

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität Tübingen**

Lehrbereich: Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth

**Genomveränderungen in *Staphylococcus aureus*
während der chronischen Lungeninfektion
bei Zystischer Fibrose**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Saskia Matias y Papenberg
aus
Stuttgart**

2005

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. C. Wolz

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Stern

Für meine Großmutter und meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
1. EINLEITUNG	3
1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> : Epidemiologie und Ökologie	3
1.2. Pathogenitätsfaktoren von <i>S. aureus</i>	4
1.3. <i>S. aureus</i> als Krankheitserreger	5
1.4. <i>S. aureus</i> und Zystische Fibrose (CF)	7
1.4.1. Zystische Fibrose: Ätiologie und Pathogenese	7
1.4.2. Zystische Fibrose: Klinische Manifestationen und Prognose	7
1.4.3. Zystische Fibrose: Die Rolle von <i>S. aureus</i>	8
1.4.4. Zystische Fibrose: Therapie	9
1.5. Molekulare Adaptationsmechanismen von Bakterien	10
1.6. Vergleichende Genomanalyse bei <i>S. aureus</i> und Typisierungsmethoden	11
1.7. Zielsetzung der Studie	15
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1. Chemikalien, Enzyme, Molekulargewichtsstandart, Materialien und Geräte	17
2.2. Medien und Stammlösungen	19
2.3. Untersuchungsmaterial	20
2.4. Isolierung von <i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.5. Typisierung von <i>Staphylococcus aureus</i> -Isolaten mittels PFGE	21
2.5.1. DNA-Isolierung	21
2.5.2. Restriktionsverdau	22
2.5.3. Elektrophorese	22
2.6. Polymorphismus des <i>agr</i> -Locus und des <i>cap</i> -Locus	23
2.6.1. DNA-Isolierung	23
2.6.2. PCR	23

2.6.3.	Sequenzierung	25
2.6.4.	Restriktionsverdau mit <i>DraI</i>	26
2.7.	In vitro follow-up-Isolate	27
2.7.1.	Subkultivierung auf Festmedien	27
2.7.2.	Subkultivierung in Flüssigmedien	27
2.8.	Statistische Analyse	28
3.	ERGEBNISSE	29
3.1.	Erfassung von klonalen <i>S. aureus</i> -Folgeisolaten	29
3.2.	Häufigkeit von Genomveränderungen bei <i>S. aureus</i> während der Infektion und Kolonisation	39
3.3.	Genomtypverteilung und der Zusammenhang zwischen Genomtyp und Genomveränderung	41
3.4.	Beobachtungen des Rekombinationsverhaltens von <i>S. aureus</i> in vitro	44
3.5.	Fallbeispiel des Verhaltens von <i>S. aureus</i> bei einer <i>S. aureus</i> -assoziierten Hauterkrankung	46
4.	DISKUSSION	48
4.1.	Genomveränderungen während der Kolonisation bzw. Infektion anderer Patientengruppen	49
4.2.	Potentielle Selektionsbedingungen, die zu Genomveränderungen führen können	51
4.3.	Genomtypspezifische Veränderungsrate	53
4.4.	Molekulare Ursachen von Genomveränderungen	54
5.	ZUSAMMENFASSUNG	57
6.	LITERATUR	59
	DANKSAGUNG	69
	LEBENS LAUF	70

1. EINLEITUNG

1.1. *Staphylococcus aureus*: Epidemiologie und Ökologie

Staphylococcus aureus ist ein gram-positives, fakultativ anaerobes, unbewegliches Bakterium, welches den *Micrococcaceae* zugeordnet wird (51, 65). Die circa 1 µm im Durchmesser großen Kokken bilden traubenförmige Einheiten (101). Das natürliche Reservoir von *S. aureus* ist der Mensch, vorzugsweise der Nasenrachenraum und seine unmittelbare Umgebung (65). Die Pathogenität von *S. aureus* lässt sich durch seine große Widerstandsfähigkeit und seine Anpassungsfähigkeit an den Wirt erklären. *S. aureus* kann große Temperaturschwankungen überleben. Ein Zellwachstum findet zwischen 10 und 45°C noch statt. Seine Stabilität gegenüber Trockenheit erklärt den Nachweis von *S. aureus* außerhalb des menschlichen und tierischen Organismus. *S. aureus* kann in der Luft, im Staub, auf Textilien und trockenen Oberflächen relativ lange persistieren. Für das Überleben in hohen NaCl-Konzentrationen ist eine Osmoprotektion verantwortlich, die ein Wachstum in Medien bis zu 20% NaCl-Gehalt möglich macht (101). Diese Fähigkeit erklärt das Wachstum in Lebensmitteln mit hohem Salzgehalt, beispielsweise in Konservendosen (3, 101).

Bei etwa 30% der Bevölkerung lässt sich *S. aureus* regelmäßig auf der vorderen Nasenschleimhaut nachweisen, dies häufig nicht kontinuierlich. Damit wird zwischen Trägern, Nicht-Trägern und Intermittierenden-Trägern unterschieden (44). Die Kolonisation der Nase wird für den Träger als harmlos betrachtet. Eine nicht genau geklärte Disposition hinsichtlich der Kolonisation mit *S. aureus*, wird diskutiert (44). Als Krankenhausinfektionserreger spielt *S. aureus* eine große Rolle, da er für eine große Anzahl von nosokomialen Infektionen verantwortlich gemacht wird (79). Ein Beispiel hierfür sind postoperative Wundinfektionen oder das Toxic-Shock-Syndrom (77). Durch *S. aureus*-Träger im Krankenhauspersonal oder im Patientenkollektiv kann der

Keim aerogen oder durch Hautkontakt auf andere Patienten übertragen werden (11, 45, 92). Trotzdem wird angenommen, dass bei den meisten, durch *S. aureus* verursachten Infektionen, eine endogene Infektion aus dem eigenen Reservoir, ausgehend von dem Nasen-Rachenraum, vorliegt (44, 97). Studien beweisen, dass bei infektionsgefährdeten Patienten - z. B. Dialyse-Patienten - die Infektionsrate durch Anwendung einer bakteriziden Salbe (Mupirocin) im Nasenvorhof gesenkt werden kann (35). Da eine Resistenzentwicklung der *S. aureus*-Keime gegen Mupirocin zu erwarten ist, wird der breite Einsatz dieser Substanz kontrovers diskutiert (21, 100).

Dass *S. aureus*-assoziierte Infektionen gerade in den letzten Jahren und Jahrzehnten so an Bedeutung gewonnen haben, liegt unter anderem an der zunehmenden Resistenzentwicklung dieses Keimes (50). Methicillinresistente *S. aureus*-Stämme werden schon lange auf Verbreitung und Übertragungswege untersucht. Sie zeichnen sich nicht nur durch die Resistenz gegen alte β -Lactam-Antibiotika aus, sondern zunehmend auch durch eine gleichzeitige Resistenz gegenüber anderen Antibiotika. Der unkontrollierte Einsatz von Antibiotika fördert die Zunahme dieser Resistenzen. Es ist zu befürchten, dass in den nächsten Jahren die Wirksamkeit des Ausweichantibiotikums Vancomycin noch verloren geht (6, 91).

1.2. Pathogenitätsfaktoren von *S. aureus*

S. aureus verfügt über verschiedene Adhärenz- und Virulenzfaktoren mit unterschiedlichen Aufgaben. So können spezifische Bindungsproteine für die initiale Kolonisation exprimiert werden. Eine Anzahl von Oberflächenproteinen, welche als Adhäsine agieren, befähigen die Bindung von *S. aureus* an Matrixproteine (51) und andere Gewebsbestandteile wie beispielsweise Glykolipide (46) und Mukuskomponenten. Des Weiteren kann es auch zur direkten Bindung an Endothel- und Epithelzellen kommen. Dies ist für die initiale Kolonisation der Nase, Lunge, etc. von Bedeutung (37, 94).

S. aureus ist in der Lage, zum Schutz vor der lokalen Immunantwort des Wirtes, Abwehrproteine zu bilden. So wird von mehr als 95% aller *S. aureus*-Stämme das zellgebundene Protein A exprimiert, welches durch Bindung von humanem IgG die Opsonierung der Bakterien verhindert und damit wahrscheinlich einen Phagozytoseschutz vermittelt.

S. aureus exprimiert eine Vielzahl von extrazellulären Virulenzfaktoren, hauptsächlich Exoenzyme und Exotoxine, welche maßgeblich für die Pathogenität des Bakteriums verantwortlich sind (48). Je nach Stamm können Invasine und/oder Toxine sekretiert werden, die für eine Infektion relevant sind. Ein Beispiel hierfür ist die Synthese so genannter pyogener Superantigene, welche für die *S. aureus* bedingte Lebensmittelintoxikation und den septischen Schock verantwortlich gemacht werden (5, 16, 81). Verschiedene Proteasen stehen im Verdacht, für die Inaktivierung von Wirtsproteinen eine Rolle zu spielen (4). Auch andere Toxine werden von *S. aureus* sekretiert, wie z. B. Exfoliativtoxine, Phospholipase C. Des Weiteren verfügt *S. aureus* über eine Anzahl an Hämolsinen. So ist das α -Toxin (Hämolysin, *hla*) der wahrscheinlich wichtigste Virulenzfaktor von *S. aureus*. Durch dieses sekretierte Protein kommt es zur Bildung von Poren auf der Zellmembran und damit zu einem Verlust des osmotischen Gleichgewichts der Zelle, was letztendlich zur Lyse der Zelle führt. Eine humanpathogene Bedeutung wird für das α -Toxin aufgrund der hohen Sensitivität von Thrombozyten, Monozyten, Lymphozyten und Endothelzellen gegenüber dem Toxin vermutet (28).

1.3. *S. aureus* als Krankheitserreger

Als potentiell pathogener Keim hat *S. aureus* vor allem als nosokomialer Erreger in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen (22). Durch invasive medizinische Eingriffe, Wunden und Immunsuppression erhält *S. aureus* die Gelegenheit, die natürlichen Barrieren, wie z. B. die Haut und die Schleimhaut, zu überwinden und lokale wie auch systemische Infektionen zu verursachen.

Bei Menschen und Tieren kann er opportunistisch eine Vielzahl von milden bis lebensbedrohlichen Infektionen auslösen, wie z. B. Abszesse, Mastitis, Pneumonien, Sepsis, Osteomyelitis, Toxic-Shock-Syndrom, Endokarditis und Wundinfektionen (51). Die zum Teil schwerwiegenden Erkrankungen, meist pyogene Prozesse, hängen von dem Infektionsort, der Immunitätslage des Patienten und der Virulenz des Infektionsstammes ab (13, 84).

So ist der Furunkel, die eitrige Parotitis und die Mastitis puerpalis pathognomonisch für *S. aureus*. Sowohl die primäre hämatogene Osteomyelitis, eine oft im Kindesalter auftretende schwerwiegende Erkrankung, wie die sekundäre, posttraumatische oder postoperative Osteomyelitis können durch *S. aureus* verursacht werden (20). Lebensbedrohlich sind nach wie vor *S. aureus*-Bakteriämien, deren Verlauf durch Endokarditis und Mikroabszessbildung in verschiedenen Organen erschwert wird und im septischen Schock enden kann (12, 40). Auch die *S. aureus*-Pneumonie ist durch ihre Neigung zur Abszessbildung mit einer hohen Mortalität verbunden (31).

S. aureus kann durch die Vielzahl verschiedener Enterotoxine Erkrankungen hervorrufen. Die Ursache dafür sind Superantigene, welche im Infektionsherd gebildet werden können, oft aber auch außerhalb des Patienten gebildet werden, wie im Fall der Enterotoxinbedingten Gastroenteritis, wo das Toxin in der Nahrung gebildet wird (26).

Das Toxic Shock Syndrome Toxin 1 (TSST1) ist eines der bekanntesten Toxine von *S. aureus*. Es verursacht das Toxic Shock Syndrome, eine Erkrankung, die meist in Zusammenhang mit der Menstruation, vor allem bei jungen Frauen auftritt und mit Exanthem, Fieber und Hypotonie einhergehen kann, bis hin zum vollständigen Organversagen (77). Eine andere Toxinvermittelte Erkrankung ist das Staphylococcal Scaled Skin Syndrom (SSSS). Sie kommt vorwiegend bei Neugeborenen und immunsupprimierten Menschen vor und geht mit einer lebensbedrohlichen Ablösung des Stratum corneum der Haut einher (49, 71).

1.4. S. aureus und Zystische Fibrose (CF)

1.4.1. Zystische Fibrose: Ätiologie und Pathogenese

Die Zystische Fibrose (CF) ist mit einer Prävalenz von 1:2500 die häufigste autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselstörung in der Bundesrepublik Deutschland. Das für die Krankheit verantwortliche Gen befindet sich auf dem langen Arm des Chromosom 7 und wird als Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene (CFTR-Gen) bezeichnet. Von über 500 beschriebenen Mutationen auf dem CFTR-Gen (9) lässt sich bei circa 70 % der CF-Patienten, die Mutation $\Delta F 508$ nachweisen. Das CFTR-Gen kodiert für das Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Protein (CFTR), ein Membranprotein des cAMP-abhängigen Cl^- -Kanals. Bei den Mutationen des CFTR-Gens ist CFTR fehlerhaft angelegt. Dies führt zu einem erschwerten, epithelialen Na^+ - Cl^- -und HCO_2^- -Transport (47, 85). Durch vermehrte Produktion, erhöhte Viskosität und veränderte Elektrolytzusammensetzung des Sekrets aller exokrinen Drüsen kommt es vor allem zu Komplikationen im Bereich der Atemwege und des Gastrointestinaltrakts (18, 19, 75).

1.4.2. Zystische Fibrose: Klinische Manifestationen und Prognose

Ein häufiges Frühsymptom in der Neugeborenenperiode ist die gastrointestinale Blockade (Mekonium-Ileus) (19). Ferner leiden die jungen Patienten aufgrund einer exokrinen Pankreasinsuffizienz unter Maldigestion und Gedeihstörungen (90). Auch der endokrine Teil des Pankreas kann betroffen sein. Als Folge manifestiert sich später häufig ein Diabetes mellitus (54). Durch die unzureichende Chloridreabsorption in den Schweißdrüsen weist der Schweiß erhöhte Kochsalzwerte auf. Dies kann man sich in der Frühdiagnostik der Zystischen Fibrose, z. B. im Falle einer positiven Familienanamnese, zunutze machen, indem die Natrium-Chlorid-Konzentration des Schweißes bestimmt wird (57).

Die respiratorischen Probleme beginnen meist mit der Verstopfung der kleinen Bronchien. Das wasserarme, hochvisköse Lungensekret kann nicht, oder nur schlecht abfließen. Dadurch wird die Ausatmung erschwert und die Entstehung eines Emphysems begünstigt. Die Folge ist eine Vergrößerung des Totraumes und eine Verminderung des Atemvolumens. Das viskös veränderte mukoides Sekret im Bronchialtrakt begünstigt die Besiedelung mit Bakterien. Dadurch kommt es zur eitrigen Bronchitis, lobulären Pneumonie und segmentalen Atelektasen. Sekundär ist ein fibrotischer Umbau der betroffenen Organe die Folge (75).

Circa 80-95 % der CF-Patienten sterben an respiratorischem Versagen (60, 62). Aufgrund sich ständig weiterentwickelnder Diagnostik und Therapie hat sich die Lebensqualität jedoch inzwischen erheblich verbessert (73). Die mittlere Lebenserwartung in Deutschland ist auf über 30 Jahre angestiegen (38).

1.4.3. Zystische Fibrose: Die Rolle von *S. aureus*

Aufgrund des CFTR-Defektes entstehen in der Lunge von CF-Patienten lokale Entzündungen (17, 75). Die Lungenschädigung kann eventuell auch als Folge viraler Infektionen entstehen (55). Auch nichtspezifische Entzündungsvorgänge scheinen eine Rolle zu spielen. Bereits im Alter von 4 Wochen konnten im Bronchialsekret von CF-Kindern ohne positiven Nachweis von Bakterien oder Viren erhöhte Entzündungsparameter nachgewiesen werden (98). Die Vorschädigung der Lungenschleimhaut begünstigt die bakterielle Kolonisation.

