neun AS. Die Molekulargewichte der reifen Proteine differieren minimal: So beträgt es für SEC1 27,5kDa, für SEC2 und SEC3 27,6kDa [3]. *sec* ist zusammen mit zwei anderen Enterotoxin-Genen (*sek* und *sel*) auf der Pathogenitätsinsel SaPI4 lokalisiert [71].

1.2.1.4. Staphylokokken Enterotoxin D (SED)

SED [13] ist das zweithäufigste Toxin, welches mit Lebensmittelvergiftungen assoziiert ist. *sed* ist auf einem Plasmid (pIB485) lokalisiert und kodiert für ein Vorläuferprotein mit 258 AS [4]. Das reife Polypeptid enthält 228 AS, sein Molekulargewicht beträgt 26,9kDa und zeigt in seiner Gensequenz sehr viele Ähnlichkeiten zu anderen SEs. SED ist in der Lage Zn^{2+} -abhängig Homodimere zu bilden, was eine hohe Affinität zu MHC II-Rezeptoren ermöglicht [3]. In einer Arbeit von Becker et al. wurde gezeigt, dass SED mit SEJ assoziiert ist [5].

1.2.1.5. Staphylokokken Enterotoxin E (SEE)

Das Gen für SEE (*see*) wird wie *sea* von temperenten Bakteriophagen getragen und kodiert für ein Vorläuferprotein mit einem Molekulargewicht von 29kDa, welches zu einem reifen Protein mit einem Molekulargewicht von 26,4kDa prozessiert wird [18]. Gemeinsamkeiten in der DNA-Sequenz mit *sed* und *sea* weisen auf eine enge Verwandtschaft hin [100]. Am deutlichsten ist die Ähnlichkeit zwischen *see* und *sea*: Die Angaben in der Literatur differieren ein wenig, doch werden Werte zwischen 81% [3] und 90% [25] in Bezug auf identische AS angegeben.

1.2.1.6. Staphylokokken Enterotoxin G (SEG)

seg kodiert für ein 258 AS langes Vorläuferprotein, dessen prozessierte Form ein Molekulargewicht von 27,0kDa hat und das eine hohe Ähnlichkeit mit SEB und SEC aufweist [68]. *seg* gehört zusammen mit *sei* und weiteren Enterotoxinen (*sek*, *sel* und *sem*) zu einem Operon, dem „enterotoxin gene cluster“ (*egc*) [42].

1.2.1.7. Staphylokokken Enterotoxin H (SEH)

SEH, welches ein Molekulargewicht von 27,3 kDa hat, ist nur entfernt mit den anderen Enterotoxinen verwandt und zeigt eine einzigartige NH₂-terminale Aminosäuresequenz. Es lassen sich auch keine Kreuzreaktionen mit anderen Enterotoxinen in Immunodiffusionsversuchen nachweisen [94]. Ein weiterer Unterschied zu allen anderen SEs liegt im Bindungsverhalten an den Tc-Rezeptor: SEH bindet als einziges SE an die α -Kette und nicht, wie alle anderen, an die β -Kette des TcR [77].

1.2.1.8. Staphylokokken Enterotoxin I (SEI)

SEI entsteht aus einem Vorläuferprotein mit 242 AS und weist am wenigsten Ähnlichkeiten mit anderen SEs auf. Die meisten Gemeinsamkeiten bestehen mit SEA, SED und

SEE (26-28%). Das reife Protein besteht aus 218 AS und hat ein Molekulargewicht von 24,9kDa [68]. *sei* ist wie *seg* ein Bestandteil des „enterotoxin gene cluster“ (*egc*) [42], was sich in der fixen Kombination beider Toxine zeigt, wie auch von Becker et al. beschrieben [5].

1.2.1.9. Staphylokokken Enterotoxin J (SEJ)

sej ist auf dem gleichen Plasmid wie *sed* lokalisiert (pIB485) [4, 110]. SEJ ist mit einem Molekulargewicht von 28,5kDa das schwerste der untersuchten Enterotoxine und weist deutliche Ähnlichkeit mit SEA, SED und SEE auf [3]. Wie in Kapitel 1.2.1.4 bereits erwähnt besteht eine Assoziation von SEJ mit SED [5].

1.2.2. Exfoliativtoxine

1.2.2.1. Exfoliativtoxine A und B

Bei den Exfoliativtoxinen handelt es sich um Serinproteasen, deren Zielmolekül Desmoglein-I in der Epidermis ist [1, 54]. Sie sind unter anderem verantwortlich für das Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS), auch bekannt als Dermatitis exfoliativa, Pemphigus neonatorum oder Morbus Ritter von Rittershain. Das SSSS betrifft vor allem Säuglinge und Kleinkinder, aber auch immungeschwächte Erwachsene. Es ist gekennzeichnet durch großflächige Epidermolyse und verläuft, soweit keine Komplikationen auftreten, in der Regel gutartig und heilt ohne Narbenbildung ab. Neben dieser generalisierten Form einer bullösen Impetigo sind Exfoliativtoxine auch mit lokalisierten bullösen und nicht-bullösen impetiginösen Formen assoziiert [22]. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Serotyp A im Zusammenhang mit der bullösen Impetigo steht, während der Serotyp B für das generalisierte SSSS verantwortlich ist [109].

S. aureus ist in der Lage, vier verschiedene Serotypen von Exfoliativtoxinen zu produzieren (ETA bis ETD), wovon zwei in den meisten Fällen der Auslöser von SSSS sind [109]. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass ETA der vorherrschende Serotyp

in Europa und den USA ist, hingegen dominiert ETB im japanischen Raum [55]. ETA besteht aus 242 AS, hat ein Molekulargewicht von 26,95kDa und ist hitzestabil. Das kodierende Gen *eta* ist chromosomal lokalisiert. Im Gegensatz zu ETA ist ETB hitzelabil und das kodierende Gen auf einem Plasmid lokalisiert. Das reife Protein enthält 246 AS, sein Molekulargewicht beträgt 27,27kDa [54].

Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind ETA und ETB. Der Vollständigkeit halber sei aber kurz auf ETC und ETD eingegangen: ETC ist ein hitzelabiles Protein mit einem Molekulargewicht von 27kDa, welches bei einem *S. aureus*-Stamm von Pferden nachgewiesen wurde und aufgrund seiner Ähnlichkeiten mit humanen Exfoliativtoxinen als Exfoliativtoxin C bezeichnet wurde [82]. ETD wurde 2002 von Yamaguchi et al. beschrieben [108]. Wegen vieler Gemeinsamkeiten in der Aminosäuresequenz mit ETA (40%) und ETB (59%) und dem gleichen Zielmolekül (Desmoglein-I) wurde es als neues Mitglied in die Gruppe der Exfoliativtoxine eingeordnet [108].

1.2.2.2. Toxisches Schock-Syndrom Toxin (TSST-1)

Das Toxische Schock Syndrom (TSS) ist eine schwere Erkrankung, charakterisiert durch plötzliches hohes Fieber, Hautrötung und –ablösung und eine in weniger als 5% letal verlaufende Sepsis [19]. Die Betroffenen sind häufig junge Frauen, die zur Menstruationshygiene Tampons verwenden. Nahezu 100% der aus vaginalen Abstrichen isolierten *S. aureus*-Stämme bei menstruations-assoziiertem TSS produzieren TSST-1 [83]. Ein TSS auslösen können ebenfalls die Enterotoxine B und C. Sie sind in 47% bzw. 3% der nicht menstruations-assoziierten TSS nachweisbar, in 50% der Fälle ist TSST-1 der Auslöser [10].

Das Toxin wird durch das Gen *tst* kodiert, das Molekulargewicht des reifen Proteins beträgt 22kDa. Es handelt sich um eine einzelne Polypeptidkette, die auch bei Erhitzen auf 100°C über eine Stunde keine nennenswerten Einbußen ihrer biologischen Aktivität zu verzeichnen hat und sich gegenüber Proteasen stabil zeigt [10]. Trotz seiner funktionellen Ähnlichkeit mit anderen SEs zeigt TSST-1 wenige Gemeinsamkeiten mit ihnen im Hinblick auf Gensequenz oder antikörperbindende Epitope [9]. *tst* findet sich auf der

Pathogenitätsinsel SaPII, konnte aber auch im Zusammenhang mit SaPI2 nachgewiesen werden [71, 81].

1.2.3. Accessory Gene Regulator (*agr*)

Das *agr*-System ist ein quorum sensing-System, das insbesondere die bakterielle Dichte wahrnimmt und die Produktion von Oberflächenproteinen und sezernierten Proteinen an diese anpasst [70]. Bei *S. aureus* wird über dieses System die Expression von Toxin-Genen gesteigert, die von Genen für Oberflächenproteine hingegen supprimiert [79]. So konnte z.B. gezeigt werden, dass Stämme mit einer *agr*-Mutation keine Exotoxine produzieren konnten oder diese zumindest signifikant reduziert waren [79]. Der *agr*-Genlocus kodiert für einen Zwei-Komponenten-Signalweg, dessen aktivierender Ligand, das „autoinducing peptide“ (AIP), von dieser Region kodiert wird [44]. AIP aktiviert die Synthese eines 0,5 kDa schweren Proteins, delta Hämolyisin, das durch RNAIII kodiert wird, welches der eigentliche Effektor des *agr*-Systems ist [72]. Durch eine im *agr*-Locus enthaltene hypervariable Region lassen sich vier *agr*-Typen definieren, welche untereinander kreuzreagieren und in der Lage sind, sich gegenseitig in ihrer *agr*-Aktivität zu inhibieren [40, 43]. Es wird vermutet, dass diese Form der bakteriellen Interferenz eine wichtige Rolle im Rahmen der Kolonisation und Infektion mit *S. aureus* spielt [40]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Assoziation bestimmter *agr*-Typen (I-IV) mit verschiedenen Virulenz-Genen bestand. Zum Beispiel wird ein Zusammenhang von *agr III* mit dem Vorhandensein von *tst* und von *agr IV* mit dem Vorhandensein der Exfoliativtoxine *eta* und *etb* beschrieben [40, 41]. Bei *S. aureus*-Klonen, die von CF-Patienten mit persistenter Infektion stammten, konnte keine Assoziation mit einem charakteristischen *agr*-Typ nachgewiesen werden [47]. Wurden bei Patienten mehrere *S. aureus*-Klone gleichzeitig nachgewiesen, so gehörten diese Klone nahezu immer unterschiedlichen *agr*-Gruppen an. Zwar ist zu vermuten, dass die *agr*-bezogene Interferenz zwischen Bakterien eine Rolle in der frühen Besiedlung mit *S. aureus* spielt, jedoch scheinen andere Faktoren für die erfolgreiche Kolonisation durch bestimmte Klone und deren Persistenz wichtig zu sein [47].

1.2.4. Porenbildende Toxine

S. aureus ist in der Lage vier verschiedene Zytotoxine zu produzieren, die Hämolysine α , β , γ und δ . Von den hierfür kodierenden Genen wurde nur *hlg* im Rahmen dieser Arbeit betrachtet. *hla*, welches für das wichtige Zytotoxin Hämolysin α kodiert, ist nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Weiterhin wurde das Vorhandensein des Pantone-Valentine Leukozidins, bzw. der hierfür kodierenden Region, untersucht.

PVL und Hlg bestehen aus zwei bzw. drei Untereinheiten und stellen [58] heterooligomere, porenbildende, zytolytische Toxine dar [49].

1.2.4.1. Pantone-Valentine Leukozidin (PVL)

Das Vorhandensein von PVL ist mit dem Krankheitsbild der durch *S. aureus* verursachten nekrotisierenden Pneumonie assoziiert. Diese geht einher mit Leukopenie, Hämoptysen und schweren Nekrosen des respiratorischen Epithels der Bronchien und Alveolarsepten [27, 30]. Bei *S. aureus*-Isolaten gesunder Träger ist die Prävalenz von PVL sehr gering, sie beträgt unter 1%, jedoch lässt sich das Toxin bei 50% der Stämme nachweisen, die im Zusammenhang mit Hautabszessen isoliert wurden und in über 80% der Fälle von nekrotisierender Pneumonie [58].

PVL besteht aus den zwei Untereinheiten LukF-PV (34kDa) und LukS-PV (32kDa) [75] und bindet mit hoher Spezifität an die Zellwand von polymorphkernigen Leukozyten und Makrophagen. Dadurch kommt es zur Freisetzung von Histamin aus Mastzellen, Enzymen (β -Glucuronidase, Lysozym), Chemotaxinen (Leukotriene, IL-8) und Sauerstoffmetaboliten aus neutrophilen Granulozyten. Der genaue Mechanismus, wie PVL zu Nekrose und Apoptose führt, ist bisher noch unbekannt [27], jedoch ist klar, dass dieses Protein über eine hohe zytotoxische Potenz gegenüber humanen neutrophilen Granulozyten verfügt [59]. Die für dieses Toxin kodierenden Gene *lukS-PV* und *lukF-PV* werden von temperenten Bakteriophagen (ϕ PVL) getragen [50].

1.2.4.2. Gamma-Hämolysin (Hlg)

Nahezu alle *S. aureus*-Stämme besitzen das Gen *hlg* und sind in der Lage Hlg zu exprimieren. Seine verschiedenen Subtypen (HlgA, HlgB, HlgC) haben ein Molekulargewicht von 32, 34 und 32,5kDa und können mit den zwei Untereinheiten von PVL interagieren. Die sechs verschiedenen Kombinationen aus LukF-PV, LukS-PV und den drei Hlg-Subtypen wirken unterschiedlich stark hämolytisch auf Erythrozyten vieler Säugetiere [49, 75].

1.2.5. Extrazelluläres Adhärenzprotein (Eap)

Eap, auch bekannt als Map (MHC analoges Protein), ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 72kDa, welches aus 689 AS besteht. Eine 110 AS lange Domäne wiederholt sich sechs Mal und enthält eine Subdomäne, die große Ähnlichkeit mit der N-terminalen β -Kette vieler MHC II-Moleküle aufweist [34]. Es wurde gezeigt, dass es sich bei Eap um einen wichtigen Faktor bei der Adhärenz und Internalisierung von *S. aureus* in Eukaryontenzellen handelt und dass Eap in der Lage ist, die Rekrutierung von Leukozyten zu blockieren und so Einfluss auf die Entzündungsreaktion des Organismus zu nehmen [14, 34]. Desweiteren scheint Eap bei chronischen Entzündungen maßgeblich beteiligt [56] und ein potenter Inhibitor der Angiogenese zu sein und somit eine erhebliche Rolle bei Wundheilungsstörungen zu spielen [2].

Die Prävalenz von Eap bei *S. aureus* ist außerordentlich hoch. Eine Studie von Hussain et al. beschreibt eine relative Häufigkeit von nahezu 98% [37].

1.2.6. Extrazelluläres Matrixprotein (Emp)

Bei Emp handelt es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von 38,5kDa, welches bei allen *S. aureus*-Stämmen vorkommt und 2001 erstmalig nachgewiesen wurde [38]. Bisher fehlen noch detailliertere Informationen zur genauen Funktion. Jedoch legen die bisherigen Ergebnisse nahe, dass es sich hierbei um ein Molekül aus der Gruppe der Adhärenzproteine von *S. aureus* handelt, welche Bindung an ein breites

Spektrum von extrazellulären Matrixproteinen wie Fibronectin, Fibrinogen und Vitronectin vermittelt und somit maßgeblich an der Pathogenität des Bakteriums beteiligt ist [38].

1.3. Protein A

Bei Protein A handelt es sich um ein Oberflächenprotein von *S. aureus*, welches in der Lage ist, an die F_c-Region von Immunglobulin G zu binden. Über diese „verkehrte“ Bindung wirtseigener Antikörper entzieht sich das Bakterium der Phagozytose durch Makrophagen, da das F_c-Fragment als Opsonin nicht mehr zur Verfügung steht.

1.3.1. *spa*

Die für das Staphylokokken Protein A kodierende Region ist unten schematisch dargestellt. Das *spa* Gen besteht aus 2150 bp und beinhaltet verschiedene funktionelle Regionen: Die IgG-bindende Region besteht aus vier bis fünf Domänen („Repeats“) von jeweils 160bp Länge [16, 98]. Am C-terminalen Ende des Gens befindet sich eine Region (X_c), welche für den Teil des Proteins kodiert, der für die Verankerung mit der Zellwand verantwortlich ist [84]. Zwischen den beiden beschriebenen Anteilen befindet sich die hypervariable X-Region (X_r) [32]. In diesem Bereich treten eine variable Anzahl sich wiederholender Sequenzabschnitte („Repeats“) mit einer Länge von in der Regel 24bp auf. Frénay et al. beschrieben 1993 in ihrer Arbeit das Vorkommen von 3 bis 15 vollständigen Repeats [26].

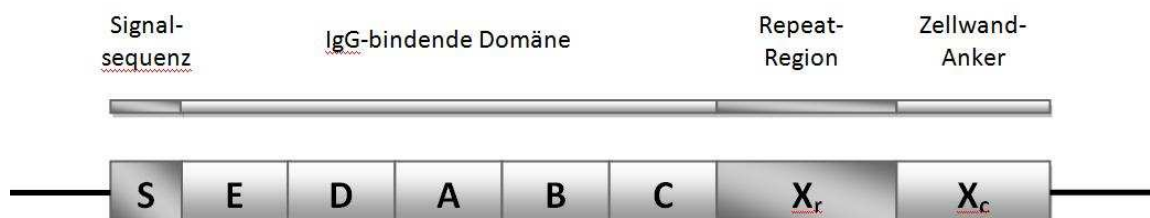


Abbildung 1: Schematische Darstellung der SpA-Region

1.3.2. *spa*-Typisierung

Bei der *spa*-Typisierung handelt es sich um eine Sequenzanalyse der hochvariablen X-Region innerhalb des *S. aureus* Protein A-Gens [48]. Mit Hilfe einer Software (Ridom StaphType™ [Ridom GmbH, Würzburg, Deutschland]) [33] ist es möglich, automatisch Sequenzen einzulesen, Repeat-Muster zu erkennen und den jeweiligen *spa*-Typen zuzuordnen [92]. Entscheidende Vorteile dieser Form der molekularen Typisierung sind die schnelle Verfügbarkeit von Ergebnissen, deren einfache Interpretation [88] und die Möglichkeit zum Vergleich der Sequenzen und *spa*-Typen verschiedener Labore via Internet (www.ridom.de/spaserver/) [48]. Die *spa*-Typisierung fungiert als genetischer Marker und lässt sich sowohl zur Analyse von Ausbrüchen einer *S. aureus*-Infektion, als auch für epidemiologische Beobachtungen [26] und Langzeitstudien einsetzen [48, 53]. Es wurde gezeigt, dass sich anhand von Übereinstimmungen in der Sequenz der Repeats gemeinsame Abstammungslinien ermitteln lassen [53]. Diese Methode konnte auch in der Analyse von persistierenden *S. aureus*-Stämmen bei CF-Patienten eingesetzt werden. So gelang z.B. der Nachweis, dass es im Schnitt alle 70 Monate zu einer unabhängigen Mutation im Bereich der Repeat-Region kam, die zu einer Änderung des *spa*-Typen führte, was zeigt, dass bei Persistenz über einen langen Zeitraum eine Weiterentwicklung und Veränderung im Bereich der Repeat-Regionen von Proteinen möglich ist [48].

1.4. Mukoviszidose

Mukoviszidose oder Zystische Fibrose (engl.: Cystic Fibrosis, CF) ist eine genetisch bedingte, autosomal-rezessive Stoffwechselerkrankung und mit einer Inzidenz von 1:2500 die häufigste lebensverkürzende genetische Erkrankung der weißen Bevölkerung. Zu Grunde liegt eine Mutation des „cystic fibrosis transmembrane regulator“ Gens, eine ca.250kDa großen Region auf dem langen Arm von Chromosom 7. Es sind mehr als tausend verschiedene Mutationen bekannt. Die mit Abstand häufigste, mit 70% aller CF-Allele, ist $\Delta F508$, eine Deletion des Basentriplets, das für Phenylalanin kodiert, an Position 508 [29].

In vitro Studien haben gezeigt, dass Mutationen des CF-Gens den cAMP- abhängigen CFTR-Kanal epithelialer Zellen auf unterschiedliche Weise beeinträchtigen können. Dies reicht von einer eingeschränkten Chlorid-Leitfähigkeit bis hin zu einem kompletten Verlust des Proteins [105]. Hiervon betroffen sind alle exokrinen Drüsen in Bronchialsystem, Pankreas, Dünndarm, Gallenwege, Gonaden und Schweißdrüsen. Der Defekt des Ionenkanals führt zu einer erniedrigten extrazellulären Chlorid-Konzentration. Zur Aufrechterhaltung des elektrochemischen Gleichgewichtes strömen Natrium und H₂O zurück in die Zellen, was zu einer Dehydratation des produzierten Sekretes im Lumen der jeweiligen Drüse führt. Die erhöhte Viskosität erschwert den Abtransport des Sekretes. Durch die Verlegung der Abflusswege und dem konsekutiven Sekretstau kommt es zu einem zystischen oder fibrotischen Umbau der Organe mit nachfolgender Insuffizienz.

In 5-10% der Fälle fallen die Patienten bereits als Neugeborene durch einen Mekoniumileus auf, welcher durch eine inadäquate Produktion von Pankreasenzymen in der Fetalperiode und eine verminderte gastrointestinale Sekretion bedingt ist. Durch das Defizit an Verdauungsenzymen kommt es zur Malabsorption, welche bei den erkrankten Kindern Gedeihstörungen verursacht. Bei Erwachsenen manifestiert sich die CF häufig mit pankreatogenem Diabetes mellitus [111]. Männliche Patienten sind in der Regel durch eine bilaterale Obliteration der Vasa deferentia infertil, bei Frauen ist die Fertilität vermindert.

Für CF-Patienten steht keine kausale Therapie zur Verfügung. Die symptomatische Therapie beinhaltet eine ausreichende NaCl-Zufuhr, Mukolyse und Drainage des zähen Bronchialsekretes. Zur Prophylaxe und Früheradikationstherapie von *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen kommen Tobramycin-Inhalationen und systemische Antibiotikatherapie zum Einsatz, im Falle einer Spastik Bronchospasmolytika. Bei Infektionen wird gezielt systemisch antibiotisch behandelt. Bei Vorliegen einer Pankreasinsuffizienz werden die Enzyme und fettlöslichen Vitamine substituiert. Bei zunehmender respiratorischer Insuffizienz besteht die Möglichkeit einer O₂-Langzeittherapie. Als ultima ratio kann eine Lungentransplantation erwogen werden.

