

**Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. M. Frosch

**Vergleich der Bakterienlast in vivo und Wachstumskinetik
in vitro hyperletaler Meningokokkentypen**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Karolin Leitenberger

aus

München

Würzburg, korrigierte Version September 2019

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. habil. Johannes Elias

Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. med. Martina Prelog

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 05.03.2020

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Allgemeines zu <i>Neisseria meningitidis</i>	1
1.2	Serogruppen.....	1
1.3	Erkrankungsspektrum.....	1
1.4	Erregernachweis und Typisierung.....	2
1.5	Therapie.....	3
1.6	Prävention.....	3
1.7	Trägertum versus Invasivität.....	3
1.8	Risikofaktoren.....	4
1.9	Immunantwort.....	4
1.10	Virulenzfaktoren.....	5
1.11	Genotyp und Virulenz.....	6
1.11.1	Hyperletale Feintypen.....	7
1.12	Einfluss der Bakterienlast und der Krankheitsmanifestation auf die Letalität.....	7
1.12.1	Optische Dichte als Maß für die Bakterienlast.....	8
1.13	Hypothesen.....	8
2	Material und Methoden.....	10
2.1	qPCR-Verfahren zur Bestimmung der Bakterienlast.....	10
2.1.1	Herstellung der Positivkontrolle und des Standards.....	11
2.1.2	Evaluierung der Testung bereits vorhandener Eluate.....	11
2.1.3	Reaktionsansatz.....	12
2.1.4	Bestimmung der Bakterienlast.....	13
2.1.5	Nachweisgrenze.....	14
2.2	Bestimmung von Wachstumsgeschwindigkeit (μ) und Kapazität (A) hyperletaler Feintypen.....	15
2.2.2	Versuchsablauf.....	18
2.2.3	Erfassung der Messparameter und deren Auswertung.....	19
2.3	Weitere Software.....	20

2.4	Statistische Analyse	21
3	Ergebnisse.....	22
3.1	qPCR-Verfahren	22
3.1.1	Bakterienlast und Krankheitsausgang (Tod versus Überleben).....	22
3.1.2	Bakterienlast und klinisches Bild.....	23
3.1.3	Bakterienlast und Serogruppe.....	24
3.1.4	Bakterienlast und Feintyp.....	25
3.1.5	Rohdaten der qPCR	27
3.2	Wachstumsversuche	31
3.2.1	Invasive versus nicht-invasive Sequenztypen	31
3.2.2	Hyperletale Feintypen versus Kontrollstämmen	33
3.2.3	Rohdaten der Wachstumsversuche	35
4	Diskussion	37
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	37
4.2	Diskussion des Messverfahrens (qPCR-Methode)	39
4.2.1	Einfluss der antibiotischen Therapie auf die Bakterienlast.....	39
4.2.2	Einfluss des Probenmaterials und des Probenalters auf die Analyse	40
4.2.3	Sensitivität und Spezifität der Primer	40
4.2.4	Limitationen der Stichprobe	41
4.3	Diskussion der Ergebnisse (qPCR-Methode)	41
4.3.1	Bakterienlast und Krankheitsausgang sowie klinisches Bild.....	41
4.3.2	Bakterienlast und Serogruppe.....	44
4.3.3	Bakterienlast und Feintyp.....	45
4.3.4	Abschließender Vergleich mit anderen Studien und analytische Sensitivität	45

4.4	Diskussion der kontinuierlichen Absorptionsmessung im Mikrotiterplattenleser (TECAN-Reader)	45
4.4.1	Vorteile der kontinuierlichen Absorptionsmessung	46
4.4.2	Limitationen der Wachstumsversuche	47
4.5	Diskussion der Ergebnisse (TECAN-Reader)	47
4.5.1	Invasive versus nicht-invasive Sequenztypen	47
4.5.2	Hyperletale Feintypen versus Kontrollstämme	48
4.6	Ausblick	49
5	Zusammenfassung	50
6	Verzeichnisse	52
6.1	Literaturverzeichnis	52
6.2	Abbildungsverzeichnis	56
6.3	Tabellenverzeichnis	57
7	Anhang	58
7.1	Änderungsliste	58

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaar
cc	klonaler Komplex
<i>cnI</i>	Kapsel-Null-Lokus
C _T -Wert	cycle threshold
DNA	deoxyribonucleic acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ET	elektrophoretischer Typ
GSH	Glutathion
IQR	Interquartilsabstand
LPS	Lipopolysaccharid
MBL2	Mannose bindendes Lektin 2
MLST	Multilokussequenztypisierung
NA	Daten nicht verfügbar (not available)
NRZMHi	Nationales Referenzzentrum für Meningokokken und <i>Haemophilus influenzae</i>
OD	optische Dichte
PPM	Proteose-Pepton-Medium
PPM+	Proteose-Pepton-Medium mit 1% PolyVitex (bioMérieux), MgCl ₂ und NaHCO ₃
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RKI	Robert-Koch-Institut
ST	Sequenztyp
WFS	Waterhouse-Friderichsen Syndrom

Einleitung

1 Einleitung

1.1 Allgemeines zu *Neisseria meningitidis*

Meningokokken sind gramnegative, zur Familie der *Neisseriaceae* gehörende Diplokokken, die bekapselt oder unbekapselt vorliegen können (1). Sie rufen schwere bis tödlich verlaufende Erkrankungen hervor oder können als harmlose Kommensale den Nasen- und Rachenraum besiedeln, ohne den Wirt dabei zu schädigen (1). Meningokokken werden über großtröpfige Aerosole oder engen Kontakt von Mensch zu Mensch übertragen, z.B. bei großen Menschenansammlungen, in Internaten, in Kasernen und beim Küssen (1). Es gibt zwei Erkrankungsgipfel für eine Infektion mit Meningokokken: Kinder unter fünf Jahren weisen trotz geringer Prävalenz des Trägertums die höchste Inzidenzrate auf (2), was vor allem auf den nachlassenden Nestschutz durch die Mutter zurückzuführen ist. Ein zweiter Gipfel liegt im jungen Erwachsenenalter (1). Die Übertragung durch engen Kontakt erklärt, dass um das 19. Lebensjahr die Prävalenz des Trägertums ihr Maximum erreicht (3). Die Inkubationszeit liegt bei ein bis vierzehn Tagen (1).

1.2 Serogruppen

Meningokokken werden anhand ihrer Polysaccharidkapsel zwölf Serogruppen zugeordnet (4). Am häufigsten sind die Serogruppen A, B, C, W, X und Y für invasive Erkrankungen verantwortlich (4). In Europa kommen überwiegend Serogruppe B (65-70%) und C (20-25%) mit Erkrankungen v.a. im Winter und Frühjahr vor (5). Trotz Rückgang der Inzidenz der Infektion mit Meningokokken und der antibiotischen Behandlung liegt die Letalität weiterhin bei 10% (1). In den Industrieländern tritt die Erkrankung mit Meningokokken meist als Einzelfall, in seltenen Fällen gehäuft auf (5). In Deutschland lag die bundesweite jährliche Inzidenz im Jahre 2016 bei unter 0,5 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner (5). Große Epidemien gibt es hauptsächlich im Meningitisgürtel von Afrika (5).

1.3 Erkrankungsspektrum

Das Spektrum der Erkrankung reicht von Meningitis (Hirnhautentzündung), Sepsis (Blutvergiftung) bis hin zum Waterhouse-Friderichsen Syndrom (WFS),

Einleitung

das mit der höchsten Letalität von ca. 38% (6) einhergeht. Zwei Drittel der Erkrankten erleiden eine Meningitis mit Symptomen wie Kopfschmerzen, Fieber und Genickstarre (5). Eine mögliche Komplikation ist der Tod durch ein Hirnödem (1). Bei ca. einem Drittel der Erkrankten kommt es zu einer septischen Manifestation (5). Diese kann petechiale Blutungen und Emboli der Extremitäten versorgenden Gefäße verursachen, weshalb manchmal Amputationen nötig werden (5). Das WFS mit septischem Schock und ausgeprägten Hämorrhagien in Haut und innere Organe (u.a. Einblutungen in die Nebenniere) stellt die schwerste Form der Meningokokkenerkrankung dar (5,7). Es tritt bei ca. 10-15% der Patienten mit Sepsis auf (5). Trotz ausgeheilter Erkrankung können Langzeitfolgen bestehen bleiben wie mentale Retardierung mit Epilepsie, Hörverlust, chronische Kopfschmerzen und Paresen (8). Seltener lösen Meningokokken auch lokale Infektionen wie Pneumonien, Myokarditis, Endokarditis, Perikarditis, Arthritis oder Osteomyelitis aus (5,7).

In Deutschland muss dem Gesundheitsamt der Krankheitsverdacht, die Erkrankung sowie der Tod an einer Meningokokken-Meningitis oder –Sepsis unter Angabe des Namens gemeldet werden (5). Auch der direkte Erregernachweis ist meldepflichtig (5).

1.4 Erregernachweis und Typisierung

Der Erregernachweis erfolgt durch kulturelle Anzucht aus Liquor- und Blutkulturen oder durch mikroskopischen Nachweis in Liquor und Hauteffloreszenzen (5). Da nach einer antibiotischer Therapie oft keine kulturelle Anzucht mehr möglich ist (5), gewinnt der Nachweis der Erkrankung durch die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) an Bedeutung. Mittels anschließender Feintypisierung kann zusätzlich zur Serogruppe der Antigensequenztyp bestimmt werden, indem Proteine der äußeren Membran (PorA und FetA) charakterisiert werden (5). Dies wird durch Amplifikation und nachfolgender Sequenzierung der zu den variablen Regionen VR1 und VR2 zugehörigen Genabschnitte von PorA und der variablen Region von FetA durchgeführt (9).

Der Feintyp eines Stammes wird folgendermaßen bezeichnet: Serogruppe: P1 PorA-Sequenztyp: F FetA-Sequenztyp (5). Zusätzlich kann bei angezüchteten Stämmen eine Multilokussequenztypisierung (MLST) erfolgen, die zur Überwachung der Populationsstruktur invasiver Isolate im europäischen und globalen Kontext beiträgt (5). Jolley und Kollegen (10) empfehlen daher eine

Einleitung

erweiterte Nomenklatur, in der die durch MLST gewonnenen Informationen des Sequenztyps (ST) und des klonalen Komplexes (cc) ebenfalls angegeben werden (z.B. B:P1.19,15:F5-1:ST-33 (cc32)).

1.5 Therapie

Wichtig für die Prognose ist die sofortige Einleitung einer antibiotischen Therapie (5). Das Mittel der Wahl in Deutschland ist Penicillin G oder Cephalosporine der 3. Generation (5). Weiterhin sollte eine symptomatische Therapie erfolgen und beim septischen Schock unterstützende Maßnahmen eingeleitet werden (1). Die häufigste Todesursache in den Industrieländern stellt das Kreislaufversagen dar, das mit Verlust der Endothelbarriere mit Flüssigkeitsansammlungen im Interstitium, Vasodilatation und Reduktion der Herzleistung einhergeht (1).

1.6 Prävention

Zur Krankheitsprävention stehen verschiedene Impfstoffe zur Verfügung. Seit 2006 ist die konjugierte monovalente Meningokokken-C-Impfung für alle Kinder ab dem zweiten Lebensjahr empfohlen (5). Impfungen gegen die anderen Serogruppen wird besonders gefährdeten Personen wie Reisenden in Endemiegebieten, Personen mit Immundefekten und Laborpersonal geraten (5).

1.7 Trägertum versus Invasivität

Die Invasivität entspricht am ehesten einer evolutionären Sackgasse und nicht dem Ziel der Meningokokken, da die Krankheit mit dem Tod des Wirtes enden kann und somit die eigene Verbreitung verhindert wird (2). So ist es die Regel, dass Meningokokken den Nasen- und Rachenraum der Menschen kolonisieren, ohne eine Erkrankung auszulösen (2). Fraglich ist, welche Eigenschaften die Stämme, die zu schwerwiegenden Erkrankungen führen, im Vergleich zu den Trägerstämmen aufweisen, die keine Erkrankung hervorrufen. Die Suche nach den Virulenzfaktoren der Meningokokken hat neben der Polysaccharidkapsel bisher keine eindeutigen Ergebnisse zutage gefördert.

Die Gründe dafür, dass manche Menschen erkranken und andere nicht, sind wahrscheinlich sowohl bei Wirt wie auch Erreger zu suchen.

Einleitung

1.8 Risikofaktoren

Das Verhalten des Wirtes spielt hierbei eine führende Rolle. Beispielsweise sind Menschen, die häufig Diskotheken, Kneipen und Clubs aufsuchen, auch häufiger Träger von Meningokokken (11,12). Kommen schleimhautschädigende Faktoren wie Rauchen oder Koinfektionen im Nasen- und Rachenraum hinzu, kann es zum Ausbruch der Erkrankung kommen (1).

1.9 Immunantwort

Für die erfolgreiche Abwehr der Erreger ist die Funktion der eigenen Immunantwort essenziell, da die wichtigsten Risikofaktoren für eine systemische Infektion mit Meningokokken fehlende protektive Antikörper sowie Defekte im Komplementsystem sind (2). So ist das Risiko, an einer durch Meningokokkenvermittelten Infektion zu erkranken, bei angeborenen oder erworbenen Immundefekten erhöht (2).

Bei Kindern unter zwei Jahren mit einem Defekt des Mannose bindenden Lektins 2 (MBL2) und den damit einhergehenden reduzierten MBL2-Spiegeln wurde beispielsweise eine höhere Bakterienlast im Blut detektiert (13). Dies war vor allem bei Infektionen mit der Serogruppe C der Fall. Die Beobachtung legt nahe, dass MBL2 als Aktivator des Komplementsystems wichtig für die Funktion der angeborenen Immunität in den ersten Lebensmonaten ist, bevor die erworbene Immunität einen ausreichenden Schutz durch Antikörper gewährleisten kann (13).

Auch der x-chromosomal vererbte Properdindeфекt geht durch fehlende Aktivierung des Komplementsystems mit ungewöhnlich schweren Verläufen von Meningokokkenerkrankungen einher (14).

Weiterhin kommt es beim nephrotischen Syndrom mit Verlust von Immunglobulinen über die Niere, bei der Hypogammaglobulinämie und bei splenektomierten Patienten durch die fehlende Abwehr gegenüber bekapselten Erregern gelegentlich zu Meningokokkenerkrankungen (1).

Einleitung

1.10 Virulenzfaktoren

Bei der Diskussion um die Virulenzfaktoren der Meningokokken stand v.a. die Polysaccharidkapsel im Mittelpunkt. Sie schützt die Bakterien vor Umweltfaktoren wie z.B. Hitze und Austrocknung und kann wirksam die komplement vermittelte Lyse und die Opsonophagozytose verhindern (15).

Man geht davon aus, dass die bekapselten pathogenen Meningokokkenstämme von unbekapselten Vorfahren (*N. gonorrhoeae* und *N. lactamica*) abstammen und durch horizontalen Gentransfer von Bakterien der Familie der *Pasteurellaceae* erst kürzlich die Fähigkeit zur Kapselsynthese erworben haben. Dies erklärt die geringen Unterschiede im Genom zwischen Trägerstämmen und invasiven Stämmen (15). Obwohl die meisten Trägerstämme nicht bekapselt sind, wurden Isolate gefunden, die Polysaccharidkapseln aufwiesen, wie sie bei invasiven Stämmen ebenfalls vorkommen (15). Die Fähigkeit zur Synthese der Kapsel ist somit nicht auf die invasiven Stämme beschränkt und kann nicht als alleiniger Virulenzfaktor angesehen werden (15).

Die Rolle des Prophagen Nf1 ist noch nicht abschließend geklärt, da er für keinen bekannten Virulenzfaktor kodiert (15). Er kommt im Genom von einigen besonders virulenten, sogenannten hypervirulenten Stämmen vor.

Auch die Expression von verschiedenen Oberflächenstrukturen wie z.B. Pili für die Adhäsion an Geweben oder Porine für die Interaktionen zwischen Bakterium und Wirt wurden untersucht (1). Endotoxine wie das Lipopolysaccharid (LPS) sind weitere Virulenzfaktoren, die zu einer massiven Entzündungsreaktion im Wirt führen können und für die Entwicklung einer fulminanten Sepsis und Meningitis verantwortlich sind (1). Weiterhin zu nennen sind die schnelle Verdopplungszeit, die Phasen- und Antigenvariation, die Freisetzung von Toxinen (1) sowie molekulares Mimikry der Serogruppe B (7). Durch letzteres können Meningokokken der komplement vermittelten Lyse entgehen (16). Aus Laktat, das als Energiequelle dient, stellen sie N-Acetylneuraminsäure her und besetzen die äußere Membran mit diesem Molekül, das auch auf anderen menschlichen Zellen zu finden ist (16). So erkennt das Immunsystem die Meningokokken nicht als fremd (16).

Insgesamt kann man die bisher angenommenen Virulenzgene eher als Fitness-Gene verstehen, die die Kolonisation des Nasopharynx ermöglichen und eben nicht als Virulenzfaktoren zur Invasion von Geweben dienen (15). Derzeit ist nach

Einleitung

aktuellem Forschungsstand noch ungeklärt, was der ausschlaggebende Faktor für eine invasive Erkrankung ist.