Pathognomonisch für die Zystische Fibrose ist die chronische bakterielle Lungenbesiedelung. Im Krankheitsverlauf lassen sich vor allem *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) und *S. aureus* nachweisen (55). Diese konnte man bislang in Lungengewebschnitten nur im Mukus darstellen, obwohl eine Bindung an das respiratorische Epithel

theoretisch möglich ist (44). Die spezifische Bindung von *S. aureus* zu Bestandteilen des Muzins wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen (44, 83, 93, 95).

S. aureus kann meist schon früh aus Rachenabstrichen, bzw. aus dem Sputum von CF-Patienten isoliert werden. Da die Infektion mit *P. aeruginosa* erst in höherem Alter zu erfolgen scheint, wird die Infektion der Lunge mit *S. aureus* als begünstigender Faktor für die spätere Infektion mit *P. aeruginosa* betrachtet (52, 85). Andererseits wurde beobachtet, dass *P. aeruginosa* das Wachstum von *S. aureus* durch bestimmte Enzyme behindern kann (7, 53). Die Lungeninfektion mit *S. aureus* scheint durch autologe Übertragung aus dem Nasen-Rachenraum zu geschehen. In rund 80 % der Fälle lässt sich derselbe Keim in der Nase wie im Sputum nachweisen (29). Bei anderen Patientenkollektiven konnte bereits die ausschlaggebende Rolle der Nasenkolonisation für nachfolgende Infektionen eindeutig belegt werden (44). Bislang gibt es keine Hinweise für CF-spezifische *S. aureus*-Stämme (29).

1.4.4. Zystische Fibrose: Therapie

Eine kausale Therapie der Zystischen Fibrose ist bislang nicht möglich. Im Vordergrund steht die Verbesserung der Lebensqualität durch Kompensation der Funktionsstörung betroffener Organe und die Hinauszögerung der lebenslimitierenden Schädigung der Lunge. Die Therapie stützt sich auf drei Säulen.

Einerseits sind eine ergänzende Ernährung und eine erhöhte Kochsalz-Zufuhr erforderlich. Die fehlenden Pankreas-Enzyme, sowie nicht ausreichend gebildete Hormone müssen ersetzt werden. Ferner wird durch Physiotherapie und Inhalationen die Lungenfunktion verbessert. Der antibiotischen Therapie wird besondere Bedeutung zugemessen und ist insbesondere für *S. aureus* doch sehr umstritten (76, 87). Da es keine einheitlichen Richtlinien gibt, wird die

antibiotische Therapie von Zentrum zu Zentrum unterschiedlich gehandhabt. Der Grund dafür sind sich widersprechende Studienergebnisse. Während einige Autoren eine prophylaktische Dauertherapie gegen *S. aureus* befürworten (43, 59, 99), halten andere eine intermittierende Therapie bei positivem Rachenabstrich für ausreichend (10, 82, 89). Auch hinsichtlich des Einflusses von Antibiotika auf die Nasenbesiedelung gibt es Widersprüche. Obwohl systemisch eingesetzte Antibiotika keine ausreichende Wirkung gegen die Keime der Nasenflora besitzen, zeigen epidemiologische Studien, dass CF-Patienten ohne Antibiotikatherapie eine signifikant höhere Prävalenz von *S. aureus* im Nasenvorhof aufweisen als Patienten mit Antibiotikatherapie oder die gesunde Population (29). Letztendlich kann man aber davon ausgehen, dass, auch wenn hauptsächlich *Pseudomonas aeruginosa* für den respiratorischen Verfall von CF-Patienten verantwortlich gemacht wird, eine durch *S. aureus* verursachte Infektion ohne antibiotische Therapie zur früheren Lungendestruktion des Patienten und damit zu einer verkürzten Lebenserwartung führt (36).

1.5. Molekulare Adaptationsmechanismen von Bakterien

Bakterien vermehren sich prinzipiell asexuell durch Zellteilung. Trotzdem verfügen sie über eine Anzahl von Mechanismen des Transfers von Erbgut, welche die Evolution der Bakterien mitbestimmen. Durch ‚parasexuelle‘ Prozesse können sowohl Resistenzmechanismen als auch Virulenzfaktoren ausgetauscht werden. Es gibt unterschiedliche molekulare Mechanismen, die zur Evolution der Bakterien beitragen. Veränderungen durch Mutationen finden kontinuierlich auf der Einzell-Zell-Ebene statt. Die meisten dieser Mutationen sind für das Bakterium schädlich und nur Mutanten mit einem Selektionsvorteil unter den entsprechenden Bedingungen setzen sich in der Gesamtpopulation durch.

Bei der Rekombination werden DNA-Sequenzen interchromosomal oder intrachromosomal ausgetauscht (2). Dadurch entstehen neue Genomkombinationen und es können z. B. Resistenz-Determinanten zwischen Donor- und Empfänger-Stämmen übertragen werden. Bei der Transformation wird die ‚nackte‘ DNA direkt von den Bakterienzellen aufgenommen, während die Transduktion mit Hilfe von Bakteriophagen abläuft. Als Konjugation wird eine durch Zell-zu-Zell-Kontakt stattfindende Übertragung von konjugativen Elementen der DNA bezeichnet (Plasmide, konjugative Transposons).

S. aureus wird als nicht kompetent für die Transformation angesehen. Deswegen sind Phagen wahrscheinlich die primären Vektoren des horizontalen Gentransfers und somit als wesentlich für die innerartliche Diversifikation anzusehen (64). Bisher konnten die ursächlichen Mechanismen der Phageninduktion noch nicht gänzlich geklärt werden. Dennoch häufen sich die Belege, dass Phagen bevorzugt während der Infektion induziert werden. Die Phagenmobilisierung während der Infektion kann als bedeutend sowohl für die evolutionäre Entwicklung der Spezies, als auch hinsichtlich der Pathogenese angesehen werden (1). Bei *S. aureus* sind gleich mehrere Virulenzfaktoren, wie z. B. Enterotoxine, phagenkodiert. Weiterhin können die Phagen spezifisch in Gene für potentielle Virulenzfaktoren inserieren und diese dadurch inaktivieren (48, 66).

1.6. Vergleichende Genomanalyse bei *S. aureus* und Typisierungsmethoden

In den letzten Jahren wurde die Evolution pathogener Mikroorganismen vermehrt diskutiert (24, 63). Die Nase kann als natürliches Reservoir von *S. aureus* angesehen werden und es ist daher anzunehmen, dass der Keim an diese Umweltbedingung im Laufe der Langzeitevolution gut angepasst ist. Zu selektiven Veränderungen kann es jedoch durch Antibiotikatherapie, die meist nicht zur Eradikation des Keimes aus der Nase führt, kommen. Daneben ist

vorstellbar, dass es auf Grund der veränderten Wachstumsbedingungen und der provozierten Immunreaktion nach Eindringen des Keimes in den Wirt, zu selektiven Veränderungen kommt. Solche Veränderungen könnten während der chronischen Lungeninfektion von CF-Patienten stattfinden. Für *P. aeruginosa* konnte bereits gezeigt werden, dass es bei Zystischer Fibrose zu spezifischen Veränderungen der Bakterien kommt. *P. aeruginosae*-Stämme von chronisch infizierten CF-Patienten zeichnen sich beispielsweise durch einen mukoiden Phänotyp und durch eine erhöhte Mutationsfrequenz aus (58, 68).

Viele Gene, welche möglicherweise für die Virulenz und Anpassungsfähigkeit verantwortlich gemacht werden, sind mit so genannten mobilen Elementen assoziiert. Diese lassen sich hauptsächlich in Transposons, IS-Elemente, Bakteriophagen und Pathogenitätsinseln unterscheiden (48). DNA-Microarray-Studien beweisen, dass der horizontale Gentransfer bei der Evolution von *S. aureus* eine ausschlaggebende Rolle spielt (25, 61). So wurde herausgefunden, dass das *mec*-Gen, welches für die Methizillinresistenz kodiert, mindestens fünfmal zwischen verschiedenen Genomtypen transferiert wurde, und so methizillinresistente Stämme polyklonal sind (25). Es gibt Grund zur Annahme, dass der horizontale Transfer nicht nur unter Bakterien, sondern auch zwischen Prokaryonten und Eukaryonten stattfindet. So wurde bei der Aufschlüsselung des Genoms von *S. aureus* ein Gen für einen Urat-Transporter entdeckt, welches homolog in Vertebraten zu finden ist (48). Anhand der Genomsequenzierdaten wird der Anteil der durch horizontalen Gentransfer erworbenen Gene bei *S. aureus* auf bis zu 50 % geschätzt (48). Über die Frequenz von Mutations- und Rekombinationsereignissen, sowie über die relativen Bedingungen, die zur Veränderung von Bakterienpopulationen führen, ist wenig bekannt.

Grundlegend neue Einblicke in die evolutionären Veränderungen bakterieller Genome wurden erst mit der Entwicklung und Verwendung molekularer Typisierungsmethoden und der vergleichenden Genomanalyse möglich (63). Durch den Vergleich von Genomtypen und der Beobachtung von genetischen

Veränderungen wird versucht, auf ursprüngliche Genomtypen, bzw. Klone zurückzuschließen (25, 86). Klone sind Organismen, welche aus einem Parentalstamm, durch Vervielfältigung (Zellteilung) entstanden sind und dadurch die gleiche genetische Ausstattung haben. Veränderungen eines Klons sind durch Mutation oder Rekombination möglich (2, 23, 86). Man nimmt an, dass sich einige Bakterienspezies im Laufe der Zeit durch Rekombination so stark veränderten, dass das ursprüngliche Genom nicht mehr erkennbar ist. Verschiedene phäno- und genotypische Methoden wurden zur Typisierung von *S. aureus*-Stämmen eingesetzt.

Die Phagentypisierung wird seit über 25 Jahren zur Differenzierung von *S. aureus*-Stämmen durchgeführt. Die unterschiedlichen *S. aureus*-Stämme werden aufgrund ihrer Empfänglichkeit für eine Auswahl von Bakteriophagen klassifiziert. Andere Eigenschaften des Bakteriums werden außer acht gelassen. Eine definitive Aussage über die klonale Verwandtschaft von *S. aureus*-Stämmen kann mit dieser Methode nicht getroffen werden (70).

Mit den klassischen Methoden die zur Phänotypisierung eingesetzt werden, können klonale Zusammenhänge in der Regel nicht aufgeklärt werden. Erst durch die Entwicklung molekulargenetischer Techniken wurde dies möglich. Auf dieser Ebene haben sich im Laufe der Jahre mehrere Typisierungsmethoden etabliert. Eine molekulare Typisierungsmethode ist die *agr*-Typisierung. Das accessory-gene-regulator-Operon (*agr*) ist eines mehrerer globaler Regulatoren, die die Expression von Genen bei *S. aureus* koordinieren. Untersuchungen haben ergeben, dass durch *agr* die Synthese der meisten Virulenz-Gene und anderer extrazellulärer Proteine kontrolliert wird (27). Bezüglich des Polymorphismus im *agr*-Lokus lassen sich die verschiedenen Stämme von *S. aureus* in vier Gruppen unterteilen (I-IV). Maßgeblich für die Unterteilung von *S. aureus* in vier Gruppen ist ein vom *agrD* produziertes extrazelluläres Octapeptid, bekannt als autoinduzierendes Peptid (AIP) und dessen Rezeptor *agrC*. Beide Peptide unterliegen einer hohen Variabilität (39, 41). Diese Methode ist nur für eine grobe Klassifizierung geeignet. Aufgrund der

Stabilität der *agr*-Loci ist diese aber gut reproduzierbar und die *agr*-Typen stellen wahrscheinlich ursprüngliche klonale Linien dar (66).

Circa 90% der *S. aureus*-Stämme produzieren über das *cap*-Gen eine Polysacharidkapsel. Bislang konnten 11 Kapseltypen unterschieden werden, die in *cap1* bis *cap11* klassifiziert werden (88). 80% der *S. aureus*-Isolate sind *cap5* oder *cap8* zuzuordnen. Durch die Kapseltypisierung können nahezu alle *S. aureus*-Stämme in zwei Hauptgruppen untergliedert werden. Diese Methode ist, wie die *agr*-Typisierung, durch die Stabilität des untersuchten Merkmals gekennzeichnet.

Durch die Entwicklung der Multilocus-Sequenz-Typisierung Methode (MLST), eine Methode die aus der Multilocus-Enzym-Elektrophorese (MLEE) hervorgeht und sich auf die unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit von Enzymen stützt, können Verwandtschaftsgrade verschiedener Stämme innerhalb einer Bakterienspezies ermittelt werden (86, 102). Sie basiert auf der Sequenzierung von internen Fragmenten (etwa 450 - 500 bp) von sieben ‚house-keeping‘-Genen. Subpopulationen einer Bakterienspezies werden durch die unterschiedlichen Allel-Profile dieser Gene definiert (24) Die detektierten Punktmutationen können als Maß für die vertikale Evolution der Spezies verwendet werden (67). Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass nicht nur Punktmutationen erfasst werden, sondern anhand der Kongruenz der deduzierten Stammbäume auch auf Rekombinationsereignisse geschlossen werden kann (23). Durch diese Methode konnte festgestellt werden, dass unterschiedliche Bakterienspezies über unterschiedlich hohe Rekombinationsraten verfügen. Während sich beispielsweise *Salmonella enterica* durch eine uniforme klonale Populationsstruktur auszeichnet, ist diese in anderen Spezies, wie z. B. *Helicobacter pylori* auf Grund hoher Rekombinationsraten nicht mehr erkennbar (24). Dies kann durch die hohe Kompetenz dieser Spezies zur Transformation, also zur Aufnahmefähigkeit von freier DNA, erklärt werden.

Als Goldstandard der molekularen Typisierungsmethoden hat sich die Puls-Feld-Gel-Elektrophorese (PFGE) durchgesetzt (32, 92). Mit dieser Methode unterscheidet man Bakterienstämme nach Anzahl und Länge von DNA-Fragmenten. Durch den Einsatz von Restriktionsenzymen, welche an seltenen Nukleotidsequenzen schneiden, erhält man für jeden Klon ein typisches Fragmentmuster. Die PFGE erfasst Fragmentlängenunterschiede und somit DNA-Sequenzveränderungen, welche auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen sind, wie z. B. Punktmutationen, Insertionen, Deletionen usw. (80). Durch Bandenmustervergleiche lassen sich Verwandtschaftsgrade aufstellen. Aufgrund der hohen Diskriminationsfähigkeit stellen Stämme mit identischem, bzw. sich ähnlichem Bandenmuster klonale Komplexe dar.

PFGE-Typisierung hat sich als Methode zur Stammdiskriminisation bewährt (29, 32). Durch Bandenmustervergleiche lassen sich Subtypen (Klone) von Stämmen identifizieren (8, 80). Als Subtypen werden Stämme anerkannt, welche sich in nur wenigen Banden vom Originalstamm unterscheiden. Eine Bandenmusteränderung könnte auf einen genetischen Transfer hinweisen, da die Veränderung auf eine Rekombination im Genom zurückzuführen ist. Somit scheint PFGE eine Methode zu sein, die zur Aufklärung klonaler Beziehungen geeignet ist. Studien haben ergeben, dass die Ergebnisse der PFGE gut mit den Ergebnissen der MLST korrelieren (33, 72).

1.7. Zielsetzung der Studie

Während früherer molekular-epidemiologischer Studien der Arbeitsgruppe, wurde beobachtet, dass sich *S. aureus*-Folgeisolaten von CF-Patienten durch einzelne Veränderungen im Restriktionsfragmentmuster nach PFGE unterscheiden. Es ist daher anzunehmen, dass es im Laufe der Infektion zu bakteriellen Genomveränderungen kommen kann.