1.5. Atemwegsinfektionen bei Mukoviszidose

In 80-95% versterben CF-Patienten an einer respiratorischen Insuffizienz, verursacht durch persistierende und rekurrende bakterielle Infektionen und die sie begleitende neutrophile Entzündungsreaktion [61]. Durch die in Kapitel 1.4 beschriebenen Veränderungen ist im respiratorischen System die mukoziliäre Clearance erheblich beeinträchtigt. Dies zeigt sich in einer Dilatation der Atemwege und der Ausbildung von Bronchiektasien. Im weiteren Verlauf treten Atelektasen und gehäuft Pneumonien auf, als Spätfolgen pulmonale Zysten und Hypertension. Die beschriebenen Veränderungen begünstigen eine Besiedlung mit pathogenen und opportunistischen Erregern [29]. Hier ist *S. aureus* nicht nur einer der ersten, sondern auch einer der häufigsten Keime, der in den Atemwegen von CF-Patienten nachweisbar ist [91] und dort für viele Jahre persistiert [11, 46]. Neben *S. aureus* ist auch *Hämophilus influenzae* bereits bei Kindern häufig nachweisbar. Für beide Erreger wird diskutiert, dass sie über eine Schädigung des respiratorischen Epithels eine vermehrte Anhaftung von *P. aeruginosa* ermöglichen, sodass *S. aureus* und *H. influenzae* als Wegbereiter für eine Infektion mit *P. aeruginosa* angesehen werden [61]. *P. aeruginosa* ist der bedeutendste Erreger in den Atemwegen älterer CF-Patienten, da er über verschiedene Mechanismen sowohl gegenüber der körpereigenen Abwehr als auch gegenüber antimikrobieller Therapeutika sehr resistent ist. So verfügt der Erreger z.B. über die Fähigkeit, Biofilme zu bilden [65] und zahlreiche potente Toxine zu produzieren [21]. Desweiteren ist *P. aeruginosa* in der Lage, einen mukoiden Phänotyp zu bilden, was sich vor allem nach längerer Infektionsdauer zeigt [12]. Der Nachweis des mukoiden Phänotyps zeigt immer eine Verschlechterung der Lungenfunktion an. Im weiteren Krankheitsverlauf lassen sich bei einigen Patienten zusätzliche Bakterien wie z.B. *Burkholderia cepacia* und *Stenotrophomonas maltophilia* nachweisen [29].

In der Regel erfolgt die Behandlung einer pulmonalen Infektion bei CF-Patienten nach Isolation des Erregers in Abhängigkeit vom entsprechenden Resistogramm. Zur Therapie der *S. aureus*-bedingten Infektionen liegen keine international anerkannten Leitlinien vor. So werden verschiedene Therapieregime unterschieden: 1. Die kontinuierliche Anti-Staphylokokken-Therapie, die nach Diagnosestellung von CF ohne Erregernachweis in einigen Zentren über mehrere Jahre oder sogar lebenslang durchgeführt wird; 2.

Die antibiotische Therapie bei Nachweis von *S. aureus* und 3. die Therapie bei Nachweis von *S. aureus* und Auftreten von Symptomen. Zwei Studien haben kürzlich aufgezeigt, dass die kontinuierliche Anti-Staphylokokkentherapie im Hinblick auf klinische Parameter wie Lungenfunktion und Gewichtszunahme keine Vorteile brachte und dass das Risiko eines früheren *P. aeruginosa* Nachweises sogar erhöht war [78, 93].

Um besser unterscheiden zu können, wann eine Therapie erforderlich ist, besteht die Notwendigkeit, eine Infektion mit *S. aureus* von einer Kolonisation zu unterscheiden. Im Rahmen der dieser Arbeit zu Grunde liegenden multizentrischen prospektiven Langzeit-Observationsstudie wird versucht, Parameter zur Unterscheidung von Kolonisation und Infektion zu identifizieren, was wichtige therapeutische Konsequenzen hätte. Bisher liegen nur sehr wenige Daten zum Vorkommen wichtiger Virulenzfaktoren bei *S. aureus*-Isolaten von Mukoviszidose-Patienten vor. Der Nachweis solcher Virulenzfaktoren und ihre Betrachtung im zeitlichen Verlauf sind Gegenstand dieser Arbeit und sollen im Folgenden erörtert werden.

2. Fragestellung

Es ist nicht bekannt, ob eine Infektion der CF-Patienten durch *S. aureus* mit dem Auftreten von Stämmen mit einer besonderen Toxin-Ausstattung assoziiert ist. Da die Toxine aber eine erhebliche Rolle in der Pathogenese von *S. aureus*-bedingten Infektionen spielen und der Erreger den Respirationstrakt dieser Patienten häufig über einen langen Zeitraum kolonisiert, soll diese Arbeit klären, wie es sich mit der Toxin-Ausstattung klinischer Isolate von CF-Patienten mit chronischer *S. aureus*-Infektion bzw. -Kolonisation verhält. Im Einzelnen soll folgenden Fragen nachgegangen werden:

1. Wie hoch ist die Prävalenz der untersuchten Virulenzfaktoren im betrachteten Kollektiv?
2. Unterscheidet sich die Prävalenz bestimmter Virulenzfaktoren in den einzelnen Untersuchungsmaterialien (Nasen-, Rachenabstriche, Sputum) voneinander?
3. Bestehen Unterschiede in der Toxin-Ausstattung zwischen *S. aureus*-Isolaten der vier *agr*-Gruppen?
4. Gibt es Assoziationen zwischen verschiedenen Toxin-Genen?

Desweiteren soll die Toxin-Ausstattung der häufigsten *S. aureus*-Klone im Verlauf beurteilt werden, um Aussagen über die Entwicklung der Toxin-Ausstattung treffen und folgenden Aspekt betrachten zu können:

5. Findet bei persistierender Kolonisation/ Infektion mit *S. aureus* ein Zugewinn oder Verlust von Virulenzfaktoren statt?

Außerdem werden die häufigsten *spa*-Typen betrachtet, um folgende Fragen zu klären:

6. Zeigen sich Variationen der Toxin-Ausstattung bei verschiedenen Isolaten desselben *spa*-Typs in einem Material?
7. Lässt sich eine unterschiedliche Toxin-Ausstattung bei Isolaten desselben *spa*-Typs von verschiedenen Patienten nachweisen?

Im Anschluss sollen die Daten zu den nachgewiesenen Toxinen mit klinischen Daten korreliert werden, um eine Aussage treffen zu können, ob ein Zusammenhang zwischen der Toxin-Ausstattung und der klinischen Situation der Patienten besteht.

3. Experimentelle Untersuchungen: Material und Methoden

3.1. Bakterienstämme und Patienten

Die untersuchten Stämme wurden im Rahmen einer multizentrischen Studie zur Unterscheidung einer Kolonisation von einer Infektion der Atemwege von CF-Patienten mit *S. aureus* im Zeitraum von Juli 2008 bis Dezember 2009 gesammelt. In die Studie eingeschlossen wurden 160 CF Patienten, die älter als sechs Jahre waren, bei denen innerhalb des letzten Jahres vor Einschluss in die Studie über mindestens sechs Monate *S. aureus* aus den Atemwegen nachgewiesen werden konnte. Zu den Ausschlusskriterien zählten eine Kolonisation oder Infektion mit *P. aeruginosa* oder *B. cepacia* über mehr als sechs Monate innerhalb eines Jahres vor Einschluss in die Studie und ein Nachweis der genannten Bakterien über ebenfalls sechs Monate im Beobachtungszeitraum.

Mittels standardisierter Fragebögen wurden klinische Daten zur Lungenfunktion, dem Body Mass Index und erfolgten oder eingeleiteten antibiotischen Therapien erhoben. Weiterhin wurden die Patienten nach ihrem subjektiven Krankheitsgefühl befragt. Diese Erhebung wurde bei der Erstvorstellung der Patienten und auch bei jeder weiteren Konsultation im Studienverlauf durchgeführt.

Die Bakterien wurden aus Nasen- und Rachenabstrichen, sowie aus Sputum isoliert und nach Morphotypen charakterisiert. Beurteilt wurden hierbei das Wachstum auf Blut- und Schädleragar hinsichtlich Hämolyse, Pigmentierung, Größe und Konsistenz. Mittels *spa*-Typisierung wurden die insgesamt 1169 Stämme molekulargenetisch identifiziert. Für jeden Patienten mit *S. aureus*-Nachweis wurde mindestens ein Isolat eines Klones in die Auswertung eingeschlossen, im Falle eines Nachweises mehrerer verschiedener Klone wurde jeder unterschiedliche Klon in die Auswertung einbezogen. Zeigten sich Unterschiede im Profil der untersuchten Virulenzfaktoren bei unterschiedlichen Morphotypen eines Klons desselben Patienten, so wurden auch diese Isolate mit in die Analyse aufgenommen. Ausgewertet wurden schließlich 333 Stämme von 134 Patienten mit *S. aureus*-Nachweis. Hierbei handelte es sich um 47 weibliche und 82 männliche Patienten, die zum Zeitpunkt des Einschlusses in die Studie im Durchschnitt 16 Jahre alt waren. Von fünf Patienten lagen die Daten zu Alter und Geschlecht nicht vor, so dass diese nicht in die demographische Auswertung eingeschlossen werden konnten. Bei 26

der 160 eingeschlossenen Patienten konnte *S. aureus* bislang nicht nachgewiesen werden.

In einer erweiterten Analyse wurde das Vorkommen der Virulenzfaktoren im Verlauf beobachtet. Hierfür wurden die Daten von 10 Patienten ausgewertet, von denen im Rahmen der Studie bereits viermal, im zeitlichen Rahmen von ungefähr einem Jahr, Materialien gewonnen wurden. Es handelte sich um 4 weibliche und 6 männliche Patienten, die bei Einschluss in die Studie durchschnittlich 16 Jahre alt waren.

Weiterhin wurden die Klone mit den häufigsten nachgewiesenen *spa*-Typen hinsichtlich ihrer Ausstattung mit den untersuchten Toxin-Genen betrachtet. Hierbei handelte es sich um Isolate mit den *spa*-Typen t002 (11x nachgewiesen), t008 (10x), t015 (14x), t084 (28x) und t091 (17x).

In einer letzten Analyse wurde versucht, einen Zusammenhang zwischen klinischer Situation der Patienten und der Toxin-Ausstattung herzustellen. Hierfür wurden exemplarisch vier Patienten mit einer klinisch manifesten Infektion ausgewählt und die Toxin-Ausstattung der entsprechenden *S. aureus*-Stämme betrachtet. Als Kriterien für eine klinisch manifeste Infektion galten folgende Bedingungen:

1. Vorliegen einer Exazerbation
2. Vorliegen einer Infektion
3. Angabe des Patienten zum Auftreten eines mittelstarken oder ausgeprägten Krankheitsgefühls

Die ersten beiden Kriterien wurden durch den Prüfarzt mittels standardisierter Fragebögen beurteilt. Hierbei wurden folgende klinischen Daten erfasst:

- Veränderungen von Volumen, Farbe oder Konsistenz des Sputums
- Zunehmender Husten
- Malaise, Fatigue, Lethargie
- Körpertemperatur > 38°C
- Neu aufgetretene oder zunehmende Hämoptysen
- Gewichtsverlust/ Anorexie
- Schmerzen der Sinus oder veränderter Nasenausfluss

- Veränderung des auskultatorischen Befundes
- Abnahme der Lungenfunktion um > 10% (FEV₁, MEF25) des Ausgangswertes
- Röntgenologische Hinweise auf eine pulmonale Infektion

Die letzte Bedingung konnte durch den Patienten angegeben werden und wurde bei jeder Untersuchung erfragt.

3.2. *spa*-Typisierung

Vor Beginn der eigentlichen *spa*-Sequenzierung ist eine Lyse der DNA aus den Bakterienstämmen notwendig. Hierfür wurde das InstaGene Matrix Kit (BioRad, München, Deutschland) verwendet. 20µl des Lysates wurden für die Amplifikation mittels PCR verwendet. Bei den eingesetzten Primern handelt es sich um *spa*-1113f (5'-TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC-3') und *spa*-1514r (5'-CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT-3'). Nach enzymatischer Reinigung des Produktes erfolgte die Sequenzierung mittels ABI 3100 Avant Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, Ca.). Zur anschließenden Bestimmung der *spa*-Typen wurde die in der Einleitung bereits erwähnte Ridom StaphTypeTM Software (Ridom GmbH, Würzburg, Deutschland) verwendet.

3.3. PCR und Agarosegel-Elektrophorese

Das Verfahren der Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) wurde 1984 von Kary Mullis entwickelt [67]. Sie dient der Amplifikation spezifischer Sequenzen und wird heutzutage vielfach in Forschung und Diagnostik eingesetzt. Der erste Schritt ist die Denaturierung des DNA-Doppelstrangs des zu untersuchenden Erregers durch Erhitzen auf 95°C. Nach raschem Abkühlen auf, je nach PCR-Protokoll, 55-60°C setzen die komplementären Primer (Oligonukleotide mit 15-25 Basen) an den 3'-Enden der DNA-Stücke, die amplifiziert werden sollen, an. Um eine unspezifische Hybridisierung zu verhindern wird die Temperatur auf 72°C erhöht. Durch eine Taq-Polymerase werden die Einzelstränge mit den zugesetzten Desoxyribonukleotiden (dNTPs) komplementiert, so dass nach Abschluss der Reaktion doppelt so viele DNA-Stränge vorhanden sind wie zu Beginn. Diese Schritte werden 30 Mal wiederholt, so dass eine ausreichende Menge Amplifikat vorliegt um im Anschluss mittels Gelelektrophorese das Vorhandensein der gesuchten Sequenzen zu prüfen.

Das Prinzip der Gelelektrophorese beruht auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit verschieden großer DNA-Fragmente. Die negativ geladenen Fragmente wandern von der Kathode zur Anode und zwar umso schneller, je geringer ihre molekulare Masse ist.

Zur Herstellung eines zweiprozentigen Agarosegels wurden 4,5mg Agarose mit 225ml TEA-Puffer (Tris-Acetat-EDTA) aufgekocht (entspricht 0,02g Agarose/ml). Die Flüssigkeit wurde auf ein mit Aussparungen für die Taschen versehenes Trägertablett gegossen und erstarrte beim Abkühlen.

Nach abgeschlossener PCR wurden 8µl des Amplifikates entnommen und zusammen mit 8µl GEBS-Puffer in eine Tasche des in einer Laufkammer vorbereiteten Agarosegels pipettiert. In die äußersten Vertiefungen einer Reihe wurden Marker (1kb + 100bp ladder, Biolabs) aufgetragen. Mittels Elektrophoresegerät (BioRad Power Pac) wurden bei 400mA abhängig von der Anzahl der zu erwartenden Banden für 40 bis 60 min 160V appliziert. Nach Ablauf der Elektrophorese wurden die Gele in Ethidiumbromid gefärbt, unter UV-Licht betrachtet und fotografiert.

Die Negativkontrollen wurden jeweils in der vierten Reihe des Trägertabletts aufgetragen, so dass diese auf den Abbildungen nicht erfasst sind, da hier Gele aus den davor liegenden Reihen fotografiert wurden.

Virulenzfaktor	Primer	Sequenz (5'→3')	Referenz
<i>sea</i>	SEA-3	CCTTTGGAAACGGTTAAAACG	[6]
	SEA-4	TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC	
<i>seb</i>	SEB-1	TCGCATCAAACCTGACAAACG	[6]
	SEB-4	GCAGGTACTCTATAAGTGCCTGC	
<i>sec</i>	SEC-3	CTCAAGAAGTAGACATAAAAGCTAGG	[6]
	SEC-4	TCAAAATCGGATTAACATTATCC	
<i>sed</i>	SED-3	CTAGTTTGGTAATATCTCCTTTAAACG	[6]
	SED-4	TTAATGCTATATCTTATAGGGTAAACATC	
<i>see</i>	SEE-2	TAACCTACCGTGGACCCTTC	[6]
	SEE-3	CAGTACCTATAGATAAAGTTAAAACAAGC	
<i>eta</i>	ETA-3	CTAGTGCATTTGTTATTCAAGACG	[6]
	ETA-4	TGCATTGACACCATAGTACTTATTC	
<i>etb</i>	ETB-3	ACGGCTATATACATTCAATTCAATG	[6]
	ETB-4	AAAGTTATTCATTTAATGCACTGTCTC	
<i>tst</i>	TST-3	AAGCCCTTTGTTGCTTGCG	[6]
	TST-6	ATCGAACTTTGGCCATACTTT	
<i>seg</i>	SEG-1	AATGCTCAACCCGATCCTA	[5]
	SEG-4	CTTCCTTCAACAGGTGGAGAC	
<i>seh</i>	SEH-1	TTAGAAATCAAGGTGATAGTGGC	[5]
	SEH-2	TTTTGAATACCATCTACCCAAAC	
<i>sei</i>	SEI-1	GCCACTTTATCAGGACAATACTT	[5]
	SEI-2	AAAACCTTACAGGCAGTCCATCTC	
<i>sej</i>	SEJ-1	CTCCCTGACGTTAACTACTAATAA	[5]
	SEJ-2	TTGTCTGGATATTGACCTATAACATT	
<i>agr</i>	AGRSA-KON1	ATGCACATGGTGCACATGC	[57]
	AGRSA1-2	GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT	
	AGRSA2-2	TATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC	
	AGRSA3-2	GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCAG	
	AGRSA4-2	CGATAATGCCGTAATACCCG	
<i>pvl</i>	PVL-1	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	[103]
	PVL-2	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC	
<i>hlg</i>	HLG-1	GCCAATCCGTTATTAGAAAATGC	[103]
	HLG-2	CCATAGAAGTAGCAACGGAT	
<i>eap</i>	EAP-CON1	TACTAACGAAGCATCTGCC	[39]
	EAP-CON2	TTAAATCGATATCACTAATACCTC	
<i>emp</i>	EMP-1	AATAATCGCGTGAATGTAG	[38]
	EMP-2	CGTAGTAATGAAGTGGTGGT	

Tabelle 1: Sequenzen der verwendeten Primer

3.3.1. *sea-see*

Die Gene der Enterotoxine SEA-SEE wurden mittels Multiplex-PCR nachgewiesen [6]. Hierfür wurde ein Reaktionsmix mit 32µl H₂O (Merck, Darmstadt), 5µl 10xPuffer in MgCl₂, 8µl MgCl₂ (beides Qiagen, Hilden) und 1µl dNTP (Qbiogene, Foster City, Ca.) angesetzt. Als Primer wurden jeweils 0,25µl von SEA 3 und 4, SEB 1 und 4, SEC 3 und 4, SED 3 und 4 und SEE 2 und 3 (alle Eurofins MWG Synthesis GmbH, Ebersberg) zugefügt, außerdem 0,5µl einer Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden). Zu den 49µl dieses Mixes wurde 1µl des zu untersuchenden DNA-Lysates pipettiert. Der gesamte Ansatz wurde in einem Thermocycler (iCycler, BioRad, Hercules, USA) nach initialer Denaturierung bei 95°C für 15 min in 30 Zyklen prozessiert. Jeder Zyklus bestand aus einer 1 min Denaturierung bei 95°C, einem 1 min Annealing bei 60°C und einer Extensionsphase von 2 min Dauer. An den letzten Zyklus schlossen sich noch weitere 10 min bei 72°C an. Als Kontrollen wurden die Stämme KN556, *S. aureus* 62/69 und 1229/93, ATCC 23235 und ATCC 27664 eingesetzt.

Reaktionsmix	
H ₂ O (Merck, Darmstadt)	32µl
10xPuffer in MgCl ₂ (Qiagen, Hilden)	5µl
MgCl ₂ (Qiagen, Hilden)	8µl
dNTP (Qbiogene)	1µl
SEA 3+4 (MWG Synthesis GmbH)	jew. 0,25µl
SEB 1+4 (MWG Synthesis GmbH)	jew. 0,25µl
SEC 3+4 (MWG Synthesis GmbH)	jew. 0,25µl
SED 3+4 (MWG Synthesis GmbH)	jew. 0,25µl
SEE 2+3 (MWG Synthesis GmbH)	jew. 0,25µl
Taq-Polymerase (Qiagen)	0,5 µl

Tabelle 2: Ansatz für Multiplex-PCR der Enterotoxine A bis E

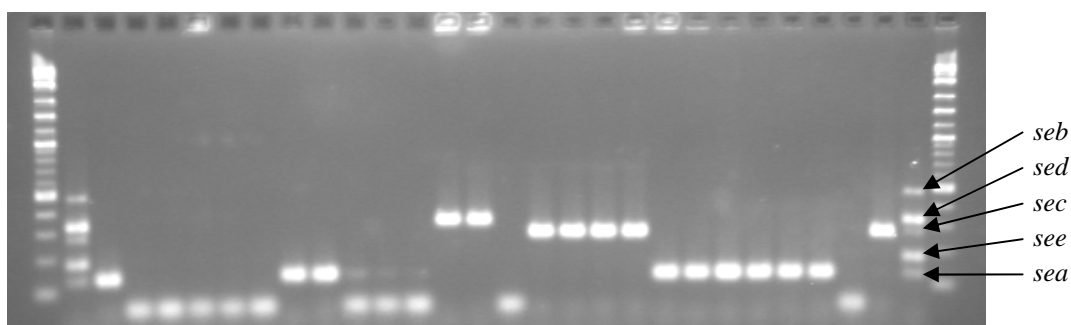


Abbildung 2: Agarosegel-Elektrophorese der PCR für *sea* bis *see*

3.3.2. *eta*, *etb* und *tst*

Die Exfoliativtoxine A und B, sowie TSST-1 wurden ebenfalls mittels Multiplex-PCR untersucht [6]. Für den Reaktionsmix wurden 33µl H₂O (Merck, Darmstadt), 5µl 10xPuffer in MgCl₂, 8µl MgCl₂ (beides Qiagen, Hilden) und 1µl dNTP (Qbiogene, Foster City, Ca.) gemischt. Hinzugefügt wurden jeweils 0,25µl der Primer ETA 3 und 4, ETB 3 und 4 und TST 3 und 6 (alle Eurofins MWG Synthesis GmbH, Ebersberg), sowie 0,5µl Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden). Zu den 49µl des Gemisches wurde 1µl des DNA-Lysates pipettiert. Der Ansatz wurde in einem Thermocycler (iCycler, BioRad, Hercules, USA) nach demselben Schema wie das der Enterotoxine amplifiziert. Zur Kontrolle wurden die Stämme *S. aureus* 456/7/8, BM 10431 und KN 813 verwendet.

