Universitätsklinikum Ulm
Institut für Mikrobiologie und Hygiene
Amtierender Leiter: Prof. Dr. med. Steffen Stenger

Die molekulare Epidemiologie „Streptococcal Toxic Shock Syndrome“ verursachender Gruppe-B-Streptokokken

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Beatrice Reinisch
aus Altenburg

2010

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Barbara Spellerberg

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Detlef Michel

Tag der Promotion: 10.06.2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1 Einleitung **1**

1.1 Streptokokken 1

1.2 STSS und NF 4

1.2.1 Klinik 4

1.2.2 Forschungsbedarf auf molekularer Ebene 5

1.3 STSS-verursachende GBS 5

1.4 Typisierung der Streptokokken 6

2 Material und Methoden **11**

2.1 Verwendete Isolate 11

2.2 Methoden 11

3 Ergebnisse **21**

3.1 Sequenztypen nach MLST 21

3.2 Burst-Diagramme 24

3.3 Multiplex-PCR 27

4 Diskussion **28**

4.1 Sequenztypen 28

4.2 Burst-Diagramme 29

4.3 Multiplex-PCR 30

4.4 Virulenzfaktoren 34

5 Zusammenfassung **40**

6 Literaturverzeichnis **42**

A Burst-Diagramme **50**

Abbildungsverzeichnis **54**

Tabellenverzeichnis **55**

Abkürzungsverzeichnis

verwendete Abkürzung	Bedeutung
ARDS	**A**cute **R**espiratory **D**istress **S**yndrome
Aqua bid.	**Aqua bid**estilliert
bp	**B**asen**p**aare
CDC	**C**enter of **D**isease **C**ontrol and Prevention
DIC	**D**isseminated **I**ntravascular **C**oagulopathy
DNA	**D**esoxyribo**N**ucleic**A**cid
dNTP	**D**esoxy-**N**ukleinsäure**T**ri**P**hosphat
EDTA	**E**thylen**D**iamin**T**etraessigsäure (a=**A**cid)
GAS	**G**ruppe-**A**-**S**treptokokken
GBS	**G**ruppe-**B**-**S**treptokokken
IL-...	**I**nter**L**eukin-...
MLST	**M**ulti **L**ocus **S**equence **T**yping
MVLST	**M**ulti **V**irulence **L**ocus **S**equence **T**yping
mRNA	**m**essenger-**R**ibo**n**ucleic**a**cid
NADase	**N**ikotin**A**mid**D**inukleotid-glykohydrol**ase**
NF	**N**ekrotisierende **F**asziitis
NT	**N**on-**T**ypeable
PCR	**P**olymerase **C**hain **R**eaction
PFGE	**P**ulsed-**F**ield **G**el **E**lectrophoresis
PMN	**P**oly**M**orpho**N**ukleäre (Leukozyten)
SLO	**S**trepto**L**ysin **O**
SLS	**S**trepto**L**ysin **S**
SPE	**S**treptococcal **P**yrogenic **E**xotoxin
S. agalactiae	***S**treptococcus agalactiae*
S. dysgalactiae	***S**treptococcus dysgalactiae*
S. pneumoniae	***S**treptococcus pneumoniae*
S. pyogenes	***S**treptococcus pyogenes*
STSS	**S**treptococcal **T**oxic **S**hock **S**yndrome
TNFα	**T**umor **N**ekrose **F**aktor α

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Streptokokken

Streptokokken gehören zu den gram-positiven humanpathogenen Keimen. Aufgrund ihres Hämolyse-Verhaltens während ihres Wachstums auf Blut-Agar-Platten kann man sie einteilen in α-, β- und γ-hämolytisch. α-Hämolyse beschreibt dabei eine partielle Lyse der umgebenden Erythrozyten, sodass die Abbauprodukte des Hämoglobins als grüne Verfärbung des Mediums um die Kolonien herum wahrzunehmen sind. Bei der β-Hämolyse werden die Erythrozyten vollständig gelöst, sodass der „Hof“ um die wachsenden Kolonien klar erscheint. γ-Hämolyse sagt aus, dass die umgebenden Zellen nicht lysiert werden.

Weiterhin können die Streptokokken aufgrund spezieller Polysaccharide auf ihrer Zellwand, den sogenannten Lancefield-Antigenen, in Gruppen unterteilt werden. Lediglich *Streptococcus pneumoniae* und die sogenannte *Viridans*-Gruppe besitzen keine Lancefield-Antigene [21].

Streptococcus agalactiae sind β-hämolysierende Gruppe-B-Streptokokken (GBS). (siehe Abb. 1) Sie tragen das Lancefield-Antigen B und lysieren bei Anzüchtung auf einem Blut-Agar die umgebenden Erythrozyten vollständig. Bekannt sind sie

als Bestandteil der Vaginalflora bei Frauen. Als solcher können diese Streptokokken während des Geburtsvorganges übertragen werden und bei den Neugeborenen typischerweise Meningitiden, Pneumonien und Sepsis auslösen. Ebenso können die GBS im Verlauf einer Schwangerschaft zur Bakteriämie und Sepsis bei den Frauen selbst führen, sodass der Fetus sekundär infiziert wird, was in ca. 30 % der Fälle in einem spontanen Abort oder einer Totgeburt resultiert.

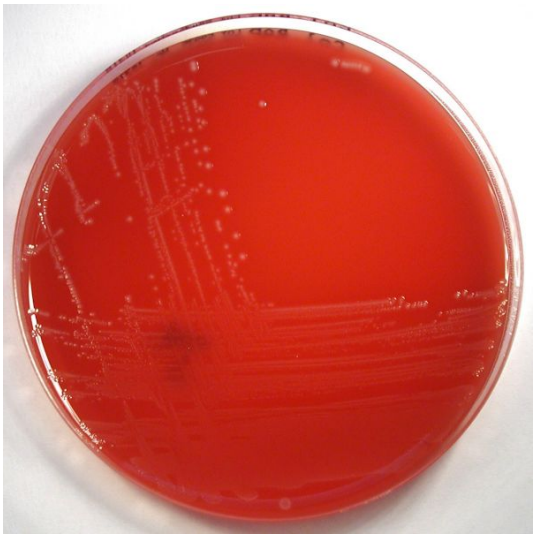

Abb. 1: Streptococcus agalactiae (Gruppe-B-Streptokokken, GBS) nach einem Tag Wachstum bei 37°C [32]. Der β-Hämolyse-Hof fällt bei Gruppe-B-Streptokokken wesentlich geringer aus als bei Gruppe-A-Streptokokken (GAS). (vgl. Abb. 2).

Auch in anderen immunkompromittierten Personen treten *Streptococcus agalactiae* gelegentlich als Erreger von Pneumonie, Sepsis oder (selten) Meningitis auf, wobei bevorzugt ältere Personen mit Vorerkrankungen[1] betroffen sind [27]. Auch Haut-, Weichteil-, Knochen- und Gelenkinfektionen sind möglich.
Als wesentlich weniger ernstes aber typisches Krankheitsbild tritt – auch bei Immunkompetenten – eine Harnwegsentzündung auf.

Bei einer zweiten humanpathogenen Gruppe handelt es sich um die β-hämolysierenden Gruppe-A-Streptokokken (GAS), zu der z. B. *Streptococcus*

[1] Diabetes mellitus, Lebererkrankungen, Schlaganfall oder Krebs in der Vorgeschichte, Dekubitus

pyogenes gehört. (siehe Abb. 2) Aus der Zellwand dieser Bakterien ragen filamentöse Proteine hervor, welche als M-Proteine bezeichnet werden und anhand ihrer antigenen Struktur eine weitere Einteilung der Gruppe-A-Streptokokken in Serovare erlauben. Der biologische Nutzen dieser M-Proteine, die von sogenannten emm/emmL-Genen abgelesen werden, liegt in ihrer antiphagozytotischen Wirkung. M-Proteine tragen auch zur Pathogenität für den Menschen bei, indem sie z.B. an humanes Kollagen IV binden und so die Bildung von Autoantikörpern induzieren, was nach überstandener Infektion zu den Folgekrankheiten Glomerulonephritis und/oder akutes rheumatisches Fieber führen kann bzw. sich als Endo-/Myo-/Perikarditis, Chorea, Erythema marginatum oder Knötchen in der Subkutis zeigt.



Abb. 2: Gruppe-A-Streptokokken mit β-Hämolyse

Für die akuten Infektionen selbst zeichnen jedoch Toxine und Enzyme der Kokken verantwortlich. So greift das O_2-labile Streptolysin O (SLO) mit seiner porenbildenden Wirkung sowohl Erythrozyten als auch weitere Zellen an. Streptolysin O und S bezeichnet man daher als Hämolysine. Außerdem dient es dem menschlichen Immunsystem als Antigen, weswegen überstandene Infektionen anhand des Antistreptolysin[O]-Titers nachgewiesen werden. Die Bedeutung von Streptolysin S (SLS) bei der Krankheitsentstehung lässt sich auch daran begründen, dass der

menschliche Organismus SLS-negative Bakterien mit minimaler Gewebsverletzung und Entzündungsreaktion beseitigt, während SLS-positive Kokken mit Auslösung von Geschwüren, heftigen neutrophilen Entzündungsreaktionen, Gefäßverletzungen und Gewebsnekrosen in Verbindung gebracht werden [5].

Typischerweise lösen GAS Pharyngitis, Hautinfektionen wie beispielsweise ein Erysipel, Scharlach oder auch das „Streptococcal toxic shock syndrome“ (STSS) aus. Prophagen kodieren ungefähr 10% des Genoms von *S. pyogenes*, darunter wesentliche Virulenzfaktoren: namentlich pyrogene Streptokokken Exotoxine (Spe-) A, B und C [9]. Diese wirken als Superantigene, welche definitionsgemäß eine überschießende Zytokinproduktion auslösen und daher zu Fieber, Scharlach-Exanthemen/Enanthemen oder Sepsis bis hin zum STSS[2] und septischen Schock führen können. Besondere Risiko-MHCII-Allotypen[3] sollen dabei wegen ihrer hohen Affinität von SPE-(A) zu ihrem MHCII-Komplex und zur β-Kette des T-Zellrezeptors für das seltene Auftreten der nekrotisierenden Fasziitis (NF) (1-2 erfasste Fälle/Million pro Jahr) verantwortlich sein [45], [37].

1.2 STSS und NF

1.2.1 Klinik

1994 wurde in der britischen Presse von sogenannten „flesh-eating bacteria“ berichtet, welche innerhalb eines halben Jahres eine Epidemie nekrotisierender Fasziitiden auslösten. Bei der NF[4] handelt es sich um eine akute Entzündung der

[2] Diagnosekriterien: Isolierung von GAS aus Patientenmaterialien + Hypotension + 2 Kriterien aus Nierenversagen/Koagulopathie/Leberschädigung/Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)/Exanthem/Desquamation/Gangrän [51]

[3] DRB*14/DQB*0503 und DRB*07/DQB*0201

[4] Diagnosekriterien nach [51]: Weichteilnekrose mit Beteiligung der Faszie + Isolierung von GAS aus normalerweise sterilem Material ODER min. 1 Kriterium aus Tod/Schock (systolischer Blutdruck <90 mmHg)/Disseminated intravascular coagulopathy(DIC)/Organversagen [Lunge, Leber, Niere]

subkutanen Faszien mit Gangrän des subkutanen Fettgewebes und der Muskulatur [25]. Klinisch präsentiert sich der meist junge Patient ohne Vorerkranungen mit plötzlich auftretenden heftigen Schmerzen, häufig an der Stelle eines vorhergehenden Bagatelltraumas. In 50 % der Fälle bleibt die Eintrittspforte allerdings ungeklärt. Es folgen Schwellung, Rötung und Erwärmung. Während der nächsten 24 bis 48 Stunden verfärbt sich das Erythem ähnlich einem frischen Hämatom; Bläschen und Blasen, welche eine klare, gelbe bis dunkelrote Flüssigkeit enthalten, formen sich. Aus den verfärbten Arealen entwickelt sich am 4. bis 5. Tag eine Gangrän, ab dem 7. bis 10. Tag erscheint eine scharfe Demarkationslinie. Unter der Haut befindet sich zu diesem Zeitpunkt eine ausgedehnte Nekrose des subkutanen Gewebes. Während dieses Prozesses fiebert der Patient und trübt ein, was sich als Verwirrung, Delir oder Koma äußern kann.
Die Letalität liegt trotz aggressiver antibiotischer und chirurgischer Therapie zwischen 20 und >50 %. Diese „flesh-eating bacteria“ wurden schließlich als Gruppe-A-Streptokokken (GAS) identifiziert.

1.2.2 Forschungsbedarf auf molekularer Ebene

Derzeit wird das Auftreten des STSS und NF aufgrund pyrogener Streptokokken Exotoxine (Spe) postuliert. Da hierbei jedoch Diskrepanzen zwischen dem bisherigen Lehrbuchwissen und dem aktuellen Forschungsstand bestehen, sei für eine Diskussion der molekularen Vorgänge auf das Kapitel 4.4 verwiesen.

1.3 STSS-verursachende GBS

GAS sind nicht die einzigen Vertreter der Streptokokken, die subkutanes Fettgewebe, Muskeln und Faszien in nekrotisches Gewebe umwandeln und gleichzeitig einen Schock mit oder ohne Organversagen auslösen können. In 51% der Fälle werden andere Streptokokken (non-GAS) isoliert [45]. In letzter Zeit fallen zunehmend Ka-

suistiken auf [20], [10], [4][5], bei denen in Zusammenhang mit STSS bzw. NF alleinig Streptokokken der Gruppe B, wie sie bei 16% aller Frauen im Vaginal- oder Rektaltrakt vorkommen [8], isoliert werden konnten. GBS sind bisher eher als Auslöser für early-onset-Meningitis oder/und Sepsis bei Neugeborenen bekannt[6].

Müssen wir jetzt die GBS als die neuen „fleischfressenden Bakterien“ fürchten? - Das wird vermutlich nur die Zukunft zeigen, doch können wir uns zunächst in dieser Arbeit mit der Frage befassen:

Handelt es sich bei den „gefährlichen“ (= invasiven) GBS um die gleichen Subtypen, die einen nicht unbedeutenden Teil der Bevölkerung kolonisieren? Handelt es sich möglicherweise um einen Klon?

Zur Beantwortung dieser Frage wenden wir uns der Epidemiologie dieser invasiven und kolonisierenden Streptokokken zu.

1.4 Typisierung der Streptokokken

Die Typisierung dient der Unterteilung der Streptokokken innerhalb einzelner Spezies.

Die erste Subtypisierung der nach dem Lancefield-B-Antigen bezeichneten Streptokokken erfolgte zunächst über kapsuläre Polysaccharide, die sich an der Oberfläche der Bakterienwand befinden. Daraus resultiert die Einteilung in die neun Serotypen Ia bis VIII. Allerdings ergibt sich bei fehlenden Polysacchariden oder fehlender Exprimierung der Kapsel das Problem nicht-typisierbarer („non-typeable“, kurz NT-) Streptokokken. Unter diesen NT-Streptokokken fanden sich vereinzelte Stämme, welche mit einem bisher unkonventionellen Antiserum reagierten und in ihrer DNA die Gene für ein weiteres kapsuläres Polysaccharid tragen, weswegen vor

[5] Kontakt: s.besier@em.uni-frankfurt.de
[6] s. Kapitel 1.1

kurzem über einen zusätzlichen Serotyp IX berichtet wurde [48]. Die Mehrzahl der untersuchten Stämme blieben allerdings „non-typeable“.

Ein zweites System unterteilt die GBS nach ihren Oberflächenproteinen. Bisher beschrieben wurden rib, Epsilon, Alpha-C, alp2/3 und alp4 [14]. Schon aus der Differenz der Subtypen wird deutlich, dass beide Systeme nicht hundertprozentig miteinander übereinstimmen. Zudem erfolgt hier eine Genotypisierung von Merkmalen, die unter Umständen phänotypisch modifiziert exprimiert werden und nur begrenzt Rückschlüsse auf die Verwandtschaft zulassen. Der nächste Schritt bestand daher in dem Versuch, die Streptokokken auf der Ebene ihrer Desoxyribonukleinsäure (DNA)-sequenz genotypisch zu charakterisieren.