Ziel dieser Studie war es, Genomveränderungen während Kolonisation und Infektion systematisch zu erfassen und die Frequenz solcher Ereignisse zu bestimmen. Es sollte insbesondere untersucht werden, inwieweit diese während der chronischen Lungeninfektion bei CF-Patienten häufiger auftreten als während der asymptomatischen *S. aureus*-Kolonisation der Nase gesunder Individuen. Weiter sollte geklärt werden, ob dies gegebenenfalls mit dem Vorkommen CF-spezifischer *S. aureus*-Stämmen assoziiert ist.

Hierfür sollten *S. aureus*-Folgeisolate von CF-Patienten und Nasenabstrichen gesunder Menschen gesammelt und mittels Puls-Feld-Gel-Elektrophorese typisiert werden. Nur Individuen, die zwischen zwei Probenahmen mit dem gleichen Stamm besiedelt waren, sollten eingeschlossen werden. Die Stamm- (Klon-) Definition sollte primär über die PFGE erfolgen, jedoch durch weitere Typisierungsmethoden überprüft werden. Veränderungen im Restriktionsfragmentmuster von Folge-Klonen wurden als Genomveränderungen definiert.

Ein weiteres Ziel war, aufzuklären ob Genomveränderungen in vitro durch mehrfache Subkultivierung unter normalen wie unter Stressbedingungen beobachtet werden können. Hierzu sollten ausgewählte Stämme, bei denen in vivo Genomveränderungen beobachtet wurden, sowie der prototypische Laborstamm RN6390 verwendet werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien, Enzyme, Molekulargewichtsstandart, Materialien und Geräte

Chemikalien

Agarosen:

- Seakem GTG	FMC, Biozym, Hess. Oldendorf
- Low melting point	Biorad München
- DNA	Biozym, Hess. Oldendorf
- Small DNA	Biozym, Hess. Oldendorf
Borsäure	Merck, Darmstadt
Brij 58	Serva, Heidelberg
BSA	Roche, Mannheim
Casamino acid	Difco, Augsburg
dNTPs	Roche, Mannheim
EDTA	Merck, Darmstadt
EGTA	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerophosphat	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Difco, Augsburg
HCL	Merck, Darmstadt
Laurylsarcosin	Sigma, München
NaCl	Merck, Darmstadt
Na-Desoxycholot	Serva, Heidelberg
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Nuclease- freies H ₂ O	Promega, Mannheim

PCR-Purification-Kit	Qiagen, Hilden
Primer	Invitrogen, Karlsruhe
StaphaurexMurex,	Burgwedel
Tris	Gibco BRL, Berlin
TSB	Oxoid, Wesel

Enzyme

<i>Dra</i> I	Roche, Mannheim
Lysostaphin	Ambi, USA
Proteinase K	Sigma, München
Polymerase Taq Hot Star	Qiagen, Hilden
<i>Sma</i> I	Roche, Mannheim

Molekulargewichtsstandart

Lamda Concatamere	Biorad, München
pGEM	Promega, Mannheim
1 kb-Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
100 bp DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe

Materialien

Schafsblutagarplatten	Heipha, Heidelberg
Mannitolagarplatten	Heipha, Heidelberg
Gusskammern	Biorad, München

Geräte

UV/visible	Pharmacia
Chef DrII PFGE	Biorad, München
Densitometer CS1	Cybertech, Berlin
Bildverarbeitungsprogramm	
WINCAM 2.2	Cybertech, Berlin
PCR-Maschine	Hybaid, Heidelberg

2.2. Medien und Stammlösungen

CYPG:	10 g Casamino acid, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl mit destilliertem H ₂ O auf 935 ml auffüllen und autoklavieren. Sterilfiltrierte 20% Glucose und 1,5 M Glycerophosphat zugeben.
blue juice:	50 Prozent Glycerin, 1mM EDTA pH 8,0, 0,25% Bromphenolblau
dNTP-Mix:	10mM dATP, 10mM dCTP, 10mM dGTP, 10mM dTTP
50x TAE:	2 M Tris-HCl, 1 M Essigsäure, 0,1 M EDTA, pH 8,2
TSA:	1,5 g Agar auf 1 Liter TSB
TSB:	30 g TSB für 1 Liter
5xTBE:	0,05 M Tris, 0,05 M Borsäure, 0,1 mM Na ₂ EDTA, pH 8,2
10xTE:	10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0

2.3. Untersuchungsmaterial

Für die Studie wurden *S. aureus*-Isolate aus Sputen, Rachen- und Nasenabstrichen von 118 CF-Patienten im Alter zwischen 1 und 25 Jahren aus Münster, Tübingen und Florenz, wie auch aus Nasenabstrichen von 208 gesunden Probanden im Alter zwischen 10 und 60 aus Tübingen und Umgebung untersucht. Die *S. aureus*-Isolate stammten größtenteils aus den seit 1994 gesammelten eigenen Isolat-Beständen der Arbeitsgruppe. Ferner wurden uns 38 Folge-Isolate von 5 CF-Patienten aus Münster geschickt. Auch aus Münster stammten 11 Folge-Isolate aus Nasenabstrichen eines Patienten, der unter dem Darier-Syndrom litt, einer *S. aureus*-assoziierten Hauterkrankung. Nur Folgeisolate des gleichen Genomtyps von *S. aureus* wurden in die Studie aufgenommen. Hiermit reduzierten sich die Patientengruppe und die Kontrollpersonen jeweils auf 26 bzw. 38 Individuen. Bei 11 Patienten wurden zwei Folgeisolate mit einem Intervall gesammelt, bei sieben Patienten konnten Isolate mit jeweils zwei Intervallen sichergestellt werden. Weitere drei Patienten lieferten vier Folgeisolate mit drei Intervallen. Ein Patient wies in fünf aufeinander folgenden Isolaten den gleichen *S. aureus*-Genomtyp mit vier Intervallen auf. Sieben Folgeisolate mit sechs Intervallen wurden bei jeweils drei Patienten gesammelt. In der Kontrollgruppe ließen sich bei 23 Personen Folgeisolate mit einem Intervall sicherstellen, zwei Intervalle bei sieben Personen. Bei weiteren sieben Individuen wurden vier Folgeisolate mit drei Intervallen gesammelt, sowie fünf Folgeisolate bei einer Person. Die Intervalllänge variierte in der CF-Gruppe zwischen 6 und 538 Tagen (im Durchschnitt 91 Tage) und in der Kontrollgruppe 31 und 304 Tagen (im Durchschnitt 133 Tage). Alle Isolate wurden zur Auswertung mittels zwei Restriktionsenzymen (*Sma*I, *Csp* I) verdaut und durch Puls-Feld-Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Die Ergebnisse der PFGE wurden durch Kapsel-, Phagen- und *agr*-Typisierung verifiziert.

2.4. Isolierung von *Staphylococcus aureus*

Zur Isolierung von *S. aureus* wurden Abstrichproben und Sputen auf Schafblutagar und Mannitolagar ausgestrichen und 24 Stunden bei 37 °C, inkubiert. Durch die typische Kolonienmorphologie sowie mit Hilfe des Farb-Indikators auf Mannitol wurden mögliche Einzelkolonien subkultiviert und mittels Staphaurex-Test als *S. aureus* identifiziert. Reinkulturen wurden in 1ml Medium/Glycerin (3:1) bei -70°C aufbewahrt.

2.5. Typisierung von *Staphylococcus aureus*-Isolaten mittels PFGE

2.5.1. DNA-Isolierung

Die *Staphylococcus-aureus*-Isolate wurden über Nacht (ÜN) in 5 ml TSB angezogen. Die Bakterien wurden entsprechend einer OD600 = 0,5 mit 12000g für 5 min bei 4°C geerntet. Das Pellet wurde mit 1ml Waschlösung (10mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 M NaCl pH 7.5) gewaschen und in 100 µl derselben Waschlösung resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde auf 55°C erwärmt und mit 100 µl 2% low melting point Agarose (in TE, pH 8.0), die ebenfalls auf 55 °C gehalten wurde, vermischt. Die Lösung wurde in vorgefertigte Gusskammern pipettiert und für 20 min bei 4 °C ausgehärtet. Die Agaroseblöckchen wurden in 1 ml Lysepuffer (6 mM Tris - HCl, 100 mM EDTA, 1 M NaCl, 0,5% Brij 58, 0,2% Na-Desoxycholat, 0,5% Laurylsarcosin pH 7.6) + 100 µg/ml Lysostaphin überführt und ÜN bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde der Lysepuffer durch 1 ml Proteolysepuffer (0,25 M EDTA, 20 mM EGTA, 1% Laurylsarcosin pH 9.0) + 500 µg/ml Proteinase K ersetzt und für 24 h inkubiert. Nach 12 h erfolgte ein Wechseln des Proteolysepuffers. Abschließend wurden die Blöckchen 5 x mit 1 x TE, pH 8 bei 4 °C unter Schütteln gewaschen. Sie konnten in 0,5 M EDTA bei 4 °C für mehrere Monate aufbewahrt werden.

2.5.2. Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau wurde ein ca. 2 mm großes Stück der Agaroseblöckchen abgeschnitten und in TE zum Entfernen des EDTAs gewaschen.

Restriktionsansatz mit *Sma*l (200 µl) :

Probe	ca. 100µl
10x Puffer	20µl
BSA (20 mg/ml)	1µl
Nuclease-freies- H ₂ O	78µl
<i>Sma</i> l (20 U/µl)	1µl

Restriktionsansatz mit *Csp* I (200 µl) :

Probe	ca. 100µl
10x Puffer	20µl
BSA (20 mg/ml)	1µl
Nuclease-freies- H ₂ O	78µl
<i>Eag</i> (20 U/µl)	1µl

Die Inkubation erfolgte bei 25 °C mit *Sma*l und bei 37 °C mit *Cspl* ÜN. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl TE gestoppt.

2.5.3. Elektrophorese

Für die Elektrophorese wurde ein 1% Agarosegel (Seakem GTG) in 0,5 x TBE mit 0,5 x TBE als Laufpuffer verwendet. Als Molekulargewichtsstandard wurden Lamda- Concatamere eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 200 V mit

Pulszeiten von 1 - 45 s für 24 h bei 12 °C. Nach dem Lauf wurde das Gel in 0,5 x TBE mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt und auf einem Transilluminator mit einer Videokamera aufgenommen und digitalisiert.

2.6. Polymorphismus des *agr*-Locus und des *cap*-Locus

2.6.1. DNA-Isolierung

Zur Isolierung der DNA wurden die Isolate in 5 ml TSB ÜN angezogen. Davon wurde je 1 ml bei 10.000 upm 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, danach wurde das Pellet mit 500 µl 1x TE gewaschen. Dem Pellet wurden 500 µl 1x TE und 3 µl Lysostaphin zugefügt und die Proben 20 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde den Proben 500 µl Proteolysepuffer und 5 µl Proteinase K zugesetzt. Es folgte eine Inkubationszeit von 1 Stunde bei 50° C. Die Proteinase K wurde anschließend 10 Minuten lang bei 94° C inaktiviert. Die isolierte DNA wurde für den Einsatz in die PCR 1:100 oder 1:10 verdünnt und im Kühlschrank aufbewahrt.

2.6.2. PCR

Folgende Primer wurden für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt:

agr1801	5'- ACCAGTTTGCCACGTATC - 3'
agr3668	5'- TAAACCACGACCTTCACC - 3'
cap5	5'- GAAAGTGAACGATTAGTAGAA - 3'
	5'- GTACGAAGCGTTTTGATAGTT - 3'
cap8	5'- GTGGGATTTTTGTAGCTTTT - 3'
	5'- CGCCTCGCTATATGAACTAT - 3'

PCR-Mix (50 µl Ansatz):

Die in Tab. 1 aufgeführten Reagentien wurden für den PCR-Ansatz verwendet.

Tabelle 1: Für den PCR-Ansatz verwendete Reagentien. Gesamtmenge des Ansatzes beträgt 50 µl.

Reagenz	Menge
10x Reaktionspuffer	5 µl
dNTP-Mix	4 µl
MgCl ₂ (25mM)	2 µl
Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl
Nuclease-freies H ₂ O	34,5 µl
Polymerase Taq Hot Star	0,5 µl
DNA-Template	2,0 µl

Für die Amplifikation wurde das in Tab. 2 beschriebene Temperaturprofil verwendet.

Tabelle 2: Temperaturprofil für die DNA-Amplifikation in der PCR

Temperatur	Zeit		Anzahl Zyklen
94°C	15 min	Aktivierung der Polymerase	
94°C	1 min	Denaturierung	
55°C - 0,9°C pro Zyklus	1 min	Annealing	10 Zyklen
72°C	2 min	Verlängerung	
94°C	1 min	Denaturierung	
47°C	1 min	Annealing	30 Zyklen
72°C	2 min	Verlängerung	
72°C	10 min	Verlängerung	

Je 5 µl des PCR-Produkts wurden mit je 3 µl blue juice gemischt, auf ein 1%iges Ethidium-Bromid enthaltendes Agarose-Gel aufgetragen und mithilfe von UV-Licht sichtbar gemacht.

2.6.3. Sequenzierung

Die PCR-Fragmente wurden mit einem PCR-Purifikations-Kit gereinigt und in einem externen Labor (4baselab, Reutlingen) sequenziert.

2.6.4. Restriktionsverdau mit *DraI*

Der Restriktionsverdau wurde mit dem Enzym *DraI* durchgeführt (Tab. 3).

Schnittstelle des Restriktionsenzym *DraI* TTT / AAA
AAA / TTT

Tabelle 3: Für den Ansatz des Restriktionsverdaus verwendete Reagentien. Gesamtmenge des Ansatzes: 20 µl.

Reagenz	Menge
DNA aus PCR	7 µl
10x Puffer	2 µl
Restriktionsenzym	1 µl
BSA	1 µl
Nuclease-freies H ₂ O	9 µl

Die Inkubationszeit betrug 4 h bei 37°C.

Je 10 µl des Ansatzes für den Restriktionsverdau wurden mit 3 µl blue juice gemischt, auf ein 3%iges, Ethidium-Bromid enthaltendes Agarose-Gel aufgetragen und mithilfe von UV-Licht sichtbar gemacht.

Anhand des Restriktionsmusters konnten alle Isolate einem der vier bekannten *agr*-Gruppen (I-IV), bzw. einem *cap*-Locus (*cap5* oder *cap8*) zugeordnet werden.

2.7. In vitro follow-up-Isolate

2.7.1. Subkultivierung auf Festmedien

Fünf ausgesuchte *S. aureus*-Stämme - zwei Isolatpaare, welche in vivo Genomveränderungen gezeigt hatten und zusätzlich der Laborstamm RN6390 (Novick) - wurden auf Veränderungen in vitro analysiert. Für die Untersuchung wurden die Isolate auf Schafblutagar ausgestrichen und bei 37 °C bebrütet. Nach 24 h wurden Einzelkolonien auf eine frische Blutagarplatte überimpft und wiederum bei 37 °C inkubiert. Diese Prozedur wurde 33 Mal wiederholt. Circa jede 10 Kultur wurde in 1ml Medium/Glycerin (3:1) bei -70 °C aufbewahrt. Alle Platten wurden visuell ausgewertet und auf phänotypische Veränderungen untersucht (Hämolyse, Morphologie). Phänotypisch veränderte Kolonien wurden separiert, subkultiviert und ebenfalls aufbewahrt.

2.7.2. Subkultivierung in Flüssigmedien

Zwei ausgesuchte *S. aureus*-Stämme wurden in 5 ml eines flüssigen Mediums (CYPG) angeimpft. Diese waren der Laborstamm RN6390 und ein Isolat, welches eine Veränderung im PFGE-Bandenmuster gezeigt hatte. Nach 48 Stunden Bebrütung bei 37 °C wurde die Kultur in neue 5 ml CYPG überimpft. Dies wurde 14-mal wiederholt. Zur visuellen Kontrolle über möglich aufgetretene Veränderungen, wurde jede dritte bis vierte Kultur auf Schafblutagar ausgestrichen. War eine phänotypische Veränderung (Hämolyse, Morphologie) sichtbar, wurden Varianten separat isoliert und eingefroren. Bei der ersten und der zehnten Kultur wurde nach jeweils 16 h wie 48 h eine Keimzahlbestimmung durchgeführt. Dafür wurden serielle Verdünnungen der Bakterienkultur in 0,9% NaCl vorgenommen auf Schafblutagar ausgestrichen und die Lebendkeimzahl bestimmt. Die erste und die letzte Bakterienkultur wurde auf Blutagar ausgestrichen und in 1ml Medium/Glycerin (3:1) bei - 70 °C aufbewahrt.