Reaktionsmix	
H ₂ O (Merck, Darmstadt)	33µl
10xPuffer in MgCl ₂ (Qiagen)	5µl
MgCl ₂ (Qiagen)	8µl
dNTP (Qbiogene)	1µl
ETA 3+4 (MWG Synthesis GmbH)	jew. 0,25µl
ETB 3+4 (MWG Synthesis GmbH)	jew. 0,25µl
TST 3+6 (MWG Synthesis GmbH)	jew. 0,25µl
Taq (Qiagen)	0,5µl

Tabelle 3: Ansatz für Multiplex-PCR der Exfoliativtoxine A und B, TSST

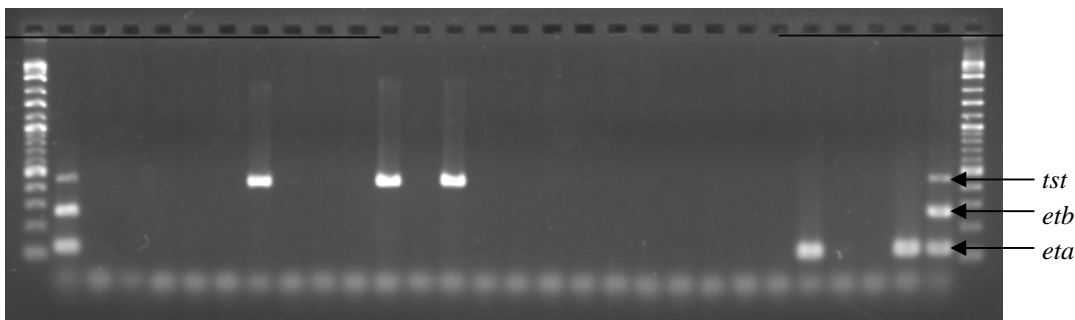


Abbildung 3: Agarosegel-Elektrophorese der PCR für *eta*, *etb* und *tst*

3.3.3. *seg-sej*

Das Vorkommen dieser vier Enterotoxine wurde ebenfalls mittels Multiplex-PCR untersucht [5]. Der Reaktionsmix setzte sich zusammen aus 32µl H₂O (Merck, Darmstadt), 5µl 10xPuffer in MgCl₂, 8µl MgCl₂ (beides Qiagen, Hilden) und 1µl dNTP (Qbiogene, Foster City, Ca.). Zugesetzt wurden jeweils 0,25µl der Primer SEG 1 und 2, SEH 1 und 2, SEI 1 und 2 und SEJ 1 und 2 (alle Eurofins MWG Synthesis GmbH, Ebersberg), sowie 0,5µl Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden). Diesem Ansatz wurde 1µl des zu untersuchenden DNA-Lysates hinzugefügt und das Gemisch in 30 Zyklen in einem Thermocycler (iCycler, BioRad, Hercules, USA) amplifiziert. Die Zyklen entsprachen denen der PCR für die Enterotoxine *sea-see*. Zur Kontrolle wurden die Stämme MJB 1316, ATCC 51811, FRI 445 und FRI 1472 eingesetzt.

Reaktionsmix	
H ₂ O (Merck, Darmstadt)	32µl
10xPuffer in MgCl ₂ (Qiagen)	5µl
MgCl ₂ (Qiagen)	8µl
dNTP (Qbiogene)	1µl
SEG 1+2 (MWG Synthesis GmbH)	jew. 0,25µl
SEH 1+2 (MWG Synthesis GmbH)	jew. 0,25µl
SEI 1+2 (MWG Synthesis GmbH)	jew. 0,25µl
SEJ 1+2 (MWG Synthesis GmbH)	jew. 0,25µl
Taq-Polymerase (Qiagen)	0,5µl

Tabelle 4: Ansatz für Multiplex-PCR der Enterotoxine G bis J

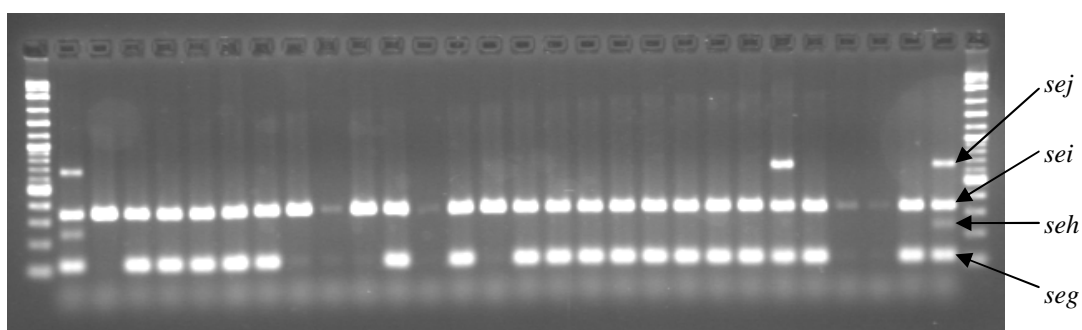


Abbildung 4: Agarosegel-Elektrophorese der PCR für *seg* bis *sej*

3.3.4. *agr*

Der Reaktionsmix für die *agr*-PCR enthielt 40,5µl H₂O (Merck, Darmstadt), 5µl 10xPuffer in MgCl₂ und 1µl dNTP (beides Qbiogene, Foster City, USA). Als Primer wurden 1µl AGRSA kon-1 und jeweils 0,25µl AGRSA 1-2, 2-2, 3-2 und 4-2 (alle Eurofins MWG Synthesis GmbH, Ebersberg) zugesetzt, sowie 0,5µl Taq-Polymerase (Qbiogene, Foster City, USA). Ebenfalls wurde 1µl DNA-Lysat hinzugefügt. Der Ansatz wurde im Thermocycler (iCycler, BioRad, Hercules, USA) nach 5 min initialer Denaturierung bei 95°C über 30 Zyklen amplifiziert. Ein Zyklus begann mit einer 1 min Denaturierungsphase bei 95°C, gefolgt von einem Annealing bei 55°C über 1min und einer 2 min Extensionsphase bei 72°C. Nach Durchlaufen der Zyklen schloss sich nochmals eine Extensionsphase von 10 min Dauer bei 72°C an. Zur Kontrolle wurde die DNA der Stämme RNI, RN 6607, RN 3904 und RN 4850 verwendet.

Reaktionsmix	
H ₂ O (Merck, Darmstadt)	40,5µl
10xPuffer in MgCl ₂ (Qbiogene)	5µl
dNTP (Qbiogene)	1µl
AGRSA-kon1 (MWG Synthesis GmbH)	1µl
AGRSA 1-2 (MWG Synthesis GmbH)	0,25µl
AGRSA 2-2 (MWG Synthesis GmbH)	0,25µl
AGRSA 3-2 (MWG Synthesis GmbH)	0,25µl
AGRSA 4-2 (MWG Synthesis GmbH)	0,25µl
Taq-Polymerase (Qbiogene)	0,5µl

Tabelle 5: Ansatz für *agr*-PCR

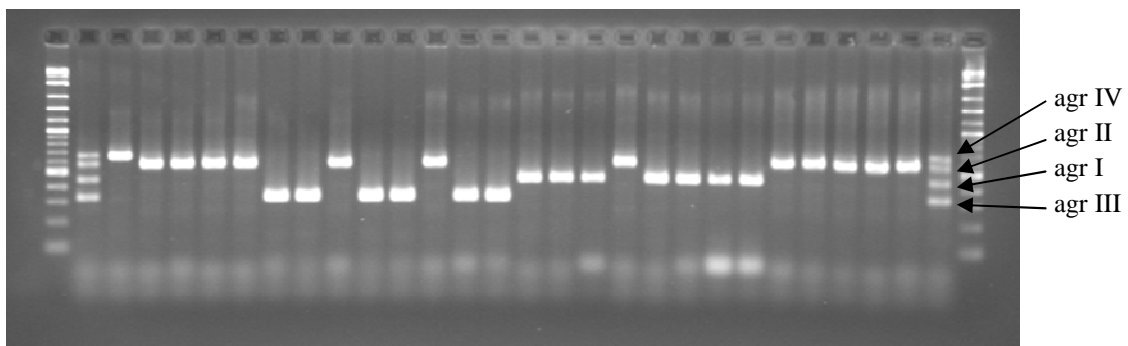


Abbildung 5: Agarosegel-Elektrophorese der PCR für *agr*

3.3.5. *pvl* und *hlg*

Für diese PCR wurden 40,5µl H₂O (Merck, Darmstadt), 5µl 10xPuffer in MgCl₂ und 1µl dNTP (beides Qbiogene) pipettiert und jeweils 0,5µl der Primer PVL 1 und 2 und HLG 1 und 2 (alles Eurofins MWG Synthesis GmbH, Ebersberg), sowie 0,25µl Taq-Polymerase (Qbiogene) hinzugefügt. Dem wurde 1µl des zu untersuchenden DNA-Lysates zugesetzt und der Ansatz im Thermocycler (iCycler, BioRad, Hercules, USA) nach dem gleichen Schema wie das der PCR für *agr* amplifiziert. Lediglich die Annealing-Temperatur wurde variiert und betrug 56°C. Die Kontrollen wurden mit den Stämmen *S. aureus* 703/08 (positiv für *pvl* und *hlg*) und ATCC 29213 (nur *hlg* positiv) durchgeführt.

Reaktionsmix	
H ₂ O (Merck, Darmstadt)	40,5µl
10xPuffer in MgCl ₂ (Qbiogene)	5µl
dNTP (Qbiogene)	1µl
PVL 1+2 [1:10] (MWG Synthesis GmbH)	jew. 0,5µl
HLG 1+2 [1:10] (MWG Synthesis GmbH)	jew. 0,5µl
Taq-Polymerase (Qbiogene)	0,25µl

Tabelle 6: Ansatz für *pvl-hlg*-PCR

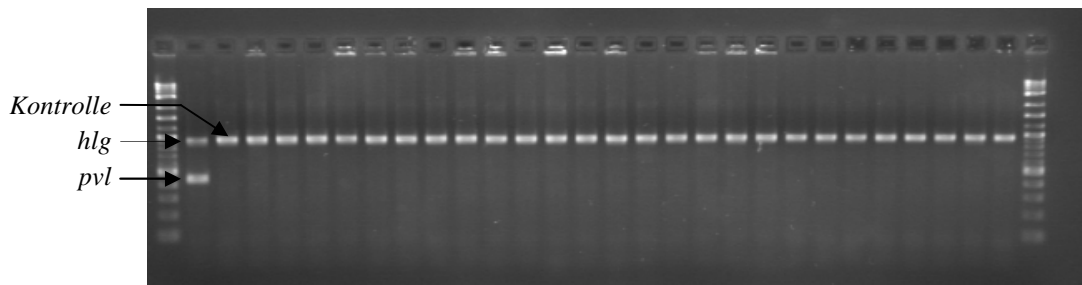


Abbildung 6: Agarosegel-Elektrophorese der PCR für *pvl* und *hlg*

3.3.6. *eap*

Für den Ansatz der *eap*-PCR wurden 41,75µl H₂O (Merck, Darmstadt), 5µl 10xPuffer in MgCl₂ und 1µl dNTP (beides Qbiogene) gemischt und jeweils 0,5µl der beiden Primer EAP-CON1 und EAP-CON2 (beides Eurofins MWG Synthesis GmbH, Ebersberg) sowie 0,25µl einer Taq-Polymerase (Qbiogene) hinzugefügt. Ebenfalls wurde 1µl des DNA-Lysates pipettiert. Der Ansatz wurde in einen Thermocycler (iCycler, BioRad, Hercules, USA) gegeben und genauso wie die PCR für *agr* prozessiert. Als Kontrollen wurden die Stämme Wood 46 und Newman eingesetzt.

Reaktionsmix	
H ₂ O (Merck, Darmstadt)	41,75µl
10xPuffer in MgCl ₂ (Qbiogene)	5µl
dNTP (Qbiogene)	1µl
EAP-CON 1 (MWG Synthesis GmbH)	0,5µl
EAP-CON 2 (MWG Synthesis GmbH)	0,5µl
Taq-Polymerase (Qbiogene)	0,25µl

Tabelle 7: Ansatz für *eap*-PCR

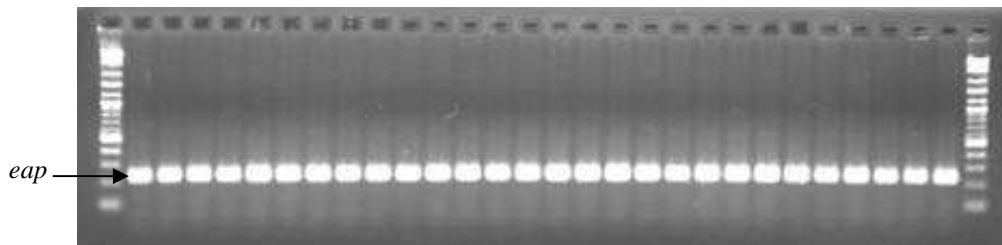


Abbildung 7: Agarosegel-Elektrophorese der PCR für *eap*

3.3.7. *emp*

Der Ansatz für die *emp*-PCR bestand aus 41,5µl H₂O (Merck, Darmstadt), 5µl 10xPuffer in MgCl₂ und 1µl dNTP (beides Qbiogene). Er enthielt desweiteren jeweils 0,5µl der Primer EMP 1 und 2 (Eurofins MWG Synthesis GmbH, Ebersberg) und 0,5µl Taq-Polymerase (Qbiogene). Nach Zusatz von 1µl DNA-Lysat durchlief der Ansatz die gleichen Zyklen wie die PCR für *agr*, mit einer abweichenden Annealing-Temperatur von 58°C. Als Kontrollen wurden auch hier die Stämme Newman und Wood 46 verwendet.

Reaktionsmix	
H ₂ O (Merck, Darmstadt)	41,5µl
10xPuffer in MgCl ₂ (Qbiogene)	5µl
dNTP (Qbiogene)	1µl
EMP 1 (MWG Synthesis GmbH)	0,5µl
EMP 2 (MWG Synthesis GmbH)	0,5µl
Taq-Polymerase (Qbiogene)	0,5µl

Tabelle 8: Ansatz für *emp*-PCR

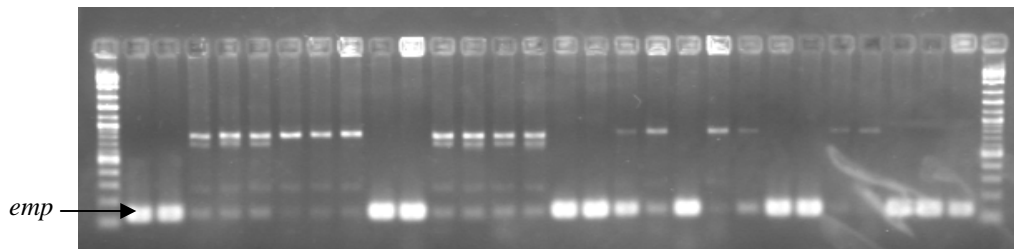


Abbildung 8: Agarosegel-Elektrophorese der PCR für *emp*

4. Ergebnisse

Zur Betrachtung der Häufigkeiten und Verteilungsmuster der Virulenzfaktoren bei Erstuntersuchung wurden schließlich 333 Isolate (n=333) von 134 Patienten ausgewertet. Bei 26 der 160 betrachteten Patienten war *S. aureus* bisher nicht nachzuweisen. Es ließen sich pro Patient maximal vier verschiedene *S. aureus*-Klone mittels *spa*-Typisierung unterscheiden. Bei 81 der 134 Patienten war lediglich ein Klon nachweisbar. 39 Patienten wiesen 2 unterschiedliche Klone auf, bei 11 Patienten waren 3 Klone nachzuweisen und 3 Patienten zeigten 4 unterschiedliche Klone.

Anzahl <i>S. aureus</i> -Klone	1	2	3	4
Patienten (n=134)	81	39	11	3

Tabelle 9: Anzahl der *S. aureus*-Klone

4.1. Häufigkeiten und Verteilungsmuster der Virulenzfaktoren bei Erstuntersuchung

4.1.1. Allgemeine Häufigkeiten

Bei den untersuchten Isolaten (n= 333) wurden die betrachteten Virulenzfaktoren mit folgenden Häufigkeiten nachgewiesen:

Virulenzfaktor	Häufigkeit (%)	Virulenzfaktor	Häufigkeit (%)	Virulenzfaktor	Häufigkeit (%)
<i>sea</i>	39 (12%)	<i>tst</i>	59 (18%)	<i>agrIII</i>	58 (17%)
<i>seb</i>	2 (1%)	<i>seg</i>	209 (63%)	<i>agrIV</i>	14 (4%)
<i>sec</i>	52 (16%)	<i>seh</i>	22 (7%)	<i>pvl</i>	1 (<0,5%)
<i>sed</i>	20 (6%)	<i>sei</i>	212 (64%)	<i>hlg</i>	333 (100%)
<i>see</i>	2 (1%)	<i>sej</i>	16 (5%)	<i>eap</i>	333 (100%)
<i>eta</i>	5 (2%)	<i>agrI</i>	166 (50%)	<i>emp</i>	333 (100%)
<i>etb</i>	2 (1%)	<i>agrII</i>	91 (27%)		

Tabelle 10: Häufigkeitsverteilung der Virulenzfaktoren (VF) insgesamt

Die Gene *hlg*, *eap* und *emp* waren bei allen untersuchten Isolaten nachzuweisen (100%). Die häufigsten nachgewiesenen Enterotoxine waren *seg* (63%) und *sei* (64%), gefolgt von *sec* (16%) und *sea* (12%). *tst* war bei 18% der untersuchten Isolate nachweisbar. Selten nachgewiesene Toxin-Gene waren *seb* (1%), *see* (1%), *eta* (2%), *etb* (1%) und *pvl* (<0,5%).

agr I war mit 50% die häufigste nachgewiesene *agr*-Spezifitätsgruppe, gefolgt von *agr II* (27%), *III* (17%) und *IV* (4%). 2% der untersuchten Isolate konnten keinem *agr*-Typ zugeordnet werden.

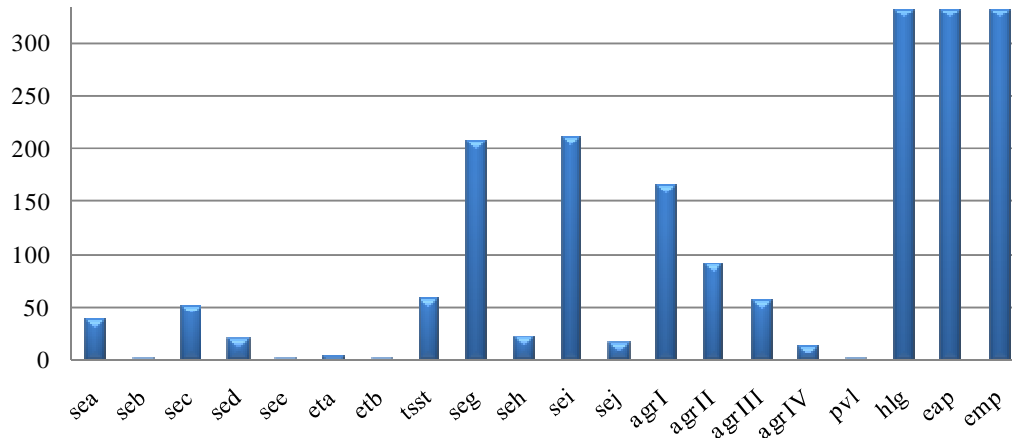


Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung der Virulenzfaktoren (VF) (absolut)

4.1.2. Verteilung der Virulenzfaktoren nach Materialien

Die Verteilung der Virulenzfaktoren den verschiedenen untersuchten Materialien zugeordnet:

Virulenzfaktor	Nase (n= 117)			Rachen (n= 140)			Sputum (n= 76)		
	Nase (n= 117)	Rachen (n= 140)	Sputum (n= 76)	Virulenzfaktor	Nase (n= 117)	Rachen (n= 140)	Sputum (n= 76)		
<i>sea</i>	14 (12%)	14 (10%)	11 (14%)	<i>sei</i>	80 (68%)	82 (59%)	50 (66%)		
<i>seb</i>	1 (<1%)	0 (0%)	1 (1%)	<i>sej</i>	7 (6%)	6 (4%)	3 (4%)		
<i>sec</i>	21 (18%)	22 (16%)	9 (12%)	<i>pvl</i>	1 (<1%)	0 (0%)	0 (0%)		
<i>sed</i>	9 (8%)	9 (6%)	2 (3%)	<i>hlg</i>	117 (100%)	140 (100%)	76 (100%)		
<i>see</i>	1 (<1%)	1 (<1%)	0 (0%)	<i>agrI</i>	58 (50%)	71 (51%)	37 (49%)		
<i>eta</i>	2 (2%)	1 (<1%)	2 (3%)	<i>agrII</i>	29 (25%)	41 (29%)	21 (28%)		
<i>etb</i>	1 (<1%)	1 (<1%)	0 (0%)	<i>agrIII</i>	21 (18%)	22 (16%)	15 (20%)		
<i>tst</i>	19 (16%)	27 (19%)	13 (17%)	<i>agrIV</i>	7 (6%)	4 (3%)	3 (4%)		
<i>seg</i>	78 (67%)	81 (58%)	50 (66%)	<i>eap</i>	117 (100%)	140 (100%)	76 (100%)		
<i>seh</i>	5 (4%)	10 (7%)	7 (9%)	<i>emp</i>	117 (100%)	140 (100%)	76 (100%)		

Tabelle 11: Ortsspezifische Häufigkeitsverteilung der Virulenzfaktoren

Die Häufigkeitsverteilung der Virulenzfaktoren unterschied sich in den Materialien nicht signifikant (χ^2 -Test nach Pearson). Dennoch zeigten sich geringe Unterschiede in

der Verteilung. *sec* konnte in 12% der Sputa nachgewiesen werden, jedoch in 16 bzw. 18% aller Rachen- bzw. Nasenabstriche. *sed* war in 3% aller Sputa nachzuweisen, aber in 6 bzw. 9% aller Rachen- bzw. Nasenabstriche. *seg* war bei 66 bzw. 67% der Nasenabstriche bzw. Sputa nachweisbar und bei 58% der Rachenabstriche. Eine ähnliche Verteilung zeigte sich für *sei*. Hier waren 68% der Nasenabstriche positiv für *seg*, 66% der Sputa und 59% der Rachenabstriche.

