

Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. C. P. Speer

**Zur lokalen Epidemiologie multiresistenter biofilmbildender
Staphylococcus epidermidis-Stämme bei sehr kleinen Frühgeborenen und
ihren Müttern**

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

vorgelegt von
Eva Gellichsheimer
aus Kirchberg an der Jagst

Würzburg, Juni 2012

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. W. Thomas

Koreferentin: Priv.-Doz. Dr. med. W. Ziebuhr

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:
08.11.2013

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	<u>I</u>
<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>V</u>
<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	<u>VI</u>
<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>VII</u>
<u>1 EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1 STAPHYLOKOKKEN	1
1.1.1 Allgemeines	1
1.1.2 Klinik	3
1.1.3 Antibiotikaresistenz bei Staphylokokken	4
1.1.4 Biofilmbildung bei <i>S. epidermidis</i>	6
1.1.5 Fragestellung	8
<u>2 MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>9</u>
2.1 MATERIAL.....	9
2.1.1 Geräte	9
2.1.2 Chemikalien	10
2.1.3 Puffer und Lösungen.....	10
2.1.4 Nährmedien und Agarplatten	10
2.1.5 Bakterienstämme	11
2.1.6 Laborkits	11
2.1.7 Enzyme	11
2.1.8 DNA-Größenmarker.....	11

2.1.9	Oligonukleotide	12
2.2	METHODEN	13
2.2.1	Isolierung und Identifizierung von Bakterienstämmen in der Neonatologie der Universitäts-Kinderklinik Würzburg	13
2.2.2	Koagulase-Test.....	14
2.2.3	Api-Staph-Test.....	15
2.2.4	Agardiffusionstest zur Erstellung von Antibiogrammen.....	15
2.2.5	Adhärenz-Assay zur Beurteilung der Biofilmbildung	16
2.2.6	Isolierung chromosomaler DNA	17
2.2.7	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	18
2.2.8	Horizontale Gelelektrophorese.....	19
2.2.9	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	20
2.2.10	Messung der DNA-Konzentration	20
2.2.11	Multi-Locus-Sequence-Typing (MLST)	20
3	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>23</u>
3.1	ÜBERSICHT IM QUERSCHNITT	23
3.1.1	Identifizierung der Stämme	23
3.1.2	Antibiotikaresistenzen	23
3.1.3	<i>icaA</i> -Präsenz und Biofilm.....	25
3.1.4	Multi-Locus-Sequence-Typing (MLST)	27
3.2	DIE MUTTER-KIND-PAARE IM LÄNGSSCHNITT.....	31
3.2.1	Mutter-Kind-Paar I.....	31
3.2.1.1	Klinik.....	31
3.2.1.2	Spezies mit Eigenschaften Mutter-Kind-Paar I	32
3.2.1.3	MLST.....	33
3.2.1.4	Antibiotikaresistenzen	33

3.2.1.5	Biofilmbildung und <i>icaA</i> -Präsenz.....	35
3.2.2	Mutter-Kind-Paar II.....	37
3.2.2.1	Klinik.....	37
3.2.2.2	Spezies mit Eigenschaften Mutter-Kind-Paar II	38
3.2.2.3	MLST-Profil	38
3.2.2.4	Antibiotikaresistenzen	39
3.2.2.5	Biofilmbildung und <i>icaA</i> -Präsenz.....	41
3.2.3	Mutter-Kind Paar-III.....	42
3.2.3.1	Klinik.....	42
3.2.3.2	Spezies mit Eigenschaften Mutter-Kind-Paar III	43
3.2.3.3	MLST-Profil	43
3.2.3.4	Antibiotikaresistenzen	43
3.2.3.5	Biofilmbildung und <i>icaA</i> -Präsenz.....	44
4	<u>DISKUSSION</u>	<u>45</u>
4.1	EPIDEMIOLOGIE VON <i>S. EPIDERMIDIS</i>-STÄMMEN	45
4.2	MLST.....	46
4.3	ANTIBIOTIKARESISTENZEN.....	50
4.4	BIOFILMBILDUNG.....	52
4.4.1	Beobachtungen zur Biofilmbildung in der Studie.....	52
4.4.2	Primäre Adhäsion	53
4.4.3	Akkumulation	54
4.4.4	Beeinflussung durch Umweltfaktoren.....	55
4.4.5	Regulation der Biofilmbildung und PIA-unabhängige Mechanismen.....	55
4.4.6	Beobachtungen und Bedeutung der Biofilmbildung im klinischen Zusammenhang	57
4.5	FAZIT UND AUSBLICK.....	59

<u>5</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>60</u>
<u>6</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>62</u>
<u>7</u>	<u>ANHANG.....</u>	<u>76</u>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: DNA-Größenmarker.....	12
Abbildung 2: Spezies-Bestimmung und Anteil der verschiedenen Spezies aller 43 Isolate.....	23
Abbildung 3: Prozentualer Anteil von Resistenzen der sechs getesteten Antibiotika der drei Mutter-Kind-Paare	24
Abbildung 4: Präsenz des <i>mecA</i> -Gens bei allen <i>S. epidermidis</i> -Isolaten	25
Abbildung 5: Präsenz des <i>icaA</i> -Gens bei allen <i>S. epidermidis</i> -Isolaten	25
Abbildung 6: Biofilmbildung im Adhärenzassay bei den drei Mutter-Kind-Paaren	26
Abbildung 7: Korrelation <i>icaA</i> -Präsenz und Biofilmbildung.....	26
Abbildung 8: Burst-Analyse der <i>S. epidermidis</i> -Isolate aller drei Mutter-Kind-Paare	29
Abbildung 9: Antibiotikresistenzen – Mutter und Kind im Vergleich	34
Abbildung 10: <i>icaA</i> -PCR Mutter-Kind-Paar I, Mutter.....	36
Abbildung 11: <i>icaA</i> -PCR Mutter-Kind Paar I, Kind.....	37
Abbildung 12: <i>mecA</i> -PCR Mutter-Kind-Paar II.....	41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	9
Tabelle 2: Kontroll-Bakterienstämme.....	11
Tabelle 3: Primer <i>rRNA</i> , <i>mecA</i> , <i>icaA</i> , <i>16SrevSeq</i>	12
Tabelle 4: Hemmhofgrenzwerte der getesteten Antibiotika (mm).....	16
Tabelle 5: Verwendete Primer MLST.....	22
Tabelle 6: Häufigkeit der ST aller drei Mutter-Kind-Paare und der Personalstämme mit Eigenschaften.....	30
Tabelle 7: Spezies Mutter-Kind-Paar I.....	32
Tabelle 8: MLST-Profil Mutter-Kind Paar I.....	33
Tabelle 9: Antibiotikaresistenzen Mutter-Kind-Paar I.....	35
Tabelle 10: Biofilmbildung und Präsenz des <i>icaA</i> -Gens Mutter-Kind-Paar I (links Mutter, rechts Kind).....	36
Tabelle 11: Spezies Mutter-Kind-Paar II.....	38
Tabelle 12: MLST Profil Mutter-Kind-Paar II.....	39
Tabelle 13: Antibiotikaresistenzen Mutter-Kind-Paar II.....	40
Tabelle 14: Biofilmbildung und <i>icaA</i> -Präsenz Mutter-Kind-Paar II.....	41
Tabelle 15: Spezies Mutter-Kind-Paar III.....	43
Tabelle 16: MLST-Profil Mutter-Kind-Paar III.....	43
Tabelle 17: Antibiotikaresistenzen Mutter-Kind-Paar III.....	44
Tabelle 18: Biofilmbildung und <i>icaA</i> -Präsenz Mutter-Kind Paar III.....	44
Tabelle 19: Personalstämme mit Eigenschaften wie Antibiotikaempfindlichkeit, Präsenz des <i>ica</i> - und <i>mecA</i> -Gens, Biofilmbildung und Sequenztyp.....	77

Abkürzungsverzeichnis

ADH	Arginine Dihydrolase
<i>agr</i>	accessory gene regulator
Ap/Apr	Ampicillin/Ampicillinresistenz
BHI	Brain Heart Infusion Broth
bp	Basenpaare
C/Cr	Chloramphenicol/Chloramphenicolresistenz
CIP	Ciprofloxacin
CN	Gentamicin
dATP	Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-Triphosphat
DEPC	Diethyl Pyrocarbonat
DGTP	Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
dTTP	Desoxythymidin-5'-Triphosphat
E	Erythromycin
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
g	Gramm
h	Stunde
<i>ica</i>	intercellular adhesin
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani Broth
M	Molar
mg	Milligramm
MH	Müller-Hinton Broth
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar

Abkürzungsverzeichnis

MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
MRSE	Methicillin-resistenter Staphylococcus epidermidis
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
OX	Oxacillin
P	Penicillin G
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIA	interzelluläre Polysaccharid-Adhäsion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>sar</i>	staphylococcal accessory regulator
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SSC	Standard Salin Citra
SSW	Schwangerschaftswoche
ST	Sequenztyp
Ta	annealing temperature
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tetracyclin
TPE	Tris-Phosphat-EDTA
TSB	Tryptic Soyabean Broth
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
VA	Vancomycin
VLBW	very low birth weight infants
W	Watt
µg	Mikrogramm
z.B.	zum Beispiel
ZVK	zentraler Venenkatheter

1 Einleitung

1.1 Staphylokokken

1.1.1 Allgemeines

Staphylokokken gehören zur Gattung grampositiver, unbeweglicher, traubenförmig gelagerter Kugelbakterien der Familie Micrococcaceae. Sie bilden keine Sporen und sind üblicherweise zwischen 0,8–1,2 µm groß. Erstmals beschrieben wurden Staphylokokken von Ogston im Jahre 1883 (Ogston 1883). Derzeit unterscheidet man 36 verschiedene Arten, die zum Genus der Staphylokokken zählen (Götz et al. 2004). Dabei differenziert man Koagulase-negative von Koagulase-positiven Staphylokokken, wobei nur *S. aureus* Koagulase bildet, alle anderen Staphylokokken-Spezies werden unter den Koagulase-negativen Staphylokokken (KoNS) zusammengefasst. Koagulase ist ein extrazelluläres Enzym, das im Serum an Prothrombin bindet und die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen aktiviert und vor allem bei der Ausbildung von Abszessen eine Rolle spielt.

Für den Menschen relevant sind neben *S. aureus* auch einige KoNS. Bei Vertretern der KoNS, die für Humaninfektionen verantwortlich sein können, handelt es sich unter anderem um *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. hämolyticus* und *S. hominis*.

Bis in die 80er Jahre des letzten Jahrhunderts galt *S. aureus* als einziger humanpathogener Vertreter unter den Staphylokokken. *S. aureus* findet man als natürlichen Bestandteil der Haut- und Schleimhautflora bei 20-30% aller Menschen, wobei dieses Bakterium aber auch einen wichtigen pathogenen Erreger darstellen kann. Die von *S. aureus* verursachten Infektionen reichen von leichten Haut- und Wundinfekten über Sepsis und Pneumonie bis hin zu schweren Infektionen der inneren Organe (Lowy 1998). Ebenso gehören KoNS zur normalen Flora der Haut und der Schleimhäute des Menschen. Den wichtigsten Vertreter dieser Gruppe stellt *S. epidermidis* dar. Schon im Jahre 1958 entdeckten Smith und seine Arbeitsgruppe das Pathogenitätspotential von

KoNS als Sepsiserreger (Smith et al. 1958). Einige Jahre später berichteten Pulverer und Halswick über 128 Fälle von Endokarditis, von denen sie glaubten, dass sie durch KoNS verursacht wurden (Pulverer und Halswick 1967). Trotzdem nahm man lange Zeit an, dass KoNS nur als Kontaminanten in klinischen Isolaten nachgewiesen werden können und als relativ harmlose Kommensale die Haut und Schleimhaut von Mensch und Tier besiedeln. Es hat sich jedoch gezeigt, dass diese Keime, vor allem *S. epidermidis*, eine wichtige Rolle als opportunistische Humanpathogene spielen. Während *S. epidermidis* bei immunkompetenten Menschen nur eine sehr geringe Pathogenität besitzt, gehören diese Bakterien heute zu sehr häufigen Erregern nosokomialer Infektionen bei Immunsupprimierten in Zusammenhang mit Fremdkörpern. Dies liegt zum einen an der Fähigkeit von *S. epidermidis*, Biofilm zu bilden. Die Bakterien sind durch diese physikalische Barriere vor dem Immunsystem des Wirts sowie vor Antibiotika geschützt. Zum anderen stellt die Antibiotikaresistenzentwicklung unter *S. epidermidis* ein zunehmendes Problem dar. So sind beispielsweise Personen gefährdet, deren Immunsystem noch nicht vollständig ausgebildet ist, wie sehr unreife Frühgeborene. Auch für Personen mit supprimiertem Immunsystem, wie dies zum Beispiel bei AIDS, Immundefekten oder Krebserkrankungen der Fall ist, stellt *S. epidermidis* eine Gefährdung dar. Besonders in Zusammenhang mit Fremdkörpern wie Kathetersystemen, künstlichen Gelenken oder Herzklappen treten hierbei Infektionen auf (Kloos und Bannerman 1994; Rupp und Archer 1994).

Grundsätzlich muss man, wie schon erwähnt, unterscheiden zwischen *S. epidermidis*-Stämmen, die als harmlose Kommensale der menschlichen Haut und Schleimhaut vorkommen und *S. epidermidis*-Stämmen, die einen gefährlichen Krankheitserreger für immunsupprimierte Menschen oder Personen mit unreifem Immunsystem darstellen. Dabei hat *S. epidermidis* diverse Strategien entwickelt, um sich gerade in Krankenhäusern eine ökologische Nische zu schaffen und sich vor allem dort als nosokomialer Erreger auszubreiten. Diese nosokomialen Isolate zeichnen sich besonders durch eine hohe Methicillinresistenz und die Fähigkeit zur Biofilmbildung auf medizinischen Fremdkörpern aus. Bisher werden für die hohe

Anpassungsfähigkeit des Bakteriums verschiedene Mechanismen, wie v.a. die Rekombination und der Erwerb von mobilen genetischen Elementen, verantwortlich gemacht (Schönfelder 2010, Miragaia 2007).

1.1.2 Klinik

In diversen Studien konnte die Bedeutsamkeit von *S. epidermidis* und anderen KoNS in der Neonatologie nachgewiesen werden. So stellen KoNS heutzutage die häufigste Ursache der late-onset-Sepsis auf neonatologischen Intensivstationen dar (Kashu et al. 2006, Weisman 2004, Raimundo et al. 2002, Villari et al. 2000). In einer größeren australischen Studie wurden über zehn Jahre 1281 Fälle von Sepsis mit KoNS auf 18 verschiedenen neonatologischen Stationen beobachtet. In über 57% aller late-onset-Sepsis-Fälle waren KoNS verantwortlich, von diesen traten 71% bei Frühgeborenen auf, die zwischen der 24.-29. SSW geboren wurden. Unter den KoNS war mit 69% am häufigsten *S. epidermidis* vertreten (Isaacs 2003). Villari et al. wiederum beobachteten über einen Zeitraum von 3 Jahren das Vorkommen von nosokomialen Infektionen auf einer neonatologischen Intensivstation in Italien, wobei *S. epidermidis* am häufigsten als Erreger gefunden wurde. In den meisten Fällen verursachte *S. epidermidis* hierbei eine Sepsis (Villari et al. 2000).

Frühgeborene sind aufgrund einer fehlenden Kolonisationsresistenz sowie einer häufigen Anwendung breit wirksamer Antibiotika besonders gefährdet mit multiresistenten nosokomialen Infektionserregern kolonisiert zu werden. Die Besiedlung kann hierbei über Hautkontakt (v.a. der Hände) des behandelnden Personals oder der Eltern sowie durch kontaminierte Gegenstände auch von Kind zu Kind zustande kommen. Das Immunsystem Frühgeborener ist unreif und somit anfällig für schwere Infektionen. Beispielsweise sind die Knochenmarksreserven für neutrophile Granulozyten bei Neugeborenen eingeschränkt. Die Granulozytenfunktion wird hierbei durch verminderte Chemotaxis und eine eingeschränkte Adhärenz und Verformbarkeit weiter eingeschränkt (Urlichs, Speer 2004). Zudem besteht ein Mangel an spezifischen IgG-Antikörpern, die für die opsoninabhängige Phagozytose verantwortlich sind. Eine deutlich verminderte Synthese von Gamma-Interferon

führt zu einer eingeschränkten Makrophagenfunktion im Verlauf eines Entzündungsgeschehens. Die Unreife des Immunsystems ist verbunden mit einem erhöhten Risiko eine Sepsis zu entwickeln (Venkatesh et al 2006). Besonders betroffen sind dabei sehr kleine Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht < 1500 g (VLBW = very low birth weight infants).

Die Diagnose einer Sepsis ist bei Frühgeborenen oftmals schwer eindeutig zu stellen. Begleiterkrankungen des Neugeborenen und unterschiedliche Manifestationsformen infektiöser Erkrankungen erschweren die Diagnose. Frühgeborene mit einer *S. epidermidis* Sepsis fallen insbesondere durch Atemstörungen, wie Tachypnoe, Dyspnoe oder Apnoe oder gastrointestinale Symptome wie Erbrechen, abdominelle Distension und Trinkschwäche auf. Ebenso kann sich eine Hypothermie oder Hyperthermie zeigen. Als weitere Symptome können auch eine Hypotonie oder Mikrozirkulationsstörungen mit Veränderungen des Hautkolorits und neurologische Störungen, wie z.B. Lethargie auftreten (Noel G.J., Edelson P.J. 1984, Speer und Gahr 2009).

Doch nicht nur ein unreifes Immunsystem trägt dazu bei, dass *S. epidermidis* ein häufiges Problem in neonatologischen Abteilungen darstellt. Zur Virulenz dieses Erregers tragen vor allem die Biofilmbildung und die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen bei. Hierauf wird in den nächsten Abschnitten näher eingegangen.

1.1.3 Antibiotikaresistenz bei Staphylokokken

Antibiotikaresistenzen bei Staphylokokken stellen ein zunehmendes Problem dar. Seit den 40er Jahren des 20. Jahrhunderts konnte man Penicillin als ein sehr wirksames Antibiotikum gegen Staphylokokken verwenden. Penicillin unterbindet die Funktion der Penicillin-Bindeproteine (PBP 1–4) und verhindert dadurch die Kreuzvernetzung der Mureinschicht der bakteriellen Zellwand. Doch schon bald beobachtete man erste Resistenzen auf Grund von β -Lactamasebildenden Stämmen (Roundtree und Freeman 1956). Schon in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts war die Resistenz durch β -Lactamaseproduzierende Stämme so weit verbreitet, dass die Anwendung

von Penicillin bei Staphylokokken wirkungslos wurde (Jevons 1961; Li et al. 2009; Chambers und De Leo 2009). Aus diesem Grund wurden β -Lactamase-stabile Antibiotika entwickelt, wie z.B. Methicillin oder Oxacillin, deren Lactamring geschützt war. Für kurze Zeit schien das Problem gelöst. Jedoch traten schon zu Beginn der 1960er Jahre die ersten Infektionen durch methicillinresistente *S. aureus* Stämme in europäischen Krankenhäusern auf (Barber 1961; Stewart et al. 1963; Benner et al. 1968). Ende des 20. Jahrhunderts waren 15% der *S. aureus* Stämme in Deutschland und Mitteleuropa resistent gegen Oxacillin (Kresken et al. 2001). Zu diesem Zeitpunkt waren schon über 50% aller nosokomialen *S. epidermidis*-Stämme resistent gegen Oxacillin (Kresken et al. 2001). Entsprechend den Zahlen der Paul-Ehrlich-Gesellschaft stieg die Resistenzrate bei *S. epidermidis* bis zum Jahr 2007 auf 74%. In der Intensivpflege zeigten sich sogar Resistenzraten bis zu 85%. Hierbei fällt die deutlich höhere Resistenzrate von *S. epidermidis* im Vergleich zu *S. aureus* auf (Paul-Ehrlich-Gesellschaft 2007).

Die Unempfindlichkeit gegenüber Methicillin und Oxacillin beruht auf einem Penicillin-Bindeprotein (PBP2a), das vom *mecA*-Gen kodiert wird und nur eine geringe Affinität zu β -Lactam-Antibiotika hat. Sehr wahrscheinlich stammt *mecA* aus *S. sciuri* und wurde über horizontalen Gentransfer auf andere Staphylokokken-Spezies übertragen (Wielders et al. 2001; Wu et al. 1996). *mecA* ist Teil einer mobilen genomischen Insel, der *staphylococcal cassette chromosome* (SCCmec). Bisher wurden 8 verschiedene SCCmec-Typen identifiziert (I-V) (Miragaia 2008).

Studien besagen, dass bis zu 90% der bei neonatologischen Intensivpatienten isolierten KoNS *mecA*-Gen-positiv sind (Krediet et al. 2001, Krediet et al. 2004). Bei methicillinresistenten Staphylokokken treten sehr häufig Parallelresistenzen zu diversen anderen Antibiotika, wie z.B. Aminoglykosiden, Fluorchinolonen, Makroliden und Tetrazyklinen auf. Resistenzen gegen Glykopeptid-Antibiotika, wie Vancomycin und Teicoplanin sind jedoch eher selten, wobei die ersten Glykopeptid-Resistenzen bei KoNS schon 1987 beschrieben wurden (Schwalbe et al. 1987). Der Wirkmechanismus von Glykopeptiden beruht darauf, dass sie

bei der Zellwandsynthese am terminalen D-Alanin der N-Acetyl-Muraminsäure angreifen und so die Vernetzung verhindern. Bei resistenten Stämmen endet die Seitenkette statt mit D-Alanin-D-Alanin mit D-Alanin-D-Hydroxybutyrat. Dadurch kann das Antibiotikum nicht mehr binden und ist wirkungslos. Viele Staphylokokken-Infektionen sind heute nur noch mit Reserveantibiotika, wie z.B. Linezolid, einem Hemmstoff der bakteriellen Proteinbiosynthese, oder einigen weiterentwickelten Glykopeptid-Derivaten therapierbar.

1.1.4 Biofilmbildung bei *S. epidermidis*

Man kann Biofilme als eine Gemeinschaft von Mikroorganismen definieren, die an eine Oberfläche gebunden sind (Costerton et al. 1999, O'Toole et al. 2000). Schon lange ist bekannt, dass die Biofilmbildung ein in der Natur sehr häufiges Phänomen ist. So publizierte Anton van Leeuwenhoek schon im Jahre 1683 Zeichnungen von winzigen „animalcules“. Er hatte Zahnbelag unter seinem Mikroskop untersucht und die unbekannt Formenvielfalt aufgezeichnet. Jedoch dauerte es noch bis in die 80er Jahre des 20. Jahrhunderts, bis die Biofilmbildung genauer beschrieben werden konnte. 1982 etablierten Christensen und seine Arbeitsgruppe einen In-vitro-Test, der es ermöglichte, die Biofilmbildung quantitativ zu untersuchen (Christensen et al. 1982). Dieser sogenannte Biofilm-Assay hat entscheidend zum Verständnis der Entstehung von Biofilmen bei *S. epidermidis* beigetragen. Hierbei fiel auf, dass, im Unterschied zu Multispezies-Biofilmen in der Umwelt, diese klinischen Biofilme hauptsächlich von Bakterien einer Art und eines einzigen Stammes gebildet werden.

