Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Universität Ulm
Prof. Dr. Steffen Stenger

Epidemiologie und molekulare Charakterisierung von *Streptococcus agalactiae* Isolaten

Dissertation

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

vorgelegt von Sabrina Johanna Swoboda
aus Winterrieden

2013

Amtierender Dekan : Prof. Dr. Thomas Wirth

1.Berichterstatter : Prof. Dr. Barbara Spellerberg

2.Berichterstatter : Prof. Dr. Christian Sinzger

Tag der Promotion : 13.02.2014

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis III

I. Einleitung 1

1. **Geschichtlicher Hintergrund** 1

2. **Klinische Bedeutung** 1

3. **Mikrobiologische Charakteristika** 3

3.1 Allgemeine Eigenschaften, Morphologie und Kultur 3

3.2 Einteilung 3

4. **Epidemiologie von *Streptococcus agalactiae*** 6

5. **Ziel dieser Arbeit** 9

II. Material und Methoden 11

1. *Streptococcus agalactiae* – Stämme 11

2. Enzyme, Kits und Oligonukleotide 14

2.1 Enzyme 14

2.2 Kits 14

2.3 Oligonukleotide 14

3. Chemikalien, Geräte und Gebrauchsmaterial 16

3.1 Chemikalien 16

3.2 Geräte 17

3.3 Gebrauchsmaterial 18

4. Bakterienlagerung und -kultivierung 18

5. MLST – Multilocus Sequence Typing 19

5.1 Allgemeines zur MLST von *S. agalactiae* nach Jones *et al.* (2003) 19

5.2 Isolierung chromosmaler DNA aus *S. agalactiae* Stämmen 20

5.3 Polymerase Kettenreaktion zur Amplifikation der chromosomalen DNA 22

5.4 Auftrennung des PCR-Produkts mittels Gelelektrophorese 23

5.5 Aufreinigung der PCR-Produkte 25

5.6 Sequenzierung 26

5.7 Auswertung der Sequenzen 29

5.8 Einordnung in epidemiologische Zusammenhänge innerhalb der Bakterienpopulation 29

III. Ergebnisse 31

1. MLST der kolonisierenden *Streptococcus agalactiae*-Stämme vom Serotyp III 31

2. Informationen zu Herkunft, Isolationszeitpunkt sowie Isolationslokalisation der einzelnen kolonisierenden *Streptococcus agalactiae* Isolate 36

2.1. Angaben zum Ursprungsort sowie ermittelte Sequenztypen der einzelnen Städte 38

2.2. Angaben zur Abstrichlokalisation sowie Sequenztypverteilung an den einzelnen Lokalisationen 38

2.3. Isolationsdatum und Sequenztypverteilung bezogen auf die verschiedenen Isolationsjahre 39

3. Verteilung der untersuchten kolonisierenden Stämme in der Gesamtpopulation von *Streptococcus agalactiae* 39

4. Analyse der Häufigkeit von Mutationsereignissen mittels MLST 41

IV. Diskussion 45

1. Populationsstruktur humaner *S. agalactiae* Stämme 46

2. Vergleich zwischen kolonisierenden und invasiven Isolaten 48

3. Kritik am Verfahren der MLST 52

4. Stabilität der Sequenztypen 54

V. Zusammenfassung 56

VI. Literaturverzeichnis 58

VII. Anhang 67

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ATCC	American Type Culture Collection
adhP	Alcohol dehydrogenase
atr	Amino acid transporter
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CAMP-Faktor	benannt nach Christie, Atkins und Munch-Petersen, wird zur Identifizierung von *S. agalactiae* genutzt
CC	Klonaler Komplex
CDC	Center for Disease Control and Prevention
C-Substanz	Polysaccharid, das als wichtiges Differenzierungsantigen dient
ddNTP(s)	Didesoxynukleosid-5‘-triphosphat(e)
DGGG	Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
DGPI	Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Infektionen
DLV(s)	Double locus variant(s), Sequenztypen, die sich in 2 Allelen unterscheiden
DNA	Desoxyribonukleinsäure, desoxyribonucleic acid
dNTP(s)	Desoxyribonukleosid-5’-triphosphat(e)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EOD	Early-onset Disease
ET	Elektrophoretischer Typ
G	Guanin
GBS	Gruppe-B Streptokokken
glck	Glucose kinase
glnA	Glutamine synthetase
GNPI	Deutsche Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin
H_2O_{bidest}	zweifach destilliertes Wasser
LOD	Late-onset Disease
MLEE	Multilocus enzyme electrophoresis
MLST	Multilocus sequence typing

MLVA	Multilocus-Variant-Repeat Assay
n	number, Anzahl
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pheS	Phenylalanyl tRNA synthetase
PHLS	Public Health Laboratory Center for Disease Surveillance and Control, UK
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
RAPD	Random Amplified Polymorphism DNA
RDP	Restriction digest pattern
rpm	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
sdhA	Serin dehydratase
SLV(s)	Single locus variant(s), Sequenztypen, die sich in einem Allel unterscheiden
ST	Sequenztyp
S. agalactiae	*Streptococcus agalactiae*
S. pyogenes	*Streptococcus pyogenes*
Taq	*Thermus aquaticus*
TBE	Tris-Borat-EDTA, Pufferlösung
THY	Todd Hewitt Broth(THB) + Yeast (Hefe), Anzuchtmedium für S. agalactiae
T	Thymin
tkt	Transketolase
TLV(s)	Trible locus variant(s), Sequenztypen, die sich in 3Allelen unterscheiden
TPE	Tris-Phosphorsäure-EDTA, Pufferlösung
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan

I. Einleitung

1. Geschichtlicher Hintergrund

Streptococcus agalactiae wurde 1887 von Nocard und Mollereau als Erreger der bovinen Mastitis entdeckt (Nocard und Mollereau 1887, Jones 1918). In den 1930er Jahren wurde *S. agalactiae* erstmals als Verursacher der puerperalen Sepsis (Kindbettfieber) identifiziert und somit seine Bedeutung als humaner Infektionserreger nachgewiesen (Lancefield und Hare 1935; Colebrook & Purdie 1937; Fry 1938). Tatsächlich gerät *S. agalactiae* jedoch erst nach 1960 in den Fokus als bedeutender neonataler Infektionserreger, während zuvor nur sporadisch von Infektionen beim Menschen berichtet wurde (Ross 1984). Heute gilt *S. agalactiae* als Hauptursache von invasiven Säuglingsinfektionen. Er ist Auslöser schwerwiegender Erkrankungen wie Sepsis, Meningitis und Pneumonie (Spellerberg 2000). Bei Erwachsenen galt *S. agalactiae* lange Zeit als asymptomatischer Besiedler. In den letzten Jahrzehnten konnten jedoch in zahlreichen Untersuchungen zunehmend invasive Infektionen beobachtet werden, die vor allem bei älteren, chronisch Kranken und immunsupprimierten Erwachsenen auftreten (Farley *et al.* 1993; Schuchat 1998, Edwards und Baker 2005, Phares *et al*. 2008, Sunkara *et al.* 2012).

2. Klinische Bedeutung

Grundsätzlich wird sowohl im Säuglings- als auch im Erwachsenenalter zwischen einer invasiven Infektion und einer asymptomatischen Besiedlung mit *S. agalactiae* unterschieden.

Zwischen 1999 und 2005 wurden in den USA 14573 invasive Infektionen und 1348 Todesfälle durch *S. agalactiae* verursacht (Phares *et al.* 2008).

Durchschnittlich sind in Deutschland etwa 16 % der gesunden Erwachsenen mit GBS besiedelt (Brimil *et al.* 2006). Das natürliche Erregerreservoir wäre hierbei vor allem der Gastrointestinaltrakt und Rektovaginalbereich. Die Übertragung von der Mutter auf das Kind erfolgt vor oder während der Geburt (Hickman *et al.* 1999), wobei die Übertragungsrate ohne Antibiotikaprophylaxe bei ca. 45 % liegt (Easmon *et al.* 1983). In Deutschland liegt die Inzidenz von Säuglingsinfektionen zwischen 0,47 und 1,71 Infektionen auf 1000 Lebendgeburten (Flügge *et al.* 2006; Kunze *et al.* 2011).

Bei der invasiven Infektion wird grundsätzlich zwischen 2 verschiedenen Verlaufsformen unterschieden: Early-onset Disease (EOD) und Late-onset Disease (LOD).

Bei der EOD erfolgt die Übertragung vertikal von der Mutter auf das Kind entweder bereits intrauterin oder während des Geburtsvorgangs durch Aspiration infizierter Amnionflüssigkeit oder direkten Kontakt im Geburtskanal. Klinisch manifestiert sich die frühe Form innerhalb der ersten 7 Tage post partum.

Die Übertragungswege bei der LOD, die erst eine Woche bis 3 Monate nach der Geburt auftritt, sind nicht vollständig geklärt. So kommen sowohl die Übertragung von der Mutter auf das Kind, als auch ein nosokomialer Erwerb z.B. durch das Pflegepersonal in Frage (Schuchat *et al.* 1998).

Insgesamt erfolgt die Übertragung bei mehr als 95 % aller besiedelten Säuglinge vertikal von der Mutter auf das Kind. Andere Übertragungswege sind hingegen nur sehr selten (Hickman *et al.* 1999).

Zu den klinischen Manifestationen der Neugeboreneninfektion gehören vor allem Sepsis und Pneumonie, seltener Meningitis, Osteomyelitis oder Arthritis. Teilweise kann der Verlauf dramatisch sein, wobei auch mit neurologischen Langzeitfolgen bis hin zum Tod des Neugeborenen gerechnet werden muss (DGGG, Leitlinien 2008). Die Mortalität einer invasiven Erkrankung ist trotz einer adäquaten Antibiotikatherapie immer noch hoch und liegt bei bis ca. 4 % und ist bei unreifen Frühgeborenen deutlich höher (Schrag *et al.* 2000), weshalb Präventionsmaßnahmen eine außerordentliche Bedeutung zukommt. Den Hauptrisikofaktor für eine invasive Neugeboreneninfektion stellt die Besiedlung des Gastrointestinal- oder Urogenitaltrakts der Mutter mit *S. agalactiae* dar (Brimil *et al.* 2006).

Nachdem die Bedeutung von *S. agalactiae* für Neugeboreneninfektionen erkannt wurde, wurden 1996 in den USA erstmals einheitliche Richtlinien zur Prävention von perinatalen GBS-Erkrankungen vom CDC (Center for Disease Control and Prevention) herausgegeben. Im Jahre 2000 wurden auch in Deutschland von der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG), der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Infektionen (DGPI) und der Deutschen Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI) entsprechende Leitlinien eingeführt (DGGG, Leitlinien 2008).

Um eine Infektion im Neugeborenenalter zu vermeiden soll bei Besiedlung der Mutter mit GBS eine antibiotische Prophylaxe durchgeführt werden. Durch Screening aller schwangeren Frauen zwischen der 35. und 37. Schwangerschaftswoche und anschließender antibiotischer Prophylaxe mit Ampicillin oder Penicillin G bei Besiedlung kann die Übertragung von der Mutter auf das Kind in den meisten Fällen verhindert werden

(Schuchat *et al.* 1994; Schrag *et al.* 2002). Ein besonders hohes Risiko einer Neugeboreneninfektion liegt vor bei Frühgeborenen, niedrigem Geburtsgewicht, vorzeitigem Blasensprung und lang andauernden Geburten (Apgar *et al.* 2005).

S. agalactiae hat zunehmend an Bedeutung gewonnen als Verursacher von Infektionen im Erwachsenenalter. Besonders gefährdet sind hierbei über 60-jährige, Diabetiker, Krebs- oder HIV-Erkrankte und Immunsupprimierte im Allgemeinen (Farley *et al.* 1995; Jackson *et al.* 1995). Das klinische Erscheinungsbild reicht hier von Haut-, Weichteil- und Knocheninfektionen bis hin zu Pneumonie, Meningitis, Endokarditis und Sepsis.

Jedoch wurde auch bei immunkompetenten Erwachsenen von invasiven *S. agalactiae* Infektionen berichtet (Mouly *et al*. 1999, Reguera *et al*. 2011).

3. Mikrobiologische Charakteristika

3.1. Allgemeine Eigenschaften, Morphologie und Kultur

Zur Familie der *Streptococcaceae* werden Streptokokken, Enterokokken und Laktokokken gezählt. *S. agalactiae* als Vertreter der Gattung *Streptococcus* ist ein grampositives, katalase-negatives, unbewegliches, paare- bzw. kettenbildendes Bakterium, welches nicht zur Sporenbildung befähigt ist. Streptokokken sind anspruchsvolle Keime, die hohe Anforderungen an die Kulturmedien und Kulturbedingungen stellen. Für die Kultivierung besonders geeignet sind hierbei bluthaltige Nährböden, wobei die humanpathogenen Arten wie *S. agalactiae* am besten bei 35 °C bis 37 °C wachsen. Streptokokken sind aerotolerante Bakterien, d. h. sie werden durch die Anwesenheit von Sauerstoff nicht in ihrem Wachstum gestört. Die Energiegewinnung erfolgt jedoch anaerob über die homofermentative Milchsäuregärung, d.h. es wird nur ein einziges charakteristisches Gärprodukt erzeugt, die Milchsäure (Madigan, Martinko & Parker 2009).

