

**Untersuchungen zur Taxonomie, Epidemiologie, Genotypisierung  
und Immunpathologie von klinischen *Staphylococcus*-Isolaten**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**

**(Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl. Biochemikerin Franziska Layer  
geb. am 12.03.1981 in Altenburg

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Brigitte König  
Prof. Dr. med. Karsten Becker

eingereicht am: 19. September 2008

verteidigt am: 01. April 2009

*The most beautiful experience we can have is the mysterious. It is the fundamental emotion which stands at the cradle of true art and true science.*

*Albert Einstein (1879-1955)*

**Meinen Eltern,  
für ihre bedingungslose Liebe, Unterstützung und Ermutigung.**

**Teile der vorliegenden Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:**

**Franziska Layer**, Beniam Ghebremedhin, Wolfgang König, Brigitte König (2006)

Heterogeneity of Methicilin-sensitive *Staphylococcus aureus* at a German University Hospital -a Potential Source of New Emerging MRSA Clones.

J. Clin. Microbiol. 44(6):2179-2185

**Franziska Layer**, Beniam Ghebremedhin, Karen-Anja Moder, Wolfgang König, Brigitte König (2006)

Comparative Study Using Various Methods for the Identification of *Staphylococcus* Species from Clinical Specimens.

J. Clin. Microbiol. 44(8):2824-2830

**Franziska Layer**, Beniam Ghebremedhin, Wolfgang König, Brigitte König (2007)

Differentiation of *Staphylococcus* spp. by Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Glyceraldehyd-3-Phosphate Dehydrogenase-Encoding Gene.

J. Microbiol. Methods 70(3):542-549

Beniam Ghebremedhin\*, **Franziska Layer**\*, Wolfgang König, Brigitte König (2008)

Genetic Classification and Distinguishing of *Staphylococcus* Species Based on Different Partial *gap*, 16S rRNA, *hsp60*, *rpoB*, *sodA*, and *tuf* Gene Sequences.

J. Clin. Microbiol. 46(3): 1019-1025

\*diese Autoren waren zu gleichen Teilen beteiligt

# I INHALTSVERZEICHNIS

<b>I</b>	<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>II</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>III</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>IV</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>IX</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Staphylokokken: Taxonomie, Geschichte und Mikrobiologie.....	1
1.2	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	2
1.2.1	Pathogenese.....	2
1.2.2	Virulenzfaktoren.....	3
1.2.3	Antibiotikaresistenzen und MRSA-Epidemiologie.....	9
1.3	Koagulase-negative Staphylokokken.....	12
1.3.1	Pathogenese.....	12
1.3.2	Biofilmbildung und Virulenzfaktoren.....	15
1.3.3	Antibiotikaresistenz.....	16
1.4	Angeborene Immunität und <i>S. aureus</i> .....	17
1.5	Antimikrobielle Peptide als Komponenten der angeborenen Immunität.....	18
1.5.1	Defensine.....	19
1.5.2	Cathelizidine.....	20
1.5.3	Regulation antimikrobieller Peptide.....	21
1.6	Antimikrobielle Peptide und Proteine als Komponenten der Immunantwort der Haut.....	22
1.7	Antimikrobielle Peptide bei Hauterkrankungen.....	23
<b>2</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>26</b>
3.1	Chemikalien.....	26
3.2	Bakterienstämme.....	26
3.3	Zellkulturen.....	28
3.4	Nährmedien und Platten für Bakterienkulturen.....	28
3.5	Kultivierung der HaCaT-Zelllinie.....	29
3.5.1.1	Einfrieren und Auftauen von adhärent wachsenden Zellen.....	29
3.6	Kultivierung von Bakterien.....	30
3.7	Phänotypische Identifizierung.....	30
3.7.1	Vitek <sup>®</sup> 2.....	31
3.7.2	Phoenix <sup>™</sup> .....	32
3.7.3	ATB-System.....	33
3.8	Präparation chromosomaler DNA.....	33
3.9	Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA.....	34

3.10	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	34
3.10.1	PCR zur Detektion virulenz-assoziiierter Gene von Staphylokokken .....	34
3.10.2	PCRs zur Genotypisierung von Staphylokokken .....	36
3.11	Agarose Gelelektrophorese.....	38
3.12	Aufreinigung von PCR-Produkten .....	38
3.13	Sequenzierung.....	38
3.13.1	DNA Cycle Sequencing von PCR-Produkten .....	39
3.13.2	Kapillar-Elektrophorese für die DNA-Sequenzierung.....	40
3.13.3	Anwendungen der Sequenzierung.....	40
3.13.3.1	Partielle Sequenzierung des <i>gap</i> -Gens .....	40
3.13.3.2	Sequenzierung des 16S rRNA-Gens.....	41
3.13.3.3	Multilocus Sequenzanalyse (MLST).....	41
3.13.3.4	<i>spa</i> -Typisierung .....	43
3.13.4	Sequenzanalyse und Sequenzvergleiche.....	43
3.13.5	Phylogenetische Stammbäume .....	44
3.13.5.1	Dendrogramm für MLST.....	44
3.13.5.2	Dendrogramme für <i>gap</i> -, 16S rRNA-, <i>hsp60</i> , <i>rpoB</i> -, <i>sodA</i> - und <i>tuf</i> -Gensequenzen .....	45
3.14	T-RFLP .....	47
3.14.1	PCR für T-RFLP .....	47
3.14.2	Restriktion .....	48
3.14.3	Interner Größenstandard.....	48
3.14.4	Kapillar-Elektrophorese für die T-RFLP .....	49
3.15	Anwendung der T-RFLP zur Identifizierung von Staphylokokken aus klinischen Isolaten ..	49
3.16	Infektionsexperimente .....	50
3.17	RNA-Isolierung .....	50
3.18	Reverse Transkription von RNA (cDNA-Synthese) .....	50
3.19	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR.....	51
3.20	ELISA .....	52
3.20.1	IL-6 und IL-8 ELISA .....	52
3.21	Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse.....	53
3.22	Datenbanken .....	53
3.23	Phasenkontrastmikroskopie .....	54
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>55</b>
4.1	Heterogenität von <i>S. aureus</i> -Isolaten innerhalb der Universitätsklinik .....	55
4.1.1	Charakterisierung der <i>S. aureus</i> -Isolate.....	56
4.1.2	Typisierung der <i>tst</i> -positiven <i>S. aureus</i> -Isolate.....	63
4.2	Differenzierung von <i>Staphylococcus</i> spp. durch <i>gap</i> -basierte T-RFLP .....	66
4.2.1	Sequenzierung des <i>gap</i> –Gens .....	66
4.2.2	Phylogenetische Analyse der <i>gap</i> -Sequenzen der verschiedenen <i>Staphylococcus</i> spp.....	70

---

4.2.3	Entwicklung der T-RFLP .....	74
4.2.4	Vergleichende Identifizierung von Staphylokokken .....	80
4.3	<i>Staphylococcus</i> -Spezies als potentielle Virulenzfaktoren in bakteriellen Hautinfektionen....	84
4.3.1	Charakterisierung der Staphylokokken-Isolate .....	84
4.3.2	Induktion der angeborenen Immunantwort in epithelialen Zellen durch <i>Staphylococcus</i> -Spezies.....	86
4.3.2.1	Induktion proinflammatorischer Zytokine .....	87
4.3.2.2	Induktion antimikrobieller Peptide.....	91
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>100</b>
5.1	Heterogenität von <i>S. aureus</i> -Isolaten.....	100
5.2	Differenzierung von <i>Staphylococcus</i> -Spezies durch partielle <i>gap</i> -, 16S rRNA-, <i>hsp60</i> -, <i>rpoB</i> -, <i>sodA</i> - und <i>tuf</i> -Gensequenzen.....	106
5.3	Differenzierung von <i>Staphylococcus</i> spp. durch <i>gap</i> -basierte T-RFLP .....	111
5.4	Vergleich verschiedener Methoden zur Identifizierung von klinischen <i>Staphylococcus</i> spp. ....	113
5.5	Untersuchungen der Induktion der angeborenen Immunantwort in epithelialen Zellen durch <i>Staphylococcus</i> -Spezies. ....	116
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>121</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>122</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>142</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>154</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>155</b>
	<b>Erklärung .....</b>	<b>156</b>

## II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampere (Stromstärke)
Abb.	Abbildung
AD	atopische Dermatitis
<i>agr</i>	<i>accessory gene regulator</i>
AMP	antimikrobielle Peptide
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
CA-MRSA	<i>community acquired</i> Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
CIP	Ciprofloxacin
CLI	Clindamycin
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's <i>Phosphate buffered saline</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERY	Erythromycin
<i>et al.</i>	<i>et aliter</i>
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	Fötale Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GEN	Gentamycin
h	Stunde
HA-MRSA	<i>hospital acquired</i> Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i>
hBD	humanes $\beta$ -Defensin
HEX	6-Hexachlorfluorescein
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
M	molar

---

min	Minute
MLST	<i>multilocus sequence typing</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>
OD	optische Dichte
OXA	Oxacillin
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEN	Penicillin
PVL	Panton-Valentine-Leukozidin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCC <i>mec</i>	<i>staphylococcal cassette chromosome mec</i>
SE	Staphylokokken-Enterotoxine
Spa	<i>Staphylococcus aureus</i> Protein A
TET	Tetracyclin
TLR	<i>Toll-like-receptor</i>
T-RFLP	terminaler Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
TSST-1	Toxisch-Schock-Syndrom-Toxin-1
Tween20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaureat
U	Unit/ml
UPGMA	<i>unweighted pair group method using arithmetic averages</i>
V	Volt



**Aminosäuren**

Alanin	Ala	A	Methionin	Met	M
Cystein	Cys	C	Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D	Prolin	Pro	P
Glutaminsäure	Glu	E	Glutamin	Gln	Q
Phenylalanin	Phe	F	Argenin	Arg	R
Glycin	Gly	G	Serin	Ser	S
Histidin	His	H	Threonin	Thr	T
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V
Lysin	Lys	K	Tryptophan	Trp	W
Leucin	Leu	L	Tyrosin	Tyr	Y

**Nukleotide**

A	Adenosin	B	Cytidin, Guanosin oder Thymidin
C	Cytidin	D	Adenosin, Guanosin oder Thymidin
G	Guanosin	H	Adenosin, Cytidin oder Thymidin
T	Thymidin	V	Adenosin, Cytidin oder Guanosin
R	Adenosin oder Guanosin	S	Guanosin oder Cytidin
Y	Cytidin oder Thymidin	W	Adenosin oder Thymidin
K	Guanosin oder Thymidin	N	Adenosin, Cytidin, Guanosin oder Thymidin
M	Adenosin oder Cytidin		

### III ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: Mikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 100-fach) eines Gram-gefärbten Präparates einer Staphylokokkeninfektion.....	1
Abbildung 1.2: T-Zell-Aktivierung durch klassische Antigene (A) und Superantigene (B).....	8
Abbildung 1.3: Modell einer Biofilmbildung mit Kolonisierung-, Biofilm- und Disseminationsphase. ...	15
Abbildung 1.4: Modell der angeborenen Immunantwort bei Infektionen mit <i>S. aureus</i> .....	18
Abbildung 1.5: Aminosäuresequenz und Struktur wichtiger antimikrobieller Peptide .....	19
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Multilocus Sequenzanalyse (MLST).....	42
Abbildung 3.2: Genetische Organisation des <i>S. aureus</i> Protein A-Gens. ....	43
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Analyse der terminalen Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismen.....	47
Abbildung 4.1: Beispielhafte Darstellung der PCR zum Nachweis der <i>intergenic spacer</i> -Region von <i>S. aureus</i> und des <i>mecA</i> -Gens. ....	57
Abbildung 4.2: Multiplex-PCR ausgewählter Isolate zum Nachweis der verschiedenen <i>agr</i> -Gruppen. ...	59
Abbildung 4.3: Beispielhafte Darstellung der PCR-Ergebnisse zur Detektion der Gene der Staphylokokken-Enterotoxine .....	61
Abbildung 4.4: PCR zum Nachweis des <i>tst</i> -Gens für ausgewählte Isolate.....	62
Abbildung 4.5: Dendrogramm, erstellt nach dem UPGMA-Algorithmus zur Analyse der klonalen Beziehung der <i>tst</i> -positiven MSSA-Isolate. ....	64
Abbildung 4.6: Sequenzvergleich zum Erstellen der Primer für die Sequenzierung des <i>gap</i> -Gens. D.....	68
Abbildung 4.7: Einträge der erhaltenen partiellen <i>gap</i> -Sequenzen für <i>Staphylococcus saprophyticus</i> und <i>Staphylococcus equorum</i> in der NCBI-Genbank.....	69
Abbildung 4.8: DNA-Sequenzähnlichkeitsmatrix basierend auf dem Vergleich der erhaltenen <i>gap</i> -Sequenzen der <i>Staphylococcus</i> -Spezies. ....	70
Abbildung 4.9: Phylogenetische Stammbäume erstellt aus <i>gap</i> -, 16S rRNA-, <i>hsp60</i> -, <i>rpoB</i> -, <i>sodA</i> - und <i>tuf</i> -Sequenzen verschiedener <i>Staphylococcus</i> -Spezies.....	73
Abbildung 4.10: Schema zur Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme für die <i>gap</i> -basierte T-RFLP am Beispiel ausgewählter <i>Staphylococcus</i> -Spezies. ....	74
Abbildung 4.11: T-RFLP-Profil von <i>S. epidermidis</i> DSM 20044 nach Restriktion mit <i>DdeI</i> , <i>TaqI</i> und <i>BspHI</i> .....	75

---

Abbildung 4.12: Variabilität und Verteilung der T-RF-Größen (in bp) für 28 klinische <i>S. haemolyticus</i> Isolate.....	78
Abbildung 4.13: Variabilität und Verteilung der T-RF-Größen (in bp) für 34 klinische <i>S. epidermidis</i> Isolate.....	79
Abbildung 4.14: Erhaltene PCR-Ergebnisse der klinischen <i>Staphylococcus</i> -Isolate von AD-Patienten zur Detektion der Gene für das Leukozidin LukED ( <i>lukE/D</i> ) und für $\gamma$ -Hämolyisin ( <i>hlgA</i> bzw. <i>hlgB/C</i> ).....	86
Abbildung 4.15: Mikroskopische Aufnahme von HaCaT-Zellen nach Infektion mit verschiedenen <i>Staphylococcus</i> -Spezies. ....	86
Abbildung 4.16: <i>Staphylococcus</i> -Spezies induzierten die Produktion von IL-6 im Verlauf der Infektion.	88
Abbildung 4.17: <i>Staphylococcus</i> -Spezies induzieren die Produktion von IL-8 im Verlauf der Infektion.	90
Abbildung 4.18: Zeitabhängige Expression von hBD1 mRNA nach Stimulation von HaCaT-Zellen mit <i>Staphylococcus</i> -Referenzstämmen und bzw. klinischen <i>Staphylococcus</i> -Isolaten.....	92
Abbildung 4.19: Zeitabhängige Expression von hBD2 mRNA nach Stimulation von HaCaT-Zellen mit <i>Staphylococcus</i> -Referenzstämmen und bzw. klinischen <i>Staphylococcus</i> -Isolaten.....	94
Abbildung 4.20: Zeitabhängige Expression von hBD3 mRNA nach Stimulation von HaCaT-Zellen mit <i>Staphylococcus</i> -Referenzstämmen und bzw. klinischen <i>Staphylococcus</i> -Isolaten.....	96
Abbildung 4.21: Zeitabhängige Expression von LL-37 mRNA nach Stimulation von HaCaT-Zellen mit <i>Staphylococcus</i> -Referenzstämmen und bzw. klinischen <i>Staphylococcus</i> -Isolaten.....	98
Abbildung 8.1: T-RFLP-Profile aller <i>Staphylococcus</i> -Referenzstämme nach Restriktion mit <i>DdeI</i> , <i>TaqI</i> und <i>BspHI</i> . ....	153

## IV TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1: Virulenzfaktoren von <i>S. aureus</i> , die als Adhäsine beschrieben sind.....	4
Tabelle 1.2: Virulenzfaktoren von <i>S. aureus</i> , die als Invasine beschrieben sind.....	6
Tabelle 1.3: Superantigene von <i>S. aureus</i> (nach Alouf und Müller-Alouf, 2003).....	7
Tabelle 1.4: Anteil der MRSA an der Gesamtzahl der <i>S. aureus</i> -Isolate und die Anzahl der MRSA-Patienten am Universitätsklinikum Magdeburg 2003-2007.....	11
Tabelle 1.5: Erkrankungen und klinische Bedeutung Koagulase-negativer Staphylokokken. ....	13
Tabelle 1.6: Ausgewählte antimikrobielle Peptide und Proteine der humanen Haut.....	22
Tabelle 3.1: Verwendete Referenzstämme verschiedener <i>Staphylococcus</i> spp.....	26
Tabelle 3.2: Verwendete klinische <i>Staphylococcus</i> spp. Isolate. ....	27
Tabelle 3.3: Verwendete klinische Isolate von Patienten mit atopischer Dermatitis.....	28
Tabelle 3.4: Oligonukleotide zur Detektion virulenz-assoziiierter Gene der Staphylokokken.....	35
Tabelle 3.5: PCR-Programme zur Detektion virulenz-assoziiierter Gene der Staphylokokken. ....	36
Tabelle 3.6: Oligonukleotide zur Genotypisierung von Staphylokokken. ....	37
Tabelle 3.7: PCR-Programme zur Genotypisierung von Staphylokokken.....	37
Tabelle 3.8: Primer für die Sequenzierung des <i>gap</i> -Gens.....	40
Tabelle 3.9: Primer für die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens. ....	41
Tabelle 3.10: Verwendete Sequenzen der NCBI-Genbank zur Erstellung von Dendrogrammen. ....	46
Tabelle 4.1: Verteilung der <i>Staphylococcus aureus</i> -Isolate auf den Stationen der Universitätsklinik und der mit der Klinik verbundenen Einrichtungen.....	56
Tabelle 4.2: Resistenzmuster der <i>Staphylococcus aureus</i> -Isolate. ....	58
Tabelle 4.3: Ergebnisse der Analyse des Virulenzoperons <i>agr</i> .....	59
Tabelle 4.4: Pathogenitätsprofile der <i>Staphylococcus aureus</i> -Isolate.....	60
Tabelle 4.5: Pathogenitätsprofile der <i>tst</i> -positiven <i>Staphylococcus aureus</i> -Isolate in Kombinationen mit den Genen für die Staphylokokken-Enterotoxine.....	62
Tabelle 4.6: Analyse der <i>spa</i> -Typen und der dazugehörigen Sequenztypen der verschiedenen <i>tst</i> -positiven <i>S. aureus</i> -Isolate. ....	65
Tabelle 4.7: Analyse der Sequenztypen und der dazugehörigen <i>agr</i> -Typen für die verschiedenen <i>tst</i> -positiven <i>S. aureus</i> -Isolate. ....	65

---

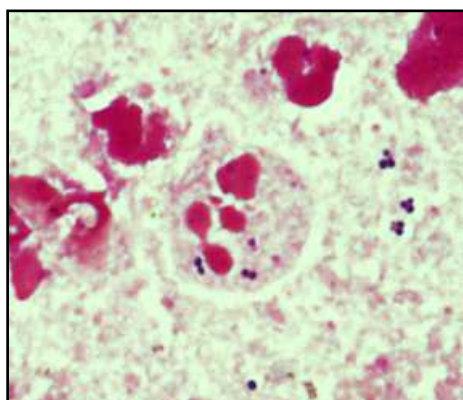
Tabelle 4.8: Terminale Fragmentgrößen (in bp) für die <i>Staphylococcus</i> spp. Referenzstämme. ....	76
Tabelle 4.9: Genauigkeit der T-RFLP bei klinischen <i>S. epidermidis</i> und <i>S. haemolyticus</i> Isolaten im Vergleich zur <i>in silico</i> ermittelten T-RF- Größe. ....	77
Tabelle 4.10: Ergebnisse der Identifizierungen mit der ID-GPC und der ID-GP Karte des Vitek <sup>®</sup> 2, der ID-13 Karte des Phoenix <sup>™</sup> und des ATB ID32 STAPH für die <i>Staphylococcus</i> -Referenzstämme.....	81
Tabelle 4.11: Zusammenfassung der Identifizierungen für die <i>Staphylococcus</i> -Referenzstämme.....	81
Tabelle 4.12: Ergebnisse der Identifizierungen für 86 klinische <i>Staphylococcus</i> -Isolate, die unter Verwendung der ID-GP Karte des Vitek <sup>®</sup> 2, der ID-13 Karte des Phoenix <sup>™</sup> und der <i>gap</i> -basierten T-RFLP erhalten wurden. ....	82
Tabelle 4.13: Zusammenfassung der Identifizierungen für die klinischen <i>Staphylococcus</i> -Isolate.....	83
Tabelle 4.14: Übereinstimmung der erhaltenen Ergebnisse der Identifizierungen der klinischen <i>Staphylococcus</i> -Isolate mit den automatischen Systemen und der T-RFLP. ....	83
Tabelle 4.15: Identifizierung und Charakterisierung der Staphylokokken-Isolate von Patienten mit atopischer Dermatitis.....	85
Tabelle 8.1: Herkunft <sup>a</sup> , Resistenzprofile <sup>b</sup> und erhaltene Ergebnisse (p: positiv/ n: negativ) der Analyse der Gene für die Staphylokokken-Enterotoxine A-E ( <i>sea-see</i> ), G-J ( <i>seg-sej</i> ), das Toxisch-Schock-Syndrom-Toxin-1 ( <i>tst</i> ), das Panton-Valentine-Leukozidin ( <i>lukPV</i> ) und das Virulenzoperon <i>agr</i> für alle <i>S. aureus</i> -Patientenisolate. ....	142

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 STAPHYLOKOKKEN: TAXONOMIE, GESCHICHTE UND MIKROBIOLOGIE

Staphylokokken sind Gram-positive, unbewegliche und in der Regel fakultativ anaerobe Kokken (Abbildung 1.1). Die Gattung *Staphylococcus* gehört zur Familie der *Micrococcaceae* (Foster, 2002) und wird bis zum heutigen Zeitpunkt in 66 Spezies und Subspezies untergliedert ([www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)). Ihre Differenzierung erfolgt auf Grund struktureller Merkmale der Zellwand sowie physiologischer, biochemischer und molekularer Eigenschaften (Foster, 2002).

A.



B.

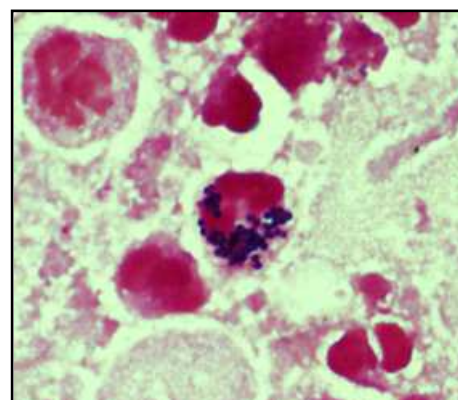


Abbildung 1.1: Mikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 100-fach) eines Gram-gefärbten Präparates einer Staphylokokkeninfektion. Staphylokokken sind dabei (A.) einzeln, in Paaren, kurzen Ketten oder (B.) in Haufen gelagert (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Magdeburg).

Bereits 1874 beschrieben Christian Albert und Theodor Billroth Kokken in Eiterproben (Hahn *et al.*, 1999) und 1878 erkannte Robert Koch, dass diese Mikroorganismen verschiedene Krankheiten hervorrufen (Novick, 1990). Die Namensgebung prägte 1883 der schottische Chirurg Alexander Ogston (Ogston, 1883). Er isolierte die Bakterien aus dem Eiter von Furunkeln und Abszessen und benutzte dabei als erster den Namen Staphylokokken (Kloos *et al.*, 1992). Die Bezeichnung leitet sich von den griechischen Wörtern *staphyle* (= Traube) und *kokkos* (= Kugel) ab und bezieht sich auf die traubenförmige Lagerung im mikroskopischen Präparat. Rosenbach erstellte 1884 die erste taxonomische Klassifizierung der Gattung *Staphylococcus* und unterteilte sie auf Grund ihrer Koloniefarbe in zwei Arten, *S. aureus* und *S. albus* (Kloos, 1980). Die Einteilung der Staphylokokken nach Anwesenheit oder Abwesenheit des Enzyms

Plasmakoagulase wurde von Datányi geprägt, der 1926 zum ersten Mal die Zusammenhänge zwischen der Aktivität der Plasmakoagulase von Staphylokokken und ihrer Pathogenität formulierte. Er unterschied dabei *S. aureus* und *S. intermedius* aufgrund der Bildung der freien Koagulase, einem Enzym, das die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin im Blutplasma unterschiedlicher Spezies bewirkt, von den übrigen, d.h. Koagulase-negativen Staphylokokken-Spezies (KNS). Heute weiß man allerdings, dass die Einteilung der Staphylokokken in Koagulase-positive und Koagulase-negative Spezies kaum Rückschlüsse auf die Virulenz dieser Bakterien zulässt (Brandis *et al.*, 1994).

Staphylokokken haben einen Durchmesser von 0,5-1,5 µm. Betrachtet man sie im mikroskopischen Präparat, so liegen sie meistens in Haufen zusammen, können aber auch einzeln, in Paaren oder kurzen Ketten vorkommen. Diese Mikroorganismen gehören außerdem zu den Widerstandsfähigsten unter den nicht sporenbildenden Bakterien. Sie können noch bei Kochsalzgehalten von 10% wachsen, besitzen also eine erhöhte pH-Toleranz und sind resistent gegen Austrocknung. Sie wachsen bei verschiedenen Temperaturen, am besten zwischen 30°C und 37°C, einige überleben sogar kurzzeitig Temperaturen bis zu 60°C. Staphylokokken wachsen auf einem breiten Spektrum von Nährmedien. Die 1-2 mm großen Kolonien können auf dem Kulturmedium eine grau-weiße, grau-gelbe oder auch eine gold-gelbe Pigmentierung aufweisen und von verschiedenen großen Hämolysezonen umgeben sein (Foster, 2002).

## **1.2 STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

### **1.2.1 PATHOGENESE**

Der Mensch ist ein natürliches Reservoir von *S. aureus*. Beim gesunden Menschen kolonisiert dieser Mikroorganismus die vorderen Nasenhöhlen und kann sich, ausgehend davon, auf weitere Bereiche der Haut und Schleimhäute ausbreiten. Weiterhin wird dieses Bakterium gelegentlich auch in den Axillae und der Perianalregion gefunden (Williams, 1963). *Staphylococcus aureus* ist ebenfalls ein Teil der natürlichen Standortflora des Verdauungs- und Vaginaltraktes (Smith *et al.*, 1982; Enright, 2008). Etwa 20% der gesunden Erwachsenen sind nicht mit dem Erreger kolonisiert, 20-25% sind permanent und 55-60% sind intermittierend mit *S. aureus* besiedelt (Enright, 2008).

*Staphylococcus aureus* ist weltweit einer der häufigsten Erreger innerhalb und außerhalb des Krankenhauses erworbener Infektionskrankheiten. Die durch dieses Bakterium verursachten Krankheitsbilder lassen sich in invasive (lokal, tiefgehend, systemisch) und toxinvermittelte Infektionen einteilen (Lowy, 1998). Zu den invasiven

Infektionen, die von lokal oberflächlich bis hin zu tief invasiv und systemisch reichen, werden Furunkel, Karbunkel, Pyodermie, Wund- und Weichteilinfektionen, Gelenkempyeme, Parotitis, Mastitis, Osteomyelitis und Pneumonien gezählt. Diese Prozesse können eine Keimausschwemmung in die Blutbahn nach sich ziehen und damit zur Endokarditis und Sepsis führen (Peters und Pulverer, 1994). Über die Schwere und den Verlauf der invasiven Infektionen entscheiden der Infektionsort, die Prädisposition des Wirtes und die Virulenz des verursachenden *S. aureus*-Stammes (von Eiff *et al.*, 1993). Bei den toxinvermittelten Infektionen bestimmt das jeweilige, vom Bakterium sezernierte Toxin über die Schwere der Infektion, da dieses Toxin selbst direkt die Reaktion des Wirtes auslöst. Zu diesen Krankheiten werden Lebensmittelintoxikationen, ausgelöst durch Enterotoxine, das Toxisch-Shock-Syndrom (TSS) und die staphylogene toxische epidermische Nekrolyse (*staphylococcal scalded skin syndrom* = SSSS) gezählt. Die TSS wird durch ein Superantigen ausgelöst, was eine massenhafte Zytokinausschüttung und die Symptomatik eines toxischen Schocks bewirkt. SSSS wird durch Exfoliatine verursacht, die Desmosomen lockern, was eine charakteristische Blasenbildung der Haut bewirkt. *Staphylococcus aureus* ist ebenfalls in der Lage an Kunststoff- und Metalloberflächen zu haften und somit Biofilme zum Beispiel auf Kathetern, *Shunts* und Gelenkprothesen auszubilden.

## 1.2.2 VIRULENZFAKTOREN

Verschiedene Pathogenitätsfaktoren von Staphylokokken und deren zelluläre Regulation sind in den letzten Jahren gut charakterisiert worden. *S. aureus* ist mit einer Vielzahl dieser Pathogenitätsfaktoren ausgestattet und weist daher von allen Staphylokokken-Spezies die höchste Pathogenität auf. Einige dieser Faktoren wurden klar als Virulenzmechanismen beschrieben, andere sind aufgrund ihrer komplexen und redundanten Regulation noch weniger untersucht. Man unterscheidet bei *S. aureus* zwischen mehr als 40 zellwandassoziierten und sezernierten Proteinen. Zellwandassoziierte Proteine (Adhäsine) an der Oberfläche von *S. aureus* sind in der Lage an extrazelluläre Gewebematrix (Laminin, Fibronectin, Kollagen) zu binden und stellen somit den ersten Schritt der Kolonisation und zur Ausprägung einer Infektion dar. Tabelle 1.1 fasst diese Faktoren bezüglich ihrer Rolle bei Infektionen, insbesondere in Bezug auf Adhärenz, Invasion und Immunmodulation zusammen und einige von ihnen werden im Folgenden näher beschrieben.



Tabelle 1.1: Virulenzfaktoren von *S. aureus*, die als Adhäsine beschrieben sind.

Virulenzfaktor	Gen(e)	Funktion und Bindung	Referenzen
Clumping Factor A	<i>clfA</i>	Adhäsion; Fibrinogen, Kalzium, Plättchen	McDevitt <i>et al.</i> , 1994
Clumping Factor B	<i>clfB</i>	Adhäsion; Fibrinogen	Ni Eidhin <i>et al.</i> , 1998
Kollagen-bindendes Protein	<i>cna</i>	Adhäsion; Kollagen	Patti <i>et al.</i> , 1994
Elastin-bindendes Protein	<i>ebpS</i>	Adhäsion; Elastin	Park <i>et al.</i> , 1996
Fibrinogen-bindendes Protein	<i>fbp</i>	Adhäsion; Fibrinogen	Cheung <i>et al.</i> , 1995
Fibronectin-bindende Proteine A und B	<i>fna, fnb</i>	Adhäsion; Fibronectin, Fibrinogen	Jonsson <i>et al.</i> , 1991
Extrazelluläres Fibrinogen-bindendes Protein	<i>efb</i>	Adhäsion; Fibrinogen	Boden und Flock, 1992
Laminin-bindendes Protein	<i>lbp</i>	Adhäsion; Laminin	Lopes <i>et al.</i> , 1985
Thrombospondin-bindendes Protein		Adhäsion; Thrombospondin	Hermann <i>et al.</i> , 1991
MHCII analoges Protein (Map)/ Extrazelluläres Adhäsion-Protein (Eap)	<i>map</i>	Adhäsion; Fibrinogen, Fibronectin, Sialoprotein, Thrombospondin, Prothrombin; Internalisation	McGavin <i>et al.</i> , 1993; Palma <i>et al.</i> , 1999
Koagulase	<i>coa</i>	Adhäsion; Fibrinogen, Prothrombin	Boden und Flock, 1992
Interzelluläre Adhärenz-Proteine	<i>icaA, icaB, icaC, icaD, icaR</i>	Adhäsion; Biofilmbildung	Cramton <i>et al.</i> , 2001
Kapsel	<i>cap8A-cap8P</i>	Antiphagozytose; Kapselbildung; Bindung von Komplementfaktoren	Lee <i>et al.</i> , 1994
Staphylokokken Protein A (SpA)	<i>spa</i>	Adhäsion/ Antiphagozytose; Bindung der Fc-Domäne von IgG	Uhlén <i>et al.</i> , 1984

Zu den zellwandassoziierten Proteinen, die kovalent an die Zellwand gebunden sind, zählt WTA (*wall teichoic acid*), LTA (*lipo teichoic acid*) dagegen ist zellwandverankert (Neuhaus and Baddiley, 2003). Diese Proteine sind essentiell für die Adhäsion an Epithelzellen (Lowy, 2000). MSCRAMMS (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*), ebenfalls zellwandverankerte Proteine, besitzen ein LPXTG-Motiv an dem eine Sortase das jeweilige Protein erkennt und dieses in der Zellwand verankert (Mazmanian *et al.*, 1999). Zu dieser Gruppe gehören Spa (*staphylococcal protein A*), FnbpA und FnbpB (*fibronectin-binding proteins*), Cna (*collagen adhesin*), ClfA und ClfB (*clumping factors*). Protein A interagiert mit

verschiedenen Faktoren der Wirtszellen, unter anderen bindet es an die Fc-Domäne von IgG und verhindert damit, dass IgG an den Fc-Rezeptor von Phagozyten binden kann (Peterson *et al.*, 1977). Damit wird eine effiziente Opsonisierung und anschließende Phagozytose verhindert und das Bakterium kann sich dem Zugriff des Immunsystems entziehen. Außerdem agiert es wie ein Superantigen, induziert Apoptose und vermindert die Aktivität von Zellen der Immunantwort (Goodyear and Silverman, 2004). FnbpA und FnbpB binden an Fibronectin (Flock *et al.*, 1987) und Elastin (Roche *et al.*, 2004), und sind an der Invasion in Zellen (Dziewanowska *et al.*, 1999) und Zelllinien (Sinha *et al.*, 2000) beteiligt. Auch ClfA und ClfB binden an Fibrinogen, das die Adhäsion an Blutgerinnsel bzw. traumatisiertes Gewebe vermittelt. Es werden Fibrinmonomere aktiviert, die einen Fibrinschutzwall bilden, welcher dann den Infektionsherd abgrenzt und *S. aureus* der Immunantwort entzieht (McDevitt *et al.*, 1994). Cna ist in der Lage Kollagen zu binden (Patti *et al.*, 1994). *S. aureus* besitzt ebenfalls eine Vielzahl sezernerter Virulenzfaktoren. Eap/Map (*extracellular adherence protein/MHC class II analogous protein*) vereinfacht die Adhäsion von *S. aureus* an die Wirtszelle. Es bindet an verschiedene Plasmaproteine, Fibroblasten und Epithelzellen (Palma *et al.*, 1999), inhibiert die Migration von Leukozyten (Chavakis *et al.*, 2002) und die Proliferation von T-Zellen (Lee *et al.*, 2002).

Die Invasion von *S. aureus* in das Gewebe wird durch zytotoxische, membranzerstörende Proteine erleichtert (Song *et al.*, 1996). Zu diesen so genannten Invasinen (Tabelle 1.2) zählen  $\alpha$ -Hämolysin,  $\beta$ -Hämolysin,  $\delta$ -Hämolysin,  $\gamma$ -Hämolysin und Leukozidine. Das monomere  $\alpha$ -Hämolysin lagert sich als Hexamer oder Heptamer zusammen und bildet Poren in der Zellmembran von Endothel- und Epithelzellen, Erythrozyten und Phagozyten, was zur Lyse der Zellen führt (Bhakdi und Trantum-Jensen, 1991). Außerdem ist es ein bedeutender Faktor für die *S. aureus*-induzierte Apoptose (Haslinger *et al.*, 2003). Die Sphingomyelinase  $\beta$ -Hämolysin degradiert Sphingomyelin in der Zellmembran (Bohach und Foster, 2000) und ist bei Erythrozyten für das Phänomen der *hot-cold-lysis*, bei der die Lyse partiell in der Kälte ablaufen muss, verantwortlich (Projan *et al.*, 1989).  $\gamma$ -Hämolysin und Leukozidine bestehen jeweils aus einer S- und einer F-Komponente und formen ebenfalls Poren, die zur Lyse von Leukozyten führen (Kamio *et al.*, 1993; Joubert *et al.*, 2006). Neben seiner leukozytolytischen Aktivität lysiert  $\gamma$ -Hämolysin auch Erythrozyten. In der Form des Panton-Valentine-Leukozidin (PVL) erlangt ein Leukozidin derzeit in CA-MRSA-Stämmen, d.h. *community acquired* MRSA die außerhalb medizinischer Einrichtungen erworben werden, spezielle klinische Bedeutung. Es zerstört polymorphkernige Granulozyten und Makrophagen (Finck-Barbancon *et al.*, 1993) und wird in Zusammenhang mit tödlich verlaufenden nekrotisierenden Pneumonien gebracht (Gillet *et al.*, 2002). Leukozidine kommen nur in einem kleinen Prozentsatz der *S. aureus* Isolate vor, stellen jedoch einen wichtigen Pathogenitätsfaktor dar, da sie in mehr als

90% der Isolate von Patienten mit abszedierenden bzw. nekrotisierenden Hautinfektionen und nekrotisierenden Pneumonien gefunden werden können.

Tabelle 1.2: Virulenzfaktoren von *S. aureus*, die als Invasine beschrieben sind.

Virulenzfaktor	Gen(e)	Funktion	Referenz
<b>Hämolyse</b>			
$\alpha$ -Hämolysin,	<i>hla</i>	Membranzerstörung, vollständige Hämolyse	Bhakdi und Trantum-Jensen, 1991
$\beta$ -Hämolysin	<i>hlb</i>	Sphingomyelinase, partielle Hämolyse, Zerstörung von Blutkörperchen	Projan <i>et al.</i> , 1989
$\gamma$ -Hämolysin	<i>hlgA, hlgB, hlgC</i>	Membranzerstörung	Kamio <i>et al.</i> , 1993
$\delta$ -Hämolysin	<i>hld</i>	Membranzerstörung, vollständige Hämolyse	Birkbeck und Whitelaw, 1980
<b>Leukozydine</b>			
Luke-LukD	<i>lukE, lukD</i>	Zerstörung von polymorphkernigen Granulozyten und Makrophagen	Bohach und Foster, 2000
Panton-Valentine-Leukozydin (PVL)	<i>lukS-PV/lukM-PV, lukF-PV</i>		Prevost <i>et al.</i> , 1995b
<b>Exoenzyme</b>			
Staphylokinase (Sak)	<i>sak</i>	Plasminogenaktivierung, Erregerausbreitung erleichtert	Sako und Tsuchida, 1983
Chemotaxis-inhibierendes Protein (CHIPS)	<i>chp</i>	Repressor der Chemotaxis von Neutrophilen und Monozyten	van Wamel <i>et al.</i> , 2006
SCIN ( <i>staphylococcal complement inhibitor</i> )	<i>scn</i>	inhibiert Komplementaktivierung	Rooijackers <i>et al.</i> , 2005
Hyaluronidase	<i>hysA</i>	löst Hyaluronsäure auf, Erregerausbreitung erleichtert	Turmanidze <i>et al.</i> , 1996
Lipase	<i>geh</i>	hydrolytische Enzyme, Gewebeerstörung	Arvidson, 2000
Phospholipase C	<i>plc</i>	hydrolytische Enzyme, Gewebeerstörung	Marques <i>et al.</i> , 1989
Protease	<i>sspA, sspB</i>	hydrolytische Enzyme, Gewebeerstörung	Arvidson, 2000
DNase		Degradation von Wirtsnukleinsäuren, Erleichterung der Erregerausbreitung im Gewebe	Hacha und Fredericq, 1966
Thermonuklease	<i>nuc</i>	Degradation von Wirtsnukleinsäuren, Erleichterung der Erregerausbreitung im Gewebe	Brakstad <i>et al.</i> , 1992

Eine weitere Gruppe von Virulenzfaktoren sind Superantigene (Tabelle 1.3), zu denen die Staphylokokken-Enterotoxine, das Toxisch-Shock-Syndrom-Toxin 1 (TSST-1) und die exfoliativen Toxine A und B gezählt werden (Alouf und Müller-Alouf, 2003).

Tabelle 1.3: Superantigene von *S. aureus* (nach Alouf und Müller-Alouf, 2003).

Toxin(e)	Gen(e)	Funktion
Staphylokokken-Enterotoxine SEA-SEE, SEG-SEU	<i>sea-see, seg-seu</i>	Lebensmittelintoxikationen
Exfoliative Toxine A, B, C und D	<i>eta, etb, etc, etd</i>	Serinproteasen, Verursacher des <i>Staphylococcal-Scalded-Skin-Syndrome</i> (SSSS)
Toxisch-Schock-Syndrom-Toxin-1 (TSST-1)	<i>tst</i>	Verursacher des Toxisch-Schock-Syndrom (TSS)

Die Gene für diese Virulenzfaktoren sind auf genetischen Elementen, wie Phagen, Plasmiden oder Pathogenitätsinseln angesiedelt (Lindsay *et al.*, 1998). Superantigene stimulieren die T-Lymphozytenproliferation in einer nicht antigen-spezifischen Weise. Sie lagern sich von außen an HLA (*human leucocyte antigen*)-Moleküle an und nicht wie die klassischen Antigene über die spezielle Bindungsgruppe der HLA-Moleküle. Bei der Interaktion mit dem T-Zell-Rezeptor binden Superantigene nicht an dessen hypervariablen Teil, sondern direkt an einige der V $\beta$ -Segmente (Abbildung 1.2) (Kappler *et al.*, 1989). Im Gegensatz zur antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung, bei der im Rahmen einer Infektion in der Regel unter 1% aller T-Zellen aktiviert werden, stimulieren Superantigene antigen-unabhängig jeweils bis zu 30% des T-Zell-Repertoires mit entsprechend massiv gesteigerter Zytokin-Freisetzung und der Folge eines Zytokin-induzierten Schocks. Die Mehrzahl dieser als Toxisch-Shock-Syndrom bezeichneten Zustände sind durch das TSST-1 bedingt (Kreiwirth, 1989; Lowy, 2000).

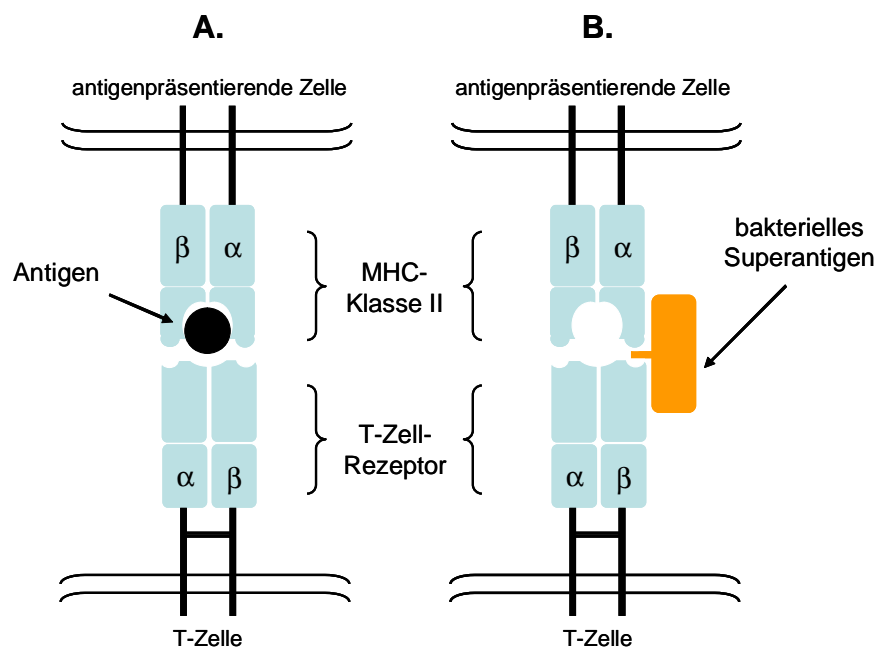


Abbildung 1.2: T-Zell-Aktivierung durch klassische Antigene (A) und Superantigene (B). Das klassische Antigen bindet in der Furche des MHC-II-Moleküls und aktiviert antigenspezifisch T-Zellen durch den T-Zell-Rezeptor. Das Superantigen kann unabhängig an MHC-II-Moleküle und an T-Zell-Rezeptoren binden, indem es sich weit außerhalb der komplementaritätsbestimmenden Region an die  $V\beta$ -Domäne des T-Zell-Rezeptors sowie weit entfernt von der peptidbindenden Furche an die Außenseite des MHC-II-Moleküls anlagert (Abb. in Anlehnung an Skov und Baadsgaard, 2000).

Weitere Superantigen-Struktur aufweisende Staphylokokken-Toxine sind die Lebensmittelvergiftungen hervorrufenden Staphylokokken-Enterotoxine, von denen bereits eine große Anzahl, SEA bis SEE und SEG bis SEU, typisiert wurden (Schlievert und Case, 2007). Die exfoliativen Toxine A und B können lokale Läsionen der Haut verursachen, führen aber auch bis hin zum *staphylococcal scaled skin syndrome* (SSSS), einer großflächigen Infektion und Ablösung der Epidermis bei Erkrankungen mit *S. aureus*-Stämmen, die diese Toxine bilden (Lee *et al.*, 1987; Ladhani, 2003).

Daneben tragen eine Vielzahl von Gewebsstrukturen abbauenden Enzymen wie Koagulase, Staphylokinase, Hyaluronidase, DNase, Lipasen und Proteasen zur Gewebsinvasion bei. Die Rolle der Koagulase bei *S. aureus*-Infektionen ist noch relativ unklar. Koagulase assoziiert mit Prothrombin und bildet Staphylothrombin, was zur Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin und damit zur Koagulation von Serum führt (Lowy, 2000). Die Staphylokinase ist ein Plasminogenaktivator (Lähteenmäki *et al.*, 2001) und induziert die Freisetzung von Defensinen aus Neutrophilen, um diese dann zu binden und ihre antimikrobielle Aktivität zu hemmen (Jin *et al.*, 2004; Bokarewa *et al.*, 2006). Hyaluronidase baut Hyaluronsäure, die sich zum Beispiel in der Haut und in den Knochen befindet, ab. Die Rolle von Proteasen als Virulenzfaktor ist sehr komplex. Sie werden in Zusammenhang mit der Degradation von Wirtszellkomponenten, wie Immunglobulinen, Plasmaproteinen und antimikrobiellen Peptiden, und Geweben

gebracht (Potempa *et al.*, 1991; Lowy, 2000; Sieprawska-Lupa *et al.*, 2004). Lipasen, wie FAME (*fatty acid modifying enzyme*), wirken gegen Fettsäuren, die sonst einen bakteriziden Effekt auf *S. aureus* hätten (Chamberlain und Imanoel, 1996).

Ein weiterer Mechanismus, um die Aktivierung des Komplementsystems und damit Phagozytose von Staphylokokken durch das angeborene Immunsystem zu verhindern, ist die Ausbildung einer Kapsel aus Polysacchariden um das Bakterium (Lee *et al.*, 1994; Thakker *et al.*, 1998; Watts *et al.*, 2005).

Um eine *S. aureus*-Infektion erfolgreich zu etablieren, müssen die verschiedenen Pathogenitätsfaktoren koordiniert reguliert werden. Das setzt die Kommunikation der Bakterien einer Population mit Hilfe von *Quorum Sensing*-Systemen voraus. Wird eine bestimmte Populationsdichte der Bakterien erreicht, aktivieren Autoinduktoren posttranskriptionale Regulatoren (Kong *et al.*, 2006). Die Regulation erfolgt dabei über Zwei-Komponentensysteme, die aus einem Transmembranrezeptor und einem zytoplasmatischen Effektorprotein bestehen. Für *S. aureus* sind verschiedene Zwei-Komponentensysteme, z.B. *agr*, *sae*, *srr* und *arl*, beschrieben (Fournier, 2008). Die Expression von Virulenzfaktoren wird hauptsächlich von *agr* zusammen mit dem Transkriptionsfaktor SarA kontrolliert (Otto *et al.*, 1999), weshalb *agr* auch mit der Pathogenese von *S. aureus* in Verbindung gebracht wird. Man geht davon aus, dass zu Beginn einer Infektion, bei geringer Bakteriendichte, vermehrt Adhäsine gebildet werden und nach der Kolonisierung des Wirtes die Expression der Virulenzfaktoren erhöht wird (Novick, 2003).

### 1.2.3 ANTIBIOTIKARESISTENZEN UND MRSA-EPIDEMIOLOGIE

*Staphylococcus aureus* gilt als einer der wichtigsten Infektionserreger im humanmedizinischen Bereich. Die Behandlung der Staphylokokken-Infektionen mit entsprechenden Antibiotika übt auf die Erreger einen Selektionsdruck aus und ruft bei *S. aureus* vergleichsweise schnell eine Resistenzentwicklung durch Mutationen oder den Erwerb von Resistenzgenen hervor (Livermore, 2000).

Erste Resistenzen traten bereits kurz nach der Einführung von  $\beta$ -Lactamase-stabilen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in der Therapie auf. 1961 wurde erstmalig aus England über die Resistenz eines *S. aureus*-Stammes gegenüber diesem Antibiotika berichtet (Jevons, 1961). Methicillin war das zuerst in die Therapie eingeführte penicillinasefeste Penicillin. Später wurde es durch die besser verträglichen Isoxazolympenicilline, wie zum Beispiel Oxacillin, ersetzt. Stämme mit diesen Resistenzen werden deshalb MRSA (Methicillin-resistenter *S. aureus*) oder von einigen Autoren auch ORSA (Oxacillin-resistenter *S. aureus*) benannt. Die Resistenz gegen Methicillin ist auf ein zusätzliches

Penicillinbindeprotein (PBP2a), das sich gegen so genannte penicillinasefeste Penicilline richtet, zurückzuführen. Dieses Protein wird durch das *mecA*-Gen kodiert, welches innerhalb des mobilen genetischen Elementes *SCCmec* (*staphylococcal cassette chromosome mec*) liegt (Ito *et al.*, 2001). Zusätzlich zu der *mecA*-kodierten Methicillin-Resistenz bei MRSA gibt es auch Stämme, die so genannten MODSA (*modified-low affinity S. aureus*), deren Methicillin-Resistenzen auf Mutationen in anderen Genen und damit auf Veränderungen in den Penicillinbindeproteinen beruhen. Die Entwicklung und der Einsatz neuer Antibiotika im Bereich der Gram-negativen Erreger erhöhte zusätzlich den Selektionsdruck insbesondere auf *S. aureus*. Daher traten schon zu Beginn der 80er Jahre in den USA zunehmend MRSA-Klone auf, die parallel Resistenzen gegen Aminoglykoside, Lincosamide, Makrolide, Tetracycline, Fluorochinolone, Sulfonamide und weitere Substanzklassen aufwiesen und damit die Behandlungsmöglichkeiten von MRSA-Infektionen deutlich einschränkten (Emori und Gaynes, 1993; Peters und Becker, 1996; Kipp *et al.*, 2004). Zu erwähnen sind dabei speziell Vancomycin-(Glykopeptid-)intermediär-empfindliche *S. aureus*-Stämme (VISA bzw. GISA, nur in MRSA) und die erstmals 2002 in den USA beschriebenen vollständig Vancomycin-resistenten MRSA (sog. VRSA), welche die Therapiemöglichkeiten weiter drastisch reduzieren (Kipp *et al.*, 2004).

Die ersten Ausbrüche von Nosokomialinfektionen, d.h. Infektionen, die in Krankenhäusern und Gesundheitseinrichtungen erworben werden, mit MRSA-Stämmen, wurden in den 70er Jahren verzeichnet (Crossley *et al.*, 1979). Seit dieser Zeit ist ein exponentieller Anstieg von Publikationen über nosokomiale Ausbrüche mit HA-MRSA (*hospital acquired MRSA*) in aller Welt zu verzeichnen. MRSA sind ein Hauptverursacher nosokomialer Infektionen an denen Patienten versterben und die in Form von Ausbrüchen auftreten, da diese Pathogene verhältnismäßig leicht zwischen Patienten sowie zwischen Patienten und Personal übertragbar sind. Betrachtet man die Prävalenz von MRSA, so sind beträchtliche Unterschiede zwischen europäischen Ländern, innerhalb Deutschlands zwischen verschiedenen Krankenhäusern und selbst innerhalb unterschiedlicher Abteilungen eines Krankenhauses zu beobachten. In den USA, Japan und den südeuropäischen Ländern wird von einer hohen MRSA-Rate zwischen 30% und 80% ausgegangen. Dagegen ist die Prävalenz in den Niederlanden (<0,5%) und den skandinavischen Ländern (Dänemark, Finnland: <1%) sehr gering (Kipp *et al.*, 2004). Die Häufigkeit von MRSA in Deutschland variiert je nach Erhebung, z.B. durch EARSS (*european antimicrobial resistance surveillance system*), PEG (Paul-Ehrlich-Gesellschaft) oder GENARS (*german network for antimicrobial resistance surveillance*), und insbesondere bei verschiedenen Krankenhäusern sowie innerhalb eines Krankenhauses, je nach Risikobereich, von 0% bis 35% und in Einzelfällen bis zu 60%. In den Krankenhäusern sind verschiedene klinische Disziplinen unterschiedlich häufig von MRSA betroffen. Dabei stehen die

intensivmedizinischen Bereiche, insbesondere chirurgische Intensivstationen sowie Einheiten für die Betreuung von Neugeborenen und Brandverletzten, im Vordergrund (Epidemiologisches Bulletin, Robert Koch-Institut, 5/2005, S.31-38). Tabelle 1.4 zeigt die MRSA-Statistik für das Universitätsklinikum Magdeburg.

Tabelle 1.4: Anteil der MRSA an der Gesamtzahl der *S. aureus*-Isolate und die Anzahl der MRSA-Patienten am Universitätsklinikum Magdeburg 2003-2007 (persönliche Mitteilung OÄ Dr. med. I. Tammer/ OA Dr. med. H. Lauf).

<b>Jahr</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>
<b>Erst- und Folgeisolate MRSA (%)</b>	28,6%	26,1%	23,2%	24,9%	23,4%
<b>MRSA-Patienten (n)</b>	198	176	187	155	239

Seit einigen Jahren werden vermehrt MRSA-Stämme von Patienten isoliert, die eigentlich keine Risikofaktoren für MRSA-Infektionen, wie direkten vorherigen Kontakt zu stationären medizinischen Einrichtungen, schwere Grunderkrankungen oder vorliegende Antibiotikabehandlungen, aufweisen (Epidemiologisches Bulletin, Robert Koch-Institut, 5/2004, S.33-36). Diese CA-MRSA (*community acquired MRSA*) wurden erstmals bei Ureinwohnern Nordamerikas und Australien gefunden und später auch von ambulanten Patienten isoliert, die besonders invasive Infektionen der Haut und seltener schwere Krankheitsbilder wie nekrotisierende Faszitis oder nekrotisierende Pneumonie aufwiesen (Kipp *et al.*, 2004; King *et al.*, 2006). Letztere tritt oft als Superinfektion eines grippalen Infekts vor allem bei Kindern und Jugendlichen auf und hat eine Letalität von zirka 70% zur Folge. Diese CA-MRSA trugen als besonderen Virulenzfaktor das Panton-Valentine-Leukozidin-Gen (Gillet *et al.*, 2002; van der Flier *et al.*, 2003). In Deutschland waren 2004 1,1% der am Nationalen Referenzzentrum für Staphylokokken untersuchten MRSA-Isolate CA-MRSA, 2005 waren es 1,5% und 2006 bereits 2,7%. Zurzeit überwiegen in den USA zwei CA-MRSA-Klone MW2 und USA300, die über zwei Drittel aller rezidivierenden Haut- und Weichteilinfektionen verursachen (Diep *et al.*, 2006; King *et al.*, 2006). Wie bei anderen epidemischen MRSA gibt es auch bei diesen Stämmen eine globale Verbreitung. Der CA-MRSA-Klon USA300 wird zum Beispiel seit 2005 auch in Deutschland nachgewiesen, allerdings traten überwiegend sporadische Infektionen auf (Witte *et al.*, 2007; Epidemiologisches Bulletin, Robert Koch-Institut, 11/2008, S.88-89). Aber auch für die in Deutschland und Europa bisher noch vereinzelt auftretenden CA-MRSA kann eine weitere Verbreitung nicht ausgeschlossen werden.



## 1.3 KOAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOKOKKEN

### 1.3.1 PATHOGENESE

Neben *S. aureus*, der klinisch bedeutendsten *Staphylococcus*-Spezies, gibt es potenziell humanpathogene Koagulase-negative Staphylokokken, von denen die meisten ein natürlicher Bestandteil der menschlichen Hautflora sind und sowohl die äußere Haut als auch die Schleimhäute kolonisieren. Auf der menschlichen Haut lebende Staphylokokken besitzen entsprechend der hohen Osmolarität der Haut und ihres lokal niedrigen pH-Wertes eine ausgeprägte Osmo- und Azidotoleranz. Zusätzlich sind sie weitestgehend an mechanischen Stress und Veränderungen der Temperatur und Feuchtigkeit angepasst (Otto, 2004).

Koagulase-negative Staphylokokken wurden sehr lange als apathogene Mikroorganismen angesehen. Dass diese Bakterien eine bedeutende Rolle als Krankheitserreger nosokomialer und allgemein erworbener Erkrankungen einnehmen, wurde erst in den letzten Jahrzehnten erkannt. Insbesondere bei alten Menschen, Kindern und Neugeborenen wurden besonders schwere und fulminant verlaufende Erkrankungen beobachtet. Koagulase-negative Staphylokokken sind die häufigste Ursache der im Krankenhaus erworbenen, nosokomialen neonatalen Sepsis (Weisman, 2004). Durch den vermehrten Einsatz von implantierten Polymeren in der modernen Medizin treten verstärkt septische und Fremdkörper-assoziierte Infektionen bei Patienten mit Venenkathetern, Liquorshunts, künstlichen Herzklappen und Gelenk- und Gefäßprothesen auf (Hübner und Goldmann, 1999). Weitere schwere Erkrankungen, die durch Koagulase-negative Staphylokokken hervorgerufen werden, sind Endokarditiden und Meningitiden (Huang *et al.*, 2005), Wund-, Weichgewebe- und Harnwegsinfektionen, Enterokolitiden und Infektionen der Haut und des Auges. Koagulase-negative Staphylokokken sind zusammen mit Klebsiellen die sechsthäufigste Erregergruppe bei Patienten auf deutschen Intensivstationen (Stock, 2008), 5% aller Haut- und Weichgewebeinfektionen werden durch sie verursacht (Fritsche *et al.*, 2005) und in der Ophthalmologie sind sie die Erreger der meisten benignen Erkrankungen. Auch bei akuten Konjunktivitiden, Keratitiden und postoperativen Endophthalmitiden sind Koagulase-negative Staphylokokken wahrscheinlich die häufigste bakterielle Ursache für diese Erkrankungen (Kattan *et al.*, 1991; Speaker *et al.*, 1991).

Zum jetzigen Zeitpunkt werden 14 verschiedene Koagulase-negative *Staphylococcus*-Spezies als Erreger von Humaninfektionen beschrieben (Tabelle 1.5).

Tabelle 1.5: Erkrankungen und klinische Bedeutung Koagulase-negativer Staphylokokken (nach Stock, 2008).

Art	Auftreten als Krankheitserreger	Erkrankung
<i>S. epidermidis</i>	sehr häufig	Sepsis, Endokarditis, Meningitis, Harnwegsinfektionen, Wundinfektionen, Infektionen des Auges und der Haut
<i>S. hominis</i>	häufig	Sepsis, Harnwegsinfektionen, Infektionen des Auges
<i>S. haemolyticus</i>	häufig	Sepsis, Endokarditis, Meningitis, Peritonitis, Harnwegsinfektionen, Wundinfektionen, Knochen- und Gelenkinfektionen, Weichgewebeeinfektionen, Erkrankungen der Haut
<i>S. warneri</i>	häufig	Sepsis, Endokarditis, Osteomyelitis, Katheterinfektionen, Infektionen des Auges
<i>S. lugdunensis</i>	häufig	Endokarditis, Arthritis, Katheterinfektionen, Sepsis, Harnwegsinfektionen, Gelenkinfektionen
<i>S. saprophyticus</i>	häufig	Harnwegsinfektionen, Endokarditis, Sepsis, Wundinfektionen
<i>S. capitis</i>	gelegentlich	Endokarditis, Sepsis, Katheterinfektionen, Infektionen des Auges
<i>S. caprae</i>	gelegentlich	Endokarditis, Harnwegsinfektionen, Arthritis, Osteomyelitis, Wund- und Gelenkinfektionen
<i>S. cohnii</i>	gelegentlich	Endokarditis, Pneumonie, Harnwegsinfektionen, Arthritis
<i>S. saccharolyticus</i>	gelegentlich	Endokarditis
<i>S. schleiferi</i>	gelegentlich	Sepsis, Harnwegsinfektionen, Osteomyelitis, Wund- und Gelenkinfektionen, Katheterinfektionen
<i>S. sciuri</i>	gelegentlich	Wund-, Haut- und Weichgewebeeinfektionen
<i>S. simulans</i>	gelegentlich	Endokarditis, Sepsis, Osteomyelitis
<i>S. xylosus</i>	gelegentlich	Harnwegsinfektionen

Die Beurteilung der klinischen Bedeutung einzelner Spezies gestaltet sich zum Teil allerdings sehr schwierig, da unter Verwendung der biochemischen Identifizierung oft andere *Staphylococcus*-Spezies (Carretto *et al.*, 2005; Layer *et al.*, 2006) oder sogar andere Bakteriengattungen (Ben-Ami *et al.*, 2005) erhalten werden. In letzter Zeit laufen bereits Studien, die die Spezifität von genotypischen und phänotypischen Testverfahren beurteilen und optimieren, um eine zuverlässige Identifizierung der Staphylokokken auf Speziesebene zu erhalten (Ben-Ami *et al.*, 2005; Layer *et al.*, 2006).

Eine große humanmedizinische Bedeutung als Krankheitserreger wird neben *S. epidermidis*, vor allem *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. lugdunensis* und *S. saprophyticus* zugeschrieben. *Staphylococcus epidermidis* ist die am häufigsten aus klinischen Materialien isolierte Koagulase-negative Staphylokokken-Spezies (Garcia *et al.*, 2004; Singhal *et al.*, 2006). Weltweit gehört *S. epidermidis* besonders bei

Septikämien, Endokarditiden, Wund- und Harnwegsinfektionen (Garcia *et al.*, 2004; Jain *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005) und ophthalmologischen Infektionen (Rupp und Archer, 1994; Pinna *et al.*, 1999) zu den vorherrschenden *Staphylococcus*-Spezies. Vor allem in mediterranen Regionen und Nordamerika tritt *S. hominis* als Krankheitserreger auf (Kloos *et al.*, 1998; Cuevas *et al.*, 2004; Chaves *et al.*, 2005). Diese Spezies ist der hauptsächliche Verursacher von Sepsis bei Neugeborenen und Kleinkindern. Die meisten Infektionen werden von *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*, einer Unterart die gegenüber zahlreichen Antibiotika resistent ist, hervorgerufen (Kloos *et al.*, 1998; Fitzgibbon *et al.*, 2001; Chaves *et al.*, 2005). Allerdings ist *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* im Gegensatz zu *S. hominis* subsp. *hominis* gar nicht oder nur in geringer Zellzahl auf der menschlichen Haut zu finden (Kloos *et al.*, 1998). *Staphylococcus haemolyticus* wird ebenfalls häufig aus klinischem Material isoliert und verursacht neben diversen anderen Infektionen (Bannerman, 2003; Shittu *et al.*, 2005), vor allem bei Neugeborenen auf Intensivstationen Septikämien (Jain *et al.*, 2004; Chaves *et al.*, 2005; Raponi *et al.*, 2005). Ein weiterer Verursacher neonataler Sepsis ist *S. warneri*. In Studien über diese Spezies wird beschrieben, dass zwischen 8 und 16% aller durch Koagulase-negative Staphylokokken verursachte Sepsis-Infektionen unter Neugeborenen auf dieses Bakterium zurückzuführen sind (Kacica *et al.*, 1994; Buttery *et al.*, 1997; Kallman *et al.*, 1997). Diese Spezies wird auch als Erreger von Endokarditiden, Osteomyelitiden und weiterer Erkrankungen bei immunsupprimierten und immunkompetenten Patienten beschrieben (Wood *et al.*, 1989; Center *et al.*, 2003; Announ *et al.*, 2004). *Staphylococcus warneri* gehört zur natürlichen Hautflora des Menschen, wird aber dort nur in geringer Zellzahl vorgefunden (Bannerman, 2003). Nosokomiale und ambulant erworbene Infektionen mit *S. lugdunensis* wurden in den letzten Jahren gehäuft beschrieben. Diese Spezies ist, wie die anderen Koagulase-negativen Staphylokokken, für zahlreiche Infektionen verantwortlich (Bellamy und Barkham, 2002; Kaabia *et al.*, 2002; Greig und Wood, 2003; Ebricht *et al.*, 2004), allerdings sind die Erkrankungen im Zusammenhang mit *S. lugdunensis* meist durch schwere und fulminante Verläufe gekennzeichnet. Besonders Endokarditiden gehen mit einer hohen Letalität einher (Anguera *et al.*, 2005; van Hoovels *et al.*, 2005). *Staphylococcus saprophyticus* ist nach *Escherichia coli* der häufigste Erreger von Harnwegsinfektionen der Frau (Raz *et al.*, 2005). Diverse Studien haben gezeigt, dass die Häufigkeit der Infektion von der untersuchten Altersgruppe und der Region abhängt (Schneider und Riley, 1996; Gupta *et al.*, 1999). Harnwegsinfektionen bei Männern, die mit *S. saprophyticus* assoziiert sind, kommen relativ selten vor (Kauffman *et al.*, 1983). Als Erreger anderer Infektionen spielt *S. saprophyticus* eine untergeordnete Rolle. Es wurden vereinzelt Fälle von Endokarditiden (Garduno *et al.*, 2005) und Septikämien (Raz *et al.*, 2005) beschrieben.