Zu diesem Zweck trennte man GBS-DNA elektrophoretisch auf, stieß jedoch bald auf das Problem, dass zu große DNA-Stücke nicht wie geplant durch das Gel liefen, sondern einen uncharakteristischen Schimmer ohne Muster auf dem Gel hinterließen. Dieses Problem wird durch die „**P**ulsed-**F**ield **G**el **E**lectrophoresis“ (PFGE) gelöst: Durch einen ständigen Wechsel der Polarität am Gel werden auch größere DNA-Stücke aufgetrennt, sodass sich für einzelne GBS-Stämme die entsprechenden Profile ergeben. Auf diese Weise lassen sich in relativ kurzer Zeit viele Stämme nebeneinander typisieren, jedoch ergibt sich neben dem hohen technischen Aufwand ein Vergleichsproblem. Je nach eingesetztem Gel oder verwendeter Spannung können sich für identische Stämme unterschiedliche Bilder auf dem Gel ergeben, welche in verschiedenen Laboren selbst mit genauen Standardisierungen nicht eindeutig reproduzierbar sind. Ein Vorteil liegt darin, dass mithilfe der PFGE die Zuordnung von NT-Stämmen zu Serotypen gelingen kann [47]. Für den Vergleich innerhalb eines Labores, z.B. bei der Fragestellung nach Übereinstimmung der Isolate zweier Patienten desselben Krankenhauses, stellt sie eine sinnvolle Methode dar. Ein identisches Bandenmuster bedeutet im Wesentlichen ein identisches Isolat - vorausgesetzt die Proben wurden in einem engen Zeitraum gewonnen,

der keinen Spielraum für Punktmutationen zulässt, welche im Bandenmuster auf dem Gel nicht erkannt werden können [33], [35]. Limitiert wird das Verfahren durch sein „Auflösungsvermögen“, d.h. die Abgrenzbarkeit der Banden auf dem Gel.

Um hingegen international Vergleiche anstellen zu können und gleichzeitig auf Ebene der DNA-Sequenz eine Klassifizierung zu erreichen, hat sich ein neueres Verfahren bewährt, welches auch für die vorliegende Arbeit verwendet wurde und im Folgenden kurz vorgestellt werden soll: die Multilokus-Sequenztypisierung („Multi Locus Sequence Typing“), kurz MLST. Für eine genauere Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte sei auf Kapitel 2.2 verwiesen.

Erstmalig wurde dieses Verfahren 1998 von M. C. J. Maiden *et al.* für *Neisseria meningitidis* beschrieben [40]. Es beruht auf der Aufschlüsselung typischer Allele der zu untersuchenden Bakterien, sog. „housekeeping genes“ oder „housekeeping loci“, nach deren DNA-Sequenz. Diese „housekeeping genes“ kodieren z. B. spezifische Transportproteine, die relativ konstant weitergegeben werden, nicht jedoch Virulenzfaktoren oder andere sich rasch verändernde Merkmale. Jeder erstmalig nachgewiesenen DNA-Sequenz eines „housekeeping gene“ wird eine neue Nummer zugeordnet, sodass sich selbst Punktmutationen numerisch voneinander unterscheiden. Je nach Anzahl der „housekeeping genes“ erhält man auf diese Weise eine Kombination, die die jeweiligen Sequenzen beschreibt. Beispielsweise ergeben sieben Genloci eine Kombination aus sieben Nummern. Eine solche Kombination wird als Sequenztyp zusammengefasst. Zwei verschiedene Sequenztypen unterscheiden sich in mindestens einem Allel eines „housekeeping gene“.

Auf diese Weise erhält man Daten, die weltweit zwischen den unterschiedlichsten Laboren vergleichbar sind. Dies stellt einen wichtigen Unterschied zur Pulsfeld-Gelelektrophorese (siehe Seite 7) dar, bei der große DNA-Fragmente nach ihrer Beweglichkeit im Gel aufgetrennt werden, sodass ebenfalls eine Untersuchung

auf DNA-Ebene möglich ist – allerdings kaum ein Vergleich zwischen verschiedenen Laboren aufgrund variabler Untersuchungsbedingungen. Zudem erfasst man bei der MLST die Gene selbst bei geringfügigen Änderungen der Sequenz direkt. Diese Änderungen sind unter Umständen, z.B. bei Punktmutationen ohne resultierende Veränderung der Aminosäuresequenz, in den Genprodukten gar nicht nachvollziehbar. Aus ihnen lassen sich jedoch Rückschlüsse auf eine mögliche Abfolge der Evolution ziehen. Für die MLST benötigt man lediglich DNA, die mittels Polymerase-Kettenreaktion (**P**olymerase **C**hain **R**eaction, PCR) amplifiziert und anschließend sequenziert werden kann. Notwendig ist jedoch das Finden geeigneter „housekeeping genes“, die einerseits identisch genug weitergegeben werden um einen Vergleich überhaupt durchführen zu können, andererseits variabel genug sind um einzelne Allele bzw. Sequenztypen zu definieren. An dieser Voraussetzung scheitert z. B. die MLST bei *Salmonella typhimurium* [16], da die bisherigen „housekeeping genes“ dieser Spezies eine 100 %ige Übereinstimmung ergeben und somit die Einteilung in unterschiedliche Sequenztypen nicht möglich ist.

Auch ein zeitlicher Unterschied zwischen den einzelnen Isolaten spielt für die Vergleichbarkeit keine Rolle, da das Verfahren beliebig oft aus dem Ausgangsmaterial reproduzierbar ist. Die weltweite Verfügbarkeit und gleichzeitige Sammlung der gewonnenen Daten auf einem Server führt zu einem schnellen Anstieg der Informationen: 2003 waren nur 28 Sequenztypen für *S. agalactiae* bekannt [52], 2010 sind es laut Statistik 500 Profile [31][7]. Da zeitliche Unteschiede für die MLST keine Rolle spielen, lässt sich die mögliche Evolution der untersuchten Spezies[8] ebenso verfolgen wie deren weltweite Ausbreitung bzw. geografische Isolation. So wurde eine bisher einzigartige Subpopulation von *Cryptococcus neoformans* in Botswana entdeckt [39].

Einen entscheidenden Nachteil stellen jedoch die relativ hohen Kosten dar, welche mit der Untersuchungsmethode verbunden sind. Außerdem werden nicht

[7] Stand: 05.07.2010
[8] siehe Seite 29

die eigentlichen, sich häufig rekombinierenden Virulenzfaktoren erfasst, sondern eben relativ konstant weitergegebene Merkmale wie z.B. Transportproteine. Zwar ermöglichst das eine Aussage über die generelle Epidemiologie, erlaubt aber keine direkten Rückschlüsse auf die tatsächliche Virulenz.

Für *Listeria monocytogenes* gelang bereits dieser Schritt einer Multi-Virulenz-Lokus Sequenztypisierung (MVLST) [12], allerdings müssen dafür entscheidende Virulenzfaktoren bekannt sein. Im Falle des STSS (und STSS-verursachender Bakterien) besteht jedoch auf dieser Ebene weiterhin Forschungsbedarf (siehe Seite 34), weswegen auch in dieser Arbeit der „indirekte“ Weg über die Epidemiologie gewählt wurde.
Die MLST für GBS wurde erstmalig 2003 von N. Jones *et al.* [36] durchgeführt.

Die für diese Arbeit untersuchten Gruppe-B-Streptokokken, welche während eines STSS aus dem Blut von Patienten isoliert worden sind, wurden uns freundlicherweise vom Center of Disease Control and Prevention (CDC) aus den USA bereitgestellt.

Mithilfe dieses Materials und der MLST wird in dieser Arbeit die Epidemiologie von STSS-verursachenden GBS untersucht: Bestehen Unterschiede in der Epidemiologie hinsichtlich der Sequenztypen von invasiven und kolonisierenden GBS? Sind bestimmte „Risiko-Sequenztypen“[9] oder gar ein bestimmter Klon für das Auftreten invasiver Erkrankungen verantwortlich? Gibt es „harmlose“ Sequenztypen?

[9] z.B. wurde für neonatale Infektionen ST-17 als ein „hochvirulenter“ Klon herausgearbeitet und ein entsprechender Schnelltest entwickelt [38].

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Verwendete Isolate

Eingang in die Untersuchung fanden 22 GBS-Stämme, die zuvor aus dem Blut von Patienten mit STSS isoliert worden waren. Im Center of Disease Control and Prevention (CDC) wurden sie aus drei verschiedenen Staaten der USA zusammengetragen. Die Untersuchung der Stämme erfolgte unabhängig von der ethnischen Gruppe der Patienten oder dem Verlauf der Erkrankung. In einem Fall traten STSS und NF gemeinsam auf. Die Informationen zu den Serotypen der invasiven Isolate wurden vom CDC übernommen (siehe Tabelle 1).
Zum Vergleich dienten 30 ausgewählte Isolate aus Aachen und München aus Vaginal- bzw. Rektalabstrichen von Frauen, deren Proben bereits für eine vorausgehende epidemiologische Studie gesammelt worden waren. Darunter befanden sich jeweils sechs Stämme der am häufigsten vertretenen fünf Serotypen Deutschlands [8].

2.2 Methoden

Die Anzüchtung der Streptokokken erfolgte auf Caso-Blutagar Tryptic Soy BAP[1] bei 37° C und 5 % CO_2 über Nacht im Brutschrank. Zur DNA-Isolierung wurde

[1] Heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim, Deutschland, http://www.heipha.de

Tab. 1: Verwendete Isolate des Center of disease control and prevention (CDC), welche in dieser Arbeit als „invasive Isolate“ bezeichnet werden. Abkürzungen: Alter = Patientenalter in Jahren (j), Monaten (m) oder Tagen (t); Geschlecht m = männlich, w = weiblich; Afro-Am. = Afro-Amerikaner

State-ID	LAB-ID	Serotyp	Alter j/m/t	Geschlecht	Rasse	Resultat	Material	STSS	NF
GA44702	7697-05	III	2m	w	Afro-Am.	überlebt	Blut	ja	nein
GA44997	3882-06	IV	46j	w	Afro-Am.	überlebt	Blut	ja	nein
MD63155	6226-06	V	70j	m	Weiß	überlebt	Blut	ja	nein
MD63178	3822-06	NT	66j	m	Weiß	verstorben	Blut	ja	nein
MD63192	3830-06	IA	79j	w	Weiß	verstorben	Blut	ja	nein
MD63238	3855-06	V	94j	m	Weiß	überlebt	Blut	ja	nein
MD63275	4194-06	V	46j	m	Weiß	verstorben	Blut	ja	nein
MD63278	4183-06	NT	59j	w	Weiß	überlebt	Blut	ja	nein
MD63354	4235-06	V	76j	w	Weiß	überlebt	Blut	ja	nein
MD63425	4269-06	III	35j	m	Weiß	verstorben	Blut	ja	nein
GA41788	9391-04	IA	71j	m	Weiß	überlebt	Blut	ja	nein
MD62534	5697-04	IA	0t	m	Afro-Am.	überlebt	Blut	ja	nein
MD62628	8673-04	V	60j	w	Weiß	überlebt	Blut	ja	nein
MD62792	9609-04	V	73j	w	Weiß	überlebt	Blut	ja	nein
MD62805	9612-04	II	65j	w	Afro-Am.	verstorben	Blut	ja	nein
MD62897	3329-05	IA	48j	m	Weiß	überlebt	Blut	ja	nein
MD62908	3339-05	V	43j	m	Weiß	überlebt	Blut	ja	nein
MD62929	3348-05	IB	63j	m	Weiß	verstorben	Blut	ja	nein
MD63041	4146-05	V	61j	w	Afro-Am.	verstorben	Blut	ja	ja
MD63069	4172-05	V	34j	w	Afro-Am.	überlebt	Blut	ja	nein
MD63092	4197-05	V	45j	w	Afro-Am.	überlebt	Blut	ja	nein
OR04123	6980-04	IA	1m	m	Weiß	verstorben	Blut	ja	nein

das QiaAmp DNA Kit[2] verwendet, gemäß dem Protokoll für grampositive Keime: Zur Gewinnung der chromosomalen DNA wurden die angewachsenen Kulturen vom Nährmedium in Eppendorf-Gefäße überführt und mit Qiagen-Puffer (20 mM Tris pH 8,0 + 2 mM EDTA + 1,2 % TritonX), Mutanolysin und Lysozym behandelt, anschließend bei 37° C 30 min lang unter Schüttelung inkubiert. Durch Hinzugabe von Proteinase K und AL-Puffer aus dem Kit mit nachfolgender erneuter Inkubation bei 56° C im Schüttler (1400 Umdrehungen/min) für 30 min und anschließend für 15 min bei 95° C erfolgte die Spaltung der Proteine. Nach kurzer Abzentrifugierung erfolgte anschließend die Ausfällung der DNA mittels 200 μl einer 100 %igen Ethanollösung. Die so erhaltene Mischung wurde in QIAmp-Säulchen transferiert und eine Minute bei 8000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Durch Zugabe von AW-1-Puffer wurde die in den Säulchen verbliebene DNA gebunden, im Weiteren mit AW-2-Puffer gereinigt und nach 1 min Inkubation mit 2x AE-Puffer eluiert. Für eine kurze Zusammenfassung sei hierzu auch auf Tabelle 2 verwiesen.

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch mit Ultrospec 3000[3] bei 312 nm. Dann wurden PCRs der „housekeeping genes“ adhP (Alcohol dehydrogenase), pheS (Phenylalanyl tRNA Synthetase), atr (Amino acid transporter), glnA (Glutamine Synthetase), sdhA (Serin dehydratase), glcK (Glucose kinase) und tkt (Transketolase) durchgeführt, um die einzelnen Stämme mittels MLST gemäß N. Jones *et al.* [36] zu typisieren.

Der 100 μl Amplifikationsansatz (siehe Tabelle 3) bestand dabei für jede Probe aus 10 μl Pufferlösung (10x Buffer: 100 mM Tris-HCl, 15 mM $MgCl_2$, 500 mM KCl, pH 8.3 (20° C)), 1 μl Taq-DNA-Polymerase und 2 μl PCR Nucleotide Mix[4]. Hinzu kamen jeweils 5 μl forward- und reverse-Amplifikations-Primer des jeweiligen „housekeeping locus“ und 5 μl isolierter DNA. Zum Erreichen der gewünschten Pro-

[2] Qiagen GmbH Germany, Hilden, Deutschland, http://www1.qiagen.com
[3] Pharmacia Biotech (jetzt: GE Healthcare Company, Hauptgeschäftssitz in Chalfont St. Giles, Großbritannien, http://www.gehealthcare.com)
[4] Roche, Grenzach, Deutschland, http://www.roche.de

Tab. 2: Zusammenfassung der Arbeitsschritte zur DNA-Isolierung in Tabellenform. Eine ausführliche Beschreibung befindet sich in Kapitel 2.2. Abkürzungen: U/ml = Units pro Milliliter; AL-Puffer dient der Aufrechterhaltung des optimalen Milieus für maximale Aktivität der Proteinase K, AW-1-Puffer zur Anbindung der Reaktionsprodukte an die QIAmp-Säulchen, AW-2-Puffer zur Aufreinigung und AE-Puffer zur Auswaschung derselben aus den Säulchen.

Arbeitsschritte	Geräte/Substanzen	Ablauf
Anzüchtung der Streptokokken	Caso-Blutagar Tryptic Soy BAP[1]	Bebrütung bei 37° C und 5 % CO_2 über Nacht
DNA-Isolierung	QiaAmp DNA Kit[2]	Überführung der angewachsenen Kulturen vom Nährboden in Eppendorf-Gefäße Zugabe von • 126 μl Qiagen-Puffer • 18 μl Mutanolysin (5000 U/ml) • 18 μl Lysozym (50 mg/ml) Inkubation unter Schüttelung bei 37° C für 30 min Zugabe von • 20μl Proteinase K • 200 μl AL-Puffer Inkubation bei 56° C im Schüttler (1400 Umdrehungen/min) für 30min Inkubation für 15 min bei 95° C Abzentrifugation
DNA-Aufreinigung gemäß Kit-Protokoll		Ausfällung mit 200 μl 100 %igen Ethanol Transfer in QIAmp-Säulchen Zentrifugation mit 8000 Umdrehungen/min Zugabe von • 500 μl AW-1-Puffer • 500 μl AW-2-Puffer • 2x 50 μl AE-Puffer
Konzentrationsbestimmung der DNA	Ultrospec 3000[3]	photometrische Bestimmung bei 312 nm

benmenge von 100 μl dienten entsprechend 72 μl Aqua bid. Die Primer-Sequenzen wurden aus der von Nicola Jones veröffentlichten Arbeit [36] übernommen (siehe Tabelle 4).