1.11 Genotyp und Virulenz

Der Genotyp ist mit der Virulenz des Erregers assoziiert. Bakterienstämme können durch MLST verschiedenen Sequenztypen (ST) zugeordnet werden (17). Eine Gruppe verwandter Sequenztypen wird als klonaler Komplex (clonal complex = cc) bezeichnet (17). Diese persistieren über Jahrzehnte und bleiben auch während der weltweiten Ausbreitung von Meningokokkenisolaten relativ stabil (18). Die Einteilung der Isolate in klonale Komplexe ermöglicht eine strukturiertere Erfassung der hohen genetischen Diversität (18). Weiterhin helfen molekulare Methoden wie die MLST bei der Erfassung und Verfolgung virulenter Stämme im Rahmen von Ausbrüche (5,17).

Ein Vergleich von Serogruppen und Genotypen zwischen gesunden asymptomatischen Trägern und erkrankten Patienten (19) zeigte, dass die Serogruppe C mit einer höheren Erkrankungswahrscheinlichkeit assoziiert ist und in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts die Mehrzahl der Meningokokkenerkrankungen von einer begrenzten Zahl an klonalen Komplexen, den sogenannten hyperinvasiven Stämmen hervorgerufen wurde. Beispielsweise geht der ST-11 Komplex, der häufig mit Serogruppe C assoziiert ist, mit einer hohen Krankheitswahrscheinlichkeit einher, wohingegen der ST-23 Komplex negativ mit der Erkrankungswahrscheinlichkeit korreliert (19). Bei den hyperinvasiven Stämmen ist demnach das Verhältnis zwischen Besiedlung und Krankheitsauslösung stärker in Richtung Krankheit verschoben.

Eine Untersuchung von 1045 Patienten mit nachgewiesener Meningokokkenerkrankung ergab eine fast dreifach höhere Letalität bei Infektionen mit Serogruppe C, wobei auch hier die Mehrzahl der Isolate den ST-11 Komplex beinhalteten (20). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass die höhere Letalität bestimmter Meningokokken von der Serogruppe und dem Serotyp abhängig ist. Hier war die Letalität bei C:2a- und B:2a- Stämmen um ein Dreifaches erhöht (21). Weitere sogenannte hypervirulente klonale Komplexe sind ST-32, ST-8, ST-41/44, ST-1, ST-4 und ST-5 (22). Der elektrophoretische Typ 15 (ET-15), ein Subklon von ST-11, geht ebenfalls mit einer höheren Letalität und häufigeren Spät komplikationen einher (22). Er kann durch Sequenzierung von *fumC* nachgewiesen werden (23). Seit der Erstbeschreibung in Ontario,

Einleitung

Kanada, im Jahre 1989 (24), ist er weltweit für invasive Meningokokkenerkrankungen verantwortlich (25,26) und konnte kürzlich auch bei in Deutschland lebenden homosexuellen Männern nachgewiesen werden (27). ET-15 ist häufig mit dem Feintyp C:P1.5-1,10-8:F3-6 assoziiert (22,26,27).

1.11.1 Hyperletale Feintypen

Ein ähnliches Ergebnis bezüglich Letalität ergab eine explorative Analyse von mehr als 4.000 Fällen in zwölf Jahren (bisher nicht veröffentlichte Daten des Nationalen Referenzzentrums für Meningokokken und *Haemophilus influenzae* (NRZMHi)). Danach sind Feintyp C:P1.5-1,10-8:F3-6 und Feintyp C:P1.5,2:F3-3, die beide zu dem ST-11 Komplex gehören, mit einer überdurchschnittlich hohen Letalität assoziiert und können somit auch als „hyperletal“ bezeichnet werden. Auch B:P1.7-2,4:F1-5 war geringfügig häufiger mit Tod vergesellschaftet als andere Stämme. Dieser Feintyp ist hauptsächlich für invasive Meningokokkenerkrankungen der Serogruppe B in Westeuropa der letzten zwanzig Jahre verantwortlich (28) und mit dem ST-41/44 Komplex assoziiert (29). Er wurde während einer Epidemie in Neuseeland mit hohen Erkrankungsraten nachgewiesen (30). Ein Stamm dieses Feintyps (NZ98/254) diente als Grundlage für die Produktion eines Membranvesikelimpfstoffes (29), der Teil eines in Deutschland unter dem Namen Bexsero® vertriebenen Impfstoffes ist.

1.12 Einfluss der Bakterienlast und der Krankheitsmanifestation auf die Letalität

Die Schwere der Erkrankung ist abhängig vom Alter des Patienten, dem klinischen Bild (Meningitis, Sepsis, WFS) und der Bakterienlast. In verschiedenen Veröffentlichungen wurde bereits ein Zusammenhang zwischen der Erkrankungsschwere und der Bakterienlast festgestellt. Øvstebø und Kollegen (31) zeigten die naheliegende Korrelation zwischen der Meningokokken-DNS-Menge und den LPS-Spiegeln in Liquor und Plasma. Interessant war die Beobachtung, dass die Menge der DNS bzw. die LPS-Spiegel in Liquor oder Plasma je nach Manifestation unterschiedlich waren: Im Falle der Meningitis war die Menge an LPS und Meningokokken-DNS im Plasma niedrig, im Liquor aber deutlich erhöht (31). Bei der fulminanten Sepsis als schwerste

Einleitung

Form der Erkrankung erreichten die Mengen an DNS und LPS im Plasma ihr Maximum, im Liquor waren die Spiegel eher niedrig (31).

Diese Studie zeigte, dass sowohl die DNS-Menge wie auch die LPS-Spiegel wichtige Informationen über die Erkrankungsschwere und den Ausgang der Infektion geben (31): Eine höhere Bakterienlast bei septischen Patienten wurde beispielsweise mit einer höheren Letalität assoziiert (31).

Auch in einer Studie von Hackett und Kollegen (32) konnte ein Zusammenhang zwischen der Bakterienlast und der Erkrankungsschwere beobachtet werden.

Neben der bakteriellen Last spielt die Manifestation der Erkrankung für die Letalität eine entscheidende Rolle: Bei einer alleinigen Meningitis liegt sie am niedrigsten bei 2,1%, bei septischen Verläufen bei 18% und beim WFS bei 38% (6).

1.12.1 Optische Dichte als Maß für die Bakterienlast

Nicht nur die Untersuchung des Nativmaterials von Patienten mit der Bestimmung der Bakterienlast lieferte interessante Beobachtungen: Bei Experimenten mit Bakterienstämmen, bei denen die optische Dichte (OD) als Maß für die Anzahl der lebenden Bakterien in der frühstationären Phase diente, wurde ein Unterschied in der maximal in Flüssigkultur erreichten Konzentration der Bakterien zwischen invasiven Stämmen und Trägerstämmen gefunden (16). Die invasiven Stämme wuchsen bei gleichen Wachstumsraten in dem Proteose-Pepton-Medium mit 1% PolyVitex (bioMérieux), MgCl₂ und NaHCO₃ (PPM+) zu höheren optischen Dichten heran als die Trägerstämme (16). Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Schoen (16) lassen vermuten, dass es als Grund für die erhöhte Letalität einen Unterschied in der Wachstumskinetik innerhalb der Gruppe der invasiven Stämme geben könnte.

1.13 Hypothesen

Wie oben ausführlich beschrieben gibt es scheinbar nicht ein spezifisches Virulenzgen, das die Schwere einer Meningokokkenerkrankung bestimmt.

Vorherige Beobachtungen zeigten eine Korrelation der Letalität mit der Bakterienlast (31,32), Unterschiede bezüglich der Letalität je nach Serogruppe (20), eine erhöhte Letalität bei Infektionen mit sogenannten hyperletalen Feintypen (bisher nicht veröffentlichte Daten des NRZMHi) sowie

Einleitung

einen Unterschied in der maximal in Flüssigkultur erreichten Konzentration der Bakterien zwischen invasiven Stämmen und Trägerstämmen (16).

In dieser Arbeit sollen mögliche Gründe für die Hyperletalität bestimmter Meningokokkentypen untersucht werden. Unter den „hyperletalen“ Meningokokkentypen versteht man hierbei Feintypen, die in einer explorativen Analyse (bisher nicht veröffentlichte Daten des NRZMHis) durch ihre überdurchschnittliche Letalität aufgefallen waren. Hierzu zählen die Feintypen C:P1.5-1,10-8:F3-6, C:P1.5,2:F3-3 und B:P1.7-2,4:F1-5. Eine mögliche Ursache für die hohe Letalität könnte das Erreichen einer höheren Bakterienlast im Nativmaterial im Vergleich zu nicht hyperletalen Meningokokkentypen sein, da besonders hohe Keimzahlen zu extrem hohen Konzentrationen an toxischem LPS führen. Ein weiterer Grund könnte die Fähigkeit der hyperletalen Meningokokken darstellen, zu höheren optischen Dichten in Flüssigkultur heranwachsen zu können und damit möglicherweise höhere Konzentrationen von Bakterien *in vivo* zu erreichen.

Folgende Hypothesen werden demnach in der vorliegenden Arbeit untersucht:

1. Die Bakterienlast im Blut ist bei Erkrankung durch sogenannte hyperletale Meningokokken höher als bei anderen Meningokokkentypen.
2. Kinetische Parameter wie die maximale Wachstumsgeschwindigkeit und die Bakteriendichte in Flüssigkultur zwischen hyperletalen und nicht-hyperletalen Typen sind unterschiedlich.

Im Folgenden wurde die Bakterienlast im Blut zwischen den Serogruppen sowie zwischen den hyperletalen Stämmen und Kontrollstämmen verglichen. Weiterhin wurde mit einem zweiten Experiment geklärt, ob es Unterschiede in der Wachstumskinetik zwischen eben diesen Typen gibt.

Material und Methoden

2 Material und Methoden

Die verwendeten Methoden umfassen eine quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) zur Bestimmung der Bakterienlast in 62 Blutproben und Wachstumsversuche mit Berechnung der Wachstumsgeschwindigkeit μ und der Kapazität A, die mit dem Gerät TECAN Infinite 200 Pro durchgeführt wurden.

Die Versuche wurden am NRZMHi in Würzburg durchgeführt. Dieses typisiert im Auftrag des Robert-Koch-Instituts (RKI) die eingesandten Stämme oder die bakterielle DNS im Patientenmaterial (z.B. Blut) bei den in Deutschland erkrankten Personen. Dadurch standen sowohl die eingesandten Blutproben (Eingang zwischen den Jahren 2003 bis 2012) wie auch die Stammsammlung (Eingang zwischen den Jahren 2002 bis 2013) für die Versuche zur Verfügung. Da die am NRZMHi generierten Daten und die am RKI eingegangenen Meldedaten regelmäßig abgeglichen werden, konnten die Informationen der typisierten Stämme um die Daten der Krankheitsmanifestation (Meningitis, Sepsis, WFS) und Letalität ergänzt werden.

Wenn eine vollständige Typisierung des Nativmaterials nicht möglich war, von diesem Patienten jedoch ein Meningokokkenstamm isoliert und typisiert werden konnte, wurde das Nativmaterial um diese Information ergänzt.

Die Versuche mit Patientenmaterial (Blutproben) wurden von der Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt (Antragsnummer AZ 126/14).

2.1 qPCR-Verfahren zur Bestimmung der Bakterienlast

Ziel der Verwendung des qPCR-Verfahrens (siehe 2.1.4 Bestimmung der Bakterienlast, Seite 13) war es, die bakterielle DNS-Menge in Eluatn aus Blut von Patienten zu quantifizieren, die eine mit molekularen Methoden (Nachweis von 16S-rDNS oder der Gene *csb*, *csc*, *csw*, *csy*, *porA* oder *fetA*) bestätigte invasive Meningokokkenerkrankung hatten.

Dazu standen dem NRZMHi 62 Blutproben zur Verfügung, darunter elf Proben des hyperletalen Feintyps B:P1.7-2,4:F1-5 und fünf Proben des hyperletalen Feintyps C:P1.5,2:F3-3. Da keine Blutproben des Feintyps C:P1.5-1,10-8:F3-6 vorhanden waren, konnte dieser nicht in der Ergebnisanalyse berücksichtigt werden.

Material und Methoden

Die Quantifizierung der bakteriellen DNS erfolgte über den Nachweis des *ctrA*-Gens (33) in den jeweiligen Proben. Pro Bakterienzelle ist genau eine Kopie des *ctrA*-Gens vorhanden, sodass eine nachgewiesene Kopie im Nativmaterial einem Bakterium entsprach.

2.1.1 Herstellung der Positivkontrolle und des Standards

Es wurden die Primer *ctrA*-F2 (5'GCTGCGGTAGGTGGTTC) und DM2-2 (5'CTTAATTACTCACATTAATTAG) verwendet, um das *ctrA*-Gen mit 581 Basenpaaren (bp) mittels PCR bei verschiedenen inaktivierten Meningokokkenstämmen, darunter MZ85/14, nachzuweisen. Die Aufreinigung des PCR-Produktes von MZ85/14 erfolgte mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden). Die Anwesenheit des aufgereinigten Produktes im Eluat wurde durch Gelelektrophorese kontrolliert und mittels „TOPO XL PCR Cloning Kit“ (Invitrogen) wurde es in den Vektor „pCR-XL-TOPO“, welcher ein Gen für Kanamycinresistenz besitzt, kloniert. Der Vektor mit Insert wurde in den *E. coli* Stamm TOP 10 des Kits „One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli*“ (Invitrogen) auf Medien mit Kanamycin selektiert und vervielfältigt. Die Aufreinigung erfolgte mittels „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden).

Die Konzentration des Plasmids, dessen korrektes Insert durch Sequenzierung bestätigt wurde, wurde mittels Nano Drop (Thermo Scientific) bestimmt.

Es wurden Standardproben in unterschiedlichen Verdünnungen (10^8 Kopien/4 μ l bis 10^1 Kopien/4 μ l) hergestellt. Sechs dieser Standardproben (10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^4 , 10^2 , 10^1) wurden zusätzlich zur Negativkontrolle und den zu testenden Blutproben bei jedem Versuchsdurchlauf mitgeführt.

2.1.2 Evaluierung der Testung bereits vorhandener Eluate

Weiterhin wurde eine Inventur mit Volumenbestimmung des Nativmaterials und der Eluate, die in der Sammlung des DNA-Labors bzw. des NRZMHI vorhanden waren, durchgeführt. Um zu prüfen, ob die Verwendung von schon vorhandenem Eluat oder die Verwendung des Eluats von frisch aufgereinigtem Nativmaterial geeigneter ist, wurde die Bakterienlast von zehn Proben bestimmt, bei denen ausreichend Eluat und Nativmaterial vorhanden war. Der t-Test von zwei verbundenen Stichproben ergab keinen Unterschied hinsichtlich des dekadischen Logarithmus der Kopienzahl/ml ($p=0,173$). Aus Gründen der Praktikabilität wurde,

Material und Methoden

wenn bereits vorhanden, Eluat verwendet. War das Eluat in der Sammlung des DNA-Labors nicht vorhanden oder das Volumen zu gering, wurden 200µl des Vollbluts mit dem „QIAamp Blood Mini Kit“ (Qiagen, Hilden), welches standardmäßig im DNA-Labor eingesetzt wird, erneut aufgereinigt und mit 200µl eluiert. Es kam also bei der Herstellung der Eluate weder zu einer Verdünnung noch zu einer Konzentrierung.

2.1.3 Reaktionsansatz

Der Reaktionsansatz pro Reaktionsgefäß bestand aus einem Master Mix von 21µl. Darunter fielen 12,5µl des „QuantiFast Multiplex PCR Master Mix“ (Qiagen, Hilden), 1,25µl des 20x Primer-Probe-Mix und 7,25µl H₂O. Der 20x Primer-Probe-Mix enthielt 10µmol/l von Primer ctrA_1_F (5'-GCTGCGGTAGGTGGTTCAA), 10µmol/l von Primer ctrA_1_R (5'-TTGTCGCGGATTGCAACTA) und 4µmol/l der Sonde ctrA_1_P (6-FAM-CATTGCCACGTGTCAGCTGCACAT) in „AE Puffer“ (ein Tris-EDTA-Puffer der Firma Qiagen). Die Primer markierten ein Fragment von ca. 100bp. Das Templatevolumen betrug standardmäßig 4µl. Wenn dieses Volumen für den C_T-Wert (cycle threshold, Erklärung siehe 2.1.4 Bestimmung der Bakterienlast, Seite 13) nicht ausreichend war, wurde das maximal mögliche Volumen von 11,25µl verwendet und der Master Mix entsprechend angepasst (ein Volumen von maximal 25µl pro Reaktionsgefäß durfte nicht überschritten werden). Pro Versuchsdurchlauf konnten maximal 24 Eluate, die Negativkontrolle und sechs Standardproben mitgeführt werden. Die qPCR-Untersuchung erfolgte mit dem Gerät Smart Cycler (Cepheid). Folgendes Programm wurde für den Smart Cycler eingestellt: Aktivierung der HotStarTaq Plus DNA-Polymerase bei 95°C über fünf Minuten, Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden und anschließend kombinierter Annealing- / Extension-Schritt bei 60°C für ebenfalls 30 Sekunden mit Detektion des Produktes. Die Anzahl der Zyklen lag bei 40.

Um Kontaminationen während des Versuchsansatzes zu vermeiden, wurde eine Raumentrennung bezüglich Master Mix Herstellung, Zugabe von Template und Amplifikation eingehalten.