### 1.3.2 BIOFILMBILDUNG UND VIRULENZFAKTOREN

Die meisten Koagulase-negativen Staphylokokken sind ein natürlicher Bestandteil der Hautflora und besitzen somit bestimmte Mechanismen und Adhärenzfaktoren, welche die dauerhafte Kolonisation der Haut und eine effiziente Vermehrung der Staphylokokken unterstützen. Entfällt die natürliche Barrierefunktion der Haut, so bilden diese Adhärenzfaktoren den ersten Schritt im Verlauf einer Erkrankung oder einer Fremdkörper-assoziierten Infektion. Koagulase-negative Staphylokokken können sich somit zum Beispiel an implantierte Polymermaterialien anheften und bilden durch die ebenfalls enge Adhäsion der Bakterien untereinander so genannte Biofilme aus. Als einen Biofilm bezeichnet man eine Lebensgemeinschaft von Mikroorganismen, die sich durch Bildung einer extrazellulären, meist aus Polysacchariden und Proteinen bestehenden Matrix in einem engen Kontakt zueinander und zu diversen Oberflächenstrukturen befinden (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Das Modell einer Biofilmbildung ist in Abbildung 1.3 zu sehen. Die Bakterien adhären über unspezifische Faktoren an der jeweiligen Oberflächenstruktur (Ziebuhr *et al.*, 2006). Nachfolgend oder parallel dazu wird über die Teichonsäuren der Zellwand und bestimmte Proteine wie Autolysine oder Zellwand-assoziierte Proteine, die mit Kollagen, Fibronectin oder anderen Matrixproteinen interferieren, dieser Kontakt verstärkt. Die Verdichtung und Vergrößerung des Biofilms erfolgt dann durch die Expression von Zell-Zell-Kontakten-vermittelnden Faktoren. Solche Faktoren sind z.B. bei *S. epidermidis* das so genannte Polysaccharid-interzelluläre Adhäsion (PIA), die Oberflächen-assoziierten Proteine Aap (*accumulation-associated protein*), die Bap/Bhp-Proteine (*biofilm-associated protein*) und extrazelluläre Teichonsäuren (Ziebuhr *et al.*, 2006).

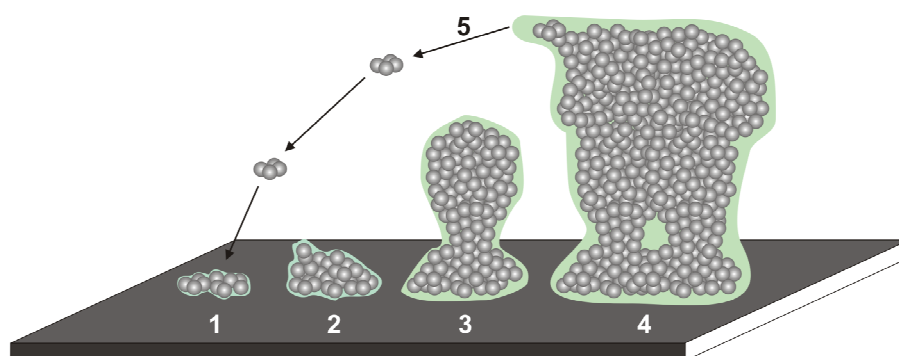


Abbildung 1.3: Modell einer Biofilmbildung mit Kolonisierungs-, Biofilm- und Disseminationsphase: Initiale Adhärenz von planktonischen Bakterien und Ausbildung einer adhärenzenden einschichtigen Zellschicht (1); Zell-Zell-Adhäsion und Proliferation (2); frühe Entwicklungsstufe des Biofilms (3); Reifung (4); Ablösung von Bakterien aus dem Biofilm (5) (Abb. in Anlehnung an Lasa, 2006; Stock, 2007).

Die Ausbildung von Biofilmen stellt außerdem ein großes Problem für die antibakterielle Therapie von Infektionen, die durch Koagulase-negative Staphylokokken verursacht werden, dar. Einige Antibiotika können nur in geringem Maße in den Biofilm diffundieren. Außerdem weisen Bakterien, die Teil eines Biofilms sind, oft eine lange Generationszeit auf, so dass Antibiotika, die auf sich replizierende Zellen einwirken, weniger effektiv sind (Costerton *et al.*, 1999). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung von Biofilmen durch subinhibitorische Konzentrationen des jeweiligen Antibiotikums in Abhängigkeit vom Erregerstamm und vom verwendeten Antibiotikum stimuliert oder inhibiert wurde (Rachid *et al.*, 2000; Cerca *et al.*, 2005). *In-vitro* und *in-vivo*-Studien deuten darauf hin, dass keiner der bislang für die Behandlung von Staphylokokken eingesetzten Wirkstoffe in der klinischen Routine innerhalb von Biofilmen vorliegende Bakterien vollständig eliminieren kann (Gander *et al.*, 2005). Somit sind in Biofilmen vorkommende Staphylokokken sowohl gegen die körpereigene Immunabwehr als auch gegen antibakteriell wirkende Substanzen teilweise geschützt.

### 1.3.3 ANTIBIOTIKARESISTENZ

Koagulase-negative Staphylokokken sind *per se* keine multiresistenten Bakterien. Stämme diverser *Staphylococcus*-Spezies haben allerdings die Resistenz gegen Antibiotika verschiedener Substanzklassen erworben. Dazu zählen unter anderem Resistenzen gegenüber Beta-Lactamen, Aminoglykosiden, Chinolonen, Makroliden, Lincosamiden, Fusidinsäure und Co-trimoxazol. Allerdings sind Daten über die Häufigkeit der Resistenzen bei bestimmten Spezies rar. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden Multiresistenzen vor allem bei *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* und *S. warneri* beschrieben (Bannerman, 2003; Center *et al.*, 2003; Monsen *et al.*, 2005; Singhal *et al.*, 2006).

## 1.4 ANGEBORENE IMMUNITÄT UND *S. AUREUS*

Das angeborene Immunsystem ist für die Bekämpfung bakterieller Infektionen von grundlegender Bedeutung, da es eine erste Verteidigungslinie gegen viele Mikroorganismen bildet und bei der Auslösung und Steuerung der adaptiven Immunreaktion eine entscheidende Rolle spielt. Der erste Schutz des Organismus gegen Infektionen sind die inneren und äußeren Epithelien, die neben der Funktion als physikalische Barriere auch antibakterielle Substanzen sekretieren. Haben Bakterien diesen ersten Schutz überwunden, werden sie von Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen erkannt, die weitere Effektorzellen anlocken. Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems erfolgt mit Hilfe keimbahnkodierter Rezeptoren, sog. PRRs (*pattern recognition receptors*). Zu den membranständigen PRRs werden z.B. *Toll-like* Rezeptoren und Komplementrezeptoren gezählt. Weiterhin sind sezernierte, lösliche (z.B. das LPS-bindende Protein) und zytosolische, intrazelluläre PRRs (z.B. Nod1/2 Moleküle) bekannt. Die PRRs binden, bis auf wenige Ausnahmen, bakterielle Zellwandbestandteile (z.B. Lipoteichonsäure und Peptidoglykan), die in der Regel aus einem über viele Spezies konservierten und einem weniger konservierten Bereich bestehen. Diese Erkennungsstrukturen werden als PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) bezeichnet. Die Bindung von PAMPs führt zur Aktivierung von verschiedenen Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, wie z.B. Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und natürlichen Killerzellen. Pro- und anti-inflammatorische Mediatoren gewährleisten dabei ein koordiniertes Zusammenwirken der Zellen des Immunsystems. Zu diesen Mediatoren werden unter anderem Zytokine gezählt, die eine Entzündung und die darauf folgende Immunantwort vermitteln und für die Kommunikation zwischen den Zellen zuständig sind. Wichtige Zytokine der angeborenen Immunantwort sind IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$ . IL-1 und TNF- $\alpha$  fördern die entzündliche Immunantwort am Ort der Infektion, IL-6 stimuliert die Produktion so genannter „akute Phase-Proteinen“ und rekrutiert Neutrophile, IL-8 lockt weitere Effektorzellen und anti-inflammatorische Zytokine, wie IL-4 und IL-10. Diese hemmen unter anderem die Aktivierung von Makrophagen und führen zu einer Limitierung der Entzündungsreaktion (Janeway und Travers, 2002; Fournier und Philpott, 2005). Durch die Stimulation der PRRs und die Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren werden co-stimulatorische Moleküle (CD80, CD86, MHC-II) hochreguliert, die eine schnelle klonale Expansion der antigenspezifischen T- und B-Zellen ermöglichen und somit die erworbene Immunantwort auslösen. Abbildung 1.4 fasst zusammen, wie *S. aureus* die angeborene Immunabwehr der Wirtszelle gleichzeitig stimulieren und supprimieren kann.

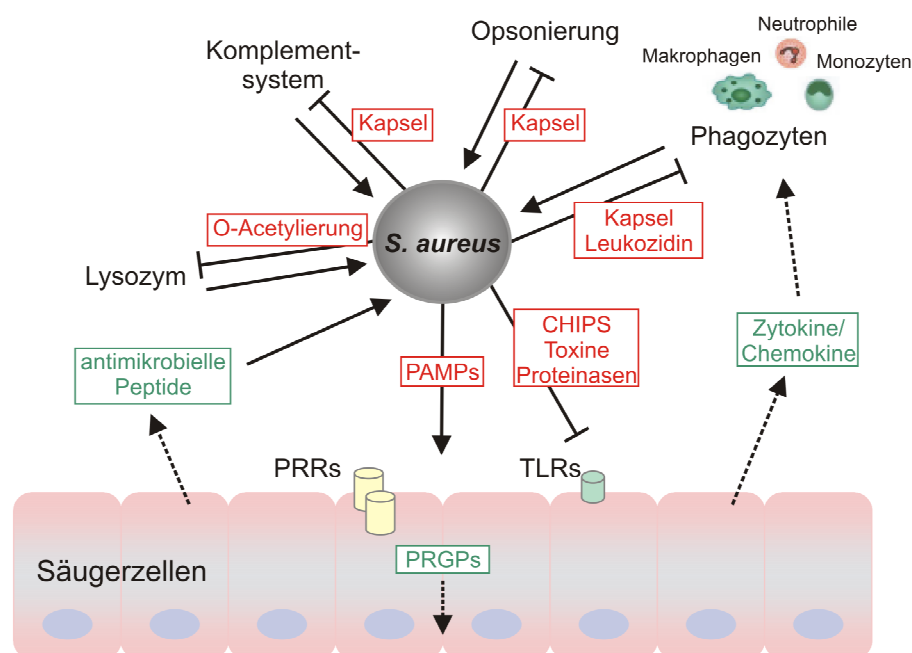


Abbildung 1.4: Modell der angeborenen Immunantwort bei Infektionen mit *S. aureus*. Zellen erkennen PAMPs z.B. mit Hilfe von PRRs, wie TLRs, und produzieren verschiedenen Faktoren (gepunktete Pfeile), wie Zytokine, Chemokine und antimikrobielle Peptide. Ebenso werden Phagozyten mobilisiert. Faktoren, die *S. aureus* eine Resistenz gegen bestimmte Komponenten des angeborenen Immunsystems vermitteln, sind ebenfalls dargestellt (Abb. in Anlehnung an Komatsuzawa *et al.*, 2006).

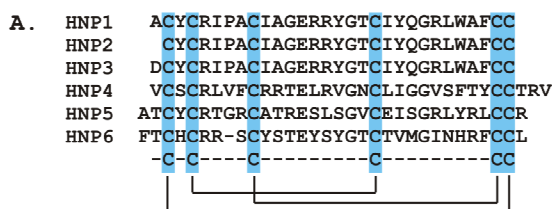
## 1.5 ANTIMIKROBIELLE PEPTIDE ALS KOMPONENTEN DER ANGEBORENEN IMMUNITÄT

Antimikrobielle Peptide (AMP) sind Effektormoleküle der angeborenen Immunität. Als AMP werden allgemein alle Peptide eines Organismus bezeichnet, die eine antimikrobielle Aktivität aufweisen und die damit in der Lage sind Mikroorganismen abzutöten oder in ihrem Wachstum zu inhibieren. Antimikrobielle Peptide sind evolutionsgeschichtlich sehr alt, mehr als 700 verschiedene Peptide wurden bereits in Bakterien, Pflanzen und Tieren beschrieben. Sie werden von diversen Zellen gebildet und unterscheiden sich in ihrer Funktionsweise und ihren Zielorganismen. Ihre antimikrobielle Aktivität liegt darin begründet, dass sie durch elektrostatische Wechselwirkungen an die Zielzelle binden und mit der bakteriellen Zellmembran interagieren, was letztendlich zur Instabilität und Lyse der Bakterien führt. Es gibt verschiedene Theorien darüber, wie AMP die Zellmembran destabilisieren. Entweder bilden mehrere dieser antimikrobiellen Peptide einen stabilen Kanal oder sie lagern sich zu unstrukturierten Aggregaten in der Zellmembran zusammen, aus denen sich spontan und kurzfristig Poren bilden (Wu *et al.*, 1999). Weiterhin könnten die AMP die Zellmembran großflächig bedecken und somit deren Stabilität stören (Heller *et al.*,

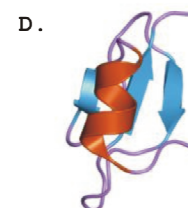
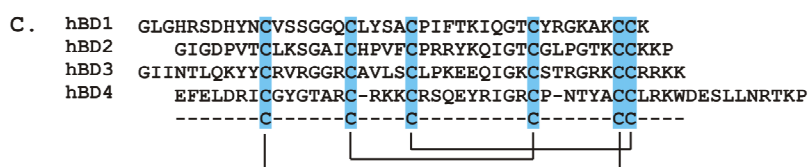
2000). Die AMP wirken auch als Entzündungsmediatoren und beeinflussen somit die Immunantwort. Sie wirken chemotaktisch auf Leukozyten und sind an der Regulation der Zellproliferation, der Angiogenese und der Wundheilung beteiligt (Huttner und Bevins, 1999; Yang *et al.*, 2004).

Die Klassifizierung der AMP erfolgt anhand ihrer Größe, Struktur und Aminosäuresequenz. Wegen der großen Menge an Peptiden mit antimikrobieller Aktivität und weil regelmäßig neue AMP entdeckt werden, existiert noch keine einheitliche, allgemein akzeptierte Klassifizierung (Andreu und Rivas, 1998; van't Hof *et al.*, 2001). Im Folgenden werden einige Klassen antimikrobieller Peptide näher beschrieben.

#### $\alpha$ -Defensine



#### $\beta$ -Defensine



#### Cathelizidin



Abbildung 1.5: Aminosäuresequenz und Struktur wichtiger antimikrobieller Peptide:  $\alpha$ -Defensine bestehen aus 29-35 AS (A.), die Tertiärstruktur entspricht einer dreisträngigen  $\beta$ -Faltblattstruktur mit einer  $\beta$ -Haarnadel (B.: HNP 3 (EMBL-EBI Datenbank));  $\beta$ -Defensine bestehen aus 36-42 AS (C.), die Tertiärstruktur ist ein kurzes helikales Element gefolgt von einem dreisträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt (D.: hBD2 (EMBL-EBI Datenbank)); LL-37 (E.) als aktiver C-terminaler Teil von hCAP-18.

### 1.5.1 DEFENSINE

Defensine stellen eine Gruppe der antimikrobiellen Peptide dar. Sie sind kationische, nicht glykosilierte Peptide, mit einer Größe von 3,5 bis 4,5 kDa, die zahlreich die positiv geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin und sechs Cysteine besitzen. Die sechs Cysteine wiederum bilden drei charakteristische intramolekulare Disulfidbrücken aus (Lehrer *et al.*, 1991). Die Einteilung der Defensine erfolgt auf Grund ihrer allgemeinen molekularen Struktur und der unterschiedlichen Verknüpfung der Cysteine



zu Disulfidbrücken in  $\alpha$ -Defensine,  $\beta$ -Defensine und  $\theta$ -Defensine (siehe Abbildung 1.5).

Die ersten humanen Defensine wurden in den 80er Jahren in neutrophilen Granulozyten entdeckt. Diese sogenannten  $\alpha$ -Defensine wurden als HNP (humane neutrophile Peptide) 1 bis 3 (Selstedt *et al.*, 1985) und HNP4 (Wilde *et al.*, 1989) benannt. HNP1-4 sind in großen Mengen in den azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten lokalisiert. Dort unterstützen sie die Funktion des Sauerstoff-unabhängigen Abtötens von phagozytierten Mikroorganismen (Ganz *et al.*, 1985; Selsted *et al.*, 1985). Zwei weitere humane  $\alpha$ -Defensine, HD5 und HD6, wurden in den Paneth-Zellen des Dünndarms und im Auge gefunden (Jones und Bevins, 1993; Haynes *et al.*, 1999; Wehkamp *et al.*, 2002). Das erste humane  $\beta$ -Defensin (hBD1) wurde 1995 aus dem Blutplasma des Menschen isoliert (Bensch *et al.*, 1995). Es gehört zu den konstitutiv exprimierten antimikrobiellen Peptiden, ist also durch inflammatorische Prozesse oder Bakterien nicht induzierbar (Zhao *et al.*, 1996). Zwei Jahre später wurde das humane  $\beta$ -Defensin 2 (hBD2) aus läsionalen Hautschuppen des Menschen gewonnen (Harder *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu hBD1 ist hBD2 induzierbar, es wird besonders nach Kontakt mit Gram-negativen aber auch mit Gram-positiven Bakterien und anderen inflammatorischen Stimuli in Epithelzellen gebildet. Die hBD2 mRNA wurde auch in kultivierten Epithelzellen der Bronchien, der Lunge, der Nase, des Magens und des Darms nachgewiesen (Schröder und Harder, 1999). Im Folgenden konnten weitere  $\beta$ -Defensine, wie das hBD3 (Harder *et al.*, 2001) in Keratinozyten und das hBD4 (Garcia *et al.*, 2001) in Lungenepithelien, aufgereinigt und analysiert werden. Diese beiden  $\beta$ -Defensine sind ebenfalls durch Infektion und Entzündung induzierbar (Harder *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2001b).  $\theta$ -Defensine, benannt wegen ihrer zirkulären molekularen Struktur, wurden 1999 aus neutrophilen Granulozyten von Rhesusaffen isoliert (Tang *et al.*, 1999). Dieses so genannte Rhesus- $\theta$ -Defensin-1 (RTD-1) wird durch posttranslationale Ligation aus zwei verkürzten  $\alpha$ -Defensinen gebildet (Leonova *et al.*, 2001). Durch Datenbankrecherchen wurde das Retrocyclin-Gen, homolog dem RTD-1, beim Menschen gefunden, das allerdings Stopkodons in seiner Signalsequenz enthält und somit die Synthese eines funktionsfähigen Proteins unterbunden wird. Erstaunlicherweise haben Studien gezeigt, dass ein chemisch synthetisiertes Protein, das genetisch mit dem inaktivierten Peptid Retrocyclin übereinstimmt, die Replikation von HIV-1 blockiert (Nguyen *et al.*, 2003; Munk *et al.*, 2003).

### 1.5.2 CATHELIZIDINE

Neben den Defensinen existieren noch andere antimikrobielle Peptide, z.B. Cathelizidine. Die AMP der Cathelizidin-Familie besitzen eine hoch konservierte Signalsequenz und Pro-Region, diese wird auch Cathelin genannt, aber eine heterogene

C-terminale Domäne. Die Cathelin Pro-Region ist ein Inhibitor der Proteinase Cathepsin L und besitzt antimikrobielle Aktivität (Zaiou *et al.*, 2003). Die C-terminale Domäne, das eigentliche antimikrobielle Peptid, ist zwischen 12 und 80 Aminosäuren groß (Zanetti *et al.*, 1995; Lehrer und Ganz, 2002). Das einzige bekannte humane Cathelizin ist das LL-37 (Frohm *et al.*, 1997), wobei das nicht aktive Proprotein als hCAP-18 bezeichnet wird. LL-37/hCAP-18 wird hauptsächlich in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten synthetisiert und dort als Propeptid in spezifischen Granula gespeichert (Cowland *et al.*, 1995), kann aber auch von Lymphozyten, Monozyten (Agerberth *et al.*, 2000) und Epithelien der Lunge (Bals *et al.*, 1998), des Darms (Hase *et al.*, 2002) und der Haut (Frohm *et al.*, 1997; Malm *et al.*, 2000) gebildet werden. Der Mechanismus der Prozessierung von LL-37/hCAP-18 ist momentan nur für neutrophile Granulozyten bekannt. Die Signalsequenz des Präproteins signalisiert bei der Synthese im endoplasmatischen Retikulum, dass das Protein exportiert werden soll. Nach dem Abspalten der Signalsequenz wird das Proprotein in spezifischen Granula gespeichert. Sekretiert die Zelle dieses Proprotein, so wird es extrazellulär durch die Protease 3 geschnitten, wobei Cathelin und das aktive LL-37 entstehen (Sorensen *et al.*, 2001).

### 1.5.3 REGULATION ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE

Die konstitutive Expression und Induktion der Synthese von antimikrobiellen Peptiden ist an die Aktivierung des angeborenen Immunsystems gebunden. Die AMP werden von Geweben und in Entzündungszellen, die sich an der Abwehr von Pathogenen beteiligen, gebildet. Pathogene Mikroorganismen werden vom Immunsystem über ihre PAMPs, z.B. Peptidoglykane, Lipopolysaccharide (LPS), Teichonsäuren und bakterielle Lipoproteine, erkannt und in Folge werden verschiedene Signalkaskaden initiiert. Betrachtet man exemplarisch Peptidoglykane, so aktivieren diese den TLR2, während Lipopolysaccharide zur Aktivierung des TLR4 führen (Fournier und Philpott, 2005). Der Toll-Signalweg endet schließlich in der Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und zur Expression von antimikrobiellen Peptiden. Das Präpropeptid, was als Ergebnis der Genexpression erhalten wird, besitzt eine Erkennungssequenz für den Export in das endoplasmatische Retikulum (Charpentier *et al.*, 1998; Faurschou *et al.*, 2005). Dort kann das Propeptid weiter modifiziert werden und im Anschluss je nach Art und Funktion des exprimierenden Gewebes direkt in den Extrazellulärraum abgegeben (Diamond *et al.*, 1991; Quellet und Selsted, 1996) oder bis zu seiner Verwendung in spezifischen Granula gespeichert werden (Ganz *et al.*, 1985; Cowland *et al.*, 1995). Beim Menschen werden HNP1 bis 4 in neutrophilen Granulozyten gespeichert, HD5 und HD6 als inaktives Protein sekretiert und durch proteolytische Spaltung aktiviert. Die vier humanen  $\beta$ -Defensine hBD1 bis 4 werden

hauptsächlich von verschiedenen Epithelzellen organspezifisch, meistens von den oberen, spezialisierten Zellschichten produziert.

## 1.6 ANTIMIKROBIELLE PEPTIDE UND PROTEINE ALS KOMPONENTEN DER IMMUNANTWORT DER HAUT

Die Haut und andere Epithelien des Menschen besitzen eine komplexe angeborene Immunabwehr, bei der sich konstitutiv exprimierte antimikrobielle Peptide und Erregerspezifische induzierbare Peptide ergänzen.

Neben  $\alpha$ -Defensinen,  $\beta$ -Defensinen und dem Cathelizidin hCAP18/LL-37 gibt es weitere antimikrobielle Peptide und Proteine des Menschen, die speziell bei der angeborenen Immunantwort von Epithelien eine Rolle spielen (Tabelle 1.6). Dazu zählen unter anderem Psoriasin, Granulysin und Dermicidin.

Tabelle 1.6: Ausgewählte antimikrobielle Peptide und Proteine der humanen Haut (in Anlehnung an Zaiou *et al.*, 2005).

<b>AMPs in ortsansässigen Zellen:</b>	HCAP18/LL-37; $\beta$ -Defensine; Lactoferrin; Lysozym; Dermicidin; RNase 7
<b>AMPs in einwandernden Zellen:</b>	HCAP18/LL-37; $\alpha$ -Defensine; Lactoferrin; Granulysin; ECP; EDN
<b>AMPs mit Funktion als Proteaseinhibitor:</b>	HCAP18/LL-37 Prosequenz ; Antileukiprotease/SLPI

Psoriasin wird von Epithelien gebildet und trägt zur angeborenen Immunantwort bei, indem es bei Neutrophilen die Produktion von Cytokinen und Chemokinen induziert und die Expression von  $\alpha$ -Defensinen unterstützt (Zheng *et al.*, 2008). Granulysin wird von zytolytischen T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen gebildet und ist gegen diverse Krankheitserreger, wie Bakterien, Viren, Pilze, aber auch gegen Tumorzellen aktiv (Anderersson *et al.*, 1995; Stenger *et al.*, 1998; Andreu *et al.*, 1999). Dermicidin weist keine Homologie zu einem bekannten antimikrobiellen Peptid auf. Es wird in den Schweißdrüsen der Haut gebildet und in den Schweiß abgegeben, es wurde bei gesunden Menschen noch nie in den Keratinozyten der Haut nachgewiesen (Rieg *et al.*, 2004). Die antimikrobielle Aktivität umfasst ein weites Wirtsspektrum, unter anderem Gram-positive und Gram-negative Bakterien (Lai *et al.*, 2005). In eosinophilen Granulozyten konnten mit den RNasen ECP (*eosinophil cationic protein*) und EDN (*eosinophil-derived neurotoxin*) antimikrobiell aktive Proteine nachgewiesen werden (Domachowske *et al.*, 1998a, 1998b). Im Jahr 2002 wurde aus dem *Stratum corneum* des Menschen eine weitere antimikrobiell aktive RNase, die RNase 7, isoliert (Harder und Schröder, 2002). Humane Keratinozyten sind außerdem in der Lage, Proteaseinhibitoren zu exprimieren. Diese inhibieren humane Proteasen und beugen

somit einer Gewebsschädigung durch körpereigene Proteasen, z.B. aus neutrophilen Granulozyten, vor. Ein Beispiel dafür ist die Antileukoprotease (Wiedow *et al.*, 1998), die auch als SLPI (*secretory leukocyte protease inhibitor*) bezeichnet wird. SLPI inhibiert Serinproteasen, wie neutrophile Elastase und Cathepsin G (Franzke *et al.*, 1996), und ist gegen eine Vielzahl von Pathogenen antimikrobiell aktiv (Goetz *et al.*, 2002).

Neben der antimikrobiellen Aktivität sind antimikrobielle Peptide der Haut auch an der Zellproliferation, Zytokinfreisetzung, Chemotaxis, Wundheilung und Aktivierung von Immunzellen beteiligt. HNPs und hBDs sind chemotaktisch für unreife dendritische Zellen (Yang *et al.*, 2004). Das hBD2 kann zum Beispiel an den Chemokinrezeptor CCR6 binden, der bei unreifen und dendritischen Zellen und Gedächtnis T-Zellen vorhanden ist (Yang *et al.*, 1999). Über CCR6 scheinen Defensine somit die angeborene Immunität mit der adaptiven Immunität zu verbinden. Weiterhin unterstützen HNP1 bis 4 und das Cathelizidin LL-37 die Proliferation von Epithelzellen und Fibroblasten im Prozess der Wundheilung (Murphy *et al.*, 1993).

## 1.7 ANTIMIKROBIELLE PEPTIDE BEI HAUTERKRANKUNGEN

Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass die menschliche Haut mit vielfältigen antimikrobiellen Peptiden und Proteinen ausgerüstet ist, die bedeutende Faktoren beim Erhalt der Gesundheit der Haut sind. In diesem Zusammenhang werden einige Hautkrankheiten mit der verminderten oder erhöhten Expression antimikrobieller Peptide in Verbindung gebracht.

In humanen Keratinozyten wird die erhöhte Expression von hBD2, hBD3 und LL-37 durch Bakterien und deren mikrobielle Produkte induziert. Damit lässt sich erklären, dass bei Entzündungen der Haut, wie bei Psoriasis, erhöhte Mengen an hBD2, hBD3 und LL-37 gemessen werden (Frohm *et al.*, 1997). Die umgekehrte Situation findet man bei atopischer Dermatitis (AD). Bei dieser Erkrankung findet keine Hochregulation von LL-37 und  $\beta$ -Defensinen statt und die Patienten sind sehr anfällig für Infektionen der Haut, z.B. mit *S. aureus* (Ong *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu sind bei Psoriasis-Patienten Infektionen relativ selten, was durch die erhöhte Expression an AMP bedingt ist (Henseler und Christophers, 1995). Die geringe Menge an  $\beta$ -Defensinen bei AD ist das durch die erhöhte Synthese von Th2-Zytokinen und der verminderten Expression proinflammatorischer Zytokine zu erklären (Nomura *et al.*, 2003). Da LL-37/hCAP-18 aber durch proinflammatorische Zytokine nicht hochreguliert wird, kann diese Tatsache im Zusammenhang mit AD noch nicht erklärt werden.

In Brandwunden und Flüssigkeiten aus Brandblasen, ist die Expression von hBD2 drastisch reduziert (Milner und Ortega, 1999). Sehr häufig kommt es im Fall von Verbrennungen dann zu Infektionen mit Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa*, da durch den fehlenden Schutz der Haut das Wachstum dieser Mikroorganismen gefördert wird.

Die Expression antimikrobieller Peptide wurde auch im Zusammenhang mit Acne vulgaris untersucht. Hier kommt es zu einer Hochregulation von hBD1 und hBD2 in entzündeten Follikeln und Hautläsionen (Chronnell *et al.*, 2001). Im Gegensatz zum umgebenden Epithel, sind die Haarwurzel, die innere und die äußere Haarwurzelscheide kaum mikrobiellen Invasionen ausgesetzt, weshalb die Defensine hier nur gering ausgeprägt sind. Somit können sich Bakterien, wie zum Beispiel *Propionibacterium acnes* auch in der inneren Haarwurzelscheide vermehren und dort Entzündungen bis hin zur Akne verursachen (Chronnell *et al.*, 2001; Philpott, 2003).

## 2 ZIELSETZUNG

Staphylokokken sind weltweit verbreitet und gehören zur Normalflora von Haut, Hautdrüsen und Schleimhaut des Menschen. Dennoch sind *S. aureus* und einige andere *Staphylococcus*-Spezies potenziell humanpathogene Keime, die durch begünstigende Umstände lokale oder systemische Infektionen auslösen, welche nicht selten mit fulminanten Krankheitsverläufen einhergehen.

Methicillin-resistente *S. aureus*-Stämme sind weltweit in medizinischen Einrichtungen verbreitet. In diesem Zusammenhang sind Studien zur MRSA-Prävalenz besonders wichtig, um Veränderungen in der Epidemiologie dieser Stämme zu beobachten und die Risikofaktoren für die jeweiligen Einrichtungen beurteilen zu können. Erst in den letzten Jahrzehnten wurden auch andere Staphylokokken, außer *S. aureus*, als Erreger nosokomialer und allgemein erworbener Infektionen erkannt. Die exakte Identifizierung und Differenzierung von *Staphylococcus*-Spezies und Studien zur angeborenen Immunabwehr des Wirtes sind die Grundlage, um die Pathophysiologie Staphylokokken-assoziiierter Infektionen zu verstehen.

Der Fokus meiner Arbeit lag auf folgenden Schwerpunkten:

- I. Charakterisierung und Typisierung der im Universitätsklinikum Magdeburg zirkulierenden *S. aureus*-Stämme, unter Berücksichtigung der Methicillin-Resistenz.
- II. Entwicklung und Etablierung einer Methode, welche die Identifizierung von *Staphylococcus*-Spezies auf molekularer Ebene ermöglicht.
- III. Untersuchungen zur Induktion der angeborenen Immunantwort in epithelialen Zellen durch *Staphylococcus*-Spezies.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 CHEMIKALIEN

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden die Chemikalien in analysenreiner Qualität (p.a.) von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

### 3.2 BAKTERIENSTÄMME

Für die Studien zur Diversität von *S. aureus*-Isolaten innerhalb des Universitätsklinikums Magdeburg wurden 106 verschiedene, klinische *S. aureus*-Stämme eingesetzt. Detaillierte Angaben zu den Stämmen sind der Tabelle 8.1 im Anhang zu entnehmen.

Die Stämme, welche für die Sequenzierung des *gap*-Gens und die Entwicklung der *gap*-basierten T-RFLP verwendet wurden, sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Verwendete Referenzstämme verschiedener *Staphylococcus* spp.

<b>Stamm</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Referenz*</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	klinisches Isolat	Layer <i>et al.</i> , 2006
<i>Staphylococcus arlettae</i>	Referenzstamm	DSM 20672
<i>Staphylococcus auricularis</i>	Referenzstamm	ATCC 33753
<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	Referenzstamm	CCM 2734
<i>Staphylococcus caprae</i>	Referenzstamm	CCM 3573
<i>Staphylococcus carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i>	Referenzstamm	DSM 20501
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Referenzstamm	CCM 3387
<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	Referenzstamm	DSM 20260
<i>Staphylococcus delphini</i>	Referenzstamm	DSM 20771
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Referenzstamm	DSM 20044
<i>Staphylococcus equorum</i> subsp. <i>equorum</i>	Referenzstamm	DSM 20674
<i>Staphylococcus felis</i>	Referenzstamm	ATCC 49168
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	Referenzstamm	CCM 3572
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Referenzstamm	CCM 1798
<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	Referenzstamm	CCM 2732
<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	klinisches Isolat	Layer <i>et al.</i> , 2007
<i>Staphylococcus hyicus</i>	Referenzstamm	DSM 20459

<i>Staphylococcus intermedius</i>	Referenzstamm	DSM 20373
<i>Staphylococcus kloosii</i>	Referenzstamm	DSM 20676
<i>Staphylococcus lentus</i>	Referenzstamm	CCM 3472
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	Referenzstamm	DSM 4804
<i>Staphylococcus muscae</i>	Referenzstamm	CCM 4175
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	klinisches Isolat	Layer <i>et al.</i> , 2007
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	Referenzstamm	CCM 883
<i>Staphylococcus schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	Referenzstamm	ATCC 43808
<i>Staphylococcus sciuri</i>	Referenzstamm	CCM 3473
<i>Staphylococcus simulans</i>	Referenzstamm	CCM 2705
<i>Staphylococcus warneri</i>	Referenzstamm	DSM 20316
<i>Staphylococcus xylosus</i>	Referenzstamm	CCM 2725

\* DSM: Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; ATCC: *American Type Culture Collection*; CCM: *Czech Collection of Microorganisms*

Für die vergleichende Identifizierung von klinischen Isolaten mit *gap*-basierter T-RFLP und automatisierten Systemen wurden, neben den in Tabelle 3.1 aufgeführten Referenzstämmen, Isolate verschiedener koagulase-negativer Staphylokokken Spezies aus dem Universitätsklinikum Magdeburg verwendet (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Verwendete klinische *Staphylococcus* spp. Isolate.

<b>Spezies</b>	<b>Anzahl der Isolate (n)</b>
<i>Staphylococcus capitis</i>	6
<i>Staphylococcus cohnii</i> spp. <i>cohnii</i>	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	42
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	30
<i>Staphylococcus hominis</i>	4
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1
<i>Staphylococcus simulans</i>	1
<i>Staphylococcus warneri</i>	1

Die Infektionsexperimente wurden mit Stämmen, die von der Haut atopischer Dermatitis Patienten isoliert wurden (Tabelle 3.3), durchgeführt. Die Anzucht der Isolate erfolgte aus Abstrichen, die von der Klinik für Dermatologie und Venerologie (Prof. Dr. Bonnekoh) zur Verfügung gestellt wurden.



Tabelle 3.3: Verwendete klinische Isolate von Patienten mit atopischer Dermatitis.

<b>Stamm</b>	<b>Stamm-Nr.</b>	<b>Beschreibung</b>
<i>Staphylococcus hominis</i>	KCK1	klinisches Isolat; Patient 1; atopische Dermatitis
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCK3	klinisches Isolat; Patient 1; atopische Dermatitis
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KCK4	klinisches Isolat; Patient 1; atopische Dermatitis
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	KCK5	klinisches Isolat; Patient 1; atopische Dermatitis
<i>Staphylococcus capitis</i>	KCK6	klinisches Isolat; Patient 1; atopische Dermatitis
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KCK7	klinisches Isolat; Patient 2; atopische Dermatitis
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KCK8	klinisches Isolat; Patient 2; atopische Dermatitis
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	KCK10	klinisches Isolat; Patient 2; atopische Dermatitis
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KCK11	klinisches Isolat; Patient 2; atopische Dermatitis
<i>Staphylococcus capitis</i>	KCK12	klinisches Isolat; Patient 3; atopische Dermatitis
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KCK14	klinisches Isolat; Patient 4; atopische Dermatitis
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCK15	klinisches Isolat; Patient 4; atopische Dermatitis
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KCK16	klinisches Isolat; Patient 4; atopische Dermatitis
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCK17	klinisches Isolat; Patient 4; atopische Dermatitis
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCK18	klinisches Isolat; Patient 4; atopische Dermatitis

### 3.3 ZELLKULTUREN

Für die Infektionsexperimente wurde die HaCaT-Zelllinie verwendet. Diese Zelllinie ist eine humane, immortalisierte, nicht-tumorigene Zelllinie, die spontan aus normalen humanen Keratinozyten durch Kultur bei erhöhter Temperatur und geringer Kalziumkonzentration entstand (Boukamp *et al.*, 1988). Die Zellen wurden vom *Cell-Lines-Service* (Eppelheim, Deutschland) bezogen.

### 3.4 NÄHRMEDIEN UND PLATTEN FÜR BAKTERIENKULTUREN

<b>Columbia-Blut-Agar:</b>	Pepton (5,0 g/l), Fleischextrakt (1,0 g/l), Hefeextrakt (1,0 g/l), Natriumchlorid (5,0 g/l), Agar (15,0 g/l); autoklaviert
<b>Trypticase Soy Broth (TSB) – Medium:</b>	Sojamehl-Pepton (3,0 g/l), Casein-Pepton (17,0 g/l), Glukose (2,5 g/l), Natriumchlorid (5,0 g/l), Dikaliumhydrogenphosphat (2,5 g/l); autoklaviert

Die Kultivierung von Staphylokokken erfolgte auf Columbia-Blut-Agar bzw. im TSB-Flüssigmedium.

### 3.5 KULTIVIERUNG DER HAcAT-ZELLINIE

<b>Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM):</b>	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<b>Fötales Kälberserum (FCS):</b>	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<b>PBS:</b>	Bio Whittacker, Verviers, Belgien
<b>Antibiotik-Antimykotik-Lösung:</b>	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
<b>Trypsin-EDTA-Lösung:</b>	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Die Kultivierung der HaCaT-Zelllinie erfolgte in DMEM-Medium mit 10% fötalem Kälberserum und 1% Antibiotik-Antimykotik-Lösung in 75 cm<sup>2</sup> bzw. 175 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflaschen (Greiner-Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) bei 37°C wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub>-Begasung. Zur Inaktivierung von Komplementfaktoren wurde das fötale Kälberserum vor der Verwendung bei 56°C für 30 min inkubiert.

Eine Subkultivierung adhärent wachsender HaCaT-Zellen erfolgte bei 80-90% Konfluenz, da diese Zellen in Kultur bei Erreichen der Konfluenz im Wachstum inhibiert werden (Crabtree *et al.*, 1999). Zum Ablösen der HaCaT-Zellen von Kulturgefäßboden wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und im Anschluß mit 5 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung für 5 min im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von 5 ml DMEM-Medium wurde die enzymatische Proteolyse abgestoppt und die letzten, noch adhärennten Zellen durch Einsatz eines Zellschabers abgelöst. 1/5 der Zellen wurden in eine neue 75 cm<sup>2</sup> Flasche mit DMEM (+10% FCS, +1% Antibiotik-Antimykotik-Lösung) zur weiteren Kultivierung umgesetzt. Für Stimulationsversuche wurden die Zellen in sterile 6-Loch bzw. 12-Loch Kultur-Platten oder Petrischalen mit DMEM-Medium ohne Antibiotik-Antimykotik-Lösung überführt. Nach mehrmaligen Passagieren der Zellen können phänotypische Veränderungen auftreten, weshalb nach 30 Passagen neue Zellen aufgetaut und aufgezogen wurden.

#### 3.5.1.1 EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ADHÄRENT WACHSENDEN ZELLEN

**Einfriermedium:** 90% FCS, 10% DMSO

Das Aufbewahren von Zellen erfolgte durch Kryokonservierung in Flüssigstickstoff. Dazu wurden die Zellen einer Kultur geerntet (siehe Kapitel 3.5), mit FCS-haltigem DMEM-Medium gewaschen und für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpräzipitat in 1,8 ml hitzeinaktiviertem FCS, welches mit 10% DMSO versetzt wurde, aufgenommen. Die Zellsuspension (2x10<sup>6</sup> Zellen) wurde in vorgekühlte Kryoröhrchen (Greiner-Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) gegeben, sofort bei -70°C über Nacht eingefroren und am nächsten Tag zur dauerhaften Lagerung bei -196°C in flüssigen Stickstoff überführt. Die hohe Dielektrizitätskonstante

von DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen bei tiefen Temperaturen, bewirkt aber oberhalb und im Bereich des Gefrierpunktes die Solubilisierung der Zellmembran. Um in flüssigen Stickstoff gelagerte Zellen zu rekultivieren, wurde die tiefgefrorene Zellsuspension kurz im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, in DMEM-Medium (+10% FCS, +1% Antibiotik-Antimykotik-Lösung) gegeben und für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde wiederum in Medium aufgenommen und in Gewebekulturflaschen überführt. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt, um das noch vorhandene DMSO zu entfernen und die Zellen entsprechend weiter kultiviert.

### **3.6 KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN**

Die Anzucht der Bakterien erfolgte über Nacht auf Columbia-Blut-Agar bei 37°C (siehe Kapitel 3.4). Die bei -20°C eingefrorenen Bakterienstämme wurden ebenfalls auf Blutagarplatten bei 37°C über Nacht angezogen. Klinische Isolate wurden zweimal über Nacht auf Blutagarplatten subkultiviert.

Zur Herstellung von Flüssigkulturen wurde eine Impföse des jeweiligen Stammes vom Columbia-Blut-Agar in TSB-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C schüttelnd (160 rpm) inkubiert.

Zur Stammerhaltung wurden von den Bakterien Kryokulturen angelegt (Cryobank, Mast Diagnostica, UK), diese bei -20°C gelagert und jeweils ein Kügelchen aus dem Kryoröhrchen zur Rekultivierung auf Columbia-Blut-Agar verwendet.

### **3.7 PHÄNOTYPISCHE IDENTIFIZIERUNG**

Alle kommerziellen Identifizierungssysteme für die medizinische Mikrobiologie basieren auf wenigen verschiedenen Technologien oder kombinieren diese miteinander. Sie umfassen Fermentations-, Oxidation- und Kohlenhydrat-Abbau-Tests, Wachstumstest, pH-Wert-Veränderungen und Enzymnachweis-Tests, d.h. farbliche Veränderungen von farblosen Indikatorsubstanzen durch Vorhandensein von bestimmten Enzymen. Von einer großen Zahl bekannter, untersuchter Referenzstämme wurden Datenbanken angelegt, welche die typischen Reaktionen der betreffenden Spezies auf eine aussagekräftige Auswahl biochemischer Substrate enthält. Aus dem Zusammenspiel der Ergebnisse der biochemischen Identifizierungsreaktionen, die in Biotypnummern übersetzt werden, wird ein Reaktionsprofil erstellt und mit dem im Speicher befindlichen Bakteriendatensatz verglichen. Das Ergebnis wird in Form eines Speziesnamens sowie der Wahrscheinlichkeit für dieses Ergebnis angegeben.

Die Anzucht der Bakterien erfolgte auf Columbia-Blut-Agar, wie unter Kapitel 3.6 beschrieben. Anschließend wurden die Bakterien gemäß der Anleitungen der Hersteller parallel für die Geräte vorbereitet.

### 3.7.1 VITEK<sup>®</sup>2

Das Vitek<sup>®</sup>2, als die Weiterentwicklung des Vitek<sup>®</sup>1, der Firma *bioMérieux* ist ein automatisiertes Analysegerät für die Identifizierung und Resistenzbestimmung von Bakterien. Je nach Anwendung gibt es verschiedene Testkarten. Für die Identifizierung der Staphylokokken wurden Testkarten für gram-positive Kokken des Typs ID-GPC (alte Version) und des Typs ID-GP (neue Version) verwendet. Nach der Anzucht der Bakterien auf Columbia-Blut-Agar wurde eine Bakteriensuspension in 0,45% Kochsalzlösung mit einer Trübung entsprechend einem McFarland Standard von 0,5 hergestellt. Die Aufarbeitung der Proben und die Auswertung (Software Version 4.01) erfolgte streng nach den Richtlinien des Herstellers. Das Vitek<sup>®</sup>2-System ordnet die Ergebnisse, je nach Zuverlässigkeit, in verschiedene Kategorien ein: exzellente, sehr gute, gute und akzeptable Identifizierung (in diesen vier Kategorien wird jeweils nur ein Ergebnis erhalten), geringe Diskriminierung, ergebnislose Identifizierung und unidentifiziert. Im Fall der geringen Diskriminierung wird mehr als ein Identifizierungsergebnis erhalten. Die Software schlägt hier automatisch weitere Tests (z.B. Hämolyse, Oxidase, Pigmentierung) vor, um eine korrekte Identifizierung zu erhalten. Die alte ID-GPC-Karte enthält 46 fluorimetrische Tests, die anhand von pH-Wert-Änderungen und entstehenden Abbauprodukten, Aminopeptidasen (Substrate sind mit 7-Amino-Methylkumarin gekoppelt) und Aminooxidasen (Substrate sind mit 4-Methyl-Umbelliferon gekoppelt) detektieren. Weiterhin umfasst diese Karte 16 Fermentationstests (für D-Raffinose, Amygdalin, Arbutin, D-Galactose, Glycerol, D-Glucose, L-Arabinose, Lactose, D-Maltose, D-Mannitol, N-Acetylglucosamin, Salicin, D-Sorbitol, D-Trehalose, D-Melibiose, D-Xylose), zwei Dekarboxylasetests (für Ornithin und Arginin) und sechs andere Tests (für Urease, Pyruvat, Optichin, Novobiocin, Polymyxin B Sulfate, 6% NaCl). Die neue ID-GP-Identifizierungskarte ähnelt dem Format der alten ID-GPC-Karte, sie enthält allerdings anstatt der 47 nun 43 Tests. Diese umfassen kolorimetrische Tests für die folgenden Reaktionen: Phosphatidylinositol-Phospholipase C, Arginindihydrolase,  $\beta$ -Galactosidase,  $\alpha$ -Glucosidase, Alanin-Phenyl-Alanin-Prolin Arylamidase, Aspartamsäure Arylamidase,  $\alpha$ -Mannosidase, Alkalische Phosphatase, L-Leucin Arylamidase, Prolin Arylamidase,  $\beta$ -Glucuronidase, L-Pyroglutaminsäure Arylamidase, Alanin Arylamidase, Tyrosin Arylamidase und Urease. Weiterhin testet diese Karte die Säureproduktion beim Umsatz folgender Substrate: Amygdalin, Xylose,  $\alpha$ -Cyclodextrin, Sorbitol, Galaktose, Ribose, Laktat, Laktose, N-Acetylglucosamin, Maltose, Mannitol, Mannose, Methyl- $\beta$ -

D-Glucopyranosid, Pullulan, Raffinose, Salicin, Sucrose und Trehalose. Ebenfalls enthalten sind Tests für das Wachstum in 6,5% NaCl und Resistenzen gegen Polymyxin B, Bacitracin, Novobiocin, O129 und Optochin. Im Vergleich zur Datenbank der ID-GPC-Karte wurde die Datenbank der ID-GP-Karte des Vitek<sup>®</sup>2-Systems um folgende Stämme erweitert: *S. arlettae*, *S. caprae*, *S. carnosus*, *S. equorum*, *S. gallinarum*, *S. vitulinus*.

### 3.7.2 PHOENIX<sup>™</sup>

Das Phoenix<sup>™</sup> ist, wie das Vitek<sup>®</sup>2, ein automatisiertes Analysegerät zur Identifizierung und Resistenzbestimmung von Bakterien. Je nach Bedarf sind reine Identifizierungskarten oder kombinierte Testkarten für Identifizierung und Antibiotika-Empfindlichkeitsmessung zu erhalten. Für die Identifizierung und Resistenzbestimmung der Staphylokokken wurde die Testkarte des Typs PMIC/ID-13 für gram-positive Erreger verwendet. Diese kombinierte Testkarte besteht aus 45 Vertiefungen mit verschiedenen Substraten. Die Identifizierung basiert auf der Analyse von 20 enzymatischen Reaktionen, wofür 16 verschiedene Kohlenhydrate und sieben andere Kohlenstoffquellen verwendet werden, und der Empfindlichkeitsmessung gegen zwei Antibiotika (Colistin und Polymyxin B). Die Anwendung und Auswertung des Phoenix<sup>™</sup> Systems erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers. Nach der Anzucht der Bakterien auf Columbia-Blut-Agar wurde eine Bakteriensuspension in ID-Nährlösung (BD, Erembodegem, Belgien) mit einer Trübung entsprechend einem McFarland Standard von 0,5 hergestellt, die Suspension innerhalb von 30 min in die Testkarte eingefüllt und diese in das Gerät eingegeben. Nach 3 bis 4h wird das Ergebnis mit dem Phoenix<sup>™</sup> (Software Version 1.06; BD Phoenix 100) angezeigt, wenn der jeweilige Stamm mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 90% identifiziert wird und nur ein mögliches Ergebnis in Frage kommt. Bezogen auf das Phoenix<sup>™</sup>, das Vitek<sup>®</sup>2 und die untersuchten *Staphylococcus* Spezies, enthielt nur die Datenbank des Phoenix<sup>™</sup> *S. pasteurii* und *S. felis*. *Staphylococcus arlettae* war nur in der Datenbank des Vitek<sup>®</sup>2 eingeschlossen. *Staphylococcus delphini* und *S. muscae* waren in den Datenbanken beider Systeme nicht vorhanden.

### 3.7.3 ATB-SYSTEM

Das ATB-System (*bioMérieux*) wurde eingesetzt, wenn Differenzen bei der Identifizierung von Stämmen auftraten. Die Reaktionsstreifen umfassen biochemische Reaktionen, die aufgrund ihrer hohen Aussagekraft für die Keimdifferenzierung ausgewählt wurden. Die verwendeten ID 32 STAPH-Teststreifen wurden automatisch nach 18h – 24h mit Hilfe des ATB Expression-Gerätes und der ATB Plus Software (Version ATB Plus 2.9.8 Expert V 2.4.5; *bioMérieux*) ausgewertet. Die Verwendung und Auswertung der Teststreifen erfolgte streng nach Herstellervorgaben.

## 3.8 PRÄPARATION CHROMOSOMALER DNA

<b>QIAamp DNA Mini Kit:</b>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>Lysozym:</b>	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
<b>Lysostaphin:</b>	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Die Isolierung von genomischer DNA für alle molekularbiologischen Untersuchungen erfolgte mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen Bakterienstämme wurden auf Blutagarplatten bei  $37^{\circ}\text{C}$  über Nacht angezogen. Klinische Isolate wurden zweimal über Nacht auf Blutagarplatten subkultiviert. Eine Impföse Bakterienmaterial wurde in  $160\ \mu\text{l}$  Puffer ATL resuspendiert und mit  $20\ \mu\text{l}$  Lysozym-Lösung ( $100\ \text{mg/ml}$ ) und  $20\ \mu\text{l}$  Lysostaphin-Lösung ( $1\ \text{mg/ml}$ ) im Heizblock bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 30 min lysiert. Nach Zugabe von  $20\ \mu\text{l}$  Proteinase K, welche die bei der Lyse freigesetzten störenden Proteine (z.B. Desoxy- und Ribonukleasen) inaktiviert, und  $200\ \mu\text{l}$  Puffer AL wurde der Ansatz 30 min bei  $70^{\circ}\text{C}$  und weitere 15 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Dem Ansatz wurden  $200\ \mu\text{l}$  absolutes Ethanol zugesetzt, bevor er komplett auf eine Säule gegeben wurde und diese für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert wurde, um die DNA an die Silikamembran der Säule zu binden. Zum Waschen der Silikamembran wurden  $500\ \mu\text{l}$  AW1-Puffer zugegeben, 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert,  $500\ \mu\text{l}$  AW2-Puffer zugegeben und wiederum 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Durch einen 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm wurde die Silikamembran getrocknet. Um die DNA zu eluieren wurden anschließend  $100\ \mu\text{l}$  AE-Puffer auf die Säule gegeben, 1 min bei RT inkubiert und 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Die gereinigte DNA wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.9 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNA/RNA

Die Konzentration von DNA bzw. RNA wurde im *NanoDrop* 1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) über die Absorption bei 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine OD bei 260 nm 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger RNA. Nukleinsäuren absorbieren auf Grund der in ihnen enthaltenen Basen UV-Licht bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm, während Proteine hauptsächlich bei einer Wellenlänge von 280 nm angeregt werden. Demzufolge kann der Quotient aus  $\text{Absorption}^{260 \text{ nm}}/\text{Absorption}^{280 \text{ nm}}$  als ein Maß für die Reinheit angesehen werden. Liegt eine reine Lösung vor, so werden Werte zwischen 1,8 und 2,0 erwartet.

### 3.10 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde im Jahr 1988 erstmals beschrieben (Saiki *et al.*, 1988) und dient der Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Zwei zu den Einzelsträngen der DNA komplementäre, gegenläufige Oligonukleotid-Primer für das 3' und 5' Ende flankieren die Zielsequenz und dienen der DNA-Polymerase als Start. Durch abwechselnde Zyklen von Denaturierung der DNA, Anlagerung der Primer und Synthese des komplementären Stranges kommt es zur exponentiellen Vervielfältigung des gewünschten Fragmentes. Nach 30 Zyklen beträgt der Vermehrungsfaktor  $10^7$ . Anschließend kann das Amplifikat in einer Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

#### 3.10.1 PCR ZUR DETEKTION VIRULENZ-ASSOZIIERTER GENE VON STAPHYLOKOKKEN

<i>Taq</i> DNA Polymerase Kit:	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>Deoxynucleoside Triphosphate Set</i> :	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Zur Detektion virulenz-assoziiertter Gene der Staphylokokken wurde das *Taq* DNA Polymerase Kit von Qiagen verwendet. Ein Reaktionsansatz bestand aus 1 x PCR Buffer, 800 µM dNTPs, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 U *Taq* DNA Polymerase, 1,0 µM der jeweiligen Primer und HPLC-H<sub>2</sub>O bis zu einem Endvolumen von 50 µl. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3.4 und die dazugehörigen PCR-Programme sind in Tabelle 3.5 aufgeführt. Die PCR-Produkte wurden mit einer Gelelektrophorese in einem 1,5%igem Agarosegel analysiert.

Tabelle 3.4: Oligonukleotide zur Detektion virulenz-assoziiierter Gene der Staphylokokken.

<b>Gen</b>	<b>Amplifikatgröße (bp)</b>		<b>Oligonukleotide (5' → 3')</b>	<b>Referenz</b>
<i>sea</i>	127	for	CCTTTGGAAACGGTTAAAACG	Becker <i>et al.</i> , 1998
		rev	TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC	
<i>seb</i>	477	for	TCGCATCAAACGACAAAACG	Becker <i>et al.</i> , 1998
		rev	GCAGGTACTCTATAAGTGCCCTGC	
<i>sec</i>	271	for	CTCAAGAACTAGACATAAAAGCTAGG	Becker <i>et al.</i> , 1998
		rev	TCAAAAATCGGATTAACATTATCC	
<i>sed</i>	319	for	CTAGTTTGGTAATATCTCCTTTAAAACG	Becker <i>et al.</i> , 1998
		rev	TTAATGCTATATCTTATAGGGTAAACATC	
<i>seg</i>	116	for	AATCGYCAACCYGATCCTA	Becker <i>et al.</i> , 2003
		rev	CCTCCTTCAACAGGTGGAGAC	
<i>seh</i>	235	for	TTAGAAATCAAGGTGATAGTGGC	Becker <i>et al.</i> , 2003
		rev	TTTTGAATACCATCTACCCAAAC	
<i>see</i>	178	for	CAGTACCTATAGATAAAGTTAAAACAAGC	Becker <i>et al.</i> , 1998
		rev	TAACTTACCGTGGACCCTTC	
<i>sei</i>	330	for	GCCACTTTATCAGGACAATACTT	Becker <i>et al.</i> , 2003
		rev	AAAACCTTACAGGCAGTCCATCTC	
<i>sej</i>	640	for	CTCCCTGACGTTAACTACTAATAA	Becker <i>et al.</i> , 2003
		rev	TGTCTGGATATTGACCTATAACATT	
<i>tst</i>	445	for	AAGCCCTTTGTGTGCTTGCG	Becker <i>et al.</i> , 1998
		rev	ATCGAACTTTGGCCATACTTT	
<i>hlgA</i>	350	for	ATGATTAATAATAAATATTAACAGCAACT	Bronner <i>et al.</i> , 2000
		rev	ATCAACATTAGAGTCTTTCGTTTT	
<i>hlgB/C</i>	940	for	AGCTCTCGAACACATATTATA	Bronner <i>et al.</i> , 2000
		rev	CTGCAGCTTTAAGCACTAAAG	
<i>lukE/D</i>	516	for	TAGGCAAATCATCAGTTGCTTCAT	Bronner <i>et al.</i> , 2000
		rev	GTAGTTCTGTAACCTTTCTTGTTT	
<i>lukPV</i>	433	for	ATCATTAGGTAATAATGTCTGGACATGATCCA	Lina <i>et al.</i> , 1999
		rev	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAGC	
<i>mecA</i>	162	for	TCCAGATTACAACCTCACCAGG	Murakami <i>et al.</i> , 1991
		rev	CCACTTCATATCTTGTAACG	
<i>SA442</i>	107	for	AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG	Martineau <i>et al.</i> , 1998
		rev	CGTAATGAGATTTTCAGTAGATAATACAACA	
<i>agr</i>		agr	ATGCACATGGTGACATGC	Lina <i>et al.</i> , 2003
<i>agr-1</i>	439	agr1	GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT	
<i>agr-2</i>	572	agr2	TATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC	



<i>agr-3</i>	321	<i>agr3</i>	GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCAG
<i>agr-4</i>	657	<i>agr4</i>	CGATAATGCCGTAATACCCG

Tabelle 3.5: PCR-Programme zur Detektion virulenz-assoziiierter Gene der Staphylokokken.

Gen	Amplifikationszyklus
<i>sea, seb, sec*</i>	
<i>sed, seg, seh*</i>	
<i>see, sei*</i>	
<i>sej</i>	1 min 95°C; 30 Zyklen: 1 min, 95°C; 1 min, 55°C; 2 min, 72°C; 3 min 72°C
<i>tst</i>	
<i>hlgA</i>	
<i>hlgB/C</i>	
<i>lukE/D</i>	
<i>lukPV</i>	5 min 94°C; 25 Zyklen: 30 s, 94°C; 30 s, 55°C; 1 min, 72°C; 7 min 72°C
<i>mecA</i>	4 min 94°C; 30 Zyklen: 30 s, 94°C; 30 s, 53°C; 1 min, 72°C; 4 min 72°C
<i>SA442</i>	5 min 94°C; 30 Zyklen: 30 s, 94°C; 30 s, 55°C; 30 s, 72°C; 7 min 72°C
<i>agr*</i>	5 min 95°C; 30 Zyklen: 1 min, 94°C; 1 min, 55°C; 1 min, 72°C; 10 min 72°C

\* Für die Detektion dieser Gene wurde jeweils eine Multiplex-PCR durchgeführt

### 3.10.2 PCRS ZUR GENOTYPISIERUNG VON STAPHYLOKOKKEN

**TaKaRa Ex Taq DNA Polymerase Kit:** Takara Bio, Otsu, Japan

Zur Genotypisierung der Staphylokokken wurden verschiedene Methoden verwendet, die alle auf der Amplifikation und Sequenzierung von einem bzw. mehreren Genen basieren. Für die PCR fand das TaKaRa Ex Taq DNA Polymerase Kit von TaKaRa Verwendung. Ein Reaktionsansatz bestand aus 1 x Ex Taq Buffer, 800 µM dNTPs, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 U Ex Taq Polymerase, jeweils 1,0 µM Primer und HPLC-H<sub>2</sub>O bis zu einem Endvolumen von 50 µl. Tabelle 3.6 fasst die verwendeten Primer und Tabelle 3.7 die PCR-Programme der grundlegenden PCRs für die partielle Sequenzierung des *gap*-Gens (Yugueros *et al.*, 2000; Layer *et al.*, 2007), die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens (Becker *et al.*, 2004), der Multilocus Sequenzanalyse (Enright *et al.*, 2000) und der *spa*-Sequenzanalyse (Harmsen *et al.*, 2003) zusammen. Die erhaltenen Amplifikate wurden mit einer Gelelektrophorese in einem 1,5% igem Agarosegels analysiert und im Anschluss sequenziert (siehe Kapitel 3.13).

Tabelle 3.6: Oligonukleotide zur Genotypisierung von Staphylokokken.

Gen	Amplifikatgröße (bp)	Oligonukleotide (5' → 3')	
<b>Partielle Sequenzierung des <i>gap</i>-Gens</b>			
<i>gap</i>	933	Gap1 - for	ATGGTTTTGGTAGAATTGGTCGTTTA
		Gap2 - rev	GACATTTTCGTTATCATACCAAGCTG
<b>Sequenzierung des 16S rRNA-Gens</b>			
16S rRNA	1484	8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
		1492R	TACCTTGTTACGACTT
<b>Multilocus Sequenzanalyse (MLST)</b>			
<i>arcC</i>	456	<i>arcC</i> -UP	TTGATTCACCAGCGGTATTGTC
		<i>arcC</i> -DN	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG
<i>aroE</i>	456	<i>aroE</i> -UP	ATCGGAAATCCTATTTACATTC
		<i>aroE</i> -DN	GGTGTGTATTAATAACGATATC
<i>glpF</i>	465	<i>glpF</i> -UP	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC
		<i>glpF</i> -DN	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC
<i>gmk</i>	429	<i>gmk</i> -UP	ATCGTTTTATCGGGACCATC
		<i>gmk</i> -DN	TCATTAAC TACAACGTAATCGTA
<i>pta</i>	474	<i>pta</i> -UP	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG
		<i>pta</i> -DN	GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA
<i>tpi</i>	402	<i>tpi</i> -UP	TCGTTCAATTCTGAACGTCGTGAA
		<i>tpi</i> -DN	TTTGACCTTCTAACAATTGTAC
<i>yqil</i>	516	<i>yqil</i> -UP	CAGCATA CAGGACACCTATTGGC
		<i>yqil</i> -DN	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC
<b><i>spa</i> Sequenzanalyse</b>			
<i>spa</i>	401	<i>spa</i> -1113f	TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC
		<i>spa</i> -1514r	CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT

Tabelle 3.7: PCR-Programme zur Genotypisierung von Staphylokokken.

Gen	Amplifikationszyklus
<i>gap</i>	2 min 94°C; 40 Zyklen: 20 s, 94°C; 30 s, 55°C; 40 s, 72°C; 5 min 72°C
16S rRNA	5 min 94°C; 30 Zyklen: 25 s, 94°C; 30 s, 54°C; 45 s, 72°C; 7 min 72°C
<i>arcC</i> , <i>aroE</i> , <i>glpF</i> , <i>gmk</i> , <i>pta</i> , <i>tpi</i> , <i>yqil</i>	5 min 95°C; 30 Zyklen: 1 min, 95°C; 1 min, 55°C; 1 min, 72°C; 5 min 72°C
<i>spa</i>	5 min 94°C; 35 Zyklen: 45 s, 94°C; 45 s, 60°C; 90 s, 72°C; 10 min 72°C

### 3.11 AGAROSE GELELEKTROPHORESE

<b>1 x TBE-Puffer:</b>	89 mM Tris/HCl (pH 8,35), 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA
<b>Biozym LE Agarose:</b>	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
<b>Ethidiumbromid-Stammlösung 1%:</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus und 6 x Loading Dye Solution:</b>	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

Die Agarose Gelelektrophorese verwendet man zur Auftrennung von DNA-Fragmenten, aufgrund ihrer Ladung, Größe und Konformation, in einem mit Agarose als Matrix dienendem Gel in einem elektrischen Feld (Sambrook, 1989). Durch den im Gel enthaltenen Farbstoff Ethidiumbromid wird die DNA als fluoreszierende Bande unter UV-Licht sichtbar gemacht. Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgte unter nicht-denaturierenden Bedingungen in 1,5%igen (w/v) Agarosegelen mit 1 x TBE-Puffer und 10 µl Ethidiumbromid-Stammlösung je 200 ml Agaroselösung (Endkonzentration: 0,000005% Ethidiumbromid). Je 7 µl PCR-Produkt wurden mit 3 µl Gelladepuffer versetzt, aufgetragen und bei 130 V und 130 mA aufgetrennt. Als Größenvergleich fanden standardisierte Marker, z.B. der *Gene Ruler 100bp Ladder Plus*, Verwendung. Die aufgetrennte DNA wurde auf einem UV-Transilluminator betrachtet und mit dem *Gel Logic 100 Imaging System* (Kodak, Stuttgart, Deutschland) dokumentiert.

### 3.12 AUFREINIGUNG VON PCR-PRODUKTEN

<b>QIAquick PCR Purification Kit:</b>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>QIAquick Gel Extraction Kit:</b>	Qiagen, Hilden, Deutschland

Zur weiteren Analyse von PCR-Produkten ist es notwendig, diese von Puffersalzen, überschüssigen Primern, dNTPs und Polymerase zu reinigen. Dafür wurde das *QIAquick PCR Purification* oder das *QIAquick Gel Extraction Kit* entsprechend den Vorgaben des Herstellers verwendet. Das Prinzip der Aufreinigung beruht auf einer Zentrifugationssäulenteknik mit einer Silikagelmembran, die selektiv größere Mengen und Längen von Nukleinsäuren bindet, während Oligonukleotide kleiner als 50 bp, Salze und Enzyme abzentrifugiert werden. Das Elutionsvolumen entsprach dem Ausgangsvolumen.

### 3.13 SEQUENZIERUNG

Bei der Sequenzierung wird die Nukleotidabfolge eines Gens oder DNA-Fragments bestimmt. Die heute am weitesten verbreitete Form der Sequenzierung erfolgt nach einer Methode, die in den 70er Jahren von Sanger (Sanger *et al.*, 1977) entwickelt wurde. Von einem für die zu sequenzierende DNA spezifischem Primer ausgehend,

wird mit Taq-Polymerasen ein neuer DNA-Strang synthetisiert. Während dieser Synthese lagert sich zufällig ein Didesoxynukleotid (ddNTP) an und die DNA-Synthese bricht an dieser Stelle ab. Durch die Wiederholung dieser Reaktion während der PCR werden Fragmente unterschiedlicher Länge generiert. Ursprünglich wurden die Fragmente bei der Synthese radioaktiv markiert und die Nukleotidabfolge nach dem Auftragen auf ein Polyacrylamidgel mittels Autoradiographie bestimmt. Heute erfolgt die Sequenzierung mit automatisierten Sequenzierern, bei denen anstatt radioaktiver Marker Fluoreszenzmarker mit vier verschiedenen Farbstoffen für die vier Nukleinsäuren verwendet werden. Die Sequenz wird automatisch vom Computer analysiert und als Chromatogramm und Nukleinsäureabfolge ausgegeben (Middendorf *et al.*, 2001; Madigan *et al.*, 2003).

Zunächst wurde der zu sequenzierende DNA-Abschnitt mittels PCR amplifiziert und die erhaltenen Amplifikate aufgereinigt. Daran schloss sich eine zweite PCR, welche nach dem Prinzip des *Cycle Sequencing* ablief, an. Die erhaltenen Fragmente wurden wiederum aufgereinigt und mittels einer Kapillar-Elektrophorese analysiert.