Tab. 3: Master-Mix für den Amplifikationsansatz zur Vervielfältigung der Bakterien-DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR), siehe auch Kapitel 2.2.

Menge	Substanz
10 μl	Puffer
1 μl	Taq-DNA-Polymerase (5 units/μl)
2 μl	PCR Nucleotide Mix[4] (200 μM pro dNTP)
5 μl	1:20 verdünnter forward-Amplifikations-Primer[a] (0,1 - 0,6 μM)
5 μl	1:20 verdünnter reverse-Amplifikations-Primer[a] (0,1 - 0,6 μM)
5 μl	isolierte DNA (20 ng/ml)
72 μl	Aqua bidestilliert
100 μl	Amplifikations-Ansatz

[a] des jeweiligen „housekeeping locus“

Tab. 4: Zur Amplifikation und zur Sequenzierung verwendete Primer für die Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung (MLST) der Gruppe-B-Streptokokken nach Nicola Jones *et al.* [36], aufgelistet nach dem jeweiligen „housekeeping gene“.

Genort	Verwendung	Primer(5´-3´)	Reverse-Primer(3´-5´)	Amplifikatlänge (bp)
adhP	Amplifikation	GTTGGTCATGGTGAAGCACT	ACTGTACCTCCAGCACGAAC	672
	Sequenzierung	GGTGTGTGCCATACTGATTT	ACAGCAGTCACAACCACTCC	498
pheS	Amplifikation	GATTAAGGAGTAGTGGCACG	TTGAGATCGCCCATTGAAAT	723
	Sequenzierung	ATATCAACTCAAGAAAAGCT	TGATGGAATTGATGGCTATG	501
atr	Amplifikation	CGATTCTCTCAGCTTTGTTA	AAGAAATCTCTTGTGCGGAT	627
	Sequenzierung	ATGGTTGAGCCAATTATTTC	CCTTGCTCAACAATAATGCC	501
glnA	Amplifikation	CCGGCTACAGATGAACAATT	CTGATAATTGCCATTCCACG	589
	Sequenzierung	AATAAAGCAATGTTTGATGG	GCATTGTTCCCTTCATTATC	498
sdhA	Amplifikation	AGAGCAAGCTAATAGCCAAC	ATATCAGCAGCAACAAGTGC	646
	Sequenzierung	AACATAGCAGAGCTCATGAT	GGGACTTCAACTAAACCTGC	519
glcK	Amplifikation	CTCGGAGGAACGACCATTAA	CTTGTAACAGTATCACCGTT	607
	Sequenzierung	GGTATCTTGACGCTTGAGGG	ATCGCTGCTTTAATGGCAGA	459
tkt	Amplifikation	CCAGGCTTTGATTTAGTTGA	AATAGCTTGTTGGCTTGAAA	859
	Sequenzierung	ACACTTCATGGTGATGGTTG	TGACCTAGGTCATGAGCTTT	480

Bei der PCR lief 30 Zyklen lang die Denaturierung bei 94° C für 60 s, die Annäherung der Primer bei 55° C für 45 s und die Polymerisierung der DNA-Stränge bei 72° C für 90 s ab. Zum Nachweis der erfolgreichen Amplifizierung wurden jeweils

10 μl der PCR-Produkte auf einem 1 %igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

Die erfolgreich amplifizierten PCR-Produkte wurden anschließend mit dem Purification Kit „NucleoSpin Extract“[5] gemäß dem enthaltenen Protokoll aufgereinigt (s. Tabelle 5). Zunächst erfolgte die Bindung der PCR-Produkte mittels NT-Puffer im Verhältnis 1:2 an die Siliziumoxid-Membran bei einer Minute Zentrifugation. Ein Reinigungsschritt mit Reinigungspuffer (NT3) bei 11.000 Umdrehungen pro Minute für 1min und die Entfernung des Waschpuffers bei 11.000 Umdrehungen/min für 2 min schlossen sich an. Abschließend wurde die Probe für 1 min mit Auswaschpuffer (NE) bei Raumtemperatur inkubiert und für 1 min bei obiger Umdrehungszahl zentrifugiert, um das gereinigte PCR-Produkt auszuwaschen. Für die Sequenzierung wurde das BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit[6] unter Zugabe der jeweiligen Sequenzierungs-Primer[7] nach Herstellerangaben verwendet, wobei folgende Reaktionsbedingungen bei der PCR herrschten: 96° C für 15 s, 50° C für 15 s und 60° C für 4 min; insgesamt 25 Zyklen lang.

Zur Aufreinigung der Reaktionsprodukte (siehe Tabelle 6) dienten Natriumacetat und 100 %iges Ethanol. Zudem wurden die Proben mit Dextranblau-Verdünnung angefärbt und nach 10min Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min zentrifugiert. Für die abgesetzten PCR-Produkte folgte ein zweiter Reinigungsschritt mit 70 % Ethanol und eine erneute fünfminütige Zentrifugation. Danach wurden die Proben getrocknet und im Anschluss in HiDi Formamide[6] resuspendiert. Anschließend wurden 5 μl der so resuspendierten Lösung nochmals mit 20 μl HiDi Formamide versetzt. Für die Sequenzierung wurde der ABI PRISM 310 Genetic Analyzer[6] verwendet.

[5] Macherey-Nagel, Düren, Deutschland, http://www.macherey-nagel.com
[6] Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland, www.appliedbiosystems.com
[7] jeweils forward und reverse, Thermo Electron, Ulm, Deutschland, http://www.thermo.com

Tab. 5: Arbeitsschritte zur Aufreinigung und Vorbereitung der PCR-Produkte zur Sequenzierungs-PCR. Für eine ausführliche Beschreibung sei auf Kapitel 2.2 verwiesen. PCR = Polymerase-Kettenreaktion.

Arbeitsschritte	Geräte/Substanzen	Ablauf
Aufreinigung der PCR-Produkte	Purification Kit „NucleoSpin Extract“[5]	Zugabe von • Anbindungspuffer (NT) im Verhältnis 1:2 Zentrifugation bei 11.000 Umdrehungen/min für 1min • 600 μl Reinigungspuffer (NT3) 11.000 Umdrehungen/min für 1 min Entfernung des Reinigungspuffers bei 11.000 Umdrehungen/min für 2min • 15-50 μl Auswaschpuffer (NE) Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur 11.000 Umdrehungen/min für 1 min
Ansatz zur Sequenzierungs-PCR	BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit[6]	Zugabe der jeweiligen Sequenzierungs-Primer[7] (s. Tabelle 4)

Der Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit der MLST-Internet-Datenbank für GBS [31] erfolgte anhand einer Umschreibung der reverse-Sequenzen[8] sowie einer direkten Gegenüberstellung der forward- und reverse-Sequenzen mithilfe der Multalin-Datenbank [30].

Außerdem wurden die einzelnen Sequenztypen mithilfe der auf eburst.mlst.net [28] verfügbaren Software ihren jeweiligen Burst-Gruppen[9] zugeordnet, um ihren Verwandtschaftsgrad festzustellen sowie die Verteilungswahr-

[8] mit Hilfe der frei verfügbaren Homepage [26] zur Umschreibung der reverse-Sequenzen

[9] Der eburst-Algorithmus wurde am „Department of Infectious Disease Epidemiology“ des „Imperial College London“ von Professor Brian G. Spratt entwickelt [29] und vergleicht verwandte Genotypen einer Bakterien-Spezies, um deren mögliche Evolution zu beschreiben.

Tab. 6: Arbeitsschritte zur Aufreinigung der PCR-Produkte und Vorbereitung zur Sequenzierung. Für eine ausführliche Beschreibung sei auf Kapitel 2.2 verwiesen. PCR = Polymerase-Kettenreaktion.

Arbeitsschritte	Geräte/Substanzen
Aufreinigung	Zugabe von • 10 μl 3 M Natriumacetat • 250 μl 100 % Ethanol
Anfärbung	80 μl Dextranblau-Verdünnung (10 μl auf 1,5 ml Aqua bidestilliert)
Inkubation	10 min bei Raumtemperatur
Zentrifugation	30 min bei 25.000 Umdrehungen/min
zweite Reinigung	70 % Ethanol
Zentrifugation	5 min bei 25.000 Umdrehungen/min
Trocknung	bei 37° C
Re-Suspension	25 μl HiDi Formamide[6]
Verdünnung	5 μl resuspendierte Lösung in 20 μl HiDi Formamide
Sequenzierung	ABI PRISM 310 Genetic Analyzer[6]

scheinlichkeit der untersuchten Isolate zu verifizieren, wobei zum Zeitpunkt der Untersuchung die Version eBURSTv3 vorlag.

Um die Korrelation zwischen Sequenztypen und Oberflächenproteinen zu demonstrieren, wurde für die invasiven Stämme eine Multiplex-PCR nach Roberta Creti [14] durchgeführt (siehe Tabelle 7). Ein Probenansatz enthielt dabei 5 μl (20 ng/ml) DNA, 5 μl 10x Puffer + 2 mM $MgCl_2$, 1 μl 400 μM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 2,5 μl 400 nM „universal forward“ Primer, sowie 2,5 μl 400 nM spezifischen reverse Primer[10] und 1 μl (0,25 units) Taq-Polymerase. Außerdem wurden 38 μl Aqua bid. zugegeben, um eine Menge von 55 μl pro Probe zu erhalten. Die anschließende PCR lief 3 min bei 96° C ab, danach folgten 30 Zyklen (jeweils 95° C für 60 s, 58° C für 45 s und 72° C für 45 s), die durch einen finalen Schritt bei 72° C für 10 min am Ende der PCR abgeschlossen wurden.

[10]beide Primer Thermo Electron, Ulm, Deutschland, http://www.thermo.com, Sequenz laut [14]

Tab. 7: Probenansatz für Multiplex-PCR (siehe auch Kapitel 2.2). PCR = Polymerase-Kettenreaktion. dATP = desoxy-Adenosintriphosphat, dCTP = desoxy-Cytosintriphosphat, dGTP = desoxy-Guanintriphosphat, dTTP = desoxy-Thymidintriphosphat

Menge	Substanz
5 μl	isolierte DNA (20 ng/ml)
5 μl	10x Puffer + 2 mM $MgCl_2$
1 μl	400 μM dATP, dCTP, dGTP und dTTP[4]
2,5 μl	400 nM „universal forward“ Primer[10]
2,5 μl	400 nM spezifischer reverse Primer[10]
1 μl	Taq-Polymerase (0,25 units/μl)
38 μl	Aqua bid.
55 μl	Probenansatz

Identifiziert wurden die einzelnen Oberflächenproteine über die Länge ihrer jeweiligen PCR-Produkte auf 2 %igem Agarose-Gel unter UV-Licht nach Anfärbung mit Ethidiumdibromid.

Zum Vergleich der Korrelation von Sequenztypen und Oberflächenproteinen wurde eine Darstellung von GBS aus dem Respirationstrakt von Patienten mit zystischer Fibrose bzw. deren kolonisierende Vergleichsgruppe aus einer vorhergehenden Arbeit [15] übernommen (siehe Abbildung 3, Seite 20).

Mit Hilfe der entsprechenden Daten vom CDC konnte ebenso die Korrelation zwischen Serotyp und Oberflächenproteinen der invasiven GBS dargestellt werden (siehe Abbildung 4, Seite 20).

Die Korrelation von *Sero*typ und Oberflächenprotein einerseits und *Sequenz*typ und Oberflächenprotein andererseits wird in Kapitel 4.3 diskutiert.

Alle Grafiken wurden mit Microsoft Excel 2002 erstellt, Tabellen mit LaTeX erarbeitet.

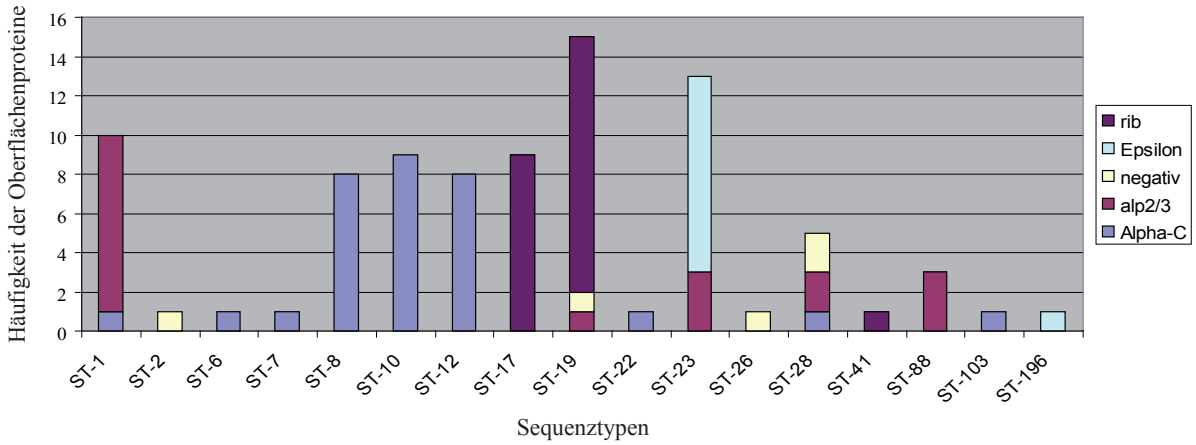

Abb. 3: Häufigkeit der Oberflächenproteine kolonisierender Gruppe-B-Streptokokken (GBS) bei Sequenztypen von GBS aus dem Respirationstrakt von Patienten mit zystischer Fibrose übernommen von Vera Eickel *et al.* [15]. Die Farben kodieren die nebenstehenden Oberflächenproteine (siehe Legende). ST = Sequenztyp

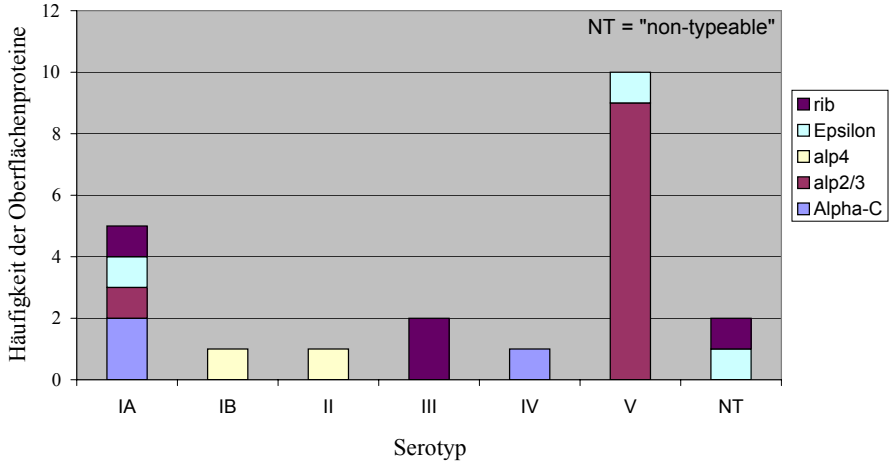

Abb. 4: Korrelation zwischen Serotyp und exprimiertem Oberflächenprotein bei invasiven Gruppe-B-Streptokokken (GBS). Die Serotypen der einzelnen Stämme wurden aus den Daten des Censters of disease control and prevention (CDC) (Tabelle 1) übernommen. Die Farben kodieren die nebenstehenden Oberflächenproteine (siehe Legende). Für die ausführliche Diskussion sei auf Kapitel 4.3 verwiesen.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Sequenztypen nach MLST

Abbildung 5 zeigt die einzelnen Allelnummern und die daraus resultierenden Sequenztypen sowohl für die invasiven Isolate als auch für die kolonisierende Referenzgruppe. Dabei ließen sich unter den 30 Referenzstämmen 13 verschiedene Sequenztypen nachweisen, darunter ein bisher nicht in der Datenbank eingetragenes tkt-Allel, welches sich durch einen Basenaustausch von Allel 2 unterscheidet, mit einem daraus resultierenden neuen Sequenztyp. Die 22 invasiven Isolate umfassen 8 bisher bekannte und 3 bislang nicht in der MLST-Datenbank [31] erfasste Sequenztypen. Einer dieser 3 Sequenztypen wird dabei durch eine neue Kombination bekannter Allele beschrieben, die beiden verbleibenden Sequenztypen durch einen Basenaustausch im Vergleich zu dem bekannten Allel 1 der Gene adhP bzw. glnA.