2.8. Statistische Analyse

Die Transformationsrate wurde sowohl in der CF-Gruppe als auch in der Kontrollgruppe nach der Maximum-Likelihood-Methode geschätzt. Es wurde eine Exponential-Verteilung bis zu dem Zeitpunkt einer Veränderung angenommen. Wurde eine Veränderung in einem Zeitraum der Länge t beobachtet, ließ sich der Beitrag zur Wahrscheinlichkeit durch die Formel,

$$1 - \exp(-\lambda t)$$

ausdrücken, wobei λ für die zu schätzende Transformationsrate steht. Der Kehrwert von λ ist die angenommene Zeit bis zur Veränderung. Im Fall, dass keine Veränderung in einem Zeitraum der Länge t stattgefunden hatte, entsprach der Beitrag zur Likelihood

$$\exp(-\lambda t).$$

Damit die Beobachtungen mit dem Modell verglichen werden konnten (Abb. 3), wurden für die Zeiten, bis zu einer Veränderung Kaplan-Meier Kurven errechnet. Diese Zeiten wurden gemäß einer Gleichverteilung innerhalb des Beobachtungsintervalles zufällig eingesetzt. Zeitintervalle, in denen keine Veränderung stattfand, zählten für die Kaplan-Meier Schätzung als zensierte Beobachtungen.

3. ERGEBNISSE

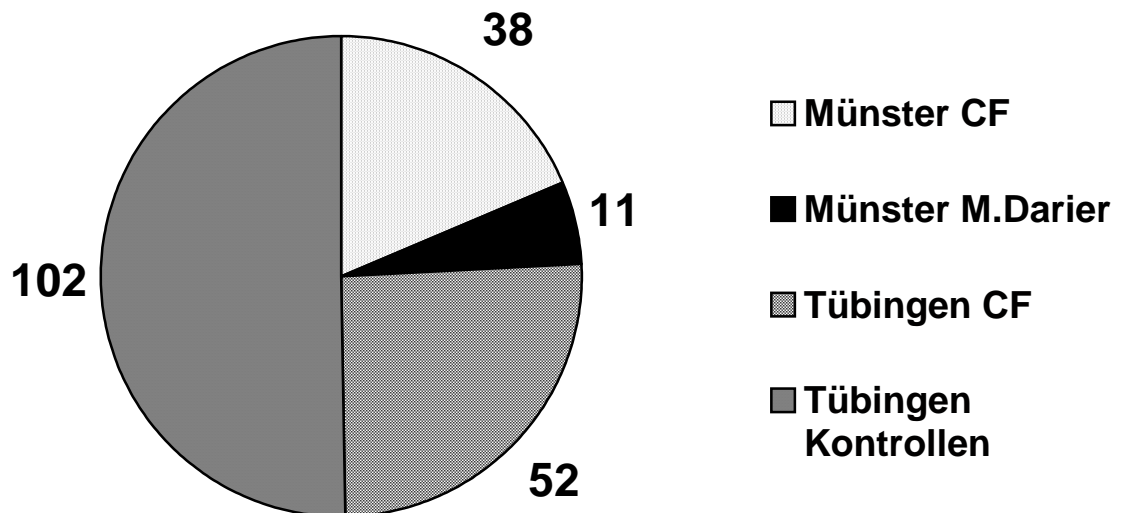
3.1. Erfassung von klonalen *S. aureus*-Folgeisolaten

Für die systematische Erfassung von Genomveränderung während Infektion und Kolonisation wurden Folgeisolate von CF-Patienten und gesunden Kontrollpersonen gesammelt. Ausgehend von der Stammsammlung der Arbeitsgruppe wurden alle bereits typisierten Isolate von CF-Patienten sowie von gesunden Kontrollpersonen, die dem gleichen Genomtyp zugeordnet wurden, ausgewählt. Ferner wurden von einer Arbeitsgruppe aus Münster Folgeisolate von 5 CF-Patienten und einem Patienten, der unter dem Darier-Syndrom leidet, über Jahre hinweg gesammelt. Alle Isolate wurden noch einmal ausgestrichen und typisiert. Im Studienverlauf wurden weitere Nasenabstriche von gesunden Personen aus Tübingen und Umgebung gesammelt, ausgestrichen und typisiert.

Alle Isolate wurden durch PFGE typisiert. Zur Typisierung der Bakterienstämme wurde die DNA mittels PFGE aufgetrennt und die Bandenmuster sowohl visuell als auch computerunterstützt ausgewertet. Es wurden Restriktionsenzyme eingesetzt (*Sma*I, *Eag*I), welche an seltenen Nukleotidsequenzen angreifen, so dass die DNA in relativ große Fragmente unterteilt werden konnte. Die Folgeisolate eines Patienten oder einer Kontrollperson wurden immer in fortlaufender Reihenfolge auf einem PFGE-Gel analysiert. Dies erlaubte den direkten visuellen Vergleich von Folgeisolaten. Genomveränderungen wurden durch zusätzliche, fehlende oder in der Größe unterschiedliche Banden detektiert.

Für die Auswertung wurden die erhaltenen Bandenmuster in eine eigens dafür etablierte Datenbank eingelesen und ihr Verwandtschaftsgrad untereinander durch den Dice-Koeffizienten berechnet.

Für die Analyse von Genomveränderungen während der Infektion wurden nur Individuen berücksichtigt, bei denen sich an mindestens zwei aufeinanderfolgenden Entnahmezeitpunkten der gleiche Genomtyp feststellen ließ. Unter dieser Bedingung ließen sich 93 Isolate von 26 CF-Patienten und 102 Isolate von 38 gesunden Testpersonen für diese Studie sicherstellen. 27 Folgeisolate stammten aus der Nase eines Patienten mit Morbus Darier, einer *S. aureus*-assoziierten Hautkrankheit.



Münster CF: Isolate von an Zystischer Fibrose erkrankten Individuen aus Münster
Münster M. Darier: Isolate von einer unter Morbus Darier leidenden Person aus Münster
Tübingen CF: Isolate von an Zystischer Fibrose erkrankten Individuen aus Tübingen
Tübingen Kontrollen: Isolate von gesunden Individuen aus Tübingen und Umgebung

Abbildung 1: Anzahl und Herkunft aller Individuen, die an der Studie teilgenommen haben

In Tabelle 4 und Tabelle 5 ist ein Überblick aller analysierten Isolate aufgeführt

Tabelle 4: Fälle

Patient	Isolat-Nr. 1	Isolat-Nr. 2	Intervall (Tage)	Quelle	GT	Veränderung
Ital.B	CG29B	CG17A	59	Sputum	17	ja
Ital.E	CG7A	CG27	112	Sputum	1	nein
Ital.G	CG12	CG18	84	Sputum	108	nein
Ital.J	CG8B	CG23C	63	Sputum	2	ja
MH	M96	M97	21	Rachen	109	nein
MH	M97	M99	14	Rachen	109	nein
LF	M90	M91	42	Rachen	16	nein
LF	M93	M94	14	Rachen	16	nein
LF	M94	CFS56B	12	Rachen	16	nein
SE	M46	M47	87	Rachen	36	ja
SE	M47	M48	14	Rachen	36	nein
NE	M30	M31	32	Rachen	36	nein
NE	M31	M44	86	Rachen	36	nein
D	s87	s90	450	Rachen	7	ja
D	s94	s96	391	Sputum	7	nein
H	s105	s107	78	Sputum	2	nein
H	s107	s109	419	Sputum	2	nein
H	s113	s116	119	Sputum	16	ja
H	s122	s124	127	Sputum	16	nein
H	s124	s126	110	Sputum	16	nein
H	s126	s129	157	Sputum	16	ja
RK	M61	M62	36	Rachen	54	nein
RK	M62	M70	70	Rachen	54	nein
RK	M70	CFS67A	6	Sputum	54	nein
K	s134	s136	88	Rachen	109	nein
K	s136	s137	90	Rachen	109	nein
K	s137	s142	537	Rachen	109	nein
K	s142	s145	280	Rachen	109	nein
K	s145	s147	299	Sputum	109	nein
K	s147	s148	122	Rachen	109	ja
Ku	s151	s152	176	Sputum	1	nein
Ku	s152	s155	262	Sputum	1	ja
Ku	s155	s158	293	Sputum	1	ja
Ku	s158	s161	167	Sputum	1	nein

Patient	Isolat-Nr. 1	Isolat-Nr. 2	Intervall (Tage)	Quelle	GT	Veränderung
Ku	s164	s165	133	Sputum	1	nein
Ku	s165	s168	285	Sputum	1	ja
R	s62	s64	155	Sputum	31	nein
R	s64	s72	314	Sputum	31	ja
R	s80	s84	266	Sputum	31	ja
YD	CFS42	CFS392	112	Sputum	2	nein
MF	CFS46	CFS72	14	Sputum	2	ja
MF	CFS72	CFS430	132	Sputum	2	nein
SS	CFS498	CFS511	41	Sputum	19	nein
SS	CFS511	CFS515	8	Sputum	19	nein
MZ	CFS562	CFS579	14	Sputum	48	nein
ME	CFS41	CFS513	225	Sputum	19	nein
ST	CFS218	CFS370	34	Sputum	36	nein
ST	CFS370	CFS488	57	Sputum	36	nein
ST	CFS488	CFS512	54	Sputum	36	nein
SK	CFS425	CFS555	96	Sputum	7	ja
UG	CFS479	CFS556	85	Sputum	17	nein
18cf	i54	k150	304	Sputum	17	ja
33cf	i101	i102	91	Sputum	2	nein
33cf	i102	k106b	304	Sputum	2	ja
33cf	f1	f2	91	Sputum	88	nein
33cf	f2	f4	304	Sputum	88	nein
37cf	i123	i124	91	Sputum	40	nein
37cf	k119	k145	182	Sputum	2	ja
43cf	i149	i150	91	Sputum	16	nein

GT: Genomtyp

Tabelle 5: Kontrollen

Patient	Isolat-Nr. 1	Isolat-Nr. 2	Intervall (Tage)	Quelle	GT	Veränderung
15V	k77	k15	182	Nase	7	nein
17V	i55	i56	91	Nase	49	nein
38M	i 126	i 127	91	Nase	19	nein
38M	i 127	k59	304	Nase	19	nein
3V	i3	i4	91	Nase	36	nein
3V	i4	k62	91	Nase	36	nein
3V	k62	k1	182	Nase	36	nein
3M	i1	i2	91	Nase	15	ja
3M	k63	k2	182	Nase	36	nein
15V	i41	k77	304	Nase	7	nein
17V	i56	k65	304	Nase	49	nein
17V	k65	k21	182	Nase	49	nein
41V	i 139	i 140	91	Nase	2	nein
41V	i 140	k125	304	Nase	2	nein
41V	k125	k128	182	Nase	2	nein
Mi55	Mi55A	Mi55B	62	Nase	48	nein
Mi54	Mi54A	Mi54B	62	Nase	43	ja
Mi49	Mi49A	Mi49b	62	Nase	109	nein
Mi47	Mi47A	Mi47B	62	Nase	16	nein
Mi64	Mi64A	Mi64B	62	Nase	2	nein
Mi39	Mi39A	Mi39B	58	Nase	54	nein
Mi44	Mi44A	Mi44B	252	Nase	2	nein
Mi18	Mi18A	Mi18B	201	Nase	36	nein
Mi10	Mi10A	Mi10B	202	Nase	36	nein
Mi11	Mi11A	Mi11B	203	Nase	2	nein

Patient	Isolat-Nr. 1	Isolat-Nr. 2	Intervall (Tage)	Quelle	GT	Veränderung
VS	s173	s175	31	Nase	36	nein
VS	s175	s177	65	Nase	36	nein
VS	s177	s179	133	Nase	36	nein
VS	s179	s181	161	Nase	36	nein
MK	s172	s174	31	Nase	2	nein
MK	s176	s178	133	Nase	7	nein
14V	i35	i36	91	Nase	2	nein
15K3	i46	i47	91	Nase	7	nein
15M	i42	i43	91	Nase	7	nein
15M	i43	k78	304	Nase	7	nein
15M	k78	k16b	182	Nase	7	nein
41K1	i141	i142	91	Nase	54	nein
41K1	i142	k126	304	Nase	54	nein
11KK1	i21	i22	91	Nase	36	nein
12KK1	i32	k73	304	Nase	36	nein
12KK1	k73	k12	182	Nase	36	nein
12KK2	i33	i34	91	Nase	36	nein
12KK2	i34	k74	304	Nase	36	nein
12KK2	k74	k13	182	Nase	36	nein
12KM	i30	i31	91	Nase	36	nein
12KV	i28	i29	91	Nase	16	nein
33KK1	i105	i106	91	Nase	30	nein
33KK1	i106	k111	304	Nase	30	nein
33KM	i103	i104	91	Nase	30	nein
33KM	i104	k110	304	Nase	30	nein
33KM	k110	k47	182	Nase	30	nein
35KK1	k114	k55	182	Nase	30	nein
35KK3	k115	k56	182	Nase	1	nein
46KK	i155	i156	91	Nase	19	nein
47KM	i157	i158	91	Nase	2	nein
49KK1	i165	i166	91	Nase	16	nein

Patient	Isolat-Nr. 1	Isolat-Nr. 2	Intervall (Tage)	Quelle	GT	Veränderung
49KV	i161	i162	91	Nase	2	nein
29KK2	i90	k100	304	Nase	7	nein
29KM	i85	i86	91	Nase	8	nein
32KM	i96	i97	91	Nase	36	nein
32KM	i97	k104	304	Nase	36	nein
32KM	k104	k43	182	Nase	36	nein

GT: Genomtyp

Die Bandenmuster wurden paarweise miteinander verglichen. Stämme mit nur kleineren Unterschieden im Bandenmuster wurden dem gleichen Genomtyp zugeordnet. Innerhalb dieses Bereiches fand eine Unterteilung in Subtypen statt.

Zur weiteren Analyse wurden alle Folgeisolate mit gleichem oder ähnlichem *Sma*I-Fragmentmuster zusätzlich nach Restriktionsverdau mit einem weiteren Enzym (*Eag*I) untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung ließen sich mit den Ergebnissen aus der *Sma*I-Analyse gut korrelieren. In allen Fällen, in denen ein Unterschied in den *Sma*I-Fragmentmustern zu sehen war, zeigten sich Bandenveränderungen in den *Eag*I-Fragmentmustern. Diese waren auch immer ähnlich, aber nicht identisch. Folglich handelt es sich bei den Unterschieden in den *Sma*I-Fragmentmustern nicht um Punktmutationen, sondern um Insertionen oder Deletionen größerer DNA-Bereiche.