### 3.13.1 DNA CYCLE SEQUENCING VON PCR-PRODUKTEN

***BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit:*** Applied Biosystems, Foster City, USA

***DyeEx 2.0 Spin Kit:*** Qiagen, Hilden, Deutschland

Das sogenannte *Cycle Sequencing* basiert auf einer modifizierten Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Engelke *et al.*, 1988). Da die vier Didesoxynukleotide mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind, kann die Reaktion in einem Ansatz stattfinden (Smith *et al.*, 1986). Der zu sequenzierende DNA-Abschnitt wurde amplifiziert und aufgereinigt. Für das anschließende *Cycle Sequencing* wurde das *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) verwendet. *BigDyes* bestehen aus dem Energiedonor Fluoreszin und dem daran gebundenen Akzeptor Dichlorrhodamin (Lee *et al.*, 1997). In jedem Reaktionsansatz befanden sich die 140 ng aufgereinigtes Amplifikat, 1 µl des jeweiligen Sequenzierprimers (3,25 nM), 9 µl des *Big Dye Terminator Mixes* und H<sub>2</sub>O ad 20 µl. Es folgten 30 Zyklen thermischer Denaturierung bei 96°C (30 s), Anlagerung des Primers und die DNA-Matrize bei 54-60°C (10 s) und Extension bei 60°C (4 min). Während der Extension wurden sowohl unmarkierte dNTPs als auch markierte ddNTPs eingebaut, wobei letztere zum Kettenabbruch führten. Nach dem *Cycle Sequencing* wurden die Produkte von überschüssigen Reaktionskomponenten mit Hilfe des *DyeEx 2.0 Spin Kit* (Applied Biosystems) nach den Angaben des Herstellers gereinigt.

### 3.13.2 KAPILLAR-ELEKTROPHORESE FÜR DIE DNA-SEQUENZIERUNG

#### HiDi Formamide:

Applied Biosystems, Foster City, USA

Bei der Kapillarelektrophorese mit dem *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) werden die markierten Produkte in eine mit POP-6-Polymer (PE Biosystems) gefüllte Kapillare injiziert. Die DNA wird in der Kapillare elektrophoretisch nach der Größe aufgetrennt und passiert eine Passage, wo die Fluoreszenzfarbstoffe, durch einen Laser angeregt, Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren. Das spektrographisch separierte Licht wird mit einer CCD-Kamera aufgenommen und als Signal von der *Collection Software* gespeichert. Diese Daten werden von der *ABI Prism Sequencing Analysis 3.0* (PE Biosystems) Analysesoftware zu vierfarbigen Elektropherogrammen verrechnet. Für die DNA-Sequenzierung wurden 5 µl aufgereinigtes *Cycle Sequencing* PCR-Produkt und 15 µl HiDi gemischt und im Gerät analysiert.

### 3.13.3 ANWENDUNGEN DER SEQUENZIERUNG

Die verschiedenen Anwendungen, für die Gene partiell oder ganz sequenziert wurden, werden im Folgenden beschrieben:

#### 3.13.3.1 PARTIELLE SEQUENZIERUNG DES GAP-GENS

Das *gap*-Gen der Staphylokokken kodiert für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, welche die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-phosphat in 1,3-Diphosphoglycerat katalysiert. Das *gap*-Gen gehört zu den universellen Funktionsgenen, die innerhalb einer Bakterienspezies sehr homolog sind und deshalb zur Identifizierung und Differenzierung herangezogen werden können. Als Grundlage für die Entwicklung der *gap*-basierten T-RFLP wurden diverse *Staphylococcus*-Spezies sequenziert. Die Sequenzierprimer Gap3 bis Gap8 (Tabelle 3.8) wurden nach einem *Alignment* aller *gap*-Gensequenzen von Staphylokokken, die in NCBI-Genbank enthalten waren, konstruiert. Die Sequenzierung erfolgte, wie unter 3.13.1 und 3.13.2 beschrieben (Layer *et al.*, 2007).

Tabelle 3.8: Primer für die Sequenzierung des *gap*-Gens.

Sequenzierprimer	Sequenz (5' → 3')	Annealing Temp. [°C]
Gap1 - for	ATGGTTTTGGTAGAATTGGTCGTTTA	55
Gap2 - rev	GACATTCGTTATCATACCAAGCTG	55
Gap3 - rev	GHTTTNAYTTCTTDWCCRTTHACDC	55
Gap4 - for	GAYGTNGTNYTWGAATGTACWGG	55
Gap5 - rev	GTTWGTWGTACADGAHGACCCWG	55

Gap6 - for	GAAGGHYTHATGACDACWATYCAYG	55
Gap7 - rev	GAACCGWTWGCWACWGGHACACGTTG	55
Gap8 - for	GAAHCATTYGGTTACAMHGAWGAYG	55

### 3.13.3.2 SEQUENZIERUNG DES 16S rRNA-GENS

Das 16S rRNA-Gen, ebenfalls ein universelles Funktionsgen, kodiert für die bakterielle ribosomale DNA, die zusammen mit der 23S rRNA, der 5S rRNA und den ribosomalen Proteinen den Translationskomplex für die Proteinbiosynthese bildet. Die Sequenzierung des 16S rRNA-Genes wurde zur Identifizierung der klinischen Isolate und Referenzstämme, die durch andere Identifikationssysteme nicht analysiert werden konnten oder wo divergente Ergebnisse vorlagen, durchgeführt. Mit Hilfe des Programmes BLAST (*Basic Local Alignment Tool*) des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) können die erhaltenen 16S rRNA-Gensequenzen gegen eine weltweite Datenbank abgeglichen werden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Dazu wurden die in Tabelle 3.9 aufgeführten Primer (Becker *et al.*, 2004) verwendet und die Sequenzierung, wie unter 3.13.1 und 3.13.2 beschrieben, durchgeführt.

Tabelle 3.9: Primer für die Sequenzierung des 16S rRNA-Genes.

Sequenzierprimer	Sequenz (5' → 3')	Annealing Temp. [°C]
8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	54
338F	ACTCCTACGGGAGGCAGC	54
515F	GCCAGCAGCCGGGTAA	54
776F	GCAAACAGGATTAGATA	54
810R	GGCGTGGACTTCCAGGGTATCT	54
1104R	CAAGTCAGGGATTGGGTGAG	54
1492R	TACCTTGTTACGACTT	54

### 3.13.3.3 MULTILOCUS SEQUENZANALYSE (MLST)

Bei der Multilocus Sequenzanalyse (*multilocus sequence typing* = MLST) werden mit Hilfe verschiedener Gensequenzen für jede Probe Allelprofile erstellt. Unterschiedliche Sequenzen werden als Allele dieses Gens bezeichnet und erhalten unterschiedliche Allelnummern. Die Allelnummern der verschiedenen Genloci einer einzelnen Probe ergeben deren Allelprofil, dem jeweils ein Sequenztyp (ST) zugeordnet wird (siehe Abbildung 3.1). Unterschiedliche Sequenztypen erhalten dabei verschiedene Nummern. Nah verwandte Isolate haben nahezu identische Allelprofile, die sich nur an wenigen Genloci unterscheiden. Nicht verwandte Isolate haben dagegen nicht verwandte

Allelprofile (Enright und Spratt, 1999; Urwin und Maiden, 2003). Die Allelprofile können anschließend genutzt werden, um phylogenetische Stammbäume zu erstellen oder populationsgenetische Analysen durchzuführen. Die Auflösung dieser Methode ist abhängig von der Anzahl und der Art der Gene, der Länge der Sequenzen und dem Grad der Diversität in der untersuchten Art (Cooper und Feil, 2004). MLST für *S. aureus* wurde von Mark Enright entwickelt, um die Klonalität von MSSA- und MRSA-Isolaten zu untersuchen (Enright, 2000). Es werden Allelprofile für die Genloci der sieben Haushaltsgene Carbamatkinase (*arcC*), Shikimatdehydrogenase (*aro*), Glycerinkinase (*glp*), Guanylatkinase (*gmk*), Phosphatäcetyltransferase (*pta*), Triosephosphatisomerase (*tpi*) und Acetyl-CoA-Acetyltransferase (*yqi*) erstellt. Jedes *S. aureus*-Isolat erhält, mit Hilfe eines internetbasierten Servers, eine Sequenztypnummer ausgehend von den Allelnummern der sieben Gene (<http://www.mlst.net>).

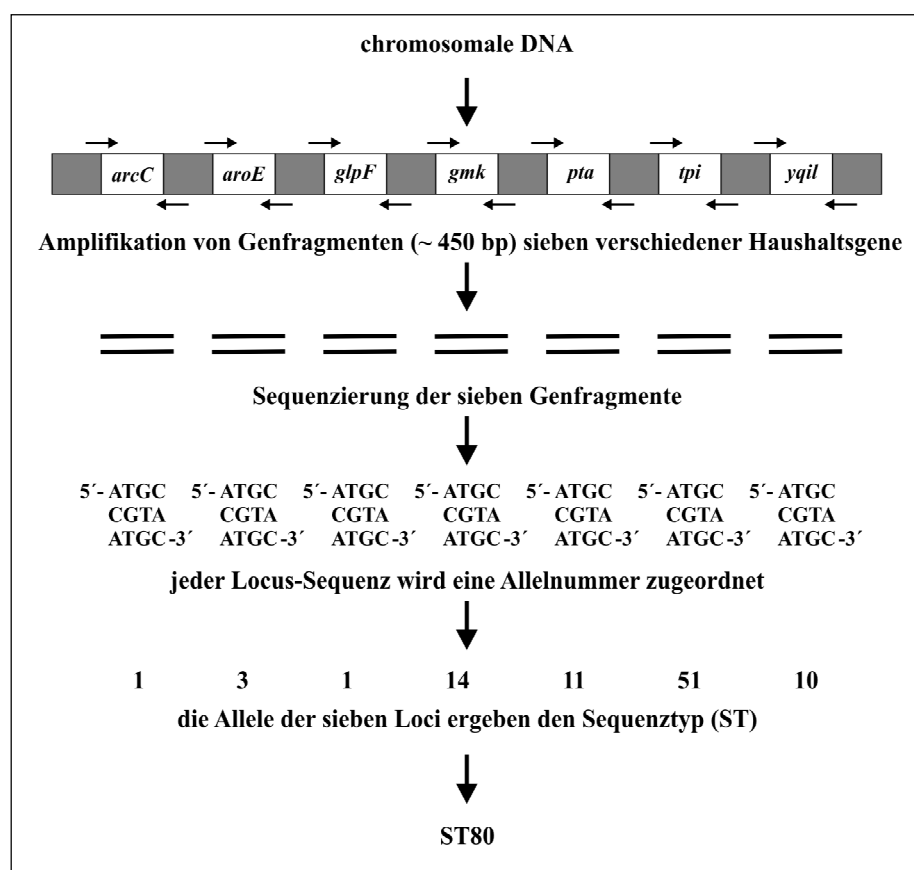


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Multilocus Sequenzanalyse (MLST).

Die Sequenzierung erfolgte mit den in Tabelle 3.6 aufgeführten Primern bei einer *Annealingtemperatur* von 55°C, wie unter 3.13.1 und 3.13.2 beschrieben.

### 3.13.3.4 SPA-TYPISIERUNG

Die *spa*-Typisierung umfasst eine Sequenzanalyse der hochvariablen x-Region innerhalb des *S. aureus* Protein A-Gens (*spa*). Dieser Bereich ist durch kurze, 21-27 bp lange, wiederkehrende Sequenzabschnitte (*Repeats*) gekennzeichnet (siehe Abbildung 3.2) (Schwarzkopf, 1993; Tang, 2000). Für eine automatisierte Auswertung dieser Sequenzdaten wird eine Software verwendet, die es ermöglicht, automatisch Sequenzen einzulesen, *Repeat*-Muster zu erkennen und den *spa*-Typ zuzuweisen. Mit Hilfe einer Datenbank können Ergebnisse zu den einzelnen *spa*-Typen abgerufen und verwaltet werden (Harmsen, 2003). Ein internetbasierter Server ermöglicht zusätzlich den Abgleich der Typisierungsergebnisse und die Vergabe einer einheitlichen Nomenklatur für neu aufgetretene *spa*-Typen (<http://www.spaServer.rindom.de>).

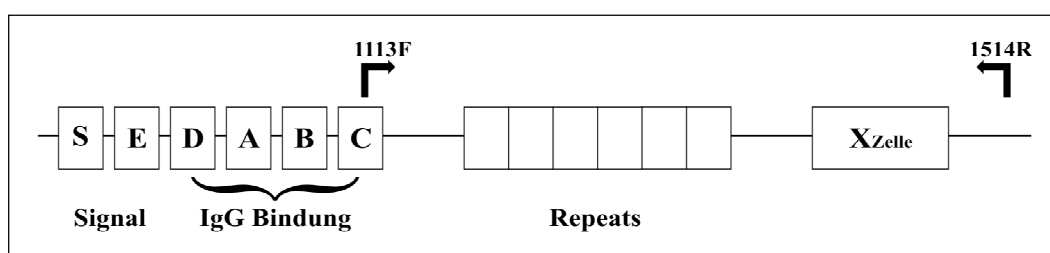


Abbildung 3.2: Genetische Organisation des *S. aureus* Protein A-Gens (*spa*) (modifiziert nach Shopsin *et al.*, 1999).

Die Sequenzierung erfolgte mit den in Tabelle 3.6 aufgeführten Primern bei einer *Annealingtemperatur* von 60°C, wie unter 3.13.1 und 3.13.2 beschrieben.

### 3.13.4 SEQUENZANALYSE UND SEQUENZVERGLEICHE

Die erhaltenen Gensequenzen wurden unter Verwendung der *ABI Prism Sequencing Analysis 3.0* Analysesoftware (Applied Biosystems) und der *Assembler* Software (Applied Biosystems) analysiert, mit der jeweiligen Datenbank abgeglichen und ausgewertet.

Um Gensequenzen untereinander zu vergleichen und den Verwandtschaftsgrad zu ermitteln, wurden Sequenzvergleiche (*Alignments*) erstellt. Bei einem *Alignment* handelt es sich um das Anordnen und Ausrichten von mehreren Gensequenzen. Dabei werden die zu analysierenden Sequenzen so gegeneinander verschoben, dass die größte mögliche Übereinstimmung und die wenigsten Lücken in der Basenfolge entstehen. Für das Erstellen phylogenetischer Stammbäume wurden außerdem die untereinander ausgerichteten Sequenzen auf dieselbe Länge gekürzt.



Die *Alignments* in der vorliegenden Arbeit wurden mit *BioEdit* Version 7.0.1 (Hall, 1999) oder DNASIS<sup>®</sup>MAX Version 2.0.5 (Hitachi Software Engineering, Japan) durchgeführt.

### 3.13.5 PHYLOGENETISCHE STAMMBÄUME

Ähnlichkeiten in Gensequenzen verschiedener Organismen deuten immer auf eine gewisse phylogenetische Beziehung hin und können somit evolutionäre Beziehungen aufzeigen. Diese Verwandtschaftsbeziehungen werden durch die Lage der Organismen im Dendrogramm zueinander, sowie die Astlänge der phylogenetischen Bäume ausgedrückt. Zur Berechnung dieser phylogenetischen Stammbäume können verschiedene Algorithmen angewendet werden. Am häufigsten eingesetzt werden dabei der UPGMA (*unweighted pair group method using arithmetic averages*)-Algorithmus und der *Neighbour joining*-Algorithmus, die beide zu den Distanzmethoden zählen. Bei den Distanzmethoden wird durch den schrittweisen Vergleich der Sequenzdaten zunächst eine Distanzmatrix berechnet, mit deren Hilfe anschließend das Dendrogramm erstellt wird.

Aus den erhaltenen Sequenzdaten der MLST und der partiellen Sequenzierung des *gap*-Gens wurden evolutionäre Stammbäume erstellt. Dabei wurde zunächst aus allen paarweisen *Alignments* der Sequenzdaten eine Distanzmatrix berechnet. Diese Primärdaten konnten im Anschluss durch die verschiedenen Stammbaumentwickelnden Algorithmen ausgewertet werden.

#### 3.13.5.1 DENDROGRAMM FÜR MLST

Für die phylogenetische Analyse der *S. aureus*-Stämme wurde ein Dendrogramm aus den Allelprofilen der sieben sequenzierten Haushaltsgene erstellt. Phylogenien, die auf kombinierten Datensätzen mehrerer Loci beruhen, sind meist verlässlicher als Phylogenien, die auf einem einzigen Locus beruhen. Die Sequenzunterschiede in den Allelprofilen der verschiedenen *S. aureus*-Isolate wurden mit Hilfe der nicht gewichteten Paargruppenmethode mit arithmetischen Mittelwerten (UPGMA; *unweighted pair group method using arithmetic averages*) analysiert. Der UPGMA-Algorithmus (Sokal und Mitchener, 1985) ist die einfachste Methode, um aus genetischen Distanzen phylogenetische Beziehungen abzuschätzen. Im Gegensatz zur *Neighbour joining*-Methode setzt UPGMA eine konstante Evolutionsrate voraus. Gegeben ist eine Anzahl von Sequenzen und eine Distanzmatrix, welche die paarweisen Distanzen dieser Sequenzen enthält. Zum Anfang ist jede Sequenz in ihrem eigenen *Cluster* (Einheit). In jedem folgenden Schritt werden die beiden *Cluster* mit der geringsten Distanz zusammengefasst, die Distanzmatrix neu berechnet und somit ähnliche Sequenzen zu neuen *Clustern* zusammengefasst. Die Distanz zwischen zwei

*Clustern* ist der Mittelwert der paarweisen Distanzen aller Sequenzen in beiden *Clustern* und die Länge der Äste, die zwei *Cluster* trennen, sind proportional zum berechneten phylogenetischen Abstand zwischen ihnen.

### 3.13.5.2 DENDROGRAMME FÜR *GAP*-, *16S rRNA*-, *HSP60*-, *RPOB*-, *SODA*- UND *TUF*-GENSEQUENZEN

Für die Erstellung der phylogenetischen Bäume wurden alle Sequenzen, außer die der *gap*-Gene, der NCBI-Genbank entnommen (Tabelle 3.10). Die Sequenzen wurden manuell im *Sequencher*<sup>TM</sup> 3.0 (Gene Codes Corporation, USA) ausgerichtet und wenn nötig bearbeitet, um die Abschnitte innerhalb dieser Sequenzen zu bestimmen, die für die phylogenetische Analyse nicht in Frage kamen. Die *Alignments* wurden mit Hilfe des Programms DNASIS<sup>®</sup>MAX Version 2.0.5 (Hitachi Software Engineering, Japan) angefertigt. Die Erstellung der phylogenetischen Bäume erfolgte mit dem *Neighbour joining*-Algorithmus unter Verwendung von DNASIS<sup>®</sup>MAX und einer *Bootstrap*-Analyse von 1000 Wiederholungen. Die *Neighbour joining*-Methode (Saitou und Nei, 1987) basiert auf dem Minimum-Evolution-Prinzip für phylogenetische Bäume, d.h. es wird berücksichtigt, dass die Evolutionsgeschwindigkeit nicht konstant ist. Ausgehend von einer sternförmigen Topologie (Sternbaum), in dem alle Datensätze in einem Zentrum miteinander verbunden sind, werden paarweise die Sequenzen mit der geringsten genetischen Distanz ausgewählt und zu einer neuen Einheit zusammengefasst. Die genetischen Distanzen der Sequenzen werden neu berechnet und wiederum die nächstverwandten Sequenzen zu einem Ast zusammengefügt, so lange bis der ursprüngliche Baum aufgelöst ist. Bei jedem Konstruktionsschritt wird das *Minimum-Evolution*-Prinzip angewendet, d.h. das Paar an Sequenzen wird jeweils zusammengefasst für das die Gesamtlänge des entstehenden Baumes minimal wird. Zur statistischen Absicherung wurde eine *Bootstrap*-Analyse von 1000 Wiederholungen durchgeführt (Felsenstein, 1985). Dabei werden aus dem realen *Alignment* zufällig Daten ausgewählt und zu einem *Alignment* gleicher Länge wie das Original zusammengesetzt. Jedes so erhaltene *Alignment* wird zur Konstruktion eines Dendrogramms verwendet. Wiederholt man den Prozess, so kann man den prozentualen Anteil an Dendrogrammen, in denen eine bestimmte Gruppe von Sequenzen als monophyletisch erscheint, als ein Maß dafür verwenden, wie homogen diese Gruppe wirklich ist und wie stark sie durch das Original-*Alignment* unterstützt wird.

Zur Darstellung der phylogenetischen Analysen wurde das Programm *TreeView drawtree* Version 1.6.6. (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) verwendet.

Tabelle 3.10: Verwendete Sequenzen der NCBI-Genbank zur Erstellung von Dendrogrammen.

Stamm	NCBI-Genbank Sequenz für:				
	16S rRNA	<i>hsp60</i>	<i>rpoB</i>	<i>sodA</i>	<i>tuf</i>
<i>S. arlettae</i>	AY688029	AF053580	AF325874	AJ343894	
<i>S. aureus</i>	AY688034	AF060191	AF325894	AY485191	AF274739
<i>S. auricularis</i>	AY688030	AF242278	AF325889	AJ343937	AF298797
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	AY688039	AF036322	AF325885	AJ343940	AF298798
<i>S. caprae</i>	AY688036	AF053574	AF325896	AJ343898	
<i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i>	AY688041	AF242279	AF325880	AJ343899	
<i>S. chromogenes</i>	AY688044	AF242280	AF325892	AJ343945	
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	AY688046	AF053582	AF325893	AJ343902	
<i>S. delphini</i>	AY688050	AF019774		AJ343905	
<i>S. epidermidis</i>	AY688053	AF029245	AF325872	AJ343906	AF298800
<i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i>	AY688054	AF242281	AF325882	AY878697	
<i>S. felis</i>	AY688057	AF242282	AF325878	AJ343908	
<i>S. gallinarum</i>	AY688059	AF053579	AF325890	AJ343909	
<i>S. haemolyticus</i>	AY688062	U92809	AF325888	AJ343910	AF298801
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	AY688064	AF053572	AF325875	AJ343911	
<i>S. hyicus</i>	AY688066	AF019778	AF325876	AJ343913	
<i>S. intermedius</i>	AY688070	AY123723	AF325869	AJ343914	
<i>S. kloosii</i>	AY688072	AF053575	AF325891	AJ343915	
<i>S. lentus</i>	AY688073	AF053586	AY036973	AY485195	
<i>S. lugdunensis</i>	AY688076	AF053570	AF325870	AJ343917	AF298803
<i>S. muscae</i>	AY688079	AF242285	AF325884	AJ343919	
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	AY688089	AF053578	AF325873	AJ343954	AF298804
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	AY688093	AF053585	AF325886	AJ343955	
<i>S. sciuri</i>	AB212276	AY820255	AY820256	AY820257	AY763434
<i>S. simulans</i>	AY688101	AF053584	AF325877	AJ343956	AF298805
<i>S. warneri</i>	AY688106	AF053569	AF325887	AJ343958	AF298806
<i>S. xylosus</i>	AY688107	AF053573	AF325883	AJ343859	AY763438

### 3.14 T-RFLP

Die Analysemethode der terminalen Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismen (T-RFLP) ist eine weiterentwickelte Form des RFLP (Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus). Ähnlich diesem wird die DNA eines Gens aus der extrahierten chromosomalen DNA mittels PCR amplifiziert (Abbildung 3.3). Bei der T-RFLP werden jedoch fluoreszenzmarkierte Primer eingesetzt, so dass alle Amplifikate eine terminale Markierung erhalten. Werden diese markierten Amplifikate anschließend mit spezifischen Restriktionsenzymen geschnitten, erhält man Fragmentstücke unterschiedlicher Länge, von denen nun nur die terminalen Fragmente eine Fluoreszenzmarkierung aufweisen. Mit Hilfe eines automatisierten Sequenzierers kann die Größe der markierten Fragmentstücke bestimmt und mit bekannten Mustern verglichen werden.

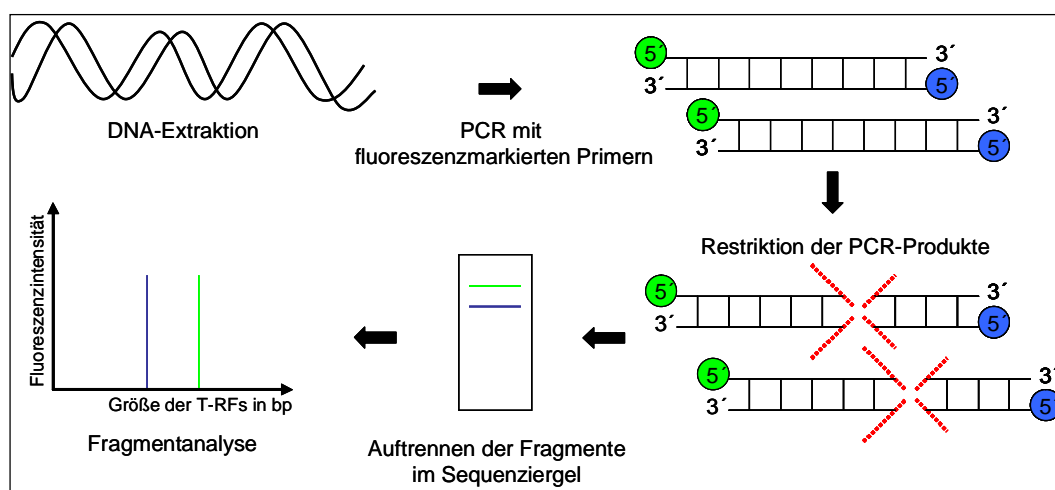


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Analyse der terminalen Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die T-RFLP, basierend auf dem *gap*-Gen, zur Differenzierung und Identifizierung von *Staphylococcus*-Spezies, herangezogen.

#### 3.14.1 PCR FÜR T-RFLP

<b>TaKaRa Ex Taq DNA Polymerase Kit:</b>	Takara Bio, Otsu, Japan
<b>QIAquick Gel Extraction Kit:</b>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide:</b>	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland

Extrahierte genomische DNA wurde verwendet, um in einer PCR ein 933 bp Fragment des *gap* Gens zu amplifizieren (Yugueros *et al.*, 2000). Der Primer Gap-1-for wurde am 5'-Ende mit 6-Hexachlorfluorescein und der Primer Gap-2-rev wurde am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein markiert. Jeder Reaktionsansatz enthielt beide Primer in einer

Konzentration von 1  $\mu\text{M}$ , 1x *Ex Taq*<sup>TM</sup> Puffer, 800  $\mu\text{M}$  Deoxynukleosidtriphosphate, 8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1,25 U *TaKaRa Ex Taq*<sup>TM</sup> Polymerase, 5  $\mu\text{l}$  Proben-DNA (10-100 ng/ $\mu\text{l}$ ) und HPLC-Wasser bis zu einem Endvolumen von 50  $\mu\text{l}$ . Die Amplifikation der DNA wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: ein initialer Denaturierungsschritt bei 94°C für 2 min gefolgt von 40 Zyklen (20 s Denaturierung bei 94°C, 30 s Primeranlagerung bei 55°C und 40 s Verlängerung der Primer bei 72°C) und einem abschließenden Verlängerungsschritt bei 72°C für 5 min. Die PCR-Produkte wurden mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) aus dem Agarosegel aufgereinigt (siehe 3.12) und anschließend einem enzymatischen Verdau unterzogen.

### 3.14.2 RESTRIKTION

*BspHI*, *DdeI*, *TaqI*:

New England Biolabs, Ipswich, USA

Der enzymatische Verdau erfolgte in Anlehnung an Moyer *et al.* (Moyer *et al.*, 1996). Dabei wurde jedes PCR-Produkt mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen *TaqI*, *BspHI* und *DdeI* in getrennten Ansätzen verdaut. Jeder Restriktionsansatz bestand aus 10  $\mu\text{l}$  doppelt fluoreszenzmarkiertem PCR-Produkt, 10 U Restriktionsenzym, dem entsprechenden Puffer 1 x und HPLC-Wasser bis zu einem Endvolumen von 20  $\mu\text{l}$ . Die Ansätze mit *BspHI* und *DdeI* wurden bei 37°C und die Ansätze mit *TaqI* wurden bei 65°C für 12h inkubiert.

### 3.14.3 INTERNER GRÖßENSTANDARD

Um zusätzliche Fragmente für den internen Größenstandard zu generieren wurde *Escherichia coli* C2 verwendet. Die Amplifikation der 730 bp und 981 bp Fragmente aus der genomischen DNA von *E. coli* C2, das Klonieren dieser Fragmente, die Sequenzierung ausgesuchter Plasmide und das Generieren von fluoreszenzmarkierten Fragmenten aus diesen Plasmiden wurden mit einigen Modifizierungen in Anlehnung an Trotha *et al.* durchgeführt (Trotha *et al.*, 2002). Für die Amplifikation des 730 bp Fragmentes wurde das Primerpaar 776F/ 1492R verwendet. Das Primerpaar 515F/ 1492R wurde in der PCR für das 981 bp Fragment eingesetzt. Für die finale Amplifikation der Fragmente aus den erhaltenen Plasmiden wurde der Primer 1492R am 5'-Ende mit 6-Carboxyl-X-Rhodamin (ROX) markiert. Die zusätzlichen ROX-markierten Fragmente für den Größenstandard wurden mit HPLC-Wasser auf 12 ng/ $\mu\text{l}$  verdünnt und bei 4°C gelagert.

### 3.14.4 KAPILLAR-ELEKTROPHORESE FÜR DIE T-RFLP

**HiDi Formamide:**

Applied Biosystems, Foster City, USA

Für die Fragmentanalyse wurde 1 µl des Restriktionsproduktes mit 19,5 µl deionisiertem Formamid (HiDi, Applied Biosystems) und 1,5 µl des Größenstandards gemischt. Der interne Größenstandard bestand aus Fragmenten bis 500 bp (GS-500 ROX, Applied Biosystems), die kommerziell erhältlich waren, und den zusätzlich generierten ROX-30 bp und ROX-981 bp Fragmenten. Die Größe der T-RFs wurde durch Kapillarelektrophorese in einem ABI PRISM 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) ermittelt. Die Elektrophorese wurde mit POP-6-Polymer in einer 30 cm-Kapillare im Sequenziermodus unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 20 s Injektionszeit, 244 V/cm Laufspannung, 50°C Lauftemperatur, 180 s Vorlaufzeit und 6500 s Analysezeit. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Dateien vom Sequenzierformat (.ab1) in das *Genescanformat* (.fsa) umgeschrieben. Die Längen der FAM und HEX markierten Fragmente wurden mit Hilfe der *GeneScan (PE Biosystems) Analysis Software 3.7* durch den Vergleich mit den bekannten Größen der ROX markierten Fragmente des Standards erhalten.

## 3.15 ANWENDUNG DER T-RFLP ZUR IDENTIFIZIERUNG VON STAPHYLOKOKKEN AUS KLINISCHEN ISOLATEN

Die Reproduzierbarkeit der *gap*-basierten T-RFLP wurde an 130 klinischen Isolaten und Referenzstämmen getestet. Alle Stämme wurden parallel mit dem Phoenix™-System, dem Vitek®2-System und der *gap*-basierten T-RFLP analysiert. Dabei wurde die *gap*-basierte T-RFLP als Referenz für die Identifizierung angesehen. Die erhaltenen T-RFLP-Muster wurden dabei mit dem Muster des jeweiligen Referenzstammes verglichen. Wenn die Ergebnisse des Phoenix™ und/oder des Vitek®2 nicht mit dem Ergebnis der T-RFLP übereinstimmten, dann wurde die Identifizierung mit den Automaten wiederholt. Entsprachen die Ergebnisse des Phoenix™ und/oder des Vitek®2 auch nach der nochmaligen Analyse nicht dem Ergebnis der *gap*-basierten T-RFLP, so wurde zusätzlich das ATB-System eingesetzt. Waren die Ergebnisse des ATB und der T-RFLP verschieden, wurde zur eindeutigen Klärung der Identität die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens des jeweiligen Isolates angeschlossen. Unter den 130 klinischen Isolaten befanden sich 34 *S. epidermidis* und 28 *S. haemolyticus*, mit deren T-RF-Daten zusätzlich noch Quantile-Quantile-Plots erstellt wurden, um die Reproduzierbarkeit der T-RFLP darzustellen.

### 3.16 INFEKTIONSEXPERIMENTE

Die für die Infektionsversuche eingesäten Zellen wurden bis zum Erreichen einer Konfluenz von zirka 80% bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die für die Infektion eingesetzten Bakterien wurden über Nacht in TSB-Medium bei 37°C und 160 rpm kultiviert. Die Konzentration der Bakteriensuspension wurde photometrisch (OD = 600) bestimmt und die Zellen mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 50 infiziert. Zu den nicht infizierten Zellen wurde das gleiche Volumen an PBS gegeben. Die Infektion der Zellen erfolgte über den jeweiligen Zeitraum in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Mittels Phasenkontrastmikroskop wurde der Verlauf der Infektion dokumentiert und zu gegebenen Zeitpunkten die Zellkulturüberstände sowie die Zellen geerntet und weiter verarbeitet.

### 3.17 RNA-ISOLIERUNG

***RNeasy Mini Kit:***

Qiagen, Hilden, Deutschland

Aus den kultivierten Keratinozyten wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des *RNeasyMini-Kits* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers extrahiert. Zuerst wurde das Zellkulturmedium abgenommen und dann durch Zugabe von 350 µl Lysispuffer, welcher sofort die RNase inaktivierte, die Keratinozyten vom Boden der 6-Loch Kulturplatte gelöst. Die Proben wurden auf *RNeasyMini*-Säulen gegeben, die RNA an der Silikagelmembran gebunden, gewaschen und in 50 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert. Die Lagerung der RNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C.

### 3.18 REVERSE TRANSKRIPTION VON RNA (CDNA-SYNTHESE)

***M-MLV Reverse Transcriptase Set :***

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

***Oligo(dT)<sub>20</sub>Primer:***

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

***DTT:***

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

***RNase OUT Recombinant Ribonuclease:***

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

***Deoxynucleoside Triphosphate Set:***

Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Für weitere Experimente wurde die aus den Keratinozyten gewonnene RNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Das Enzym *Reverse Transkriptase* synthetisiert in dieser Reaktion mit Hilfe einer RNA-Matrize die komplementäre DNA (cDNA) (Gallo, 1971). Die Reaktionsansätze enthielten 1 x M-MLV RT Reaktionspuffer (Invitrogen), 500 µM dNTPs (Roche), 0,5 µg Oligo-DT (Invitrogen), 10,8 U *RNase-Inhibitor* (Invitrogen), 10 mM DTT (Invitrogen), 200 U M-MLV Reverse Transkriptase (Invitrogen), 8 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O und 20 µl RNA. Die reverse

Transkription, d.h. die Hybridisierung der Oligo(dT)-Primer und Synthese der cDNA, erfolgte für eine Stunde bei 37°C. Die cDNA wurde im Anschluss bei -20°C gelagert.

### 3.19 QUANTITATIVE *REAL-TIME* PCR

Mit Hilfe der quantitativen *real-time* PCR (TaqMan<sup>®</sup>) konnte die Menge an mRNA- bzw. cDNA-Kopien von hBD1, hBD2, hBD3 und LL-37 in der Gesamt-RNA, bzw. bereits transkribierter Gesamt-cDNA, bestimmt werden. Bei dieser Methode ist es möglich, das Fortschreiten der PCR-Reaktion mittels einer Farbreaktion zu verfolgen. Zusätzlich zu den beiden Primern, die in jeder PCR vorhanden sind, befindet sich eine Sonde, die an eine Gensequenz zwischen den beiden Primern bindet und mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Reporterfarbstoff und *Quenchnermolekül*) markiert ist, in dieser Reaktion. Wird der Reporter bei einer spezifischen Wellenlänge angeregt, so emittiert er ein fluoreszierendes Signal, das auf Grund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET) unterdrückt wird. Durch die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der Polymerase wird die Sonde jedoch während der PCR abgebaut und das Signal des Reporterfarbstoffes freigesetzt, welches nun gemessen werden kann.

**TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays:** Applied Biosystems, Foster City, USA

**TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix:** Applied Biosystems, Foster City, USA

Die Messungen wurden mit den TaqMan<sup>®</sup> *Gene Expression Assays* (Applied Biosystems) für hBD1, hBD2, hBD3, LL-37, GAPDH und dem TaqMan<sup>®</sup> *Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), jeweils in Doppelbestimmungen von drei unabhängigen Experimenten, nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Ein 20 µl Reaktionsansatz bestand aus 1 x TaqMan<sup>®</sup> *Universal PCR Master Mix*, 1 x TaqMan<sup>®</sup> *Gene Expression Assay*, 6,5 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O und 2,5 µl cDNA (10-100 ng). Die *real-time* PCR fand in der *DNA Engine Opticon 2* (MJ Research, Waltham, USA) unter folgenden Bedingungen statt: 2 min bei 50°C, 10 min bei 95°C und 50 Zyklen von 15 s bei 95°C und 1 min bei 60°C, wobei nach jedem Zyklus das Fluoreszenzsignal gemessen wurde.

Der Nachweis der PCR-Produkte basiert auf dem sogenannten *threshold cycle* (Ct). Der *threshold cycle* ist der erste PCR-Zyklus, der eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenz über der Hintergrund-Fluoreszenz zeigt. Zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge an DNA und dem *threshold cycle* der *real-time* PCR besteht eine lineare Beziehung. Für die relative Quantifizierung wurde die Expression der Zielgene (hBD1, hBD2, hBD3, LL-37) mit dem eines nicht regulierten Referenz-Gens (GAPDH) normalisiert. Von jeder cDNA-Probe wurde eine simultane Amplifikation des zu untersuchenden Zielgens und des Referenzgens durchgeführt, so dass die erhaltenen Ct-



Werte beider Reaktionen miteinander verrechnet werden können. Die Bestimmung des Expressionsunterschiedes (Ratio) erfolgte über die  $\Delta\Delta\text{Ct}$  Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Dabei wurde im ersten Schritt (I) für jede untersuchte Probe der Ct-Wert des Referenzgens vom Ct-Wert des Zielgens subtrahiert.

$$\text{I} \quad \Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct}_{\text{Referenzgen}}$$

Nach dieser Normierung wird vom  $\Delta\text{Ct}$  Wert der infizierten Probe der  $\Delta\text{Ct}$  Wert der nicht infizierten Kontrolle abgezogen (II), und man erhält den sogenannten  $\Delta\Delta\text{Ct}$  Wert.

$$\text{II} \quad \Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{infizierte Probe}} - \Delta\text{Ct}_{\text{nicht infizierte Probe}}$$

Der relative Expressionsunterschied (Ratio) des Zielgens zwischen der infizierten Probe und der nicht infizierten Kontrolle, beide Werte normalisiert zum Referenzgen ergibt sich aus folgender arithmetischen Formel:

$$\text{III} \quad \text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}.$$

## 3.20 ELISA

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) ist eine semiquantitative Nachweismethode für Proteine. Eine ELISA-Kunststoffplatte wird mit einem Antikörper, welcher spezifisch für das nachzuweisende Protein ist, beschichtet. Nach Zugabe der Proteinlösung und Bindung des Proteins an den spezifischen Antikörper, wird nicht gebundenes Protein abgewaschen und die freien Bindungsstellen durch Verwendung eines Blockierungspuffers geblockt. Zur Detektion des gebundenen Proteins wird ein biotinylierter, protein-spezifischer Antikörper zugegeben, welcher mit Hilfe einer Substrat-Chromogen-Lösung einen zur Konjugatkonzentration äquivalenten Farbumschlag hervorruft. Dieser wird mit einem Photometer gemessen und die Konzentration des nachzuweisenden Proteins anhand einer mitgeführten Standardkurve berechnet.

### 3.20.1 IL-6 UND IL-8 ELISA

<b>OptEIA™ Human IL-6 Set:</b>	BD-Bioscience, San Diego, USA
<b>OptEIA™ Human IL-8 Set:</b>	BD-Bioscience, San Diego, USA
<b>Coating-Puffer:</b>	PBS
<b>Blockierungspuffer, Assay-Puffer:</b>	PBS + 10% FCS
<b>Wasch-Puffer:</b>	130 mM NaCl, 90 mM Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, 1 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 3 mM KCl

<b>Substrat-Lösung:</b>	Tetramethylbenzidin (TMB) Lösung (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
<b>Stopp-Lösung:</b>	2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

Die Zytokine IL-6 und IL-8 wurden unter Verwendung des OptEIA™ Human IL-6 Sets und des OptEIA™ Human IL-8 Sets (BD-Bioscience, San Diego, USA) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die ELISA-Platten (Greiner-Bio-one, Frickenhausen, Deutschland) wurden mit je 100 µl in *Coating*-Puffer verdünnten IL-6 bzw. IL-8 Antikörper beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden gewaschen und die Vertiefungen der Platte mit je 200 µl Blockierungspuffer für 1h bei RT inkubiert, um die freien Bindungsstellen abzusättigen. Die Platte wurde erneut gewaschen und je 100 µl der Proteinproben (IL-6: unverdünnt; IL-8: 1/20 in *Assay*-Puffer) bzw. definierten Standardlösungen zugegeben und für 2h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Zugabe von je 100 µl des in *Assay*-Puffer verdünnten Detektionsantikörpers sowie des Streptavidin-*Horseradish-Peroxidase*-Gemisches für 1h bei RT. Die Platte wurde gewaschen, mit je 100 µl Substrat-Lösung für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert und mit 50 µl Stopp-Lösung abgestoppt. Die Ergebnisse wurden mit einem Plattenphotometer (SpectraFluor Plus, Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 405 nm gemessen und ausgewertet. Die Bestimmung jeder Probe erfolgte dreifach.

### 3.21 STATISTISCHE AUSWERTUNG UND DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE

Die statistische Auswertung der TaqMan®- und ELISA-Daten erfolgte mit dem Programm SigmaStat Version 2.03 unter Verwendung des t-Testes nach Student. Der t-Test nach Student dient zum Vergleich zweier unabhängiger Datengruppen, wobei die Werte der beiden Datengruppen normalverteilt sein müssen und eine hohe Varianzhomogenität vorliegen muss (Precht und Kraft, 1992; Bühl und Zöfel, 1995). P-Werte ≤ 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen (\* ≤ 0,05; \*\* ≤ 0,005). Die Daten wurden als Mittelwerte +/- Standardabweichung angegeben.

### 3.22 DATENBANKEN

Folgende Datenbanken wurden für die Literatursuche, die Analyse von DNA-Sequenzen und zur statistischen Auswertung verwendet:

National Center for Biotechnology Information (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>  
Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>  
ClustalW: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>

Multi Locus Sequence Typing (MLST): <http://www.mlst.net>

Ridom Spa Server: <http://spaserver.ridom.de>

The R Project for Statistical Computing: [www.r-project.org](http://www.r-project.org)

### **3.23 PHASENKONTRASTMIKROSKOPIE**

Die HaCaT-Zellen wurden direkt in den 6-Loch Kulturplatten mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops mit einer 20-fachen Vergrößerung betrachtet. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit einer CCD Kamera MP Focus 5000 (Intas, Göttingen, Deutschland) und dem Programm *ImageProPlus* (MediaCybernetics, Wokingham Berkshire, UK).

## 4 ERGEBNISSE

Die klinische Bedeutung von *S. aureus* und anderen *Staphylococcus*-Spezies hat in den letzten Jahren gerade im Zusammenhang mit nosokomialen und allgemein erworbenen Infektionen zugenommen. In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Aspekte der Diversität, Identifizierung und Pathogenese von Staphylokokken betrachtet. Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung und Typisierung von *S. aureus*-Isolaten des Universitätsklinikums Magdeburg. Der zweite Teil beschreibt die Entwicklung einer Methode, basierend auf terminalen Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismen des Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase Gens, welche die akkurate Identifizierung und Differenzierung von *Staphylococcus*-Spezies ermöglicht. Im dritten Teil werden Aspekte der Induktion der angeborenen Immunantwort in epithelialen Zellen durch *Staphylococcus*-Spezies betrachtet.

### 4.1 HETEROGENITÄT VON *S. AUREUS*-ISOLATEN INNERHALB DER UNIVERSITÄTSKLINIK

*Staphylococcus aureus* ist weltweit einer der häufigsten Erreger von innerhalb und außerhalb des Krankenhauses erworbenen Infektionskrankheiten. Die Therapie dieser Infektionen mit entsprechenden Antibiotika führt bei *S. aureus* relativ schnell zu einer Resistenzentwicklung. Die Anfang der 60er Jahre erstmals aufgetretenen Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) stellen dabei ein zunehmendes Problem als Hauptverursacher nosokomialer Infektionen, an denen Patienten versterben und die in Form von Ausbrüchen auftreten können, dar.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden *S. aureus*-Isolate aus dem Universitätsklinikum Magdeburg anhand ihrer Resistenzphänotypen, Toxinprofile und des Virulenzoperons *agr* charakterisiert. Weiterhin wurden ausgewählte Methicillin-sensible *S. aureus* (MSSA) molekulargenetisch typisiert und mit bereits im Klinikum zirkulierenden MRSA-Klonen verglichen.

### 4.1.1 CHARAKTERISIERUNG DER *S. AUREUS*-ISOLATE

Die verwendeten *S. aureus*-Stämme wurden über einen Zeitraum von vier Wochen aus verschiedenen klinischen Materialien, die zur Diagnostik in das Institut für Medizinische Mikrobiologie geschickt wurden, isoliert und identifiziert. Die Bestätigung der Identifizierung erfolgte durch die PCR-Analyse des *SA442*-Elementes und des *mecA*-Gens, welche spezifisch für *S. aureus* bzw. Methicillin-resistente *S. aureus* sind (Abbildung 4.1). Tabelle 4.1 zeigt die Verteilung der Methicillin-sensiblen (MSSA) und Methicillin-resistenten *S. aureus*-Isolate (MRSA) auf den Stationen des Universitätsklinikums Magdeburg und der mit der Klinik verbundenen Einrichtungen.

Tabelle 4.1: Verteilung der *Staphylococcus aureus*-Isolate auf den Stationen der Universitätsklinik und der mit der Klinik verbundenen Einrichtungen.

Fachbereich	MSSA ( <i>n</i> )	MRSA ( <i>n</i> )
Innere Medizin		
Gastroenterologie	2	0
Kardiologie	4	2
Kardiologie Ambulanz	2	0
Nephrologie	0	1
Urologie	0	1
Endokrinologie	2	2
Hämatologie	2	1
Orthopädie	2	0
Dermatologie	29	2
HNO	7	1
Neurologie	0	1
Anästhesiologie	9	4
Chirurgie		
Herzchirurgie	1	0
Kinderchirurgie	2	0
Neurochirurgie	4	4
Plastische Chirurgie	1	0
Chirurgische Tagesklinik	3	0
Intensivstation	3	1
Augenklinik	0	1
Gynäkologie	2	0
Pädiatrie	6	0
Notaufnahme	0	1
Rehabilitationszentrum (Flechtingen)	1	2
total ( <i>n</i> )	82	24
total (%)	77	23

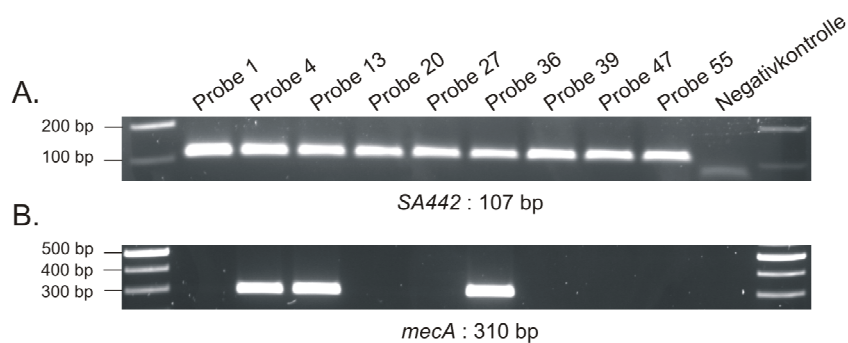


Abbildung 4.1: Beispielhafte Darstellung der PCR zum Nachweis (A.) der *intergenic spacer*-Region von *S. aureus*, auch SA 442-Element genannt, und (B.) des *mecA*-Gens, welches für ein verändertes Penicillinbindeprotein (PBP2a) bei MRSA verantwortlich ist.

Unter den 106 konsekutiven *S. aureus*-Isolaten befanden sich 82 (77%) MSSA und 24 (23%) MRSA (Abb. 4.1). Der größte Anteil MSSA wurde von Materialien aus der Dermatologie (35,37%), der Chirurgie (17,07%) und der Inneren Medizin (12,20%) isoliert. Die meisten MRSA-Stämme wurden von den Stationen der Inneren Medizin (29,17%) und der Chirurgie (20,83%) gewonnen.

*Staphylococcus aureus* kann neben der Penicillin/Oxacillin-Resistenz auch diverse andere Antibiotikaresistenzen erwerben und damit die Therapieoption von Staphylokokken-Infektionen deutlich einschränken. Im Folgenden wurden die isolierten *S. aureus*-Stämme auf Resistenzen gegen verschiedene Antibiotikaklassen getestet und neben den einzelnen Resistenzphänotypen auch die Resistenzmuster analysiert. Von den 82 MSSA waren 58 (70,7%), 19 (23,2%), 13 (15,9%) und 3 (3,7%) Stämme resistent gegen Penicillin, Ciprofloxacin, Clindamycin, Erythromycin und Gentamicin. Achtzehn (23%) MSSA-Isolate zeigten keine Resistenz gegen die eingesetzten Antibiotika. Von den 24 MRSA-Stämmen zeigten, neben der Methicillin/Oxacillin-Resistenz, 24 (100%), 22 (91,67%), 21 (87,50%), 20 (83,33) und fünf (20,83%) Stämme eine Resistenz gegen Penicillin, Ciprofloxacin, Erythromycin, Clindamycin und Gentamicin. Die Resistenzmuster der *S. aureus*-Isolate sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.2: Resistenzmuster der *Staphylococcus aureus*-Isolate (PEN: Penicillin; OXA: Oxazillin; CIP: Ciprofloxacin; ERY: Erythromycin; CLI: Clindamycin; GEN: Gentamycin; TET: Tetracyclin).

Resistenzphänotyp	MSSA ( <i>n</i> ) positiv für Phänotyp	MRSA ( <i>n</i> ) positiv für Phänotyp
keine Resistenz	18	0
PEN	32	0
GEN	1	0
CIP	1	0
PEN-CIP	7	0
PEN-OXA	0	1
PEN-GEN	1	0
TET-CIP	2	0
PEN-TET	4	0
ERY-CLI	1	0
PEN-OXA-CIP	0	2
PEN-OXA-ERY	0	1
PEN-TET-CIP	3	0
PEN-ERY-CLI	5	0
ERY-CIP-CLI	1	0
PEN-TET-ERY-CLI	1	0
PEN-ERY-CIP-CLI	4	0
PEN-ERY-CIP-CLI-GEN	1	0
PEN-OXA-ERY-CIP-CLI	0	15
PEN-OXA-ERY-CIP-CLI-GEN	0	5
total ( <i>n</i> )	82	24

Die Mehrzahl der MSSA ( $n = 32$ ; 39,02%) besaß nur eine Penicillinresistenz. Neben der Penicillinresistenz wurden bei 12 (14,6%) Isolaten eine zusätzliche Antibiotikaresistenz, bei acht (9,75%) Isolaten zwei zusätzliche Antibiotikaresistenzen und bei fünf (6,1%) Isolaten drei zusätzliche Antibiotikaresistenzen detektiert. Einem MSSA-Stamm konnte eine Breitbandresistenz gegen Penicillin, Erythromycin, Ciprofloxacin, Clindamycin und Gentamicin zugeordnet werden. Nur sechs MSSA zeigten Resistenzphänotypen ohne Penicillin. Alle MRSA-Stämme zeigten neben der Oxacillinresistenz auch eine Resistenz gegen Penicillin. Drei MRSA besaßen neben der Oxacillin- und Penicillinresistenz noch eine Resistenz gegen Ciprofloxacin ( $n = 2$ ; 8,33%) bzw. Erythromycin ( $n = 1$ ; 4,17%). Den meisten MRSA ( $n = 15$ ; 62,5%) wurde der Resistenzphänotyp Penicillin-Oxacillin-Erythromycin-Ciprofloxacin-Clindamycin zugeordnet. Fünf (20,83%) MRSA-Stämme waren zusätzlich zu diesen fünf Antibiotika noch resistent gegen Gentamicin.

Die klassischen Methoden der Phänotypisierung können klonale Zusammenhänge zwischen Isolaten nicht aufklären. Eine molekulare Methode für die Analyse der Populationsdynamik von Staphylokokken ist die *agr*-Typisierung. Das *accessory-gene-regulator*-Operon (*agr*) ist eines mehrerer globaler Regulatoren, die die Expression von Genen bei *S. aureus* koordinieren. Durch *agr* wird die Synthese der meisten Virulenzgene und anderer extrazellulärer Proteine kontrolliert. Bezüglich eines Polymorphismus im *agr*-Lokus lassen sich die *S. aureus*-Isolate in vier Gruppen (I-IV) unterteilen. Ausschlaggebend für die Einordnung in diese vier Gruppen sind ein von

*agrD* produziertes autoinduziertes Peptid (AIP) und dessen Rezeptor. Beide Peptide unterliegen einer hohen Variabilität. Man benutzt diese Methode als grobe Typisierung und geht dabei davon aus, dass die vier verschiedenen *agr*-Gruppen ursprünglich klonale Linien darstellen (Fournier, 2008). Tabelle 4.3 fasst die Ergebnisse der *agr*-Typisierung der untersuchten Stämme zusammen. In Abbildung 4.2 ist die für die Analyse verwendete Multiplex-PCR am Beispiel ausgewählter Isolate dargestellt.

Tabelle 4.3: Ergebnisse der Analyse des Virulenzoperons *agr*.

<i>agr</i> -Gruppe	MSSA ( $n = 82$ )	MRSA ( $n = 24$ )	Gesamt ( $n = 106$ )
I	53	18	71
II	17	6	23
III	7	0	7
IV	5	0	5

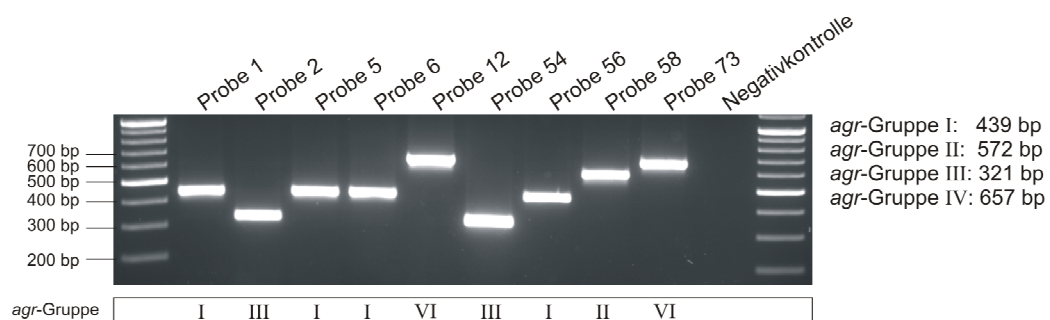


Abbildung 4.2: Multiplex-PCR ausgewählter Isolate zum Nachweis der verschiedenen *agr*-Gruppen.

75% ( $n = 18$ ) der MRSA-Isolate besaßen die *agr*-Gruppe I und 25% ( $n = 6$ ) die *agr*-Gruppe II. 64,63% ( $n = 53$ ) der MSSA-Isolate wurde die *agr*-Gruppe I und 20,73% ( $n = 17$ ) die *agr*-Gruppe II zugeordnet. Isolate der *agr*-Gruppen III und IV waren ausschließlich MSSA-Stämme.

Die Fähigkeit von *S. aureus*, eine Vielzahl von Infektionen bei Menschen zu verursachen, ist unter anderem auf die Produktion von vielfältigen Virulenzfaktoren zurückzuführen. Eine bedeutende Gruppe von Virulenzfaktoren sind dabei Toxine, die als Superantigene wirken und mit schweren Krankheitsverläufen einhergehen. Die 106 MSSA- und MRSA-Isolate wurden deshalb auf das Vorhandensein von Genen für die Staphylokokken-Enterotoxine A-E (*sea-see*), G-J (*seg-sej*) und das Toxisch-Schock-Syndrom-Toxin-1 (*tst*), die alle zu den Superantigenen gezählt werden, untersucht. Zusätzlich erfolgte die Detektion des Panton-Valentine-Leukozidin (*lukPV*), welches speziell in CA-MRSA große klinische Bedeutung erlangt. Die detaillierten Ergebnisse



der erhaltenen Staphylokokken-Enterotoxine sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst. Abbildung 4.3 zeigt ausgewählte Ergebnisse der dafür eingesetzten PCR-Nachweise.

Tabelle 4.4: Pathogenitätsprofile der *Staphylococcus aureus*-Isolate, erhaltenen aus den nachgewiesenen Genen der Staphylokokken-Enterotoxine (*sea-see* und *seg-sej*: Gene der Staphylokokken-Enterotoxine A-E und G-J).

Toxingen(e)	MSSA (n)	MRSA (n)
keine	8	0
<i>sea</i>	3	6
<i>sed</i>	1	0
<i>seg</i>	0	1
<i>sei</i>	13	1
<i>sej</i>	1	0
<i>sea, sei</i>	0	1
<i>sec, sei</i>	4	1
<i>sed, sei</i>	4	0
<i>seg, sei</i>	18	4
<i>seh, sei</i>	1	0
<i>sei, sej</i>	3	1
<i>sea, seg, sei</i>	4	4
<i>seb, seg, sei</i>	1	1
<i>sec, seg, sei</i>	5	5
<i>sed, sei, sej</i>	5	0
<i>seg, sei, sej</i>	4	1
<i>sea, seg, sei, sej</i>	2	1
<i>seb, sed, sei, sej</i>	2	0
<i>sec, seg, sei, sej</i>	1	3
<i>sec, seh, sei, sej</i>	1	0
<i>seb, sed, seg, sei, sej</i>	1	0

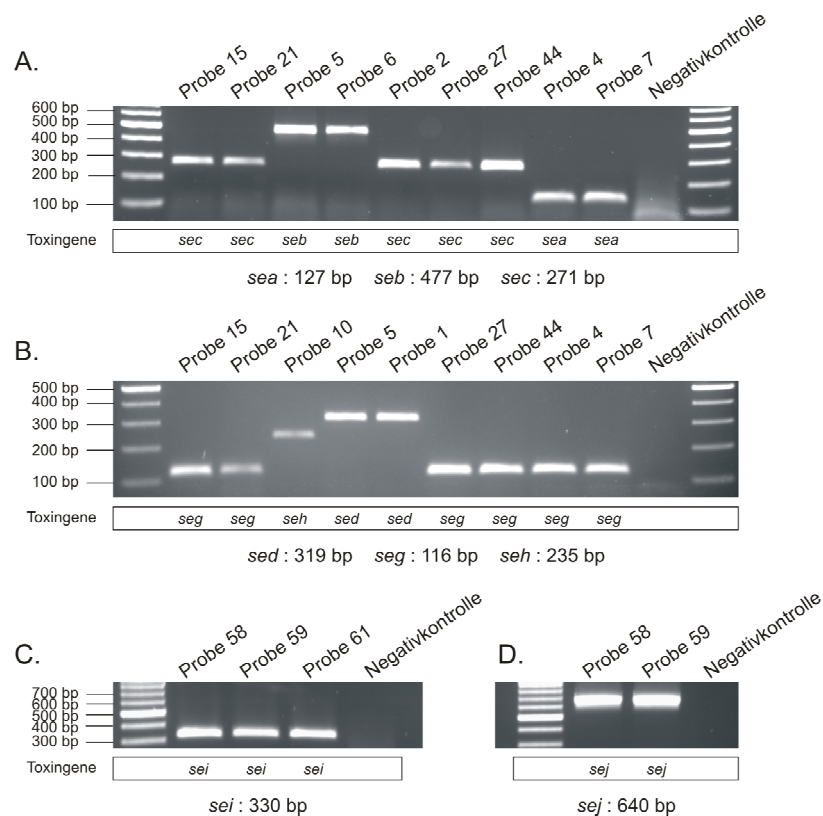


Abbildung 4.3: Beispielhafte Darstellung der PCR-Ergebnisse zur Detektion der Gene der Staphylokokken-Enterotoxine (A.) SEA-SEC (*sea-sec*); (B.) SED, SEG, SEH (*sed, seg, seh*); (C.) SEI (*sei*) und (D.) SEJ (*sej*).

Von den 82 MSSA-Isolaten konnte bei acht Stämmen keines der Enterotoxingene nachgewiesen werden. Weiterhin besaßen 18 MSSA-Stämme ein Gen des Enterotoxinclusters, bei 30 Stämmen konnten gleichzeitig zwei Enterotoxingene nachgewiesen werden, 19 Stämme besaßen drei Gene und sechs Stämme vier Gene des Enterotoxinclusters. Bei einem MSSA wurden gleichzeitig fünf der Staphylokokken-Enterotoxine detektiert. Dieser Stamm, welcher von einem Patienten der Dermatologie isoliert wurde, besaß ebenfalls als einziger von allen 106 *S. aureus*-Stämmen auch das Gen für das Panton-Valentine-Leukozidin. Insgesamt wurde bei den MSSA-Stämmen das *sea*-Gen neun Mal und das *seb*-Gen vier Mal detektiert, allerdings traten die beiden Gene niemals zusammen auf. Bei jedem der 24 MRSA-Isolate konnten Enterotoxingene nachgewiesen werden. Zwei MRSA-Stämme besaßen jeweils ein Gen des Enterotoxinclusters, bei sieben Stämmen konnten zwei Gene, bei 11 Stämmen drei Gene und bei vier Stämmen vier Gene für Staphylokokken-Enterotoxine detektiert werden. Keines der MRSA-Isolate besaß das Gen für das Panton-Valentine-Leukozidin.

Die Ergebnisse der Untersuchung der klinischen Isolate auf die Anwesenheit des Gens für das Toxisch-Schock-Syndrom-Toxin-1 in Kombination mit den Staphylokokken-

Enterotoxinen sind in Tabelle 4.5 dargestellt. Abbildung 4.4 zeigt beispielhaft die PCR zur Detektion des *tst*-Gens.

Tabelle 4.5: Pathogenitätsprofile der *tst*-positiven *Staphylococcus aureus*-Isolate in Kombinationen mit den Genen für die Staphylokokken-Enterotoxine (*sea-see* und *seg-sej*: Gene der Staphylokokken-Enterotoxine A-E und G-J; *tst*: Gen für das Toxisch-Schock-Syndrom-Toxin-1).

Toxingene(e)	MSSA ( <i>n</i> = 33) positiv für Toxingene	MRSA ( <i>n</i> = 3) positiv für Toxingene
<i>sei, tst</i>	5	1
<i>sec, sei, tst</i>	4	0
<i>sed, sei, tst</i>	1	0
<i>seg, sei, tst</i>	6	0
<i>seh, sei, tst</i>	1	0
<i>sei, sej, tst</i>	1	0
<i>sea, seg, sei, tst</i>	4	1
<i>sec, seg, sei, tst</i>	1	0
<i>sec, seg, sej, tst</i>	1	0
<i>sed, sei, sej, tst</i>	4	0
<i>seg, sei, sej, tst</i>	1	1
<i>sea, seg, sei, sej, tst</i>	1	0
<i>seb, sed, sei, sej, tst</i>	2	0
<i>sec, seg, sei, sej, tst</i>	1	0

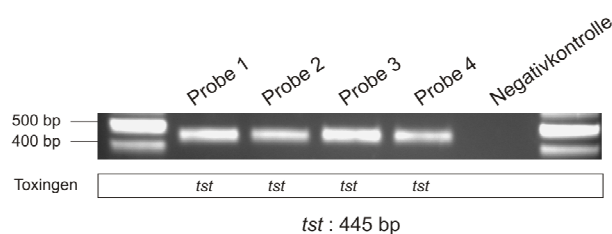


Abbildung 4.4: PCR zum Nachweis des *tst*-Gens für ausgewählte Isolate.

Bei 40% der MSSA-Stämme (*n* = 33) konnte das *tst*-Gen nachgewiesen werden. Alle *tst*-positiven MSSA-Isolate besaßen ebenfalls bis zu vier Gene der Staphylokokken-Enterotoxine. Nur bei drei (12,5%) der MRSA-Stämme konnte das *tst*-Gen detektiert werden, wobei bei diesen Isolaten auch bis zu drei Gene des Enterotoxinclusters vorhanden waren.

Die Mehrzahl (*n* = 24) der *tst*-positiven MSSA-Stämme wurden aus Patientenmaterial der Intensivstationen, der Chirurgie, der Anästhesiologie (Intensivstation) und der Dermatologie isoliert. Da diese Stationen Hochrisikobereiche für eine MRSA-Prävalenz sind, wurde eine detaillierte Analyse der 24 *tst*-positiven Isolate von diesen Stationen

angeschlossen. Zum einen erfolgte die molekulare Typisierung und Bestimmung der klonalen Zusammenhänge der *tst*-positiven MSSA-Isolate. Zum anderen sollte das Risiko neu auftretender *tst*-positiver MRSA-Klone, entstanden durch horizontalen Gentransfer von Resistenzgenen aus *tst*-positiven MSSA, im Universitätsklinikum Magdeburg beurteilt werden.

#### 4.1.2 TYPISIERUNG DER *TST*-POSITIVEN *S. AUREUS*-ISOLATE

Die molekulare Typisierung der *tst*-positiven *S. aureus*-Isolate erfolgte unter Verwendung der Multilocus Sequenzanalyse (*multilocus sequence typing* = MLST) und der Typisierung des Protein A kodierenden Gens von *S. aureus* (*spa*) (siehe Kapitel 3.13.3.3 bzw. 3.13.3.4). Beide Methoden werden genutzt um populationsgenetische Analysen durchzuführen und in diesem Zusammenhang zum Beispiel phylogenetische Stammbäume zu erstellen. Im Anschluss an die MLST und die *spa*-Typisierung wurden die erhaltenen Ergebnisse mit der bereits durchgeführten Analyse des Virulenzoperons *agr* in Zusammenhang gebracht.

Die Multilocus Sequenzanalyse ordnete den 21 MSSA-Isolaten neun verschiedene Sequenztypen (STs) zu. Detailliert waren das ST1 ( $n = 1$ ), ST8 ( $n = 6$ ), ST30 ( $n = 1$ ), ST39 ( $n = 2$ ), ST45 ( $n = 5$ ), ST101 ( $n = 2$ ), ST121 ( $n = 1$ ), ST395 ( $n = 2$ ) und ST426 ( $n = 1$ ). Die drei *tst*-positiven MRSA-Isolate wurden ST22, ST45 und ST228 zugeordnet. Diese Ergebnisse lassen erkennen, dass die *S. aureus*-Stämme bezüglich der Multilocus Sequenzanalyse sehr heterogen waren. Zur phylogenetischen Analyse und um die verwandtschaftliche Beziehung zwischen den Stämmen mit den unterschiedlichen ST-Typen zu verdeutlichen, wurde ein Dendrogramm erstellt (Abbildung 4.5). Ist die genetische Distanz im Dendrogramm gleich null, so korreliert das mit identischen ST-Mustern. Jeder Ast des Dendrogrammes repräsentiert dabei einen Sequenztyp. Vergleicht man die *S. aureus*-Isolate in Abbildung 4.5 so sind drei verschiedene Gruppierungen (*Cluster*) zu erkennen. ST8 gehört zum *Cluster* I, während ST1 und ST 228 das *Cluster* II bilden. Das *Cluster* III ist heterogen und vereint ST101, ST22, ST121, ST30, ST39, ST45, ST395 und ST426. Dabei sind ST45, ST395 und ST426 genauso wie ST30 und ST39 innerhalb des *Clusters* III eng miteinander verwandt. ST121 ist innerhalb dieses *Clusters* genetisch am weitesten von den anderen entfernt.

