

Aus dem Institut für
Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. M. Frosch

**Verbreitung von Meningokokken bei
gesunden Trägern in Bayern
unter besonderer Berücksichtigung
des hypervirulenten ET-15-Klons**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Frank Hessler
aus Biebergemünd

Würzburg, Januar 2005

Referent: Prof. Dr. med. Ulrich Vogel

Korreferent: Prof. Dr. med. dent. Ulrich Schlagenhaut

Dekan: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2005

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Allgemeines zu <i>Neisseria meningitidis</i>	1
1.2	Trägertum	2
1.2.1	Altersverteilung und Dauer des Trägertums	2
1.2.2	Trägertum bei Kontaktpersonen von Erkrankten	2
1.3	Erkrankungen	3
1.4	Virulenzfaktoren	4
1.5	Prävention und Therapie	4
1.5.1	Behandlung mit Antibiotika	4
1.5.2	Antibiotika-Resistenzen	5
1.5.3	Vakzinierung	6
1.6	Epidemiologie	7
1.6.1	Deutschland	7
1.6.2	Globale Epidemiologie	8
1.6.3	Risikofaktoren	9
1.7	Populationsstruktur	11
1.7.1	Genetische und antigenetische Variabilität	11
1.7.1.1	Kapsel	11
1.7.1.2	Proteine der äußeren Zellmembran (OMP)	11
1.7.2	Phylogenetische Methoden	13
1.7.2.1	MLEE (<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>)	13
1.7.2.2	MLST (<i>Multilocus Sequence Typing</i>)	14
1.7.3	Hypervirulente Klone	14
1.8	Der ST-11-Komplex	15
1.8.1	Genotypische Besonderheiten	15
1.8.2	Epidemiologie von ET-15-Meningokokken	17
2	Material und Methoden	20
2.1	Geräte	20
2.1.1	Großgeräte	20
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	20
2.2	Chemikalien	21
2.2.1	Allgemeine Chemikalien	21

2.2.2	Reagenzien für PCR und Sequenzierung	21
2.2.3	Chemikalien für die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	22
2.2.4	Herstellung der Stocklösungen	23
2.2.5	Herstellung der Gebrauchslösungen	23
2.3	Bakterienstämme	24
2.3.1	Kontrollstämme für die biochemische Speziesidentifikation	24
2.3.2	Kontrollstämme für die <i>porB</i> -PCR	25
2.3.3	Stämme für die Pulsfeldgelelektrophorese	25
2.4	Software, <i>Websites</i>	25
2.5	Aufbau der Studie	25
2.6	Abstrichentnahme	28
2.7	Biochemische Speziesidentifikation	28
2.8	Herstellung einer DNA-Suspension	29
2.9	PCR	30
2.10	Gelelektrophorese	31
2.11	DNA-Aufreinigung	32
2.12	DNA-Sequenzierung	32
2.13	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	32
2.13.1	Herstellung der Agaroseblöckchen	33
2.13.2	Lyse und Proteinase K-Verdau	33
2.13.3	DNA-Restriktion	33
2.13.4	Herstellen und Beladen des Laufgels	34
2.13.5	Vorbereitung der Pulsfeldgelelektrophorese	34
2.13.6	Bilddokumentation	35
2.14	Statistische Methoden	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Epidemiologie des Meningokokken-Trägertums in Bayern	36
3.1.1	Trägerraten bei Bundeswehrsoldaten, Kindern und Jugendlichen	36
3.1.2	Trägertum in verschiedenen Altersgruppen	36
3.1.3	Unterschiede im Trägertum in verschiedenen Orten	37
3.1.4	Vergleich einzelner Institutionen	37
3.1.5	Trägertum von Meningokokken bei Bundeswehrsoldaten	40

3.2	Identifizierung der ET-15-Meningokokken	42
3.3	Epidemiologische Analyse der ET-15-Meningokokken	44
3.4	Feintypisierung von ET-15-Meningokokken mittels Pulsfeldgelelektrophorese	44
4	Diskussion	48
4.1	Epidemiologie der ET-15 Meningokokken in Bayern im Vergleich zu anderen Ländern	48
4.2	Dynamik des Trägertums von Meningokokken hypervirulenter Gruppierungen	51
4.3	Vakzinierung gegen Serogruppe-C-Meningokokken in Bayern	53
4.4	Heterogenität der ET-15-Meningokokken	55
5	Zusammenfassung	60
6	Literaturverzeichnis	61
7	Anhang	75
7.1	Einverständniserklärung und Fragebogen für Probanden der Bayerischen Meningokokken-Trägerstudie	75
7.2	Abkürzungsverzeichnis	76

1. Einleitung

1.1 Allgemeines zu *Neisseria meningitidis*

Die Bakterienspezies *Neisseria meningitidis*, im allgemeinen Sprachgebrauch auch Meningokokken genannt, wird mit *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria polysaccharea* und einer Vielzahl weiterer Spezies aufgrund eines hohen Grads an Homologie im bakteriellen Genom zur Gattung *Neisseria* zusammengefasst (Guibourdenche *et al.*, 1986). Die Gattung *Neisseria* gehört zur β -Klasse der Proteobakterien (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser). Neisserien gewinnen ihre zum Leben benötigte Energie unter anderem durch Fermentation von Kohlenhydraten, wobei Meningokokken im Gegensatz zu *Neisseria lactamica* keine Laktose fermentieren können, was für die diagnostische Differenzierung ausgenutzt wird (Mitchell *et al.*, 1965). Meningokokken werden aufgrund unterschiedlicher Kapselpolysaccharide in zwölf verschiedene Serogruppen eingeteilt, welche durch entsprechende Antikörper mittels serologischer Methoden differenziert werden können (Abdillahi *et al.*, 1987). Die Serogruppen A, B, C, W-135 und Y können Erkrankungen hervorrufen, während die Serogruppen 29E, H, I, K, L, X und Z klinisch keine Rolle spielen (Vedros, 1987). Das komplette Genom von Serogruppe-B-Meningokokken ist sequenziert und umfasst 2.272.351 Basenpaare mit 2158 Genen (Tettelin *et al.*, 2000). Ebenso sind die Genome von Serogruppe-A- und von Serogruppe-C-Meningokokken sequenziert (Parkhill *et al.*, 2000; www.sanger.ac.uk/Projects/N_meningitidis). Meningokokken selbst stellen eine sehr heterogene Bakterienspezies dar, was durch horizontalen Gentransfer begründet ist (Caugant *et al.*, 1988; Maiden *et al.*, 1998; Feil *et al.*, 1999). Bei Neisserien handelt es sich um Gram-negative, pleomorphe, ca. 1 μm große Diplokokken, die zwar zu den Aerobiern zählen, zum Wachstum aber neben einem bluthaltigen Medium und 35-37°C auch 5-10% Kohlendioxid benötigen. *Neisseria meningitidis* ist sehr empfindlich gegen Auskühlung und Austrocknung. Der Mensch ist außerdem der einzige Wirt von Meningokokken, was auch bedeutet, dass es kein befriedigendes Tiermodell gibt (Vogel and Frosch, 1999; Zak and Sande, 1999). Neisserien besiedeln die Schleimhäute des Nasopharynx sowie in schwächerer Form auch die Schleimhaut der restlichen oberen Atemwege. Die Übertragung geschieht durch Tröpfchen und Sekrete, was meist Trägertum ohne anschließende Erkrankung zur Folge hat. Zur Übertragung kann es nur durch engen Kontakt zwischen den Übertragungspartnern kommen (Nelson, 1996).

1.2 Trägertum

1.2.1 Altersverteilung und Dauer des Trägertums

In Europa beträgt die durchschnittliche Trägerrate etwa 10%. Die altersspezifischen Trägerraten sind bei Kleinkindern sehr gering und nehmen mit zunehmendem Alter zu, wobei das Maximum von über 25% bei jungen Erwachsenen erreicht wird. Danach ist eine Abnahme des Trägertums bei zunehmendem Alter zu verzeichnen (Cartwright *et al.*, 1987). Das Trägertum dauert unterschiedlich lange und nach einigen Wochen sind oftmals keine Meningokokken im Rachen mehr nachweisbar. Es kann beobachtet werden, dass ein ehemaliger Träger in der Folgezeit mit einem anderen Stamm besiedelt ist (Caugant *et al.*, 1992). Trägertum von Meningokokken im Nasen-Rachen-Raum induziert die systemische Bildung von stammspezifischen Antikörpern (Jones *et al.*, 1998). Ebenso scheint es, dass vor allem bei Kindern hohe Trägerraten von einigen apathogenen Neisserien-Spezies, wie zum Beispiel *Neisseria lactamica*, bei der Bildung von kreuzreagierenden Antikörpern gegen Meningokokken eine wichtige Rolle spielen (Gold *et al.*, 1978). Die Verteilung von genotypischen Merkmalen der Stämme von gesunden Trägern weicht deutlich von denen der Erkrankungsstämme ab. Das bedeutet, dass die Mehrzahl der Stämme von gesunden Trägern nicht bei Erkrankungen vorkommt und dass die häufigsten Erkrankungsstämme bei gesunden Trägern nur sehr selten gefunden werden (Caugant *et al.*, 1986). Die Stämme, die fast alle Erkrankungen auslösen, werden als hypervirulente Linien bezeichnet und wegen der niedrigen Trägerrate nur relativ selten übertragen. Die Verteilung dieser hypervirulenten Linien ist aber sowohl geographisch als auch zeitlich sehr heterogen (Aakre *et al.*, 1998).

1.2.2 Trägertum bei Kontaktpersonen von Erkrankten

Die Meningokokken-Trägerraten bei Kontaktpersonen von Erkrankten sind höher als die der Normalbevölkerung, wobei es durch die Form der Kontakte bedingte große Unterschiede gibt (Cartwright *et al.*, 1991a). Etwa die Hälfte der Meningokokkenstämme, die bei Kontaktpersonen von Erkrankten gefunden werden, entsprechen den jeweiligen Erkrankungsstämmen (Simmons *et al.*, 2001). Bei Kontaktpersonen von Erkrankten ist außerdem die Trägerrate an apathogenen Neisserien-Spezies wie *Neisseria lactamica* niedriger als die Trägerrate von Meningokokken (Simmons *et al.*, 2000b). Während in einer Region mit hoher Inzidenz für Meningokokken-Erkrankungen die Trägerrate für *Neisseria meningitidis* in der Allgemeinbevölkerung höher ist als in einer Region mit niedriger Inzidenz, verhält es sich für Trägerraten von *Neisseria lactamica* umgekehrt (Olsen *et al.*,

1991). Besonders hoch sind Meningokokken-Trägerraten bei Soldaten (Riordan *et al.*, 1998). Bei fast allen Soldaten, die in Kasernen untergebracht sind, kann man Antikörper gegen Meningokokken im Blut nachweisen (Caugant *et al.*, 1992). Die Gesamtträgerrate von Soldaten bleibt aber auch über einen längeren Zeitraum in etwa konstant. Während einige Soldaten, die zunächst Träger waren, ihre Bakterienbesiedlung verlieren, erwerben andere Soldaten vor allem am Beginn des Wehrdienstes die Bakterien neu (Andersen *et al.*, 1998).

1.3 Erkrankungen

Neisseria meningitidis verursacht vor allem bei Kindern und Jugendlichen bakterielle Hirnhautentzündung und Sepsis, die in ein Waterhouse-Friderichsen-Syndrom übergehen kann. Nach Einführung der Impfung gegen *Haemophilus influenzae* Typ b verursachen *Neisseria meningitidis* und *Streptococcus pneumoniae* unter den Bakterien zahlenmäßig die meisten dieser Erkrankungen, wobei in manchen Altersgruppen die Pneumokokken überwiegen (Jones, 1995; Cartwright, 1995). Das Krankheitsbild wurde im Jahre 1805 zum ersten Mal von Vieusseux in Genf beschrieben (Vieusseux, 1805). Im Jahre 1887 wurden dann Meningokokken zum ersten Mal isoliert und nachgewiesen (Weichselbaum, 1887). Trotz des hohen Trägertums von 10% erkranken nur 1-10 Personen/100000 Einwohner/Jahr. In der Regel bricht die Erkrankung innerhalb der ersten Tage nach Erwerb von Meningokokken aus, wobei auch Einzelfälle beschrieben sind, bei denen zwischen Erwerb von Meningokokken und Erkrankung mehrere Wochen liegen (Neal *et al.*, 1999). Ein bestimmter Stamm kann bei verschiedenen Individuen unterschiedliche Erkrankungen verursachen, was die Bedeutung des wirtseigenen Immunsystems für die Entstehung der Erkrankung betont (Riesbeck *et al.*, 2000). Klinisch äußert sich die Erkrankung durch hohes Fieber, starke Kopfschmerzen, Nackensteifigkeit, Durchfall und hämorrhagische Hautausschläge. Bei etwa einem Drittel verläuft die Septikämie fulminant, so dass es zu disseminierter intravaskulärer Koagulation, Endotoxämie, Schock und Nierenversagen kommt. Bei schweren Fällen kann es zu Blutungen im Gehirn und in den Nebennieren kommen. Die Letalitätsrate betrug 1993-1996 für Meningokokken-Erkrankungen in Europa im Durchschnitt 8,3%, wobei die Letalität für Meningitis 5,1 % und für Sepsis 12,2 % betrug und je nach Serogruppe etwas variierte, wobei die Letalitätsrate von Serogruppe-C-Erkrankungen etwas höher war (Connolly *et al.*, 1999). In Deutschland betrug die Gesamtletalität für Meningokokken-Erkrankungen im Jahr 2001 6,7% (N.N., 2002b). Ebenso betrug 1990-1994 in Kanada die Rate der durch Meningokokken bedingte Folgeschäden, wie Amputationen, Nierenversagen, Sprachverlust, Hörverlust, Gelenkschäden oder

neurologische Defizite etwa 10 %, wobei die Folgeschäden nach Erkrankungen durch Serogruppe C etwa fünf Mal häufiger auftraten als nach Erkrankungen durch Serogruppe B (Erickson *et al.*, 1998).

1.4 Virulenzfaktoren

Beim Auftreten einer Erkrankung durch *Neisseria meningitidis* spielen verschiedene Virulenzfaktoren eine Rolle (Deuren *et al.*, 2000). Einen wichtigen Virulenzfaktor stellen Lipopolysaccharide (LPS) dar, die neutrophile Granulozyten aktivieren können, was wiederum eine Zerstörung des Gefäßendothels zur Folge hat und somit die Invasion der Bakterien in die Blutbahn begünstigt (Klein *et al.*, 1996). Hohe LPS-Spiegel im Blut gehen mit einer erhöhten Letalität einher. Der Ausmaß der LPS-Freisetzung ist erheblich mit dem Schweregrad des Krankheitsbildes assoziiert (Brandtzaeg *et al.*, 2001). Ein weiterer bedeutender Virulenzfaktor von *Neisseria meningitidis* ist die aus Polysacchariden bestehende Kapsel, welche die Meningokokken während der Übertragung vor dem Austrocknen sowie bei der Besiedlung und Invasion vor dem Immunsystem schützt (Vogel and Frosch, 1999). Daneben stellen Pili, von denen es mehrere Klassen gibt, weitere wichtige Virulenzfaktoren dar, die sowohl für die Adhäsion an verschiedenen Epithelzellen des Rachens als auch für Adhäsion an Endothelzellen der Blutgefäße verantwortlich sind (Virji *et al.*, 1992). Außerdem finden sich auf der äußeren Zellmembran Adhäsine (Vries *et al.*, 1998).

1.5 Prävention und Therapie

1.5.1 Behandlung mit Antibiotika

Beim Auftreten einer Erkrankung durch Meningokokken ist eine schnelle Behandlung mit β -Laktam-Antibiotika notwendig. Oftmals wird bei eindeutigen klinischen Zeichen schon vor der Isolation der Bakterien mit einer Antibiotika-Therapie begonnen. Die sofortige Antibiotikagabe vor der Krankenhauseinweisung bringt bei schwer verlaufenden Formen der Meningokokken-Erkrankung, die sich durch Hautblutungen und Disseminierte Intravaskuläre Gerinnung (DIC) äußern, einen Vorteil gegenüber der erstmaligen Behandlung im Krankenhaus. Allerdings erfolgt die präklinische Antibiotikagabe meist bei Patienten, bei denen die Symptome besonders ausgeprägt sind und somit die Prognose schlechter ist (Sörensen *et al.*, 1998). Kontaktpersonen von Erkrankten werden mit Rifampicin, Ciprofloxacin oder Ceftriaxon prophylaktisch behandelt, wobei Ceftriaxon nur bei Schwangeren indiziert ist (Schwartz, 1991). Diese Antibiotika zeigen bei 97-98% der Stämme

eine Wirkung, wobei die orale Rifampicingabe trotz der häufigeren Nebenwirkungen meist der billigeren, aber schmerzhaften intramuskulären Ceftriaxongabe vorgezogen wird (Simmons *et al.*, 2000a). Bei Erwachsenen wird die perorale Gabe von Ciprofloxacin häufig dem Rifampicin aufgrund der einmaligen Dosierung vorgezogen.

1.5.2 Antibiotika-Resistenzen

Ungefähr 3% aller Meningokokken-Erkrankungsstämme sind gegen Penicillin resistent, wobei es sich nur selten um die Produktion von β -Lactamase, sondern meistens um Mutationen in Penicillin-Bindeproteinen handelt (Rosenstein *et al.*, 2000). In einigen Gegenden weisen auftretende Stämme eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Penicillin auf, die auf Modifikationen im penA-Protein basieren, wobei die klinische Bedeutung dieser Modifikation unklar ist, da ein Großteil der Patienten, die durch solche intermediär resistenten Stämme erkrankt sind, erfolgreich mit Penicillin behandelt werden können (Grzybowska *et al.*, 2001; Quagliarello and Scheld, 1997). Die Resistenzlage ist in Europa und in den USA ähnlich (Rosenstein *et al.*, 2000; Andrews *et al.*, 2000). Es sind Resistenzen gegenüber Sulfonamiden bekannt, die auch hypervirulenten Klone einschließen (Caugant *et al.*, 1988). Die Resistenz gegen Sulfonamide wird als epidemiologischen Marker verwendet, obwohl Sulfonamide bei der Behandlung von Erkrankungen durch Meningokokken keine Rolle mehr spielen. So kam es in den Neunziger Jahren in Norwegen zu Ausbrüchen durch Sulfonamid-resistenten Serogruppe-C-Meningokokken. Nach diesen Ausbrüchen waren etwa 1/3 aller Meningokokkenstämme bei asymptomatischen Trägern der Gegend resistent gegen Sulfonamide (Smith *et al.*, 1999). Inzwischen gibt es Rifampicin-resistente Stämme, in denen bestimmte Mutationen nachgewiesen sind (Stefanelli *et al.*, 2001). In Spanien waren bei einer Untersuchung von 901 Meningokokkenstämmen auf Antibiotikaempfindlichkeit fast alle Stämme gegen Sulfonamide resistent, während es gegen Penicillin, Ampicillin, Ceftriaxon, Cefotaxim, Rifampicin und Ciprofloxacin keine Resistenzen gab. Allerdings zeigten etwa 65% der Serogruppe-C-Stämme eine verminderte Empfindlichkeit gegen Penicillin und etwa 90% eine verminderte Empfindlichkeit gegen Ampicillin. Bei den anderen Stämmen zeigten etwa 35% eine verminderte Empfindlichkeit gegen Penicillin und etwa 60% eine verminderte Empfindlichkeit gegen Ampicillin. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen Träger- und Erkrankungsisolaten. Gegen die anderen getesteten Antibiotika waren alle Stämme empfindlich (Arreaza *et al.*, 2000). Insbesondere gibt es bei *Neisseria meningitidis* zur Zeit keine Resistenzen gegen Ciprofloxacin, die für *Neisseria gonorrhoeae* beschrieben wurden (Xia *et al.*, 1996). Als weiteres Antibiotikum wird vor allem während Epidemien in der

Dritten Welt Chloramphenicol eingesetzt, wobei inzwischen Resistenzen gegen dieses Antibiotikum durch den Erwerb einer Plasmid-kodierten Chloramphenicol-Acetyltransferase beobachtet wurden (Galimand *et al.*, 1998). Chloramphenicol wird aus wirtschaftlichen Gründen inzwischen nicht mehr hergestellt, so dass dieses kostengünstige, effektive Antibiotikum nicht mehr zur Verfügung steht.

1.5.3 Vakzinierung

Zur Zeit sind Polysaccharid-Impfstoffe gegen Meningokokken der Serogruppen A, C, Y und W-135 erhältlich. Im Jahr 1999 wurde in Großbritannien als erstem Land ein Konjugatimpfstoff gegen Meningokokken der Serogruppe C als Routineimpfung aller Personen bis 18 Jahre eingeführt, da die klassischen Polysaccharid-Impfseren nur einen zeitlich begrenzten und bei Kleinkindern nur einen ungenügenden Impfschutz boten. Dieser Konjugatimpfstoff bewirkte eine deutliche Reduktion der Erkrankungen durch Serogruppe-C-Meningokokken bei vakzinierten Kindern und Jugendlichen gegenüber nicht-vakzinierten Kindern und Jugendlichen (Ramsay *et al.*, 2001). Ein Jahr nach den Impfungen lag die Trägerrate von Serogruppe-C-Meningokokken bei Jugendlichen etwa 66% niedriger als vor der Impfung, während die Trägerraten der anderen Serogruppen unverändert blieben (Maiden *et al.*, 2002). In den beiden folgenden Jahren war auch eine Abnahme der altersspezifischen Inzidenz für Serogruppe-C-Meningokokken-Erkrankungen bei den Nichtgeimpften von 48-80% zu verzeichnen, was für die Entwicklung einer Herdimmunität spricht (Ramsay *et al.*, 2003). Gegen Meningokokken der Serogruppe B steht derzeit noch kein Impfstoff zur Verfügung, da es bei der Antikörperbildung zu einer Kreuzreaktion zwischen dem Kapselpolysaccharid-Antigen von B-Meningokokken und bestimmten glykosilierten menschlichen Antigenen kommt. Die einzelnen Porine der Meningokokken induzieren hingegen eine starke, allerdings klonspezifische Antikörperbildung (Jódar *et al.*, 2002). Die Lipo-Oligosaccharide, die einen bedeutenden Virulenzfaktor der Meningokokken darstellen, sind im Tierexperiment in der Lage, eine adäquate Immunantwort zu induzieren (Verheul *et al.*, 1993). Daneben besteht die Möglichkeit zur Induktion von Antikörpern durch Oberflächenproteine (Porine), die in Vesikel der äußeren Zellmembran (OMV = *outer membrane vesicle*) verpackt werden. Die Reaktionen sind besonders gut gegen das PorA- und das Opc-Protein (Rosenqvist *et al.*, 1995). Ein Schutz besteht aber nur gegen den Stamm des Impferums, was aufgrund der großen genetischen Variabilität von Meningokokken zu keinem breiten Schutz gegen B-Meningokokken führt (Jódar *et al.*, 2002). Die Vakzinierungen wurde bereits in Norwegen, Kuba und Chile erfolgreich durchgeführt, derzeit

wird eine OMV-Vakzine für Neuseeland produziert. Des Weiteren gibt es gemeinsame Oberflächenproteine von Meningokokken und apathogenen Neisserien-Stämmen, die immunogen wirken (Cann *et al.*, 1989). Das Genom von Meningokokken der Serogruppe B ist sequenziert. Unter 350 potentiellen Oberflächenantigenen, gegen die Mäuse immunisiert wurden, induzieren 28 eine Immunantwort (Pizza *et al.*, 2000). Mit der Sequenzierung des bakteriellen Genoms können konservierte Oberflächenproteine identifiziert werden, die immunogen wirken und somit als potentielle Vakzinkandidaten in Betracht kommen. Ein bestimmtes Protein (GNA33) induziert einen sehr hohen Antikörperspiegel, was allerdings als Kreuzreaktion gegen Loop IV des porA-Proteins des Serosubtyps P1.5,2 aufzufassen ist (Granoff *et al.*, 2001).

1.6 Epidemiologie

1.6.1 Deutschland

In Deutschland beträgt die Inzidenz für Meningokokken-Erkrankungen $<1,0/100000/\text{Jahr}$. Im Jahr 2002 wurden 730 Erkrankungen durch Meningokokken an das Robert-Koch-Institut gemeldet. Etwa 60% der Erkrankungen betreffen Kinder und Jugendliche. 60-70% der Fälle sind durch Meningokokken der Serogruppe B verursacht, während Serogruppe-C-Meningokokken für etwa 30% der Erkrankungen verantwortlich sind. Die Gesamtletalität der durch Meningokokken verursachten Erkrankungen liegen in Deutschland bei etwa 6,7% (N.N., 2002b; www.meningococcus.de). Die aktuellen Inzidenzen für Meningokokken-Erkrankungen variieren für einzelne deutsche Bundesländer von $0,5/100000/\text{Jahr}$ (Rheinland-Pfalz) bis $2,4/100000/\text{Jahr}$ (Hamburg) und sind insgesamt leicht ansteigend, wobei insgesamt für das erste Quartal jedes Jahres eine besonders hohe Rate an Neuerkrankungen zu verzeichnen ist (N.N., 2002b). Im Jahr 2002 war in Deutschland eine steigende Tendenz für Erkrankungen durch Meningokokken der Serogruppe C zu verzeichnen, da diese Serogruppe über 30% der invasiven Meningokokken-Erkrankungen verursachte, wobei der Anstieg in Süddeutschland und Nordrhein-Westfalen besonders hoch war (Angabe des Nationalen Referenzzentrums für Meningokokken in Würzburg). Dieser Trend hat sich im Jahr 2003 bestätigt.

1.6.2 Globale Epidemiologie

Die Inzidenz an Meningokokken-Erkrankungen nahm in den Neunziger Jahren in Europa um 44% zu. Sie stieg von 0,9 Erkrankungen/100.000 Einwohner/Jahr auf 1,3 Erkrankungen/100.000 Einwohner/Jahr an. Innerhalb von 32 europäischen Ländern variieren die Inzidenzen von 0,1 bis 8,0 Erkrankungen/100.000 Einwohner/Jahr. In der nördlichen Hälfte von Europa ist die Inzidenz höher als in der südlichen Hälfte. Eine signifikante Zunahme der Inzidenz ist in Finnland, Großbritannien, Malta, Österreich und in der Slowakischen Republik zu verzeichnen (Connolly *et al.*, 1999). In der USA ist die epidemiologische Situation mit der in Europa vergleichbar (Jones, 1995; Cartwright, 1995). Seit 1990 ist in den Vereinigten Staaten ein Zuwachs an Erkrankungen durch Meningokokken der Serogruppe C zu verzeichnen (Jackson *et al.*, 1995). Bei Untersuchungen von einzelnen Ausbrüchen in verschiedenen geographisch begrenzten Gebieten zeigt sich, dass oft ein einzelner Stamm für die meisten lokalen Ausbrüche verantwortlich ist (Popovic *et al.*, 2001). In Europa werden 68% der Erkrankungen durch Meningokokken der Serogruppe B und 28% durch Serogruppe C verursacht, wobei es hier in einigen Ländern, wie z. B. in der Tschechischen Republik zu starken Abweichungen kommt. Erkrankungen durch die Serogruppe A spielen in Europa nur in Russland eine Rolle, die Serogruppe Y ist bisher nur in Schweden und in den USA in nennenswertem Umfang mit Erkrankungen assoziiert. Die häufigsten Serotypen sind B:15:P1.7,16, B:4:P1.4, C:2a:P1.5, C:2a:P1.2 und C:2b:P1.5,2. In den letzten Jahren ist in Europa eine Zunahme von 35% an Erkrankungen durch Serogruppe-C-Meningokokken zu verzeichnen, wobei sich der Serotyp C:2a ungefähr verdoppelt hat (Connolly *et al.*, 1999). In Spanien, wo es früher fast ausschließlich Erkrankungen durch B-Meningokokken gab, ist inzwischen der Serotyp C:2b:P1.5,2 für rund 2/3 aller Erkrankungen verantwortlich, was für einen epidemiologischen Wechsel der Serogruppen zugunsten von Serogruppe-C spricht (Berrón *et al.*, 1998). Dieser Vorgang wird in Abhängigkeit vom zugrundeliegenden Mechanismus als *clonal replacement* oder Serogruppen-Switch bezeichnet. Beim Serogruppen-Switch kommt es durch horizontalen Austausch der Kapselsynthesegene zu einem Wechsel der Serogruppe bei einem Erkrankungsstamm (Vogel *et al.*, 2000; Swartley *et al.*, 1997). Diese Szenario ist jedoch nur in den seltensten Fällen eines Serogruppenwechsels innerhalb einer klonalen Linie direkt nachweisbar. Im Jahr 2000 ereignete sich ein weltweiter Ausbruch von Meningokokken der Serogruppe W-135 unter Hadsch-Pilgern und deren Angehörigen, wobei es sich bei dem Ausbruch nicht um einen neuen Stamm, sondern um einen einzelnen Klon des hypervirulenten ST-11-Komplexes handelte, der sonst zumeist in Form der Serogruppe C auftritt (Mayer *et al.*, 2002). Trotz dieser Beispiele bleiben die

Serogruppen bestimmter klonaler Linien im Verlauf der Zeit erstaunlich stabil. Ein Wechsel der Serogruppe scheint also die Fitness der jeweiligen klonalen Linie zu reduzieren.