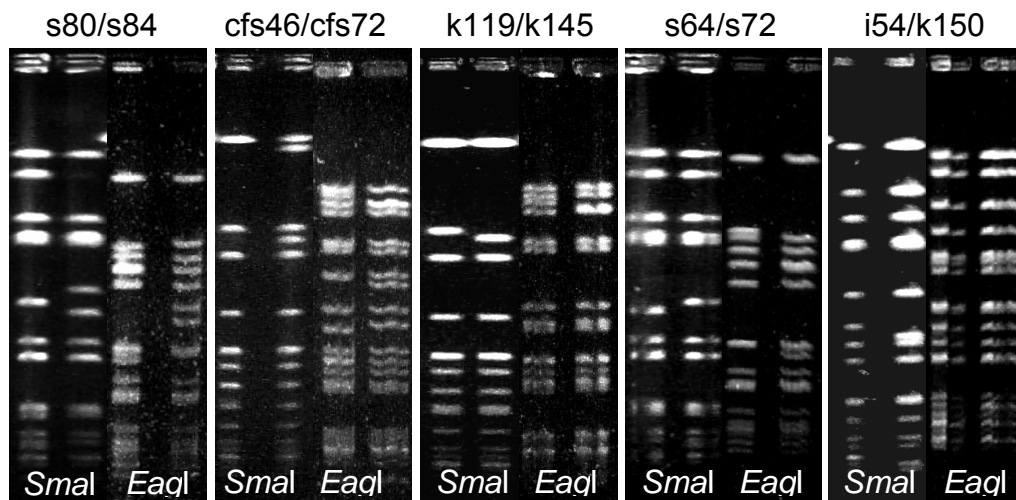


Abbildung 2: Veränderungen im PFGE-Bandenmuster

Es wurde davon ausgegangen, dass es sich bei Folgeisolaten mit wenigen Unterschieden im Bandenmuster um identische Klone handelt, bei denen es im Laufe der Infektion, bzw. Kolonisation zu genomischen Veränderungen im Genom kommen kann. Zur weiteren Bestätigung der Klonalität solcher Isolate wurden zusätzliche Typisierungsmethoden angewendet. Alle Isolate wurden mittels Phagentypisierung, Kapseltypisierung, Antibiotika-Empfindlichkeit und *agr*-Typisierung analysiert. Die Ergebnisse der PFGE-Typisierung wurden durch diese alternativen Typisierungsmethoden bestätigt (Tabelle 6). Die Klone, welche durch die PFGE einem Genomtyp zugeordnet wurden, entsprachen sowohl dem gleichen Kapsel-Typ, als auch dem gleichen *agr*-Typ. Auch wurden sie ähnlichen Phagen-Gruppen zugeteilt. Einzelne Abweichungen wurden in der Antibiotika-Empfindlichkeit gefunden. Dies konnte eine Folge der Genomtypveränderungen sein, welche als Subtypen charakterisiert wurden.

Tabelle 6: Typisierung von *S. aureus*-Folgeisolaten mit Genomveränderungen

Isolat	Patient	GT	LT	AB- Empfind.	agr- Typ	CP	Hämolyse	beta
i54	18cf	17	80 6 42E 47 75	PEN GEN OTE SXT FUS	la	5	+	+
k150	18cf	17	80 3A 6 42E 54	PEN GEN SXT FUS	la	5	+	+
k119b	37cf	2	52 80	PEN CIP	III	8	-	-
k145	37cf	2	29 52 80	PEN	III	8	-	-
i1	3M	15	NT	PEN	lb	8	+	-
i2	3M	15	NT	PEN	lb	8	+	-
s87	D	7	95	PEN	lb	8	-	-
s90	D	7	95	PEN	lb	8	+	+
i102	FW	2	29 52 80		III	8	-	-
k106b	FW	2	29 52 80		III	8	-	+
s113	H	16	29 52 52A 80 42E	PEN GEN	la	8	+	-
s116	H	16	52 52A 80	PEN GEN	la	8	+	-
s126	H	16	80	PEN GEN	la	8	+	-
s129	H	16	(80)	PEN GEN	la	8	+	+
CG29A	Ital.B	18	6 47 54	PEN OXA GEN ERY	II	5	+	-
CG29B	Ital.B	18	47 54	PEN OXA GEN ERY CIP	II	5	+	-
CG17A	Ital.B	18	47 54	PEN OXA GEN ERY CIP	II	5	+	-
CG17B	Ital.B	18	47 54	PEN OXA GEN ERY CIP	II	5	+	-
CG23C	Ital.J	2	29 52 52A 80 95	PEN	III	8	+	-
CG8B	Ital.J	2	52	PEN	III	8	-	-
s147	K	109	(53)	PEN	la	8	-	+

Isolat	Patient	GT	LT	AB- Empfind.	agr- Typ	CP	Hämolyse	beta
s148	K	109	53		la	8	-	-
s152	Ku	1	94 96	PEN GEN CIP	la	5	+	-
s155	Ku	1	94 96	PEN GEN CIP	la	nt	+	+
s158	Ku	1	94 96	CIP	la	5	+	+
s165	Ku	1	94 96	PEN GEN CIP	la	5	+	-
s168	Ku	1	94 96	PEN GEN CIP	la	5	+	+
CFS46	MF	2	29 52 52A 79 80	PEN	III	8	-	-
CFS72	MF	2	29 52	PEN	III	8	-	-
Mi54A	Mi54	43	NT	PEN	II	8	+	+
Mi54B	Mi54	43	NT	PEN	II	8	+	-
s64	R	31	29 52 52A 80 6 53 54 75 85 95	PEN CMP	II	5	+	-
s72	R	31	29 52 52A 80 6 53 54 75 85 95	PEN	II	5	+	-
s80	R	31	29 52 80 6 53 54 75 85 95	PEN	II	5	+	-
s84	R	31	29 52 80 6 53 75 85 95	PEN	II	5	+	-
M46	SE	36	3A 3C	PEN	II	8	+	-
M47	SE	36	3A 3C 55 71	PEN	II	8	+	-
CFS425	SK	7	95	PEN ERY	lb	8	+	-
CFS555	SK	7	95	PEN ERY	lb	8	+	+

GT: Genomtyp, **AB-Empfind.:** Antibiotika gegen die der jeweilige genomty empfindlich reagiert, **LT:** Lysotyp, **Pen:** Penicillin, **OXA:** oxacillin, **GEN:** gentamicin, **ERY:** erythromycin, **CMP:** chloramphenicol, **OTE:** tetracycline, **CIP:** ciprofloxacin, **SXT:** trimethoprim+sulfamethoxazole, **FUS:** fusidic acid

3.2. Häufigkeit von Genomveränderungen bei *S. aureus* während der Infektion und Kolonisation

Um eine statistisch verwertbare Quantifizierung der Häufigkeit und der Frequenz von Genomveränderungen bei *S. aureus* im Infektions- bzw. Kolonisations-Verlauf zu erstellen, wurden alle *S. aureus*-Isolate auf die beschriebene Weise typisiert und miteinander verglichen. Bei signifikant ($P < 0,0001$) mehr CF-Patienten (13/26) wurden *S. aureus*-Stämme nachgewiesen, welche eine oder mehrere Genomveränderungen zeigten, als bei *S. aureus*-Folgeisolaten der Kontrollgruppe. Hier zeigten nur zwei Stämme eine Veränderung (2/38). Innerhalb der CF-Gruppe kam es bei einem Patienten zu drei Veränderungen und bei zwei Patienten zu jeweils zwei Veränderungen während des Untersuchungszeitraumes. Bei allen anderen Individuen kam es jeweils nur zu einer Veränderung.

Bedingt durch Koordinationsschwierigkeiten bei der Gewinnung von Isolaten und der Zusammenarbeit unterschiedlicher Institute konnten keine einheitlichen Zeitabstände (Intervalle) zwischen den Probe-Entnahmedaten gewährleistet werden. So entsprachen die 93 Isolate der CF-Gruppe 59 Intervallen von durchschnittlich 91 (Minimum 6; Maximum 538) Tagen und die 102 Isolate der 38 gesunden Testpersonen entsprachen 62 Intervallen von durchschnittlich 133 (Minimum 31; Maximum 304) Tagen. Waren von einer Person mehrere Folgeisolate vorhanden, so wurde jedes Intervall als unabhängige Episode gewertet.

Die 59 Intervalle bei den CF-Patienten zusammen mit 62 Intervallen bei den Kontrollpersonen stellten also 121 einzelne Ereignisse dar. Es ließ sich ein Mittelwert für die Zeit errechnen, nach der sich eine Genomveränderung beobachten ließ. Dieser wurde sowohl für die Patientengruppe als auch für die Kontrollgruppe erstellt. Festzustellen war, dass die mittlere Zeit, in der es zu Veränderungen kommt, bei der CF-Patientengruppe signifikant kürzer war als bei der Kontrollgruppe ($P < 0,0001$). So trat im Durchschnitt bei den CF-

Patienten eine Genomveränderung nach 376 Tagen auf (240 - 637 Tage), während es in der Kontrollgruppe durchschnittlich 4878 Tage dauerte (1580 - 29 317 Tage) bis dieses Ereignis auftrat. Dies ist ein statistischer Wert - welcher mittels Kaplan-Meier-Kurven errechnet wurde - da sich derselbe Genomtyp selten über so lange Zeit am Kolonisationsort nachweisen lässt.

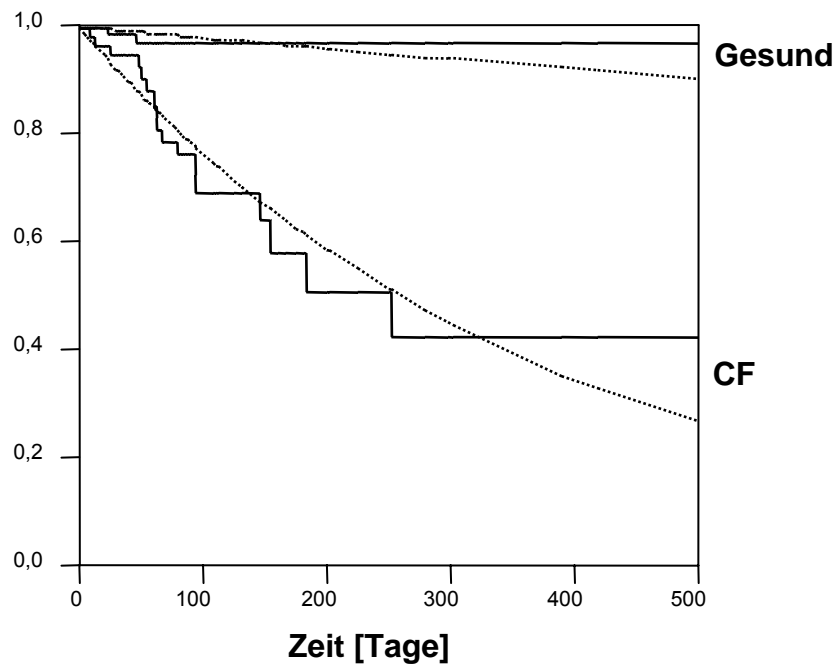


Abbildung 3: Mittlere Zeit bis zum Eintritt einer Veränderung im Kaplan-Meier-Modell

3.3. Genomtypverteilung und der Zusammenhang zwischen Genomtyp und Genomveränderung

Eines der Ziele dieser Studie war, den Zusammenhang zwischen Genomtyp und der Häufigkeit von Genomveränderungen zu untersuchen. Ferner sollte die Verteilung von Genomtypen auf Patienten und Kontrollen analysiert werden. Hierfür wurden die gesammelten *S. aureus*-Isolate der insgesamt 64 Personen, welche an der Studie teilnahmen, mittels PFGE typisiert und 19 Genomtypen (GT) zugeordnet, wobei Isolate des gleichen Genomtyps einer klonalen Linie zuzuschreiben waren. Dies wurde durch zusätzliche Phagentypisierung und *agr*-Typisierung bestätigt.

Es stellte sich heraus, dass die meisten Isolate schon bekannten und häufigen Genomtypen zugeordnet werden konnten. 11 von 19 Genomtypen traten bei mehr als einer Person auf. Die häufigsten Genomtypen waren GT 2, GT 36 und GT 16. So wurden der GT 36, 27-mal nachgewiesen und der GT 2, 19-mal. GT 2, GT 19 und GT 54 traten bei beiden Gruppen gleichmäßig oft auf. Es wurde kein Hinweis auf einen CF-assoziierten GT gefunden ($P = 0,31$) (Tabelle 7).

Tabelle 7: Genomtypverteilung unter den Studienteilnehmern

GT	Pers. Ges.	CF	Kontrolle
1	3	2	1
108	1	1	-
109	3	2	1
15	1	-	1
16	6	3	3
17	3	3	-

GT	Pers. Ges.	CF	Kontrolle
19	4	2	2
2	14	6	8
30	3	3	-
31	1	1	-
36	13	3	10
40	1	1	-
43	1	1	-
48	2	1	1
49	1	1	-
54	3	1	2
7	7	2	5
8	1	-	1
88	1	2	-

GT: Genomtyp, **Pers. Ges.:** Gesamtzahl der Individuen die diesen Genomtypen aufweisen, **CF:** Zystische Fibrose (Fälle), **Kontrolle:** gesunde Kontrollpersonen

Bei 10 von 19 Genomtypen konnten Veränderungen nachgewiesen werden. Isolate, welche solche Veränderungen (Deletion, Addition oder Verschieben einer Bande) gegenüber seinem Vorgänger aufwiesen, wurden als Subtypen klassifiziert. Aus den vorliegenden Daten konnte kein Zusammenhang zwischen Genomtyp und Frequenzrate für die Veränderung hergestellt werden. Sowohl bei den häufigen, wie auch bei den seltenen Genomtypen, traten Ereignisse, welche auf eine Genomrekombination hinweisen könnten, auf (Tabelle 8).

Tabelle 8: Genomtypen (GT) bei denen Veränderungen aufgetreten sind

GT	Intervalle	Fall (V)	Fall (kV)	Kontr. (V)	Kontr. (kV)
2	19	4	5	-	10
1	8	3	4	-	1
16	11	2	6	-	3
17	3	2	1	-	-
31	3	2	1	-	-
7	11	2	1	-	8
109	9	1	7	-	1
36	27	1	6	-	20
15	1	-	-	1	-
43	1	-	-	1	-
108	1	-	1	-	-
19	6	-	3	-	3
30	6	-	-	-	6
40	1	-	1	-	-
48	2	-	1	-	1
49	3	-	-	-	3
54	6	-	3	-	3
8	1	-	-	-	1
88	2	-	2	-	-

GT: Genomtyp

Intervalle: Gesamtzahl der Intervalle zwischen zwei Isolaten eines Genomtyps

V: Veränderung, bez. auf Fälle und Kontrollen (Anzahl der Isolate des gleichen Genomtyps, welche sich verändert haben)

kV: keine Veränderung, bez. auf Fälle und Kontrollen (Anzahl der Isolate eines Genomtyps welche sich nicht verändert haben)

3.4. Beobachtungen des Rekombinationsverhaltens von *S. aureus* in vitro

Bei *S. aureus*-Isolaten von CF-Patienten treten häufig während der Infektion Veränderungen auf. Um zu überprüfen, ob die Ursache in der Instabilität der einzelnen Isolate liegt, oder ob dieses Phänomen bevorzugt in vivo stattfindet, wurden exemplarisch zwei Stämme, welche in vivo Veränderungen gezeigt hatten, mehrmals in vitro subkultiviert und mittels PFGE typisiert. Des Weiteren wurde zum Vergleich der für Laborexperimente häufig verwendete Stamm RN6390 (Novick) analysiert. Jedes Isolat wurde 33-mal auf Blutagar subkultiviert. Trat phänotypisch eine Veränderung (Hämolyse, Farbe) auf, wurden die Varianten separiert und getrennt typisiert. Bei allen Isolaten traten im Laufe der Zeit phänotypische Veränderungen auf. Nach Typisierung durch PFGE war eine genetische Veränderung aber in keinem der Fälle nachzuweisen (Tabelle 9).

Tabelle 9: Vergleich phänotypische Veränderung und genotypische Veränderung

Stamm	Generation	Hämolyse-Phänotyp	GT
s2	10	keine Hämolyse	79
	11	Hämolyse	79
	18	keine Hämolyse	79
	19	Hämolyse	79
	20	keine Hämolyse	79
	23	Hämolyse	79
	24	keine Hämolyse	79

Stamm	Generation	Hämolyse-Phänotyp	GT
s3	10	keine Hämolyse	79
	11	Hämolyse	79
	19	keine Hämolyse	79
	22	Hämolyse	79
	24	keine Hämolyse	79
	33	Hämolyse	79
I1	12	Hämolyse	15
I2	31	keine Hämolyse	15
	33	Hämolyse	15
RN6390	10	Hämolyse	132
	12	keine Hämolyse	132
	13	Hämolyse	132
	18	keine Hämolyse	132
	30	Hämolyse	132

GT: Genomtyp

Man kann davon ausgehen, dass die Bakterien in CF-Lungen und -Rachen unter anderen Bedingungen wachsen - z. B. andere Mukuszusammensetzung und Konsistenz - als in vitro. Aus diesem Grund wurden die Isolate unter Bedingungen des Nahrungsmangels subkultiviert und so unter Stress gesetzt. Hierfür wurden ein repräsentativer Stamm und ein Laborstamm (RN 6390) in einem Flüssigmedium herangezüchtet und alle 48 Stunden subkultiviert. Durch den Nahrungsmangel nach 48 Stunden fiel das Bakterienwachstum um eine Zehnerpotenz (Tabelle 10, Tabelle11). Nach der 8. Subkultivierung trat beim S2 Stamm ein Farbumschlag von gelb zu orange auf. Der Keim wurde ausplattiert und getrennt weiterhin subkultiviert. Die 8., die 11., und die 12. Generation wurden mittels PFGE typisiert und miteinander verglichen. Die visuelle Veränderung spiegelte sich jedoch nicht in einer Genomveränderung wieder.