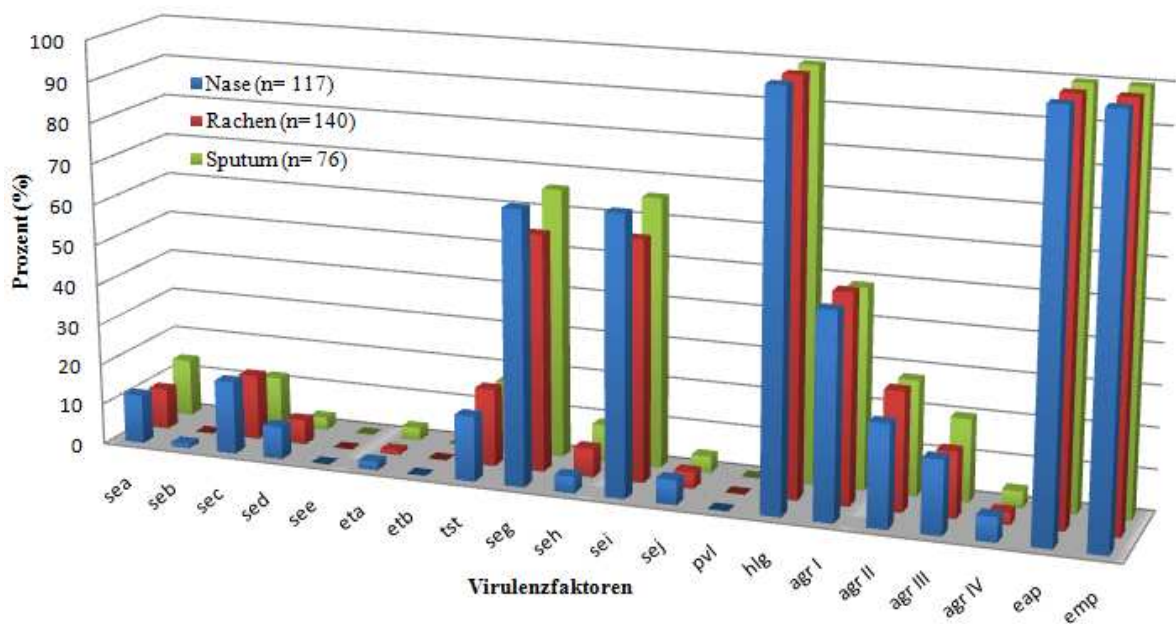


Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung der VF (nach Materialien)

4.1.3. Verteilung der Virulenzfaktoren nach *agr*-Typen

Die Verteilung der Virulenzfaktoren nach *agr*-Typen unterschied sich in einigen Fällen signifikant (χ^2 -Test nach Pearson). *sec* zeigte sich signifikant häufiger bei Isolaten der *agr*-Gruppe I ($p < 0,05$), die Häufigkeit von *eta* war hochsignifikant bei Isolaten der *agr*-Gruppe IV ($p < 0,05$) und *sea*, *tst* und *seh* traten signifikant häufiger bei Isolaten der *agr*-Gruppe III auf (beide $p < 0,05$).

Virulenzfaktor	agr I (n=166)				agr II (n=91)				agr III (n=58)				agr IV (n=14)			
	agr I (n=166)	agr II (n=91)	agr III (n=58)	agr IV (n=14)	agr I (n=166)	agr II (n=91)	agr III (n=58)	agr IV (n=14)	agr I (n=166)	agr II (n=91)	agr III (n=58)	agr IV (n=14)	agr I (n=166)	agr II (n=91)	agr III (n=58)	agr IV (n=14)
<i>sea</i>	15 (9%)	2 (2%)	22 (38%)	0 (0%)	103 (62%)	46 (51%)	49 (84%)	11 (79%)	4 (2%)	0 (0%)	18 (31%)	0 (0%)	104 (63%)	46 (51%)	49 (84%)	13 (93%)
<i>seb</i>	0 (0%)	1 (1%)	1 (2%)	0 (0%)	11 (7%)	4 (4%)	0 (0%)	1 (7%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)
<i>sec</i>	49 (30%)	2 (2%)	1 (2%)	0 (0%)	166 (100%)	91 (100%)	58 (100%)	14 (100%)	166 (100%)	91 (100%)	58 (100%)	14 (100%)	166 (100%)	91 (100%)	58 (100%)	14 (100%)
<i>sed</i>	14 (8%)	4 (4%)	2 (3%)	0 (0%)	166 (100%)	91 (100%)	58 (100%)	14 (100%)	166 (100%)	91 (100%)	58 (100%)	14 (100%)	166 (100%)	91 (100%)	58 (100%)	14 (100%)
<i>see</i>	2 (1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	166 (100%)	91 (100%)	58 (100%)	14 (100%)	166 (100%)	91 (100%)	58 (100%)	14 (100%)	166 (100%)	91 (100%)	58 (100%)	14 (100%)
<i>eta</i>	0 (0%)	1 (1%)	0 (0%)	4 (29%)	166 (100%)	91 (100%)	58 (100%)	14 (100%)	166 (100%)	91 (100%)	58 (100%)	14 (100%)	166 (100%)	91 (100%)	58 (100%)	14 (100%)
<i>etb</i>	0 (0%)	2 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	166 (100%)	91 (100%)	58 (100%)	14 (100%)	166 (100%)	91 (100%)	58 (100%)	14 (100%)	166 (100%)	91 (100%)	58 (100%)	14 (100%)
<i>tst</i>	20 (12%)	6 (7%)	32 (55%)	1 (7%)	166 (100%)	91 (100%)	58 (100%)	14 (100%)	166 (100%)	91 (100%)	58 (100%)	14 (100%)	166 (100%)	91 (100%)	58 (100%)	14 (100%)

Tabelle 12: Verteilung der VF nach agr-Typen

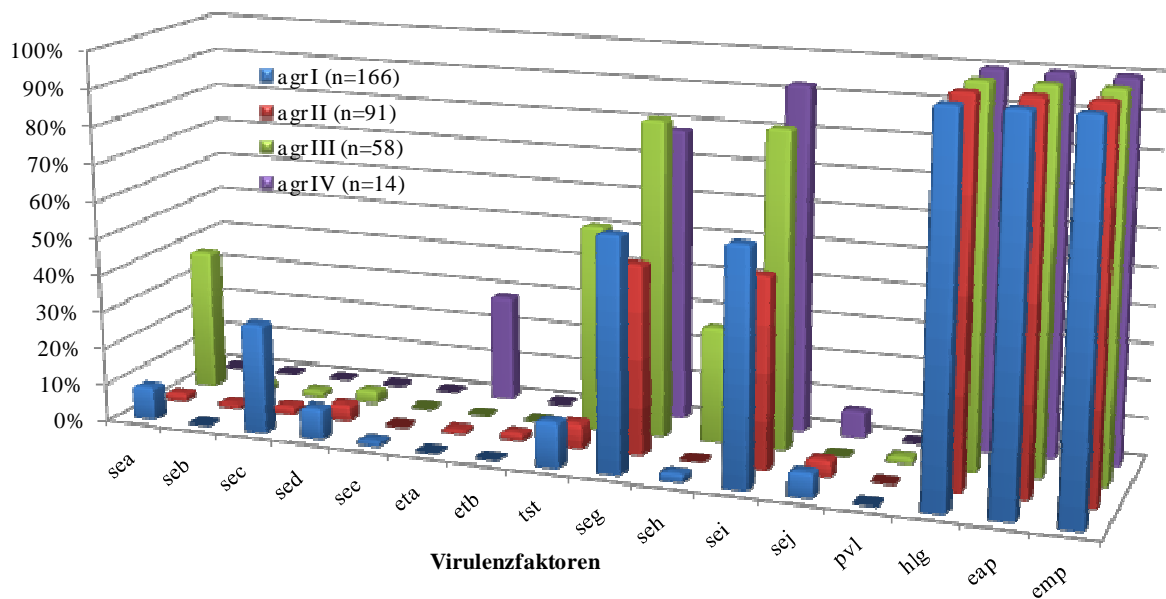


Abbildung 11: VF nach agr-Typ, Prozentangaben der rel. Häufigkeit

4.1.4. Korrelationen zwischen verschiedenen Toxinen

In Tabelle 13 wurden die positiven Ergebnisse miteinander in Zusammenhang gebracht. Es wurde betrachtet, wie viele Nachweise eines Virulenzfaktors vorlagen, wenn die Positivtestung eines anderen Toxins als Bedingung gegeben war. Zu Grunde lagen die Isolate der Patienten, die beim ersten Ambulanzbesuch isoliert wurden. Die Ergebnisse sind als relative Häufigkeiten dargestellt.

Betrachtet man die Korrelationen der Enterotoxin-Gene *sea* bis *see* untereinander, so zeigt sich, dass einige Toxine nie gemeinsam auftraten, z.B. *sea* und *sec*, bei anderen aber ein gewisser Zusammenhang bestand. 18% aller *sea*-positiven Isolate waren auch positiv für *sed*, 13% aller *sec*-positiven Isolate waren ebenfalls positiv für *sed*. Umgekehrt ließ sich ermitteln, dass jeweils 35% der *sed*-positiven Isolate auch positiv für *sea* bzw. *sec* waren.

Weitere Korrelationen der Enterotoxin-Gene zu anderen untersuchten Genen ergaben sich ebenfalls: 51% der *sea*-positiven Isolate waren positiv für *tst*, jeweils 64% für *seg* und *sei* und 13% für *seh* und *sej*. 56% der *sea*-positiven Isolate waren der *agr*-Gruppe *III* zuzuordnen, 38% der *agr*-Gruppe *I*. Da *eap*, *emp* und *hlg* bei allen untersuchten Isolaten nachweisbar waren, besteht eine 100%ige Korrelation zu allen anderen betrachteten Genen. Für das lediglich einmal (n=1) nachgewiesene *pvl* ist die Korrelation zu allen anderen Genen 0%, mit Ausnahme von *agr III* (100%). *seb*-positive Isolate wiesen in 50% der Fälle ebenfalls *seh* auf, und waren in jeweils 50% den *agr*-Gruppen *II* und *III* zuzuordnen. *sec* korrelierte in jeweils 88% mit *seg* und *sei* und die Isolate waren zu 94% der *agr*-Gruppe *I* zuzuweisen. *sed*-positive Isolate waren zu jeweils 70% ebenfalls positiv für *seg* und *sei*, zu 75% positiv für *sej* und in 70% der *agr*-Gruppe *I* zuzuordnen. Die Korrelationen zu *see* hatten aufgrund der sehr kleinen Fallzahl (n=2) kaum Aussagekraft, gleiches gilt für *eta* (n=5) und *etb* (n=2). *tst*-positive Isolate waren in 34% der Fälle auch positiv für *sea*, in 80 bzw. 81% für *seg* bzw. *sei* und waren in 54% der *agr*-Gruppe *III* zuzuordnen. Da *seg* und *sei* bis auf wenige Ausnahmen stets kombiniert auftraten, stimmten die Korrelationen mit anderen Toxinen nahezu überein. Bei 22% der *seg*- bzw. *sei*-positiven Isolate ließ sich auch *sec* nachweisen, bei 22 bzw. 23% *tst* und in 49% waren die Isolate der *agr*-Gruppe *I* zuzuordnen. 100% aller *seg*-positiven Isolate wiesen auch *sei* auf, jedoch zeigten nur 98% der *sei*-Positiven auch *seg*. *seh*-positive

Isolate waren zu 23% ebenfalls positiv für *sea*, zu 45% für *tst*, zu 77 bzw. 82% für *seg* bzw. *seh* und gehörten in 82% zur *agr*-Gruppe III. *sej* trat zu 31% gemeinsam mit *sea* auf, zu 38% mit *sec* und zu 94% mit *sed*. 69% aller *sej*-positiven Isolate gehörten zur *agr*-Gruppe I. Die Korrelationen zu den einzelnen *agr*-Typen sind in Kapitel 4.1.3 gesondert dargestellt.

		Wenn																			
		<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>eta</i>	<i>etb</i>	<i>tst</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	<i>sej</i>	<i>pvl</i>	<i>Hlg</i>	<i>agr I</i>	<i>agr II</i>	<i>agr III</i>	<i>agr IV</i>	<i>eap</i>	<i>emp</i>
		ebenfalls positiv (x100 = %)																			
<i>sea</i>		0,00	0,00	0,00	0,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,23	0,12	0,31	0,00	0,12	0,09	0,02	0,38	0,00	0,12	0,12
<i>seb</i>		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,12
<i>sec</i>		0,00	0,00	0,00	0,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22	0,22	0,38	0,00	0,00	0,16	0,30	0,02	0,02	0,00	0,16	0,16
<i>sed</i>		0,18	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,07	0,94	0,00	0,06	0,08	0,04	0,03	0,00	0,06	0,06	0,06
<i>see</i>		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01
<i>eta</i>		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,29	0,02	0,02
<i>etb</i>		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01
<i>tst</i>		0,51	0,00	0,04	0,35	1,00	0,00	1,00	0,22	0,45	0,23	0,25	0,00	0,18	0,12	0,07	0,55	0,07	0,18	0,18	0,18
<i>seg</i>		0,64	0,00	0,88	0,70	0,50	1,00	0,80	0,77	0,98	0,98	0,69	0,00	0,63	0,62	0,51	0,84	0,79	0,63	0,63	0,63
<i>seh</i>		0,13	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17	0,08	0,82	0,08	0,00	0,00	0,07	0,02	0,00	0,31	0,00	0,07	0,07	0,07
<i>sei</i>		0,64	0,00	0,88	0,70	0,50	1,00	0,81	1,00	0,82	0,08	0,69	0,00	0,64	0,63	0,51	0,84	0,93	0,64	0,64	0,64
<i>sej</i>		0,13	0,00	0,12	0,75	0,00	0,00	0,07	0,05	0,00	0,05	0,00	0,00	0,05	0,07	0,04	0,00	0,07	0,05	0,05	0,05
<i>pvl</i>		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>hlg*</i>		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
<i>agr I</i>		0,38	0,00	0,94	0,70	1,00	0,00	0,34	0,49	0,18	0,49	0,69	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,50	0,50
<i>agr II</i>		0,05	0,50	0,04	0,20	0,00	0,20	0,10	0,22	0,00	0,22	0,25	0,00	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,27	0,27	0,27
<i>agr III</i>		0,56	0,50	0,02	0,10	0,00	0,00	0,54	0,23	0,82	0,23	0,00	1,00	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17	0,17	0,17
<i>agr IV</i>		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,80	0,02	0,05	0,00	0,06	0,06	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,04	0,04
<i>eap*</i>		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
<i>emp*</i>		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

zu 100% positive Ergebnisse

Tabelle 13: Kreuztabelle/ Korrelation der Positivtestungen (rel. Häufigkeiten, n=333)

4.2. Betrachtung der Virulenzfaktoren im Verlauf

Gegenstand dieser Betrachtung waren die Isolate von 10 Patienten, von denen im zeitlichen Verlauf der Studie bereits viermal Material gewonnen wurde. Betrachtet wurde das Vorkommen von Klonen unterschiedlicher *spa*-Typen abhängig vom Untersuchungsmaterial. Klone mit identischem *spa*-Typ, die Unterschiede in der Ausstattung mit Virulenz-Genen aufwiesen, wurden gesondert dargestellt.

Von insgesamt 103 Isolaten von 10 Patienten waren 51 (49%) der *agr*-Gruppe I, 9 (9%) *agr II*, 40 (39%) *agr III* und 3 (3%) *agr IV* zuzuordnen.

Bei den Isolaten waren *hlg*, *eap* und *emp* immer positiv, *pvl* war mittels PCR nie nachzuweisen.

4.2.1. Patient 1

	1. Ambulanzbesuch	2. Ambulanzbesuch	3. Ambulanzbesuch	4. Ambulanzbesuch
Nase	t002	-	t002 t548	t159 t5430
Rachen	t002	t002 t078 t159	t078 t078 t5430	t078
Sputum	t159	kein Mat.	-	kein Mat.
Nasensekret	kein Mat.	kein Mat.	t078 t078	kein Mat.

Tabelle 14: Patient 1, nachgewiesene *spa*-Typen

Beim 1. Patienten ließen sich im Beobachtungszeitraum insgesamt 5 verschiedene Klone nachweisen. Davon maximal 4 zu einem Zeitpunkt (3. Ambulanzbesuch). Isolate des *spa*-Typs t002 waren bei drei aufeinander folgenden Ambulanzbesuchen nachweisbar, waren aber in ihrer Toxigen-Ausstattung stabil. Alle untersuchten Klone des *spa*-Typs t002 waren positiv für *seg*, *sei*, *hlg*, *eap* und *emp* und gehörten der *agr*-Gruppe II an. Bei den Isolaten der *spa*-Typen t078 und t5430 fielen unterschiedliche Toxin-ausstattungen auf.

4.2.1.1. *S. aureus*-Isolate des *spa*-Typs t078

Bei *S. aureus*-Isolaten des *spa*-Typs t078 zeigten sich Unterschiede in der Ausstattung mit den folgenden Enterotoxin-Genen im Verlauf der Beobachtung: *seb*, *seg* und *seh*. In der folgenden Tabelle ist nach der Materialbezeichnung, aus der das jeweilige Isolat angezüchtet wurde, der jeweilige Ambulanzbesuch in Klammern angegeben.

	<i>seb</i>	<i>seg</i>	<i>sei</i>	
Rachen (2.)	✓	✓	✓	✗ = negativ ✓ = positiv
Rachen (3.)	✓	✓	✓	
Rachen (3.)	✓	✗	✗	
Rachen (4.)	✓	✓	✓	
Nasensekret (3.)	✓	✓	✓	
Nasensekret (3.)	✗	✗	✗	

Tabelle 15: VF der Isolate des *spa*-Typs t078 bei Patient 1, nach Materialien

Alle Proben gehörten zur *agr* Gruppe I. Von 6 Isolaten des *spa* Typs t078 war ein Isolat nur *seb* positiv, 4 Isolate wiesen die Kombination *seb*, *seg* und *sei* auf und ein Isolat besaß keines der Enterotoxin-Gene.

4.2.1.2. *S. aureus*-Isolate des *spa*-Typs t5430

Bei *S. aureus*-Isolaten dieses *spa*-Typs konnten ebenfalls Veränderungen in der Toxin-Ausstattung beobachtet werden. Diese zeigten sich bei den Virulenz-Genen *tst*, *seg*, *seh* und *sej*.

	<i>tst</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	
Rachen (3.)	✗	✗	✗	✗	✗ = negativ ✓ = positiv
Rachen (3.)	✓	✗	✗	✗	
Nasensekret (3.)	✓	✗	✗	✗	
Nase (4.)	✓	✓	✓	✓	

Tabelle 16: VF der Isolate des *spa*-Typs t5430 bei Patient 1, nach Materialien

Von den 4 Isolaten des *spa*-Typen t5430 war einer von zwei Rachenabstrichen zum gleichen Zeitpunkt (3.Ambulanzbesuch) positiv für *tst*. Der im Rahmen des 4. Ambulanzbesuches gewonnene Klon mit dem *spa*-Typen t5430 war sowohl für *tst*, als auch für die Enterotoxine *seg*, *seh* und *sei* positiv. Bei den vorangegangenen drei Untersuchungen war dieser Klon in der Nase nicht nachzuweisen.

4.2.2. Patient 2, *spa*-Typ t012

	1. Ambulanzbesuch	2. Ambulanzbesuch	3. Ambulanzbesuch	4. Ambulanzbesuch
Nase	t012	t012	t012	t012
Rachen	kein Mat.	t012	t012	kein Mat.
Sputum	t012	-	t012	t012

Tabelle 17: Patient 2, nachgewiesene *spa*-Typen

Bei Patient 2 ließ sich über den gesamten Zeitraum nur ein Klon nachweisen, welcher jedoch durch Unterschiede in der Toxin-Ausstattung auffiel.

Bei Isolaten des *spa*-Typs t012 zeigte sich im Verlauf eine Änderung in der Ausstattung mit *tst*. Im gesamten Beobachtungszeitraum waren bei den Isolaten *seg* und *sei* nachweisbar. In Klammern hinter den Materialbezeichnungen sind wieder die Ambulanzbesuche vermerkt.

	<i>tst</i>	
Nase (1.)	✓	✗ = negativ ✓ = positiv
Nase (2.)	✓	
Nase (3.)	✓	
Nase (4.)	✗	
Rachen (2.)	✓	
Rachen (3.)	✓	
Sputum (1.)	✓	
Sputum (3.)	✓	
Sputum (4.)	✓	

Tabelle 18: VF der Isolate des *spa*-Typs 012 bei Patient 2, nach Materialien

Die Isolate mit dem *spa*-Typ t012 bei Patient 2 wies in 8 von 9 Fällen *tst* auf. Lediglich im Rahmen des 4. Ambulanzbesuches ließ sich aus der Nase ein Klon isolieren, bei dem *tst* nicht nachzuweisen war. Alle Isolate gehörten zur Gruppe *agrIII*.

4.2.3. Patient 3

	1. Ambulanz- besuch	2. Ambulanz- besuch	3. Ambulanz- besuch	4. Ambulanz- besuch
Nase	t091	t015	-	t091
Rachen	kein Mat.	kein Mat.	kein Mat.	kein Mat.
Sputum	t091 t164	t015 t091 t164	-	t091

Tabelle 19: Patient 3, nachgewiesene *spa*-Typen

Bei Patient 3 waren insgesamt 3 verschiedene Klone nachweisbar. Zum Zeitpunkt des 2. Ambulanzbesuches fanden sich alle drei gleichzeitig im Sputum. Bei keinem der Isolate eines *spa*-Typs waren Unterschiede in der Toxin-Ausstattung während der Beobachtungszeit zu finden. Die beiden Isolate des *spa*-Typs t015 waren positiv für *sec*, *seg* und *sei*, bei den Isolaten des *spa*-Typs t164 ließen sich ebenfalls *seg* und *sei* nachweisen. Isolate des *spa*-Typs t091 wiesen weder Entero- noch Exfoliativtoxin-Gene auf. Bei allen hier betrachteten Isolaten waren *hlg*, *eap* und *emp* nachweisbar, alle Isolate gehörten zur *agr*-Gruppe *I*. Kein Isolat wies das *pvl*-Gen auf.

4.2.4. Patient 4

	1. Ambulanz- besuch	2. Ambulanz- besuch	3. Ambulanz- besuch	4. Ambulanz- besuch
Nase	-	-	-	-
Rachen	kein Mat.	kein Mat.	kein Mat.	t050
Sputum	t050	t050	t050	t050

Tabelle 20: Patient 4, nachgewiesene *spa*-Typen

Der einzige nachweisbare Klon beim 4. Patienten war der mit dem *spa*-Typ t050 während der Beobachtungszeit. Hier zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede hinsichtlich der nachweisbaren Toxine. Alle hier betrachteten Isolate waren positiv für *sec*, *seg*, *sei*, *hlg*, *eap* und *emp*. *pvl* war nie nachzuweisen. Alle Isolate gehörten der *agr*-Gruppe I an.

4.2.5. Patient 5

	1. Ambulanz- besuch	2. Ambulanz- besuch	3. Ambulanz- besuch	4. Ambulanz- besuch
Nase	-	-	-	-
	t277			
Rachen	t4870 t1050	t004	t004	t004
Sputum	kein Mat.	kein Mat.	kein Mat.	kein Mat.

Tabelle 21: Patient 5, nachgewiesene *spa*-Typen

Bei Patient 5 waren insgesamt 4 verschiedene Klone nachzuweisen, davon 3 nebeneinander im Rachenabstrich zum Zeitpunkt des 1. Ambulanzbesuches. In der Folge ließen sich diese drei Isolate nicht mehr nachweisen, dafür aber in durchweg allen Rachenabstrichen der Klon mit dem *spa*-Typ t004. Dieser zeigte im Verlauf keinerlei Änderungen in seiner Toxin-Ausstattung.