1.6.3 Risikofaktoren

Die Inzidenz der Erkrankungen durch Meningokokken nimmt in den Industrienationen in den ersten drei Monaten eines Jahres zu. Als Ursache hierfür gelten, der im Winter häufigere Aufenthalt in geschlossenen Räumen und der dadurch bedingte dichtere Kontakt zu Mitmenschen, was die Weiterverbreitung der Meningokokken begünstigt. In den Ländern des Meningitisgürtels in Afrika steigt die Inzidenz am Ende der Trockenzeit an und fällt während der Regenzeit wieder ab (Jones, 1995; Cartwright, 1995). Im Gegensatz zu den Erkrankungszahlen unterscheiden sich die Trägerraten für Meningokokken aber nicht jahreszeitlich (Riordan *et al.*, 1998). Kontaktpersonen eines an Meningokokken-Meningitis oder Meningokokken-Sepsis Erkrankten haben ein ein über 1000-fach erhöhtes Risiko, selbst an einer Meningokokken-Erkrankung zu erkranken. Diese Kontaktpersonen müssen aber nicht erkranken, sondern können auch den Erkrankungsstamm nur erwerben und ihn auf andere Personen übertragen. Dieses Risiko einer Übertragung zwischen Kontaktperson beträgt etwa 5 % (Kristiansen *et al.*, 1998). Als ein wichtiger Risikofaktor für den Erwerb von Meningokokken gilt das Ableisten des Militärdienstes, bzw. die Unterbringung in Kasernen. Das Risiko für den Erwerb von Meningokokken korreliert unmittelbar mit der Dauer des Dienstes sowie mit der Anzahl der Kontakte zu anderen Soldaten (Block *et al.*, 1999). Weiterhin gibt es altersspezifische Risikofaktoren für den Erwerb von Meningokokken, wobei es zu einem ersten Peak in der Erkrankungshäufigkeit bei den ca. 6 Monate alten Kindern und zu einem zweiten kleineren Peak bei den 16- bis 19-jährigen kommt (Jones, 1995; Cartwright, 1995). Während der zweite Peak vor allem durch soziale Bedingungen verursacht wird, ist der erste Peak durch den Verlust der maternalen Antikörper zu erklären, durch die der Säugling in den ersten Lebensmonaten noch geschützt war, während eigene Antikörper gegen Meningokokken noch nicht gebildet worden sind. Das männliche Geschlecht und die Zugehörigkeit zu einer unteren sozialen Schicht stellen weitere Risikofaktoren für eine Erkrankung durch Meningokokken dar (Davies *et al.*, 1996). In Europa ist die Hälfte der erkrankten Personen jünger als fünf Jahre alt, wobei in den letzten Jahren eine Verschiebung der Erkrankungshäufigkeit zu den 16- bis 19-jährigen stattfand (Connolly *et al.*, 1999). In den USA erkranken außerdem mehr Angehörige der afroamerikanischen als der kaukasischen Bevölkerung (Jones, 1995; Cartwright, 1995). Es werden auch immer wieder Ausbrüche im Zusammenhang mit intensiven Sozialkontakten beschrieben, wie zum Beispiel in Schulen

oder Universitäten (Gilmore *et al.*, 1999). Die Trägerrate von Bediensteten von Bars oder Kneipen ist ein Vielfaches höher, als die der Allgemeinbevölkerung. Wegen des hierdurch bedingten erhöhten Übertragungsrisikos, zählen auch häufige Bar- oder Kneipenbesuche zu den Risikofaktoren des Meningokokkenerwerbs (Imrey *et al.*, 1995). Einen weiteren Zusammenhang besteht zwischen einem Trägertum von Meningokokken und dem Rauchen, das sowohl aktiv als auch passiv erfolgen kann. Es spielt aber keine Rolle, wie viele Zigaretten geraucht werden, bzw. wie viele Passivraucher mit in dem Haushalt leben (Stuart *et al.*, 1989). Das Rauchen hat allerdings weniger einen Einfluss auf den Erwerb von Meningokokken, als auf die Dauer des Trägertums (Riordan *et al.*, 1998). Stäube in Form von Stein- oder Gipsstaub stellen ebenfalls Risikofaktoren für die Entstehung einer Meningokokken-Erkrankung dar, wobei es nicht entscheidend ist, ob diese Stäube durch Aufenthalt in einer Wohnung oder durch Belastung im Beruf oder Hobby eingeatmet werden. Chemikalien und hier speziell Lösungsmittel begünstigen den Erwerb von Meningokokken nicht und sind nicht mit gehäuftem Auftreten von Meningokokken-Erkrankungen assoziiert (Stanwell-Smith *et al.*, 1994). Ein weiterer Risikofaktor für den Erwerb von Meningokokken ist die gleichzeitige oder unmittelbar vorhergegangene Erkrankung mit dem Influenza-A-Virus. Bei Influenza-A-Epidemien kommt mit einer zweiwöchigen Verzögerung zu einem Anstieg der Meningokokken-Erkrankungen, was auf die Schädigung des lokalen Immunsystems durch Influenza-A-Viren zurückzuführen ist (Cartwright *et al.*, 1991b). Außerdem sind noch andere Infektionen des oberen Respirationstraktes, wie zum Beispiel Influenza B, *Mycoplasma pneumoniae* oder Adenoviren gehäuft mit Meningokokken-Erkrankungen assoziiert. Diese Risikofaktoren sind allerdings nicht für die Meningokokken-Meningitis spezifisch, sondern auch für Meningitis durch *Haemophilus influenzae* oder *Streptococcus pneumoniae* (Krasinski *et al.*, 1987). Außerdem erhöhen z.B. diverse angeborene Defekte im Komplementsystem das Risiko für den Erwerb von Meningokokken sowie für die Entwicklung einer durch sie bedingten Erkrankung (Merino *et al.*, 1983). Es gibt hier allerdings keine Unterschiede in den Erkrankungshäufigkeiten durch bestimmte Stämme (Fijen *et al.*, 1998).

1.7 Populationsstruktur

1.7.1 Genetische und antigenetische Variabilität

1.7.1.1 Kapsel

Neisseria meningitidis wird mittels serologischer Verfahren in Serogruppen, Serotypen und Serosubtypen eingeteilt. Hierbei werden verschiedene antigenetische Eigenschaften der Bakterienoberfläche ausgenutzt. Die Serogruppe eines Stammes wird durch seine Polysaccharidkapsel determiniert, wobei die Serogruppen A, B, C, H, I, K, L, W-135, X, Y, Z und 29E beschrieben wurden (Vedros, 1987). Die Gene für die Synthese der Polysaccharidkapsel befinden sich im Kapselsynthese-Genkluster (*cps*), welcher die Gene für die Polysialinsäuresynthese (Region A: *siaA*, *siaB*, *siaC*, *siaD*), Kapselmodifikation (Region B: *lipA*, *lipB*), Kapseltransport (Region C: *ctrA*, *ctrB*, *ctrC*, *ctrD*), und LPS-Biosynthese (Region D + unvollständige Duplikatur Region D') und ein bislang in der Funktion noch unbekanntes Gen (Region E: *tex*) enthält. Diese Regionen können in unterschiedlicher Reihenfolge angeordnet sein. Bei einigen Trägerisolaten sind die Regionen A, B und C durch eine nicht-codierende Region (*cnl*-Locus) ersetzt, die auch bei anderen Neisserien-Spezies vorkommt (Claus *et al.*, 2002). Bei den Serogruppen B, C, Y und W-135 ist die Kapsel aus Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure) Bestandteil des Polysaccharids. Die Kapselsynthesegene der Sialinsäure-haltigen Meningokokken unterscheiden sich nur im für die Polysialinsäuretransferase kodierenden *siaD*-Gen, während die Kapselsynthesegene *siaA*-*siaC* und die Kapseltransportgene *ctrA* – *ctrD* konserviert sind. Trägerisolate exprimieren aufgrund von Phasenvariation häufig kein Polysaccharid, wobei die Phasenvariation durch die reversible Inaktivierung des Sialinsäurebiosynthese-Gens *siaA* durch das Insertionselement *IS1301* oder durch *slipped strand mispairing* verursacht wird (Hammerschmidt *et al.*, 1996a; Hammerschmidt *et al.*, 1996b). Im Fall einer Phasenvariation kann eine Genotypisierung mittels PCR-Amplifikation von Kapselsynthesegenen erfolgen. Dies gilt auch für kulturnegative Materialien, die nach Beginn der Antibiose bei Erkrankten gewonnen wurden (Vogel *et al.*, 1998).

1.7.1.2 Proteine der äußeren Zellmembran (OMP)

Meningokokken exprimieren auf ihrer äußeren Zellmembran fünf dominante Klassen von Oberflächenproteinen, wobei die Klassendefinition aufgrund von SDS-PAGE erfolgt. Diese fünf *Outer-Membrane-Proteins* (OMPs) werden auch als Porine der Klassen I-V bezeichnet

und haben Molekulargewichte von 28 bis 46 Kilodalton. Mit ihrem hydrophoben Teil sind sie in der Zellmembran verankert, während der hydrophile Teil nach außen zeigt. Diese hydrophilen Regionen sind auch von Stamm zu Stamm variabel, da sie dem Immunsystem des Wirts ausgesetzt sind (Tsai *et al.*, 1981). Während die OMPs der Klassen I, IV und V von allen Meningokokkenstämmen exprimiert werden, kann ein bestimmter Meningokokkenstamm nur entweder ein Klasse-II- oder ein Klasse-III-Protein auf seiner Oberfläche exprimieren (Feavers *et al.*, 1992). Das Klasse 1 OMP ist identisch mit dem PorA-Protein und ist das Molekül für die Serosubtypisierung mit monoklonalen Antikörpern (Tsai *et al.*, 1981). Das Oberflächenprotein PorA hat acht extrazelluläre Schleifen mit drei variablen Regionen (VR1, VR2, VR3), wobei es in den ersten beiden den meisten Variationen gibt. Diese variablen Regionen befinden sich auf den Oberflächenschleifen I und IV und sind 8 bis 17 Aminosäuren groß (Ley *et al.*, 1991; Maiden *et al.*, 1991). Herdimmunität gegen PorA kann die Entwicklung von Escape-Varianten induzieren (Taha *et al.*, 2001). Einige Stämme lassen sich nicht mit monoklonalen Antikörpern typisieren und werden deshalb als NST (Nichtserotypisierbar) bezeichnet. Aus diesem Grund wird inzwischen zur Serosubtypisierung die DNA-Sequenz des PorA-Gens verwendet (www.neisseria.org). Die Klasse II und III OMPs entsprechen dem PorB-Molekül, welches vier variable Regionen hat und den Serotyp eines Stammes definiert (Feavers *et al.*, 1992). Bei bestimmten Serotypen liegt ein wesentlicher Unterschied zwischen PorB-Klasse-II und PorB-Klasse-III darin, dass PorB-Klasse-III wesentlich schlechter die Bildung von menschlichen Antikörpern gegen Meningokokken induziert als PorB-Klasse-II (Michaelsen *et al.*, 2001). Auch im PorB-Klasse-III-Molekül gibt es zellmembranständige und oberflächliche Anteile, wobei letztere ebenso wie PorA variable Regionen hat (Bash *et al.*, 1995). Das PorB-Klasse-III-Molekül hat fünf variable Regionen, von denen zwei die für die Serotypisierung notwendigen Epitope tragen (Zapata *et al.*, 1992). Beim Vergleich, der für die jeweiligen Porine codierenden Gene, zeigt sich eine gewisse Homologie, die sich auch auf die Gene für Oberflächenproteinen anderer Neisserien-Spezies erstreckt (Butcher *et al.*, 1991). Speziell das PorB-Klasse-II-Molekül besitzen eine große Homologie zu bestimmten Oberflächenproteinen von Gonokokken (Murakami *et al.*, 1992).

1.7.2 Phylogenetische Methoden

1.7.2.1 MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*)

Die heterogene Populationsstruktur von Meningokokken kann für epidemiologische Analysen ausgenutzt werden. In den 80er und 90er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde die Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE) hierfür angewendet. Hierbei wird das unterschiedliche Wanderungsverhalten von Isoenzymen im elektrischen Feld ausgenutzt, welches durch unterschiedliche Aminosäuresequenzen zustande kommt. Die Enzyme liegen intrazellulär, was zur Folge hat, dass diese Moleküle keinem Selektionsdruck durch das wirtseigene Immunsystem ausgesetzt sind. Für jeden Meningokokkenstamm gibt es für jedes der 17 verwendeten Enzyme ein bestimmtes Allel. Diese Muster von verschiedenen Allelen werden zu elektrophoretischen Typen (ET) zusammengefasst (Selander *et al.*, 1986). Außerdem kann anhand der Anzahl von übereinstimmenden elektrophoretischen Bandenmustern die Verwandtschaft zwischen Stämmen berechnet werden. Stämme, zwischen denen es nur wenige Unterschiede im Bandenmuster gibt, werden zu Klustern, Komplexen, Linien oder Subgruppen zusammengefasst (Caugant *et al.*, 1988). Gruppen verwandter ET werden wiederum in genetische Linien zusammengefasst, die sich in der Evolution aus einem bestimmten Meningokokkenstamm entwickelt haben. Zwischen der durch MLEE ermittelten Populationsstruktur von *Neisseria meningitidis* und der Verteilung von serologischen Markern gibt es nur bedingt Zusammenhänge, so dass es innerhalb einer Serogruppe viele ETs gibt und innerhalb eines ETs mehrere Serogruppen vorkommen (Caugant *et al.*, 1987). Mit der MLEE konnte die Verbreitung von bestimmten klonalen Linien verfolgt werden (Caugant *et al.*, 1986). Die interkontinentale Verbreitung einiger ETs und das permanente Vorkommen einiger ETs über viele Jahre sind Indizien für eine epidemische Populationsstruktur von *Neisseria meningitidis* (Caugant *et al.*, 1987; Spratt et Maiden, 1999). Stämme von gesunden Trägern sind heterogener als Stämme von Erkrankten, außerdem sind manche ETs besonders häufig mit Erkrankungen assoziiert (Caugant *et al.*, 1986). So wurde eine bestimmte Gruppe von Meningokokken mit einem sehr ähnlichen Isoenzymmuster als ET-37-Meningokokken bezeichnet. Weitere Gruppen, die häufig mit Erkrankungen assoziiert sind und deshalb als hypervirulente Linien bezeichnet werden, stellen der Cluster A4, die Linie III, der ET-5-Komplex und der Serogruppe-A-Cluster dar (Caugant, 1998). Bei Ausbrüchen, die meist durch Klone der hypervirulenten Linien bedingt sind, werden die Stämme mit verschiedenen Feintypisierungsmethoden weiter differenziert, unter anderem um festzustellen, ob es sich bei allen Erkrankten um die gleichen Erkrankungsstämme handelt

und ob es sich um eine neue Variante oder um einen importierten, klonal expandierten Stamm handelt (Vogel *et al.*, 1998).

1.7.2.2 MLST (*Multilocus Sequence Typing*)

Um eine deutliche Vereinfachung der MLEE und eine Verbesserung der Vergleichbarkeit der Daten zwischen den Laboratorien zu erreichen, wurde die MLST (*Multilocus Sequence Typing*) etabliert. Hierzu werden von den Meningokokken DNA-Fragmente von 7 Stoffwechselgenen mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Für jeden Locus erhalten unterschiedliche Allele bestimmte Nummern. Kombinationen von Allelen werden zu einem Sequenztyp (ST) zusammengefasst, wobei durch den Nachweis bestimmter DNA-Sequenzunterschiede auch die Verwandtschaft einzelner Stämme untereinander gezeigt werden kann. Mit der MLST von Trägerisolaten konnte gezeigt werden, dass es von jedem Stoffwechselgen eine Vielzahl an Allelen gibt, wobei deren Anzahl von Gen zu Gen unterschiedlich groß ist. Dementsprechend groß ist auch die Anzahl an Sequenztypen (ST) innerhalb einer Trägerstudie. Ein Großteil dieser Sequenztypen tritt allerdings nicht in Zusammenhang mit Erkrankungen auf, während andere Sequenztypen bei Erkrankungen sehr häufig auftreten (Jolley *et al.*, 2000; Claus *et al.*, 2002). MLST und MLEE sind miteinander vergleichbar, da die Einteilungen von Meningokokkenstämmen in bestimmte Gruppen, Cluster oder Komplexe bei beiden Methoden im Wesentlichen übereinstimmen, wobei die MLST aufgrund des direkten Allelnachweises auf DNA-Ebene die feinere Auflösung bietet (Maiden *et al.*, 1998). Die gewonnenen DNA-Sequenzen und die hieraus resultierenden Allele und Sequenztypen (ST) können dann in Datenbanken übertragen werden, was ein Vergleich zwischen Stämmen verschiedener Herkünfte ebenso ermöglicht wie auch die Bestimmung der genetischen Distanz der Stämme untereinander. Aktuell sind im Oktober 2004 in der MLST-Datenbank 6048 verschiedene Stämme aus 71 Ländern und einem Zeitraum von 87 Jahren abgespeichert, die zu 4194 verschiedenen Sequenztypen gehören. Neben den eigentlichen MLST-Daten werden auch noch andere epidemiologische Faktoren, wie Art der Erkrankung, Antibiotika-Empfindlichkeit oder Serogruppen mitberücksichtigt (www.neisseria.org). Die MLST wird mittlerweile für eine Vielzahl von Bakterienarten und auch Hefepilze verwendet (www.pubmlst.org).

1.7.3 Hypervirulente Klone

Als hypervirulente Klone werden jene Gruppierungen von Meningokokken bezeichnet, die für die Mehrzahl der Erkrankungen verantwortlich sind. Bei gesunden Trägern werden diese

Stämme mit Ausnahme der dominierenden pathogenen Klone, jedoch nur selten im Abstrich gefunden (Caugant *et al.*, 1988; Jolley *et al.*, 2000). Innerhalb dieser hypervirulenten Klone lassen sich die Stämme mit verschiedenen Methoden weiter differenzieren (Kriz *et al.*, 1999b). Hierbei sind neuere molekularbiologische Methoden, wie Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), Multilocus-Enzym-Elektrophorese (MLEE), Ribotypisierung oder PCR-Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) den konventionellen Methoden mittels monoklonalen Antikörpern in der Feindiskriminierung der Isolate überlegen, da alle Stämme mit diesen Verfahren typisiert werden können, wobei die Pulsfeldgelelektrophorese die feinste Auflösung bietet (Swaminathan *et al.*, 1996). Mit der Pulsfeldgelelektrophorese kann auch gezeigt werden, ob es sich während einer Epidemie um das Auftreten eines einzelnen Stammes oder um das gleichzeitige Auftreten mehrerer verschiedener Stämme handelt (Popovic *et al.*, 2001). Der Nachteil der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) liegt allerdings in der langen Zeitdauer von etwa einer Woche, was in einer Ausbruchssituation zu lang ist, und in der mangelhaften Portabilität der Daten. Neben den genannten Methoden gibt es zur Feintypisierung von Meningokokken noch die Möglichkeit der Sequenzierung und des Sequenzvergleichs des *PorA*-Gens über Datenbanken, was eine sehr hohe Auflösung aber nur wenig populationsgenetische Auskünfte ergibt, da das PorA-Protein der Immunselektion ausgesetzt ist (Feavers *et al.*, 1996). Daneben bietet sich noch die Möglichkeit der MLST in Kombination mit Sequenzanalyse anderer hypervariabler Regionen, wie zum Beispiel der Gene, welche für das Transferrin-bindende-Protein-B (TbPb) oder den Enterobactin-Rezeptor *FetA* kodieren (Robki *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 2003).

1.8 Der ST-11-Komplex

1.8.1 Genotypische Besonderheiten

ET-15-Meningokokken stellen eine Gruppe bestimmter Meningokokken innerhalb des ST-11-Komplexes dar, welcher zu den hypervirulenten Linien gehört. Von anderen ST-11-Stämmen können ET-15-Meningokokken durch die Multilocus-Enzym-Elektrophorese (MLEE) unterschieden werden, da ET-15-Stämme sich durch das Vorhandensein eines besonderen Allels des Enzyms Fumerase C (*fumC 3*) auszeichnen, welches sonst nur sehr selten gefunden wird (Ashton *et al.*, 1991). ST-11-Meningokokken gehören größtenteils zur Serogruppe C und besitzen immer ein Porin der Klasse-II. Der Serotyp lautet bei ST-11-Meningokokken meistens 2a, wohingegen die Sequenzen der *porA*-Gene, die für die Serosubtypen-spezifischen Porine der Klasse I kodieren, meistens in der variablen Region 1 (VR1) zur P5-

und in der variablen Region 2 (VR2) zur P2- oder P10-Familie gehören. Meningokokken diesen Typs exprimieren aufgrund einer Deletion des *opc*-Gens keine *opc*-Proteine, obwohl diese in anderen Meningokokken vorkommen (Wang *et al.*, 1993). Es sind bis zu drei verschiedene Opa-Proteine vorhanden, die sich meist nur in einer ihrer beiden hypervariablen Regionen voneinander unterscheiden. Bei den Pili besitzen ST-11-Meningokokken das Klasse-IIb-Pilin. Diese antigenetischen Eigenschaften sind auch bei ST-11-Meningokokken von verschiedenen Ausbrüchen ähnlich (Wang *et al.*, 1993). Ein weiteres wichtiges Oberflächenprotein von Meningokokken stellt das Transferrin-bindende Protein (Tbp) dar, welches aus den Untereinheiten TbpA und TbpB besteht (Robki *et al.*, 1993). Beim *TbpB*-Gen wird zwischen dem Isotyp I (1,8 kb) und dem Isotyp II (2,1 kb) unterschieden, wobei ST-11-Meningokokken im Gegensatz zu Meningokokken anderer hypervirulenter Linien ausschließlich den Tbp-Isotyp I besitzen (Robki *et al.*, 2000). Interessanterweise weisen ET-15-Meningokokken den Tbp-Isotyp II auf (Caugant *et al.*, unveröffentlicht). Sie scheinen diesen Isotyp im Laufe ihrer Evolution akquiriert zu haben. Mit neueren molekularbiologischen Methoden, wie Multilocus-Enzym-Elektrophorese (MLEE), Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), Whole-cell enzyme immunoassay (WCE) und randomly amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) können ET-15-Meningokokken noch feiner unterschieden werden, wobei die Pulsfeldgelelektrophorese die feinste Auslösung bietet (Kriz *et al.*, 2000). ET-15-Stämme unterscheiden sich von anderen Stämmen des ST-11-Komplexes durch eine nicht-synonyme Punktmutation an Position 640 des *fumC*-Gens, wodurch es zum Austausch einer Aminosäure Glutamat durch Lysin im entsprechenden Protein kommt und sich somit das Wanderungsverhalten in der Multilokus Enzym Elektrophorese (MLEE) ändert (Vogel *et al.*, 2000b). ET-15-Meningokokken können von anderen Stämmen des ST-11-Komplexes durch die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) unterschieden werden. Beim Vergleich der Anordnung verschiedener Stoffwechsel- und Oberflächenproteingene auf dem bakteriellen Chromosom zeigt sich, dass sich sowohl bei verschiedenen Nicht-ET-15-Stämmen des ET-37-Komplexes als auch im Zusammenhang mit dem Auftreten der ET-15-Meningokokken im bakteriellen Chromosom große genetische Rearrangements ereignet haben (Jelfs *et al.*, 2000a). Bei den erst relativ kurzzeitig vorkommenden ET-15-Meningokokken gibt es inzwischen schon eine Vielzahl an *PorA*-Allelen. In Deutschland und in den Niederlanden weisen ET-15-Meningokokken häufig neben P1.5-2 den *porA*-Typ P1.5-1 oder P1.10-8 auf (Nationales Referenzzentrum für Meningokokken, Würzburg). Die Würzburger Arbeitsgruppe hat sich mit genomischen Unterschieden zwischen ET-15-Meningokokken und anderen Meningokokken des ST-11-Komplexes beschäftigt. Es konnte

zum Beispiel gezeigt werden, dass ET-15-Meningokokken das Insertionselement IS1301 tragen (Claus *et al.*, unveröffentlicht).

Tab. 1: Antigenetische Eigenschaften von ST-11-Komplex-Stämmen bei verschiedenen Ausbrüchen (Wang *et al.*, 1993; Jelfs *et al.*, 2000b; Mayer *et al.*, 2002).