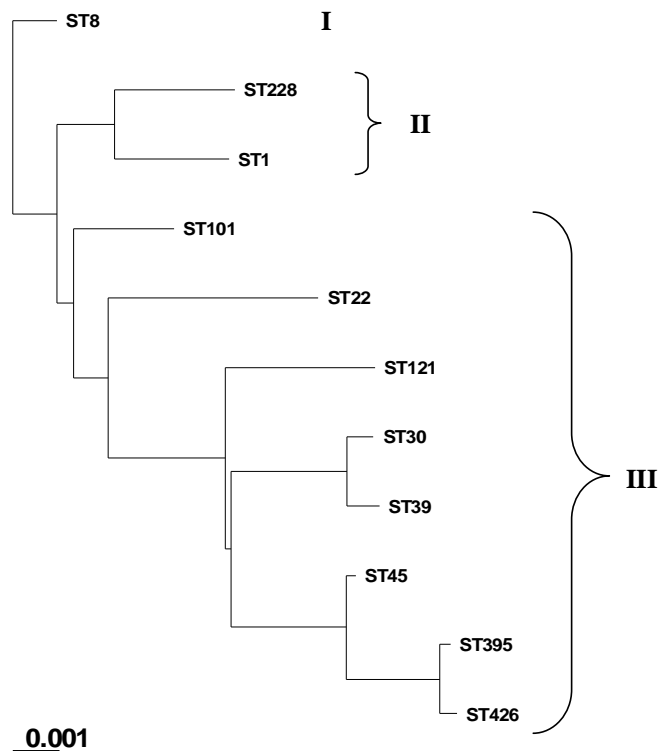


Abbildung 4.5: Dendrogramm, erstellt nach dem UPGMA-Algorithmus (siehe Kapitel 3.13.5.1), zur Analyse der klonalen Beziehung der *tst*-positiven MSSA-Isolate. Jeder Ast des Dendrogramms repräsentiert einen Sequenztyp (ST). Die verschiedenen ST's können wiederum in drei charakteristische Gruppierungen (*Cluster*) eingeordnet werden können. Die Distanz zwischen zwei Gruppierungen ist der Mittelwert der paarweisen Distanzen aller Sequenzen in beiden Gruppierungen. Die Länge der Äste, die zwei Gruppierungen trennen, sind proportional zum berechneten phylogenetischen Abstand zwischen ihnen.

Die *spa*-Typisierung erfolgt durch die Analyse bestimmter Wiederholungen dieser *spa*-Gensequenzen. Die 21 MSSA-Isolate konnten 14 verschiedenen *spa*-Typen zugeordnet werden: t008 ( $n = 2$ ), t012 ( $n = 1$ ), t015 ( $n = 2$ ), t019 ( $n = 1$ ), t024 ( $n = 2$ ), t056 ( $n = 2$ ), t065 ( $n = 2$ ), t127 ( $n = 1$ ), t133 ( $n = 1$ ), t162 ( $n = 1$ ), t271 ( $n = 1$ ), t287 ( $n = 1$ ), t399 ( $n = 2$ ) und t400 ( $n = 2$ ). Die drei MRSA-Isolate besaßen die *spa*-Typen t001, t028 und t032. Die Kombination der *spa*-Typen mit den korrespondierenden Sequenztypen in Tabelle 4.6 zeigt, dass ein einzelner Sequenztyp verschiedene *spa*-Typen in sich vereinen kann. Diesbezüglich besaßen Stämme mit ST8 die *spa*-Typen t008, t024 und t400 oder Stämme mit ST45 die *spa*-Typen t015, t028, t065 und t133. Den verbleibenden Sequenztypen ST1, ST22, ST30, ST39, ST101, ST121 und ST228 konnte jeweils nur ein *spa*-Typ zugeordnet werden.

Tabelle 4.6: Analyse der *spa*-Typen und der dazugehörigen Sequenztypen der verschiedenen *tst*-positiven *S. aureus*-Isolate.

<i>spa</i> -Typ ( <i>n</i> )	Anzahl von <i>S. aureus</i> -Stämmen mit folgendem MLST-Typ:										
	ST1	ST8	ST22	ST30	ST39	ST45	ST101	ST121	ST228	ST395	ST426
t001 (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
t008 (2)	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
t012 (1)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
t015 (2)	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
t019 (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
t024 (2)	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
t028 (1)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
t032 (1)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
t056 (2)	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
t065 (2)	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
t127 (1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
t133 (1)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
t162 (1)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
t271 (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
t287 (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
t399 (2)	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
t400 (2)	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Das Virulenzoperon *agr* spielt eine wesentliche Rolle im regulatorischen Netzwerk und der Populationsdynamik von *S. aureus*. Aus diesem Grund wurden die *agr*-Gruppen der *tst*-positiven Isolate in Zusammenhang mit den erhaltenen Ergebnissen der MLST-Typisierung gebracht. Wie der Tabelle 4.7 zu entnehmen ist, sind unter den *tst*-positiven Isolaten die *agr*-Gruppen I, II, III und IV zu finden. Alle Isolate mit den Sequenztypen ST8, ST22, ST101 und ST395 zeigten die *agr*-Gruppe I. Von den sechs ST45-Stämmen wurde einem die *agr*-Gruppe IV zugeordnet, während die anderen fünf Stämme (vier MSSA und ein MRSA) zur *agr*-Gruppe I gehörten. Das ST121-Isolat besaß die *agr*-Gruppe IV, das ST228 und das ST426-Isolat die *agr*-Gruppe II. Die Isolate mit ST1 und ST30, welche zu den neu aufgetretenen US-amerikanischen Klonen gehören die unter CA-MRSA entdeckt wurden, besaßen die *agr*-Gruppe III. Der ST39-Stamm besaß ebenfalls die *agr*-Gruppe III.

Tabelle 4.7: Analyse der Sequenztypen und der dazugehörigen *agr*-Typen für die verschiedenen *tst*-positiven *S. aureus*-Isolate.

MLST ( <i>n</i> )	Anzahl von <i>S. aureus</i> -Stämmen mit folgendem <i>agr</i> -Typ:			
	I	II	III	IV
ST1 (1)	0	0	1	0
ST8 (6)	6	0	0	0
ST22 (1)	1	0	0	0
ST30 (1)	0	0	1	0
ST39 (2)	0	0	2	0
ST45 (6)	5	0	0	1
ST101 (2)	2	0	0	0
ST121 (1)	0	0	0	1
ST228 (1)	0	1	0	0
ST395 (2)	2	0	0	0
ST426 (1)	0	1	0	0

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass 23% der untersuchten *S. aureus*-Isolate als MRSA eingeordnet wurden, wobei die meisten außerdem einen multiresistenten Phänotyp zeigten. Die Resistenzmuster der MSSA-Isolate waren heterogener. Betrachtet man die erhaltenen Toxinprofile, so sind diese sowohl bei den MRSA- als auch bei den MSSA-Isolaten sehr vielfältig. Auffallend waren allerdings eine relativ große Anzahl von *tst*-positiven MSSA, die von Hochrisikostationen für MRSA isoliert wurden. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass diese *tst*-positiven MSSA sehr heterogen bezüglich ihrer Resistenzmuster, Toxinprofile, Sequenztypen und *spa*-Typen waren.

## 4.2 DIFFERENZIERUNG VON *Staphylococcus* SPP. DURCH GAP-BASIERTE T-RFLP

Neben *S. aureus* gibt es potenziell humanpathogene Koagulase-negative Staphylokokken (KNS), die ebenfalls eine bedeutende Rolle als Krankheitserreger nosokomialer Infektionen einnehmen. Die exakte Differenzierung der *Staphylococcus*-Spezies ist eine grundlegende Voraussetzung für die erfolgreiche Therapie Staphylokokken-assoziiierter Erkrankungen. Identifizierungssysteme, die auf biochemischen Reaktionen beruhen führen dabei oft nur zu unzureichenden Ergebnissen. Deshalb werden molekulargenetischen Analysen zur Differenzierung von Staphylokokken entwickelt.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Entwicklung einer Methode zur Differenzierung verschiedener *Staphylococcus*-Spezies, die auf der Analyse der terminalen Restriktions-Fragmentlängen-polymorphismen (T-RFLP) des Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*gap*) Gens beruht. Dafür wurde das *gap*-Gen verschiedener *Staphylococcus*-Spezies partiell sequenziert. Im Anschluss erfolgte die phylogenetische Analyse der erhaltenen Sequenzen, auch im Vergleich zu anderen Genen, die für die Identifizierung verwendet werden. Dann wurde die *gap*-basierte T-RFLP für Staphylokokken Referenzstämme etabliert und die Reproduzierbarkeit dieser Methode durch die Identifizierung von klinischen Isolaten bewiesen. Den Abschluss bildeten vergleichende Identifizierungen von klinischen *Staphylococcus*-Isolaten und Referenzstämmen, die sowohl mit der *gap*-basierten T-RFLP als auch mit phänotypischen Identifizierungssystemen durchgeführt wurden.

### 4.2.1 SEQUENZIERUNG DES GAP-GENS

Zunächst wurden Sequenzvergleiche mit *gap*-Sequenzen, die bereits in der NCBI-Genbank enthalten waren, erstellt, um Primer für die PCR und die Sequenzierung des *gap*-Gens zu entwickeln. Dazu wurden partielle Sequenzen folgender Stämme

verwendet: *S. aureus* (NCBI-Genbank Zugangsnummer: AJ133520), *S. arlettae* (AF495475), *S. auricularis* (AF495476), *S. capitis* (AF495487), *S. caprae* (AF495477), *S. carnosus* (AF495488), *S. chromogenes* (AF495478), *S. cohnii* (AF495489), *S. delphini* (AF495497), *S. epidermidis* (AF495479), *S. equorum* (AF495490), *S. gallinarum* (AF495480), *S. haemolyticus* (AF495491), *S. hominis* (AF495481), *S. hyicus* (AF495492), *S. intermedius* (AF495482), *S. kloosii* (AF495493), *S. lentus* (AF495483), *S. lugdunensis* (AF495494), *S. saprophyticus* (AF495495), *S. schleiferi* (AF495485), *S. simulans* (AF495498), *S. warneri* (AY024363) und *S. xylosus* (AF495486). Abbildung 4.6 zeigt Ausschnitte dieses Sequenzvergleichs, mit dessen Hilfe die hochkonservierten Bereiche innerhalb der bereits publizierten *gap*-Sequenzen aufgezeigt wurden. Es wurden dann Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer für die Sequenzierung ausgewählt, die im Verlauf der Sequenzier-PCR genau in diesen konservierten DNA-Abschnitten angreifen. Die Sequenzierung und Auswertung der erhaltenen Genabschnitte erfolgte wie unter 3.13 beschrieben.



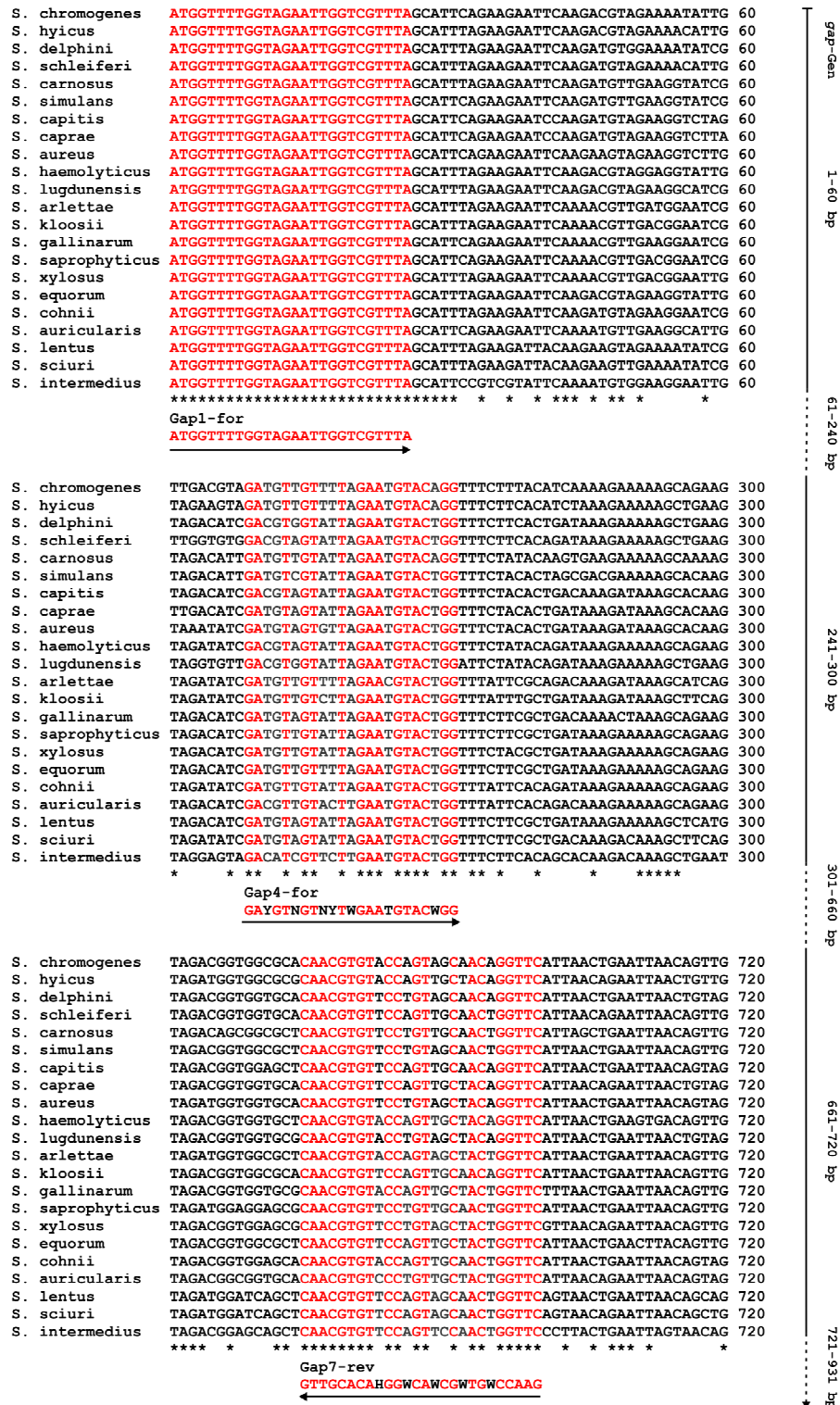


Abbildung 4.6: Sequenzvergleich zum Erstellen der Primer für die Sequenzierung des *gap*-Gens. Die Sequenzen der verschiedenen Spezies wurden der NCBI-Genbank entnommen. Die mit \* markierten Positionen stellen übereinstimmende Basen in allen Sequenzen dar. Beispielhaft sind die Positionen und Sequenzen von drei Sequenzierprimern, Gap1-for, Gap4-for und Gap7-rev, dargestellt. Rot hinterlegt sind dabei übereinstimmende Basen innerhalb der Primer, an den anderen Positionen wurden *Whobbles* eingebaut.

Die im Anschluss an die Sequenzierung erhaltenen partiellen 931-934 bp großen *gap*-Sequenzen wurden in der NCBI-Genbank unter den Zugangsnummern DQ321674 bis DQ321700 hinterlegt. Abbildung 4.7 zeigt beispielhaft die Datenbankeinträge für *S. saprophyticus* und *S. equorum*.

A. LOCUS DQ321695 931 bp DNA linear BCT 07-AUG-2006  
 DEFINITION *Staphylococcus saprophyticus* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gap*) gene, partial cds.  
 ACCESSION DQ321695  
 VERSION DQ321695.1 GI:85062717  
 CDS <1..>931  
 /gene="gap"  
 /codon\_start=3  
 /transl\_table=bacterial and plant pastid code  
 /product="glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase"  
 ORIGIN  
 1 atggttttgg tagaattggt cgtttagcat tcagaagaat tcaaaacggt gacggaatcg  
 61 acgtagtagc agtaaacgat ttaacagatg acgaaatggt agctcattta ttaaaatattg  
 121 atactatgca aggcgcttc acaggagaag ttgaagtaga aaaagacggt ttcccgtaa  
 181 acggacaaga agtaaatca ttctctgagc ctgaaccaag taaattacct tggaaagact  
 241 tagacatcga tgttgattta gaatgtactg gtttctctgc tgataaagaa aaagcagaag  
 301 cacacatcaa tgcaggtgct aaaaaagtat taatctctgc tccagctaca ggcgatttaa  
 361 aaacaatcgt ttataataca aaccaccaag aattagacgg ttcagaaact gttgtttcag  
 421 gtgcttcacg tactactaac tcattagctc ctggtgctaa agttttaaat gatgacttcg  
 481 gtttagtaga aggtttcatg actactatcc acgcatacac tggtgaccaag agcacacaag  
 541 atgcaccaca cagaaaagc gacaaaagtc gtgcgctgac agctgctgaa aacatcatcc  
 601 ctaactcaac tgggtgctgct aaagcaattg gcttagtaat tcctgaaatt gatggtaaat  
 661 tagatggagg agcgcacagc gttcctgttg caactggttc attaactgaa ttaacagttg  
 721 ttttagaaaa aaatgtaagc attgaagatg taaatgctgc aatgaaaaat gcttcaaacg  
 781 aatcattcgg ttacacagaa gacgaaatcg tatcttcaga cgtaatcggg atgacttatg  
 841 gttcattatt tgatgcaaca caaactcgtg taatgactgt tggcgaccgt caattagtta  
 901 aagtagcagc ttggtatgat aacgaaatgt c

B. LOCUS DQ321684 931 bp DNA linear BCT 07-AUG-2006  
 DEFINITION *Staphylococcus equorum* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gap*) gene, partial cds.  
 ACCESSION DQ321684  
 VERSION DQ321684.1 GI:85062695  
 CDS <1..>931  
 /gene="gap"  
 /codon\_start=3  
 /transl\_table=bacterial and plant pastid code  
 /product="glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase"  
 ORIGIN  
 1 atggttttgg tagaattggt cgtttagcat ttagaagaat tcaagacgta gaaggtattg  
 61 acgtagtagc agttaacgat ttaacagatg acgaaatggt agctcattta ttaaaatattg  
 121 aactacaca aggtcgcttc acaggagaag ttgaagtaga aaaagacgga ttccgtgtaa  
 181 atggacaaga agttaaataca ttctcagaac ctgaaccaag taaattacct tggaaagatt  
 241 tagacatcga tgttgattta gaatgtactg gtttctctgc tgataaagaa aaagcagaag  
 301 ctcacattga cgctggcgtc aaaaaagtat taatctctgc accagcaaca ggcgacttaa  
 361 aaacaatcgt ttataaact aaccacagtg aattagatgg ttcagaaaca gttgtttcag  
 421 gtgcttcacg tactactaac tcattagctc cagtagctaa agttttaaat gaogacttcg  
 481 gcttagtgta aggtttcatg actactatcc acgcatacac tggtgaccaag agtactcaag  
 541 atgctccaca cagaaaagc gacaaaagtc gtgcacgtgc agctgctgaa aacatcatcc  
 601 ctaactcaac aggtgctgct aaagcaattg gtttagtaat ccctgaaatc gatggtaaat  
 661 tagacggtgg cgctcaacgt gttccagttg ctactggttc attaactgaa cttacagttg  
 721 tattagaaaa agacgtaagc gttgaagacg ttaacgcagc aatgaaaaat gcttcagacg  
 781 aatcatttgg ttacactgaa gacgaaatcg tttctctgta cgtaatcggg atgacttacg  
 841 gttcattatt cgatgcaacg caaactcgtg ttatgacagt tggagatcac caattagtta  
 901 aaatagcagc ttggtatgat aacgaaatgt c

Abbildung 4.7: Einträge der erhaltenen partiellen *gap*-Sequenzen für (A.) *Staphylococcus saprophyticus* und (B.) *Staphylococcus equorum* in der NCBI-Genbank.

### 4.2.2 PHYLOGENETISCHE ANALYSE DER GAP-SEQUENZEN DER VERSCHIEDENEN STAPHYLOCOCCUS SPP.

Im Folgenden wurde die Sequenzähnlichkeit der erhaltenen partiellen *gap*-Sequenzen durch das Erstellen einer DNA-Sequenzähnlichkeitsmatrix beurteilt (Abbildung 4.8). Vergleichend dazu wurden Ähnlichkeitsmatrices für die 16S rRNA-, *sodA*-, *hsp60*-, *rpoB*- und *tuf*-Gene verschiedener *Staphylococcus*-Spezies mit Sequenzen aus der NCBI-Genbank erzeugt.

Stamm ( <i>gap</i> -Gen)	<i>S. arlettae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. auricularis</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. caprae</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. delphini</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. equorum</i>	<i>S. felis</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. kloosii</i>	<i>S. lentus</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. muscae</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. schleiferi</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. xyloso</i>
<i>S. arlettae</i>	ID																										
<i>S. aureus</i>	75	ID																									
<i>S. auricularis</i>	85	74	ID																								
<i>S. capitis</i>	75	90	75	ID																							
<i>S. caprae</i>	24	27	24	27	ID																						
<i>S. carnosus</i>	29	27	27	27	45	ID																					
<i>S. chromogenes</i>	84	74	83	72	24	29	ID																				
<i>S. cohnii</i>	88	75	87	75	26	28	83	ID																			
<i>S. delphini</i>	85	74	84	72	25	29	88	85	ID																		
<i>S. epidermidis</i>	74	89	75	91	27	27	72	76	74	ID																	
<i>S. equorum</i>	90	74	86	74	25	28	84	89	84	74	ID																
<i>S. felis</i>	47	46	47	46	25	27	47	48	48	47	46	ID															
<i>S. gallinarum</i>	89	74	87	74	25	28	84	88	84	74	89	47	ID														
<i>S. haemolyticus</i>	30	28	28	28	44	85	30	29	31	28	29	27	29	ID													
<i>S. hominis</i>	86	75	83	75	25	28	85	85	84	75	85	46	85	29	ID												
<i>S. hyicus</i>	84	74	84	72	24	27	91	84	88	72	84	48	84	29	83	ID											
<i>S. intermedius</i>	86	74	84	73	25	29	88	85	96	74	84	49	84	31	84	87	ID										
<i>S. kloosii</i>	92	75	86	75	25	28	84	89	85	74	89	48	90	30	85	85	85	ID									
<i>S. lentus</i>	81	70	80	71	26	27	81	81	82	71	83	48	83	28	80	81	83	82	ID								
<i>S. lugdunensis</i>	74	88	75	88	26	26	72	74	73	87	73	46	74	27	77	72	73	74	69	ID							
<i>S. muscae</i>	29	27	28	27	44	83	30	29	30	27	28	27	28	85	28	28	30	29	28	26	ID						
<i>S. saprophyticus</i>	89	74	86	73	24	28	85	90	84	73	91	47	90	29	85	84	84	89	82	72	29	ID					
<i>S. schleiferi</i>	30	27	28	27	43	83	29	29	30	28	29	26	28	86	29	28	29	30	27	27	88	29	ID				
<i>S. sciuri</i>	82	69	80	70	26	27	80	81	82	70	83	48	83	29	81	80	83	82	93	69	28	82	27	ID			
<i>S. simulans</i>	29	27	27	27	44	95	29	28	29	28	28	28	86	28	27	29	28	28	26	84	28	83	28	ID			
<i>S. warneri</i>	87	77	85	78	24	27	84	86	84	76	88	47	89	29	87	83	85	89	83	75	28	86	29	83	28	ID	
<i>S. xyloso</i>	29	27	29	26	41	81	30	28	30	27	28	27	28	84	29	28	30	29	27	25	80	29	80	27	82	27	ID

Abbildung 4.8: DNA-Sequenzähnlichkeitsmatrix basierend auf dem Vergleich der erhaltenen *gap*-Sequenzen der *Staphylococcus*-Spezies. Die Analyse erfolgte mit dem Programm *BioEdit*, Version 7.0.1.

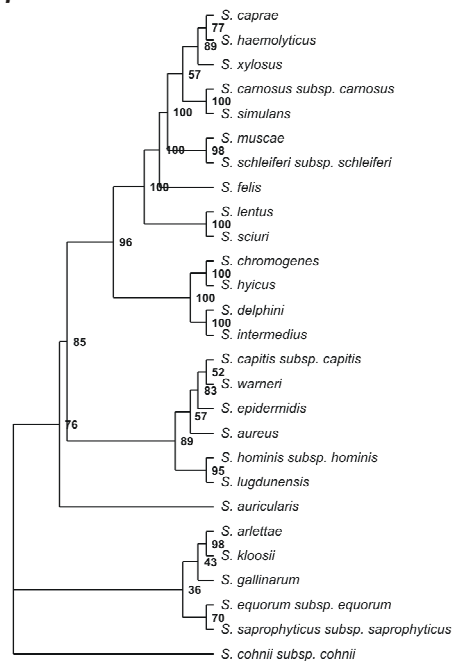
Durch den paarweisen Vergleich der *gap*-Sequenzen wurden Sequenzähnlichkeiten zwischen 24% und 96% erhalten. Die Spezies *S. lentus* und *S. sciuri* zeigten eine Sequenzähnlichkeit bezüglich ihrer partiellen *gap*-Gene von 93%, wohingegen Vergleiche die auf anderen Genen basierten Ähnlichkeiten zwischen 88% und 98% aufwiesen. Im Speziellen waren das 88% für *hsp60*, 88,9% für *sodA* und 98% für das 16S rRNA-Gen. Beim Vergleich der partiellen *gap*-Sequenzen von *S. capitis* und *S. caprae* betrug die Sequenzähnlichkeit nur 27%, wobei die Sequenzen der *sodA*-, 16S rRNA- und *hsp60*-Gene Ähnlichkeiten von 94%, 95% und 99% zeigten. Für *S. carnosus* und *S. simulans* wurde eine *gap*-Sequenzähnlichkeit von 95% erhalten, wohingegen die *rpoB*- und 16S rRNA-Gene Ähnlichkeiten von 88% bzw. 96%

aufwiesen. Die *gap*-Sequenz von *S. chromogenes* und *S. hyicus* stimmte zu 91% überein, während die Vergleiche der *sodA*- und 16S rRNA-Daten Sequenzähnlichkeiten von 77,6% und 98% ergaben.

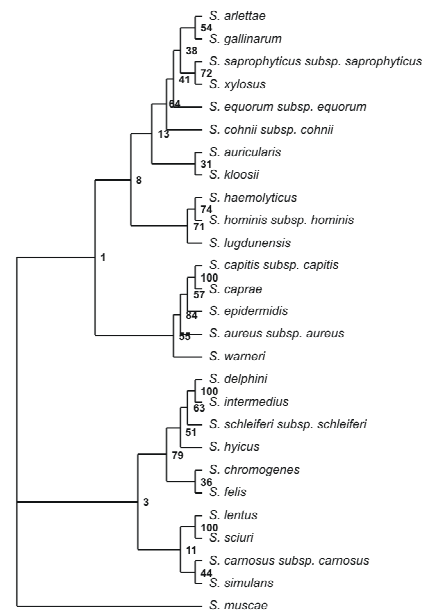
Aus den partiellen *gap*-Sequenzen wurde nun ein phylogenetischer Stammbaum erstellt (Abbildung 4.9 A.). Die verschiedenen *Staphylococcus*-Spezies wurden dabei in drei verschiedene Gruppierungen (*Cluster*) mit signifikanten *Bootstrap*-Werten >90% eingeteilt. Das erste *Cluster* wurde als *S. hyicus/S. intermedius*-Gruppe bezeichnet und umfasste *S. hyicus*, *S. chromogenes*, *S. delphini* und *S. intermedius*. Das zweite *Cluster* enthielt zwei Gruppen, die *S. sciuri*-Gruppe mit *S. sciuri* und *S. lentus*, und die *S. haemolyticus/S. simulans*-Gruppe mit *S. haemolyticus*, *S. xylosus*, *S. muscae*, *S. simulans*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, *S. carnosus* subsp. *carnosus*, *S. caprae* und *S. felis*. Das dritte *Cluster* bestand aus der *S. aureus/S. epidermidis*-Gruppe, welche *S. aureus*, *S. hominis* subsp. *hominis*, *S. warneri*, *S. epidermidis*, *S. capitis* subsp. *capitis* und *S. lugdunensis* umfasste. *Staphylococcus auricularis* und *S. cohnii* konnten keinem *Cluster* zugeordnet werden. Dasselbe traf für den Stammbaumzweig der heterogenen *S. saprophyticus*-Gruppe zu, welcher *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, *S. equorum* subsp. *equorum*, *S. gallinarum*, *S. arlettae* und *S. kloosii*, mit *Bootstrap*-Werten von 75%, 75% und 29%, umfasste. Beim Vergleich der partiellen *gap*-Sequenzen von *S. sciuri* und *S. lentus* wurden Sequenzähnlichkeiten von 82% (Abbildung 4.8) ermittelt. Der Position beider Spezies im phylogenetischen Stammbaum zueinander wird ein *Bootstrap*-Wert von 100% zugeordnet.

Auch für die aus der NCBI-Genbank entnommenen 16S rRNA-, *hsp60*-, *rpoB*-, *sodA*- und *tuf*-Sequenzen der *Staphylococcus*-Spezies wurden phylogenetische Stammbäume erstellt (Abbildung 4.9 B.-F.) und diese mit dem *gap*-Stammbaum verglichen. Betrachtet man dabei *S. felis* und *S. muscae*, so werden beide Spezies bezüglich ihrer *gap*-, *rpoB*- und *sodA*-Gensequenzen innerhalb der jeweiligen phylogenetischen Stammbäume demselben *Cluster* zugeordnet. Im Gegensatz dazu deuten die Stammbäume, die auf 16S rRNA- und *hsp60*-Sequenzen basieren, auf keine enge Verwandtschaft dieser beiden Spezies hin. *Staphylococcus hyicus* und *S. chromogenes* befinden sich bei der Analyse ihrer 16S rRNA-, *hsp60*- und *rpoB*-Sequenzen innerhalb eines *Clusters*, innerhalb des *sodA*-Stammbaums ist diese Verwandtschaft weniger eng. Die Gruppierung beider Spezies innerhalb des Stammbaums, welcher auf *gap*-Gensequenzen basiert, bekräftigt wiederum die Annahme einer engen Verwandtschaft von *S. hyicus* und *S. chromogenes*. *Staphylococcus arlettae* und *S. kloosii* wurden sowohl bei der Betrachtung des *gap*-basierten Stammbaumes (*Bootstrap*-Wert von 98%), als auch der Stammbäume der *hsp60*-, *rpoB*-, *sodA*- und 16S rRNA-Gene (*Bootstrap*-Werte < 43%) ähnlich eingeordnet. *Staphylococcus hominis* subsp. *hominis* und *S. lugdunensis* wurden entsprechend der *gap*- (*Bootstrap*-Wert von 95%), *tuf*

(*Bootstrap*-Wert von 44%)- und *hsp60*-Stammbäume (*Bootstrap*-Wert von 29%) in dasselbe *Cluster* eingeordnet, während das bei der Analyse ihrer 16S rRNA-, *rpoB*- und *sodA*-Gensequenzen jedoch nicht beobachtet werden konnte. Die Gruppierung von *S. delphini* und *S. intermedius* war innerhalb der *gap*-, 16S rRNA-, *hsp60*- und *sodA*-Stammbäume vergleichbar. Die phylogenetische Verwandtschaft von *S. chromogenes* und *S. hyicus* auf der Basis der *gap*- und *rpoB*-Stammbäume (jeweils ein *Bootstrap*-Wert von 100%) wurde von ähnlichen Gruppierungen innerhalb der Stammbäume, deren Grundlage *hsp60*-, 16S rRNA- und *sodA*-Gensequenzen waren, unterstützt. Ein hoher Verwandtschaftsgrad zwischen *S. carnosus* subsp. *carnosus* und *S. simulans* zeigte sich bei der Analyse der *gap*- (*Bootstrap*-Wert von 100%), *hsp60*-, *sodA*- (jeweils ein *Bootstrap*-Wert von 98%) und *rpoB*-Gene (*Bootstrap*-Wert von 79%). *Staphylococcus delphini* und *S. intermedius* wurden entsprechend ihrer *gap*-, 16S rRNA-, *sodA*- und *hsp60*-Sequenzen, mit *Bootstrap*-Werten von jeweils 100%, in dasselbe *Cluster* eingeordnet.

A. *gap*

## B. 16S rRNA



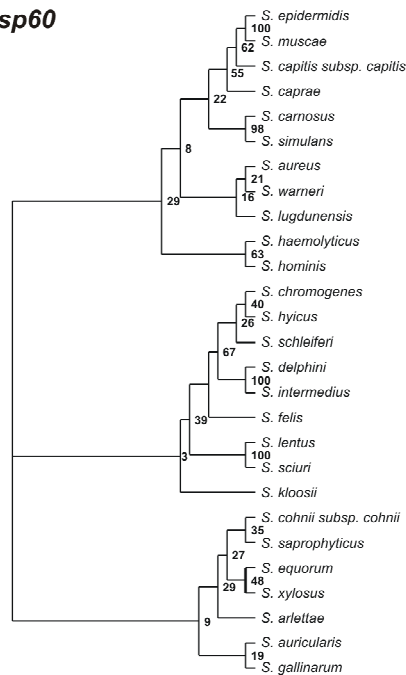
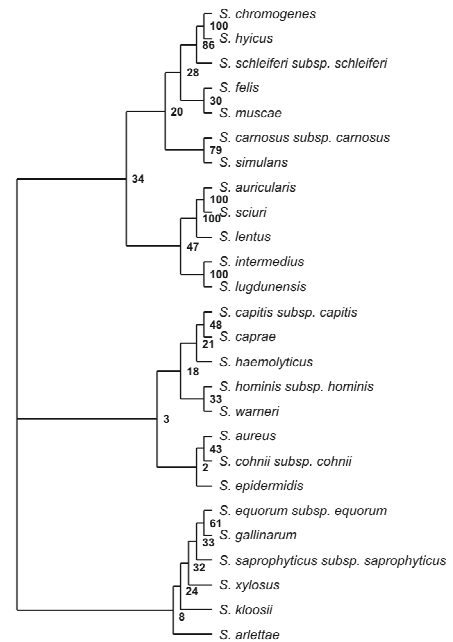
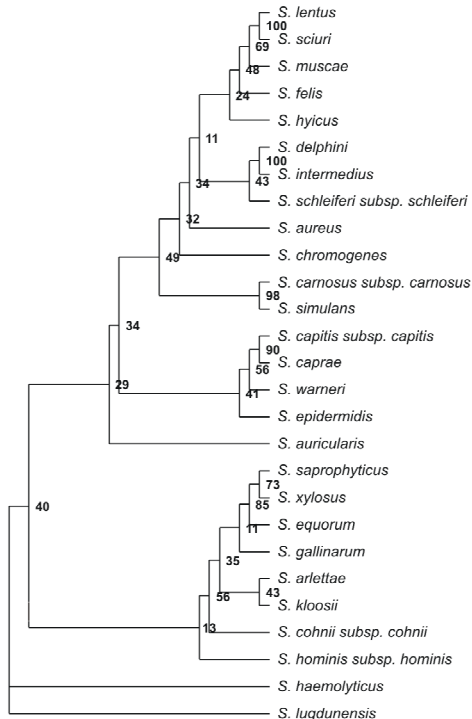
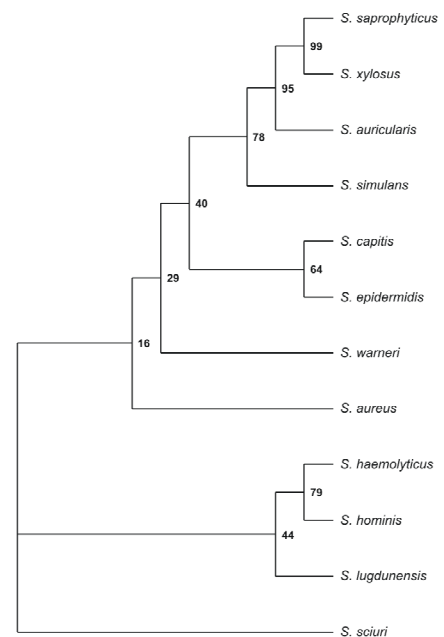
C. *hsp60*D. *rpoB*E. *sodA*F. *tuf*

Abbildung 4.9: Phylogenetische Stammbäume erstellt aus (A.) *gap*-, (B.) 16S rRNA-, (C.) *hsp60*-, (D.) *rpoB*-, (E.) *sodA*- und (F.) *tuf*-Sequenzen verschiedener *Staphylococcus*-Spezies. Die Analyse basiert auf dem *Neighbour joining*-Algorithmus mit einer *Bootstrap*-Analyse von 1000 Wiederholungen. Der angegebene Wert an den Verzweigungen zeigt an, wie oft diese Verzweigung an derselben Position der, im Verlauf der *Bootstrap*-Analyse erstellten Stammbäume, auftritt (Kapitel 3.13.5.2).

### 4.2.3 ENTWICKLUNG DER T-RFLP

Nach der partiellen Sequenzierung des *gap*-Gens bestand der nächste Schritt zum Aufbau der T-RFLP in der Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme, um die *Staphylococcus*-Spezies möglichst gut voneinander differenzieren zu können. Aus diesem Grund wurden *in silico*-Analysen unter Verwendung der erhaltenen partiellen *gap*-Sequenzen und des Programms *NEBcutter* V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) durchgeführt. Um alle 28 *Staphylococcus* spp. voneinander unterscheiden zu können, sind Restriktionen mit drei verschiedenen Enzymen, *DdeI*, *TaqI* und *BspHI*, notwendig. Zusätzlich wurden beide PCR-Primer mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen versehen, um den Informationsgehalt der Proben zu erhöhen. Somit wurden nach der Restriktion in der sich anschließenden Fragmentanalyse im Sequenzierer nur die Größen der mit Fluoreszenz markierten terminalen Enden bestimmt (Abbildung 4.10).

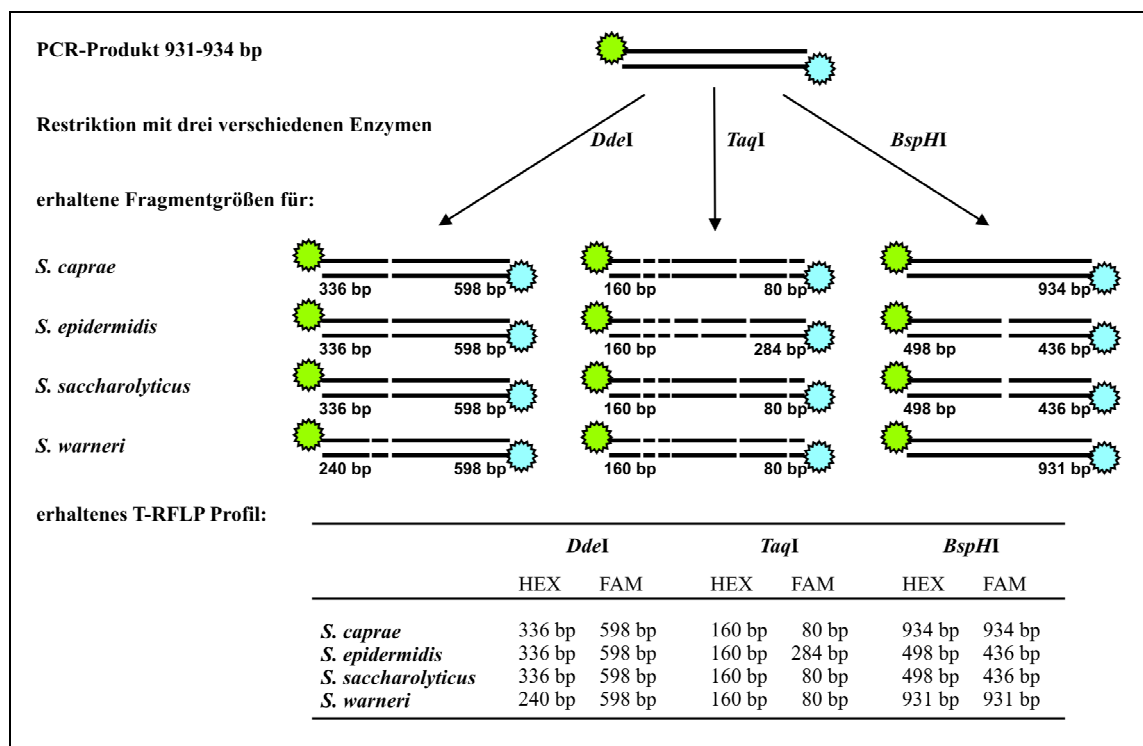


Abbildung 4.10: Schema zur Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme für die *gap*-basierte T-RFLP am Beispiel ausgewählter *Staphylococcus*-Spezies. Das PCR-Produkt wird mit fluoreszenzmarkierten Primern generiert und im Anschluss mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. Nach der Fragmentanalyse ergibt sich für jede Spezies ein charakteristisches T-RFLP-Profil (grün: HEX-markiertes terminales Ende; blau: FAM-markierte terminales Ende).

Betrachtet man zum Beispiel *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. saccharolyticus* und *S. warneri*, so erhielt man als Ergebnis der Restriktion mit *DdeI* zwei verschiedene Muster. Nur *S. warneri* konnte in diesem Fall von den anderen drei Spezies unterschieden werden. Verwendet man *TaqI* als zweites Restriktionsenzym, so waren die *DdeI/TaqI* T-RFLP Muster für *S. epidermidis* und *S. warneri* einmalig. Diese

konnten eindeutig von den anderen zwei Spezies unterschieden werden. Um *S. caprae* und *S. saccharolyticus* differenzieren zu können, wurde zusätzlich eine Restriktion mit *BspHI* durchgeführt. Nur das PCR-Produkt von *S. saccharolyticus* wurde durch *BspHI* geschnitten, womit sich bei Verwendung von *DdeI/TaqI/BspHI* auch für *S. caprae* und *S. saccharolyticus* einmalige T-RFLP-Muster zur Identifizierung ergaben. Nur in der Kombination aller drei Restriktionsenzyme und mit zwei verschiedenen, terminalen Markierungen der PCR-Produkte konnten die hier aufgeführten *Staphylococcus* spp. differenziert werden.

Um Referenzmuster zur Identifizierung und Differenzierung der Staphylokokken zu erstellen, wurde die T-RFLP mit 28 verschiedenen *Staphylococcus* spp. Referenzstämmen durchgeführt. Für jeden Referenzstamm wurde das T-RFLP-Profil drei Mal aus unabhängigen Versuchen ermittelt, um gesicherte Daten zu erhalten, die dann die Grundlage für alle folgenden Identifizierungen bildeten. In Abbildung 4.11 sind die Ergebnisse der Fragmentanalyse für *S. epidermidis* DSM 20044 zu sehen. Die Profile der anderen Referenzstämmen sind dem Anhang (Abbildung 8.1) zu entnehmen. Tabelle 4.8 fasst die erhaltenen Größen der terminalen Restriktionsfragmente und damit die individuellen T-RFLP-Profile für jeden Stamm zusammen.



Abbildung 4.11: T-RFLP-Profil von *S. epidermidis* DSM 20044 nach Restriktion mit *DdeI* (A.), *TaqI* (B.) und *BspHI* (C.). Die x-Achse entspricht der Fragmentgröße in bp und die y-Achse zeigt die Fluoreszenzintensität in relativen Fluoreszenzeinheiten. (\* HEX-markierte Fragmente; Δ FAM-markierte Fragmente)



Tabelle 4.8: Terminale Fragmentgrößen (in bp) für die *Staphylococcus* spp. Referenzstämme.

Stamm	Referenz <sup>a</sup>	Fragmentgrößen in bp nach Restriktion mit folgenden Enzymen:					
		<i>DdeI</i>		<i>TaqI</i>		<i>BspHI</i>	
		Markierung					
		HEX	FAM	HEX	FAM	HEX	FAM
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	CCM 883	204,97	297,25	59,57	680,06	496,64	432,13
<i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i>	DSM 20674	203,15	447,06	247,57	79,76	496,85	432,97
<i>S. gallinarum</i>	CCM 3572	205,13	593,67	58,94	80,15	k.S. <sup>b</sup>	k.S.
<i>S. arlettae</i>	DSM 20672	203,60	691,07	59,39	80,15	k.S.	k.S.
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	DSM 20260	205,68	691,29	59,01	187,04	496,99	433,65
<i>S. xylosus</i>	CCM 2725	204,81	725,55	247,63	80,07	496,25	431,49
<i>S. lentus</i>	CCM 3472	239,59	298,34	58,81	80,49	k.S.	k.S.
<i>S. muscae</i>	CCM 4175	240,26	592,71	64,88	80,42	k.S.	k.S.
<i>S. warneri</i>	DSM 20316	239,80	593,17	161,34	79,81	k.S.	k.S.
<i>S. kloosii</i>	DSM 20676	239,98	672,77	59,04	80,21	k.S.	k.S.
<i>S. intermedius</i>	DSM 20373	239,94	689,64	58,74	80,42	k.S.	k.S.
<i>S. hyicus</i>	DSM 20459	240,21	690,03	852,23	80,38	k.S.	k.S.
<i>S. auricularis</i>	ATCC 33753	239,51	693,51	202,00	80,88	496,04	59,67
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	ATCC 43808	335,49	594,26	852,66	80,51	k.S.	k.S.
<i>S. saccharolyticus</i>	Isolat	335,24	595,31	161,59	79,81	495,99	434,26
<i>S. epidermidis</i>	DSM 20044	334,83	596,01	161,50	283,37	497,27	436,05
<i>S. caprae</i>	CCM 3573	334,78	596,80	161,26	80,07	k.S.	k.S.
<i>S. aureus</i>	Isolat	335,55	596,90	248,24	80,51	k.S.	k.S.
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	CCM 2732	392,15	51,00	248,45	80,54	k.S.	k.S.
<i>S. haemolyticus</i>	CCM 1798	392,07	537,25	249,17	79,55	k.S.	k.S.
<i>S. lugdunensis</i>	DSM 4804	392,70	538,72	58,68	283,74	k.S.	k.S.
<i>S. felis</i>	ATCC 49168	448,45	298,41	59,15	120,94	k.S.	k.S.
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	Isolat	875,31	51,00	248,38	80,50	k.S.	k.S.
<i>S. sciuri</i>	CCM 3473	k.S.	k.S.	59,00	620,32	k.S.	k.S.
<i>S. delphini</i>	DSM 20771	k.S.	k.S.	59,07	80,56	760,70	167,16
<i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i>	DSM 20501	k.S.	k.S.	59,41	281,87	497,06	433,82
<i>S. simulans</i>	CCM 2705	k.S.	k.S.	59,93	79,77	496,57	432,42
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	CCM 2734	k.S.	k.S.	161,33	80,14	k.S.	k.S.
<i>S. chromogenes</i>	CCM 3387	k.S.	k.S.	k.S.	k.S.	k.S.	k.S.

<sup>a</sup>: DSM: Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; ATCC: *American Type Culture Collection*; CCM: *Czech Collection of Mikroorganisms*; <sup>b</sup>k.S.: keine Schnittstelle vorhanden

Die erhaltenen T-RFLP-Profile der Referenzstämme konnten durch die Analyse diverser klinischer Isolate vielfach reproduziert werden und diese Methode zur Identifizierung von *Staphylococcus*-Spezies erfolgreich in unserem Labor etabliert werden. Fast alle klinischen Isolate zeigten ein T-RFLP-Profil, was identisch mit dem Profil des jeweiligen Referenzstammes war. Nur bei der Analyse von *S. hominis*-Isolaten trat zusätzlich ein T-RFLP-Muster auf, welches nicht dem des Referenzstammes entsprach. Die Identität dieser Isolate wurde mittels partieller Sequenzierung des 16S rRNA-Gens nochmals überprüft und das zusätzliche T-RFLP-Profil für *S. hominis* subsp. *hominis* in die Liste der Referenzstämme für T-RFLP aufgenommen (Tabelle 4.8).

Zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit der *gap*-basierten T-RFLP wurden die Größen der terminalen Fragmente von 34 klinischen *S. epidermidis*-Stämmen und 28 klinischen *S. haemolyticus*-Isolaten mit den theoretisch berechneten Fragmentgrößen verglichen (Tabelle 4.9). Die Abweichung zwischen den erhaltenen und den theoretisch berechneten Fragmentgröße lag im Bereich von  $-2$  bis  $+2$  bp. Die Verteilung der T-RF-Größen ist in Abbildung 4.12 für *S. haemolyticus* und in Abbildung 4.13 für *S. epidermidis* anhand von Quantile-Quantile-Plots (Q-Q-Plots) dargestellt. Annähernd lineare Plots kennzeichnen dabei eine geringe Variation der Fragmentgröße verschiedener Isolate innerhalb einer Spezies. Die meisten dargestellten Plots sind als linear zu bezeichnen und beweisen die hohe Reproduzierbarkeit der *gap*-basierten T-RFLP. Abweichungen von linearen Plots treten bei Fragmentgrößen größer als 500 bp und kleiner als 80 bp auf.

Tabelle 4.9: Genauigkeit der T-RFLP bei klinischen *S. epidermidis* und *S. haemolyticus* Isolaten im Vergleich zur *in silico* ermittelten T-RF-Größe.

	Fragmentgrößen in bp nach Restriktion mit folgenden Enzymen:					
	<i>DdeI</i>		<i>TaqI</i>		<i>BspHI</i>	
	Markierung					
	HEX	FAM	HEX	FAM	HEX	FAM
<i>S. epidermidis</i> (n = 34)						
Ø experimentell ermittelt	335,25	596,67	161,70	283,62	497,04	435,96
theoretisch berechnet	336,00	598,00	160,00	284,00	498,00	436,00
Δbp	-0,75	-1,33	+1,70	-0,38	-0,96	-0,04
<i>S. haemolyticus</i> (n = 28)						
Ø experimentell ermittelt	392,30	536,67	248,70	79,72	k.S. <sup>a</sup>	k.S.
theoretisch berechnet	394,00	537,00	248,00	80,00	k.S.	k.S.
Δbp	-1,70	-0,33	+0,70	-0,28	-	-

<sup>a</sup>k.S.: keine Schnittstelle vorhanden

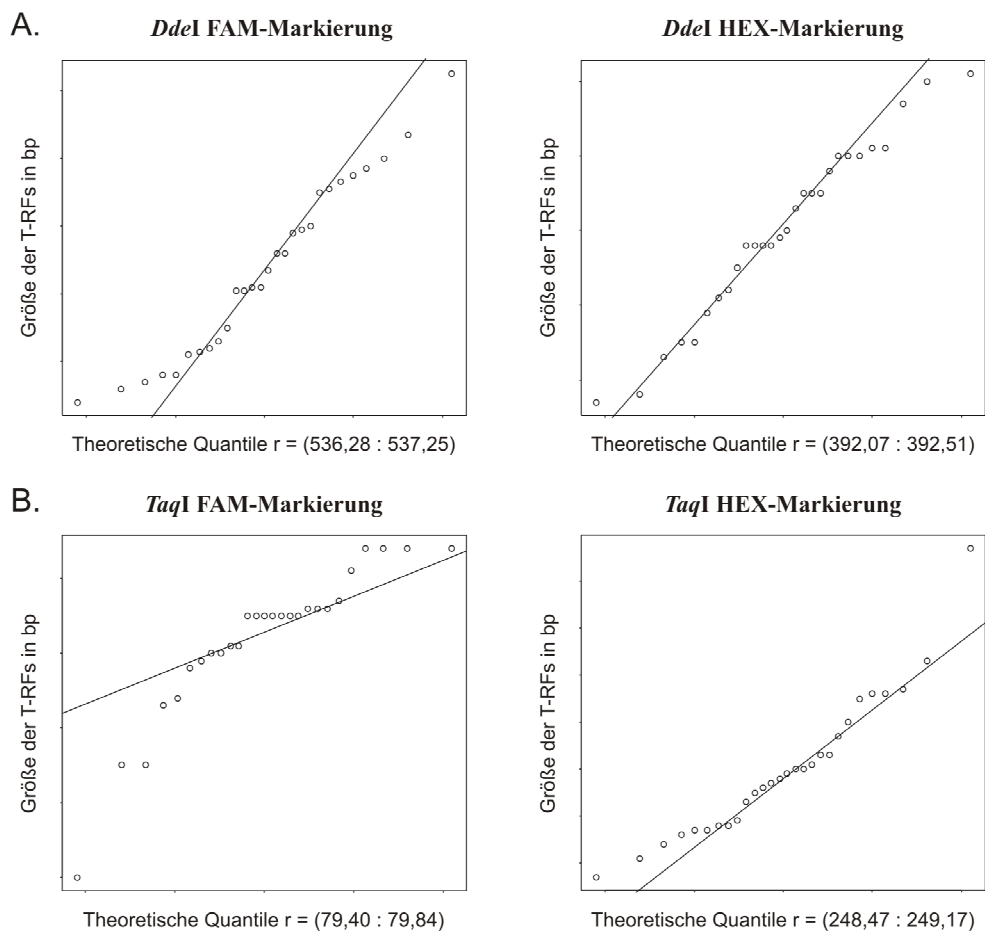


Abbildung 4.12: Variabilität und Verteilung der T-RF-Größen (in bp) für 28 klinische *S. haemolyticus* Isolate. Die Abbildung zeigt Quantile-Quantile Plots der T-RF-Daten nach Restriktion mit (A.) *DdeI* und (B.) *TaqI*. Die geordneten T-RF Werte (in bp; y-Achse) werden gegen die Quantilen einer Normalverteilung (x-Achse) aufgetragen und durch die erste und dritte Quantile wird eine Achse gezogen. Ein annähernd linearer Plot kennzeichnet eine Normalverteilung. ( $r = \text{range} [\text{Minimumwert}; \text{Maximumwert}]$ ).

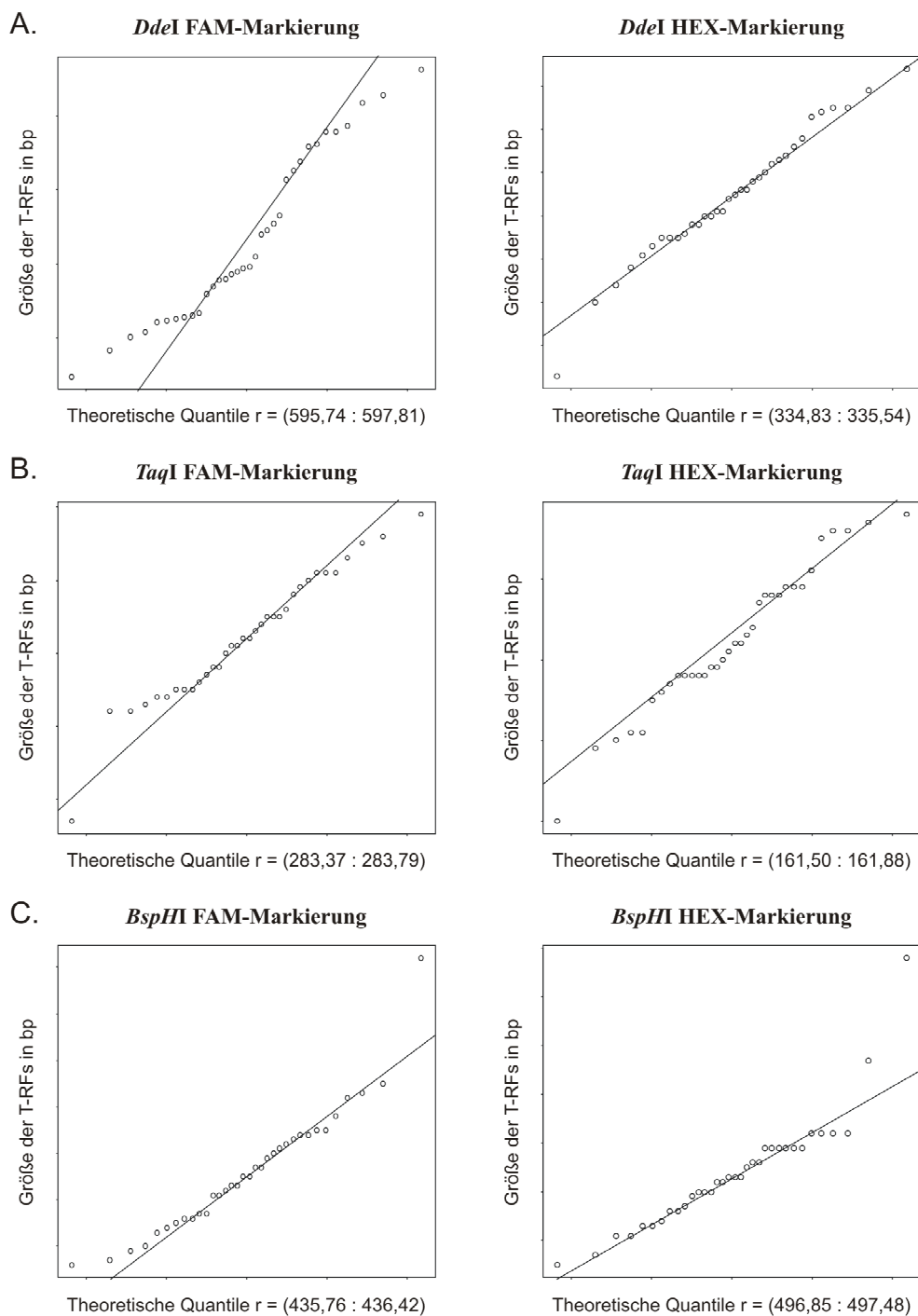


Abbildung 4.13: Variabilität und Verteilung der T-RF-Größen (in bp) für 34 klinische *S. epidermidis* Isolate. Die Abbildung zeigt Quantile-Quantile Plots der T-RF-Daten nach Restriktion mit (A.) *DdeI*, (B.) *TaqI* und (C.) *BspHI*. Die geordneten T-RF Werte (in bp; y-Achse) werden gegen die Quantilen einer Normalverteilung (x-Achse) aufgetragen und durch die erste und dritte Quantile wird eine Achse gezogen. Ein annähernd linearer Plot kennzeichnet eine Normalverteilung. ( $r = \text{range}$  [Minimumwert; Maximumwert]).

#### 4.2.4 VERGLEICHENDE IDENTIFIZIERUNG VON STAPHYLOKOKKEN

Die klassischen phänotypischen Methoden zur Identifizierung, basierend auf den biochemischen Reaktionen der Staphylokokken, sind oft nicht verlässlich. Aber klinisch wichtige *Staphylococcus*-Spezies müssen durch eine sichere und reproduzierbare Methode identifiziert werden. Die in dieser Arbeit entwickelte genotypische Identifizierung mit der *gap*-basierten T-RFLP wurde nun mit herkömmlichen phänotypischen Identifizierungssystemen verglichen.

Die *Staphylococcus*-Referenzstämme wurden parallel mit der T-RFLP und den phänotypischen Systemen, d.h. dem Phoenix<sup>™</sup>-, dem Vitek<sup>®</sup>2- und dem ATB-System, identifiziert und die Ergebnisse verglichen. Die detaillierten Ergebnisse sind in Tabelle 4.10 und eine Zusammenfassung in Tabelle 4.11 zu sehen. Mit dem Vitek<sup>®</sup>2-System und der ID-GPC-Karte wurden 10 (38,46%) der 26 Stämme korrekt auf Spezies-Ebene identifiziert. Drei (11,54%) Stämme wurden zwar richtig identifiziert, allerdings nicht zu 100%, auch andere Ergebnisse wären hier möglich gewesen. Vier (15,38%) Stämme wurden falsch identifiziert, einen (3,85%) Stamm konnte das Gerät nicht identifizieren und acht (30,77%) konnten nicht bestimmt werden, da sie in der Datenbank des Vitek<sup>®</sup>2 nicht vorhanden waren. Mit der neuen GP-Karte des Vitek<sup>®</sup>2-Systems konnten 19 (73,08%) der Referenzstämme korrekt identifiziert werden. Ein (3,85%) Stamm wurde richtig identifiziert, aber nicht mit 100%iger Wahrscheinlichkeit. Vier (15,38%) Stämme wurden falsch identifiziert, drei (11,54%) Stämme konnten nicht identifiziert werden und drei (11,54%) Stämme waren nicht in der Datenbank des Systems. Die Weiterentwicklung der GPC-Karte, die GP-Karte, zeigte somit bessere und sicherere Ergebnisse bei der Analyse der Referenzstämme mit dem Vitek<sup>®</sup>2. Von den Referenzstämmen identifizierte das Phoenix<sup>™</sup>-System 17 (65,38%) korrekt und fünf (19,23%) falsch. Dieses System konnte *S. arlettae*, *S. delphini* und *S. muscae* nicht identifizieren, da diese Stämme in der Datenbank nicht enthalten waren. Das ATB ID32 STAPH-System, welches in vielen Laboratorien die bevorzugte Referenzmethode ist, identifizierte einen Stamm (*S. kloosii*) falsch. Drei Referenzstämme (*S. delphini*, *S. felis*, *S. muscae*) befanden sich nicht in der Datenbank des Systems und konnten somit auch nicht identifiziert werden. Auch mit diesem System wurden Ergebnisse erhalten, die den Stamm (*S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. cohnii*) nicht exakt, mit weniger als 100%iger Wahrscheinlichkeit, identifizierten. In einigen Fällen wurde zur endgültigen Identifizierung der Spezies die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens angeschlossen.

Tabelle 4.10: Ergebnisse der Identifizierungen mit der ID-GPC und der ID-GP Karte des Vitek®2, der ID-13 Karte des Phoenix™ und des ATB ID32 STAPH für die *Staphylococcus*-Referenzstämme.

Stamm	Referenz <sup>a</sup>	Phoenix™ ID-13	Vitek®2		ATB ID32 STAPH
			ID-GPC	ID-GP	
<i>S. arlettae</i>	DSM 20672	n.m. <sup>b</sup>	n.m.	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> (51%) <i>S. warneri</i> (49%)	<i>S. arlettae</i>
<i>S. auricularis</i>	ATCC 33753	<i>S. warneri</i>	<i>S. auricularis</i>	<i>S. auricularis</i>	<i>S. auricularis</i>
<i>S. capitis</i>	CCM 2734	<i>S. capitis</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. capitis</i>
subsp. <i>capitis</i>		subsp. <i>capitis</i>			
<i>S. caprae</i>	CCM 3573	<i>S. caprae</i>	n.m.	<i>S. caprae</i>	<i>S. caprae</i>
<i>S. carnosus</i>	DSM 20501	<i>S. carnosus</i>	n.m.	<i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i>	<i>S. carnosus</i>
subsp. <i>carnosus</i>					
<i>S. chromogenes</i>	CCM 3387	<i>S. capitis</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>
		subsp. <i>ureolyticus</i>	(96%), <i>S. hyicus</i> (95%)		
<i>S. cohnii</i>	DSM 20260	<i>S. capitis</i>	<i>Kocuria rosea</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>S. cohnii</i> (46%)
subsp. <i>cohnii</i>		subsp. <i>capitis</i>		<i>viridans</i>	
<i>S. delphini</i> <sup>d</sup>	DSM 20771	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
<i>S. epidermidis</i>	DSM 20044	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>S. equorum</i>	DSM 20674	<i>S. equorum</i>	n.m.	<i>S. quorum</i>	<i>S. equorum</i>
subsp. <i>equorum</i>					
<i>S. felis</i> <sup>d</sup>	ATCC 49168	<i>S. felis</i>	n.m.	n.m.	n.m.
<i>S. gallinarum</i>	CCM 3572	<i>S. gallinarum</i>	n.m.	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. gallinarum</i>
<i>S. haemolyticus</i>	CCM 1798	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
<i>S. hominis</i>	CCM 2732	<i>S. hominis</i>	<i>S. warneri</i> (87%) <i>S. hominis</i> (86%)	<i>S. hominis</i>	<i>S. hominis</i>
subsp. <i>hominis</i>					
<i>S. hyicus</i>	DSM 20459	<i>S. hyicus</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. hyicus</i> (51%) <i>S. chromogenes</i> (49%)	<i>S. hyicus</i> (54%) <i>S. chromogenes</i> (46%)
<i>S. intermedius</i>	DSM 20373	<i>S. hyicus</i>	<i>S. simulans</i> (14%) <i>S. chromogenes</i> (11%)	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. xylosus</i> <i>S. intermedius</i>
<i>S. kloosii</i>	DSM 20676	<i>S. schleiferi</i>	<i>S. schleiferi</i> (77%) <i>S. chromogenes</i> (75%)	<i>S. schleiferi</i>	<i>S. schleiferi</i>
<i>S. lentus</i>	CCM 3472	<i>S. lentus</i>	keine ID	<i>S. lentus</i>	<i>S. lentus</i>
<i>S. lugdunensis</i>	DSM 4804	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. schleiferi</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. lugdunensis</i>
<i>S. muscae</i> <sup>d</sup>	CCM 4175	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
<i>S. saprophyticus</i>	CCM 883	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. chromogenes</i> (48%) <i>S. saprophyticus</i> (46%)	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>
subsp. <i>saprophyticus</i>					
<i>S. schleiferi</i>	ATCC 43808	<i>S. schleiferi</i>	<i>S. schleiferi</i>	<i>S. schleiferi</i>	<i>S. schleiferi</i>
subsp. <i>schleiferi</i>		subsp. <i>schleiferi</i>			
<i>S. sciuri</i>	CCM 3473	<i>S. sciuri</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>S. sciuri</i>
<i>S. simulans</i>	CCM 2705	<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>
<i>S. warneri</i>	DSM 20316	<i>S. warneri</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. warneri</i>
<i>S. xylosus</i>	CCM 2725	keine ID	<i>S. xylosus</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. xylosus</i>

<sup>a</sup>DSMZ, Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; ATCC: *American Type Culture Collection*; CCM: *Czech Collection of Microorganisms*; <sup>b</sup>n.m.: Identifizierung dieser Spezies ist mit dem Systems nicht möglich; <sup>c</sup>MRSA, Epidemiestamm von 1996; <sup>d</sup>zusätzliche Sequenzierung des 16S rRNA-Gens zur Validierung der Spezies

Tabelle 4.11: Zusammenfassung der Identifizierungen für die *Staphylococcus*-Referenzstämme.

	T-RFLP	Phoenix™ ID-13	Vitek®2		ATB ID32 STAPH
			ID-GPC	ID-GP	
Referenzstämme (n)	26	26	25	26	26
korrekte Identifizierung	26	17	12	19	22
keine Identifizierung	0	1	1	0	0
falsche Identifizierung	0	5	4	4	1
nicht in der Datenbank des Systems	0	3	8	3	3

Im Anschluss wurden klinische Koagulase-negative Staphylokokken-Isolate mit den verschiedenen Identifizierungssystemen differenziert. Mittels T-RFLP wurden die 86 Isolate als *S. capitis* ( $n = 6$ ), *S. cohnii* subsp. *cohnii* ( $n = 1$ ), *S. epidermidis* ( $n = 42$ ), *S. haemolyticus* ( $n = 30$ ), *S. hominis* ( $n = 4$ ), *S. lugdunensis* ( $n = 1$ ), *S. simulans* ( $n = 1$ ) und *S. warneri* ( $n = 1$ ) identifiziert (siehe Tabelle 4.12).