Das Isolat mit dem *spa*-Typ t1050 war positiv für *seg* und *sei*, beim Isolat des *spa*-Typs t277 waren die beiden Enterotoxin-Gene ebenfalls nachweisbar, zusätzlich zeigte sich hier noch *sed*. Das Isolat mit dem *spa*-Typ t4870 war nur positiv für *tst*, *seg* und *sei* konnten hier nicht nachgewiesen werden. Der längere Zeit persistierende Klon t004 zeigte *seg* und *sei*. Alle hier betrachteten Isolate waren positiv für *hlg*, *eap* und *emp* und gehörten der *agr*-Gruppe I an. *pvl* konnte nicht nachgewiesen werden.

Eine detaillierte Analyse der gefundenen *spa*-Typen zeigte, dass es sich bei *spa*-Typ t004 um einen Abkömmling des *spa*-Typen t277 handelt. Hier liegt eine Punktmutation zu Grunde.

4.2.6. Patient 6

	1. Ambulanz- besuch	2. Ambulanz- besuch	3. Ambulanz- besuch	4. Ambulanz- besuch
Nase	t1978	-	-	-
Rachen	t1978	t1978	t1978	t1978
Sputum	kein Mat.	kein Mat.	kein Mat.	kein Mat.

Tabelle 22: Patient 6, nachgewiesene *spa*-Typen

Bei Patient 6 war über die Beobachtungszeit ausschließlich ein einziger Klon nachweisbar, der (t1978) keine Veränderungen im Hinblick auf seine Ausstattung mit Toxinen zeigte. Hier waren kontinuierlich die Enterotoxin-Gene *seg*, *seh* und *sei* nachweisbar, ebenso *hlg*, *eap* und *emp*. Alle Isolate gehörten der *agr*-Gruppe III an, *pvl* war in keinem Fall nachzuweisen.

4.2.7. Patient 7, *spa*-Typ t1577

	1. Ambulanz- besuch	2. Ambulanz- besuch	3. Ambulanz- besuch	4. Ambulanz- besuch
Nase	t1577	t1577	t1577	t1577
Rachen	-	t166	kein Mat.	t1577
Sputum	t1577	t1577	t091	kein Mat.
	t166	t166	t164	

Tabelle 23: Patient 7, nachgewiesene *spa*-Typen

Bei diesem Patienten ließen sich im Beobachtungszeitraum insgesamt 4 verschiedene Klone nachweisen, davon maximal 3 gleichzeitig (3. Ambulanzbesuch) im Sputum. Immer vorhanden war der Klon mit dem *spa*-Typen t1577, welcher im Verlauf Unterschiede in der Toxin-Ausstattung zeigte.

Unterschiede traten hinsichtlich der Ausstattung mit dem Toxin-Gen *tst* und den Enterotoxin-Genen *seg* und *sei* auf. In Klammern sind wieder die Ambulanzbesuche vermerkt.

	<i>tst</i>	<i>seg</i>	<i>sei</i>
Nase (1.)	✓	✓	✓
Nase (2.)	✗	✓	✓
Nase (3.)	✓	✗	✗
Nase (4.)	✗	✓	✓
Sputum (1.)	✓	✓	✓
Sputum (2.)	✗	✓	✓
Sputum (3.)	✓	✓	✓
Rachen (4.)	✓	✓	✓

Tabelle 24: VF der Isolate des *spa*-Typs t1577 bei Patient 7, nach Materialien

Alle Isolate des *spa*-Typs t1577 gehörten zur Gruppe *agr III* und waren positiv für *sea*. 4 der 8 Isolate zeigten die Kombination *tst*, *seg* und *sei*. Bei 2 Isolaten waren nur *seg* und *sei* nachweisbar und bei einem Isolat lediglich *tst*. *hlg*, *eap* und *emp* waren stets positiv, *pvl* war in keinem Fall nachweisbar.

Die Isolate mit dem *spa*-Typ t166 wiesen *tst*, *seg*, *seh* und *sei* auf und gehörten *agr*-Gruppe *III* an, das Isolat mit *spa*-Typ t164 war positiv für *seg* und *sei*. Bei dem Isolat mit *spa*-Typ t091 waren weder Entero- noch Exfoliativtoxin-Gene nachweisbar. Die beiden zuletzt genannten Isolate ließen sich der Gruppe *agr I* zuordnen.

4.2.8. Patient 8

	1. Ambulanz- besuch	2. Ambulanz- besuch	3. Ambulanz- besuch	4. Ambulanz- besuch
Nase	t493 t050	t050 t3331	t1577 t166 t2133	t209
Rachen	t091	t050 t091	t2133	t209
Sputum	t091	t050 t091 t3331	kein Mat.	kein Mat.

Tabelle 25: Patient 8, nachgewiesene *spa*-Typen

Beim 8. Patienten wurden insgesamt 8 verschiedene Klone im Beobachtungszeitraum nachgewiesen, davon maximal 3 zum gleichen Zeitpunkt im selben Untersuchungsmaterial. Keiner der Klone zeigte Änderungen in der Toxin-Ausstattung während der Beobachtung.

Die Isolate des *spa*-Typs t050 waren alle positiv für *seg* und *sei* und gehörten der *agr*-Gruppe I an. Andere Enterotoxin- oder Exfoliativtoxin-Gene waren nicht nachweisbar. Die Isolate der *spa*-Typen t091 und t3331 wiesen keinerlei Entero- oder Exfoliativtoxin-Gene auf und gehörten ebenfalls der *agr*-Gruppe I an. Bei dem Isolat mit *spa*-Typ t1577 ließen sich *sea*, *tst*, *seg* und *sei* nachweisen, bei dem mit *spa*-Typ t166 fehlte *sea*, dafür war zusätzlich *seh* nachweisbar. Beide waren der Spezifitätsgruppe *agr III* zuzuordnen. Die Isolate mit *spa*-Typ t209 wiesen *eta*, *seg* und *sei* auf und gehörten der *agr*-Gruppe II an. Die Isolate mit *spa*-Typ t2133 waren positiv für *seb* und gehörten zur Gruppe *agr II*. Bei dem Isolat des *spa*-Typs t493 ließen sich keine Exfoliativtoxin-Gene nachweisen, jedoch wurden die Enterotoxin-Gene *seh* und *sei* nachgewiesen. Dieses Isolat war der Spezifitätsgruppe *agr I* zuzuordnen. Alle Isolate dieses Patienten waren positiv für *hlg*, *eap* und *emp*. *pvl* war in keinem Fall nachweisbar.

4.2.9. Patient 9, *spa*-Typ t211

	1. Ambulanzbesuch	2. Ambulanzbesuch	3. Ambulanzbesuch	4. Ambulanzbesuch
Nase	t211	t211	t211	t211
Rachen	t211	kein Mat.	t211	t211 t211
Sputum	kein Mat.	t211	t211 t3745	-

Tabelle 26: Patient 9, nachgewiesene *spa*-Typen

Bei Patient 9 ließen sich 2 verschiedene Klone nachweisen, wobei es sich bei den Isolaten mit dem *spa*-Typ t211 um den vorherrschenden Klon handelte. Dieser Klon war im gesamten Beobachtungszeitraum nachweisbar und zeigte Auffälligkeiten bei der Toxin-Ausstattung.

Isolate dieses *spa*-Typs zeigten Unterschiede im Hinblick auf den Nachweis der folgenden Toxine: *tst*, *seg* und *sei*. (Hinter den Bezeichnungen der Materialien sind wieder in Klammern die Ambulanzbesuche aufgeführt.)

	<i>tst</i>	<i>seg</i>	<i>sei</i>	
Nase (1.)	✗	✗	✗	✗ = negativ ✓ = positiv
Nase (2.)	✗	✗	✗	
Nase (3.)	✗	✗	✗	
Nase (4.)	✗	✗	✗	
Rachen (1.)	✗	✗	✗	
Rachen (3.)	✗	✗	✗	
Rachen (4.)	✗	✗	✗	
Rachen (4.)	✓	✓	✓	
Sputum (2.)	✗	✗	✗	
Sputum (3.)	✗	✗	✗	

Tabelle 27: VF der Isolate des *spa*-Typs t211 bei Patient 9, nach Materialien

Alle Isolate des *spa*-Typs t211 gehörten zur *agr* Gruppe III. Am Ende des Beobachtungszeitraums hatte einer von zwei Klonen, der sich aus einem Rachenabstrich isolieren ließ, Gene für *tst*, *seg* und *sei* aufgenommen.

Bei dem Isolat mit *spa*-Typ t3745 ließ *sea* sich nicht nachweisen, aber *eta*, *seg* und *sei*. Es war der *agr* Gruppe II zuzuordnen. Alle Isolate des Patienten waren positiv für *hlg*, *eap* und *emp*, *pvl* war in keinem Fall nachzuweisen.

4.2.10. Patient 10, *spa*-Typ t338

	1. Ambulanzbesuch	2. Ambulanzbesuch	3. Ambulanzbesuch	4. Ambulanzbesuch
Nase	t338	t338	t338	t338
Rachen	t289 t338	t338	t338	t026 t338
Sputum	kein Mat.	kein Mat.	kein Mat.	kein Mat.

Tabelle 28: Patient 10, nachgewiesene *spa*-Typen

Insgesamt konnten beim 10. Patienten 3 verschiedene Klone isoliert werden, wobei Isolate mit dem *spa*-Typ t338 konsequent im gesamten Beobachtungszeitraum in Nase und Rachen nachzuweisen waren.

Hier zeigten sich ebenfalls Unterschiede in der Toxin-Ausstattung, wenn auch lediglich im Hinblick auf *tst*. Auch hier sind wieder die Ambulanzbesuche hinter den Materialbezeichnungen in Klammern aufgeführt.

<i>tst</i>	
Nase (1.)	✓
Nase (2.)	✓
Nase (3.)	✓
Nase (4.)	✓
Rachen (1.)	✓
Rachen (2.)	✗
Rachen (3.)	✓
Rachen (4.)	✓

✗ = negativ
✓ = positiv

Tabelle 29: VF der Isolate des *spa*-Typs t338 bei Patient 10, nach Materialien

Von 8 nachgewiesenen Isolaten mit dem *spa*-Typ t338 waren 7 positiv für *tst*, bei einem Isolat konnte *tst* nicht nachgewiesen werden. Alle Isolate dieses *spa*-Typs wiesen zusätzlich *seg* und *sei* auf und waren der Gruppe *agr III* zuzuordnen. Die beiden Isolate der *spa*-Typen t026 und t289 gehörten *agr*-Gruppe *I* an. Das Isolat mit *spa*-Typ t289 wies keinerlei Entero- oder Exfoliativtoxin-Gene auf, das Isolat mit *spa*-Typ t026 war positiv für *sec*, *seg* und *sei*, *tst* war hier nicht nachweisbar. Bei allen hier betrachteten Isolaten waren *hlg*, *eap* und *emp* nachzuweisen, der *pvl*-Nachweis war stets negativ.

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Verlaufsbeobachtung 26 verschiedene Klone betrachtet, wobei Klone mit *spa*-Typ t050, t164, t166 und t1577 bei jeweils 2 Patienten nachgewiesen wurden und *spa*-Typ t091 sich sogar bei 3 Patienten zeigte. Von 26 Klonen wiesen 6 Veränderungen in der Toxin-Ausstattung auf. Besonders häufig fanden sich Unterschiede in der Ausstattung mit *seg*, *sei* (beide lokalisiert auf dem *egc*) und *tst* (lokalisiert auf SaPI 1). Die Toxinnachweise der übrigen 20 Klone waren im Beobachtungszeitraum stabil.

4.3. Toxin-Ausstattung der Isolate mit den häufigsten *spa*-Typen

Bei den häufigsten *spa*-Typen handelte es sich um t002, t008, t015, t084 und t091. Für diese Auswertung wurde jeweils ein Stamm mit dem entsprechenden *spa*-Typen pro Patient und gewonnenem Material ausgewählt. Wurden im jeweiligen Untersuchungsmaterial Klone mit divergierender Toxin-Ausstattung gefunden, so wurden beide in die Auswertung eingeschlossen. Im jeweils entsprechenden Absatz ist die Größe des Kollektivs an phänotypisch unterschiedlichen Klonen, aus denen die beurteilten Klone ausgewählt wurden, angegeben.

Betrachtet wurden nur Isolate, die während des 1. Ambulanzbesuches im Rahmen der zugrunde liegenden Studie gewonnen wurden, entsprechend dem Grundkollektiv (n=333, s. Kap. 4.1). Zur besseren Übersicht sind die Patienten laufend durchnummeriert. Es besteht kein Zusammenhang der Nummerierungen innerhalb des Kapitels oder in anderen Teilen der vorliegenden Arbeit.

4.3.1. Isolate des *spa*-Typs t002

Dargestellt ist die Toxin-Ausstattung von 11 von insgesamt 15 phänotypisch unterschiedlichen *S. aureus*-Stämmen mit *spa*-Typ t002, die bei 7 Patienten nachgewiesen wurden, sortiert nach Untersuchungsmaterialien. In allen Fällen konnte *pvl* nicht nachgewiesen werden. *hlg*, *eap* und *emp* waren immer positiv. Alle Isolate gehörten zur *agr*-Gruppe II.

		<i>sea</i>	<i>sed</i>	<i>tst</i>	<i>seg</i>	<i>sei</i>	<i>sej</i>	
1	Nase	×	×	×	✓	✓	×	×
	Rachen	×	×	×	✓	✓	×	
2	Rachen	×	×	×	✓	✓	×	
3	Rachen	✓	×	✓	✓	✓	×	
	Sputum	✓	×	✓	✓	✓	×	
4	Nase	×	×	×	✓	✓	×	
	Rachen	×	×	×	×	×	×	
			×	×	×	✓	✓	×
5	Nase	×	×	×	✓	✓	×	
6	Rachen	×	✓	✓	✓	✓	✓	
7	Sputum	×	×	×	✓	✓	×	

× = negativ
 ✓ = positiv

Tabelle 30: Isolate des *spa*-Typs t002, nach Materialien

Bei den beiden Isolaten, welche positiv für *sea*, *tst*, *seg* und *sei* waren, handelte es sich um Isolate von demselben Patienten. Ein Isolat mit *spa*-Typ t002 aus dem Rachenabstrich eines weiteren Patienten war positiv für *sed*, *tst*, *seg*, *sei* und *sej*.

4.3.2. Isolate des *spa*-Typs t008

Im Folgenden wird die Toxin-Ausstattung von 10 von insgesamt 14 phänotypisch verschiedenen Stämmen mit *spa*-Typ t008 von 5 Patienten aufgeführt, sortiert nach Materialien. Alle Isolate gehörten zur *agr*-Gruppe I.

		<i>sea</i>	<i>sed</i>	<i>tst</i>	<i>sej</i>
1	Rachen	✗	✗	✗	✗
	Nase	✗	✗	✗	✗
2	Nase	✗	✗	✗	✗
	Rachen	✗	✗	✗	✗
3	Rachen	✗	✗	✗	✗
4	Rachen	✓	✓	✗	✓
5	Sputum	✓	✓	✓	✓
		✗	✗	✓	✗
	Rachen	✓	✓	✓	✓
		✗	✗	✓	✗

✗ = negativ
✓ = positiv

Tabelle 31: Isolate des *spa*-Typs t008, nach Materialien

Von 10 nachgewiesenen Isolaten mit *spa*-Typ t008 waren 2 positiv für *sea*, *sed*, *tst* und *sej*. Ein Isolat wies *sea*, *sed* und *sej* auf und 2 waren nur positiv für *tst*.

Bei einem Patienten ließen sich jeweils in Rachen und Sputum zwei Isolate mit demselben *spa*-Typen und unterschiedlicher Toxin-Ausstattung nachweisen. Je ein Isolat aus Rachen und Sputum zeigte nur *tst*, während sich bei je einem weiteren Isolat *sea*, *sed*, *tst* und *sej* nachweisen ließen.

4.3.3. Isolate des *spa*-Typs t015

Isolate mit dem *spa*-Typ t015 ließen sich bei 333 untersuchten Proben 15-mal in Abstrichen aus Nase und Rachen von 8 Patienten nachweisen. Zwei Isolate stammten aus

demselben Untersuchungsmaterial und waren hinsichtlich ihrer Toxin-Ausstattung identisch, so dass in diese Auswertung insgesamt 14 Proben eingingen. In Sputa konnten Isolate mit dem *spa*-Typ t015 generell nicht gefunden werden. Von den Patienten, bei denen Klone mit *spa*-Typ t015 nachgewiesen wurden, lagen keine Sputa vor. Auch hier war *pvl* immer negativ, *hlg*, *eap* und *emp* waren stets positiv. Alle 14 Isolate gehörten zur *agr*-Gruppe I.

		<i>sec</i>	<i>seg</i>	<i>sei</i>	
1	Rachen	✓	✓	✓	✗ = negativ ✓ = positiv
2	Nase	✓	✓	✓	
	Nase	✓	✓	✓	
	Rachen	✓	✗	✗	
3	Nase	✓	✓	✓	
	Rachen	✓	✓	✓	
4	Rachen	✓	✓	✓	
5	Nase	✓	✓	✓	
	Rachen	✓	✓	✓	
6	Nase	✓	✓	✓	
	Rachen	✓	✓	✓	
7	Rachen	✓	✓	✓	
8	Nase	✓	✓	✓	
	Rachen	✓	✓	✓	

Tabelle 32: Isolate des *spa*-Typs t015, nach Materialien

In dieser Gruppe zeigte sich bei einem Isolat eine Abweichung der Toxin-Ausstattung. Hierbei handelt es sich um ein Isolat aus einem Rachenabstrich eines Patienten, dessen Nasenabstrich wie alle anderen Proben positiv für *sec*, *seg* und *sei* war.

4.3.4. Isolate des *spa*-Typs t084

Bei *spa*-Typ t084 handelt es sich um den am häufigsten nachgewiesenen *spa*-Typen. Er zeigte sich in 47 phänotypisch unterschiedlichen Isolaten von 17 Patienten, wovon 28 Isolate in die Auswertung eingingen. Auch hier war *pvl* immer negativ, *hlg*, *eap* und *emp* waren durchweg positiv. Der vorherrschende *agr*-Typ war *agr II*, jedoch gehörten Isolate auch jeweils einmal zur Gruppe *agr I* und *agr III*, die auch eine unterschiedliche Toxin-Ausstattung aufwiesen.

		<i>sea</i>	<i>sec</i>	<i>see</i>	<i>tst</i>	<i>seg</i>	<i>sei</i>	<i>agr</i> <i>I</i>	<i>agr</i> <i>II</i>	<i>agr</i> <i>III</i>
1	Nase	×	×	×	×	×	×	×	✓	×
	Sputum	×	×	×	×	×	×	×	✓	×
2	Rachen	×	×	×	×	×	×	×	✓	×
3	Rachen	×	×	×	×	×	×	×	✓	×
	Rachen	×	×	×	×	✓	✓	×	✓	×
4	Nase	×	×	×	×	×	×	×	✓	×
	Rachen	×	×	×	×	×	×	×	✓	×
	Sputum	×	×	×	×	×	×	×	✓	×
5	Rachen	×	×	×	×	×	×	×	✓	×
6	Rachen	×	×	×	×	×	×	×	✓	×
7	Rachen	×	×	×	×	×	×	×	✓	×
8	Nase	×	×	×	×	✓	✓	×	✓	×
9	Rachen	×	×	×	×	×	×	×	✓	×
	Sputum	×	×	×	×	×	×	×	✓	×
	Sputum	×	✓	×	×	✓	✓	×	✓	×
10	Nase	×	×	×	×	×	×	×	✓	×
	Rachen	×	×	×	×	×	×	×	✓	×
	Sputum	×	×	×	×	×	×	×	✓	×
11	Nase	×	×	×	×	×	×	×	✓	×
	Rachen	×	×	×	×	×	×	×	✓	×
12	Nase	×	×	×	×	×	×	×	✓	×
	Rachen	×	×	×	×	×	×	×	✓	×
13	Rachen	×	×	×	×	×	×	×	✓	×
14	Rachen	×	×	×	×	×	×	×	✓	×
	Sputum	×	×	×	×	×	×	×	✓	×
15	Rachen	×	×	×	×	✓	✓	×	✓	×
16	Nase	×	×	✓	✓	×	×	✓	×	×
17	Sputum	✓	×	×	✓	✓	✓	×	×	✓

× = negativ
✓ = positiv

Tabelle 33: Isolate des *spa*-Typs t084, nach Materialien

Bei diesem *spa*-Typen wiesen die meisten Isolate keine der untersuchten Virulenz-Gene auf, nur wenige Isolate waren vereinzelt positiv für *sea*, *sec*, *see*, *tst*, *seg* und *sei*.

Drei Isolate, von unterschiedlichen Patienten, waren positiv für *seg* und *sei*, ein weiteres wies neben *seg* und *sei* noch *sec* auf. Bei einem Isolat waren *seg* und *sei* ebenfalls nachweisbar und zusätzlich noch *sea* und *tst*. Abweichend von der bei diesem *spa*-Typ am häufigsten gezeigten *agr*-Gruppe II gehörte dieses Isolat zur *agr*-Gruppe III. Ein anderes Isolat war positiv für *see* und *tst* und wurde der *agr*-Gruppe I zugeordnet.

4.3.5. Isolate des *spa*-Typs t091

Der *spa*-Typ t091 gehört mit 17 Nachweisen von 9 Patienten, bei insgesamt 27 phänotypisch unterschiedlichen Isolaten, zu den häufigsten *spa*-Typen im untersuchten Kollektiv. *pvl* war wie bei den vorangegangenen *spa*-Typen immer negativ, *hlg*, *eap* und *emp* waren wie zuvor stets positiv. Fast alle Isolate gehörten zur *agr*-Gruppe I, jedoch konnte bei jeweils einem Nasen- und einem Rachenabstrich, die beide von demselben Patienten stammten, keine *agr* Gruppe mittels PCR ermittelt werden.

		<i>sea</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	<i>agrI</i>	
1	Sputum	x	x	x	x	✓	x = negativ ✓ = positiv
	Nase	x	x	x	x	✓	
2	Rachen	x	x	x	x	✓	
	Sputum	x	x	x	x	✓	
3	Nase	x	x	x	x	✓	
4	Rachen	x	x	x	x	✓	
	Nase	x	x	x	x	✓	
5	Rachen	x	x	x	x	✓	
6	Rachen	x	x	x	x	✓	
7	Nase	x	x	x	x	✓	
		x	x	x	x	x	
	Rachen	x	x	x	x	✓	
		x	x	x	x	x	
8	Nase	x	x	x	x	✓	
	Rachen	x	x	x	x	✓	
9	Sputum	✓	✓	✓	✓	✓	
	Rachen	✓	✓	✓	✓	✓	

Tabelle 34: Isolate des *spa*-Typs t091, nach Materialien

Bei 15 der 17 Isolate des *spa*-Typs t091 ließen sich keine Virulenz-Gene nachweisen (bis auf die, die bei allen Isolaten positiv waren). Nur bei zwei Isolaten ließen sich *sea*, *seg*, *seh* und *sei* nachweisen. Diese Isolate stammten von demselben Patienten. Bei diesem Patienten ließen sich keine weiteren *S. aureus*-Klone nachweisen.