Die genetischen und molekularen Grundlagen der Biofilmbildung bei Staphylokokken sind sehr vielfältig. Die Biofilmbildung erfolgt in zwei Phasen: Zunächst binden die einzelnen Bakterienzellen an eine Polymer-Oberfläche im Schritt der primären Adhäsion. Die zweite Phase besteht in der Proliferation und Akkumulation der Zellen in vielen Zellschichten. Dies erfordert die Fähigkeit zur interzellulären Adhäsion, sowie die Ausbildung einer die Bakterienzelle umhüllenden Glycocalyx.

Die primäre Adhäsion wird durch spezifische und unspezifische Faktoren beeinflusst. Zudem spielen die Eigenschaften der Polymeroberfläche sowie die Strukturen der Bakterienzellwand eine Rolle (Hogt et al. 1986; Ludwicka et al. 1984). Der erste Kontakt der Bakterien mit der Oberfläche geschieht durch hydrophobe Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräfte (Hogt et al. 1985; Ludwicka et al. 1984). Fremdmaterialien werden nach Implantation oft mit einer Schicht aus körpereigenen Plasmaproteinen, extrazellulären Matrixproteinen oder Thrombozyten überzogen, wobei die Anwesenheit von Fibronectin, Fibrinogen und aktivierten Thrombozyten die Adhäsion der Bakterien begünstigt (Vaudaux et al. 1989; Wang et al. 1993). Bei der primären Bindung spielen aber auch mehrere Erreger-spezifische Faktoren eine Rolle. Bisher konnte dem *autolysin protein AtlE* und dem Protein *Aae* sowie den Proteinen *staphylococcal surface protein SSP-1* und *-2* eine Beteiligung bei diesem ersten Schritt der Biofilmbildung nachgewiesen werden (Heilmann et al. 1997; Heilmann et al. 2003; Mack 1999; Timmerman et al., 1991; Veenstra et al. 1996). Desweiteren spielen bei der primären Bindung Matrixproteine wie *SdrF* und *SdrG*, die an Kollagen bzw. Fibrinogen binden, eine Rolle (Arrecubieta et al. 2007; Arrecubieta et al. 2009).

Im zweiten Schritt der Biofilmbildung, der Akkumulation, sind ebenfalls mehrere Proteine von Bedeutung. Besonders bedeutsam als Faktor der Akkumulation ist das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsin (PIA). Dabei handelt es sich um ein lineares Homoglykan, das man in zwei Polysaccharidfraktionen aufreinigen kann. Erstmals wurde es 1992 von der Arbeitsgruppe um Mack isoliert (Mack et al. 1992). In einer Arbeit konnte eine Korrelation bei *S. epidermidis*-Stämmen zwischen Biofilm-positivem Phänotyp und PIA-Produktion gezeigt werden (Mack et al. 1996). Für die PIA-Synthese verantwortlich ist das *ica* (intercellular adhesion)-Operon, das 1996 von der Arbeitsgruppe um Heilmann identifiziert werden konnte. Das Operon besteht aus den vier Genen *icaA*, *icaD*, *icaB* und *icaC* (Gerke et al. 1998, Heilmann et al. 1996). Das vorgelagerte Gen *icaR* fungiert als Repressor. Es existieren jedoch auch PIA-unabhängige Mechanismen bei der Biofilmbildung (Rohde et al. 2005, Toledo-Arana et al.

2005, Tormo et al. 2005, Hussain et al. 1997) Hierauf wird im Diskussionsteil näher eingegangen (vgl. Abschnitt 4.4.5.)

1.1.5 Fragestellung

Auch in der Universitäts-Kinderklinik Würzburg spielen KoNS als Erreger der late-onset Sepsis bei Neugeborenen eine bedeutende Rolle. Sie stellen v.a. für sogenannte sehr kleine Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht < 1500 g (VLBW) ein relevantes Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko dar, das zudem zu einer Verlängerung des stationären Krankenhausaufenthaltes führen kann.

Es stellt sich die Frage, wie die Frühgeborenen mit pathogenen KoNS-Stämmen besiedelt werden. Zum einen könnten die Mütter die Stämme durch Haut-zu-Haut-Kontakt übertragen, zum anderen könnte das Personal der neonatologischen Intensivstation mit verantwortlich sein.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, für *S. epidermidis* als häufigsten und klinisch bedeutsamen KoNS zu eruieren, ob die zunehmende Dauer des stationären Krankenhausaufenthaltes von sehr kleinen Frühgeborenen mit einer höheren Rate an *ica*-Präsenz, Biofilmbildung und Antibiotikaresistenz assoziiert ist. Hierzu wurden sequenzielle Isolate von *S. epidermidis* bei Müttern und Kindern gewonnen und mittels MLST (Multilocus-Sequence-Typing) typisiert. Sie wurden auf Antibiotikaresistenzen, Biofilmbildung und Präsenz des *icaA*- sowie des *mecA*-Gens untersucht und mit Isolaten, die aus Blutkulturen oder Venenkatheter des Kindes isoliert wurden, verglichen.

So sollte das Reservoir für diese Stämme identifiziert werden, sowie Übertragungswege von biofilmbildenden *S. epidermidis*-Stämmen aufgeklärt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Die Geräte, die für die vorliegende Studie verwendet wurden, sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Geräte

37°C Schüttler	Innova 4300, Innova
Feinwaage	Balance, Ohyo
Geldokumentationsanlage	Gel Doc 2000, Bio-Rad
Heizblock	Liebisch
Horizontale Elektrophorese Gelkammer	Ettan DALT six, Amersham Biosciences
Inkubator	Heraeus
Magnetrührer	M21, GLW
Mikropipetten	0,5 µl - 10µl, Eppendorf
	1 µl - 20 µl, Gilson
	20 µl – 200 µl, Eppendorf
	200 µl – 1 ml, Gilson
Mikrowellengerät	Micromat, AEG
Photometer	Ultrospec3000, Amersham Biosciences
Polymerasekettenreaktionseinheit	T3 Thermocycler, Biometra
Sterilarbeitsbank	NaAirII Typ A/B3, NaAir
Sequenziergerät	ABI-Sequenzierer, Perkin Elmer
Tischzentrifuge	Zentrifuge 5415c, Eppendorf
Vertikalschüttler	H5501 digital, Kika Labortechnik
Vortexer	L46, GLW
Wagen	470, Kern
	NavigatorTM, Ohaus
Zellkulturplatten	(96-Loch) CELLSTAR No 655166, Greiner Bio-one

2.1.2 Chemikalien

Die benötigten Chemikalien wurden bei den Firmen Applichem; Becton, Dickinson & Company (BD); Fluka; Merck; Oxoid; Roth und Sigma bezogen.

2.1.3 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen werden bei den entsprechenden Methoden dargestellt.

2.1.4 Nährmedien und Agarplatten

Im Folgenden wird die Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien und Fertigmedien beschrieben:

LB (Luria- Bertani)- Medium:

Trypton- Caseinpepton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l
Aqua bidest. ad 1000 ml	

TSB (Trypticase-Soy-Broth)

Bei diesem Medium wurden 30 g/l des Fertigpräparates der Firma BD verwendet.

Die Zusammensetzung des Produktes ist für 30 g laut Herstellerangaben wie folgt:

Caseinpepton	17 g
Pepton aus Sojamehl	3 g
Glukose	2,5 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g

MH (Mueller-Hinton-Broth)

23 g	ad 1000 ml Aqua bidest
------	------------------------

Für feste Medien wurde zu dem jeweiligen Medium 1,5% Agar zugegeben, d.h. 15 g Agar auf 1000 ml Medium. Alle Nährmedien wurden bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert.

2.1.5 Bakterienstämme

Die verwendeten Kontroll-Bakterienstämme sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Kontroll-Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaft/Verwendung	Referenz
<i>S. aureus</i> RN4220	Positivkontrolle für den Koagulase-Test	Kreiswirth et al., 1983
<i>S. epidermidis</i> RP62A	ica-positiv Positivkontrolle im Biofilmtest	ATCC 32984
<i>S. carnosus</i> TM 300	ica-negativ, Biofilm-negativ, Negativkontrolle im Biofilm-Test	Götz et al., 1990

2.1.6 Laborkits

Im Folgenden sind die verwendeten Laborkits mit Herstellerangaben aufgelistet.

Kits

„API-Staph“

„QIAquick PCR Purification Kit“

„Staphytect Plus“

Hersteller

Bio Merieux, Lyon, Frankreich

Qiagen, Hilden

Oxoid

2.1.7 Enzyme

Die Enzyme wurden gemäß den Empfehlungen der Hersteller gelagert und verwendet. Dabei handelt es sich um folgende Enzyme und Hersteller:

DNase; Invitrogen, Karlsruhe

Lysozym; Sigma, Mannheim

Lysostaphin; Sigma, Mannheim

Taq-DNA-Polymerase; Qiagen, Hilden

2.1.8 DNA-Größenmarker

Als DNA-Größenmarker wurde die 1kb DNA Ladder der Firma Fermentas verwendet (vgl. Abbildung 1).

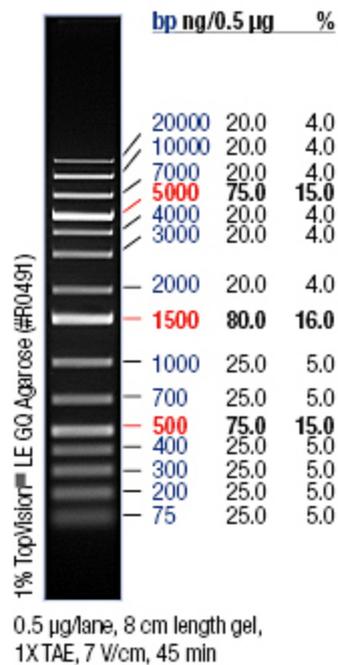


Abbildung 1: DNA-Größenmarker

2.1.9 Oligonukleotide

Tabelle 3 enthält die verwendeten Primer. Der Primer 16SrevSeq wird zur Ansequenzierung des PCR-Fragments verwendet, weswegen keine definierte Größe des Genabschnitts angegeben werden kann.

Tabelle 3: Primer *rRNA*, *mecA*, *icaA*, 16SrevSeq

Gen	codiertes Protein	Primer	Annealing-Temp.	Größe (bp)
<i>rRNA</i>	16s ribosomale RNA	5'-GAGTTTGATCCTGGCTA-3'	57°C	1523
		5'-TACGGCTACCTTGTTACGAACTT-3'		
<i>MecA</i>	Penicillin-Bindeprotein2'	5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3'	56°C	533
		5'-AGTTCTGCAGTACGGGATTTGC-3'		
<i>IcaA</i>	Intercellular adhesion protein A	5'-GACCTCGAAGTCAATAGAGGT-3'	58°C	814
		5'-CCCAGTATAACGTTGGATACC-3'		
16SrevSeq		5'CATTTACCGCTACACACATGGA-3'	57°C	

Die Primer für das MLST (Multi-Locus-Sequence-Typing) findet man unter dem entsprechenden Abschnitt im Methodenteil (vgl. Tabelle 5).

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung und Identifizierung von Bakterienstämmen in der Neonatologie der Universitäts-Kinderklinik Würzburg

Die Proben für die vorliegende Untersuchung wurden im Jahr 2003 auf den neonatologischen Stationen der Universitäts-Kinderklinik Würzburg gesammelt. Insgesamt wurden für diese Studie Abstriche von 30 Mutter-Kind Paaren mit sehr kleinen Frühgeborenen sowie vom Krankenhauspersonal der neonatologischen Stationen mit Patientenkontakt gesammelt. Für die vorliegende Arbeit wurden Abstriche von drei Mutter-Kind-Paaren verwendet, von denen klinische Isolate von *S. epidermidis* existierten, die von zentralen Venenkathetern (ZVK) oder in einer Blutkultur kultiviert werden konnten, als der klinische Verdacht auf eine Infektion bestand. Die ZVK-Spitzen und Blutkulturen wurden an das Institut für Mikrobiologie der Universität Würzburg versendet, das uns die klinischen Isolate freundlicherweise zur Verfügung stellte, wobei das Isolat von Mutter-Kind-Paar I für die vorliegende Untersuchung nicht mehr verfügbar war. Die beim Personal isolierten Stämme sind Gegenstand einer anderen Arbeit (Ch. Ströbele, Diplomarbeit, 2005).

Abstriche wurden von den Müttern und ihren Kindern jeweils an den Tagen 1, 3, 7, 14, und danach immer in einwöchigem Abstand (Tag 21, 28, 35, 42, 49, 56,...) ihres Krankenhausaufenthaltes entnommen und kultiviert. Bei den maternalen Abstrichen handelt es sich um Nasenabstriche, bei den Kindern wurden Hautabstriche der Axilla entnommen. Die verschiedenen Isolate der Mutter-Kind-Paare wurden bei -80°C in einer Glycerinkultur gelagert. Um die Spezies der Isolate zu bestimmen, wurden sie zunächst auf Agarplatten ausgestrichen und phänotypisch untersucht. Lag eine Mischkultur vor, wurden die Kolonien mit unterschiedlicher Größe erneut getrennt voneinander ausgestrichen. Sobald der Ausstrich ein homogenes Bild zeigte und der Morphologie von Staphylokokken-Kolonien entsprach, wurde die chromosomale DNA isoliert und ein Teil des rRNA-Lokus, der die ribosomale RNA der 16S Untereinheit des Ribosoms kodiert, sequenziert.

Die Stämme wurden dann nach folgender Nomenklatur benannt: Ein Großbuchstabe (M/K) zeigt an, ob der Abstrich von Mutter oder Kind stammt, eine folgende Zahl beschreibt die Nummer des Mutter-Kind-Paars, ein zweiter Buchstabe zeigt

alphanumerisch den Tag an, an dem der Abstrich entnommen wurde (a entspricht 1.Tag, b = 3.Tag, c = 7.Tag usw.). Ein Buchstabe in Klammern steht dort, wenn eine Mischkultur vorliegt (k=klein, g=groß) und beschreibt die Größe der getrennten Kolonien. So erhält ein Isolat von Tag 1 der Mutter des ersten Mutter-Kind-Paares die Bezeichnung M 1a (g), wenn das Isolat aus einer gemischten Kultur mit großen Kolonien stammt. Bei Zwillingen erhält der 1. Geminus den Zusatz „1“ nach dem Großbuchstaben K und der 2. Zwilling eine „2“ nach dem K.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 43 Isolate von 3 Mutter-Kind-Paaren untersucht. Der Koagulase-Test diente zunächst als Unterscheidung zwischen koagulase-positiven und koagulase-negativen Staphylokokken. Die Speziesidentifizierung der Isolate erfolgte nach Isolierung der chromosomale DNA durch die anschließende PCR des 16S rRNA DNA-Lokus der Stämme. Nach der Amplifikation erfolgte die Aufreinigung. Danach wurde mit dem Forward-Primer „27f“ und mit dem Backward-Primer „16SrevSeq“ sequenziert, somit erhält man einen Sense- und den komplementären Antisense-Strang. Nach entsprechendem Datenbankabgleich der erhaltenen Nukleotidsequenz wurde damit schließlich die Spezies bestimmt.

2.2.2 Koagulase-Test

Der Koagulase-Test zur Differenzierung von koagulase-negativen und koagulase-positiven Staphylokokken wurde mit dem Kit “Staphytest Plus” von Oxoid durchgeführt. Der Staphytest Plus-Test ist ein Latex-Objektträger-Agglutinationstest zur Differenzierung von Staphylokokken, die den Clumping-Faktor, ProteinA sowie bestimmte Kapselpolysaccharide bilden. Das Latex-Reagenz liegt in getrockneter Form auf dem Reaktionsobjektträger vor, der sowohl mit Schweinefibrinogen, Kaninchen-IgG als auch mit spezifischen polyklonalen Antikörpern gegen die Kapselpolysaccharide von *S. aureus* beschichtet ist. Werden Staphylokokken in einer physiologischen Kochsalzlösung emulgiert und mit dem Latex-Testreagenz auf der Reaktionskarte vermischt, kommt es zu einer Agglutination, die hervorgerufen wird durch eine Reaktion zwischen (i) Fibrinogen und Clumping-Faktor, (ii) dem Fc-Anteil von IgG und ProteinA, (iii) spezifischen Antikörpern und den Kapselpolysacchariden. Bei *S. aureus* ist diese Reaktion positiv.

2.2.3 Api-Staph-Test

Zur Identifizierung von KoNS diente der Api-Staph-Test, der mit Hilfe standardisierter biochemischer Reaktionen arbeitet. Zunächst wird eine Reinkultur in TSB-Medium 18-24 Stunden bei 37°C angezchtet. In einer Ampulle Api-Staph Medium stellt man eine homogene Bakteriensuspension her, deren Trübung dem McFarland Standard 0,5 entspricht. Das beimpfte Api-Staph-Medium wird mit einer Pipette in die Röhrcchen des Streifens pipettiert. Die Reaktionen zum Nachweis von ADH (Arginine Dihydrolase) und URE (Urease) werden mit Paraffinöl überschichtet, so dass anaerobe Bedingungen entstehen. Die Inkubationswanne wird abgedeckt und 18-24 h bei 37°C inkubiert. Danach wird jeweils ein Tropfen von verschiedenen Reagenzien in das Röhrcchen pipettiert und die Reaktion wird nach der Farbe (gelb oder rot) anhand einer Ablesetabelle bestimmt. Die Reaktionen werden auf dem Ergebnisblatt notiert und in Form eines numerischen Profils kodiert, so dass zwischen den verschiedenen KoNS unterschieden werden kann.

2.2.4 Agardiffusionstest zur Erstellung von Antibioogrammen

100 µl einer Übernachtskultur werden in 2 ml frischem LB angeimpft und 4 h bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Nun wird die Kultur auf den MacFarland Standard 0,5 (BioMerieux) eingestellt und danach 1:200 verdünnt. 100 µl dieser Verdünnung wird auf MH-Nährböden ausplattiert. Man legt dann maximal drei Antibiotikatestplättchen (Oxoid) auf einer Platte aus. Über Nacht wird die Agarplatte bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung erfolgt am nächsten Tag, indem man die Hemmhöfe um die Testplättchen, in welchen keine Bakterien wachsen, ausmisst.

Hier wurden folgende Antibiotika in der angegebenen Konzentration getestet:

Penicillin	10 units
Erythromycin	30 µg
Gentamicin	10 µg
Ciprofloxacin	5 µg
Chloramphenicol	30 µg
Tetracyclin	30 µg

In Tabelle 4 sind die Hemmhofgrenzwerte der entsprechenden Antibiotika aufgelistet.

Tabelle 4: Hemmhofgrenzwerte der getesteten Antibiotika (mm)

Antibiotikum	Hemmhofgrenzwerte für Staphylokokken
Penicillin	< 28: r
	> 28: s
Erythromycin	< 16: r
	> 21: s
Gentamicin	< 13: r
	> 14: s
Ciprofloxacin	< 16: r
	> 20: s
Chloramphenicol	< 20: r
	> 21: s
Tetracyclin	< 16: r
	> 22: s

r=resistent; s=sensibel

Liegt ein Hemmhofgrenzwert zwischen den beiden Millimeterangaben ist er intermediär sensibel.

2.2.5 Adhärenz-Assay zur Beurteilung der Biofilmbildung

Es wird eine Übernachtskultur angelegt. Diese wird 1:200 verdünnt. Von der 1:200 Verdünnung werden jeweils 200 µl in eine 96-Well-Gewebekulturplatte pipetiert. Nach 18 h Inkubation im Brutschrank bei 37°C wird die Platte dreimal mit 1×PBS gewaschen. Anschließend werden die adhärennten Zellen auf dem Heizblock bei 60°C hitzefixiert und danach mit Kristallviolett gefärbt. Der Farbstoff bindet an die adhärennten Zellen, das nicht gebundene Kristallviolett wird mit Aqua dest. abgewaschen.

Nun misst man die Intensität des Farbstoffs mit einem Microtiter-Platten-Reader bei 492 nm. Ist die OD > 0,36, gilt der getestete Stamm als starker Biofilm-Bildner. Bei einer OD zwischen 0,18 und 0,36 werden die Stämme als schwache Biofilm-Bildner bezeichnet und bei einer OD < 0,18 als Biofilm-negativ.

Dabei entspricht der erste Schwellenwert, also 0,18, dem dreifachen der Extinktion des Biofilm-negativen Stamms *S. carnosus* TM300. Dieser Stamm wurde auch als

Negativkontrolle verwendet. Als Positivkontrolle diente der Biofilm-bildende Stamm *S. epidermidis* RP62A.

Ein Versuch erfolgte in achtfacher Bestimmung. Der Adhärenz-Assay wurde zweimal wiederholt. Im Folgenden sind die verwendeten Lösungen zum Adhärenz-Assay mit der entsprechenden Zusammensetzung aufgelistet:

10x PBS: 80 g NaCl
 2 g KH₂PO₄
 2 g KCl
 11,4 g Na₂HPO₄
 ad 1000 ml Aqua dest.

Kristallviolett: gesättigte Lösung mit Aqua dest.
 1,6 g auf 100 ml Aqua dest.

2.2.6 Isolierung chromosomaler DNA

Zur Isolierung chromosomaler DNA legt man zunächst eine Übernachtskultur mit 3 ml LB + 1 % Glycin an. Davon werden 2 ml abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Nun wird das Pellet in 1 ml 1× TE-Puffer resuspendiert und anschließend wieder abzentrifugiert (ca. 5 min.). Danach löst man das Pellet in 100 µl 10 mM Tris-HCl, 25% Sucrose pH 7,5; weiterhin gibt man 20 µl Lysostaphin (2 mg/ml) und 15 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 dazu und inkubiert den Ansatz nun solange bei 37° C, bis er klar und viskös erscheint (ca. 30 min.). Lysostaphin zerstört die Zellwand der Bakterien, indem es β-1,6-Glycin-Brücken spaltet. EDTA fängt durch Chelatbildung zweiwertige Ionen ab. Hinzu kommen jetzt 375 µl TE-Puffer, 225 µl SDS 10% zur Proteindenaturierung und Zellmembranlyse und 20 µl Proteinase K (10 mg/ml) zur DNase-Inaktivierung. Es folgt eine Inkubation bei 55° C für 45 min. Nach Zugabe von 150 µl Natriumperchlorat wird das Cap kurz geschwenkt. Natriumperchlorat fällt Proteine und andere Bestandteile der Zelle, wie z.B. Plasmide. Die chromosomale DNA bleibt in Lösung. Danach fügt man zur Reinigung der DNA 450µl Chloroform/Isoamylalkohol hinzu und lässt den Ansatz für mindestens 1,5 h auf dem Orbitalschüttler kräftig schütteln. Der Ansatz wird dann bei 14 000 rpm 10 min lang abzentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgezogen und auf zwei neue 1,5 ml

Eppendorf-Tubes verteilt. Die DNA wird nun mit dem doppeltem Volumenteil (also etwa 800 µl) 100% Ethanol gefällt. Es wird nochmals 10 min abzentrifugiert, anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet lässt man lufttrocknen und nimmt es schließlich in 50 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,5 (EB-Puffer) auf. Die chromosomale DNA muss im Kühlschrank aufbewahrt werden und kann etwa ein halbes Jahr lang verwendet werden.