Der CAMP-Faktor aus *S. agalactiae* wurde erstmals 1944 von Christie, Atkins und Munch-Petersen beschrieben. Dieses extrazelluläre Protein verstärkt den Hämolysehof um *S. aureus,* was zur Identifizierung von *S. agalactiae* genutzt werden kann (Waitkins, 1980).

3.2. Einteilung

3.2.1. Hämolyseverhalten

Streptokokken lassen sich anhand ihres Hämolyseverhaltens auf Blutagar einteilen, wobei sich 3 verschiedene Hämolyseformen unterscheiden lassen.

Bei der α-Hämolyse kommt es durch Reduktion des Hämoglobins zu Biliverdin zu einer grünlichen Farbe um die Bakterienkolonie. Die β-Hämolyse führt zu einem klaren,

durchscheinenden Hof um die Kolonie, da durch die Absonderung von Hämolysinen, Streptolysin O oder Streptolysin S, die Erythrozyten vollständig aufgelöst werden. Bei der γ-Hämolyse findet keine Hämolyse statt. *S. agalactiae* gehört zu den ß-hämolysierenden Streptokokken, da beim Wachstum auf bluthaltigen Nährböden nach einer Inkubation von 24 Stunden ein klarer jedoch relativ kleiner Hämolysehof um die 0,5 mm bis 2 mm großen, feuchten, grauen bis weißlichen Kolonien zu sehen ist.

3.2.2. Serologische Einteilung

Rebecca Lancefield etablierte eine serologische Einteilung der ß-hämolytischen Streptokokken aufgrund des Musters bestimmter Kohlenhydratantigenen in der Zellwand in die Serogruppen A-E (Lancefield, 1933). Als wichtigstes Differenzierungsantigen erweist sich dabei ein Polysaccharid, das als C-Sustanz bezeichnet wird. Mittlerweile konnten die serologischen Gruppen A-V etabliert werden (Hahn *et al.* 2004). Bei den ß-hämolytischen Streptokokken der Gruppe A kommt *Streptococcus pyogenes* die größte medizinische Bedeutung zu. Er ist unter anderem Verursacher von Mandelentzündungen, Scharlach, Impetigo, Erysipel und lebensbedrohlichen Infektionen wie der nekrotisierenden Fasziitis. Enterokokken hingegen tragen das D-Antigen.

S. agalactiae ist der einzige Vertreter der serologischen Gruppe B, weshalb man auch von Gruppe-B-Streptokokken spricht, kurz GBS.

Die Kapsel gilt schon lange als einer der wichtigsten Virulenzfaktoren (Rubens, 1987). Anhand der unterschiedlichen Struktur der Kapselpolysaccharide lassen sich mittlerweile 10 verschiedene Serotypen Ia, Ib, II - IX unterscheiden (Slotved *et al.* 2007). Der Serotyp III ist der Hauptverursacher von invasiven Infektionen bei Säuglingen (Schuchat, 1998).

Weitere serologische Differenzierungsmöglichkeiten ergeben sich durch die wichtigsten Oberflächenproteine alpha-C-Protein, epsilon, Alp2-4 und Rib, die sehr wahrscheinlich eine wichtige Bedeutung für die Pathogenese der GBS-Infektion darstellen (Kong *et al.* 2002; Lachenauer *et al.* 2000; Lindahl *et al.* 2005).

3.2.3. Molekulargenetische Einteilungsmöglichkeiten

Eine weitere Möglichkeit um *S. agalactiae* zu klassifizieren stellen molekulargenetische Untersuchungen wie MLEE (multilocus enzyme electrophoresis), das davon abgeleitete Verfahren der MLST (multilocus sequence typing), PFGE (Pulsfeldgelelektrophorese) und RDP (restriction digest pattern) dar (Jones *et al.* 2003).

Bei der MLEE werden verschiedene Varianten von Stoffwechselenzymen anhand ihrer Mobilität im elektrischen Feld untersucht. Stämme mit identischem Enzymmuster weisen einen hohen Grad an genetischer Verwandtschaft auf und werden als elektrophoretischer Typ (ET) zusammengefasst (Musser *et al.* 1989, Quentin *et al*. 1995).

MLST ist ein auf DNA-Sequenzen basierendes Verfahren zur molekularen Charakterisierung von Bakterienspezies und anderen Mikroorganismen, das 1998 durch Maiden *et al.* zunächst für *Neisseria meningitidis* entwickelt wurde (Maiden *et al.* 1998) und mittlerweile eine eindeutige molekulare Typisierungsmethode für zahlreiche Bakterien- und Pilzspezies darstellt. Durch die Sequenzanalyse von je nach Bakterienspezies 6 bis 8 hochkonservierten Genen, sogenannte Housekeeping-Gene, die zum Kerngenom der jeweiligen Spezies gehören und für grundlegende Zellfunktionen verantwortlich sind, lassen sich die Unterschiede auf Nukleinsäureebene erfassen (Jolley *et al.* 2004). Die Nukleotidsequenzen im Bereich der Housekeeping-Loci verfügen über durchschnittlich 500 Basenpaare und sind innerhalb eines Bakterienstammes in ihrer Sequenz stabil. In der Gesamtpopulation finden sich jedoch ausreichende Unterschiede. Diese Nukleotidsequenzen werden zunächst mittels PCR amplifiziert, um dann gemäß dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger sequenziert zu werden. Den einzelnen Sequenzen kann, nachdem sie mit allen bisher an diesem Genlocus identifizierten Sequenzen sprich Allelen innerhalb einer Bakterienspezies verglichen wurden, eine bestimmte Allelnummer zugeordnet werden (www.mlst.net). Kombiniert man die Allelnummern der verschiedenen Genloci miteinander ergibt sich das Allelprofil des Bakterienstamms, das für den jeweiligen Sequenztyp spezifisch ist (Anansen und Spratt, 2008).

MLST basiert auf dem etablierten Verfahren der Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE), unterscheidet sich jedoch darin, dass den Housekeeping-Loci durch Sequenzierung direkt Allelnummern zugeordnet werden können und die verschiedenen Allele nicht indirekt durch Auftrennung in der Elektrophorese zugeordnet werden müssen. Das Verfahren der MLST ist besser reproduzierbar und es können feinere Sequenzunterschiede erkannt werden, die sich auf das elektrophoretische Laufverhalten der Genprodukte nicht auswirken. Der große Vorteil der MLST besteht darin, dass die Stämme eindeutig charakterisiert werden können und die Allelprofile einzelner Isolate problemlos über das Internet mit einer großen zentralen Datenbank verglichen werden können.

Die MLST-Datenbanken stehen auf 2 Webseiten zur freien Verfügung: http:/www.mlst.net und http:/pubmlst.org. MLST ist besonders für epidemiologische Untersuchungen

geeignet, da die Daten problemlos zwischen verschiedenen Laboratorien ausgetauscht werden können (Jones *et al.* 2003).

Mittlerweile wurde das Verfahren der MLST zu einer molekularen Schlüsseltechnik in der deskriptiven Epidemiologie von pathogenen Organismen, indem es Einblicke in die Populationsbiologie dieser Organismen gewährt (Bisharat *et al.* 2005).

Innerhalb der Bakterienpopulation von *S. agalactiae* wurden bisher 624 verschiedene Allelprofile und somit Sequenztypen ermittelt (www.mlst.net).

Das MLST-Schema für *S. agalactiae* wurde 2003 von Jones *et al.* entwickelt und soll im Material und Methodenteil genauer beschrieben werden.

Bei der PFGE wird das gesamte bakterielle Genom durch spezifische Restriktionsendonukleasen (z.B Sma1) hydrolysiert und die entstandenen Fragmente anschließend in einem speziellen Agarosegel unter wechselnden elektrischen Spannungen elektrophoretisch aufgetrennt. Für die einzelnen Bakterienstämme entsteht ein spezifisches Bandenmuster (Rolland *et al.* 1999). Bereits kleinste Veränderungen im Genom können hierbei sichtbar gemacht werden, weshalb sich dieses Verfahren besonders zur Untersuchung lokaler Ausbruchsgeschehen eignet, weniger jedoch für epidemiologische Untersuchungen an der Gesamtpopulation. Da es sich bei der PFGE um ein bildgestütztes Verfahren handelt, ist es schwer Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboratorien zu vergleichen.

Auch bei der Typisierung mittels RDP wird das bakterielle Genom mittels Restriktionsenzymen z.B. Hind III verdaut und in einem konventionellen Agarosegel aufgetrennt (Takahashi *et al* 1998, Bohnsack *et al.* 2001).

Die unterschiedlichen Serotypen, Oberflächenproteine und Sequenztypen scheinen mit einer unterschiedlichen Virulenz der verschiedenen *S. agalactiae* Stämme assoziiert zu sein.

4. Epidemiologie von *Streptococcus agalactiae*

S. agalactiae wird bei 10 bis 35 % in der Regel symptomlosen Erwachsenen im Urogenital- oder Gastrointestinaltrakt nachgewiesen (Badri *et al.* 1977; Bliss *et al.* 2002; Dillon *et al.* 1982, Foxman *et al.* 2006; Hickman *et al.* 1999, Manning *et al.* 2004).

2006 wurden Daten zur Besiedlungsrate in Deutschland veröffentlicht. In einer Studie von *Brimil et al.* wurde eine Besiedlungsrate von 16 % bei Schwangeren und Nicht-Schwangeren Personen gefunden, wobei sich häufiger eine Besiedlung des Genital- als des Gastrointestinaltrakts zeigte (Brimil *et al.* 2006).

Bei der Geburt werden ohne antibiotische Prophylaxe in Abhängigkeit von den Risikofaktoren bis zu 80 % der Kinder kolonisierter Mütter mit GBS besiedelt, was zur meist asymptomatischen Kolonisation der Haut- und Schleimhautoberflächen bei den Neugeborenen führt. Allerdings entwickeln immerhin 1–2 % dieser Kinder eine invasive Erkrankung (Spellerberg 2000). Mit Einführung der Präventionsrichtlinien sank die Inzidenz in den USA von 1,7 Erkrankungen pro 1000 Lebendgeburten im Jahre 1993 auf 0,34 pro 1000 Lebendgeburten zwischen 2003 und 2005 (Phares *et al.* 2005, Schrag *et al.* 2000). Die derzeitige Inzidenz in Deutschland von GBS-Infektionen im Säuglingsalter liegt zwischen 0,47 und 1,71 pro 1000 Lebendgeburten (Fluegge *et al.* 2006; Kunze *et al.* 2011). Die weiterhin relativ hohe Inzidenz in der Publikation von Kunze *et al.* 2011 lässt vermuten, dass die Empfehlungen zur GBS Prophylaxe nicht ausreichend umgesetzt werden und eine bessere Compliance gefördert werden muss. Trotz allem kann nicht jede neonatale Infektion durch den Einsatz einer Antibiotikaprophylaxe verhindert werden. Um in etwa 80 bis 90 % eine Infektion zu verhindern, muss bei 25 % aller Geburten eine Antibiose gegeben werden, wobei sich jedoch in den wenigsten Fällen eine invasive Erkrankung entwickeln würde (Spellerberg, 2000). Desweiteren führt der Einsatz von Antibiotika zur Selektion anderer fakultativ pathogener Bakterien und zu vermehrten Resistenzraten. Während die EOD durch *S. agalactiae* durch die präventive Antibiotikagabe deutlich seltener auftritt, hat die Anzahl an Neugeborenenseptitiden durch gramnegative Keime zugenommen (Levine *et al.* 1999). Ein Impfstoff gegen *S. agalactiae* würde eine sinnvolle Alternative zu den bisherigen Präventionsmaßnahmen darstellen.

Die Kolonisation des Neugeborenen ist der erste Schritt in Richtung invasive Erkrankung. Da jedoch nicht alle besiedelten Neugeborenen erkranken, scheint es essentielle Unterschiede in der Virulenz der jeweiligen *S. agalactiae* Stämme zu geben. Um die Pathogenese von invasiven neonatalen Infektionen besser verstehen zu können, ist es wichtig sowohl die serologischen als auch die molekulargenetischen Unterschiede zwischen kolonisierenden Stämmen bei der Mutter, kolonisierenden Stämmen beim Säugling und schließlich Stämmen, die zu einer invasiven Infektion beim Säugling führen, zu kennen. Durch eine genaue Identifizierung virulenter Stämme wäre es eventuell möglich gezielt nur für diese Stämme, die von der Mutter auf das Kind übertragen werden und eine invasive Erkrankung hervorrufen können, einen spezifischen Impfstoff zu entwickeln.

Bereits 1975 konnte in einer Studie von Lancefield *et al.* bei Mäusen gezeigt werden, dass das Vorhandensein Serotyp-spezifischer Antikörper vor invasiven GBS-Erkrankungen

schützen kann (Lancefield *et al.* 1975). Auch beim Menschen ist die Wahrscheinlichkeit einer EOD beim Säugling abhängig von der Höhe der Serumkonzentration an Serotyp-spezifischen Antikörper bei der Mutter (Feng-Ying *et al.* 2001). Der Serotyp III wird häufiger bei invasiven Infektionen gefunden als andere Serotypen. Dies hängt möglicherweise mit der geringen Serotyp III spezifischen Antikörperproduktion der Mutter zusammen (Davies *et al.* 2001).