4.4. Assoziation der Toxinprofile mit dem klinischen Zustand

Im Folgenden wurden die Toxinprofile der Isolate der Patienten im Bezug zum klinischen Zustand analysiert, wobei nur die Fälle untersucht wurden, bei denen bei den Patienten nach Angabe der klinischen Ärzte eine Infektion vorliegen sollte.

Aus dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit betrachteten Patientenkollektiv konnte bislang bei 4 Patienten eine klinisch manifeste Infektion nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich um drei männliche Patienten (13, 19 und 36 Jahre alt) und eine weibliche Patientin (24 Jahre alt). Ein Patient wurde in der nachfolgenden Betrachtung zweimal erfasst, da bei zwei Ambulanzbesuchen hintereinander die oben aufgezählten Kriterien zutrafen. Die Patienten wurden in der Reihenfolge ihrer Erfassung durchnummeriert. Es besteht kein Zusammenhang mit der Nummerierung in Kapitel 4.2. Dargestellt sind nur die Toxingruppen (Enterotoxine, Exfoliativtoxine, *agr*-Gruppen), in denen sich Unterschiede zeigten. Die ebenfalls untersuchten Toxine *hlg*, *eap* und *emp* zeigten sich in allen Fällen positiv. *pvl* war immer negativ.

Patient	Material	<i>spa</i> -Typ	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>tst</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	<i>sej</i>	<i>agr I</i>	<i>agr II</i>
1	Nase	t2383	✓	✗	✓	✓	✗	✓	✗	✓	✗
	Rachen	t078	✓	✗	✓	✓	✗	✓	✗	✓	✗
2	Sputum	t4989	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✗	✓
3(1)	Sputum	t189	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗
	Sputum	t891	✗	✗	✓	✓	✗	✓	✗	✓	✗
	Sputum	t5152	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
3(2)	Sputum	t891	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
	Sputum	t5152	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✗	✓	✗
	Sputum	t189	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
4	Rachen	t5758	✓	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
	Rachen	t002	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✓	✗	✓

Tabelle 35: Toxinprofile von Isolaten von Patienten mit klinisch manifester Infektion

Die Toxinprofile dieser sehr kleinen Gruppe zeigten keine besonderen Abweichungen zum betrachteten Gesamtkollektiv. Auffällig sind aber die Variationen in der Toxin-Ausstattung der einzelnen Isolate eines *spa*-Typen bei Patient 3 im Verlauf. So ließen sich bei dem Isolat des *spa*-Typs t189 im Rahmen der ersten Erfassung keine Toxine nachweisen, beim zweiten Mal war das Isolat dieses *spa*-Typs jedoch positiv für *seg*

und *sei*. Ein Isolat des *spa*-Typs t5152 zeigte beim zweiten Ambulanzbesuch zusätzlich zu *seg* und *sei*, die im Isolat des ersten Ambulanzbesuches vorhanden waren, auch *seh* und bei dem einem Isolat des *spa*-Typs t891 ließ sich das initial positive *tst* in dem Isolat des zweiten Ambulanzbesuches nicht mehr nachweisen. Die Isolate des Patienten 3 gehörten zu dem *agr*-Typ *I*.

Zum Vergleich wurde eine Kontrollgruppe mit sehr ähnlichen epidemiologischen Daten gebildet. Die hierfür blind ausgewählten Patienten, die aus dem Grundkollektiv stammen, wiesen keine Infektionszeichen auf. Auch hier wurden die Patienten laufend durchnummeriert, unabhängig von anderen Nummerierungen in dieser Arbeit.

Patient	Material	<i>spa</i> -Typ	<i>sea</i>	<i>etb</i>	<i>tst</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	<i>agrI</i>	<i>agrII</i>
1	Nase	t548	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✓
	Rachen	t548	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✓
2	Nase	t010	✗	✓	✓	✓	✗	✓	✗	✓
	Rachen	t010	✗	✓	✓	✓	✗	✓	✗	✓
3	Rachen	t100	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✓
	Sputum	t100	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✓
4	Rachen	t091	✓	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✗
	Sputum	t091	✓	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✗

Tabelle 36: Toxinprofile von Patienten ohne klinisch manifeste Infektion

Bei jedem der 4 zufällig ausgewählten Patienten der Kontrollgruppe wurde jeweils nur ein Klon nachgewiesen. Die Toxin-Ausstattungen der einzelnen Klone zeigten keine Variationen. Alle betrachteten Isolate wiesen die Enterotoxin-Gene *seg* und *sei* auf, außerdem *hlg*, *eap* und *emp. pvl* war nicht nachweisbar. 3 der 4 nachgewiesenen Klone gehörten der *agr*-Gruppe *II* an, einer war *agr I* zuzuordnen.

Die Isolate von 2 Patienten (*spa*-Typ t548 und t100) dieser Betrachtung wiesen neben den bereits genannten Toxin-Genen keine weiteren auf. Bei den Isolaten mit *spa*-Typ t010 (Patient 2) waren zusätzlich *etb* und *tst* nachweisbar. Die Isolate von Patient 4 (*spa*-Typ t091) waren neben den oben genannten Genen positiv für *sea* und *seh*.

5. Diskussion

Die Lebenserwartung der meisten Mukoviszidose-Patienten ist aufgrund einer respiratorischen Insuffizienz infolge der fortschreitenden obstruktiven Lungenerkrankung, begünstigt durch rezidivierende Infektionen, stark verkürzt. *S. aureus* ist in der Regel bereits im Kindesalter in den Atemwegen der Patienten nachweisbar und persistiert dort oft über Jahre.

Bislang gibt es keine Informationen zur Prävalenz bedeutender Virulenz-Gene bei *S. aureus*-Stämmen, die aus den Atemwegen von Mukoviszidose-Patienten isoliert wurden. Wir vermuten, dass sich Unterschiede in der Prävalenz wichtiger Virulenz-Gene gegenüber anderen *S. aureus*-Populationen ergeben, da die CF-Stämme den Respirationstrakt der Patienten häufig über einen langen Zeitraum besiedeln. In den Atemwegen herrscht ein besonders hoher Selektionsdruck durch die Wirtsabwehr, die Konkurrenz mit anderen Erregern sowie wiederholte antibiotische Therapiezyklen.

5.1. Prävalenz und Verteilungsmuster der Virulenzfaktoren

Die untersuchten Virulenz-Gene *hlg*, *eap* und *emp* ließen sich bei den CF-Isolaten stets nachweisen. Kaneko et al. beschrieben für den *hlg*-Locus eine Prävalenz von 99% bei klinischen *S. aureus*-Isolaten [49], was unseren Ergebnissen nahezu entspricht. Der geringe Unterschied wäre durch ein anderes Patientenkollektiv oder größere Fallzahlen bei Kaneko et al. zu erklären. Die Gene *eap* und *emp* wurden in großen Kollektiven bei 100% der Stämme nachgewiesen [38, 39]. Anhand unserer Ergebnisse lässt sich nun zeigen, dass diese Prävalenz auch für *S. aureus*-Isolate von Mukoviszidose-Patienten zutrifft.

Von den anderen untersuchten Toxingenen wurden am häufigsten *seg* (63%) und *sei* (64%) nachgewiesen, was sich mit Ergebnissen anderer Studien deckt. So fanden Peacock et al. in einer Gruppe (n=178) gesunder *S. aureus*-Träger eine Prävalenz von 64% (*seg*) bzw. 60% (*sei*) [74]. In der Gruppe invasiver Isolate (n=155) konnten Peacock et al. *seg* und *sei* deutlich seltener nachweisen (55 bzw. 52%). Auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefundene Prävalenz von *tst* (18%) entsprach näherungsweise den

Resultaten anderer Studien. Zum Beispiel beschrieben Monecke et al. eine Prävalenz von 15% für *tst* bei asymptomatischen Trägern [66], Becker et al. 22,4% [5]. Bei *S. aureus*-Isolaten aus Blutkulturen wiesen Becker et al. eine Prävalenz von 18,3% für *tst* nach [5]. Im Gegensatz hierzu konnten Peacock et al. keinen Unterschied in der Prävalenz von *tst* bei Isolaten asymptomatischer Träger und invasiven Isolaten nachweisen [74]. Als mögliche Erklärung für diese leicht divergierenden Ergebnisse kommen Unterschiede im Patientenkollektiv in Frage. Weiterhin könnte eine unterschiedliche geographische Verteilung von *tst*-positiven Stämmen bzw. der *tst*-tragenden SaPIs zu Grunde liegen. Auch die Prävalenz der Enterotoxin-Gene *sea* bis *see*, *seh* und *sej* entsprach den Ergebnissen von Studien mit gesunden Probanden [5, 74]. Allerdings ist zu beachten, dass es sich beim betrachteten Kollektiv von CF-Patienten streng genommen um eine gemischte Gruppe aus kolonisierten, also asymptomatischen, und infizierten Patienten handelt und wir bisher nicht in der Lage sind, diese beiden Gruppen zweifelsfrei zu unterscheiden. Es ist Ziel der dieser Arbeit zu Grunde liegenden Studie, diese Unterscheidung vornehmen zu können. Wenn dies gelingt, wäre es interessant die Daten des Grundkollektivs unter diesem Gesichtspunkt erneut auszuwerten und zu erfahren, ob sich dann Gemeinsamkeiten oder Unterschiede mit Kontroll- oder Infektionsgruppen anderer Studien ergeben.

Der Vergleich mit den gesunden Kontrollgruppen der Studien von Peacock und Becker ist allerdings nur bedingt möglich. In beiden Fällen wurden die Isolate nur aus Nasenabstrichen gewonnen, die untersuchten Isolate der vorliegenden Arbeit stammen aber auch aus Rachen und unteren Atemwegen. Dadurch werden mögliche Einflüsse auf die Toxin-Ausstattung durch die Lokalisation beim Vergleich mit den Arbeiten von Becker und Peacock nicht berücksichtigt. Allerdings wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch eine Betrachtung der Prävalenz von Virulenz-Genen in Abhängigkeit vom Untersuchungsmaterial durchgeführt, so dass auch eine Untergruppe (n=117) vorliegt, bei der ein direkter Vergleich zulässig ist. Jedoch ergaben sich hier ebenfalls keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Toxingen-Ausstattung.

Bei der Analyse der Prävalenz der untersuchten Virulenz-Gene wurden die Ergebnisse auch daraufhin ausgewertet, ob einzelne Gene bei Isolaten aus bestimmten Studienzentren gehäuft nachzuweisen sind. Dieser Umstand würde dafür sprechen, dass Isolate mit

bestimmten mobilen genetischen Elementen, wie SaPIs und Plasmide, lokal gehäuft vorkommen und sich horizontal ausbreiten würden. Ein solcher Zusammenhang konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht gezeigt werden. Es wären umfangreiche Verlaufsbeobachtungen notwendig, um herauszufinden, ob einige Virulenz-Gene eine größere horizontale Mobilität aufweisen als andere.

Weiterhin wurde die Prävalenz der Virulenz-Gene der untersuchten *S. aureus*-Stämme unter verschiedenen Gesichtspunkten betrachtet. In der vergleichenden Analyse der unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien zeigten sich keine Auffälligkeiten. Die Prävalenz der einzelnen Virulenz-Gene in den verschiedenen Materialien unterschied sich nicht signifikant. Es wurde vermutet, dass möglicherweise Differenzen in der Prävalenz der Virulenz-Gene zwischen den Sputum-Isolaten und den Nasen- und Rachen-Isolaten bestehen könnten. Dies wäre dadurch zu erklären gewesen, dass *S. aureus* in den unteren Atemwegen länger persistiert und so über einen längeren Zeitraum einem besonders hohen Selektionsdruck, bedingt durch antibiotische Therapien, die Wirtsabwehr und die Konkurrenz mit anderen Keimen, ausgesetzt ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede gefunden werden, so dass möglicherweise die Ausstattung der Isolate mit einzelnen der untersuchten Virulenz-Gene keinen Selektionsvorteil hinsichtlich einer langfristigen Kolonisierung der unteren Atemwege mit *S. aureus* bietet. Es könnte jedoch auch sein, dass die Querschnittserfassung der Daten für diese Fragestellung nicht ausreichend ist und eine längere Beobachtungszeit dafür notwendig ist.

Die Analyse der Verteilung der Virulenz-Gene nach *agr*-Typen zeigte bereits bekannte sowie neue Zusammenhänge auf. So scheint die beschriebene Assoziation der *agr*-Gruppe III mit *tst* auch für *S. aureus*-Stämme von Mukoviszidose-Patienten zu gelten, ebenso wie die von *agr IV* mit *eta* [40, 41]. 55% der Isolate der *agr*-Gruppe III (n=58) wiesen *tst* auf. Bei den anderen Gruppen waren es 12% (*agr I*) bzw. 7% (*agr II* und *IV*). *eta* war bei 29% der Isolate mit *agr*-Gruppe IV (n=14) positiv, bei Isolaten der *agr*-Gruppe I, II und III war *eta* maximal in 1% der Fälle nachweisbar. In unserer Untersuchung wurde zum ersten Mal eine Assoziation bestimmter Enterotoxin-Gene mit einzelnen *agr*-Gruppen gefunden. So zeigte sich ein signifikant häufigeres Auftreten von *sea* bei Isolaten der *agr*-Gruppe III und von *sec* bei Isolaten der *agr*-Gruppe I (jeweils

$p < 0,05$). Ersteres entspricht nicht den Ergebnissen von Jarraud et al. (2002), welche einen Zusammenhang von Enterotoxin-assoziierten (*sea-sej*) Erkrankungen mit *agr*-Typ *I* und *II* beschrieben [41] und diesen mit dem unterschiedlichen phylogenetischen Hintergrund erklärten. Es könnte also sein, dass in der Untersuchung von Jarraud et al. ganz andere klonale *S. aureus*-Linien untersucht wurden, möglicherweise bedingt durch die unterschiedliche Verteilung von *S. aureus*-Klonen innerhalb Deutschlands und Frankreichs. Da Jarraud et al. leider keine leicht vergleichbare Typisierung wie die *spa*-Typisierung oder MLST der Isolate durchgeführt haben, lässt sich nicht ohne Weiteres darüber eine Aussage treffen.

Verkaik et al. konnten 2009 nachweisen, dass es sich bei SEA um ein aktiv exprimiertes Toxin handelt, welches eine Antwort des humoralen Immunsystems bewirkt und zu einer Bildung von anti-SEA Immunglobulin G führt [101]. Der Anstieg der anti-SEA-IgG-Konzentration im Laufe einer Infektion deutet darauf hin, dass *sea* eine wichtige Rolle in der Pathogenese von *S. aureus*-Infektionen spielt. So war *sea* in der Gruppe mit Isolaten aus Blutkulturen in 33% der Fälle positiv [101]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Peacock et al., die *sea* bei 32% der Blutkulturen des betrachteten Kollektivs ($n=155$) nachwies [74]. Somit könnte der Nachweis dieses Toxin-Gens insbesondere bei mit *S. aureus* kolonisierten Mukoviszidose-Patienten für weitere Therapieentscheidungen wichtig sein, da immerhin 12% der im Rahmen dieser Studie untersuchten Isolate *sea*-positiv waren.

Betrachtet man alleine die Prävalenz der einzelnen *agr*-Typen, so fällt auf, dass Isolate mit der *agr*-Gruppe *I* mit 50% deutlich am häufigsten nachzuweisen waren, Isolate der *agr*-Gruppe *IV* am seltensten, was auf einen Zusammenhang zwischen Isolaten der *agr*-Gruppe *I* und einer erfolgreichen Kolonisation/ Infektion mit *S. aureus* bei CF-Patienten hindeuten könnte. Gestützt wird diese Vermutung durch verschiedene Untersuchungen zur Prävalenz der verschiedenen *agr*-Gruppen und der Assoziation mit anderen Toxinen bei gesunden Trägern: Mégevand et al. untersuchten *S. aureus*-Träger und beschrieben eine Prävalenz von Isolaten der *agr*-Gruppe *I* von 45% [64]. Goerke et al. bestimmten in einer Kontrollgruppe gesunder Träger eine Prävalenz von Isolaten der *agr*-Gruppe *I* von 41% [31]. In dieser Arbeit wurde auch eine Prävalenz von Isolaten der *agr*-Gruppe *I* von 51% bei CF-Patienten beschrieben [31], die dem hier gefundenen Wert nahezu

entspricht. Im Gegensatz zu diesen Studienergebnissen, die die Idee eines Zusammenhangs zwischen Mukoviszidose und Isolaten der *agr*-Gruppe *I* unterstützten, beschrieb unsere Arbeitsgruppe 2003 in einer Untersuchung zur *agr*-abhängigen bakteriellen Interferenz im Zusammenhang mit der Kolonisation von CF-Patienten eine Prävalenz von 44% für Isolate der *agr*-Gruppe *I* bei CF-Patienten und von 47% aus Nasenabstrichen von gesunden *S. aureus*-Trägern. Es stellt sich also die Frage, ob die gefundenen Prävalenzen ein Ausdruck der allgemeinen Verteilung der verschiedenen *agr*-Typen innerhalb der *S. aureus*-Populationen sind und die Prävalenz der Isolate der *agr*-Gruppe *I* nur zufällig leicht über den Werten der gesunden Träger lag oder ob tatsächlich ein Zusammenhang zwischen Isolaten der *agr*-Gruppe *I* und Mukoviszidose besteht.

Dieser oben beschriebene Unterschied in der Prävalenz der Isolate mit den verschiedenen *agr*-Typen konnte im Rahmen der Verlaufsbetrachtung ebenfalls gezeigt werden. Unterstützt wird die Idee eines Zusammenhangs zwischen Isolaten der *agr*-Gruppe *I* und Mukoviszidose durch die Ergebnisse aus Kapitel 4.3. Drei der fünf häufigsten *spa*-Typen gehörten *agr*-Gruppe *I* an. Somit liegt die Vermutung nahe, dass *agr I* einen Vorteil bedeutet, da Isolate dieser *agr*-Gruppe sich besonders häufig, trotz des hohen Selektionsdruckes, dem die Bakterien unterworfen sind, durchsetzen konnten.

Werden die Häufigkeiten einzelner Virulenz-Gene miteinander korreliert, so zeigen sich einige interessante Zusammenhänge. In der Positivkorrelation der Toxine zueinander wird erkennbar, dass *seg* und *sei*, sowie *sed* und *sej* zwar häufig gemeinsam auftreten, wie Becker et al. 2003 beschrieben [5]. Jedoch scheint dies nicht generell zu gelten, wie die Auswertung der für diese Arbeit erhobenen Daten zeigt. So war *sei* in 99,5% der Fälle nachzuweisen, wenn *seg* positiv war. Umgekehrt waren es 98,1%. In absoluten Zahlen ausgedrückt bedeutet dies, dass ein Isolat zwar positiv für *seg* war, aber *sei* nicht nachweisbar war und bei 4 *sei*-positiven Isolaten kein *seg* nachgewiesen wurde. Im Gegensatz dazu beschrieben Becker et al. eine hundertprozentige Korrelation. Weiterhin war *sej* nur bei 75% aller positiven *sed*-Nachweise positiv, umgekehrt waren es allerdings 93,8%. Becker et al. beschreiben *sed* und *sej* als fixe Genkombination [5], was sich durch unsere Ergebnisse nicht bestätigen lässt. Da *sed* und *sej* auf demselben Plasmid lokalisiert sind [4, 110], und *seg* und *sei* demselben „enterotoxin gene cluster“ [42] angehören, stellt sich die Frage, wie es zu diesen Diskrepanzen in der Korrelation

kommen kann. Es könnte sein, dass bei den Isolaten Veränderungen in der Primerbindungsregion stattgefunden haben, die dazu führen, dass sich das Gen mittels der benutzen Primer nicht nachweisen lässt. Das würde bedeuten, dass zwar jeweils beide Gene vorhanden wären, aber eines von beiden mit den eingesetzten Methoden nicht nachzuweisen wäre. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das gesamte Gen durch Mutation verloren gegangen und so tatsächlich nicht nachzuweisen ist. Um dies zu klären, müsste eine Untersuchung z. B. mittels Southernblot Analyse [90] durchgeführt werden.

Bei der Betrachtung der Korrelationen für *sed* und *sej* fiel auf, dass wenige Assoziationen mit anderen Genen auftraten, *sei* und *seg* ausgenommen. *sei* und *seg* waren in 70% bzw. 69% der Fälle positiv wenn *sed* bzw. *sej* nachgewiesen wurden. Alle vier hier erwähnten Gene waren zu 70% (*sed*, *sej*) bzw. 49% (*seg*, *sei*) mit Isolaten der *agr*-Gruppe I assoziiert. Hier liegt die Vermutung nahe, dass die genetische Ausstattung der Isolate der *agr*-Gruppe I die Aufnahme dieser Enterotoxin-Gene fördern und möglicherweise auch einen Einfluss auf die Expression der Gene nimmt, was dazu führen könnte, dass diese deshalb häufiger gemeinsam und in Kombination mit Isolaten dieser *agr*-Spezifitätsgruppe auftreten.

Ebenfalls auffällig ist, dass *eta* und *etb* in keinem Fall zusammen mit *sea*-*see* auftraten. Diese Negativkorrelation wird durch die Tatsache unterstrichen, dass Isolate der *agr*-Gruppe IV nie Enterotoxine aufwiesen. Jarraud et al. beschrieben 2001 in ihrer Arbeit die Assoziation der Gruppe der Enterotoxin-vermittelten Erkrankungen mit den verschiedenen *agr*-Gruppen und zeigten, dass sehr selten eine Verbindung zwischen diesen Erkrankungen und *agr* IV bestand [41], was die gefundenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreicht. Jedoch ist dieser Sachverhalt aufgrund der geringen Fallzahlen (*agr* IV n=14) nur unter Vorbehalt zu betrachten und bedarf weiterer Untersuchungen.