Tabelle 4.12: Ergebnisse der Identifizierungen für 86 klinische *Staphylococcus*-Isolate, die unter Verwendung der ID-GP Karte des Vitek<sup>®</sup>2, der ID-13 Karte des Phoenix<sup>™</sup> und der *gap*-basierten T-RFLP erhalten wurden.

<i>n</i> ( <i>n</i> = 86)	T-RFLP	Phoenix <sup>™</sup> ID-13	Vitek <sup>®</sup> 2 ID-GP	ATB ID32 STAPH	endgültige ID
6	<i>S. capitis</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. capitis</i>		<i>S. capitis</i>
1	<i>S. cohnii</i>	<i>S. capri</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. cohnii</i>
31	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>		<i>S. epidermidis</i>
1	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
2	<i>S. epidermidis</i>	keine ID	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
3	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
1	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
1	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. hominis</i>		<i>S. epidermidis</i> <sup>a</sup>
1	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
1	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i> <sup>a</sup>
1	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
24	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>		<i>S. haemolyticus</i>
1	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
1	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. lentus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
2	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
1	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. caprae</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
1	<i>S. haemolyticus</i>	keine ID	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
3	<i>S. hominis</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. hominis</i>		<i>S. hominis</i>
1	<i>S. hominis</i>	keine ID	<i>S. hominis</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. hominis</i>
1	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. lugdunensis</i>		<i>S. lugdunensis</i>
1	<i>S. simulans</i>	<i>S. pasteurii</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>
1	<i>S. warneri</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. lentus</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. warneri</i>

<sup>a</sup> zusätzliche Sequenzierung des 16S rRNA-Gens zur Validierung der endgültigen ID; in beiden Fällen wurde *S. epidermidis* erhalten

Für die Analyse mit dem Vitek<sup>®</sup>2-System wurde nur die neue GP-Karte verwendet, da diese eine Weiterentwicklung der GPC-Karte ist und mehr Stämme in deren Datenbank aufgenommen wurden. Tabelle 4.13 ist zu entnehmen, dass das Vitek<sup>®</sup>2 sechs (6,98%) Stämme falsch identifizierte. Zwei *S. epidermidis*-Stämme wurden dabei falsch als *S. hominis* bestimmt, drei *S. haemolyticus*-Isolate wurden falsch als *S. lentus* und *S. warneri* identifiziert und ein *S. warneri* wurde als *S. lentus* bestimmt. Das Phoenix<sup>™</sup>-System ordnete 12 (13,95%) Isolaten die falsche Spezies zu. Die acht falsch identifizierten klinischen *S. epidermidis*-Isolate wurden fünf verschiedenen Spezies

(*S. warneri*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. aureus*, *S. cohnii*) zugeordnet. Weiterhin wurden zwei *S. haemolyticus*-Stämme falsch als *S. epidermidis* und *S. caprae* bestimmt. Vier Isolate (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*) konnten von diesem System nicht identifiziert werden. In Tabelle 4.13 sind die Ergebnisse der Identifizierungen mit dem Vitek<sup>®</sup>2, dem Phoenix<sup>™</sup> und der *gap*-basierten T-RFLP für alle klinischen Isolate zusammengefasst.

Tabelle 4.13: Zusammenfassung der Identifizierungen für die klinischen *Staphylococcus*-Isolate.

	T-RFLP	Phoenix <sup>™</sup>	Vitek <sup>®</sup> 2	ATB
		ID-13	ID-GP	ID32 STAPH
klinische Isolate ( <i>n</i> )	86	86	86	20
korrekte Identifizierung	86	70	80	19
keine Identifizierung	0	4	0	0
falsche Identifizierung	0	12	6	1
nicht in der Datenbank des Systems	0	0	0	0

Im Bezug auf die Ergebnisse der T-RFLP identifizierte das Vitek<sup>®</sup>2-System 70 (81,40%) Isolate korrekt und das Phoenix<sup>™</sup> konnte 80 (93,02%) Isolaten die richtige Spezies zuordnen. Die Resultate für die verschiedenen Staphylokokken-Spezies sind in Tabelle 4.14 zusammengefasst.

Tabelle 4.14: Übereinstimmung der erhaltenen Ergebnisse der Identifizierungen der klinischen *Staphylococcus*-Isolate mit den automatischen Systemen und der T-RFLP.

Endgültige Identifikation ( <i>n</i> )	Anzahl ( <i>n</i> / %) der korrekt identifizierten Isolate mit folgenden Systemen:		
	T-RFLP	Phoenix <sup>™</sup>	Vitek <sup>®</sup> 2
		ID-13	ID-GP
<i>S. capitis</i> (6)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)
<i>S. cohnii</i> (1)	1 (100%)	0 (0%)	0 (100%)
<i>S. epidermidis</i> (42)	42 (100%)	32 (76,19%)	32 (95,24%)
<i>S. haemolyticus</i> (30)	30 (100%)	27 (90%)	27 (90%)
<i>S. hominis</i> (4)	4 (100%)	3 (75%)	3 (100%)
<i>S. lugdunensis</i> (1)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
<i>S. simulans</i> (1)	1 (100%)	0 (0%)	0 (100%)
<i>S. warneri</i> (1)	1 (100%)	1 (100%)	1 (0%)

Fasst man die Ergebnisse des zweiten Abschnitts zusammen so konnte gezeigt werden, dass die hier entwickelte *gap*-basierte T-RFLP eine spezifische und zuverlässige Methode ist, um *Staphylococcus* spp. zu identifizieren. Obwohl die



Identifizierungskarten phänotypischer Systeme laufend aktualisiert werden und somit immer besser werden, ist die genotypische Identifizierung der T-RFLP bei der akkuraten Differenzierung von verschiedenen *Staphylococcus*-Spezies diesen Systemen immer noch überlegen.

### **4.3 STAPHYLOCOCCUS-SPEZIES ALS POTENTIELLE VIRULENZFAKTOREN IN BAKTERIELLEN HAUTINFEKTIONEN**

Die Kolonisierung und Infektion mit Staphylokokken ist ein ernstzunehmender Faktor in bakteriellen Hautinfektionen, speziell bei atopischer Dermatitis (AD). Das Epithel der Haut bietet als physikalische Barriere einen Schutz gegen potentiell pathogene Mikroorganismen. Daneben sind Epithelien auch ein Bestandteil der angeborenen Immunantwort und bilden in diesem Zusammenhang zum Beispiel antimikrobielle Peptide als chemische Barriere.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden *Staphylococcus*-Isolate von Patienten mit atopischer Dermatitis identifiziert und auf ihre Virulenzfaktoren hin untersucht. Anschließend wurden epitheliale Zellen mit diesen Isolaten und den jeweiligen Referenzstämmen infiziert und deren Einfluss auf die Induktion der angeborenen Immunantwort näher betrachtet.

#### **4.3.1 CHARAKTERISIERUNG DER STAPHYLOKOKKEN-ISOLATE**

Die klinischen Staphylokokken-Isolate von Patienten mit atopischer Dermatitis wurden zuerst identifiziert. Dafür wurden zum einen das Phoenix<sup>TM</sup> und zum anderen die *gap*-basierte T-RFLP verwendet (Tabelle 4.15). Für vier der 15 Isolate wurden mit der phänotypischen Identifizierung andere Ergebnisse erhalten als mit der genotypischen Identifizierung. KCK8 wurde vom Phoenix<sup>TM</sup> als *S. hominis* identifiziert, während die T-RFLP *S. epidermidis* ergab. Für das Isolat KCK10 wurde mit dem Phoenix<sup>TM</sup> *S. epidermidis* und mit der T-RFLP *S. haemolyticus* erhalten. Das mit dem Phoenix<sup>TM</sup> als *S. chromogenes* identifizierte Isolat KCK11 zeigte bei der genotypischen Identifizierung das charakteristische T-RFLP-Profil für *S. epidermidis*. Die Ergebnisse für das Isolat KCK18 waren *S. capitis* mit dem Phoenix<sup>TM</sup> und *S. aureus* unter Verwendung der T-RFLP.

Tabelle 4.15: Identifizierung und Charakterisierung der Staphylokokken-Isolate von Patienten mit atopischer Dermatitis. Die Identifizierungen wurden vergleichend mit dem Phoenix™ und der *gap*-basierten T-RFLP durchgeführt. Zusätzlich sind die Virulenzfaktoren der verschiedenen Isolate angegeben.

Stamm-Nr.	VITEK®2 ID-GP	T-RFLP	Virulenzfaktor(en)
KCK1	<i>S. hominis</i>	<i>S. hominis</i>	keine
KCK3	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	γ-Hämolysin, Leukozidin LukED
KCK4	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	γ-Hämolysin, Leukozidin LukED
KCK5	<i>S. scheiferei</i>	<i>S. scheiferei</i>	keine
KCK6	<i>S. capitis</i>	<i>S. capitis</i>	keine
KCK7	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	keine
KCK8	<i>S. hominis</i>	<i>S. epidermidis</i>	keine
KCK10	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	keine
KCK11	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	keine
KCK12	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. capitis</i>	keine
KCK14	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	keine
KCK15	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	γ-Hämolysin, Leukozidin LukED
KCK16	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	keine
KCK17	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	γ-Hämolysin, Leukozidin LukED
KCK18	<i>S. capitis</i>	<i>S. aureus</i>	keine

Im Anschluss wurden die Staphylokokken-Isolate auf das Vorhandensein von Genen für verschiedene Virulenzfaktoren untersucht (Abbildung 4.15). Dazu zählten das *mecA*-Gen bei *S. aureus*-Isolaten, Gene für das γ-Hämolysin (*hlgA*, *hlgB/C*), das Leukozidin LukED (*lukE/D*), das Panton-Valentine-Leukozidin (*lukPV*) und die Gene für die Toxine SEA-SEE (*sea-see*), SEG-SEJ (*seg-sej*) und TSST-1 (*tst*). Bei keinem der *S. aureus*-Isolate konnte das *mecA*-Gen nachgewiesen werden. Vier Stämme, darunter drei *S. aureus*-Isolate und ein *S. epidermidis*-Isolat, besaßen die Gene für γ-Hämolysin. Die Gene für das Leukozidin LukED konnten ebenfalls genau diesen vier Isolaten zugeordnet werden. Bei keinem der Staphylokokken-Isolate konnten die Gene für das Panton-Valentine-Leukozidin oder eines der Toxingene nachgewiesen werden (Tabelle 4.15).

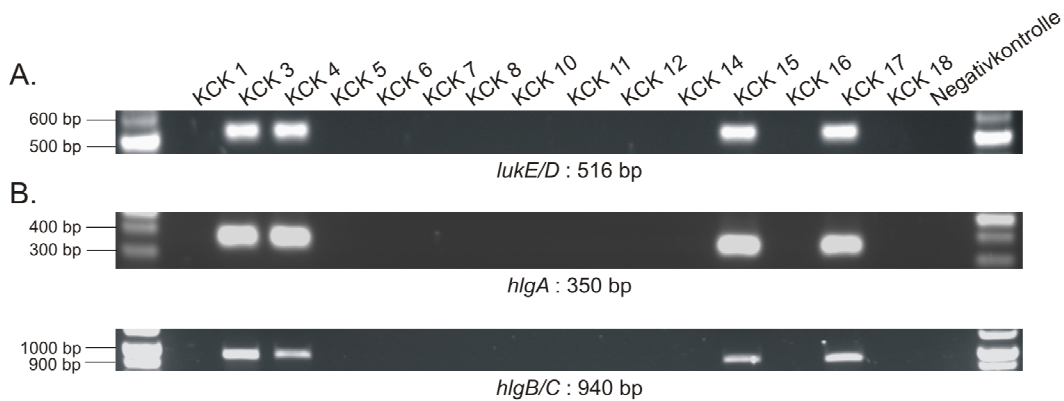


Abbildung 4.14: Erhaltene PCR-Ergebnisse der klinischen *Staphylococcus*-Isolate von AD-Patienten zur Detektion der Gene für (A.) das Leukozidin LukED (*lukE/D*) und (B.) für  $\gamma$ -Hämolysin (*hlgA* bzw. *hlgB/C*).

### 4.3.2 INDUKTION DER ANGEBORENEN IMMUNANTWORT IN EPITHELIALEN ZELLEN DURCH *STAPHYLOCOCCUS*-SPEZIES

Die angeborene Immunantwort ist unter anderem durch die Bildung von Interleukinen und antimikrobiellen Peptiden charakterisiert (Kapitel 1.4 und 1.5). In dieser Arbeit wurde die Sekretion der Interleukine IL-6 und IL-8, sowie die Induktion der antimikrobiellen Peptide hBD1, hBD2, hBD3 und LL-37 in Infektionen mit ausgewählten Referenzstämmen im Vergleich zu den klinischen Isolaten analysiert. Zu diesem Zweck wurden HaCaT-Zellen mit dem jeweiligen Stamm infiziert (Abbildung 4.15) und sowohl die sekretierten Mengen an IL-6 und IL-8 als auch die Expression der mRNA von hBD1, hBD2, hBD3 und LL-37 untersucht. Die Ergebnisse sind im Folgenden zusammenfassend dargestellt.

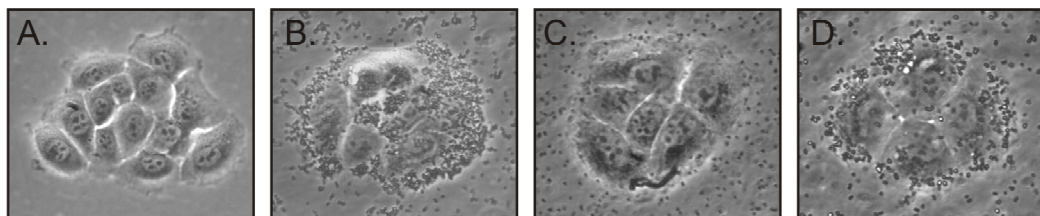


Abbildung 4.15: Mikroskopische Aufnahme von HaCaT-Zellen nach Infektion mit verschiedenen *Staphylococcus*-Spezies. HaCaT-Zellen wurden mit den jeweiligen Stämmen (MOI = 50) für 4h infiziert. Vergleichend zur (A.) nicht infizierten Kontrolle sind die Zellen nach Infektion mit (B.) *S. schleiferi* KCK5, (C.) *S. epidermidis* KCK4 oder (D.) *S. haemolyticus* KCK10 dargestellt.

#### 4.3.2.1 INDUKTION PROINFLAMMATORISCHER ZYTOKINE

Die verwendeten Keratinozyten produzierten im nicht infizierten Zustand bereits eine geringe Menge an IL-6 von 11 pg/ml. Im Verlauf der Infektionen mit den Referenzstämmen und den verschiedenen Isolaten konnte zu jedem Zeitpunkt IL-6 nachgewiesen werden (Abbildung 4.16). Betrachtet man die IL-6-Mengen der Referenzstämmen, so war im zeitlichen Verlauf von 4h bis 12h ein Anstieg von IL-6 zu verzeichnen. In der Infektion mit *S. aureus* 844/96 wurde nach 12h der höchste IL-6-Wert von 305 pg/ml gemessen. Auch beim *S. aureus*-Isolat KCK3 wurde, verglichen mit allen anderen AD-Isolaten, mit 251 pg/ml die größte Menge an IL-6 nachgewiesen. Betrachtet man die Produktion von IL-6 im zeitlichen Verlauf, so induzierten *S. aureus* 844/96 und *S. schleiferi* ATCC 43808 ähnliche Mengen an IL-6 wie die klinischen Isolate der jeweiligen Spezies. Betrachtet man *S. epidermidis* DSM 20044 und alle *S. epidermidis*-Isolate, so fand überall innerhalb der 12h-Infektion ein kontinuierlicher Anstieg von IL-6 statt. Allerdings traten Unterschiede beim Vergleich der gemessenen Mengen an IL-6 auf. Im Verlauf der Infektionen mit den klinischen Isolaten von *S. epidermidis* wurde deutlich mehr IL-6 detektiert als in den Infektionen mit dem Referenzstamm *S. epidermidis* DSM 20044. Die gemessenen IL-6-Werte von *S. haemolyticus* CCM 1798 nach 12h Infektion waren vergleichbar mit dem des klinischen Isolates. Allerdings wurden im Verlauf der Infektion mit *S. haemolyticus* KCK10 zu allen Zeitpunkten ähnliche Mengen an IL-6, zwischen 118 pg/ml und 148 pg/ml, detektiert während diese bei *S. haemolyticus* CCM 1798 kontinuierlich anstiegen. *Staphylococcus hominis* CCM 2732 induzierte weniger IL-6 als das klinische Isolat dieser Spezies. Das Maximum der IL-6-Produktion war bei den Infektionen mit *S. hominis* KCK1 bereits nach 8h erreicht, danach wurde die IL-6-Menge wieder geringer. Vergleicht man die beiden *S. capitis*-Isolate KCK6 und KCK12, so zeigten die Stämme unterschiedliche IL-6-Mengen, sowohl was die IL-6-Produktion im zeitlichen Verlauf als auch die Menge an nachgewiesenem IL-6 betraf. Dabei lagen die ermittelten 12h-Werte zwischen 162 pg/ml und 219 pg/ml. Das IL-6-Profil von *S. capitis* CCM 2734 ähnelte dem Profil des Isolates *S. capitis* KCK6.

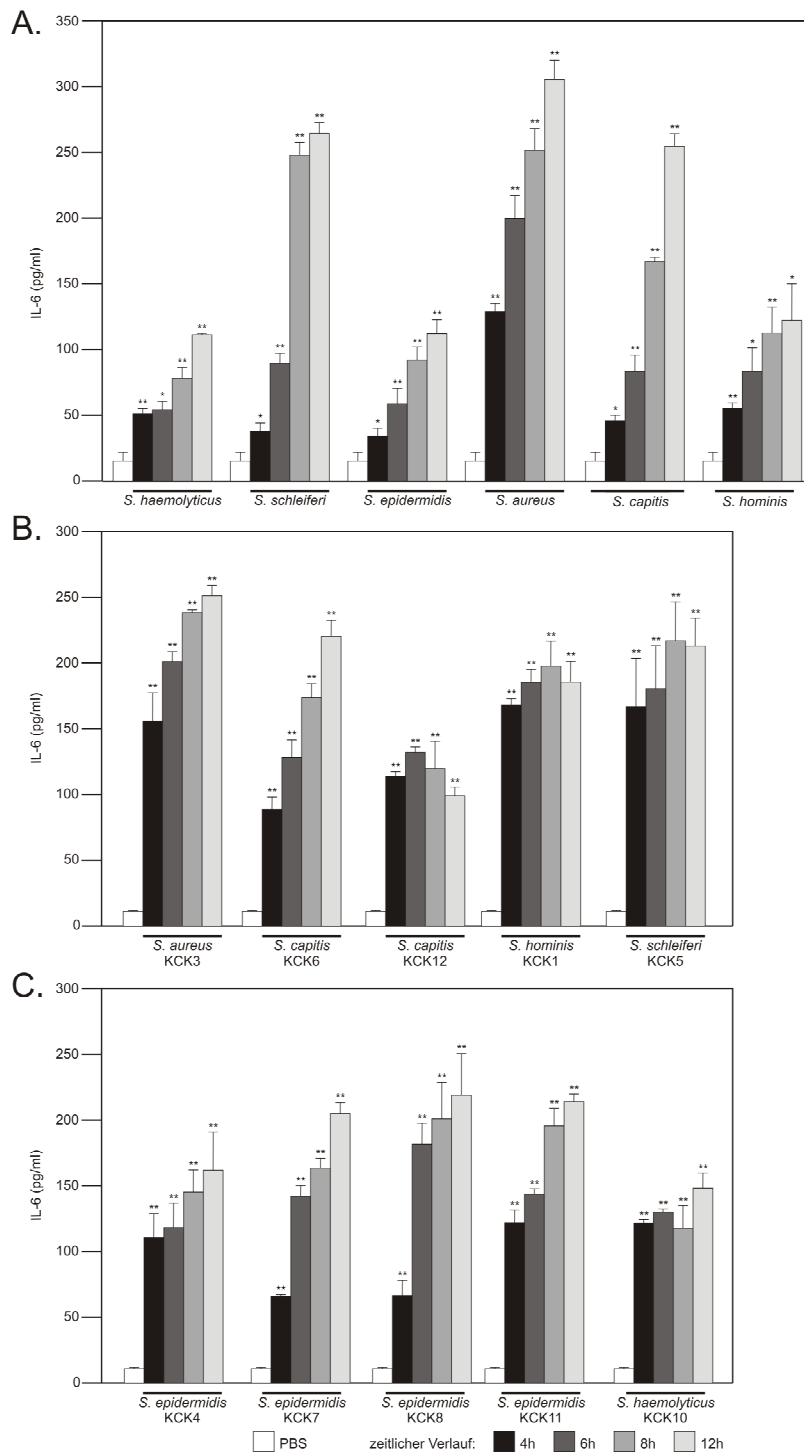


Abbildung 4.16: *Staphylococcus*-Spezies induzierten die Produktion von IL-6 im Verlauf der Infektion. HaCaT-Zellen wurden mit (A.) den Referenzstämmen oder (B.) bzw. (C.) mit den klinischen Isolaten über 4h, 6h, 8h und 12h infiziert und anschließend die sekretierten Mengen an IL-6 bestimmt. Die IL-6-ELISA-Analysen zeigten, dass die induzierten IL-6-Mengen zeitabhängig und isolatspezifisch waren. Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten angegeben. P-Werte beziehen sich immer auf die nicht infizierte Kontrolle und Werte  $\leq 0,05$  wurden dabei als statistisch signifikant angesehen (\*  $\leq 0,05$ ; \*\*  $\leq 0,005$ ).

Neben einer verstärkten IL-6-Sekretion konnte auch eine verstärkte IL-8-Sekretion in Folge der Infektionen mit den verschiedenen Stämmen nachgewiesen werden (Abbildung 4.17).

Die nicht infizierten Zellen bildeten bereits 182 pg/ml IL-8. Während der Infektionen mit den Referenzstämmen und den Isolaten verschiedener *Staphylococcus*-Spezies war im zeitlichen Verlauf ein IL-8-Anstieg zu verzeichnen, wobei deutliche Unterschiede in der Menge des gebildeten IL-8 auftraten. Betrachtet man zum Beispiel die Infektionen mit den Referenzstämmen *S. schleiferi* ATCC 43808, *S. epidermidis* DSM 20044, *S. capitis* CCM 2734 und *S. hominis* CCM 2732, so stieg die IL-8-Menge im Verlauf der Infektion deutlich an. Bei *S. haemolyticus* CCM 1798 und *S. aureus* 844/96 dagegen wurden geringere Mengen an IL-8 gemessen, was den Ergebnissen der Infektionen mit den klinischen Isolaten der jeweiligen Spezies entspricht. Die Infektionen mit *S. aureus* KCK3 zeigten im zeitlichen Verlauf nur einen geringen Anstieg der IL-8-Produktion. Die gemessenen Mengen an IL-8 lagen 4h nach Infektion bei 1204 pg/ml und 12h nach Infektion nur geringfügig höher bei 1480 pg/ml. Ähnliche Ergebnisse wurden in den Infektionen mit *S. hominis* KCK1, *S. haemolyticus* KCK10 und dem *S. capitis*-Isolat KCK12 erhalten. Die mit 3915 pg/ml und 3449 pg/ml größten Mengen an IL-8 wurden nach 12h Infektion mit *S. capitis* CCM 2734 und *S. schleiferi* ATCC 43808 detektiert. Die im Verlauf der Infektion produzierten IL-8-Mengen ähneln dabei denen der klinischen Isolate *S. capitis* KCK6 und *S. schleiferi* KCK5. Das *S. capitis*-Isolat KCK6 induzierte dabei deutlich mehr IL-8 als das bereits erwähnte *S. capitis* KCK12. Bei KCK6 stieg IL-8 im Verlauf der Infektion von 236 pg/ml auf 3981 pg/ml an. Ähnliche Werte zeigten sich in den Infektionen mit *S. schleiferi* KCK5. Hier stieg IL-8 von 1095 pg/ml auf 3624 pg/ml an. Die Zunahme von IL-8 in den Infektionen mit *S. hominis* CCM 2732 ist deutlicher, als in den Infektionen mit dem klinischen Isolat KCK1. Die vier verschiedenen *S. epidermidis*-Isolate induzierten die größte Menge an IL-8 im Infektionsverlauf. Bei KCK4 zum Beispiel fand innerhalb der 12h ein kontinuierlicher Anstieg von IL-8 bis auf 4787 pg/ml statt. Im Vergleich zu den klinischen *S. epidermidis* Isolaten induzierte *S. epidermidis* DSM 20044 eine geringere IL-8-Menge.

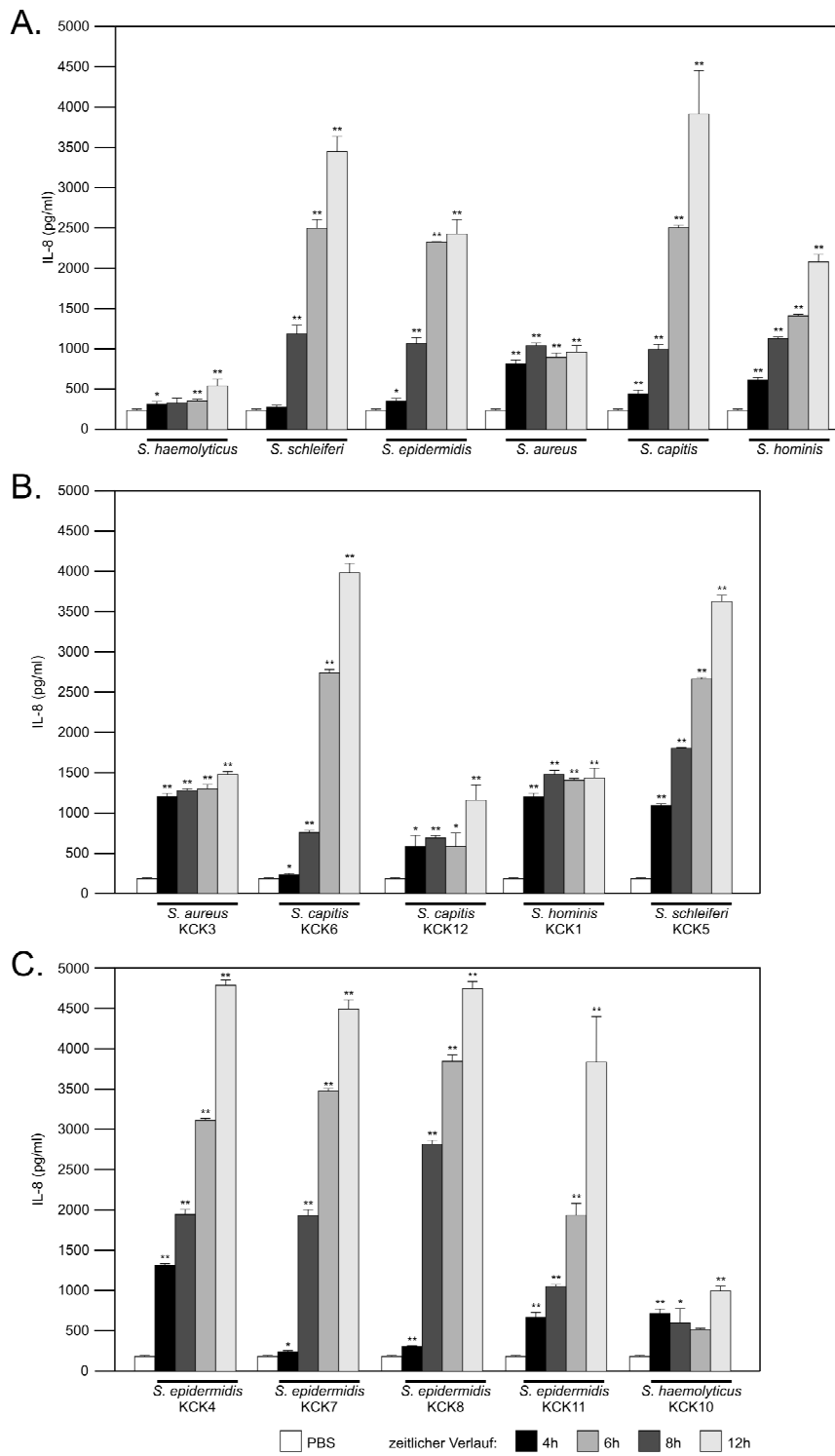


Abbildung 4.17: *Staphylococcus*-Spezies induzieren die Produktion von IL-8 im Verlauf der Infektion. HaCaT-Zellen wurden mit (A.) den Referenzstämmen oder (B.) bzw. (C.) mit den klinischen Isolaten über 4h, 6h, 8h und 12h infiziert und anschließend die sekretierten Mengen an IL-8 bestimmt. Die IL-8-ELISA-Analysen zeigten, dass die induzierten IL-8-Mengen zeitabhängig und isolatspezifisch waren. Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten angegeben. P-Werte beziehen sich immer auf die nicht infizierte Kontrolle und Werte  $\leq 0,05$  wurden dabei als statistisch signifikant angesehen (\*  $\leq 0,05$ ; \*\*  $\leq 0,005$ ).

#### 4.3.2.2 INDUKTION ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE

Die Induktion antimikrobieller Faktoren durch Mikroorganismen, bakterielle Produkte und inflammatorische Mediatoren ist ein wesentliches Element der angeborenen Immunantwort. Deshalb wurde die mRNA-Expression von hBD1, hBD2, hBD3 und LL-37 in HaCaT-Zellen im Verlauf der Staphylokokken-Infektionen näher betrachtet.

Bei fast allen Infektionen mit den Referenzstämmen wurde nach 6h die größte Menge an hBD1 mRNA gemessen, während bei fast allen Infektionen mit den Isolaten nach 8h das Maximum an hBD1 mRNA detektiert wurde (Abbildung 4.18). Die maximale Menge an induzierter hBD1 mRNA der Referenzstämmen *S. aureus* 844/96 (3-fach) und *S. capitis* CCM 2734 (3-fach) war mit den klinischen Isolaten der jeweiligen Spezies vergleichbar, während sich die hBD1-Mengen im zeitlichen Verlauf unterschieden. Die maximale Menge an detektierter hBD1 mRNA war in den Infektionen mit dem klinischen Isolat von *S. hominis* höher (6,5-fach) als bei denen mit dem Referenzstamm *S. hominis* CCM 2732 (5,4-fach). Die hBD1-Mengen von *S. haemolyticus* CCM 1798 und *S. schleiferi* ATCC 43808 unterschieden sich deutlich von denen ihrer klinischen Isolate. Während die ermittelten Mengen an hBD1 mRNA bei den Referenzstämmen relativ gering waren (1,4-fach bis 2,1-fach bei *S. haemolyticus* CCM 1798 und 1-fach bis 1,5-fach bei *S. schleiferi* ATCC 43808), so war bei den klinischen Stämmen der jeweiligen Spezies ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen. Die Menge an exprimierter hBD1 mRNA war dabei bei *S. haemolyticus* KCK10 6,3 Mal und bei *S. schleiferi* KCK5 7,7 Mal mehr als in den nicht infizierten Kontrollen. Im Fall des *S. schleiferi*-Isolates KCK5 erreichte die Menge an hBD1 mRNA allerdings bereits bei 6h bereits ihr Maximum. *Staphylococcus epidermidis* DSM 20044 induzierte nach 6h eine 3,3-fache hBD1 mRNA-Expression und lag damit innerhalb der Werte der klinischen *S. epidermidis* Isolate, deren maximale hBD1 mRNA-Expressionen zwischen 1-fach und 4,8-fach detektiert wurden. Die Menge an exprimierter hBD1 mRNA variierte nicht nur zwischen den Isolaten verschiedener Spezies sondern auch zwischen verschiedenen Isolaten ein und derselben Spezies. Betrachtet man die *S. epidermidis*-Isolate, so exprimierte das Isolat KCK11 nach 8h 4,8 Mal mehr hBD1 als die nicht infizierte Kontrolle, während bei KCK4 und KCK7 1,7 bzw. 2,4 Mal mehr hBD1 im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle induziert wurde. *Staphylococcus epidermidis* KCK8 zeigte so gut wie keine Induktion der hBD1 mRNA-Expression in Keratinozyten, hier war nach 12h sogar ein Absinken der Menge an hBD1 mRNA auf das 0,3-fache der Kontrolle zu verzeichnen.



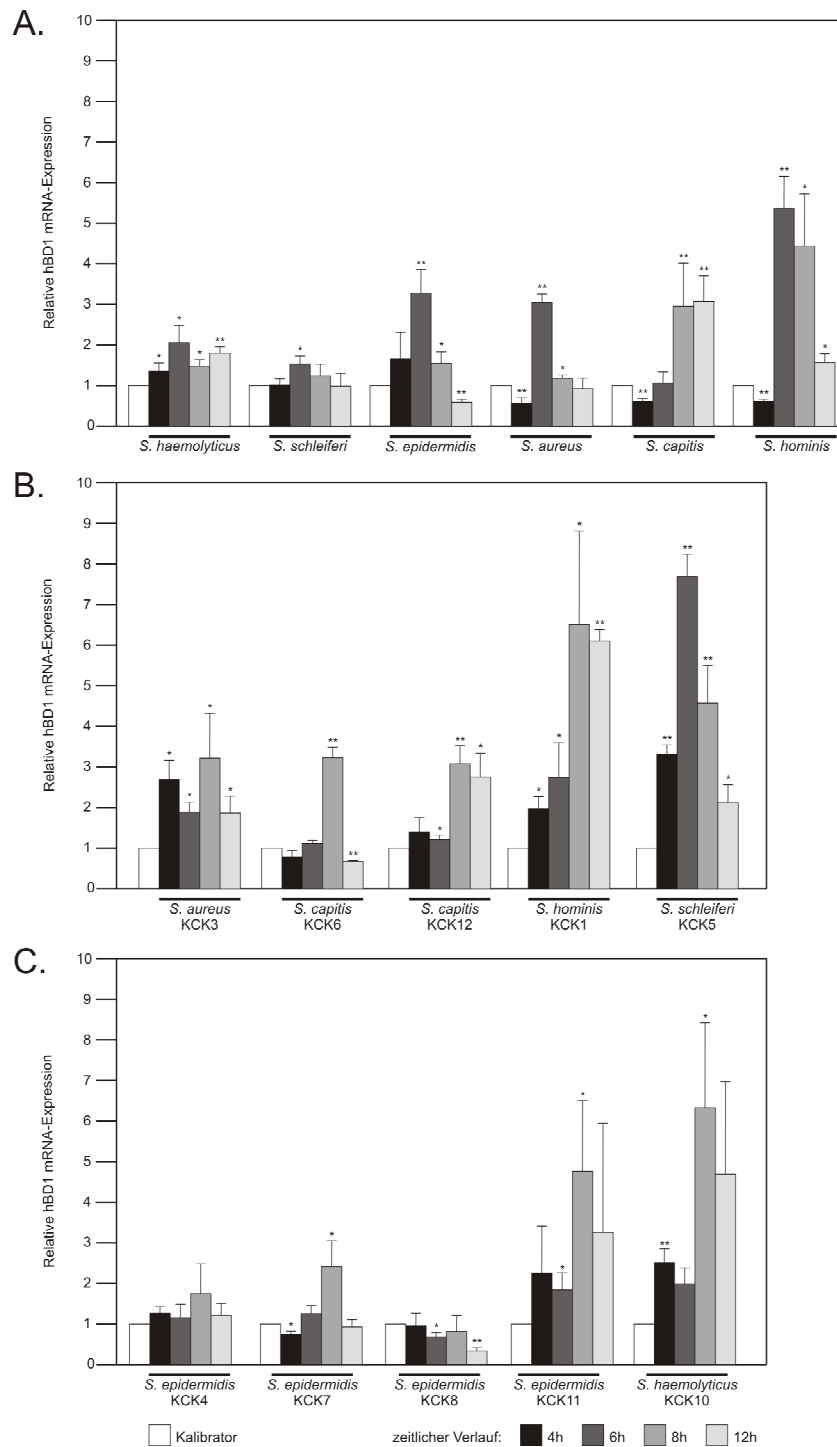


Abbildung 4.18: Zeitabhängige Expression von hBD1 mRNA nach Stimulation von HaCaT-Zellen mit (A.) *Staphylococcus*-Referenzstämmen und (B.) bzw. (C.) klinischen *Staphylococcus*-Isolaten. Für die relative Quantifizierung wurden die Ct-Werte der hBD1 mRNA gegen die Ct-Werte der GAPDH normalisiert und der Expressionsunterschied über die  $\Delta\Delta Ct$  Methode berechnet (Kapitel 3.19). Der Kalibrator entsprach dabei der nicht infizierten Kontrolle. Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten angegeben. P-Werte sind immer im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle angegeben und Werte  $\leq 0,05$  wurden dabei als statistisch signifikant angesehen (\*  $\leq 0,05$ ; \*\*  $\leq 0,005$ ).

Betrachtet man die Expression von hBD2 mRNA im Verlauf der Infektionen (Abbildung 4.19), so waren sowohl bei den Referenzstämmen als auch bei den klinischen Isolaten nach 12h die maximalen Werte an hBD2 mRNA zu verzeichnen. Allerdings waren dabei auch die großen Unterschiede in der Menge an hBD2 mRNA auffällig. *Staphylococcus haemolyticus* CCM 1798 induzierte ein Drittel weniger hBD2 mRNA (93,4-fach) als das klinische *S. haemolyticus* Isolat KCK10 (154-fach). Ähnliche Ergebnisse wurden bei *S. schleiferi* ATCC 43808 (173-fach) im Vergleich mit dem klinischen Isolat KCK5 (273-fach) erhalten. Auch die Stämme einer Spezies sind heterogen. Drei der *S. epidermidis*-Isolate exprimierten nach 12h die maximale Menge an hBD2 mRNA (128-, 266-, und 285-fach), während das vierte Isolat KCK8 bereits nach 8h mit der 78-fachen Menge an hBD2 das Maximum erreichte. Die hBD2 mRNA-Mengen von *S. epidermidis* DSM 20044 waren dabei vergleichbar mit exprimierten Mengen des klinischen *S. epidermidis* Isolates KCK11 mit der höchsten hBD2 mRNA-Induktion. Die maximale hBD2 mRNA-Expression in den Infektionen des klinischen Isolates von *S. aureus* war mehr als doppelt so hoch wie die des Referenzstammes *S. aureus* 944/96. Ähnlich verhielten sich die Mengen an hBD2 mRNA wenn man *S. capitis* CCM 2734 mit dem *S. capitis* Isolat KCK12 vergleicht. Im Gegensatz dazu induzierte das klinische *S. hominis* Isolat eine 15,6-fache hBD2 mRNA-Expression, während beim Referenzstamm *S. hominis* CCM 2732 eine 91,6-fache Expression zu verzeichnen war. Im Vergleich zu den anderen untersuchten antimikrobiellen Peptiden hBD1, hBD3 und LL-37 wurde die hBD2-Expression in den Infektionen am stärksten induziert.

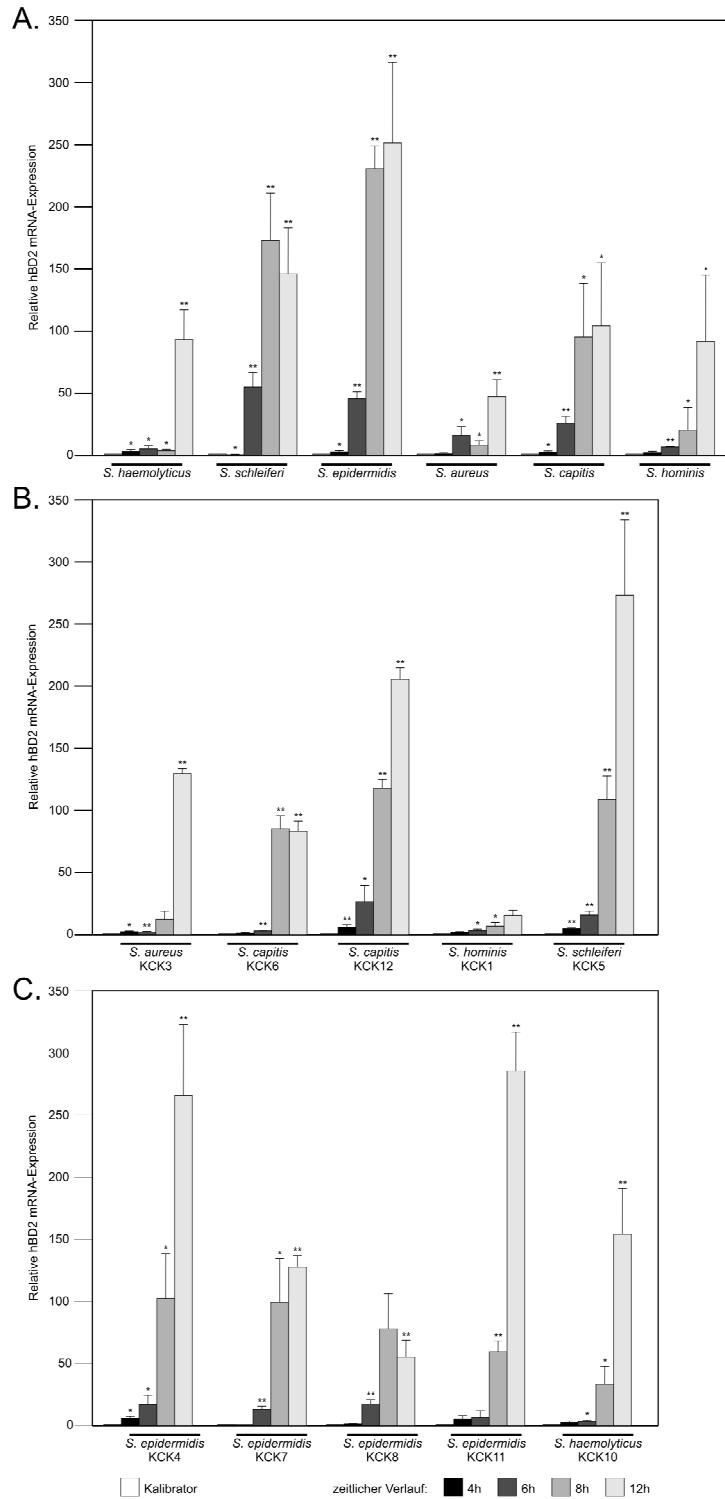


Abbildung 4.19: Zeitabhängige Expression von hBD2 mRNA nach Stimulation von HaCaT-Zellen mit (A.) *Staphylococcus*-Referenzstämmen und (B.) bzw. (C.) klinischen *Staphylococcus*-Isolaten. Für die relative Quantifizierung wurden die Ct-Werte der hBD2 mRNA gegen die Ct-Werte der GAPDH normalisiert und der Expressionsunterschied über die  $\Delta\Delta Ct$  Methode berechnet (Kapitel 3.19). Der Kalibrator entsprach dabei der nicht infizierten Kontrolle. Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten angegeben. P-Werte sind immer im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle angegeben und Werte  $\leq 0,05$  wurden dabei als statistisch signifikant angesehen (\*  $\leq 0,05$ ; \*\*  $\leq 0,005$ ).

Im Verlauf der Infektionen war ebenfalls ein Anstieg der hBD3 mRNA-Expression bei allen Referenzstämmen und Isolaten zu verzeichnen (Abbildung 4.20). Bei den meisten Isolaten erreichte die Menge an hBD3 mRNA nach 8h ihr Maximum und nahm danach wieder ab. Die 8h-Werte lagen dabei zwischen 1,8-facher und 6-facher Induktion der hBD3 mRNA im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle. Die gemessene hBD3 mRNA war bei den Infektionen mit *S. schleiferi* ATCC 43808 und *S. capitis* CCM 2734 maximal 1,7-fach bzw. 1,5-fach höher als in der nicht infizierten Kontrolle. Die klinischen Isolate der jeweiligen Spezies induzierten eine höhere hBD3 mRNA-Expression. Vergleicht man *S. haemolyticus* CCM 1798 mit dem klinischen Isolat KCK10, so induzierten beide Stämme ähnliche Mengen an hBD3 mRNA (5,5-fach bzw. 5,3-fach), allerdings unterschieden sich die induzierte Menge im zeitlichen Verlauf. Ähnliches war bei *S. aureus* 844/96 und *S. epidermidis* DSM 20044 zu beobachten. *Staphylococcus hominis* CCM 2732 zeigte nach 12h eine 5,2-fache hBD3 mRNA-Expression. Zu allen anderen Zeitpunkten war die Menge an exprimierter hBD3 mRNA geringer als in den Infektionen mit dem klinischen Isolat KCK1.

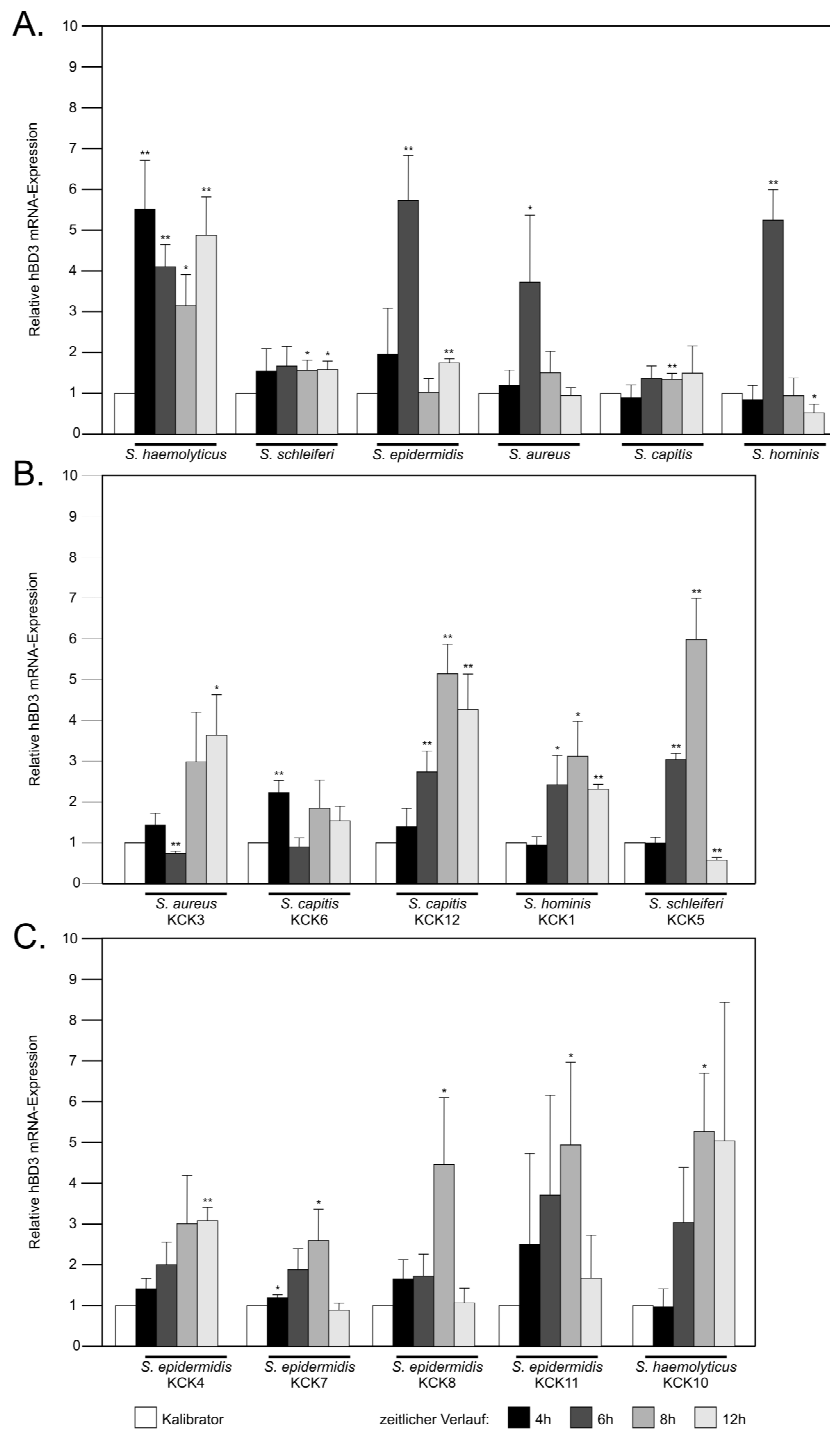


Abbildung 4.20: Zeitabhängige Expression von hBD3 mRNA nach Stimulation von HaCaT-Zellen mit (A.) *Staphylococcus*-Referenzstämmen und (B.) bzw. (C.) klinischen *Staphylococcus*-Isolaten. Für die relative Quantifizierung wurden die Ct-Werte der hBD3 mRNA gegen die Ct-Werte der GAPDH normalisiert und der Expressionsunterschied über die  $\Delta\Delta C_t$  Methode berechnet (Kapitel 3.19). Der Kalibrator entsprach dabei der nicht infizierten Kontrolle. Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten angegeben. P-Werte sind immer im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle angegeben und Werte  $\leq 0,05$  wurden dabei als statistisch signifikant angesehen (\*  $\leq 0,05$ ; \*\*  $\leq 0,005$ ).

Auch die Expression der mRNA des Cathelizidins LL-37 konnte im Verlauf der Infektion bei allen Isolaten und Referenzstämmen beobachtet werden (Abbildung 4.21). Dabei war jedoch der jeweilige Anstieg und Abfall der Menge an LL-37 mRNA im zeitlichen Verlauf verschieden. Die Referenzstämme *S. haemolyticus* CCM 1798 (0,9- bis 2-fach) und *S. schleiferi* ATCC 43808 (1,2- bis 1,8-fach) induzierten, verglichen mit ihren klinischen Isolaten, im Verlauf der Infektionen relativ wenig LL-37 mRNA. Für alle anderen Referenzstämme wurden ähnliche LL-37 mRNA-Mengen gemessen wie für die Isolate der jeweiligen Spezies, allerdings traten Variationen im zeitlichen Verlauf der Infektionen auf. Bei der Infektion mit dem Isolat *S. aureus* KCK3 war das Maximum an LL-37 mRNA (5,9-fach) bereits nach 4h erreicht, danach nahm die Menge kontinuierlich ab. Das Isolat *S. capitis* KCK12 induzierte bis 6h die vermehrte Expression von LL-37 mRNA (8,4-fach). Zu den späteren Zeitpunkten nahm die Menge an exprimierter LL-37 mRNA ab. In den Infektionen mit den anderen Isolaten verschiedener Spezies konnte bei 8h das Maximum an LL-37 mRNA detektiert werden. Betrachtet man dabei die maximale Menge an exprimierter LL-37 mRNA unabhängig vom jeweiligen Zeitpunkt, so lag diese 5,6 bis 8,4 Mal so hoch wie die der nicht infizierten Kontrollen.

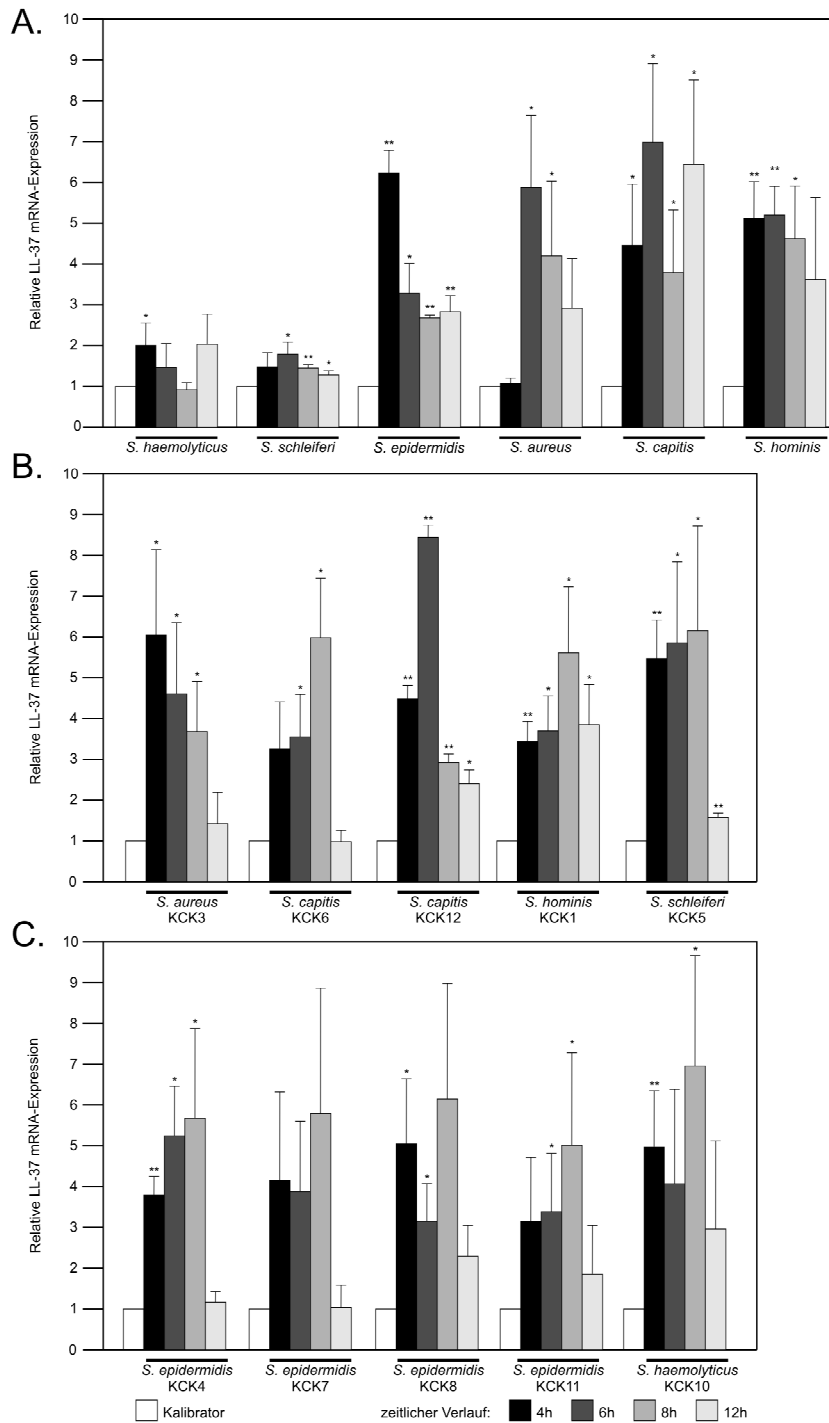


Abbildung 4.21: Zeitabhängige Expression von LL-37 mRNA nach Stimulation von HaCaT-Zellen mit (A.) *Staphylococcus*-Referenzstämmen und (B.) bzw. (C.) klinischen *Staphylococcus*-Isolaten. Für die relative Quantifizierung wurden die Ct-Werte der LL-37 mRNA gegen die Ct-Werte der GAPDH normalisiert und der Expressionsunterschied über die  $\Delta\Delta Ct$  Methode berechnet (Kapitel 3.19). Der Kalibrator entsprach dabei der nicht infizierten Kontrolle. Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten angegeben. P-Werte  $\leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen (\*  $\leq 0,05$ ; \*\*  $\leq 0,005$ ).

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die *Staphylococcus*-Isolate, erhalten von Patienten mit atopischer Dermatitis, Gene für  $\gamma$ -Hämolysin und das Leukozidin LukED besaßen. Infizierte man Keratinozyten sowohl mit diesen klinischen Isolaten, als auch mit den jeweiligen Referenzstämmen, so war die induzierte angeborene Immunantwort isolatspezifisch. Es konnten im zeitlichen Verlauf der Infektionen unterschiedliche Mengen an IL-6 und IL-8 detektiert werden. Außerdem induzierten alle verwendeten Staphylokokken unterschiedlich große mRNA-Mengen an hBD1, hBD2, hBD3 und LL-37, wobei die hBD2 mRNA-Expression am stärksten war.



## 5 DISKUSSION

Staphylokokken sind weltweit verbreitet und werden zur Normalflora von Haut, Hautdrüsen und Schleimhaut des Menschen gezählt. Dennoch handelt es sich bei *S. aureus* und einigen anderen *Staphylococcus*-Spezies um fakultativ pathogene Keime, die durch begünstigende Umstände lokale oder systemische Infektionen auslösen, welche nicht selten mit schweren Krankheitsverläufen einhergehen.

Ziele meiner Arbeiten waren (i) die Charakterisierung und Typisierung der im Universitätsklinikum Magdeburg zirkulierenden *S. aureus*-Stämme, unter Berücksichtigung der Methicillin-Resistenz, (ii) die Etablierung einer Methode, welche die Identifizierung von *Staphylococcus*-Spezies auf molekularer Ebene ermöglicht und (iii) Untersuchungen der Induktion der angeborenen Immunantwort in epithelialen Zellen durch *Staphylococcus*-Spezies.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde (i) die Heterogenität und der Übergang zu Resistenzen bei *S. aureus*-Stämmen am Universitätsklinikum Magdeburg gezeigt und speziell zirkulierende Methicillin-sensible *S. aureus* als potentielle Quelle für neu auftretende Methicillin-resistente *S. aureus* identifiziert, (ii) ausgehend von der Sequenzierung des *gap*-Gens eine *gap*-basierte T-RFLP zur Identifizierung von *Staphylococcus*-Spezies entwickelt und etabliert, sowie (iii) durch die Induktion von IL-6, IL-8, hBD1, hBD2, hBD3 und LL-37 in epithelialen Zellen durch *Staphylococcus*-Spezies gezeigt, dass die Antwort des angeborenen Immunsystems auf *Staphylococcus*-Spezies isolatspezifisch ist.

### 5.1 HETEROGENITÄT VON *S. AUREUS*-ISOLATEN

Methicillin-resistente *S. aureus* sind immer noch hauptsächlich in Krankenhäusern, Rehabilitationseinrichtungen und Altenheimen verbreitet (sog. *hospital acquired* MRSA; HA-MRSA). Trotzdem sind Veränderungen in der Epidemiologie zu beobachten. Beruhten Epidemien früher auf der klonalen Verbreitung von nur wenigen MRSA-Stämmen (Lacey und Grinsted, 1973), so sind sie heute viel heterogener. Ein ernst zu nehmendes Problem stellt außerdem die Verbreitung von MRSA außerhalb von medizinischen Einrichtungen (sog. *community acquired* MRSA; CA-MRSA) und den damit verbundenen Risikofaktoren dar (Gorak *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu HA-MRSA erkranken an CA-MRSA Patienten, die nicht dem klassischen MRSA-Patientenkollektiv angehören. Obwohl CA-MRSA-Stämme noch relativ gut auf gängige

Antibiotika ansprechen, sind sie durch Synthese von Membrantoxinen, wie dem Panton-Valentin-Leukozidin, durch eine hohe Virulenz und ausgeprägte Invasivität gekennzeichnet. MRSA entstehen immer dann, wenn die Determinanten für Methicillin-Resistenz (SCC*mec*) durch Rekombinationsereignisse in das Genom von MSSA integriert werden. Es wird deshalb vermutet, dass die Evolution der CA-MRSA-Stämme von der Aufnahme des SCC*mec*-Elementes in MSSA-Stämme, die bereits erfolgreich im Milieu zirkulieren und deren Fitness mit der Antibiotikaresistenz optimiert wird, abhängig ist (Salgado *et al.*, 2003; Kluytmans-Vandenbergh und Kluytmans, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb klinische *S. aureus*-Stämme, die innerhalb eines Monats in das Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Magdeburg geschickt wurden, charakterisiert, um neben dem Verfolgen der Verbreitung von MRSA auch genauere Kenntnisse über die zirkulierenden MSSA zu erhalten und deren potentielle Virulenz zu beurteilen. Die *S. aureus*-Stämme wurden dafür nach ihrer Herkunft, ihren Antibiotikaresistenzen und Toxinprofilen analysiert und ausgewählte Stämme populationsgenetisch typisiert.

Obwohl die Zunahme von MRSA weltweit zu verzeichnen ist, gibt es erhebliche Unterschiede zwischen verschiedenen Ländern. Die MRSA-Prävalenz ist in den südeuropäischen Staaten, in Japan und den USA am höchsten, während die Niederlande und die skandinavischen Länder Finnland und Dänemark durch strikte Kontrollen ihre Rate niedrig halten (Tiemersma *et al.*, 2004; van Trijp *et al.*, 2007, Paez und Skiest, 2008; Aires de Sousa *et al.*, 2005). Ghebremedhin *et al.* veröffentlichten 2005, dass unter allen *S. aureus*-Erstisolaten, die man innerhalb eines Jahres an der Universitätsklinik Magdeburg analysierte, etwa 7,3% als MRSA klassifiziert wurden (Ghebremedhin *et al.*, 2005). Vorwiegend wurden MRSA-Stämme der Dermatologie und den Intensivstationen der Anästhesiologie und Chirurgie zugeordnet. 23% der *S. aureus*-Stämme meiner Arbeit wurden als MRSA identifiziert, die hauptsächlich aus Patientenmaterial der Stationen der Inneren Medizin und der Chirurgie isoliert wurden.

Betrachtet man die Resistenzmuster von MRSA so besaßen diese bis 1995 weltweit, auch in Deutschland, einen multiresistenten Phänotyp (Witte *et al.*, 1997). Mittlerweile haben sich sowohl die epidemischen Stämme, als auch deren Resistenzphänotypen verändert (Chambers, 2001; Enright *et al.*, 2002). Auch an der Uniklinik in Magdeburg konnte in den letzten Jahren eine Einengung der Resistenzmuster unter epidemischen MRSA verzeichnet werden (Witte *et al.*, 2000; Ghebremedhin *et al.*, 2005). Witte *et al.* berichteten außerdem von einer zunehmenden Anzahl von CA-MRSA, die ebenfalls nur wenig Resistenzen besaßen (Witte *et al.*, 2004). Die meisten, der in dieser Arbeit aufgeführten MRSA-Isolate, besaßen neben ihrer Penicillin-Oxacillin-Resistenz noch Resistenzen gegen Erythromycin, Clindamycin und Ciprofloxacin. Die Multilocus Sequenztypisierung eines dieser Stämme ergab den Sequenztyp 22. Dieses Isolat

entsprach somit dem Barnim-Epidemiestamm, dessen verstärktes Auftreten mit dem hier beschriebenen Resistenzmuster am Universitätsklinikum Magdeburg bereits beschrieben wurde (Ghebremedhin *et al.*, 2007). Fünf der MRSA-Isolate waren neben ihrer Penicillin-Oxacillin-Resistenz noch resistent gegen vier zusätzliche Antibiotika (Ciprofloxacin, Clindamycin, Erythromycin, Gentamycin). Die Analyse mit MLST ergab für einen dieser Stämme ST228, womit er dem Süddeutschen-Epidemiestamm zugeordnet werden konnte. Auch in diesem Fall existieren Publikationen, die das Auftreten von MRSA mit diesen Resistenzen beschreiben (Witte *et al.*, 2000; Ghebremdhin *et al.*, 2005). Die anderen, der in dieser Arbeit aufgeführten MRSA-Isolate, besaßen ebenfalls ein relativ kleines Resistenzspektrum, d.h. sie waren neben einer Penicillin-Oxacillin-Resistenz nur noch resistent gegen ein oder gar kein zusätzliches Antibiotikum. Einer dieser Stämme mit dem kleinen Resistenzspektrum Penicillin-Oxacillin-Ciprofloxacin entsprach dem Berliner-Epidemiestamm (ST45), dessen, sich einengendes Resistenzspektrum, ebenfalls seit einigen Jahren beobachtet wird (Witte *et al.*, 2000; Ghebremdhin *et al.*, 2005). Von den 82 MSSA-Stämmen, die in meiner Arbeit untersucht wurden, waren die meisten Isolate nur resistent gegen Penicillin, gefolgt von Stämmen die zusätzlich zur Penicillinresistenz noch resistent gegen ein oder zwei weitere Antibiotika waren. Auch bei den Methicillin-sensiblen *S. aureus* zeigte sich somit ein relativ enges Resistenzspektrum. Würden diese, bereits in der Umwelt erfolgreich zirkulierenden, MSSA-Stämme das *mecA*-Gen aufnehmen, eventuell durch die SCC*mec* Typ IV, dann würden CA-MRSA mit einem kleinen Resistenzspektrum entstehen.

Nicht nur die Antibiotikaresistenzen bedingen das virulente Potential von Methicillin-resistenten und Methicillin-sensiblen *S. aureus*. Die meisten Publikationen unterstützen die These, dass MSSA und MRSA äquivalente Potentiale zur Kolonisation und Verursachung von Krankheiten haben (Archer, 1998). Zu den Virulenzfaktoren werden unter anderem Leukozidine und Toxine, die als Superantigene wirken, gezählt. Im Allgemeinen besitzen *S. aureus*-Isolate die Bakteriämien verursachen klassische Superantigene (*sea*, *seb*, *sec*), bei Isolaten von Patienten mit Diarrhöe kann man vor allem das *seb*-Gen nachweisen und Isolate von Wundinfektionen enthalten vorrangig das *sec*-Gen (Uchiyama *et al.*, 1994). Eine Vielzahl von *S. aureus*-Stämmen, die aus Furunkeln und Karbunkeln isoliert wurden, produzierten dagegen das Panton-Valentine-Leukozidin (*lukPV*) (Lina *et al.*, 1999; Diep *et al.*, 2004). Zusätzlich zu den Enterotoxinen können *S. aureus*-Stämme auch das Toxisch-Schock-Syndrom-Toxin-1 (*tst*) bilden und damit einen septischen Schock, das sog. Toxisch-Schock-Syndrom verursachen (Uchiyama *et al.*, 1989; McCormick *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde nur ein *luk-PV*-positives Isolat detektiert. Nur wenige MSSA besaßen die klassischen Enterotoxingene *sea*, *seb* oder *sec*. Im Gegensatz dazu konnten in fast allen MSSA-Isolaten das *sei*-Gen, welches zum *egc*-Cluster gehört, nachgewiesen werden.

Betrachtet man die Toxingene der MRSA-Stämme, so wurden ähnliche Ergebnisse wie für die MSSA-Stämme erhalten. Unterschiede traten bei der Detektion des *tst*-Gens auf. Überraschenderweise besaßen etwa 40% der MSSA-Stämme, aber nur 12,5% der MRSA-Stämme, das Gen für das Toxisch-Schock-Syndrom-Toxin-1. Zwei dieser *tst*-positiven MSSA-Isolate konnte auch noch das *seb*-Gen zugeordnet werden, was im Kontrast zu Publikationen anderer Arbeitsgruppen steht (Bohach *et al.*, 1990). Interessanterweise wurden die *tst*-positiven MSSA von Stationen mit den höchsten Raten an MRSA, d.h. der Dermatologie und den Intensivstationen der Anästhesiologie und Chirurgie, isoliert. Die meisten der bis zum heutigen Zeitpunkt am Uniklinikum Magdeburg mit Hilfe der MLST analysierten MRSA gehörten den Sequenztypen ST22, ST228 oder ST45 an und besaßen selten das *tst*-Gen (Ghebremedhin *et al.*, 2005; Ghebremedhin *et al.*, 2007). Die Multilocus Sequenztypisierung und die *spa*-Analyse der drei *tst*-positiven MRSA der vorliegenden Studie ergab, dass diese zu den bekannten epidemischen Sequenztypen ST22, ST45, ST228 und den *spa*-Typen t001, t028 und t032 gehören. Aus der Literatur ist bekannt, dass in Europa der epidemische MRSA-Stamm EMRSA-16 sporadisch das *tst*-Gen besitzt (Murchan *et al.*, 2004). Allerdings wird diesen Stämmen der Sequenztyp 36 zugeordnet. Es existieren auch andere Publikationen über TSST-1-produzierende MRSA-Stämme (Schmitz *et al.*, 1997; Zaraket *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2008). Nur in der Publikation der japanischen Arbeitsgruppe sind MLST-Daten verfügbar. Die *tst*-positiven MRSA gehörten dabei ST5, ST8 und ST 91 an, wobei nur ST8 auch bei unseren MSSA-Stämmen auftrat (Zaraket *et al.*, 2007).