Land	Jahr	Serogruppe	Serotyp	Serosubgruppe
USA	1964-1979	B; C; NG; W135; Y	2a	P1.5,2; P1.-; P1.5,y
Südafrika	1970-1996	B; W135	2a	P1.5,2; P1.2; NST
Norwegen	1981-1994	C	2a; NT	P1.5,2; P1.5; P1.2; NST
Burkina Faso	1984	C	2a	P1.5,2
Italien	1984	C	2a	P1.5,2
Chile	1985	B	2a	P1.10
Kanada	1988-1993	C	2a; NT	P1.5,2; P1.2; NST
Griechenland	1989	C	2a	P1.5,2
Mali	1989-1990	C	2a	P1.5,y; P1.-
Niederlande	1990	C	2a	P1.5,2
Österreich	1991	C	2a	P1.5,2
Island	1991-1993	C	2a	NST
Israel	1991-1994	B; C	2a; NT	P1.2; P1.5,2; P1.5
Finnland	1992-1995	C	2a	P1.2; P1.5; NST
Tschech. Rep.	1993	C	2a	P1.2; P1.5,2
Australien	1994-1997	B; C	2a	P1.5; P1.2; P1.5,2
England	1995	C	2a	P1.5,2; P1.5; NST
Saudi-Arabien	2000	W-135	2a ; NT	P1.5,2

1.8.2 Epidemiologie von ET-15-Meningokokken

1988 traten im kanadischen Victoria County, Ontario erstmals bei einem lokalen Ausbruch Meningokokken des elektrophoretischen Typs ET-15 auf. Dieser Klon verbreitete sich zunächst über die ganze Provinz Ontario und war dann 1990 für über 65 % der Erkrankungen durch Serogruppe-C-Meningokokken verantwortlich (Ashton *et al.*, 1991). Der Ausbruch an ET-15-Meningokokken in Kanada wurde durch wenige Einzelstämme, die sehr dicht miteinander verwandt waren, verursacht (Strathdee *et al.*, 1993). Erkrankungen durch ET-15-Meningokokken weisen mit 18% eine etwa doppelt so hohe Letalitätsrate wie andere Meningokokken-Erkrankungen auf. Außerdem erkrankten an ET-15-Meningokokken meist ältere Kinder (Whalen *et al.*, 1995). 1993 tauchten dann in Kanada zum ersten Mal ET-15-Meningokokken der Serogruppe B auf. Das Auftreten dieser neuen Variante stand geographisch und zeitlich in Verbindung mit Massenimpfungen gegen Meningokokken der Serogruppen A und C (Kertesz *et al.*, 1998). Da *Neisseria meningitidis* natürlich kompetent für Transformation ist, erfolgt der Serogruppenwechsel durch Austausch von

serogruppenspezifischen Polysialyltransferase-Genen, was bei Epidemien durch hohe Trägerraten vermutlich begünstigt wird (Swartley *et al.*, 1997). In den USA, wo es im Zeitraum von 1981 bis 1993 eine Zunahme der Ausbrüche von Serogruppe-C-Meningokokken gab, traten ET-15-Meningokokken zum ersten Mal 1992 im Bundesstaat New York auf und verursachten seitdem einige Ausbrüche (Jackson *et al.*, 1995). 1993 gab es in der Tschechischen Republik mehrere Ausbrüche durch ET-15-Meningokokken. Hier waren sie sowohl für einige Erkrankungen unter Soldaten in Kasernen im östlichen Landesteil als auch für Ausbrüche unter der Zivilbevölkerung in zwei Bezirken verantwortlich. Bei Untersuchungen aller Meningokokkenstämme, die seit 1973 in Verbindung mit Erkrankungen in der Tschechischen Republik gesammelt wurden, war dieser Klon bislang nicht identifiziert worden. Der ET-15-Klon machte 80% der Erkrankungsstämme durch Serogruppe-C-Meningokokken aus und führte zu einem Anstieg sowohl der Inzidenz (1,9/100000/Jahr) als auch der Letalität (20% statt 8,8%) (Krizova *et al.*, 1995). 1995 hatte sich der Klon über das ganze Land verbreitet und die Inzidenz erreichte in der Tschechischen Republik mit 2,2/100000/Jahr ihren Höhepunkt, was in einem der beiden betroffenen Bezirke eine Massenimpfung der Jugendlichen von 15 bis 19 Jahren und in dem anderen Bezirk eine Impfung der Kontaktpersonen nach sich zog (Kriz *et al.*, 1995). In jenem Jahr traten zum ersten Mal auch ET-15-Meningokokken der Serogruppe B auf (B:2a:P1.5,2). Insgesamt nahmen von 1993 bis 1997 in der Tschechischen Republik die Erkrankungen durch Serogruppe B ab, während bei Erkrankungen durch Serogruppe C ein Zuwachs zu verzeichnen war. Die Gesamt-Inzidenz sank seit 1994 ab und stabilisierte sich wieder auf dem Niveau von vor 1993. Außerdem verschob sich die altersspezifische Inzidenz nach einer Impfkampagne von den 15- bis 19-jährigen zu den 0- bis 4-jährigen (Krizova *et al.*, 1997). Im Vergleich zu den 80er Jahren nahm die Herdimmunität gegenüber Meningokokken der Serotypen B:2a:P1.5,2 und C:2a:P1.5,2 in der Bevölkerung zu. Besonders stark ist die Zunahme der Herdimmunität gegen die B-Variante, gegen die bei rund 20% der Bevölkerung Antikörper nachzuweisen sind. Außerdem sind Antikörper gegen B:2a:P1.5,2 häufiger bei Kindern vorhanden, während der Erwerb von Antikörpern gegen C:2a:P1.5,2 erst einige Jahre später stattfindet (Kriz *et al.*, 1999a). Im niederbayerischen Landkreis Rottal-Inn ereignete sich im Winter 1997/1998 unter Jugendlichen ein Ausbruch von Meningokokken des Phänotyps C:2a:P1.5,2, bei dem 8 Personen erkrankten (Hauri *et al.*, 2000). Bis auf zwei Stämme, die eine Abweichung von einem Fragment bei der PFGE hatten, waren alle Erkrankungsstämme identisch. Bei einer Fall-Kontroll-Studie wurde ein häufiges Besuchen von Diskotheken während der Ausbruchzeit als Risikofaktor identifiziert (Hauri *et al.*, 2000).

Seither wurden in Deutschland größere Ausbrüche in Karlsruhe und Schwerte beobachtet (N.N., 2002a). ET-15-Meningokokken zeichnen sich durch eine hohe Virulenz aus. Sie sind auch in Deutschland für Ausbrüche der Meningokokken-Erkrankung verantwortlich. Bislang gab es keine Untersuchung zur Verbreitung der hypervirulenten ET-15-Meningokokken unter der gesunden Bevölkerung in Deutschland. In der vorliegenden Arbeit soll die Verbreitung von Meningokokken und des ET-15-Klons unter 8000 gesunden Kindergartenkindern, Schülern und Bundeswehrsoldaten in Bayern untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

2.1.1 Großgeräte

Brutschrank Heraeus 6000 (Heraeus, Hanau)
Brutschrank Heraeus thermicon-T (Heraeus, Hanau)
Tischzentrifuge 15 (Heraeus, Hanau)
Photometer (Hitachi, San Jose, CA, USA)
Thermocycler Trio-Thermoblock (Biometra, Göttingen)
Thermocycler Primus 96 (MWG, Ebersberg)
Analysenwaage (Mettlerwaagen, Gießen)
Elektrophoresekammer H6-Set (Herolab, Wiesloch)
Power Supply Standard Power Pak (Biometra, Göttingen)
Power Supply 3000Xi (BioRad, München)
UV-Detektor (Herolab, Wiesloch)
Sequenziergerät rism™ Sequencer 377 (Perkin Elmer, Weiterstadt)
Variable Speed pump (BioRad, München)
Power Supply Modell 200/2.0 (BioRad, München)
Pulse Wave 760 (BioRad, München)
CHEF electrophoresis cell (BioRad, München)
Modell 1000 Mini Chiller (BioRad, München)
CHEF-DR II Drive module (BioRad, München)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Martin-Lewis-Agar (Becton-Dickinson, Heidelberg)

Martin-Lewis-Agar ist ein Selektivmedium zur Isolation von Neisserienspezies. Hämoglobin, BioX und Dextrose ersetzen Kochblut, um den Bakterien genügend Nährstoffe für das Wachstum zu geben. Antibiotika, wie Vancomycin, Colistin und Anisomycin verhindern das Wachstum von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien sowie von Hefen. Trimethoprimlactat verhindert das Wachstum von Proteus.

sterile Wattetupfer (Strätz, Estenfeld)

Mundspatel (Strätz, Estenfeld)

Küvetten 1 ml (Sarstedt, Nümbrecht)
Wasserbäder (verschiedene Hersteller)
50 ml Zentrifugengefäße Falcon (Becton-Dickinson, Heidelberg)
1,0 ml-, 1,5 ml- und 2,0 ml-Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht)
Eppendorfpipetten verschiedener Größen (Eppendorf, Hamburg)
Einfriergefäße 1,0 ml Nunc Cryo Tube™ vials (Nalge Nunc, Dänemark)
Combitips 12,5 ml, 5,0 ml (Eppendorf, Hamburg)
Falcon 15 ml Rundbodenröhrchen (Becton-Dickinson, Heidelberg)
PCR 0,2 ml Reaction Tube (Biometra, Göttingen)

2.2 Chemikalien

2.2.1 Allgemeine Chemikalien

Agarose (Carl Roth, Karlsruhe)
 σ -Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG) (Sigma, Deisenhofen)
0,9% Natriumchlorid (NaCl) (Merck, Darmstadt)
0,1% SDS (Merck, Darmstadt)
 γ -L-Glutaminsäure-4-Nitrilanilid (Substrat der γ -GT) (Serva, Heidelberg)
Dimethyl-p-Phenylendiamin (Oxidase-Reagenz) (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)
DNA Quick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)
Einfriermedium Standard 1 (Merck, Darmstadt)
apiNH (bioMérieux, Marcy l'Etoile Frankreich)
DNA-Größenstandard *1-kb-ladder* (Life Technologies, Karlsruhe)
DNA-Größenstandard *Smart-ladder* (Eurogentec, Seraing, Belgien)

2.2.2 Reagenzien für PCR und Sequenzierung

AmpliTaq® DNA-Polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgien)
Magnesiumchlorid (MgCl₂) 25mM (Roche, Mannheim)
10 x PCR-Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,3, 25 mM MgCl₂) (Roche, Mannheim)
dNTP-Mix, jeweils 2,5 mM (TaKaRa, Otsu Shiga, Japan)
Oligonukleotide (ARK Scientific, Darmstadt)

porB-PCR:

HC216 5'-AGCGGCAGCGTACAATACG-3'

HC217 5'-AAGTGCCTTTGGAGAAGTCG-3'

fumC-PCR:

fumC P1 5'-CACCGAACACGACACGATGG-3'

fumC P2 5'-ACGACCAGTTCGTCAAATC-3'

pdhC-PCR:

pdhc P1 5'-GGTTTCCAACGTATCGGCGAC-3'

pdhc P2 5'-ATCGGCTTTGATGCCGTATTT-3'

pgm-PCR:

pgm P1 5'-CTTCAAAGCCTACGACATCCG-3'

pgm P2 5'-CGGATTGCTTTTCGATGACGGC-3'

Zum Sequenzieren des *fumC*-Allels:

fumC P3 5'-CGTAAAAGCCCTGCGCGAC-3'

fumC S1 5'-TCGGCACGGGTTTGAACAGC-3'

fumC S2 5'-CAACGGCGGTTTCGCGCAAC-3'

Zum Sequenzieren des *pdhc*-Allels:

pdhc S1 5'-TCTACTACATCACCTGATG-3'

Zum Sequenzieren des *pgm*-Allels:

pgm S1 5'-CGGCGATGCCGACCGCTTGG-3'

pgm S2 5'-GGTGATGATTTTCGGTTGCGCC-3'

2.2.3 Chemikalien für die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Ethanol absolut (Merck, Darmstadt)

SeaKem GTG Agarose (FMC, Rockland, USA)*Tris ultrapure* (Serva, Heidelberg)

EDTA-Dinatrium (Serva, Heidelberg)

N-Lauroylsarcosin (Sigma, Deisenhofen)

Natriumhydroxid (NaOH) (Merck, Darmstadt)

Natriumchlorid (NaCl) (Merck, Darmstadt)

Magnesiumchlorid (MgCl₂) (Merck, Darmstadt)

Salzsäure (HCl) 32% (Merck, Darmstadt)

Brij 58 (Merck, Darmstadt)

Desoxycholat (Sigma, Deisenhofen)

Proteinase K (Merck, Darmstadt)

Borsäure (Merck, Darmstadt)

Ethidiumbromid (1% Lösung in Wasser) (Merck, Darmstadt)

SpeI (GibcoBRL Grand Island, NY, USA)

Mid Range PFGE-Längenmarker (Biolabs, Frankfurt/Main)

2.2.4 Herstellung der Stocklösungen

0,5 M EDTA-Lösung:

93,06 g EDTA + 7,5 g NaOH

mit Aqua dest. auf 500 ml aufgießen

5 M NaCl-Lösung:

146,1 g NaCl

mit Aqua dest. auf 500 ml aufgießen

1 M MgCl₂-Lösung:

101,65 g MgCl₂

mit Aqua dest. auf 500 ml aufgießen

1 M Tris/HCl pH 8,5:

121,1 g Tris in 700 ml Aqua dest. lösen

pH auf 8,5 mit Salzsäure (HCl) einstellen

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

10 x TBE-Puffer:

108 g Tris + 55 g Borsäure + 4 ml 0,5 M EDTA

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

2.2.5 Herstellung der Gebrauchslösungen

CHEF-TE-Puffer

100 ml 1 M Tris/HCl pH 8,5 + 200 ml 0,5 M EDTA-Lösung

auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen

DNS-Puffer

5 ml 1 M Tris/HCl + 250 µl 1 M MgCl₂
auf 50 ml mit Aqua dest. aufgießen

EC-Puffer pH 7,6

0,6 ml 1 M Tris/HCl + 20 ml 5 M NaCl + 2 ml 0,5 M EDTA + 0,5 g Brij 58
+ 0,2 g Desoxycholat
auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen

ES-Puffer

1 g N-Lauroylsarcosin in 200 ml 0,5 M EDTA lösen

Ethidiumbromid

200 µl 1% Ethidiumbromidlösung in 1 l Aqua dest. lösen

Proteinase K

40 mg Proteinase K in 2 ml Aqua dest. lösen
0,5 x TBE
110 ml 10 x TBE in 2090 ml Aqua dest. lösen
0,6 x TBE
2 ml 10 x TBE in 33,4 ml Aqua dest. lösen

TEN-Puffer

10 ml 1 M Tris/HCl + 20 ml 0,5 M EDTA + 3 ml 5 M NaCl
auf 100 ml mit Aqua dest. aufgießen

2.3 Bakterienstämme**2.3.1 Kontrollstämme für die biochemische Speziesidentifikation**

Neisseria lactamica #2117 (DSMZ 4691)

Neisseria meningitidis #2118 (Serogruppe B, ST-32-Komplex)

2.3.2 Kontrollstämme für die *porB*-PCR

- Neisseria meningitidis* #2120 (Eigenes klinisches Isolat aus Bayern 1997, Serogruppe C, ST-11-Komplex) (Vogel *et al.*, 1998)
- Neisseria meningitidis* #2135 (Klinisches Isolat aus Großbritannien 1985, MC 58, Serogruppe B, ST-32-Komplex)

2.3.3 Stämme für die Pulsfeldgelelektrophorese

- Neisseria meningitidis* #2120 (Eigenes klinisches Isolat aus Bayern 1997, Serogruppe C, ET-37-Komplex) (Vogel *et al.*, 1998)
- Neisseria meningitidis* #2211 (Klinisches Isolat, Rottal/Inn, 1998, ET-15, NRZ Heidelberg)
- Neisseria meningitidis* #2359 (Klinisches Isolat, Tschechische Republik, 1993, ET-15, P. Kriz)
- Neisseria meningitidis* #ID 90 (Klinisches Isolat, Auerbach, 29.11.1999, ET-15-Klon, ST-11, ST-11-Komplex, NRZ Heidelberg)
- Neisseria meningitidis* #ID 95 (Klinisches Isolat, Aschaffenburg, 20.01.2000, ET-15-Klon, ST-11, ST-11-Komplex, NRZ Heidelberg)
- Neisseria meningitidis* #ID 104 (Klinisches Isolat, Sonthofen, 24.02.2000, ET-15-Klon, ST-11, ST-11-Komplex, NRZ Heidelberg)
- Neisseria meningitidis* #ID 127 (Klinisches Isolat, München, 18.03.2000, ET-15-Klon, ST-761, ST-11-Komplex, NRZ Heidelberg)

2.4 Software, *Websites*

- MegAlign® (DNASTar, Madison, USA)
- GelCompare® version 4.0 (Applied Maths, Belgium)
- Access (Microsoft, Reno, USA)
- <http://neisseria.org/nm/typing/mlst/>

2.5 Aufbau der Studie

Vom 04.11.1999 bis zum 14.03.2000 wurden insgesamt 8000 Probanden auf Meningokokken-Trägertum untersucht (Claus *et al.*, 2002). Die Untersuchungen wurden mit Hilfe des bayerischen Staatsministeriums für Arbeit, Sozialordnung, Familie, Frauen und

Gesundheit und mit Unterstützung der Gesundheitsämter der jeweiligen Landkreise/Städte, sowie der Bundeswehr durchgeführt.

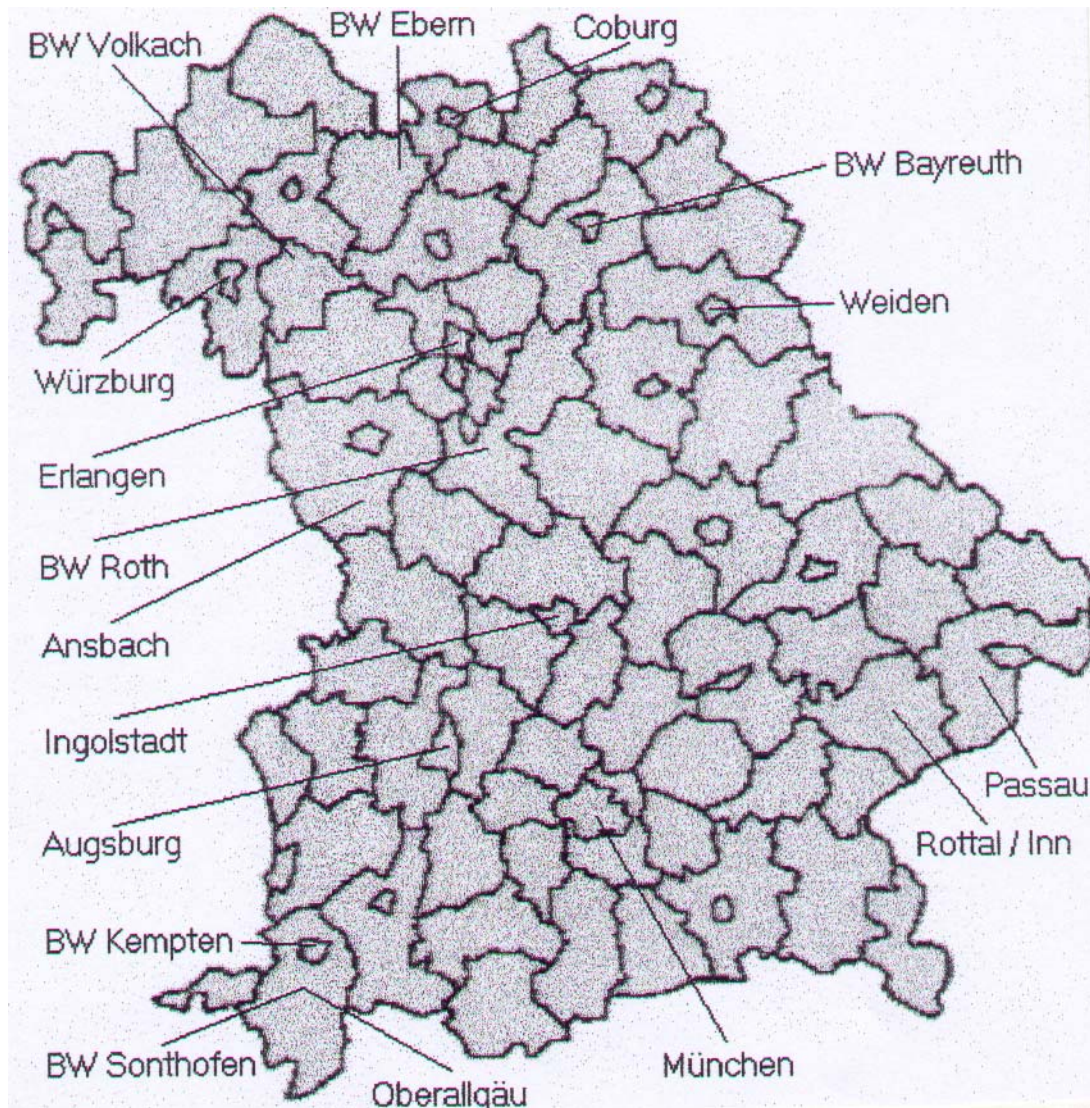
Die Probanden verteilten sich wie folgt auf Landkreise und Städte (siehe Abb. 1):

Ansbach:	254	Kaserne Bayreuth	302
Augsburg:	606	Kaserne Ebern	34
Coburg:	409	Kaserne Kempten	146
Erlangen:	1088	Kaserne Roth	366
Ingolstadt:	896	Kaserne Sonthofen	73
München:	1233	Kaserne Volkach	258
Oberallgäu:	251		
Passau:	781		
Rottal / Inn:	584		
Weiden:	278		
Würzburg:	441		

Außerdem erfolgte eine Unterscheidung nach verschiedenen Schultypen, die das unterschiedliche Alter der Probanden widerspiegeln:

Kindergärten:	3-6 Jahre	938
Grundschulen:	6-11 Jahre	2299
Hauptschulen / Realschulen:	10-17 Jahre	2511
gymnasiale Oberstufen:	16-20 Jahre	1073
Bundeswehrkasernen:	18-26 Jahre	1179

Abb. 1: Landkarte von Bayern mit Markierung der Orte, an denen Rachenabstriche entnommen wurden. Orte mit Zusatz „BW“ entsprechen einzelnen Bundeswehrkasernen, bei Orten ohne Angabe bezieht sich der Name auf den Stadt- bzw. Landkreis, aus denen die Kindern und Jugendlichen stammen.



Die Untersuchung erfolgte in anonymer Form, wobei allerdings ein Fragebogen beigefügt wurde, in dem nach Alter, Geschlecht, sowie nach Auslandsreisen, speziell in die Tschechische Republik und nach Österreich in den letzten beiden Monaten vor der Untersuchung gefragt wurde (siehe Anhang). Vor Beginn der Studie wurde die Genehmigung der Ethikkommission (Genehmigungsnummer 137/99) der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg eingeholt. Bei der Bundeswehr erfolgten alle Abstrichentnahmen bei Rekruten innerhalb einer Woche nach Rekrutierung. Nicht-bayerische Rekruten wurden berücksichtigt (siehe Abb. 3).

2.6 Abstrichentnahme

Mit einem sterilen Wattetupfer wurden bei insgesamt 8000 Probanden Abstriche von der Rachenhinterwand entnommen. Hierbei war darauf zu achten, dass möglichst kräftig ein großes Areal abgestrichen und besonders der obere Abschnitt des Pharynx, in dem die Meningokokkenbesiedlung am stärksten ausgeprägt ist, erreicht wurde. Nach der Abstrichentnahme wurden sofort Martin-Lewis-Platten beimpft, die unmittelbar danach zum Institut für Hygiene und Mikrobiologie nach Würzburg transportiert und über Nacht bei 37,5°C und 5% CO₂ bebrütet wurden. Die maximale Zeitspanne zwischen Abstrichentnahme und dem Beginn der Bebrütung betrug sechs Stunden. Martin-Lewis-Agar ist ein Selektivmedium für pathogene Neisserien, da das Wachstum von bakterieller Begleitflora und Pilzen verhindert wird (Martin et Lewis, 1977). Einige apathogene Neisserienarten, wie zum Beispiel *Neisseria lactamica*, sind ebenfalls in der Lage auf Martin-Lewis-Agar zu wachsen.

2.7 Biochemische Speziesidentifikation

Nach der Bebrütung von 12 bis 18 Stunden wurden die Martin-Lewis-Platten visuell inspiziert. Ein Verdacht auf Meningokokken bestand bei runder, erhabener, scharf begrenzter, stecknadelkopfgroßer Kolonie. Von Oxidase-positiven Kolonien wurde eine Subkultur angeimpft. Von der Subkultur wurden einige Kolonien mittels eines sterilen Wattetupfers abgenommen und jeweils in 1 ml σ -Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid-Lösung (ONPG) als Substrat für die Laktose-fermentierenden Enzyme bzw. 1 ml 1 mM γ -L-Glutaminsäure-4-Nitrilanilid-Lösung (346,3mg/l) als Substrat für die γ -Glutamyltransferase eingegeben und zwei bis drei Stunden (ONPG), bzw. vier bis fünf Stunden (γ -GT) im Brutschrank bei 37,5°C inkubiert. In beiden Fällen zeigt sich im positiven Fall ein Farbumschlag von Farblos nach Gelb. Meningokokken sind ONPG-negativ und γ -GT-positiv. Bei vielen apathogenen Neisserienstämmen wie zum Beispiel *Neisseria lactamica* verhält es sich dagegen genau umgedreht (Mitchell *et al.*, 1965). Die biochemische Testung von Oxidase-positiven Kolonien mit typischer Morphologie auf *Neisseria meningitidis* mittels ONPG- und γ -GT-Test wurde anhand von Ergebnissen validiert, die mit dem kommerziell erhältlichen Testsystem apiNH gewonnen wurden.

Bei der biochemischen Speziesidentifikation mittels apiNH wurden jeweils die Testnapfe mit einem Tropfen Bakteriensuspension, die vorher durch das Abtupfen von mehreren Kolonien von Martin-Lewis-Agar und dem anschließenden Einreiben in 0,9 % NaCl-Lösung hergestellt wurde, beladen und dann nach einer zweistündigen Inkubationszeit die Farbveränderungen abgelesen. Für die Reaktionen 10 – 12 musste jeweils noch ein Reagenz, welches dem apiNH

beigegeben war, zugeführt werden. Für jede positive Reaktion wurde die vorgesehene Punktzahl vergeben. Bei einer ausbleibenden Reaktion wurde der Wert 0 vergeben. Es wurden dann jeweils die Punktwerte von drei folgenden Reaktionen addiert, was bei den zwölf Reaktionen eine vierstellige Zahlenkombination ergab. Jede dieser Zahlenkombinationen war für eine Bakteriengattung spezifisch und konnte mit Hilfe des Beiblattes des apiNH-Herstellers (bioMérieux) entschlüsselt werden. Für *Neisseria meningitidis* war unter anderem die Zahlenkombination 5002 gefordert (GLU +; FRU -; MAL+; SAC-; ODC- ; URE- ; LIP- ; PAL- ; β GAL- ; PROA- ; GGT+ ; IND-) (siehe Tabelle 2).

Tab.2 Stoffwechselreaktionen bei apiNH

Nr.	Test	Reaktion	Substrat	negative Reaktion	Punkte	positive Reaktion
1	GLU	Glukose-Fermentation	Glukose	rot	1	gelb
2	FRU	Fruktose-Fermentation	Fruktose	rot	2	gelb
3	MAL	Maltose-Fermentation	Maltose	rot	4	gelb
4	SAC	Saccharose-Fermentation	Saccharose	rot	1	gelb
5	ODC	Ornithindecaboxylase	Ornithin	gelb-grün	2	blau
6	URE	Urease	Harnstoff	gelb	4	violett
7	LIP	Lipase	Lipid	farblos	1	blau
8	PAL	Alkalische Phosphatase	Nitrophenylphosphat	gelb	2	orange
9	β GAL	β -Galaktosidase	ONPG	farblos	4	gelb
10	PROA	Prolin-Arylamidase	Prolinnaphthylamid	gelb	1	orange
11	GGT	Glutamyl-Transferase	Glutamynaphthylamid	gelb	2	orange
12	IND	Indol	Tryptophan	farblos	4	rosa

2.8 Herstellung einer DNA-Suspension

Bei Bestätigung durch apiNH wurde ein Teil der auf der Martin-Lewis-Platte gewachsenen Bakterien mittels einem sterilen Wattetupfer abgenommen, in ein Glycerin-haltiges Einfriermedium (Standard 1 + Glycerin) überführt sowie bei -80°C konserviert. Der Rest der gewachsenen Bakterien wurde für die Erzeugung einer Hitze-denaturierten

Bakteriensuspension für PCR-Analysen verwendet. Hierzu wurden die Bakterien mittels einem sterilen Wattetupfer in ein Reaktionsgefäß mit 1 ml PBS-Lösung eingerieben und anschließend 10 Minuten im Heizbad bei 95°C aufgeköcht. Das DNA-Pellet wurde dann auf die optische Dichte von 0,1 eingestellt.