**Tabelle 10: Überleben von *S. aureus*-Stamm s202 nach 16h und 48h
Bebrütung**

	KBE nach 16 h	KBE nach 48 h
1. Subk.	1,86 x 10 ¹¹	2,75 x 10 ¹⁰
2. Subk.	1,20 x 10 ¹¹	4,20 x 10 ¹⁰
11. Subk.	1,70 x 10 ¹¹	1,70 x 10 ¹⁰

Subk.: Subkultivierung, **KBE:** Kolonie bildende Einheiten

**Tabelle 11: Überleben von *S. aureus*-Stamm RN6390 nach 16h und 48h
Bebrütung**

	KBE nach 16 h	KBE nach 48 h
1. Subk.	1,85 x 10 ¹⁰	2,50 x 10 ⁹
2. Subk.	8,80 x 10 ¹⁰	5,25 x 10 ⁹
11. Subk.	1,30 x 10 ¹¹	3,65 x 10 ¹⁰

Subk.: Subkultivierung, **KBE:** Kolonie bildende Einheiten

3.5. Fallbeispiel des Verhaltens von *S. aureus* bei einer *S. aureus*- assozierten Hauterkrankung

Zusätzlich zu den *S. aureus*-Folgeisolaten aus Sputen und Nasenabstrichen von CF-Patienten und Kontrollpersonen, erhielten wir weitere *S. aureus*-Folgeisolate. Diese stammten von einem Patienten, welcher an Dyskeratosis follicularis, auch Darier-Krankheit genannt, leidet. Dabei handelt es sich um eine autosomal-dominante Erbkrankheit, die mit Haut- und Schleimhautveränderungen einhergeht. Dadurch wird die Entstehung von Hautinfektionen begünstigt, die unter anderem durch *S. aureus* verursacht werden. Bei dem uns

vorliegende Fall handelt es sich um einen 39-jährigen Patienten, der schon mehrmals wegen Verschlechterung des Hautzustandes hospitalisiert wurde. Die Krankheit wurde bei dieser Person im Alter von 22 Jahren anhand des histologischen Befunds diagnostiziert. Die Folgeisolate stammten vorwiegend aus der Nase und aus Hautbiopsien des Oberarmes und wurden in unregelmäßigen Abständen von einem Monat bis zu einem Jahr innerhalb von 28 Monaten gesammelt. Um einen Einblick in das Veränderungsverhalten von *S. aureus* bei einer *S. aureus*-assoziierten Krankheit, die nicht Zystische Fibrose ist, zu bekommen, wurden die vorhandenen Folgeisolate mittels PFGE analysiert und Genomtypen zugeordnet.

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass im Laufe der 28 Monate vier unterschiedliche Genomtypen (GT 16, GT 36, GT 54 und GT 79) die Nase des Patienten kolonisiert hatten. Unseren Beobachtungen nach zu urteilen, handelt es sich dabei um zwei häufig auftretende (GT 16, GT 36) und zwei seltener auftretenden Genomtypen (GT 54, GT 79). Chronologisch gesehen wurde zuerst GT 79 über längere Zeit hinweg isoliert. Daraufhin folgte kurzzeitig GT 16, der von GT 54 abgelöst wurde. Der GT 36 ließ sich über den kompletten Zeitraum sporadisch nachweisen. Von den vier Genomtypen veränderte sich GT 79. Bei den anderen Genomtypen kamen innerhalb des untersuchten Zeitraums keine Veränderungen vor.

4. DISKUSSION

S. aureus besiedelt als potentiell pathogener Keim bei etwa 30 % der Bevölkerung die Nasenschleimhaut. Daneben wird er als Infektionserreger mit einer Reihe von zum Teil chronischer Erkrankungen assoziiert. Darunter auch mit der Zystischen Fibrose. *S. aureus* ist insbesondere bei Kleinkindern mit Zystischer Fibrose einer der am häufigsten nachgewiesenen Keime des Bronchialsekrets (52). Als Infektions-Quelle für die Lunge wird eine endogene Übertragung ausgehend vom Nasen-Rachenraum vermutet (29). Es kann angenommen werden, dass es während der chronischen, schlecht therapierbaren Lungeninfektion zu infektionsspezifischen Anpassung des Bakteriums kommt.

Durch die vorliegende Studie sollte die Frequenz von Genomalterationen bei *S. aureus* während der Nasenkolonisation im Vergleich zur persistenten Lungeninfektion bei CF-Patienten ermittelt werden. Hierfür wurden Folgeisolate aus der Nasenschleimhaut von gesunden Testpersonen sowie aus der Nasenschleimhaut und/oder Sputum von CF-Patienten gesammelt und durch PFGE typisiert. Die Persistenz von *S. aureus* in der Nase Gesunder ist individuell stark unterschiedlich. Nach 1 ½ Jahren ist der Keim entweder häufig verschwunden, oder wird durch einen anderen Genomtyp ersetzt (29). Diese Tatsache erschwert die Aufgabe, genügend Folgeisolate gleichen Genomtyps für die Analyse von Genomveränderungen zu gewinnen. Während der vorliegenden Studie konnten von 38 Testpersonen 102 klonale Folgeisolate einbezogen werden. In der Lunge von CF-Patienten kommt es zur jahrelangen Persistenz von *S. aureus* (42). Die häufig eingesetzte Antibiotikatherapie kann nur zur kurzfristigen Keimreduktion führen; eine Keimeradikation ist jedoch selten erreichbar. Dementsprechend gehörten die meisten der untersuchten Folgeisolate von CF-Patienten dem gleichen Genomtyp an, sodass von 26 CF-Patienten 93 klonale Folgeisolate zur Verfügung standen.

Aus den Ergebnissen der PFGE geht hervor, dass *S. aureus*-Stämme, welche aus den Atemwegen von CF-Patienten stammen, schneller Genomveränderungen durchlaufen, als Stämme, die aus der Nase von gesunden Personen gewonnen wurden. Bei 13 von 26 CF-Patienten jedoch nur 2 von 38 Kontrollpersonen konnten Genomveränderungen beobachtet werden. Während es bei CF-Patienten im Durchschnitt 376 Tage dauert, tritt in der Kontrollgruppe, statistisch gesehen, erst nach durchschnittlich 4878 Tage eine Genomveränderung auf.

4.1. Genomveränderungen während der Kolonisation bzw. Infektion anderer Patientengruppen

Aus den vorliegenden Ergebnissen geht hervor, dass bei *S. aureus*-Stämmen, die in den Atemwegen von CF-Patienten nachgewiesen wurden, schneller Genomveränderungen stattfinden, als bei den Kontrollstämmen aus der Nase von gesunden Personen. Über die zu Grunde liegenden Mechanismen, kann man nur spekulieren, da über dieses Phänomen in der Literatur vergleichsweise wenig zu finden ist. Veränderungen im PFGE-Bandenmuster bei Mehrfach und/oder Folgeisolaten wurden zwar vereinzelt beschrieben, aber es fand bislang keine systematische Erfassung statt. Während einer Langzeitstudie mit Folgeisolaten Gesunder zeigten sich bei 2 von 5 *S. aureus*-Trägern Genomveränderungen nach 12 Jahren (96). Dies liegt im Bereich der hier beschriebenen Frequenz von Genomveränderungen während der Nasenkolonisation. P. C. L. Moore und J. A. Lindsay (61) beschreiben den Fall eines an Sepsis verstorbenen Patienten, in dessen Lunge und Nase der gleiche *S. aureus*-Klon nachgewiesen wurde. Die Isolate unterschieden sich jedoch durch geringe Veränderungen im Restriktionsfragmentmuster und das Nasen isolat war im Gegensatz zum Lungenisolat negativ für das Enterotoxin A-kodierende Gen *sea*. *Sea* ist bekanntermaßen phagenkodiert, so dass anzunehmen ist, dass die Veränderung durch Phageninsertion bzw. -Deletion verursacht wurde. Ferner wurden Genomalterationen in PFGE-Bandenmustern

bei MRSA-Folgeisolaten beschrieben. 4/20 *S. aureus*-Isolate zeigten Genomveränderungen innerhalb von einer mittleren Zeitspanne von 78 Tagen (34). Ähnliche Ereignisse traten in einer Zeitspanne von circa 9 Monaten bei 5 von 25 Folgeisolaten auf (56). Dies spricht für eine Transformationsrate, die höher als die hier beschriebene Transformationsrate während der Nasenkolonisation liegt. Es kann spekuliert werden, dass MRSA-Stämme sich zum Beispiel durch erhöhte Mutations- oder Rekombinationsrate eventuell schneller verändern als MSSA-Stämme. Es ist jedoch auch denkbar, dass es sich bei diesen Folgeisolaten vorwiegend um Isolate von Infektionen handelt, so dass auch hier eine infektionsinduzierte Veränderung als Ursache in Betracht kommt. Über die Quelle der MRSA-Stämme werden in den Publikationen jedoch ungenügende Angaben gemacht. Bei der Analyse von zwei *S. aureus*-Folgeisolaten eines Decubitus-Patienten, und von zwei *S. aureus*-Simultanisolaten von einem Patienten mit Zystischer Fibrose wurde festgestellt, dass jeweils die beiden Isolate des gleichen Patienten dem gleichen Genomtypen zuzuordnen waren. Die Klone unterschieden sich nur in der Größe eines *Sma*I-DNA-Fragments auf dem das für die Methicillinresistenz verantwortliche *mec*-Gen kodiert ist. Bei jeweils einem der beiden Isolate fehlte dieses Gen, so dass der eine Klon methicillinresistent und der andere Klon methicillinsensibel war (15). Es konnte daraus geschlossen werden, dass es in beiden Fällen in vivo zum Verlust der Methicillinresistenz durch Deletion des *mec*-Genclusters kam. In unserer Studie wurden zusätzlich zu den CF-Isolaten, *S. aureus*-Folgeisolate aus der Nase eines an Morbus Darier erkrankten Patienten, analysiert. Diese erbliche Hautkrankheit geht mit Veränderungen der Haut und Schleimhaut einher. Virale und bakterielle Infektionen, darunter auch *S. aureus*, kommen sehr häufig vor. Bei der Analyse dieser *S. aureus*-Folgeisolate wurden vereinzelt Genomveränderungen festgestellt.

4.2. Potentielle Selektionsbedingungen, die zu Genomveränderungen führen können

Die Ergebnisse dieser Studie weisen auf eine höhere Frequenz der Genomalterationen bei CF-assoziierten *S. aureus*-Stämmen, als bei *S. aureus*-Stämmen, welche aus Nasenabstrichen von gesunden Individuen gewonnen wurden, hin. Diese Tatsache suggeriert einen starken Selektionsdruck für diesen Keim während der langjährigen Infektion bei CF-Patienten. Sowohl die entzündungsspezifische Reaktion des Wirts, wie auch der hohe und frequente Antibiotikaeinsatz zur Bekämpfung des Bakteriums, können dazu beitragen.

S. aureus ist ein potentiell pathogener Keim welcher Haut und Schleimhaut, insbesondere die Nasenschleimhaut, kolonisiert. Eine spezifische Bindung von *S. aureus* an Mukusbestandteile ist bewiesen (44, 52). Bei Zystischer Fibrose ist das Lungensekret wasserarm und viskös. Das Elektrolytverhältnis ist verschoben (75). Dadurch herrschen in CF-veränderten Lungen atypische Wachstumsbedingungen für *S. aureus*. Als potentiell pathogener Keim kann *S. aureus* schwerwiegende Infektionen verursachen. Dabei wird die Immunantwort des Wirts eingeschaltet. Es kommt zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren. Die Temperatur erhöht und der pH-Wert verändert sich. Daraus ergeben sich auch veränderte Selektionsbedingungen. Ob die im PFGE-Bandenmuster beobachteten Genomveränderung bei *S. aureus* sich zum Vorteil bei der Lungenkolonisation, bzw. Lungeninfektion, auswirken, ist noch unklar. Für *Pseudomonas aeruginosa*, neben *S. aureus* der wichtigste Keim bei der Infektion von CF-veränderten Lungen, ist eine Adaptation an diese Veränderungen beschrieben worden. Durch eine erhöhte Mutationsfrequenz (68) und durch Häufung von Genomalterationen (78) soll die Entstehung eines CF-spezifischen Phänotyps begünstigt werden. Es konnte auch die Bildung eines Biofilms nachgewiesen werden. Dieses Ereignis tritt während der Infektion von CF-erkrankten Individuen auf und könnte sich als Schutzmechanismus vor der möglichen Immunantwort des Wirts auswirken. Hypermutierende *P. aeruginosa*-Stämme werden, im Laufe der chronischen

Lungeninfektion von CF-Patienten, selektiert und können für mehrere Jahre persistieren (68). Für *S. aureus* wird derzeit das Vorkommen von hypermutierenden Stämmen bei der CF-assoziierten Lungeninfektion kontrovers diskutiert (69, 74).

Bisher konnte die Rolle, die *S. aureus* im Krankheitsverlauf der Zystischen Fibrose spielt, noch nicht aufgeklärt werden. Ob der Keim in das Lungengewebe eindringt, ist trotz eingehender Untersuchungen bis heute unklar geblieben. Dieser Zustand tritt in vitro zwar auf, ist jedoch in Lungenschnittpräparaten erkrankter Personen bisher nicht nachzuweisen gewesen. Insofern lässt sich darüber diskutieren, ob *S. aureus* direkt am fibrotischen Lungengewebsumbau beteiligt ist, oder ob es sich dabei um eine indirekte Folge der Entzündungsprozesse handelt, wie man es für *Pseudomonas aeruginosa* annimmt. Trotz dieser Tatsache kommt es bei der CF-spezifischen Therapie zum häufigen Antibiotikaeinsatz. Da die Richtlinien für die Therapie nicht einheitlich sind reicht die Einsatzbreite für Antibiotika von Prophylaxe bis zur ausschließlichen Akutbehandlung. Dass der unkontrollierte Einsatz von Antibiotika bei bakteriellen Infektionen zur Ausbildung von Resistenzmechanismen geführt hat, ist weithin bekannt. Ein Beispiel dafür ist das Penicillinase-Enzym. Das Gen dafür liegt auf einem Plasmid, welches angesichts des Selektionsdrucks und mit Hilfe der Rekombination bei fast 100 % der *S. aureus*-Stämme zur Resistenz gegen Penicillin geführt hat (67). Ein aktuelles Beispiel ist auch das für die Methicillinresistenz verantwortliche *mec*-Gen, welches sich durch den Selektionsvorteil für *S. aureus* hat weit verbreiten können (25). Weiterhin wurde beobachtet, dass der breit angelegte Makrolideinsatz, als Therapie und Prophylaxe der Pneumonie bei CF-Patienten, zu einer Resistenz gegen Erythromycin geführt hatte. Ursächlich wurde eine Mutation innerhalb der ribosomalen Gensequenz verantwortlich gemacht (74).

Die während unserer Studie beobachteten Genomalterationen könnten auf eine Reaktion auf die Antibiotikatherapie hindeuten. Auch bei *Staphylococcus epidermidis* hat man Genomveränderungen durch Antibiotika beobachten

können. Diese haben zu einer Antibiotikaresistenz gegen Rifampicin und einem Biofilmproduktionsverlust geführt. Zuvor war es zu einem massiven Antibiotikaeinsatz gekommen (103). Ob die Veränderungen im Bandenmuster von *S. aureus* sich tatsächlich in einer Resistenz gegen bestimmte Antibiotika auswirken, konnte nicht nachvollzogen werden. Allerdings ließen sich bei diesen *S. aureus*-Stämmen Veränderungen im Antibiotikaempfindlichkeitsspektrum nachweisen.