Material und Methoden

2.1.4 Bestimmung der Bakterienlast

Die qPCR ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht (34). Mit zunehmender Amplifikation der DNS steigt das Fluoreszenzsignal, welches durch die Abspaltung des Fluorophors 6-FAM von der Sonde während des Amplifikationsprozesses bedingt ist (34). Unter dem C_T -Wert wird die Anzahl der Zyklen verstanden, bei der sich das Fluoreszenzsignal deutlich vom Hintergrund abhebt (Schwellenwert) (34). Je mehr DNS in der Probe vorhanden ist, desto schneller wird der Schwellenwert erreicht, d.h. je höher die DNS-Menge, desto kleiner ist der C_T -Wert (34). Anhand des C_T -Wertes kann die Kopienzahl rechnerisch ermittelt werden (34).

Die Quantifizierung der Meningokokken-DNS erfolgte durch lineare Regression des dekadischen Logarithmus der Kopienzahlen und der C_T -Werte mit dem Programm R (siehe Abbildung 1, Seite 14). Bevor die Ergebnisse eines Versuchsdurchlaufs gewertet wurden, mussten folgende Qualitätskriterien erfüllt sein: Die Negativkontrolle sollte keinen C_T -Wert haben, der Determinationskoeffizient R^2 musste größer als 0,98 sein und der C_T -Wert der Probe musste kleiner sein als der der 10^1 Kopien/4 μ l.

Material und Methoden

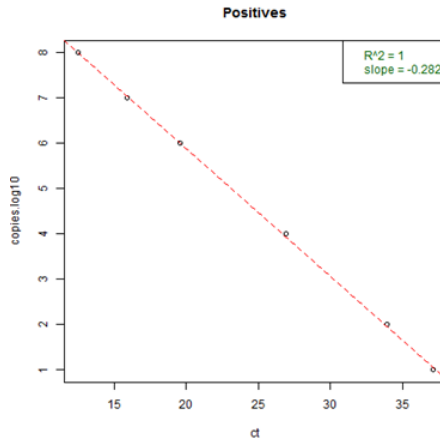


Abbildung 1: Beispielhafte Standardkurve eines qPCR Laufs mit Standardproben 10^1 , 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^7 , 10^8

Die aus dem C_T -Wert errechnete Kopienzahl der Probe galt jeweils nur für einen Ansatz mit dem Templatevolumen von $4\mu\text{l}$ oder $11,25\mu\text{l}$. Das Ergebnis Kopien/Templatevolumen wurde im Falle der $4\mu\text{l}$ Templatevolumen mit 250 ($1000/4$) multipliziert, um die Angabe Kopien/ml zu erhalten. Bei $11,25\mu\text{l}$ war es eine Multiplikation mit 88,89 ($1000/11,25$).

2.1.5 Nachweisgrenze

Die theoretische untere Nachweisgrenze der angewandten Methode lag bei einem Templatevolumen von $4\mu\text{l}$ bei 2455 Kopien/ml und bei einem Templatevolumen von $11,25\mu\text{l}$ bei 871 Kopien/ml.

Material und Methoden

2.2 Bestimmung von Wachstumsgeschwindigkeit (μ) und Kapazität (A) hyperletaler Feintypen

Der zweite Versuch diente der Überprüfung, ob die hyperletalen Feintypen eine andere Wachstumskinetik hinsichtlich μ und A aufwiesen als die Kontrollstämme. Die Kapazität A beschreibt die maximale Konzentrationszunahme als Logarithmus der gemessenen OD im Verhältnis zur Ausgangsdichte OD_{T_0} in der stationären Phase. Die Wachstumsgeschwindigkeit μ wird aus der Steigung im Wendepunkt während der exponentiellen Phase des Wachstums berechnet.

Eine bakterielle Wachstumskurve kann allgemein in vier Phasen unterteilt werden:

1. Die Lag-Phase (Verzögerungsphase), in der sich die Bakterien an die Umgebungsbedingungen und das Medium adaptieren
2. Die exponentielle Phase mit der Phase des schnellsten Wachstums
3. Die stationäre Phase, in der die maximale OD / Kapazität erreicht wird und
4. Die Absterbe-Phase.

Dem Experiment liegt die Annahme zugrunde, dass die OD in der frühstationären Phase (bis zum Anfang des Plateaus) mit der Anzahl der lebenden Bakterien korreliert. Durch visuelle Kontrolle wurden deshalb in der Auswertung ausschließlich die Zeitpunkte bis zum Ende der frühstationären Phase jedes einzelnen Stammes betrachtet.

Es wurden jeweils zehn Stämme der hyperletalen Feintypen B:P1.7-2.4:F1-5, C:P1.5-1,10-8:F3-6 und C:P1.5,2:F3-3 mit ihren jeweiligen nicht zu der Gruppe der hyperletalen Feintypen gehörenden Kontrollstämmen (siehe Tabelle 1, Seite 16) getestet, bei denen ein Abgleich nach Alter des Patienten, Alter der Probe und Geschlecht vorgenommen wurde. Das Alter des Patienten des Kontrollstammes durfte dabei maximal um die Hälfte des Patientenalters vom hyperletalen Feintyp abweichen. Beim Alter der Proben wurde ein Unterschied von maximal einem Jahr toleriert. Das Matching erfolgte im Verhältnis 1:1 durch Zufall.

Material und Methoden

Tabelle 1: Hyperletale Feintypen versus Kontrollstämme

Hyperletaler Feintyp	Stamm-Nr.	Eingangsdatum	Feintyp Kontrollstamm	Stamm-Nr. Kontrollstamm	Eingangsdatum Kontrollstamm
B:P1.7-2,4:F1-5	9022	26.09.2002	B:P1.17,9:F1-5	8778	22.05.2002
B:P1.7-2,4:F1-5	9643	09.01.2004	B:P1.18-1,3:F1-5	9699	19.02.2004
B:P1.7-2,4:F1-5	9678	03.02.2004	B:P1.12-1,16:F5-1	9232	12.02.2003
B:P1.7-2,4:F1-5	9992	15.12.2004	B:P1.5-1,10-13:F1-17	10286	07.07.2005
B:P1.7-2,4:F1-5	10110	03.03.2005	B:P1.18-1,3:F1-5	10393	23.11.2005
B:P1.7-2,4:F1-5	10421	14.12.2005	Y:P1.5-1,10-4:F4-1	10645	21.04.2006
B:P1.7-2,4:F1-5	11246	06.11.2007	B:P1.7-1,1:F1-5	11556	01.10.2008
B:P1.7-2,4:F1-5	11773	26.03.2009	W135:P1.5,2:F1-1	11941	15.12.2009
B:P1.7-2,4:F1-5	12055	14.04.2010	W135:P1.18-1,3:F4-1	11967	09.01.2010
B:P1.7-2,4:F1-5	12941	22.05.2013	B:P1.22,14:F5-5	12952	06.06.2013
C:P1.5-1,10-8:F3-6	9168	07.01.2003	W135:P1.22-1,14:F1-18	8504	11.02.2002
C:P1.5-1,10-8:F3-6	10273	25.06.2005	B:P1.5-2,10:F5-1	9864	30.06.2004
C:P1.5-1,10-8:F3-6	10545	24.02.2006	C:P1.5,2:F3-6	10291	09.07.2005
C:P1.5-1,10-8:F3-6	10793	23.08.2006	B:P1.5-1,10-8:F1-5	10700	01.06.2006
C:P1.5-1,10-8:F3-6	10818	14.09.2006	C:P1.5-1,10-55:F3-6	10544	25.02.2006
C:P1.5-1,10-8:F3-6	11614	03.12.2008	B:P1.5-2,10:F5-1	11609	27.11.2008
C:P1.5-1,10-8:F3-6	11798	22.04.2009	B:P1.17,16-4:F5-12	11536	05.09.2008

Material und Methoden

Hyperletaler Feintyp	Stamm-Nr.	Eingangsdatum	Feintyp Kontrollstamm	Stamm-Nr. Kontrollstamm	Eingangsdatum Kontrollstamm
C:P1.5-1,10-8:F3-6	12472	18.10.2011	W135:P1.18-1,3:F4-1	12677	22.06.2012
C:P1.5-1,10-8:F3-6	12787	30.11.2012	B:P1.22,9:F4-3	12650	18.05.2012
C:P1.5-1,10-8:F3-6	12823	19.01.2013	B:P1.7-2,4:F5-1	12999	05.09.2013
C:P1.5,2:F3-3	9464	11.07.2003	B:P1.7-2,4:F5-1	9830	27.05.2004
C:P1.5,2:F3-3	9696	18.02.2004	B:P1.22,14:F5-9	9685	10.02.2004
C:P1.5,2:F3-3	9849	15.06.2004	B:P1.5-1,2-2:F1-7	10234	25.05.2005
C:P1.5,2:F3-3	10359	14.10.2005	W135:P1.18-1,3:F3-12	10572	15.03.2006
C:P1.5,2:F3-3	10559	07.03.2006	W135:P1.18-1,3:F5-8	10825	26.09.2006
C:P1.5,2:F3-3	10788	21.08.2006	B:P1.19,15:F1-14	10493	27.01.2006
C:P1.5,2:F3-3	11259	22.11.2007	B:P1.22,9:F1-7	11396	28.03.2008
C:P1.5,2:F3-3	12343	24.03.2011	C:P1.NA,NA:F3-9	12351	05.04.2011
C:P1.5,2:F3-3	12536	09.01.2012	C:P1.5-1,10-8:F5-7	12659	05.06.2012
C:P1.5,2:F3-3	12954	06.06.2013	B:P1.22,14:F5-1	12768	08.11.2012

Material und Methoden

2.2.2 Versuchsablauf

Die Wachstumsversuche wurden mit dem TECAN Infinite 200 Pro (Tecan Group Ltd., Männedorf / Schweiz) durchgeführt. Dieser ist ein Photometer mit Heiz- und Schüttelfunktion. Er wurde für jeden Versuch mit einer 96-Well-Platte bestückt, in deren Vertiefungen sich die Bakteriensuspensionen befanden. Durch nicht-invasive OD-Messungen wurde alle 30 Minuten über einen Zeitraum von 16 Stunden die OD bei 620nm gemessen. Anhand der ermittelten Werte wurden Wachstumskurven erstellt.

Pro Versuchsdurchlauf konnten zehn Stämme getestet werden, um eine im Vorfeld festgelegte Toleranzzeit (Zeit von der Herstellung der Bakteriensuspension in dem Medium PPM+ bis Start des TECAN-Readers) von 30 Minuten nicht zu überschreiten. Die Stämme wurden über Nacht (ca. 18 Stunden) auf Columbia Blutagar (bioMérieux) bei 35°C mit 5% CO₂ bebrütet. Am nächsten Tag wurden mindestens zehn Einzelkolonien kreisförmig auf je eine Columbia Blutagar-Platte (Größe entspricht einer 2€-Geldmünze) überimpft und für erneute vier Stunden inkubiert, um die exponentielle Phase der Meningokokken zu erreichen. Es wurde eine Bakteriensuspension in PPM+ bei einer OD von 0,1 bei 600nm hergestellt. Die Variabilität des Wachstums wurde durch die Verwendung von nur einer Charge PPM minimiert.

Die 96-Well-Platte wurde mit jeweils 200µl Suspension pro Vertiefung befüllt, wobei pro Stamm vier Vertiefungen belegt wurden. Als Verdunstungsschutz wurden die äußeren Vertiefungen mit PPM aufgefüllt, sodass die zu testenden Stämme von Medium umrahmt wurden. Aus Sicherheitsgründen wurde die Platte mit einem Deckel verschlossen und in den TECAN-Reader gegeben. Das verwendete Programm bestimmte alle 30 Minuten über einen Zeitraum von 16 Stunden die OD bei 620nm mit zehn Blitzen. Die Temperatur im Gerät betrug nach dem Vorheizungsschritt 37°C mit einer Spanne von 35,0 - 37,5°C. Der Inkubationsschritt setzte sich aus einem orbitalen Schüttelschritt für 600 Sekunden, einem linearen Schüttelschritt für die gleiche Zeitspanne und einem erneuten orbitalen Schüttelschritt für 560 Sekunden zusammen. Die Schüttelamplitude war jeweils 4mm. Zwischen den Dichtemessungen betrug die Wartezeit jeweils zwei Sekunden.

Material und Methoden

2.2.3 Erfassung der Messparameter und deren Auswertung

Der TECAN-Reader erstellte während der Messungen eine Excel-Tabelle, in der Zyklusnummer, Messzeitpunkt, Temperatur und gemessene OD in den einzelnen Vertiefungen abzulesen waren. Nachträglich konnten die Stammmummern in einer Excel-Tabellenspalte entsprechend eingetragen werden. Durch das R-Skript „Growth Meister“ (erstellt von Priv.-Doz. Dr. med. habil. Johannes Elias) erfolgte die Auswertung der gewonnenen Messdaten mittels automatischer nicht-linearer Regression anhand der modifizierten Gompertz-Funktion (35). Die Gompertz-Funktion ist eine sigmoide Kurve zur Beschreibung von bakteriellem Wachstum mit den Parametern μ , A und λ , wobei die Bestimmung von λ als Parameter der Lag-Phase in den Versuchen nicht berücksichtigt wurde. Die OD wurde der Populationsgröße gleichgesetzt. OD_{T_0} gab die Ausgangs-OD zum Zeitpunkt Null (erster Messwert des TECAN-Readers) an (siehe Abbildung 2, Seite 20).

Die zu bestimmenden Parameter waren μ (Wachstumsgeschwindigkeit) und A (Kapazität). Sie wurden als Mittelwert von vier Vertiefungen pro Stamm errechnet. Jeder Stamm wurde drei Mal getestet, wobei die einzelnen Versuche an verschiedenen Tagen erfolgten. Für die Auswertung wurde der Mittelwert dieser drei Testwerte verwendet.

Material und Methoden

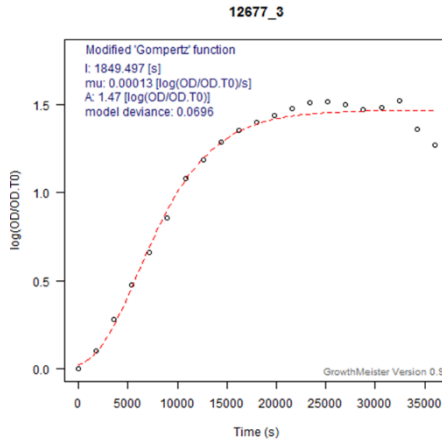


Abbildung 2: Kurvenbeispiel Stamm 12677 Vertiefung 3

Die bereits händisch durchgeführten Wachstumsversuche einer anderen Arbeitsgruppe (16) wurden mit der neuen Methode validiert. Dazu wurden 15 Stämme mit invasivem Sequenztyp und 14 Stämme ohne invasiven Sequenztyp (Trägerstämme) getestet und hinsichtlich μ und A verglichen.

2.3 Weitere Software

Die Daten (Kopienzahl/ml, μ und A) wurden mit dem Programm Excel 2013 gesammelt. Die statistische Auswertung beider Versuche erfolgte mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS 24.0. Das Matching der Meningokokkenstämme für die Wachstumsversuche wurde mit der Zufallsfunktion des Programms R 3.1.2 durchgeführt. Die Arbeit selbst wurde in Word 2013 verfasst und die Literatur mit Zotero 5.0 verwaltet.

Material und Methoden

2.4 Statistische Analyse

Zunächst wurden die erhobenen Daten (Kopienzahl/ml in Abhängigkeit von Krankheitsausgang, klinischem Bild, Serogruppe und Feintyp sowie die Parameter μ und A) mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet. Waren die Daten normalverteilt, wurden der t-Test oder die einfaktorielte Varianzanalyse durchgeführt. Zeigten sich die Daten als nicht normalverteilt, wurde ein nicht-parametrisches Testverfahren (z.B. der Wilcoxon-Test) gewählt.

Die Auswertung der qPCR erfolgte mit parametrischen Tests für zwei (t-Test) oder für drei (einfaktorielte Varianzanalyse) unabhängige Stichproben. Zwei unabhängige Stichproben waren beispielsweise Tod versus Überleben. Drei unabhängige Stichproben waren beispielsweise Meningitis, Sepsis und WFS.

Für die Auswertung der Wachstumsversuche wurde aufgrund der „matched pairs“ (Abgleich der Stämme nach Alter des Patienten, Alter der Probe und Geschlecht) ein Test für verbundene Stichproben verwendet. Bei normalverteilten Daten wurde der t-Test für verbundene Stichproben angewendet, bei fehlender Normalverteilung der Daten wurde der Wilcoxon-Rangsummentest als nicht-parametrischer Test für zwei abhängige Stichproben gewählt. Für den Vergleich der Dichtedifferenz der drei hyperletalen Feintypen mit ihren Kontrollstämmen wurde die einfaktorielte Varianzanalyse verwendet. Die Analyse der invasiven Stämme versus der Trägerstämmen erfolgte mittels Wilcoxon-Rangsummentest für A und mittels t-Test für unabhängige Stichproben für μ .

Die Daten wurden in Boxplots veranschaulicht, wobei in den Boxplot-Diagrammen der Median, sowie die 25%- und 75%-Perzentile in Form einer den Median umgebenden Box angegeben wurden. Die 10%- und 90%-Perzentile wurden als T-Balken, Daten außerhalb dieser Perzentilen als extra Punkte im Diagramm dargestellt.