2.2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur Amplifizierung von definierten DNA-Abschnitten. Dadurch kann man kleinste Mengen DNA direkt nachweisen. Die PCR beruht auf der zyklischen Wiederholung von drei Schritten:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge
2. Anlagerung (Annealing) von synthetischen Oligonukleotiden (Primern) an die flankierenden Enden des zu amplifizierenden Genbereiches. Die Primer, die komplementär zum Matrizenstrang sind, bestehen aus ca. 20 bp und lagern sich bei einer bestimmten Annealingtemperatur an die einzelsträngige DNA an.
3. Polymerisierung (Neubildung) der doppelsträngigen DNA, ausgehend von den Primern, mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase sowie der vier Desoxynukleotide (dNTPs): dATP, dTTP, dCTP, dGTP. Dabei verwendet man die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, die eine Denaturierungstemperatur von 72°C benötigt, aber auch noch bei höheren Temperaturen stabil ist. Für eine optimale Aktivität der Polymerase ist die Zugabe von MgCl₂ nötig.

Somit wird die DNA zwischen den beiden Primern mit jedem Zyklus verdoppelt. Dies führt zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA.

Zum Nachweis der Amplifikations-Produkte wird die DNA mit Ethidium-Bromid gefärbt, in Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht betrachtet. Eine sichtbare Bande der erwarteten Länge (nach Vergleich mit DNA Längenstandards) wird als positiv bewertet.

Für die PCR wird in der Regel ein Master-Mix hergestellt, in dem Nukleotide, Magnesium und Reaktionspuffer in den benötigten Konzentrationen enthalten sind:

2 Material und Methoden

Master Mix 6 ml Ansatz:

652 μ l 10x Puffer

130 μ l 20mM dNTPs (5mM/Nukleotid)

261 μ l 50 mM MgCl₂

4957 μ l Aqua bidest.

Die verwendeten Primer sind jeweils in Tabelle 3 und Tabelle 5 dargestellt.

Im Folgenden wird der übliche PCR-Ansatz beschrieben:

PCR 50 μ l Ansatz:

46 μ l Master Mix

2 μ l Primer (10 pmol pro Primer)

0,5 μ l Taq Polymerase

1,5 μ l Template

Ein Reaktionszyklus einer PCR sieht dabei folgendermaßen aus:

1 Initiale Denaturierung	3 min	95° C
2 Denaturierung	1 min	95° C
3 Primer-Annealing	1 min	Ta
4 Elongation	1 kb/min	72° C
5 Finale Elongation	5 min	72° C
6 Kühlung		4° C

2.2.8 Horizontale Gelelektrophorese

In 200 ml 1×TAE werden 2g Agarose durch Kochen in der Mikrowelle gelöst, um ein 1%-iges Agarosegel herzustellen. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wird das Gel in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Sobald das Gel erstarrt ist, kann der Kamm vorsichtig herausgezogen werden. Nun wird das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt und mit 1×TAE überschichtet. Die Proben werden mit einem Probenpuffer versetzt und dann in die Geltaschen pipetiert. Zusätzlich wird in einer Spur ein DNA-Größenmarker aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung, die bei 90 V für 2 h erfolgt, wird das Gel für 10 min im Ethidiumbromidbad angefärbt, kurz

mit Wasser abgespült und anschließend unter UV-Licht mit der Gel-Dokumentations-Einheit ausgewertet.

2.2.9 Aufreinigung von PCR-Produkten

Für die Sequenzierungs-PCR muss die DNA zunächst aufgereinigt werden, um Produkte der vorherigen PCR zu entfernen. Es wurde das PCR-Purification-Kit von Qiagen verwendet. Zuerst fügt man dem unaufgereinigten PCR Produkt im Verhältnis 1:5 Buffer PB zu. Um die DNA zu binden, wird die Probe bei 13 000 rpm für 30-60 s zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Um die Probe zu waschen, fügt man nun 0,75 ml Buffer PE hinzu und zentrifugiert wieder 30-60 s. Der Überstand wird wieder verworfen und das Säulchen nochmal 1 min lang zentrifugiert. Um die DNA zu eluieren, kommen nun 30 µl Aqua dest. hinzu. Danach wird wieder für 1 min zentrifugiert.

2.2.10 Messung der DNA-Konzentration

Man bestimmt die DNA-Konzentrationen am Photometer. 100 µl einer 1:100 Verdünnung der DNA in Aqua bidest. werden in einer Quarzküvette mit 10 mm Schichtdicke bei 260 nm und 280 nm gemessen. Dabei entspricht eine Einheit bei OD 260 einer Doppelstrang-DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Durch den Quotienten A_{260}/A_{280} wird der Reinheitsgrad der DNA ermittelt. Die DNA gilt als rein, wenn der Reinheitsgrad zwischen 1,8 und 2,0 liegt.

2.2.11 Multi-Locus-Sequence-Typing (MLST)

Durch das Multi-Locus-Sequence-Typing (MLST) werden die sieben „Housekeeping“-Gene der *S. epidermidis* Stämme ermittelt. Die 7 „Housekeeping“-Gene sind *arcC* (Carbamate kinase), *aroE* (Shikimate 5-dehydrogenase), *glpK* (Glycerol kinase), *gmk* (Guanylate kinase), *pta* (Phosphateacetyltransferase), *tpiA* (Triphosphateisomerase) und *yqiL* (Acetyl-CoA acetyltransferase). In vorliegender Studie wird entsprechend das Protokoll von Wisplinghoff verwendet, das auch von Kozitskaya verwendet wurde (Wisplinghoff et al. 2003, Kozitskaya et al. 2005). Es existieren jedoch noch weitere Protokolle: eines von Wang et al., das auf dem Schema von *S. aureus* basiert und das Protokoll von Paacock et al., das die Gene *gmk* und *pta* aus den vorausgegangenen Schemata enthält sowie fünf neue Gene.

Dieses Protokoll wurde jedoch nicht veröffentlicht (Wang et al. 2003; Thomas et al. 2007). Ein neues MLST Schema wurde von Thomas et al. veröffentlicht. Dies enthält folgende Gene: *arcC*, *aroE*, *tpiA*, *yqiL*, ABC transporter (*gtr*), DNA mismatch repair protein (*mutS*), Pyrimidine operon regulatory protein (*pyrR*) (Thomas et al. 2007).

Zunächst führt man beim MLST eine Amplifizierung der Gene mittels PCR durch. Hierzu verwendet man folgenden Ansatz:

Pro Cap 50 µl Gesamtvolumen:

46,5 µl Master Mix

je 1 µl Primer (upper and lower)

0,5 µl Taq-Polymerase

1 µl Template

Die Annealing-Temperatur beträgt 57°C, die Elongationszeit 30 s.

Danach trägt man das PCR-Produkt auf Agarosegel auf. Wenn das PCR-Produkt hier die richtige Größe aufweist und keine Bande bei der Negativkontrolle auftritt, kann man die amplifizierte DNA mit dem PCR-Purification-Kit von Qiagen aufreinigen.

Des Weiteren erfolgt die Sequenzierung der DNA.

Dabei verwendet man pro Cap mit 5 µl Gesamtvolumen:

1 µl Premix

1 µl BigDYE

1 µl Primer (10 pmol/µl)

2 µl aufgereinigtes PCR-Produkt

Annealing-Temp. 57°C, Elongationszeit 30 s

Pro Sequenztyp führt man die Sequenzierung dabei mit zwei verschiedenen Primern durch, einmal mit dem upper- und einmal mit dem lower-Primer. Somit erhält man zwei gleiche Sequenzen, die einmal am DNA-Strang unten und einmal am DNA-Strang oben anfangen.

Nun kann man diese Sequenzen zusammensetzen und erhält die vollständige Basenabfolge des entsprechenden Gens. In folgender Tabelle sind die 14 verschiedenen Primer für die 7 housekeeping-Gene aufgelistet.

Tabelle 5: Verwendete Primer MLST

Gen	kodiertes Protein	Primerpaare	Größe des Gen-Abschnitts (bp)
<i>arcC</i>	Carbamate kinase	5'-TGTGATGAGCAGCTACCGTTAG-3'	465
		5'-TCCAAGTAAACCCATCGGTCTG-3'	
<i>aroE</i>	Shikimate 5-dehydrogenase	5'-CAAGCGAAATCTGTTGGGG-3'	420
		5'-GATTGGATTACCTCTTTGTTTCAGC-3'	
<i>glpK</i>	Glycerol kinase	5'-CAGGTCGTCCAATCTATCACGC-3'	468
		5'-CATCACCACGGTCAAAACAGC-3'	
<i>gmk</i>	Guanylate kinase	5'-CTATTGACTGAATTTCGATTC-3'	465
		5'-CCTTCAGGTGTTGGAAAGGG-3'	
<i>pta</i>	Phosphate acetyltransferase	5'-TGGTGCTGCACATTCTACTGGA-3'	477
		5'-TACTGCATCGTATCCACCTAAACG-3'	
<i>tpi</i>	Triphosphate isomerase	5'-GCTTACTTTGAAGAAAGCGGTG-3'	408
		5'-CCACCATATTGAATACGTGTAGCG-3'	
<i>yqi</i>	Acetyl-CoA acetyltransferase	5'-ATCCTGCTCGTATTGCTGCG-3'	474
		5'-TGCTGGACGGAGTTGTGCTAAC-3'	

Bei einer anschließenden BURST-Analyse kann man Abstammungsschemata aller Sequenztypen vom Ausgangsgenotyp des klonalen Komplexes erhalten. Hierauf wird im Ergebnisteil näher eingegangen.

3 Ergebnisse

3.1 Übersicht im Querschnitt

3.1.1 Identifizierung der Stämme

Zunächst soll ein Überblick über alle 43 untersuchten Isolate gegeben werden. Hierbei wird nicht zwischen einer maternalen oder kindlichen Herkunft der Stämme unterschieden.

Von den 43 untersuchten Isolaten konnten 40 als Staphylokokken identifiziert werden. Bei den anderen drei Stämmen handelt es sich um *Enterococcus faecalis*. Von den Koagulase-negativen Staphylokokken waren 29 *S. epidermidis* (67%), fünf *S. hominis* (12%) und fünf *S. hämolyticus* (12%). *S. aureus* (2%) wurde einmal gefunden.

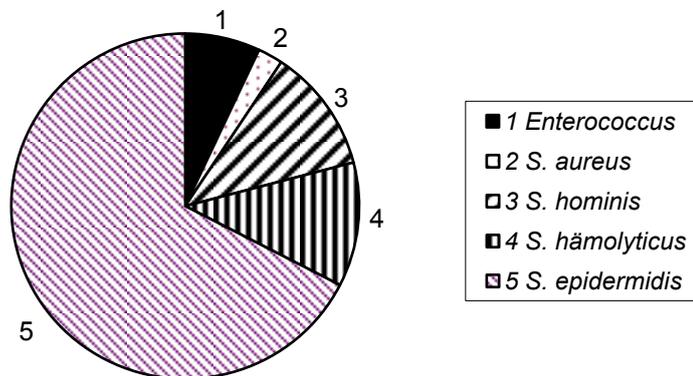


Abbildung 2: Spezies-Bestimmung und Anteil der verschiedenen Spezies aller 43 Isolate

Die 29 *S. epidermidis* Isolate wurden weiter bearbeitet. Hier soll nun ein kurzer Überblick über die Ergebnisse aller *S. epidermidis*-Stämme gegeben werden.

3.1.2 Antibiotikaresistenzen

Mit Hilfe des Agardiffusionstests wurden die Antibiotikaresistenzen der Staphylokokkenisolate beurteilt. Dabei wurde auf folgende Antibiotika getestet:

3 Ergebnisse

Penicillin, Erythromycin, Tetracyclin, Gentamicin, Ciprofloxacin und Chloramphenicol. 24 der 29 *S. epidermidis* Isolate waren dabei gegen Penicillin resistent (83%). Ein Isolat (3%) war intermediär empfindlich. Gegen Erythromycin waren 22 (76%) der *S. epidermidis* Isolate resistent, gegen Gentamicin 16 (55%), gegen Tetracyclin waren drei (10%) resistent und 11 (38%) intermediär empfindlich. Vier Isolate (14%) waren gegen Ciprofloxacin resistent. Am wenigsten Resistenzen fanden sich bei Chloramphenicol, worauf 3 (10%) der Isolate intermediär sensibel waren.

25 der 29 Staphylokokkenisolate (90%) waren gegen mindestens ein Antibiotikum resistent oder intermediär empfindlich, was eine sehr hohe Resistenzrate bei *S. epidermidis* zeigt.

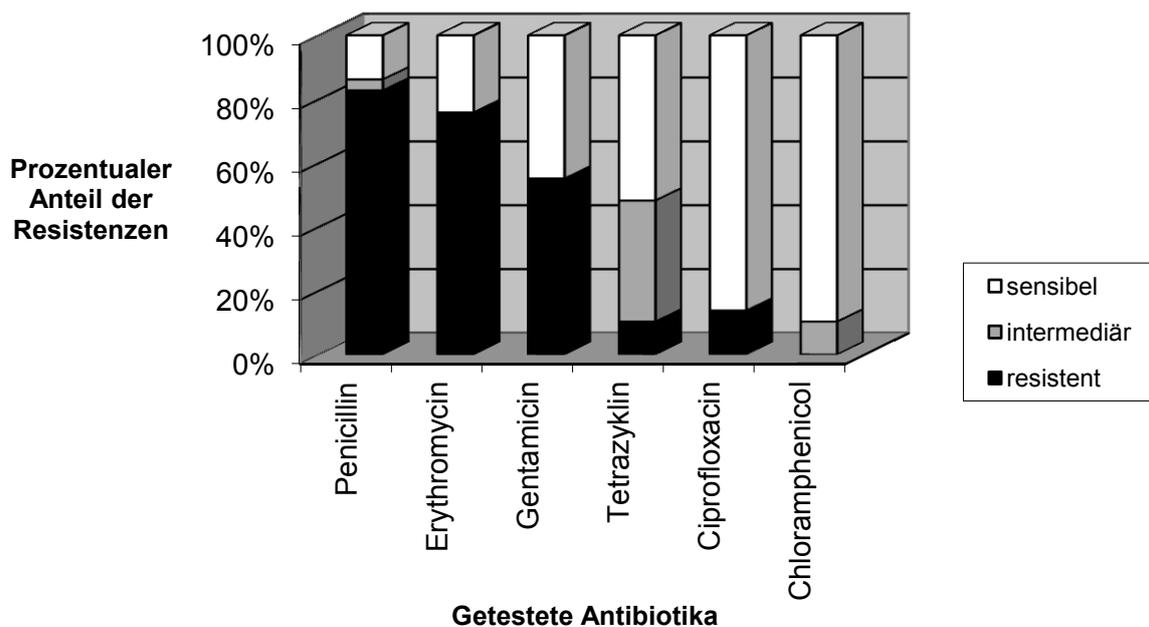


Abbildung 3: Prozentualer Anteil von Resistenzen der sechs getesteten Antibiotika der drei Mutter-Kind-Paare

3 Ergebnisse

Das *mecA*-Gen war bei 16 (55%) aller *S. epidermidis*-Isolate vorhanden (vgl. Abbildung 4).

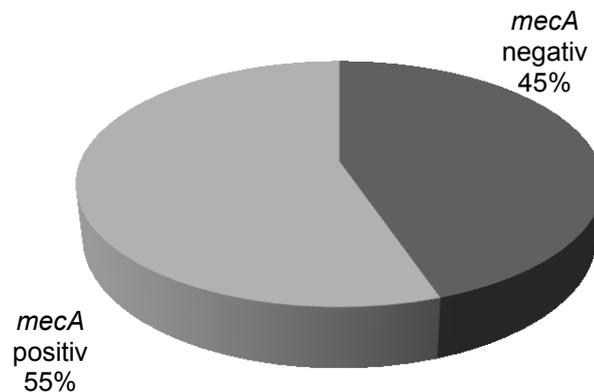


Abbildung 4: Präsenz des *mecA*-Gens bei allen *S. epidermidis*-Isolaten

3.1.3 *icaA*-Präsenz und Biofilm

Alle 29 *S. epidermidis*-Isolate wurden phänotypisch auf Biofilmbildung untersucht. Des Weiteren testete man die Isolate auf das Vorhandensein des *icaA*-Gens. Dabei zeigten 14 Isolate (48%) in der *icaA*-PCR die spezifische Fragmentgröße von 814 bp und trugen somit das *icaA*-Gen (vgl. Abbildung 5).

Vier Stämme (14%) waren im Adhärenzassay zur Biofilmbildung stark adhärent, drei (11%) schwach adhärent. Die übrigen Isolate zeigten gar keine Biofilmbildung (vgl. Abbildung 6).

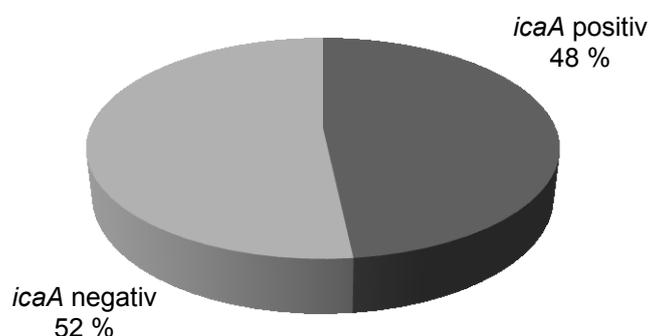


Abbildung 5: Präsenz des *icaA*-Gens bei allen *S. epidermidis*-Isolaten

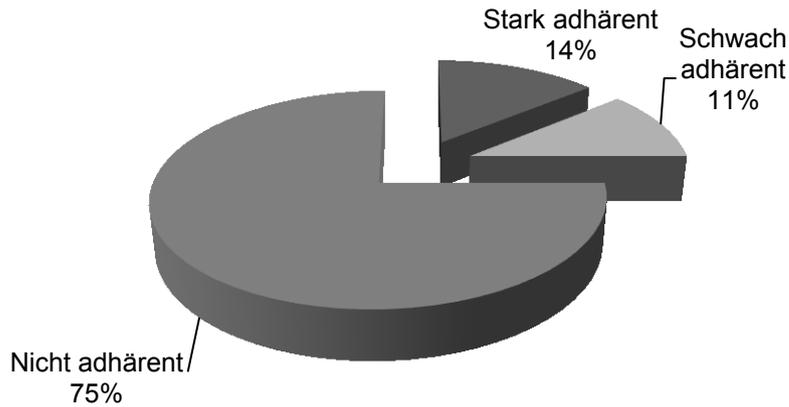


Abbildung 6: Biofilmbildung im Adhärenzassay bei den drei Mutter-Kind-Paaren

Hierbei fällt auf, dass das Vorhandensein des *icaA*-Gens nicht immer mit der phänotypischen Biofilmbildung korreliert (vgl. Abbildung 7). Ein Stamm zeigte im Adhärenzassay Biofilmbildung, wies aber nicht das *icaA*-Gen auf (vgl. Tabelle 10). Acht Isolate besaßen zwar das *icaA*-Gen, bildeten jedoch keinen Biofilm im Adhärenzassay (vgl. Tabelle 10 und Tabelle 18). Schwach adhärente Stämme wurden dabei zur Vereinfachung als Biofilm-positiv gewertet. Auf die Mechanismen, die hierfür verantwortlich sein können, wird im Diskussionsteil näher eingegangen (vgl. Abschnitt 4.4).

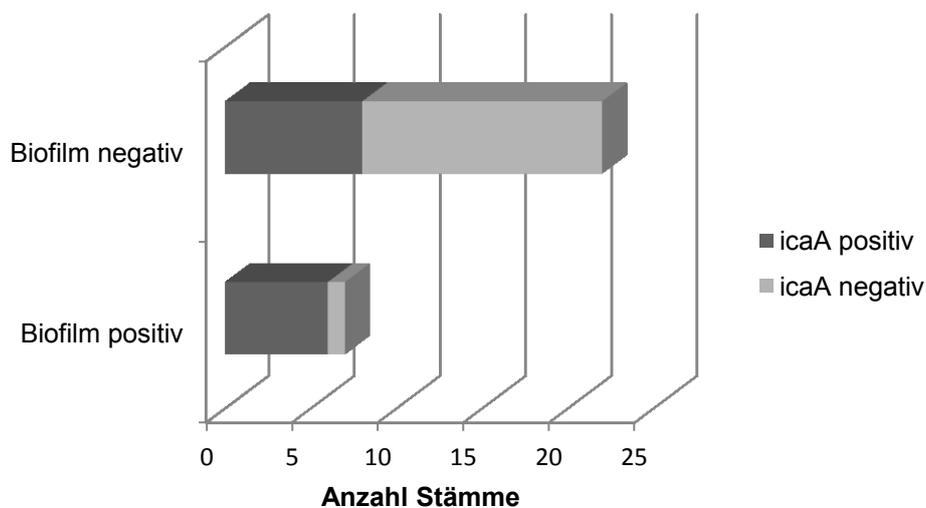


Abbildung 7: Korrelation *icaA*-Präsenz und Biofilmbildung

3.1.4 Multi-Locus-Sequence-Typing (MLST)

Das Multilocus-Sequence-Typing (MLST) stellt eine Methode dar, um verwandtschaftliche Beziehungen zwischen verschiedenen Staphylokokken-Spezies zu untersuchen. Diese Technik basiert auf der Sequenzanalyse von sieben hochkonservierten Genen (*Housekeeping-Gene*), die innerhalb der Isolate der Erregerspezies stabil sind, jedoch innerhalb der gesamten Speziespopulation eine ausreichende Diversität aufweisen. (Aanensen und Spratt, 2005; Hanage et al., 2004; Maiden, 1998). Damit ermöglicht MLST Laboratorien, Bakterienstämme durch Sequenzierung der sieben Genfragmente schnell zu charakterisieren und diese mit Stämmen, deren MLST-Daten von anderen Laboren eingereicht wurden, sowie mit der gesamten Population zu vergleichen (Aanensen und Spratt, 2005), so dass man daraus wichtige Schlüsse über die Übertragungswege und die Verbreitung der Staphylokokken ziehen kann. Für das MLST wurde inzwischen eine Datenbank etabliert. So kann man im Internet die verschiedenen Sequenztypen untereinander vergleichen (www.mlst.net, Website). Inzwischen ist jedoch auf dieser Website ein neues Schema zur *S. epidermidis*-Analyse hinterlegt worden, das nicht mehr die im Protokoll von Kozitskaya et al. (2005) enthaltenen Sequenztypen (STs) und Allele enthält.

Die Sequenzen jedes Genfragments werden mit allen zuvor an diesem Genlocus identifizierten Sequenzen (Allelen) abgeglichen und einer Allelnummer für diesen Locus zugeordnet. Die Kombination der sieben Allelnummern definiert das Allelprofil des Bakterienstammes, das für einen bestimmten Sequenztyp (ST) spezifisch ist. MLST hat sich als effektive Methode zur Untersuchung der taxonomischen und genetischen Diversität von mikrobiellen Pathogenen erwiesen.