2.9 PCR

Zunächst wurden von allen 830 Meningokokkenstämmen das *porB*-Gen amplifiziert. Die *porB*-Genklassen wurden mittels PCR und Fragmentlängenvergleiche durch Agarosegelelektrophorese bestimmt. Für die PCR wurde zunächst ein Mastermix, der folgende Bestandteile enthielt, angesetzt:

H ₂ O	71,6µl
10x PCR-Puffer	10,0µl
25 mM Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	6,0µl
dNTP-Mix je 2,5 mM	10,0µl
Primer HC 216 (200µM/ml)	1,0µl
Primer HC 217 (200µM/ml)	1,0µl
Ampli-Taq®DNA-Polymerase	0,4µl

Von den 100 µl Mastermix werden dann 92 µl mit 8 µl DNA-Suspension in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Der Thermocycler wird wie folgt programmiert:

Denaturierung:	94°C
Annealing:	56°C 60 Sekunden
Polymerisation:	72°C 30 Sekunden
Anzahl der Zyklen:	36

Für die *fumC*-PCR wurden dann nur noch die Stämme verwendet, die in der *porB*-PCR ein *porB* der Klasse II hatten, da die gesuchten ET-15-Meningokokken zum ST-11-Komplex zählen, die immer ein *porB*-Klasse-II-Molekül besitzen. Die *fumC*-PCR wurde nach einem ähnlichen Muster, wie die *porB*-PCR durchgeführt, außer dass anstelle der Primer HC 216 und HC 217 die Primer *fumC* P1 und *fumC* P2 verwendet wurden und das Programm des Thermocyclers wie folgt lautete:

Denaturierung:	94°C
Annealing:	56°C 60 Sekunden
Polymerisation:	72°C 60 Sekunden
Anzahl der Zyklen:	36

Das entstehende Fragment war etwa 1,2 kb groß.

Für die *pgm*-PCR wurden dann nur noch die Stämme verwendet, die bei der Sequenzierung des *fumC*-Gens das Allel 3 ergaben. Für die *pgm*-PCR wurden die Primer *pgm*-P1 und *pgm*-P2 verwendet. Das Programm des Thermocyclers lautete wie folgt:

Denaturierung:	94°C
Annealing:	60°C 60 Sekunden
Polymerisation:	72°C 90 Sekunden
Anzahl der Zyklen:	36

Das hierbei entstehende Fragment war etwa 1,3 kb groß.

Für die *pdhC*-PCR wurden die Primer *pdhC*-P1 und *pdhC*-P2 verwendet und der Thermocycler wie folgt programmiert:

Denaturierung:	94°C
Annealing:	56°C 60 Sekunden
Polymerisation:	72°C 60 Sekunden
Anzahl der Zyklen:	36

Das hierbei entstandene Fragment war etwa 0,8 kb groß.

2.10 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der in der PCR gewonnenen DNA erfolgte in 1,5%igen Agarosegelen. Die Agarose wurde in 1xTBE unter Erhitzen in der Mikrowelle bei 750 Watt gelöst. Nach leichtem Abkühlen wurde die flüssige Agaroselösung in einen horizontalen Gelträger gegossen und zwei Stunden lang bei Raumtemperatur polymerisieren lassen. Dann wurde das Gel in die mit 1xTBE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Von der zu analysierenden DNA wurden 10 µl entnommen, mit 5 µl GEBS, das dem Sichtbarmachen der DNA-Lauffront im Gel dient, gemischt und auf das Gel aufgetragen. In der ersten, mittleren und letzten Gelvertiefung wurde jeweils ein DNA-Größenstandard mitgeführt. Diese Größenstandards waren der *Smart-Ladder* und der *1-Kb-Ladder*. Die Elektrophoresekammer wurde an den Power-Supply angeschlossen und bei 200 V die Gelelektrophorese durchgeführt. Nach ca. 30 Minuten wurde dann das Gel aus der Elektrophoresekammer entfernt, für 10 Minuten in ein Ethidiumbromidbad (2 mg/l) gelegt und unter einen UV-Detektor (302 nm) betrachtet, bzw. abfotografiert.

2.11 DNA-Aufreinigung

Vor der Sequenzierung der PCR-Produkte musste die DNA aufgereinigt werden. Hierzu wurde der QIAquick PCR Purification Kit® nach Herstellerangabe verwendet. Die Aufreinigung diente in erster Linie der Entfernung von überzähligem Primermaterial.

2.12 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte im Bereich Molekularbiologie des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie Würzburg mit dem automatischen Sequenziergerät *ABI Prism Sequencer 377*® von Perkin Elmer. Die doppelsträngige DNA wurde zunächst denaturiert und ein Sequenzierprimer an die entstandenen Einzelstränge angelagert. Dieser diente der Taq-DNA-Polymerase als Startpunkt für die DNA-Synthese, die auf dem gleichen Prinzip wie bei der PCR basierte. Bei der Sequenzierung werden allerdings zu einem bestimmten Prozentsatz auch solche Nukleotide verwendet, die zwar selbst für die Kettenverlängerung gebraucht werden können, an die aber keine Kettenverlängerung mehr möglich ist. Der Einbau dieser Dinukleotide führte zum Stop der DNA-Synthese und damit zu unterschiedlich langen DNA-Strängen, die jeweils mit einer definierten Base am Schluss endeten. Jedes der vier Dinukleotide war mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert, der nach einer elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente mittels eines Laserscanners detektiert wurde (Sanger *et al.*, 1977). Zur Sequenzierung wurden 0,1 µg des PCR-Produktes, was aufgrund der Fragmentgröße etwa 5 µl entsprach, und 1 µl eines Sequenzierprimers der Konzentration 5 pmol/l in ein 10µl-Sequenziergefäß gegeben. Dazu kamen noch 2 µl eines Sequenzier-Mix, um ein Volumen von 10 µl zu erreichen. Im Einzelnen handelte es sich bei der Sequenzierung um folgende Sequenzierprimer:

fumC-Sequenzierung: *fumC*-P3, *fumC*-S1, *fumC*-S2

pgm-Sequenzierung: *pgm*-S1, *pgm*-S2

pdhC-Sequenzierung: *pdhC*-S1

2.13 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) ist eine hoch auflösende Methode, die zur Stammtypisierung verwendet wird. Das bakterielle Chromosom wird mit einem relativ selten bindenden Restriktionsenzym verdaut und die entstehenden, großen DNA-Fragmente dann gelelektrophoretisch getrennt (Vogel *et al.*, 1998).

2.13.1 Herstellung der Agaroseblöckchen

Zunächst wurden pro Meningokokken-Isolat ein steriles Reaktionsgefäß auf der Analysenwaage ausgewogen, beschriftet und das Gewicht notiert. Danach wurde in jedes Gefäß 1,0 ml 0,9% NaCl gegeben und mit einem sterilen Wattetupfer jeweils ca. 15 mg feuchtes Bakteriensediment in die NaCl-Lösung eingerieben. Dann wurde 1 Minute in der Tischzentrifuge bei 15000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde erneut in 1,0 ml 0,9% NaCl resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun wurde das Bakterien-Pellet auf 5 mg ausgewogen und mit 10 µl NaCl und 400 µl TEN-Puffer resuspendiert. Es wurde eine 2% GTG-Agarose angesetzt, indem 0,6 g Agarose in 30 ml TEN-Puffer gelöst und aufgeköcht wurde. Danach wurde in jedes Reaktionsgefäß 600 µl der heißen Agarose-Lösung dazu pipettiert und ca. 200 µl des Gemisches luftblasenfrei in die *Plug Molds* gegossen. Es wurden dabei von jedem Meningokokken-Isolat mehrere Blöckchen gegossen, die dann innerhalb 15 Minuten bei 2-8°C polymerisierten.

2.13.2 Lyse und Proteinase K-Verdau

Es wurden pro Meningokokken-Isolat ein steriles Reaktionsgefäß beschriftet und mit 1 ml steril filtriertem EC-Puffer gefüllt, in den dann jeweils zwei Agaroseblöckchen gelegt wurden. Die Reaktionsgefäße wurden dann verschlossen und bei 55°C über Nacht auf einem Heizblock inkubiert. Es kam hierbei zur Lyse der Zellmembran. Am nächsten Morgen wurde dann der EC-Puffer abgesaugt und jeweils 1 ml CHEF-TE-Puffer in die Reaktionsgefäße pipettiert und gleich wieder abgesaugt. Es wurde dann erneut 1 ml CHEF-TE in jedes Reaktionsgefäß pipettiert und die Agaroseblöckchen darin 30 Minuten lang inkubiert. Danach wurden jeweils zwei Agaroseblöckchen in ein neues, steriles und beschriftetes Reaktionsgefäß überführt. Zu den Agaroseblöckchen wurde dann jeweils 1 ml steril filtrierter ES-Puffer und 100 µl Proteinase K-Lösung dazu pipettiert und über Nacht bei 50°C im Heizblock inkubiert.

2.13.3 DNA-Restriktion

Am nächsten Tag wurde der ES-Puffer abpipettiert und 1 ml CHEF-TE-Puffer zu jedem Agaroseblöckchen pipettiert. Der CHEF-TE-Puffer wurde dann gleich wieder abpipettiert und erneut hinzugegeben. Danach wurden die Agaroseblöckchen bei Raumtemperatur eine Stunde lang in CHEF-TE-Puffer inkubiert. Nach einer Stunde wurde der CHEF-TE-Puffer abpipettiert und verworfen. Dieser Waschvorgang wurde dann noch drei Mal wiederholt. Nach Ende des vierten Waschvorgangs wurden die Agaroseblöckchen in ein neues

beschriftetes Reaktionsgefäß überführt und 300 µl DNS-Puffer dazu pipettiert. Der DNS-Puffer wurde sofort wieder abpipettiert, verworfen und neuer DNS-Puffer hinzugegeben. Die Agaroseblöckchen wurden bei Raumtemperatur eine Stunde lang in DNS-Puffer inkubiert, wobei alle 15 Minuten der DNS-Puffer gewechselt wurde. Nach einer Stunde wurde der DNS-Puffer gründlich abgesaugt. Es wurde dann für 11 Reaktionen der Enzympuffer angesetzt, indem 6675 µl HPLC-Wasser, 75 µl bovines Serumalbumin und 750 µl Reaktionspuffer gemischt wurden. Vom fertigen Enzympuffer wurden zu jedem Agaroseblöckchen 300 µl hinzugegeben und 30 Minuten bei 2-8°C inkubiert. Dann wurde der Enzympuffer abpipettiert und verworfen, sowie neuer Enzympuffer zu den Agaroseblöckchen pipettiert. Jetzt wurde zu jedem Agaroseblöckchen 2 µl von dem Restriktionsenzym *SpeI* mit der Konzentration 10 Units/µl gegeben und gut gemischt. Die Agaroseblöckchen werden zusammen mit dem Enzympuffer und dem Restriktionsenzym zunächst 30 Minuten bei 2-8°C inkubiert und anschließend bei 37°C über Nacht (12-20 Stunden) auf den Heizblock gestellt. Am nächsten Morgen wurde dann zum Stoppen der Restriktion 250 µl 0,6 x TBE-Puffer dazu gegeben.

2.13.4 Herstellen und Beladen des Laufgels

Zunächst wurde der Gießrahmen mit 70% Ethanol abgerieben. Dann wurde 1,3 g GTG-Agarose in 130 ml 0,5 x TBE gelöst und aufgeköcht. Die Agaroseblöckchen wurden auf den Gießkamm gelegt und jeweils mit einem Tropfen heißer Agaroselösung fixiert. Der Kamm mit den Agaroseblöckchen wurde dann im Gießrahmen positioniert und die leicht abgekühlte Agarose dazugegossen. Das Gel polymerisierte bei Raumtemperatur für 45 Minuten. Danach wurden die überstehenden Agaroseblöckchen mit dem Skalpell abgetrennt und der Kamm vorsichtig herausgezogen. Es wurden außerdem noch zwei jeweils 2 mm dicke Scheiben mit Marker-DNA (*Mid Range*® PFGE-Längenmarker, Biolabs) in die dafür vorgesehenen Vertiefungen luftblasenfrei überführt. Am Ende wurden die verbliebenen Defekte im Gel mit der erneut erhitzten restlichen Agarose abgedichtet und diese polymerisieren lassen.

2.13.5 Vorbereitung der Pulsfeldgelelektrophorese

Die Elektrophoresekammer wurde mit 2400 ml 0,5 x TBE gefüllt und der *Mini Chiller* sowie das *Drive module* gestartet. Die Temperatur wurde auf 14°C eingestellt und die Flüssigkeit lief über 15 Minuten ein. Danach wurde das Gel in der Kammer positioniert und 30 Minuten gekühlt. Jetzt wurde der Power Supply mit folgenden Einstellungen gestartet: Molecular

weight low = 15 kb; Molecular weight high = 600 kb; Gradient = 4,9 V / cm; Run Time = 26 h; Initial A time = 6 sec; Final A time = 13 sec; Ramping factor = linear.

2.13.6 Bilddokumentation

Nach rund 27 Stunden Laufzeit wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer genommen und zunächst in ein Ethidiumbromidbad zum Färben der DNA-Fragmente gelegt. Nach 5 Minuten wurde das Gel aus dem Ethidiumbromid genommen und 15 Minuten lang gewässert. Zum Schluss erfolgte die Bilddokumentation mittels UV-Licht-Transluminator und die Beschriftung, bzw. Auswertung des Bildes.

2.14 Statistische Methoden

Zum Vergleich der Trägerraten zwischen verschiedenen Orten, bzw. Institutionen wurde der Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) verwendet, bei dem folgende mathematischer Formel verwendet wird:

$$\chi^2 = (b_1 - e_1)^2 / e_1 + (b_2 - e_2)^2 / e_2$$

b_1 = beobachtete Anzahl von Merkmalsträgern

e_1 = erwartete Anzahl von Merkmalsträgern

b_2 = beobachtete Anzahl von Nichtmerkmalsträgern

e_2 = erwartete Anzahl von Nichtmerkmalsträgern

Zwei Werte unterscheiden sich signifikant, wenn der errechnete χ^2 -Wert größer als der kritische Wert für die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ ist; die Werte unterscheiden sich sehr signifikant, wenn χ^2 größer als der kritische Wert für die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,01$ ist und eine hohe Signifikanz liegt vor, wenn χ^2 größer als der kritische Wert für die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,001$ ist. Da in der vorliegenden Arbeit immer mit einem Freiheitsgrad gerechnet wird, betragen die kritischen Werte:

$$p \leq 0,05 : \quad 3,84146$$

$$p \leq 0,01 : \quad 5,02389$$

$$p \leq 0,001 : \quad 10,8283$$

3. Ergebnisse

3.1 Epidemiologie des Meningokokken-Trägertums in Bayern

3.1.1 Trägerraten bei Bundeswehrsoldaten, Kindern und Jugendlichen

Von 8000 genommenen Abstrichen konnten nach kultureller Anzucht und biochemischer Speziesidentifikation bei 830 Probanden Meningokokken nachgewiesen werden, was einer durchschnittlichen Trägerrate von 10,4% entsprach. Von diesen 830 Meningokokken-Isolaten wurden 446 von den 6821 Kindern und Jugendlichen aus Kindergärten und Schulen gewonnen (Trägerrate: 6,5%). Die restlichen 384 Meningokokken-Isolate stammten von den 1179 untersuchten Bundeswehrrekruten (Trägerrate: 32,6%). Sowohl die Trägerrate der Bundeswehrsoldaten, als auch die Trägerrate der Kinder und Jugendlichen wick hoch signifikant ($p \leq 0,001$) von der Durchschnittsträgerrate ab (Bundeswehrsoldaten: $\chi^2 = 621,87$; Kinder und Jugendliche: $\chi^2 = 109,14$).

3.1.2 Trägertum in verschiedenen Altersgruppen

Die Trägerraten von Kindern und Jugendlichen waren unterschiedlich. Die durchschnittlichen Trägerraten aller vier Gruppen wichen von der Gesamtträgerrate von 6,5 % unter den Kindern und Jugendlichen signifikant ab (siehe Tabelle 3). Die Trägerrate von 17,9 % an den gymnasialen Oberstufen war hoch signifikant ($p \leq 0,001$) höher als die durchschnittliche Trägerrate unter allen Kindern und Jugendlichen ($\chi^2 = 226,39$). Die Trägerrate von 7,6 % an den Haupt- und Realschulen war signifikant ($p \leq 0,05$) höher als die durchschnittliche Trägerrate von 6,5 % unter allen Kindern und Jugendlichen ($\chi^2 = 4,34$). Die Trägerraten an den Grundschulen (2,0 %) und den Kindergärten (1,8 %) waren jeweils hoch signifikant ($p \leq 0,001$) niedriger als die durchschnittliche Trägerraten unter allen Kindern und Jugendlichen (χ^2 Grundschulen = 75,99; χ^2 Kindergärten = 34,29).

Tab. 3: Trägertum von *Neisseria meningitidis* in verschiedenen Schultypen

	Probanden (n)	Träger (n)	Trägerrate	χ^2 -Wert ¹
Gymnasium (Oberstufe)	1073	192	17,9%	226,39
Haupt- und Realschule	2511	190	7,5%	4,34
Grundschule	2299	47	2,0%	75,99
Kindergarten	938	17	1,8%	34,29

¹Der χ^2 -Wert bezieht sich auf den Vergleich mit der Gesamtträgerrate aller Schulen und Kindergärten (6,5%).

3.1.3 Unterschiede im Trägertum in verschiedenen Orten

Unterschied man die durchschnittliche Trägerrate von 6,5 % an allen Schulen und Kindergärten nach den verschiedenen Orten, so hatte Weiden/Oberpfalz mit 3,6 % Trägern die niedrigste und Würzburg mit 11,1 % Trägertum die höchste Trägerrate. Die Abweichungen von einzelnen Orten gegenüber der durchschnittlichen Trägerrate von 6,5% bei allen Schulen und Kindergärten ist nur bedingt aussagekräftig, da die Anzahl der Probanden der einzelnen Orte und die Art der bezeichneten Institutionen sehr unterschiedlich war (siehe Tab. 4).

Tab. 4: Trägerraten von *Neisseria meningitidis* an verschiedenen Orten.

Ort	Stadt/Landkreis	Probanden (n)	Träger (n)	Trägerrate (%)	χ^2 ¹
Ansbach	Landkreis	254	17	6,7	1,65
Augsburg	Stadt	606	23	3,8	0,28
Coburg	Stadt	409	38	9,3	3,47
Erlangen	Stadt	1088	57	5,2	3,85
Ingolstadt	Stadt	896	62	6,9	0,26
München	Stadt	1233	75	6,1	1,29
Oberallgäu	Landkreis	251	20	8,0	0,05
Passau	Landkreis	781	47	6,0	0,86
Rottal/Inn	Landkreis	584	48	8,2	2,84
Weiden	Stadt	278	10	3,6	3,85
Würzburg	Stadt und Landkreis	441	49	11,1	15,43

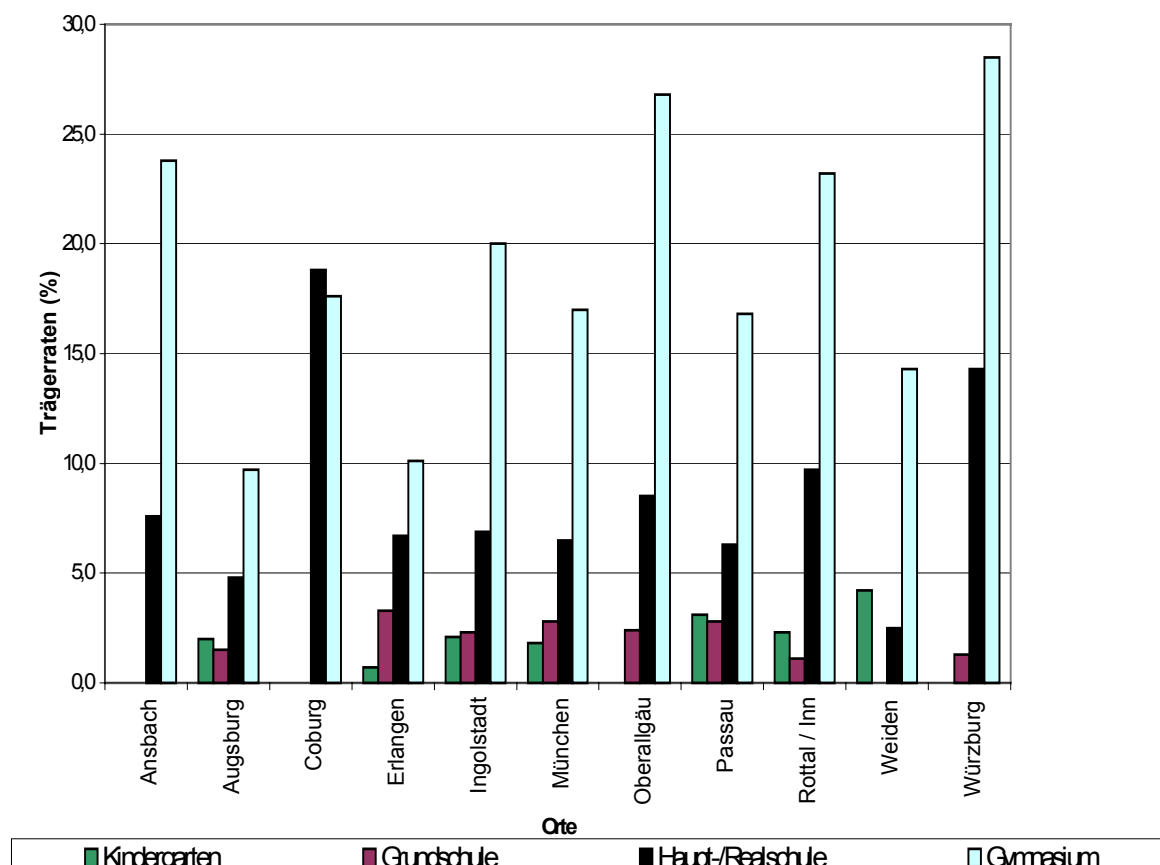
¹ Der χ^2 -Wert bezieht sich auf die durchschnittliche Trägerrate aller Kindergärten und Schulen von 6,5%.

3.1.4 Vergleich einzelner Institution

Die durchschnittliche Trägerrate an allen gymnasialen Oberstufen betrug 17,9%. Dabei variierten die Werte von 9,7 % in Augsburg bis zu 28,2 % in Würzburg (siehe Tab. 5). Aussagen über die Signifikanz von Unterschieden in den Trägerraten gegenüber der Gesamtträgerrate können nicht gemacht werden, da die Kollektive der entsprechenden Orte unterschiedlich groß waren und von 41 Gymnasiasten im Oberallgäu bis zu 189 Gymnasiasten in Erlangen reichten. Bei den Haupt- und Realschulen fand sich in Weiden/Oberpfalz mit 2,5 % die niedrigste Trägerrate, währenddessen Coburg mit 18,8 % die

höchste Trägerrate dieser Schulform vorwies (siehe Tab. 5). Coburg war der einzige Ort, in dem die Trägerrate der Haupt- und Realschulen höher als die Trägerrate der gymnasialen Oberstufe war (siehe Abb. 2). Die durchschnittliche Trägerrate an allen untersuchten Haupt- und Realschulen betrug 7,5%. Die Anzahl der Probanden variierte in dieser Altersgruppe von 80 in Weiden/Oberpfalz bis 492 in München (siehe Tab. 5). In den Grundschulen lag die Trägerrate in Ansbach, Coburg und Weiden/Oberpfalz bei 0,0 %, was bedeutete, dass bei keinem der untersuchten Schüler Meningokokken im Rachenabstrich nachgewiesen wurde. Bei diesem Schultyp hatte Erlangen mit 3,3 % die höchste Trägerrate und die durchschnittliche Trägerrate unter allen untersuchten Grundschulern lag bei 2,0%. Untersucht wurden an den einzelnen Orten zwischen 85 (Ansbach) und 419 (Erlangen) Grundschüler. Bei den Kindergartenkindern in Ansbach, Coburg und Würzburg wurden bei keinem Kind Meningokokken nachgewiesen. Die höchste Trägerrate gab es bei Kindergartenkindern in Passau mit 3,1 %. Im Durchschnitt waren 1,8% aller untersuchten Kindergartenkinder Träger von Meningokokken. Die Kollektivgröße unter den Kindergartenkindern variierte von 32 in Coburg bis 219 in München (siehe Tab.5).

Abb. 2: Graphische Darstellung der Trägerraten von *Neisseria meningitidis* getrennt nach Orten und Institutionen.



Tab. 5: Trägerraten von *Neisseria meningitidis*, gegliedert nach verschiedenen Orten und Institutionen.

Ort	Institution	Probanden (n)	Träger (n)	Trägerrate (%)
Ansbach	Kindergarten	39	0	0,0
	Grundschule	81	0	0,0
	Haupt-/ Realschule	92	7	7,6
	Gymnasium	42	10	23,8
Augsburg	Kindergarten	100	2	2,0
	Grundschule	203	3	1,5
	Haupt-/ Realschule	231	11	4,8
	Gymnasium	72	7	9,7
Coburg	Kindergarten	32	0	0,0
	Grundschule	170	0	0,0
	Haupt-/ Realschule	133	25	18,8
	Gymnasium	74	13	17,6
Erlangen	Kindergarten	137	1	0,7
	Grundschule	419	14	3,3
	Haupt-/ Realschule	343	23	6,7
	Gymnasium	189	19	10,1
Ingolstadt	Kindergarten	97	2	2,1
	Grundschule	304	7	2,3
	Haupt-/ Realschule	350	24	6,9
	Gymnasium	145	29	20,0
München	Kindergarten	219	4	1,8
	Grundschule	351	10	2,8
	Haupt-/Realschule	492	32	6,5
	Gymnasium	171	29	17,0
Oberallgäu	Kindergarten	43	0	0,0
	Grundschule	85	2	2,4
	Haupt-/ Realschule	82	7	8,5
	Gymnasium	41	11	26,8
Passau	Kindergarten	129	4	3,1
	Grundschule	248	7	2,8
	Haupt-/ Realschule	303	19	6,3
	Gymnasium	101	17	16,8
Rottal/Inn	Kindergarten	87	2	2,3
	Grundschule	176	2	1,1
	Haupt-/ Realschule	226	22	9,7
	Gymnasium	95	22	23,2
Weiden	Kindergarten	48	2	4,2
	Grundschule	108	0	0,0
	Haupt-/ Realschule	80	2	2,5
	Gymnasium	42	6	14,3
Würzburg	Kindergarten	63	0	0,0
	Grundschule	149	2	1,3
	Haupt-/ Realschule	126	18	14,3
	Gymnasium	103	29	28,2
	Gesamt	6821	446	6,5

3.1.5 Trägertum von Meningokokken bei Bundeswehrsoldaten

Die durchschnittliche Trägerrate aller Bundeswehrsoldaten betrug 32,6%. Nach verschiedenen Orten sortiert, variierten die Trägerraten von 28,8 % (Sonthofen) bis 37,2 % (Volkach). Die Trägerraten von Soldaten der Bundeswehr variierten bei den einzelnen Abstrichentnahmen zwischen 18,5 % und 40,3 % (siehe Tab. 7). Die Anzahl der Probanden variierte zwischen 34 (Ebern) und 366 (Roth) (siehe Tab. 6).