Insgesamt lässt sich zu den Korrelationen zusammenfassend sagen, dass eine hohe Positivkorrelation auf eine Assoziation der untersuchten Gene hindeutet, z.B. durch Lokalisation auf demselben *egc* (enterotoxin gene cluster) (*seg* + *sei*) oder demselben Plasmid (*sed* + *sej*). Besteht hingegen eine niedrige Positivkorrelation, so deutet dies eher darauf hin, dass das jeweilige Gen allein, z.B. auf einem Bakteriophagen (*see*), lokalisiert ist

5.2. Analyse der Virulenzfaktoren im Verlauf

Während des Studienverlaufs fiel auf, dass verschiedene Stämme nicht konsequent im selben Untersuchungsbereich nachzuweisen waren, sondern zwischen den verschiedenen Lokalisationen zu wandern schienen. Zum Beispiel war bei Patient 1 der Verlaufsbeobachtung im Rahmen des 1. Ambulanzbesuches im Sputum der Klon mit dem *spa*-Typ t159 nachweisbar, in anderen Untersuchungsmaterialien nicht. Bei der Wiedervorstellung zeigte sich dieser Klon im Rachenausstrich, im weiteren Verlauf konnte er schließlich auch in der Nase nachgewiesen werden.

Desweiteren zeigten einige Isolate bei gleichem *spa*-Typ unterschiedliche Toxinprofile. Zum Beispiel wiesen Isolate mit *spa*-Typ t078 in einigen Fällen die Enterotoxin-Gene *seb*, *seg* und *sei* auf, jedoch nicht konsequent. Solche und ähnliche Konstellationen konnten in 6 Fällen bei 5 der 10 Patienten der Verlaufsbeobachtung gezeigt werden. Hierfür sind verschiedene Erklärungen möglich.

So könnte eine Ursache im methodischen Ansatz liegen: Die Gewinnung der Untersuchungsmaterialien erfolgte durch Abstriche bzw. das Expektorieren und Sammeln von Sputum. Hierbei ergibt sich die Möglichkeit, dass ein eventuell vorhandener Keim durch den Abstrich nicht erfasst wurde, oder dass das Sputum aus einem anderen Bereich der Lunge stammt und so mit den weiteren Methoden der bakteriologischen Diagnostik nicht nachzuweisen war. Ähnlich kann das Vorhandensein verschiedener Subklone eines *spa*-Typen an unterschiedlichen Lokalisationen erklärt werden. Weiterhin könnte es sein, dass der Erreger in einer so geringen Menge vorhanden war, dass diese unter der Nachweisgrenze lag. Desweiteren wurden die einzelnen *S. aureus*-Stämme nach phänotypischen Gesichtspunkten beurteilt und isoliert, so dass die Möglichkeit besteht, dass nicht alle genotypisch unterschiedlichen Klone- und Subklone des jeweiligen *spa*-Typen bzw. Stammes erfasst wurden, da sie sich möglicherweise phänotypisch nicht unterschieden.

Die Unterschiede der genetischen Ausstattung von Isolaten desselben *spa*-Typen könnten, von methodischen Ursachen abgesehen, auch dadurch bedingt sein, dass es aufgrund des enormen Selektionsdrucks, dem die Bakterien ausgesetzt sind, zum Erwerb bzw. Verlust von Genen kommt, wodurch diese einen Selektionsvorteil haben. Peacock

et al. zeigten 2002 in einer Arbeit [74], dass Hinweise für einen beachtlichen horizontalen Transfer von Genen vorlagen. Novick et al. beschrieben mobile genetische Elemente, so genannte Pathogenitätsinseln (SaPI), die für SAgs kodieren [71, 73]. Mit der Unterstützung durch Helfer-Phagen können diese aus dem Genom exzidiert, repliziert und verkapselt werden. So entstehen Partikel, mit einer außerordentlich hohen Transferrate, welche für Toxine kodierende Gene tragen [71, 73]. Es liegt die Vermutung nahe, dass ein solcher Transfer von Toxin-Genen gerade auch bei *S. aureus*-Stämmen stattfindet, welche über einen langen Zeitraum nebeneinander die Atemwege von Mukoviszidose-Patienten besiedeln. Wird der gleiche Klon mit verändertem Toxinprofilen nachgewiesen, so kann als Ursache angenommen werden, dass einer der Klone eine bestimmte Pathogenitätsinsel, ein Plasmid, einen Bakteriophagen oder ein „enterotoxin gene cluster“ erworben oder verloren hat.

Insgesamt war die hohe Mobilität von Virulenz-Genen sehr auffällig, was durch deren Lokalisation auf mobilen genetischen Elementen, Phagen, Plasmiden und SaPIs zu erklären ist. So zeigten einige Gene eine besonders hohe Beweglichkeit: *seg* und *sei*, gemeinsam auf dem *egc* lokalisiert, waren bei 4 (t078, t5430, t1577, t211) der 6 gesondert betrachteten Klone der *spa*-Typen unterschiedlich nachweisbar. *tst*, lokalisiert auf SaPI1, zeigte sogar bei 5 (t5430, t012, t1577, t211, t338) der 6 betrachteten Klone Unterschiede. Die genannten Toxin-Gene zeigten eine hohe Mobilität, waren im Verlauf mal vorhanden und mal nicht nachzuweisen. Weiterhin konnten in einem Fall (*S. aureus*-Klon mit dem *spa*-Typ t078) Unterschiede beim Nachweis von *seb*, lokalisiert auf SaPI3, beobachtet werden. Bei den Isolaten des *spa*-Typs t078 von Patient 1 trat während der Beobachtungszeit ein Verlust von *seb*, *seg* und *sei* auf. Bei Isolaten des *spa*-Typs t5430 desselben Patienten wurde ein Zugewinn von *tst*, *seg*, *seh* und *sei* beobachtet.

Bei den Isolaten aus Rachenabstrichen des *spa*-Typs t211 des Patienten 9 fiel auf, dass lediglich im Rahmen des 4. Ambulanzbesuches *tst*, *seg* und *sei* bei diesem Klon nachweisbar waren, die bei den früher nachgewiesenen Klonen nicht vorhanden waren. Solche und ähnliche Entwicklungen der Toxinprofile waren bei allen im Rahmen der Verlaufsbeobachtung gesondert beschriebenen Klonen zu beobachten. Eine Erklärung für die Beobachtungen des Zugewinns von 3 Toxin-Genen bei Patient 9 könnte sein, dass die-

ses Toxinprofil (*tst*, *seg*, *sei*) früher bei allen Klonen dieses *spa*-Typs (t211) vorlag, diese Gene jedoch mit der Zeit verloren gingen. Der in dieser Arbeit gefundene, für diese Toxin-Gene positive Klon hätte demnach weiterhin persistiert und wurde jetzt erst beim 4. Ambulanzbesuch erfasst. Es könnte sich tatsächlich aber auch um den Zugewinn an genetischer Information handeln, wobei jedoch größere Bereiche hinzugekommen sein müssten, da *tst* und *seg*, *sei* auf unterschiedlichen mobilen Elementen, *tst* auf SaPI1, *seg* und *sei* auf *egc*, gelagert sind. Es bleibt abzuwarten, ob dieses Isolat mit den 3 Toxin-Genen in weiteren Untersuchungen nachweisbar sein wird.

Um überzeugend darzustellen, dass es sich beim Nachweis verschiedener Subklone eines *spa*-Typen tatsächlich um verwandte Klone handelt, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, die eine molekulare Typisierung gestatten. Eine mögliche Methode zur weiteren Typisierung ist die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), die von vielen Autoren als wichtiges Werkzeug epidemiologischer Untersuchungen angesehen wird (u.a. [28, 95]). Hierbei wird die DNA mittels eines seltenen schneidenden Restriktionsenzym (*smal*) gespalten und via Gelelektrophorese aufgetrennt. Die entstandenen Banden werden mit denen anderer Isolate verglichen und lassen so Rückschlüsse auf den Verwandtheitsgrad zu [95]. PFGE war bis vor kurzem die mit Abstand häufigste Methode zur Typisierung Methicillin-sensibler (MSSA) und -resistenter *S. aureus*-Stämme (MRSA) [69]. Weiterhin ist eine Typisierung mittels Multilocus Sequenz Typisierung (MLST) möglich. Hierbei handelt es sich um eine hoch-diskriminative Methode zur Charakterisierung bakterieller Isolate, basierend auf den Sequenzen ca. 450bp langer Fragmente von sieben „Haushalts“-Genen [62]. Der Vorteil der MLST liegt in der guten Vergleichbarkeit der Ergebnisse über das Internet, was einen Austausch der Informationen zwischen verschiedenen Laboren gestattet [23].

5.3. Prävalenz der Virulenz-Gene häufiger *spa*-Typen

Bei dieser Analyse sollte untersucht werden, ob die Prävalenz der Virulenz-Gene bei Isolaten eines *spa*-Typs, der häufig bei unterschiedlichen Patienten nachgewiesen wurde, identisch oder unterschiedlich ist. Betrachtet wurden die *spa*-Typen t002 (11 Isolate

von 7 Patienten), t008 (10 Isolate von 5 Patienten), t015 (14 Isolate von 8 Patienten), t084 (28 Isolate von 17 Patienten) und t091 (17 Isolate von 9 Patienten).

Obwohl *seg* und *sei* insgesamt häufig bei den untersuchten Isolaten nachweisbar waren (63% bzw. 64%), konnten diese Gene interessanterweise beim mit Abstand häufigsten *spa*-Typen (t084) lediglich in 5 von 28 Fällen nachgewiesen werden. Auch andere Enterotoxin-Gene und *tst* konnten nur vereinzelt detektiert werden. Insgesamt wiesen die Isolate des *spa*-Typen t084 eine äußerst geringe Prävalenz der untersuchten Virulenz-Gene auf. Die weite Verbreitung dieses Klons mit derart geringer Toxin-Ausstattung lässt vermuten, dass *S. aureus*-Klone mit wenig zusätzlicher genetischer Information möglicherweise einen Vorteil gegenüber Stämmen haben, die mit zusätzlicher genetischer Information „belastet“ sind. Zusätzliche DNA in Form von Virulenz-Genen, die für das Überleben des Bakteriums nicht essentiell sind, bedeutet in diesem Fall unnötige Mehrarbeit und einen höheren Energiebedarf der Zelle, so dass es für die Ausbreitung eines Klons von Vorteil sein kann, über weniger Gene zu verfügen. Daher vermuten wir einen Zusammenhang zwischen erfolgreicher Ausbreitung eines Klons und dem Fehlen von Virulenz-Genen, was in weiteren Untersuchungen bestätigt werden muss.

Für die gefundenen Unterschiede in der Toxin-Ausstattung von Klonen desselben *spa*-Typen wäre abermals eine mögliche Erklärung, dass die Ursache methodischer Art ist. Jedoch ist die Stichprobe so groß (n=333), dass man davon ausgehen kann, dass sie durchaus repräsentativ ist und ausreichend Klone erfasst wurden, um erste Aussagen zur tatsächlichen Toxin-Ausstattung treffen zu können.

Die Toxingen-Ausstattung der anderen vier häufigsten *spa*-Typen (t002, t008, t015 und t091) ist nur unter Vorbehalt zu betrachten, da die Stichproben doch insgesamt zu klein sind, um generelle Aussagen zu treffen. Hier war die Ausstattung mit Toxin-Genen insgesamt etwas großzügiger: *seg*, *sei* und *tst* wurden sehr häufig beobachtet, außerdem *sea*, *sec* und *sed*. Dieser Sachverhalt unterstreicht wieder unsere Vermutung: Der Klon, der sich am häufigsten durchsetzte, ist mit weniger Toxin-Genen ausgestattet.

Die Ergebnisse zeigen kein charakteristisches Virulenz-Profil für *S. aureus*-Isolate von CF-Patienten, was den Schluss zulässt, dass eine erfolgreiche Kolonisation/ Infektion

der Atemwege von CF-Patienten nicht von einer bestimmten Ausstattung mit den von uns untersuchten Virulenz-Genen abhängig ist, oder aber, dass möglicherweise wichtige Gene nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchung waren.

Bei der Untersuchung der *agr*-Typen fiel auf, dass bei Klonen des *spa*-Typs t091 in 2 Fällen *agr* (Isolate von demselben Patienten) mittels PCR nicht nachzuweisen war. Insgesamt konnte in der Studie bei 4 Isolaten von 2 Patienten kein *agr*-Typ gefunden werden. Shopsin et al. zeigten 2008 in einer Arbeit [87], dass 15 von 160 gesunden Probanden mit einem *agr*-defekten *S. aureus*-Stamm oder einer Kombination von *agr*-defekten und *agr*-positiven Klonen kolonisiert waren. Shopsin et al. vermuteten, dass diese Stämme zum einen übertragbar seien und zum anderen in einem nosokomialen Setting selektiert werden könnten, da die Autoren eine Assoziation zu Krankenhausaufenthalten fanden [87]. Vor allem die Überlegung zur Verbindung mit Hospitalisierungen ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Bezug auf Mukoviszidose-Patienten besonders naheliegend, da bei dieser Gruppe aufgrund der Grunderkrankung stationäre Aufenthalte häufiger notwendig sind. Ob die Isolate, bei denen mittels PCR *agr* nicht nachgewiesen werden konnte, tatsächlich keinen *agr*-Locus besitzen oder ob es bei diesen Isolaten zu einer Mutation in der Primerbinderegion gekommen ist, müsste in weiteren Untersuchungen festgestellt werden. Auch kann mit der PCR keine Aussage über die Aktivität des *agr*-Locus getroffen werden. Auch diese Fragestellung bleibt weiteren Untersuchungen überlassen.

Auch die betrachteten Isolate des *spa*-Typs t084 wiesen eine Auffälligkeit im Hinblick auf die *agr*-Gruppe auf. 26 der 28 Isolate gehörten der *agr*-Gruppe II an, eines war jedoch Gruppe I und eines Gruppe III zuzuordnen. Hier können ebenfalls Mutationen in der Primerbinderegion oder aber im Gen selbst vermutet werden. Denkbar sind auch methodische Ursachen, wie bereits erläutert. Interessant ist, dass beide Isolate ein abweichendes Toxin-Profil aufweisen, so dass hier ebenfalls weitere Untersuchungen durchzuführen sind.

Bei der Analyse der Ergebnisse der *S. aureus*-Population aus den Atemwegen der CF-Patienten fiel auf, dass wesentlich häufiger Kombinationen von Virulenz-Genen nachweisbar waren als das Auftreten einzelner Gene. Dieser Umstand wurde von Becker et al. 2003 teilweise bereits beschrieben [5] und ist unter anderem durch die gemeinsame

Lokalisation bestimmter Gene auf Plasmiden oder anderen Gen-tragenden Einheiten zu erklären. Vor allem *seg* und *sei* und *sed* und *sej* traten gemeinsam auf [5]. Dies kann jedoch nicht als alleinige Erklärung gelten, da sich auch Kombinationen von Genen, welche nicht miteinander assoziiert sind, zeigten. Zum Beispiel war *sea* häufiger mit der Kombination von *sed* und *sej* kombiniert, was über die Lokalisation nicht zu erklären ist. So wirft also auch dieser Umstand Fragen auf, die in weiteren Untersuchungen zu klären sind: Wie kommt es zu solchen Assoziationen? Und worin liegt der Vorteil für das Bakterium, der offensichtlich vorhanden sein muss, wenn diese Kombinationen gehäuft auftreten?

Für die gefundenen Unterschiede in der Toxin-Ausstattung von Klonen desselben *spa*-Typen wäre abermals eine mögliche Erklärung, dass die Ursache methodischer Art ist. Jedoch ist die Stichprobe groß genug (n=333), um davon auszugehen, dass die Ergebnisse valide und repräsentativ sind.

5.4. Virulenz-Genprofile bei klinisch manifester Infektion

Die exemplarische Betrachtung der Virulenz-Genprofile von Isolaten bei klinisch manifester Infektion kann aufgrund der sehr geringen Fallzahl (n=4) in keiner Weise als repräsentativ gelten, jedoch kann sie ein Anstoß zu weiteren Untersuchungen in dieser Richtung sein.

Die Isolate, die bislang im Rahmen von Infektionen untersucht wurden, wiesen eine geringe Prävalenz der Enterotoxine *sea- see* und der Exfoliativtoxine *eta, etb* und *tst* auf. Die Prävalenz der Enterotoxine *seg- sej* war gegenüber dem Gesamtkollektiv unverändert. Isolate der *agr*-Gruppen *III* und *IV* traten bislang nicht auf und lassen sich durch die geringe Fallzahl erklären. Da es sich bei den Isolaten der *agr*-Gruppen *I* und *II* um die beiden häufigsten *agr*-Typen im Gesamtkollektiv handelt (50% und 27%), war das häufige Auftreten dieser Isolate im Zusammenhang mit Infektionen nicht überraschend.

Sehr interessant sind die Beobachtungen bei Patient 3 dieser Betrachtung. Jedes der nachgewiesenen Isolate zeigte beim 2. Ambulanzbesuch Unterschiede im Toxingprofil gegenüber dem 1. Ambulanzbesuch. Bei einem Isolat fand sich ein Zugewinn von

seg und *sei*, bei einem weiteren war im Verlauf zusätzlich *seh* nachweisbar. Beim dritten Isolat war im Rahmen des 2. Ambulanzbesuchs das vorher gefundene *tst* nicht mehr nachzuweisen. Diese Beobachtungen unterstreichen weiter die Vermutung einer hohen Mobilität Gen-tragender Elemente, wie bereits in den vorherigen Kapiteln diskutiert. Es bleibt die Frage, wie es zur Aufnahme dieser Elemente kommen konnte. Man kann vermuten, dass dies durch den häufigen Kontakt mit klinischen Einrichtungen, bedingt durch die Grunderkrankung und die vorliegende Infektion, geschehen ist. Auch wenn es sich hier um eine Einzelfall-Beschreibung handelt, ist dieses Ergebnis sehr interessant und bedarf weiterer Beobachtung, da sich hieraus mögliche Konsequenzen für die Behandlung von Patienten mit einer Infektion ergeben.

Bei den Isolaten der Kontrollgruppe ließen sich deutlich mehr Toxin-Gene nachweisen als bei den Isolaten der Infektionsgruppe. Auffällig war weiterhin, dass jeder Patient der Kontrollgruppe ausschließlich Isolate eines *spa*-Typs aufwies, welche auch untereinander keine Mobilität der Virulenz-Gene aufwiesen.

Peacock et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass bestimmte Virulenzfaktoren mit invasiven *S. aureus*-Infektionen assoziiert waren [74]. Ein solcher Zusammenhang lässt sich aufgrund der in unserer Untersuchung gefundenen Daten nicht vermuten. Jedoch sind hier weit umfangreichere Untersuchungen notwendig, um eine Assoziation klinisch manifester Infektionen mit bestimmten Virulenzfaktoren ausschließen zu können, zumal wir gegenwärtig noch nicht in der Lage sind eine Infektion zweifelsfrei von einer Kolonisation zu unterscheiden.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Prävalenz bestimmter Virulenzfaktoren in *S. aureus*-Isolaten, die aus den Atemwegen von Mukoviszidose-Patienten stammten, im Rahmen einer prospektiven, multizentrischen Langzeitstudie untersucht. Es zeigte sich bisher kein charakteristisches Profil der Prävalenz der Entero- und Exfoliativtoxine im untersuchten Patientenkollektiv (n=134), wobei die Ergebnisse mit denen anderer Studien, die Isolate gesunder Probanden und von Patienten mit invasiven Infektionen untersucht haben, weitestgehend übereinstimmen. Jedoch fiel auf, dass die Verteilung der *agr*-Gruppen sich von der bei gesunden Probanden unterschied. *agr I* trat bei 50% der untersuchten Isolate auf, was deutlich häufiger als bei den Isolaten Gesunder war. Weiterhin war *sec* bei Isolaten der *agr*-Gruppe *I* signifikant häufiger nachzuweisen als bei Isolaten der *agr*-Gruppen *II – IV*. Ebenfalls fand sich eine signifikante Häufung von *sea*, *seh* und *tst* bei Isolaten der *agr*-Gruppe *III*. Die Vermutung, dass die Lokalisation (Nasenvorhof, Rachen, untere Atemwege) der Bakterien eine Auswirkung auf das Virulenz-Genprofil hat, konnte in dieser Arbeit nicht belegt werden. Jedoch konnten einige interessante Positivkorrelationen von Toxinen gefunden werden, die nur zum Teil in der Literatur beschrieben sind. So waren *sed*, *sej*, *seg* und *sei* stark mit der *agr*-Gruppe *I* korreliert.

Während des Studienverlaufs konnte eine hohe Mobilität von Virulenz-Genen bei den Isolaten von 5 Patienten beobachtet werden, besonders für *seg*, *sei* und *tst*. Die am weitesten verbreiteten und am häufigsten auftretenden *spa*-Typen wiesen weniger Entero- und Exfoliativtoxin-Gene auf als die nicht so häufig auftretenden Stämme. Weiterhin konnten bei Isolaten desselben *spa*-Typs unterschiedliche Virulenz-Genprofile nachgewiesen werden, was für einen beachtlichen horizontalen Gentransfer spricht.

Bei der exemplarischen Betrachtung (n=4) der Virulenz-Genprofile bei Isolaten von Patienten mit klinisch manifester Infektion waren *sea-see* und *eta*, *etb* und *tst* bislang selten nachzuweisen, was während des weiteren Verlaufs der Studie beobachtet werden und in weiteren Untersuchungen bestätigt werden muss.