In diesem Zusammenhang war es wichtig die Epidemiologie *tst*-produzierender MSSA zu untersuchen, da dieses Toxin in der Klinik zwar selten, aber wenn, dann mit verheerenden Symptomen des Toxisch-Schock-Syndroms einhergeht. Deshalb muss auch das Auftreten von *tst*-positiven CA-MRSA besonders verfolgt werden. Es gibt verschiedene Mutmaßungen über den Ursprung und die Evolution von MRSA-Stämmen. Kreiswirth *et al.* vertreten die Hypothese, dass sich alle MRSA ursprünglich aus einem einzigen MSSA-Klon, der das SCC*mec*-Element aufgenommen hat, entwickelt haben (Kreiswirth *et al.*, 1993). Andere Publikationen unterstützen allerdings die Vermutung, dass verschiedene MRSA unabhängig voneinander durch lateralen Transfer des SCC*mec*-Elements in phylogenetisch unterschiedliche Methicillin-sensible *S. aureus* entstanden sind (Musser und Kapur, 1992; Fitzgerald *et al.*, 2001). Bis heute wurde das *mecA*-Gen in acht verschiedenen *S. aureus*-Abstammungslinien gefunden, die untereinander eine hohe Varianz innerhalb ihrer chromosomalen DNA zeigten. Gegenwärtig finden weitere Veränderungen im Auftreten und der Verbreitung von epidemischen MRSA in europäischen Kliniken statt (Lelièvre *et al.*, 1999; Witte *et al.*, 1997, 2001, 2004; Witte, 2004; Epidemiologisches Bulletin, Robert Koch-Institut, 6/2007, S. 41-46). Die Methode der Multilocus Sequenztypisierung wurde entwickelt,

um die Evolution von pandemischen MRSA-Klonen zu untersuchen (Enright und Spratt, 1999; Enright *et al.*, 2000, Peacock *et al.*, 2002). Ghebremedhin *et al.* dokumentierten 2005, dass die meisten MRSA-Stämme im Uniklinikum Magdeburg den neu aufgetreten MRSA-Klonen, dem Barnim-Epidemiestamm (ST22) oder dem Süddeutschen-Epidemiestamm (ST228), zugeordnet werden konnten. Im Vergleich dazu war der Berliner-Epidemiestamm (ST45), der in weiten Teilen Deutschlands verbreitet ist, weniger vertreten (Ghebremedhin *et al.*, 2005). Somit sind Veränderungen im Auftreten und der Verteilung verschiedener epidemischer MRSA zu beobachten und das Auftreten neuer MRSA-Klone ist zu erwarten. Neben den bereits erwähnten *tst*-positiven MRSA, wurden nun auch die *tst*-positiven MSSA dieser Arbeit nach ihren MLST- und *spa*-Typen charakterisiert. Die Ergebnisse für die TSST-1-produzierenden MSSA-Isolate waren dabei sehr heterogen, es wurden verschiedene MLST- und *spa*-Typen dokumentiert. Allerdings wurden die Sequenztypen, die während der letzten drei Jahre häufig am Universitätsklinikum unter MRSA-Isolaten aufgetreten sind (ST22, ST45, ST228) kaum oder überhaupt nicht unter den *tst*-positiven MSSA gefunden. Ähnliche Ergebnisse wurden von Aires de Sousa *et al.* beschrieben (Aires de Sousa *et al.*, 2005). Allerdings schlussfolgerte diese Arbeitsgruppe aus ihren Studien, dass die Aufnahme des SCC<sub>mec</sub>-Elements von Methicillin-sensiblen *S. aureus* wahrscheinlich ein relativ seltenes Ereignis sei. Die hier aufgeführten Ergebnisse konnten das nicht bestätigen. Den in dieser Arbeit analysierten *tst*-positiven MSSA wurden unter anderem die Sequenztypen ST1, ST8, ST30 und ST39 zugeordnet. MLST-Studien konnten zeigen, dass auftretende CA-MRSA-Stämme durch verschiedene genetische Hintergründe und unterschiedliche geographische Ursprünge gekennzeichnet sind. Waren CA-MRSA Klone ursprünglich spezifisch für einen Kontinent (Vandenesch *et al.*, 2003), so zeigen neuere Studien die Verbreitung zwischen den Kontinenten und die Dominanz einzelner Klone in verschiedenen geographischen Regionen (Tristan *et al.*, 2007). Dazu zählen zum Beispiel ST80 in Deutschland und Frankreich (Holmes *et al.*, 2005; Witte *et al.*, 2005), ST1, ST8 und ST59 in den USA (Mishaan *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2005) und ST30 in Australien (Coombs *et al.*, 2004, 2006). Vor kurzem wurde berichtet, dass ST30 sich auch in Europa ausbreitet (Hedin und Fang, 2007), währenddessen ST39 nur unter australischen MSSA und MRSA auftritt (Coombs *et al.*, 2004, 2006). Keines der typisierten *tst*-positiven MSSA-Isolate aus der Uniklinik Magdeburg besaß den Sequenztyp ST80, obwohl dieser CA-MRSA-Klon hauptsächlich in Europa vertreten ist. Allerdings befanden sich unter den in dieser Arbeit beschriebenen MSSA Stämme mit ST8/t008 und ST1/t127. Auch die CA-MRSA Klone ST1 (*spa*-Typ t127, USA400) und ST8 (*spa*-Typ t008, USA 300) gehören zu den dominierenden Klonen in Deutschland und Mitteleuropa, denen wegen ihrer hohen Virulenz immer mehr Bedeutung beigemessen wird (Larsen *et al.*, 2007; Witte *et al.*, 2007; Strommenger *et al.*, 2008). Zusammenfassend kann man schlussfolgern dass,

ähnlich wie bei *lukPV*-positiven MSSA-Isolaten, zumindest die MSSA-Stämme mit ST1, ST8 und ST30 das Potential haben das *mecA*-Gen aufzunehmen und sich als *tst*-positive CA-MRSA zu etablieren. Ob MSSA-Stämme der anderen Sequenztypen ebenfalls die Fähigkeit haben das *mecA*-Gen zu erlangen und damit als CA-MRSA in der Umwelt erfolgreicher zu sein, kann zu diesem Zeitpunkt nicht beurteilt werden. Dafür müssen weltweit mehr MLST-Daten von MSSA und MRSA dokumentiert werden. Weiterhin sind manche Virulenzgene, wie *sea*, *tst* und *eta*, auf mobilen genetischen Elementen kodiert (Moore und Lindsay, 2001). Das sind zum Beispiel Phagen oder Pathogenitätsinseln, die einen horizontalen Gentransfer zwischen Stämmen ermöglichen. Es ist anzunehmen, dass der Transfer von *tst* zwischen *S. aureus*-Stämmen somit relativ häufig stattfinden kann (Lindsay *et al.*, 1998).

Weiterhin wird vermutet, dass die verschiedenen Typen des Regulatorsystems *agr* einen Einfluss auf die Populationsdynamik von *S. aureus* haben (Lina *et al.*, 2003). Um die Isolate meiner Arbeit weiter genotypisch zu charakterisieren, wurden auch bei diesen Stämmen die *agr*-Gruppen bestimmt. In Übereinstimmung mit Witte *et al.* (Witte *et al.*, 2004) wurde 2005 eine Studie veröffentlicht, die zeigte, dass der epidemische MRSA-Klon ST228 (Süddeutscher-Epidemiestamm) mit der *agr*-Gruppe II und die neu aufgetretenen MRSA-Klone ST22 und ST45 mit der *agr*-Gruppe I am Universitätsklinikum Magdeburg zirkulierten (Ghebremedhin *et al.*, 2005). Unter den typisierten *tst*-positiven MSSA-Stämmen dieser Arbeit befanden sich Stämme, die ebenfalls diese Kombinationen von Sequenztyp und *agr*-Gruppe besaßen. Ji *et al.* berichteten, dass das Auftreten des *tst*-Gens in *S. aureus* mit der *agr*-Gruppe III gekoppelt sei (Ji *et al.*, 1997). Diese Beobachtung kann hier nicht bestätigt werden. Bei den Isolaten dieser Arbeit wurden alle vier verschiedenen *agr*-Gruppen, verstärkt *agr*-Gruppe I, detektiert. Bezüglich der Verteilung der *agr*-Gruppen unter MSSA-Stämmen bestätigten unsere Ergebnisse die Studien von Moore und Lindsay. Diese Arbeitsgruppe beschrieb die *agr*-Gruppen I, II, und III unter MSSA-Stämmen, wobei die *agr*-Gruppe I ebenfalls vermehrt vorhanden war. Allerdings wurde auch in diesem Zusammenhang beschrieben, dass das Auftreten *tst*-Gen mit der *agr*-Gruppe III korreliert (Moore und Lindsay, 2001). Bei den Stämmen der vorliegenden Arbeit schien das Auftreten des *tst*-Gens nicht mit einer speziellen *agr*-Gruppe einherzugehen, zumindest bei MSSA-Isolaten. In der Literatur wird für die neu aufgetretenen CA-MRSA ST1 und ST30 die Anwesenheit der *agr*-Gruppe III beschrieben (Takizawa *et al.*, 2005; David *et al.*, 2006; Rossney *et al.*, 2007)). Die *tst*-positiven MSSA-Isolate dieser Arbeit, die den Sequenztypen ST1, ST30 oder ST39 angehören, besitzen tatsächlich die *agr*-Gruppe III. Dieser Sachverhalt könnte wieder die Theorie der Entstehung von CA-MRSA aus zirkulierenden MSSA bestätigen. Die Isolate mit dem Sequenztyp ST8 allerdings besaßen alle die *agr*-Gruppe II, was im Gegensatz zu den CA-MRSA mit ST8 und der

*agr*-Gruppe I steht, die in der Literatur hauptsächlich beschrieben werden (Takizawa *et al.*, 2005; Rossney *et al.*, 2007).

Die hier aufgeführten Ergebnisse, erhalten durch Multilocus Sequenztypisierung, *spa*-Typisierung, durch das Erstellen von Toxin- und Resistenzprofilen, zeigen deutlich die Heterogenität, speziell von MSSA-Isolaten, im Universitätsklinikum Magdeburg. Interessanterweise findet man *tst*-positive MSSA-Stämme hauptsächlich auf Stationen mit einer hohen Rate an MRSA, unter anderem auf der Dermatologie und den Intensivstationen. Einige der hier beschriebenen *tst*-positiven MSSA haben das Potential z.B. das *SCCmec* IV-Element aufzunehmen und sich als *tst*-positive CA-MRSA erfolgreich in der Umwelt zu etablieren. Obwohl noch nicht bekannt ist, ob der horizontale Gentransfer von *tst* in Kliniken stattfinden kann, ist Vorsicht geboten und weitere Studien zum Transfer von Virulenzgenen sind notwendig.

## **5.2 DIFFERENZIERUNG VON STAPHYLOCOCCUS-SPEZIES DURCH PATRIELLE GAP-, 16S rRNA-, HSP60-, RPOB-, SODA- UND TUF-GENSEQUENZEN**

Koagulase-negative Staphylokokken wurden lange Zeit als apathogene Mikroorganismen oder allenfalls seltene opportunistische Erreger von Humaninfektionen angesehen. Die große Bedeutung dieser Bakterien, als Auslöser nosokomialer und allgemein erworbener Infektionen, wurde erst in den letzten Jahrzehnten erkannt (Stock, 2008). In diesem Zusammenhang mussten Methoden zur Identifizierung und Differenzierung von Staphylokokken entwickelt werden.

Die Typisierung und Identifizierung von *Staphylococcus*-Spezies auf molekularer Ebene wurde bereits auf verschiedenen Genen aufgebaut. Oft erforderte allerdings die sequenzbasierte Identifizierung von Bakterien bis auf Spezies-Ebene die Analyse von kompletten Genen und auch dann konnten manche phylogenetisch eng verwandte Spezies nicht von einander differenziert werden. Wegen der großen Menge an *rrs*-Sequenzen, die in den Genbanken abrufbar sind, ist es nicht verwunderlich, dass das 16S rRNA-Gen eines der ersten Gene war, welches für die Molekulardiagnostik eingesetzt wurde. Obwohl sich der Vergleich von 16S rRNA-Sequenzen für phylogenetische Studien auf Genus-Ebene als sinnvoll erwiesen hat, ist die Verwendung für die Identifizierung der Spezies fraglich. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Sequenzähnlichkeit des 16S rRNA-Gens bei Staphylokokken zwischen 90 und 99% lag (Kwok *et al.*, 1999). *Staphylococcus caprae* und *S. capitis* konnten gar nicht anhand ihrer 16S rRNA-Sequenzen unterschieden werden (Takahashi *et al.*, 1999). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei der Betrachtung der variablen Bereiche V1, V3, V7 und V9 (Raué *et al.*, 1990) des 16S rRNA-Gens. Dabei wurden sowohl in

*S. vitulens*, *S. saccharolyticus*, *S. capitis* subsp. *urealyticus* und *S. caprae*, als auch in zwei Subspezies von *S. aureus* und in zwei Subspezies von *S. cohnii* identische Sequenzen in diesen variablen Bereichen gefunden (Takahashi *et al.*, 1999). Weitere Gene, die zur Differenzierung von Staphylokokken eingesetzt wurden, sind *hsp60*, *sodA*, *rpoB* und *tuf*. Bezüglich des *hsp60*-Gen wurden von Takahashi *et al.* neun verschiedene *S. aureus*-Stämme partiell kloniert und sequenziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die erhaltenen Sequenzen im Durchschnitt nur eine Variabilität von 2% besaßen, sich also sehr ähnlich waren (Takahashi *et al.*, 1997). Außerdem könnten Kreuzhybridisierungen auftreten, wie z.B. zwischen der klonierten, partiellen *hsp60*-Gen-DNA von zwei *S. schleiferi*-Subspezies und der DNA von *S. intermedius* und *S. delphini* (Goh *et al.*, 1997). In einigen Publikationen wurde die Sequenzierung des *rpoB*- und des *sodA*-Gens als geeignet beschrieben, um *Staphylococcus*-Spezies zu identifizieren (Drancourt und Raoult, 2002; Poyart *et al.*, 2001; Mellmann *et al.*, 2006). Paarweise Sequenzvergleiche des *sodA*-Gens ergaben eine durchschnittliche Ähnlichkeit von 81,5% (Poyart *et al.*, 2001), was niedriger ist, als die Sequenzähnlichkeit von 98%, die für die *rrs*-Sequenzen von Staphylokokken bestimmt wurde (Bialkowska-Hobrzanska *et al.*, 1990; de Buyser *et al.*, 1992; Becker *et al.*, 2004). Der Vergleich von partiellen *rpoB*-Sequenzen ergab Sequenzähnlichkeitswerte zwischen 71,6 und 93,6% (Drancourt und Raoult, 2002). Die interspezifischen Sequenzähnlichkeitswerte für partielle *hsp60*- und *tuf*-Sequenzen lagen zwischen 74 und 93% bzw. 86 und 97% (Goh *et al.*, 1996; Martineau *et al.*, 2001).

Yugueros *et al.* publizierten die Sequenzen des *gap*-Gens für 12 Staphylokokken-Spezies, die relevant für Menschen sind (Yugueros *et al.*, 2000; Yugueros *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Studien erweitert und die *gap*-Gene von 28 verschiedenen *Staphylococcus*-Spezies sequenziert. Die erhaltenen *gap*-Sequenzen waren mit einer Sequenzähnlichkeit zwischen 24 und 96% weniger konserviert, als die Sequenzen der bereits erwähnten Gene.

Aus den partiellen *gap*-Sequenzen der verschiedenen *Staphylococcus*-Spezies wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt, welcher die Divergenz der ausgewählten Stämme erkennen lässt. Dieser *gap*-Stammbaum wurde mit phylogenetischen Stammbäumen verglichen, die mit Hilfe von Datenbanksequenzen der 16S rRNA, *rpoB*, *sodA*, *hsp60* und *tuf* Gene verschiedener *Staphylococcus*-Spezies angefertigt wurden. Frühere taxonomische Studien basierend auf DNA-DNA Reassoziaton zeigten, dass der Genus *Staphylococcus* in acht unterschiedliche Spezies-Gruppen, vertreten durch *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. sciuri*, *S. auricularis* und *S. aureus*, eingeteilt werden kann (Kloos und Schleifer, 1986; Kloos, 1997). Dieselbe Einordnung wurde in Studien unter Verwendung von *hsp60*- (Kwok *et al.*, 1999) und *sodA*-Sequenzen (Poyart *et al.*, 2001) vorgenommen.



Der phylogenetische Stammbaum aus den *rpoB*-Sequenzen zeigte neun verschiedene Gruppen, d.h. eine zusätzliche *S. haemolyticus*-Gruppe war vorhanden (Mollet *et al.*, 1997). Betrachtete man Stammbäume, die aus 16S rRNA-Sequenzen von 38 *Staphylococcus*-Spezies erstellt wurden, so konnten diese in 11 verschiedene Gruppen (*S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. carnosus*, *S. hyicus/S. intermedius*, *S. sciuri*, *S. auricularis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. aureus*) eingeteilt werden (Takahashi *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 1999). Allerdings waren die *Bootstrap*-Werte für die meisten Knoten der verschiedenen Gruppierungen gering. Mit den *gap*-Sequenzen und einem *Bootstrap*-Wert von >90% konnten die *Staphylococcus*-Spezies in vier Gruppen, die *S. sciuri*-Gruppe, die *S. hyicus/S.intermedius*-Gruppe, die *S. haemolyticus/S. simulans*-Gruppe und die *S. aureus/S. epidermidis*-Gruppe, eingeordnet werden.

In den *hsp60*-, 16S rRNA-, *sodA*- und *rpoB*-Stammbäumen enthielt die *S. sciuri*-Gruppe mit *Bootstrap*-Werten >97% *S. sciuri* und *S. lentus*. Alle Spezies der *S. sciuri*-Gruppe unterschieden sich von anderen *Staphylococcus*-Spezies in einigen Eigenschaften. Sie waren Novobiocin-resistent, Oxidase-positiv und besaßen in ihren *hsp60*-Proteinen dasselbe charakteristische Muster von Aminosäuresubstitutionen (Goh *et al.*, 1997; Kwok *et al.*, 1999). Die enge Verwandtschaft zwischen *S. sciuri* und *S. lentus* konnte auch in der phylogenetischen Analyse der *gap*-Sequenzen bestätigt werden. Somit bildeten die Mitglieder *S. sciuri*-Gruppe ein konstantes Cluster innerhalb der aus *hsp60*-, 16S rRNA-, *sodA*-, *rpoB*- und *gap*-Sequenzen generierten Stammbäume.

Die *S. hyicus/S.intermedius*-Gruppe, definiert sowohl durch die 16S rRNA- als auch durch die *rpoB*- und *hsp60*-Sequenzanalyse, umfasste *S. hyicus*, *S. chromogenes*, *S. muscae*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* und *S. felis*. Innerhalb des *sodA*-Stammbaums war die *S. intermedius*-Gruppe zu finden, die mit einem *Bootstrap*-Wert von 100% aus *S. intermedius* und *S. delphini* bestand. *Staphylococcus schleiferi* subsp. *schleiferi* und *S. felis* waren in dieser Gruppe allerdings nicht enthalten. Darüber hinaus ließen sich die verwandten Spezies *S. hyicus*, *S. muscae* und *S. chromogenes* auch nicht in einer *S. hyicus*-Untergruppe zusammenfassen. Die von den *gap*-Sequenzen abgeleiteten Ergebnisse unterstützen die Idee, *S. chromogenes* und andere nicht-*S. aureus* Koagulase-positive Staphylokokken, wie *S. intermedius*, *S. delphini* und *S. hyicus*, in die *S. hyicus/S. intermedius*-Gruppe einzuordnen. Allerdings befanden sich auch in unserer Studie *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* und *S. muscae* außerhalb der *S. hyicus/S. intermedius*-Gruppe. Basierend auf den *gap*-Gensequenzen konnten *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* und *S. muscae* mit in die *S. haemolyticus/S. simulans*-Gruppe eingegliedert werden. Betrachtet man den phylogenetischen 16S rRNA-Stammbaum, so wurde *S. felis* in den *S. hyicus/S.intermedius*-Stamm eingeordnet. Dennoch gab es Publikationen, die *S. felis*

in enger Verwandtschaft mit Spezies der *S. simulans*-Gruppe beschrieben (Kloos und Schleifer, 1986; Kloos und George, 1991). Der in dieser Arbeit entwickelte *gap*-Stammbaum bestätigte diese Untersuchungen. *Staphylococcus felis* befand sich dabei außerhalb der *S. hyicus*/*S. intermedius*-Gruppe in enger Verwandtschaft mit den Spezies der *S. simulans*-Gruppe.

*Staphylococcus simulans* und *S. carnosus* waren bei phylogenetischer Analyse der *gap*-Sequenzen sehr eng verwandt. Diese Beobachtung wurde durch die Stammbäume, erhalten aus den *sodA*-, *hsp60*- und *rpoB*-Sequenzen, bestätigt, stand aber im Gegensatz zu den Ergebnissen des 16S rRNA-basierten Stammbaumes.

Die *S. saprophyticus*-Gruppe, definiert durch die Analyse der 16S rRNA-Sequenzen, bestand aus den Novobiocin-resistenten, Oxidase-negativen Spezies *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, *S. arlettae*, *S. kloosii*, *S. cohnii*, *S. gallinarum*, *S. equorum* subsp. *equorum* und *S. xylosus*. Im *rpoB*-Stammbaum war *S. cohnii* außerhalb der *S. saprophyticus*-Gruppe abgebildet. Aus der Analyse der *sodA*-Sequenzen konnte man außerdem schließen, dass die Monophylie dieser Gruppe unsicher war, da sie einen *Bootstrap*-Wert von nur 68% besaß. Betrachtete man den *gap*-Stammbaum, so befanden sich *S. cohnii* und *S. xylosus* deutlich abseits der *S. saprophyticus*-Gruppe. Wie bereits erwähnt, wurde *S. cohnii* anhand des 16S rRNA-Stammbaumes der *S. saprophyticus*-Gruppe zugeordnet, was auch bei der Analyse der *hsp60*-Sequenzen der Fall war. Innerhalb des *gap*-basierten Stammbaumes waren die Verzweigungen von *S. auricularis*, *S. cohnii* und der heterogenen *S. saprophyticus*-Gruppe, bestehend aus *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, *S. equorum* subsp. *equorum*, *S. gallinarum*, *S. arlettae* und *S. kloosii*, wegen geringer *Bootstrap*-Werte nicht verlässlich.

Basierend auf den 16S rRNA-Daten wurde die *S. epidermidis*-Gruppe in fünf *Cluster*, vertreten durch *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. epidermidis* und *S. aureus*, eingeteilt (Kloos, 1997; Takahashi *et al.*, 1999). Das *S. epidermidis*-*Cluster*, welches aus *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. caprae* und *S. saccharolyticus* zusammengesetzt war, bildete bezüglich der 16S rRNA-Sequenzen eine monophyletische Verzweigung mit einem hohen *Bootstrap*-Wert von 97% (Kwok *et al.*, 2003). In der *rpoB*-Studie fand man *S. caprae* und *S. capitis* in der *S. haemolyticus*-Gruppe wieder. Ähnlich der *S. saprophyticus*-Gruppe bildete die *S. epidermidis*-Gruppe innerhalb des *sodA*-Stammbaumes keine deutlich abgegrenzte Verzweigung (*Bootstrap*-Wert von 38,9%). Ähnliche Ergebnisse waren bei der Auswertung des *gap*-basierten Stammbaumes zu verzeichnen. Darüber hinaus befand sich *S. caprae* innerhalb des *gap*-Stammbaumes in keiner engen Beziehung zu *S. epidermidis* oder *S. capitis*. Andererseits konnte man sowohl von den *gap*- als auch von den *rpoB*-Daten ableiten, dass *S. warneri* eng mit der *S. epidermidis*-Gruppe assoziiert war.

Der *tuf*-Stammbaum unterstützte die Ergebnisse der *gap*-Daten. *Staphylococcus warneri* war zum Beispiel bei Analyse der *tuf*-Sequenzen in verwandtschaftlicher Nähe der *S. epidermidis*-Gruppe zu finden. Dieser Ergebnisse wurden außerdem durch Studien über die Sequenzen des *sodA*-Gens bestätigt (Poyart *et al.*, 2001). Die Daten, welche aus dem Vergleich der *tuf*-Sequenzen erhalten wurden, zeigten oft eine größere intraspezifische Divergenz als die 16S rRNA-Daten. Offenbar waren die 16S rRNA-Sequenzen konservierter, als die *tuf*-Sequenzen. Ein paarweiser Vergleich der *tuf*-Sequenzen ließ erkennen, dass deren mittlere DNA-Sequenzähnlichkeit mit 92,6% geringer war, als die der 16S rRNA-Sequenzen mit 95,9%. Somit war das *tuf*-Gen zur Differenzierung eng verwandter *Staphylococcus*-Spezies geeigneter, als das 16S rRNA-Gen.

Die phylogenetische Analyse der *gap*-Sequenzen der Staphylokokken ergab einen Stammbaum, der sowohl topologische Ähnlichkeiten als auch geringfügige Unterschiede im Vergleich zum 16S rRNA-Stammbaum besaß.

Anhand der vorgestellten Daten wird deutlich, dass die Sequenzanalyse verschiedener Gene ein wichtiges Mittel zur Identifizierung von Bakterien und zur Erstellung phylogenetischer Studien ist. Die erhaltenen Stammbäume unterscheiden sich voneinander im Aufbau und Ähnlichkeitsgrad, in Abhängigkeit vom verwendeten Gen. Publikationen anderer Arbeitsgruppen zeigten ebenfalls, dass Gruppierungen, die aus zwei verschiedenen Sequenzen mit einem *Bootstrap*-Wert von >90% erhaltenen wurden, auch in Stammbäumen basierend auf anderen Genen beständig waren (Roux und Raoult, 2000). Betrachtet man die in dieser Arbeit aufgezeigten phylogenetischen Stammbäume, so konnte man vier statistisch abgesicherte Gruppierungen, die *S. hyicus/S. intermedius*-, die *S. sciuri*-, die *S. haemolyticus/S. simulans*- und die *S. aureus/S. epidermidis*-Gruppe, erkennen. Die Verzweigungen von *S. auricularis*, *S. cohnii* subsp. *cohnii* und der heterogenen *S. saprophyticus*-Gruppe, bestehend aus *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* und *S. equorum* subsp. *equorum*, waren weniger stabil. Die phylogenetische Analyse basierend auf den *gap*-Sequenzen machte sowohl Gemeinsamkeiten (z.B. die *S. hyicus/S. intermedius*- und die *S. sciuri*-Gruppe), als auch Unterschiede (z.B. die Gruppierungen von *S. arlettae* und *S. kloosii* im *gap*-Stammbaum) zwischen den Dendrogrammen basierend auf anderen Genen deutlich.

Die in dieser Arbeit vorgestellten phylogenetischen Beziehungen zwischen den *gap*-Sequenzen der *Staphylococcus*-Spezies stimmten außerdem mit den von Yugueros *et al.* publizierten Daten überein (Yugueros *et al.*, 2001). Die Homologie der partiellen *gap*-Sequenzen der verschiedenen *Staphylococcus*-Spezies lag zwischen 24,3 und 96%. Außerdem waren die Sequenzähnlichkeiten der partiellen *gap*-Gene geringer, als die der 16S rRNA- (~97%), *rpoB*- (~86%), *hsp60*- (~82%) und *sodA*-Gene (~78%).

Die Sequenzierung des *gap*-Gens könnte in Referenzlaboren zur Charakterisierung von Staphylokokken beitragen, die anhand ihrer phänotypischen Reaktionen nicht eingeordnet werden können. Speziell für eng verwandte *Staphylococcus*-Spezies könnte die Analyse der *gap*-Sequenzen von Vorteil sein, da das für solche Zwecke oft verwendete 16S rRNA-Gen hoch konserviert ist und somit nur eine beschränkte Differenzierung möglich ist. Die *gap*-Sequenzen sind ein gutes Mittel zur Differenzierung von *Staphylococcus*-Spezies und bietet außerdem die Möglichkeit die phylogenetische Beziehung zwischen Staphylokokken zu beurteilen. Eine exakte Differenzierung von *Staphylococcus*-Spezies ist außerdem die Grundlage, um die Pathophysiologie Staphylokokken-assoziiertes Krankheiten zu verstehen.

### **5.3 DIFFERENZIERUNG VON STAPHYLOCOCCUS SPP. DURCH GAP-BASIERTE T-RFLP**

Die Identifizierung von verschiedenen *Staphylococcus*-Spezies, speziell Koagulase-negativen Staphylokokken, im Rahmen der Routinediagnostik oder als Voraussetzung für pathophysiologische Untersuchungen, ist oft problematisch. Eine Ursache dafür ist die sich kontinuierlich entwickelnde Taxonomie des Genus *Staphylococcus* (Kloos und Bannerman, 1999; Trulzsch *et al.*, 2002). Außerdem benutzen die meisten Labore Identifizierungssysteme, die auf biochemischen Reaktionen beruhen. Hier kann die Variabilität der diagnostischen Reaktionen innerhalb einer Spezies und die subjektive Interpretation eine Fehlerquelle darstellen (Chesneau *et al.*, 2000; Marsou *et al.*, 2001). Klinisch wichtige Spezies müssen aber durch eine zuverlässige und reproduzierbare Methode identifiziert werden, um das pathogene Potential der verschiedenen *Staphylococcus*-Spezies zu untersuchen und zu verstehen. Aus diesem Grund wurden von anderen Arbeitsgruppen bereits verschiedene Ansätze zur molekulargenetischen Identifizierung von Staphylokokken entwickelt. Zum einen basierten Methoden auf der Detektion Spezies-spezifischer Sequenzen unter Verwendung von Oligonukleotiden für die PCR oder Sonden für Hybridisierungsversuche (Akatova *et al.*, 1993; Vandenesch *et al.*, 1995; Martineau *et al.*, 1996). Zum anderen wurden Variationen in universellen Genen analysiert. Das umfasst zum Beispiel die Sequenzierung der partiellen 16S rRNA- (Becker *et al.*, 2004), *hsp60*- (Goh *et al.*, 1996), *rpoB*- (Mellmann *et al.*, 2006), *sodA*- (Poyart *et al.*, 2001)- oder *dnaJ*-Gene (Shah *et al.*, 2007). Weitere PCR-basierte Methoden waren unter anderem die ITS (*internal transcribed spacer*)-PCR (Couto *et al.*, 2001) und Restriktionsanalysen wie die RFLP (Yugueros *et al.*, 2001; Barros *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2008) und das Ribotyping (Grimont und Grimont, 1986; Carretto *et al.*, 2005). Neue Ansätze für die Identifizierung von Staphylokokken waren der Einsatz der Fourier-Transformations-IR-Spektroskopie (Amiali *et al.*, 2007)

und das Protein-*Fingerprinting* (Benito *et al.*, 2008). Trotz der Vielfalt an möglichen Techniken muss immer abgewogen werden, wie praktikabel die jeweilige Methode für den Anwender ist. Es wurden zum Beispiel *Oligonukleotidarrays* und *Microarrays* zur Identifizierung von Staphylokokken entwickelt, die auf *femA*-, *rpoB*-, *hsp60*- und *sodA*-Genesequenzen basieren (Hamels *et al.*, 2001). Für einen *sodA*-Oligonukleotidarray wurde gezeigt, dass dieser innerhalb des Genus *Staphylococcus* 36 verschiedene Spezies differenzieren konnte (Giammarinaro *et al.*, 2005). Allerdings werden *Microarrays* gewöhnlich nicht zur Routinediagnostik in einem mikrobiologischen Labor eingesetzt. Die Gründe dafür sind zum einen die hohen finanziellen Investitionen und zum anderen technische Probleme wie Kreuzhybridisierungen, wenn eng verwandte Spezies an ein und dieselbe Sonde binden.

Im Vergleich dazu resultierte die in der vorliegenden Arbeit entwickelte *gap*-basierte T-RFLP Analyse zwar in komplexen, dafür aber in hohem Maße reproduzierbaren Mustern (Moyer *et al.*, 1996; Trotha *et al.*, 2002). Diese Muster erlaubten damit einen Vergleich mit den T-RFLP-Mustern der jeweiligen Staphylokokken-Referenzstämme. Computergestützte Analysen mit *rpoB* und *sodA*-Sequenzen aus den Datenbanken ergaben, dass diese Gene auch unter Anwendung verschiedener Restriktionsenzyme zum Aufbau einer T-RFLP-Analyse nicht geeignet waren. *In silico* Analysen basierend auf *gap*-Sequenzen jedoch zeigten, dass dieses Gen geeigneter war, um *Staphylococcus*-Isolate molekulargenetisch auf Spezies-Ebene zu identifizieren.

Das *gap*-Gen bildete somit die Grundlage für die Amplifikation eines ~933 bp Fragmentes, das anschließend mit Restriktionsenzymen geschnitten und die Größe der resultierenden terminalen Enden analysiert wurde. Liegen die Schnittstellen der Restriktionsenzyme innerhalb konservierter Regionen des *gap*-Gens, so kann daraus bei zwei verschiedenen Spezies dieselbe Fragmentgröße und damit ein identisches Signal im T-RFLP-Profil resultieren. Um den Informationsgehalt der T-RFLP-Profile zu erhöhen, wurden beide Primer mit verschiedenen Fluoreszenzmarkierungen versehen und das erhaltene *gap*-Fragment mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. In der Literatur variiert die Anzahl an verwendeten Restriktionsenzymen je nach Anwendung von eins (Rogers *et al.*, 2004) bis fünf (Sakamoto *et al.*, 2006). Aber auch Abweichungen innerhalb der T-RFLP-Muster müssen dabei in Betracht gezogen werden. Es wurden mehr als 130 klinische *Staphylococcus*-Isolate analysiert, um die T-RFLP-Muster der Referenzstämme zu verifizieren. Dabei wurden Abweichungen zwischen -2 und +2 bp im Vergleich zu den *in silico* ermittelten Größen der T-RFs detektiert. Diese Unterschiede zwischen den gemessenen und theoretisch ermittelten Fragmentgrößen wird als T-RF *Drift* bezeichnet. Der T-RF *Drift* wird durch kleine Unterschiede im Molekulargewicht der T-RFs, ausgelöst entweder durch den Gehalt an Purinen oder die Fluoreszenzmarkierung, verursacht (Kaplan und Kitts, 2003).

Um die Reproduzierbarkeit der *gap*-basierten T-RFLP zu untersuchen, wurden Quantile-Quantile-Plots der Datensätze von *S. haemolyticus*- und *S. epidermidis*-Isolaten erstellt. Ein annähernd linearer Plot deutet dabei auf eine Normalverteilung der Daten und geringe Stamm zu Stamm Variationen der verschiedenen Isolate einer Spezies hin. Diese Abweichungen nahmen allerdings bei T-RFs<100 bp und T-RFs>500 bp zu. Ähnliche Limitationen der T-RFLP-Technik wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Engebretson und Moyer, 2003), die das realistische Auflösungsvermögen der Kapillargelelektrophorese zwischen 50 bp und 500 bp angeben.

Bei der Typisierung der verschiedenen klinischen *Staphylococcus*-Isolate traten nur in einem Fall Abweichungen von den T-RFLP-Mustern der Referenzstämme auf. Die Analyse verschiedener *S. hominis* subsp. *hominis*-Isolate ergab ein T-RFLP-Muster, was von dem des *S. hominis* subsp. *hominis*-Referenzstammes abwich. Das HEX-markierte Fragment der *DdeI*-Restriktion war, verglichen mit demselben Fragment des Referenzstammes, größer. Dieses größere Fragment entstand dadurch, dass innerhalb des *gap*-Gens durch Änderungen in der Nukleotidsequenz eine *DdeI*-Schnittstelle entfallen war. Auch Abweichungen von den erwarteten T-RFLP-Mustern, bedingt durch Nukleotidänderungen innerhalb des *gap*-Gens und damit verbundenem Entstehen oder Wegfallen von Schnittstellen der Restriktionsenzyme, müssen bei der Anwendung dieser Methode in Betracht gezogen werden.

Die Differenzierung von *Staphylococcus*-Spezies wurde durch die Analyse der terminalen Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismen (T-RFLP) des *gap*-Gens etabliert. Die T-RFLP wurde dafür auf partiellen *gap*-Sequenzen von Referenzstämmen aufgebaut und die Reproduzierbarkeit durch die Identifizierung von klinischen Isolaten bewiesen. Neben der Identifizierung von Staphylokokken aus Bakterienkulturen, können diese auch aus Direktmaterial, ohne vorherige Anzucht, identifiziert werden.

## **5.4 VERGLEICH VERSCHIEDENER METHODEN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON KLINISCHEN STAPHYLOCOCCUS SPP.**

Zuverlässige Identifizierungen und Resistenztestungen von klinisch relevanten Bakterien sind für die Routinediagnostik in mikrobiologischen Laboratorien unbedingt erforderlich. Zu den automatisierten, phänotypischen Identifizierungssystemen gehören das Vitek<sup>®</sup>2 und das Phoenix<sup>™</sup>. Im Folgenden wurden die phänotypischen Identifizierungen, d.h. das Vitek<sup>®</sup>2 mit der neuen kolorimetrischen ID-GP-

Identifizierungskarte und das Phoenix<sup>TM</sup> mit der dazugehörigen ID-13-Identifizierungskarte, mit einer molekularen Referenzmethode, der *gap*-basierten T-RFLP, verglichen. Es gibt bis jetzt erst wenige Veröffentlichungen, die sich mit der Evaluierung der Identifizierungskarten für *Staphylococcus*-Spezies auf dem Vitek<sup>®</sup>2 beschäftigten. Ligozzi *et al.* beschrieben ähnliche Ergebnisse, wie sie bei den Isolaten dieser Arbeit dokumentiert wurden. 86 von 100 Koagulase-negativen Staphylokokken wurden korrekt bis auf die Speziesebene identifiziert, zehn Isolate wurden mit geringer Diskriminierung richtig identifiziert, ein Isolat wurde falsch identifiziert und drei Isolate konnten gar nicht identifiziert werden. Im Detail wurde zum Beispiel *S. epidermidis* zu 92,7% korrekt identifiziert (Ligozzi *et al.*, 2002). Spanu *et al.* analysierten 275 Koagulase-negative Staphylokokken mit dem Vitek<sup>®</sup>2-System und der fluorimetrischen ID-GPC-Karte (Spanu *et al.*, 2003). Dabei wurden die Ergebnisse des Vitek<sup>®</sup>2 als korrekt angesehen, wenn sie durch das ATB ID32 STAPH-System und zusätzliche manuellen Tests bestätigt werden konnten. Insgesamt identifizierte das Vitek<sup>®</sup>2 in dieser Studie 90,5% der *Staphylococcus*-Spezies richtig. Spanu *et al.* erklärten auch, dass die Identifizierung für spezielle *Staphylococcus*-Spezies, zum Beispiel *S. hominis*, immer noch verbessert werden müsste. Eine Arbeit über die neue kolorimetrische Identifizierungskarte ID-GP des Vitek<sup>®</sup>2 wurde von Funke und Funke-Kissling veröffentlicht. 89 von 95 Koagulase-negativen Staphylokokken wurden bis auf die Speziesebene korrekt identifiziert, fünf Isolate wurden mit geringer Diskriminierung richtig identifiziert und nur ein Isolat wurde falsch bestimmt (Funke und Funke-Kissling, 2005). Somit kamen sie zu dem Schluss, dass die neue ID-GP-Karte für das Vitek<sup>®</sup>2 verlässliche Ergebnisse zur Identifizierung von Gram-positiven Kokken in einem routinediagnostischen Labor liefert. Wallet *et al.* verwendeten das Vitek<sup>®</sup>2-System mit der fluorimetrischen (ID-GPC) und der kolorimetrischen (ID-GP) Karte für die Identifizierung von Gram-positiven Bakterien (Wallet *et al.*, 2005). Für Gram-positive Bakterien, inklusive Staphylokokken, wurden mit der kolorimetrischen Identifizierungskarte bessere Ergebnisse erzielt. Für Spezies der Familie *Micrococcaceae* allerdings erhielt man mit der kolorimetrischen Karte 87,2% und mit der fluorimetrischen Karte 98,3% korrekte Identifizierungen. Weiterhin gibt es Veröffentlichungen, dass das Vitek<sup>®</sup>2-System (ID-GPC) sehr oft Koagulase-negative Staphylokokken nicht identifizieren kann und deshalb als *Kocuria* spp. angibt (Ben-Ami *et al.*, 2005). Ob sich diese Unzulänglichkeit auch bei der neuen ID-GP Karte zeigt, muss in weiteren Studien untersucht werden (Ben-Ami *et al.*, 2005; Boudewijns *et al.*, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden zuerst 28 *Staphylococcus*-Referenzstämme mit den ID-GPC und den ID-GP-Identifizierungskarten des Vitek<sup>®</sup>2-Systems, dem Phoenix<sup>TM</sup>-System und dem ATB ID32 STAPH-System bestimmt. Das Vitek<sup>®</sup>2 mit der fluorimetrischen ID-GPC-Karte identifizierte nur 42,3% der Referenzstämme korrekt.

Die kolorimetrische ID-GP-Karte enthält neue Tests, die die Identifizierung von mehr Spezies zulässt. Der Datenbank des Vitek<sup>®</sup>2 wurden die Spezies *S. arlettae*, *S. caprae*, *S. carnosus* und *S. equorum* hinzugefügt. Diesbezüglich konnten mit der neuen Karte 74,1% der Referenzstämme richtig identifiziert werden. Allerdings wurde der Referenzstamm *S. arlettae* mit der verbesserten ID-GP-Karte falsch bestimmt. Bis jetzt existieren erst wenige Veröffentlichungen über die Genauigkeit des Phoenix<sup>™</sup>-Systems bei der Identifizierung von Gram-positiven Stämmen, speziell Staphylokokken. In einer Studie zeigten Fahr *et al.*, dass die Ergebnisse, die mit dem Phoenix<sup>™</sup>-System erzielt wurden sehr gut mit den Ergebnissen des Vitek<sup>®</sup>2 (ID-GPC-Karte) übereinstimmten (Fahr *et al.*, 2003). Die hier aufgeführten Daten unterstützen diese Aussage. Die aktuellen Datenbanken für *Staphylococcus*-Spezies ähneln sich sowohl bei den automatisierten Systemen Vitek<sup>®</sup>2 und Phoenix<sup>™</sup> als auch beim halbautomatisierten ATB ID32 STAPH. In diesem Zusammenhang identifizierte das Phoenix<sup>™</sup> 66,7% der Referenzstämme korrekt. Die klinischen Staphylokokken-Isolate ( $n = 86$ ) dieser Arbeit wurden so gewählt, dass sie der typischen Verteilung an *Staphylococcus* spp. in einem mikrobiologischen Labor entsprechen. Die beiden automatisierten Identifizierungssysteme zeigten unterschiedliche Ergebnisse. Das Vitek<sup>®</sup>2 mit der neueren GP-Karte identifizierte 6,98% der Isolate falsch, während das Phoenix<sup>™</sup> bei 13,95% der klinischen Isolate ein falsches Ergebnis erzielte. Somit wurden auch beim Einsatz automatisierter Systeme klinische Stämme nur unzureichend oder sogar falsch identifiziert. Das galt sowohl für Spezies die äußerst selten mit Infektionen assoziiert sind, als auch für gemeinsam auftretende Spezies, wie *S. epidermidis* und *S. haemolyticus*. Neben der höchst wichtigen Identifizierung von *S. aureus*, gewinnt auch die Differenzierung von Koagulase-negativen Staphylokokken immer mehr an Bedeutung. KNS werden zunehmend als Pathogene beschrieben, deren Auftreten beträchtliche Konsequenzen für das Management nosokomialer Infektionen mit sich bringen (Huang *et al.*, 2006). Sie verursachen nosokomial induzierte Infektionen des Blutsystems und sind die häufigsten Kontaminationen in Blutkulturen. Die Bewertung der klinischen Bedeutung von Koagulase-negativen Staphylokokken ist angesichts des Infektionsrisikos in medizinischen Einrichtungen unbedingt notwendig, gestaltet sich aber oft als relativ schwierig (Beekmann *et al.*, 2005). Auffallend ist außerdem, dass in fast allen Publikationen, die die Funktion von phänotypischen Identifizierungssystemen wie dem Vitek<sup>®</sup>2 und dem Phoenix<sup>™</sup> beurteilen, das ATB ID32 STAPH-System als Vergleich verwendet wird. Wenn die Ergebnisse dieser phänotypischen Identifizierungen übereinstimmten, wurden keine molekularen Methoden zur Bestätigung herangezogen. Theoretisch könnten einige der Isolate, die in dieser Arbeit mit der *gap*-basierten T-RFLP identifiziert wurden, von allen drei phänotypischen Identifizierungssystemen, Vitek<sup>®</sup>2, Phoenix<sup>™</sup> und ATB ID32 STAPH falsch bestimmt werden. Cunha *et al.* zum Beispiel zeigten in einer Publikation, dass das ATB ID32



STAPH nicht in der Lage ist, *Staphylococcus*-Spezies korrekt zu identifizieren (Cuhna *et al.*, 2004). Dabei verglichen sie ihre Referenzmethode, das Schema für die Identifizierung von KNS, aufgestellt von Kloos und Schleifer (Kloos und Schleifer, 1975) und modifiziert von Bannerman *et al.* (Bannerman *et al.* 1993), mit dem ATB ID32 STAPH (Renneberg *et al.*, 1995). In der Publikation von Renneberg *et al.* identifizierte das ATB ID32 STAPH-System 82,1% der getesteten KNS-Isolate korrekt. Vergleicht man das mit den Daten dieser Arbeit, dann erreichte das ATB ID32 STAPH bei den Referenzstämmen und klinischen Isolaten 89,4% korrekte Identifizierungen. Cuhna *et al.* beobachteten inkorrekte Ergebnisse, bei der Identifizierung von *S. epidermidis* (2,2%), *S. hominis* (25%), *S. haemolyticus* (37,5%) und *S. warneri* (47,1%) mit dem ATB ID32 STAPH (Cuhna *et al.*, 2004). Vergleicht man das mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, so identifizierte das ATB ID32 STAPH von sieben *S. epidermidis*-Isolaten eins falsch (14,3%). Ebenfalls konnte der Referenzstamm *S. kloosii* von diesem System nicht korrekt identifiziert werden.

Die Identitäten aller klinischen Isolate dieser Arbeit wurden genotypisch mit der *gap*-basierten T-RFLP bestimmt und diese Ergebnisse gleichzeitig als Referenz für die automatisierten, phänotypischen Identifizierungssysteme verwendet. Wenn es größere Unterschiede zwischen den phänotypischen und der genotypischen Identifizierungsergebnissen gab, wurde die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens (Becker *et al.*, 2004; Heikens *et al.*, 2005) zur endgültigen Bestimmung der Spezies durchgeführt. Weil das ATB ID32 STAPH-System in vielen Studien normalerweise als Referenzmethode verwendet wird, wurden auch in dieser Arbeit einige Isolate mit diesem System analysiert und die Ergebnisse aufgeführt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass mit der neuen Identifizierungskarte des Vitek<sup>®</sup>2-Systems in den meisten Fällen korrekte Ergebnisse erzielt wurden. Ähnlich waren die Ergebnisse für das Phoenix<sup>™</sup>-System. Beide automatisierten Systeme ermöglichen somit relativ genaue Identifizierungen in der Routinediagnostik. Sind allerdings eindeutige Identifizierungen von verschiedenen *Staphylococcus*-Spezies notwendig, so sind genotypische Identifizierungsmethoden, wie zum Beispiel die *gap*-basierte T-RFLP, den phänotypischen automatisierten Systemen immer noch überlegen.

## **5.5    UNTERSUCHUNGEN DER INDUKTION DER ANGEBORENEN IMMUNANTWORT IN EPITHELIALEN ZELLEN DURCH STAPHYLOCOCCUS-SPEZIES.**

Bakterielle Infektionen führen zur Induktion und Verschlimmerung von entzündlichen Hauterkrankungen, wie zum Beispiel Psoriasis und atopischer Dermatitis. Trotz zahlreicher Ansätze existiert bisher noch kein einheitliches Konzept, welches die

Pathogenese der atopischen Dermatitis genauer erklären kann. Daher war es von hohem Interesse, den Beitrag von Staphylokokken und ihren Produkten zum Pathomechanismus dieser akut und chronisch ablaufenden Hauterkrankung zu analysieren.

Ekzemherde bei Patienten mit atopischer Dermatitis sind zu 90% mit *S. aureus* besiedelt (Leyden *et al.*, 1974; Abeck und Mempek, 1998), während bei gesunder Haut *S. aureus* nur in 5% der Fälle isoliert wird (Baker, 2006). Diese Stämme können verstärkt Superantigene produzieren und verschlimmern somit die Entzündungsreaktion (Skov und Baadsgaard, 2000). Auch bei Koagulase-negativen Staphylokokken, die aus Material von Patienten mit Hautinfektionen isoliert wurden, wurde von einer Arbeitsgruppe, die Produktion von Superantigenen, detektiert durch einen passiven Latex-Agglutinationstest, beschrieben (Akiyama *et al.*, 2000). Im Verlauf meiner Arbeit wurden aus dem Patientenmaterial von Patienten mit AD neben *S. aureus* noch *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. hominis* und *S. schleiferi* isoliert. Dabei war kein verstärktes Auftreten von *S. aureus*-Isolaten zu beobachten. Allerdings wurden in der vorliegenden Arbeit viel weniger Patienten betrachtet, als es in Studien über das Auftreten von *S. aureus* bei Hautinfektionen der Fall war. Außerdem besaß keines der in meiner Arbeit untersuchten Isolate Gene für Staphylokokken-Superantigene. Auch das könnte wiederum durch die eingeschränkte Anzahl an Proben erklärt werden. Akiyama *et al.* zum Beispiel untersuchten 136 Koagulase-negative Staphylokokken und konnten bei 6,6% die Produktion von Superantigenen nachweisen (Akiyama *et al.*, 2000). Bei vier der in dieser Arbeit untersuchten Patientenisolate konnten die Gene für  $\gamma$ -Hämolysin und Leukozidin LukED detektiert werden. Diese 2-Komponenten-Toxine bilden Poren in Erythrozyten und Leukozyten, was zur Lyse der Zellen führt. Positiv für diese Leukotoxine waren neben drei *S. aureus*-Isolaten auch ein *S. epidermidis*-Isolat. In der Literatur ist beschrieben, dass die meisten *S. aureus*-Stämme  $\gamma$ -Hämolysin produzieren (Prevost *et al.*, 1995a, 1995b). Die Gene für das Leukozidin LukED finden sich in 30% der klinischen *S. aureus*-Isolate (Gravet *et al.*, 1998). Angaben zu Leukotoxinen im Zusammenhang mit *S. epidermidis* sind in bisherigen Publikationen nicht zu finden. In vergleichende Genomanalysen von *S. aureus* und *S. epidermidis*-Stämmen wurde gezeigt, dass Pathogenitätsinseln für Enterotoxine, Exotoxine und Leukozidine spezifisch für *S. aureus* sind. Im selben Zusammenhang wurde allerdings auch postuliert, dass neben *S. aureus* auch *S. epidermidis* in der Lage ist Pathogenitätsfaktoren von anderen Gram-positiven Bakterien aufzunehmen (Gill *et al.*, 2005). Somit besteht die Möglichkeit, dass das hier aufgeführte *S. epidermidis*-Isolat die Gene für die Leukotoxine durch Gentransfer von anderen Staphylokokken erhalten akquirierte.

In der frühen Phase einer Infektion führen die Interaktionen zwischen den pathogenen Mikroorganismen und den Zellen der angeborenen Immunantwort zu einer Induktion der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 und des Chemokins IL-8 (Janeway und Travers, 2002). Dabei spielen IL-6 und IL-8 als proinflammatorische Mediatoren eine große Rolle. In der vorliegenden Arbeit wurden HaCaT-Zellen mit verschiedenen *Staphylococcus*-Spezies, sowohl mit Referenzstämmen als auch mit klinischen Isolaten, infiziert, und die sezernierten Mengen an IL-6 und IL-8 bestimmt. Eine erhöhte IL-6- und IL-8-Expression war im zeitlichen Verlauf aller Infektionen zu verzeichnen. Die Menge an induziertem IL-6 und IL-8 ist dabei allerdings isolat- bzw. stammspezifisch. Staphylokokken sind grampositive Bakterien, deren Liganden von den *Toll-like* Rezeptoren (TLR) 2 und 6 erkannt werden. Zellwandkomponenten, wie Peptidoglykan und Lipoteichonsäure, werden über den TLR-2 gebunden. Das angeborene Immunsystem reagiert darauf mit der Aktivierung unterschiedlicher Proteinkinasen, des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und der Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen, wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und IL-10. Das Protein A von *S. aureus* bindet unter anderem an den TNF- $\alpha$ -Rezeptor-1 und löst dort die immunmodulatorischen Effekte von TNF- $\alpha$  aus, zu denen auch die NF- $\kappa$ B-abhängige IL-8-Produktion gehört (Gomez *et al.*, 2004). Auch andere Virulenzfaktoren von Staphylokokken, z.B. extrazelluläre Enzyme, Toxine und Proteasen, sind in der Lage eine inflammatorische Reaktionen des Immunsystems hervorzurufen. Allerdings sind Einflüsse dieser Komponenten noch nicht klar definiert (Fournier und Philpott, 2005).  $\alpha$ -Hämolyisin induziert die Produktion von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und in geringen Mengen auch TNF- $\alpha$  (Onogawa, 2002). Es ist bekannt, dass diese IL-8-Produktion ebenfalls NF- $\kappa$ B-abhängig ist (Dragneva *et al.*, 2001). Im Gegensatz zum  $\alpha$ -Hämolyisin lysiert  $\beta$ -Hämolyisin Zellen, die Mediatoren enthalten. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass  $\beta$ -Hämolyisin Monozyten zerstört und somit IL-1 $\beta$  freisetzt (Walev *et al.*, 1996). Sachse *et al.* publizierten 2008, dass Serinproteasen von *S. epidermidis* die Produktion von Chemokinen, wie IL-8, NF- $\kappa$ B-abhängig aktivieren (Sachse *et al.*, 2008).

Fasst man die aktuelle Literatur zusammen so wird deutlich, dass eine Vielzahl von Molekülen der Staphylokokken, wahrscheinlich auch einige, die noch nicht bekannt sind, mit dem angeborenen Immunsystem interagieren und somit die Produktion von Zytokinen und andere inflammatorische Prozesse auslösen (Fournier und Philpott, 2005). Die erhaltenen IL-6- und IL-8-Daten der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Annahme. Alle verwendeten Staphylokokken wurden bezüglich ausgewählter Virulenzfaktoren charakterisiert, wobei Unterschiede auftraten. Es ist davon auszugehen, dass sich bei der weiteren Charakterisierung die Individualität jedes Stammes bestätigt. Das individuelle, aber komplexe Zusammenspiel von Oberflächenproteinen und Virulenzfaktoren der Staphylokokken würde somit die

unterschiedlichen inflammatorischen Antworten des angeborenen Immunsystems erklären.

Defensine und Cathelizidine sind ebenfalls wichtige Komponenten der angeborenen Immunität, da sie neben ihren antimikrobiellen Eigenschaften, im Sinne einer Verbindung zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunantwort, auch Zytokin-ähnliche Eigenschaften besitzen (Yang *et al.*, 1999). Außerdem stimulieren  $\beta$ -Defensine Epithelzellen zur Synthese von immunmodulatorischen Mediatoren (IL-6, IL-10, IL-18) und haben positive Einflüsse deren Migration und Proliferation (Niyosaba *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden die induzierten mRNA-Mengen an hBD1, hBD2, hBD3 und LL-37 im Verlauf der Infektionen mit verschiedenen *Staphylococcus*-Spezies bestimmt. Als Ergebnis dieser Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Staphylokokken isolatspezifisch unterschiedliche mRNA-Mengen der jeweiligen Gene induzierten, wobei die Induktion der hBD2 mRNA am stärksten war. Für hBD2 wurde als erstes humanes Defensin gezeigt, dass es als Antwort auf lokal induzierte Entzündungsreaktionen in läsionalen Hautschuppen gebildet wird (Harder *et al.*, 1997). Später konnte es auch in kultivierten Epithelzellen der Bronchien, der Lunge, der Nase, des Magens und des Darms nachgewiesen werden (Schröder und Harder, 1999). Genomanalysen von hBD2 deuten darauf hin, dass die Promoterregion von hBD2 Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren enthält, die alle an der Induktion und Regulation inflammatorischer Prozesse beteiligt sind (Harder *et al.*, 2000). Die Produktion von hBD2 wird somit durch verschiedene bakterielle Produkte und proinflammatorische Zytokine induziert (Menendez und Finlay, 2007). In Keratinozyten wird die hBD2-Synthese durch den IL-1-Rezeptor, welcher durch IL-1 $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  aktiviert wird, oder durch TNF- $\alpha$  induziert (Menendez und Finlay, 2007). Obwohl der NF- $\kappa$ B-Signalweg als wichtigstes Element der hBD2-Induktion angesehen wird (Voss *et al.*, 2006), gibt es auch Veröffentlichungen, welche die Induktion von hBD2 über MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalwege beschreiben (McDermott *et al.*, 2003; Ouhara *et al.*, 2006). Die exprimierten mRNA-Mengen von hBD1, hBD3 und LL-37 waren, verglichen mit der hBD2 mRNA, geringer. Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass hBD-1 konstitutiv exprimiert wird (Bals und Griese, 1999). Allerdings zeigen neuere Publikationen dass hBD1 durch bakterielle Produkte induzierbar ist (Menendez und Finlay, 2007). Die erhöhte Expression von hBD3 wurde unter anderem bereits für gastrische Epithelzellen, welche mit *Helicobacter pylori* infiziert waren (Boughan *et al.*, 2006), und für mit *S. aureus* infizierte primäre, humane Keratinozyten, beschrieben (Menzies und Kenoyer, 2006). Anstatt durch den NF- $\kappa$ B-Signalweg scheint die hBD3-Induktion hauptsächlich durch den MAPK/p38-Signalweg abzulaufen (Menzies und Kenoyer, 2006). Zu den ebenfalls antimikrobiell aktiven Proteinen der Haut des Menschen gehört das Cathelizidin LL-37. Bei Verletzungen der Haut wird eine erhöhte Synthese von LL-37 detektiert.

Es gibt keinen Beweis für die direkte Induktion von LL-37 durch proinflammatorische Zytokine, wie es bei humanen  $\beta$ -Defensinen der Fall ist (Gilliet und Lande, 2008). Allerdings konnte die erhöhte Expression von LL-37 in Keratinozyten durch *S. aureus* gezeigt werden (Midorikawa *et al.*, 2003). In kultivierten Keratinozyten konnte nur der Wachstumsfaktor IGF-I (*insulin-like growth factor*), welcher eine wichtige Rolle bei der Geweberegeneration nach Verletzung spielt, die Expression von LL-37 induzieren (Sorensen *et al.*, 2003a).

Als Reaktion auf PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) aktiviert das angeborene Immunsystem verschiedene proinflammatorische Signalwege. Bis heute geht man davon aus, dass alle diese Signalwege, die TLR-abhängigen und die TLR-unabhängigen, NF- $\kappa$ B und/oder MAPK mit einbeziehen und letztendlich zur Produktion von antimikrobiellen Peptiden führen. Zellen reagieren somit auf unterschiedliche Stimuli mit der Expression verschiedener antimikrobieller Peptide. Außerdem bedingen oft verschiedene Signalwege die erhöhte Expression ein und desselben antimikrobiellen Peptids. Damit lassen sich die verschiedenen stark exprimierten Mengen an IL-6, IL-8 und der mRNA-Mengen von hBD1, hBD2, hBD3 und LL-37 erklären. Weiterhin besaß jeder eingesetzte Staphylokokken-Stamm verschiedene PAMPs und induzierte damit bereits isolatspezifisch unterschiedliche Mengen an IL-6 und IL-8. Diese proinflammatorischen Zytokine führten wiederum über diverse Signalwege zur Produktion antimikrobieller Peptide.

Die Induktion der angeborenen Immunantwort in epithelialen Zellen durch *Staphylococcus*-Spezies war isolatspezifisch. Sowohl die Staphylokokken-Referenzstämme, als auch die Staphylokokken-Isolate von Patienten mit atopischer Dermatitis, induzierten verschieden stark die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8, der humanen  $\beta$ -Defensine 1-3 und des Cathelidins LL-37.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Staphylokokken sind ein natürlicher Bestandteil der menschlichen Hautflora und kolonisieren sowohl die äußere Haut als auch die Schleimhäute und Hautdrüsen. Dennoch werden *Staphylococcus aureus* und einige andere *Staphylococcus*-Spezies als potenziell humanpathogene Bakterien beschrieben. Sie nehmen eine bedeutende Rolle als Erreger nosokomialer und ambulant erworbener Infektionen, welche oft mit schweren Krankheitsverläufen verbunden sind, ein. Ziele dieser Arbeit waren die Charakterisierung der zirkulierenden *S. aureus*-Stämme am Universitätsklinikum Magdeburg unter Berücksichtigung der Methicillin-Resistenz, die Optimierung der Differenzierung von *Staphylococcus*-Spezies und Untersuchungen zur Induktion der angeborenen Immunantwort durch Staphylokokken-Isolate.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende wichtige Ergebnisse erzielt:

I. *Staphylococcus aureus*-Isolate aus dem Universitätsklinikum Magdeburg waren bezüglich ihrer Antibiotikaresistenzen und Virulenzfaktoren heterogen. Auffällig war ein hoher Anteil von Methicillin-sensiblen *S. aureus* (MSSA), die das Gen für das Toxisch-Schock-Syndrom-Toxin-1 (*tst*) trugen und aus Patientenmaterialien von Hochrisikostationen für Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) isoliert wurden. Populationsgenetische Analysen dieser Isolate zeigten auf, dass diese MSSA das Potential besitzen, sich als neu auftretende *tst*-positive MRSA in der Umwelt zu etablieren.

II. Die Differenzierung von *Staphylococcus*-Spezies wurde durch die Analyse der terminalen Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismen (T-RFLP) des Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Gens (*gap*-Gen) etabliert. Die T-RFLP wurde auf partiellen *gap*-Sequenzen von Referenzstämmen aufgebaut und die Reproduzierbarkeit durch die Identifizierung von klinischen Isolaten bewiesen.

III. Für die exakte Differenzierung verschiedener *Staphylococcus*-Spezies war die genotypische Identifizierung unter Verwendung der *gap*-basierten T-RFLP den phänotypischen, automatisierten Identifizierungssystemen überlegen.

IV. Die Induktion der angeborenen Immunantwort in epithelialen Zellen durch *Staphylococcus*-Spezies war isolatspezifisch. Staphylokokken-Isolate von Patienten mit atopischer Dermatitis induzierten verschieden stark die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8, der humanen  $\beta$ -Defensine 1-3 und des Cathelicidins LL-37.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Abeck, D. and Mempel, M. (1998) Staphylococcus aureus colonization in atopic dermatitis and its therapeutic implications. *Br J Dermatol* **139 Suppl 53**: 13-16.

Agerberth, B., Charo, J., Werr, J., Olsson, B., Idali, F., Lindbom, L., Kiessling, R., Jornvall, H., Wigzell, H., and Gudmundsson, G. H. (2000) The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* **96**: 3086-3093.

Aires, de Sousa, Conceicao, T., Simas, C., and de Lencastre, H. (2005) Comparison of genetic backgrounds of methicillin-resistant and -susceptible Staphylococcus aureus isolates from Portuguese hospitals and the community. *J Clin Microbiol* **43**: 5150-5157.

Akatova, E. A., Schumacher-Perdreau, F., and Pulverer, G. (1993) A molecular biology approach to the species identification of coagulase-negative staphylococci. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 3-6.

Akiyama, H., Yamasaki, O., Tada, J., and Arata, J. (2000) The production of superantigenic exotoxins by coagulase-negative staphylococci isolated from human skin lesions. *J Dermatol Sci* **24**: 142-145.

Alouf, J. E. and Müller-Alouf, H. (2003) Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int J Med Microbiol* **292**: 429-440.

Amiali, N. M., Mulvey, M. R., Sedman, J., Louie, M., Simor, A. E., and Ismail, A. A. (2007) Rapid identification of coagulase-negative staphylococci by Fourier transform infrared spectroscopy. *J Microbiol Methods* **68**: 236-242.

Andersson, M., Gunne, H., Agerberth, B., Boman, A., Bergman, T., Sillard, R., Jornvall, H., Mutt, V., Olsson, B., Wigzell, H., and . (1995) NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity. *EMBO J* **14**: 1615-1625.

Andreu, D. and Rivas, L. (1998) Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* **47**: 415-433.

Andreu, D., Carreno, C., Linde, C., Boman, H. G., and Andersson, M. (1999) Identification of an antimycobacterial domain in NK-lysin and granulysin. *Biochem J* **344 Pt 3**: 845-849.

Anguera, I., Del Rio, A., Miro, J. M., Matinez-Lacasa, X., Marco, F., Guma, J. R., Quaglio, G., Claramonte, X., Moreno, A., Mestres, C. A., Mauri, E., Azqueta, M., Benito, N., Garcia-de la Maria, C., Almela, M., Jimenez-Exposito, M. J., Sued, O., De Lazzari, E., and Gatell, J. M. (2005) Staphylococcus lugdunensis infective endocarditis: description of 10 cases and analysis of native valve, prosthetic valve, and pacemaker lead endocarditis clinical profiles. *Heart* **91**: e10.

Announ, N., Mattei, J. P., Jaoua, S., Fenollar, F., Sati, H., Chagnaud, C., Roudier, J., and Guis, S. (2004) Multifocal discitis caused by Staphylococcus warneri. *Joint Bone Spine* **71**: 240-242.

Archer, G. L. (1998) Staphylococcus aureus: a well-armed pathogen. *Clin Infect Dis* **26**: 1179-1181.

Arvidson, S. (2000) Extracellular enzymes. In *Gram-positive pathogens*. Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferreti, J.J., Portnoy, D.A., and Rood, J.I. (eds.) Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 379-385.

Baker, B. S. (2006) The role of microorganisms in atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* **144**: 1-9.

Bals, R., Wang, X., Zasloff, M., and Wilson, J. M. (1998) The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9541-9546.

Bals, R. and Griese, M. (2001) Kleinmolekulare antimikrobielle Substanzen in der Atemwegsflüssigkeit. In *Mukoviszidose-Zystische Fibrose*. Reinhardt, D., Goetz, M., and Kraemer, R. (eds.) Berlin: Springer, pp. 144-143.