Tab. 6: Gesamt-Trägerraten in den einzelnen Kasernen

Ort	Probanden (n)	Träger (n)	Trägerrate (%)
Bayreuth	302	96	31,8
Ebern	34	10	29,4
Kempten	146	51	34,9
Roth	366	110	30,1
Sonthofen	73	21	28,8
Volkach	258	96	37,2
Gesamt	1179	384	32,6

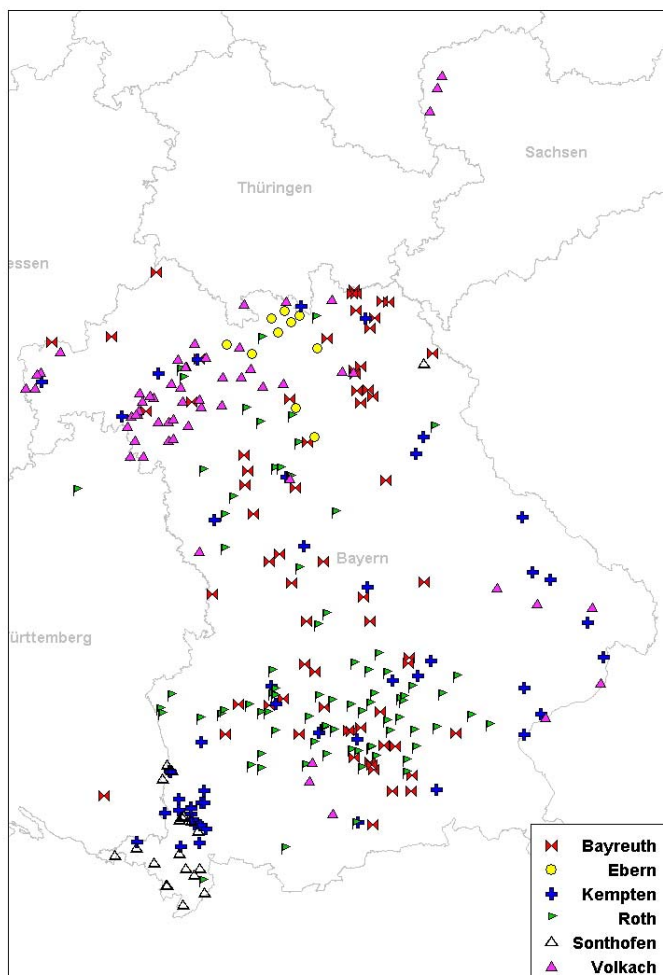
Bei allen Kasernen wurden an zwei oder drei verschiedenen Terminen Abstriche entnommen. Es handelte sich immer um neu eingezogene Rekruten, so dass jeder Soldat nur ein Mal an der Untersuchung teilnahm. Die durchschnittliche Differenz der Trägerraten zwischen Abstrichkampagnen in einer Kaserne betrug 7,50 % (Minimum: Bayreuth: erster und zweiter Termin: 0,1%; Maximum: Sonthofen: 16,3%; siehe Tab. 7).

Tab. 7: Trägerraten von *Neisseria meningitidis* bei Soldaten.

Kaserne	Termin	Probanden (n)	Träger (n)	Trägerrate (%)
Mainfrankenkasernen Volkach	1	107	36	33,6
	2	67	27	40,3
	3	84	33	39,3
Markgrafenkaserne Bayreuth	1	126	40	31,7
	2	176	56	31,8
Otto-Lilienthal-Kaserne Roth	1	157	44	28,0
	2	126	40	31,7
	3	83	26	31,3

Artillerie-Kaserne Kempten	1	77	31	40,3
	2	69	20	29,0
Grüntten-Kaserne Sonthofen	1	27	5	18,5
	2	46	16	34,8
Balthasar-Neumann-Kaserne Ebern	1	18	4	22,2
	2	16	6	37,5
Gesamt	14	1179	384	32,6

Abb. 3: Karte mit den Wohnorten der Bundeswehr-Rekruten, die als Meningokokken-Träger identifiziert wurden



Die Karte wurde von Herr Dr. med. Johannes Elias mit dem Programm Regiograph erstellt und umfasst 286 Datensätze 5-stelliger Postleitzahlen von insgesamt 381 Datensätzen.

3.2 Identifizierung der ET-15-Meningokokken

Nach Abstrichentnahme bei 8000 Probanden erfolgte zunächst die kulturelle Anzucht sowie die biochemische Speziesidentifikation. 830 Meningokokkenstämme wurden identifiziert, mehrere Einzelkolonien expandiert und für weitere Analysen asserviert. Das Flussdiagramm in Abb. 4 zeigt das weitere Vorgehen zur Identifizierung von Meningokokken des ET-15 Klon. Von allen 830 *Neisseria-meningitidis*-Stämmen wurde eine *porB*-PCR durchgeführt. Von allen Stämmen mit einem *porB* der Klasse II wurde die *fumC*-PCR mit folgender Sequenzierung durchgeführt. Bei allen Stämmen mit *fumC*-Allel 3 wurden ergänzend PCRs und Sequenzierungen der *pgm*- und *pdhC*-Gene durchgeführt. Hier sind für ET-15-Meningokokken die Allele *pgm* 6 und *pdhC* 4 gefordert. Von den Stämmen mit den entsprechenden Allelen wurden im letzten Schritt noch eine Sequenzierung der upstream-Region des für die MLST bedeutenden Fragments des *fumC*-Gens durchgeführt. Hier ist an Position 640 eine nichtsynonyme Mutation gefordert (siehe Abb. 4).

102 von 830 Stämmen (12,3%) wiesen ein *porB*-Klasse-II-Gen auf, welches an einem HC216/HC217-PCR-Produkt von 1100 bp identifiziert wurde. 728 Stämme (87,7%) wiesen ein *porB*-Klasse-3-Gen auf, welches ebenfalls an einem HC216/217-PCR-Produkt identifiziert wurde, aber nur eine Größe von 1020 bp besaß.

Das Fragment des Fumerase-C-Gens (*fumC*), welches für die MLST verwendet wird, ist 465 Basenpaare lang. Für ST-11-Meningokokken war das Allel 3 gefordert, welches von den 102 *porB*-Klasse-II positiven Stämmen folgende elf Stämme besaßen: α 122, α 198, α 223, α 306, α 308, α 324, α 507, α 605, α 737, α 738, α 749. Dies entsprach 10,8% aller *porB*-Klasse-II positiven Stämme und 1,3% aller gesammelten Meningokokkenstämme. Vom 450 Basenpaare langen Fragment des Phosphoglucomutase-Gens (*pgm*), welches für die MLST verwendet wird, ist für ST-11-Meningokokken das Allel 6 gefordert, und vom 480 Basenpaare langen Fragment des Phosphodehydrogenase-C-Gens (*pdhC*) wird für ST-11-Meningokokken das Allel 4 gefordert. Diese beiden Allele sind bei den Stämmen α 122, α 223, α 306, α 308, α 324, α 737, α 738, α 749 vorhanden. Die hier verwendete partielle MLST zur Identifizierung von ET-15-Meningokokken erwies sich als 100% spezifisch und sensitiv, wie die später durchgeführte MLST aller Stämme bewies (Claus *et al.*, unveröffentlicht). Die Stämme α 308, α 737, α 738 und α 749 wiesen an Position 640 des Fumerase-C-Gens eine Adenin-Base und somit die für ET-15-Meningokokken geforderte nicht-synonyme Punktmutation auf. Die Stämme α 122, α 223, α 306 und α 324 zeigten ein Guanin und waren somit nicht den ET-15-Meningokokken zuzurechnen (siehe Abb. 5).

Abb. 4: Flussdiagramm zur Identifizierung von ET-15-Meningokokken.

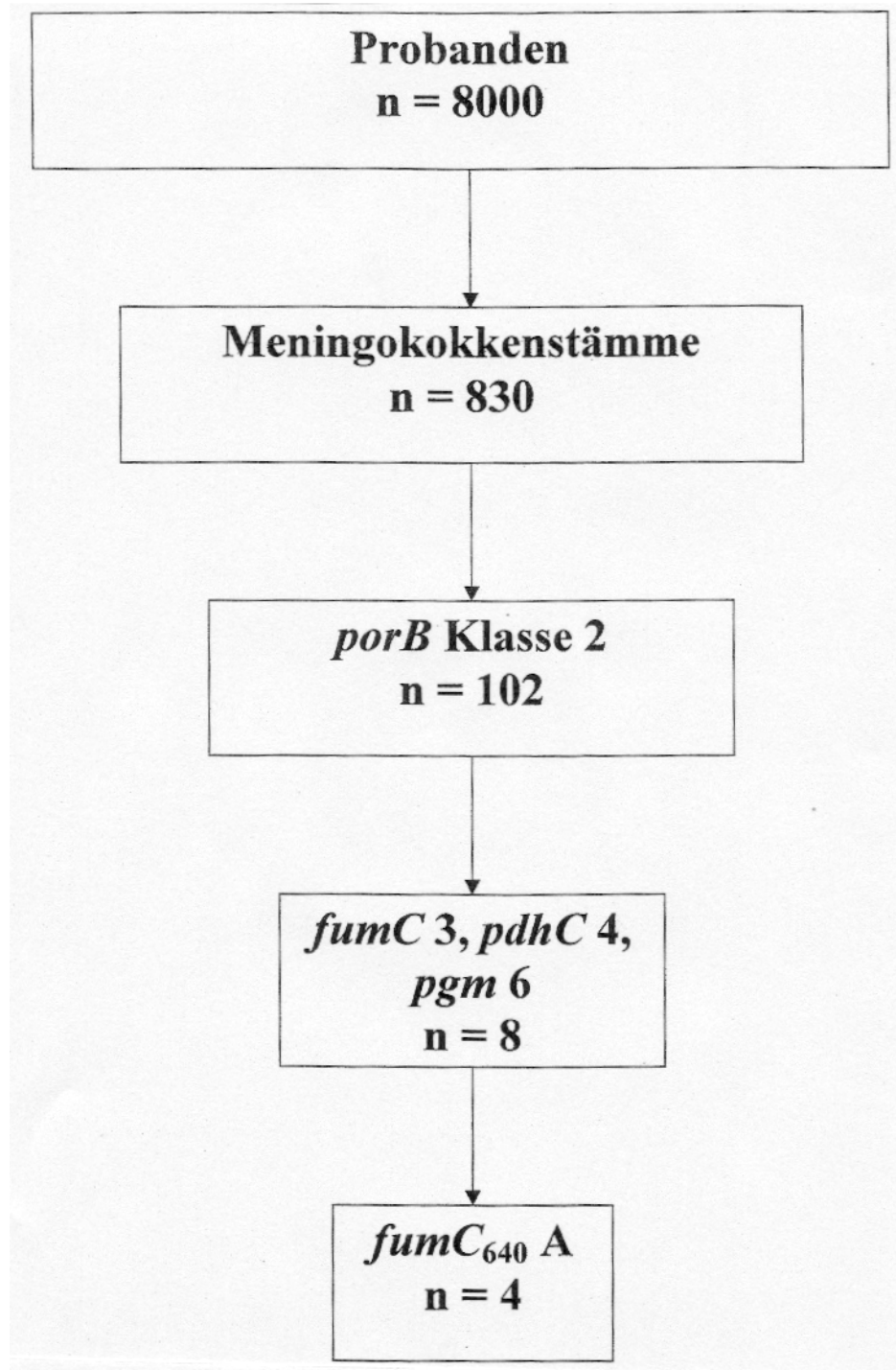


Abb. 5: Sequenzvergleich der upstream-Region des Fumerase-C-Gens.

100	AATGACGCGCTTAAAGACTTGTAT	A	AACTTGCTTTGGGCG	ET-15
100	AATGACGCGCTTAAAGACTTGTAT	G	AACTTGCTTTGGGCG	ET-37
100	AATGACGCGCTTAAAGACTTGTAT	G	AACTTGCTTTGGGCG	α 122
100	AATGACGCGCTTAAAGACTTGTAT	G	AACTTGCTTTGGGCG	α 223
100	AATGACGCGCTTAAAGACTTGTAT	G	AACTTGCTTTGGGCG	α 306
100	AATGACGCGCTTAAAGACTTGTAT	A	AACTTGCTTTGGGCG	α 308
100	AATGACGCGCTTAAAGACTTGTAT	G	AACTTGCTTTGGGCG	α 324
100	AATGACGCGCTTAAAGACTTGTAT	A	AACTTGCTTTGGGCG	α 737
100	AATGACGCGCTTAAAGACTTGTAT	A	AACTTGCTTTGGGCG	α 738
100	AATGACGCGCTTAAAGACTTGTAT	A	AACTTGCTTTGGGCG	α 749

6
4
0

3.3 Epidemiologische Analyse der ET-15-Meningokokken

Die Stämme $\alpha 306$, $\alpha 737$, $\alpha 738$ und $\alpha 749$ wiesen den für ET-15-Meningokokken geforderten Genotyp auf. Dies entsprach einer Gesamt-Trägerrate für diesen Klon von 0,05 % (4/8000). Bezogen auf alle Träger von *Neisseria meningitidis* betrug der Anteil ET-15-Meningokokken 0,5 % (4/830). Die Stämme $\alpha 737$, $\alpha 738$ und $\alpha 749$ wurden von Soldaten der Kaserne Bayreuth am zweiten Termin isoliert. Dies entsprach unter diesem Kollektiv einer Trägerrate für ET-15-Meningokokken von 1,7 %. Der Stamm $\alpha 306$ war beim zweiten Sammeltag in der Kaserne Volkach gefunden worden. Die Träger der vier ET-15-Stämme $\alpha 306$, $\alpha 737$, $\alpha 738$ und $\alpha 749$ waren 18 – 21 Jahre alt. Die anderen Träger der ST-11-Stämme $\alpha 122$, $\alpha 223$, $\alpha 308$ und $\alpha 324$ waren 18 – 24 Jahre alt. In dem Begleitfragebogen, den jeder Teilnehmer der Studie ausfüllen musste, wurde nach regelmäßigen Besuchen in der Tschechischen Republik gefragt, weil dort 1993 ET-15-Meningokokken ausbrachen. Mit Feintypisierungsmethoden konnte nachgewiesen werden, dass die tschechischen Stämme nach Bayern importiert wurden und dort für den Ausbruch in Rottal/Inn verantwortlich waren. Die Frage nach eventuellen Reisen in die Tschechische Republik im Zeitraum von acht Wochen vor der Abstrichentnahme war nur vom Träger des Isolats $\alpha 749$ bejaht worden. Die Träger der Stämme $\alpha 306$, $\alpha 737$ und $\alpha 738$ waren in diesem Zeitraum nicht in der Tschechischen Republik gewesen. Von den anderen ST-11-Trägern reiste ebenso niemand in die Tschechische Republik. Von allen 830 Meningokokken-Trägern waren 76 im genannten Zeitraum in der Tschechischen Republik gewesen, was 9,2% entsprach.

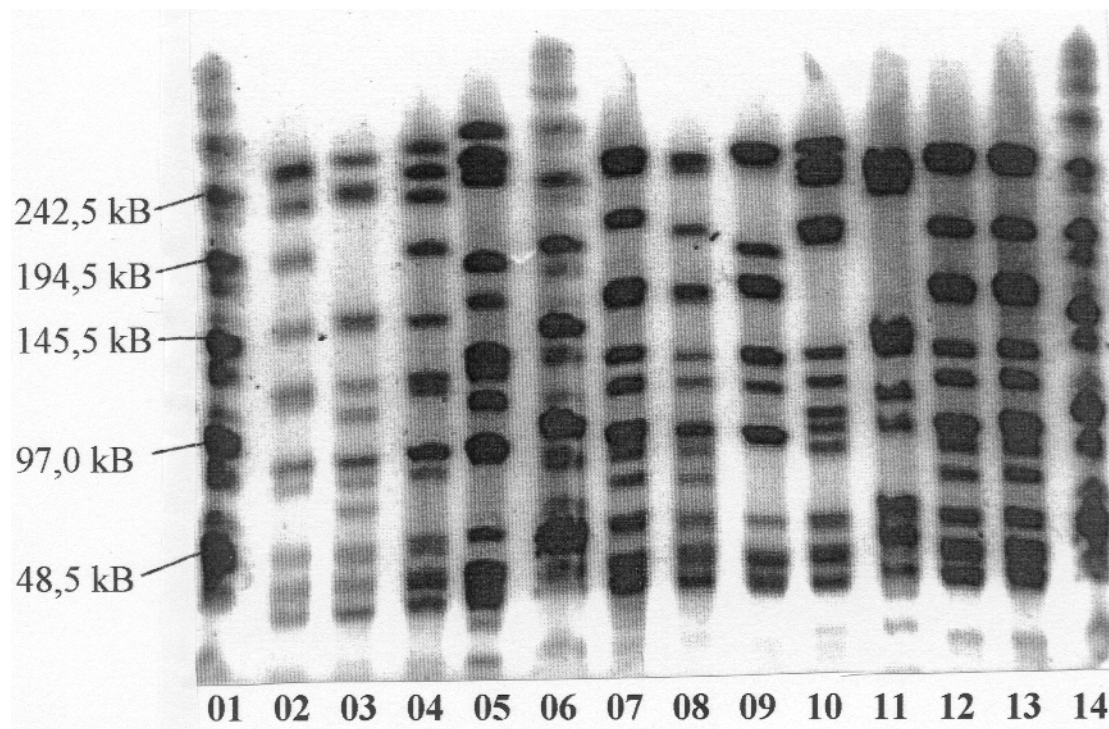
3.4 Feintypisierung von ET-15-Meningokokken mittels Pulsfeldgelelektrophorese

Die Pulsfeldgelelektrophorese ergab für die vier ET-15-Meningokokken-Trägerstämme ein jeweils unterschiedliches Bandenmuster. Die DNA-Fragmentgröße reichte von etwa 10 kb bis etwa 300 kb. Die vier Trägerstämme lieferten zwischen 11 und 13 Banden (siehe Abb. 6).

Bei der Auswertung der Pulsfeldgelelektrophorese wurde unterschieden zwischen:

1. gleichen Stämmen, mit gleicher Anzahl und genau korrespondierenden Banden
2. eng verwandten Stämmen, mit zwei oder drei unterschiedlichen Banden
3. möglicherweise verwandten Stämmen, mit vier bis sechs unterschiedlichen Banden
4. nicht verwandten Stämmen, mit mehr als sechs unterschiedlichen Banden

(Tenover *et al.*, 1995)

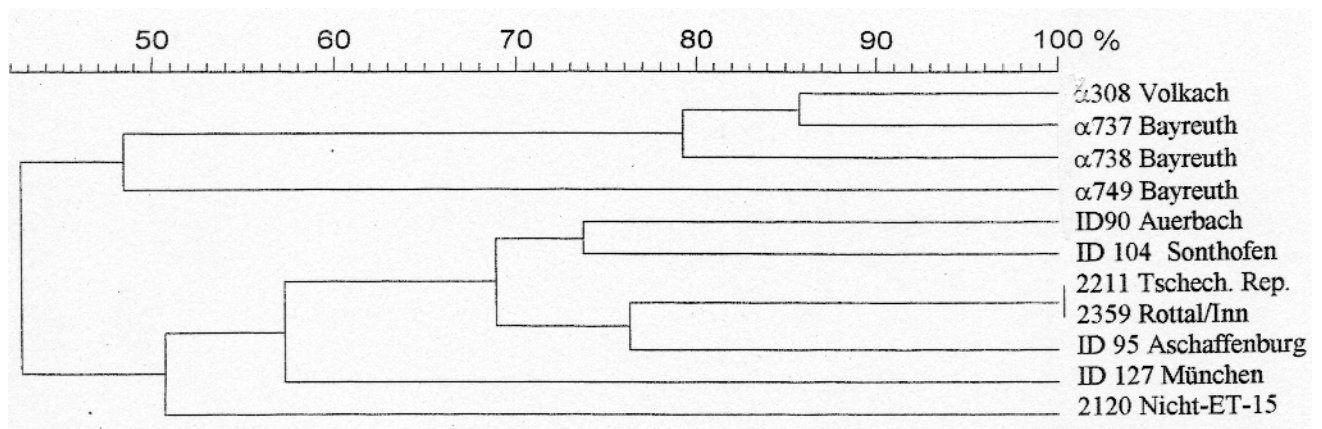
Abb. 6: Bandenmuster der Pulsfeldgelelektrophorese

- | | |
|----|--|
| 01 | Mid Range PFGE-Längenmarker |
| 02 | α 308 Trägerstamm Volkach (ET-15) |
| 03 | α 737 Trägerstamm Bayreuth (ET-15) |
| 04 | α 738 Trägerstamm Bayreuth (ET-15) |
| 05 | α 749 Trägerstamm Bayreuth (ET-15) |
| 06 | Mid Range PFGE-Längenmarker |
| 07 | ID 90 Erkrankungsstamm Auerbach (ET-15), NRZ Heidelberg |
| 08 | ID 95 Erkrankungsstamm Aschaffenburg (ET-15), NRZ Heidelberg |
| 09 | ID 104 Erkrankungsstamm Sonthofen (ET-15), NRZ Heidelberg |
| 10 | ID 127 Erkrankungsstamm München (ET-15), NRZ Heidelberg |
| 11 | 2120 ST-11, Nicht-ET-15-Erkrankungsstamm (Vogel <i>et al.</i> , 1998) |
| 12 | 2211 Erkrankungsstamm Tschechische Republik (ET-15, Kriz <i>et al.</i> , 2000) |
| 13 | 2359 Erkrankungsstamm Rottal/Inn (Hauri <i>et al.</i> , 2000) |
| 14 | Mid Range PFGE-Längenmarker |

Gel-Compare® bildete bei der Analyse der PFGE-Bandenmuster 2 Gruppen von Stämmen, zum einen die vier Trägerisolate und zum anderen die sieben Erkrankungsstäme. Die Analyse des Pulsfeldgelelektrophorese-Gels mit der Gel-Compare®-Software ergab eine Verwandtschaft der vier ET-15-Trägerstäme (siehe Abb. 7). Die größte Verwandtschaft bestand zwischen den Trägerstämmen α 308 und α 737, die aus der Mainfrankenkasernen Volkach (α 308) und der Markgrafenkaserne Bayreuth (α 737) stammten. Obwohl die drei Bayreuther Isolate an einem Tag isoliert wurden, konnte keine vollständige Übereinstimmung

der Bandenmuster erzielt werden. Dieser Befund deutet zumindest für das Isolat $\alpha 749$ auf ein unabhängiges Akquisitionereignis hin. Inwieweit die geringgradigen Unterschiede zwischen $\alpha 737$ und $\alpha 738$ auf das Phänomen einer Hyperdiskriminierung der PFGE hindeuten, kann nicht abschließend beurteilt werden. Zwischen den ET-15-Trägerstämmen und den Erkrankungsstämmen, die in der Pulsfeldgelelektrophorese mit verarbeitet wurden, gab es nur eine relativ geringe Homologie bei den Bandenmustern. Hierbei konnte außerdem gezeigt werden, dass die Übereinstimmung der Banden zwischen einem ST-11-Stamm, der nicht zu den ET-15-Meningokokken gehörte (2120), und den ET-15-Erkrankungsstämmen größer war, als zwischen den Träger-ET-15-Stämmen und den Erkrankungs-ET-15-Stämmen. Auch die Erkrankungsstämme boten ein sehr heterogenes Bild. Während zwischen den Erkrankungsstämmen aus dem Landkreis Rottal/Inn (2211) und der Tschechischen Republik (2359) eine vollständige Identität der Muster herrschte, lagen zwischen den Erkrankungsstämmen aus Bayern, die während des Sammelzeitraums isoliert wurden (ID90, ID95, ID104, ID127), eine geringere Übereinstimmung der Bandenmuster vor. Die größte Übereinstimmung gab es zwischen den Erkrankungsstämmen ID 90 aus Auerbach und ID 104 aus Sonthofen. Eine geringere Homologie bestand noch zum Bandenmuster von ID 95 aus Aschaffenburg, während die Übereinstimmung zu ID 127 aus München noch geringer war. Die größte Übereinstimmung im PFGE-Bandenmuster zwischen den bayrischen Erkrankungsstämmen und den Ausbruchsstämmen aus Rottal/Inn und der Tschechischen Republik bestand zu ID 95 aus Aschaffenburg (siehe Abb. 6 und Abb. 7). Keiner der Rottaler oder tschechischen Stämme war während der Sammelphase in Bayern für eine Erkrankung verantwortlich. Außerdem konnte bei keinem der 8000 Teilnehmer der Trägerstudie dieser Stamm isoliert werden.

Abb. 7: Dendrogramm zur Darstellung der Bandenunterschiede verschiedener ET-15-Stämme aus Bayern und der tschechischen Republik. Als *Outgroup*-Stamm wurde ein ST-11 Stamm (2120) eingefügt, der nicht zum ET-15-Klon gehört.



Das Dendrogramm wurde mit dem Programm Gel-Compare® erstellt.