Stamm	inv/kol	adhP	pheS	atr	glnA	sdhA	glck	tkt	Sequenztyp nach MLST	Labor-ID	Serotyp
5aR	k	1	1	2	1	1	2	2	ST-1		
10aV	k	5	4	6	3	2	1	3	ST-23		
20V	k	10	1	4	1	3	3	2	ST-12		
21R	k	9	1	2	1	3	2	2	ST-6		
38V	k	1	1	3	2	2	2	2	ST-19		
40aV	k	4	1	4	1	3	3	2	ST-8		
62aR	k	10	1	2	1	3	2	3	ST-7		
72R	k	10	1	4	1	3	3	2	ST-12		
88aV	k	1	1	3	5	2	2	2	ST-28		
94aV	k	1	1	3	1	1	2	2	ST-2		
100aR	k	1	1	3	2	2	2	2	ST-19		
101R	k	5	4	6	3	2	1	3	ST-23		
121R	k	5	4	6	3	2	1	3	ST-23		
128V	k	2	1	1	2	1	1	1	ST-17		
139V	k	1	1	3	2	2	2	2	ST-19		
156V	k	9	1	4	1	3	3	2	ST-10		
M9aV	k	9	1	4	1	3	3	2	ST-10		
M9R	k	2	1	1	2	1	1	1	ST-17		
M15R	k	1	1	2	1	1	2	2	ST-1		
M21aV	k	16	1	2	2	9	2	2	ST-314		
M35aR	k	4	1	4	1	3	3	2	ST-8		
M36V	k	1	1	3	2	2	2	2	ST-19		
M46aR	k	9	1	4	1	3	3	2	ST-10		
M48aV	k	1	1	2	1	1	2	2*	*		
M59aR	k	4	1	4	1	3	3	2	ST-8		
M78aV	k	10	1	4	1	3	3	2	ST-12		
M78V	k	5	4	6	3	2	1	3	ST-23		
M82aV	k	1	1	3	2	2	2	2	ST-19		
M90V	k	1	1	3	2	2	2	2	ST-19		
M97R	k	2	1	1	2	1	1	1	ST-17		
286	i	13	3	1	3	1	1	1	ST-22	9612-04	II
287	i	5	4	6	3	2	1	3	ST-23	9391-04	Ia
288	i	1	1	2	1	1	2	2	ST-1	4194-06	V
289	i	5	25	4	1	2	1	3	*ST-397	3882-06	IV
290	i	1	1	2	1	1	2	2	ST-1	3339-05	V
291	i	1	1	3	2	2	2	2	ST-19	4269-06	III
292	i	1	1	2	1	1	2	2	ST-1	4235-06	V
293	i	5	4	6	3	2	1	3	ST-23	3329-05	Ia
294	i	1	1	2	1*	1	2	4	*	4146-05	V
295	i	1	1	2	1	1	2	2	ST-1	4197-05	V
296	i	4	1	4	1	3	3	2	ST-8	3348-05	Ib
297	i	5	4	6	3	2	1	3	ST-23	5697-04	Ia
298	i	1*	25	2	1	1	2	2	*	6226-06	V
299	i	1	1	2	1	1	2	2	ST-1	8673-04	V
300	i	1	1	2	1	1	2	2	ST-1	9609-04	V
301	i	2	1	1	2	1	1	1	ST-17	3822-06	NT
302	i	2	1	1	2	1	1	1	ST-17	7697-05	III
303	i	5	4	6	3	2	1	3	ST-23	3855-06	V
304	i	5	4	6	3	2	1	3	ST-23	6980-04	Ia
305	i	1	1	2	1	1	2	2	ST-1	4172-05	V
306	i	1	1	3	1	1	2	2	ST-2	4183-06	NT
307	i	5	10	6	3	2	1	3	ST-88	3830-06	Ia

Abb. 5: Allelnummern und Sequenztypen kolonisierender und invasiver Gruppe-B-Streptokokken. Mit * bezeichnete Allele waren zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht in der MLST-Datenbank [40] enthalten; das jeweils ähnlichste bekannte Allel ist zusätzlich angegeben. Bei Stamm 294 (rote Umrandung) traten STSS und NF gemeinsam auf.
Inzwischen ist Stamm 289 als ST-397 in der Datenbank aufgeführt (Stand: 09.07.2010).
Abkürzungen: inv = invasiv, kol = kolonisierend, MLST = multi locus sequence typing, STSS = streptococcal toxic shock syndrome, NF = nekrotisierende Fasziitis, ST = Sequenztyp, NT = „non-typeable“, d.h. keiner der bisher bekannten Serotypen.

Die Sequenztypen unterscheiden sich in ihrer Verteilung bei den invasiven GBS und den kolonisierenden Referenzstämmen (siehe Abbildung 6 und 7).

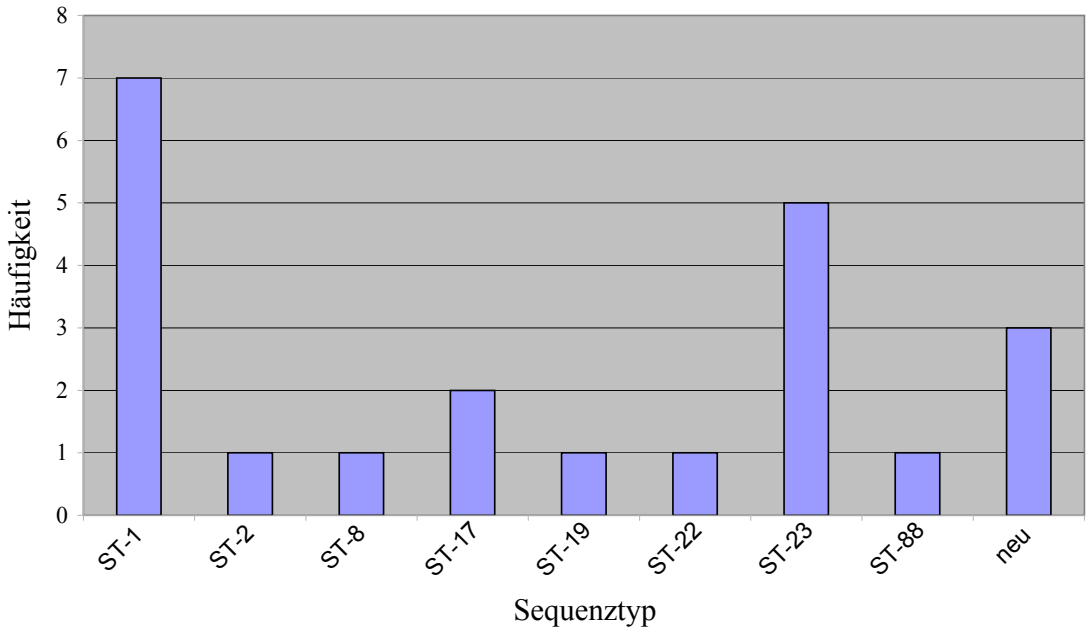

Abb. 6: Häufigkeit der Sequenztypen invasiver Gruppe-B-Streptokokken (GBS). Hinweis: Die Säule „neu“ besteht aus 3 *verschiedenen* bisher nicht in der pubmlst-Datenbank [31] aufgeführten Sequenztypen. ST = Sequenztyp.

Die kolonisierenden GBS zeigen ein breiteres Spektrum an Sequenztypen mit unterschiedlichen Häufigkeiten, während bei den invasiven Stämmen nur die Sequenztypen 1, 17 und 23 häufiger als einmal unter den Isolaten auftraten.

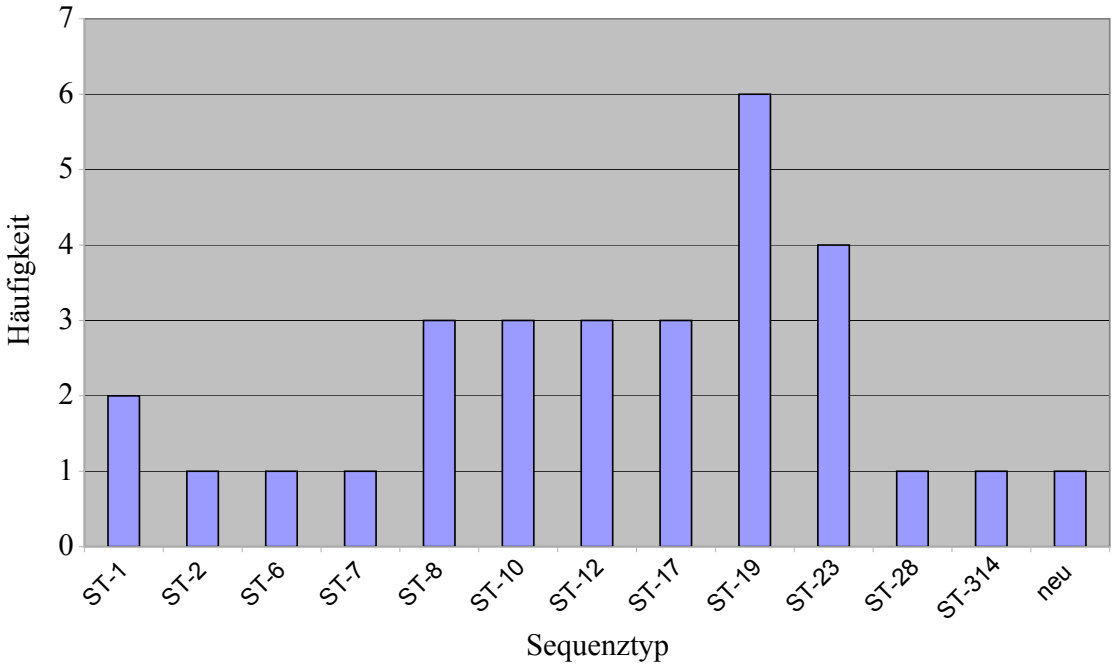

Abb. 7: Häufigkeit der Sequenztypen kolonisierender Gruppe-B-Streptokokken (GBS). ST = Sequenztyp.

3.2 Burst-Diagramme

Sämtliche nachgewiesenen Isolate befanden sich an den Knotenpunkten ihrer jeweiligen „burst groups“[1], was einer statistisch wahrscheinlichen Verteilung entspricht (Abbildung 8 - 10, Seiten 25 - 26). Rote Punkte kennzeichnen dabei die Sequenztypen der nachgewiesenen invasiven Isolate, grüne Punkte die der kolonisierenden Stämme. Eine größere Darstellung der eburst-Diagramme befindet sich im Anhang (Abbildung 12 bis 14, Seite 51 bis 53). Für eine zusammenfassende Erläuterung sei auf Kapitel 4.2 verwiesen.

[1] Stand der Burst-Diagramme: 21.10.2009
Burst-Diagramme, aus denen in der vorliegenden Untersuchung keine Sequenztypen nachgewiesen wurden, werden nicht dargestellt.

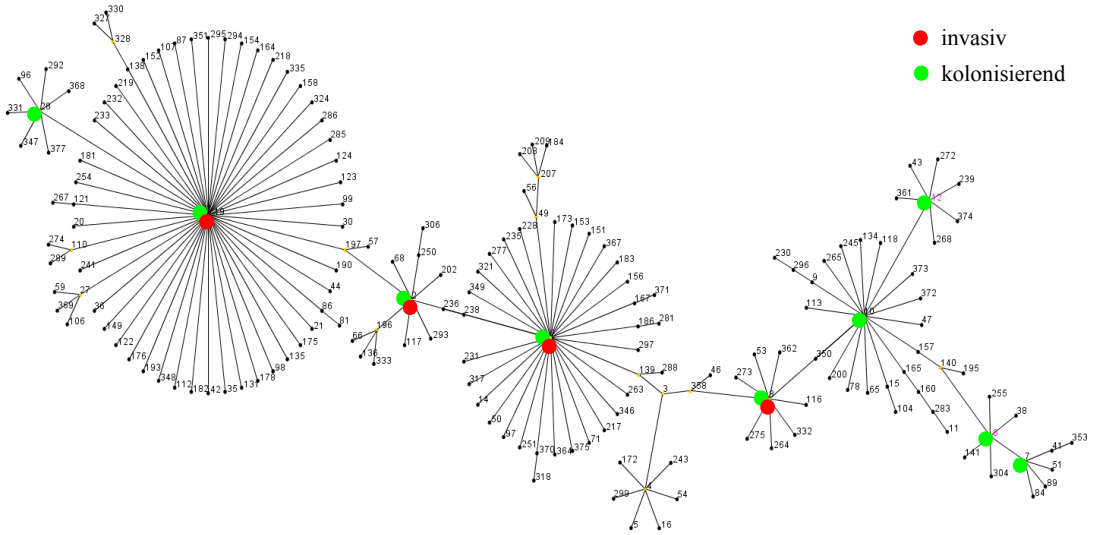

Abb. 8: „burst group“ 1 für kolonisierende (grün) und invasive (rot) Gruppe-B-Streptokokken der vorliegenden Untersuchung. Eine größere Darstellung der eburst-Diagramme befindet sich im Anhang (Abbildung 12 bis 14, Seite 51 bis 53).

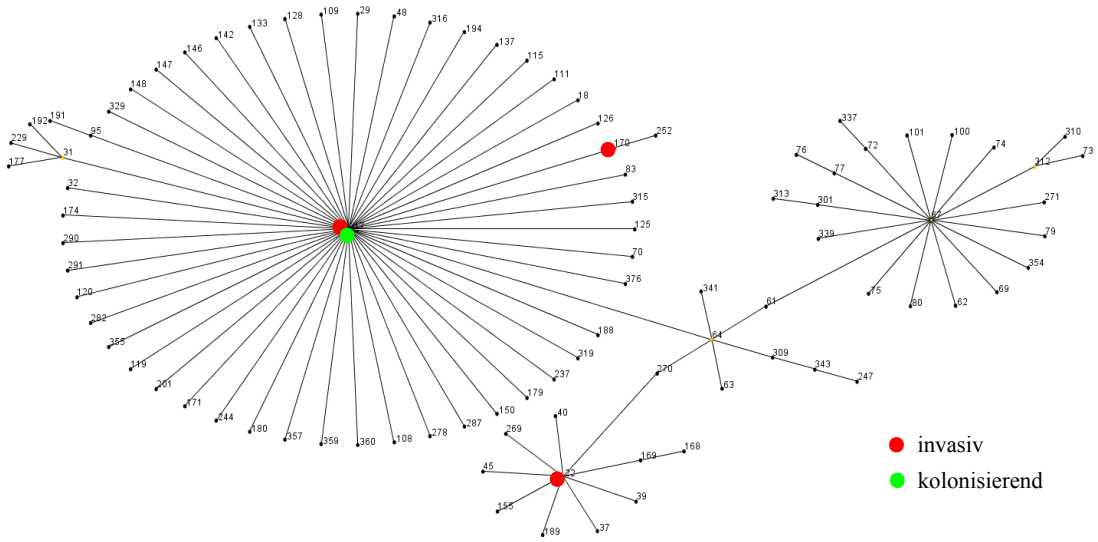

Abb. 9: „burst group“ 2 für kolonisierende (grün) und invasive (rot) Gruppe-B-Streptokokken der vorliegenden Untersuchung. Eine größere Darstellung der eburst-Diagramme befindet sich im Anhang (Abbildung 12 bis 14, Seite 51 bis 53).