Um nun die klonale Verwandtschaft von Isolaten innerhalb einer Bakterienspezies zu berechnen und darzustellen; wird das graphische Model *Based upon related sequence types* (BURST) verwendet, das zur Auswertung von MLST-Daten (Sequenztypen und ihren zugehörigen Allelprofilen) entwickelt wurde (Feil und Spratt 2001). Hierbei werden engverwandte Sequenztypen als Cluster zusammengefügt. Ein Cluster engverwandter Sequenztypen wird als klonaler Komplex bezeichnet. Dabei besitzen die Sequenztypen innerhalb eines klonalen Komplexes eine benutzerdefinierte Übereinstimmungsrate des Allelprofils, wobei die

Übereinstimmung von sechs der sieben Allele als Grundeinstellung des BURST-Algorithmus definiert ist.

Die sogenannte *single locus* Variante (SLV) innerhalb des klonalen Komplexes ist ein klonal verwandter Sequenztyp, der identische Allele an mindestens sechs der sieben Loci mit einem anderen Mitglied des klonalen Komplexes aufweist (Feil et al. 2004). Die *single locus* Varianten (SLVn) können sich verändern und so entstehen Varianten, sogenannte *double locus* Varianten (DLVn), die sich an zwei der sieben Allele unterscheiden. Als *singletons* bezeichnet man nicht klonal verwandte Sequenztypen, die sich in mehr als zwei Allelen von jedem anderen Sequenztyp des klonalen Komplexes unterscheiden. Der Sequenztyp, der die größte Anzahl an SLVn und den kleinsten durchschnittlichen Abstand zu anderen Sequenztypen im klonalen Komplex besitzt, wird als Ausgangsgenotyp eines klonalen Komplexes definiert. Der durchschnittliche Abstand eines Sequenztyps zu anderen Sequenztypen wird anhand der durchschnittlichen Anzahl an Unterschieden in den Allelen berechnet. Diese Vorgehensweise zur Bestimmung des Ausgangsgenotyps berücksichtigt die Art und Weise, mit der Klone entstehen und sich verändern. So stellt das BURST-Diagramm ein Abstammungsschema aller Sequenztypen vom Ausgangsgenotyp des klonalen Komplexes dar.

In Abbildung 8 sieht man alle Sequenztypen von *S. epidermidis*, die bei den Isolaten der Mütter, der Kinder, sowie bei den klinischen Isolaten der entfernten Katheter vorkamen. Es wurde die BURST-Analyse durchgeführt, so dass nun die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den verschiedenen Sequenztypen deutlich werden. Im inneren Kreis sind jeweils single-locus-variants (SLV) dargestellt, im äußeren double-locus variants (DLV).

3 Ergebnisse

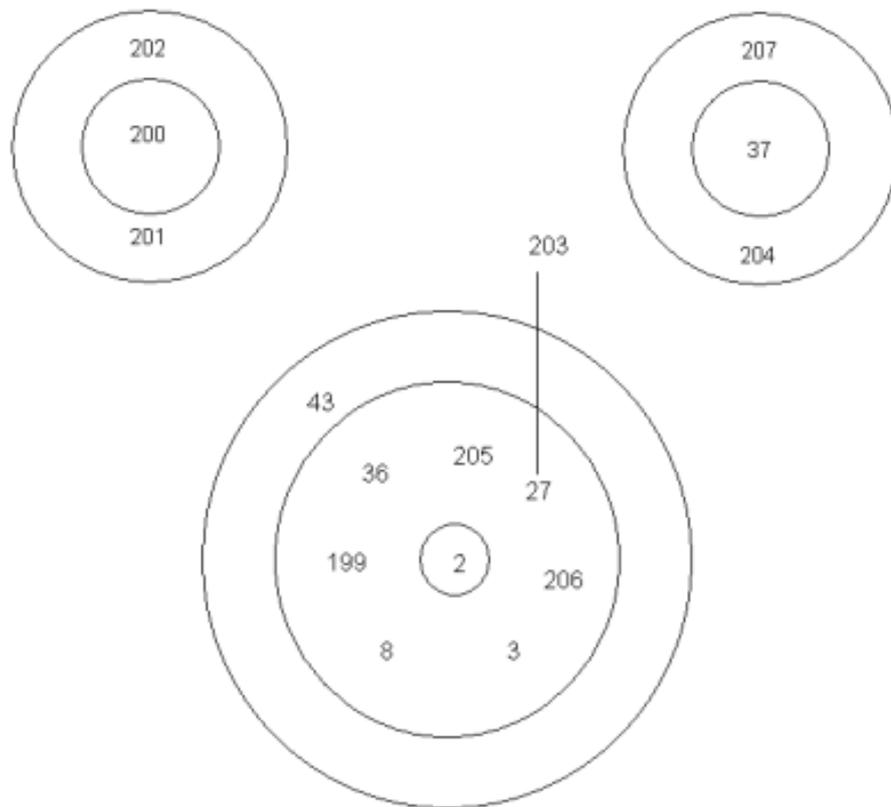


Abbildung 8: Burst-Analyse der *S. epidermidis*-Isolate aller drei Mutter-Kind-Paare

In Tabelle 6 sind die Häufigkeiten der isolierten Sequenztypen der drei Mutter-Kind-Paare und der Personalstämme mit ihren Eigenschaften bezüglich des *icaA*- und des *mecA*-Gens dargestellt.

Tabelle 6: Häufigkeit der ST aller drei Mutter-Kind-Paare und der Personalstämmen mit Eigenschaften

Sequenz- typ	Häufigkeit M-K-Paare	Häufigkeit Personal	<i>icaA</i>	<i>mecA</i>
2	1x	7x	+/-	-
3	4x	5x	+/-	+
7		1x	+	+
8	1x		+	-
18		1x	+	+
27	1x		+	+
28		1x	+	+
34		2x	+/-	+
36	1x		-	-
37	5x		-	+
43	2x	5x	-	-
44		1x	-	-
53		2x	-	+
100		1x	-	+
101		2x	-	+
102		1x	-	+
103		1x	-	-
199	1x		-	-
200	2x		+	-
201	1x		+	-
202	1x		+	-
203	4x		+	+
204	1x		+	+
205	1x		-	-
206	1x		-	-
207	1x		-	+

ST-Sequenztyp, - negativ, + positiv, +/- je nach Untersuchung negativ o. positiv

In dieser Studie gingen sowohl bei den Personalstämmen als auch bei den Mutter-Kind-Paaren viele Stämme vom Komplex ST2 aus, der von Kozitskaya et al. und Wisplinghoff et al. als eine genetische Hauptlinie von *S. epidermidis* beschrieben wird (vgl. Abbildung 8). ST2, ST3 und ST43 kamen mehrfach bei den Personalstämmen und bei den Mutter-Kind-Paaren vor. Bei den Mutter-Kind-Paaren kam zudem ein neuer Stamm, ST203, der das *icaA*- und das *mecA*-Gen besitzt, vier Mal vor. Dieser Stamm ist engverwandt mit ST27, der häufig in Krankenhäusern

isoliert wurde und für viele Infektionen verantwortlich zu sein scheint (Kozitskaya et al. 2005; Schoenefelder et al. 2010, Weisser et al. 2010). Beim Personal wurden die Stämme ST27 und ST203, die ein relativ hohes Virulenzpotential besitzen, jedoch nicht isoliert.

3.2 Die Mutter-Kind-Paare im Längsschnitt

Hier folgt nun eine Übersicht über die einzelnen Mutter-Kind Paare.

3.2.1 Mutter-Kind-Paar I

Im Folgenden soll zunächst ein kurzer Überblick über die klinische Situation des Mutter-Kind Paares vor allem im Hinblick auf Zeichen einer Kathetersepsis gegeben werden.

3.2.1.1 Klinik

Die Patientin wurde als 1. Kind einer I. Gravida mit einem Gestationsalter von 26 + 3 SSW durch *Sectio caesarea* geboren. Die Schwangerschaft verlief bis dahin unauffällig. Zwei Tage vor der Entbindung erfolgte bei Verdacht auf eine Uterusruptur die stationäre Aufnahme der Mutter. Nach zunächst abwartendem Verhalten führte man deshalb die *Sectio caesarea* durch. Das Geburtsgewicht des Frühgeborenen betrug 1040 g, die Körperlänge 35 cm, der Kopfumfang 25 cm. Die Patientin erhielt eine primäre intravenöse antibiotische Therapie mit Ampicillin und Gentamicin unmittelbar nach der Geburt.

Am 17. Lebenstag wurde bei der Patientin der zentrale Venenkatheter (ZVK) entnommen. An der ZVK-Spitze fand sich *S. epidermidis*. Im Antibiogramm stellte man eine Sensibilität auf Cotrimoxazol und Vancomycin fest. Ebenso fand man in der Blutkultur am 20. Lebenstag *S. epidermidis*, der auf Cotrimoxazol, Vancomycin und Levofloxacin sensibel war. Die Blutkultur wurde angelegt, da es bei der Patientin zu einer Infektion mit klinisch deutlicher Verschlechterung mit massiv geblähtem Abdomen und einmaligem Absetzen von Blut im Stuhl kam. Laborchemisch zeigte sich ein erhöhter CRP-Wert. Es erfolgte eine antibiotische Therapie mit Cefotaxim, Vancomycin und Metronidazol für 10 Tage. In der Stuhlprobe vom 20. Lebenstag fand man *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus faecalis* und *S. epidermidis*. Unter

3 Ergebnisse

Einbezug der Klinik stellt sich die Frage, ob bei dem Frühgeborenen eine nekrotisierende Enterokolitis bestand oder ob die klinischen Symptome allein von einer Sepsis mit *S. epidermidis* herrührten.

3.2.1.2 Spezies mit Eigenschaften Mutter-Kind-Paar I

In Tabelle 7: Spezies Mutter-Kind-Paar I sieht man die verschiedenen Bakterienspezies der Mutter und des Frühgeborenen mit Eigenschaften im Verlauf.

Tabelle 7: Spezies Mutter-Kind-Paar I

Stamm	Tag	Spezies (16S RNA)	ST	Koagulase	Biofilm	<i>icaA</i>	<i>mecA</i>
M 1a	1	<i>S.hominis</i>		-	-	-	-
M 1b	3	<i>S.hominis</i>		-	-	-	-
M 1c	7	<i>S.hominis</i>		-	-	-	-
M 1d	14	<i>S.hämolyticus</i>		-	-	-	-
M 1e	21	<i>S.epidermidis</i>	ST8	-	+/-	+	-
M 1f	28	<i>S.epidermidis</i>	ST2	-	+	+	-
M 1g	35	<i>S.epidermidis</i>	ST199	-	+/-	-	-
M 1h	42	<i>S.epidermidis</i>	ST 6	-	-	-	-
M1 i (k)	49	<i>S.epidermidis</i>	ST43	-	-	-	-
M1 i (g)	49	<i>Enterococcus faecalis</i>		-		-	-
M1 j (k)	56	<i>S.epidermidis</i>	?	-	-	-	-
M1 j (g)	56	<i>S.hominis</i>		-	-	-	-
K 1a	1	<i>S.epidermidis</i>	ST200	-	+	+	-
K 1b	3	<i>S.epidermidis</i>	ST201	-	-	+	-
K 1c (k)	7	<i>S.epidermidis</i>	ST202	-	+/-	+	-
K 1c (g)	7	<i>S.aureus</i>		+			
K 1d	14	<i>S.epidermidis</i>	ST203	-	-	+	+
K 1e	21	<i>S.epidermidis</i>	ST3	-	-	+	+
K 1f	28	<i>S.epidermidis</i>	ST203	-	-	+	+
K 1g (k)	35	<i>S.epidermidis</i>	ST43	-	-	-	-
K 1g (g)	35	<i>Enterococcus faecalis</i>		-			
K 1i	49	<i>S.epidermidis</i>	ST204	-	-	+	+
K 1j	56	<i>S.epidermidis</i>	ST3	-	-	+	+

M-Mutter; K-Kind; a,b,c,...Tag; (g,k)-Koloniegröße; - negativ; + positiv; +/- schwache Biofilmbildung

3 Ergebnisse

3.2.1.3 MLST

In Tabelle 8 wird das MLST-Profil der *S. epidermidis*-Isolate von Mutter-Kind-Paar I dargestellt.

Tabelle 8: MLST-Profil Mutter-Kind Paar I

Stamm	<i>arc</i>	<i>aroE</i>	<i>glpk</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqi</i>	ST
M 1e	1	2	3	1	1	1	1	ST8
M 1f	1	1	3	1	1	1	1	ST2
M 1g	1	1	3	1	1	1	10	ST199
M 1h	1	1	3	1	1	5	1	ST36
M 1i (k)	2	1	3	2	1	1	1	ST43
M 1j (k)	12	?	200	6	2	5	14	?
K 1a	1	1	3	1	200	1	16	ST200
K 1b	1	1	1	1	200	1	16	ST201
K 1c (k)	1	1	3	2	200	1	16	ST202
K 1d	7	1	3	1	7	1	200	ST203
K 1e	1	1	3	1	2	1	1	ST3
K 1f	7	1	3	1	7	1	200	ST203
K 1g (k)	2	1	3	2	1	1	1	ST43
K 1i	1	1	1	2	7	1	1	ST204
K 1j	1	1	3	1	2	1	1	ST3

Insgesamt wurden hier fünf neue Sequenztypen entdeckt: ST199, ST200, ST201, ST202 und ST203. Zudem traten drei neue Allele auf: zum einen von *glpk* bei dem Isolat M1j. Bei diesem Sequenztyp ließ sich jedoch für das Allel *aroE* trotz mehrfacher Wiederholung kein eindeutiges PCR Signal gewinnen, so dass hier letztendlich kein Sequenztyp bestimmt werden konnte. Zum anderen fanden sich bei den Isolaten K1a, K1b und K1c das neue Allel 200 bei *pta*. Aus der unterschiedlichen Zusammensetzung der restlichen Sequenztypen ergaben sich jedoch wieder drei neue Sequenztypen. Bei K1d trat für *yqi* ein neues Allel auf (vgl. neue Allele, Anhang)

3.2.1.4 Antibiotikaresistenzen

In Abbildung 9 sieht man die Antibiotikaresistenzen der verschiedenen Isolate von Mutter und Kind im Vergleich. Hierbei fällt auf, dass die sechs Isolate der Mutter

3 Ergebnisse

wesentlich weniger Resistenzen aufweisen als die zehn Isolate des Kindes. Bei der Mutter fanden sich zwei Isolate, die gegen ein Antibiotikum resistent sind und vier, die gegen zwei Antibiotika resistent sind. Bei dem Kind traten ausschließlich multiresistente Isolate auf. Zwei waren gegen zwei Antibiotika resistent, zwei gegen drei, vier gegen vier und eines jeweils gegen fünf und sechs Antibiotika.

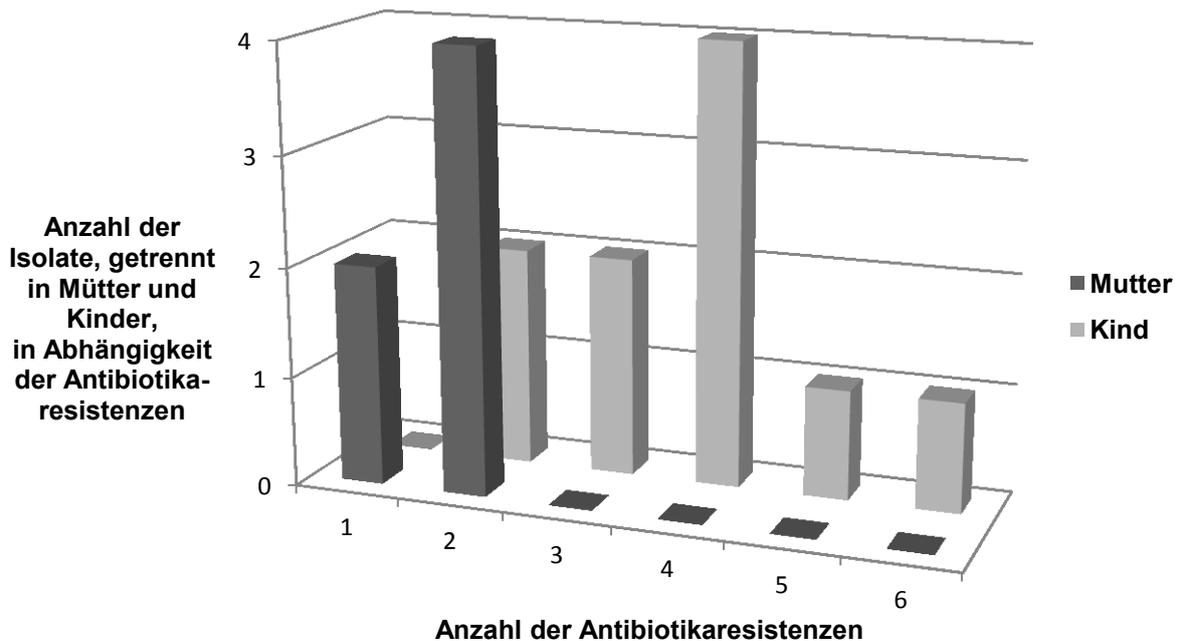


Abbildung 9: Antibiotikaresistenzen – Mutter und Kind im Vergleich

Das *mecA*-Gen konnte man bei keinem der sechs *S. epidermidis* Isolate der Mutter nachweisen, jedoch bei fünf der neun *S. epidermidis* Isolate beim Kind (56%).

In Tabelle 9 sind die Resistenzen auf die sechs getesteten Antibiotika sowie der Nachweis des *mecA*-Gens dargestellt.

Tabelle 9: Antibiotikaresistenzen Mutter-Kind-Paar I

Stamm	Spezies	TE	E	CN	P	CIP	C	<i>mecA</i>
M 1a	<i>S.hominis</i>	-	+	-	-	-	+	-
M 1b	<i>S.hominis</i>	+	(+)	-	+	-	+	-
M 1c	<i>S.hominis</i>	+	+	-	+	-	-	
M 1d	<i>S.hämolyticus</i>	-	+	-	+	-	-	-
M 1e	<i>S.epidermidis</i>	-	+	-	-	-	-	-
M 1f	<i>S.epidermidis</i>	-	+	-	-	-	-	-
M 1g	<i>S.epidermidis</i>	-	+	-	-	-	-	-
M 1h	<i>S.epidermidis</i>	-	+	-	(+)	-	-	-
M 1i (k)	<i>S.epidermidis</i>	-	+	-	+	-	-	-
M 1i (g)	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+	-	+	-	-	-
M 1j (k)	<i>S.epidermidis</i>	+	+	-	-	-	-	-
M 1j (g)	<i>S.hominis</i>	-	+	-	-	-	-	-
K 1a	<i>S.epidermidis</i>	(+)	+	-	+	-	(+)	-
K 1b	<i>S.epidermidis</i>	(+)	+	-	+	-	-	-
K 1c (k)	<i>S.epidermidis</i>	(+)	-	-	+	-	-	-
K 1c (g)	<i>S.aureus</i>	-	+	-	+	-	-	
K 1d	<i>S.epidermidis</i>	(+)	+	+	+	-	-	+
K 1e	<i>S.epidermidis</i>	(+)	+	+	+	+	(+)	+
K 1f	<i>S.epidermidis</i>	(+)	+	+	+	-	-	+
K 1g (k)	<i>S.epidermidis</i>	(+)	-	-	+	-	(+)	-
K 1i	<i>S.epidermidis</i>	(+)	+	+	+	+	-	+
K 1j	<i>S.epidermidis</i>	(+)	+	+	+	-	-	+

- sensibel, + resistent, (+) intermediär, TE-Tetracyclin, E-Erythromycin, CN-Gentamicin, P-Penicillin, CIP-Ciprofloxacin, C-Chloramphenicol

3.2.1.5 Biofilmbildung und *icaA*-Präsenz

Zwei von sechs Isolaten der Mutter (33%) wiesen im Adhärenzassay eine starke Biofilmbildung auf, wohingegen bei den Isolaten des Kindes nur zwei von neun Isolaten (22%) schwach adhären waren. Bei der Präsenz des *icaA*-Gens verhielt es sich gerade umgekehrt. Es waren mehr Isolate beim Kind *icaA* positiv als bei der Mutter. Bei der Mutter waren die beiden Isolate, die eine starke Biofilmbildung aufwiesen, auch *icaA* positiv und die nicht adhären *icaA* negativ. Beim Kind war

3 Ergebnisse

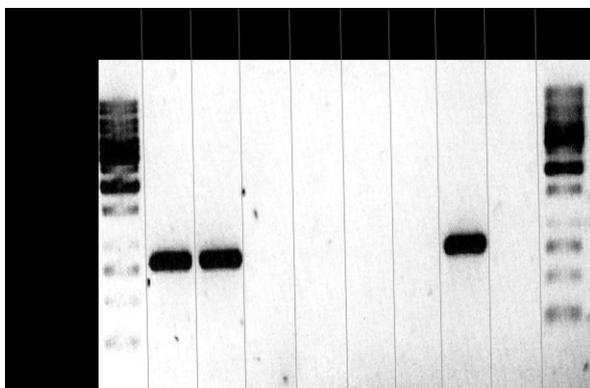
nur eines von neun Isolaten (11%) *icaA* negativ (vgl. Tabelle 10: Biofilmbildung und Präsenz des *icaA*-Gens Mutter-Kind-Paar I (links Mutter, rechts Kind)).

Tabelle 10: Biofilmbildung und Präsenz des *icaA*-Gens Mutter-Kind-Paar I (links Mutter, rechts Kind)

Stamm	Adhärenz-assay	<i>icaA</i>
M 1e	stark adhärent	+
M 1f	stark adhärent	+
M 1g	schwach adhärent	-
M 1h	nicht adhärent	-
M 1i (k)	nicht adhärent	-
M 1j (k)	nicht adhärent	-

Stamm	Adhärenz-assay	<i>icaA</i>
K 1a	schwach adhärent	+
K 1b	nicht adhärent	+
K 1c	schwach adhärent	+
K 1d	nicht adhärent	+
K 1e	nicht adhärent	+
K 1f	nicht adhärent	+
K 1g (k)	nicht adhärent	-
K 1i	nicht adhärent	+
K 1j	nicht adhärent	+

In Abbildung 10 und Abbildung 11 ist die *icaA*-PCR von Mutter-Kind-Paar I dargestellt.