Wie schon erwähnt wurde führen die Immunantwort des Wirts und der gehäufte Antibiotikaeinsatz zu einer Erhöhung des Selektionsdrucks. Diese Bedingungen, welche für die erhöhte Genomveränderungsfrequenz ursächlich sein könnten, sind nur in vivo vorhanden. Es wurde versucht, in vitro Genomveränderungen nachzuvollziehen. Hierfür erfolgte eine Folge von Subkultivierungen zweier Klone, welche Genomveränderungen gezeigt hatten. In vitro fanden wie erwartet keine Veränderungen statt. Auch als der Keim unter Nahrungsmangel, und so in eine Stresssituation versetzt wurde, ließ sich keine Genomveränderung nachweisen.

4.3. Genomtypspezifische Veränderungsrate

In der vorliegenden Studie wurden *S. aureus*-Isolate, die aus Rachenabstrichen und Sputen von CF-Patienten gewonnen wurden, analysiert und typisiert. Zum Vergleich wurden *S. aureus*-Stämme, die aus Nasenabstrichen von gesunden Personen stammen, der gleichen Prozedur unterzogen. In diesem Fall sind die *S. aureus*-Stämme aus der Nase und im Sputum gleichzusetzen. Studien beweisen, dass in 86% der Fälle, der gleiche Genomtyp im Sputum wie in der Nase nachgewiesen werden kann (29). Aus den Ergebnissen lässt sich kein Anhalt für einen CF-assoziierten Genomtypen finden. In der Patientengruppe wie auch in der Kontrollgruppe konnten keine Unterschiede bei der Verteilung von Genomtypen festgestellt werden. Dieses Ergebnis lässt sich gut mit den Ergebnissen früherer Studien korrelieren (29). Die Genomveränderungen

wurden in 11 verschiedenen Genomtypen gefunden, so dass nicht davon ausgegangen werden kann, dass bestimmte Klone variabler im Vergleich zu anderen sind.

4.4. Molekulare Ursachen von Genomveränderungen

Wir sind davon ausgegangen, dass die beobachteten Veränderungen durch Austausch von mobilen Elementen verursacht werden. Um Punktmutationen mit der Methode der PFGE nachzuweisen, müsste die Veränderung direkt an der Restriktionsenzymchnittstelle (*Sma*I-Schnittstelle) stattfinden. In unserer Studie wurde dieses Phänomen durch den Einsatz eines zweiten Restriktionsenzym (*Eag*I), ausgeschlossen. Da es sich bei den beschriebenen Genomveränderungen weitgehend um größere DNA-Sequenzen handelt, gingen wir von Rekombinationsvorgängen aus. Zwischenzeitlich konnte unsere Arbeitsgruppe, durch eingehende molekulare Analyse der Stämme zeigen, dass ein Teil der hier beschriebenen Genomveränderungen durch Mobilisation von Phagen erklärt werden kann (30). Verschiedene *S. aureus* spezifische Phagen kodieren neben den typischen Phagen-Genen, die für deren lyogenen und lytischen Lebenszyklus notwendig sind, auch verschiedene zusätzliche Gene, welche für potentielle Virulenzgene kodieren. So sind einige Gene für Enterotoxine und das Gen kodierend für die Staphylokinase phagenkodiert. Andererseits können die Phagen spezifisch in Gene für potentielle Virulenzfaktoren inserieren und diese dadurch inaktivieren. Die am besten charakterisierten *S. aureus*-Phagen stellt die Gruppe der *hly*-konvertierenden Phagen dar. Diese Phagen waren in 8 von 19 Fällen für die beobachteten Genomveränderungen, die in dieser Arbeit beschrieben wurden verantwortlich. Diese Phagen inserieren in eine spezifische Attachmentsite innerhalb des β -Hämolyysin-Gens (*hly*) und führen dadurch zur Unterbrechung des *hly*-Gens und zur Inhibition der *hly*-Expression (14). Dadurch kommt es zur Konversion von Enterotoxin und Staphylokinase positiven, *hly*-negativen Stämmen zu Enterotoxin-negativen, *hly*-positiven Stämmen. Die Bedeutung

dieser Virulenzfaktoren für die Kolonisation der Nase oder für die Lungeninfektion ist im Moment unklar. Phagen sind aber auch wesentlich für die chromosomale Rekombination durch Transduktion. Dabei kommt es durch den Einbau von Bakterien-DNA in Phagenpartikel zur Übertragung dieser DNA auf andere Stämme, wo sie mit homologen Bereichen der DNA der Empfängerstämme ausgetauscht werden kann (homologe Rekombination). Die Transduktion stellt wahrscheinlich den wesentlichen Rekombinationsmechanismus von *S. aureus* dar, da dieser Organismus nicht kompetent für die Transformation ist und auch die Konjugation wahrscheinlich eher von untergeordneter Bedeutung ist. Die im Laufe dieser Arbeit nachgewiesene Mobilisation von Phagen während der Infektion könnte daher auch Ausdruck erhöhter Transduktionsereignisse sein, die durch die PFGE-Analyse nicht erkannt werden können.

Die Variation von Bakterienpopulationen kann prinzipiell durch Mutation oder Rekombination erfolgen (24). Zurzeit sind die Angaben über die Rekombinations- und Mutationsrate von *S. aureus* widersprüchlich. Zunächst wurde angenommen, dass *S. aureus* eine hohe Rekombinationsrate zeigt, die vergleichbar mit z. B. hoch rekombinanten Spezies der Streptokokken ist (24). Dies wurde vorwiegend durch Analyse von Multilocussequenztypisierung verschiedener Stämme und verschiedener Arten geschlossen. Die gleiche Arbeitsgruppe relativierte diese Aussage neuerdings durch Reevaluierung der Daten und geht nun eher davon aus, dass bei *S. aureus* Mutationen häufiger als Rekombinationen für die Diversifikation im Laufe der Evolution verantwortlich sind (23). Dies beruht auf der Berechnung des Verhältnisses von Mutations- und Rekombinationsereignissen auf Einzelgenebene. Die Genomstruktur verschiedener *S. aureus*-Stämme ist jedoch auf Grund einer Vielzahl verschiedener potentiell mobiler Element stark unterschiedlich. Der Anteil mobiler Elemente wurde auf bis zu 25 % des Genoms geschätzt.

Punktmutationen können als zufällige ‚Fehler‘ bei der Replikation entstehen. Die meisten dieser Fehler werden anschließend durch verschiedene Reparaturmechanismen korrigiert (SOS-Response). Durch Mutationen in Genen die für

Enzyme kodieren, die wesentlich für diese Reparatur sind, kann die Mutationshäufigkeit eventuell auch die Rekombinationshäufigkeit von Bakterien erhöht sein. Solche Mutator-Stämme wurden bei anderen pathogenen Mikroorganismen beschrieben. *P. aeruginosa*-Isolate von CF-Patienten beispielsweise sind häufig solche Mutatorstämme. Man nimmt an, dass sich hierdurch die Bakterien schneller den Infektionsbedingungen anpassen können. Die Rolle solcher Mutatorstämme bei *S. aureus* in vivo ist umstritten. In den meisten dies bezüglich durchgeführter Studien, konnten keine Hinweise auf natürlich vorkommende Mutatorstämme gefunden werden. In zwei Studien wurden *S. aureus*-Isolate von CF-Patienten untersucht. Während A. J. O'Neill (69) keinen Hinweis für eine gesteigerte Mutationsfrequenz bei *S. aureus* fand, konnte neuerdings Prunier et al. (74) zeigen, dass bei 15 % der Isolate die Mutationsrate erhöht ist. Dies könnte ebenfalls mit einer erhöhten Rekombinationsfrequenz gekoppelt sein, da die Reparatursysteme molekular mit der Rekombination verknüpft sind. Untersuchungen zur Mutationsfrequenz der hier untersuchten CF-Isolate wurden bisher nicht durchgeführt, sollten aber Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Staphylococcus aureus besiedelt bei 30 % der Bevölkerung asymptomatisch den Nasenvorhof. Bei Patienten mit Zystischer Fibrose (CF) verursacht *S. aureus* chronische, schwer therapierbare Lungeninfektion. Ziel dieser Studie war es genomische Veränderungen der Bakterien während der Nasenkolonisation und der Lungeninfektion bei CF-Patienten systematisch zu erfassen. Hierzu wurden Folgeisolate von 208 gesunden Kontrollpersonen und von 118 CF-Patienten gesammelt und durch Puls-Feld-Gel-Elektrophorese (PFGE) typisiert. Nur Individuen die zwischen zwei Proben mit dem gleichen Stamm besiedelt waren, wurden in die Studie eingeschlossen. Die Stamm-Definition erfolgte über PFGE, wurde jedoch mit anderen Typisierungsmethoden überprüft. Kleinere Fragmentmuster-Variationen bei aufeinander folgenden Isolaten wurden als Genomveränderungen definiert. Bei signifikant ($p < .0001$) mehr CF-Patienten (13/26) wurden *S. aureus*-Stämme nachgewiesen, welche eine oder mehrere Genomveränderung zeigten, als bei gesunden Menschen (2/38). Die durchschnittliche Zeit, innerhalb der es zu solchen Genomveränderungen kommt, war bei *S. aureus*-Stämmen von CF-Sputen (durchschnittlich 1,03 Jahre) signifikant ($p < .0001$) kürzer, als bei Stämmen aus der Nasenschleimhaut Gesunder (durchschnittlich 13,4 Jahre). Bei den Genomveränderungen handelt es sich um Deletionen oder Insertionen größerer DNA-Bereiche (ca 20 bis 200 kb), die auf die Mobilisation von mobilen genetischen Elementen (Transposons, Phagen etc.) hindeuten. Genomveränderungen konnten in verschiedenen Klonkomplexen von *S. aureus* nachgewiesen werden. Ausgewählte Stämme wurden in vitro extensiv subkultiviert und nach Subkultivierung auf Genomveränderungen untersucht. In keinem der Fälle konnte in vitro eine Genomveränderung beobachtet werden. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass es im Laufe der *S. aureus* Lungeninfektion bei CF-Patienten häufiger zu Genomveränderungen kommt, als während der Kolonisation der Nase. *S. aureus* unterliegt möglicherweise während der Lungeninfektion einem starken Selektionsdruck der durch die

entzündungsspezifische Reaktion des Wirtes und/oder durch den massiven Antibiotika-Einsatz ausgelöst sein könnte. Inwiefern die Genomveränderungen mit einer Veränderung des Virulenzpotentials verbunden sind, sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

6. LITERATUR

1. Al-Wali WI, Elvin SJ, Mason CM, Clark A, Tranter HS. Comparative phenotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from line and non-line associated septicaemia, CAPD peritonitis, bone/joint infections and healthy nasal carriers. *J Med Microbiol* 47 (3): 265-74, 1998.
2. Arber W. Evolution of prokaryotic genomes. *Gene* 135 (1-2): 49-56, 1993.
3. Arkoudelos JS, Samaras FJ, Tassou CC. Survival of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* on salted sardines (*Sardina pilchardus*) during ripening. *J Food Prot* 66 (8): 1479-81, 2003.
4. Arvidson S. Extracellular enzymes. In: Fischetti VA NR, Ferretti JJ, Portnoy DA, and Rood JI, ed. *Gram-Positive Pathogens*. Washington, DC: ASM Press, pp. 379-385, 2000.
5. Barg NL, Harris, T. Toxin-mediated syndroms. In: Crossley KB, Archer, G.L., ed. *The Staphylococci in Human Disease*. New York: Churchill Livingstone, pp. 527-544, 1997.
6. Bierbaum G, Fuchs K, Lenz W, Szekat C, Sahl HG. Presence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18 (10): 691-6, 1999.
7. Blanco MT, Falcon MA, Chordi A. [Interaction established between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* when they are cultivated together in a semi-synthetic medium]. *Microbiol Esp* 35: 33-41, 1982.
8. Booth MC, Pence LM, Mahasreshti P, Callegan MC, Gilmore MS. Clonal associations among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infection. *Infect Immun* 69 (1): 345-52, 2001.
9. Bronsveld I, Mekus F, Bijman J, Ballmann M, de Jonge HR, Laabs U, Halley DJ, Ellemunter H, Mastella G, Thomas S, Veeze HJ, Tummler B. Chloride conductance and genetic background modulate the cystic fibrosis phenotype of Delta F508 homozygous twins and siblings. *J Clin Invest* 108 (11): 1705-15, 2001.
10. Brown J. Efficacy of antimicrobial drugs against staphylococci in cystic fibrosis. *Aust Paediatr J* 16 (3): 207-9, 1980.

11. Casewell MW. The nose: an underestimated source of *Staphylococcus aureus* causing wound infection. *J Hosp Infect* 40 Suppl B: S3-11, 1998.
12. Chang FY, Peacock JE, Jr., Musher DM, Triplett P, MacDonald BB, Mylotte JM, O'Donnell A, Wagener MM, Yu VL. *Staphylococcus aureus* bacteremia: recurrence and the impact of antibiotic treatment in a prospective multicenter study. *Medicine (Baltimore)* 82 (5): 333-9, 2003.
13. Chiller K, Selkin BA, Murakawa GJ. Skin microflora and bacterial infections of the skin. *J Investig Dermatol Symp Proc* 6 (3): 170-4, 2001.
14. Coleman DC, Sullivan DJ, Russell RJ, Arbuthnott JP, Carey BF, Pomeroy HM. *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of beta-lysin, staphylokinase and enterotoxin A: molecular mechanism of triple conversion. *J Gen Microbiol* 135 (Pt 6): 1679-97, 1989.
15. Deplano A, Tassios PT, Glupczynski Y, Godfroid E, Struelens MJ. In vivo deletion of the methicillin resistance mec region from the chromosome of *Staphylococcus aureus* strains. *J Antimicrob Chemother* 46 (4): 617-20, 2000.
16. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 13 (1): 16-34, table of contents, 2000.
17. Doring G. Serine proteinase inhibitor therapy in alpha(1)-antitrypsin inhibitor deficiency and cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 28 (5): 363-75, 1999.
18. Dray X, Bienvenu T, Desmazes-Dufeu N, Dusser D, Marteau P, Hubert D. Distal intestinal obstruction syndrome in adults with cystic fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2 (6): 498-503, 2004.
19. Eggermont E. Gastrointestinal manifestations in cystic fibrosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 8 (8): 731-8, 1996.
20. Ellington JK, Harris M, Webb L, Smith B, Smith T, Tan K, Hudson M. Intracellular *Staphylococcus aureus*. A mechanism for the indolence of osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Br* 85 (6): 918-21, 2003.
21. Eltringham I. Mupirocin resistance and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Hosp Infect* 35 (1): 1-8, 1997.

22. Emori TG, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* 6 (4): 428-42, 1993.
23. Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, Robinson DA, Enright MC, Berendt T, Peacock SJ, Smith JM, Murphy M, Spratt BG, Moore CE, Day NP. How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J Bacteriol* 185 (11): 3307-16, 2003.
24. Feil EJ, Spratt BG. Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol* 55: 561-90, 2001.
25. Fitzgerald JR, Sturdevant DE, Mackie SM, Gill SR, Musser JM. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (15): 8821-6, 2001.
26. Floret D. [Clinical aspects of streptococcal and staphylococcal toxic diseases]. *Arch Pediatr* 8 Suppl 4: 762s-768s, 2001.
27. Goerke C, Campana S, Bayer MG, Doring G, Botzenhart K, Wolz C. Direct quantitative transcript analysis of the agr regulon of *Staphylococcus aureus* during human infection in comparison to the expression profile in vitro. *Infect Immun* 68 (3): 1304-11, 2000.
28. Goerke C, Fluckiger U, Steinhuber A, Zimmerli W, Wolz C. Impact of the regulatory loci agr, sarA and sae of *Staphylococcus aureus* on the induction of alpha-toxin during device-related infection resolved by direct quantitative transcript analysis. *Mol Microbiol* 40 (6): 1439-47, 2001.
29. Goerke C, Kraning K, Stern M, Doring G, Botzenhart K, Wolz C. Molecular epidemiology of community-acquired *Staphylococcus aureus* in families with and without cystic fibrosis patients. *J Infect Dis* 181 (3): 984-9, 2000.
30. Goerke C, Matias y Papenberg S, Dasbach S, Dietz K, Ziebach R, Kahl BC, Wolz C. Increased frequency of genomic alterations in *Staphylococcus aureus* during chronic infection is in part due to phage mobilization. *J Infect Dis* 189 (4): 724-34, 2004.
31. Gonzalez C, Rubio M, Romero-Vivas J, Gonzalez M, Picazo JJ. *Staphylococcus aureus* bacteremic pneumonia: differences between community and nosocomial acquisition. *Int J Infect Dis* 7 (2): 102-8, 2003.