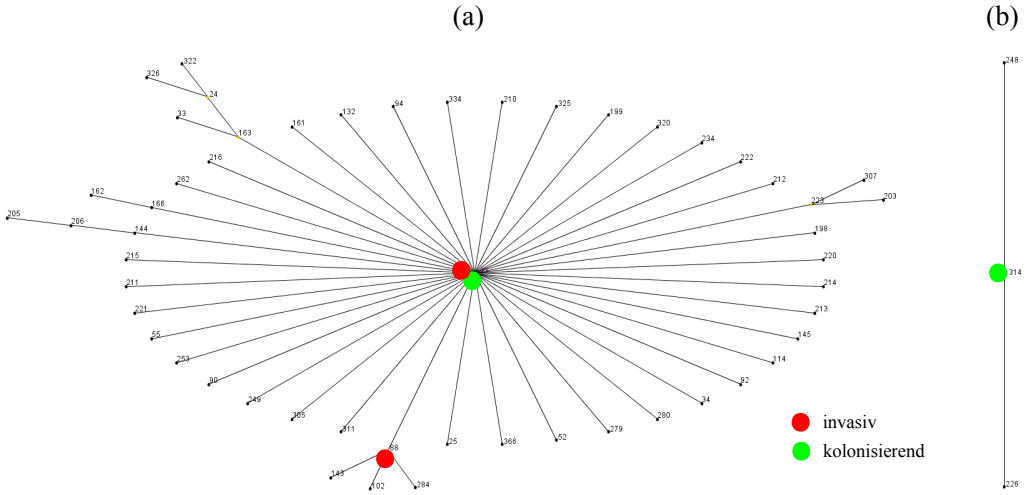

Abb. 10: (a)„burst group“ 3 und (b)„burst group“ 6 für kolonisierende (grün) und invasive (rot) Gruppe-B-Streptokokken der vorliegenden Untersuchung. Eine größere Darstellung der eburst-Diagramme befindet sich im Anhang (Abbildung 12 bis 14, Seite 51 bis 53).

3.3 Multiplex-PCR

Mithilfe der Multiplex-PCR ergab sich die in Abbildung 11 dargestellte Verteilung der Oberflächenproteine Alpha C, alp2/3, alp4, Epsilon und rib auf die unterschiedlichen Sequenztypen, bei denen alle 7 Isolate des ST-1 das Protein alp2/3 auf ihrer Oberfläche exprimierten. Alpha-C und Epsilon kamen beide auf jeweils 2 Isolaten vom ST-23 vor, ein weiteres Isolat dieses Serotyps exprimierte rib. Das Protein rib befand sich ebenfalls auf beiden Sequenztypen mit der Nummer 17.

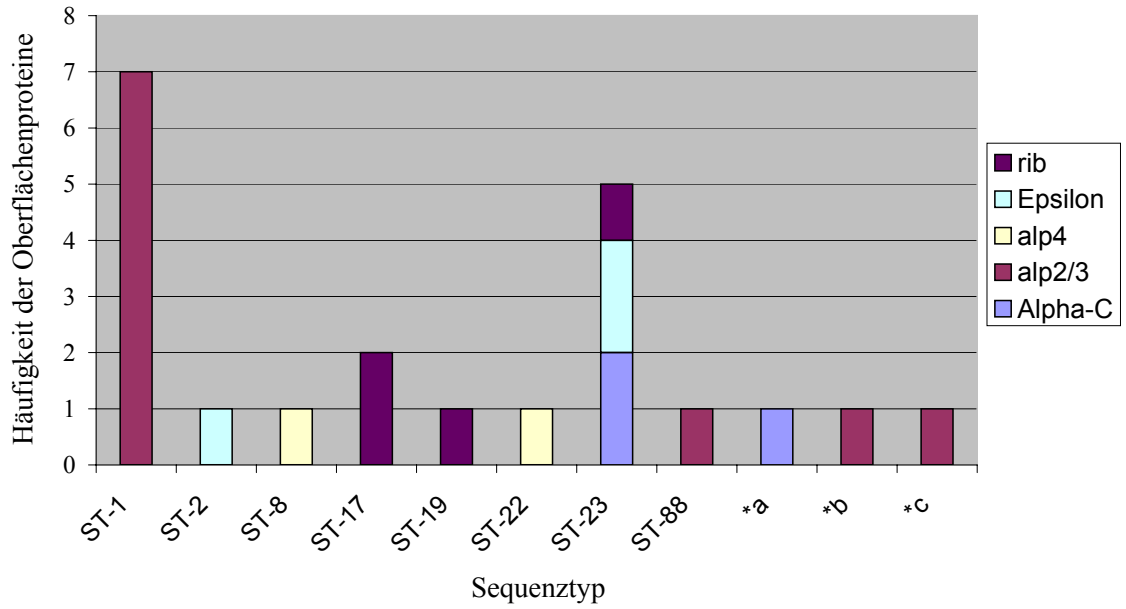

Abb. 11: Korrelation zwischen Oberflächenproteinen und Sequenztypen bei invasiven Gruppe-B-Streptokokken-Stämmen. Vor Beginn dieser Arbeit unbekannte Sequenztypen: *a = Stamm 289, *b = Stamm 294, *c = Stamm 298, siehe auch Abbildung 5. ST = Sequenztyp.

Alle anderen Sequenztypen traten nur mit einer Häufigkeit von 1 auf und tragen demzufolge zu 100 % ihr jeweiliges Oberflächenprotein. Da während der MLST auch drei vor Beginn der Arbeit unbekannte Sequenztypen nachgewiesen werden konnten, wurden diese für die Darstellung in Abbildung 11 mit *a[2], *b[3] und *c[4] bezeichnet.

[2] Stamm 289 (=ST-397) aus Abbildung 5
[3] Stamm 294 aus Abbildung 5
[4] Stamm 298 aus Abbildung 5

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Sequenztypen

Als auffälligster Unterschied in der Verteilung der Sequenztypen bei invasiven und kolonisierenden GBS erscheint zunächst die wesentlich breitere Verteilung bei den kolonisierenden Stämmen, d. h. 4 Sequenztypen (8, 10, 12 und 17) treten dreimal auf, ST-23 viermal, ST-19 sogar fünfmal. Bei den invasiven Streptokokken gibt es weniger, dafür recht deutliche Peaks: Siebenmal ST-1 und fünfmal ST-23 bilden gemeinsam mehr als 50 % der nachgewiesenen Sequenztypen. Dies erscheint insofern auffällig, da in der Veröffentlichung von N. Jones *et al.* [36] aus dem Jahr 2003 zu lesen ist: „ST-1 and ST-19 were significantly associated with asymptomatic carriage, whereas ST-23 included both carried and invasive[1] strains." Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass N. Jones *et al.* in der zitierten Arbeit 152 Isolate von GBS aus Nordamerika, Neuseeland, Thailand, Singapur, Israel, Japan, Großbritannien und Nordirland untersuchten, welche bei Neugeborenen zu einer early-onset-meningitis bzw. Sepsis bei Erwachsenen geführt hatten.

Zwar taucht ST-23 in der vorliegenden Arbeit tatsächlich in beiden Gruppen auf, ST-1 führt jedoch die Häufigkeiten der invasiven Isolate an. In diesem

[1] Es sei nochmals explizit darauf hingewiesen, dass im vorliegenden Zusammenhang „invasive" neonatale Infektionen bezeichnet und nicht das STSS gemeint ist.

Zusammenhang wäre es sicherlich interessant, weitere Studien mit evtl. größeren Versuchspopulationen im Hinblick auf diesen Trend zu verfolgen. Möglicherweise zeigt sich hier der Hinweis auf eine Zunahme der Virulenz von ST-1. Da sich „invasive strains“ bei N. Jones *et al.* jedoch auf oben genannte Erkrankungen beziehen, wäre es durchaus vorstellbar, dass ST-1 in seinem Krankheitsspektrum gegenüber den „typischen“ GBS abweicht und sich so diese gegensätzlich erscheinenden Aussagen erklären lassen.

In Betracht zu ziehen ist auch die Tatsache, dass ST-1, ST-17, ST-19 und ST-23 schon bei N. Jones *et al.* 66 % der 152 untersuchten Isolate bildeten und somit mit einer relativ hohen Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden. Ebenso stellen sie in der hier untersuchten Gruppe 50 % (15/30) der kolonisierenden und 68 % (15/22) der invasiven Stämme dar.

Der prozentuale Anteil an „neuen“, d. h. vorher nicht beschriebenen Sequenztypen ist bei den invasiven Isolaten wesentlich höher (13,6%), im Vergleich zu neuen Sequenztypen bei kolonisierenden Gruppe-B-Streptokokken (3,3%).

4.2 Burst-Diagramme

Die Burst-Diagramme wurden nach sequentiellen Unterschieden zwischen verschiedenen *S. agalactiae*-Stämmen aufgebaut, sodass zwischen zwei benachbarten Sequenztypen im Diagramm immer nur ein Allel Unterschied besteht. Die in dieser Arbeit enthaltenen eBurst-Diagramme wurden mit Hilfe der Homepage eburst.mlst.net [28] erstellt, wobei auf die entsprechenden Daten der MLST-Datenbank [40] zugegriffen wurde.

Diese Diagramme stellen somit eine mögliche Evolution der Streptokokken dar [17]. Da für die MLST „housekeeping genes“ aufgrund ihrer Stabilität ausgewählt werden, lässt sich diese Entwicklung nur mit einer gewissen Verzögerung feststellen. Mutationen außerhalb der „housekeeping genes“ werden zunächst nicht

erfasst, wenn sich aber eine Veränderung in diesen stabilen Sequenzen zeigt, haben mit hoher Wahrscheinlichkeit bereits wesentliche Veränderungen an anderen Stellen im Genom stattgefunden [1]. Aus diesen Annahmen lassen sich grobe Schätzungen über das Alter der untersuchten Spezies ableiten [52].

In den Burst-Diagrammen dieser Arbeit zeigt sich eine statistische Verteilung aller in dieser Arbeit nachgewiesenen Isolate an den Knotenpunkten ihrer jeweiligen Gruppen, sodass zumindest davon ausgegangen werden kann, dass keine insignifikante Randgruppe untersucht wurde.

Bemerkenswert erscheint auch die Tatsache, dass unter 30 kolonisierenden Isolaten nur ein unbekannter Sequenztyp (3,3 %) aufgrund eines Basenaustausches zu finden war, bei 22 invasiven dagegen 3 Stämme (13,6 %) einen Basenaustausch bzw. ein neues Allelprofil zeigten. Resultiert hier eine Evolution zu höherer Invasivität aus mehr „Entwicklungsfreude“? Dafür spricht zumindest, dass beim gemeinsamen Auftreten von STSS und NF der Stamm mit der Labor-Identifikation 294 (4146-05 des CDC) angezüchtet wurde, welcher einen Basenaustausch im Gen *glnA* aufweist und sich vor Beginn dieser Arbeit nicht in der Datenbank befand.

4.3 Multiplex-PCR

Im Rahmen der Multiplex-PCR interessieren vor allem jene Sequenztypen für die Korrelation mit Oberflächenproteinen, welche mit einer Häufigkeit >1 nachgewiesen wurden, namentlich ST-1, ST-17 und ST-23.

Verglichen mit der Absolutmenge der untersuchten Isolate sticht hier besonders ST-1 hervor, dessen 7 Isolate allesamt das Protein alp2/3 tragen, während bei ST-23 zu 40 % (2 Isolate) Epsilon, zu 40 % Alpha-C und zu 20 % (1 Isolat) rib exprimiert wurden. Insofern findet sich keine hundertprozentig eindeutige Korrelation zwischen den beiden Faktoren, jedoch zumindest ein enger Zusammenhang des Allelprofils

ST-1 mit dem auf der Zellwand befindlichen Protein alp2/3. Beide ST-17 dieser Untersuchung tragen rib (siehe Abbildung 11, Seite 27.)
ST-23 imponiert bei den invasiven Stämmen eher als „Chamäleon“: Bei 5 invasiven Isolaten exprimiert er rib (1 Isolat), Epsilon (2 Isolate) und Alpha-C (2 Isolate), während er bei Eickel *et al.* [15][2] auf 10 von 13 Isolaten das Protein Epsilon und auf 3 von 13 Isolaten das Protein alp2/3 aufweist (siehe Abbildung 3, Seite 20). Desweiteren findet sich auch in dieser Arbeit bei ST-1 zu einem überwiegendem Anteil alp2/3 (mit nur einem von 10 Isolaten AlphaC bei Eickel *et al.* [15] als Ausnahme). ST-19 trägt in beiden Untersuchungen rib, bei Eickel *et al.* [15] befindet sich unter insgesamt 15 Isolaten allerdings auch ein Isolat mit dem Protein alp2/3 und eines, auf dessen Oberfläche kein Protein nachgewiesen wurde. ST-17 exprimiert in beiden Untersuchungen auf insgesamt 11 Isolaten rib. ST-88 exprimiert in jeder der beiden Untersuchungen (insgesamt 4 Isolate) alp2/3. ST-8 weist bei Eickel *et al.* [15] bei 8 von 8 Isolaten Alpha-C auf, in der vorliegenden Arbeit jedoch alp4[3]. ST-2 und ST-22 kommen in beiden Untersuchungen je einmal vor und tragen jeweils ein unterschiedliches Oberflächenprotein. Damit konnten sämtliche bereits vor dieser Arbeit bekannten invasiven Stämme mit bereits vorliegenden Daten für kolonisierende Stämme bei zystischer Fibrose verglichen werden. Aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten Proben kann nicht nachgewiesen werden, ob die unterschiedlichen Oberflächenproteine speziell auf den identischen ST-2, ST-8 und ST-22 zur Virulenz der invasiven Isolate beitragen, ob es sich dabei einfach um Varianten handelt, bei denen der Zusammenhang zwischen Sequenztyp und Oberflächenprotein weniger eng ist (vgl. die Zusammensetzung der Oberflächenproteine von ST-23 in den Abbildungen 3, Seite 20 und 11, Seite 27), oder ob es sich um „zufällige“ Ausnahmen handelt.

Sicher wäre es von Vorteil, dies auch an einer größeren Population untersuchen zu können, allerdings gestaltet sich das Auffinden einer ausreichend hohen Anzahl

[2] s. Abbildung 3, Seite 20
[3] alp4 wurde bei [15] nicht mit untersucht

von Proben schwierig, da GBS bei STSS – wenn auch in letzter Zeit häufiger – insgesamt eher selten nachgewiesen werden. Außerdem stammen die invasiven Isolate dieser Arbeit aus Amerika, die kolonisierenden Referenzstämme aus Deutschland, sodass als Beleg für die tatsächliche Vergleichbarkeit zwei epidemiologische Studien angeführt werden: Spellerberg *et al.* [8] und Ferrieri *et al.* [18].

Ferrieri *et al.* erarbeiteten den Vergleich zwischen 289 invasiven GBS-Isolaten aus Houston, Minneapolis-St. Paul, Pittsburgh und Seattle und 2660 kolonisierenden GBS-Isolaten nicht-schwangerer Frauen aus Pittsburgh, wobei sie zum einen feststellten, dass die Verteilung sowohl der kapsulären Polysaccharide als auch der Oberflächenproteine zwischen beiden Gruppen nicht oder nur um wenige Prozentpunkte voneinander abweicht. Zum anderen beschreiben sie die Serotypen Ia, III, V und II – in dieser Reihenfolge – als die häufigsten Vertreter [18].

Für die Bundesrepublik Deutschland weisen die entsprechenden Daten von Spellerberg *et al.* auf die Serotypen III, II, Ia, V als die quantitativ stärksten hin. Damit besteht zwar ein Unterschied in der Verteilung, die vier häufigsten Serotypen sind jedoch in beiden Ländern die gleichen. Aus diesen Serotypen (und dem in Amerika nächsthäufigeren Ib) wurden auch die kolonisierenden Vergleichsisolate ausgewählt. Die untersuchte Population weist jedoch eine Diskrepanz zur erwarteten Verteilung auf, mit einer überproportionalen Vertretung von Serotyp V, was darauf zurückzuführen ist, dass die in relativ großer Anzahl vorhandenen ST-1 alle das entsprechende Kapsel-Polysaccharid tragen (siehe Abbildung 11, Seite 27).