- 1 1 kb DNA ladder
- 2 M 1e
- 3 M 1f
- 4 M 1g
- 5 M 1h
- 6 M 1i (k)
- 7 M 1j (k)
- 8 Positiv-Kontrolle RP 62A
- 9 Negativ-Kontrolle
- 10 1 kb DNA ladder

Abbildung 10: *icaA*-PCR Mutter-Kind-Paar I, Mutter

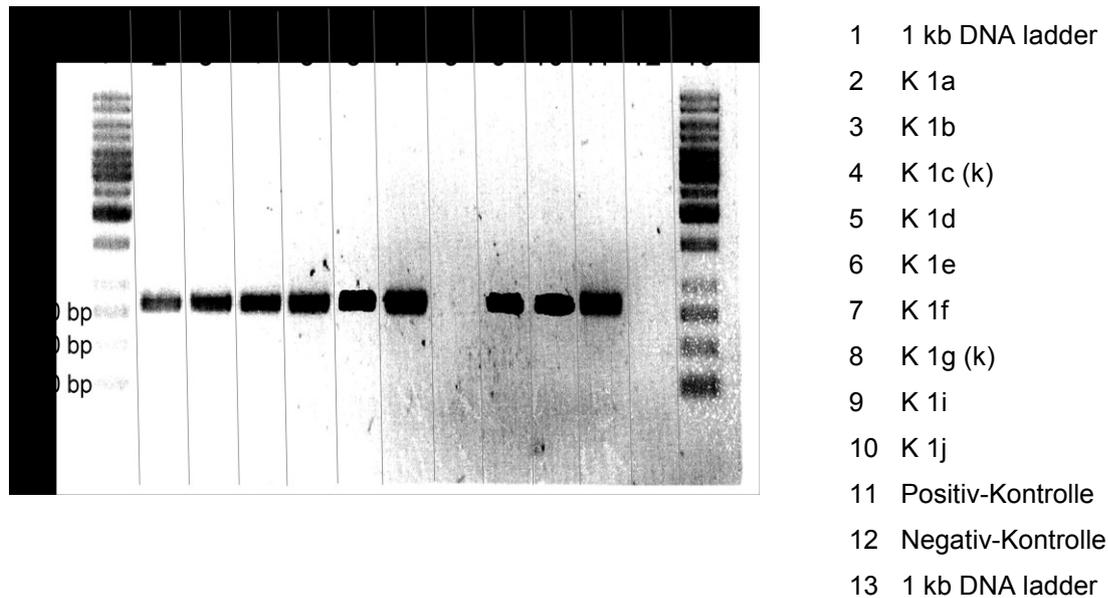


Abbildung 11: *icaA*-PCR Mutter-Kind Paar I, Kind

3.2.2 Mutter-Kind-Paar II

3.2.2.1 Klinik

Die klinische Situation dieses Mutter-Kind-Paares kann man wie folgt beschreiben:

Bei der Mutter, einer III. Gravida, bestand eine Geminigravidität. Während der Gravidität entwickelte die Patientin ein mediastinales B-Zelllymphom, das eine umgehende Bestrahlung erforderte. Aufgrund dieser Diagnose bei massiver klinischer Verschlechterung der Patientin entschied man sich zur Sectio caesarea. Die Zwillinge wurden mit einem Gestationsalter von genau 26 Schwangerschaftswochen durch Sectio caesarea entbunden.

Das Geburtsgewicht des 1. Zwillings betrug 770 g, die Körperlänge 30 cm, der Kopfumfang 23,5 cm. Initial erhielt die Patientin eine antibiotische Therapie mit Gentamicin und Ampicillin für 10 Tage. Am 3. Lebenstag entwickelte die Patientin einen drainagepflichtigen Pneumothorax rechts. Am 9. Lebenstag konnte man bei der Patientin im Trachealsekret massenhaft Koagulase-negative Staphylokokken nachweisen, ebenso an der Tubusspitze und an der Pleuraindrainagespitze. Die ZVK-Spitzen waren jedoch steril.

3 Ergebnisse

Der 2. Zwilling wog 780g, war 33 cm groß, der Kopfumfang betrug 23 cm. Initial erfolgte eine antibiotische Behandlung mit Ampicillin und Gentamicin für insgesamt 10 Tage. Am 15. Lebenstag entwickelte die Patientin vermehrt Apnoen mit CO₂-Retention bei klinisch reduziertem Allgemeinzustand. Unter dem Verdacht auf eine Kathetersepsis wurde der ZVK entfernt und eine antibiotische Therapie mit Vancomycin und Cefotaxim für 7 Tage begonnen. An der Katheterspitze fand sich *S. epidermidis*, ebenso in der Blutkultur, die am 15. Lebenstag entnommen wurde. Der Erreger war auf alle getesteten Antibiotika bis auf Vancomycin und Cotrimoxazol resistent.

3.2.2.2 Spezies mit Eigenschaften Mutter-Kind-Paar II

In Tabelle 11 sieht man die Bakterienspezies von Mutter und Kind im Verlauf.

Tabelle 11: Spezies Mutter-Kind-Paar II

Stamm	Tag	Spezies	ST	Biofilm	<i>icaA</i>	<i>mecA</i>
M 23c	7	<i>S.epidermidis</i>	ST206	-	-	-
K 23.1c	7	<i>S.epidermidis</i>	ST207	-	-	+
K 23.1d	14	<i>S.epidermidis</i>	ST37	-	-	+
K 23.1e	21	<i>S.epidermidis</i>	ST27	+	+	+
K 23.1f	28	<i>S.epidermidis</i>	ST37	-	-	+
K 23.1g	35	<i>Enterococcus faecalis</i>		-		
K 23.2 Iso		<i>S.epidermidis</i>	ST3	-	-	+
K 23.2c	7	<i>S.haemolyticus</i>		-		
K 23.2d	14	<i>S.epidermidis</i>	ST37	-	-	+
K 23.2e (k)	21	<i>S.epidermidis</i>	ST3	-	-	+
K 23.2e (g)	21	<i>S.hominis</i>		-		
K 23.2f	28	<i>S.haemolyticus</i>		-		
K 23.2g	35	<i>S.epidermidis</i>	ST37	-	-	+

Bei dem 2. Zwilling fand sich ein Isolat von der ZVK-Spitze, das den gleichen Sequenztyp, nämlich ST3, aufweist, wie ein Isolat des Hautabstrichs des 2. Geminus.

3.2.2.3 MLST-Profil

Bei Mutter-Kind-Paar II fand man ein neues Allel für *gmk*. Daraus ergab sich der neue ST207, der eng verwandt mit ST37 ist, der bei diesem Mutter-Kind-Paar

3 Ergebnisse

ebenfalls des Öfteren isoliert werden konnte. Ein neuer ST trat zudem bei M 23c auf. Hier waren jedoch schon alle Allele bekannt (vgl. Tabelle 12).

Tabelle 12: MLST Profil Mutter-Kind-Paar II

Stamm	<i>arc</i>	<i>aroE</i>	<i>glpk</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqi</i>	ST
M 23c	16	1	3	1	1	1	1	ST206
K 23.1c	1	1	3	200	7	1	1	ST207
K 23.1d	1	1	3	2	7	1	1	ST37
K 23.1e	7	1	3	1	1	1	1	ST27
K 23.1f	1	1	3	2	7	1	1	ST37
K 23.2 Iso	1	1	3	1	2	1	1	ST3
K 23.2d	1	1	3	2	7	1	1	ST37
K 23.2e	1	1	3	1	2	1	1	ST3
K 23.2g	1	1	3	2	7	1	1	ST37

3.2.2.4 Antibiotikaresistenzen

Die neun *S. epidermidis* Isolate wiesen folgende Resistenzraten gegen die verschiedenen Antibiotika auf: 11% der Isolate waren gegen Tetracyclin resistent, 89% gegen Erythromycin, 89% gegen Gentamicin, 22% gegen Ciprofloxacin, gegen Penicillin waren alle *S. epidermidis* Isolate resistent. Bei Chloramphenicol fand man keine Resistenzen (vgl. Tabelle 13).

Tabelle 13: Antibiotikaresistenzen Mutter-Kind-Paar II

Stamm	Spezies	TE	E	CN	P	CIP	C	mecA
M 23c	<i>S.epidermidis</i>	-	-	-	+	-	-	-
K 23.1c	<i>S.epidermidis</i>	-	+	+	+	-	-	+
K 23.1d	<i>S.epidermidis</i>	-	+	+	+	-	-	+
K 23.1e	<i>S.epidermidis</i>	+	+	+	+	-	-	+
K 23.1f	<i>S.epidermidis</i>	-	+	+	+	-	-	+
K 23.1g	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	(+)	+	+	-	-	
K 23.2 Iso	<i>S.epidermidis</i>	-	+	+	+	+	-	+
K 23.2c	<i>S.hämolyticus</i>	-	+	+	+	+	-	
K 23.2d	<i>S.epidermidis</i>	-	+	+	+	-	-	+
K 23.2e (k)	<i>S.epidermidis</i>	-	+	+	+	+	-	+
K 23.2e (g)	<i>S.hominis</i>	+	+	-	-	-	-	
K 23.2f	<i>S.hämolyticus</i>	-	+	+	+	+	-	
K 23.2g	<i>S.epidermidis</i>	-	+	+	+	-	-	+

Da bei diesem Mutter-Kind-Paar nur ein Isolat der Mutter vorliegt, fällt es schwer, einen Vergleich zwischen Mutter und Kindern zu ziehen. Jedoch kann man auch hier beobachten, dass das eine Isolat der Mutter nur gegen Penicillin resistent ist, wohingegen die Isolate des Kindes alle multiresistent sind.

Auch das *mecA*-Gen ist bei dem Isolat der Mutter nicht nachweisbar, tritt aber bei allen *S. epidermidis* Isolaten der Kinder, sowie dem klinischen Isolat der Katheterspitze auf. In Abbildung 12 ist die PCR-Reaktion von *mecA* dargestellt.

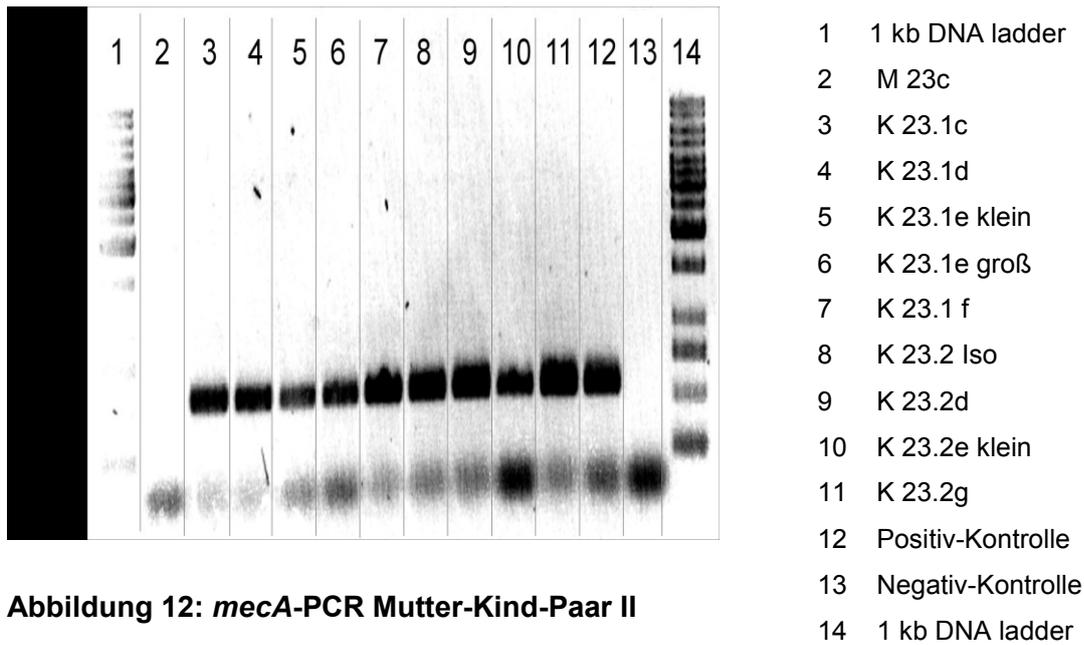


Abbildung 12: *mecA*-PCR Mutter-Kind-Paar II

3.2.2.5 Biofilmbildung und *icaA*-Präsenz

Nur ein Stamm wies das *icaA*-Gen auf und zeigte im Adhärenzassay auch eine entsprechend starke Biofilmbildung. Bei diesem Stamm handelt es sich um den Sequenztyp 27, der als starker Biofilmbilder bekannt ist. Dieser trat bei dem Isolat K 23.1e auf, das vom 1. Geminus stammt. Alle anderen Stämme bei Mutter-Kind-Paar II waren *icaA* negativ und bildeten entsprechend keinen Biofilm (vgl. Tabelle 14).

Tabelle 14: Biofilmbildung und *icaA*-Präsenz Mutter-Kind-Paar II

Stamm	Adhärenzassay	<i>icaA</i>
M 23c	nicht adhärent	-
K 23.1c	nicht adhärent	-
K 23.1d	nicht adhärent	-
K 23.1e	stark adhärent	+
K 23.1f	nicht adhärent	-
K 23.2 Iso	nicht adhärent	-
K 23.2d	nicht adhärent	-
K 23.2e (k)	nicht adhärent	-
K 23.2g	nicht adhärent	-

3.2.3 Mutter-Kind Paar-III

3.2.3.1 Klinik

Wegen Gestose und Hypertonus erfolgte einen Tag vor der Entbindung die stationäre Aufnahme der Schwangeren in der 27. SSW. Bei pathologischem CTG und beginnenden pathologischen Dopplerflüssen ergab sich die Indikation zur Sectio caesarea. Eine kindliche Retardierung war pränatal bekannt.

Die Patientin wurde als 1. Kind einer I. Gravida mit einem Gestationsalter von 26 Wochen und 6 Tagen durch Sectio caesarea entbunden. Das Geburtsgewicht betrug 550 g, die Körperlänge 30 cm und der Kopfumfang 21,5 cm. Auch diese Patientin erhielt initial Ampicillin und Gentamicin für 7 Tage. Am 12. Lebenstag entwickelte die Patientin eine Kathetersepsis mit Nachweis von *S. epidermidis* an der Katheterspitze und in der Blutkultur. Die Entzündungszeichen waren deutlich erhöht, es bestand kein Hinweis auf eine Meningitis. Unter antibiotischer Therapie mit Cefotaxim, Vancomycin und Gentamicin fanden sich rückläufige Infektparameter, der klinische Zustand besserte sich allmählich.

Am 22. Lebenstag ergab sich erneut der Verdacht auf eine nosokomiale Infektion. Es traten gehäuft Apnoen und Bradykardien bei gräulichem Hautkolorit auf. Der ZVK wurde entfernt und eine antibiotische Therapie mit Meropenem und Netilmycin begonnen. In der Blutkultur und an der Katheterspitze wurde *S. hämolyticus* nachgewiesen.

3 Ergebnisse

3.2.3.2 Spezies mit Eigenschaften Mutter-Kind-Paar III

Tabelle 15 zeigt die verschiedenen Spezies von Mutter-Kind-Paar III:

Tabelle 15: Spezies Mutter-Kind-Paar III

Stamm	Tag	Spezies	ST	Koagulase	Biofilm	<i>icaA</i>	<i>mecA</i>
M 30b	3	<i>S.epidermidis</i>	ST205	-	-	-	-
M 30c	7	<i>S.epidermidis</i>	ST200	-	+	+	-
K 30b	3	<i>S.epidermidis</i>	ST37	-	-	-	+
K 30c	7	<i>S.epidermidis</i>	ST203	-	-	+	+
K 30d	14	<i>S.haemolyticus</i>		-	-		
K 30e	28	<i>S.haemolyticus</i>		-	-	-	+
K 30 Iso	12	<i>S.epidermidis</i>	ST203	-	-	+	+

3.2.3.3 MLST-Profil

Bei diesem Mutter-Kind-Paar traten drei neue Sequentypen auf. ST200 und ST203 konnten schon bei Mutter-Kind-Paar I gefunden werden. Man sieht, dass der Sequenztyp von K 30c, also ST 203, derselbe wie im klinischen Isolat ist. Bei dem neuen ST205 konnte ein bisher unbekanntes Allel für *arcC* gefunden werden.

Tabelle 16: MLST-Profil Mutter-Kind-Paar III

Stamm	<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>glpk</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqi</i>	ST
M 30b	200	1	3	1	1	1	1	ST205
M 30c	1	1	3	1	200	1	16	ST200
K 30b	1	1	3	2	7	1	1	ST37
K 30c	7	1	3	1	7	1	200	ST203
K30 Iso	7	1	3	1	7	1	200	ST203

3.2.3.4 Antibiotikaresistenzen

Das *mecA*-Gen fand man bei keinem der Isolate der Mutter, jedoch bei den beiden Isolaten des Kindes sowie bei dem klinischen Isolat der Katheterspitze. Die beiden Isolate der Mutter wiesen deutlich weniger Resistenzen als die Isolate des Frühgeborenen auf (vgl. Tabelle 17).

Tabelle 17: Antibiotikaresistenzen Mutter-Kind-Paar III

Stamm	Spezies	TE	E	CN	P	CIP	C	<i>mecA</i>
M 30b	<i>S.epidermidis</i>	-	-	-	+	-	-	-
M 30c	<i>S.epidermidis</i>	+	-	-	+	-	-	-
K 30b	<i>S.epidermidis</i>	(+)	+	+	+	-	-	+
K 30c	<i>S.epidermidis</i>	-	+	+	+	-	-	+
K 30d	<i>S. hämolyticus</i>	-	+	+	+	+	-	
K 30e	<i>S. hämolyticus</i>	-	+	+	+	+	-	+
K 30 Iso	<i>S.epidermidis</i>	(+)	+	+	+	-	-	+

3.2.3.5 Biofilmbildung und *icaA*-Präsenz

Auch hier ergibt sich eine Diskrepanz zwischen der phänotypischen Ausbildung des Biofilms und dem Vorhandensein des *icaA*-Gens. So besitzen die Isolate K 30c sowie das Isolat der Katheterspitze, K 30 Iso, das *icaA*-Gen, zeigen aber im Adhärenzassay keine Biofilmbildung. Die Stämme, die *icaA* nicht aufweisen, bilden auch keinen Biofilm. Nur ein *icaA*-positives Isolat bildet einen schwachen Biofilm (vgl. Tabelle 18).

Tabelle 18: Biofilmbildung und *icaA*-Präsenz Mutter-Kind Paar III

Stamm	Adhärenzassay	<i>icaA</i>
M 30b	nicht adhärent	-
M 30c	schwach adhärent	+
K 30b	nicht adhärent	-
K 30c	nicht adhärent	+
K 30 Iso	nicht adhärent	+

4 Diskussion

4.1 Epidemiologie von *S. epidermidis*-Stämmen

Am häufigsten wurde in dieser Studie bei Müttern und Kindern die Spezies *S. epidermidis* isoliert. Staphylokokken sind als Erreger nosokomialer Infektionen in der Neonatologie sehr häufig anzutreffen. *S. epidermidis* zeichnet sich im Vergleich zu *S. aureus* durch wenige Virulenzfaktoren und Toxine, jedoch durch eine hohe Resistenzrate und die Fähigkeit zur Biofilmbildung aus (Götz, F. 2002; Rupp, M. E., und Archer, G. L. 1994; Iandolo 1989; Projan und Novick 1997). Zur Virulenz von *S. aureus* tragen verschiedene Komponenten der Zelloberfläche sowie extrazelluläre Proteine und Toxine bei (Iandolo 1989; Projan und Novick 1997). Man konnte bisher insgesamt über 40 verschiedene virulenzassoziierte, extrazelluläre und oberflächenassoziierte Proteine identifizieren. Die hohe Resistenzrate und die Fähigkeit zur Biofilmbildung tragen dazu bei, dass KoNS wichtige nosokomiale Erreger auf neonatologischen Intensivstationen darstellen, wie verschiedene Studien in der Vergangenheit nahelegten (Kashu et al. 2006, Weisman 2004, Raimundo et al. 2007; Villari et al. 2000).

Beispielsweise isolierte die Arbeitsgruppe von Raimundo et al. in einer Studie KoNS aus dem Blut Frühgeborener auf einer neonatologischen Intensivstation in Australien. Hierbei waren die häufigsten Erreger *S. epidermidis*, gefolgt von *S. hämolyticus* und *S. warneri*. Diese Erreger zeichneten sich vor allem durch Multiresistenzen aus, häufig konnte das *mecA*-Gen nachgewiesen werden (Raimundo et al. 2007).

Villari et al. wiederum beobachteten über einen Zeitraum von drei Jahren das Vorkommen von nosokomialen Infektionen auf einer neonatologischen Intensivstation in Italien, wobei *S. epidermidis* am häufigsten als Erreger gefunden wurde, gefolgt von *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae* und *Candida albicans*. Am häufigsten verursachte *S. epidermidis* hierbei eine Sepsis, an zweiter Stelle standen Hautinfektionen. Auch einige Fälle von Meningitis wurden durch *S. epidermidis* verursacht (Villari et al. 2000).

Dabei konnte zudem beobachtet werden, dass die mittlere Verweildauer in diesen 3 Jahren bei nosokomialen Infektionen, die durch *S. epidermidis* verursacht wurden,

langsam anstieg, wohingegen sie bei anderen nosokomialen Erregern abnahm (Villari et al. 2000). Dies kann man als Hinweis auf die zunehmende Virulenz von *S. epidermidis* werten.

In unserer Studie wurden bei den Frühgeborenen (VLBW) in Zusammenhang mit einer Infektion Fremdkörper, wie z.B. Katheterspitzen entfernt und mikrobiologisch untersucht. Das klinische Isolat der Katheterspitze des Neugeborenen bei Mutter-Kind-Paar III wies den Sequenztyp ST203 auf. Dieser wurde am 7. Lebenstag auch schon im Axillaabstrich des Frühgeborenen nachgewiesen. Auch bei Mutter-Kind-Paar II wurde beim zweiten Geminus mit Sequenztyp ST3 ein Isolat nachgewiesen, das bereits am 21. Lebenstag im Abstrich des Frühgeborenen gefunden worden war. Man erkennt somit, dass ein Zusammenhang besteht zwischen dem Auftreten des Sequenztyps im Hautabstrich und dem Nachweis im klinischen Isolat. ST3 wurde beim Personal dreimal gefunden, wohingegen die Abstriche der Mütter diese beiden Sequenztypen nicht aufwiesen (vgl. Tabelle 8, Tabelle 12, Tabelle 16 und Tabelle 19). Dieser Zusammenhang macht wahrscheinlich, dass eine Übertragung der Stämme vom Personal auf die Frühgeborenen stattfand und sogar eine Infektion verursacht haben könnte. Letztendlich kann man jedoch keine sichere Aussage darüber treffen, woher die Stämme, die die Frühgeborenen besiedeln, wirklich kommen, da die Zahl der untersuchten Personen für entsprechende Aussagen zu gering ist und in den Abstrichen sehr wahrscheinlich auch nicht alle vorkommenden Sequenztypen isoliert wurden, sofern eine Besiedelung mit mehreren Sequenztypen bestand. Diese Problematik wird im Abschnitt 4.2 näher beschrieben.

4.2 MLST

Das Multilocus-Sequence-Typing (MLST) stellt eine Methode dar, um verwandtschaftliche Beziehungen zwischen verschiedenen Staphylokokken-Spezies zu untersuchen. Diese Technik basiert auf der Sequenzanalyse von sieben hochkonservierten Genen (*Housekeeping*-Gene), die innerhalb der Isolate der Erregerspezies stabil sind, jedoch innerhalb der gesamten Speziespopulation eine ausreichende Diversität aufweisen (Aanensen und Spratt, 2005; Hanage et al., 2004; Maiden, 1998).

In der Vergangenheit wurde als Goldstandard zur Untersuchung der verschiedenen Staphylokokken-Spezies die Pulsfeld-Gelelektrophorese verwendet. Hierbei besteht jedoch das Problem, dass keine weltweite Datenbank existiert, bei der die Stämme untereinander über einen längeren Zeitraum verglichen werden können.

Eine weitere Typisierungsmethode, die in den letzten Jahren zur Erforschung der molekularen Epidemiologie von Methicillin-resistenten *S. epidermidis*-Stämmen herangezogen wurde, ist die Typisierung der SCC*mec*-Elemente, die das *mecA*-Gen tragen (Miragaia et al. 2008).