Zur Entwicklung eines Impfstoffes basierend auf der Serotypenverteilung muss das genaue Vorkommen der einzelnen Serotypen sowohl bei kolonisierenden als auch bei invasiven Stämmen verfolgt werden. In Deutschland zeigte sich unter den kolonisierenden Stämmen bei schwangeren und nicht-schwangeren Erwachsenen folgende Verteilung: Serotyp III 28 %, Serotyp II 21 %, Serotyp Ia 17 %, Serotyp V 16 %, Serotyp Ib 15 % und Serotyp IV 3 %. (Brimil *et al.* 2006).

Bei invasiven Säuglingsinfektionen hingegen ist der Serotyp III mit 65 % der Isolate deutlich stärker vertreten, darauf folgend Serotyp Ia 15 % , Serotyp V 8 % gefolgt von den Serotypen Ib und II mit jeweils 5 % und dem Serotyp IV mit 1 % (Fluegge *et al.* 2005).

Untersuchungen in den USA und in Westeuropa zeigen, dass die Serotypen I, II, III und V in 86 bis 90 % der klinischen Isolate gefunden werden können (Hickman *et al.* 1999; Kieran *et al.* 1998). Somit könnte mit einem Impfstoff gegen die Serotypen Ia, Ib, II, III und V ein Großteil der *S. agalactiae* Stämme in Deutschland abgedeckt werden (Brimil *et al.* 2006). Die Serotypenverteilung ist jedoch weltweit sehr unterschiedlich, weshalb die Entwicklung eines global effektiven Impfstoffes problematisch sein wird. In Japan wurden hauptsächlich die Serotypen VI und VIII gefunden, die in Europa und Nordamerika sehr selten vorkommen (Lachenauer *et al.* 1999).

Auch unterliegt die Serotypenverteilung einem ständigen Wandel, so gewann der Serotyp V in den letzten Jahrzehnten zunehmend an Bedeutung (Harrison *et al.* 1998). Er konnte bei durchschnittlich 21 % der invasiven Infektionen in den USA nachgewiesen werden (Blumberg *et al.* 1996).

Oberflächengebundene Proteine stellen eine potentielle Alternative bei der Impfstoffentwicklung dar. Durch sie lassen sich möglicherweise die Probleme, die sich bei Serotypspezifischen Impfungen ergeben, umgehen.

Auch auf molekularer Ebene konnten bestimmte Isolate identifiziert werden, die eine besondere Assoziation mit invasiven Infektionen aufweisen. Die Sequenztypen ST-1, ST-9, ST-17, ST-19 und ST-23 sind die häufigsten Verursacher invasiver Infektionen (Luan *et al.* 2005). Vorallem der Sequenztyp ST-17 scheint eine besondere Bedeutung für

schwerwiegende invasive Säuglingsinfektionen wie der Meningitis zu haben (Poyart *et al* 2008).

Eine genaue Untersuchung der Epidemiologie des Erregers, der Kolonisations- und Infektionsraten ist essentiell um den Erfolg der Präventionsmaßnahmen abschätzen zu können. Für die potentielle Entwicklung eines Impfstoffes ist es wichtig die Häufigkeiten der einzelnen Serotypen und ihre jeweilige Assoziation mit invasiven Erkrankungen, sowie die molekularen Charakteristiken von invasiven und harmlosen kolonisierenden Stämmen zu kennen.

5. Ziel dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Epidemiologie von kolonisierenden neonatalen *S. agalactiae* Isolaten genauer beschrieben werden. Um Unterschiede auf molekulargenetischer Ebene zwischen kolonisierenden und invasiven GBS-Stämmen zu beschreiben, sollen neonatale kolonisierende Stämme vom Serotyp III mittels Multilocus Sequence Typing (MLST) charakterisiert werden und mit den Ergebnissen von Untersuchungen an kolonisierenden und invasiven Stämmen verglichen werden. Durch den Vergleich soll eine Aussage über die genetische Verwandschaft und die Abstammungsverhältnisse getroffen werden. Es soll untersucht werden, ob sich die kolonisierenden Stämme in ihren Sequenztypen gänzlich von invasiven Stämmen unterscheiden oder ob sie lediglich ein Reservoir darstellen aus dem invasive Stämme abgeleitet werden.

Die Besiedlung des Neugeborenen stellt den ersten Schritt auf dem Weg zur invasiven Infektion dar. Aus diesem Grund ist es wichtig die molekulargenetischen Eigenschaften der kolonisierenden Stämme zu kennen und die genetische Verwandtschaft zu invasiven Stämmen zu ermitteln.

Wenn sich klare Unterschiede auf molekulargenetischer Ebene zwischen invasiven und kolonisierenden Stämmen identifizieren ließen, könnte dies die Möglichkeit eröffnen gezielt nur für invasive Stämme Präventionsmaßnahmen zu ergreifen und einen Impfstoff zu entwickeln.

Da das Verfahren der MLST mittlerweile eine sehr verbreitete Methode ist Bakterienstämme molekulargenetisch zu charakterisieren und es bisher noch sehr wenig Information bezüglich der langjährigen Stabilität der Sequenztypen gibt, sollen im zweiten Teil der Arbeit GBS-Stämme eines bestimmten Typs, die ursprünglich von ein und demselben Klon abstammen und daher den identischen Sequenztyp aufweisen müssten,

mittels MLST untersucht werden. Diese Stämme wurden jedoch bereits vor Jahrzehnten getrennt und in den Stammsammlungen verschiedener Laboratorien aufbewahrt und sollen nun auf eventuelle Punktmutationen oder Rekombinationsereignisse innerhalb der Housekeeping-Gene untersucht werden. Dadurch sollen Erkenntnisse über die Stabilität der Stoffwechselgene im Verlauf von Jahren und über mögliche Mutationen erlangt werden.

II. Material und Methoden

1. *Streptococcus agalactiae* – Stämme

Im Rahmen einer Kooperation zwischen dem Universitätsklinikum Freiburg, dem Robert-Koch-Institut-Berlin und dem Universitätsklinikum Ulm wurden im Zeitraum zwischen April 2001 und März 2003 in 16 deutschen Städten neonatale, kolonisierende GBS Stämme gesammelt, insgesamt 171 kolonisierende Isolate. Die Isolate stammen von Neugeborenen mit dem Verdacht auf Sepsis, deren Blutkulturen sich jedoch als steril erwiesen und somit keine invasive Infektion nachgewiesen werden konnte. Es handelt sich um Isolate aus Abstrichen von Nabel, Nase, Magensaft, Ohr, Rachen, Plazenta und Trachealsekret. Bei einigen Isolaten war der Abstrichort im Nachhinein nicht mehr nachvollziehbar und somit unbekannt. 50 dieser neonatalen kolonisierenden GBS-Stämme vom Serotyp III wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels MLST untersucht und mit den im selben Zeitraum gesammelten invasiven Serotyp III Isolaten verglichen.

Die *S. agalactiae* Stämme, die im 2. Teil der Arbeit mittels MLST untersucht wurden, wurden von verschiedenen Laboratorien in Russland, Tschechien, Dänemark und Italien zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um GBS-Stämme vom Typ O90, O90R und O90S. Diese Stämme leiten sich von humanen Isolaten ab, die in den 1920ern isoliert und ursprünglich als *Streptococcus Aronson* bekannt waren (Griffith 1935, Howie 1938). Die Stämme konnten von Rebecca Lancefield den B-Streptokokken zugeordnet werden und wurden von ihr zunächst als O90-Stämme bezeichnet (Lancefield 1933).

Streptokokken, die vom Menschen isoliert wurden, weisen unterschiedliche Kolonieformen auf, wobei sich sowohl eher raue, englisch **R**ough, als auch eher glatte Kolonien, englisch **S**mooth, zeigen. Dadurch entstand die Bezeichnung O90**R** für raue und O90**S** für glatte Kolonien. Die Stämme vom Typ O90R können durch viele Passagen aus O90S gewonnen werden. So kann die veränderte Form des O90R zum Beispiel gewonnen werden, indem O90S-Stämme bestimmten Konzentrationen einer Acriflavinlösung ausgesetzt werden. Es handelt sich beim O90R um eine nicht virulente, unbekapselte Form (Howie 1938).

Ursprünglich stammen die O90R und O90S-Stämme jedoch von ein und demselben Klon ab und waren definitiv genetisch identisch, als sie vor Jahrzehnten getrennt und an die verschiedenen Laboratorien gesendet wurden.

Tabelle 1a: Kolonisierende *Streptococcus agalactiae* Isolate

Isolat	Freiburger Nr.	Eigenschaften	Herkunft
390	Strep Net S 5	kolonisierend	Freiburg
391	Strep Net S 7	kolonisierend	Freiburg
392	Strep Net S 19	kolonisierend	Freiburg
393	Strep Net S 20	kolonisierend	Freiburg
394	Strep Net S 23	kolonisierend	Freiburg
395	Strep Net S 29	kolonisierend	Freiburg
396	Strep Net S 35	kolonisierend	Freiburg
397	Strep Net S 38	kolonisierend	Freiburg
398	Strep Net S 42	kolonisierend	Freiburg
399	Strep Net S 44	kolonisierend	Freiburg
400	Strep Net S 45	kolonisierend	Freiburg
401	Strep Net S 49	kolonisierend	Freiburg
402	Strep Net S 51	kolonisierend	Freiburg
403	Strep Net S 58	kolonisierend	Freiburg
404	Strep Net S 66	kolonisierend	Freiburg
405	Strep Net S 76	kolonisierend	Freiburg
406	Strep Net S 78	kolonisierend	Freiburg
407	Strep Net S 84	kolonisierend	Freiburg
408	Strep Net S 86	kolonisierend	Freiburg
409	Strep Net S 91	kolonisierend	Freiburg
410	Strep Net S 93	kolonisierend	Freiburg
411	Strep Net S 97	kolonisierend	Freiburg
412	Strep Net S 98	kolonisierend	Freiburg
413	Strep Net S 99	kolonisierend	Freiburg
414	Strep Net S 110	kolonisierend	Freiburg
415	ESPD E 10	kolonisierend	Freiburg
416	ESPD E 50	kolonisierend	Freiburg
417	ESPD E 52	kolonisierend	Freiburg
418	ESPD E 87	kolonisierend	Freiburg
419	ESPD E 166	kolonisierend	Freiburg
420	ESPD E 175	kolonisierend	Freiburg
421	ESPD E 183	kolonisierend	Freiburg
422	ESPD E 210	kolonisierend	Freiburg
423	ESPD E 217	kolonisierend	Freiburg

Tabelle 1b: Fortsetzung der kolonisierenden *Streptococcus agalactiae* Isolate

Stamm	Freiburger Nr	Eigenschaften	Herkunft
424	ESPD E 224	kolonisierend	Freiburg
425	ESPD E 229	kolonisierend	Freiburg
426	ESPD E 237	kolonisierend	Freiburg
427	ESPD E 246	kolonisierend	Freiburg
428	ESPD E 247	kolonisierend	Freiburg
429	ESPD E 258	kolonisierend	Freiburg
430	ESPD E 316	kolonisierend	Freiburg
431	ESPD E 337	kolonisierend	Freiburg
432	ESPD E 340	kolonisierend	Freiburg
433	ESPD E 355	kolonisierend	Freiburg
434	ESPD E 358	kolonisierend	Freiburg
435	ESPD E 359	kolonisierend	Freiburg
436	ESPD E 385	kolonisierend	Freiburg
437	ESPD E 386	kolonisierend	Freiburg
438	ESPD E 413	kolonisierend	Freiburg
439	ESPD E 384	kolonisierend	Freiburg

Tabelle 2: O90, O90R und O90S Stämme

Isolat	Stamm	Eigenschaften	Herkunft
21	O90S	bekapselt	Aachen
540	O90R		Russland
541	O90R 2 ccp	Vgl. 540 nach mehreren Mauspassagen	Russland
542	O90R 99/8		Russland
543	O90R 58/59		Russland
544	O90R FOS4 90r	Fosfomycin-resistent	Russland
795	O90R 1		Roberta Creti, Rom
796	O90R 2		Roberta Creti, Rom
797	O90R 3		Roberta Creti, Rom
798	O90S Strep.B Ia 8/70 B		Jitka Motlova, Tschechische Republik
799	O90R Strep B Ia 58/59 B		Jitka Motlova, Tschechische Republik
800	O90 (ATCC 12400) int. No. SK 1168		Uffe Skov Soerensen, Dänemark

2. Enzyme, Kits und Oligonukleotide

2.1. Enzyme

Der nachfolgenden Auflistung können, die in der Arbeit verwendeten Enzyme entnommen werden.