Angegeben sind im Folgenden Mittelwert und Standardabweichung für normalverteilte Stichproben. Die Angabe des Medians und des Interquartilsabstands (IQR) für nicht normalverteilte Stichproben ist gesondert gekennzeichnet.

Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 qPCR-Verfahren

Die Analyse der Ergebnisse der qPCR erfolgte in mehreren Gruppen. Folgende Endpunkte wurden untersucht: Krankheitsausgang (Tod versus Überleben), klinisches Bild (Meningitis; Sepsis (auch mit Meningitis); WFS / lediglich fulminante Sepsis), Serogruppe (B versus C) und Vergleich der Bakterienlast zwischen den hyperletalen Feintypen B:P1.7-2,4:F1-5 und C:P1.5,2:F3-3 versus den restlichen Proben.

3.1.1 Bakterienlast und Krankheitsausgang (Tod versus Überleben)

Bezüglich des Krankheitsausgangs wurden die Patienten in zwei Gruppen (Tod versus Überleben) eingeteilt. Hier fand ein Abgleich der Daten des NRZMHi und des RKI von 2002 und 2014 statt. 19 von 59 Patienten (32,2%) verstarben, 40 Patienten (67,8%) überlebten die Erkrankung und drei Patienten konnten aufgrund fehlender Information nicht in die Analyse eingeschlossen werden.

Der Mittelwert des dekadischen Logarithmus der Bakterienlast/ml lag bei den tödlich verlaufenden Meningokokkenerkrankungen mit $6,74 \pm 0,85$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) höher als bei den überlebenden Patienten mit $5,15 \pm 1,17$ (siehe Abbildung 3, Seite 23). Dieser Unterschied war statistisch signifikant (t-Test für unabhängige Stichproben, $p < 0,001$).

Ergebnisse

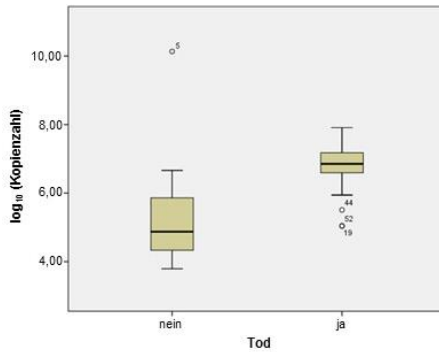


Abbildung 3: Bakterienlast und Krankheitsausgang

3.1.2 Bakterienlast und klinisches Bild

In die Analyse von Bakterienlast und klinischem Bild gingen 56 Patienten (100%) ein, bei sechs Patienten gab es keine Information bezüglich des klinischen Bildes. Zwölf Patienten (21,4%) litten unter einer Meningitis, 20 Patienten (35,7%) unter Sepsis und 24 Patienten (42,9%) unter dem WFS.

Bei Patienten mit Meningitis lag der Mittelwert des dekadischen Logarithmus der Bakterienlast/ml bei $5,22 \pm 1,13$; bei Patienten mit Sepsis bei $5,27 \pm 1,12$ und bei Patienten mit WFS bei $6,10 \pm 1,13$ (siehe Abbildung 4, Seite 24). Dieser Unterschied erwies sich als statistisch signifikant (einfaktorielle Varianzanalyse, $p=0,028$). Post-Hoc-Tests mit Bonferroni-Korrektur ergaben einen nicht mehr statistisch signifikanten Unterschied in der Kopienzahl/ml zwischen den Gruppen Sepsis und WFS ($p=0,057$), Meningitis und WFS ($p=0,098$) sowie Meningitis und Sepsis ($p=1,0$).

Ergebnisse

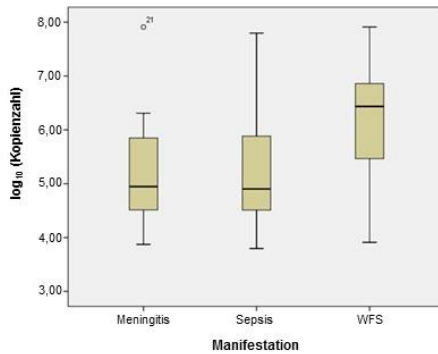


Abbildung 4: Bakterienlast und klinisches Bild

3.1.3 Bakterienlast und Serogruppe

Die uns vorliegenden Proben setzten sich aus Serogruppe B, C und W zusammen. Da von der Serogruppe W (Probennummer 1338) nur eine Probe vorhanden war, ging diese in die folgende Auswertung aufgrund der geringen Aussagekraft nicht ein. Bei 49 Patienten (80,3%) war Serogruppe B nachweisbar, bei den restlichen zwölf Patienten (19,7%) war es Serogruppe C.

Der Mittelwert des dekadischen Logarithmus der Bakterienlast/ml bei den mit Serogruppe B infizierten Patienten betrug $5,46 \pm 1,24$; bei Serogruppe C lag er bei $5,70 \pm 1,01$ (siehe Abbildung 5, Seite 25). Der Unterschied war nicht statistisch signifikant (t-Test für unabhängige Stichproben, $p=0,550$).

Ergebnisse

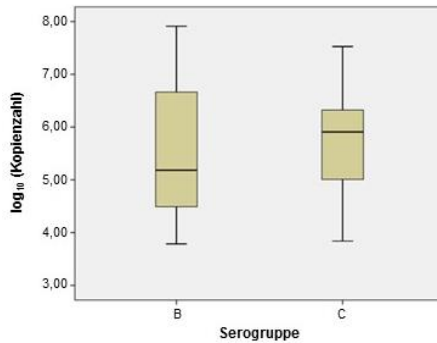


Abbildung 5: Bakterienlast und Serogruppe

3.1.4 Bakterienlast und Feintyp

Diese Analyse enthielt elf Proben (19,3%) des hyperletalen Feintyps B:P1.7-2,4:F1-5, fünf Proben (8,8%) des hyperletalen Feintyps C:P1.5,2:F3-3, 41 restliche Proben (71,9%) mit anderen Feintypen und fünf Proben, bei denen eine Bestimmung des Feintyps nicht möglich war. Mögliche Gründe hierfür könnten beispielsweise die erfolglose Amplifikation von *porA* und *fetA* bei fehlendem kulturellen Nachweis, ein fehlendes *porA*- und *fetA*-Gen, eine Punktmutation in VR1 oder in VR2 von *porA* oder eine zu geringe Probenmenge gewesen sein. Daher wurden diese fünf Proben von der Analyse ausgeschlossen. Blutproben des hyperletalen Feintyps C:P1.5-1,10-8:F3-6 lagen nicht vor. Der Mittelwert des dekadischen Logarithmus der Bakterienlast/ml lag bei dem hyperletalen Feintyp B:P1.7-2,4:F1-5 bei $6,11 \pm 1,19$; bei dem hyperletalen Feintyp C:P1.5,2:F3-3 bei $5,69 \pm 0,92$ und bei den restlichen Proben bei $5,62 \pm 1,36$ (siehe Abbildung 6, Seite 26). Der Unterschied war nicht statistisch signifikant (einfaktorielle Varianzanalyse, $p=0,550$).

Ergebnisse

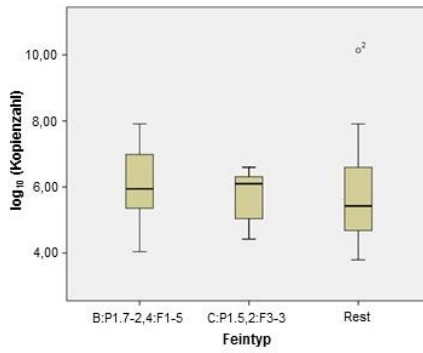


Abbildung 6: Bakterienlast und Feintyp

Ergebnisse

3.1.5 Rohdaten der qPCR

Tabelle 2: Ergebnisse der qPCR

Feintyp	Proben-Nr.	Hyperletaler Feintyp	DNS-Konz. (Kopienzahl/ml)	Material	Tod	Manifestation
B:P1.7,16:F3-3	1322	Nein	10 ^{5,5}	Blut	Nein	NA
B:P1.18-1,3:F1-2	1327	Nein	10 ^{6,9}	Blut	Ja	WFS
B:P1.NA,NA:FNA	1328	Nein	10 ^{3,8}	Blut	NA	NA
C:P1.5,2:FNA	1333	Nein	10 ^{7,5}	Blut	Ja	WFS
W:P1.18-1,3:F4-1	1338	Nein	10 ^{10,1}	Blut	Nein	NA
C:P1.7-2,4:F4-3	1412	Nein	10 ^{6,0}	Blut	Nein	WFS
B:P1.NA,NA:F1-5	1486	Nein	10 ^{5,2}	Blut	Nein	Meningitis
B:P1.NA,NA:F3-3	1497	Nein	10 ^{5,0}	Blut	Nein	Sepsis
B:P1.5-1,10-8:F1-5	2128	Nein	10 ^{5,9}	Blut	Nein	Meningitis
C:P1.NA,NA:FNA	2137	Nein	10 ^{3,8}	Blut	NA	NA
B:P1.12-1,14:F3-7	2157	Nein	10 ^{6,1}	Blut	Nein	WFS
B:P1.7-4,16:F3-3	2274	Nein	10 ^{5,4}	Blut	Nein	WFS
B:P1.7-2,4:F1-5	2364	Ja	10 ^{5,7}	Blut	Nein	Sepsis
C:P1.7,16:F3-3	2537	Nein	10 ^{5,0}	Blut	Nein	Meningitis
B:P1.7-2,4:F5-1	2541	Nein	10 ^{4,0}	Blut	Nein	Meningitis
C:P1.5,2:F1-7	2806	Nein	10 ^{5,9}	Blut	Nein	Sepsis

Ergebnisse

Feintyp	Proben-Nr.	Hyperletaler Feintyp	DNS-Konz. (Kopienzahl/ml)	Material	Tod	Manifestation
C:P1.5,2:F3-3	2851	Ja	10 ^{4,4}	Blut	Nein	Sepsis
C:P1.NA,NA:F3-3	2924	Nein	10 ^{5,4}	Blut	Nein	Sepsis
B:P1.7-2,4:F1-5	3097	Ja	10 ^{5,0}	Blut	Ja	WFS
B:P1.7-2,4:F1-5	3156	Ja	10 ^{6,9}	Blut	Ja	WFS
B:P1.12-1,13-1:F1-5	3164	Nein	10 ^{7,9}	Blut	Ja	Meningitis
B:P1.7-2,4:F1-5	3192	Ja	10 ^{7,3}	Blut	Ja	Sepsis
B:P1.NA,NA:FNA	3307	Nein	10 ^{3,9}	Blut	Nein	WFS
B:P1.7,16:F3-3	3372	Nein	10 ^{3,8}	Blut	Nein	Sepsis
B:P1.18,13-1:F3-3	3402	Nein	10 ^{3,9}	Blut	Nein	Sepsis
C:P1.5,2:F3-3	3448	Ja	10 ^{6,1}	Blut	Nein	WFS
B:P1.5,2:F1-7	3496	Nein	10 ^{4,9}	Blut	Nein	Meningitis
B:P1.7-2,4:F1-5	3545	Ja	10 ^{5,9}	Blut	Nein	Sepsis
C:P1.5,2:F3-3	3672	Ja	10 ^{6,6}	Blut	Ja	Sepsis
B:P1.7,16:F3-3	3698	Nein	10 ^{4,3}	Blut	Nein	WFS
B:P1.22,10-1:FNA	3754	Nein	10 ^{6,8}	Blut	Ja	WFS
B:P1.17,16-4:FNA	3786	Nein	10 ^{3,9}	Blut	Nein	Sepsis
C:P1.5,2:F3-3	3818	Ja	10 ^{6,3}	Blut	Nein	Meningitis
C:P1.18-1,3:F3-9	3827	Nein	10 ^{6,3}	Blut	Nein	WFS

Ergebnisse

Feintyp	Proben-Nr.	Hyperletaler Feintyp	DNS-Konz. (Kopienzahl/ml)	Material	Tod	Manifestation
B:P1.7-2,4:F1-5	3883	Ja	10 ^{5,9}	Blut	Ja	WFS
B:P1.7-2,4:F1-5	3919	Ja	10 ^{7,1}	Blut	Ja	WFS
B:P1.7-2,4:F5-1	3926	Nein	10 ^{3,9}	Blut	Nein	WFS
B:P1.7-2,4:F1-5	4111	Ja	10 ^{6,7}	Blut	Ja	WFS
B:P1.7-2,4:FNA	4215	Nein	10 ^{4,8}	Blut	Nein	Meningitis
B:P1.7-2,4:FNA	4254	Nein	10 ^{4,5}	Blut	Nein	Sepsis
B:P1.22,14:F5-1	4328	Nein	10 ^{4,5}	Blut	Nein	Sepsis
B:P1.7-2,4:F5-1	4435	Nein	10 ^{6,6}	Blut	Ja	WFS
B:P1.22,14:F5-5	4550	Nein	10 ^{4,7}	Blut	NA	NA
B:P1.5,2:F1-7	4580	Nein	10 ^{5,5}	Blut	Ja	WFS
B:P1.7-2,16:F3-3	4646	Nein	10 ^{6,9}	Blut	Ja	WFS
B:P1.NA,NA:FNA	4752	Nein	10 ^{3,9}	Blut	Nein	Meningitis
B:P1.7-2,4:F1-5	4765	Ja	10 ^{4,0}	Blut	Nein	WFS
B:P1.7,16:F5-78	4797	Nein	10 ^{4,7}	Blut	Nein	Meningitis
B:P1.7-2,13-2:F1-5	4847	Nein	10 ^{4,3}	Blut	Nein	Meningitis
B:P1.7-2,4:F1-5	4894	Ja	10 ^{4,7}	Blut	Nein	Sepsis
B:P1.5-1,10-4:F5-2	4935	Nein	10 ^{4,2}	Blut	Nein	NA
C:P1.5,2:F3-3	5088	Ja	10 ^{5,0}	Blut	Ja	Sepsis

Ergebnisse

Feintyp	Proben-Nr.	Hyperletaler Feintyp	DNS-Konz. (Kopienzahl/ml)	Material	Tod	Manifestation
B:P1.5-1,10-4:F1-5	5178	Nein	10 ^{6.7}	Blut	Ja	WFS
B:P1.7-2,4:F1-5	5182	Ja	10 ^{7.9}	Blut	Ja	WFS
B:P1.7,30-2:F3-3	5189	Nein	10 ^{6.5}	Blut	Nein	WFS
B:P1.5-2,10-1:F1-5	5362	Nein	10 ^{5.8}	Blut	Nein	Meningitis
B:P1.7-2,13-1:F5-2	5393	Nein	10 ^{4.8}	Blut	Nein	Sepsis
B:P1.22,14:F5-5	5554	Nein	10 ^{4.8}	Blut	Nein	Sepsis
B:P1.7,16:F3-3	5895	Nein	10 ^{7.8}	Blut	Ja	Sepsis
B:P1.NA,NA:FNA	5952	Nein	10 ^{4.7}	Blut	Nein	Sepsis
B:P1.22,14:F5-5	6086	Nein	10 ^{6.7}	Blut	Nein	Sepsis
B:P1.7-2,4:F5-1	6263	Nein	10 ^{7.0}	Blut	Ja	WFS

Anmerkungen zur Tabelle 2:

NA: Daten nicht verfügbar (not available)

Ergebnisse

3.2 Wachstumsversuche

3.2.1 Invasive versus nicht-invasive Sequenztypen

Die Wachstumsversuche wurden mit dem TECAN-Reader mit einem bereits publizierten Beispiel validiert (16). Dazu wurden 15 Stämme (51,7%) mit invasivem Sequenztyp und 14 Stämme (48,3%) ohne invasiven Sequenztyp (Trägerstämme) getestet und hinsichtlich μ und A verglichen.

Zwischen den invasiven Stämmen und den Trägerstämmen gab es einen marginalen Unterschied hinsichtlich A (exakter Wilcoxon-Test, $p=0,057$). Der Median von A lag bei den Trägerstämmen bei $1,40 \pm 0,23$ [$\log(\text{OD}/\text{OD}_{T0})$] (Median \pm IQR) und bei den invasiven Stämmen bei $1,52 \pm 0,17$ [$\log(\text{OD}/\text{OD}_{T0})$] (Median \pm IQR) (siehe Abbildung 7, Seite 31). Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit μ (t-Test für unabhängige Stichproben, $p=0,199$). Der Mittelwert von μ bei den Trägerstämmen lag bei $(1,39 \pm 0,44) \cdot 10^{-4}$ [$\log(\text{OD}/\text{OD}_{T0})/\text{s}$], bei den invasiven Stämmen bei $(1,56 \pm 0,26) \cdot 10^{-4}$ [$\log(\text{OD}/\text{OD}_{T0})/\text{s}$].