4. Diskussion

4.1 Epidemiologie der ET-15 Meningokokken in Bayern im Vergleich zu anderen Ländern

In der vorliegenden Studie wurden bei 830 von 8000 Probanden Meningokokken im Nasen-Rachenraum diagnostiziert, was einer Trägerrate von 10,4 % entspricht (Claus *et al.*, 2002). Bei dem englischen Stonehouse Survey (Cartwright *et al.*, 1987), die ein vergleichbar großes Kollektiv umfasste, wurde mit 10,9 % Trägertum ein vergleichbarer Wert ermittelt. Diese Studie wurde ebenso wie die vorliegende Arbeit im Anschluss an einen Ausbruch durchgeführt, wobei der damalige Ausbruchstamm bei 1,4% der Probanden gefunden wurde, was im Gegensatz zu den in dieser Studie gesuchten ET-15-Meningokokken (0,025%) sehr hoch war. Dieser hohe Wert kann man damit begründen, dass bei der vorliegenden Studie die Meningokokken in einem größeren Gebiet gesammelt wurden, als in England, wo nur in dem Ort des Ausbruches Abstriche entnommen wurden. Der Ausbruch von Stonehouse betraf 15 Personen zwischen April 1983 und November 1986 (Stuart *et al.*, 1987). In der Tschechischen Republik, wo ET-15-Meningokokken 1993 für Ausbrüche verantwortlich waren, wurden im gleichen Jahr im Rahmen einer Untersuchung bei 217 von 1400 Probanden, die keinen direkten Kontakt zu Erkrankten hatten, Meningokokken im Nasen-Rachenraum nachgewiesen, was einer Trägerrate von 15,5% entsprach. 33 Personen trugen bei jener Studie Meningokokken des ST-11-Komplexes, was einer Trägerrate von 2,4 % entsprach (Jolley *et al.*, 2000; Jolley *et al.*, 2002). In der Studie von Jolley erfolgte noch die Aufteilung der Träger in zwei alterabhängige Kohorten (15-19 Jahre und 20-24 Jahre). Dies entspricht in der vorliegenden Studie in etwa den Gruppen der gymnasialen Oberstufe und den Bundeswehrsoldaten. Insgesamt beinhaltet die Studie von Jolley eine etwas homogenere Altersgruppe, da nur Probanden im Alter von 15 bis 24 Jahren berücksichtigt wurden, während in der vorliegenden Studie Probanden im Alter von 3-26 Jahren teilnahmen. In der Altersgruppe von 15-24 Jahren ist in der vorliegenden Studie die Trägerrate von Meningokokken höher als im Gesamtkollektiv und ST-11 bzw. ET-15-Stämme wurden ausschließlich in dieser Altersgruppe gefunden. Jolley detektierte in seiner Studie nicht ET-15-Stämme, sondern führte eine MLST der Trägerstämme sowie der im gleichen Zeitraum gefundenen Erkrankungsstämme durch. In unserer Studie fanden sich insgesamt 8 ST-11-Komplex-Stämme, was einer Trägerrate von 0,1% entspricht. Die Studie ist im Bezug auf die Methodik mit der vorliegenden Studie in etwa vergleichbar, da im Wesentlichen gleiche oder ähnliche Methoden verwendet wurden. In Griechenland wurde in einer Studie unter

russischen Einwanderern eine Gesamtträgerrate von 13,1% ermittelt, was deutlich höher als der hier vorliegenden Wert ist. Allerdings lag die Trägerrate in einer anderen Schule, die eine für griechische Verhältnisse homogene Verteilung der sozialen Herkunft aufwies, bei nur 5,8% und somit deutlich unter dem in dieser Arbeit ermittelten Wert. Die Vergleichbarkeit der beiden Studien ist allerdings nur bedingt gegeben, da in den griechischen Studien jeweils nur das Kollektiv der russischen Einwanderer untersucht wurde, während in der vorliegenden Studie Schulen aus unterschiedlichsten Orten mit jeweils verschiedenen Umfeldern in die Studie mit einfließen. Deshalb liegt die Trägerrate mit 10,4 % in der Mitte dieser beiden Extremwerte (Kremastinou *et al.*, 1999). Nach dem Bekanntwerden eines Erkrankungsfalles an Meningokokken-Sepsis in Regensburg, wurden dort bei zahlreichen Kontaktpersonen Rachenabstriche genommen, wobei die Trägerquote nur 4,8% betrug. Die Kontaktpersonen gehörten zur Altersgruppe der Jugendlichen und jungen Erwachsenen, die in der vorliegenden Studie eine Trägerrate von 17,9 % haben. Ein wesentlicher Unterschied bestand allerdings darin, dass bei der Studie von Linde in Regensburg ein Transportmedium verwendet wurde und erst nach maximal vier Stunden eine Agarplatte beimpft wurde (Linde *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden die Platten sofort nach dem Abstrich beimpft, da Meningokokken sehr empfindlich gegen Austrocknen und Kälte sind. Der Zeitpunkt des Ausplattierens des Abstrichs hat einen entscheidenden Einfluss auf die Trägerrate. Werden die Wattetupfer direkt nach dem Abstreichen des Rachens auf das Nährmedium ausplattiert, so ist die Trägerrate höher als bei Verwendung eines Transportmediums und dem anschließenden Ausstreichen im Labor (Cunningham *et al.*, 2001). In zwei polnischen Kasernen wurden 1998 in einer Studie ausschließlich Soldaten bei ihrem Eintritt in die Armee sowie während ihrer ersten zwei Dienstmonate auf Meningokokken-Trägertum untersucht. Die Trägerraten beim Eintritt in die Armee betragen 16% und 24% und innerhalb der ersten zwei Monate 36% und 61%. Hiermit konnte gezeigt werden, dass mehr Soldaten Meningokokken erwerben, als solche, die ihren Trägerstatus verlieren. In der vorliegenden Trägerstudie wurden, neben einer größeren Anzahl, außerdem ausschließlich Soldaten beim Eintritt in die Bundeswehr berücksichtigt, was zu einer Trägerrate von 32,6% führte. Diese Trägerrate ist somit höher als die in Polen (Tyski *et al.*, 2001). In Dänemark betrug die Trägerrate in der Gegend um Randers nach einem Ausbruch etwa 30%, wobei nur 3% Meningokokken der Serogruppe des Ausbruchsstammes und wiederum nur 1% den eigentlichen Trägerstamm trugen. Diese Werte entsprechen in etwa den Trägerraten aus einem Nichtausbruchsgebiet (Ronne *et al.*, 1993). Verglichen mit der vorliegenden Studie waren die Gesamtträgerrate aber etwa um das Dreifache höher und die Trägerrate des Ausbruchsstammes sogar um das Vierfache höher. In

den USA waren bei einer Trägerstudie, nach einem Ausbruch durch Meningokokken der Serogruppe C, 9,9% der Teilnehmer Träger von Meningokokken und 0,3% Träger des Ausbruchstammes (Imrey *et al.*, 1996). Die Gesamtträgerrate entsprach in etwa dem Wert in der vorliegenden Studie. Die Trägerrate des den Ausbruch auslösenden Stammes war jedoch viel höher. Es sollte darauf hingewiesen werden, dass Vergleichen mit dem immunhistochemischen Nachweis von Meningokokken in Gaumenmandelgewebe nasopharyngeale Abstriche eine wesentlich niedrigere Sensitivität aufweisen (Sim *et al.*, 2000). Die Trägerrate ist abhängig von der Person, die den Abstrich entnimmt, der Abstrichtechnik, der Dauer des Transportes und der Auswahl des Transportmediums (Olcén *et al.*, 1979). In dieser Studie wurden die Abstriche von zwei Personen durchgeführt. Es zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den Trägerraten die von verschiedenen Personen ermittelt wurden. Außerdem wurden die Platten sofort nach der Abstrichentnahme in das Labor befördert und im Brutschrank bebrütet. Die Zeiträume zwischen Abstrichentnahme und Bebrütung lagen zwischen 30 Minuten und sechs Stunden. Die Sensitivität eines einzelnen retropharyngealen Rachenabstriches zur Detektion von Meningokokken beträgt zwischen 86% und 95% (Andersen *et al.*, 1998). Aufgrund der großen Menge an Abstrichen in kurzer Zeit war es technisch aber nicht möglich zwei, bzw. drei Abstriche parallel durchzuführen. Bei den Rekruten der Bundeswehr handelte es sich ausschließlich um neu eingezogene Soldaten, die ihren Grundwehrdienst ableisten und noch nicht länger als einige Tage in der Kaserne untergebracht waren. Dadurch sollte vermieden werden, dass sich ein bestimmter Klon innerhalb der Kaserne verbreiten kann und somit die Aussagekraft der Trägerstudie schmälert, da der Erwerb von Meningokokken sich in den ersten Wochen in der Kaserne ereignet (Andersen *et al.*, 1998). In einigen Kasernen wurde die Abstrichentnahme sogar im Rahmen der Eingangsuntersuchung durchgeführt, so dass ein Erwerb innerhalb der Kaserne sogar gänzlich ausgeschlossen werden kann. Neben den konventionellen Methoden mittels Anzuchtung einer Kultur, gibt es noch die Möglichkeit des serologischen Nachweises von Meningokokken-Antikörpern im Serum. Eine Person kann im Rahmen einer früheren Besiedlung Antikörper gegen Meningokokken gebildet haben. In einer Studie in England konnte gezeigt werden, dass Trägertum von Meningokokken im Rachenraum die Bildung von systemischen Antikörpern bewirkt, die stammspezifisch sind. Meist sind die humanen Antikörper gegen die Epitope der Porin-Moleküle der Meningokokken gerichtet (Jones *et al.*, 1998). Hierbei kann auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen bestimmte Serotypen geschlossen werden. Diese Methoden sind aber nur wenig validiert, da es Kreuzreaktionen gibt. In der Tschechischen Republik war zum Beispiel

die Rate an Antikörpern gegen Serogruppe A viel höher als gegen die Serogruppen B und C, wobei Serogruppe A im Gegensatz zu den anderen beiden Serogruppen weder bei Erkrankungen noch als Trägerstämme bei gesunden Trägern in der Tschechischen Republik keine Rolle spielt (Kriz *et al.*, 1999a).

4.2 Dynamik des Trägertums von Meningokokken hypervirulenter Gruppierungen

In der vorliegenden Studie lag die Trägerrate für ET-15-Meningokokken bei 0,05%. Das Gesamtträgertum für Meningokokken lag bei 10,4%. Bei einer Trägerstudie zwei Jahre nach einem Ausbruch von C-Meningokokken des ET-5-Komplexes in Westnorwegen war die Trägerrate bei 19,2%, aber nur wenige Probanden trugen den Ausbruchstamm (0,6%) (siehe Tab. 8). Im Vergleich dazu lag die Gesamt-Trägerrate während des Ausbruches bei 20,8% und 1,2% trugen den Ausbruchstamm (Smith *et al.*, 1999). In der Tschechischen Republik betrug 1993 während zweier Ausbrüche durch ST-11-Meningokokken bei einer Untersuchung von 1400 gesunden Probanden, die keinen Kontakt zu Erkrankten hatten, die Gesamtträgerrate 15,5 %, während die Trägerrate an ST-11-Meningokokken 2,4 % betrug (Jolley *et al.*, 2000; Jolley *et al.*, 2002). Dagegen ist die Gesamtträgerrate unserer Studie mit 10,4 % hoch signifikant niedriger ($\chi^2=160,43$; $p\leq 0,001$), die Trägerrate an ST-11-Meningokokken mit 0,1 % hoch signifikant ($\chi^2=177,08$; $p\leq 0,001$) niedriger als in der Tschechischen Republik. Dieser Befund lässt die Schlussfolgerung zu, dass das ET-15-Trägertum in Bayern nach dem Ausbruch in Rottal/Inn nicht mit der Situation in der Tschechischen Republik vergleichbar ist. In Galicien in Nordspanien war der Stamm C:2b:P1.5,2 für die Mehrzahl aller Meningokokken-Erkrankungen in den Jahren 1995 und 1996 verantwortlich. In einer Trägerstudie wurden fast 10.000 Probanden auf Trägertum untersucht, die eine ähnliche Altersverteilung wie unsere Studie hatten. Allerdings wurde das Untersuchungsgebiet in ein Hochinzidenzgebiet und ein Niedriginzidenzgebiet geteilt. Die Gesamt-Trägerrate an Meningokokken betrug 8% bzw. 8,8% und der Stamm C:2b:P1.5,2 war nur bei 0,4 bzw. 0,6% der Probanden nachzuweisen (siehe Tab. 8). Dies bedeutet, dass der betroffene Stamm selten bei Trägern nachweisbar ist. Die Unterschiede zwischen Hoch- und Niedriginzidenzgebiet waren allerdings nicht signifikant (Fernández *et al.*, 1999). Im Landkreis Rottal/Inn, der im Frühjahr 1998 vom Ausbruch der ET-15-Meningokokken betroffen war, wurden in unserer Studie 584 Probanden untersucht, von denen niemand Träger der damaligen Erkrankungsstämme war. Im Vergleich zur Trägerstudie von Jolley *et al.* aus der Tschechischen Republik wären 14 ST-11-Stämme zu erwarten gewesen, da der Ausbruch durch ET-15-Meningokokken verursacht wurde, die zum ST-11-Komplex gehören

(Jolley *et al.*, 2000; Jolley *et al.*, 2002). Im Bezug auf die Trägerrate eines Ausbruchstammes nach einem Ausbruch in England 1986 wären in Rottal/Inn 8 ST-11-Meningokokkenstämme zu erwarten gewesen (Cartwright *et al.*, 1987). Ein ähnliches Bild ergab sich in Norwegen, wo nach einem Erkrankungsfall in einer Kaserne die Kontaktpersonen des Erkrankten mehrmals hintereinander auf Meningokokken-Trägertum untersucht wurden. Niemand der untersuchten Probanden trug den Erkrankungsstamm (Caugant *et al.*, 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde in dem vom ET-15-Meningokokken-Ausbruch betroffenen Gebiet Rottal/Inn der Ausbruchstamm nicht gefunden, was darauf hinweist, das ET-15-Meningokokken keine an Ausbruchssituationen erinnernden Trägerraten mehr aufweist. Der Stamm scheint sich also nicht weiterverbreitet zu haben. Aus logistischen Gründen konnte leider keine repräsentativere Anzahl an Probanden rekrutiert werden. In Norwegen betrug die Trägerrate von Meningokokken nach einem Ausbruch 9,2%, was in etwa dem vorliegenden Wert von 10,4% entspricht (siehe Tab. 8). Bei dieser Studie wurde ebenfalls mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) ein molekularbiologischer Vergleich der Trägerstämme im Vergleich zum Ausbruchsstamm durchgeführt, was zu einer Trägerrate des Ausbruchstammes von 0,76% führte. 75% der Personen, die in Norwegen den Ausbruchsstamm trugen, hatten direkten Kontakt zu den Erkrankten (Bevanger *et al.*, 1998). Hierin liegt der Unterschied zur vorliegenden Studie, bei der niemand Kontakt zu den Erkrankten hatte.

Tab. 8: Zusammenfassung der zitierten Trägerstudien.

Referenz	Land ¹	Sero- gruppe	Probanden (n)	Gesamt- träger- raten	Trägerrate des Aus- bruchstamms
Andersen <i>et al.</i> , 1998	DK	B, C	1069	42,6%	
Bevanger <i>et al.</i> , 1998	N	B	469	9,2%	1,3%
Cartwright <i>et al.</i> , 1987	UK	B	6234	10,9%	1,4%
Fernández <i>et al.</i> , 1999	E	C	9724	8,1%	0,4%
Imrey <i>et al.</i> , 1996	USA	C	867	9,9%	0,4%
Jolley <i>et al.</i> , 2000	CZ	C	1400	11,1%	
Kremastinou <i>et al.</i> , 1999	GR	NG	625	13,1%	
Ronne <i>et al.</i> , 1993	DK	C	941	29,1%	1,0%
Smith <i>et al.</i> , 1999	N	C	1120	20,8%	7,1%

¹ Länderabkürzungen: CZ: Tschechische Republik, D: Deutschland, DK: Dänemark, E: Spanien, GR: Griechenland, N: Norwegen, UK: Großbritannien, USA: Vereinigte Staaten von Amerika

4.3 Vakzinierung gegen Serogruppe-C-Meningokokken in Bayern

In Norwegen wurde 1996 nach einem Ausbruch eines Serogruppe-C-Stamms aus dem ET-5-Komplex eine Massenimpfung bei 4000 Kindern, Jugendlichen und Kontaktpersonen durchgeführt. Parallel hierzu wurden Trägern mit Ofloxacin behandelt. Diese Maßnahmen hatten eine Abnahme der Inzidenz in diesen Risikogruppen von 180/100.000/Jahr auf 30/100.000/Jahr zur Folge (Smith *et al.*, 1999). In Kanada, wo ET-15-Meningokokken zum ersten Mal in großem Stil auftraten, wurden neun Massenimpfungen gegen Meningokokken der Serogruppen A und C mit jeweils mehr als 20.000 Teilnehmern durchgeführt. Vor diesen Maßnahmen verursachten in Kanada 65% der Erkrankungen Meningokokken der Serogruppe C, von denen wiederum ET-15-Meningokokken 51,8% ausmachten (Whalen *et al.*, 1995). In der am stärksten betroffenen Provinz Ontario waren im Jahr 1990 ET-15-Meningokokken für 85,0% der Serogruppe-C-Erkrankungen verantwortlich (Ashton *et al.*, 1991). Nach der Immunisierung waren Serogruppe-C-Meningokokken für 48,6% der Erkrankungen verantwortlich, von denen wiederum 93% zu den ET-15-Meningokokken gehörten. Die Gesamtinzidenz hat nach den Massenimpfungen von 1,4/100.000/Jahr lediglich auf 1,0/100.000/Jahr abgenommen (Wals *et al.*, 2001). 1993 traten die ersten ET-15-Meningokokken auf, die zu der Serogruppe B gehörten. Diese neue Variante trat bevorzugt in den Gegenden auf, in denen eine Massenimpfung durchgeführt wurde, wobei es allerdings nicht zu einem epidemischen Auftreten dieser Stämme kam. Dieser Wechsel der Serogruppe basiert entweder auf Mutationen des Ausbruchsstammes durch Aufnahme des für die Serogruppe B spezifischen Polysialyltransferase-Gens oder auf dem mit „clonal replacement“ bezeichneten Phänomen, bei dem ein schon vorher bestehender ST-11 Stamm der Serogruppe B sich in der gegen die Serogruppe C vakzinierte Population ausbreitet. In Kanada wurden 84% der Targetpopulation im Alter von sechs Monaten bis 20 Jahre gegen Meningokokken der Serogruppe A und C vakziniert. Nach der Impfung kam es zu einem signifikanten Rückgang der Erkrankungen sowohl bei den Geimpften, als auch bei den Nichtgeimpften der gleichen Altersgruppe. In den anderen Altersgruppen blieb die Inzidenz annähernd gleich, was gegen die Entwicklung einer Herdimmunität spricht (Wals *et al.*, 1996). Es kam in Kanada trotz des Serogruppenwechsels einzelner Stämme nicht zu einem Anstieg der Inzidenz für Erkrankungen durch solche Serogruppen, gegen die nicht vakziniert wurde. Ein weiteres Problem sind Kinder unter zwei Jahren, die durch eine Impfung mit dem Polysaccharid-Impfstoff nicht gegen Meningokokken geschützt werden können (Wals *et al.*, 2001). In der vorliegenden Studie wurden im Landkreis Rottal/Inn nach dem epidemischen Ausbruch der ET-15-Meningokokken rund zwei Jahre zuvor eine Vakzination bei Schülern

des entsprechenden Alters und der entsprechenden Wohngegend durchgeführt, was möglicherweise zur Folge hatte, dass sich in der Zeit zwischen der Vakzinierung und unserer Abstrichentnahme dort keine neuen Serogruppe-C-Erkrankungen ereigneten. Allerdings wurden in den Landkreisen Passau und Rottal/Inn insgesamt nur 5000 Dosen verabreicht. In der Tschechischen Republik kam es 1993 in zwei Distrikten zum Ausbruch von ET-15-Meningokokken, worauf in einem Distrikt eine Massenimpfung der Risikogruppen vorgenommen wurde. In dem zweiten Distrikt wurden außer den Kontaktpersonen der Erkrankten niemand immunisiert. In der darauffolgenden Zeit von einem Jahr war die Inzidenz für Erkrankungen durch Meningokokken in dem Distrikt mit Vakzination signifikant geringer, als in jenem Distrikt, in dem nicht vakziniert wurde. Jedoch nahm auch dort die Inzidenz etwas ab, was auf andere Ursachen zurückzuführen ist. (Kriz *et al.*, 1995). In Spanien ging nach einer Massenvakzinierung gegen Meningokokken der Serogruppe C die Inzidenz der durch diese Serogruppe verursachten Erkrankungen von 5,4/100.000/Jahr auf 1,4/100.000/Jahr zurück. Durch den Rückgang an Serogruppe-C-Erkrankungen sank auch die Gesamtinzidenz der durch Meningokokken verursachten Erkrankungen von 15,2/100.000/Jahr auf 7,9/100.000/Jahr (Pereiro *et al.*, 2001). Meningokokken werden von asymptomatischen Trägern übertragen. Eine Vakzinierung sollte daher nicht nur einen Ausbruch der Erkrankung verhindern, sondern auch vor Erwerb und Trägertum schützen. Konjugatimpfstoffe induzieren im Gegensatz zu reinen Polysaccharid-Impfstoffen eine mukosale Immunität, die wiederum die Besiedlung des Nasopharynx verhindert. Die IgA-Spiegel korrelieren mit dem IgG-Spiegel im Blut und steigen nach Impfung an. (Borrow *et al.*, 1999). In Großbritannien ging nach einer breit angelegten Massenimpfung mit Konjugatimpfstoff gegen Meningokokken der Serogruppe C die Trägerrate dieser Serogruppe innerhalb eines Jahres um 66% zurück, während die Trägerrate der anderen Serogruppen in etwa konstant blieb (Maiden *et Spratt*, 1999; Maiden *et Stuart*, 2002). Dieser Befund deutet darauf hin, dass ein Konjugatimpfstoff auch die Bildung von Schleimhaut-assoziierten Antikörpern zu induzieren vermag. Diese Schleimhaut-Immunität schützt dann vor Besiedlung durch Meningokokken der entsprechenden Serogruppe. Hierdurch werden dann weniger C-Meningokokken von Person zu Person übertragen, was zu einem niedrigeren Vorkommen der entsprechenden Bakterien in der Bevölkerung führt (Jódar *et al.*, 2002). Die niedrigeren Trägerraten führen zu einer Abfall der Inzidenz für Meningokokken-Erkrankungen auch bei Nichtgeimpften. Diese Abnahme der Meningokokken-Trägerrate und der Inzidenz der Meningokokken-Erkrankungen unter den Nichtgeimpften in einer Population mit einer hohen Impfquote wird auch als Herdimmunität bezeichnet (Ramsay *et al.*, 2003). Die

Inzidenz für Serogruppe-C-Erkrankungen war bei den geimpften Jugendlichen 97% und bei den Kindern 92% niedriger als bei den Nichtgeimpften der jeweiligen Gruppen (Ramsay *et al.*, 2001). Der Konjugatimpfstoff ist allgemein empfohlen in Großbritannien, Irland, Island, Australien, Belgien, Spanien und in den Niederlanden.

4.4 Heterogenität der ET-15-Meningokokken

Um bei Ausbrüchen von Meningokokken epidemiologische Zusammenhänge aufklären zu können, wird die hohe Variabilität von *Neisseria meningitidis* ausgenutzt. Diese Variabilität kann man mit verschiedenen Methoden zur Feintypisierung darstellen. So sind ET-15-Meningokokken mit serologischen Verfahren zu unterscheiden. Bei der Untersuchung eines bestimmten Serotyps in Polen, zeigte sich, dass molekulare Methoden, wie Ribotyping oder Pulsfeldgelelektrophorese eine höhere Auflösung aufweisen können als klassische serologische Methoden. Ein einzelner Serotyp konnte durch bestimmte Antikörper in 13 Serosubtypen eingeteilt werden, während dieser Serotyp beim Ribotyping 31 verschiedene Ribogruppen und bei der Pulsfeldgelelektrophorese mit einer 90%-Übereinstimmungsschwelle 67 verschiedene Bandenmuster ergab (Grzybowska *et al.*, 2001). Mit neueren molekularbiologischen Methoden wie PFGE, PCR-RFLP, Ribotyping und MLEE wurden in der USA 96 Meningokokken-Isolaten der Serogruppe B typisiert. Hierbei zeigten sich, dass die Pulsfeldgelelektrophorese mit 83 verschiedenen Mustern die größte Feinauflösung bietet (Swaminathan *et al.*, 1996). In der Tschechischen Republik wurden in den Jahren 1997 bis 1998 39 Stämme von Erkrankten, bzw. von Kontaktpersonen mittels MLEE, PFGE, RAPD und serologischen Verfahren differenziert. Hierbei zeigte sich, dass 24 ET-15-Stämme noch elf verschiedene PFGE-Muster hatten (Kriz *et al.*, 2000). In Großbritannien wurde bei einer Untersuchung eines Ausbruchs von ET-37-Meningokokken an der Universität Southampton, bei dem 6 Studenten innerhalb 19 Tagen erkrankten und drei hiervon starben, die Pulsfeldgelelektrophorese mit der Sequenzierung von bestimmten Meningokokken-Antigenen in Kombination mit einer MLST verglichen. Bei 147 Studenten konnten im Rahmen der Ausbruchsuntersuchung Meningokokken im Rachen nachgewiesen werden, wovon 6 zur Serogruppe C gehörten. In der MLST gehörten 1 Ausbruchsstamm und 2 Trägerstämme zu den ST-11-, 4 Ausbruchsstämme zu den ST-50-, 2 Trägerstämme zu den ST-51- und ein Trägerstamm zu den ST-52-Meningokokken. Bei der Sequenzierung der *porA*- und *porB*-Gene zeigten sich mit einer Ausnahme bei einem ST-11-Trägerstamm, der ein anderes *porB*-Allel aufwies, innerhalb eines bestimmten STs keine weiteren Unterschiede. Bei der PFGE waren der ST-11-Erkrankungsstamm und einer der ST-11-Trägerstämme nicht zu

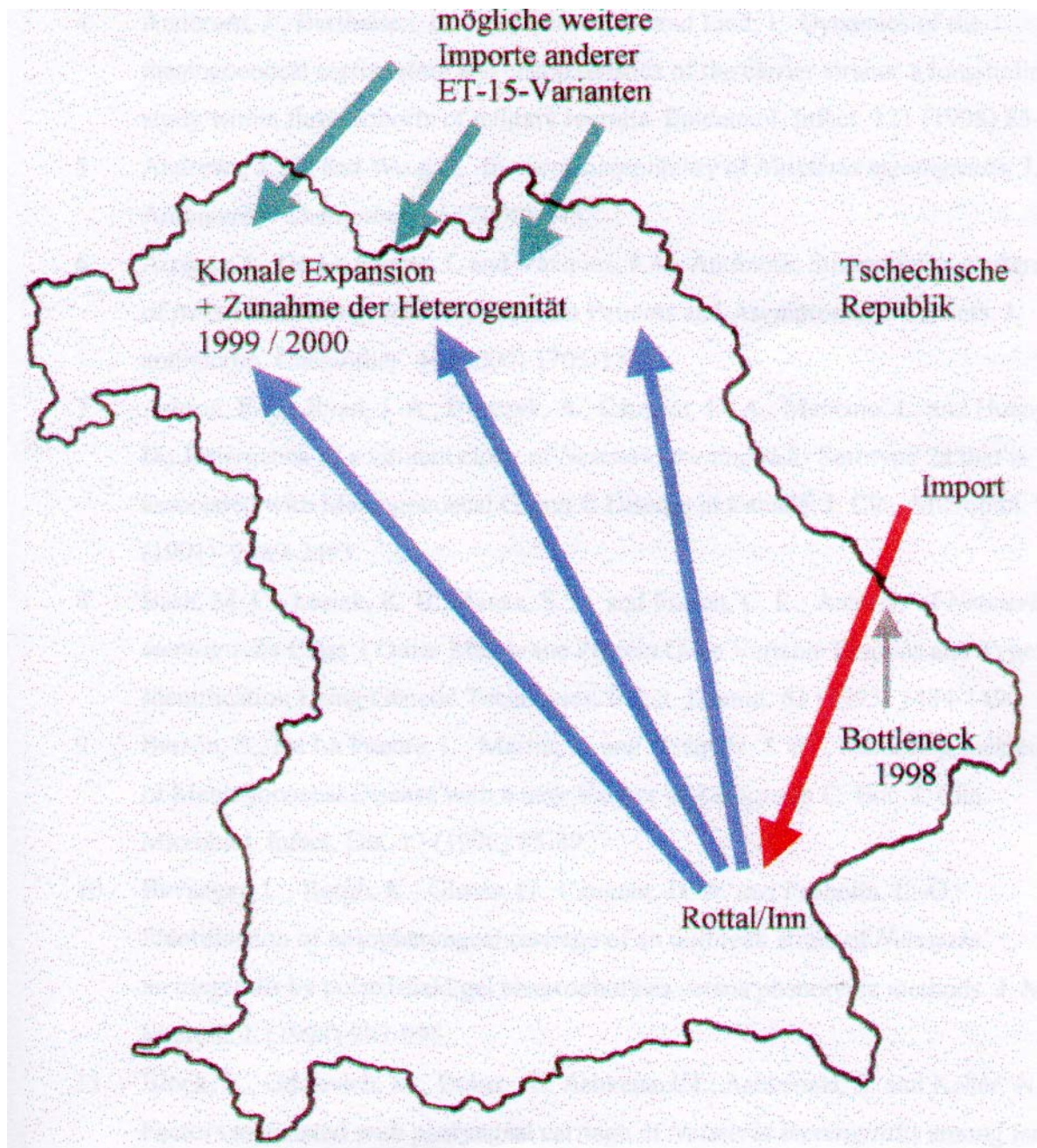
unterscheiden. Innerhalb der vier ST-50-Trägerstämme gab es jedoch unterschiedliche Bandenmuster. Die beiden ST-51-Stämme konnten auch nicht weiter unterschieden werden. Die Ergebnisse der DNA-Sequenzierung waren gegenüber der Pulsfeldgelelektrophorese einfacher zu interpretieren und gaben auch ein genaueres Bild über die genetischen Differenzen (Feavers *et al.*, 1999). Dies liegt daran, dass bei der Sequenzierung auch kleinste Veränderungen in der DNA erkannt werden, während bei der Pulsfeldgelelektrophorese nur Veränderungen sichtbar werden, wenn zufällig Mutationen in Bereichen der Restriktionsenzym-Bindungsstellen auftreten. Bei der Sequenzierung von DNA kann außerdem anhand der Anzahl der Abweichungen die genetische Distanz zwischen mehreren Stämmen berechnet werden. Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Pulsfeldgelelektrophorese stellt die Wahl der Restriktionsendonuklease dar. Hierbei spielt einmal die Anzahl der entstehenden Banden als auch die zu den jeweiligen Banden gehörenden DNA-Fragment-Größen eine wichtige Rolle. In einer vergleichenden Studie mit mehreren Restriktionsenzymen konnte gezeigt werden, dass es Enzyme gibt, bei denen ein bestimmter Stamm nur wenige Banden als Ergebnis liefert, während bei anderen Restriktionsendonukleasen sehr viele Banden entstehen, die aber teilweise von ihrem zugehörigen Molekulargewicht sehr dicht bei einander liegen und daher nur sehr schwer unterschieden werden können (Bygraves and Maiden, 1992). Eine weitere Methode zur Feindiskriminierung eines einzelnen ETs ist die Sequenzierung der *porB*- und *porA*-Gene, die den Serotyp bzw. für den Serosubtyp eines Stammes definieren. Hierbei ist allerdings zu bedenken, dass es sich zwar um Oberflächenmoleküle handelt, die einer sehr starken Immunselektion ausgesetzt sind. Dies spielt jedoch bei hochdiskriminierenden Verfahren keine große Rolle und ist in erster Linie für die Phylogenie bedeutsam (Feavers *et al.*, 1996). Bei der Feindiskriminierung von ET-15-Meningokokken zeigte die RAPD aber ein relativ homogenes Muster, während mit der Pulsfeldgelelektrophorese innerhalb dieses Klons noch viele PFGE-Muster unterschieden werden können. Auch innerhalb eines bestimmten serologischen Phänotyps zeigt sich bei den ET-15-Meningokokken eine große Heterogenität (Kriz *et al.*, 1999b). Aus diesem Grunde wurde in dieser Studie zur Feintypisierung der ET-15-Meningokokken die PFGE verwendet. Die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) zeigt bei allen vier ET-15-Stämmen, die aus den 8000 Rachenabstrichen isoliert wurden, unterschiedliche Bandenmuster. Dieser Befund deckt sich mit dem aus einer ähnlichen Studie aus Spanien, bei der 151 Serogruppe-C-Stämme mit drei verschiedenen Methoden (MLEE, Ribotyping, PFGE) weiter untersucht wurden. Hierbei zeigten sich bei den gleichen Stämmen je vier verschiedene MLEE-Muster (ETs) und Ribotyping-Muster, während die PFGE zu 16 verschiedenen Bandenmustern führte