Lysozym (50 mg/ml)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Mutanolysin (5000 U/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Proteinase K (20 mg/ml)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Proteinase K (ohne Konzentrationsangabe des Herstellers)	Im QiAamp DNA Mini Kit enthalten, Qiagen GmbH, Hilden
Taq DNA Polymerase (1 U/µl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.2. Kits

Bigdye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA USA
Centri-Sep Spin Columns	Princeton Separations, Freehold, NJ, USA
QiAamp® DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Nucleo Spin® Extract II	Macherey-Nagel GmbH, Düren

2.3. Oligonukleotide

Die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide für PCR und Sequenzierungen wurden von der Firma Thermo Hybaid, Ulm, Germany bezogen. Die Oligonukleotide wurden mit Aqua bidest auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt und bei -20 °C gelagert. Vor ihrer Verwendung erfolgte eine weitere Verdünnung. Die Forward und Reverse Primer für die Amplifikation wurden mit einer Konzentration von 10 pmol/µl in die PCR eingesetzt. Bei der Sequenzierung wurde eine Konzentration von 1 pmol/µl verwendet.

2.3.1. Forward Oligonukleotid- Primer für die Amplifikation

Tabelle 3: Forward Oligonukleotid-Primer für die Amplifikation, angegeben ist die Länge des amplfizierten Abschnitts in Basenpaaren (bp)

Locus	Forward (5‘ to 3‘)	Amplicon-Size (bp)
adhP	GTTGGTCATGGTGAAGCACT	672
pheS	GATTAAGGAGTAGTGGCACG	723
atr	CGATTCTCTCAGCTTTGTTA	627
glnA	CCGGCTACAGATGAACAATT	589
glck	CTCGGAGGAACGACCATTAA	607
sdhA	AGAGCAAGCTAATAGCCAAC	646
tkt	CCAGGCTTTGATTTAGTTGA	859

2.3.2. Reverse Oligonukleotid- Primer für die Amplifikation

Tabelle 4: Reverse Oligonukleotid-Primer für die Amplifikation, angegeben ist die Länge des amplfizierten Abschnitts in Basenpaaren (bp)

Locus	Reverse (5‘ to 3‘)	Amplicon-Size (bp)
adhP	ACTGTACCTCCAGCACGAAC	672
pheS	TTGAGATCGCCCATTGAAAT	723
atr	AAGAAATCTCTTGTGCGGAT	627
glnA	CTGATAATTGCCATTCCACG	589
glck	CTTGTAACAGTATCACCGTT	607
sdhA	ATATCAGCAGCAACAAGTGC	646
tkt	AATAGCTTGTTGGCTTGAAA	859

2.3.3. Forward Oligonukleotid-Primer für die Sequenzierung

Tabelle 5: Forward Oligonukleotid-Primer für die Sequenzierung, angegeben ist die Länge des sequenzierten Abschnitts in Basenpaaren (bp)

Locus	Forward (5‘ to 3‘)	Amplicon-Size (bp)
adhP	GGTGTGTGCCATACTGATTT	498
pheS	ATATCAACTCAAGAAAAGCT	501
atr	ATGGTTGAGCCAATTATTTC	501
glnA	AATAAAGCAATGTTTGATGG	498
glck	GGTATCTTGACGCTTGAGGG	459
sdhA	AACATAGCAGAGCTCATGAT	519
tkt	ACACTTCATGGTGATGGTTG	480

2.3.4. Reverse Oligonukleotid-Primer für die Sequenzierung

Tabelle 6: Reverse Oligonukleotid-Primer für die Sequenzierung, angegeben ist die Länge des sequenzierten Abschnitts in Basenpaaren (bp)

Locus	Reverse (5‘ to 3‘)	Amplicon-Size (bp)
adhP	ACAGCAGTCACAACCACTCC	498
pheS	TGATGGAATTGATGGCTATG	501
atr	CCTTGCTCAACAATAATGCC	501
glnA	GCATTGTTCCCTTCATTATC	498
glck	ATCGCTGCTTTAATGGCAGA	459
sdhA	GGGACTTCAACTAAACCTGC	519
tkt	TGACCTAGGTCATGAGCTTT	480

3. Chemikalien Geräte und Gebrauchsmaterial

3.1. Chemikalien

Agar: Bacto™ Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Aqua bidest; zweifach destilliertes Wasser	Aqua deltaselect Spüllösung Apotheke; Uniklink Ulm
Bromphenolblau	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Blue Dextran EDTA	Applied Biosystems, Foster City, CA USA
Dextranblau	Serva, Heidelberg
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure	Fluka-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg

<u>Größenstandard:</u>

• GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Hefeextrakt: Bacto™ Yeast Extract	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
HiDi Formamide	Applied Biosystems, Foster City, CA USA

$MgCl_2$ / 10x Puffer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
dNTPs, PCR Nucleotide Mix, 10 mmol each	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Sucrose 99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Todd Hewitt Broth	Oxoid GmbH, Wesel
Tris	USB Corporation Cleveland, OH, USA
Tris borate-EDTA-Buffer: 5x concentrate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris-EDTA-Buffer: 100x concentrate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Triton X 100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Wasserstoffperoxid-Lösung 30%	Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken

3.2. Geräte

Agarosegelelektrophoresekammer	Heraeus Instruments GmbH, Fellbach
Brutschrank:kelvitron®t/BBD 6220	Heraeus Instruments GmbH, Fellbach
Geldokumentationsanlage	Kappa opto-electronics GmbH, Gleichen
Heizblöcke: Thermomixer 5436/ Thermomixer comfort	Eppendorf-Metheler-Hinz GmbH, Hamburg
<u>PCR-Maschine:</u>	
TRIO-Thermoblock™	Biometra GmbH, Göttingen
Photometer: Ultraspec 3000	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Pipetten	Gilson International B.V. Deutschland, Limburg Offheim
<u>Sequenzierer:</u>	
ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, CA USA
UV-Durchlichtbank	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen

Zentrifugen:

• Biofuge fresco	Heraeus Instruments GmbH, Fellbach
• Varifuge 3.OR	Heraeus Instruments GmbH, Fellbach
• Centrifuge 5417C	Eppendorf AG, Hamburg

3.3. Gebrauchsmaterial

Caso Blutplatten	Heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim
Einmalpipetten(5/10/20 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Impfnadeln-/-ösen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Küvetten:

• Polysytrol	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
• Quarzglas	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim
Petrischalen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen (mit und ohne Filter)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße 0,5/1,5/2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäß Sequenzierung 0,6 ml	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf

Septen (Sequenzierung):

Genetic Analyzer Septa für 0,5 ml Tubes	Applied Biosystems, Foster City, CA USA

4. Bakterienlagerung und -kultivierung

Die verwendeten Bakterienstämme wurden als Glycerinkultur bei -70 °C aufbewahrt (Mikrobank, Pro Lab Diagnostics). Zum Anlegen einer neuen Bakterienkultur wurde mit einer Impföse der Überstand im Röhrchen, bzw. ein Kryokügelchen auf dem Nährboden ausgestrichen und anschließend über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Die verwendeten Nährböden wurden zur Sterilisation für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

Die Anzucht der *S. agalactiae* Stämme erfolgte auf THY-Platten (Todd Hewitt Broth + Yeast Extract). Um das Hämolyseverhalten der Stämme beurteilen zu können wurden sie auch auf Caso-Blutplatten angezüchtet.

THY-Medium:

Todd Hewitt Broth	36, 4 g/l
Hefeextrakt	5 g/l

Zur Herstellung der THY-Platten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren noch 15 g/l Agar zugegeben.

Caso-Blutplatten:

Caseinpepton	15 g/l
Sojamehlpepton	5 g/l
NaCl	5 g/l
Schafblut	50 ml/l
Agar	16 g/l

Die Caso-Blutplatten wurden von der Firma Heipha in Eppelheim kommerziell bezogen. Es handelt sich um Konzentrationsangaben des Herstellers.

5. MLST – Multilocus Sequence Typing

Die MLST der GBS-Stämme wurde gemäß der von Jones *et al.* (2003) entwickelten Methodik durchgeführt.

5.1 Allgemeines zur MLST von *S. agalactiae* nach Jones *et al. (2003)*

MLST ist eine eindeutige, sequenzbasierte Typisierungsmethodik, wobei Fragmente von 7 Housekeeping-Genen mit einer Länge von ca. 500 Basenpaaren sequenziert werden. Das MLST-Schema für *S. agalactiae* wurde 2003 von Jones *et al.* in einer Untersuchung an humanen GBS-Stämmen der Serotypen Ia, Ib, II, III, V, VI und VIII aus der ganzen Welt entwickelt. Es handelte sich dabei sowohl um kolonisierende Stämme als auch Stämme, die invasive Erkrankungen hervorrufen. Die Genloci für das MLST-Schema wurden ausgewählt, indem das Genom des NEM316, ein invasiver Stamm dessen Genom bereits vollständig sequenziert wurde, auf Genloci untersucht wurde, die an Stoffwechselprozessen teilnehmen, innerhalb eines Stammes stabil und gleichzeitig innerhalb der Speziespopulation ausreichend divers sind. Fragmente der 7 Housekeeping-Gene mit einer Länge zwischen 459 und 519 Baasenpaaren wurden mittels PCR

vervielfältigt und anschließend sequenziert. Die Kombination der einzelnen Allele der 7 Genloci ergab ein Allelprofil, bzw. den Sequenztyp des jeweiligen Bakterienstammes. Tabelle 7 zeigt die 7 Genloci, die für das MLST-Schema von GBS ausgewählt wurden:

Tabelle 7: Auflistung der 7 Genloci des Multilocus sequence typing -Schemas von S*treptococcus agalactiae.* Dargestellt sind die jeweiligen Forward- und Reverse-Primer für die Amplifizierung und die Sequenzierung, sowie die Länge des amplifizierten Abschnitts in Basenpaaren (bp): Alkoholdehydrogenase (*adhP*), Phenylalanin-tRNA-Synthetase (*pheS*), Aminoacidtransporter (*atr*), Glutaminsynthetase (*glnA*), Serindehydratase (*sdhA*), Glucosekinase (*glck*) und Transketolase (*tkt*).

Locus	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')	Amplicon size (bp)
adhP amplification	GTTGGTCATGGTGAAGCACT	ACTGTACCTCCAGCACGAAC	672
sequencing	GGTGTGTGCCATACTGATTT	ACAGCAGTCACAACCACTCC	498
pheS amplification	GATTAAGGAGTAGTGGCACG	TTGAGATCGCCCATTGAAAT	723
sequencing	ATATCAACTCAAGAAAAGCT	TGATGGAATTGATGGCTATG	501
atr amplification	CGATTCTCTCAGCTTTGTTA	AAGAAATCTCTTGTGCGGAT	627
sequencing	ATGGTTGAGCCAATTATTTC	CCTTGCTCAACAATAATGCC	501
glnA amplification	CCGGCTACAGATGAACAATT	CTGATAATTGCCATTCCACG	589
sequencing	AATAAAGCAATGTTTGATGG	GCATTGTTCCCTTCATTATC	498
sdhA amplification	AGAGCAAGCTAATAGCCAAC	ATATCAGCAGCAACAAGTGC	646
sequencing	AACATAGCAGAGCTCATGAT	GGGACTTCAACTAAACCTGC	519
glcK amplification	CTCGGAGGAACGACCATTAA	CTTGTAACAGTATCACCGTT	607
sequencing	GGTATCTTGACGCTTGAGGG	ATCGCTGCTTTAATGGCAGA	459
tkt amplification	CCAGGCTTTGATTTAGTTGA	AATAGCTTGTTGGCTTGAAA	859
sequencing	ACACTTCATGGTGATGGTTG	TGACCTAGGTCATGAGCTTT	480

5.2. Isolierung chromosomaler DNA aus *S. agalactiae*-Stämmen

Zur Isolierung der chromosomalen DNA wurde der QiAamp DNA Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Präparationen wurden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

Nachdem die Keime über Nacht bei 37 °C auf Blutagarplatten angezüchtet wurden, erfolgte zunächst die Überprüfung der Reinheit der Bakterienkulturen anhand ihrer homogenen Morphologie und ihres Hämolyseverhaltens. Nur bei homogenen, gräulich bis weißlichen Kolonien mit klarem Hämolysehof wurde mit der DNA-Isolierung begonnen.

Mit Hilfe einer Impföse wurden die Bakterienkolonien nun von der Agarplatte abgenommen und direkt in 126 µl Lysepuffer für grampositive Bakterien eingerieben.

Zum Verdau der bakteriellen Zellwand wurden nun 18 µl Lysozym (50 mg/ml) und 18 µl Mutanolysin (5000 U/ml) hinzugegeben. Die Suspension wurde anschließend für 30 Minuten bei 37 °C im Thermomixer inkubiert.
Nach kurzem Anzentrifugieren wurden 20 µl Proteinase K zum Proteinabbau und 200 µl AL Puffer nacheinander zugegeben.
Nach gründlichem Mischen mittels Vortexer wurde die Probe für mindestens 30 Minuten bei 56 °C im Thermomixer bei ca. 800 rpm geschüttelt. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation der Probe für 15 Minuten bei 95 °C im Thermomixer.
Im Anschluss wurden 200 µl 100 % Ethanol hinzugegeben und die Probe gemischt bis eine homogene Lösung entstand.
Die gesamte Suspension wurde nun auf eine im QiAamp DNA Mini Kit enthaltene Säule pipettiert und für 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Das Säulchen enthält eine Silika-Membran an der die festen Anteile der DNA gebunden werden. Es folgte nun ein Waschschritt mit 500 µl AW1 Puffer und Zentrifugation für 1 Minute bei 8000 rpm. Während eines weiteren abschließenden Waschvorgangs mit 500 µl AW2 Puffer wurde die Probe zunächst für 3 Minuten bei 13000 rpm in der Zentrifuge getrocknet und um alle verbliebenen Pufferreste zu entfernen nochmal für 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert.
Im Anschluss wurde das Säulchen in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß eingesetzt. Um die Menge an eluierter DNA zu erhöhen wurden die 100 µl AE Puffer in 2 Schritten zugesetzt. Zunächst wurden 50 µl AE Puffer auf die Säule pipettiert. Nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe für 1 Minute bei 8000 rpm abzentrifugiert. Dann wurden noch einmal 50 µl AE Puffer zugegeben, gefolgt von einer weiteren Inkubation und Zentrifugation.Die gewonnene chromosomale DNA konnte nun direkt in die PCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert werden.