Den Daten aus dem CDC entsprechend zeigt Abbildung 4 (Seite 20) die Korrelation zwischen Serotyp und Oberflächenproteinen für dieselben Isolate, für die auch der Zusammenhang zwischen Oberflächenproteinen und Sequenztypen gezeigt wurde. Hier stellen sich die Säulen für Serotypen, die mit einer Häufigkeit >1 einbezogen wurden, eher heterogen dar, vor allem bei Serotyp Ia scheint die Korrelation zu den entsprechenden Oberflächenproteinen eher gering ausgeprägt zu sein. Die dagegen relative Homogenität von Serotyp V erklärt sich aus dem hohen Anteil an nachgewiesenen ST-1, von denen alle alp2/3 exprimieren.

Abschließend bleibt zu erwähnen, dass es leider nicht gelungen ist, Sequenztypen herauszuarbeiten, die *eindeutig* invasive Erkrankungen hervorrufen. Ebenso können keine klaren Aussagen zu Sequenztypen getroffen werden, die *ausschließlich* den menschlichen Vaginal-/Rektaltrakt besiedeln, ohne dabei Virulenz zu zeigen. Vielmehr scheint es zumindest Präferenzen zu geben, wie z. B. bei ST-1, der vermehrt bei invasiven Erkrankungen auftritt, jedoch auch als kolonisierender Stamm. Ein weiterer häufiger Sequenztyp (ST-19) findet sich immerhin sechsmal bei den kolonisierenden Stämmen, taucht aber nicht in der invasiven Population auf, was auch den Ergebnissen von N. Jones *et al.* [36] entspricht. ST-23 wurde in beiden Gruppen etwa gleich häufig nachgewiesen und scheint demzufolge keine solche Präferenz aufzuweisen, ebenso der etwas seltenere ST-17 mit zwei invasiven und drei kolonisierenden Isolaten.

Es gibt also epidemiologische Unterschiede zwischen invasiven und kolonisierenden GBS, wenn auch weniger scharf umrissen als wünschenswert, um daraus z. B. „Risiko-GBS“ abzuleiten, nach denen man gezielt suchen bzw. gegen die man gezielt impfen könnte. Man kann allerdings sicher festhalten, dass sich der ST-1 überproportional häufig bei den invasiven „toxic shock“-Syndrom-Stämmen finden lässt. Natürlich muss bei all diesen Überlegungen die geringe Anzahl der untersuchten Stämme berücksichtigt werden, sodass der Vergleich mit weiteren, zukünftigen Arbeiten zu diesem Thema nahegelegt wird. Zur Korrelation von Oberflächenproteinen mit Sero-/Sequenztypen bleibt zu sagen, dass auf der Ebene der Sequenztypen (und damit der DNA) ein etwas engerer Zusammenhang zu den exprimierten Proteinen besteht als auf der der kapsulären Polysaccharide. Eine Einteilung, welche auf Sequenzunterschieden beruht, bietet somit eine bessere Vorhersagemöglichkeit für die exprimierten Eigenschaften. Da bei der MLST jedoch nicht die für die Oberflächenproteine verantwortlichen DNA-Abschnitte untersucht werden, sondern eher Baupläne für „universelle“ GBS-Bestandteile (sogenannte „housekeeping genes“), gibt es auch hier keine 100 %ige Abhängigkeit.

4.4 Virulenzfaktoren

Häufig tritt das STSS als zusätzliche Komplikation einer NF auf. Auf molekularer Ebene lässt sich dies folgendermaßen nachvollziehen ([45], [43], [37]): Kapsel tragende pyogene Streptokokken gelangen über die eingangs erwähnten Bagatellschäden (siehe Seite 4) in den menschlichen Körper und werden vom Immunsystem angegriffen. Das Tragen einer Hyaluronsäurekapsel und ihrer M-Proteine schützt sie vor Phagozytose. Einmal im Blut spielt zunächst eine rasche Verteilung der Krankheitserreger zu den verschiedenen Zellen eine Rolle. Dafür sorgt die Bindung menschlichen Plasminogens an bakterielle Oberflächenproteine, direkt oder als Fibrinogen-Streptokinase-Plasminogen-Komplex. Durch diese Bindung wird Plasminogen zu Plasmin aktiviert, das körpereigene α_2-Antiplasmin kann jedoch zur Gegenregulation nicht mehr angreifen. Aus der Plasminaktivierung folgt eine gesteigerte Fibrinolyse und damit eine Hämorrhagie, die ihrerseits bereits Gewebsnekrosen auslöst. Gleichzeitig sorgen Hyaluronidase über Spaltung von Bindegewebssubstanz und Streptolysine über Porenbildung für eine hohe Gewebsinvasivität und lokale Nekrosen[4], zu denen auch die Proteinasen der Streptokokken ihren Teil beitragen. Dank ihrer schädigenden Wirkung auf Endothelzellen setzen sie zusätzlich jedoch die exogene Gerinnungskaskade in Kraft. Nach erfolgreicher Adhäsion schützt sich *S. pyogenes* sowohl vor Komplement- als auch vor Immunglobulin-vermittelter Immunantwort mithilfe des Mac1-like protein (Mac), welches die Rezeptorstruktur für humanes C3b und IgG nachahmt und somit die jeweiligen Signalproteine bindet. Die Cystein-Protease SpeB spaltet zudem Kininogene sowie Oberflächenproteine und Zytokine des Wirtes über Aktivierung von wirtseigenen Proteasen. Zum einen unterstützt sie so die massiv auftretende Koagulation, was zum Bild einer disseminierten intravaskulären Koagulation (DIC) führt. Gefäßverschlüsse durch Thromben verursachen weitere Gewebsnekrosen. Zum anderen verstärkt

[4] vgl. Kapitel 1.1: d. h. Es liegt auch eine Hämolyse vor!

das Superantigen SpeB die Fieber auslösenden Mechanismen, welche auf der Wirkung von Superantigenen und Vorhandensein von Lipoteichonsäure in der Zellwand der gram-positiven Bakterien beruhen. Die Superantigene aktivieren T-Zellen und Makrophagen, die daraufhin im Überfluss Interleukin-6 (IL-6) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNFα) ausschütten. Diese Botenstoffe sorgen für einen Anstieg der Körpertemperatur und eine vermehrte Leukozytenadhärenz an den Endothelzellen; zusätzlich werden die Leukozyten aktiviert, sodass ein erheblicher Anstieg in Entzündungsmediatoren erfolgt, welche eine periphere Vasodilatation auslösen und so zum Schock führen. Aggraviert wird diese Symptomatik durch die Spaltung der Zytokin-Rezeptoren von ihren ursprünglichen Oberflächen (durch SpeB, s. o.) und deren infolge des rascheren Blutflusses verbesserten Streuung ihrer Bestandteile. So können auch zuvor von Zytokinen unbeeinflusste Zellen sensibel auf das vermehrte Auftreten dieser Botenstoffe reagieren. Aus diesem Zusammenspiel erklärt sich nach bisherigem Wissensstand das häufige Miteinander von Fasciitis necroticans und STSS.

Bemühungen zur Erklärung, warum gerade das Krankheitsbild einer NF aus einer GAS-Infektion entsteht, blieben weitgehend fruchtlos. Zumindest fand man bisher keinen speziellen *S. pyogenes*-Klon, der aufgrund einer Besonderheit unter seinen Pathogenitätsfaktoren nur bzw. bevorzugt Fasciitis necroticans und/oder STSS auslöst. Speziell bei GAS wird jedoch in letzter Zeit eine zunehmende Virulenz diskutiert. Bei dem Versuch, die für diese Entwicklung verantwortlichen Virulenzfaktoren zu identifizieren, geriet die NADase (Nikotinamiddinukleotid-glykohydrolase) in den Fokus.

Bei der NADase handelt es sich um ein Enzym, welches in der Lage ist, NAD^+ zu spalten und damit die Energiespeicher der betroffenen Zellen zu zerstören. Ein 2001 veröffentlichter Artikel über invasive, von Streptokokken verursachte Erkrankungen [49] weist auf eine Letalitätszunahme trotz intensiverer Therapiemöglichkeiten

sowie schnelleres Fortschreiten und aggressivere Gewebszerstörungen seit der Erstbeschreibung im Jahr 1924 [41] hin[5]. Der Autor zieht daraus den Schluss einer erhöhten Virulenz heutiger Stämme. Zudem berichtet er über einen sog. „NADase-Shift“: GAS vom Serovar-Typ M1 gehören zu den verbreitetesten Auslösern invasiver Erkrankungen, stammesgeschichtlich jedoch charakteristischerweise zu den nicht-NADase-Produzenten, obwohl das zugehörige *nga*-Gen sich bei allen untersuchten Stämmen mit mehr als 96% Sequenzübereinstimmung untereinander finden ließ. Seit ca. 1980 gewonnene Isolate der Typen M1, M4 und M12 zeigten bei japanischen und amerikanischen Forschungsgruppen ausnahmslos eine NADase-Produktion. Dies erscheint besonders interessant, wenn man die Funktionsweise dieses Enzyms betrachtet: SLO erleichtert die Aufnahme der NADase in die jeweilige Wirtszelle, wo diese systematisch die Energiespeicher angreift. Dies zeigt sich im Experiment an einer Verminderung des ATP- bzw. NAD^+-Gehaltes in den betroffenen Zellen bis hin zur Apoptose. Die gleichzeitige Ausbildung von SLO und NADase sorgt somit für verstärkte Zellschädigungen [42]. Bricker *et al.* 2005 [7] kamen in ihrem Untersuchungen zu dem Schluss, dass NADase und SLO gemeinsam im Mausmodell in vivo zu einer erhöhten Virulenz führen.

Abgesehen von den bisher beschriebenen Mechanismen herrscht immer noch ein reger Forschungsbetrieb zur Bestimmung der eigentlichen Virulenzfaktoren, welche die hohe Gewebsinvasivität von invasiven GAS auslösen. Im Folgenden ein kurzer Überblick hierzu:

So wird die absolute Rolle der Superantigene SpeA, SpeB und anderer Superantigene[6] angezweifelt, nachdem man 46 *S. dysgalactiae* subspecies *equisimilis*-Isolate untersuchte, die mit „invasiven Streptokokken-Erkrankungen“ (davon 7 Fälle STSS/NF) in Verbindung gebracht wurden, bei denen aber keinerlei Gene für diese

[5] Bereits 1918 beschrieb W. Pfanner das „nekrotisierende Erysipel“[44], 1924 argumentierte Meleney, dieses Krankheitsbild unterscheide sich von einem Erysipel und beschrieb es als „Hemolytic streptococcus gangrene“. Hinweise finden sich allerdings auch schon bei Hippokrates in „Epidemics, Vol 1“[50]

[6] SpeC, SpeF, SpeG, SpeH, SpeI, SpeJ, SpeK, SpeL, SpeM, SmeZ und ssa

Superantigene bzw. – in 4 Fällen – zwar das entprechende Gen für SpeG aber keine mRNA[7] nachweisbar war [6].

Auch in den zuvor zitierten Kasuistiken aus Japan konnten in 5 Fällen jeweils GBS nachgewiesen werden, jedoch exprimierte kein einziger Stamm die gefürchteten Exotoxine [10]. Alle Stämme besaßen jedoch das entsprechende Gen für *cylE*, welches für die Expression des Hämolysins notwendig ist und für *scpB*, eine oberflächengebundene C5a-Peptidase[8]. Sowohl Hämolysin als auch *scpB* lassen sich bei mehr als 98 % aller GBS-Stämme nachweisen und sind vermutlich für die Kolonisierung notwendig, jedoch nicht direkt für NF und STSS verantwortlich. Bei C5a handelt es sich um ein humanes Chemotaxin, welches Phagozyten anlockt. Interessanterweise existiert ein zu 98 % identisches Gen für eine C5a-Peptidase bei *S. pyogenes* [13], [19]. Denkbar wäre hier ein horizontaler Gen-Transfer von GAS zu GBS[9]. Hinzu kommt, dass humane GBS bei Kontakt zu humanem Serum diese C5a-Peptidase exprimieren, nicht jedoch bei Kontakt mit bovinem Serum. Bovine Stämme reagieren dagegen überhaupt nicht mit einer Enzyminduktion, weder bei Kontakt mit bovinem noch mit humanem Serum [22]. Es scheint sich hier um einen sehr human-spezifischen Virulenzfaktor zu handeln; die horizontale Weitergabe zwischen den Bakterienspezies könnte die Auslösung von STSS und NF durch verschiedene Bakterienarten erklären.

Denkbar ist auch eine andere Anpassung der GBS an ihre Umgebung: Sendi *et al.* berichten über eine Selektion von zwei verschiedenen GBS-Phänotypen aus einem identischen klonalen Ursprung [46]. Phänotypisch ergänzen sie sich in Bezug auf Wachstum, Hämolyseverhalten, Interleukin-Induktion, Zelladhärenz, Resistenz gegen das Immunsystem des Wirtes, Bakterämie und Wirtssterblichkeit. Diese Subpopulationen können die einzelnen Effekte der Pathogenese gegenseitig verstärken - während die dicke Kapsel die eine Subpopulation effektiv gegen Phagozytose

[7] messenger-Ribonucleic acid
[8] Die genannten Faktoren sind bereits als Virulenzfaktoren für GBS bekannt - im Gegensatz zu SPE [43].
[9] wie auch schon für *S. dysgalactiae* postuliert: [19]

schützt, verfügt die andere über eine bessere Zelladhärenz aufgrund der dünneren Kapsel.

Bakleh *et al.* entdeckten 2005 eine relative Armut an polymorphonukleären Leukozyten (PMNs) in untersuchten Gewebe-Biopsaten von Patienten, die an einer NF verstorben waren [3]. Ato *et al.* legen nahe, dass GAS, welche invasive Erkrankungen auslösen, zwar phagozytiert aber nicht durch PMN abgetötet werden können [2]. Im Gegenteil lysieren sie die PMN mittels SLO und verhindern zudem das Anlocken weiterer Leukozyten durch Spaltung von Interleukin-8 (IL-8) mittels Serin-Proteinase ScpC.
Hidalgo-Grass *et al.* konnten dies im Mausversuch bestätigen und weiterführen [24]: Eine ScpC-defiziente Mutante von GAS schadete den Mäusen nicht, es sei denn, die Mäuse wiesen eine Depletion ihrer PMN auf. In letzterem Fall erwies sich auch die Mutante als tödlich. Selbst junge, gesunde Menschen könnten mit den „flesh-eating bacteria“ nicht fertig werden, weil diese die Immunabwehr umgehen. Allerdings liefern Hidalgo-Grass *et al.* auch einen möglichen Lösungsansatz: Das Pheromon SilCR sorgt für eine negative Regulation der Serinprotease ScpC. In Mäusen folgte auf eine Okulation mit einem GAS-Wildtyp und einer gleichzeitigen Injektion des SilCR-Peptides eine „dramatisch“ verringerte Bakterien-Proliferation, Gewebsnekrose und Letalität dank vermehrter PMN-Migration in das betroffene Gewebe [23].

Vor dem Hintergrund der oben genannten Ergebnisse scheint die Suche nach „neuen“ Virulenzfaktoren im Moment im Hinblick auf eine mögliche Therapie schneller erfolgversprechend zu sein. Dementsprechend wird auch die Rolle der SPE noch einmal überdacht werden müssen, denn nach dem bisherigen Lehrbuchwissen[10] erscheint der folgende Satz über STSS-verursachende GAS verwirrend: „The expression of the other virulence-associated genes, such as IgG degrading protease of GAS,

[10]siehe Seite 35: Das STSS wird u. a. auf das Vorhandensein von SPE zurückgeführt.