Für *S. epidermidis* gibt es bis jetzt einige Studien, die als Typisierungsmethode das MLST angewendet haben (Kozitskaya et al., 2005; Wang et al., 2003; Wisplinghoff et al., 2003; Thomas et al., 2007, Miragaia et al. 2008). Dabei sequenzierte die Arbeitsgruppe um Wang et al. (2003) die sieben *Housekeeping*-Gene *aroE*, *gmk*, *pta*, *tpiA*, *yqiL* und *heat-shock* Protein (*hsp*) klinischer *S. epidermidis*-Stämme aus Krankenhäusern verschiedener Regionen, um den Nutzen von MLST als Typisierungsmethode bei Untersuchungen der Diversität von *S. epidermidis* zu evaluieren. Zum Vergleich mit etablierten Typisierungsmethoden wurden die klinischen *S. epidermidis*-Stämme ebenfalls mit der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) untersucht. In der Studie konnte gezeigt werden, dass MLST eine effektive Methode für die Einteilung von *S. epidermidis*-Stämmen in Subtypen ist. Im Vergleich mit anderen Spezies, für die bereits MLST-Schemata entwickelt worden sind, erwies sich MLST jedoch als weniger diskriminierend und daher als alleinige Typisierungsmethode von KoNS als nicht geeignet (Wang et al. 2003).

Das neueste MLST Schema stammt von Thomas et al. Hierbei wurden einige schon bekannte Gene sequenziert. Folgende Gene sind in dem Protokoll enthalten: *arcC*, *aroE*, *tpiA*, *yqiL*, ABC transporter (*gtr*), DNA mismatch repair protein (*mutS*), Pyrimidine operon regulatory protein (*pyrR*). Es werden 31 Sequenztypen unterschieden und man geht dabei von fünf klonalen Komplexen aus (Thomas et al. 2007). Mittlerweile befinden sich 355 Sequenztypen in der Datenbank (www.mlst.net, Website).

Eine weitere Arbeitsgruppe, die mit MLST bei *S. epidermidis* arbeitet, ist die Arbeitsgruppe um Wisplinghoff et al. (2003), die die Prävalenz der

Methicillinresistenz bei klinischen *S. epidermidis*-Stämmen von Patienten mit Herzklappenendokarditis oder Bakteriämie untersuchte. Dabei wurde die Sequenzanalyse der sieben *Housekeeping*-Gene *arcC*, *aroE*, *tpiA*, *yqiL*, *glpK*, *gmk* und *pta* durchgeführt (Wisplinghoff et al. 2003). Hierbei unterschieden sich die Amplifikationsfragmente der Gene *tpi* und *yqi* von denen bei Wang et al. (2003). Die Studie zeigte, dass die Mehrzahl der klinischen Stämme Methicillin-resistent ist und verschiedene SCC*mec*-Typen bei klonal verwandten Sequenztypen als auch bei nicht klonal verwandten Sequenztypen auftreten. Auch die Arbeitsgruppe um Kozitskaya et al. (2005) sequenzierte die bei Wisplinghoff et al. (2003) aufgeführten sieben *Housekeeping*-Gene bei klinischen und kommensalen *S. epidermidis*-Stämmen. Die Stämme, die von erwachsenen Personen stammen, wurden hinsichtlich der Prävalenz des *icaA*- und *mecA*-Gens und des Insertionselementes IS256 sowie deren Zugehörigkeit zu bestimmten Genotypen (Sequenztypen) untersucht. Dabei stellte man fest, dass *ica*-positive und *ica*-negative Stämme von einem gemeinsamen Ausgangsgenotyp abstammen und die meisten der *ica*-positiven Isolate einem einzelnen Sequenztyp angehören, der für die Mehrzahl der untersuchten *S. epidermidis* Infektionen verantwortlich war (Kozitskaya et al. 2005).

Bei Kozitskaya et al. und Wisplinghoff et al. wird der ST2 Komplex als klonaler Komplex beschrieben, der eine genetische Hauptlinie von *S. epidermidis* darstellt (Wisplinghoff et al. 2003, Kozitskaya et al. 2005). In der vorliegenden Studie gehörten die meisten Stämme sowohl bei den Personalstämmen als auch bei den Mutter-Kind-Paaren ebenfalls diesem klonalen Komplex an (vgl. Abbildung 8)

Mehrere Sequenztypen traten mehrfach in dieser Studie bei den Personalstämmen und bei den Stämmen der Mutter-Kind-Paare auf. Dabei handelt es sich um den oben beschriebenen ST2 und davon ausgehend um ST3 und ST43 (vgl. Abbildung 8).

Single locus variants von ST2 sind bei den Mutter-Kind-Paaren folgende Sequenztypen: ST36, ST27, ST3, ST8, darunter 3 neue Sequenztypen: ST199, ST205 und ST206. Dies legt ebenfalls nahe, dass der ST2-Komplex sehr verbreitet ist. Mehrere Studien zeigten, dass dieser klonale Komplex der weltweit häufigste ist (Miragaia et al. 2007, Miragaia et al. 2008, Schönfelder et al. 2010, Thomas et al. 2007, Otto 2009). Gleichzeitig konnte man nachweisen, dass sich *S. epidermidis* durch eine sehr hohe genetische Vielfalt ausweist. Diese wird vermutlich durch

genetische Rekombination und den Erwerb von mobilen genetischen Elementen verursacht (Miragaia 2007 et al., Miragaia et al. 2008, Schönfelder et al. 2010).

Der ST27, der auch eine single locus variant (SLV) von ST2 darstellt, ist durch die Fähigkeit zur Biofilmbildung sowie durch eine hohe Antibiotikaresistenz charakterisiert. Es wird vermutet, dass er sich in Krankenhäusern in Deutschland und auch weltweit ausbreitet und für viele Infektionen verantwortlich ist (Kozitskaya et al. 2005). Er wurde auch in dieser Studie bei dem Isolat K 23.1e nachgewiesen. Bei diesem Isolat K 23.1e handelt es sich um einen Abstrich eines Frühgeborenen. Bei den maternalen Abstrichen kam dieser Sequenztyp nicht vor. Dies wiederum bestätigt die Annahme, dass die nosokomialen Stämme ein höheres Potential besitzen, für immunkomprimierte Personen potenziell gefährlich zu sein, als die kommensalen Stämme. Verantwortlich dafür sind Virulenzfaktoren wie die Fähigkeit zur Biofilmbildung und eine hohe Antibiotikaresistenzrate.

Weiterhin trat bei den Abstrichen der Frühgeborenen mehrmals ein neuer ST auf, der durch *icaA*- und *mecA*-Präsenz ebenfalls eine hohe Virulenz zu besitzen scheint. Dieser ST203 unterscheidet sich in nur 2 Allelen vom ST27 und ist somit eng verwandt mit diesem Sequenztyp. Allerdings trat der ST203 nicht beim Mutter-Kind-Paar II auf, wo ST27 nachgewiesen werden konnte, sondern bei K1 und K 30. Das lässt jedoch auf eine hohe Ausbreitung dieser Sequenztypen im Krankenhaus-Milieu schließen. Beobachtungen legten nahe, dass sich kommensale *icaA*- und *mecA*-negative Stämme von *icaA*- und *mecA*-positiven Isolaten, wie ST27, in Krankenhäusern verdrängen ließen (Weisser et al. 2010, vgl. Abschnitt 4.4.6).

Theoretisch wäre es auch möglich, dass der ST203 nur durch Zufall nicht auch bei Mutter-Kind-Paar II zu finden war. Diese Problematik soll im nachfolgenden Abschnitt verdeutlicht werden.

Da die Abstriche in dieser Studie immer an verschiedenen Tagen in definierten Zeitabständen entnommen wurden, kann man daraus ersehen, ob und wie sich die Besiedlung der Mütter und der Frühgeborenen im Verlauf des Krankenhausaufenthaltes verändert hat. Dabei ergibt sich jedoch folgende methodische Problematik: Von den verschiedenen Abstrichen wurde immer nur eine Kolonie untersucht, da man bisher davon ausging, dass, in Analogie zu *S. aureus*,

die Besiedlung jeweils nur durch einen *S. epidermidis*-Stamm erfolgt. Wenn in einem Abstrich jedoch verschiedene Sequenztypen vorkommen sollten, wurde somit jeweils nur ein Sequenztyp berücksichtigt. Die MLST-Analyse der Isolate ergab bei allen Probanden einen Wechsel des Sequenztypes im Untersuchungszeitraum. Das könnte einerseits tatsächlich mit einer schnellen Veränderung der Besiedlung im Laufe des Krankenhausaufenthaltes erklärt werden. Andererseits ist aber auch eine Nichterfassung eventuell vorhandener verschiedenen Sequenztypen denkbar. Letzteres Szenario wird durch neuere Erkenntnisse gestützt: Bisher unveröffentlichte Ergebnisse aus einer Studie in Pflegeheimen in Nordirland belegen, dass in Nasenabstrichen der Bewohner und des Personals bis zu acht verschiedene *S. epidermidis*-Stämme gleichzeitig vorkommen können (mündliche Information PD Dr. W. Ziebuhr). Diese Ko-Kolonisierung durch verschiedene Staphylokokkenstämme und –spezies war zum Zeitpunkt der Studienplanung noch nicht bekannt und sollte in späteren Untersuchungen unbedingt berücksichtigt werden.

4.3 Antibiotikaresistenzen

Die höchste Resistenzrate bei allen 29 *S. epidermidis* Isolaten wies in dieser Studie bei den 3 Mutter-Kind-Paaren mit Resistenzen bei 24 Isolaten (83%) Penicillin auf (vgl. Abbildung 3). Da die meisten Bakterien sehr schnell Resistenzen gegen Penicillin entwickeln, ist dieses Ergebnis nicht weiter überraschend. Auch bei den untersuchten Personalstämmen waren die meisten Stämme gegen Penicillin resistent (94%) (vgl. Tabelle 19). Bei den meisten Staphylokokken-Stämmen kann man heutzutage Resistenzen auf Grund von β -Lactamase-bildenden Stämmen beobachten. In einer Studie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft wiesen 2007 90% aller *S. epidermidis* Stämme hierbei Resistenzen auf. So scheint es eher überraschend, dass doch noch einige der maternalen *S. epidermidis* Stämme in vitro nicht resistent gegen Penicillin waren. Dahingegen wiesen alle kindlichen Stämme Resistenzen gegen Penicillin auf.

Auch gegen β -Lactamase-stabile Antibiotika wie Methicillin entwickelten sich in der Vergangenheit Resistenzen und diese stellen heutzutage ein großes Problem in Krankenhäusern dar (Kresken et al. 2001). Die Unempfindlichkeit gegenüber Methicillin und Oxacillin beruht auf dem Penicillin-Bindeprotein (PBP2a), welches vom *mecA*-Gen auf einer mobilen genetischen Insel kodiert wird (Wielders et al.

2001; Wu et al. 1996). Man kann davon ausgehen, dass horizontaler Gentransfer zur Verbreitung von Resistenzen unter verschiedenen Staphylokokkenspezies beiträgt (Wiolders et al. 2001; Wu et al. 1996). Dies wiederum belegt die Wichtigkeit strenger Hygienebedingungen in Krankenhäusern vor allem in Bezug auf MRSE (Methicillin-resistenter *S. epidermidis*) bzw. MRSA. Dazu zählt die Händehygiene ebenso wie die Isolierung betroffener Patienten.

In vorliegender Arbeit waren alle *mecA*-positiven Stämme auch gegen Penicillin resistent, was bestätigt, dass bei methicillinresistenten *S. epidermidis* Stämmen Kreuzresistenzen gegen alle β -Lactam-Antibiotika bestehen (Wiolders et al. 2001; Wu et al. 1996).

Bei Infektion durch multiresistente Stämme bleibt noch die Gabe von Reserveantibiotika wie Vancomycin oder Teicoplanin. Doch auch hier entwickelten sich schon erste Resistenzen, allerdings ist der größte Teil aller Koagulase-negativen Staphylokokken - einschließlich der meisten multiresistenten Stämme - gegenüber diesen „klassischen“ Glykopeptiden sensibel (Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. 2007; Singhal et al. 2006). In einer multizentrischen Studie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft von 2007 wurden 15,4% aller *S. epidermidis*-Isolate als Teicoplanin-intermediär und 2,1% als Teicoplanin-resistent bewertet.

Betrachtet man exemplarisch das Mutter-Kind-Paar I wird deutlich, dass die Isolate der Mutter wesentlich weniger Resistenzen aufweisen als die Isolate des Kindes. (vgl. Abbildung 9). Diese Aussage kann man auch für die Mutter-Kind-Paare II und III treffen. Die drei untersuchten Mütter in dieser Studie waren während der Untersuchungen wesentlich kürzer hospitalisiert. So könnten die Frühgeborenen über den Kontakt mit dem Krankenhauspersonal mit den resistenten Hospitalkeimen besiedelt worden sein. Da entsprechend der erwähnten methodischen Problematik (vgl. Abschnitt 4.2) vermutlich nicht alle Sequenztypen, die bei den Müttern vorkamen, berücksichtigt wurden, könnten auch die Mütter mit den resistenten Keimen besiedelt gewesen sein und über Haut-Haut-Kontakt die Keime auf die Kinder übertragen haben. Alternativ könnte auch eine Oberflächenbesiedlung im Krankenhaus verantwortlich sein.

1998 stellte Lowy fest, dass man Bakterien nur genügend Zeit und Antibiotika zur Verfügung stellen müsse, damit sie Resistenzen entwickeln (Lowy 1998). Dies beschreibt den durch Antibiotikagabe erhöhten Selektionsdruck bei Bakterien und die dadurch resultierende Resistenzentwicklung, die häufig über Plasmide vermittelt wird.

Auch in einer Studie von Kozitskaya et al. wurde der Zusammenhang zwischen Resistenzen von *S. epidermidis*-Isolaten, die katheterassoziierte Septitiden und katheter-assoziierte Harnwegsinfekte verursachten, und von kommensalen Isolaten außerhalb des Krankenhausmilieus untersucht (Kozitskaya et al. 2004). Hierbei waren 87% der Blutkultur-Isolate und 45% der Urin-Isolate resistent gegen Gentamicin, wohingegen nur 4% der Kommensalen Resistenzen gegen Gentamicin aufwiesen. Ähnlich sah es bei den Resistenzraten bei Oxacillin aus. Ebenso war das Vorkommen des *icaADBC* Genclusters und der Biofilmbildung bei den Infektionsisolaten wesentlich häufiger als bei den Kommensalen (Kozitskaya et al. 2004). Man kann auch daraus folgern, dass durch Antibiotika-Gabe eine Selektion multiresistenter Krankenhaus-Stämme stattfindet.

4.4 Biofilmbildung

Die genetischen und molekularen Grundlagen der Biofilmbildung bei Staphylokokken sind sehr vielfältig. Die Biofilmbildung erfolgt in zwei Phasen: Zunächst binden die einzelnen Bakterienzellen an eine Polymer-Oberfläche. Die zweite Phase besteht in der Proliferation und Akkumulation der Zellen in vielen Zellschichten. Dies erfordert die Fähigkeit zur interzellulären Adhäsion, sowie die Ausbildung einer, die Bakterienzelle umhüllenden Glykokalyx.

4.4.1 Beobachtungen zur Biofilmbildung in der Studie

Die Präsenz von *icaA* war in dieser Studie nicht immer mit phänotypischer Biofilmbildung assoziiert. Dies betrifft die Mutter-Kind Paare I und III (vgl. Tabelle 10 und Tabelle 18). Insgesamt wiesen hier im Adhärenzassay zwei *icaA* positive Stämme nur eine schwache Biofilmbildung auf und acht waren überhaupt nicht adhärent. Es kam aber nur einmal vor, dass ein *icaA* negativer Stamm im Adhärenzassay einen schwachen Biofilm bildete. Dieses Phänomen konnte man

jedoch in den vorausgegangenen Untersuchungen der Personalstämmen häufiger beobachten (Ch. Ströbele 2005). Bei den Personalstämmen waren drei *icaA*-negative Stämme starke Biofilmbildner und zwei *icaA*-positive Stämme wiesen im Adhärenztest eine schwache Biofilmbildung auf. Der einzige *icaA*-positive Stamm war ein starker Biofilmbildner. Die übrigen Stämme waren *icaA*-negativ und bildeten entsprechend auch keinen Biofilm (vgl. Tabelle 19). Verschiedene Faktoren könnten dafür verantwortlich sein, dass trotz der Präsenz des *icaA*-Gens kein oder nur wenig Biofilm ausgebildet wird oder dass bei *ica*-negativen Stämmen trotzdem Biofilmproduktion auftritt. In vorliegender Studie fiel zudem auf, dass bei den zweimaligen Wiederholungen des Adhärenzassays unter denselben Bedingungen eine unterschiedliche Ausprägung des Biofilms bestand.

Im Folgenden soll auf die Regulation und die verschiedenen Faktoren der Biofilmbildung näher eingegangen werden, wodurch die o.g. Beobachtungen erklärt werden könnten.

4.4.2 Primäre Adhäsion

Die primäre Adhäsion der Biofilmbildung wird durch spezifische und unspezifische Faktoren beeinflusst. Zudem spielen die Eigenschaften der Polymeroberfläche, sowie die Strukturen der Bakterienzellwand eine Rolle (Hogt et al. 1986; Ludwicka et al. 1984). Beim ersten Kontakt der Bakterien mit der Oberfläche sind hydrophobe Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräfte beteiligt (Hogt et al. 1985; Ludwicka et al. 1984). Fremdmaterialien werden nach Implantation oft mit einer Schicht aus körpereigenen Plasmaproteinen, extrazellulären Matrixproteinen oder Thrombozyten überzogen, wobei die Anwesenheit von Fibronectin, Fibrinogen und aktivierten Thrombozyten die Adhäsion der Bakterien begünstigt (Vaudaux et al. 1989; Wang et al. 1993). Es existieren jedoch auch Faktoren, die die primäre Bindung inhibieren können, wie z.B. Serum, Plasma und Albumin (Espersen et al. 1990; Hogt et al. 1985; Vaudaux et al. 1989).

Bisher konnte dem *autolysin protein* AtlE und dem Protein Aae sowie den Proteinen *staphylococcal surface protein* SSP-1 und -2 eine Beteiligung bei diesem ersten Schritt der Biofilmbildung nachgewiesen werden (Heilmann et al. 1997; Heilmann et al. 2003; Mack 1999; Timmerman et al., 1991; Veenstra et al. 1996). Desweiteren

spielen bei der primären Bindung Matrixproteine wie SdrF und SdrG, die an Kollagen bzw. Fibrinogen binden, eine Rolle (Arrecubieta et al. 2007; Arrecubieta et al. 2009).

4.4.3 Akkumulation

Im zweiten Schritt der Biofilmbildung, der Akkumulation, sind mehrere erregereigene Proteine von Bedeutung. Eine Struktur, die man zunächst als „schleimige“ Matrix beschrieb, spielt eine entscheidende Rolle. Zunächst isolierte G. D. Christensen das Schleim assoziierte Antigen SAA (Christensen et al. 1990), welches später in der Arbeitsgruppe von D. Mack genauer charakterisiert und als *polysaccharide intercellular adhesin* (PIA) bezeichnet wurde (Baldassarri et al. 1996; Mack et al., 1992, Mack et al 1996). Bei PIA handelt es sich um ein lineares, β -1,6-verknüpftes Glukosaminoglykan, das zum einen an der Hämagglutination von Erythrozyten beteiligt ist und zum anderen die Adhärenz der Bakterien untereinander vermittelt (Fey et al. 1999, Mack et al. 1999). Für die Biosynthese von PIA ist das *intercellular adhesin* Operon (*ica*-Operon) verantwortlich. Dieses Operon besteht aus zwei Transkriptionseinheiten, einer mit den vier Genen für die PIA Biosynthese: *icaA*, *icaD*, *icaB* und *icaC* und einer für einen Regulator des Operons: *icaR* (Heilmann et al. 1996; Gerke et al. 1998; Mack 1999; Götz 2002). Die Proteine von *icaA*, *icaC* und *icaD* sind in der Membran lokalisiert, das Genprodukt von *icaB* wird ins Kultur-Medium ausgeschieden (Gerke et al. 1998). *IcaA* ist ein Transmembranprotein mit einer Acetylglukosaminyl-Transferase-Aktivität, welche durch Koexpression mit *icaD* optimiert werden kann. Es wird vermutet, dass es sich bei *IcaD* um ein Chaperon handelt, welches zum einen die Faltung und Insertion von *IcaA* in die Membran vermittelt und zum anderen eine Verbindung zwischen *IcaA* und *IcaC* herstellt. Bei *IcaC* handelt es sich um ein hydrophobes integrales Membranprotein. Man vermutet, dass es die Translokation des PIA über die Zellmembran vermittelt. Dabei ist die gleichzeitige Expression der vier Gene essenziell für die Produktion von PIA (Gerke et al. 1998; Götz 2002). Der im *ica*-Operon kodierte Regulator *IcaR* unterdrückt die Biosynthese-Gene *icaADBC*. Durch NaCl wird *IcaR* direkt inaktiviert (Götz 2002; Mack et al. 2004, O´Gara 2007).

4.4.4 Beeinflussung durch Umweltfaktoren

Auch Umweltfaktoren spielen bei der Biofilmbildung eine Rolle. Hierzu gehören zum Beispiel: die Verfügbarkeit von Sauerstoff, die Temperatur, die Osmolarität, Ethanol und Glucose. Des Weiteren können auch Antibiotika die Biofilmbildung beeinflussen (Conlon et al. 2002; Cramton et al. 2001 ; Dobinsky 2003 ; Rachid et al. 2000). Am Beispiel der Glucose konnte man Hinweise darauf finden, dass sie selbst nicht die *ica*-Expression induziert, sondern als Substrat für die PIA-Synthese verwendet wird (Vuong 2005). In diesem Zusammenhang stellte Dobinsky die Hypothese auf, dass es nicht zur PIA-Synthese kommt, wenn ein Mangel an Vorläufermolekülen und Energie besteht, auch wenn alle Enzyme für die PIA-Synthese vorhanden wären (Dobinsky 2003).

Man konnte auch nachweisen, dass beispielsweise hohe Temperaturen, osmotischer Stress sowie subinhibitorische Konzentrationen von Tetracyclin, Erythromycin und Quinupristin-Dalfopristin die *ica*-Promotoraktivität erhöhen. Der genaue Mechanismus, der dabei zur Biofilmbildung führt, konnte jedoch noch nicht beschrieben werden. Vermutlich führt bei manchen dieser Umweltfaktoren eine generelle Stressantwort zur Induktion des Biofilms (Rachid et al. 2000a; Rachid et al. 2000). Man konnte diese Reaktion bisher aber nur bei Tetracyclin, Erythromycin und Quinupristin-Dalfopristin nachweisen, nicht jedoch bei anderen Translationsinhibitoren. Bei Quinupristin-Dalfopristin handelt es sich um ein Reserveantibiotikum gegen multiresistente Staphylokokken. In vitro verursacht es eine sehr starke Biofilmbildung bei *S. epidermidis* (Rachid et al. 2000b).