Herstellung des Lysepuffers für grampositive Bakterien

TE-Puffer (100x=1M Tris-HCL pH 8,0; 0,1M EDTA)	1000 µl
Triton X 100	600 µl
Aqua bidest	48,4 ml

5.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation der chromosomalen DNA

Die Polymerasekettenreaktion ist ein Verfahren zur *In-vitro*-Amplifikation von DNA-Abschnitten. Hierbei werden hitzestabile DNA-Polymerasen thermophiler Prokaryonten eingesetzt. Entwickelt wurde das Verfahren Mitte der achtziger Jahre (Saiki *et al.* 1988, Mullis *et al.* 1986).

Zunächst wird ein PCR-Mastermix hergestellt. Dieser besteht aus der DNA, zwei synthetischen Oligonukleotidprimern, welche komplementär zu den 3‘-Enden der zu amplifizierenden Sequenz sind und die Startpunkte markieren, den Desoxynukleotiden zur Elongation und der DNA-Polymerase auch als Taq-Polymerase bezeichnet aus dem thermophilen Bakterium Thermus aquaticus. Diese vervollständigt den Doppelstrang durch Einbau der Desoxynukleotide.

Im Folgenden ist der verwendete PCR-Ansatz aufgeführt:

PCR-Ansatz:

Aqua bidest	71 µl
10x Puffer / $MgCl_2$	10 µl
dNTPs	2 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	5 µl
Primer 2 (10 pmol/µl)	5 µl
Taq-Polymerase	2 µl
DNA	5 µl

Mg^{2+}-Ionen sind für die Funktion der Polymerase essentiell Die Pufferlösung benötigt man, um den für die DNA-Polymerase geeigneten pH-Wert sicher zu stellen.

In einem Thermocycler kommt es durch die Abfolge von Denaturierung, Annealing, sprich Anlagerung des Primers, und Synthese des komplementären Stranges zur exponentiellen Vervielfältigung des DNA-Fragments. Zunächst erfolgt die Denaturierung der DNA bei 94 °C. Dabei trennen sich beide DNA-Stränge voneinander. Durch Abkühlen des Ansatzes auf 55 °C können die im Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer an die DNA hybridisieren. Durch anschließende Erhöhung der Temperatur auf 72 °C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, kommt es durch Einbau der Desoxynukleotide

zur Elongation des Primers, wobei die Zielstränge als Matrize dienen. Nach jedem Zyklus werden die neu gebildeten Doppelstränge wieder durch Erhitzen getrennt und eine neue Runde des Kopiervorgangs beginnt, somit hat sich nach jedem Zyklus die Menge an Ziel-DNA verdoppelt.
Nach 30 Zyklen wird der Ansatz für 10 Minuten bei 72 °C inkubiert um noch vorhandene einzelsträngige Enden aufzufüllen.

Die Reaktionsbedingungen im Thermocycler sind im Folgenden dargestellt:

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	94 °C	5 min
30 Zyklen		
Denaturierung	94 °C	1 min
Annealing	55 °C	45 s
Elongation	72 °C	1,5 min
Terminale Elongation	72 °C	10 min

Abkühlen der Reaktion auf 4 °C

Zur Reinheitskontrolle wurde bei jeder PCR-Reaktion eine Negativkontrolle aus Reagenzien und sterilem Aqua bidest anstelle der Template-DNA mitgeführt. Jeweils 10 µl des PCR-Produkts wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die PCR-Produkte wurden nur weiterverarbeitet, wenn in der Elektrophorese jeweils eine eindeutige Bande zu sehen war und die Negativkontrolle negativ ausfiel. Die PCR wurde für alle 7 Genloci gemäß dem oben aufgeführten MLST-Schema durchgeführt.

5.4. Auftrennung des PCR-Produkts mittels Gelelektrophorese

Die Elektrophorese ist ein Verfahren, bei dem sich geladene Moleküle in einem elektrischen Feld bewegen, wobei die Geschwindigkeit der Bewegung von der Ladung der Moleküle, ihrer Größe und Struktur sowie der Stärke des elektrischen Feldes bestimmt wird.
Die Gelelektrophorese findet meist zur Auftrennung von DNA Fragmenten Verwendung. Die Moleküle werden hierbei in einem Agarosegel getrennt. Wenn man eine elektrische

Spannung aufbaut, bewegen sich die negativ geladenen Nukleinsäuren durch das Gel in Richtung Anode, wobei die Bewegung von kleinen, kompakten Molekülen schneller erfolgt als von großen Molekülen.
Durch das Versetzen des Gels mit Ethidiumbromid, das an die DNA bindet, fluoreszieren die aufgetrennten Fragmente unter ultraviolettem Licht und können so sichtbar gemacht werden. Durch Vergleich mit einem mitgeführten Größenstandard (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder) lässt sich die Größe der Fragmente bestimmen.

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1,5%igen Agarosegel. Zur Herstellung des Gels wurden 1,5 g Agarose in 100 ml 1x TPE- bzw. 1x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht und nach Abkühlen auf ca. 60 °C mit 3 Tropfen Ethidiumbromidlösung versetzt. Durch das Abkühlen soll das Verdampfen des potentiell kanzerogenen Ethidiumbromids verhindert werden. Im Anschluss wurde das Gel unter Vermeidung der Bildung von Luftblasen in eine Horizontalgelkammer gegossen. Die Geltaschen wurden durch in das noch flüssige Gel gehängte Kämme vorgegeben. Nach Erstarren der Agarose wurde das Gel in eine mit 1x TPE- bzw. 1x TBE-Puffer aufgefüllte Agarosekammer überführt und mit 5 µl des Größenstandards sowie 10 µl des PCR-Produkts, das zuvor mit 3,5 µl Gelladepuffer versetzt wurde, befüllt. Anschließend erfolgte die Auftrennung bei ca. 100 V über eine ¾ h. Die aufgetrennten Fragmente konnten dann unter einer UV-Durchlichtbank betrachtet werden und das Gel mit dem entsprechenden Bandenmuster mittels Geldokumentationsanlage dokumentiert werden.

Gelladepuffer

Sucrose 40 %	0,4 g/ml
Bromphenolblau 5 % Lösung	20 µl/ml

TPE (10x, pH 7,5):

Tris Base (0,8 M)	108 g/l
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	40 ml/l

Der pH wurde mit ca. 25 ml Phosphorsäure (85 %) / l eingestellt

TBE (5x, pH 8,3)
Tris borate-EDTA buffer: 5x concentrate wurde von der Firma Sigma-Aldrich kommerziell bezogen und vor der Verwendung mit 5 Liter Aqua bidest auf ein 1x Konzentrat eingestellt.

Bei gut sichtbarem PCR-Produkt, einer eindeutigen Bande und negativer Negativkontrolle erfolgte die Aufreinigung der PCR mittels Nucleo Spin® Extract II von Macherey-Nagel. Bei schwachen oder vollständig fehlenden Banden musste die PCR bzw. gegebenenfalls die DNA-Isolierung wiederholt werden

5.5. Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde mit dem Nucleo Spin® Extract II von Macherey-Nagel durchgeführt und dient dazu überschüssige Oligonukleotide und dNTPs, die die Sequenzierreaktion stören würden, zu entfernen. Die Präparationen erfolgten gemäß den Empfehlungen des Herstellers.
Um eine bessere Bindungsfähigkeit der DNA herzustellen, wurde zunächst 1 Volumen des PCR-Produkts (90 µl) mit 2 Volumen des NT-Puffers (180 µl) versetzt. Im nächsten Schritt wurde die Probe in ein Nucleo-Spin-Säulchen überführt und für 1 Minute bei 11000 rpm zentrifugiert, wodurch die DNA an die Silika-Membran des Säulchens gebunden wird. Zur Entfernung der Verunreinigungen wurde die Probe in einem Waschvorgang mit 700 µl NT3-Puffer für 1 Minute bei 11000 rpm zentrifugiert. Zum Trocknen der Silikamembran und zum vollständigen Entfernen des NT3-Puffers wurde die Probe nochmal für 2 Minuten bei 11000 rpm zentrifugiert. Das Säulchen wurde dann in ein 1,5 ml Sammelgefäß überführt.
Zum Eluieren der DNA wurden 50 µl NE-Puffer zugesetzt, die Probe 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich 1 Minute bei 11000 rpm zentrifugiert.
Die Lagerung der aufgereinigten PCR-Produkte erfolgte bei 4-6 °C im Kühlschrank.
In die anschließende Sequenzierungs-PCR wurden jeweils 5 µl des aufgereingten PCR-Produkts eingesetzt.

5.6. Sequenzierung

5.6.1. Kettenabbruchverfahren nach Sanger

Die in der Arbeit angewandte Sequenziermethode basiert auf dem von Frederick Sanger entwickelten Prinzips des Kettenabbruchs (Sanger *et al.* 1977), das die genaue Bestimmung der Reihenfolge der Nucleotide im DNA-Molekül ermöglicht.

Bei der Sanger-Methode werden der DNA-Polymerase neben dNTP´s (Desoxynukleotide) auch ddNTP´s (Didesoxynukleotide) zur Polymerisation zur Verfügung gestellt. Dem Didesoxynukleotid fehlt am 3´-Kohlenstoffatom eine Hydroxylgruppe, weshalb beim Einbau in den neusynthetisierten Strang keine Verlängerung mehr erfolgen kann und es zum Kettenabbruch kommt. Die Nukleotide werden nach dem Zufallsprinzip eingebaut, somit entstehen Oligonukleotidfragmente unterschiedlicher Länge. Werden die Fragmente nun entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, lässt sich anhand der Fragmentlänge und der unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierung der ddNTPs die DNA-Sequenz ermitteln.

Durch die Entwicklung automatisierter DNA-Sequenzierungssysteme, bei denen jedes der 4 verschiedenen ddNTPs an einen anderen fluoreszierenden Farbstoff gebunden wird, ist ein Ansatz in einem einzigen Reaktionsgefäß möglich und die Produkte können durch automatisierte Elektrophorese getrennt und die Banden durch Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen werden. Die Kettenabbruchprodukte werden dabei mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit einem fluoreszenznachweisenden Laser abgetastet. Die Ergebnisse können vom Computer analysiert werden, wobei eine Sequenz erzeugt wird, bei der sich die vier Basen durch verschiedene Farben voneinander unterscheiden. Nicht eindeutige Basen oder Basen, die nicht bestimmt werden konnten werden dabei mit einem N markiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Sequenzierreaktion unter Verwendung des ABI Prism® Big Dye® Terminator v1.1 Ready Reaction mix von Applied Biosystems durchgeführt. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit dem Abi Prism 310 Genetic Analyzer.

5.6.2. Sequenzierungsreaktion

Im Folgenden sind der Ansatz für die Sequenzierungs-PCR und das verwendete PCR-Programm dargestellt. Die Sequenzierreaktion erfolgte in 0,5 ml Eppendorfhütchen.

Ansatz Sequenzierreaktion

Big Dye Terminator Ready Reaction mix	4 µl

Big Dye Terminator 5x Sequencing Buffer	4 µl
Aufgereinigtes PCR-Produkt	5 µl
Primer Forward (1 pmol/µl)	3 µl
H_2O_{bidest}	4 µl

PCR-Programm

Initiale Denaturierung	96 °C	1 min
25 Zyklen		
Denaturierung	96 °C	15 s
Annealing	50 °C	15 s
Elongation	60 °C	4 min

Die Sequenzierung wurde für alle 7 Primer des MLST-Schemas durchgeführt. Zunächst wurde der jeweilige Forward-Primer eingesetzt. Bei nicht auswertbaren Sequenzen mit vielen nicht identifizierten Basen, innerhalb der automatischen Sequenzierung mit dem Buchstaben N markiert, konnte bei sehr hohem Signal eventuell durch Verdünnung eine Besserung erzielt werden. Bei Verdacht auf Verunreinigung der Sequenzierung wurde der Sequenzieransatz vollständig wiederholt. Bei wiederholtem Erhalt nicht auswertbarer Sequenzen wurde die Sequenzierung mit Reverse-Primer durchgeführt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Sequenzierung der 7 Genloci für jeden Bakterienstamm standardmäßig sowohl mit einem Forward-Primer als auch mit einem Reverse-Primer durchgeführt, um eventuelle Punktmutationen innerhalb der Sequenzen eindeutig verifizieren bzw. ausschließen zu können.