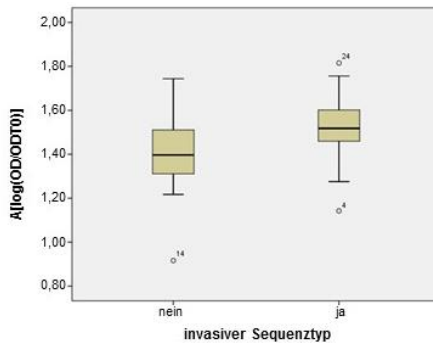


Abbildung 7: Kapazität (A) invasiver versus nicht-invasiver Sequenztypen

Ergebnisse

Tabelle 3: Werte für μ und A invasiver versus nicht-invasiver Sequenztypen

Stamm	Invasivität	μ	A
$\alpha 3$	Nein	$1,44 \cdot 10^{-4}$	1,41
$\alpha 4$	Nein	$1,64 \cdot 10^{-4}$	1,39
$\alpha 14$	Nein	$1,53 \cdot 10^{-4}$	1,30
$\alpha 31$	Ja	$1,46 \cdot 10^{-4}$	1,14
$\alpha 78$	Ja	$1,73 \cdot 10^{-4}$	1,51
$\alpha 95$	Nein	$1,29 \cdot 10^{-4}$	1,31
$\alpha 153$	Nein	$7,68 \cdot 10^{-5}$	1,63
$\alpha 267$	Nein	$1,57 \cdot 10^{-4}$	1,22
$\alpha 275$	Nein	$1,52 \cdot 10^{-4}$	1,61
$\alpha 490$	Nein	$1,40 \cdot 10^{-4}$	1,40
$\alpha 522$	Nein	$1,39 \cdot 10^{-4}$	1,47
$\alpha 533$	Nein	$1,45 \cdot 10^{-4}$	1,38
$\alpha 547$	Ja	$1,55 \cdot 10^{-4}$	1,28
$\alpha 704$	Nein	$7,77 \cdot 10^{-5}$	0,92
$\alpha 707$	Nein	$7,53 \cdot 10^{-5}$	1,33
$\alpha 710$	Ja	$1,94 \cdot 10^{-4}$	1,44
FAM18	Ja	$1,55 \cdot 10^{-4}$	1,59
WUE2121	Ja	$1,06 \cdot 10^{-4}$	1,53
WUE2594	Ja	$1,44 \cdot 10^{-4}$	1,48
MC58	Ja	$1,74 \cdot 10^{-4}$	1,52
Z2491	Ja	$1,46 \cdot 10^{-4}$	1,51
DE6904	Ja	$1,27 \cdot 10^{-4}$	1,73
DE6894	Ja	$1,39 \cdot 10^{-4}$	1,54
DE7017	Ja	$1,45 \cdot 10^{-4}$	1,82
DE7127	Ja	$1,64 \cdot 10^{-4}$	1,76
DE7865	Ja	$2,09 \cdot 10^{-4}$	1,44
DE7901	Nein	$2,51 \cdot 10^{-4}$	1,74
DE9155	Ja	$1,68 \cdot 10^{-4}$	1,61
DE8638	Nein	$1,37 \cdot 10^{-4}$	1,51

Anmerkungen zur Tabelle 3:

Einheit μ : $[\log(\text{OD}/\text{OD}_{T_0})/s]$

Einheit A: $[\log(\text{OD}/\text{OD}_{T_0})]$

Ergebnisse

3.2.2 Hyperletale Feintypen versus Kontrollstämme

Im zweiten Versuch wurden jeweils zehn Stämme der hyperletalen Feintypen B:P1.7-2,4:F1-5, C:P1.5-1,10-8:F3-6 und C:P1.5,2:F3-3 mit ihren jeweiligen Kontrollstämmen (nicht zu den oben genannten hyperletalen Feintypen gehörend) getestet. Diese waren nach Alter des Patienten, Alter der Probe und Geschlecht abgeglichen.

Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Kapazität A zwischen den beiden Gruppen (t-Test bei gepaarten Stichproben, $p=0,033$). Der Mittelwert von A lag bei den hyperletalen Feintypen bei $1,61 \pm 0,16$ [$\log(\text{OD}/\text{OD}_{T0})$] und bei den Kontrollstämmen bei $1,52 \pm 0,15$ [$\log(\text{OD}/\text{OD}_{T0})$] (siehe Abbildung 8, Seite 34). Das bedeutet, dass die Gesamtheit der hyperletalen Feintypen zu höheren Konzentrationen in der Flüssigkultur heranwuchs als die Gesamtheit der Kontrollstämme.

Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit μ zwischen den hyperletalen Feintypen und ihren Kontrollstämmen (asymptomatischer Wilcoxon-Test, $p=0,943$). Der Median von μ betrug bei den hyperletalen Feintypen $(1,43 \pm 0,31) \cdot 10^{-4}$ [$\log(\text{OD}/\text{OD}_{T0})/s$] (Median \pm IQR) und bei den Kontrollstämmen $(1,44 \pm 0,28) \cdot 10^{-4}$ [$\log(\text{OD}/\text{OD}_{T0})/s$] (Median \pm IQR).

Die Dichtedifferenz der einzelnen hyperletalen Feintypen mit ihren jeweiligen Kontrollstämmen hingegen war nicht statistisch signifikant (einfaktorielle Varianzanalyse, $p=0,121$). Der Mittelwert der Dichtedifferenz zwischen dem Stamm B:P1.7-2,4:F1-5 und seinem Kontrollstamm lag bei $0,09 \pm 0,18$ [$\log(\text{OD}/\text{OD}_{T0})$]; bei Stamm C:P1.5-1,10-8:F3-6 bei $-0,01 \pm 0,20$ [$\log(\text{OD}/\text{OD}_{T0})$] und bei Stamm C:P1.5,2:F3-3 bei $0,2 \pm 0,26$ [$\log(\text{OD}/\text{OD}_{T0})$] (siehe Abbildung 9, Seite 34).

Ergebnisse

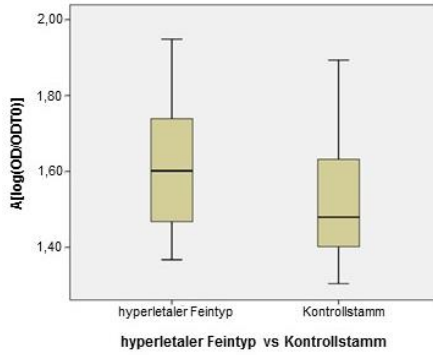


Abbildung 8: Kapazität (A) aller hyperletalen Feintypen versus Kontrollstämme

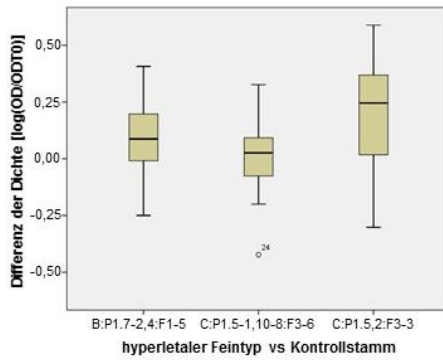


Abbildung 9: Dichtedifferenz hyperletaler Feintypen, aggregiert nach Typ, versus Kontrollstämme

Ergebnisse

3.2.3 Rohdaten der Wachstumsversuche

Tabelle 4: Werte für μ und A hyperletaler Feintypen (μ_1 und A1) versus Kontrollstämme (μ_2 und A2)

Hyperletaler Feintyp	Stamm-Nr.	Eingangsdatum	μ_1	A1	Feintyp Kontrollstamm	Stamm-Nr. Kontrollstamm	Eingangsdatum Kontrollstamm	μ_2	A2	Differenz μ	Differenz A
B:P1.7-2,4:F1-5	9022	26.09.2002	$1,48 \cdot 10^{-4}$	1,64	B:P1.17,9:F1-5	8778	22.05.2002	$1,31 \cdot 10^{-4}$	1,65	$1,73 \cdot 10^{-5}$	-0,01
B:P1.7-2,4:F1-5	9643	09.01.2004	$1,42 \cdot 10^{-4}$	1,49	B:P1.18-1,3:F1-5	9699	19.02.2004	$1,48 \cdot 10^{-4}$	1,56	$-6,17 \cdot 10^{-5}$	-0,08
B:P1.7-2,4:F1-5	9678	03.02.2004	$1,50 \cdot 10^{-4}$	1,67	B:P1.12-1,16:F5-1	9232	12.02.2003	$1,52 \cdot 10^{-4}$	1,47	$-1,92 \cdot 10^{-6}$	0,20
B:P1.7-2,4:F1-5	9992	15.12.2004	$1,01 \cdot 10^{-4}$	1,69	B:P1.5-1,10-13:F1-17	10286	07.07.2005	$1,58 \cdot 10^{-4}$	1,43	$-5,72 \cdot 10^{-5}$	0,27
B:P1.7-2,4:F1-5	10110	03.03.2005	$1,49 \cdot 10^{-4}$	1,47	B:P1.18-1,3:F1-5	10393	23.11.2005	$1,31 \cdot 10^{-4}$	1,43	$1,88 \cdot 10^{-5}$	0,03
B:P1.7-2,4:F1-5	10421	14.12.2005	$1,42 \cdot 10^{-4}$	1,44	Y:P1.5-1,10-4:F4-1	10645	21.04.2006	$1,08 \cdot 10^{-4}$	1,37	$3,38 \cdot 10^{-5}$	0,07
B:P1.7-2,4:F1-5	11246	06.11.2007	$1,31 \cdot 10^{-4}$	1,72	B:P1.7-1,1:F1-5	11556	01.10.2008	$1,55 \cdot 10^{-4}$	1,57	$-2,35 \cdot 10^{-5}$	0,15
B:P1.7-2,4:F1-5	11773	26.03.2009	$1,44 \cdot 10^{-4}$	1,40	W135:P1.5,2:F1-1	11941	15.12.2009	$1,47 \cdot 10^{-4}$	1,65	$-3,25 \cdot 10^{-6}$	-0,25
B:P1.7-2,4:F1-5	12055	14.04.2010	$2,41 \cdot 10^{-4}$	1,74	W135:P1.18-1,3:F4-1	11967	09.01.2010	$1,23 \cdot 10^{-4}$	1,33	$1,17 \cdot 10^{-4}$	0,41
B:P1.7-2,4:F1-5	12941	22.05.2013	$1,39 \cdot 10^{-4}$	1,53	B:P1.22,14:F5-5	12952	06.06.2013	$1,27 \cdot 10^{-4}$	1,43	$1,21 \cdot 10^{-5}$	0,10
C:P1.5-1,10-8:F3-6	9168	07.01.2003	$1,58 \cdot 10^{-4}$	1,74	W135:P1.22-1,14:F1-18	8504	11.02.2002	$1,30 \cdot 10^{-4}$	1,63	$2,79 \cdot 10^{-5}$	0,11
C:P1.5-1,10-8:F3-6	10273	25.06.2005	$1,58 \cdot 10^{-4}$	1,54	B:P1.5-2,10:F5-1	9864	30.06.2004	$1,45 \cdot 10^{-4}$	1,45	$1,28 \cdot 10^{-5}$	0,09
C:P1.5-1,10-8:F3-6	10545	24.02.2006	$1,29 \cdot 10^{-4}$	1,47	C:P1.5,2:F3-6	10291	09.07.2005	$1,36 \cdot 10^{-4}$	1,67	$-7,42 \cdot 10^{-6}$	-0,20
C:P1.5-1,10-8:F3-6	10793	23.08.2006	$4,58 \cdot 10^{-5}$	1,43	B:P1.5-1,10-8:F1-5	10700	01.06.2006	$1,49 \cdot 10^{-4}$	1,86	$-1,03 \cdot 10^{-4}$	-0,42
C:P1.5-1,10-8:F3-6	10818	14.09.2006	$1,01 \cdot 10^{-4}$	1,50	C:P1.5-1,10-55:F3-6	10544	25.02.2006	$1,43 \cdot 10^{-4}$	1,46	$-4,14 \cdot 10^{-5}$	0,04
C:P1.5-1,10-8:F3-6	11614	03.12.2008	$1,42 \cdot 10^{-4}$	1,41	B:P1.5-2,10:F5-1	11609	27.11.2008	$1,22 \cdot 10^{-4}$	1,49	$2,08 \cdot 10^{-5}$	-0,08

Ergebnisse

Hyperletaler Feintyp	Stamm-Nr.	Eingangsdatum	$\mu 1$	A1	Feintyp Kontrollstamm	Stamm-Nr. Kontrollstamm	Eingangsdatum Kontrollstamm	$\mu 2$	A2	Differenz μ	Differenz A
C:P1.5-1,10-8:F3-6	11798	22.04.2009	$1,28 \cdot 10^{-4}$	1,54	B:P1.17,16-4:F5-12	11536	05.09.2008	$1,93 \cdot 10^{-4}$	1,60	$-6,54 \cdot 10^{-5}$	-0,06
C:P1.5-1,10-8:F3-6	12472	18.10.2011	$1,72 \cdot 10^{-4}$	1,63	W135:P1.18-1,3:F4-1	12677	22.06.2012	$1,52 \cdot 10^{-4}$	1,55	$1,94 \cdot 10^{-5}$	0,08
C:P1.5-1,10-8:F3-6	12787	30.11.2012	$1,50 \cdot 10^{-4}$	1,78	B:P1.22,9:F4-3	12650	18.05.2012	$1,42 \cdot 10^{-4}$	1,45	$8,00 \cdot 10^{-6}$	0,33
C:P1.5-1,10-8:F3-6	12823	19.01.2013	$1,51 \cdot 10^{-4}$	1,42	B:P1.7-2,4:F5-1	12999	05.09.2013	$1,60 \cdot 10^{-4}$	1,40	$-9,17 \cdot 10^{-6}$	0,02
C:P1.5,2:F3-3	9464	11.07.2003	$1,55 \cdot 10^{-4}$	1,60	B:P1.7-2,4:F5-1	9830	27.05.2004	$1,62 \cdot 10^{-4}$	1,38	$-7,50 \cdot 10^{-6}$	0,23
C:P1.5,2:F3-3	9696	18.02.2004	$1,53 \cdot 10^{-4}$	1,75	B:P1.22,14:F5-9	9685	10.02.2004	$1,31 \cdot 10^{-4}$	1,30	$2,12 \cdot 10^{-5}$	0,45
C:P1.5,2:F3-3	9849	15.06.2004	$1,23 \cdot 10^{-4}$	1,63	B:P1.5-1,2-2:F1-7	10234	25.05.2005	$1,21 \cdot 10^{-4}$	1,61	$1,83 \cdot 10^{-6}$	0,02
C:P1.5,2:F3-3	10359	14.10.2005	$1,66 \cdot 10^{-4}$	1,77	W135:P1.18-1,3:F3-12	10572	15.03.2006	$1,57 \cdot 10^{-4}$	1,64	$9,33 \cdot 10^{-6}$	0,13
C:P1.5,2:F3-3	10559	07.03.2006	$1,22 \cdot 10^{-4}$	1,60	W135:P1.18-1,3:F5-8	10825	26.09.2006	$1,18 \cdot 10^{-4}$	1,34	$4,33 \cdot 10^{-6}$	0,26
C:P1.5,2:F3-3	10788	21.08.2006	$1,19 \cdot 10^{-4}$	1,37	B:P1.19,15:F1-14	10493	27.01.2006	$2,22 \cdot 10^{-4}$	1,67	$-1,03 \cdot 10^{-4}$	-0,30
C:P1.5,2:F3-3	11259	22.11.2007	$1,25 \cdot 10^{-4}$	1,58	B:P1.22,9:F1-7	11396	28.03.2008	$1,57 \cdot 10^{-4}$	1,31	$-3,25 \cdot 10^{-5}$	0,27
C:P1.5,2:F3-3	12343	24.03.2011	$2,97 \cdot 10^{-4}$	1,95	C:P1.NA,NA:F3-9	12351	05.04.2011	$1,38 \cdot 10^{-4}$	1,36	$1,59 \cdot 10^{-4}$	0,59
C:P1.5,2:F3-3	12536	09.01.2012	$1,05 \cdot 10^{-4}$	1,88	C:P1.5-1,10-8:F5-7	12659	05.06.2012	$1,17 \cdot 10^{-4}$	1,51	$-1,13 \cdot 10^{-5}$	0,37
C:P1.5,2:F3-3	12954	06.06.2013	$1,84 \cdot 10^{-4}$	1,85	B:P1.22,14:F5-1	12768	08.11.2012	$2,39 \cdot 10^{-4}$	1,89	$-5,44 \cdot 10^{-5}$	-0,04

Anmerkungen zur Tabelle 4:
 Einheit μ : $[\log(\text{OD}/\text{OD}_{T0})/s]$
 Einheit A: $[\log(\text{OD}/\text{OD}_{T0})]$

Diskussion

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Letalität von Meningokokkenerkrankungen liegt trotz antibiotischer Behandlung weiterhin bei 10% (1). In der bisherigen Forschung war die Suche nach spezifischen Virulenzfaktoren dieser Bakterienspezies nicht zufriedenstellend und es konnten bis jetzt keine Erklärungsansätze für ihre hohe Letalität gefunden werden. Man beobachtete jedoch, dass sogenannte hypervirulente klonale Komplexe wie ST-11, ST-32, ST-8, ST-41/44, ST-1, ST-4 und ST-5 mit einer höheren Letalität und häufigeren Spät komplikationen assoziiert sind (22). Zudem zeigte eine explorative Analyse von mehr als 4.000 Fällen in zwölf Jahren (bisher nicht veröffentlichte Daten des NRZMHi), dass Feintyp C:P1.5-1,10-8:F3-6 und Feintyp C:P1.5.2:F3-3, die beide zu dem ST-11 Komplex gehören, mit einer überdurchschnittlich hohen Letalität einhergehen und somit auch als „hyperletal“ bezeichnet werden können. Auch B:P1.7-2,4:F1-5 wurde geringfügig häufiger mit Tod assoziiert als andere Stämme.