- Bannerman, T. L., Kleeman, K. T., and Kloos, W. E. (1993) Evaluation of the Vitek Systems Gram-Positive Identification card for species identification of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* **31**: 1322-1325.
- Bannerman, T.L. (2003) Gram-positive cocci. Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In *Manual of Clinical Microbiology*. Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, J.C., and Tenover, J.C. (eds.) Washington DC: ASM Press.
- Barros, E. M., Iorio, N. L., Bastos, Mdo C., Dos Santos, K. R., and Giambiagi-Demarval, M. (2007) Species-level identification of clinical staphylococcal isolates based on polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a partial groEL gene sequence. *Diagn Microbiol Infect Dis* **59**: 251-257.
- Becker, K., Roth, R., and Peters, G. (1998) 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* **36**: 2548-2553.
- Becker, K., Friedrich, A. W., Lubritz, G., Weilert, M., Peters, G., and von Eiff, C. (2003) Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of Staphylococcus aureus isolated from blood and nasal specimens. *J Clin Microbiol* **41**: 1434-1439.
- Becker, K., Harmsen, D., Mellmann, A., Meier, C., Schumann, P., Peters, G., and von Eiff, C. (2004) Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of Staphylococcus species. *J Clin Microbiol* **42**: 4988-4995.
- Beekmann, S. E., Diekema, D. J., and Doern, G. V. (2005) Determining the clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures. *Infect Control Hosp Epidemiol* **26**: 559-566.
- Bellamy, R. and Barkham, T. (2002) Staphylococcus lugdunensis infection sites: predominance of abscesses in the pelvic girdle region. *Clin Infect Dis* **35**: E32-E34.
- Ben Ami, R., Navon-Venezia, S., Schwartz, D., Schlezinger, Y., Mekuzas, Y., and Carmeli, Y. (2005) Erroneous reporting of coagulase-negative Staphylococci as Kocuria spp. by the Vitek 2 system. *J Clin Microbiol* **43**: 1448-1450.
- Benito, M. J., Serradilla, M. J., Martin, A., Aranda, E., Hernandez, A., and Cordoba, M. G. (2008) Differentiation of Staphylococci from Iberian dry fermented sausages by protein fingerprinting. *Food Microbiol* **25**: 676-682.
- Bensch, K. W., Raida, M., Magert, H. J., Schulz-Knappe, P., and Forssmann, W. G. (1995) hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* **368**: 331-335.
- Bhakdi, S. and Trantum-Jensen, J. (1991) Alpha-toxin of Staphylococcus aureus. *Microbiol Rev* **55**: 733-751.
- Bialkowska-Hobrzanska, H., Harry, V., Jaskot, D., and Hammerberg, O. (1990) Typing of coagulase-negative staphylococci by Southern hybridization of chromosomal DNA fingerprints using a ribosomal RNA probe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **9**: 588-594.
- Birkbeck, T. H. and Whitelaw, D. D. (1980) Immunogenicity and molecular characterisation of staphylococcal delta haemolysin. *J Med Microbiol* **13**: 213-221.
- Boden, M. K. and Flock, J. I. (1992) Evidence for three different fibrinogen-binding proteins with unique properties from Staphylococcus aureus strain Newman. *Microb Pathog* **12**: 289-298.
- Bohach, G. A., Fast, D. J., Nelson, R. D., and Schlievert, P. M. (1990) Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. *Crit Rev Microbiol* **17**: 251-272.
- Bohach, G.A. and Foster, T.J. (2000) Staphylococcus aureus exotoxins. In *Gram-positive pathogens*. Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferreti, J.J., Portnoy, D.A., and Rood, J.I. (eds.) Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 367-378.
- Bokarewa, M. I., Jin, T., and Tarkowski, A. (2006) Staphylococcus aureus: Staphylokinase. *Int J Biochem Cell Biol* **38**: 504-509.



- Boudewijns, M., Vandeven, J., Verhaegen, J., Ben Ami, R., and Carmeli, Y. (2005) Vitek 2 automated identification system and *Kocuria kristinae*. *J Clin Microbiol* **43**: 5832.
- Boughan, P. K., Argent, R. H., Body-Malapel, M., Park, J. H., Ewings, K. E., Bowie, A. G., Ong, S. J., Cook, S. J., Sorensen, O. E., Manzo, B. A., Inohara, N., Klein, N. J., Nunez, G., Atherton, J. C., and Bajaj-Elliott, M. (2006) Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of beta-defensins during *Helicobacter pylori* infection. *J Biol Chem* **281**: 11637-11648.
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N. E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* **106**: 761-771.
- Brakstad, O. G., Aasbakk, K., and Maeland, J. A. (1992) Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *J Clin Microbiol* **30**: 1654-1660.
- Brandis, H., Eggers, H. J., Köhler, W., and Pulverer, G. (1994) *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*. Stuttgart-Jena-New York: Gustav Fischer Verlag.
- Bronner, S., Stoessel, P., Gravet, A., Monteil, H., and Prevost, G. (2000) Variable expressions of *Staphylococcus aureus* bicomponent leucotoxins semiquantified by competitive reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3931-3938.
- Buttery, J. P., Easton, M., Pearson, S. R., and Hogg, G. G. (1997) Pediatric bacteremia due to *Staphylococcus warneri*: microbiological, epidemiological, and clinical features. *J Clin Microbiol* **35**: 2174-2177.
- Bühl, A. and Zöfel, P. (2002) *SPSS 11. Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows*.
- Carretto, E., Barbarini, D., Couto, I., De Vitis, D., Marone, P., Verhoef, J., de Lencastre, H., and Brisse, S. (2005) Identification of coagulase-negative staphylococci other than *Staphylococcus epidermidis* by automated ribotyping. *Clin Microbiol Infect* **11**: 177-184.
- Center, K. J., Reboli, A. C., Hubler, R., Rodgers, G. L., and Long, S. S. (2003) Decreased vancomycin susceptibility of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: evidence of spread of *Staphylococcus warneri*. *J Clin Microbiol* **41**: 4660-4665.
- Cerca, N., Martins, S., Pier, G. B., Oliveira, R., and Azeredo, J. (2005) The relationship between inhibition of bacterial adhesion to a solid surface by sub-MICs of antibiotics and subsequent development of a biofilm. *Res Microbiol* **156**: 650-655.
- Chamberlain, N. R. and Imanoel, B. (1996) Genetic regulation of fatty acid modifying enzyme from *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* **44**: 125-129.
- Chambers, H. F. (2001) The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis* **7**: 178-182.
- Charpentier, S., Amiche, M., Mester, J., Vouille, V., Le Caer, J. P., Nicolas, P., and Delfour, A. (1998) Structure, synthesis, and molecular cloning of dermaseptins B, a family of skin peptide antibiotics. *J Biol Chem* **273**: 14690-14697.
- Chavakis, T., Hussain, M., Kanse, S. M., Peters, G., Bretzel, R. G., Flock, J. I., Herrmann, M., and Preissner, K. T. (2002) *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med* **8**: 687-693.
- Chaves, F., Garcia-Alvarez, M., Sanz, F., Alba, C., and Otero, J. R. (2005) Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. novobiosepticus strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* **43**: 4877-4879.
- Chesneau, O., Morvan, A., Aubert, S., and el Solh, N. (2000) The value of rRNA gene restriction site polymorphism analysis for delineating taxa in the genus *Staphylococcus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 2**: 689-697.
- Cheung, A. I., Projan, S. J., Edelstein, R. E., and Fischetti, V. A. (1995) Cloning, expression, and nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* gene (*fbpA*) encoding a fibrinogen-binding protein. *Infect Immun* **63**: 1914-1920.

- Chronnell, C. M., Ghali, L. R., Ali, R. S., Quinn, A. G., Holland, D. B., Bull, J. J., Cunliffe, W. J., McKay, I. A., Philpott, M. P., and Muller-Rover, S. (2001) Human beta defensin-1 and -2 expression in human pilosebaceous units: upregulation in acne vulgaris lesions. *J Invest Dermatol* **117**: 1120-1125.
- Chung, M., Antignac, A., Kim, C., and Tomasz, A. (2008) Comparative study of the susceptibilities of major epidemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin and to the new broad-spectrum cephalosporin ceftobiprole. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 2709-2717.
- Coombs, G. W., Nimmo, G. R., Bell, J. M., Huygens, F., O'Brien, F. G., Malkowski, M. J., Pearson, J. C., Stephens, A. J., and Giffard, P. M. (2004) Genetic diversity among community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing outpatient infections in Australia. *J Clin Microbiol* **42**: 4735-4743.
- Coombs, G. W., Pearson, J. C., O'Brien, F. G., Murray, R. J., Grubb, W. B., and Christiansen, K. J. (2006) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones, Western Australia. *Emerg Infect Dis* **12**: 241-247.
- Cooper, J. E. and Feil, E. J. (2004) Multilocus sequence typing--what is resolved? *Trends Microbiol* **12**: 373-377.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., and Greenberg, E. P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.
- Couto, I., Pereira, S., Miragaia, M., Sanches, I. S., and de Lencastre, H. (2001) Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. *J Clin Microbiol* **39**: 3099-3103.
- Cowland, J. B., Johnsen, A. H., and Borregaard, N. (1995) hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett* **368**: 173-176.
- Crabtree, G. R. (1999) Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin, and NF-AT. *Cell* **96**: 611-614.
- Cramton, S. E., Ulrich, M., Gotz, F., and Doring, G. (2001) Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **69**: 4079-4085.
- Crossley, K., Landesman, B., and Zaske, D. (1979) An outbreak of infections caused by strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides. II. Epidemiologic studies. *J Infect Dis* **139**: 280-287.
- Cuevas, O., Cercenado, E., Vindel, A., Guinea, J., Sanchez-Conde, M., Sanchez-Somolinos, M., and Bouza, E. (2004) Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 4240-4245.
- Cunha, Mde L., Sinzato, Y. K., and Silveira, L. V. (2004) Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99**: 855-860.
- David, M. D., Kearns, A. M., Gossain, S., Ganner, M., and Holmes, A. (2006) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: nosocomial transmission in a neonatal unit. *J Hosp Infect* **64**: 244-250.
- De Buyser, M. L., Morvan, A., Aubert, S., Dilasser, F., and el Solh, N. (1992) Evaluation of a ribosomal RNA gene probe for the identification of species and subspecies within the genus *Staphylococcus*. *J Gen Microbiol* **138**: 889-899.
- Diamond, G., Zasloff, M., Eck, H., Brasseur, M., Maloy, W. L., and Bevins, C. L. (1991) Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 3952-3956.
- Diep, B. A., Sensabaugh, G. F., Somboona, N. S., Carleton, H. A., and Perdreau-Remington, F. (2004) Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring the genes for Panton-Valentine leucocidin. *J Clin Microbiol* **42**: 2080-2084.
- Diep, B. A., Gill, S. R., Chang, R. F., Phan, T. H., Chen, J. H., Davidson, M. G., Lin, F., Lin, J., Carleton, H. A., Mongodin, E. F., Sensabaugh, G. F., and Perdreau-Remington, F. (2006) Complete genome

sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **367**: 731-739.

Domachowske, J. B., Bonville, C. A., Dyer, K. D., and Rosenberg, H. F. (1998a) Evolution of antiviral activity in the ribonuclease A gene superfamily: evidence for a specific interaction between eosinophil-derived neurotoxin (EDN/RNase 2) and respiratory syncytial virus. *Nucleic Acids Res* **26**: 5327-5332.

Domachowske, J. B., Dyer, K. D., Adams, A. G., Leto, T. L., and Rosenberg, H. F. (1998b) Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNase A-family ribonuclease with direct antiviral activity. *Nucleic Acids Res* **26**: 3358-3363.

Dragneva, Y., Anuradha, C. D., Valeva, A., Hoffmann, A., Bhakdi, S., and Husmann, M. (2001) Subcytotoxic attack by staphylococcal alpha-toxin activates NF-kappaB and induces interleukin-8 production. *Infect Immun* **69**: 2630-2635.

Drancourt, M. and Raoult, D. (2002) rpoB gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol* **40**: 1333-1338.

Dziewanowska, K., Patti, J. M., Deobald, C. F., Bayles, K. W., Trumble, W. R., and Bohach, G. A. (1999) Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect Immun* **67**: 4673-4678.

Ebright, J. R., Penugonda, N., and Brown, W. (2004) Clinical experience with *Staphylococcus lugdunensis* bacteremia: a retrospective analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis* **48**: 17-21.

Emori, T. G. and Gaynes, R. P. (1993) An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* **6**: 428-442.

Engebretson, J. J. and Moyer, C. L. (2003) Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal-restriction fragment length polymorphism. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4823-4829.

Engelke, D. R., Hoener, P. A., and Collins, F. S. (1988) Direct sequencing of enzymatically amplified human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 544-548.

Enright, M. (2008) The population structure of *Staphylococcus aureus*. In *Staphylococcus: Molecular Genetics*. Lindsay, J.A. (eds.) Norfolk, UK: Caister Academic Press, pp. 29-43.

Enright, M. C. and Spratt, B. G. (1999) Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol* **7**: 482-487.

Enright, M. C., Day, N. P., Davies, C. E., Peacock, S. J., and Spratt, B. G. (2000) Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **38**: 1008-1015.

Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H., and Spratt, B. G. (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 7687-7692.

Fahr, A. M., Eigner, U., Armbrust, M., Caganic, A., Dettori, G., Chezzi, C., Bertoncini, L., Benecchi, M., and Menozzi, M. G. (2003) Two-center collaborative evaluation of the performance of the BD Phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of *Enterococcus* spp. and *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol* **41**: 1135-1142.

Faurschou, M., Kamp, S., Cowland, J. B., Udby, L., Johnsen, A. H., Calafat, J., Winther, H., and Borregaard, N. (2005) Prodefensins are matrix proteins of specific granules in human neutrophils. *J Leukoc Biol* **78**: 785-793.

Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.

Finck-Barbancon, V., Duportail, G., Meunier, O., and Colin, D. A. (1993) Pore formation by a two-component leukocidin from *Staphylococcus aureus* within the membrane of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys Acta* **1182**: 275-282.

Fitzgerald, J. R., Sturdevant, D. E., Mackie, S. M., Gill, S. R., and Musser, J. M. (2001) Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8821-8826.

- Fitzgibbon, J. E., Nahvi, M. D., Dubin, D. T., and John, J. F., Jr. (2001) A sequence variant of *Staphylococcus hominis* with a high prevalence of oxacillin and fluoroquinolone resistance. *Res Microbiol* **152**: 805-810.
- Flock, J. I., Froman, G., Jonsson, K., Guss, B., Signas, C., Nilsson, B., Raucchi, G., Hook, M., Wadstrom, T., and Lindberg, M. (1987) Cloning and expression of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *EMBO J* **6**: 2351-2357.
- Foster, T. J. (2002) *Staphylococcus aureus*. In *Molecular Medical Microbiology*. Sussmann, M. (eds.) Newcastle upon Tyne: Academic Press, pp. 839-888.
- Fournier, B. and Philpott, D. J. (2005) Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev* **18**: 521-540.
- Fournier, B. (2008) Global Regulators of *Staphylococcus aureus* Virulence Genes. In *Staphylococcus: Molecular Genetics*. Lindsay, J. A. (eds.) Norfolk, UK: Caister Academic Press, pp. 131-183.
- Franzke, C. W., Baici, A., Bartels, J., Christophers, E., and Wiedow, O. (1996) Antileukoprotease inhibits stratum corneum chymotryptic enzyme. Evidence for a regulative function in desquamation. *J Biol Chem* **271**: 21886-21890.
- Fritsche, T. R., Sader, H. S., Stilwell, M. G., Dowzicky, M. J., and Jones, R. N. (2005) Potency and spectrum of tigecycline tested against an international collection of bacterial pathogens associated with skin and soft tissue infections (2000-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* **52**: 195-201.
- Frohm, M., Agerberth, B., Ahangari, G., Stahle-Backdahl, M., Liden, S., Wigzell, H., and Gudmundsson, G. H. (1997) The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* **272**: 15258-15263.
- Funke, G. and Funke-Kissling, P. (2005) Performance of the new VITEK 2 GP card for identification of medically relevant gram-positive cocci in a routine clinical laboratory. *J Clin Microbiol* **43**: 84-88.
- Gallo, R. C. (1971) Reverse transcriptase, the DNA polymerase of oncogenic RNA viruses. *Nature* **234**: 194-198.
- Gander, S., Kinnaird, A., and Finch, R. (2005) Telavancin: in vitro activity against staphylococci in a biofilm model. *J Antimicrob Chemother* **56**: 337-343.
- Ganz, T., Selsted, M. E., Szklarek, D., Harwig, S. S., Daher, K., Bainton, D. F., and Lehrer, R. I. (1985) Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* **76**: 1427-1435.
- Garcia, J. R., Krause, A., Schulz, S., Rodriguez-Jimenez, F. J., Kluver, E., Adermann, K., Forssmann, U., Frimpong-Boateng, A., Bals, R., and Forssmann, W. G. (2001) Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J* **15**: 1819-1821.
- Garcia, P., Benitez, R., Lam, M., Salinas, A. M., Wirth, H., Espinoza, C., Garay, T., Depix, M. S., Labarca, J., and Guzman, A. M. (2004) Coagulase-negative staphylococci: clinical, microbiological and molecular features to predict true bacteraemia. *J Med Microbiol* **53**: 67-72.
- Garduno, E., Marquez, I., Beteta, A., Said, I., Blanco, J., and Pineda, T. (2005) *Staphylococcus saprophyticus* causing native valve endocarditis. *Scand J Infect Dis* **37**: 690-691.
- Ghebremedhin, B., Konig, W., and Konig, B. (2005) Heterogeneity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains at a German university hospital during a 1-year period. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **24**: 388-398.
- Ghebremedhin, B., Konig, W., Witte, W., Hardy, K. J., Hawkey, P. M., and Konig, B. (2007) Subtyping of ST22-MRSA-IV (Barnim epidemic MRSA strain) at a university clinic in Germany from 2002 to 2005. *J Med Microbiol* **56**: 365-375.
- Giammarinaro, P., Leroy, S., Chacornac, J. P., Delmas, J., and Talon, R. (2005) Development of a new oligonucleotide array to identify staphylococcal strains at species level. *J Clin Microbiol* **43**: 3673-3680.
- Gill, S. R., Fouts, D. E., Archer, G. L., Mongodin, E. F., Deboy, R. T., Ravel, J., Paulsen, I. T., Kolonay, J. F., Brinkac, L., Beanan, M., Dodson, R. J., Daugherty, S. C., Madupu, R., Angiuoli, S. V., Durkin, A. S., Haft, D. H., Vamathevan, J., Khouri, H., Utterback, T., Lee, C., Dimitrov, G., Jiang, L., Qin, H., Weidman, J., Tran, K., Kang, K., Hance, I. R., Nelson, K. E., and Fraser, C. M. (2005) Insights on

evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol* **187**: 2426-2438.

Gillet, Y., Issartel, B., Vanhems, P., Fournet, J. C., Lina, G., Bes, M., Vandenesch, F., Piemont, Y., Brousse, N., Floret, D., and Etienne, J. (2002) Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* **359**: 753-759.

Gilliet, M. and Lande, R. (2008) Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Curr Opin Immunol* **20**: 401-407.

Goetz, D. H., Holmes, M. A., Borregaard, N., Bluhm, M. E., Raymond, K. N., and Strong, R. K. (2002) The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* **10**: 1033-1043.

Goh, S. H., Potter, S., Wood, J. O., Hemmingsen, S. M., Reynolds, R. P., and Chow, A. W. (1996) HSP60 gene sequences as universal targets for microbial species identification: studies with coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* **34**: 818-823.

Goh, S. H., Santucci, Z., Kloos, W. E., Faltyn, M., George, C. G., Driedger, D., and Hemmingsen, S. M. (1997) Identification of *Staphylococcus* species and subspecies by the chaperonin 60 gene identification method and reverse checkerboard hybridization. *J Clin Microbiol* **35**: 3116-3121.

Gomez, M. I., Lee, A., Reddy, B., Muir, A., Soong, G., Pitt, A., Cheung, A., and Prince, A. (2004) *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat Med* **10**: 842-848.

Goodyear, C. S. and Silverman, G. J. (2004) Staphylococcal toxin induced preferential and prolonged in vivo deletion of innate-like B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 11392-11397.

Gorak, E. J., Yamada, S. M., and Brown, J. D. (1999) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitalized adults and children without known risk factors. *Clin Infect Dis* **29**: 797-800.

Gravet, A., Colin, D. A., Keller, D., Girardot, R., Monteil, H., and Prevost, G. (1998) Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. *FEBS Lett* **436**: 202-208.

Greig, J. M. and Wood, M. J. (2003) *Staphylococcus lugdunensis* vertebral osteomyelitis. *Clin Microbiol Infect* **9**: 1139-1141.

Grimont, F. and Grimont, P. A. (1986) Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann Inst Pasteur Microbiol* **137B**: 165-175.

Gupta, K., Hooton, T. M., Wobbe, C. L., and Stamm, W. E. (1999) The prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in young women. *Int J Antimicrob Agents* **11**: 305-308.

Hacha, R. and Fredericq, E. (1966) Purification and some enzymic properties of *Staphylococcus aureus* deoxyribonuclease. *Biochim Biophys Acta* **123**: 493-502.

Hahn, H., Miksits, K., and Gaterman, S. (1999) Staphylokokken. In *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Hahn, H., Falke, D., Kaufmann, S.H.E., and Ullmann, U. (eds.) Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag, pp. 199-211.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., and Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**: 95-108.

Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**: 95-98.

Hamels, S., Gala, J. L., Dufour, S., Vannuffel, P., Zammatteo, N., and Remacle, J. (2001) Consensus PCR and microarray for diagnosis of the genus *Staphylococcus*, species, and methicillin resistance. *Biotechniques* **31**: 1364-2.

- Harder, J., Siebert, R., Zhang, Y., Matthiesen, P., Christophers, E., Schlegelberger, B., and Schroder, J. M. (1997) Mapping of the gene encoding human beta-defensin-2 (DEFB2) to chromosome region 8p22-p23.1. *Genomics* **46**: 472-475.
- Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Teran, L. M., Schwichtenberg, L., Bartels, J., Maune, S., and Schroder, J. M. (2000) Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* **22**: 714-721.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., and Schroder, J. M. (2001) Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* **276**: 5707-5713.
- Harder, J. and Schröder, J. M. (2002) RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem* **277**: 46779-46784.
- Harmsen, D., Claus, H., Witte, W., Rothganger, J., Claus, H., Turnwald, D., and Vogel, U. (2003) Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *J Clin Microbiol* **41**: 5442-5448.
- Hase, K., Eckmann, L., Leopard, J. D., Varki, N., and Kagnoff, M. F. (2002) Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium. *Infect Immun* **70**: 953-963.
- Haslinger, B., Strangfeld, K., Peters, G., Schulze-Osthoff, K., and Sinha, B. (2003) *Staphylococcus aureus* alpha-toxin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cells: role of endogenous tumour necrosis factor-alpha and the mitochondrial death pathway. *Cell Microbiol* **5**: 729-741.
- Haynes, R. J., Tighe, P. J., and Dua, H. S. (1999) Antimicrobial defensin peptides of the human ocular surface. *Br J Ophthalmol* **83**: 737-741.
- Hedin, G. and Fang, H. (2007) Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Southern Stockholm, 2000-2003. *Microb Drug Resist* **13**: 241-250.
- Heikens, E., Fleer, A., Paauw, A., Florijn, A., and Fluit, A. C. (2005) Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* **43**: 2286-2290.
- Heller, W. T., Waring, A. J., Lehrer, R. I., Harroun, T. A., Weiss, T. M., Yang, L., and Huang, H. W. (2000) Membrane thinning effect of the beta-sheet antimicrobial protegrin. *Biochemistry* **39**: 139-145.
- Henseler, T. and Christophers, E. (1995) Disease concomitance in psoriasis. *J Am Acad Dermatol* **32**: 982-986.
- Herrmann, M., Suchard, S. J., Boxer, L. A., Waldvogel, F. A., and Lew, P. D. (1991) Thrombospondin binds to *Staphylococcus aureus* and promotes staphylococcal adherence to surfaces. *Infect Immun* **59**: 279-288.
- Holmes, A., Ganner, M., McGuane, S., Pitt, T. L., Cookson, B. D., and Kearns, A. M. (2005) *Staphylococcus aureus* isolates carrying Pantone-Valentine leucocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. *J Clin Microbiol* **43**: 2384-2390.
- Huang, C. R., Lu, C. H., Wu, J. J., Chang, H. W., Chien, C. C., Lei, C. B., and Chang, W. N. (2005) Coagulase-negative staphylococcal meningitis in adults: clinical characteristics and therapeutic outcomes. *Infection* **33**: 56-60.
- Huang, Y. C., Wang, Y. H., Su, L. H., Chou, Y. H., Lien, R. I., and Lin, T. Y. (2006) Determining the significance of coagulase-negative staphylococci identified in cultures of paired blood specimens from neonates by species identification and strain clonality. *Infect Control Hosp Epidemiol* **27**: 70-73.
- Huebner, J. and Goldmann, D. A. (1999) Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu Rev Med* **50**: 223-236.
- Huttner, K. M. and Bevins, C. L. (1999) Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense. *Pediatr Res* **45**: 785-794.
- Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C., and Hiramatsu, K. (2001) Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the

chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 1323-1336.

Jain, A., Agarwal, J., and Bansal, S. (2004) Prevalence of methicillin-resistant, coagulase-negative staphylococci in neonatal intensive care units: findings from a tertiary care hospital in India. *J Med Microbiol* **53**: 941-944.

Janeway, C.A. and Travers, P. (2002) *Immunologie*. Heidelberg: Spektrum-Akademischer Verlag.

Jevons, P. M. (1961) Celbenin resistant staphylococci. *Brit Med J* **1**: 124-125.

Ji, G., Beavis, R., and Novick, R. P. (1997) Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* **276**: 2027-2030.

Jin, T., Bokarewa, M., Foster, T., Mitchell, J., Higgins, J., and Tarkowski, A. (2004) *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J Immunol* **172**: 1169-1176.

Jones, D. E. and Bevins, C. L. (1993) Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Lett* **315**: 187-192.

Jonsson, K., Signas, C., Muller, H. P., and Lindberg, M. (1991) Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *Eur J Biochem* **202**: 1041-1048.

Joubert, O., Viero, G., Keller, D., Martinez, E., Colin, D. A., Monteil, H., Mourey, L., Dalla, Serra M., and Prevost, G. (2006) Engineered covalent leucotoxin heterodimers form functional pores: insights into S-F interactions. *Biochem J* **396**: 381-389.

Kaabia, N., Scauarda, D., Lena, G., and Drancourt, M. (2002) Molecular identification of *Staphylococcus lugdunensis* in a patient with meningitis. *J Clin Microbiol* **40**: 1824-1825.

Kacica, M. A., Horgan, M. J., Preston, K. E., Lepow, M., and Venezia, R. A. (1994) Relatedness of coagulase-negative staphylococci causing bacteremia in low-birthweight infants. *Infect Control Hosp Epidemiol* **15**: 658-662.

Kallman, J., Kihlstrom, E., Sjoberg, L., and Schollin, J. (1997) Increase of staphylococci in neonatal septicemia: a fourteen-year study. *Acta Paediatr* **86**: 533-538.

Kamio, Y., Rahman, A., Nariya, H., Ozawa, T., and Izaki, K. (1993) The two *Staphylococcal* bi-component toxins, leukocidin and gamma-hemolysin, share one component in common. *FEBS Lett* **321**: 15-18.

Kaplan, C. W. and Kitts, C. L. (2003) Variation between observed and true Terminal Restriction Fragment length is dependent on true TRF length and purine content. *J Microbiol Methods* **54**: 121-125.

Kappler, J., Kotzin, B., Herron, L., Gelfand, E. W., Bigler, R. D., Boylston, A., Carrel, S., Posnett, D. N., Choi, Y., and Marrack, P. (1989) V beta-specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* **244**: 811-813.

Kattan, H. M., Flynn, H. W., Jr., Pflugfelder, S. C., Robertson, C., and Forster, R. K. (1991) Nosocomial endophthalmitis survey. Current incidence of infection after intraocular surgery. *Ophthalmology* **98**: 227-238.

Kauffman, C. A., Hertz, C. S., and Sheagren, J. N. (1983) *Staphylococcus saprophyticus*: role in urinary tract infections in men. *J Urol* **130**: 493-494.

King, M. D., Humphrey, B. J., Wang, Y. F., Kourbatova, E. V., Ray, S. M., and Blumberg, H. M. (2006) Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as the predominant cause of skin and soft-tissue infections. *Ann Intern Med* **144**: 309-317.

Kipp, F., Friedrich, A. W., Becker, K., and von Eiff, C. (2004) Bedrohliche Zunahme Methicillin-resistenter *Staphylococcus-aureus*-Stämme. *Deutsches Ärzteblatt* **101**: 2045-2050.

Kloos, W. E. and Schleifer, K. H. (1975) Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol* **1**: 82-88.

- Kloos, W. E. (1980) Natural populations of the genus *Staphylococcus*. *Annu Rev Microbiol* **34**: 559-592.
- Kloos, W.E. and Schleifer, K.H. (1986) Genus IV. *Staphylococcus*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., and Holt, J.G. (eds.) Baltimore, MD: Williams & Wilkins, pp. 1013-1035.
- Kloos, W. E. and George, C. G. (1991) Identification of *Staphylococcus* species and subspecies with the MicroScan Pos ID and Rapid Pos ID panel systems. *J Clin Microbiol* **29**: 738-744.
- Kloos, W.E., Schleifer, K.H., and Götz, F. (1992) The genus *Staphylococcus*. In *The Prokaryotes*. Balows, A., Trüper, H.G., and Dworkin, M. (eds.) New York: Springer-Verlag, pp. 1369-1420.
- Kloos, W.E. (1997) Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. In *The staphylococci in humans and disease*. Crossley, K.B. and Archer, G.L. (eds.) New York, NY: Churchill Livingstone, pp. 113-137.
- Kloos, W. E., George, C. G., Olgiate, J. S., Van Pelt, L., McKinnon, M. L., Zimmer, B. L., Muller, E., Weinstein, M. P., and Mirrett, S. (1998) *Staphylococcus hominis* subsp. novobiosepticus subsp. nov., a novel trehalose- and N-acetyl-D-glucosamine-negative, novobiocin- and multiple-antibiotic-resistant subspecies isolated from human blood cultures. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 3**: 799-812.
- Kloos, W.E. and Bannerman, T.L. (1999) *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In *Manual of clinical microbiology*. Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C., and Tenover, R.H. (eds.) Washington, DC: American Society for Microbiology, pp. 264-282.
- Kluytmans-Vandenbergh, M. F. and Kluytmans, J. A. (2006) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives. *Clin Microbiol Infect* **12 Suppl 1**: 9-15.
- Komatsuzawa, H., Ouhara, K., Yamada, S., Fujiwara, T., Sayama, K., Hashimoto, K., and Sugai, M. (2006) Innate defences against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection. *J Pathol* **208**: 249-260.
- Kong, K. F., Vuong, C., and Otto, M. (2006) *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol* **296**: 133-139.
- Kreiswirth, B., Kornblum, J., Arbeit, R. D., Eisner, W., Maslow, J. N., McGeer, A., Low, D. E., and Novick, R. P. (1993) Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science* **259**: 227-230.
- Kreiswirth, B. N. (1989) Genetics and expression of toxic shock syndrome toxin 1: overview. *Rev Infect Dis* **11 Suppl 1**: S97-100.
- Kwok, A. Y., Su, S. C., Reynolds, R. P., Bay, S. J., Av-Gay, Y., Dovichi, N. J., and Chow, A. W. (1999) Species identification and phylogenetic relationships based on partial HSP60 gene sequences within the genus *Staphylococcus*. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 3**: 1181-1192.
- Kwok, A. Y. and Chow, A. W. (2003) Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial hsp60 gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 87-92.
- Lacey, R. W. and Grinstead, J. (1973) Genetic analysis of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*; evidence for their evolution from a single clone. *J Med Microbiol* **6**: 511-526.
- Ladhani, S. (2003) Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **39**: 181-189.
- Lai, Y. P., Peng, Y. F., Zuo, Y., Li, J., Huang, J., Wang, L. F., and Wu, Z. R. (2005) Functional and structural characterization of recombinant dermcidin-1L, a human antimicrobial peptide. *Biochem Biophys Res Commun* **328**: 243-250.
- Larsen, A., Stegger, M., Goering, R., Sorum, M., and Skov, R. (2007) Emergence and dissemination of the methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone in Denmark (2000-2005). *Euro Surveill* **12**.
- Lasa, I. (2006) Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *Int Microbiol* **9**: 21-28.



- Layer, F., Ghebremedhin, B., Moder, K. A., König, W., and König, B. (2006) Comparative study using various methods for identification of *Staphylococcus* species in clinical specimens. *J Clin Microbiol* **44**: 2824-2830.
- Layer, F., Ghebremedhin, B., König, W., and König, B. (2007) Differentiation of *Staphylococcus* spp. by terminal-restriction fragment length polymorphism analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene. *J Microbiol Methods* **70**: 542-549.
- Lähteenmäki, K., Kuusela, P., and Korhonen, T. K. (2001) Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 531-552.
- Lee, C. Y., Schmidt, J. J., Johnson-Winegar, A. D., Spero, L., and Iandolo, J. J. (1987) Sequence determination and comparison of the exfoliative toxin A and toxin B genes from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **169**: 3904-3909.
- Lee, J. C., Xu, S., Albus, A., and Livolsi, P. J. (1994) Genetic analysis of type 5 capsular polysaccharide expression by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **176**: 4883-4889.
- Lee, L. G., Spurgeon, S. L., Heiner, C. R., Benson, S. C., Rosenblum, B. B., Menchen, S. M., Graham, R. J., Constantinescu, A., Upadhy, K. G., and Cassel, J. M. (1997) New energy transfer dyes for DNA sequencing. *Nucleic Acids Res* **25**: 2816-2822.
- Lee, L. Y., Miyamoto, Y. J., McIntyre, B. W., Hook, M., McCrea, K. W., McDevitt, D., and Brown, E. L. (2002) The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. *J Clin Invest* **110**: 1461-1471.
- Lehrer, R. I., Ganz, T., and Selsted, M. E. (1991) Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell* **64**: 229-230.
- Lehrer, R. I. and Ganz, T. (2002) Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides. *Curr Opin Hematol* **9**: 18-22.
- Lelievre, H., Lina, G., Jones, M. E., Olive, C., Forey, F., Roussel-Delvallez, M., Nicolas-Chanoine, M. H., Bebear, C. M., Jarlier, V., Andremont, A., Vandenesch, F., and Etienne, J. (1999) Emergence and spread in French hospitals of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with increasing susceptibility to gentamicin and other antibiotics. *J Clin Microbiol* **37**: 3452-3457.
- Leonova, L., Kokryakov, V. N., Aleshina, G., Hong, T., Nguyen, T., Zhao, C., Waring, A. J., and Lehrer, R. I. (2001) Circular minidefensins and posttranslational generation of molecular diversity. *J Leukoc Biol* **70**: 461-464.
- Leyden, J. J., Marples, R. R., and Kligman, A. M. (1974) *Staphylococcus aureus* in the lesions of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* **90**: 525-530.
- Ligozzi, M., Bernini, C., Bonora, M. G., De Fatima, M., Zuliani, J., and Fontana, R. (2002) Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. *J Clin Microbiol* **40**: 1681-1686.
- Lina, G., Piemont, Y., Godail-Gamot, F., Bes, M., Peter, M. O., Gauduchon, V., Vandenesch, F., and Etienne, J. (1999) Involvement of Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* **29**: 1128-1132.
- Lina, G., Boutite, F., Tristan, A., Bes, M., Etienne, J., and Vandenesch, F. (2003) Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of *Staphylococcal agr* alleles. *Appl Environ Microbiol* **69**: 18-23.
- Lindsay, J. A., Ruzin, A., Ross, H. F., Kurepina, N., and Novick, R. P. (1998) The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **29**: 527-543.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Livermore, D. M. (2000) Antibiotic resistance in staphylococci. *Int J Antimicrob Agents* **16 Suppl 1**: S3-10.

- Lopes, J. D., dos Reis M., and Brentani, R. R. (1985) Presence of laminin receptors in *Staphylococcus aureus*. *Science* **229**: 275-277.
- Lowy, F. D. (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* **339**: 520-532.
- Lowy, F. D. (2000) Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen? *Trends Microbiol* **8**: 341-343.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., and Brock, T. D. (2003) Brock Biology of Microorganisms. *International Edition Perason Education, Inc , New Jersey*.
- Malm, J., Sorensen, O., Persson, T., Frohm-Nilsson, M., Johansson, B., Bjartell, A., Lilja, H., Stahle-Backdahl, M., Borregaard, N., and Egesten, A. (2000) The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. *Infect Immun* **68**: 4297-4302.
- Marques, M. B., Weller, P. F., Parsonnet, J., Ransil, B. J., and Nicholson-Weller, A. (1989) Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, a possible virulence factor of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **27**: 2451-2454.
- Marsou, R., Bes, M., Brun, Y., Boudouma, M., Idrissi, L., Meugnier, H., Freney, J., and Etienne, J. (2001) Molecular techniques open up new vistas for typing of coagulase-negative staphylococci. *Pathol Biol (Paris)* **49**: 205-215.
- Martineau, F., Picard, F. J., Roy, P. H., Ouellette, M., and Bergeron, M. G. (1996) Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol* **34**: 2888-2893.
- Martineau, F., Picard, F. J., Roy, P. H., Ouellette, M., and Bergeron, M. G. (1998) Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **36**: 618-623.
- Martineau, F., Picard, F. J., Ke, D., Paradis, S., Roy, P. H., Ouellette, M., and Bergeron, M. G. (2001) Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. *J Clin Microbiol* **39**: 2541-2547.
- Mazmanian, S. K., Liu, G., Ton-That, H., and Schneewind, O. (1999) *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science* **285**: 760-763.
- McCormick, J. K., Yarwood, J. M., and Schlievert, P. M. (2001) Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu Rev Microbiol* **55**: 77-104.
- McDermott, A. M., Redfern, R. L., Zhang, B., Pei, Y., Huang, L., and Proske, R. J. (2003) Defensin expression by the cornea: multiple signalling pathways mediate IL-1beta stimulation of hBD-2 expression by human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**: 1859-1865.
- McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P., and Foster, T. j. (1994) Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **11**: 237-248.
- McGavin, M. H., Krajewska-Pietrasik, D., Ryden, C., and Hook, M. (1993) Identification of a *Staphylococcus aureus* extracellular matrix-binding protein with broad specificity. *Infect Immun* **61**: 2479-2485.
- Mellmann, A., Becker, K., von Eiff, C., Keckevoet, U., Schumann, P., and Harmsen, D. (2006) Sequencing and staphylococci identification. *Emerg Infect Dis* **12**: 333-336.
- Menendez, A. and Brett, Finlay B. (2007) Defensins in the immunology of bacterial infections. *Curr Opin Immunol* **19**: 385-391.
- Menzies, B. E. and Kenoyer, A. (2006) Signal transduction and nuclear responses in *Staphylococcus aureus*-induced expression of human beta-defensin 3 in skin keratinocytes. *Infect Immun* **74**: 6847-6854.
- Middendorf, L. R., Humphrey, P. G., Narayanan, N., and Roemer, S. C. (2001) Sequencing technology. In *Genomics and bioinformatics*. Sensen, C. W. (eds.) Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, Band 5b, pp. 165-208.
- Midorikawa, K., Ouhara, K., Komatsuzawa, H., Kawai, T., Yamada, S., Fujiwara, T., Yamazaki, K., Sayama, K., Taubman, M. A., Kurihara, H., Hashimoto, K., and Sugai, M. (2003) *Staphylococcus aureus*

susceptibility to innate antimicrobial peptides, beta-defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes. *Infect Immun* **71**: 3730-3739.

Milner, S. M. and Ortega, M. R. (1999) Reduced antimicrobial peptide expression in human burn wounds. *Burns* **25**: 411-413.

Mishaan, A. M., Mason, E. O., Jr., Martinez-Aguilar, G., Hammerman, W., Propst, J. J., Lupski, J. R., Stankiewicz, P., Kaplan, S. L., and Hulten, K. (2005) Emergence of a predominant clone of community-acquired *Staphylococcus aureus* among children in Houston, Texas. *Pediatr Infect Dis J* **24**: 201-206.

Mollet, C., Drancourt, M., and Raoult, D. (1997) *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol Microbiol* **26**: 1005-1011.

Monsen, T., Karlsson, C., and Wistrom, J. (2005) Spread of clones of multidrug-resistant, coagulase-negative staphylococci within a university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* **26**: 76-80.

Moore, P. C. and Lindsay, J. A. (2001) Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes. *J Clin Microbiol* **39**: 2760-2767.

Moyer, C. L., Tiedje, J. M., Dobbs, F. C., and Karl, D. M. (1996) A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2501-2507.

Munk, C., Wei, G., Yang, O. O., Waring, A. J., Wang, W., Hong, T., Lehrer, R. I., Landau, N. R., and Cole, A. M. (2003) The theta-defensin, retrocyclin, inhibits HIV-1 entry. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**: 875-881.

Murakami, K., Minamide, W., Wada, K., Nakamura, E., Teraoka, H., and Watanabe, S. (1991) Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **29**: 2240-2244.

Murchan, S., Aucken, H. M., O'Neill, G. L., Ganner, M., and Cookson, B. D. (2004) Emergence, spread, and characterization of phage variants of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 16 in England and Wales. *J Clin Microbiol* **42**: 5154-5160.

Murphy, C. J., Foster, B. A., Mannis, M. J., Selsted, M. E., and Reid, T. W. (1993) Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol* **155**: 408-413.

Musser, J. M. and Kapur, V. (1992) Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the *mec* gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. *J Clin Microbiol* **30**: 2058-2063.

Neuhaus, F. C. and Baddiley, J. (2003) A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 686-723.

Nguyen, T. X., Cole, A. M., and Lehrer, R. I. (2003) Evolution of primate theta-defensins: a serpentine path to a sweet tooth. *Peptides* **24**: 1647-1654.

Ni, E. D., Perkins, S., Francois, P., Vaudaux, P., Hook, M., and Foster, T. J. (1998) Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **30**: 245-257.

Niyonsaba, F., Ushio, H., Nakano, N., Ng, W., Sayama, K., Hashimoto, K., Nagaoka, I., Okumura, K., and Ogawa, H. (2007) Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol* **127**: 594-604.

Nomura, I., Goleva, E., Howell, M. D., Hamid, Q. A., Ong, P. Y., Hall, C. F., Darst, M. A., Gao, B., Boguniewicz, M., Travers, J. B., and Leung, D. Y. (2003) Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol* **171**: 3262-3269.

Novick, R. P. (1990) *Staphylococci*. In *Microbiology*. Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., and Ginsberg, H. S. (eds.) Philadelphia: J. B. Lippincott Company, pp. 539-550.

- Novick, R. P. (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* **48**: 1429-1449.
- Ogston, A. (1883) Micrococcus poisoning. *J Anat Physiol (London)* **17**: 24-58.
- Ong, P. Y., Ohtake, T., Brandt, C., Strickland, I., Boguniewicz, M., Ganz, T., Gallo, R. L., and Leung, D. Y. (2002) Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* **347**: 1151-1160.
- Onogawa, T. (2002) Staphylococcal alpha-toxin synergistically enhances inflammation caused by bacterial components. *FEMS Immunol Med Microbiol* **33**: 15-21.
- Otto, M., Sussmuth, R., Vuong, C., Jung, G., and Gotz, F. (1999) Inhibition of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus* by the *Staphylococcus epidermidis* agr pheromone and derivatives. *FEBS Lett* **450**: 257-262.
- Otto, M. (2004) Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. *Front Biosci* **9**: 841-863.
- Ouhara, K., Komatsuzawa, H., Shiba, H., Uchida, Y., Kawai, T., Sayama, K., Hashimoto, K., Taubman, M. A., Kurihara, H., and Sugai, M. (2006) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* outer membrane protein 100 triggers innate immunity and production of beta-defensin and the 18-kilodalton cationic antimicrobial protein through the fibronectin-integrin pathway in human gingival epithelial cells. *Infect Immun* **74**: 5211-5220.
- Paez, A. and Skiest, D. (2008) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: From the Hospital to the Community. *Curr Infect Dis Rep* **10**: 14-21.
- Palma, M., Haggar, A., and Flock, J. I. (1999) Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J Bacteriol* **181**: 2840-2845.
- Pan, E. S., Diep, B. A., Charlebois, E. D., Auerswald, C., Carleton, H. A., Sensabaugh, G. F., and Perdreau-Remington, F. (2005) Population dynamics of nasal strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*--and their relation to community-associated disease activity. *J Infect Dis* **192**: 811-818.
- Park, P. W., Rosenbloom, J., Abrams, W. R., Rosenbloom, J., and Mecham, R. P. (1996) Molecular cloning and expression of the gene for elastin-binding protein (ebpS) in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **271**: 15803-15809.
- Patti, J. M., Allen, B. L., McGavin, M. J., and Hook, M. (1994) MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* **48**: 585-617.
- Peacock, S. J., de Silva, G. D., Justice, A., Cowland, A., Moore, C. E., Winearls, C. G., and Day, N. P. (2002) Comparison of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis as tools for typing *Staphylococcus aureus* isolates in a microepidemiological setting. *J Clin Microbiol* **40**: 3764-3770.
- Peters, G. and Pulverer, G. (1994) Die Familie der Micrococcaceae. In *Medizinische Mikrobiologie*. Brandis, H., Eggers, H. J., Köhler, W., and Pulverer, G. (eds.) Stuttgart, Jena, New York: Fischer Verlag, pp. 350-360.
- Peters, G. and Becker, K. (1996) Epidemiology, control and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Drugs* **52 Suppl 2**: 50-54.
- Peterson, P. K., Verhoef, J., Sabath, L. D., and Quie, P. G. (1977) Effect of protein A on staphylococcal opsonization. *Infect Immun* **15**: 760-764.
- Philpott, M. P. (2003) Defensins and acne. *Mol Immunol* **40**: 457-462.
- Pinna, A., Zanetti, S., Sotgiu, M., Sechi, L. A., Fadda, G., and Carta, F. (1999) Identification and antibiotic susceptibility of coagulase negative staphylococci isolated in corneal/external infections. *Br J Ophthalmol* **83**: 771-773.
- Potempa, J., Fedak, D., Dubin, A., Mast, A., and Travis, J. (1991) Proteolytic inactivation of alpha-1-anti-chymotrypsin. Sites of cleavage and generation of chemotactic activity. *J Biol Chem* **266**: 21482-21487.

- Poyart, C., Quesne, G., Boumaila, C., and Trieu-Cuot, P. (2001) Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sodA* gene as a target. *J Clin Microbiol* **39**: 4296-4301.
- Precht, M. and Kraft, R. (1992) *Bio-Statistik I*. München-Wien: R. Oldenburger Verlag.
- Prevost, G., Cribier, B., Couppie, P., Petiau, P., Supersac, G., Finck-Barbançon, V., Monteil, H., and Piemont, Y. (1995b) Panton-Valentine leukocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun* **63**: 4121-4129.
- Prevost, G., Couppie, P., Prevost, P., Gayet, S., Petiau, P., Cribier, B., Monteil, H., and Piemont, Y. (1995a) Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *J Med Microbiol* **42**: 237-245.
- Projan, S. J., Kornblum, J., Kreiswirth, B., Moghazeh, S. L., Eisner, W., and Novick, R. P. (1989) Nucleotide sequence: the beta-hemolysin gene of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res* **17**: 3305.
- Quellette, A. J. and Selsted, M. E. (1996) Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense. *FASEB J* **10**: 1280-1289.
- Rachid, S., Ohlsen, K., Witte, W., Hacker, J., and Ziebuhr, W. (2000) Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesion expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 3357-3363.
- Raponi, G., Ghezzi, M. C., Gherardi, G., Dicuonzo, G., Caputo, D., Venditti, M., Rocco, M., Micozzi, A., and Mancini, C. (2005) Antimicrobial susceptibility, biochemical and genetic profiles of *Staphylococcus haemolyticus* strains isolated from the bloodstream of patients hospitalized in critical care units. *J Chemother* **17**: 264-269.
- Raué, H. A., Musters, W., Rutgers, C. A., van't-Riet, J., and Planta, R. J. (1999) rRNA: from structure to function. In *The ribosome: structure, function, and evolution*. Hill, W.E., Moore, P.B., Dahlberg, A., Schlessinger, D., Garrett, R.A., Warner, J.R. (eds.). Washington, D C: American Society for Microbiology, pp. 217-235.
- Raz, R., Colodner, R., and Kunin, C. M. (2005) Who are you - *Staphylococcus saprophyticus*? *Clin Infect Dis* **40**: 896-898.
- Renneberg, J., Rieneck, K., and Gutschik, E. (1995) Evaluation of Staph ID 32 system and Staph-Zym system for identification of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* **33**: 1150-1153.
- Rieg, S., Garbe, C., Sauer, B., Kalbacher, H., and Schitteck, B. (2004) Dermcidin is constitutively produced by eccrine sweat glands and is not induced in epidermal cells under inflammatory skin conditions. *Br J Dermatol* **151**: 534-539.
- Roche, F. M., Downer, R., Keane, F., Speziale, P., Park, P. W., and Foster, T. J. (2004) The N-terminal A domain of fibronectin-binding proteins A and B promotes adhesion of *Staphylococcus aureus* to elastin. *J Biol Chem* **279**: 38433-38440.
- Rogers, G. B., Carroll, M. P., Serisier, D. J., Hockey, P. M., Jones, G., and Bruce, K. D. (2004) characterization of bacterial community diversity in cystic fibrosis lung infections by use of 16s ribosomal DNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *J Clin Microbiol* **42**: 5176-5183.
- Rooijackers, S. H., Ruyken, M., Roos, A., Daha, M. R., Presanis, J. S., Sim, R. B., van Wamel, W. J., van Kessel, K. P., and van Strijp, J. A. (2005) Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat Immunol* **6**: 920-927.
- Rossney, A. S., Shore, A. C., Morgan, P. M., Fitzgibbon, M. M., O'Connell, B., and Coleman, D. C. (2007) The emergence and importation of diverse genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) harboring the Panton-Valentine leukocidin gene (*pvl*) reveal that *pvl* is a poor marker for community-acquired MRSA strains in Ireland. *J Clin Microbiol* **45**: 2554-2563.
- Roux, V. and Raoult, D. (2000) Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (*ompB*). *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 4**: 1449-1455.

- Rupp, M. E. and Archer, G. L. (1994) Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis* **19**: 231-243.
- Sachse, F., von Eiff, C., Becker, K., Steinhoff, M., and Rudack, C. (2008) Proinflammatory impact of *Staphylococcus epidermidis* on the nasal epithelium quantified by IL-8 and GRO-alpha responses in primary human nasal epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol* **145**: 24-32.
- Saiki, R. K., Chang, C. A., Levenson, C. H., Warren, T. C., Boehm, C. D., Kazazian, H. H., Jr., and Erlich, H. A. (1988) Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med* **319**: 537-541.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.
- Sakamoto, M., Rocas, I. N., Siqueira, J. F., Jr., and Benno, Y. (2006) Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* **21**: 112-122.
- Sako, T. and Tsuchida, N. (1983) Nucleotide sequence of the staphylokinase gene from *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res* **11**: 7679-7693.
- Salgado, C. D., Farr, B. M., and Calfee, D. P. (2003) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin Infect Dis* **36**: 131-139.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning*. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Santos, O. C., Barros, E. M., Brito, M. A., Bastos, M. C., Dos Santos, K. R., and Giambiagi-Demarval, M. (2008) Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis using RFLP-PCR of the groEL gene. *Vet Microbiol* **130**: 134-140.
- Schlievert, P. M. and Case, L. C. (2007) Molecular analysis of staphylococcal superantigens. *Methods Mol Biol* **391**: 113-126.
- Schmitz, F. J., MacKenzie, C. R., Geisel, R., Wagner, S., Idel, H., Verhoef, J., Hadding, U., and Heinz, H. P. (1997) Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production of methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Eur J Epidemiol* **13**: 699-708.
- Schneider, P. F. and Riley, T. V. (1996) *Staphylococcus saprophyticus* urinary tract infections: epidemiological data from Western Australia. *Eur J Epidemiol* **12**: 51-54.
- Schröder, J. M. and Harder, J. (1999) Human beta-defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol* **31**: 645-651.
- Schwarzkopf, A., Karch, H., Schmidt, H., Lenz, W., and Heesemann, J. (1993) Phenotypical and genotypical characterization of epidemic clumping factor-negative, oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **31**: 2281-2285.
- Selsted, M. E., Harwig, S. S., Ganz, T., Schilling, J. W., and Lehrer, R. I. (1985) Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest* **76**: 1436-1439.
- Shah, M. M., Iihara, H., Noda, M., Song, S. X., Nhung, P. H., Ohkusu, K., Kawamura, Y., and Ezaki, T. (2007) dnaJ gene sequence-based assay for species identification and phylogenetic grouping in the genus *Staphylococcus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 25-30.
- Shittu, A. O., Lin, J., Morrison, D., and Kolawole, D. O. (2005) The discovery of a multi-resistant *Staphylococcus haemolyticus* clone in the hospital and community environment in south western Nigeria. *Ostomy Wound Manage* **51**: 67-70.
- Sieprawska-Lupa, M., Mydel, P., Krawczyk, K., Wojcik, K., Puklo, M., Lupa, B., Suder, P., Silberring, J., Reed, M., Pohl, J., Shafer, W., McAleese, F., Foster, T., Travis, J., and Potempa, J. (2004) Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 4673-4679.

- Singhal, R., Dhawan, S., Mohanty, S., Sood, S., Dhawan, B., Das, B., and Kapil, A. (2006) Species distribution & antimicrobial susceptibility of coagulase negative Staphylococci in a tertiary care hospital. *Indian J Med Res* **123**: 569-570.
- Sinha, B., Francois, P., Que, Y. A., Hussain, M., Heilmann, C., Moreillon, P., Lew, D., Krause, K. H., Peters, G., and Herrmann, M. (2000) Heterologously expressed Staphylococcus aureus fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect Immun* **68**: 6871-6878.
- Skov, L. and Baadsgaard, O. (2000) Bacterial superantigens and inflammatory skin diseases. *Clin Exp Dermatol* **25**: 57-61.
- Smith, C. B., Noble, V., Bensch, R., Ahlin, P. A., Jacobson, J. A., and Latham, R. H. (1982) Bacterial flora of the vagina during the menstrual cycle: findings in users of tampons, napkins, and sea sponges. *Ann Intern Med* **96**: 948-951.
- Smith, D. A. (1986) Human Genome Sequencing. *Science* **233**: 1246.
- Sokal, R. R. and Michener, C. D. (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin* **38**: 1409-1438.
- Song, L., Hobaugh, M. R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H., and Gouaux, J. E. (1996) Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* **274**: 1859-1866.
- Sorensen, O. E., Follin, P., Johnsen, A. H., Calafat, J., Tjabringa, G. S., Hiemstra, P. S., and Borregaard, N. (2001) Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* **97**: 3951-3959.
- Sorensen, O. E., Cowland, J. B., Theilgaard-Monch, K., Liu, L., Ganz, T., and Borregaard, N. (2003) Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J Immunol* **170**: 5583-5589.
- Spanu, T., Sanguinetti, M., Ciccaglione, D., D'Inzeo, T., Romano, L., Leone, F., and Fadda, G. (2003) Use of the VITEK 2 system for rapid identification of clinical isolates of Staphylococci from bloodstream infections. *J Clin Microbiol* **41**: 4259-4263.
- Speaker, M. G., Milch, F. A., Shah, M. K., Eisner, W., and Kreiswirth, B. N. (1991) Role of external bacterial flora in the pathogenesis of acute postoperative endophthalmitis. *Ophthalmology* **98**: 639-649.
- Stenger, S., Hanson, D. A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niazi, K. R., Froelich, C. J., Ganz, T., Thomas-Uszynski, S., Melian, A., Bogdan, C., Porcelli, S. A., Bloom, B. R., Krensky, A. M., and Modlin, R. L. (1998) An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* **282**: 121-125.
- Stock, I. (2008) Erkrankungen durch Koagulase-negative Staphylokokken. *Chemotherapie Journal* **17**: 10-24.
- Strommenger, B., Brulke, C., Pasemann, B., Schmidt, C., and Witte, W. (2008) Multiplex PCR for rapid detection of Staphylococcus aureus isolates suspected to represent community-acquired strains. *J Clin Microbiol* **46**: 582-587.
- Takahashi, T., Kaneko, M., Mori, Y., Tsuji, M., Kikuchi, N., and Hiramune, T. (1997) Phylogenetic analyses of Staphylococcus based on the 16S rDNA sequence and assignment of clinical isolates from animals. *J Vet Med Sci* **59**: 775-783.
- Takahashi, T., Satoh, I., and Kikuchi, N. (1999) Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus Staphylococcus based on 16S rRNA gene sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 2**: 725-728.
- Takizawa, Y., Taneike, I., Nakagawa, S., Oishi, T., Nitahara, Y., Iwakura, N., Ozaki, K., Takano, M., Nakayama, T., and Yamamoto, T. (2005) A Pantone-Valentine leucocidin (PVL)-positive community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strain, another such strain carrying a multiple-drug resistance plasmid, and other more-typical PVL-negative MRSA strains found in Japan. *J Clin Microbiol* **43**: 3356-3363.
- Tang, Y. Q., Yuan, J., Osapay, G., Osapay, K., Tran, D., Miller, C. J., Ouellette, A. J., and Selsted, M. E. (1999) A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science* **286**: 498-502.

- Tang, Y. W., Waddington, M. G., Smith, D. H., Manahan, J. M., Kohner, P. C., Highsmith, L. M., Li, H., Cockerill, F. R., III, Thompson, R. L., Montgomery, S. O., and Persing, D. H. (2000) Comparison of protein A gene sequencing with pulsed-field gel electrophoresis and epidemiologic data for molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **38**: 1347-1351.
- Thakker, M., Park, J. S., Carey, V., and Lee, J. C. (1998) *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect Immun* **66**: 5183-5189.
- Tiemersma, E. W., Bronzwaer, S. L., Lyytikäinen, O., Degener, J. E., Schrijnemakers, P., Bruinsma, N., Monen, J., Witte, W., and Grundman, H. (2004) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. *Emerg Infect Dis* **10**: 1627-1634.
- Tristan, A., Bes, M., Meugnier, H., Lina, G., Bozdogan, B., Courvalin, P., Reverdy, M. E., Enright, M. C., Vandenesch, F., and Etienne, J. (2007) Global distribution of Panton-Valentine leukocidin--positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerg Infect Dis* **13**: 594-600.
- Trotha, R., Reichl, U., Thies, F. L., Sperling, D., König, W., and König, B. (2002) Adaption of a fragment analysis technique to an automated high-throughput multicapillary electrophoresis device for the precise qualitative and quantitative characterization of microbial communities. *Electrophoresis* **23**: 1070-1079.
- Trulzsch, K., Rinder, H., Trcek, J., Bader, L., Wilhelm, U., and Heesemann, J. (2002) "Staphylococcus pettenkoferi," a novel staphylococcal species isolated from clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* **43**: 175-182.
- Turmanidze, T. S., Kvesitadze, G. I., Mikanadze, I. U., Shanidze, M. G., Loladze, M. Z., Birkadze, T. V., and Alibegashvili, M. G. (1996) Isolation and physico-chemical characteristics of *Staphylococcus hyaluronidase*. *Prikl Biokhim Mikrobiol* **32**: 519-523.
- Uchiyama, T., Tadakuma, T., Imanishi, K., Araake, M., Saito, S., Yan, X. J., Fujikawa, H., Igarashi, H., and Yamaura, N. (1989) Activation of murine T cells by toxic shock syndrome toxin-1. The toxin-binding structures expressed on murine accessory cells are MHC class II molecules. *J Immunol* **143**: 3175-3182.
- Uchiyama, T., Yan, X. J., Imanishi, K., and Yagi, J. (1994) Bacterial superantigens--mechanism of T cell activation by the superantigens and their role in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbiol Immunol* **38**: 245-256.
- Uhlen, M., Guss, B., Nilsson, B., Gatenbeck, S., Philipson, L., and Lindberg, M. (1984) Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. *J Biol Chem* **259**: 1695-1702.
- Urwin, R. and Maiden, M. C. (2003) Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol* **11**: 479-487.
- van 't, Hof W., Veerman, E. C., Helmerhorst, E. J., and Amerongen, A. V. (2001) Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol Chem* **382**: 597-619.
- van der, Flier M., van Dijk, N. B., Fluit, A. C., Fleer, A., Wolfs, T. F., and van Gestel, J. P. (2003) Fatal pneumonia in an adolescent due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* positive for Panton-Valentine-leukocidin. *Ned Tijdschr Geneesk* **147**: 1076-1079.
- van Hoovels, L., De Munter, P., Colaert, J., Surmont, I., Van Wijngaerden, E., Peetermans, W. E., and Verhaegen, J. (2005) Three cases of destructive native valve endocarditis caused by *Staphylococcus lugdunensis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **24**: 149-152.
- van Trijp, M. J., Melles, D. C., Hendriks, W. D., Parlevliet, G. A., Gommans, M., and Ott, A. (2007) Successful control of widespread methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection in a large teaching hospital in the Netherlands. *Infect Control Hosp Epidemiol* **28**: 970-975.
- van Wamel, W. J., Rooijackers, S. H., Ruyken, M., van Kessel, K. P., and van Strijp, J. A. (2006) The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *J Bacteriol* **188**: 1310-1315.



- Vandenesch, F., Perrier-Gros-Claude, J. D., Bes, M., Fuhrmann, C., Delorme, V., Mouren, C., and Etienne, J. (1995) Staphylococcus pasteurii-specific oligonucleotide probes derived from a random amplified DNA fragment. *FEMS Microbiol Lett* **132**: 147-152.
- Vandenesch, F., Naimi, T., Enright, M. C., Lina, G., Nimmo, G. R., Heffernan, H., Liassine, N., Bes, M., Greenland, T., Reverdy, M. E., and Etienne, J. (2003) Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* **9**: 978-984.
- von Eiff, C., Kaufhold, A., and Peters, G. (1993) Klinik und Pathogenese von Infektionen durch Staphylokokken und Streptokokken. In *Infektion und Haut*. Macher, E., Kolde, G., and Bröcker, E. B. (eds.) Züllich: Biermann Verlag, pp. 63-86.
- Voss, E., Wehkamp, J., Wehkamp, K., Stange, E. F., Schroder, J. M., and Harder, J. (2006) NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *J Biol Chem* **281**: 2005-2011.
- Walev, I., Weller, U., Strauch, S., Foster, T., and Bhakdi, S. (1996) Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (beta-toxin) of Staphylococcus aureus. *Infect Immun* **64**: 2974-2979.
- Wallet, F., Loiez, C., Renaux, E., Lemaitre, N., and Courcol, R. J. (2005) Performances of VITEK 2 colorimetric cards for identification of gram-positive and gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol* **43**: 4402-4406.
- Watts, A., Ke, D., Wang, Q., Pillay, A., Nicholson-Weller, A., and Lee, J. C. (2005) Staphylococcus aureus strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. *Infect Immun* **73**: 3502-3511.
- Wehkamp, J., Schwind, B., Herrlinger, K. R., Baxmann, S., Schmidt, K., Duchrow, M., Wohlschläger, C., Feller, A. C., Stange, E. F., and Fellermann, K. (2002) Innate immunity and colonic inflammation: enhanced expression of epithelial alpha-defensins. *Dig Dis Sci* **47**: 1349-1355.
- Weisman, L. E. (2004) Coagulase-negative staphylococcal disease: emerging therapies for the neonatal and pediatric patient. *Curr Opin Infect Dis* **17**: 237-241.
- Wiedow, O., Harder, J., Bartels, J., Streit, V., and Christophers, E. (1998) Antileukoprotease in human skin: an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **248**: 904-909.
- Wilde, C. G., Griffith, J. E., Marra, M. N., Snable, J. L., and Scott, R. W. (1989) Purification and characterization of human neutrophil peptide 4, a novel member of the defensin family. *J Biol Chem* **264**: 11200-11203.
- Williams, R. E. (1963) Healthy carriage of Staphylococcus aureus: its prevalence and importance. *Bacteriol Rev* **27**: 56-71.
- Witte, W., Cuny, C., Bräulke, C., Heuck, D., and Klare, I. (1997) Widespread dissemination of epidemic MRSA in German hospitals. *Euro Surveill* **2**: 25-28.
- Witte, W., Bräulke, C., Heuck, D., and Cuny, C. (2000) Methicillin resistant Staphylococcus aureus in German hospitals develop narrower patterns of antimicrobial resistance. *Euro Surveill* **5**: 31-34.
- Witte, W., Enright, M., Schmitz, F. J., Cuny, C., Bräulke, C., and Heuck, D. (2001) Characteristics of a new epidemic MRSA in Germany ancestral to United Kingdom EMRSA 15. *Int J Med Microbiol* **290**: 677-682.
- Witte, W., Cuny, C., Strommenger, B., Bräulke, C., and Heuck, D. (2004) Emergence of a new community acquired MRSA strain in Germany. *Euro Surveill* **9**: 16-18.
- Witte, W. (2004) International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens. *Infect Genet Evol* **4**: 187-191.
- Witte, W., Bräulke, C., Cuny, C., Strommenger, B., Werner, G., Heuck, D., Jappe, U., Wendt, C., Linde, H. J., and Harmsen, D. (2005) Emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus with Panton-Valentine leukocidin genes in central Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **24**: 1-5.

- Witte, W., Strommenger, B., Cuny, C., Heuck, D., and Nuebel, U. (2007) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the Panton-Valentine leucocidin gene in Germany in 2005 and 2006. *J Antimicrob Chemother* **60**: 1258-1263.
- Wood, C. A., Sewell, D. L., and Strausbaugh, L. J. (1989) Vertebral osteomyelitis and native valve endocarditis caused by *Staphylococcus warneri*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **12**: 261-263.
- Wu, M., Maier, E., Benz, R., and Hancock, R. E. (1999) Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **38**: 7235-7242.
- Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S. N., Chen, Q., Buffo, M. J., Shogan, J., Anderson, M., Schroder, J. M., Wang, J. M., Howard, O. M., and Oppenheim, J. J. (1999) Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* **286**: 525-528.
- Yang, D., Biragyn, A., Hoover, D. M., Lubkowski, J., and Oppenheim, J. J. (2004) Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol* **22**: 181-215.
- Yugueros, J., Temprano, A., Berzal, B., Sanchez, M., Hernanz, C., Luengo, J. M., and Naharro, G. (2000) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene as a useful taxonomic tool for *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol* **38**: 4351-4355.
- Yugueros, J., Temprano, A., Sanchez, M., Luengo, J. M., and Naharro, G. (2001) Identification of *Staphylococcus* spp. by PCR-restriction fragment length polymorphism of gap gene. *J Clin Microbiol* **39**: 3693-3695.
- Zaiou, M., Nizet, V., and Gallo, R. L. (2003) Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *J Invest Dermatol* **120**: 810-816.
- Zaiou, M., Gallo, R. C., and Braff, M. H. (2005) Natural Antimicrobial Peptides: A Barrier against Human Skin Infection. In *Antimicrobial peptides in human health and disease*. Gallo, R. C. (eds.) Wymondham, U.K: Horizon Bioscience, pp. 253-276.
- Zanetti, M., Gennaro, R., and Romeo, D. (1995) Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett* **374**: 1-5.
- Zaraket, H., Otsuka, T., Saito, K., Dohmae, S., Takano, T., Higuchi, W., Ohkubo, T., Ozaki, K., Takano, M., Reva, I., Baranovich, T., and Yamamoto, T. (2007) Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals in Niigata, Japan: divergence and transmission. *Microbiol Immunol* **51**: 171-176.
- Zhao, C., Wang, I., and Lehrer, R. I. (1996) Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett* **396**: 319-322.
- Zheng, Y., Niyonsaba, F., Ushio, H., Ikeda, S., Nagaoka, I., Okumura, K., and Ogawa, H. (2008) Microbicidal protein psoriasin is a multifunctional modulator of neutrophil activation. *Immunology* **124**: 357-367.
- Ziebuhr, W., Hennig, S., Eckart, M., Kranzler, H., Batzilla, C., and Kozitskaya, S. (2006) Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int J Antimicrob Agents* **28 Suppl 1**: S14-S20.