5.6.3. Aufreinigung des Sequenzierprodukts

Die Aufreinigung des Sequenzierprodukts erfolgte durch die im Folgenden aufgeführten Methoden.

5.6.3.1. Aufreinigung durch alkoholische Fällung

In einem 1,5 µl Reaktionsgefäß wurden 10 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,2), 250 µl 100 % Ethanol und 80 µl Loading Puffer (Dextranblau-Verdünnung, 1:150 in Aqua bidest) vorgelegt. Anschließend wurden 20 µl der Sequenzierreaktion zugegeben. Nach kurzem Vortexen wurde der Ansatz 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 30 Minuten

Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der entstandene Überstand abgenommen und verworfen. Im darauffolgenden Waschschritt wurden 500 µl Ethanol (70 %) auf das Pellet pipettiert und die Probe für 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Auch jetzt wurde der Überstand abgenommen.
Das Pellet wurde ca. 5 Minuten bei 37 °C im Thermomixer getrocknet und anschließend durch kurzes Anzentrifugieren in 25 µl HiDi Formamid gelöst. Von der entstandenen Suspension wurden 5 µl in einem 0.5 ml Genetic-Analyzer-Reaktionsgefäß (Applied Biosystems) mit 25 µl HiDi Formamid verdünnt. Das Reaktionsgefäß wurde mit einer Septa verschlossen und bis zur Analyse im Abi Prism 310 Genetic Analyzer bei -20 °C gelagert.

5.6.3.2. Aufreinigung mittels Säulchen

Zunächst erfolgte die Vorbereitung der Centri-Sep Spin Columns der Firma Princeton Separations. Durch Antippen der Säule wurde das Gel nach unten gebracht. Anschließend wurden 800 µl Aqua bidest hinzugegeben und das Gel gemischt. Vor ihrer Verwendung wurde die Säule für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die fertigen Säulen konnten für ca. 3 Tage bei 2-8 °C im Kühlschrank gelagert werden. Vor dem Gebrauch mussten sie zunächst auf Raumtemperatur gebracht und die vorhandenen Luftblasen durch vorsichtiges Antippen entfernt werden.

Im anschließenden Arbeitsschritt wurde die Säule zunächst in ein 2 ml Sammelgefäß gestellt und bis zum Ende des Flüssigkeitsdurchflusses gewartet. Dann wurde die Säule in einem frischen Waschgefäß für 2 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen und in ein 1,5 ml Sammelgefäß gestellt. Nun wurden 20 µl des Sequenzierprodukts auf die Mitte der Säule pipettiert, wobei die Geloberfläche nicht berührt werden sollte. Im Anschluss wurde die Probe für 2 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert, wobei der höchste Punkt des Gels in der Zentrifuge jeweils nach außen zeigen musste. Der gewonnene Durchfluss wurde nun in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß mit 20 µl HIDI Formamid vermengt und das Reaktionsgefäß mit einer Septa verschlossen. Die Analyse der Probe erfolgte im Abi Prism™ 310 Genetic Analyzer.

5.7. Auswertung der Sequenzen

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte unter Zuhilfenahme einer elektronischen Datenbank im Internet, die unter folgender Adresse zu finden ist: www.pubmlst.org/sagalactiae.

Zunächst wurden die Sequenzen mittels Vergleichssequenzen aus der Datenbank auf die entsprechende Länge des jeweiligen Genlocus zugeschnitten. Im Anschluss wurde die MLST-Datenbank genutzt, um die Sequenzen mit allen bisher an diesem Genlocus identifizierten Sequenzen bzw. Allelen innerhalb der Bakterienspezies zu vergleichen und dann der entsprechenden Allelnummern zuzuordnen. Durch Kombination der Allelnummern der 7 verschiedenen Housekeeping-Gene ergab sich der entsprechende Sequenztyp für jeden einzelnen Bakterienstamm und die Zuordnung zum jeweiligen klonalen Komplex und damit Einordnung in die Gesamtpopulation von *S. agalactiae.*

Die komplementären und rückläufigen Sequenzen, die bei Sequenzierung mit einem Reverse-Primer entstehen, mussten vor der Auswertung zunächst mit Hilfe folgender Website umgeschrieben werden: www.cellbiol.com.

5.8. Einordnung in epidemiologische Zusammenhänge innerhalb der Bakterienpopulation

Die Darstellung der Abstammungsverhältnisse einzelner Bakterienstämme und ihre Einordnung in die Gesamtpopulation von *Streptococcus agalactiae* erfolgte mit Hilfe des Programms eBURSTV3, das die Zugehörigkeit eines Bakterienstamms zu einem bestimmten klonalen Komplex (CC) auf der Basis des jeweiligen Allelprofils identifiziert und die graphische Darstellung der genetischen Verwandtschaft der untersuchten Stämme ermöglicht (Feil *et al.* 2004). Das Programm eBurstV3 findet sich unter folgender Website: http://eburst.mlst.net.

In einem klonalen Komplex werden die Sequenztypen zusammengefasst, die genetisch eng miteinander verwandt sind und in mindestens 5 der 7 Allele mit mindestens einem Sequenztyp aus dem jeweiligen klonalen Komplex übereinstimmen. In der Mitte ist jeweils der ursprüngliche Sequenztyp und Namensgeber eines klonalen Komplexes dargestellt. Sequenztypen, die sich von diesem Urspungsklon ableiten und sich auf Grund von Punktmutationen oder Rekombinationsereignissen in einem Allel unterscheiden, sind in

Kreisen um den Ursprungssequenztyp angeordnet und werden als Single Locus Variants (SLVs) bezeichnet. Der Gründer-Sequenztyp ist derjenige Genotyp innerhalb eines klonalen Komplexes, der die meisten dieser Single Locus Variants besitzt. SLVs können sich nun weiter differenzieren. Wenn sie sich in 2 Allelen vom ursprünglichen Sequenztyp unterscheiden, spricht man von Double Locus Variants (DLVs). Wenn sie sich in 3 Allelen unterscheiden, werden sie als Triple Locus Variants (TLVs) bezeichnet und so weiter (Feil *et al.* 2004). Die einzelnen klonalen Komplexe können teilweise über ihre Abkömmlinge miteinander verbunden werden. So kann ihre genetische Verwandtschaft untereinander dargestelltwerden.

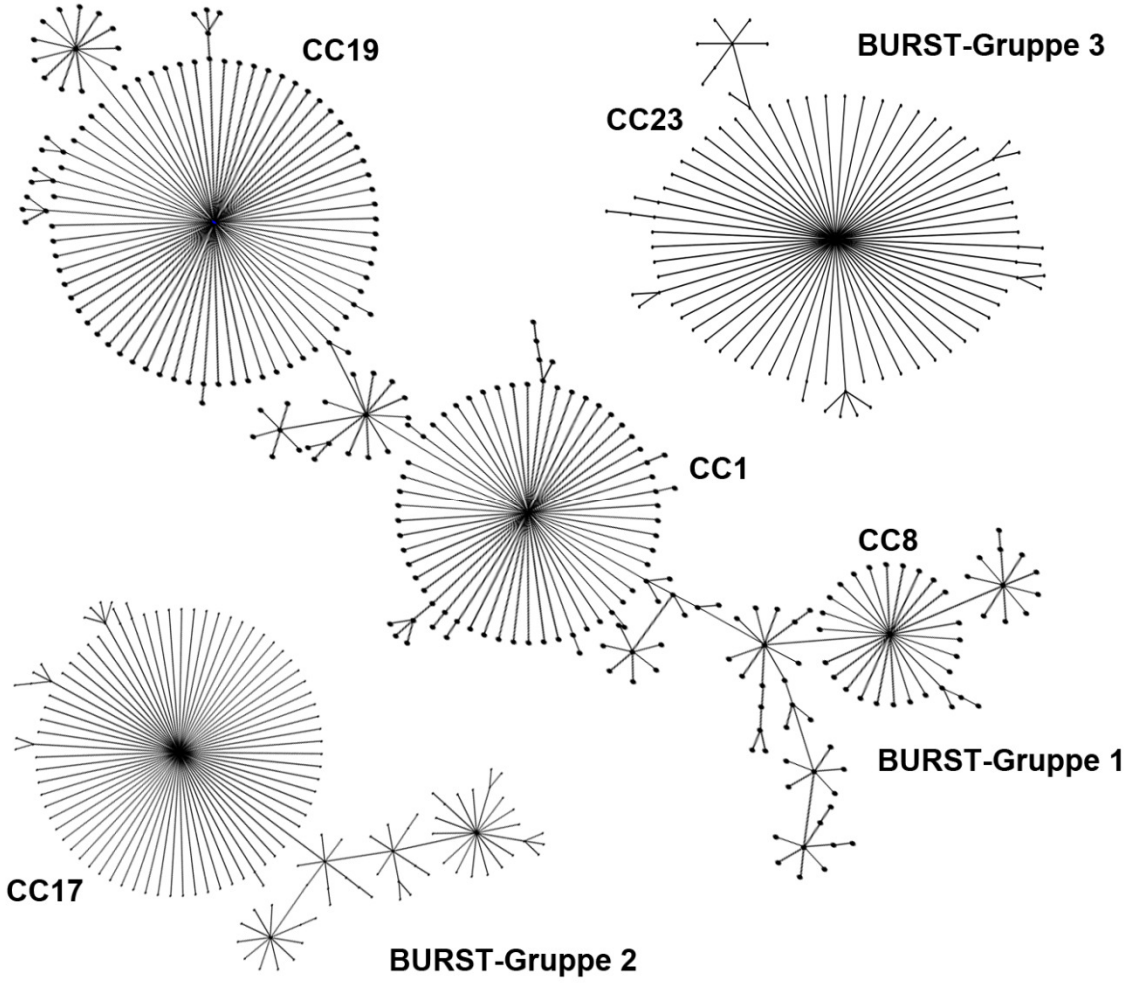


Abbildung 1: Gesamtpopulation von *Streptococcus agalactiae*. Dargestellt sind die 3 größten bekannten Burst-Gruppen von *Streptococcus agalactiae.* Zentral ist jeweils der ursprüngliche Sequenztyp und Namensgeber eines klonalen Komplexes (CC) dargestellt. Davon abgeleitete Sequenztypen, die sich in einem Allel unterscheiden (Single locus variants) sind kreisförmig um den zentralen Sequenztyp angeordnet.

III. Ergebnisse

1. MLST der kolonisierenden *Streptococcus agalactiae*-Stämme vom Serotyp III

Im Rahmen einer Kooperation zwischen dem Robert-Koch-Institut Berlin, der Universität Freiburg und der Universität Ulm sollten genetische Unterschiede zwischen neonatalen invasiven und neonatalen kolonisierenden *Streptococcus agalactiae* Stämmen untersucht werden. Im Zeitraum zwischen April 2001 und März 2003 wurden deutschlandweit 296 invasive Stämme von maximal 3 Monate alten Säuglingen, die an einer invasiven GBS Infektion erkrankt waren, gesammelt. Vor Beginn dieser Untersuchung waren nur wenige Daten über die Serotypenverteilung von invasiven GBS-Isolaten unter Säuglingen in Europa verfügbar. Somit handelt es sich um die erste Darstellung der Serotypenverteilung unter Säuglingen, die entweder an einer EOD oder LOD erkrankt waren (Fluegge *et al.* 2005). Sämtliche mikrobiologische Institute in ganz Deutschland, die an Pädiatrische Kliniken angeschlossen sind, wurden vom Robert-Koch-Institut dazu aufgefordert invasive Säuglingsinfektionen zu melden und die isolierten GBS-Stämme an das Forschungslabor in Freiburg zu senden. Man sprach dabei von einer invasiven Infektion, wenn GBS in normalerweise keimfreien Körperflüssigkeiten, wie Blut oder Liquor, isoliert werden konnte. Insgesamt wurden 95 % der Infektionen gemeldet und 82 % der Isolate zur Verfügung gestellt.

Im gleichen Zeitraum wurden deutschlandweit insgesamt 90 kolonisierende *S. agalactiae* Stämme gesammelt. Isoliert wurden die kolonisierenden Bakterienstämme von maximal 24 Stunden alten Neugeborenen, die mit dem Verdacht auf Sepsis ins Krankenhaus kamen, deren Blutkulturen sich jedoch als steril erwiesen. Zusätzlich wurden 81 Stämme mit in die Untersuchung einbezogen, die von Säuglingen mit dem Verdacht auf EOD isoliert wurden, in deren Blut- und Liquorkulturen jedoch keine Keime nachgewiesen werden konnten. GBS konnte bei den Säuglingen lediglich von Lokalisationen mit physiologischer Standortflora isoliert werden. Diese Stämme wurden im Rahmen der oben erwähnten deutschlandweiten Untersuchung nach Freiburg geschickt, wurden jedoch den kolonisierenden *Streptococcus agalactiae* Stämmen zugeordnet, da keine invasive Infektion aufgrund der negativen Blut- und Liquorkulturen nachgewiesen werden konnte. Somit standen insgesamt 171 nicht-invasive, kolonisierende *S. agalactiae* Isolate zur Verfügung.