Diese Beobachtungen werfen die Frage auf, ob eine besonders hohe Bakterienlast im Blut und / oder eine spezifische Wachstums kinetik in vitro mit der hohen Letalität bestimmter Meningokokkentypen in Zusammenhang stehen könnten. Auf dieser Annahme basierend wurden in der vorliegenden Arbeit beispielhaft zwei (siehe 3.1.4 Bakterienlast und Feintyp, Seite 25) bzw. drei (siehe 3.2.2 Hyperletale Feintypen versus Kontrollstämme, Seite 33) sogenannte hyperletale Feintypen, die mit oben genannten hypervirulenten klonalen Komplexen assoziiert sind, auf ihre Bakterienlast im Blut bzw. auf ihre Wachstums kinetik in Flüssigkultur untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass es einen statistisch signifikanten Unterschied der Bakterienlast je nach Krankheitsausgang und klinischem Bild gibt. Patienten, deren Nativmaterial eine hohe Bakterienlast aufwies, verstarben häufiger als Patienten mit einer geringeren Bakterienlast im Nativmaterial (siehe Abbildung 3: Bakterienlast und Krankheitsausgang, Seite 23). Je höher die Bakterienlast, desto kritischer war auch das klinische Bild des Patienten (siehe Abbildung 4: Bakterienlast und klinisches Bild, Seite 24). Zeigte der Patient beispielsweise

Diskussion

Zeichen einer Sepsis oder sogar einer fulminanten Sepsis, konnte dies mit einer hohen bakteriellen Last assoziiert werden.

Des Weiteren konnte ein Unterschied in der Kapazität A zwischen den hyperletalen Feintypen und ihren Kontrollstämmen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 8: Kapazität (A) aller hyperletalen Feintypen versus Kontrollstämmen, Seite 34). Das bedeutet, dass die Gruppe der hyperletalen Feintypen zu höheren Konzentrationen in der Flüssigkultur heranwuchsen als die Gruppe der Kontrollstämmen. Folglich kommt eine höhere bakterielle Last als mögliche Ursache für die überdurchschnittlich hohe Letalität in Frage. Ein statistisch signifikanter Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit μ ergab sich nicht. Die Dichtedifferenz der einzelnen hyperletalen Feintypen mit ihren jeweiligen Kontrollstämmen hingegen war nicht statistisch signifikant, d.h. die Aggregation auf Typebene führte, möglicherweise begünstigt durch die kleine Zahl der Einzelmessungen, zu einem Verlust des oben genannten Effekts (siehe Abbildung 9: Dichtedifferenz hyperletaler Feintypen, aggregiert nach Typ, versus Kontrollstämmen, Seite 34).

Der Vergleich der Bakterienlast zwischen der Serogruppe B und C (siehe Abbildung 5: Bakterienlast und Serogruppe, Seite 25) ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied. Ebenso zeigten die hyperletalen Feintypen B:P1.7-2,4:F1-5 und C:P1.5,2:F3-3 im Vergleich zu den restlichen Proben keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Bakterienlast (siehe Abbildung 6: Bakterienlast und Feintyp, Seite 26).

Somit konnte Hypothese 1, die einen Unterschied in der bakteriellen Last im Blut bei den sogenannten hyperletalen Typen im Vergleich zu den Kontrollstämmen als Grund für die erhöhte Letalität vermuten ließ, nicht bestätigt werden (siehe Abbildung 6: Bakterienlast und Feintyp, Seite 26).

Hypothese 2 wurde bestätigt. Demnach könnte ein Unterschied im Bakterienwachstum, insbesondere in der maximalen Bakteriendichte in Flüssigkultur bei den hyperletalen Typen im Vergleich zu ihren Kontrollstämmen, ein Grund für die erhöhte Letalität sein (siehe Abbildung 8: Kapazität (A) aller hyperletalen Feintypen versus Kontrollstämmen, Seite 34).

Diskussion

4.2 Diskussion des Messverfahrens (qPCR-Methode)

4.2.1 Einfluss der antibiotischen Therapie auf die Bakterienlast

Durch den Einsatz einer antibiotischen Therapie wird das Verhältnis von lebenden zu toten Bakterien verschoben. Daher ist die Verwendung der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion - im Gegensatz zu älteren Methoden wie die Bestimmung der lebenden Bakterien über quantitative Blutkulturen – besonders geeignet zur Detektion der gesamten Bakterienlast, da sie den Nachweis der DNS von lebenden wie auch von verstorbenen Meningokokken (31,32) gewährleistet. Dies kann einen Unterschied von drei bis zu vier Zehnerpotenzen ausmachen (31). Damit kann eine Abschätzung der wahren Bakterienlast erfolgen, da sowohl die lebenden wie auch die toten Bakterien ihren Beitrag zur Schwere der Erkrankung leisten. Durch Freisetzung des toxischen LPS aus verstorbenen Meningokokken wird beispielsweise eine massive Entzündungsreaktion mit Flüssigkeitsverschiebungen, Vasodilatation bis hin zum septischen Schock vermittelt.

In dieser Arbeit wurde bei der Ermittlung der bakteriellen Last nicht berücksichtigt, ob der Patient zum Zeitpunkt der Blutentnahme bereits eine antibiotische Therapie erhalten hatte oder nicht. Eine Verfälschung der Messdaten durch eine antibiotische Therapie oder durch ein verzögertes Einreichen der Probe erscheint unter Berücksichtigung der folgenden Studien unwahrscheinlich.

Darton und Kollegen (20) zeigen in ihrer Studie, dass es für die Bakterienlast keine Rolle spielt, ob die Einleitung einer antibiotischen Therapie vor oder bei Krankenhausaufnahme erfolgt ($p=0,455$, Mann-Whitney-U-Test). Ebenfalls führte ein verzögertes Einreichen der Probe zu keinem statistisch signifikanten Unterschied in der Bakterienlast (20).

Zudem zeigte die Studie von Hackett et al. (32), dass nach Einleitung einer Therapie (antibiotische Therapie oder Flüssigkeitssubstitution) die Bakterienlast nicht von der therapiebedingten DNS-Eliminationsrate abhängig ist. Patienten, die ein ähnliches klinisches Bild zeigten und vergleichbare Therapien erhielten, wiesen trotzdem deutliche Unterschiede in der Elimination der DNS auf (32). Es scheint vielmehr eine individuelle DNS-Eliminationsrate des Wirtes und nicht die antibiotische Therapie selbst für den Unterschied in der Bakterienlast verantwortlich zu sein (32).

Diskussion

Aus oben genannten Gründen war es legitim, die Gabe von Antibiotika in der Auswertung unberücksichtigt zu lassen.

4.2.2 Einfluss des Probenmaterials und des Probenalters auf die Analyse

In der Literatur lagen unterschiedliche Empfehlungen bezüglich des Materialtyps vor. Darton et al. (20) empfiehlt die Verwendung von EDTA-Blut, da dieses sich sensitiver als Plasma erwies. Øvstebø et al. (31) plädiert für die Verwendung von Plasma, da die Menge der gewonnenen DNS aus Plasma höher im Vergleich zu Serum sei. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Øvstebø et al. (31) eignete sich Liquor als möglicher Materialtyp für die vorliegenden Versuche nicht, da hier ein Nachweis von Meningokokken-DNS nur im Falle der Meningitis zu erwarten ist. In den vorliegenden Versuchen wurden alle zur Verfügung stehenden Proben aus Blut (EDTA-Blut, Plasma) in die Testung eingeschlossen.

Bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit muss berücksichtigt werden, dass die untersuchten Proben (Eingang zwischen 2003 und 2012) über viele Jahre eingefroren waren und eine Degradation von DNS durch die Lagerungsdauer sowie durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren nicht auszuschließen ist. Eine dadurch geringer gemessene Kopienzahl könnte möglicherweise vorliegen.

4.2.3 Sensitivität und Spezifität der Primer

Die Bestimmung der Bakterienlast erfolgte durch den Nachweis des *ctrA*-Gens mit den Primern *ctrA_1_F* (5'-GCTGCGGTAGGTGGTTCAA), *ctrA_1_R* (5'-TTGTCGCGGATTGCAACTA) und der Sonde *ctrA_1_P* (6-FAM-CATTGCCACGTGTCAGCTGCACAT). Die verwendeten Primer markierten ein Fragment von ca. 100bp des 1160bp (36) großen *ctrA*-Gens. Sie wiesen in der Studie von Corless et al. (33) eine Sensitivität von 88,4% sowie eine Spezifität von 100% auf. Damit waren sie sensitiver als andere bisher beschriebene Primer (37). Aufgrund ihrer hohen Spezifität und Sensitivität sowie der Stabilität der Nukleotidsequenzen des *ctrA*-Gens innerhalb der verschiedenen Serogruppen (36) ist von einer guten Detektionsrate auszugehen. Es gibt allerdings auch Fälle, bei denen der Nachweis des *ctrA*-Gens versagt. Beispielsweise waren 16,4% der Trägerstämme einer untersuchten Population in

Diskussion

Bayern aus dem Jahre 2002 *ctrA*-negativ und enthielten stattdessen den sogenannten Kapsel-Null-Lokus (*cnl*) (38,39). In den untersuchten Proben dieser Arbeit lagen Erkrankungen mit *cnl* jedoch nicht vor.

4.2.4 Limitationen der Stichprobe

Die Quantifizierung der Bakterienlast erfolgte aufgrund der geringen Probenzahl von 62 mit allen dem NRZMHi zur Verfügung stehenden Blutproben mit Informationen bezüglich Serogruppe, Feintyp, Krankheitsmanifestation und Letalität. Diese Daten wurden entweder am NRZMHi selbst generiert (Serogruppe, Feintyp) oder sie stammten von den am RKI eingegangenen Meldedaten (Krankheitsmanifestation, Letalität). Da bei Krankheitsverdacht, Erkrankung sowie Tod an einer Meningokokken-Meningitis oder –Sepsis wie auch beim direkten Erregernachweis eine Meldepflicht innerhalb von 24 Stunden an das Gesundheitsamt besteht (5), ist die Wahrscheinlichkeit einer Verzerrung der Daten aufgrund von Erinnerungslücken (Recall Bias) relativ gering. Weiterhin wurden die Daten von ärztlichem Personal erhoben, welches diese wahrscheinlich gewissenhaft weiterleitete. Durch die ausschließliche Verwendung von allen zur Verfügung stehenden Blutproben ist eine Auswahlverzerrung (Selection Bias) möglich. Die Proben wurden aufgrund des gewünschten Materialtyps „Blut“ in die Analyse eingeschlossen.

Eine Limitation dieser Arbeit ist im geringen Stichprobenumfang und der dadurch geringen Teststärke zu sehen. Die vergleichsweise niedrige Probenzahl könnte ein Grund für den nicht nachweisbaren Unterschied in der bakteriellen Last der Serogruppe B und C und den nicht nachweisbaren Unterschied zwischen den hyperletalen Feintypen und den restlichen Proben sein. Um statistisch signifikante Ergebnisse zu erreichen, sollte die Testung mit einer höheren Stichprobenzahl fortgeführt werden.

4.3 Diskussion der Ergebnisse (qPCR-Methode)

4.3.1 Bakterienlast und Krankheitsausgang sowie klinisches Bild

In einigen Studien wurde der Zusammenhang zwischen der Bakterienlast je nach Manifestation der Erkrankung beschrieben. Es wurde gezeigt, dass sowohl die DNS-Menge, wie auch die LPS-Spiegel wichtige Informationen über die Erkrankungsschwere und den Ausgang der Infektion geben (31). Auch in einer

Diskussion

Studie von Hackett und Kollegen (32) wurde der Zusammenhang zwischen der Bakterienlast mit dem Ausgang der Infektion und mit der Erkrankungsschwere beobachtet. Diese Zusammenhänge konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden: Patienten, die an einer Meningokokkenerkrankung verstarben, wiesen einen höheren Median der Kopienzahl/ml ($7,1 \times 10^6$ Kopien/ml) als die überlebenden Patienten ($7,4 \times 10^4$ Kopien/ml) auf (siehe Abbildung 3: Bakterienlast und Krankheitsausgang, Seite 23). Bei der Meningitis als mögliche Manifestationsform der Erkrankung lag der Median der Kopienzahl/ml bei ($8,9 \times 10^4$ Kopien/ml), bei den septischen Patienten lag der Median in der gleichen Größenordnung ($7,9 \times 10^4$ Kopien/ml) und bei Patienten mit WFS wurde die höchste Menge an Meningokokken-DNS nachgewiesen ($2,8 \times 10^6$ Kopien/ml) (siehe Abbildung 4: Bakterienlast und klinisches Bild, Seite 24). In der Studie von Øvstebø und Kollegen (31) zeigte sich ebenfalls ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,029$) zwischen den verstorbenen Patienten mit fulminanter Sepsis und den überlebenden Patienten. Der Median der Kopienzahl/ml lag bei den verstorbenen Patienten bei $4,6 \times 10^7$ Kopien/ml und bei den überlebenden Patienten bei 1×10^7 Kopien/ml. Weiterhin wurde auch hier ein statistisch signifikanter Unterschied ($p<0,001$) in der Kopienzahl/ml zwischen Patienten mit fulminanter Sepsis und Meningitis beschrieben. Bei Patienten mit Meningitis betrug der Median weniger als 10^3 Kopien/ml, bei Patienten mit milder systemischer Meningokokkenerkrankung (eine Entität, die in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde) lag er bei $7,7 \times 10^3$ Kopien/ml, bei Patienten mit Sepsis und Meningitis betrug dieser $1,1 \times 10^7$ Kopien/ml und bei Patienten mit fulminanter Sepsis bzw. WFS waren es $2,0 \times 10^7$ Kopien/ml. Die Differenz des Medians zwischen den überlebenden und den verstorbenen Patienten betrug in der vorliegenden Arbeit zwei Zehnerpotenzen ($7,4 \times 10^4$ Kopien/ml vs. $7,1 \times 10^6$ Kopien/ml). Die Berechnungen des Medians von Øvstebø und Kollegen (31) ergaben sowohl bei den überlebenden wie auch bei den verstorbenen Patienten die gleiche Größenordnung (1×10^7 Kopien/ml vs. $4,6 \times 10^7$ Kopien/ml). Der Unterschied des Medians in der Kopienzahl/ml zwischen den an Meningitis erkrankten Patienten im Vergleich zu den an Sepsis erkrankten Patienten war in der vorliegenden Arbeit vernachlässigbar gering ($8,9 \times 10^4$ Kopien/ml vs. $7,9 \times 10^4$ Kopien/ml), die Differenz des Medians innerhalb dieser Gruppen lag bei Øvstebø und Kollegen (31) bei vier Zehnerpotenzen ($<10^3$ Kopien/ml vs. $1,1 \times 10^7$ Kopien/ml) mit einem dafür sehr

Diskussion

geringen Unterschied zwischen den an Sepsis und den an fulminanter Sepsis bzw. dem WFS erkrankten Patienten ($1,1 \times 10^7$ Kopien/ml vs. $2,0 \times 10^7$ Kopien/ml). In der vorliegenden Arbeit betrug der Unterschied des Medians der Bakterienlast zwischen den an Sepsis oder an dem WFS erkrankten Patienten zwei Zehnerpotenzen ($7,9 \times 10^4$ Kopien/ml vs. $2,8 \times 10^6$ Kopien/ml).

Im Vergleich zu den Werten der vorliegenden Arbeit zeigten sich Unterschiede zu den Werten der Studie von Øvstebø und Kollegen (31). Diese wiesen in der Gruppe der Sepsis und Meningitis sowie der fulminanten Sepsis höhere und in der Gruppe der milden systemischen Meningokokkenerkrankung sowie der Meningitis geringere Kopienzahlen nach. Letzteres könnte auf die Einteilung der verschiedenen Gruppen bei Øvstebø und Kollegen (31) zurückzuführen sein: Die Bestimmung der Meningokokken-DNS über die Detektion des *ctrA*-Gens ist nur bei 41 von 65 Proben gelungen, obwohl bei allen Proben nachweislich (kulturell, serologisch oder mittels PCR) eine Meningokokkenerkrankung vorlag. Patienten ohne messbare Meningokokken-DNS wurden in die klinischen Gruppen „milde systemische Meningokokkenerkrankung“ (n=5) oder „Meningitis“ (n=19) eingeteilt. Daher sind die Gruppen der milden systemischen Meningokokkenerkrankung und der Meningitis in der Studie von Øvstebø und Kollegen (31) verhältnismäßig groß (42 von 65) und die Gruppe der Patienten mit Sepsis und Meningitis sowie der fulminanten Sepsis verhältnismäßig klein (23 von 65).