7. Index

7.1. Verwendete Abkürzungen & Maßeinheiten

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
AGR	Accessory Gene Regulator
<i>agr</i>	Gen für Accessory Gene Regulator
AIP	Autoinducing Peptide
APC	Antigen presenting cells
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
CF	Cystic Fibrosis
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
<i>eap</i>	Gen für Extracellular Adherence Protein
Eap	Extracellular adherence protein
<i>egc</i>	enterotoxin gene cluster
<i>emp</i>	Gen für extracellular matrix protein
Emp	Extracellular matrix protein
<i>eta</i>	Gen für Exfoliativtoxin A
<i>etb</i>	Gen für Exfoliativtoxin B
FEV ₁	Einsekundenkapazität
<i>hlg</i>	Gen für Gamma-Hämolyisin
Hlg	Gamma-Hämolyisin

Ig	Immunglobulin
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-2	Interleukin 2
IL-8	Interleukin 8
kDa	Kilodalton
MEF25	Maximaler Exspiratorischer Flow bei 25% der Vitalkapazität
MHC II	Major Histocompatibility Complex II
min	Minute(n)
MLST	Multilocus Sequenz Typisierung
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PFGE	Pulsfeld Gelelektrophorese
PT	pyrogenes Toxin
PVL	Panton Valentin Leucocidin
<i>pvl</i>	Gen für Panton Valentin Leucocidin
s. Kap.	siehe Kapitel
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAg	Superantigen
SaPI	<i>Staphylococcus aureus</i> Pathogenicity Island
SE	Staphylococcal Enterotoxin
SEA -SEJ	Staphylococcal Enterotoxin A -J

<i>sea-sej</i>	Gene für Enterotoxine A - J
SpA	Staphylococcal Protein A
<i>spa</i>	Gen für Staphylococcal Protein A
SSSS	Staphylococcal Scalded Skin Syndrome
TcR	T-Zell Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TSS	Toxisches Schock Syndrom
TSST-1	Toxic Shock-Syndrom Toxin
<i>tst</i>	Gen für TSST-1
VF	Virulenzfaktoren
Zn ²⁺	Zink-Ion

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der SpA-Region	14
Abbildung 2: Agarosegel-Elektrophorese der PCR für <i>sea</i> bis <i>see</i>	25
Abbildung 3: Agarosegel-Elektrophorese der PCR für <i>eta</i> , <i>etb</i> und <i>tst</i>	26
Abbildung 4: Agarosegel-Elektrophorese der PCR für <i>seg</i> bis <i>sej</i>	27
Abbildung 5: Agarosegel-Elektrophorese der PCR für <i>agr</i>	28
Abbildung 6: Agarosegel-Elektrophorese der PCR für <i>pvl</i> und <i>hlg</i>	29
Abbildung 7: Agarosegel-Elektrophorese der PCR für <i>eap</i>	30
Abbildung 8: Agarosegel-Elektrophorese der PCR für <i>emp</i>	31
Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung der Virulenzfaktoren (VF) (absolut).....	33
Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung der VF (nach Materialien)	34
Abbildung 11: VF nach <i>agr</i> -Typ, Prozentangaben der rel. Häufigkeit	35

7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sequenzen der verwendeten Primer	24
Tabelle 2: Ansatz für Multiplex-PCR der Enterotoxine A bis E.....	25
Tabelle 3: Ansatz für Multiplex-PCR der Exfoliativtoxine A und B, TSST.....	26
Tabelle 4: Ansatz für Multiplex-PCR der Enterotoxine G bis J.....	27
Tabelle 5: Ansatz für <i>agr</i> -PCR.....	28
Tabelle 6: Ansatz für <i>pvl-hlg</i> -PCR	29
Tabelle 7: Ansatz für <i>eap</i> -PCR.....	30
Tabelle 8: Ansatz für <i>emp</i> -PCR.....	31
Tabelle 9: Anzahl der <i>S. aureus</i> -Klone	32
Tabelle 10: Häufigkeitsverteilung der Virulenzfaktoren (VF) insgesamt.....	32
Tabelle 11: Ortsspezifische Häufigkeitsverteilung der Virulenzfaktoren	33
Tabelle 12: Verteilung der VF nach <i>agr</i> -Typen	35
Tabelle 13: Kreuztabelle/ Korrelation der Positivtestungen (rel. Häufigkeiten, n=333)	37
Tabelle 14: Patient 1, nachgewiesene <i>spa</i> -Typen.....	38
Tabelle 15: VF der Isolate des <i>spa</i> -Typs t078 bei Patient 1, nach Materialien.....	39
Tabelle 16: VF der Isolate des <i>spa</i> -Typs t5430 bei Patient 1, nach Materialien.....	39
Tabelle 17: Patient 2, nachgewiesene <i>spa</i> -Typen.....	40
Tabelle 18: VF der Isolate des <i>spa</i> -Typs 012 bei Patient 2, nach Materialien	40
Tabelle 19: Patient 3, nachgewiesene <i>spa</i> -Typen.....	41
Tabelle 20: Patient 4, nachgewiesene <i>spa</i> -Typen.....	41
Tabelle 21: Patient 5, nachgewiesene <i>spa</i> -Typen.....	42
Tabelle 22: Patient 6, nachgewiesene <i>spa</i> -Typen.....	43
Tabelle 23: Patient 7, nachgewiesene <i>spa</i> -Typen.....	43
Tabelle 24: VF der Isolate des <i>spa</i> -Typs t1577 bei Patient 7, nach Materialien.....	44
Tabelle 25: Patient 8, nachgewiesene <i>spa</i> -Typen.....	44
Tabelle 26: Patient 9, nachgewiesene <i>spa</i> -Typen.....	45
Tabelle 27: VF der Isolate des <i>spa</i> -Typs t211 bei Patient 9, nach Materialien.....	46
Tabelle 28: Patient 10, nachgewiesene <i>spa</i> -Typen.....	46
Tabelle 29: VF der Isolate des <i>spa</i> -Typs t338 bei Patient 10, nach Materialien.....	47
Tabelle 30: Isolate des <i>spa</i> -Typs t002, nach Materialien	48
Tabelle 31: Isolate des <i>spa</i> -Typs t008, nach Materialien	49

Tabelle 32: Isolate des <i>spa</i> -Typs t015, nach Materialien	50
Tabelle 33: Isolate des <i>spa</i> -Typs t084, nach Materialien	51
Tabelle 34: Isolate des <i>spa</i> -Typs t091, nach Materialien	52
Tabelle 35: Toxinprofile von Isolaten von Patienten mit klinisch manifester Infektion	53
Tabelle 36: Toxinprofile von Patienten ohne klinisch manifeste Infektion	54

8. Literaturverzeichnis

1. Amagai, M., N. Matsuyoshi, et al., Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nat Med*, 2000. **6**(11): p. 1275-7.
2. Athanasopoulos, A.N., M. Economopoulou, et al., The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms. *Blood*, 2006. **107**(7): p. 2720-7.
3. Balaban, N. and A. Rasooly, Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol*, 2000. **61**(1): p. 1-10.
4. Bayles, K.W. and J.J. Iandolo, Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J Bacteriol*, 1989. **171**(9): p. 4799-806.
5. Becker, K., A.W. Friedrich, et al., Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. *J Clin Microbiol*, 2003. **41**(4): p. 1434-9.
6. Becker, K., R. Roth, and G. Peters, Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J Clin Microbiol*, 1998. **36**(9): p. 2548-53.
7. Benhamou, D., A.S. Carrie, and F. Lecomte, [Staphylococcus aureus: role and impact in the treatment of nosocomial pneumonia]. *Rev Mal Respir*, 2005. **22**(4): p. 595-603.
8. Betley, M.J. and J.J. Mekalanos, Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science*, 1985. **229**(4709): p. 185-7.
9. Blomster-Hautamaa, D.A., B.N. Kreiswirth, et al., The nucleotide and partial amino acid sequence of toxic shock syndrome toxin-1. *J Biol Chem*, 1986. **261**(33): p. 15783-6.
10. Bohach, G.A., D.J. Fast, et al., Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. *Crit Rev Microbiol*, 1990. **17**(4): p. 251-72.
11. Branger, C., C. Gardye, and N. Lambert-Zechovsky, Persistence of *Staphylococcus aureus* strains among cystic fibrosis patients over extended periods of time. *J Med Microbiol*, 1996. **45**(4): p. 294-301.
12. Burns, J.L., R.L. Gibson, et al., Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis*, 2001. **183**(3): p. 444-52.

13. Chang, H.C. and M.S. Bergdoll, Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin D. *Biochemistry*, 1979. **18**(10): p. 1937-42.
14. Chavakis, T., M. Hussain, et al., Staphylococcus aureus extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med*, 2002. **8**(7): p. 687-93.
15. Chavakis, T., K.T. Preissner, and M. Herrmann, The anti-inflammatory activities of Staphylococcus aureus. *Trends Immunol*, 2007. **28**(9): p. 408-18.
16. Colbert, D., A. Anilionis, et al., Molecular organization of the protein A gene and its expression in recombinant host organisms. *J Biol Response Mod*, 1984. **3**(3): p. 255-9.
17. Couch, J.L. and M.J. Betley, Nucleotide sequence of the type C3 staphylococcal enterotoxin gene suggests that intergenic recombination causes antigenic variation. *J Bacteriol*, 1989. **171**(8): p. 4507-10.
18. Couch, J.L., M.T. Soltis, and M.J. Betley, Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. *J Bacteriol*, 1988. **170**(7): p. 2954-60.
19. Descloux, E., T. Perpoint, et al., One in five mortality in non-menstrual toxic shock syndrome versus no mortality in menstrual cases in a balanced French series of 55 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2008. **27**(1): p. 37-43.
20. Dinges, M.M., P.M. Orwin, and P.M. Schlievert, Exotoxins of Staphylococcus aureus. *Clin Microbiol Rev*, 2000. **13**(1): p. 16-34, table of contents.
21. Driscoll, J.A., S.L. Brody, and M.H. Kollef, The epidemiology, pathogenesis and treatment of Pseudomonas aeruginosa infections. *Drugs*, 2007. **67**(3): p. 351-68.
22. Durupt, F., L. Mayor, et al., Prevalence of Staphylococcus aureus toxins and nasal carriage in furuncles and impetigo. *Br J Dermatol*, 2007. **157**(6): p. 1161-7.
23. Enright, M.C., N.P. Day, et al., Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus. *J Clin Microbiol*, 2000. **38**(3): p. 1008-15.
24. Foster, T.J., The Staphylococcus aureus "superbug". *J Clin Invest*, 2004. **114**(12): p. 1693-6.
25. Fraser, J.D. and T. Proft, The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunol Rev*, 2008. **225**: p. 226-43.
26. Frenay, H.M., J.P. Theelen, et al., Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains on the basis of protein A gene polymorphism. *J Clin Microbiol*, 1994. **32**(3): p. 846-7.
27. Genestier, A.L., M.C. Michallet, et al., Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest*, 2005. **115**(11): p. 3117-27.
28. Gibson, J.R., K. Sutherland, and R.J. Owen, Inhibition of DNase activity in PFGE analysis of DNA from Campylobacter jejuni. *Lett Appl Microbiol*, 1994. **19**(5): p. 357-8.
29. Gibson, R.L., J.L. Burns, and B.W. Ramsey, Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003. **168**(8): p. 918-51.
30. Gillet, Y., B. Issartel, et al., Association between Staphylococcus aureus strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising

- pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*, 2002. **359**(9308): p. 753-9.
31. Goerke, C., M. Kummel, et al., Evaluation of intraspecies interference due to agr polymorphism in *Staphylococcus aureus* during infection and colonization. *J Infect Dis*, 2003. **188**(2): p. 250-6.
 32. Guss, B., M. Uhlen, et al., Region X, the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A. *Eur J Biochem*, 1984. **138**(2): p. 413-20.
 33. Harmsen, D., H. Claus, et al., 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*, 2003. **41**(12): p. 5442-8.
 34. Harraghy, N., M. Hussain, et al., The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiology*, 2003. **149**(Pt 10): p. 2701-7.
 35. Hovde, C.J., S.P. Hackett, and G.A. Bohach, Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C3 gene: sequence comparison of all three type C staphylococcal enterotoxins. *Mol Gen Genet*, 1990. **220**(2): p. 329-33.
 36. Huang, I.Y., J.L. Hughes, et al., Complete amino acid sequence of staphylococcal enterotoxin A. *J Biol Chem*, 1987. **262**(15): p. 7006-13.
 37. Hussain, M., K. Becker, et al., Analogs of Eap protein are conserved and prevalent in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001. **8**(6): p. 1271-6.
 38. Hussain, M., K. Becker, et al., Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of *Staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins. *J Bacteriol*, 2001. **183**(23): p. 6778-86.
 39. Hussain, M., C. von Eiff, et al., eap Gene as novel target for specific identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 2008. **46**(2): p. 470-6.
 40. Jarraud, S., G.J. Lyon, et al., Exfoliatin-producing strains define a fourth agr specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 2000. **182**(22): p. 6517-22.
 41. Jarraud, S., C. Mougel, et al., Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect Immun*, 2002. **70**(2): p. 631-41.
 42. Jarraud, S., M.A. Peyrat, et al., egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*, 2001. **166**(1): p. 669-77.
 43. Ji, G., R. Beavis, and R.P. Novick, Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science*, 1997. **276**(5321): p. 2027-30.
 44. Ji, G., R.C. Beavis, and R.P. Novick, Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(26): p. 12055-9.
 45. Jones, R.N., Global epidemiology of antimicrobial resistance among community-acquired and nosocomial pathogens: a five-year summary from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *Semin Respir Crit Care Med*, 2003. **24**(1): p. 121-34.

46. Kahl, B., M. Herrmann, et al., Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis*, 1998. **177**(4): p. 1023-9.
47. Kahl, B.C., K. Becker, et al., 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*, 2003. **41**(11): p. 5199-201.
48. Kahl, B.C., A. Mellmann, et al., 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*, 2005. **43**(1): p. 502-5.
49. Kaneko, J. and Y. Kamio, Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004. **68**(5): p. 981-1003.
50. Kaneko, J., T. Kimura, et al., Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage phiPVL carrying Panton-Valentine leukocidin genes. *Gene*, 1998. **215**(1): p. 57-67.
51. Kirmani, N., C.U. Tuazon, et al., *Staphylococcus aureus* carriage rate of patients receiving long-term hemodialysis. *Arch Intern Med*, 1978. **138**(11): p. 1657-9.
52. Kluytmans, J., A. van Belkum, and H. Verbrugh, Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev*, 1997. **10**(3): p. 505-20.
53. Koreen, L., S.V. Ramaswamy, et al., 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*, 2004. **42**(2): p. 792-9.
54. Ladhani, S., Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2003. **39**(2): p. 181-9.
55. Ladhani, S., C.L. Joannou, et al., Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin Microbiol Rev*, 1999. **12**(2): p. 224-42.
56. Lee, L.Y., Y.J. Miyamoto, et al., The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. *J Clin Invest*, 2002. **110**(10): p. 1461-71.
57. Lina, G., F. Boutite, et al., Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of *Staphylococcal* agr alleles. *Appl Environ Microbiol*, 2003. **69**(1): p. 18-23.
58. Lina, G., Y. Piemont, et al., Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis*, 1999. **29**(5): p. 1128-32.
59. Loffler, B., M. Hussain, et al., *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog*. **6**(1): p. e1000715.
60. Lowy, F.D., *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, 1998. **339**(8): p. 520-32.
61. Lyczak, J.B., C.L. Cannon, and G.B. Pier, Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*, 2002. **15**(2): p. 194-222.

62. Maiden, M.C., J.A. Bygraves, et al., Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(6): p. 3140-5.
63. Martin, R.R., V. Buttram, et al., Nasal and vaginal *Staphylococcus aureus* in young women: quantitative studies. *Ann Intern Med*, 1982. **96**(6 Pt 2): p. 951-3.
64. Megevand, C., A. Gervaix, et al., Molecular epidemiology of the nasal colonization by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in Swiss children. *Clin Microbiol Infect*, 2009.
65. Meluleni, G.J., M. Grout, et al., Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm in vitro are killed by opsonic antibodies to the mucoid exopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients. *J Immunol*, 1995. **155**(4): p. 2029-38.
66. Monecke, S., C. Luedicke, et al., Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in asymptomatic carriers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2009. **28**(9): p. 1159-65.
67. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 1987. **155**: p. 335-50.
68. Munson, S.H., M.T. Tremaine, et al., Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 1998. **66**(7): p. 3337-48.
69. Murchan, S., M.E. Kaufmann, et al., Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol*, 2003. **41**(4): p. 1574-85.
70. Novick, R.P., Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol*, 2003. **48**(6): p. 1429-49.
71. Novick, R.P., Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid*, 2003. **49**(2): p. 93-105.
72. Novick, R.P., H.F. Ross, et al., Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J*, 1993. **12**(10): p. 3967-75.
73. Novick, R.P. and A. Subedi, The SaPIs: mobile pathogenicity islands of *Staphylococcus*. *Chem Immunol Allergy*, 2007. **93**: p. 42-57.
74. Peacock, S.J., C.E. Moore, et al., Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 2002. **70**(9): p. 4987-96.
75. Prevost, G., B. Cribier, et al., Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun*, 1995. **63**(10): p. 4121-9.
76. Proft, T. and J.D. Fraser, Bacterial superantigens. *Clin Exp Immunol*, 2003. **133**(3): p. 299-306.
77. Pumphrey, N., A. Vuidepot, et al., Cutting edge: Evidence of direct TCR alpha-chain interaction with superantigen. *J Immunol*, 2007. **179**(5): p. 2700-4.
78. Ratjen, F., G. Comes, et al., Effect of continuous antistaphylococcal therapy on the rate of *P. aeruginosa* acquisition in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 2001. **31**(1): p. 13-6.

79. Recsei, P., B. Kreiswirth, et al., Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar. *Mol Gen Genet*, 1986. **202**(1): p. 58-61.
80. Rimland, D. and B. Roberson, Gastrointestinal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 1986. **24**(1): p. 137-8.
81. Ruzin, A., J. Lindsay, and R.P. Novick, Molecular genetics of SaPI1--a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, 2001. **41**(2): p. 365-77.
82. Sato, H., Y. Matsumori, et al., A new type of staphylococcal exfoliative toxin from a *Staphylococcus aureus* strain isolated from a horse with phlegmon. *Infect Immun*, 1994. **62**(9): p. 3780-5.
83. Schlievert, P.M., D.A. Blomster, and J.A. Kelly, Toxic shock syndrome *Staphylococcus aureus*: effect of tampons on toxic shock syndrome toxin 1 production. *Obstet Gynecol*, 1984. **64**(5): p. 666-71.
84. Schneewind, O., P. Model, and V.A. Fischetti, Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall. *Cell*, 1992. **70**(2): p. 267-81.
85. Shafer, W.M. and J.J. Iandolo, Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. *Infect Immun*, 1978. **20**(1): p. 273-8.
86. Shalita, Z., I. Hertman, and S. Sarid, Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 1977. **129**(1): p. 317-25.
87. Shopsin, B., A. Drlica-Wagner, et al., Prevalence of agr dysfunction among colonizing *Staphylococcus aureus* strains. *J Infect Dis*, 2008. **198**(8): p. 1171-4.
88. Shopsin, B., M. Gomez, et al., Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*, 1999. **37**(11): p. 3556-63.
89. Smith, C.B., V. Noble, et al., Bacterial flora of the vagina during the menstrual cycle: findings in users of tampons, napkins, and sea sponges. *Ann Intern Med*, 1982. **96**(6 Pt 2): p. 948-51.
90. Southern, E.M., Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 1975. **98**(3): p. 503-17.
91. Stone, A. and L. Saiman, Update on the epidemiology and management of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, in patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*, 2007. **13**(6): p. 515-21.
92. Strommenger, B., C. Kettlitz, et al., Assignment of *Staphylococcus* isolates to groups by spa typing, SmaI macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*, 2006. **44**(7): p. 2533-40.
93. Stutman, H.R., J.M. Lieberman, et al., Antibiotic prophylaxis in infants and young children with cystic fibrosis: a randomized controlled trial. *J Pediatr*, 2002. **140**(3): p. 299-305.
94. Su, Y.C. and A.C. Wong, Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. *Appl Environ Microbiol*, 1995. **61**(4): p. 1438-43.
95. Tenover, F.C., R.D. Arbeit, et al., Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, 1995. **33**(9): p. 2233-9.
96. Tremaine, M.T., D.K. Brockman, and M.J. Betley, Staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression is not affected by the accessory gene regulator (agr). *Infect Immun*, 1993. **61**(1): p. 356-9.

97. Tuazon, C.U., A. Perez, et al., Staphylococcus aureus among insulin-injecting diabetic patients. An increased carrier rate. JAMA, 1975. **231**(12): p. 1272.
98. Uhlen, M., B. Guss, et al., Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. J Biol Chem, 1984. **259**(3): p. 1695-702.
99. van Belkum, A., N.J. Verkaik, et al., Reclassification of Staphylococcus aureus nasal carriage types. J Infect Dis, 2009. **199**(12): p. 1820-6.
100. Van den Bussche, R.A., J.D. Lyon, and G.A. Bohach, Molecular evolution of the staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxin gene family. Mol Phylogenet Evol, 1993. **2**(4): p. 281-92.
101. Verkaik, N.J., O. Dauwalder, et al., Immunogenicity of toxins during Staphylococcus aureus infection. Clin Infect Dis. **50**(1): p. 61-8.
102. von Eiff, C., K. Becker, et al., Nasal carriage as a source of Staphylococcus aureus bacteremia. Study Group. N Engl J Med, 2001. **344**(1): p. 11-6.
103. von Eiff, C., A.W. Friedrich, et al., Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of Staphylococcus aureus. Diagn Microbiol Infect Dis, 2004. **49**(3): p. 157-62.
104. Waldvogel, F.A., ed. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). 5th Edition ed. Principles and Practice of Infectious Disease, ed. D. Mandell, Bennett. 2000, Churchill Livingstone. pg. 2069.
105. Welsh, M.J. and A.E. Smith, Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. Cell, 1993. **73**(7): p. 1251-4.
106. Wertheim, H.F., M.C. Vos, et al., Risk and outcome of nosocomial Staphylococcus aureus bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. Lancet, 2004. **364**(9435): p. 703-5.
107. Williams, R.E., Healthy carriage of Staphylococcus aureus: its prevalence and importance. Bacteriol Rev, 1963. **27**: p. 56-71.
108. Yamaguchi, T., K. Nishifuji, et al., Identification of the Staphylococcus aureus etd pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. Infect Immun, 2002. **70**(10): p. 5835-45.
109. Yamasaki, O., T. Yamaguchi, et al., Clinical manifestations of staphylococcal scalded-skin syndrome depend on serotypes of exfoliative toxins. J Clin Microbiol, 2005. **43**(4): p. 1890-3.
110. Zhang, S., J.J. Iandolo, and G.C. Stewart, The enterotoxin D plasmid of Staphylococcus aureus encodes a second enterotoxin determinant (sej). FEMS Microbiol Lett, 1998. **168**(2): p. 227-33.
111. Zirbes, J. and C.E. Milla, Cystic fibrosis related diabetes. Paediatr Respir Rev, 2009. **10**(3): p. 118-23; quiz 123.

Lebenslauf

Widmung und Danksagung

Gewidmet meinen geliebten Eltern Margarete und Gerhard, die mich im Leben stets nach Kräften unterstützt haben und immer zu mir standen, und meinem Ehemann Stephan, in der Hoffnung, dass er ahnt, wie dankbar ich ihm bin.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Georg Peters, Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, für die zur Verfügung gestellten Rahmenbedingungen innerhalb des Instituts.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Barbara Kahl, Oberärztin am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, für die Überlassung des Themas und die immer gewährte umfassende Unterstützung, nicht nur bei der praktischen Durchführung, sondern auch bei der Ausarbeitung. Durch diese Arbeit wurde mein Interesse an weiterer wissenschaftlicher Tätigkeit und dem Fach Mikrobiologie geweckt.

Ganz herzlich danke ich auch den vielen Mitarbeitern des Instituts, besonders Frau Martina Schulte und Frau Susanne Deiwick, die stets ein offenes Ohr für Fragen hatten und durch deren Hilfestellung die praktische Arbeit erst gelingen konnte.

Ferner gilt mein Dank den anderen Doktoranden der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Barbara Kahl für hervorragende Zusammenarbeit und den Umstand, dass die vielen Stunden im Labor gemeinsam mit ihnen sehr kurzweilig wurden.