Wie zahlreiche Untersuchungen belegen, ist der Serotyp III am häufigsten für invasive Infektionen verantwortlich. Um unabhängig vom Serotyp die molekulargenetischen Unterschiede zwischen invasiven und kolonisierenden GBS-Stämme zu ermitteln, sollten im Rahmen der Kooperation sowohl die 188 invasiven als auch die 50 nicht-invasiven GBS-Isolate vom Serotyp III mittels MLST untersucht werden und die Ergebnisse miteinander verglichen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden schließlich die 50 kolonisierenden Stämme vom Serotyp III mittels MLST untersucht.

Bei einem der aus Freiburg zur Verfügung gestellten kolonisierenden Stämme vom Serotyp III konnten aus technischen Gründen trotz mehrmaliger Wiederholungen der PCR-Amplifikation, sowie der DNA-Isolierung keine PCR-Produkte der Housekeeping-Gene nachgewiesen werden. Der Sequenztyp dieses Stammes konnte somit nicht bestimmt werden. Daher wurden lediglich 49 Stämme in die Auswertung einbezogen.

Unter den kolonisierenden Stämmen konnten insgesamt 14 verschiedene Sequenztypen mittels MLST ermittelt werden. Der Sequenztyp ST-389, ein SLV des ST-19, erwies sich mit 43 % (n=21) aller Stämme als am häufigsten vertreten. Am zweithäufigsten mit 29 % (n=14) ist der Sequenztyp ST-17, ein Sequenztyp der sehr häufig mit invasiven Infektionen assoziiert ist. Die Sequenztypen ST-23 und ST-200 waren jeweils mit einem Anteil von 4 % (n=2)vertreten. Bei den restlichen ermittelten Sequenztypen handelt es sich um ST-8, ST-24, ST-147, ST-148, ST-182, ST-186, ST-370, ST-466 und die beiden zum Untersuchungszeitpunkt neu ermittelten Sequenztypen ST-558 und ST-559 mit jeweils 2 % (n=1) aller untersuchten Stämme. Die Sequenztypenverteilung kann noch einmal graphisch dem unten aufgeführten Kreisdiagramm entnommen werden.

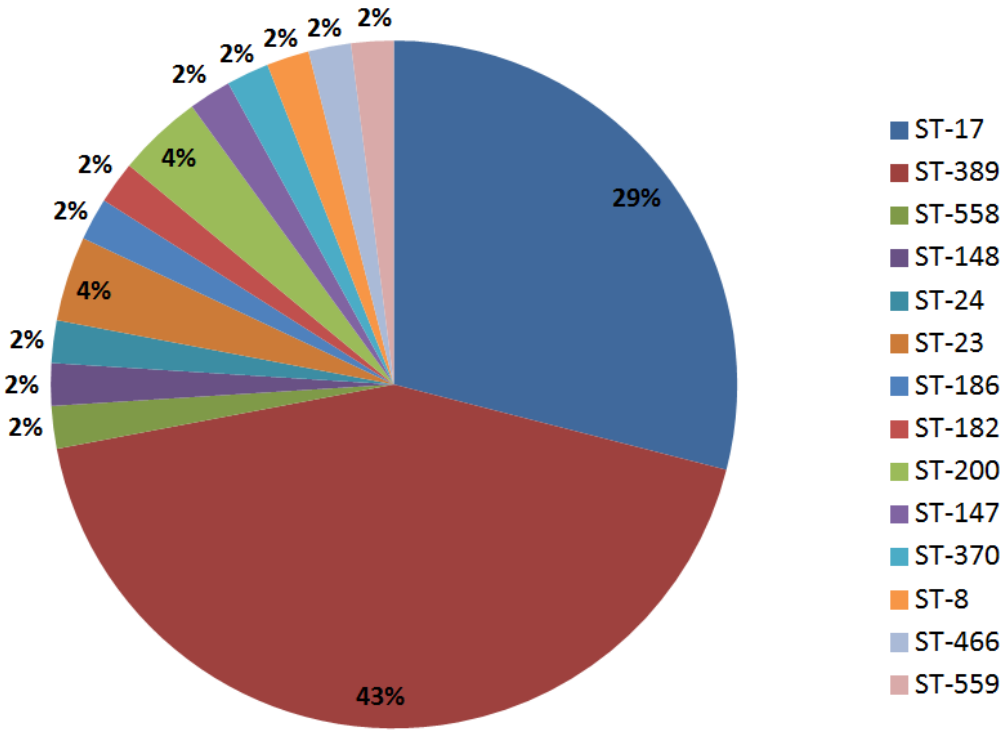


Abbildung 2: Prozentuale Häufigkeit der einzelnen Sequenztypen (ST) der 49 untersuchten kolonisierenden *Streptococcus agalactiae* Isolate vom Serotyp III

In Tabelle 8 sind alle untersuchten Isolate mit ihrer jeweiligen Nummer in der Stammsammlung unseres Labors, sowie der Freiburger Nummer aufgelistet. Es kann die jeweils ermittelte Allelnummer der einzelnen Genloci *adhP, pheS, atr, glnA, sdhA, glcK* und *tkt* entnommen werden. Die genaue Basenabfolge der einzelnen Allele der jeweiligen Genloci findet sich im Anhang.

Bei 2 Isolaten wurde eine neue, bisher unbekannte Allelkombination gefunden. Beide Isolate stimmen in jeweils 6 Allelen mit bereits bekannten Sequenztypen überein. Das Isolat 392, Freiburger Nummer Strep Net S19, zeigt beim Genlocus *tkt* das Allel 5 und nicht wie der Sequenztyp ST-7 das Allel 2. Es handelt sich somit um einen SLV des ST-7. Die Allelkombination wurde als ST-558 in die MLST-Datenbank aufgenommen. Desweiteren wurde beim Isolat 432, Freiburger Nummer ESPD 340, eine neue Allelkombination nachgewiesen. Es handelt sich hierbei um einen SLV des ST-389 bzw. einen DLV des ST-19. Im Vergleich zum ST-389 findet sich beim Genlocus *atr* das Allel 16 anstelle des Allels 3. Das Allelprofil wurde als ST-559 in die Datenbank aufgenommen.

Bei 3 Isolaten war keine hundertprozentige Allelzuweisung möglich. Bei dem Isolat mit der Nummer 405 und der Freiburger Nummer Strep Net S 76 war am Genlocus *tkt* die

Allelzuweisung zum Allel 5 nur zu 99,79 % möglich, wobei sich an der Nukleotidposition nt-158 nicht wie bei Allel 5 ein Cytosin sondern ein Adenin findet. Es handelt sich somit nur am ehesten um Allel 5, folglich war auch keine hundertprozentige Zuweisung zum Sequenztyp ST-389 möglich. Desweiteren zeigte sich beim Isolat 418 mit der Freiburger Nummer ESPD E87 eine Abweichung im Locus *tkt* zum bekannten Allel 5, wobei das Isolat an Position nt-84 anstelle des zu erwartenden Guanins ein Adenin zeigte, weshalb nur eine 99,8%ige Zuweisung zum Allel 5 und somit insgesamt zu Sequenztyp ST-389 möglich ist.

Zuletzt ist auch die Zuweisung des Isolats 426, Freiburger Nummer ESPD E 237 zum Sequenztyp ST-17 nicht hundertprozentig (99,8 %), da es sich am Genlocus *adhP* nur am ehesten um Allel 2 handelt. Im Gegensatz zum bekannten Allel 2 zeigte sich hierbei an Position nt-407 anstelle eines Cytosins ein Thymin.

Tabelle 8a: Auflistung der kolonisierenden Stämme mit der jeweiligen Isolatnummer in unserer Stammsammlung, sowie ihrer Freiburger Nummer. Aufgeführt sind die Allelnummern der 7 untersuchten Genloci und der daraus resultierende Sequenztyp (ST). Rot markiert sind die Isolate bei denen eine neue, zuvor unbekannte Allelkombination ermittelt wurde.

Isolat	**Freiburger Nr.**	**ST**	**adhP**	**pheS**	**atr**	**glnA**	**sdhA**	**glcK**	**tkt**
390	Strep Net S 5	**17**	2	1	1	2	1	1	1
391	Strep Net S 7	**389**	1	1	3	2	2	2	5
392	Strep Net S 19	**558**	10	1	2	1	3	2	5
393	Strep Net S 20	**17**	2	1	1	2	1	1	1
394	Strep Net S 23	**17**	2	1	1	2	1	1	1
395	Strep Net S 29	**17**	2	1	1	2	1	1	1
396	Strep Net S 35	**389**	1	1	3	2	2	2	5
397	Strep Net S 38	**389**	1	1	3	2	2	2	5
398	Strep Net S 42	**17**	2	1	1	2	1	1	1
399	Strep Net S 44	**148**	2	1	1	24	1	1	1
400	Strep Net S 45	**389**	1	1	3	2	2	2	5
401	Strep Net S 49	**389**	1	1	3	2	2	2	5
402	Strep Net S 51	**389**	1	1	3	2	2	2	5
403	Strep Net S 58	**17**	2	1	1	2	1	1	1
404	Strep Net S 66	**17**	2	1	1	2	1	1	1
405	Strep Net S 76	**389**	1	1	3	2	2	2	5
406	Strep Net S 78	**389**	1	1	3	2	2	2	5
407	Strep Net S 84	**17**	2	1	1	2	1	1	1

Tabelle 8b: Fortsetzung der Auflistung der kolonisierenden Stämme mit der jeweiligen Isolatnummer in unserer Stammsammlung, sowie ihrer Freiburger Nummer. Aufgeführt sind die Allelnummern der 7 untersuchten Genloci und der daraus resultierende Sequenztyp (ST). Rot markiert sind die Isolate bei denen eine neue, zuvor unbekannte Allelkombination ermittelt wurde.

Isolat	Freiburger Nr	ST	adhP	pheS	atr	glnA	sdhA	glcK	tkt
408	Strep Net S 86	**466**	2	1	16	2	1	1	1
409	Strep Net S 91	**389**	1	1	3	2	2	2	5
410	Strep Net S 93	**24**	5	4	4	3	2	3	3
411	Strep Net S 97	**17**	2	1	1	2	1	1	1
412	Strep Net S 98	**389**	1	1	3	2	2	2	5
413	Strep Net S 99	**17**	2	1	1	2	1	1	1
414	Strep Net S 110	**23**	5	4	6	3	2	1	3
415	ESPD E 10	**389**	1	1	3	2	2	2	5
416	ESPD E 50	**389**	1	1	3	2	2	2	5
417	ESPD E 52	**389**	1	1	3	2	2	2	5
418	ESPD E 87	**389**	1	1	3	2	2	2	5
419	ESPD E 166	**186**	1	1	2	1	1	2	5
420	ESPD E 175	**389**	1	1	3	2	2	2	5
421	ESPD E 183	**17**	2	1	1	2	1	1	1
422	ESPD E 210	**389**	1	1	3	2	2	2	5
423	ESPD E 217	**182**	1	1	3	2	18	2	2
424	ESPD E 224	**23**	5	4	6	3	2	1	3
425	ESPD E 229	**17**	2	1	1	2	1	1	1
426	ESPD E 237	**17**	2	1	1	2	1	1	1
427	ESPD E 246	**389**	1	1	3	2	2	2	5
428	ESPD E 247	**389**	1	1	3	2	2	2	5
429	ESPD E 258	**17**	2	1	1	2	1	1	1
430	ESPD E 316	**389**	1	1	3	2	2	2	5
431	ESPD E 337	**200**	9	1	4	1	3	3	5
432	ESPD E 340	**559**	1	1	16	2	2	2	5
433	ESPD E 355	**147**	2	1	1	22	1	1	1
435	ESPD E 359	**389**	1	1	3	2	2	2	5
436	ESPD E 385	**200**	9	1	4	1	3	3	5
437	ESPD E 386	**370**	1	1	2	1	1	1	2
438	ESPD E 413	**389**	1	1	3	2	2	2	5
439	ESPD E 384	**8**	4	1	4	1	3	3	2

Aufgrund bekannter Assoziationen zwischen den Sequenztypen ST-23 und ST-24 mit dem Serotyp Ia wurden die Isolate 410, 414 und 424, bei denen die genannten Sequenztypen ermittelt wurden zur Überprüfung des Serotyps mittels Serotypen-PCR untersucht. Dabei zeigten die Isolate 410 und 414 jeweils den Serotyp Ia, was folglich mit bisherigen Assoziationen übereinstimmt. Das Isolat 424 erwies sich jedoch weiterhin als Serotyp III.

2. Informationen zur Herkunft, Isolationszeitpunkt sowie Isolationslokalisation der einzelnen kolonisierenden *Streptococcus agalactiae* Isolate

Tabelle 9 kann entnommen werden in welcher Stadt, an welcher Abstrichlokalisation und zu welchem Datum die einzelnen Stämme isoliert wurden.