(Berrón *et al.*, 1998). In Kanada, wo ET-15-Meningokokken zum ersten Mal auftraten, konnte gezeigt werden, dass alle ET-15-Meningokokken ein sehr ähnliches Bandenmuster in der Pulsfeldgelelektrophorese haben und miteinander sehr dicht verwandt sind (Strathdee *et al.*, 1993). Da in der Folgezeit dieser hypervirulenter Klon in verschiedenen Ländern der Erde auftrat, ist davon auszugehen, dass es inzwischen zu vielen genetischen Rekombinationen gekommen ist und es ET-15-Meningokokken mit anderen Bandenmustern gibt. In der vorliegenden Studie lag der Ausbruch von ET-15-Meningokokken ungefähr zwei Jahre zurück, so dass es in der Zwischenzeit zu einer Vermischung von Genen zwischen dem damals epidemisch aufgetretenen Stamm C:2a:P1.5,2 und den anderen endemisch vorkommenden Stämmen gekommen ist. Dies hat zur Folge, dass nun der Ausbruchstamm nicht mehr zu eruieren ist. Keiner der Trägerisolate war mit den Ausbruchstämmen identisch. Es zeigt sich aber auch, dass diese Heterogenität erst im Laufe der Zeit nach dem erstmaligen Auftreten der ET-15-Stämme entstanden ist, was wohl auf den genetische Rekombination dieser Stämme mit endemisch vorkommenden Klonen zurückzuführen ist (siehe Abb.8). In Australien tauchten inzwischen ET-15-Meningokokken auf, die trotz des Sequenztyps 11 und der Punktmutation von G nach A an Position 640 des Fumerase-Gens ein anderes porA auf ihrer Oberfläche exprimieren. Außerdem zeigen diese ET-15-Stämme sechs verschiedene PFGE-Bandenmuster, wobei der normale Phänotyp C:2a:P1.5,2 vier verschiedene Bandenmuster zeigt. Fünf verschiedene Stämme mit gleichem Sequenztyp (ST-11) zeigten in der PFGE jeweils unterschiedliche PFGE-Bandenmuster. Von diesen fünf Stämmen hatten vier an Stelle 640 des Fumerase-Gens ein A statt ein G (Tribe *et al.*, 2002). Dieser Befund korreliert zu dem Ergebnis der Pulsfeldgelelektrophorese in der vorliegenden Studie, die mit vier ET-15-Trägerstämmen und den Erkrankungsstämmen des Sammelzeitraumes durchgeführt wurde. In den USA zeigte sich bei der Untersuchung von mehreren epidemischen und endemischen Ausbruchstämmen oftmals eine Heterogenität innerhalb eines einzelnen elektrophoretischen Typs (ET) (Popovic *et al.*, 2001). Diese Befunde werden durch die vorliegende Studie bestätigt. Es wurden in unserer Studie zur Suche von ET-15-Meningokokken allerdings keine Serogruppen oder Oberflächenproteine, sondern nur Allele von Genen bestimmt, die für Stoffwechsellzyme codieren und somit nicht der Immunselektion ausgesetzt sind. Im horizontalen Genaustausch zeigt sich aber eine Erklärung für die unterschiedlichen Bandenmuster in der Pulsfeldgelelektrophorese bei den Trägerstämmen im Vergleich zu den Erkrankungsstämmen, da die Banden bei der Pulsfeldgelelektrophorese durch Digestion des gesamten Genoms entsteht und eine einzelnen Mutation im Bereich der Erkennungssequenz ein Nichterkennen des Verdauungsenzyms zur

Folge hat. PFGE-Unterschiede entstehen auch chromosomale Rearrangements, Deletionen und Punktmutationen. Bei Untersuchungen von Trägerisolaten von gesunden Meningokokken-Trägern zeigte sich, dass diese Stämme ein sehr heterogenes Bild bieten (Caugant *et al.*, 1988). Die hypervirulenten Stämme, die für fast alle Erkrankten verantwortlich sind, kommen nur bei etwa 20% der Träger vor. Der Großteil, der bei asymptomatischen Trägern gefundenen Stämme ist mit keiner Erkrankung assoziiert. Bei den Erkrankten verhält es sich umgedreht; hier wird als Trägerisolat fast immer ein Stamm gefunden, der zu den hypervirulenten Klonen gehört (Verdú *et al.*, 2001).

Trotz des horizontalen Austauschs von genetischem Material zwischen verschiedenen Meningokokkenstämmen, bereinigen sich Meningokokken während der überregionalen Ausbreitung durch den Prozess des „bottleneckings“ von bestimmten genetischen Varianten, indem zum Beispiel nur ein bestimmter Stamm in eine entfernte geographische Region gelangt, wo er sich wiederum klonal verbreiten kann (siehe Abb. 8). Nach dem „bottlenecking“ kommt es dann wieder durch horizontalen Genaustausch zur Entstehung von neuen Varianten (Achtman, 1998). In der vorliegenden Studie wurden drei von vier ET-15-Meningokokkenstämmen in der Kaserne Bayreuth an einem einzigen Sammeltag gefunden, wobei aber alle drei Stämme bei der Pulsfeldgelelektrophorese ein unterschiedliches Bandenmuster aufwiesen. Es scheint sich hier nicht um einen Stamm zu handeln, der von außen über einen „bottleneck“-Mechanismus eingeführt wurde und sich dann klonal innerhalb der Kaserne verbreitet hat, sondern um drei verschiedene Stämme, da die Stämme von Soldaten kurz nach Rekrutierung gewonnen wurden. In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, dass ein Bakterienstamm nach der Übertragung zwischen zwei Trägern innerhalb kürzester Zeit ein anderes Pulsfeldgelelektrophoresen-Bandenmuster zeigen können. Zudem wurde eine 40-kb-Deletionen mittels PFGE nachgewiesen, die während der Invasion eines Stammes vom Rachen in die Blutbahn entstand (Vogel *et al.*, 1998). Die Pulsfeldgelelektrophorese ist in diesen Fällen als hyperdiskriminierend einzuschätzen. Zumindest eines der 3 Bayreuther Isolate wich allerdings erheblich von den anderen beiden Trägerisolaten relativ stark ab, so dass hier nicht von einer so schnell erfolgten Mutation ausgegangen werden kann, zumal die Abstriche am Beginn des Grundwehrdienstes erfolgten, so dass mehrere, zeitlich aufeinander folgende horizontale Gentransfers und Deletionen ebenso wie auch große genetische Rearrangements unwahrscheinlich sind. Die Befunde lassen sich in folgendem Modell der Mikroevolution bayerischer ET-15-Meningokokken zusammenfassen (Abb. 8):

Abb. 8: Hypothetische Darstellung eines Modells des Imports von ET-15-Meningokokken nach Bayern mit anschließender klonaler Expansion.



5. Zusammenfassung

Neisseria meningitidis (Meningokokken) stellen einen häufigen Erreger von bakterieller Meningitis und generalisierter Sepsis bei Kleinkindern und Jugendlichen dar. Diese Bakterienspezies ist sehr kompetent für horizontalen DNA-Austausch durch Transformation, was zur einer sehr heterogenen Populationsstruktur führt. Innerhalb der Population gibt es wenige klonale Linien, die für die Mehrzahl der Erkrankungen verantwortlich sind, aber bei gesunden Trägern relativ selten gefunden werden. In den Achtziger Jahren trat ein hypervirulenter Klon in Kanada auf und war dort für die Mehrzahl der Erkrankungen verantwortlich. Dieser Klon wird als Elektrophoretischen Typ 15 (ET-15) bezeichnet und führt zu besonders schweren Erkrankungsverläufen, und einer hohen Letalität. In den Neunziger Jahren breitete sich dieser Klon in der Tschechischen Republik aus und trat 1998 im bayerischen Landkreis Rottal/Inn bei einem Ausbruch in Erscheinung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verbreitung von ET-15-Meningokokken unter 8000 Kindergartenkindern, Schülern und Bundeswehrsoldaten in elf Landkreisen und kreisfreien Städten sowie in sechs Bundeswehrkasernen untersucht. Die allgemeine Trägerrate an Meningokokken betrug 10,4%. Bei vier Probanden aus zwei Orten wurden ET-15-Meningokokken isoliert, was einer Trägerrate von 0,05% entspricht. Im Landkreis Rottal/ Inn wurden keine ET-15-Meningokokken gefunden. Während des Beobachtungszeitraumes ereigneten sich in Bayern vier Erkrankungsfälle durch diesen Bakterienklon. Der anschließende Vergleich der chromosomalen DNA mittels Pulsfeldgelelektrophorese nach *SpeI*-Verdau legte nahe, dass es sich bei den Trägerstämmen nicht um vier identische Klone handelte. Ebenso war kein gemeinsames Bandenmuster zwischen den vier Trägerisolaten und den vier Erkrankungsstämmen zu erkennen. Parallel dazu wurden die Träger- und Erkrankungsstämme mit identischen Referenzstämmen aus der Tschechischen Republik und aus Rottal/Inn verglichen, wobei sich auch hier kein gemeinsames DNA-Muster zeigte. Bei den Träger- als auch bei den Erkrankungsisolaten aus dem Untersuchungszeitraum in Bayern handelt es sich um neue Varianten des ET-15-Klones, die in Folge klonaler Expansion entstanden sein könnten. Die Inzidenz des ET-15-Trägertums in Bayern im Beobachtungszeitraum ist als niedrig einzuschätzen.

6. Literaturverzeichnis

- Aakre, R. K., Jenkins, A., Kristiansen, B.-E. and Froholm, L. O.:** Clonal Distribution of Invasive *Neisseria meningitidis* Isolates from the Norwegian County of Telemark, 1987 to 1995. *J. Clin. Microbiol.* 36(9) (1998) 2623-2628.
- Abdillahi, H. and Poolman, J. T.:** Whole-cell ELISA for typing *Neisseria meningitidis* with monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol. Lett.* 48 (1987) 367-371.
- Achtman, M.:** Microevolution during epidemic spread of *Neisseria meningitidis*. *Electrophoresis* 19(4) (1998) 593-596.
- Andersen, J., Berthelsen, L., Bech Jensen, B. and Lind, I.:** Dynamics of the meningococcal carrier state and characteristics of the carrier strains: a longitudinal study within three cohorts of military recruits. *Epidemiol. Infect.* 121 (1998) 85-94.
- Andrews, J. M. and Wise, R.:** In vitro susceptibility of *Neisseria meningitidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 45 (2000) 548.
- Arreaza, L, Fuente, L. De La and Vázquez, J.A.:** Antibiotic Susceptibility Patterns of *Neisseria meningitidis* Isolates from Patients and Asymptomatic Carriers. *J. antimicrob. Chemother.* 44 (2000) 1705-1707.
- Ashton, F. E., Ryan, J. A., Borczyk, A., Caugant, D. A., Mancino, L. and Huang, D.:** Emergence of a virulent clone of *Neisseria meningitidis* Serotype 2a that is associated with Meningococcal Group C Disease in Canada. *J. Clin. Microbiol.* 29 (1991) 2489-2493.
- Bash, M. C., Lesiak, K. B., Banks, S. D. and Frasch, C. E.:** Analysis of *Neisseria meningitidis* Class 3 Outer Membrane Protein Gene Variable Regions and Type Identification Using Genetic Techniques. *Infect. Immun.* 63 (1995) 1484-1490.
- Berrón, S., De La Fuente, L., Martín, E. and Vázquez, J. A.:** Increasing Incidence of Meningococcal Disease with a new Variant of Serogroup C. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17 (1998) 85-89.
- Bevanger, L., Bergh, K., Gisnas, G., Caugant, D. A. and Froholm, L.-O.:** Identification of nasopharyngeal carriage of an outbreak strain of *Neisseria meningitidis* by pulsed-field gel electrophoresis versus phenotypic methods. *J. Med. Microbiol.* (1998) 993-998.
- Block, C., Gdalevich, M., Buber, R., Ashkenazi, I., Ashkenazi, S. and Keller, N.:** Factors associated with pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* among Israel Defense Force personnel at the end of their compulsory service. *Epidemiol. Infect.* 122 (1999) 51-57.

- Borrow, R., Fox, A. J., Cartwright, K., Begg, N. T. and Jones, D. M.:** Salivary antibodies following parenteral immunization of infants with a meningococcal serogroup A and C conjugated vaccine. *Epidemiol. Infect.* 123 (1999) 201-208.
- Brandtzaeg, P., Bjerre, A., Ovstebo, R., Brunsletto, B., Joo, G.B. and Kierulf, P.:** *Neisseria meningitidis* lipopolysaccharides in human pathology. *J. Endotoxin Res.* 7 (2001) 401-420.
- Butcher, S., Sarvas, M. and Runeberg-Nyman, K.:** Class-3 porin protein of *Neisseria meningitidis*: cloning and structure of the gene. *Gene* 105 (1991) 125-128.
- Bygraves, J. A. and Maiden, M. C. J.:** Analysis of the clonal relationships between strains of *Neisseria meningitidis* by pulsed field gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.* 138 (1992) 523-531.
- Cann, K. J. and Rogers, T. R.:** Detection of antibodies to common antigens of pathogenic and commensal *Neisseria* species. *J. Med. Microbiol.* 30 (1989) 23-30.
- Cartwright, K.A.V., Stuart, J.M. and Robinson, P. M.:** Meningococcal carriage in close contacts of cases. *Epidemiol. Infect.* 106 (1991a) 133-141.
- Cartwright, K. A. V., Stuart, J. M., Jones, D. M. and Noah, N. D.:** The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. *Epidemiol. Infect.* 99 (1987) 591-601.
- Cartwright, K. A. V., Jones, D. M., Smith, A. J., Stuart, J. M., Kaczmarek, E. B. and Palmer, S. R.:** Influenza A and meningococcal disease. *Lancet* 338 (1991b) 554-557.
- Caugant, D.A.:** Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *APMIS* 106 (1998) 505-525.
- Caugant, D. A., Kristansen, B.-E., Froholm, L.-O., Bovre, K. and Selander, R. K.:** Clonal Diversity of *Neisseria meningitidis* from a Population of Asymptomatic Carriers. *Infect. Immun.* (1988) 2060-2068.
- Caugant, D. A., Hoiby, E. A., Rosenqvist, E., Froholm, L. O. and Selander, R. K.:** Transmission of *Neisseria meningitidis* among asymptomatic military recruits and antibody analysis. *Epidemiol. Infect.* 109 (1992) 241-253.
- Caugant, D.A., Mocca, L.F., Frasch, C.E., Froholm, L.O., Zollinger, W.D. and Selander, R.K.:** Genetic Structure of *Neisseria meningitidis* Populations in Relation to Serogroup, Serotype, and Outer Membrane Protein Pattern. *J. Bacteriol.* 169 (1987) 2781-2792.

- Caugant, D.A., Bovre, K., Gaustad, P., Bryn, K., Holten, E., Hoiby, E.A. and Froholm, L.-O.:** Multilocus Genotypes Determined by Enzyme Electrophoresis of *Neisseria meningitidis* Isolated from Patients with Systemic Disease and from Healthy Carriers. *J. Gen. Microbiol.* 132 (1986) 641-652.
- Claus, H., Maiden, M.C.J., Maag, R., Frosch, M. and Vogel, U.:** Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. *Microbiology* 148 (2002) 1813-1819.
- Connolly, M. and Noah, N.:** Is group C meningococcal disease increasing in Europe? A report of surveillance of meningococcal infection in Europe 1993-6. *Epidemiol. Infect.* 122 (1999) 41-49.
- Cunningham, R., Matthews, R., Lewendon, G., Harrison, S. and Stuart, J. M.:** Improved Rate of Isolation of *Neisseria meningitidis* by Direct Plating of Pharyngeal Swabs. *J. Clin. Microbiol.* 39(12) (2001) 4575-4576.
- Davies, A. L., O'Flanagan, D., Salmon, R. L. and Coleman, T. J.:** Risk factors for *Neisseria meningitidis* carriage in a school during a community outbreak of meningococcal infection. *Epidemiol. Infect.* 117 (1996) 259-266.
- Deuren, M. van, Brandtzaeg, P. and Meer, J. W. M. van der:** Update on Meningococcal Disease with Emphasis on Pathogenesis and Clinical Management. *Clin. Microbiol. Rev.* (2000) 144-166.
- Erickson, L. and Wals, P. De:** Complications and Sequelae of Meningococcal Disease in Quebec, Canada. *Clin. Infect. Dis.* 26 (1998) 1159-1164.
- Feavers, I. M., Suker, J., McKenna, A. J., Heath, A. B. and Maiden, M. C. J.:** Molecular Analysis of the Serotyping Antigens of *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 60 (1992) 3620-3629.
- Feavers, I. M., Fox, A. J., Gray, S., Jones, D. M. and Maiden, M. C. J.:** Antigenic Diversity of Meningococcal Outer Membrane Protein PorA Has Implications for Epidemiological Analysis and Vaccine Design. *Clin. Diagn. Lab. Immun.* 3(4)(1996) 444-450.
- Feavers, I. M., Gray, S. J., Urwin, R., Russell, J. E., Bygraves, J. A., Kaczmarek, E. B. and Maiden, M. C. J.:** Multilocus Sequence Typing and Antigen Gene Sequencing in the Investigation of a Meningococcal Disease Outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 37(12) (1999) 3883-3887.

- Feil, E. J., Maiden, M. C. J., Achtman, M. and Spratt, B. G.:** The Relative Contributions of Recombination and Mutation to the Divergence of Clones of *Neisseria meningitidis*. *Mol. Biol. Evol.* 16 (11) (1999) 1496-1502.
- Fernández, S., Arreaza, L., Santiago, I., Malvar, A., Berrón, S., Vazquez, J. A., Hervada, X. and Gestal, J. J.:** Carriage of a new epidemic strain of *Neisseria meningitidis* and its relationship with the incidence of meningococcal disease in Galicia, Spain. *Epidemiol. Infect.* 123 (1999) 349-357.
- Fijen, C. A. P., Kuijper, E. J., Dankert, J., Daha, M. R. and Caugant, D. A.:** Characterization of *Neisseria meningitidis* Strains Causing Disease in Complement-Deficient and Complement-Sufficient Patients. *J. Clin. Microbiol.* 36 (8) (1998) 2342-2345.
- Galimand, M., Gerbaud, G., Guibourdenche, M., Riou, JY and Courvalin, P.:** High-level chloramphenicol resistance in *Neisseria meningitidis*. *N. Engl. J. Med.* 339 (1998) 868-874.
- Gilmore, A., Jones, G., Barker, M., Soltanpoor, N. and Stuart, J. M.:** Meningococcal disease at the University of Southampton: outbreak investigation. *Epidemiol. Infect.* 123 (1999) 185-192.
- Gold, R., Goldschneider, M., Lepow, M. L., Draper, T. D. and Randolph M.:** Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in Infants and Children. *J. Infect. Dis.* 137 (1978) 112-121.
- Granoff, D.M., Moe, G.R., Giuliani, M.M., Adu-Bobie, J., Santini, L., Brunelli, B., Piccinetti, F., Zuno-Mitchell, P., Lee, S.S., Neri, P., Bracci, L., Lozzi, L. and Rappuoli, R.:** A Novel Mimetic Antigen Eliciting Protective Antibody to *Neisseria meningitidis*. *J. Immunol* 167 (2001) 6487-6496.
- Grzybowska, S., Tyski, L., Berthelsen, L. and Lind, I.:** Cluster Analysis of *Neisseria meningitidis* Type 22 Strains Isolated in Poland. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20 (2001) 243-247.
- Guibourdenche, M., Popoff, M. Y., Riou, J. Y.:** Desoxyribonucleic and Relatedness among *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N. lactamica*, *N. cinerea* and “*Neisseria polysaccharea*”. *Ann. Inst. Pasteur* 137B (1986) 177-185.
- Hammerschmidt, S., Hilse, R., Putten, J.P.M. van, Gerardy-Schahn, R., Unkmeir, A. and Frosch, M.:** Modulation of cell surface sialic acid expression in *Neisseria meningitidis* via a transposable genetic element. *EMBO* 15 (1996a) 192-198.

- Hammerschmidt, S., Müller, A., Sillmann, H., Mühlenhoff, M., Borrow, R., Fox, A., Putten, J. van, Zollinger, W.D., Gerady-Schahn, R. and Frosch, M.:** Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gen (siaD): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol. Microbiol.* 20 (1996b) 1211-1220.
- Hauri, A. M., Ehrhard, I., Frank, U., Ammer, J., Fell, G., Hamouda, O. and Petersen, L.:** Serogroup C meningococcal disease outbreak associated with discotheque attendance during carnival. *Epidemiol. Infect.* 124 (2000) 69-73.
- Imrey, P. B., Jackson, L. A., Ludwinski, P. H., England, A. C., Fella, G. A., Fox, B. C., Isdale, L. B., Reeves, M. W. and Wenger, J. D.:** Meningococcal Carriage, Alcohol Consumption, and Campus Bar Patronage in a Serogroup C Meningococcal Disease Outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 33(12) (1995) 3133-3137.
- Imrey, P. B., Jackson, L. A., Ludwinski, P. H., England, A. C., Fella, G. A., Fox, B. C., Isdale, L. B., Reeves, M. W. and Wenger, J. D.:** Outbreak of Serogroup C Meningococcal Disease Associated with Campus Bar Patronage. *Am. J. Epidemiol.* 143 (1996) 624-630.
- Jackson, L. A., Schuchat, A., Reeves, M. W. and Wenger, J. D.:** Serogroup C Meningococcal Outbreaks in the United States. *JAMA* 273 (1995) 383-389.
- Jelfs, J., Munro, R., Wedege, E. and Caugant, D. A.:** Sequence Variation in the porA Gene of a Clone of *Neisseria meningitidis* during Epidemic Spread. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* (5) (2000b) 390-395.
- Jelfs, J., Munro, R., Ashton, F.E. and Caugant, D.A.:** Genetic characterization of a new variant within the ET-37 complex of *Neisseria meningitidis* associated with outbreaks in various parts of the world. *Epidemiol. Infect.* 125 (2000a) 285-298.
- Jóðar, L., Feavers, I. M., Salisbury, D. and Granoff, D. M.:** Development of vaccines against meningococcal disease. *Lancet* 359 (2002) 1499-1508.
- Jolley, K. A., Kalmusova, Feil, E. J., Gupta, S., Musilek, M., Kriz, P. and Maiden, M. C. J.:** Carried Meningococci in the Czech Republic: a Diverse Recombining Population. *J. Clin. Microbiol.* 38(12) (2000) 4492-4498.
- Jolley, K. A., Kalmusova, Feil, E. J., Gupta, S., Musilek, M., Kriz, P. and Maiden, M. C. J.:** Author's Correction Carried Meningococci in the Czech Republic: a Diverse Recombining Population. *J. Clin. Microbiol.* 40 (9) (2002) 3549-3550.
- Jones, D.:** Epidemiology of Meningococcal Disease In Europe and the USA. In: **Cartwright, K. (Ed.):** Meningococcal disease. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, England (1995) 144-158.

- Jones, G. R., Christodoulides, M., Brooks, J. L., Miller, A. R. O., Cartwright, K. A. V. and Heckels, J. E.:** Dynamics of Carriage of *Neisseria meningitidis* in a Group of Military Recruits: Subtype Stability and Specificity of the Immune Response following Colonization. *J. Infect. Dis.* 178 (1998) 451-459.
- Kertesz, D. A., Coulthart, M. B., Ryan, J. A., Johnson, W. M. and Ashton, F. E.:** Serogroup B, Electrophoretic Type 15 *Neisseria meningitidis* in Canada. *J. Infect. Dis.* 177 (1998) 1754-1757.
- Klein, N. J., Ison, A., Peakman, M., Levin, M., Hammerschmidt, S., Frosch, M. and Heyderman, R. S.:** The Influence of Capsulation and Lipooligosaccharide Structure on Neutrophil Adhesion Molecule Expression and Endothelial Injury by *Neisseria meningitidis*. *J. Infect. Dis.* 173 (1996) 172-179.
- Krasinski, K., Nelson, J. D., Butler, S. Luby, J. P. and Kusmiesz, H.:** Possible Association of Mycoplasma and viral respiratory infections with bacterial meningitis. *Am. J. Epidemiol.* 125 (1987) 499-508.
- Kremastinou, J., Tzanakaki, G., Velonakis, E., Voyiatzi, A., Nickolaou, A., Elton, R. A., Weir, D. and Blackwell, C.:** Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* among ethnic Greek school children from Russian immigrant families in Athens. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 23 (1999) 13-20.
- Kristiansen, B.-E., Tveten, Y. and Jenkins, A.:** Which contacts of patients with meningococcal disease carry the pathogenic strain of *Neisseria meningitidis*? A population based study. *BMJ* 317 (1998) 621-625.
- Kriz, P., Vlcikova, J. and Bobak, M.:** Targeted vaccination with meningococcal polysaccharide vaccine in one district of the Czech Republic. *Epidemiol. Infect.* 115 (1995) 411-418.
- Kriz, P., Kriz, B., Svandova, E. and Musilek, M.:** Antimeningococcal herd immunity in the Czech Republic – influence of an emerging clone, *Neisseria meningitidis* ET-15/37. *Epidemiol. Infect.* 123 (1999a) 193-200.
- Kriz, P., Musilek, M., Skoczynska, A. and Hryniewicz, W.:** Genetic and Antigenetic Characteristics of *Neisseria meningitidis* Strains Isolated in the Czech Republic in 1997-1998. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19 (2000) 452-459.
- Kriz, P., Giorgini, D., Musilek, M., Larribe, M. and Taha, M.-K.:** Microevolution through DNA exchange among strains of *Neisseria meningitidis* isolated during an outbreak in the Czech Republic. *Res. Microbiol.* 150 (1999b) 273-280.