In einer Studie von Darton und Kollegen (20) wurde der statistisch signifikante Unterschied in der bakteriellen Last zwischen den verstorbenen im Vergleich zu den überlebenden Patienten erneut bestätigt (n=1045, $p < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test). Es erfolgte wie in den Versuchen der vorliegenden Arbeit der Nachweis des *ctrA*-Gens aus EDTA-Blut mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion. Der Median lag bei den verstorbenen Patienten bei $1,9 \times 10^5$ Kopien/ml im Vergleich zu $6,2 \times 10^3$ Kopien/ml bei den überlebenden Patienten. Der Unterschied betrug damit zwei Zehnerpotenzen. In der vorliegenden Arbeit lag der Median bei den verstorbenen Patienten bei $7,1 \times 10^6$ Kopien/ml und bei den überlebenden Patienten bei $7,4 \times 10^4$ Kopien/ml (siehe Abbildung 3: Bakterienlast und Krankheitsausgang, Seite 23).

Diskussion

4.3.2 Bakterienlast und Serogruppe

Weiterhin wurde in derselben Arbeit von Darton und Kollegen (20) eine dreifach erhöhte Letalität für Infektionen mit Serogruppe C im Vergleich zu Infektionen mit anderen Serogruppen beschrieben ($n=1252$, $p<0,001$, Chi-Quadrat-Test). Der Vergleich der bakteriellen Last zwischen den Serogruppen ergab einen Median von $5,5 \times 10^3$ Kopien/ml für Infektionen mit Serogruppe B und $2,5 \times 10^4$ Kopien/ml für Infektionen mit Serogruppe C. Infektionen mit Serogruppe B waren mit einer niedrigeren ($n=1045$, $p<0,001$, Mann-Whitney-U-Test), Infektionen mit Serogruppe C hingegen mit einer höheren bakteriellen Last assoziiert ($n=1045$, $p<0,001$, Mann-Whitney-U-Test). Das Ergebnis unterscheidet sich von den Resultaten der vorliegenden Arbeit, bei denen es zwischen dem Mittelwert der bakteriellen Last der Serogruppen B ($3,2 \times 10^5$ Kopien/ml) und C ($5,0 \times 10^5$ Kopien/ml) zwar einen tendenziellen, aber keinen statistisch signifikanten Unterschied gab (siehe Abbildung 5: Bakterienlast und Serogruppe, Seite 25).

Am wahrscheinlichsten für den in dieser Studie nicht signifikanten Unterschied zwischen den Serogruppen ist die geringe Teststärke, bedingt durch die geringe Probenzahl von 61 im Vergleich zu den 1045 Proben aller Serogruppen (bzw. 904 Proben der Serogruppe B und C) der Studie von Darton und Kollegen (20). Von den 61 Proben der vorliegenden Arbeit waren bei 49 Proben Serogruppe B und in zwölf Proben Serogruppe C nachgewiesen worden. Im Verhältnis dazu stehen 587 Proben der Serogruppe B und 317 Proben der Serogruppe C aus der Studie von Darton und Kollegen (20).

Ein weiterer Einflussfaktor könnte der unterschiedliche Sammelzeitraum der Proben sein. Die Proben von Darton und Kollegen (20) wurden im Zeitraum von Januar 1999 bis Dezember 2001 im Vereinigtem Königreich gesammelt, die Proben der vorliegenden Studie stammen aus den Jahren 2003 bis 2012 und aus Deutschland. Weiterhin könnte die unterschiedliche Verteilung der klonalen Komplexe das Ergebnis beeinflussen. Die meisten Isolate der Serogruppe C aus der Zeit der Studie von Darton und Kollegen (20) enthielten den ST-11 Komplex und waren womöglich deshalb mit einer erhöhten Letalität und einer erhöhten Bakterienlast assoziiert. Da in einer Studie von Brehony und Kollegen (17) geringe Unterschiede in der geographischen Verteilung der klonalen Komplexe zwischen den Ländern zu verzeichnen sind, könnte möglicherweise ein

Diskussion

Unterschied in der Prävalenz des ST-11 Komplexes zwischen Deutschland sowie dem Vereinigten Königreich die fehlende Signifikanz in der Kopienzahl zwischen Serogruppe B und C der vorliegenden Studie erklären.

Es könnte sein, dass die oben genannten Faktoren zu dem nicht statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Serogruppen in dieser Studie beitragen.

4.3.3 Bakterienlast und Feintyp

In den vorliegenden Versuchen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Bakterienlast in vivo zwischen den hyperletalen Feintypen und den restlichen Proben (siehe Abbildung 6: Bakterienlast und Feintyp, Seite 26).

Als ein möglicher Grund könnte auch hier die bereits diskutierte geringe Stichprobengröße zu diesem Ergebnis geführt haben. Ein anderer Grund wäre, dass der Effekt tatsächlich nicht existiert. Um statistisch signifikante Ergebnisse zu erreichen, sollte eine Testung von weiterem Material erfolgen.

4.3.4 Abschließender Vergleich mit anderen Studien und analytische Sensitivität

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die aus Nativmaterial ermittelten Kopien/ml je nach untersuchter Gruppe (Krankheitsausgang, klinisches Bild, Serogruppe) verglichen mit anderen Studien (20,31,32) ähnliche Werte aufwiesen.

Die Quantifizierung der bakteriellen Last durch Nachweis des *ctrA*-Gens mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion wird in der Literatur in einem Bereich von 10^3 bis 10^8 Kopien/ml (20) bzw. von 10^3 bis 10^9 Kopien/ml (32) angegeben. Øvstebø und Kollegen (31) geben die untere theoretische Nachweisgrenze ebenfalls bei 10^3 Kopien/ml an. Damit liegt die analytische Sensitivität dieser Arbeit, die 10^3 bis 10^{10} Kopien/ml erfasst, im Bereich der in der Literatur zu findenden Angaben.

4.4 Diskussion der kontinuierlichen Absorptionsmessung im Mikrotiterplattenleser (TECAN-Reader)

Durch die umfassende Stammsammlung des NRZMHi konnten die Wachstumsversuche mit einer großen Auswahl an Stämmen durchgeführt werden. Das Matching der Stämme im Verhältnis 1:1 nach Alter des Patienten,

Diskussion

Alter der Probe und Geschlecht machte eine gemeinsame Analyse der hyperletalen Stämme mit ihren Kontrollstämmen möglich.

4.4.1 Vorteile der kontinuierlichen Absorptionsmessung

In dieser Arbeit wurde eine neue Methode zur vereinfachten Durchführung von Wachstumsversuchen mit Meningokokken vorgestellt. Die Versuche erfolgten mittels kontinuierlicher Absorptionsmessung im Mikrotiterplattenleser (TECAN-Reader).

Die Verwendung des TECAN-Readers ermöglicht simultan die Inkubation der Bakterien und die maschinelle Messung der OD über einen bestimmten Zeitraum. Das Gerät garantiert für die Dauer der Messung eine konstante Temperatur mit einer Spanne von 2,5°C. Der Zeitraum und die Häufigkeit der Messungen sind variabel einstellbar. Die Schüttelschritte mit der Möglichkeit des linearen und orbitalen Schüttelns können individuell optimiert werden. Zudem wird die Sicherheit durch die Reduktion der einzelnen Handgriffe erhöht. Die maschinelle Messung ist eine effiziente Methode, weil lediglich ein Mitarbeiter für den Ansatz der Bakteriensuspension und Befüllung der Platte benötigt wird. Danach erfolgen die Messungen automatisch. Durch die vom TECAN-Reader generierte Messdatentabelle können Fehlmessungen und deren Ursache noch während des Versuches aufgedeckt werden.

In den Versuchen dieser Arbeit war eine Testung mit maximaler Effizienz von zehn Stämmen pro Tag möglich, da die vorher festgelegte Toleranzzeit nicht überschritten werden sollte und ein Verdunstungsschutz in den äußeren Vertiefungen benötigt wurde. Für andere Versuchsvoraussetzungen könnte die Anzahl der Stämme pro Versuchsdurchlauf möglicherweise erhöht werden, was die Effizienz des Verfahrens weiter steigern würde. Andere Bakterienspezies könnten nach Anpassung des Protokolls ebenso mit dieser Methode getestet werden.

Diese Punkte stellen eine deutliche Erleichterung gegenüber den aufwendigen halbstündlichen Messungen im Schüttelversuch dar. Manuelle Unterbrechungen zur Messung der OD, Temperaturveränderungen und Schwankungen in der Sauerstoffkonzentration beim Öffnen der Maschine, können im TECAN-Reader vermieden werden. Zudem wird die Wahrscheinlichkeit von Fehlern z.B. durch Probenverwechslung oder Fehlmessungen durch die maschinelle Absorptionsmessung reduziert.

Diskussion

4.4.2 Limitationen der Wachstumsversuche

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen aus verschiedenen Gründen Limitationen auf. Die geringe Stichprobengröße macht weitere Testungen mit größerer Stammzahl erforderlich. Eine weitere Limitation dieser Arbeit ist der geringfügig detektierte Unterschied ($p=0,057$) in der Kapazität zwischen Trägerstämmen und invasiven Stämmen im Vergleich zu den statistisch signifikanten Ergebnissen ($p=0,029$) von Schoen und Kollegen (16). Damit konnte die Anwendung des TECAN-Readers zur Ermittlung von μ und A nur mit Einschränkung als valide befunden werden. Die abweichenden Ergebnisse können auf mehrere potentielle Ursachen zurückgeführt werden.

Möglicherweise ist das Verfahren des TECAN-Readers mit der händischen OD-Messung von Schoen et al. (16) nicht ganz vergleichbar. Es wurde zwar ein ähnliches Protokoll verwendet, allerdings gibt es zwischen beiden Verfahren Unterschiede in der Auswertung (siehe 4.5.1 Invasive versus nicht-invasive Sequenztypen, Seite 47).

Es könnte auch an der Messung des TECAN-Readers liegen, der im Vergleich zur händischen OD-Messung eine geringere Spanne zwischen minimaler und maximal messbarer OD aufweist. Dadurch wird eine reduzierte Verteilung der Daten generiert.

Als weiterer Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse kommt die Methode selbst in Frage, jedoch spricht hier der festgestellte Unterschied in der Kapazität zwischen den hyperletalen Feintypen und den Kontrollstämmen dagegen.

Zudem könnten die Ergebnisse dieser Arbeit Ausdruck einer statistischen Variabilität sein.

4.5 Diskussion der Ergebnisse (TECAN-Reader)

4.5.1 Invasive versus nicht-invasive Sequenztypen

Den Wachstumsversuchen lag die bereits erwähnte Studie der Arbeitsgruppe Schoen (16) zugrunde, in der ein statistisch signifikanter Unterschied in der maximalen optischen Dichte zwischen Trägerstämmen und invasiven Stämmen in PPM+ zugunsten der invasiven Stämme nachwiesen wurde ($n=29$, $p=0,029$, Wilcoxon-Rangsummentest). Ein Unterschied in der Wachstumsrate konnte nicht festgestellt werden (16). Die Kulturen wurden bei 37°C mit einer Geschwindigkeit

Diskussion

von 200rpm (revolutions per minute) in zwei verschiedenen Medien, darunter PPM+, inkubiert (16). Die OD zum Zeitpunkt Null betrug 0,1 (16). Die Messungen der optischen Dichte wurden bei 600nm zu acht verschiedenen Zeitpunkten über eine Dauer von 24 Stunden durchgeführt (16).

Die Studie der Arbeitsgruppe Schoen (16) diente zur Validierung der Versuche des TECAN-Readers unter Verwendung eines ähnlichen Protokolls für den Versuchsansatz (siehe 2.2.2 Versuchsablauf, Seite 18). Die Kulturen wurden im TECAN-Reader ebenfalls bei 37°C mit einer initialen OD von 0,1 bei 600nm in PPM+ inkubiert. Das Schütteln wurde durch orbitale und lineare Schüttelschritte gewährleistet. Durch nicht-invasive OD-Messungen wurde alle 30 Minuten über einen Zeitraum von 16 Stunden die OD bei 620nm gemessen. Anhand der ermittelten Werte wurden Wachstumskurven erstellt.

In der Auswertung der Messergebnisse beider Verfahren gab es folgende Unterschiede: Schoen et al. (16) ermittelte die Mittel- bzw. Medianwerte von μ und K der Trägerstämme und der invasiven Isolate für jeden Stamm aus drei Messungen mit anschließender nicht-linearer Regression. Das Bakterienwachstum wurde hierbei mit der logistischen Funktion beschrieben (16). Die Auswertung der maschinell gewonnen Messdaten des TECAN-Readers erfolgte mittels automatischer nicht-linearer Regression anhand der modifizierten Gompertz-Funktion (35) mit dem R-Skript „Growth Meister“ (erstellt von PD Dr. med. habil. Johannes Elias). Die zu bestimmenden Parameter μ und A wurden als Mittelwert von vier Vertiefungen pro Stamm errechnet. Jeder Stamm wurde drei Mal getestet. Für die Auswertung wurde der Mittelwert dieser drei Testwerte verwendet. Es ergab sich ein lediglich geringfügiger Unterschied in der Kapazität zwischen Trägerstämmen und invasiven Stämmen ($p=0,057$, Wilcoxon-Rangsummentest). Dieser kann möglicherweise auf die bereits diskutierten Ursachen (siehe 4.4.2 Limitationen der Wachstumsversuche, Seite 47) zurückgeführt werden.

4.5.2 Hyperletale Feintypen versus Kontrollstämme

Hypothese 2, die als Grund für die erhöhte Letalität einen Unterschied in der Wachstumskinetik, insbesondere in der maximalen Bakteriendichte in Flüssigkultur bei den hyperletalen Typen im Vergleich zu ihren Kontrollstämmen vermutete, konnte bestätigt werden (siehe Abbildung 8: Kapazität (A) aller

Diskussion

hyperletalen Feintypen versus Kontrollstämmen, Seite 34). Dabei wurde in dem vorliegenden Versuchsaufbau die Inkubation in PPM+ bei einer Temperatur von 37°C gewählt, wie sie auch der Situation in vivo entsprechen würde. Der Einfluss des Immunsystems bzw. die individuelle Antwort des Wirtes auf die Wachstumskinetik konnte in dem Medium PPM+ nicht simuliert werden und erfordert weitere Testungen mit anderen Medien wie Blut oder Liquor. Die Ergebnisse zeigen, dass es einen bisher unbekanntem Faktor geben muss, der den hyperletalen Typen ein höheres Wachstum in Flüssigkultur ermöglicht als den Kontrollstämmen.

Zu einem ähnlichen Ergebnis sind bereits Schoen und Kollegen (16) gekommen, die einen Unterschied in der maximal in Flüssigkultur erreichten Konzentration der Bakterien zwischen invasiven Stämmen und Trägerstämmen beobachtet haben. Sie vermuteten, dass die invasiven Stämme im Vergleich zu den Trägerstämmen besser an Stressbedingungen, vor allem während der frühstationären Phase, adaptiert sind (16). Eventuell spielt eine unterschiedliche Expression und Regulation von Genen, die für die Antwort auf oxidativen Stress und dem GSH (Glutathion)-Metabolismus unter der Infektion zuständig sind, eine führende Rolle (16). Diese Erklärung könnte auch für den Unterschied in der Kapazität zwischen den hyperletalen Feintypen und ihren Kontrollstämmen zutreffend sein. Auch bei Schoen und Kollegen gab es (16) keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Wachstumsrate, daher scheint die Fähigkeit zur Kolonisierung des Nasopharynx zwischen Trägerstämmen und invasiven Stämmen (bzw. zwischen hyperletalen Feintypen und Kontrollstämmen) gleich zu sein (16).

4.6 Ausblick

Die vorliegende Arbeit liefert einen wichtigen Beitrag zur Klärung der Hyperletalität der Meningokokken.

Ein Zusammenhang zwischen der Bakterienlast in vivo und der maximal erreichbaren Dichte in vitro konnte mit der vorliegenden Stichprobe nicht gefunden werden. Weitere Testungen mit einer größeren Anzahl an Blutproben zur Bestimmung der Bakterienlast könnten eventuell signifikante Unterschiede zwischen der Bakterienlast je nach Serogruppe oder Feintyp bestätigen. Zudem könnte eine Ausweitung der Wachstumsversuche auf Medien wie Blut oder Liquor zur besseren Simulation der Bedingungen in vivo erfolgen.

Zusammenfassung

5 Zusammenfassung

Ziel: Die vorliegende Studie klärt die Frage, ob sogenannte hyperletale Meningokokkentypen mit einer höheren bakteriellen Last im Blut assoziiert sind und ob sie andere Wachstumscharakteristiken im Vergleich zu ihren Kontrollstämmen *in vitro* zeigen.

Methode: Mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion erfolgte der Nachweis des *ctrA*-Gens zur Bestimmung der bakteriellen Last in 62 Blutproben von Patienten mit bestätigter invasiver Meningokokkenerkrankung. Darunter waren elf Proben des hyperletalen Feintyps B:P1.7-2,4:F1-5 und fünf Proben des hyperletalen Feintyps C:P1.5,2:F3-3.

Die Wachstumsversuche wurden mit jeweils zehn Stämmen der hyperletalen Feintypen B:P1.7-2,4:F1-5, C:P1.5-1,10-8:F3-6 und C:P1.5,2:F3-3 mit ihren jeweiligen nicht zu der Gruppe der hyperletalen Feintypen gehörenden Kontrollstämmen in dem Medium PPM+ durchgeführt. Die Wachstumsgeschwindigkeit μ sowie die Kapazität A (maximale Konzentrationszunahme als Logarithmus der gemessenen OD im Verhältnis zur Ausgangsdichte OD_{T0}) wurden durch nicht-lineare Regression anhand der modifizierten Gompertz-Funktion ermittelt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte alle 30 Minuten über 16 Stunden bei 620nm durch das Gerät TECAN Infinite 200 Pro (Tecan Group Ltd., Männedorf / Schweiz). Die Methode wurde anhand einer publizierten Studie zwischen Trägerstämmen und invasiven Stämmen validiert (16) und bestätigte einen marginalen Unterschied in der optischen Dichte (Wilcoxon-Test, $p=0,057$) zwischen den Gruppen. Es zeigte sich kein Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit.