# 8 ANHANG

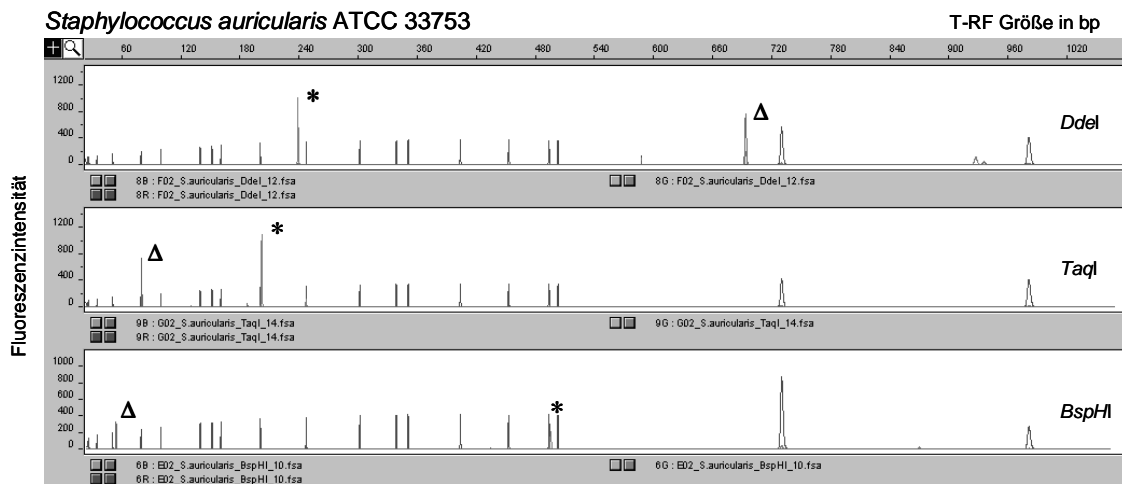
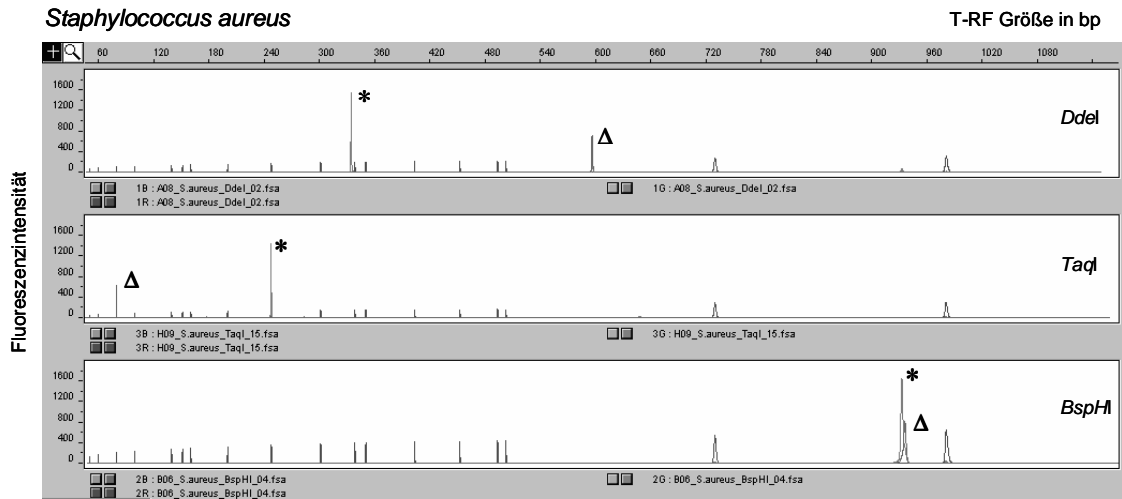
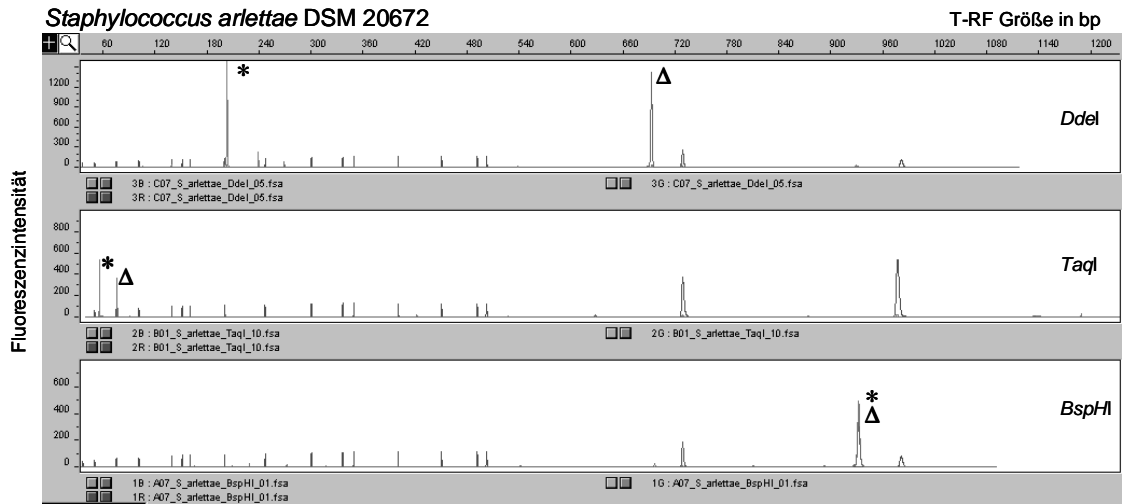
Tabelle 8.1: Herkunft<sup>a</sup>, Resistenzprofile<sup>b</sup> und erhaltene Ergebnisse (p: positiv/ n: negativ) der Analyse der Gene für die Staphylokokken-Enterotoxine A-E (*sea-see*), G-J (*seg-sej*), das Toxisch-Schock-Syndrom-Toxin-1 (*tst*), das Panton-Valentine-Leukozidin (*lukPV*) und das Virulenzoperon *agr* für alle *S. aureus*-Patientenisolate.

Nr.	Station	Resistenz	SA442	<i>mecA</i>	<i>lukPV</i>	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	<i>sej</i>	<i>tst</i>	<i>agr</i> -Gruppe
1	AIT	PEN-ERY-CIP-CLI	p	n	n	n	n	n	p	n	n	n	p	n	p	I
2	AIT	PEN	p	n	n	n	n	p	n	n	n	n	p	n	p	III
3	AIT	PEN	p	n	n	n	n	p	n	n	n	n	p	n	p	III
4	AIT	PEN-OXA-ERY-GEN-CIP-CLI	p	p	n	p	n	n	n	n	p	n	p	n	p	II
5	AIT	TET-CIP	p	n	n	n	p	n	p	n	n	n	p	p	p	I
6	AIT	TET-CIP	p	n	n	n	p	n	p	n	n	n	p	p	p	I
7	CAP	PEN	p	n	n	p	n	n	n	n	p	n	p	n	p	III
8	CHH	PEN	p	n	n	p	n	n	n	n	p	n	p	n	p	III
9	CHI	PEN-CIP	p	n	n	n	n	n	p	n	n	n	p	p	p	I
10	CHI	keine	p	n	n	n	n	n	n	n	n	p	n	n	p	III
11	CHK	keine	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	II
12	CHN	PEN	p	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	n	p	IV
13	CHN	PEN-OXA-ERY-CIP-CLI	p	p	n	n	n	n	n	n	p	n	p	p	p	I
14	CHN	PEN	p	n	n	n	n	p	n	n	n	n	p	n	p	I
15	CHPA	keine	p	n	n	n	n	p	n	n	p	n	n	p	p	I
16	CHU	PEN	p	n	n	n	n	n	p	n	n	n	p	p	p	I
17	CHU	PEN	p	n	n	n	n	n	p	n	n	n	p	p	p	I
18	END	PEN-TET	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	II
19	END	ERY-CLI	p	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	n	p	I
20	GHI	PEN-ERY-GEN-CIP-CLI	p	n	n	p	n	n	n	n	p	n	p	p	p	II
21	GHI	PEN	p	n	n	n	n	p	n	n	p	n	p	p	p	I
22	HAU	PEN	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	I
23	HAU	PEN-TET-CIP	p	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	n	p	I
24	HAU	PEN-TET-CIP	p	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	n	p	I
25	HAU	PEN-GEN	p	n	n	p	n	n	n	n	p	n	p	n	p	IV
26	HAU	keine	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	I
27	HAU	keine	p	n	n	n	n	p	n	n	p	n	p	n	p	I
28	HAU	GEN	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	I
29	HNO	keine	p	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	p	p	I
30	HNO	PEN-ERY-CIP-CLI	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	II
31	HNO	PEN-ERY-CLI	p	n	n	n	n	p	n	n	n	n	p	n	p	I
32	HNO	PEN-ERY-CLI	p	n	n	p	n	n	n	n	p	n	p	n	p	I
33	ORTA	PEN-CIP	p	n	n	n	n	n	p	n	n	n	p	p	p	I
34	PAEA	keine	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	p	p	p	I
35	PAEA	keine	p	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	n	p	I
36	ZNA	PEN-OXA-CIP	p	p	n	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	I
37	AIT	PEN	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	p	n	n	II
38	AIT	PEN-ERY-CLI	p	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	n	n	II
39	AIT	PEN-ERY-CLI	p	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	n	n	II
40	AIT	PEN-ERY-CIP-CLI	p	n	n	n	n	n	p	n	n	n	p	n	n	I
41	AIT	PEN-OXA-ERY-GEN-CIP-CLI	p	p	n	p	n	n	n	n	p	n	p	n	n	II
42	AIT	PEN-OXA-ERY-GEN-CIP-CLI	p	p	n	p	n	n	n	n	p	n	p	n	n	II
43	AIT	PEN-OXA-ERY-GEN-CIP-CLI	p	p	n	p	n	n	n	n	p	n	p	n	n	II
44	AUG	PEN-OXA-ERY	p	p	n	n	n	p	n	n	p	n	p	n	n	I
45	CAP	PEN-CIP	p	n	n	n	n	n	p	n	n	n	p	p	n	I
46	CHI	PEN-OXA-CIP	p	p	n	p	n	n	n	n	n	n	p	n	n	I
47	CHK	PEN	p	n	n	n	n	n	p	n	n	n	n	n	n	I
48	CHN	keine	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	II
49	CHN	PEN	p	n	n	n	n	n	n	n	p	p	p	n	n	I
50	CHN	PEN-OXA-ERY-CIP-CLI	p	p	n	n	n	n	n	n	p	p	p	n	n	I
51	CHN	PEN-OXA-ERY-CIP-CLI	p	p	n	n	n	n	n	n	p	p	p	n	n	I
52	CHU	PEN-ERY-CLI	p	n	n	n	n	n	n	n	p	p	p	p	n	II
53	END	PEN-OXA-ERY-CIP-CLI	p	p	n	n	n	p	n	n	p	p	p	n	n	I
54	FLE	PEN-OXA-ERY-CIP-CLI	p	p	n	n	n	n	n	n	p	p	p	n	n	II
55	GYN	PEN	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	II
56	GYN	PEN	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	p	n	n	I
57	HAE	CIP	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	I
58	HAE	PEN-OXA-ERY-GEN-CIP-CLI	p	p	n	p	n	n	n	n	n	p	p	p	n	II
59	HAU	PEN-CIP	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	p	p	n	I
60	HAU	PEN	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	II
61	HAU	PEN	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	p	n	n	II
62	HAU	PEN	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	p	n	n	II
63	HAU	PEN	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	p	n	n	II
64	HAU	PEN-OXA-ERY-CIP-CLI	p	p	n	n	n	p	n	n	p	p	p	n	n	I
65	HAU	PEN-OXA-ERY-CIP-CLI	p	p	n	n	n	p	n	n	p	p	p	n	n	I

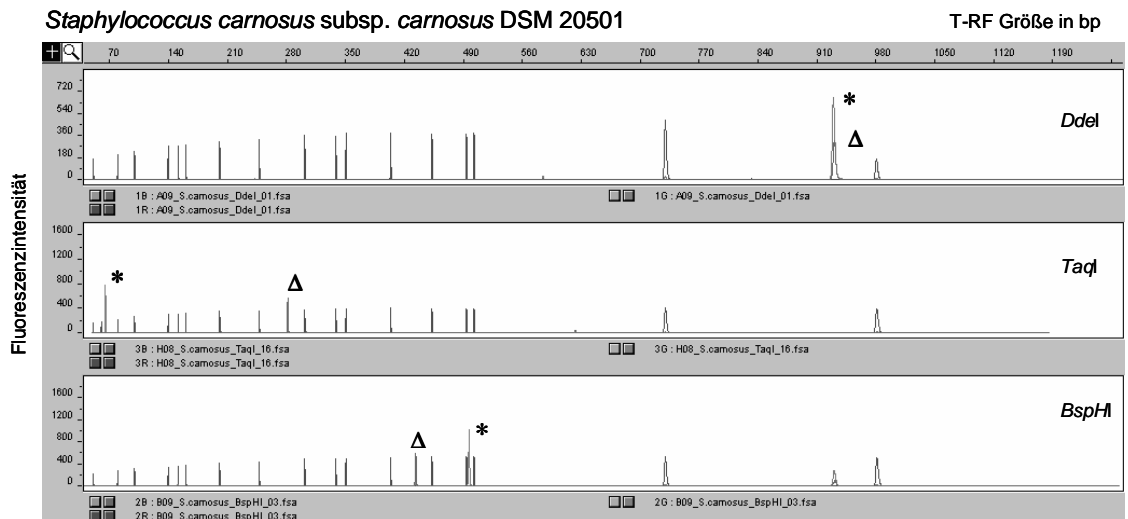
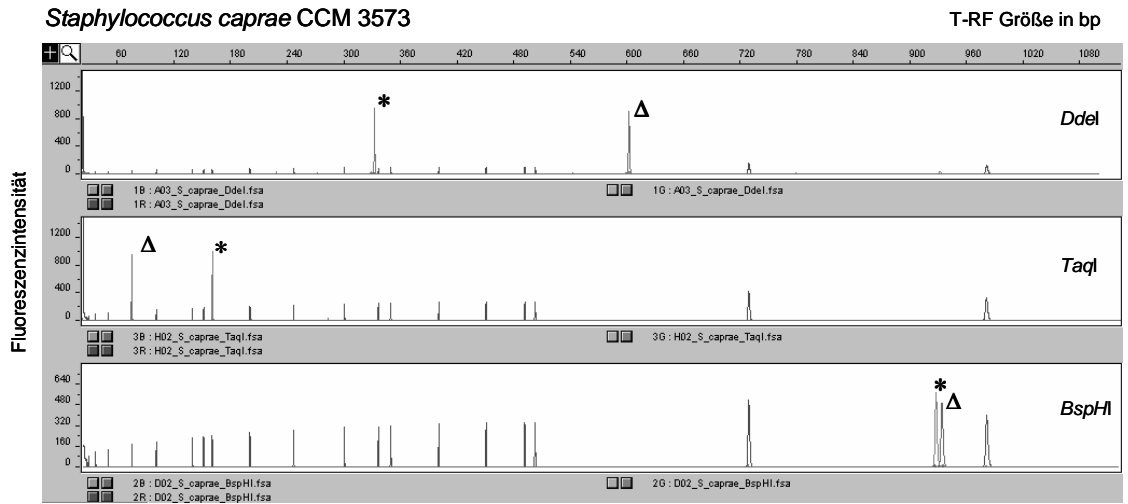
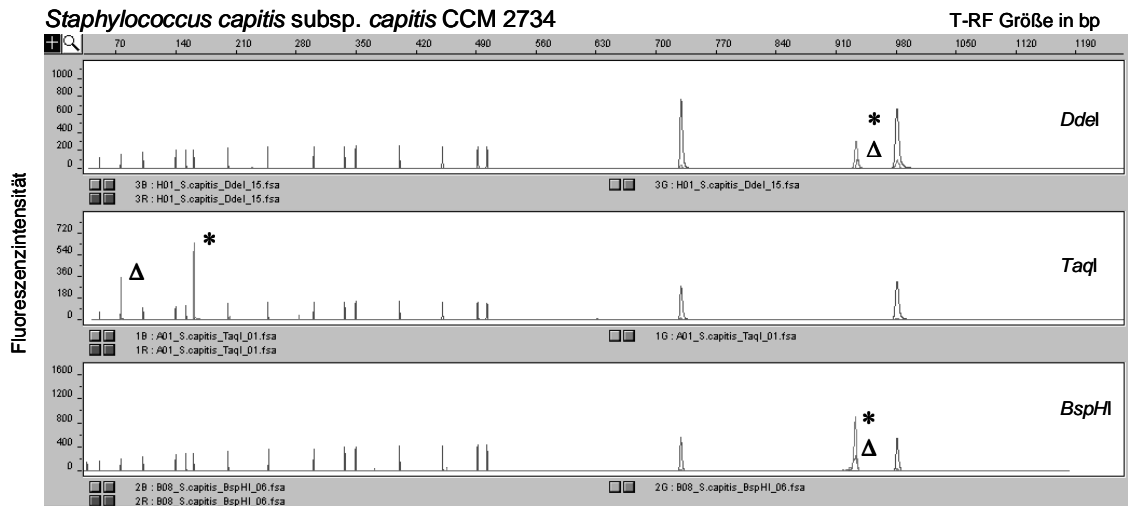
Nr.	Station	Resistenz	SA442	mecA	lukPVL	sea	seb	sec	sed	see	seg	seh	sei	sej	tst	agr-Gruppe
66	HAU	PEN	p	n	n	n	n	p	n	n	p	n	p	n	n	I
67	HAU	PEN	p	n	n	n	p	n	n	n	p	n	p	n	n	I
68	HAU	keine	p	n	n	n	n	p	n	n	p	n	p	n	n	I
69	HAU	PEN-TET	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	p	n	n	II
70	HAU	ERY-CIP-CLI	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	I
71	HAU	PEN	p	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	n	n	I
72	HAU	PEN	p	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	p	n	I
73	HAU	PEN-TET-ERY-CLI	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	p	n	IV
74	HAU	PEN	p	n	n	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	I
75	HAU	keine	p	n	n	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	I
76	HAU	keine	p	n	n	p	n	n	n	n	p	n	p	p	n	I
77	HAU	PEN	p	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	n	n	I
78	HNO	PEN-TET	p	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	n	n	IV
79	HNO	PEN-OXA-ERY-CIP-CLI	p	p	n	n	n	p	n	n	p	n	p	n	n	I
80	HNO	PEN-CIP	p	n	n	n	n	n	p	n	n	n	p	n	n	I
81	HNO	PEN-CIP	p	n	n	n	n	p	n	n	p	n	p	n	n	I
82	KAR	PEN-ERY-CIP-CLI	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	p	p	n	I
83	KAR	PEN-CIP	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	I
84	KAR	PEN-OXA-ERY-CIP-CLI	p	p	n	n	n	n	n	n	p	n	p	n	n	I
85	KAR	PEN	p	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	n	n	I
86	KAR	PEN-OXA-ERY-CIP-CLI	p	p	n	n	n	p	n	n	p	n	p	p	n	I
87	KAR	PEN	p	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	p	n	I
88	NEP	PEN-OXA-ERY-CIP-CLI	p	p	n	n	n	p	n	n	n	n	p	p	n	I
89	NEU	PEN-OXA-ERY-CIP-CLI	p	p	n	n	n	n	n	n	n	n	p	p	n	I
90	ORTA	PEN	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	I
91	PAEA	PEN	p	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	n	n	II
92	PAEA	keine	p	n	n	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	I
93	URO	PEN-OXA-ERY-CIP-CLI	p	p	n	n	n	p	n	n	p	n	p	p	n	I
94	CHI	PEN	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	p	n	n	I
95	CHN	PEN-OXA-ERY-CIP-CLI	p	p	n	n	n	n	n	n	p	n	n	n	n	I
96	END	PEN-OXA-ERY-CIP-CLI	p	p	n	n	n	p	n	n	p	n	p	p	n	I
97	FLE	PEN	p	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	n	n	I
98	HAE	keine	p	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	n	n	III
99	HAU	PEN	p	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	n	n	III
100	HAU	PEN	p	n	n	n	n	n	p	n	n	n	p	n	n	I
101	HAU	PEN	p	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	n	n	IV
102	HAU	PEN-TET-CIP	p	n	n	n	n	n	n	n	p	n	p	n	n	I
103	HAU	PEN-TET	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	p	n	n	II
104	NRZ	PEN-OXA	p	p	n	n	p	n	n	n	p	n	p	n	n	I
105	PAEA	PEN	p	n	n	n	n	n	n	n	p	p	p	p	n	I
106	PAEA	keine	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	I

<sup>a</sup> AIT: Anästhesiologie; AUG: Augenklinik; CAP: Kardiologie Ambulanz; CHH: Herzchirurgie; CHI: Chirurgische Intensivstation; CHK: Kinderchirurgie; CHN: Neurochirurgie; CHPA: Plastische Chirurgie; CHU: Chirurgische Tagesklinik; END: Endokrinologie; FLE/NRZ: Rehabilitationszentrum Flechtingen; GHI: Gastroenterologie; GYN: Gynäkologie; HAE: Hämatologie; HAU: Dermatologie; HNO: Hals-Nasen-Ohren-Klinik; KAR: Kardiologie; NEP: Nephrologie; NEU: Neurologie; ORTA: Orthopädie; PAEA: Pädiatrie; URO: Urologie; ZNA: Notaufnahme

<sup>b</sup> CIP: Ciprofloxacin; CLI: Clindamycin; ERY: Erythromycin; GEN: Gentamycin; OXA: Oxazillin; PEN: Penicillin; TET: Tetracyclin



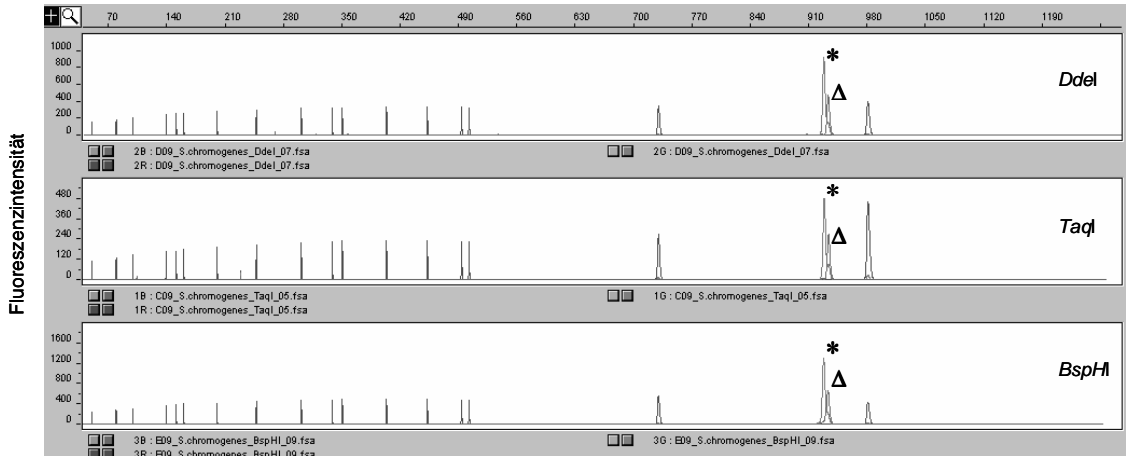
\* :HEX-Markierung, Δ :FAM-Markierung



\* :HEX-Markierung, Δ :FAM-Markierung

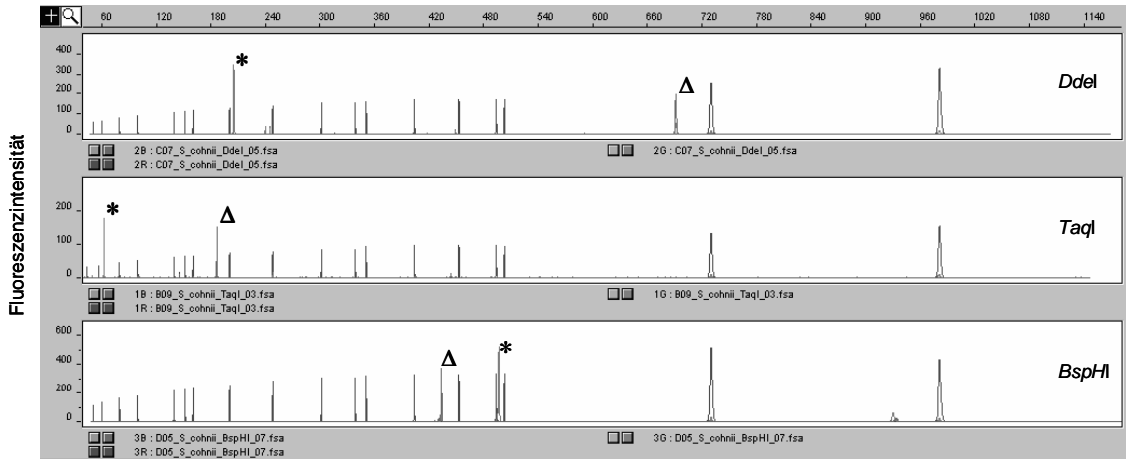
*Staphylococcus chromogenes* CCM 3387

T-RF Größe in bp



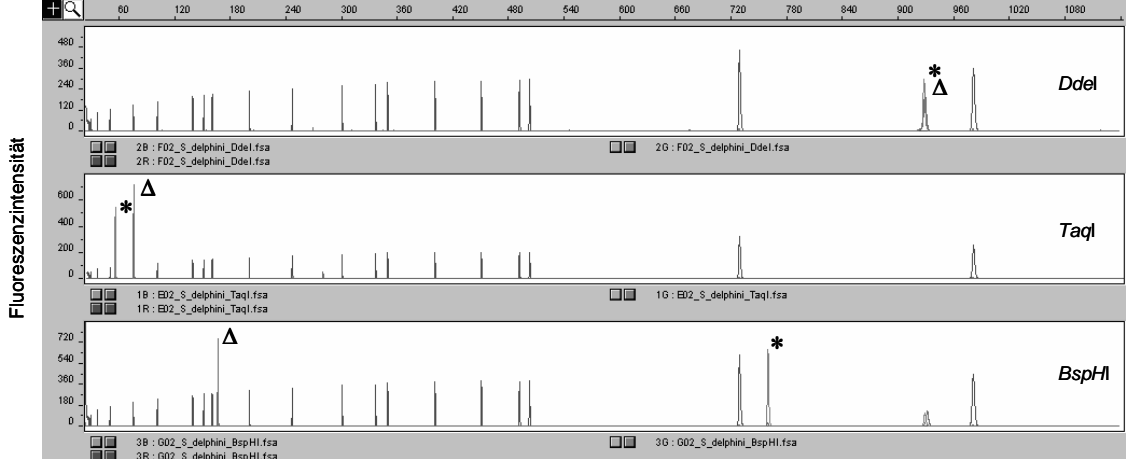
*Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii* DSM 20260

T-RF Größe in bp

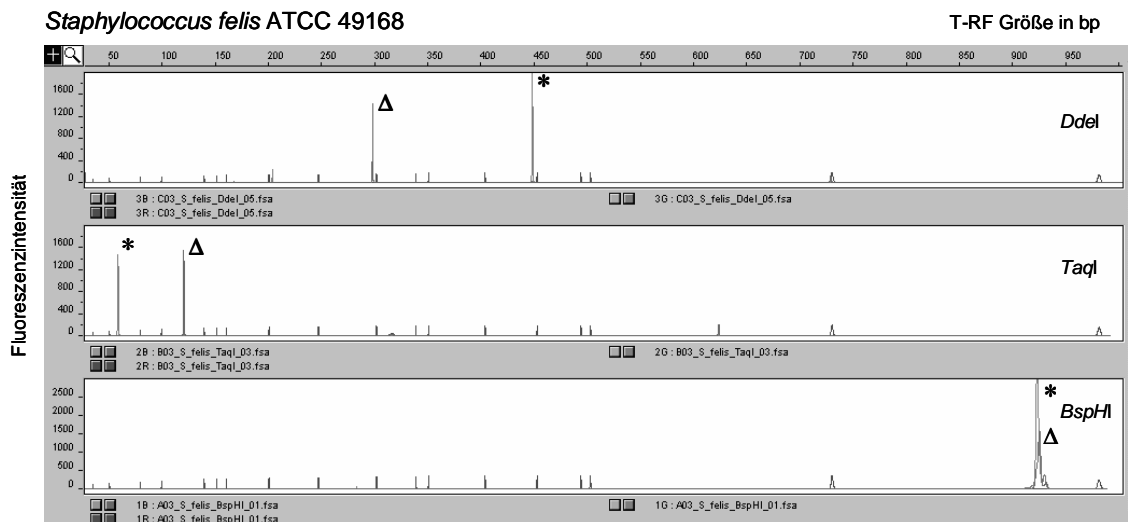
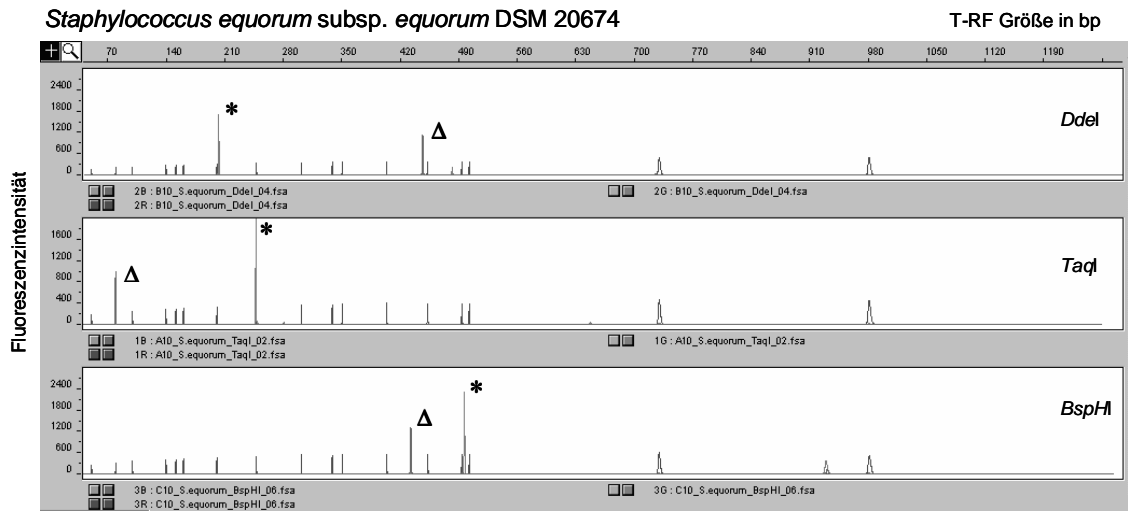
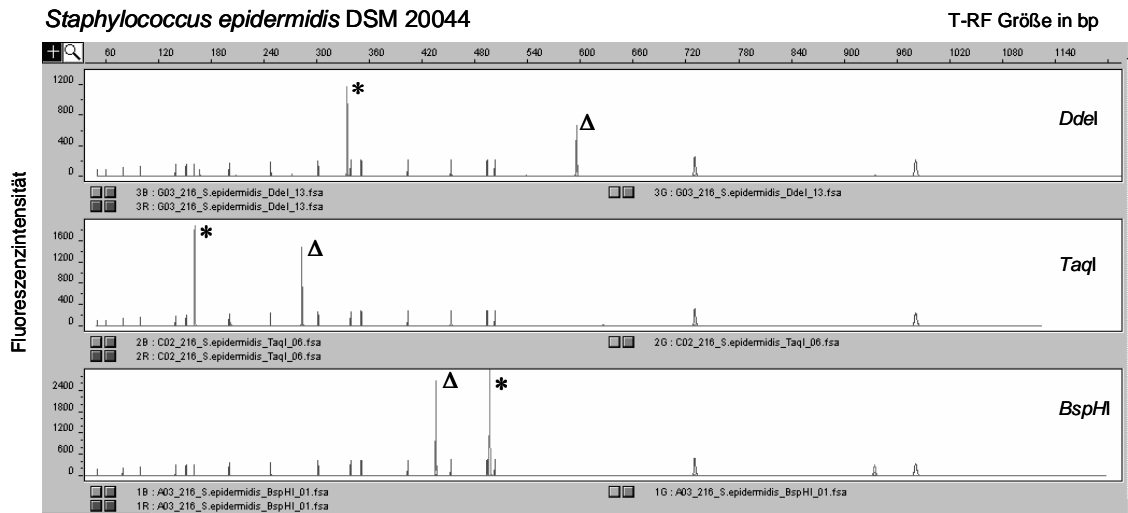


*Staphylococcus delphini* DSM 20771

T-RF Größe in bp

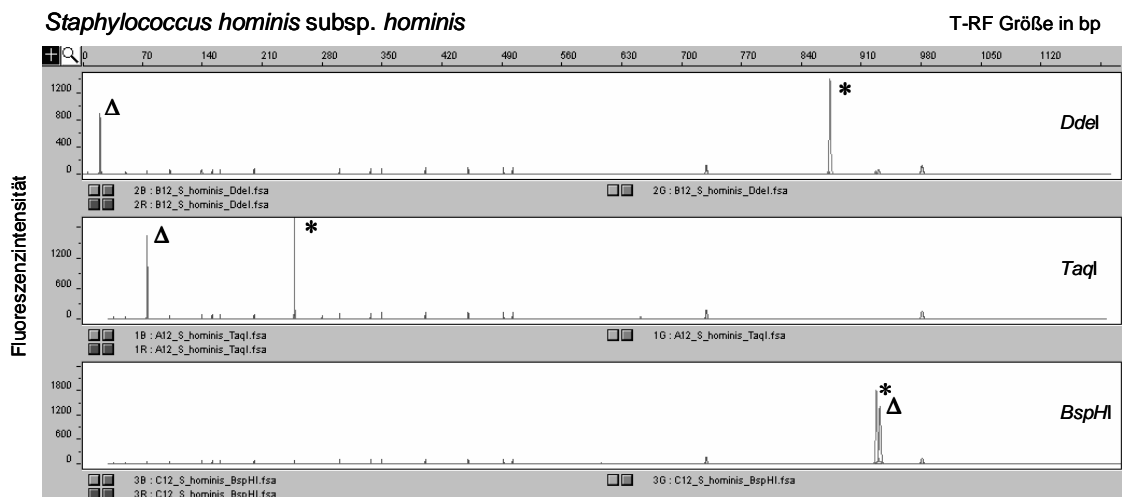
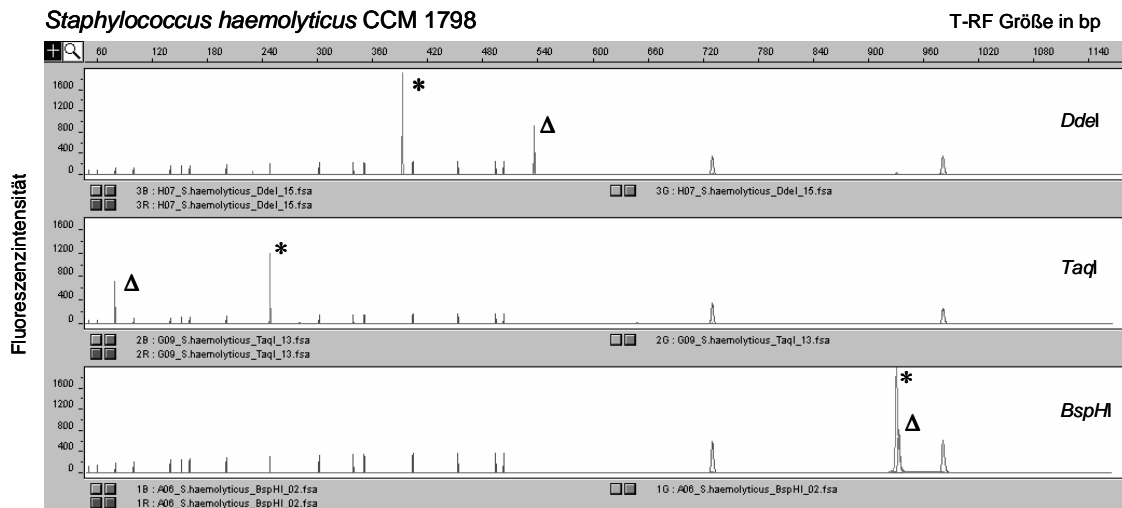


\*:HEX-Markierung, Δ:FAM-Markierung



\* :HEX-Markierung, Δ :FAM-Markierung

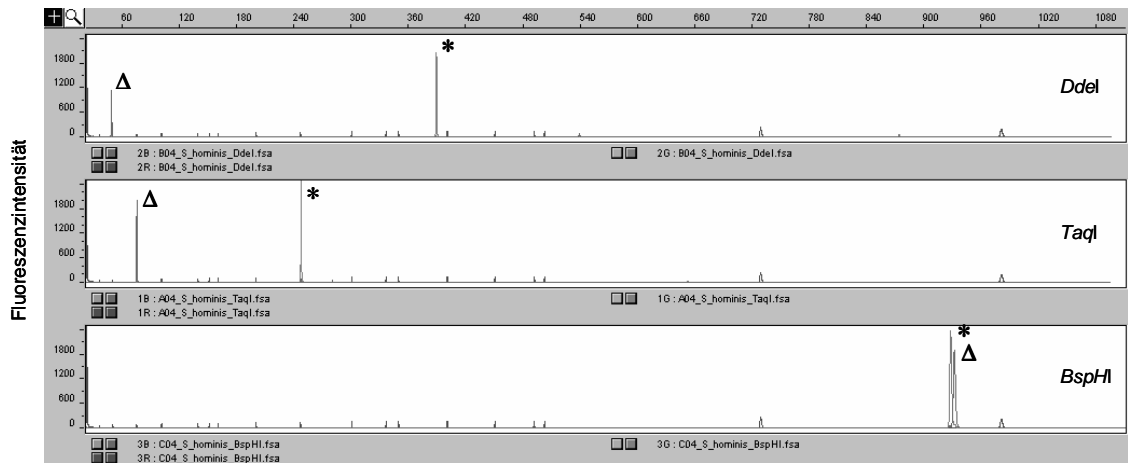




\* :HEX-Markierung, Δ :FAM-Markierung

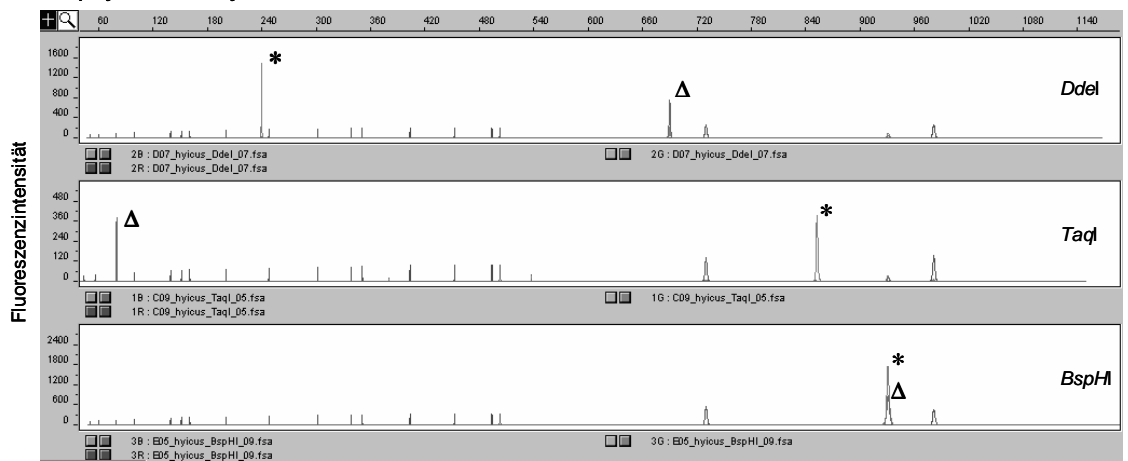
*Staphylococcus hominis* subsp. *hominis* CCM 2732

T-RF Größe in bp



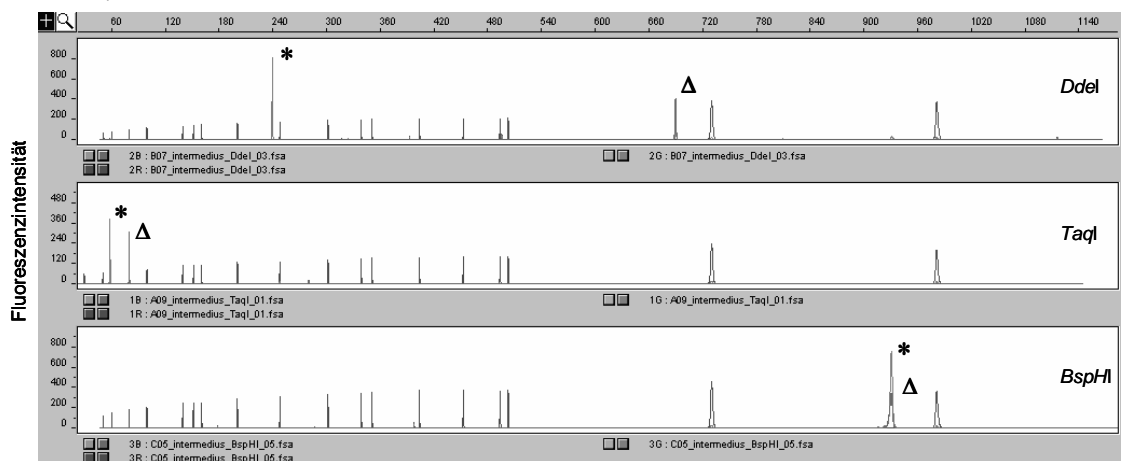
*Staphylococcus hyicus* DSM 20459

T-RF Größe in bp

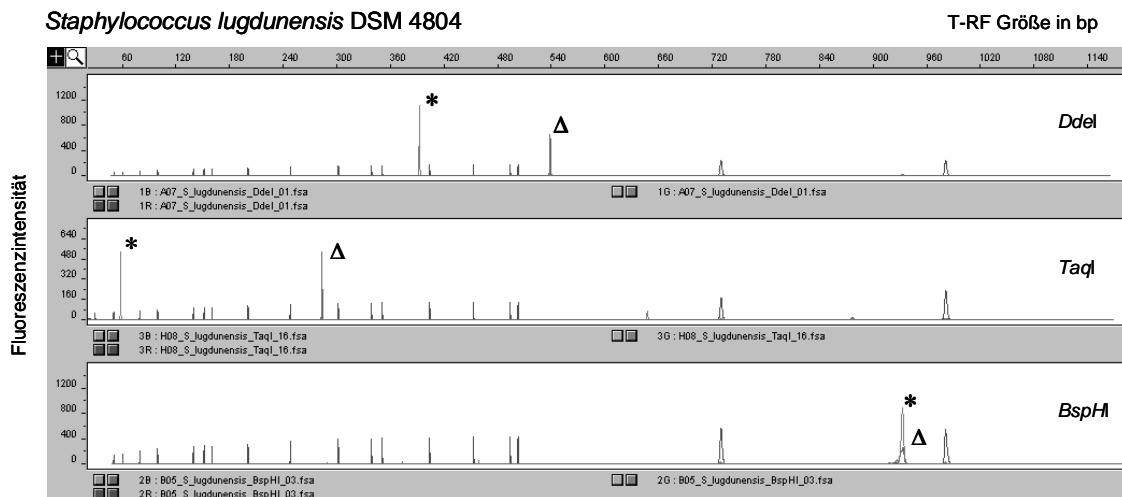
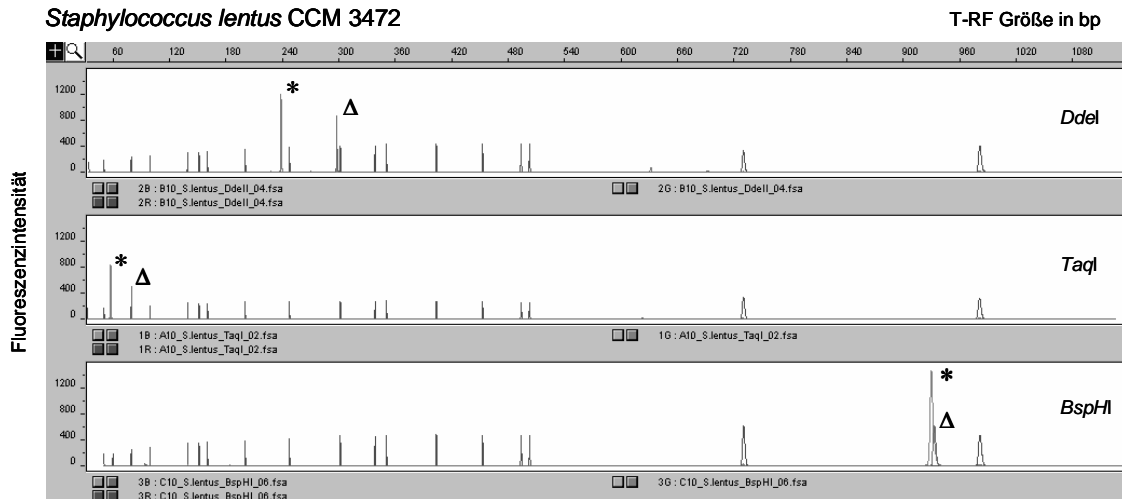
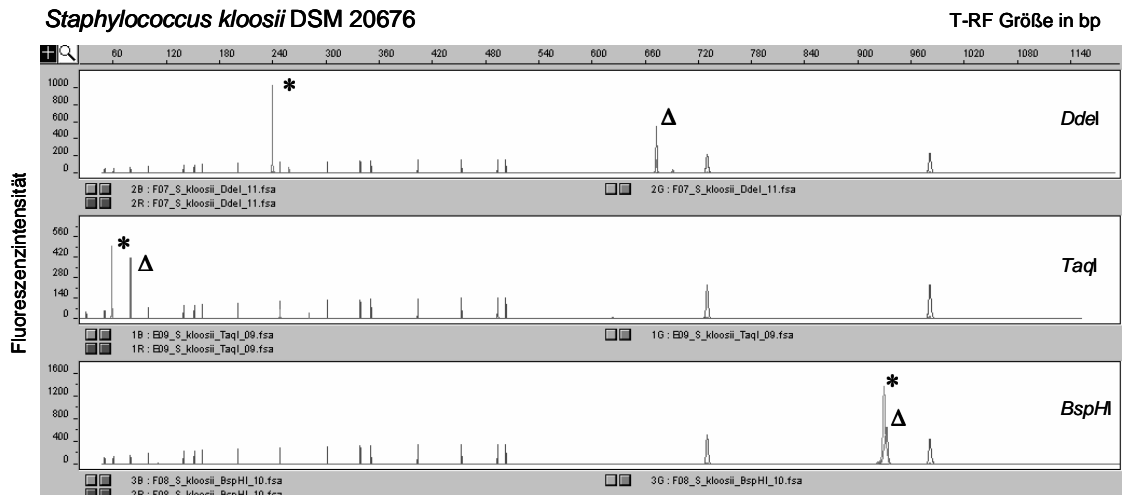


*Staphylococcus intermedius* DSM 20373

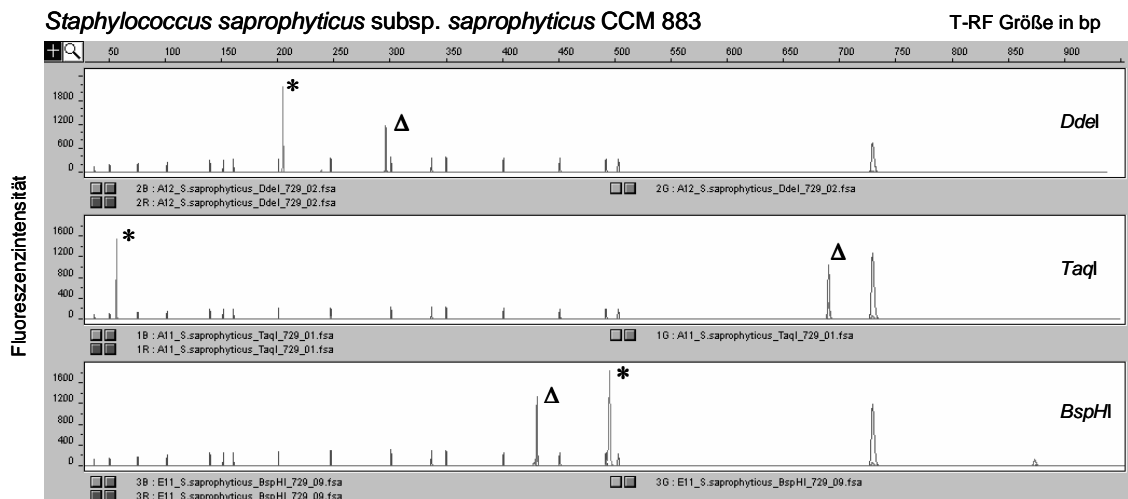
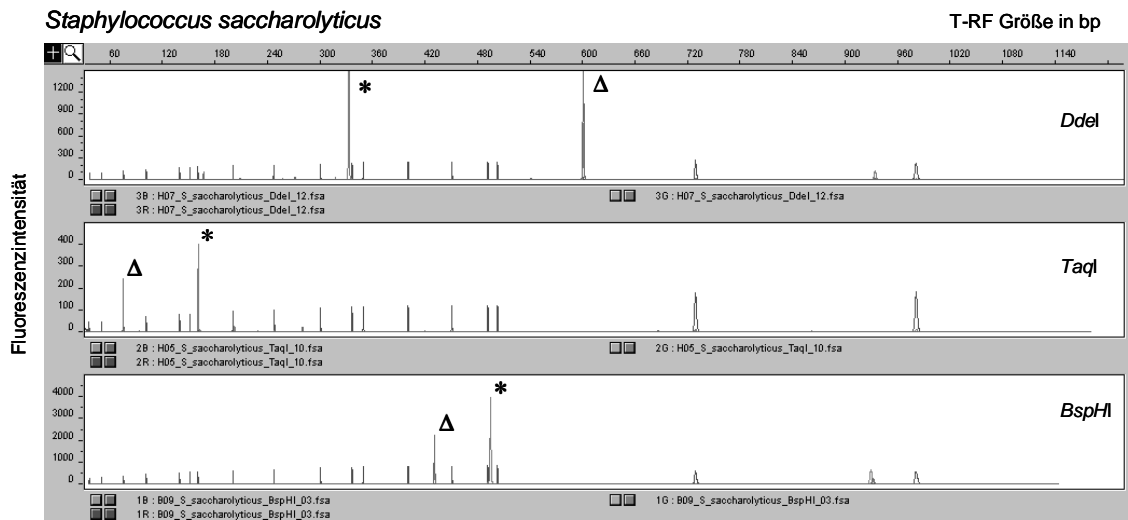
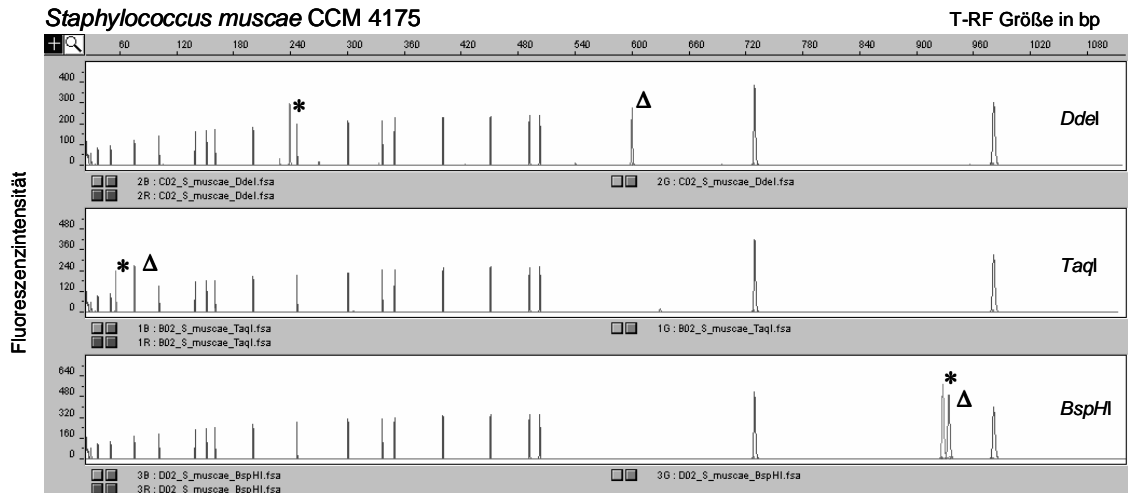
T-RF Größe in bp



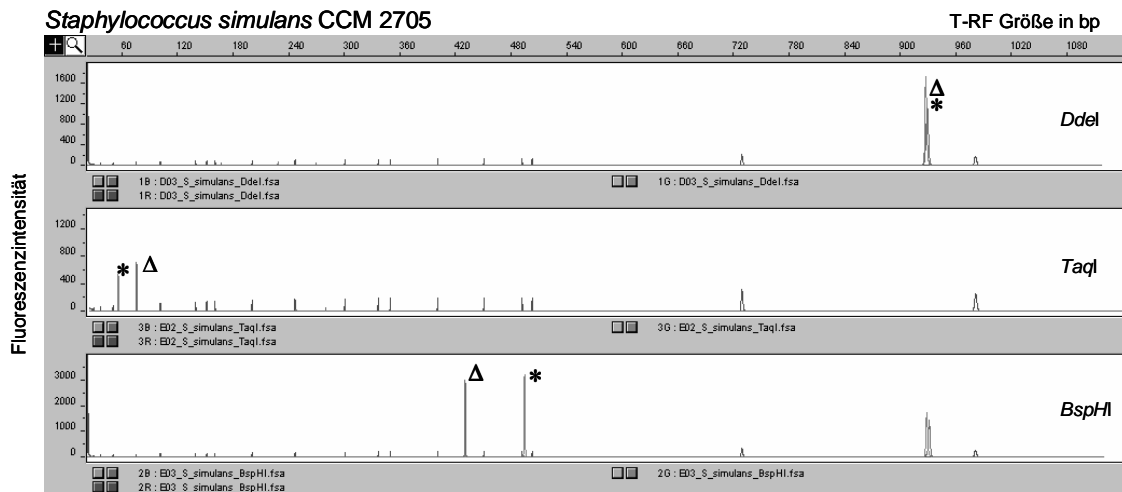
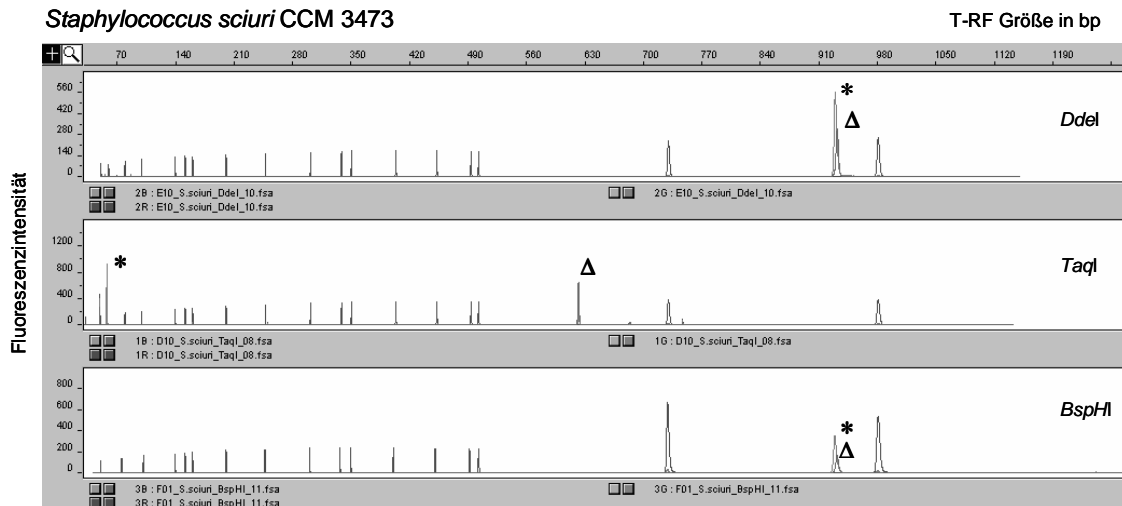
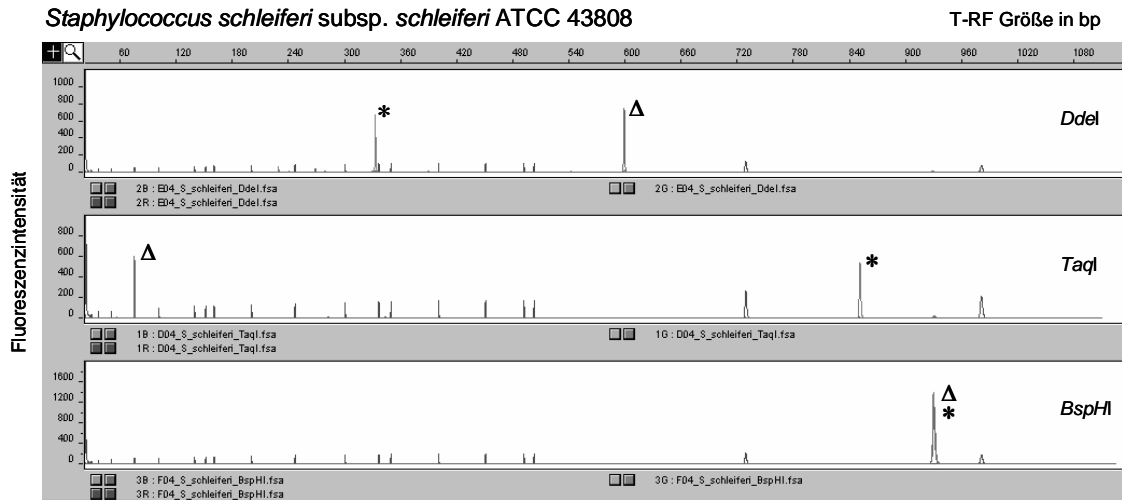
\* :HEX-Markierung, Δ :FAM-Markierung



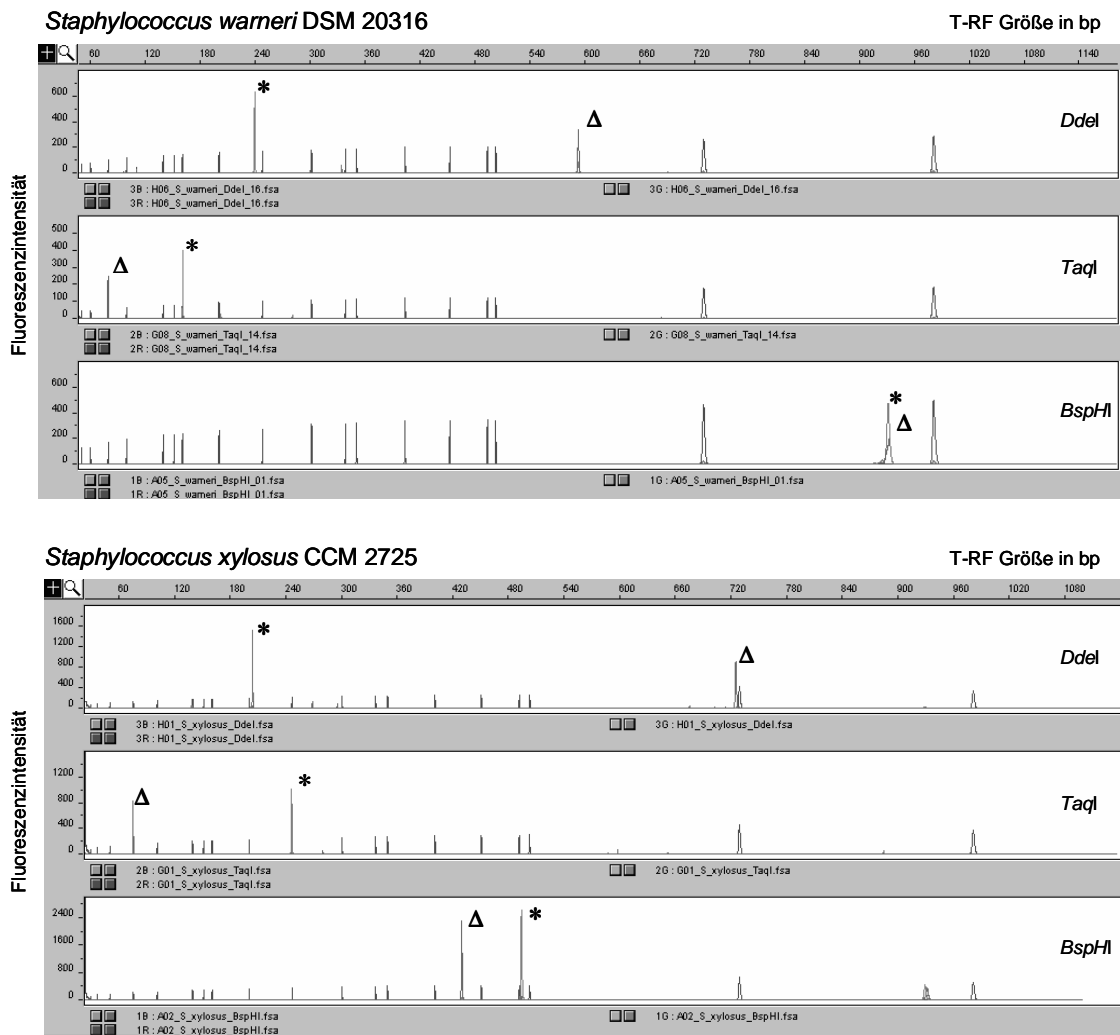
\* :HEX-Markierung, Δ :FAM-Markierung



\* :HEX-Markierung, Δ :FAM-Markierung



\* :HEX-Markierung, Δ :FAM-Markierung



\*:HEX-Markierung, Δ:FAM-Markierung

Abbildung 8.1: T-RFLP-Profile aller *Staphylococcus*-Referenzstämme nach Restriktion mit *DdeI*, *TaqI* und *BspHI*. Die x-Achse entspricht der Fragmentgröße in bp und die y-Achse zeigt die Fluoreszenzintensität in relativen Fluoreszenzeinheiten. (\* HEX-markierte Fragmente; Δ FAM-markierte Fragmente; alle anderen markierten Fragmente sind ROX-markierte Standardfragmente)

## DANKSAGUNG

Mein Dank Frau Prof. Dr. rer. nat. B. König für die interessante Aufgabenstellung, die weit genug gefasst war, so dass ich genug Freiheit bei der Umsetzung meiner eigenen Ideen im Rahmen dieser Dissertation hatte.

Prof. Dr. med. König danke ich für die sehr guten Arbeitsbedingungen im Institut und für die Möglichkeit, meine Daten auf nationalen und internationalen Tagungen zu präsentieren.

Viele Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie sind im Verlauf der letzten Jahre meine Freunde geworden, nur einige seien hier genannt:

Frau Dr. Moder, Frau Dr. Färber, Frau OA Dr. Tammer und Herrn Dr. Arnold verdanke ich viele Einblicke in die medizinische Welt, Ideen für Projekte und das damit verbundene gelegentliche Chaos, was wieder entwirrt werden musste.

Die Mädels aus der Molekularbiologie hatten immer Schokolade für mich in ihrer Schublade....

Ich danke Herrn Dr. Ghebremdhin für sein unermüdliches Arbeiten an unseren Papern, auch noch nachdem er mit Sabine und mir die Weiten der kanadischen Wälder erkunden musste, worauf er sicher gerne verzichtet hätte...

Ein ganz großes Dankeschön möchte ich Dr. Sabine Brandt sagen, mit der ich jegliche verrückte wissenschaftliche Theorie bei einem Bier diskutieren konnte und die mich in den letzten Jahren durch private und promotionsbedingte Hoch- und Tiefphasen begleitet hat. Sabine und Andreas, ihr habt es geschafft, dass Magdeburg ein Stück Heimat für mich geworden ist.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Großeltern, die mich in jeder meiner Entscheidungen immer bedingungslos unterstützt haben. Ohne das Wissen, Euch an meiner Seite zu haben, hätte ich diesen Weg nicht gehen können.

Ich danke Euch allen. Ich weiß mein Glück zu schätzen.

Magdeburg, 19.09.2008

Franziska Layer

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Name: Franziska Layer  
Geburtsdatum: 12.03.1981  
Geburtsort: Altenburg  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Adresse: Carl-von-Ossietzky Str. 27, 04600 Altenburg

### Schulbildung

1987 – 1991 Polytechnische Oberschule Bruno Leuschner, Altenburg  
1991 – 1999 Lerchenberggymnasium, Altenburg  
Abschluss: Abitur

### Studium

10/1999 – 06/2004 Studium der Biochemie, Universität Leipzig  
Abschluss: Dipl.-Biochemikerin  
10/2002 – 03/2003 Studienarbeit (Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle,  
Umweltmikrobiologie, Dr. B. Kiesel), Thema: Molekular-  
genetische Untersuchungen zum Stamm *Comamonas acidovorans*  
02/2003 – 03/2003 Projektarbeit (Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle,  
Umweltmikrobiologie, Dr. B. Kiesel/Prof. Dr. W. Babel)  
Thema: Gentransfer in Mikroorganismen aus extremen Umwelten  
10/2003 – 04/2004 Diplomarbeit (Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle,  
Umweltmikrobiologie, Dr. B. Kiesel/Prof. Dr. W. Babel)  
Thema: Plasmide in sauren Bergbauseen

### Praktische Tätigkeiten

05/2001 – 02/2002 HiWi (Max-Planck-Institut für evolutionäre Anthropologie,  
Leipzig, Primatologie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. C. Boesch),  
Projekt: Schimpansen im Tai-Nationalpark  
03/2002 – 07/2002 HiWi (Max-Planck-Institut für evolutionäre Anthropologie,  
Genetik, Arbeitsgruppe Prof. Dr. S. Pääbo) Projekt: „Ancient  
DNA“ - Untersuchungen zu DNA-Sequenzen von Faultieren aus  
archäologischen and paläontologischen Resten  
seit 10/2004 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Medizinische  
Mikrobiologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg



## ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zum Thema: „Untersuchungen zur Taxonomie, Epidemiologie, Genotypisierung und Immunpathologie von klinischen *Staphylococcus*-Isolaten“ selbstständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, den 19.09.2008