- Krizova, P. and Musilek, M.:** Changing Epidemiology of Meningococcal invasive disease in the Czech Republic caused by new clone *Neisseria meningitidis* C:2a:P1.2(P1.5), ET-15/37. *Centr. Eur. J. Publ. Hlth.* 3 (1995) 189-194.
- Krizova, P., Musilek, M. and Kalmusova, J.:** Development of the epidemiological situation in invasive meningococcal disease in the Czech Republic caused by emerging *Neisseria meningitidis* clone ET-15/37. *Centr. Eur. J. Publ. Hlth.* 5 (1997) 214-218.
- Ley, P. van der, Heckels, J. E., Virji, M., Hoogerhout, P. and Poolman, J. T.:** Topology of Outer Membrane Porins in Pathogenic *Neisseria* spp. *Infect. Immun.* 59 (1991) 2963-2971.
- Linde, H., Glück, T., Metz, M., Reng, C., Erlmeier, S. and Lehn, N.:** Six Different Strains of *Neisseria meningitidis* in a Case with Meningococcal Sepsis and Five Contact Persons in a Boys' Home. *Infection* 28 (2000) 157-160.
- Maiden, M. C. J. and Spratt, B. G. :** Meningococcal conjugate vaccines: new opportunities and new challenges. *Lancet* 354 (1999) 615-616.
- Maiden, M. C. J., Suker, J., McKenna, A. J., Bygraves, J. A. and Feavers, I. M.:** Comparison of the class 1 outer membrane proteins of eight serological reference strains of *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* 5 (3) (1991) 727-736.
- Maiden, M. C. J., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtmann, M. and Spratt, B. G.:** Multilocus sequence typing : A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 3140-3145.
- Maiden, M.C.J. and Stuart, J.M.:** Carriage of serogroup C meningococci 1 year after meningococcal C conjugate polysaccharide vaccination. *Lancet* 359 (2002) 1829-1830.
- Martin, J. E. and Lewis, J. S.:** anisomycin: improved antimycotic activity in modified Thayer-Martin medium. *Public Health Lab.* 35 (1977) 53-62.
- Mayer, L. W., Reeves, M. W., Al-Hamdan, N., Sacchi, C. L., Taha, M.-K., Ajello, G. W., Schmink, S. E., Noble, C. A., Tondella, M. L. C., Whitney, A. M., Al-Mazrou, Y., Al-Jefri, M., Mishkhis, A., Sabban, S., Caugant, D. A., Lingappa, J., Rosenstein, N. E. and Popovic, T.:** Outbreak of W135 Meningococcal Disease in 2000: Not Emergence of a New W135 Strain but Clonal Expansion within the Electrophoretic Type-37 Complex. *J. Infect. Dis.* 185 (2002) 1596-1605.
- Merino, J., Rodriguez-Valverde, V., Lamelas, J. A., Riestra, J. L. and Casanueva, B.:** Prevalence of Deficits of Complement Components in Patients with Recurrent Meningococcal Infections. *J. Infect. Dis.* 148 (1983) 331.

- Michaelsen, T.E., Aase, A., Kolberg, J., Wedge, E. and Rosenqvist, E.:** PorB3 outer membrane protein on *Neisseria meningitidis* is poorly accessible for antibody binding on live bacteria. *Vaccine* 19 (2001) 1526-1533.
- Mitchell, M. S., Rhoden, D. L. and King, E. O.:** Lactose-Fermenting Organisms Resembling *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* 90 (1965) 560.
- Murakami, K., Gotschlich, E. C. and Seiff, M. E.:** Cloning and Characterization of the Structural Gene for the Class 2 Protein of *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 57 (1989) 2318-2323.
- N.N.:** Erkrankungen durch Meningokokken der Serogruppe C: Örtliche Häufung führte zu einer öffentlichen Impfpfhlung. *Epidemiologisches Bulletin* 21 (2002a) 175-177.
- N.N.:** Teil 1: Invasive Meningokokken-Erkrankungen, Deutschland 2001. *Epidemiologisches Bulletin* 33 (2002b) 277-281.
- Neal, K. R., Nguyen-Van-Tam, J. S., Slack, R. C. B., Kaczmarek, E. B., White, A. and Ala'Aldeen, D. A. A.:** Seven-week interval between acquisition of meningococcus and the onset of invasive disease. A case report. *Epidemiol. Infect.* 123 (1999) 507-509.
- Nelson, J. D.:** Jails, Microbes, and the three-foot barrier. *Lancet* 335 (1996) 885-886.
- Olcén, P., Kjellander, J., Danielsson, D. and Lindquist, B. L.:** Culture diagnosis of meningococcal carriers: yield from different sites and influence of storage in transport medium. *J. Clin. Pathol.* 32 (1979) 1222-1225.
- Olsen, S. F., Djurhuus, B., Rasmussen, K., Joensen, H. D., Larsen, S. O., Zoffman, H. and Lind, I.:** Pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in households with infants within areas with high and low incidences of meningococcal disease. *Epidemiol. Infect.* 106 (1991) 445-457.
- Parkhill, J., Achtman, M., James, K. D., Bentley, S. D., Churcher, C., Klee, S. R., Morelli, G., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Davies, R. M., Davis, P., Devlin, K., Feltwell, T., Hamlin, N., Holroyd, S., Jagels, K., Leather, S., Moule, S., Mungall, K., Quail, M. A., Rajandream, M.-A., Rutherford, K. M., Simmonds, M., Skelton, J., Whitehead, S., Spratt, B. G. and Barrell, B. G.:** Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491. *Nature* 404 (2000) 502-506.
- Pereiró, I., Díez-Domingo, J., Morant, A., Gimeno, C., Lerma, M., San-Martin, M. and González, A.:** Epidemiological Pattern of Meningococcal Disease in Valencia, Spain. Impact of a Mass Immunization Campaign with Meningococcal C Polysaccharide Vaccine. *Scand. J. Infect. Dis.* 33 (2001) 581-584.

- Pizza, M., Scarlato, V., Masignani, V., Giuliani, M. M., Arico, B., Comanducci, M., Jennings, G. T., Baldi, L., Bartolini, E., Capecchi, B., Galeotti, C. L., Luzzi, E., Manetti, R., Marchetti, E., Mora, M., Nuti, S., Ratti, G., Santini, L., Savino, S., Scarselli, M., Storni, E., Zuo, P., Broeker, M., Hundt, E., Knapp, B., Blair, E., Mason, T., Tettelin, H., Hood, D. W., Jeffries, A. C., Saunders, N. J., Granoff, D. M., Venter, J. C., Moxon, E. R., Grandi, G and Rappuoli, R.:** Identification of Vaccine Candidates Against Serogroup B Meningococcus by Whole-Genome Sequencing. *Science* 287 (2000) 1816-1820.
- Popovic, T., Schmink, S., Rosenstein, N.A., Ajello, G.W., Reeves, M.W., Plikaytis, B., Hunter, S.B., Ribot, E.M., Boxrud, D., Tondella, M.L., Chung, K., Noble, C., Mothershed, E., Besser, J. and Perkins, B.A.:** Evaluation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis in Epidemiological Investigations of Meningococcal Disease Outbreaks caused by *Neisseria meningitidis* Serogroup C. *J. Clin. Microbiol.* 39(1) (2001) 75-85.
- Quagliarello, V.J. and Scheld, W.M.:** Treatment of Bacterial Meningitis. *NEJM* 336(10) (1997) 708-716.
- Ramsay, M.E., Andrews, N., Kaczmarski, E.B. and Miller, E.:** Efficacy of meningococcal serogroup C conjugate vaccine in teenagers and toddlers in England. *Lancet* 357 (2001) 195-196.
- Ramsay, M.E., Andrews, N.J., Trotter, C.L., Kaczmarski, E.B. and Miller, E.:** Herd immunity from meningococcal serogroup C conjugate vaccination in England: database analysis. *BMJ* 326 (2003) 365-366.
- Riesbeck, K., Orvelid-Mölling, P., Fredlund, H. and Olcén, P.:** Long-Term Persistence of a Discotheque-Associated Invasive *Neisseria meningitidis* Group C Strain as Proven by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and porA Gene Sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 38 (4) (2000) 1638-1640.
- Riordan, T., Cartwright, K., Andrews, N., Stuart, J., Burris, A., Fox, A., Borrow, R., Douglas-Riley, T., Gabb, J. and Miller, A.:** Acquisition and carriage of meningococci in marine commando recruits. *Epidemiol. Infect.* 121 (1998) 495-505.
- Robki, B., Mazarin, V., Maitre-Wilmotte, G. and Quentin-Millet, M.-J.:** Identification of two major families of transferrin receptor among *Neisseria meningitidis* strains based on antigenic and genomic features. *FEMS Microbiol. Lett.* 110 (1993) 51-58.

- Robki, B., Renauld-Mongenien, G., Mignon, M., Danve, B., Poncet, D., Chabanel, C., Caugant, D.A. and Quentin-Millet, M.-J.:** Allelic Diversity of the Two Transferrin Binding Protein B Gene Isotypes among a Collection of *Neisseria meningitidis* Strains Representative of Serogroup B Disease: Implication for the Composition of a Recombinant TbpB-Based Vaccine. *Infect. Immun.* 68 (2000) 4938-4947.
- Ronne, T., Berthelsen, L. Buhl, L. H. and Lind, I.:** Comparative Studies on Pharyngeal Carriage of *Neisseria meningitidis* during a Localized Outbreak of Serogroup C Meningococcal Disease. *Scand. J. Infect. Dis.* 25 (1993) 331-339.
- Rosenqvist, E., Hoiby, E.A., Wedege, E., Bryn, K., Kolberg, J., Klem, A., Ronnild, E., Bjune, G. and Nokleby, H.:** Human Antibody Responses to Meningococcal Outer Membrane Antigens after Three Doses of the Norwegian Group B Meningococcal Vaccine. *Infect. Immun.* 63 (1995) 4642-4652.
- Rosenstein, N. E., Stocker, S. A., Popovic, T., Tenover, F. C., Perkins, B. A. and the Active Bacterial Core Surveillance (ABCs) Team:** Antimicrobial Resistance of *Neisseria meningitidis* in the United States, 1997. *Clin. Infect. Dis.* 30 (2000) 212-213.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.:** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (1977) 5463-5467.
- Schwartz, B.:** Chemoprophylaxis for Bacterial Infections: Principles of and Application to Meningococcal Infections. *Rev. Infect. Dis.* 13(Suppl.2) (1991) S170-S173.
- Selander, R. K., Caugant, D. A., Ochsmann, H., Musser, J. M., Gilmour, M. N. and Whittam, T. S.:** Methods of Multilocus Enzyme Electrophoresis for Bacterial Population Genetics and Systematics. *Appl. Env. Microbiol.* 51 (5) (1986) 873-884.
- Sim, R.J., Harrison, M.M., Moxon, E.R. and Tang, C.M.:** Underestimation of meningococci in tonsillar tissue by nasopharyngeal swabbing. *Lancet* 356 (2000) 1653-1654.
- Simmons, G., Jones, N. and Calder, L.:** Equivalence of ceftriaxone and rifampicin in eliminating nasopharyngeal carriage of serogroup B *Neisseria meningitidis*. *J. Antimicrob. Chemoth.* 45 (2000a) 909-911.
- Simmons, G., Martin, D, Stewart, J. and Bremner, D.:** Carriage of *N. lactamica* in a population at high risk of meningococcal disease. *Epidemiol. Infect.* 125 (2000b) 99-104.
- Simmons, G., Stewart, M. J., Jones, N. Calder, L. and Bremner, D.:** Carriage of *Neisseria meningitidis* among Household Contacts of Patients with Meningococcal Disease in New Zealand. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20 (2001) 237-242.

- Smith, I., Lehmann, A. K., Lie, L., Digranes, A., Caugant, D. A., Hoiby, E. A., Froholm, L. O. and Halstensen, A.:** Outbreak of meningococcal disease in western Norway due to a new serogroup C variant of the ET-5 clone: effect of vaccination and selective carriage eradication. *Epidemiol. Infect.* 123 (1999) 373-382.
- Sörensen, H. T., Nielsen, G. L., Schönheyder, H. C., Steffensen, F. H., Hansen, I., Sabroe, S., Dahlerup, J. F., Hamburger, H. and Olsen, J.:** Outcome of Pre-hospital Antibiotic Treatment of Meningococcal Disease. *J. Clin. Epidemiol.* 51 (9) (1998) 717-721.
- Spratt, B.G. and Maiden, M.C.J.:** Bacterial population genetics, evolution and epidemiology. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 354 (1999) 701-710.
- Stanwell-Smith, R. E., Stuart, J. M., Hughes, A. O., Robinson, P., Griffin, M. B. and Cartwright, K.:** Smoking, the environment and meningococcal disease: a case control study. *Epidemiol. Infect.* 112 (1994) 315-328.
- Stefanelli, P., Fazio, C., La Rosa, G., Marianelli, C., Muscillo, M. and Mastrantonio, P.:** Rifampicin-resistant meningococci causing invasive disease: detection of point mutations in the *rpoB* gene and molecular characterization of the strains. *J. Antimicrob. Chemoth.* 47 (2001) 219-222.
- Strathdee, C. A., Tyler, S. D., Ryan, J. A., Johnson, W. M. and Ashton, F. E.:** Genomic Fingerprinting of *Neisseria meningitidis* associated with Group C Meningococcal Disease in Canada. *J. Clin. Microbiol.* 31(9) (1993) 2506-2508.
- Stuart, J. M., Cartwright, K. A., Jones, D. M., Noah, N.D., Wall, R.J., Blackwell, C.C., Jephcott, A.E. and Ferguson, I.R.:** An outbreak of meningococcal disease in Stonehouse: planning execution of a large-scale survey. *Epidemiol Infect.* 99 (3) (1987) 579-589.
- Stuart, J. M., Cartwright, K. A. V., Robinson, P. M. and Noah, N. D.:** Effect of Smoking on Meningococcal carriage. *Lancet* (1989) 723-725.
- Swaminathan, B., Matar, G.M., Reeves, M.W., Graves, L.M., Ajello, G., Bibb, W.F., Helsel, L.O., Morales, M., Dronavalli, H., El-Swify, M., Witt, W. De and Hunter, S.B.:** Molecular Subtyping of *Neisseria meningitidis* Serogroup B: Comparison of Five Methods. *J. Clin. Microbiol.* 34(6) (1996) 1468-1473.
- Swartley, J. S., Marfin, A. A., Edupuganti, S., Liu, L.-J., Cieslak, P., Perkins, B., Wenger, J. D. and Stephens, D. S.:** Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (1997) 271-276.
- Taha, M.-K., Bichier, E., Perrocheau, A. and Alonso, J.-M.:** Circumvention of Herd Immunity during an Outbreak of Meningococcal Disease Could Be Correlated to Escape Mutation in the *porA* Gene of *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 69(3) (2001) 1971-1973.

- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H. and Swaminathan, B.:** Interpreting Chromosomal DNA restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrohoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J. Clin. Microbiol.* 33(9) (1995) 2233-2239.
- Tettelin, H., Saunders, N. J., Heidelberg, J., Jeffries, A. C., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Ketchum, K. A., Hood, D. W., Peden, J. F., Dodson, R. J., Nelson, W. C., Gwinn, M. L., Boy, R. De, Peterson, J. D., Hickey, E. K., Haft, D. H., Salzberg, S. L., White, O., Fleischmann, R. D., Dougherty, B. A., Mason, T., Ciecko, A., Parksey, S., Blair, E., Citti, H., Clark, E. B., Cotton, M. D., Utterback, T. R., Khouri, H., Qin, H., Vamathevan, J., Gill, J., Scarlato, V., Masignani, V., Pizza, M., Grandi, G., Sun, L., Smith, H. O., Fraser, C. M., Moxon, E. R., Rappuoli, R. and Venter, J. C.:** Complete Genome Sequence of *Neisseria meningitidis* Serogroup B Strain MC58. *Science* 287 (2000) 1809-1815.
- Thompson, E.A.L., Feavers, I.M. and Maiden, M.C.J.:** Antigenic diversity of meningococcal enterobactin receptor FetA, a vaccine component. *Microbiology* 149 (2003) 1849-1858.
- Tribe, D. E., Zaia, A. M., Griffith, J. M., Robinson, P. M., Li, H. Y., Taylor, K. N. and Hogg, G. G.:** Increase in meningococcal disease associated with the emergence of a novel ST-11 variant of serogroup C *Neisseria meningitidis* in Victoria, Australia, 1999-2000. *Epidemiol. Infect.* 128 (2002) 7-14.
- Tsai, C.-M., Frasch, C. E. and Mocca, L. F.:** Five Structural Classes of Major Outer Membrane Proteins in *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* 146 (1981) 69-78.
- Tyski, S., Grzybowska, W., Dulny, G., Berthelsen, L. and Lind, I.:** Phenotypical and Genotypical Characterization of *Neisseria meningitidis* Carrier Strains Isolated from Polish Recruits in 1998. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20 (2001) 350-353.
- Vedros, N. A.:** Development of Meningococcal Serogroups. In Vedros, N. A. (Ed.): *Evolution of meningococcal disease.* (1987) Boca Raton, Fla. USA
- Verdú, M.E., Coll, P., Vázquez, J.A., March, F., Fontanals, D., Berrón, S., Pons, I., Esso, D. van and Prats, G.:** Association between asymptomatic carriage and sporadic (endemic) meningococcal disease in an open community. *Epidemiol. Infect.* 127 (2001) 245-259.

- Verheul, A.F.M., Snippe, H. and Poolman, J.T.:** Meningococcal Lipopolysaccharides: Virulence Factor and Potential Vaccine Component. *Microbiol. Rev.* 57 (1993) 34-49.
- Vieusseux, M.:** Memoire sur la maladie qui a régné à Genève au printemps de 1805. *J. Méd. Chir. Pharmacol* 11 (1806) 163-182.
- Virji, M., Alexandrescu, C., Ferguson, D. J. P., Saunders, J. R. and Moxon, E. R.:** Variations in the expression of pili: the effect on adherence of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. *Mol. Microbiol.* 6 (10) (1992) 1271-1279.
- Vogel, U. and Frosch, M.:** Mechanisms of neisserial serum resistance. *Mol. Microbiol.* 32 (6) (1999) 1133-1139.
- Vogel, U. and Frosch, M.:** Infant Rat Model of meningitis. In: **Zak, O. and Sande, M. (Ed.):** Experimental Models in Antimicrobial Chemotherapy. Academic Press, London (1999) 619-626.
- Vogel, U., Claus, H. and Frosch, M.:** Rapid serogroup switching in *Neisseria meningitidis*. *N. Engl. J. Med.* 342(3) (2000a) 219-220.
- Vogel, U., Claus, H., Frosch, M. and Caugant, D.A.:** Molecular Basis for Distinction of the ET-15 clone within the ET-37 Complex of *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Microbiol.* 38(2) (2000b) 941-942.
- Vogel, U., Morelli, G., Zurth, K., Claus, H., Kriener, E., Achtman, M. and Frosch, M.:** Necessity of Molecular Techniques to Distinguish between *Neisseria meningitidis* Strains Isolated from Patients with Meningococcal Disease and from Their Healthy Contacts. *J. Clin. Microbiol.* 36(9) (1998) 2465-2470.
- Vries, F. P. De, Cole, R., Dankert, J., Frosch, M. and Putten, J. P. M. van:** *Neisseria meningitidis* producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors. *Mol. Microbiol.* 27 (6) (1998) 1203-1212.
- Wals, P. De, Serres, G. De and Niyonsenga, T.:** Effectiveness of a mass immunization campaign against serogroup C meningococcal disease in Quebec. *JAMA* 285 (2001) 177-181.
- Wals, P. De, Dionne, M., Douville-Fradet, M., Boulianne, N., Drapeau, J. and Serres, G. De:** Impact of a mass immunization campaign against serogroup C meningococcus in the Province of Quebec, Canada. *Bull. World Health Organ.* 74 (4) (1996) 407-411.
- Wang, J.-F., Caugant, D. A., Morelli, G., Koumare, B. and Achtman, M.:** Antigenetic and Epidemiologic Properties of the ET-37 Complex of *Neisseria meningitidis*. *J. Infect. Dis.* 167 (1993) 1320-1329.
- Weichselbaum, A.:** Ueber die Aetiologie der akuten Meningitis cerebro-spinalis. *Fortschr. Med.* 5 (1887) 573-583.

-
- Whalen, C. M., Hockin, J. C., Ryan, A. and Ashton, F.:** The Changing Epidemiology of Invasive Meningococcal Disease in Canada, 1985 Through 1992. *JAMA* 273 (1995) 390-394.
- Xia, M., Roberts, M.C., Whittington, W.L., Holmes, K.K., Knapp, J.S., Dillon, J.R. and Wi, T.:** *Neisseria gonorrhoeae* with decreased susceptibility to ciprofloxacin: pulsed-field gel electrophoresis typing of strains from North America, Hawaii, and the Philippines. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 (1996) 2439-2440.
- Zapata, G. A., Vann, W. F., Rubinstein, Y. and Frasch, C. E.:** Identification of variable region differences in *Neisseria meningitidis* class 3 protein sequences among five group B serotypes. *Mol. Microbiol.* 6 (1992) 3493-3499.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
C	Celsius
CHEF-TE	Tris-HCl-EDTA-Puffer
cnl	Kapselnull-Lokus
cps	Kapselsynthese-Gencluster
ctr	Gen für Kapseltransport
DIC	Disseminierte intravaskuläre Gerinnung
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Mischung aus Desoxyribonukleosidtriphosphaten aATP, dCTP, dGTP, dTTP
EC	Tris-HCl-NaCl-EDTA-Brij-Desoxycholat-Puffer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES	N-Lauroylsarcosin-EDTA-Puffer
ET	elektrophoretischer Typ
fetA	Enterobactin-Rezeptor
fumC	Fumerase C
G	Guanin
GEBS	Glycerin/EDTA/Bromphenolblau/N-Lauroylsarkosin
h	Stunden
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
kb	Kilobasenpaare
lip	Gen für Kapselmodifikation
LPS	Lipopolysaccharide
μ	mikro
m	milli
M	molar
MLEE	Multilokus-Enzymelektrophorese
MLST	Multilokus-Sequenztypisierung
n	Anzahl
n	nano
NG	keiner Serogruppe zuzuordnen
NRZ	Nationales Referenzzentrum
NST	keinem Serosubtypen zuzuordnen

NT	keinem Serotypen zuzuordnen
OMP	Protein der äußeren Zellmembran
OMV	äußere-Membran-Vesikel
ONPG	σ -Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pdhC	Phosphodehydrogenase C
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pgm	Phosphoglucomutase
porA	Porin A
porB	Porin B
RAPD	<i>Randomly amplified polymorphic DNA analysis</i>
RFLP	Restriktionslängenpolymorphismus
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
sia	Gen für Polysialinsäure-Synthese
ST	Sequenztyp
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TbPa	Tranferrin-bindendes Protein A
TbPb	Tranferrin-bindendes Protein B
TE	Tris-HCl-EDTA-Puffer
TEN	Tris-HCl-EDTA-NaCl-Puffer
tex	bislang unbekannte Region des Kapselsynthese-Komplexes
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
VR	variable Region
WCE	<i>Whole-cell enzyme immunoassay</i>

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Herrn Professor Dr. med. Ulrich Vogel am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Ulrich Vogel für die Überlassung des sehr interessanten Themas und seine fortwährende Bereitschaft, diese Arbeit zu fördern.

Herzlichen Dank auch an den Vorstand des Institutes für Hygiene und medizinische Mikrobiologie, Herrn Professor Dr. med. Matthias Frosch für die Möglichkeit an seinem Institut diese Arbeit durchführen zu können.

Außerdem danke ich hiermit Herrn Professor Dr. med. dent. Ulrich Schlagenhaut für das Korreferat dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Heike Claus und Frau Gabi Heinze für die gründlichen Einweisungen in die praktische Laborarbeit und das dazugehörigen theoretische Wissen.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Dr. med. Dirk Alber und Herr Dr. med. Marc Oberkötter für die tatkräftige Unterstützung beim Sammeln der Bakterienstämme.

Ich danke Herr Dr. med. Johannes Elias für das Erstellen der Landkarte auf Seite 41 mit dem Programm Regiograph.

Des Weiteren bedanke ich mich bei der Firma bei der Firma Becton-Dickinson für die kostenlose Bereitstellung der Martin-Lewis-Agarplatten und der apiNH.

Nicht zuletzt gilt mein herzlicher Dank meinem Vater Willi Hessler, der mir meinen beruflichen Werdegang ermöglicht und mich zu jeder Zeit hilfreich unterstützt hat.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Frank Hessler
Wohnort: Lanzinger Str. 7
63599 Biebergemünd

Geburtstag und -ort: 05.10.1975 in Gelnhausen
Familienstand: ledig, keine Kinder

Schulbildung

08/1982 – 06/1986 Grundschule Biebertal Biebergemünd-Bieber
08/1986 – 06/1992 Kreisrealschule Gelnhausen
08/1992 – 06/1995 Berufliches Gymnasium für Chemietechnik Ludwig-Geissler-Schule
Hanau, Abschluss: allgemeine deutsche Hochschulreife

Zivildienst

09/1995 – 09/1996 Krankenpflegerhelfer Unfallchirurgie Kreiskrankenhaus Gelnhausen

Hochschulausbildung

10/1996 – 09/1998 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-
Maximilians-Universität Würzburg
10/1998 – 03/2003 Klinisches Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-
Maximilians-Universität Würzburg

Prüfungen

09/1998 Ärztliche Vorprüfung
08/1999 1. Staatsexamen
03/2002 2. Staatsexamen
06/2003 3. Staatsexamen

Famulaturen

09/1999 Innere Medizin, Prof. Dr. med. von Lilienfeld-Toal, Main-Kinzig-
Kliniken Gelnhausen
09/2000 Chirurgie, Prof. Dr. med. Valesky, Klinikum der Stadt Hanau
03/2001 Radiologie, Gemeinschaftspraxis Dres. med. Ballreich/Krauß,
Gelnhausen
08/2001 Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Prof. Dr. med. Helms, Universitäts-HNO-
Klinik, Würzburg

Praktisches Jahr

04/2002 – 06/2002 Unfallchirurgie, Prof. Dr. med. Friedl, Klinikum Aschaffenburg
06/2002 – 08/2002 Allgemeinchirurgie, Prof. Dr. med. Engemann, Klinikum
Aschaffenburg
08/2002 – 10/2002 Kardiologie, Prof. Dr. med. Uebis, Klinikum Aschaffenburg
10/2002 – 12/2002 Gastroenterologie, Prof. Dr. med. Fischbach, Klinikum Aschaffenburg
12/2002 – 03/2003 Dermatologie, Prof. Dr. med. Bröcker, Universitäts-Hautklinik
Würzburg

06/2003 **Erlaubnis für die Tätigkeit als AIP**

09/2003 - 09/2004 **Arzt im Praktikum (AIP)**
Dermatologie, Prof. Dr. med. Wassilew, Klinikum Krefeld

10/2004 **Erteilung der ärztlichen Approbation**

seit 10/2004 **Assistenzarzt**
Dermatologie, Prof. Dr. med. Wassilew, Klinikum Krefeld

Biebergemünd, 09.01.2005

A handwritten signature in black ink, reading "Frank Hessler". The signature is written in a cursive, flowing style.

Frank Hessler