32. Grothues D, Tummeler B. New approaches in genome analysis by pulsed-field gel electrophoresis: application to the analysis of *Pseudomonas* species. *Mol Microbiol* 5 (11): 2763-76, 1991.
33. Grundmann H, Hori S, Enright MC, Webster C, Tami A, Feil EJ, Pitt T. Determining the genetic structure of the natural population of *Staphylococcus aureus*: a comparison of multilocus sequence typing with pulsed-field gel electrophoresis, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and phage typing. *J Clin Microbiol* 40 (12): 4544-6, 2002.
34. Hartstein AI, Phelps CL, Kwok RY, Mulligan ME. In vivo stability and discriminatory power of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing by restriction endonuclease analysis of plasmid DNA compared with those of other molecular methods. *J Clin Microbiol* 33 (8): 2022-6, 1995.
35. Herwaldt LA. Reduction of *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in dialysis patients. *J Hosp Infect* 40 Suppl B: S13-23, 1998.
36. Hoiby N. Cystic fibrosis: infection. *Schweiz Med Wochenschr* 121 (4): 105-9, 1991.
37. Imundo L, Barasch J, Prince A, Al-Awqati Q. Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (7): 3019-23, 1995.
38. Jackson R, Pencharz PB. Transition of care between paediatric and adult gastroenterology. Cystic fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17 (2): 213-35, 2003.
39. Jarraud S, Lyon GJ, Figueiredo AM, Gerard L, Vandenesch F, Etienne J, Muir TW, Novick RP. Exfoliatin-producing strains define a fourth agr specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 182 (22): 6517-22, 2000.
40. Jensen AG. *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Dan Med Bull* 50 (4): 423-38, 2003.
41. Ji G, Beavis R, Novick RP. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* 276 (5321): 2027-30, 1997.
42. Kahl BC, Becker K, Friedrich AW, Clasen J, Sinha B, Von Eiff C, Peters G. agr-dependent bacterial interference has no impact on long-term colonization of *Staphylococcus aureus* during persistent airway infection of cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 41 (11): 5199-201, 2003.

43. Kapranov NI, Shabalova LA, Kashirskaia N, Simonova OO, Voronkova A, Osipova IA, Semykin S, Polikarpova SV, Postnikov SS. [Antibiotic therapy of cystic fibrosis in children]. *Antibiot Khimioter* 46 (2): 26-32, 2001.
44. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 10 (3): 505-20, 1997.
45. Kreiswirth BN, Kravitz GR, Schlievert PM, Novick RP. Nosocomial transmission of a strain of *Staphylococcus aureus* causing toxic shock syndrome. *Ann Intern Med* 105 (5): 704-7, 1986.
46. Krivan HC, Roberts DD, Ginsburg V. Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc beta 1-4Gal found in some glycolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (16): 6157-61, 1988.
47. Kunzelmann K, Mall M. Pharmacotherapy of the ion transport defect in cystic fibrosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28 (11): 857-67, 2001.
48. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami H, Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hiramatsu H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hattori M, Ogasawara N, Hayashi H, Hiramatsu K. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357 (9264): 1225-40, 2001.
49. Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, Evans RW, Poston SM. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin Microbiol Rev* 12 (2): 224-42, 1999.
50. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 111 (9): 1265-73, 2003.
51. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339 (8): 520-32, 1998.
52. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 15 (2): 194-222, 2002.

53. Machan ZA, Pitt TL, White W, Watson D, Taylor GW, Cole PJ, Wilson R. Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*: description of an anti-staphylococcal substance. *J Med Microbiol* 34 (4): 213-7, 1991.
54. Mackie AD, Thornton SJ, Edenborough FP. Cystic fibrosis-related diabetes. *Diabet Med* 20 (6): 425-36, 2003.
55. Marks JH, Hare KL, Saunders RA, Homnick DN. Pulmonary function and sputum production in patients with cystic fibrosis: a pilot study comparing the PercussiveTech HF device and standard chest physiotherapy. *Chest* 125 (4): 1507-11, 2004.
56. Maslow JN, Brecher S, Gunn J, Durbin A, Barlow MA, Arbeit RD. Variation and persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains among individual patients over extended periods of time. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 14 (4): 282-90, 1995.
57. Mastella G, Zanolla L, Castellani C, Altieri S, Furnari M, Giglio L, Lombardo M, Miano A, Sciuto C, Pardo F, Magazzu G. Neonatal screening for cystic fibrosis: long-term clinical balance. *Pancreatology* 1 (5): 531-7, 2001.
58. Mathee K, Ciofu O, Sternberg C, Lindum PW, Campbell JI, Jensen P, Johnsen AH, Givskov M, Ohman DE, Molin S, Hoiby N, Kharazmi A. Mucoïd conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 145 (Pt 6): 1349-57, 1999.
59. McCaffery K, Olver RE, Franklin M, Mukhopadhyay S. Systematic review of antistaphylococcal antibiotic therapy in cystic fibrosis. *Thorax* 54 (5): 380-3, 1999.
60. Milla CE, Warwick WJ. Risk of death in cystic fibrosis patients with severely compromised lung function. *Chest* 113 (5): 1230-4, 1998.
61. Moore PC, Lindsay JA. Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes. *J Clin Microbiol* 39 (8): 2760-7, 2001.
62. Morgan WJ, Butler SM, Johnson CA, Colin AA, FitzSimmons SC, Geller DE, Konstan MW, Light MJ, Rabin HR, Regelman WE, Schidlow DV, Stokes DC, Wohl ME, Kaplowitz H, Wyatt MM, Stryker S. Epidemiologic study of cystic fibrosis: design and implementation of a prospective,

- multicenter, observational study of patients with cystic fibrosis in the U.S. and Canada. *Pediatr Pulmonol* 28 (4): 231-41, 1999.
63. Musser JM. Molecular population genetic analysis of emerged bacterial pathogens: selected insights. *Emerg Infect Dis* 2 (1): 1-17, 1996.
 64. Nesterenko LN, Zueva VS. [*Staphylococcus aureus* phages]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* (11): 76-82, 1989.
 65. Noble WC. Skin microbiology: coming of age. *J Med Microbiol* 17 (1): 1-12, 1984.
 66. Novick RP, Projan SJ, Kornblum J, Ross HF, Ji G, Kreiswirth B, Vandenesch F, Moghazeh S. The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* 248 (4): 446-58, 1995.
 67. Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis* 2 (3): 180-9, 2002.
 68. Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288 (5469): 1251-4, 2000.
 69. O'Neill AJ, Chopra I. Insertional inactivation of mutS in *Staphylococcus aureus* reveals potential for elevated mutation frequencies, although the prevalence of mutators in clinical isolates is low. *J Antimicrob Chemother* 50 (2): 161-9, 2002.
 70. Parker MT. The significance of phage-typing patterns of *Staphylococcus aureus*. In: Eastmon CSF, Adlam C., ed. *Staphylococci and staphylococcal infections*. London: Academy Press, pp. 33-62, 1983.
 71. Patel GK, Finlay AY. Staphylococcal scalded skin syndrome: diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol* 4 (3): 165-75, 2003.
 72. Peacock SJ, de Silva GD, Justice A, Cowland A, Moore CE, Winearls CG, Day NP. Comparison of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis as tools for typing *Staphylococcus aureus* isolates in a microepidemiological setting. *J Clin Microbiol* 40 (10): 3764-70, 2002.
 73. Posselt HG. [Mucoviscidosis--cystic fibrosis. Diagnosis--therapy--prognosis]. *Z Arztl Fortbild Qualitatssich* 91 (3): 243-9, 1997.

74. Prunier AL, Malbruny B, Laurans M, Brouard J, Duhamel JF, Leclercq R. High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains. *J Infect Dis* 187 (11): 1709-16, 2003.
75. Puchelle E, Bajolet O, Abely M. Airway mucus in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 3 (2): 115-9, 2002.
76. Ratjen F. Changes in strategies for optimal antibacterial therapy in cystic fibrosis. *Int J Antimicrob Agents* 17 (2): 93-6, 2001.
77. Reiss MA. Toxic shock syndrome. *Prim. Care Update Ob Gyns* 7 (3): 85-90, 2000.
78. Romling U, Schmidt KD, Tummler B. Large chromosomal inversions occur in *Pseudomonas aeruginosa* clone C strains isolated from cystic fibrosis patients. *FEMS Microbiol Lett* 150 (1): 149-56, 1997.
79. Safdar N, Maki DG. The commonality of risk factors for nosocomial colonization and infection with antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus*, enterococcus, gram-negative bacilli, *Clostridium difficile*, and *Candida*. *Ann Intern Med* 136 (11): 834-44, 2002.
80. Schmidt KD, Schmidt-Rose T, Romling U, Tummler B. Differential genome analysis of bacteria by genomic subtractive hybridization and pulsed field gel electrophoresis. *Electrophoresis* 19 (4): 509-14, 1998.
81. Schneewind O, Fowler A, Faull KF. Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus*. *Science* 268 (5207): 103-6, 1995.
82. Shapera RM, Warwick WJ, Matsen JM. Clindamycin therapy of staphylococcal pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *J Pediatr* 99 (4): 647-50, 1981.
83. Shuter J, Hatcher VB, Lowy FD. *Staphylococcus aureus* binding to human nasal mucin. *Infect Immun* 64 (1): 310-8, 1996.
84. Slobodnikova L. [*Staphylococcus aureus* and the human immune system]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 44 (3): 130-8, 1995.
85. Smith A. Pathogenesis of bacterial bronchitis in cystic fibrosis. *Pediatr Infect Dis J* 16 (1): 91-5; discussion 95-6, 123-6, 1997.

86. Smith JM, Feil EJ, Smith NH. Population structure and evolutionary dynamics of pathogenic bacteria. *Bioessays* 22 (12): 1115-22, 2000.
87. Smyth A, Walters S. Prophylactic antibiotics for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* (3): CD001912, 2003.
88. Sompolinsky D, Samra Z, Karakawa WW, Vann WF, Schneerson R, Malik Z. Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. *J Clin Microbiol* 22 (5): 828-34, 1985.
89. Szaff M, Hoiby N, Flensburg EW. Frequent antibiotic therapy improves survival of cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Acta Paediatr Scand* 72 (5): 651-7, 1983.
90. Taylor CJ, Aswani N. The pancreas in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 3 (1): 77-81, 2002.
91. Tenover FC, Biddle JW, Lancaster MV. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 7 (2): 327-32, 2001.
92. Tenover FC, Gaynes, R.P. The Epidemiology of Staphylococcus Infections. In: Fischetti VA NR, Ferretti JJ, Portnoy DA, and Rood JI, ed. *Gram-Positive Pathogens*. Washington, D.C: ASM Press, pp. 414-421, 2000.
93. Thomas VL, Sanford BA, Ramsay MA. Calcium- and mucin-binding proteins of staphylococci. *J Gen Microbiol* 139 (Pt 3): 623-9, 1993.
94. Tompkins DC, Blackwell LJ, Hatcher VB, Elliott DA, O'Hagan-Sotsky C, Lowy FD. *Staphylococcus aureus* proteins that bind to human endothelial cells. *Infect Immun* 60 (3): 965-9, 1992.
95. Trivier D, Houdret N, Courcol RJ, Lamblin G, Roussel P, Davril M. The binding of surface proteins from *Staphylococcus aureus* to human bronchial mucins. *Eur Respir J* 10 (4): 804-10, 1997.
96. Vandenberg MF, Verbrugh HA. Carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical relevance. *J Lab Clin Med* 133 (6): 525-34, 1999.
97. von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med* 344 (1): 11-6, 2001.

98. Wagener JS, Kahn TZ, Copenhaver SC, Accurso FJ. Early inflammation and the development of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol Suppl* 16: 267-8, 1997.
99. Weaver LT, Green MR, Nicholson K, Mills J, Heeley ME, Kuzemko JA, Austin S, Gregory GA, Dux AE, Davis JA. Prognosis in cystic fibrosis treated with continuous flucloxacillin from the neonatal period. *Arch Dis Child* 70 (2): 84-9, 1994.
100. Wertheim HF, Vos MC, Ott A, Voss A, Kluytmans JA, Vandembroucke-Grauls CM, Meester MH, van Keulen PH, Verbrugh HA. Mupirocin prophylaxis against nosocomial *Staphylococcus aureus* infections in nonsurgical patients: a randomized study. *Ann Intern Med* 140 (6): 419-25, 2004.
101. Wilkinson BJ. Biology. In: Crossley KB, Archer, G.L., ed. *The staphylococci in human diseases*. New York, Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, San Francisco, Tokyo: Churchill Livingstone, pp. 1-37, 1997.
102. Witte W. Diagnostics, Typing and Taxonomy. In: Fischetti VA NR, Ferretti JJ, Portnoy DA, and Rood JI, ed. *Gram-Positive Pathogens*. Washington, DC: ASM Press, pp. 309-316, 2000.
103. Ziebuhr W, Dietrich K, Trautmann M, Wilhelm M. Chromosomal rearrangements affecting biofilm production and antibiotic resistance in a *Staphylococcus epidermidis* strain causing shunt-associated ventriculitis. *Int J Med Microbiol* 290 (1): 115-20, 2000.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Hygiene-Institut, Lehrbereich Medizin, unter der Anleitung von Frau PD Dr. C. Wolz, Hygiene-Institut der Universität Tübingen, durchgeführt. Ihr danke ich für die Überlassung des Themas und für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit.

Frau Dr. C. Goerke danke ich ebenfalls für die unermüdliche Betreuung und die immer bereitwillige Unterstützung im Laufe dieser Studie.

Besonders danke ich Frau B. Kahl und Herrn C. von Eiff für die freundliche Überlassung der *S. aureus* -Folgeisolate ihrer Arbeitsgruppe.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Frau S. Esser, für Ihre Hilfe und tatkräftige Unterstützung bei den Laborarbeiten, bedanken.

Außerdem danke ich ganz besonders Frau R. Schwetlick und Frau A. Pflugfelder für das Korrekturlesen.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders herzlich bei meiner Familie bedanken, ohne deren Unterstützung die Fertigstellung dieser Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Saskia Matias y Papenberg
Geburtstag: 28.12.1977
Geburtsort: Stuttgart
Eltern: Lorenzo Matias und Barbara Papenberg

Schul- und Hochschulausbildung:

1983-1996: Grundschule und Gymnasium an der Deutschen Schule, Madrid
1997-2004: Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen

Examina:

1996: Deutsche und Spanische Reifeprüfung
06.05.2004: Dritter Abschnitt Ärztliches Staatsexamen

Auslandspraktika:

2001: Innere Medizin am Universitätskrankenhaus „La Paz“ in Madrid, Spanien
2002: Infektions- und Tropenmedizin am Universitätskrankenhaus “Cayetano Heredia” in Lima, Peru
2003: Gynäkologie und Geburtshilfe am Universitätskrankenhaus „Hospital Civil“ in Guadalajara, Mexiko
2004: Herz- und Gefäßchirurgie am Texas Heart Institute in Houston, Texas

Seit 15.07.2004: Assistenzärztin, Frauenklinik der Städtischen Kliniken, Esslingen a. N.