4.4.5 Regulation der Biofilmbildung und PIA-unabhängige Mechanismen

Entgegen der bisherigen Annahme, dass PIA essenziell für die Biofilmbildung bei Staphylokokken ist, fand man heraus, dass auch PIA-unabhängige Mechanismen existieren. So wurden *ica* *ADBC*-negative Stämme beschrieben, die Biofilm bilden.

Dabei spielen unter anderem folgende Proteine eine Rolle: das *accumulation associated protein* Aap und das bovine *biofilm associated protein* Bap. Bei Aap handelt es sich um ein 140 kD großes Protein, das jedoch nicht alle Biofilm-positiven Stämmen aufweisen. Stämme, die Aap sezernieren, bilden aber wesentlich mehr Biofilm (Hussain et al. 1997). Bei einer Mutation des Aap-Gens kommt es bei

Staphylokokken zu einem Defekt in der Akkumulation auf Glas- und Plastikoberflächen (Heilmann et al. 1997; Hussain et al. 1997). Durch spezifische Antikörper gegen Aap kann die Biofilmbildung beim *S. epidermidis* Stamm RP62A abgeschwächt werden, was eine Bestätigung für die Rolle von Aap bei der Biofilmbildung darstellt (Sun et al. 2005). Auch Rhode et al. beschreibt im Zusammenhang mit dem Protein Aap die PIA-unabhängige Biofilmbildung. Er zeigte, dass das 220 kD große Aap in eine kleinere 140 kD Form abgebaut werden kann, die zu einer starken Akkumulation der Bakterien führt (Rohde et al. 2005).

Bap, ein Zellwand assoziiertes Protein von *S. aureus*, ist sowohl beim Anheften an Oberflächen als auch bei der Akkumulation zu einem Biofilm beteiligt (Cucarella et al. 2001). Man konnte Bap bisher in 5% der von Rindern isolierten *S. aureus* Stämmen finden, aber noch in keinem Humanisolat (Götz 2002.). Es wurde nachgewiesen, dass alle Stämme, die Bap exprimieren, hochgradig adhärent und somit starke Biofilmbildner sind (Cucarella et al. 2001). Bei humanen *S. epidermidis*- Isolaten fand man ein zum Bap homologes Protein, welches ebenfalls an der Biofilmbildung beteiligt ist. Man bezeichnet dieses Protein als Bap *homologue protein* (Bhp) (Bowden et al. 2005) bzw. SesD (Gill et al. 2005).

Neben PIA als Hauptkomponente der Biofilmmatrix konnte ein weiteres Kohlenhydratpolymer gefunden werden: extrazelluläre Teichonsäuren (*extracellular teichoic acids* EC TA), die auch ein essenzieller Bestandteil dieser Matrix zu sein scheinen. Man konnte nachweisen, dass das Verhältnis von PIA und EC TA von den Wachstumsbedingungen und der Wachstumsphase abhängig ist (Sadovskaya et al. 2005). Kogan und seine Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass in einigen klinischen Biofilm-positiven Staphylokokken-Isolaten verschiedener Spezies, die jedoch PIA-negativ waren, die Biofilmmatrix vollständig aus EC TA bestand (Kogan et al. 2006).

Eine weitere wichtige Komponente bei der Regulation der Biofilmbildung stellen Quorum-sensing Systeme dar, wobei das bisher am besten untersuchte Quorum-sensing-System das „accessory gene regulator system“ (*agr*) ist. Mutationen dieses Regulators *agr* können sowohl ohne Effekt auf die Biofilmbildung sein, als auch die Biofilmbildung verstärken (Toledo-Arana et al. 2005, O’Gara 2007).

Ein weiterer Faktor, der bei der Biofilmbildung eine Rolle spielt, ist der Sigmafaktor B (Sig B). Es stellte sich heraus, dass SigB den Repressor des *ica*-Operons (*icaR*) unmittelbar hemmen kann. Dies wurde an einer Reihe von Deletionsmutanten im Sigma B Operon untersucht (Knobloch et al., 2004). Des Weiteren scheint der Sigmafaktor B auch für die Beständigkeit des Biofilms wichtig zu sein (Jager et al. 2005, O'Gara 2007).

Eine wichtige Rolle bei der Regulation spielt zudem SarA (staphylococcal accessory regulator A). SarA gilt als essenziell für die *icaADCB*-Genexpression. Dabei zeigten SarA-*S. epidermidis*-Mutanten einen Biofilm-negativen Phänotyp (Tormo et al. 2005, Conlon et al. 2004).

Bei der Biofilmbildung kann auch eine Phasenvariation durch das mobile genetische Element IS256 stattfinden, das ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulation spielt. Durch Integration dieses Elements in das *ica*-Operon wird die PIA-Biosynthese verhindert. Das Element kann jedoch den Genlokus auch wieder verlassen, wodurch die Fähigkeit zur Biofilmbildung wiederhergestellt wird. Damit handelt es sich um ein klassisches Phasenvariationsereignis (Kozitskaya et al. 2004; Ziebuhr et al. 1999).

4.4.6 Beobachtungen und Bedeutung der Biofilmbildung im klinischen Zusammenhang

Es ist zu bemerken, dass das *icaADBC* Operon in klinischen Isolaten von Katheter-assoziierten Infektionen mit KoNS weitaus häufiger vorkommt als in Isolaten der Haut gesunder, nicht hospitalisierter Menschen (Ziebuhr et al. 1997). Biofilm-bildende KoNS-Stämme finden sich weitaus häufiger bei Fremdkörper-assoziierten Infektionen als Biofilm-negative (Christensen et al. 1983; Davenport et al. 1986; Deighton und Balkau 1990; Dunne et al. 1987; Ishak et al. 1985; Ziebuhr et al. 1997). Des Weiteren kann man in tierexperimentellen Modellen beobachten, dass ein Zusammenhang besteht zwischen der Fähigkeit zur Biofilmbildung und der Virulenz von KoNS (Deighton et al. 1996; Rupp et al. 1999a; Rupp et al. 1999b; Rupp et al. 2001).

Zudem korreliert das Versagen einer alleinigen antibiotischen Therapie solcher Infektionen ebenfalls mit dem Vorhandensein eines Biofilm-positiven Phänotyps bei

den isolierten Infektionsstämmen (Davenport et al. 1986; Diaz-Mitoma et al. 1987; Younger et al. 1987). Somit stellt die Fähigkeit zur Biofilmbildung einen sehr entscheidenden Faktor von *S. epidermidis* im Rahmen von Fremdkörper-assoziierten Infektionen dar. Entsprechend dem Zusammenhang zwischen der Biofilmbildung bzw. dem Vorhandensein des *icaADBC* Genclusters und der Multiresistenz gegen Antibiotika fiel in vorliegender Studie auf, dass *icaA*-positive Stämme mehr Resistenzen als *icaA*-negative aufwiesen.

In der Studie von Kozitskaya et al. waren die nosokomialen Infektionsisolate in der Regel auch multiresistent. Weiterhin fiel auf, dass die Biofilmbildung bei nur 6,5% der kommensalen, aber 71,4% der nosokomialen Infektisolate vorkam. Entsprechend verhielt es sich mit der Präsenz des *icaADBC* Genclusters (Kozitskaya et al. 2005).

In einer Studie von Rogers et al. fiel auf, dass die PIA-Produktion bei *S. epidermidis*-Stämmen, die die Haut von gesunden Menschen kolonisieren, nachteilig für diese *S. epidermidis*-Stämme ist. Man konnte hierbei in einer Untersuchung mit neun gesunden Probanden nachweisen, dass *S. epidermidis*-Isolate, die das *icaADBC* Operon nicht besitzen, die Fähigkeit haben, Isolate, die PIA produzieren, zu verdrängen (Rogers et al. 2008). Dahingegen zeigten Vuong und seine Arbeitsgruppe, dass PIA-Produktion über die Bildung einer extrazellulären Matrix *S. epidermidis* vor einer Zerstörung durch das menschliche Immunsystem schützt (Vuong et al. 2004). Ebenso stellten Flückinger und ihre Arbeitsgruppe in in-vivo-Untersuchungen fest, dass die Bakterienanzahl bei Fremdkörper-assoziierten Infektionen mit *icaADBC*-positiven Isolaten höher lag als bei einer *ica*-negativen-Mutante. Somit lässt die PIA-Produktion diese Stämme im Blut überleben (Flückinger et al. 2005). Da die meisten Fremdkörper-assoziierten Infektionen durch *icaADBC*-positive Isolate verursacht werden, legt diese Beobachtung nahe, dass die PIA-Produktion in bestimmten Nischen, wie gerade in Krankenhäusern, einen Vorteil für *S. epidermidis* darstellt. Bei einer reinen Besiedelung der Haut stellt die PIA-Produktion jedoch, wie oben beschrieben, für diese kommensalen *S. epidermidis*-Stämme keinen Vorteil dar.

Des Weiteren wurde von Weisser et al. eine interessante Beobachtung beschrieben. Bei einem Patienten mit ALL (akute lymphatische Leukämie), der sich in der Aplasie befand, wurde in unterschiedlichen Blutkulturen mehrmals *S. epidermidis*

nachgewiesen. Initial zeigten sich noch *icaA*- und *mecA*-Gen-negative-Isolate. Im weiteren Verlauf wurden diese jedoch von starken biofilmbildenden und Methicillin-resistenten Stämmen verdrängt (Weisser et al. 2010). Dies verdeutlicht, dass potenziell gefährliche *S.epidermidis*-Stämme die kommensale Flora des Menschen verdrängen können und sich so als nosokomiale Erreger ausbreiten können.

4.5 Fazit und Ausblick

Das Ziel der Studie war u.a. Übertragungswege und das Reservoir klinisch bedeutsamer *S. epidermidis* Stämme mit Hilfe des MLST zu ermitteln. In dieser Studie wurden drei Mutter-Kind-Paare untersucht. Für ein aussagekräftigeres Ergebnis müssten weitere Paare untersucht werden, was mit dieser Untersuchungsmethode jedoch einen großen Aufwand darstellen würde. Da in dieser Studie nur eine Kolonie pro Abstrich untersucht und somit nur ein Sequenztyp sequenziert wurde, bleibt offen, ob eine entsprechende Person zum gleichen Zeitpunkt mit mehreren Stämmen besiedelt war. Neue Ergebnisse aus Pflegeheimen in Nordirland belegen, dass in Nasenabstrichen bis zu acht verschiedene *S. epidermidis*-Stämme vorkommen können (mündliche Information PD Dr. W. Ziebuhr). Diese Ko-Kolonisierung durch verschiedene Staphylokokkenstämme und –spezies war zum Zeitpunkt der Studienplanung noch nicht bekannt und sollte in späteren Untersuchungen unbedingt berücksichtigt werden

In der Studie fand man mehrfach *S. epidermidis*-Isolate, die durch die Präsenz des *icaA*- und des *mecA*-Gens auffielen und durch diese Virulenzfaktoren potenziell für Infektionen verantwortlich sein können. Des Weiteren fanden sich auch Isolate, die diese Virulenzfaktoren nicht besaßen. Es ist oftmals schwierig zwischen kommensalen und nosokomialen *S. epidermidis*-Stämmen zu unterscheiden. Da *S. epidermidis* jedoch ein Reservoir für verschiedene genetische Elemente darstellt, wie z.B. der *SCCmec*-Elemente und dabei mit zur Ausbreitung von Antibiotika-Resistenzgenen beiträgt (Otto 2009), ist es wichtig, in diesem Bereich weiter zu forschen, um den Zusammenhang zwischen kommensalen und nosokomialen *S. epidermidis*-Stämmen noch besser zu verstehen.

5 Zusammenfassung

Das grampositive Bakterium *Staphylococcus epidermidis* ist ein wesentlicher Bestandteil der kommensalen Flora der Haut und der Schleimhäute des Menschen. Jedoch stellen diese Bakterien eine häufige Ursache nosokomialer Katheter-assoziiertes Infektionen bei immunsupprimierten Patienten dar. Dies liegt zum einen an der Fähigkeit von *S. epidermidis*, Biofilm zu bilden. Diese physikalische Barriere schützt die Bakterien vor dem Immunsystem sowie vor Antibiotika. Dabei zählen sie zu den häufigsten Erregern von Infektionen an implantierten Fremdkörpern mit Plastikoberflächen, wie z. B. Venenkathetern, künstlichen Herzklappen oder Gefäßprothesen. Zum anderen stellt die Antibiotikaresistenzentwicklung unter *S. epidermidis* ein zunehmendes Problem dar.

Vor allem die late-onset Sepsis, die durch *S. epidermidis* als Erreger verursacht werden kann, stellt für Frühgeborene eine Gefahr dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, für *S. epidermidis* als häufigsten und klinisch bedeutsamen KoNS zu eruieren, ob die zunehmende Dauer des stationären Krankenhausaufenthaltes von sehr kleinen Frühgeborenen mit einer höheren Rate an *ica*-Präsenz, Biofilmbildung und Antibiotikaresistenz assoziiert ist, sowie die Verbreitungswege und das Reservoir für diese *S. epidermidis*-Stämme zu identifizieren. Hierzu wurden sequenzielle Isolate von *S. epidermidis* bei Müttern, Kindern und vom Krankenhauspersonal gewonnen und mittels MLST (Multilocus-Sequence-Typing) klonal typisiert. Sie wurden auf Antibiotikaresistenzen, Biofilmbildung und Präsenz des *icaA*-Gens, das eine Rolle bei der Biofilmbildung spielt, sowie des *mecA*-Gens untersucht und mit Isolaten, die aus Blutkulturen oder Venenkatheter des Kindes isoliert wurden, verglichen.

Es fiel auf, dass die Isolate der sehr kleinen Frühgeborenen deutlich mehr Virulenzfaktoren, wie z.B. Biofilmbildung, hohe Antibiotikaresistenzraten sowie die Präsenz des *mecA*- und des *icaA*- Gens, als die maternalen Stämme besaßen. Im Vergleich mit den Ergebnissen der untersuchten Personalstämme

liegt der Verdacht nahe, dass oftmals auch das Personal als Transmitter, vor allem von Klonen mit mehreren Virulenzfaktoren, dient. Das Krankenhaus-Milieu scheint dabei ein ideales Reservoir für die Ausbreitung solcher gefährlichen *S. epidermidis*-Stämme zu sein.

6 Literaturverzeichnis

Arrecubieta, C., Lee, M.H., Macey, A., Foster, T.J., Lowy, F.D., (2007): SdrF, a *Staphylococcus epidermidis* surface protein, binds type I collagen. *J. Biol. Chem.* 282, 18767–18776.

Arrecubieta, C., Toba, F.A., von Bayern, M., Akashi, H., Deng, M.C., Naka, Y., Lowy, F.D., (2009): SdrF, a *Staphylococcus epidermidis* surface protein, contributes to the initiation of ventricular assist device driveline-related infections. *PLoS Pathog.* 5, e1000411.

Aanensen, D. M. and Spratt, B. G. (2005): The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res.* 33: W728-W733.

Baldassarri, L., Donnelly, G., Gelosia, A., Voglino, M. C., Simpson, A. W. and Christensen, G. D. (1996): Purification and characterization of the staphylococcal slime associated antigen and its occurrence among *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *Infect Immun* 64: 3410-5.

Barber, M. (1961): Methicillin-resistant staphylococci. In: *J Clin Pathol* 14: 385–393

Benner, E. J. and Kayser, F. H. (1968): Growing clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 11: 741-744.

Bowden, M. G., Chen, W., Singvall, J., Xu, Y., Peacock, S. J., Valtulina, V., Speziale, P. and Hook, M. (2005): Identification and preliminary characterization of cellwall-anchored proteins of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* 151:1453-1464.

Chambers, H. F and De Leo, F. R. (2009): Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol.* 7:629-41.

Chapman, R.L., Faix, R.G. (2003): Persistent bacteremia and outcome in late onset infection among infants in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J* , 22: 17-21.

Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L., and Beachey, E.H. (1982): Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* 37: 318-326

Christensen, G.D., Parisi, J.T., Bisno, A.L., Simpson, W.A., and Beachey, E.H. (1983): Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 18: 258-269.

Christensen, G.D., Barker, L.P., Mawhinney, T.P., Baddour, L.M. (1990): Identification of an antigenic marker of slime production for *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun*; 58: 2906-11.

Conlon, K. M., Humphreys, H. and O'Gara, J. P. (2002): *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* 184: 4400-8.

Conlon, K.M, Humphreys, H., and O'Gara, J.P. (2004): Inactivations of *rsbU* and *sarA* by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotypic variation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* 186: 6208–6219.

Costerton, J. W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. (1999): Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* Vol. 284: 1318-1322.

Cramton, S. E., Ulrich, M., Gotz, F. and Doring, G. (2001): Anaerobic induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 69: 4079-85.

Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., Penades, J.R. (2001): Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 183: 2888–2896

Davenport, D.S., Massanari, R.M., Pfaller, M.A., Bale, M.J., Streed, S.A. and Hierholzer, W.J., Jr. (1986): Usefulness of a test for slime production as a marker for clinically significant infections with coagulase-negative staphylococci. *J Infect Dis* 153: 332-339.

Deighton, M.A. und Balkau, B. (1990): Adherence measured by microtiter assay as a virulence marker for *Staphylococcus epidermidis* infections. *J Clin Microbiol* 28: 2442-2447

Deighton, M., Borland, R. and Capstick, J.A. (1996): Virulence of *Staphylococcus epidermidis* in a mouse model: significance of extracellular slime. *Epidemiol Infect* 117: 267-280

Diaz-Mitoma, F., Harding, G.K., Hoban, D.J., Roberts, R.S., and Low, D.E. (1987): Clinical significance of a test for slime production in ventriculoperitoneal shunt infections caused by coagulase-negative staphylococci. *J Infect Dis* 156: 555-560.

Dunne, W.M., Jr., Nelson, D.B., and Chusid, M.J. (1987): Epidemiologic markers of pediatric infections caused by coagulase-negative staphylococci. *Pediatr Infect Dis J* 6: 1031-1035

Dobinsky, S., K. Kiel, H. Rohde, K. Bartscht, J. K. Knobloch, M. A. Horstkotte and D. Mack (2003): Glucose-related dissociation between *icaADBC* transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis. *J Bacteriol* 185: 2879-86.

Espersen, F., Wilkinson, B.J., Gahrn-Hansen, B., Thamdrup Rosdahl, V., and Clemmensen, I. (1990): Attachment of staphylococci to silicone catheters *in vitro*. *APMIS* 98: 471-478.

Feil, E. J., and Spratt, B. G. (2001): Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 561-590.

Fey, P. D., Ulphani, J. S., Götz, F., Heilmann, C., Mack, D. and Rupp, M. E. (1999): Characterization of the relationship between polysaccharide intercellular adhesin and hemagglutination in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 179: 1561-4.

Flückiger, U., Ulrich, M., Steinhuber, A., Doring, G., Mack, D., Landmann, R., Goerke, C., Wolz, C. (2005): Biofilm formation, *icaADBC* transcription, and

polysaccharide intercellular adhesin synthesis by staphylococci in a device-related infection model. *Infect. Immun.* 73: 1811-1819

Gerke, C., Kraft, A., Sussmuth, R., Schweitzer, O. and Götz, F. (1998): Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem* 273: 18586-93.

Gill, S. R., Fouts, D. E., Archer, G. L., Mongodin, E. F, DeBoy, R. T., Ravel, J., Paulsen, I. T. , Kolonay, J. F. , Brinkac, L., Beanan, M., Dodson, R. J., Daugherty, S. C., Madupu, R., Angiuoli, S. V., Durkin, A. S., Haft, D. H., Vamathevan, J., Khouri, H., Utterback, T., Lee, C., Dimitrov, G., Jiang, L., Qin, H., Weidman, J., Tran, K. , Kang, K. , Hance, I. R., Nelson, K. E. and Fraser, C. M. (2005): Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J. Bacteriol.* 187: 2426-2438.

Götz, F. (2002): *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 43:1367-78.

Götz, F., Bannerman, T., Schleifer, K.H. (2004): The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Dworkin, M. (Hrsg.) *et al.: The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. New York: Springer-Verlag, 5. März 2004 (3. Auflage, Ausgabe 3.16).

Hanage, W. P., Auranen, K., Syrjanen, R., Herva, E., Makela, P. H., Kilpi, T. and Spratt, B. G. (2004): Ability of pneumococcal serotypes and clones to cause acute otitis media: implications for the prevention of otitis media by conjugate vaccines. *Infect. Immun.* 72: 76-81.

Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D. and Götz, F. (1996): Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* 20: 1083-91

Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G. and Götz, F. (1997): Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol* 24: 1013-24.

Heilmann, C.T., Thumm, G., Chhatwal, G.S., Hartleib, J., Uekötter, A., Peters, G., (2003): Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* 149, 2769–2778.

Hogt, A.H., Dankert, J., and Feijen, J. (1985): Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* to a hydrophobic biomaterial. *J Gen Microbiol* 131: 2485-2491.

Hogt, A.H., Dankert, J., Hulstaert, C.E., and Feijen, J. (1986): Cell surface characteristics of coagulase-negative staphylococci and their adherence to fluorinated poly(ethylenepropylene). *Infect Immun* 51: 294-301.

Hussain, M., Herrmann, M., von Eiff, C., Perdreau-Remington, F. and Peters, G. (1997): A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun* 65: 519-24.

Iandolo, J. J. (1989): Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol* 43: 375-402.

Isaacs, D. (2003): A ten year, multicentre study of coagulase negative staphylococcal infections in Australasian neonatal units. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88: F89-F93

Ishak, M.A., Groschel, D.H., Mandell, G.L., and Wenzel, R.P. (1985): Association of slime with pathogenicity of coagulase-negative staphylococci causing nosocomial septicemia. *J Clin Microbiol* 22: 1025-1029.

Jevons, M.P. (1961): “Celbenin”-resistant staphylococci. *Br Med J* 1:124–125.

Jager, S., Mack, D., Rohde, H., Horstkotte, M. A. and Knobloch, J. K. (2005): Disintegration of *Staphylococcus epidermidis* biofilms under glucose-limiting conditions depends on the activity of the alternative sigma factor sigmaB. *Appl Environ Microbiol* 71: 5577–5581.

Khashu, M., Osiovich, H., Henry, D., Solimano, S., Speert D. (2006): A new 'syndrome' of neonatal sepsis: persistent bacteremia and severe thrombocytopenia due to Coagulase Negative Staphylococcus. *Pediatr* 2006; 117: 340 – 348.

Kogan, G., Sadovskaya, I., Chaignon, P., Chokr, A., and Jabbouri, S. (2006): Biofilms of clinical strains of Staphylococcus that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. *FEMS Microbiol Lett* 255: 11-16.

Kozitskaya, S., Cho, S.H., Dietrich, K., Marre, R., Naber, K., and Ziebuhr, W. (2004): The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial Staphylococcus epidermidis isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. *Infect Immun* 72: 1210-1215

Kozitskaya, S.; Olson, M.E.; Fey, P.D.; Witte, W.; Ohlsen, K.; Ziebuhr, W. (2005): Clonal analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying or lacking biofilmmediating genes by multilocus sequence typing. In: *J Clin Microbiol* 43 (2005), Sep, Nr. 9, S. 4751–4757

Kloos, W. E., and T. L. Bannerman (1994): Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 7: 117-40.

Knobloch, J. K., Bartscht, K., Sabottke, A., Rohde, H., Feucht, H. H. and Mack, D. (2001): Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *J Bacteriol* 183: 2624-33.