Ergebnisse: Die Analyse der Ergebnisse ergab einen statistisch signifikanten Unterschied (t-Test für unabhängige Stichproben ($p<0,001$)) zwischen der Bakterienlast und dem Krankheitsausgang. Ebenfalls erwies sich die Bakterienlast als statistisch signifikant unterschiedlich je nach klinischem Bild (einfaktorielle Varianzanalyse, $p=0,028$). Post-Hoc-Tests mit Bonferroni-Korrektur ergaben einen nicht mehr statistisch signifikanten Unterschied in der Kopienzahl/ml zwischen den Gruppen Sepsis und WFS ($p=0,057$), Meningitis und WFS ($p=0,098$) sowie Meningitis und Sepsis ($p=1,0$).

Zusammenfassung

Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Bakterienlast und Serogruppe B und C (t-Test für unabhängige Stichproben, $p=0,550$) bzw. zwischen Bakterienlast und Feintyp (einfaktorielle Varianzanalyse, $p=0,550$).

Die Gesamtheit der hyperletalen Feintypen wuchs im Vergleich zu ihren Kontrollstämmen zu einer höheren Kapazität A, d.h. zu einer höheren Konzentration in Flüssigkultur heran (t-Test bei gepaarten Stichproben, $p=0,033$).

Es zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit μ (asymptomatischer Wilcoxon-Test, $p=0,943$). Die Dichtedifferenz der einzelnen hyperletalen Feintypen mit ihren jeweiligen Kontrollstämmen war hingegen nicht statistisch signifikant (einfaktorielle Varianzanalyse, $p=0,121$).

Schlussfolgerung: Aus den Ergebnissen dieser Arbeit können drei wesentliche Schlussfolgerungen gezogen werden:

1. Die Bakterienlast in dieser Stichprobe ist, entgegen der Literatur, nicht abhängig von der Serogruppe und dem Feintyp, jedoch von der Krankheitsmanifestation.
2. Die Kapazität A ist in der Gruppe der „hyperletalen“ Typen im Vergleich zu den Kontrollstämmen möglicherweise höher.
3. Größere Stichproben (Nativmaterial, Stämme) sind erforderlich, um die Beobachtungen dieser Studie zu bestätigen.

Verzeichnisse

6 Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

1. Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and Neisseria meningitidis. *The Lancet*. Juli 2007;369(9580):2196–210.
2. Caugant DA, Maiden MCJ. Meningococcal carriage and disease—Population biology and evolution. *Vaccine*. Juni 2009;27(4):B64–70.
3. Christensen H, May M, Bowen L, Hickman M, Trotter CL. Meningococcal carriage by age: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. Dezember 2010;10(12):853–61.
4. Harrison OB, Claus H, Jiang Y, Bennett JS, Bratcher HB, Jolley KA, u. a. Description and Nomenclature of Neisseria meningitidis Capsule Locus. *Emerg Infect Dis*. April 2013;19(4):566–73.
5. RKI - RKI-Ratgeber für Ärzte - Meningokokken-Erkrankungen [Internet]. [zitiert 22. August 2017]. Verfügbar unter: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Meningokokken.html
6. Epidemiologische Bulletin des Robert Koch-Institut Ausgabe 43/2016 - 22BEulHJw6lgm2.pdf [Internet]. [zitiert 22. August 2017]. Verfügbar unter: http://edoc.rki.de/documents/rki_fv/reNcihhWF2YFQ/PDF/22BEulHJw6lgm2.pdf
7. Kayser FH, Böttger EC, Zinkernagel RM, Haller O, Eckert J, Deplazes P, Herausgeber. Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie [Internet]. 12. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; Sommer 2010 [zitiert 10. Mai 2015]. Verfügbar unter: <http://www.thieme -connect.de/products/ebooks/book/10.1055/b-002-44935>
8. Buysse CMP, Raat H, Hazelzet JA, Hulst JM, Cransberg K, Hop WCJ, u. a. Long-term health status in childhood survivors of meningococcal septic shock. *Arch Pediatr Adolesc Med*. November 2008;162(11):1036–41.
9. Elias J, Harmsen D, Claus H, Hellenbrand W, Frosch M, Vogel U. Spatiotemporal Analysis of Invasive Meningococcal Disease, Germany. *Emerg Infect Dis*. November 2006;12(11):1689–95.

Verzeichnisse

10. Jolley KA, Brehony C, Maiden MCJ. Molecular typing of meningococci: recommendations for target choice and nomenclature. *FEMS Microbiol Rev.* Januar 2007;31(1):89–96.
11. Conyn-van Spaendonck MA, Reintjes R, Spanjaard L, van Kregten E, Kraaijeveld AG, Jacobs PH. Meningococcal carriage in relation to an outbreak of invasive disease due to *Neisseria meningitidis* serogroup C in the Netherlands. *J Infect.* Juli 1999;39(1):42–8.
12. MacLennan J, Kafatos G, Neal K, Andrews N, Cameron JC, Roberts R, u. a. Social Behavior and Meningococcal Carriage in British Teenagers. *Emerg Infect Dis.* Juni 2006;12(6):950–7.
13. Darton TC, Jack DL, Johnson M, Borrow R, Guiver M, Kaczmarski EB, u. a. MBL2 deficiency is associated with higher genomic bacterial loads during meningococemia in young children. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* Dezember 2014;20(12):1337–42.
14. Sjöholm AG, Braconier JH, Söderström C. Properdin deficiency in a family with fulminant meningococcal infections. *Clin Exp Immunol.* November 1982;50(2):291–7.
15. Schoen C, Blom J, Claus H, Schramm-Glück A, Brandt P, Müller T, u. a. Whole-genome comparison of disease and carriage strains provides insights into virulence evolution in *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* März 2008;105(9):3473–8.
16. Schoen C, Kischkies L, Elias J, Ampattu BJ. Metabolism and virulence in *Neisseria meningitidis*. *Front Cell Infect Microbiol.* August 2014;4:114.
17. Brehony C, Jolley KA, Maiden MCJ. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. *FEMS Microbiol Rev.* Januar 2007;31(1):15–26.
18. Caugant DA. Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* Mai 1998;106(5):505–25.
19. Yazdankhah SP, Kriz P, Tzanakaki G, Kremastinou J, Kalmusova J, Musilek M, u. a. Distribution of serogroups and genotypes among disease-associated and carried isolates of *Neisseria meningitidis* from the Czech Republic, Greece, and Norway. *J Clin Microbiol.* November 2004;42(11):5146–53.
20. Darton T, Guiver M, Naylor S, Jack DL, Kaczmarski EB, Borrow R, u. a. Severity of meningococcal disease associated with genomic bacterial load. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* März 2009;48(5):587–94.

Verzeichnisse

21. Trotter CL, Fox AJ, Ramsay ME, Sadler F, Gray SJ, Mallard R, u. a. Fatal outcome from meningococcal disease--an association with meningococcal phenotype but not with reduced susceptibility to benzylpenicillin. *J Med Microbiol.* Oktober 2002;51(10):855–60.
22. Elias J, Vogel U. IS1301 fingerprint analysis of *Neisseria meningitidis* strains belonging to the ET-15 clone. *J Clin Microbiol.* Januar 2007;45(1):159–67.
23. Vogel U, Claus H, Frosch M, Caugant DA. Molecular basis for distinction of the ET-15 clone within the ET-37 complex of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol.* Februar 2000;38(2):941–2.
24. Ashton FE, Ryan JA, Borczyk A, Caugant DA, Mancino L, 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.* November 1991;29(11):2489–93.
25. Kremastinou J, Tzanakaki G, Kansouzidou A, Pagalis A, Danielides V, Koupari G, u. a. Recent emergence of serogroup C meningococcal disease in Greece. *FEMS Immunol Med Microbiol.* Januar 1999;23(1):49–55.
26. Krizova P, 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. *Cent Eur J Public Health.* November 1995;3(4):189–94.
27. Marcus U, Vogel U, Schubert A, Claus H, Baetzing-Feigenbaum J, Hellenbrand W, u. a. A cluster of invasive meningococcal disease in young men who have sex with men in Berlin, October 2012 to May 2013. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* Juli 2013;18(28).
28. Elias J, Schouls LM, van de Pol I, Keijzers WC, Martin DR, Glennie A, u. a. Vaccine preventability of meningococcal clone, Greater Aachen Region, Germany. *Emerg Infect Dis.* März 2010;16(3):465–72.
29. Urwin R, Russell JE, Thompson EAL, Holmes EC, Feavers IM, Maiden MCJ. Distribution of surface protein variants among hyperinvasive meningococci: implications for vaccine design. *Infect Immun.* Oktober 2004;72(10):5955–62.
30. Martin DR, Walker SJ, Baker MG, Lennon DR. New Zealand epidemic of meningococcal disease identified by a strain with phenotype B:4:P1.4. *J Infect Dis.* Februar 1998;177(2):497–500.

Verzeichnisse

31. Øvstebø R, Brandtzaeg P, Brusletto B, Haug KBF, Lande K, Høiby EA, u. a. Use of robotized DNA isolation and real-time PCR to quantify and identify close correlation between levels of *Neisseria meningitidis* DNA and lipopolysaccharides in plasma and cerebrospinal fluid from patients with systemic meningococcal disease. *J Clin Microbiol.* Juli 2004;42(7):2980–7.
32. Hackett S, Guiver M, Marsh J, Sills J, Thomson A, Kaczmarski E, u. a. Meningococcal bacterial DNA load at presentation correlates with disease severity. *Arch Dis Child.* Januar 2002;86(1):44–6.
33. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarski EB. Simultaneous Detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in Suspected Cases of Meningitis and Septicemia Using Real-Time PCR. *J Clin Microbiol.* April 2001;39(4):1553–8.
34. Mülhardt C. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In: *Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics.* Der Experimentator. Springer-Verlag; Juli 2013. 304 S.
35. Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, van 't Riet K. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol.* Juni 1990;56(6):1875–81.
36. Frosch M, Müller D, Bousset K, Müller A. Conserved outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* involved in capsule expression. *Infect Immun.* März 1992;60(3):798–803.
37. Guiver M, Borrow R, Marsh J, Gray SJ, Kaczmarski EB, Howells D, u. a. Evaluation of the Applied Biosystems automated Taqman polymerase chain reaction system for the detection of meningococcal DNA. *FEMS Immunol Med Microbiol.* Juni 2000;28(2):173–9.
38. Thomas JD, Hatcher CP, Satterfield DA, Theodore MJ, Bach MC, Linscott KB, u. a. sodC-Based Real-Time PCR for Detection of *Neisseria meningitidis*. *PLOS ONE.* Mai 2011;6(5):e19361.
39. Claus H, Maiden MCJ, Maag R, Frosch M, Vogel U. Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. *Microbiology.* Juni 2002;148(6):1813–9.

Verzeichnisse

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispielhafte Standardkurve eines qPCR Laufs mit Standardproben 10^1 , 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^7 , 10^8	14
Abbildung 2: Kurvenbeispiel Stamm 12677 Vertiefung 3	20
Abbildung 3: Bakterienlast und Krankheitsausgang	23
Abbildung 4: Bakterienlast und klinisches Bild	24
Abbildung 5: Bakterienlast und Serogruppe	25
Abbildung 6: Bakterienlast und Feintyp	26
Abbildung 7: Kapazität (A) invasiver versus nicht-invasiver Sequenztypen	31
Abbildung 8: Kapazität (A) aller hyperletalen Feintypen versus Kontrollstämme	34
Abbildung 9: Dichtedifferenz hyperletaler Feintypen, aggregiert nach Typ, versus Kontrollstämme	34

Verzeichnisse

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hyperletale Feintypen versus Kontrollstämme	16
Tabelle 2: Ergebnisse der qPCR	27
Tabelle 3: Werte für μ und A invasiver versus nicht-invasiver Sequenztypen.....	32
Tabelle 4: Werte für μ und A hyperletaler Feintypen (μ_1 und A1) versus Kontrollstämme (μ_2 und A2).....	35

Anhang

7 Anhang

7.1 Änderungsliste

Auf Wunsch der Berichterstatteerin Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Cynthia Mira Sharma wurden in die Doktorarbeit (Version Dezember 2018) folgende Änderungen eingearbeitet:

1. Literaturverzeichnis, Seite 52 bis Seite 55: Referenzen wurden einheitlich formatiert mit Angabe von Monat und Jahr, bei Internetquellen wurde das exakte Datum des Aufrufs der Seite angegeben.
2. Hypothesen, Seite 9: Ursprünglicher Wortlaut der Hypothese 1: „Die höhere Letalität sogenannter hyperletaler Meningokokkentypen ist durch eine höhere bakterielle Last im Blut bedingt.“ Geänderter Wortlaut: „Die Bakterienlast im Blut ist bei Erkrankung durch sogenannte hyperletale Meningokokken höher als bei anderen Meningokokkentypen.“
Ursprünglicher Wortlaut der Hypothese 2: „Kinetische Parameter wie die maximale Wachstumsgeschwindigkeit und die Bakteriendichte in Flüssigkultur zwischen hyperletalen und nicht-hyperletalen Typen sind unterschiedlich und möglicherweise eine Erklärung für die höhere Letalität.“ Geänderter Wortlaut: „Kinetische Parameter wie die maximale Wachstumsgeschwindigkeit und die Bakteriendichte in Flüssigkultur zwischen hyperletalen und nicht-hyperletalen Typen sind unterschiedlich.“
3. Änderung des Titels von „3.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der qPCR“, Seite 27, in „3.1.5 Rohdaten der qPCR“.
4. Änderung des Titels von „3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Wachstumsversuche“, Seite 35, in „3.2.3 Rohdaten der Wachstumsversuche“.
5. Abschnitt 3.2.1, Seite 31, wurde überarbeitet. Statt „ $1,39 \cdot 10^{-4} \pm 0,44 \cdot 10^{-4}$ “ erfolgte die Änderung nach „ $(1,39 \pm 0,44) \cdot 10^{-4}$ “. Statt „ $1,56 \cdot 10^{-4} \pm 0,26 \cdot 10^{-4}$ “ erfolgte die Änderung nach „ $(1,56 \pm 0,26) \cdot 10^{-4}$ “.

Anhang

6. Abschnitt 3.2.2., Seite 33, wurde überarbeitet. Statt „ $1,43 \cdot 10^{-4} \pm 3,14 \cdot 10^{-5}$ “ und „ $1,44 \cdot 10^{-4} \pm 2,75 \cdot 10^{-5}$ “ erfolgte die Änderung nach „ $(1,43 \pm 0,31) \cdot 10^{-4}$ “ und „ $(1,44 \pm 0,28) \cdot 10^{-4}$ “.
7. Die Einheit der Wachstumsgeschwindigkeit wurde in der gesamten Arbeit korrigiert. Ursprünglich wurde sie mit $[s^{-1}]$ angegeben, die richtige Einheit ist $[\log(OD/OD_{T0})/s]$. Ebenfalls wurde die fehlende Angabe der Einheit der Kapazität A in der gesamten Arbeit um die Einheit $[\log(OD/OD_{T0})]$ ergänzt. Aus Gründen der Übersicht wurden die Einheiten in Tabelle 3 und 4 unter „Anmerkungen zur Tabelle“ und nicht in der Kopfzeile der Tabelle angegeben. Zudem wurde als Einheit der Dichtedifferenz in Abschnitt 3.2.2, Seite 33, ebenfalls die Einheit $[\log(OD/OD_{T0})]$ gewählt.
8. Aus Gründen der Einheitlichkeit wurde unterhalb der Tabelle 2 „Anmerkungen zur Tabelle 2“ ergänzt.
9. Das Datum der Abgabe auf dem Titelblatt wurde von „Dezember 2018“ geändert in „korrigierte Version September 2019“.
10. Der Lebenslauf wurde aktualisiert bezüglich des jetzigen Wohnortes und der aktuellen ärztlichen Tätigkeit. Auch hier erfolgte die Aktualisierung des Datums unterhalb des Lebenslaufs.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. med. habil. Johannes Elias für seine wissenschaftliche und methodische Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Professor Dr. med. Ulrich Vogel sowie auch dem 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.

Weiterhin danke ich hiermit Frau Prof. Dr. med. Martina Prelog für das Korreferat dieser Arbeit.

Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Heike Claus danke ich für die zahlreichen und unermüdlichen fachlichen Ratschläge während der Laborarbeit.

Frau Olivia Käsgen und Daniela Stanke bin ich für die gründlichen Einweisungen in die praktische Laborarbeit sehr dankbar.

Bedanken möchte ich mich zudem bei Roland Trepesch und Dr. med. Manfred Lehmann für die Durchsicht meiner Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, besonders meinen Eltern Elke und Armin Leitenberger, die mir meinen beruflichen Werdegang ermöglicht und mich zu jeder Zeit hilfreich unterstützt haben.

Lebenslauf