Mac-1-like protein (mac), nicotine adenine dinucleotide glycohydrolase (nga), polysaccharide capsule production (hasA), and C5a peptidase (scpA), was also upregulated in the severe invasive GAS, greater than that detected in the non-invasive GAS [...]. *Contrarily, the levels of streptococcal pyrogenic endotoxin (speB), SLS (sagA), and mitogenic factor (speF) genes were downregulated in the severe invasive GAS, compared to that found in the non-invasive GAS*“ [2].

Möglicherweise kann uns die Konzentration auf die Umgehung der Abwehrmechanismen des menschlichen Körpers schneller voranbringen als die Suche nach einem besonders gefährlichen Bakterien-Klon, denn zum einen blieb die Suche nach einem solchen Klon bisher erfolglos (wenn auch gewisse Stämme der einzelnen Spezies deutlicher zu Invasivität neigen), zum anderen besteht die Gefahr, dass einzelne Virulenzfaktoren über einen horizontalen Gen-Transfer übertragen werden und somit im Extremfall Spezies-Grenzen überspringen, d. h. nicht die Therapie gegen eine Spezies (allein) sollte im Vordergrund stehen, sondern dir Durchbrechung der Mechanismen, die zur Umgehung der körpereigenen Abwehr und damit zu der erhöhten Invasivität bei STSS und NF führen. Dies scheint vor allem sinnvoll, da auch unerwartete, bisher im Zusammenhang mit STSS unbekannte Krankheitserreger wie z.B. *Streptococcus suis*[11] oder *Vibrio vulnificus*[12] gelegentlich diese Symptomatik hervorrufen.

[11] 2 Fälle aus China, zoonotischer Krankheitserreger, typische humane Infektionen: Meningitis, Sepsis, Arthritis [11]

[12] Fall aus Texas, USA, der Patient war Diabetiker; Vibrio vulnificus verursacht nach Angaben des CDC eher selten Infektionen und betrifft 80fach häufiger Patienten mit einer Grunderkrankung als gesunde Patienten. [34]

Kapitel 5

Zusammenfassung

Das **S**treptococcal **T**oxic **S**hock **S**yndrome (STSS) ist ein untypisches Krankheitsbild für *Streptococcus agalactiae*. Diese Untersuchung geht der Frage nach, ob STSS-auslösende Stämme einem speziellen epidemiologischen *S. agalactiae*-Subtyp zuzuordnen sind. Dafür wurden 22 Stämme ausgewählt, welche bei einem STSS nachgewiesen werden konnten und mit 30 kolonisierenden Stämmen verglichen.

Aus den verschiedenen Typisierungsmöglichkeiten wurde aufgrund die MLST (**M**ulti **L**ocus **S**equence **T**yping) ausgewählt, um die molekulare Epidemiologie beider Gruppen zu untersuchen. Außerdem wurde bei unbekanntem Serotyp eine Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion zur Bestimmung der Oberflächenproteine angefertigt.

Es gibt keine Sequenztypen (ST), die immer invasive Erkrankungen auslösen oder immer ohne Erkrankung des Trägers mit diesem koexistieren. Allerdings weisen einige Sequenztypen Präferenzen auf. Am häufigsten vertreten unter den Stämmen waren ST-1, ST-19 und ST-23. ST-1 taucht überproportional häufig als invasiver Stamm auf, ST-19 dagegen ausschließlich kolonisierend. ST-17 und ST-23 finden sich in beiden Gruppen, anscheinend ohne solche Präferenz.

Insgesamt zeigt sich bei den kolonisierenden Streptokokken eine breitere Aufteilung in unterschiedliche Sequenztypen, während bei der Häufigkeitsverteilung invasiver Sequenztypen ST-1 und ST-23 herausstechen. Außerdem ist der prozentuale Anteil zuvor nicht beschriebener Sequenztypen bei invasiven Isolaten wesentlich höher. Es gibt somit epidemiologische Unterschiede zwischen invasiven und kolonisierenden Gruppe-B-Streptokokken (GBS), allerdings sind diese keinesfalls klar in Risiko-Sequenztypen und „harmlose“ Sequenztypen einteilbar.

Trotz der geringen Menge an zur Verfügung stehenden invasiven Isolaten zeigte die Verteilung in den auf den Sequenztypen basierenden Burst-Diagrammen ein für zufällig ausgewählte Stämme wahrscheinliches Muster an den Knotenpunkten der jeweiligen klonalen Komplexe, sodass mit Sicherheit nicht nur eine genetisch eng verwandte Randgruppe untersucht wurde.

Die Typisierung mithilfe der MLST – und damit auf DNA-Ebene – weist einen etwas engeren Zusammenhang zwischen der Einteilung in verschiedene Sequenztypen und ihren exprimierten Oberflächenproteinen auf als frühere Klassifizierungen. Da bei der MLST jedoch nicht die für die Oberflächenproteine verantwortlichen DNA-Abschnitte untersucht werden, sondern eher Baupläne für „universelle“ GBS-Bestandteile (sogenannte „housekeeping genes“), gibt es auch hier keine 100 %ige Abhängigkeit.

Im Moment scheint die Ausschaltung von bekannten Virulenzfaktoren, die zur Umgehung des Immunsystems führen, eine potentielle Therapie für die Zukunft zu sein. Möglicherweise gelingt damit eine erfolgreiche Bekämpfung des eigentlichen Problems – der Invasivität – unabhängig von der jeweilig isolierten Bakterienspezies. Und damit unabhängig von – bisher nicht eindeutig definierten – Risiko-Sequenztypen.

Literaturverzeichnis

[1] David M. Aanensen and Brian G. Spratt. **The multilocus sequence typing network: mlst.net**. *Nucleic Acids Research*, 33:W728–W733, 2005.

[2] M. Ato, T. Ikebe, H. Kawabata, T. Takemori, and H. Watanabe. **Incompetence of Neutrophils to Invasive Group A streptococcus Is Attributed to Induction of Plural Virulence Factors by Dysfunction of a Regulator**. *PLoS ONE*, 3, 2008.

[3] M. Bakleh, L.E. Wold, J.N. Mandrekar, W.S. Harmsen, H.H. Dimashkieh, and L.M. Baddour. **Correlation of histopathologic findings with clinical outcome in necrotizing fasciitis**. *Clinical Infectious Diseases*, 40, 2005.

[4] S. Besier, T. M. Bingold, F. Walcher, K. Engels, B. Spellerberg, V. Brade, and C. Brandt. *Kasuistiken:* **Weichteilemphysem ungewöhnlichen Ausmaßes**. *Der Chirurg*, 78:1148–1151, 2007.

[5] Stephen D. Betschel, Sergio M. Borgis, Neil L. Barg, Donald E Low, and Joyce C. S. de Azavedo. **Reduced Virulence of Group A Streptococcal Tn916 Mutants That Do Not Produce Streptolysin S**. *Infection and Immunity*, 66:1671–1679, 1998.

[6] Claudia M. Brandt, Klaus G. Schweizer, Regina Holland, Rudolf Lütticken, and Bettina S. Freyaldenhoven. **Lack of mitogenic activity of SpeG- and SpeG^{dys}-positive *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis***

isolates from patients with invasive infections. *International Journal of Medical Microbiology*, 295:539–546, 2005.

[7] Angela L. Bricker, Vincent J. Carey, and Michael R. Wessels. **Role of NADase in Virulence in Experimental Invasive Group A Streptococcal Infection**. *Infection and Immunity*, 73:6562–6566, 2005.

[8] N. Brimil, E. Barthell, U. Heindrichs, M. Kuhn, R. Lütticken, and B. Spellerberg. **Epidemiology of Streptococcus agalactiae colonization in Germany**. *International Journal of Medical Microbiology*, 296:39–44, 2006.

[9] Harald Brüssow, Carlos Canchaya, and Wolf-Dietrich Hardt. **Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68:560–602, 2004.

[10] Bin Chang, Tadayoshi Ikebe, Akihito Wada, Kikuyo Ogata, Masaaki Tomita, Chihiro Katsukawa, Ryuki Kawahara, Rieko Suzuki, Miyoko Endo, Junko Isobe, Daisuke Tanaka, Kyoko Hirasawa, Haruo Watanabe, and the Working Group for Streptococci in Japan. **Surveillance of Group B Streptococcal Toxic Shock-like Syndrome in Nonpregnant Adults and Charakterization of the Strains in Japan**. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 59:182–185, 2006.

[11] Chen Chen, Jiaqi Tang, Wei Dong, Changjun Wang, Youjun Feng, Jing Wang, Feng Zheng, Xiuzhen Pan, Di Liu, Ming Li, Yajun Song, Xinxing Zhu, Haibo Sun, Tao Feng, Zhaobiao Guo, Aiping J, Junchao Ge, Yaqing Dong, Wen Sun, Yongqiang Jiang, Jun Wang, Jinghua Yan, Huanming Yang, Xiaoning Wang, George F. Gao, Ruifu Yang, Jian Wang, and Jun Yu. **A Glimpse of Streptococcal Toxic Shock Syndrome from Comparative Genomics of S. suis 2 Chinese Isolates**. *PLoS ONE*, 2, 2007.

[12] Yi Chen, Wei Zhang, and Stephen J. Knabel. **Multi-Virulence-Locus Sequence Typing Clarifies Epidemiology of Recent Listeriosis Outbreaks in the United States**. *Journal of Clinical Microbiology*, 40:5291–5294, 2005.

[13] Ilona Chmouryguina, Alexander Suvorov, Patricia Ferrieri, and P. Patrick Cleary. **Conservation of the C5a Peptidase Genes in Group A and B Streptococci**. *Infection and Immunity*, 64:2387–2390, 1996.

[14] R. Creti, F. Fabretti, G. Orefici, and C. von Hunolstein. **Multiplex PCR Assay for Direct Identification of Group B Streptococcal Alpha-Protein-Like Protein Genes**. *Journal of Clinical Microbiology*, 42:1326–1329, 2004.

[15] V. Eickel, B. Kahl, B. Reinisch, C. Brandt, and B. Spellerberg. **Emergence of respiratory Streptococcus agalactiae isolates in cystic fibrosis patients**. *PLoS One*, 4, 2009.

[16] Mohamed K. Fakhr, Lisa K. Nolan, and Catherine M. Logue. **Multilocus Sequence Typing Lacks the Discriminatory Ability of Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium**. *Journal of Clinical Microbiology*, 43:2215–2219, 2005.

[17] Edward J. Feil, Bao C. Li, David M. Aanensen, William P. Hanage, and Brian G. Spratt. **eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data**. *Journal of Bacteriology*, 186:1518–1530, 2004.

[18] P. Ferrieri, C. J. Baker, S. L. Hillier, and A. E. Flores. **Diversity of surface protein expression in group B streptococcal colonizing & invasive isolates**. *Indian Journal of Medical Research*, 119:191–196, 2004.

[19] C. Franken, G. Haase, C. Brandt, J. Weber-Heynemann, S. Martin, C. Lämmler, A. Podbielski, R. Lütticken, and B. Spellerberg. **Horizontal gene trans-**

fer and host specificity of betahaemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing scpB and lmb. *Molecular Microbiology*, 41:925–935, 2001.

[20] Michael A. Gardam, Donald E. Low, Raphael Saginur, and Mark A. Miller. **Group B Streptococcal Necrotizing Fasciitis and Streptococcal Toxic-Shock-Like-Syndrome in Adults**. *Archives of Internal Medicine*, 158:1704–1708, 1998.

[21] M. Gladwin and B. Tattler. ***Clinical microbiology made ridiculously simple***. MedMaster, Inc., 4th edition, 2007.

[22] Ute Gleich-Theurer, Simone Aymanns, Gregor Haas, Stefanie Mauerer, Julia Vogt, and Barbara Spellerberg. **Human Serum Induces Streptococcal C5a Peptidase Expression**. *Infection and Immunity*, 77:3817–3825, 2009.

[23] C. Hidalgo-Grass, M. Dan-Goor, A. Maly, Y. Eran, L.A. Kwinn, V. Nizet, M. Ravins, J. Jaffe, A. Peyser, A.E. Moses, and E. Hanski. **Effect of a bacterial pheromone peptide on host chemokine degradation in group A streptococcal necrotising soft-tissue infections**. *Lancet*, 363:696–703, 2004.

[24] Carlos Hidalgo-Grass, Inbal Mishalian, Mary Dan-Goor, Ilia Belotserkovsky, Yoni Eran, Victor Nizet, Amnon Peled, and Emanuel Hanski. **A streptococcal protease that degrades CXC chemokines and impairs bacterial clearance from infected tissues**. *The EMBO Journal*, 25:4628–4637, 2006.

[25] H. Hildebrandt, O. Dornblüth, and W. Pschyrembel. ***Pschyrembel Klinisches Wörterbuch***. Gruyter, 260. Auflage, 2004.

[26] Homepage. Bioinformatics
http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_comp.html
Stand: 21.10.2009.

[27] Homepage. CDC: General Public, Adult Diseaes, Group B Strep:
http://www.cdc.gov/groupbstrep/general/gen_public_adult.htm
Stand: 21.10.2009.

[28] Homepage. eBurst:
http://eburst.mlst.net
Stand: 21.10.2009.

[29] Homepage. Imperial College of London:
http://www1.imperial.ac.uk/medicine/people/b.spratt/
Stand: 21.10.2009.

[30] Homepage. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering:
http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html
Stand: 21.10.2009.

[31] Homepage. Pubmlst:
http://pubmlst.org/sagalactiae/
Stand: 21.10.2009.

[32] Homepage. S. agalactiae:
http://www.bakteriologieatlas.de/Bakterien/Streptococcus_agalactiae.htm
Stand: 21.10.2009.

[33] Homepage. Wikipedia:
http://en.wikipedia.org/wiki/Multilocus_sequence_typing
Stand: 21.10.2009.

[34] Homepage. www.medicalnewstoday.com:
http://www.medicalnewstoday.com/articles/77276.php
Stand: 21.10.2009.

[35] Homepage. www.rzath.de
www.rzath.de/zk-kdstamm/kd202107/...[1]**/vorlesung_typing.ppt**
stand: 21.10.2009.

[36] N. Jones, J. F. Bohnsack, S. Takahashi, K. A. Oliver, M.-S. Chan, F. Kunst, P. Glaser, C. Rusniok, D. W. M. Crook, R. M. Harding, N. Bisharat, and B. G. Spratt. **Multilocus sequence typing system for group B streptococcus**. *Journal of Clinical Microbiology*, 41:2530–2536, 2003.

[37] Fritz H. Kayser, Erik C. Böttger, Rolf M. Zinkernagel, Otto Haller, Johannes Eckert, and Peter Deplazes. ***Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie***. Thieme, 11., überarbeitete und erweiterte Auflage, 2005.

[38] M.C. Lamy, S. Dramsi, A. Billoet, H. Reglier-Poupet, A. Tazi, J. Raymond, F. Guerin, E. Couve, F. Kunst, P. Glaser, P. Trieu-Cuot, and C. Poyart. **Rapid detection of the "highly virulent"group B Streptococcus ST-17 clone**. *Microbes and Infection*, 8:1714–1722, 2006.

[39] Anastasia P. Litvintseva, Rameshwari Thakur, Rytas Vilgalys, and Thomas G. Mitchell. **Multilocus Sequence Typing Reveals Three Genetic Subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (Serotype A), Including a Unique Population in Botswana**. *Genetics*, 172:2223–2238, 2006.

[40] M. C. J. Maiden, J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman, and B. G. Spratt. **Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95:3140–3145, 1998.

[1] .../publikationen/vorlesungen/...

[41] F. L. Meleney. **Hemolytic streptococcus gangrene**. *Archives of Surgery*, 9:317–634, 1924.

[42] A. Michos, I. Gryllos, A. Hakansson, A. Srivastava, E. Kokkotou, and M. R. Wessels. **Enhancement of streptolysin O activity and intrinsic cytotoxic effects of the group A streptococcal toxin, NAD-glycohydrolase**. *Journal of Biocommunication Papers*, 281, 2006.

[43] Timothy J. Mitchell. **The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis**. *Nature Reviews Microbiology*, 1, Dec 2003.

[44] W. Pfanner. **Zur Kenntnis und Behandlung des nekrotisierenden Erysipels**. *Deutsche Zeitschrift für Chirurgie*, 144:108, 1918.