Knobloch, J. K., Jager, S., Horstkotte, M. A., Rohde, H. and Mack, D. (2004): *RsbU* dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor sigmaB by repression of the negative regulator gene *icaR*. *Infect Immun* 72: 3838-48.

Krediet, T.G., Jones, M.E., Janssen K. et al. (2001): Prevalence of molecular types and *mecA* gene carriage of coagulase-negative Staphylococci in a neonatal intensive care unit: relation to nosocomial septicemia. *J Clin Microbiol* 39: 3376–3378

Krediet, T.G., Mascini, E.M., van Rooij, E. et al. (2004): Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci causing sepsis in a neonatal intensive care unit over an 11-year period. *J Clin Microbiol* 42: 992-995

Kresken, M., Hafner, D., Schmitz, F.J., Wichelhaus, T.A. (2001): Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum. Bericht über die Ergebnisse einer multizentrischen Studie der Arbeitsgemeinschaft *Empfindlichkeitsprüfungen & Resistenz* / Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie. 2001 – Forschungsbericht

Li, M., Diep, B.A., Villaruz, A.E., Braughton, K.R., Jiang, X., DeLeo, F.R., Chambers, H.F., Lu, Y., Otto, M. (2009): Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(14): 5883.

Lowy, F. D. (1998): *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339: 520-32.

Ludwicka, A., Uhlenbruck, G., Peters, G., Seng, P.N., Gray, E.D., Jeljaszewicz, J., and Pulverer, G. (1984): Investigation on extracellular slime substance produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 258: 256-267.

Mack, D., Nedelmann, M., Krokotsch, A., Schwarzkopf, A., Heesemann, J. and Laufs, R. (1994): Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect Immun* 62: 3244-53.

Mack, D., Fischer, W. , Krokotsch, A., Leopold, K. , Hartmann, R., Egge, H. and Laufs, R. (1996): The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* 178: 175-83.

Mack, D. (1999): Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *J Hosp Infect* 43 Suppl: 113-25.

Mack, D., Riedewald, J., Rohde, H., Magnus, T., Feucht, H. H., Elsner, H. A., Laufs, R. and Rupp, M. E. (1999): Essential functional role of the polysaccharide

intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. *Infect Immun* 67: 1004-8.

Mack, D., Becker, P. I., Dobinsky, S., Knobloch, J. K., Peters, G., Rohde, H. and Herrmann, M. (2004): Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *Int J Med Microbiol* 294: 203-12.

Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., , Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth,, K. Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M. and Spratt, B. G. (1998): Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 3140-3145.

Miragaia, M., Thomas, J.C., Couto, I., Enright, M.C. and de Lencastre, H. (2007): Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing (MLST) data. *J. Bacteriol.* 189: 2540-2552.

Miragaia, M., Carriço, J.A., Thomas, J.C., Couto, I., Enright, M.C., and H. de Lencastre (2008): Comparison of molecular typing methods for characterization of *Staphylococcus epidermidis*: proposal for clone definition. *J. Clin. Microbiol.* 46: 118-129.

Noel, G.J., Edelson, P.J. (1984): *Staphylococcus epidermidis* bacteremia in neonates: further observations and the occurrence of focal infection. *Pediatrics.* 1984 Nov; 74 (5): 832–837.

Ogston, A. (1883): *Micrococcus* poisoning. In: *J. Anat. Physiol.* 17 (1883), S. 24–58

O’Gara, J.P. (2007): Ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 270: 179–188.

O’Toole, G., Kaplan H.B., Kolter, R. (2000): Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, Vol. 54: 49-79

Otto, M. (2009): *Staphylococcus epidermidis* – the ‘accidental’ pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7: 555–567.

Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. (2007): Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum. Bericht über die Ergebnisse einer multizentrischen Studie der Arbeitsgemeinschaft Empfindlichkeitsprüfungen & Resistenz der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. aus dem Jahre 2007 (http://www.p-e-g.org/ag_resistenz/main.htm)

Projan, S. J., Novick, R. P. (1997): The molecular basis of pathogenicity, p. 55-81. The staphylococci in human disease. *K. B. Crossley and G. L. Archer (ed.), Churchill Livingstone, New York, NY.*

Pulverer, G., Halswick, R. (1967): Coagulase-negative Staphylokokken (*Staphylococcus albus*) als Krankheitserreger. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 92: 1141-1145.

Rachid, S., Cho, S., Ohlsen, K., Hacker, J. und Ziebuhr, W. (2000a): Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by environmental factors: the possible involvement of the alternative transcription factor *sigB*. *Adv Exp Med Biol* 485: 159-66.

Rachid, S., Ohlsen, K., Witte, W., Hacker, J., Ziebuhr, W. (2000b): Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesion expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 3357-63.

Raimundo, O, Heussler, H, Bruhn, J. B., Suntrarachun, S., Kelly, N., Deighton, M. A., Garland, S. M. (2002): Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia in a newborn intensive care unit. *J Hosp Infect.* 2002 May;51(1): 33-42.

Rogers, K. L., Rupp, M. E. and Fey, P. D. (2008): The presence of *icaADBC* is detrimental to the colonization of human skin by *Staphylococcus epidermidis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 6155-6157

Rohde, H., Burdelski, C., Bartscht, K., Hussain, M., Buck, F., Horstkotte, M. A. Knobloch, J. K.-M., Heilmann, C., Herrmann, M. and Mack, D. (2005): Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Molecular Microbiology* 55: 1883-1895.

Roundtree P., Freeman V. (1956): Infections caused by a particular phage type of *Staphylococcus aureus*. *Med J Aust.* 1956;42: 157–61.

Rupp, M. E., and Archer, G. L. (1994): Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis* 19: 231-43; quiz 244-5.

Rupp, M. E., Ulphani, J.S., Fey, P.D., Bartscht, K., and Mack, D. (1999a): Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. *Infect Immun* 67: 2627-2632.

Rupp, M. E., Ulphani, J.S., Fey, P.D., and Mack, D. (1999b): Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *Infect Immun* 67: 2656-2659.

Rupp, M. E., Fey, P.D., Heilmann, C., and Gotz, F. (2001): Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *J Infect Dis* 183: 1038-1042.

Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Flahaut, S., Kogan, G., and Jabbouri, S. (2005): Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infect Immun* 73: 3007-3017.

Schoenfelder, S. M., Lange, C., Eckart, M., Hennig, S., Kozytska, S., Ziebuhr, W. (2010): Success through diversity - How *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. *Int J Med Microbiol* 300(6):380-6

Schwalbe, R.S.; Stapleton, J. T.; Gilligan, P. H. (1987): Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *N Engl J Med* 316 (1987), Apr, Nr.15: 927–931

Singhal, R., Dhawan, S., Mohanty, S., Sood, S., Dhawan B, Das, B., Kapil A. (2006): Species distribution & antimicrobial susceptibility of coagulase negative Staphylococci in a tertiary care hospital. *Indian J Med Res.* 2006, 123(4): 569-70.

Smith, I. M., Beals, P. D., Kingsbury, K. R. and Hasenclever, N. F. (1958): Observations on *Staphylococcus albus* septicaemia in mice and men. *Arch. Intern. Med.* 102: 375-388.

Speer, C.P. Gahr, M. (2009): Pädiatrie. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 3. Auflage 2009

Speer, C.P. (2004): Neonatologie. In: Koletzko, Kinderheilkunde. Springer Verlag Heidelberg. 12. Auflage 2004. S. 101-104

Stewart, G. T. and Holt, R. J. (1963): Evolution of natural resistance to the newer penicillin. *Br. Med. J.* 1: 308-311.

Ströbele, Ch. (2005): Diplomarbeit „Klonale Analyse von *Staphylococcus epidermidis*–Isolaten: Multi-Locus-Sequence-Typing und Etablierung eines Screening-Systems zur Target-site-Selektivität von IS256“

Sun, D., Accavitti, M. A. and Bryers, J. D. (2005): Inhibition of biofilm formation by monoclonal antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A accumulation-associated protein. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12: 93-100.

Thomas, J. C., Vargas, M. R., Miragaia, M., Peacock, S. J., Archer, G. L., Enright, M. C. (2007): Improved Multilocus Sequence Typing scheme for *Staphylococcus epidermidis*. *J of Clinical Microbiology* Vol. 45: 616-619

Timmerman, C. P., Flier, A., Besnier, J. M., De Graaf, L., Cremers F. and Verhoef, J. (1991): Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. *Infect Immun* 59: 4187-92.

Toledo-Arana, A., Merino, N., Vergara-Irigaray, M., Debarbouille, M., Penades, J. R. and Lasa, I. (2005): *Staphylococcus aureus* develops an alternative, *ica*-independent biofilm in the absence of the *arlRS* two-component system. *J. Bacteriol.* 187: 5318-a-5329.

Tormo, M.A., Marti, M., Valle, J., Manna, A.C., Cheung, A.L., Lasa, I. und Penades, J.R. (2005): SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *J Bacteriol* 187: 2348-2356

Urlichs, F., Speer, C. P. (2004): Neutrophil function in preterm and term infants. *NeoReviews* 5: e417-e430

Venkatesh, M.P., Placencia, F., Weisman, L. E. (2006): Coagulase-negative staphylococcal infections in the neonate and child: an update. *Semin Pediatr InfectDis* 2006; 17(3):120–127.

Vaudaux, P., Pittet, D., Haeberli, A., Huggler, E., Nydegger, U.E., Lew, D.P., and Waldvogel, F.A. (1989): Host factors selectively increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin and fibrinogen or fibrin. *J Infect Dis* 160: 865-875

Veenstra, G. J., Cremers, F. F., van Dijk, H. and FLeer, A. (1996): Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* 178: 537-41.

Villari, P., Sarnataro, C., Iacuzio, L. (2000): Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in a neonatal intensive care unit over a three-year period. *Journal of Clinical Microbiology.* Vol. 38, No. 5 : 1740-1746

Vuong, C., J. M. Voyich, E. R., Fischer, K. R., Braughton, A. R., Whitney, F. R., DeLeo, and Otto, M. (2004): Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell. Microbiol.* 6: 269-275.

Vuong, C., Kidder, J. B., Jacobson, E. R., Otto, M., Proctor, R. A. and Somerville, G. A. (2005): *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular

adhesin production significantly increases during tricarboxylic acid cycle stress. *J. Bacteriol.* 187: 2967-2973.

Wang, I.W., Anderson, J.M. and Marchant, R.E. (1993): *Staphylococcus epidermidis* adhesion to hydrophobic biomedical polymer is mediated by platelets. *J Infect Dis* 167: 329-336

Wang, X. M., L. Noble, B. N. Kreiswirth, W. Eisner, W. McClements, K. U. Jansen und A. S. Anderson (2003): Evaluation of a multilocus sequence typing system for *Staphylococcus epidermidis*. *J. Med. Microbiol.* 52: 989-998.

Weisman, Leonard E (2004): Coagulase-negative staphylococcal disease: emerging therapies for the neonatal and pediatric patient. *Curr Opin Infect Dis* 17:237–241

Weisser, M, Schoenfelder, S.M., Orasch, C., Arber, C., Gratwohl, A., Frei, R, Eckart, M., Flückiger, U., Ziebuhr, W. (2010): Hypervariability of biofilm formation and oxacillin resistance in a *Staphylococcus epidermidis* strain causing persistent severe infection in an immunocompromised patient. *J Clin Microbiol.* 48(7): 2407-12

Wielders, C.L., Vriens, M.R., Brisse, S., de Graaf-Miltenburg, L.A., Troelstra, A., Fleer, A., Schmitz, F.J., Verhoef, J., Fluit, A.C. (2001): In-vivo transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357, Nr.9269, S. 1674–1675

Wisplinghoff, H. A., Rosato, E., Enright, M. C., Noto, M., Craig, W. and Archer, G. L. (2003): Related clones containing SCC*mec* type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 3574-3579.

Wu, S., Piscitelli, C., de Lencastre, H., Tomasz, A. (1996): Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. In: *Microb Drug Resist* 2 , 4: 435–441

Younger, J.J., Christensen, G.D., Bartley, D.L., Simmons, J.C., and Barrett, F.F. (1987): Coagulase-negative staphylococci isolated from cerebrospinal fluid shunts:

importance of slime production, species identification, and shunt removal to clinical outcome. *J Infect Dis* 156: 548-554.

Ziebuhr, W., Heilmann, C., Götz, F., Meyer, P., Wilms, K., Straube, E. and Hacker, J. (1997): Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect Immun* 65: 890-6.

Ziebuhr, W., Krimmer, V., Rachid, S., Lossner, I., Götz, F., and Hacker, J. (1999): A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol Microbiol* 32: 345-356.

7 Anhang

In Tabelle 19 sind die Personalstämme, die vom Personal der neonatologischen Stationen entnommen wurden, mit ihren Eigenschaften, also der Antibiotikaempfindlichkeit, der Präsenz des *icaA*- und *mecA*-Gens, der Fähigkeit zur Biofilmbildung sowie der Angabe des Sequenztyps dargestellt.

Tabelle 19: Personalstämme mit Eigenschaften wie Antibiotikaempfindlichkeit, Präsenz des *ica*- und *mecA*-Gens, Biofilmbildung und Sequenztyp

Stamm	Antibiotikaempfindlichkeit						<i>mecA</i>	<i>icaA</i>	Adhärenzassay	ST
	TE	E	CN	P	CIP	C				
P1	-	+	+	+	n.d.	n.d.	+	+	n.d.	34
P4	+	+	+	+	n.d.	n.d.	+	-	n.d.	34
P6	-	+	-	+	n.d.	n.d.	-	-	n.d.	43
P7	-	-	-	+	n.d.	n.d.	+	+	n.d.	18
P8	-	+	-	+	n.d.	n.d.	-	-	n.d.	3
P9	+	+	-	+	n.d.	n.d.	+	-	n.d.	n.d.
P12	+	+	+	+	n.d.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.
P17	-	+	-	+	n.d.	n.d.	-	+	n.d.	2
P18	-	+	-	+	n.d.	n.d.	-	-	n.d.	2
P19	+	-	-	+	n.d.	n.d.	+	+	n.d.	7
P20	-	+	+	+	n.d.	n.d.	-	-	n.d.	43
P21	+	-	+	+	n.d.	n.d.	-	-	n.d.	43
P22	-	+	-	+	n.d.	n.d.	-	-	n.d.	103
P25	+	+	+	+	n.d.	n.d.	-	-	n.d.	2
P28	-	-	-	+	n.d.	n.d.	-	-	n.d.	3
P29	+	-	+	+	n.d.	n.d.	-	-	n.d.	3
P41b	-	-	-	+	-	-	+	-	nicht adhärent	3
P45	-	-	-	+	-	-	+	-	nicht adhärent	3
P47	-	+	+	+	-	-	+	-	nicht adhärent	100
P49	+	-	-	+	-	-	+	-	nicht adhärent	101
P50a	+	-	-	+	-	-	+	-	nicht adhärent	101
P52	-	+	-	+	-	-	+	-	stark adhärent	53
P53	+	-	-	+	-	-	-	-	nicht adhärent	2
P57	-	+	-	+	-	-	+	-	nicht adhärent	102
P59	-	+	-	+	-	-	+	-	schwach adhärent	3
P60	-	-	-	+	-	-	+	-	schwach adhärent	2
P62	-	+	-	+	-	-	+	+	stark adhärent	28
P63	-	+	+	+	-	-	+	-	nicht adhärent	43
P64	-	+	-	-	-	-	+	-	nicht adhärent	2
P65	-	+	-	+	-	-	+	-	stark adhärent	53
P67	-	-	-	+	-	-	-	-	nicht adhärent	2
P71	-	+	-	+	-	-	-	-	nicht adhärent	44
P72	-	+	-	+	-	-	-	-	nicht adhärent	43

P1-P72 Personalstamm, TE-Tetracyclin P-Penicillin, E-Erythromycin, CN-Gentamicin, CIP-Ciprofloxacin, C-Chloramphenicol, ST- Sequenztyp, + positive, - negative, n.d. nicht dokumentiert

Neue Allele

Allel 200 bei *pta* K1a, K1b, K1c, M30 c

ACTGGAGATACAGTAAGACCAGCATTACAAATTATCAAACTAAACCTGGTGTAT
CTAGAACATCTGGTATTTTCTTTATGATTAAAGGTGATGAACAATATATTTTGGAA
GATTGTGCTATTAATCCAGAATTAGATGCTCAGGGACTTGCTGAAATTGCAGTAG
AGAGTGCCAAATCAGCACAAAGCTTTGGAATGGACCCTAAAGTAGCTATGTTAA
GCTTTTCTACAAAAGGTTCTGCTAAATCGGATGATGTTACTAAAGTGCAAGAAGC
ATTGAAGTTAGCTCAAGAAAAAGCTGAAGCGGATCAATTAGAGCATGTAGTTATT
GATGGGGAATTCCAATTTGACGCTGCTATTGTTCCCTAGCGTAGCAGAGAAGAAA
GCACCTGGTGCAAAAATTCAAGGTGATGCGAATGTATTTGTTTTCCCTAGTCTAG
AAGCAGGTAATATTGGTTATAAGATTGCTCAACGTTTA

Allel 200 bei *yqi* K1d, K1f, K30c, K30 Iso

ATTCATGGTGGTGTGCCAGAAGCGGTACCTTCTTTTACTGTAAATAAAGTTTGCG
GTTCTGGATTAAGCGATTCAACTTGCCTATCAATCTATTGTAGCGGGAGATAA
TGAGATTGTTATCGCTGGAGGCATGGAAAGTATGTCTCAATCTCCAATGCTTCTT
AAAAATAGTCGTTTTCGGTTTTAAATGGGAAATCAAACCTTTAGAAGATAGTATGAT
AGCTGATGGTTTAACTGATAAGTTTAAATGACTACCATATGGGCATCACAGCCGAA
AATCTAGTTGAACAGTATCAGATTAGTCGTAAAGAACAAGATCAATTTGCATTCTG
ATTCCCAACAAAAAGCATCACGTGCACAACAAGCAGGTGTGTTTGATGCTGAAA
TTGTACCTGTAGAGGTACCACAACGTAAAGGTGATCCCCTGATGATTTCTCAAG
ATGAAGGCATTAGACCTCAAACGACAATTGATAAG

Allel 200 bei *arcC* M 30b

TTCTACACTAAAGAAGAAGCAAATCGTATTCAACAGGAAAAAGGTTATCAATTTG
TAGAAGATGCTGGTCGAGGTTACCGTCGCGTTGTACCATCACCACAACCAATGT
CTATTATCGAACTGGAAAGTATTAAACTCTAGTAGAAAATGACACACTCGTCAT
CGCTGCAGGTGGAGGTGGTATAACCAGTCATTCGCGAACAGCATGATAGCTTTAA
AGGTATAGATGCCGTCATCGATAAAGACAAAACAAGTGCATTATTAGGTGCTGAT

ATTCATTGTGATCAACTCATTATTTAACAGCGATTGATTATGTTTATATCAACTAT
CATACTGACCAACAACAAGCACTTAAAACAACAAATATAGATACGCTTAAAACAT
ATATTGAAGAAAAACAATTTGCCAAAGGCAGCATGCTACCTAAAATCGAATCTGC
CATCTCCTTTATTGAAAATAATCCT

Allel 200 bei *gmk* K 23.1c

AAGGGAAGTGTAGAAAGAAGATATTTGAAGACCCAAGTACTTTCATATAAGTATT
CTATATCGATGACGACACGTCATATGCGTGAAGGTGAAATTGATGGTGTAGATT
ACTTCTTTAAAACAAGGAAGAATTTGAGGCGTTAATTAAGACGACCAGTTTAT
TGAGTATGCACAATATGTAGGTAATTACTATGGTACACCTGTACAATATGTAAG
GATACTATGGAAGAAGGTCATGACGTCTTTTTAGAAATCGAAGTTGAAGGTGCTA
AGCAAGTAAGAAAGAAATTTCCAGATGCGTTGTTTCATATTTTTAGCGCCTCCAAG
TTTAGATGACTTGAAAGAACGTATTGTTGGTAGAGGAAGTGAATCAGATGAAAAG
ATCAAAGCCGTGTGAACGAGGCGCGAAAAGAAGTAGAAATGATGAATTTATAC
GACTACGTTGTAGTTAACGACGAGGTT

Allel 200 bei *glpk* M1j

ACGCTATTGTTTGGCAATCACGTCAGACACAGGATATTTGTACAAATTTAAAGGA
ACAAGGCTATGAAGAAACATTTAGAGAAAAACAGGTTTACTTTTAGACCCGTAC
TTTGCGGGAAGTAAAGTAAATGGATTCTTGATCATGTTGAAGGTGCTAGAGAAA
AAGCTGAAAATGGTGATTTACTCTTCGGAACAATCGATTCATGGTTAGTATGGAA
ATTGTCAGGGCGTACTGCTCATATTACAGATTACACAAATGCAAGTCGTACATTA
ATGTTTAATATTTATGACCTAAAATGGGATGATGAGTTGTTAGAACTCTTAGATAT
TCCTAAACAATGTTACCTGAAGTTAAAGAATCAAGTGAAATTTACGGGAAAAGT
ATCGACTATCACTTCTTTGGACAAGAAGTACCTATTGCTGGTATTGCAGGTGACC
AACAAGCAGCATTATTTGGTCAAGCA

Danksagung

Ich möchte allen danken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben!

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. W. Thomas und Frau PD Dr. med. W. Ziebuhr, die die Arbeit mit viel Engagement und Geduld betreuten sich und sich stets Zeit für mich nahmen.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Dr. S. Kositska für die Einarbeitung und Betreuung im Labor und fürs Korrekturlesen der Arbeit. Vielen Dank für die sehr freundliche Betreuung!

Für die Unterstützung im Labor danke ich dem gesamten Laborteam des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg. Herzlichen Dank auch an Frau Christine Ströbele für die Einarbeitung! Vielen Dank an MTA Frau Elena Katzowitsch für die Bearbeitung der restlichen Personalstämme und Bereitstellung deren Ergebnisse.

Weiterhin danke ich dem Institut für Virologie der Universität Würzburg für die Sequenzierung der Stämme sowie dem Institut für Mikrobiologie der Universität Würzburg für die Bereitstellung der klinischen Isolate.

Curriculum vitae

Persönliche Angaben:

Name	Eva Gellichsheimer
Wohnort:	74592 Kirchberg/Jagst-Hornberg
Geburtsdatum:	07.05.1983
Geburtsort:	Schwäbisch Hall

Schulbildung:

August 1989 – Juli 1993	Grundschule Kirchberg/Jagst
August 1993 – Juni 2002	Gymnasium „Schloss-Schule Kirchberg“, Abitur Juni 2002

Akademische Ausbildung:

10/2002-11/2008	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians- Universität Würzburg
09/2004	Physikum
11/2008	Staatsexamen Medizin, Approbation als Ärztin

Weiterbildung Allgemeinmedizin:

01/2009-06/2010	Assistenzärztin Frauenklinik, Diakonie-Klinikum Schwäbisch Hall
09/2010-06/2012	Assistenzärztin Innere Medizin, Diakonie-Klinikum Schwäbisch Hall
Seit 07/2012	Assistenzärztin Allgemeinmedizin, „Praxicum“ Kirchberg an der Jagst

Kirchberg, November 2013