[45] A. Podbielski, E. Rodzinski, H. Wiedeck, and R. Lütticken. **Gruppe-A-Streptokokken und die nekrotisierende Fasziitis**. *Deutsches Ärzteblatt*, 8:A–414–420, 1998.

[46] Parham Sendi, Linda Johansson, Samira Dahesh, Nina M. Van Sorge, Jessica Darenberg, Mari Norgren, Jan Sjolin, Victor Nizet, and Anna Norrby-Teglund. **Bacterial phenotype variants in group B streptococcal toxic shock syndrome**. *Emerging Infectious Diseases*, 15, 2009.

[47] N. K. Skjaervold, K. Bergh, and L. Bevanger. **Distribution of PFGE types of invasive Norwegian group B streptococci in relation to serotypes**. *Indian Journal of Medical Research*, 119:201–204, 2004.

[48] H.-C. Slotved, F. Kong, L. Lambertsen, S. Sauer, and G. L. Gilbert. **Serotype IX, a Proposed new Streptococcus agalactiae Serotype**. *Journal of Clinical Microbiology*, 45:2929–2936, 2007.

[49] D. L. Stevens. **Invasive streptococcal infections**. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 7:69–80, 2001.

[50] Dennis L. Stevens. **Flesh-eating bacteria: A new disease or an old story?** *Infectious Diseases in Clinical Practice Editors' Forum*, 4, 1995.

[51] Dennis L. Stevens. **Streptococcal Toxic-Shock Syndrome: Spectrum of Disease, Pathogenesis, and New Concepts in Treatment**. *Emerging Infectious Diseases*, 1, 1995.

[52] Rachel Urwin and Martin C.J. Maiden. **Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology**. *TRENDS in Microbiology*, 11:479–487, 2003.

Anhang A

Burst-Diagramme

Sämtliche nachgewiesenen Isolate befanden sich an den Knotenpunkten ihrer jeweiligen „burst groups“[1], was einer statistisch wahrscheinlichen Verteilung entspricht. Burst-Diagramme, aus denen in der vorliegenden Untersuchung keine Sequenztypen nachgewiesen wurden, werden nicht dargestellt. Rote Punkte kennzeichnen die Sequenztypen der nachgewiesenen invasiven Isolate, grüne Punkte die der kolonisierenden Stämme. Die Burst-Diagramme wurden nach sequentiellen Unterschieden zwischen verschiedenen *S. agalactiae*-Stämmen aufgebaut, sodass zwischen zwei benachbarten Sequenztypen im Diagramm immer nur ein Allel Unterschied besteht. Die in dieser Arbeit enthaltenen eBurst-Diagramme wurden mit Hilfe von [28] erstellt, wobei auf die entsprechenden Daten der MLST-Datenbank [40] zugegriffen wurde. Für weitere Informationen siehe Kapitel 4.2.

[1] Stand der Burst-Diagramme: 21.10.2009

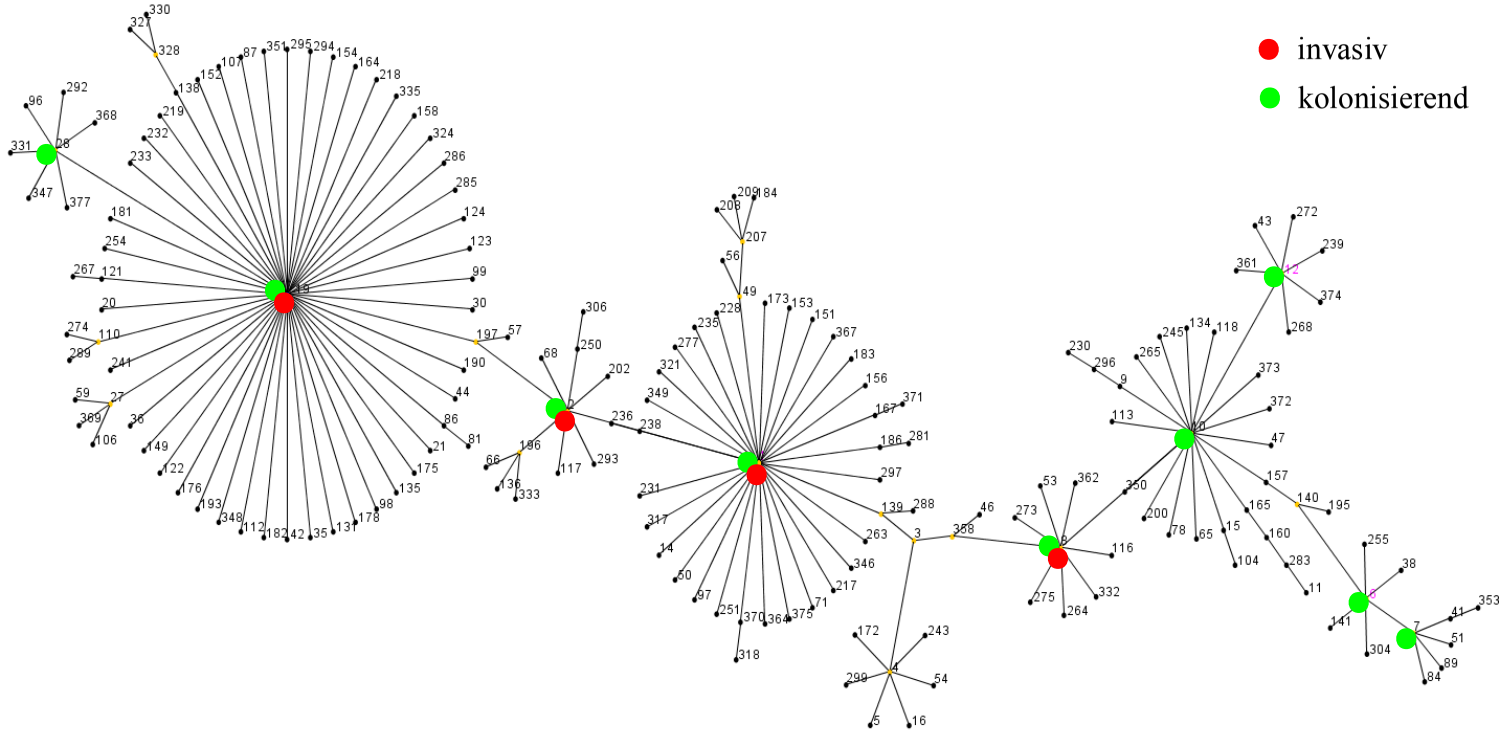

Abb. 12: „burst group“ 1 für kolonisierende (grün) und invasive (rot) Gruppe-B-Streptokokken der vorliegenden Untersuchung

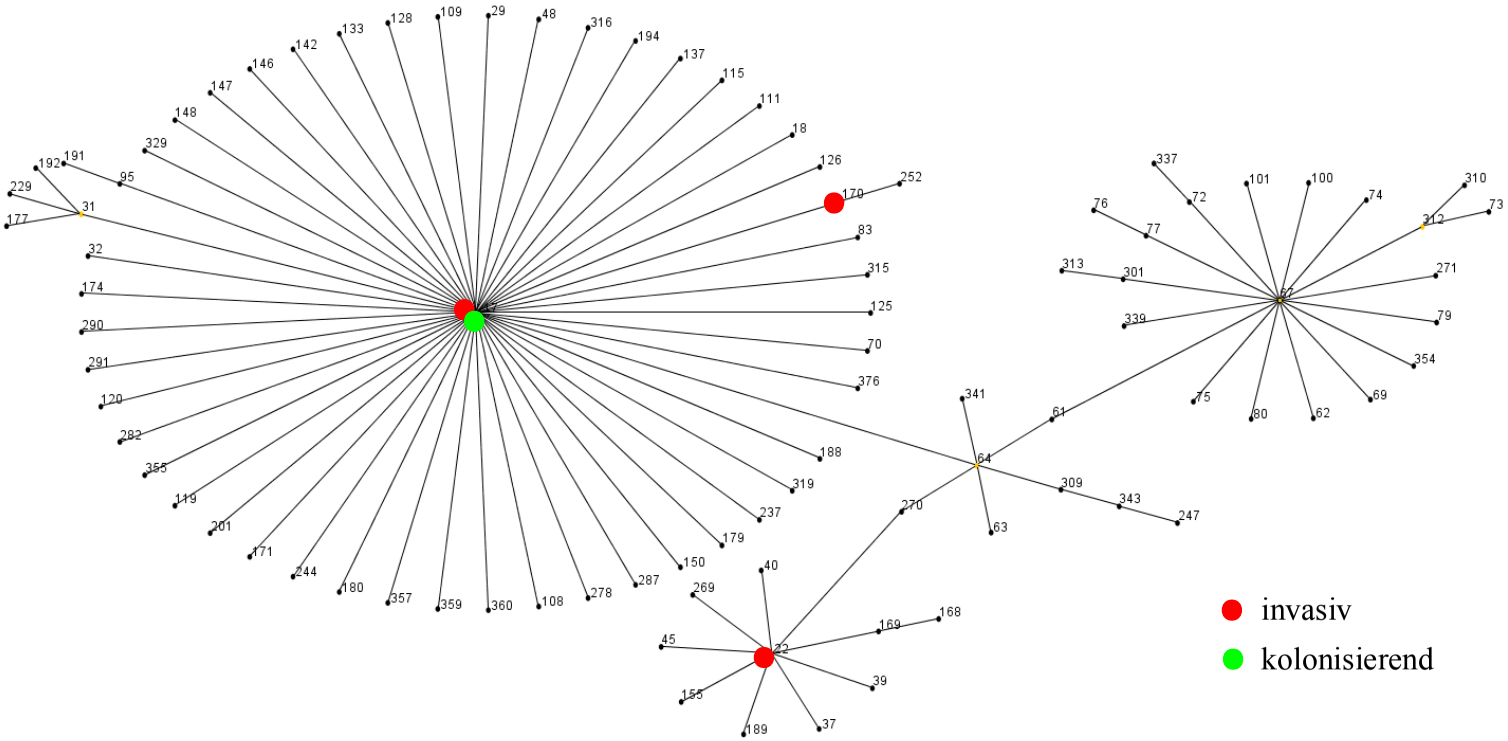

Abb. 13: „burst group“ 2 für kolonisierende (grün) und invasive (rot) Gruppe-B-Streptokokken der vorliegenden Untersuchung

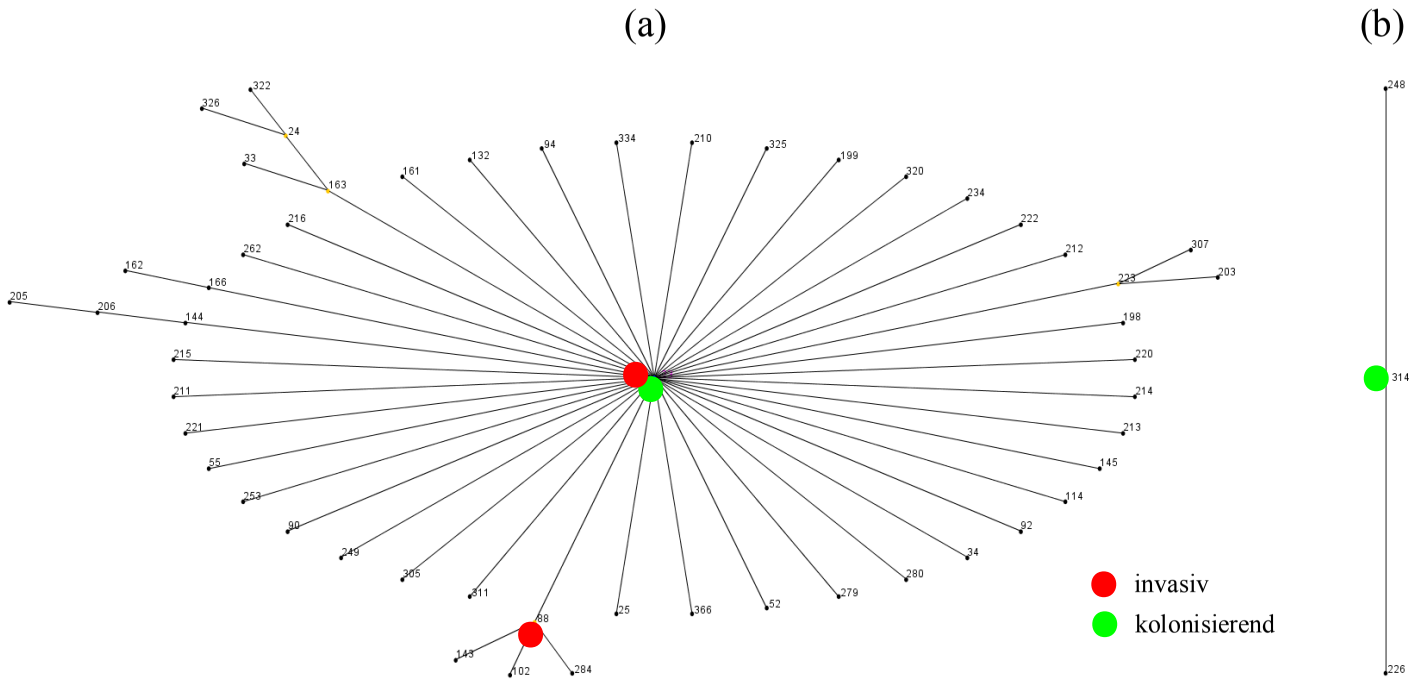

Abb. 14: (a)„burst group“ 3 und (b)„burst group“ 6 für kolonisierende (grün) und invasive (rot) Gruppe-B-Streptokokken der vorliegenden Untersuchung.

Abbildungsverzeichnis

1 Gruppe-B-Streptokokken mit β-Hämolyse 2

2 Gruppe-A-Streptokokken mit β-Hämolyse 3

3 Häufigkeit der Oberflächenproteine kolonisierender Gruppe-B-Streptokokken (GBS) bei Sequenztypen von GBS aus dem Respirationstrakt von Patienten mit zystischer Fibrose 20

4 Korrelation zwischen Serotyp und exprimiertem Oberflächenprotein bei invasiven Gruppe-B-Streptokokken 20

5 Allelnummern und Sequenztypen kolonisierender und invasiver Gruppe-B-Streptokokken 22

6 Häufigkeit der Sequenztypen invasiver Gruppe-B-Streptokokken . . . 23

7 Häufigkeit der Sequenztypen kolonisierender Gruppe-B-Streptokokken 24

8 eBurst-Diagramm für „burst group“ 1 25

9 eBurst-Diagramm für „burst group“ 2 25

10 eBurst-Diagramme für „burst groups“ 3 und 6 26

11 Korrelation zwischen Oberflächenproteinen und Sequenztypen bei invasiven Gruppe-B-Streptokokken-Stämmen 27

12 eBurst-Diagramm für „burst group“ 1 (Seitenansicht) 51

13 eBurst-Diagramm für „burst group“ 2 (Seitenansicht) 52

14 eBurst-Diagramm für „burst groups“ 3 und 6 (Seitenansicht) 53

Tabellenverzeichnis

1 Verwendete Isolate des CDC 12
2 Zusammenfassung der Arbeitsschritte zur DNA-Isolierung 14
3 Master-Mix für den Amplifikationsansatz 15
4 Verwendete Primer für die MLST der Gruppe-B-Streptokokken 15
5 Arbeitsschritte zur Aufreinigung und Vorbereitung der PCR-Produkte zur Sequenzierungs-PCR 17
6 Arbeitsschritte zur Aufreinigung der PCR-Produkte und Vorbereitung zur Sequenzierung 18
7 Probenansatz für Multiplex-PCR 19

Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt (in chronologischer Reihenfolge)

Barbara Spellerberg
für die Auswahl eines spannenden Themas

Vera Eickel
für die Einarbeitung in die MLST

Stefanie Mauerer
für ihre Unterstützung
und die häufige Beantwortung der Frage „Wo befindet sich das?“

Reinhard Schön & Wolfgang Schnitzler
meine nicht-medizinischen Berater und Korrekturleser für
LaTeX, Layout, Logik, Rechtschreibung und Grammatik