Tabelle 9a: Informationen zu Ursprungsstadt, Abstrichlokalisation und Isolationsdatum der jeweiligen Isolate mit ihrem jeweiligem Sequenztyp (ST)

Isolat	Freiburger Nr.	ST	Ort	Abstrich-Lokalisation	Datum
390	Strep Net S 5	**17**	München	Ohr	4/01
391	Strep Net S 7	**389**	München	Ohr	4/01
392	Strep Net S 19	**558**	Freiburg	Ohr	7/01
393	Strep Net S 20	**17**	Düsseldorf	Abstrich	7/01
394	Strep Net S 23	**17**	Freiburg	Nabel/Ohr	8/01
395	Strep Net S 29	**17**	München	Abstrich	8/01
396	Strep Net S 35	**389**	Freiburg	Rachen	10/01
397	Strep Net S 38	**389**	Düsseldorf	Ohr	10/01
398	Strep Net S 42	**17**	Kiel	Trachealsekr.	10/01
399	Strep Net S 44	**148**	Freiburg	Abstrich	11/01
400	Strep Net S 45	**389**	Würzburg	Abstrich	11/01
401	Strep Net S 49	**389**	München	Ohr	10/01
402	Strep Net S 51	**389**	München	Ohr	11/01
403	Strep Net S 58	**17**	München	Plazenta	12/01
404	Strep Net S 66	**17**	Kiel	Abstrich	1/02
405	Strep Net S 76	**389**	Düsseldorf	Ohr	3/02
406	Strep Net S 78	**389**	München	Nabel	3/02
407	Strep Net S 84	**17**	Freiburg	Ohr	6/02

Tabelle 9b: Fortsetzung der Informationen zu Ursprungsstadt, Abstrichlokalisation und Isolationsdatum der jeweiligen Isolate mit ihrem jeweiligem Sequenztyp (ST)

Isolat	Freiburger Nr.	ST	Ort	Abstrich-Lokalisation	Datum
408	Strep Net S 86	**466**	Freiburg	Nabel/Nase	6/02
409	Strep Net S 91	**389**	München	Ohr	4/02
410	Strep Net S 93	**24**	Freiburg	Ohr	6/02
411	Strep Net S 97	**17**	München	Ohr	6/02
412	Strep Net S 98	**389**	München	Rachen	6/02
413	Strep Net S 99	**17**	Freiburg	Ohr	7/02
414	Strep Net S 110	**23**	München	Ohr	9/02
415	ESPD E 10	**389**	Wülfrath	Abstrich	5/01
416	ESPD E 50	**389**	Offenburg	Abstrich	8/01
417	ESPD E 52	**389**	Frankfurt/O	Abstrich	7/01
418	ESPD E 87	**389**	Singen	Abstrich	10/01
419	ESPD E 166	**186**	Würzburg	Abstrich	2/02
420	ESPD E 175	**389**	Freiburg	Nabel	2/02
421	ESPD E 183	**17**	Bremen	Ohr	3/02
422	ESPD E 210	**389**	Koblenz	Abstrich	4/02
423	ESPD E 217	**182**	Koblenz	Abstrich	5/02
424	ESPD E 224	**23**	Koblenz	Abstrich	5/02
425	ESPD E 229	**17**	Leverkusen	Abstrich	6/02
426	ESPD E 237	**17**	Iserlohn	Abstrich	6/02
427	ESPD E 246	**389**	Koblenz	Abstrich	6/02
428	ESPD E 247	**389**	Koblenz	Abstrich	6/02
429	ESPD E 258	**17**	Würzburg	Abstrich	7/02
430	ESPD E 316	**389**	Cottbus	Magensaft	11/02
431	ESPD E 337	**200**	München	Abstrich	11/02
432	ESPD E 340	**559**	Koblenz	Abstrich	1/02
433	ESPD E 355	**147**	Stuttgart	Abstrich	?/03
435	ESPD E 359	**389**	Düsseldorf	Magensaft	1/03
436	ESPD E 385	**200**	Freiburg	Abstrich	3/03
437	ESPD E 386	**370**	Berlin	Abstrich	3/03
438	ESPD E 413	**389**	München	Ohr	3/03
439	ESPD E 384	**8**	Düsseldorf	Abstrich	3/03

2.1. Angaben zum Ursprungsort sowie ermittelte Sequenztypen der einzelnen Städte

Wie in Tabelle 9 ersichtlich stammen die untersuchten kolonisierenden GBS-Isolate aus 16 verschiedenen deutschen Städten: München, Freiburg, Koblenz, Düsseldorf, Würzburg, Kiel, Cottbus, Frankfurt an der Oder, Offenburg, Singen, Wülfrath, Bremen, Iserloh, Leverkusen, Berlin und Stuttgart. Ein Großteil der 49 Isolate stammt dabei aus München und Freiburg. Unter den 13 Münchner Isolaten konnte 7-mal der Sequenztyp ST-389 (53,8 %), 4-mal der Sequenztyp ST-17 (30,8 %), sowie jeweils einmal die Typen ST-23 (7,7 %) und ST-200 (7,7 %) ermittelt werden. Unter den 10 Freiburger Isolaten fand sich 3-mal der Sequenztyp ST-17 (30 %), 2-mal der ST-389 (20 %), sowie einmal die Sequenztypen ST-24 (10 %), ST-148 (10 %), ST-200 (10 %), ST-466 (10 %) und ST-558 (10 %). Die 6 Koblenzer Isolate weisen 3-mal den ST-389 (50 %) und jeweils einmal die Sequenztypen ST-23, ST-182 und ST-559 auf. Die 5 Isolate aus Düsseldorf zeigen 3-mal den Sequenztyp ST-389 (60 %), sowie einmal ST-8 (20 %) und ST-17 (20 %). Während unter den Würzburger Isolaten 3 verschiedene Sequenztypen ermittelt wurden, ST-17, ST-186 und ST-389, weisen die Kieler Isolate beide den ST-17 auf. Die Isolate aus Cottbus, Frankfurt an der Oder, Offenburg, Singen und Wülfrath weisen den Sequenztyp ST-389 auf. Für die Isolate aus Bremen, Iserloh und Leverkusen wurde der ST-17 ermittelt. Das Berliner Isolat zeigt den Sequenztyp ST-370 und das Stuttgarter den Sequenztyp ST-147.

Aufgrund der geringen Anzahl an Isolaten aus den einzelnen Städten lässt sich keine vernünftige Aussage darüber machen, ob bestimmte Sequenztypen in bestimmten Städten gehäuft vorkommen. Wollte man regionenabhängig die Verteilung der Sequenztypen bestimmen, müssten weitere Untersuchungen mit einer größeren und gleichmäßigeren Anzahl an Stämmen aus den jeweiligen Städten durchgeführt werden.

2.2. Angaben zur Abstrichlokalisation sowie Sequenztypverteilung an den einzelnen Lokalisationen

Für ca. die Hälfte (49 %) der Isolate ließen sich keine Informationen über die ursprüngliche Abstrichlokalisation ermitteln. Bei den übrigen hingegen war die Abstrichlokalisation bekannt. Insgesamt stammen 15 Isolate vom Ohr, jeweils 2 aus Magensaft, Nabel und Rachen und jeweils ein Isolat aus Nabel/Nase, Nabel/Ohr, Plazenta und Trachealsekret. Unter den Isolaten vom Ohr erwiesen sich der ST-389 und der ST-17 als dominierend. Die kolonisierenden *S. agalactiae* Stämme, die aus Magensaft, dem Rachen und ausschließlich vom Nabel isoliert wurden, zeigten alle den Sequenztyp ST-

389. Bei den Isolaten aus Trachealsekret, Plazentaabstrich und Nabel/Ohr wurde jeweils der Sequenztyp ST-17 nachgewiesen.
Auch in Bezug auf die Abstrichlokalisation lässt sich aufgrund der geringen Anzahl an Stämmen keine vernünftige Aussage bezüglich vorherrschender Sequenztypen an einer bestimmten Lokalisation treffen. Auch diesbezüglich müssten weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen folgen.

2.3. Isolationsdatum und Sequenztypverteilung bezogen auf die verschiedenen Isolationsjahre

Die 49 kolonisierenden GBS-Stämme wurden im Zeitraum von April 2001 bis März 2003 isoliert. 18 Isolate stammen aus dem Jahr 2001, 25 aus dem Jahr 2002 und 6 Isolate aus dem Jahr 2003. Insgesamt sind unter den untersuchten Isolaten aus allen Isolationsjahren die Sequenztypen ST-389 und ST-17 vorherrschend, ansonsten sind die ermittelten Sequenztypen sehr heterogen, wobei Vertreter aus allen 3 großen Burst-Gruppen ermittelt wurden.

3. Verteilung der untersuchten kolonisierenden Stämme in der Gesamtpopulation von *Streptococcus agalactiae*

Die Einordnung der untersuchten kolonisierenden Stämme in die Gesamtpopulation von *Streptococcus agalactiae* und die Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den einzelnen Sequenztypen erfolgte, wie oben erwähnt, mit dem Programm eburstV3. Unter den kolonisierenden Stämmen fanden sich Vertreter aus allen 3 großen Burst-Gruppen. Es konnten Stämme 7 verschiedener klonaler Komplexe, CC-1, CC-7, CC-8, CC-10, CC-17, CC-19 und CC-23, identifiziert werden. Insgesamt gehören 23 (47 %) der untersuchten Stämme dem klonalen Komplex CC-19 an, 17 (35 %) dem klonalen Komplex CC-17, 3 (6 %) Stämme dem klonalen Komplex CC-23, jeweils 2 (4 %) Stämme den klonalen Komplexen CC-1 und CC-10 und jeweils 1 (2 %) Stamm den klonalen Komplexen CC-7 und -8. Es zeigte sich somit eine große genetische Vielfalt unter den neonatalen kolonisierenden *Streptococcus agalactiae* Stämmen. 23 der untersuchten Stämme gehören dem klonalen Komplex CC-19 an, wobei 21mal der Sequenztyp ST-389, sowie jeweils einmal die Sequenztypen ST-182 und ST-559 ermittelt wurden. Bei letzterem handelt es sich um einen DLV des ST-19, mit einer im Rahmen der Arbeit neu ermittelten Allelkombination, die beiden erst genannten sind SLVs des ST-19. Desweiteren

konnten 17 Stämme dem CC-17 zugeordnet werden. Dabei wurden 14mal der ursprüngliche ST-17, sowie einmal die Sequenztypen ST-147, ST-148 und ST-466, wobei es sich jeweils um SLVs des ST-17 handelt, gefunden. Aus dem klonalen Komplex CC-23 wurden insgesamt 3 Stämme ermittelt, 2mal ST-23 und einmal ST-24, ein DLV des ST-23. Der Sequenztyp ST-200, der zweimal ermittelt wurde ist ein SLV des ST-10 und gehört dem klonalen Komplex CC-10 an. Die Sequenztypen ST-186 und ST-370 gehören dem CC-1 an und sind SLVs des ST-1. Der neue Sequenztyp ST-558 ist ein SLV des ST-7 und gehört somit dem CC-7 an. Ein Vertreter des CC-8, der ST-8 wurde einmal ermittelt. Die Häufigkeit der einzelnen klonalen Komplexe kann unten aufgeführtem Kreisdiagramm entnommen werden.

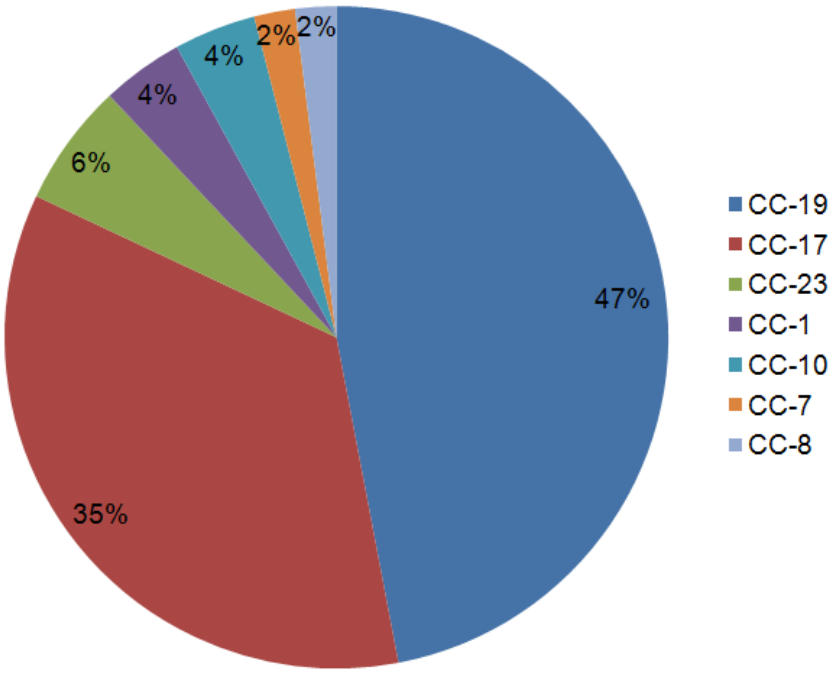


Abbildung 3: Prozentuale Häufigkeit der einzelnen klonalen Komplexe. Die Analyse beruht auf den Multilocus sequence typing -Sequenzdaten der 49 untersuchten kolonisierenden *Streptococcus agalactiae* Isolaten. Die Zuordung der Sequenztypen zum jeweiligen klonalen Komplex (CC) erfolgte mit dem Programm eburstV3. Dargestellt ist die prozentuale Häufigkeit der verschiedenen klonalen Komplexe.

Abbildung 4 kann die Verteilung der ermittelten Sequenztypen innerhalb der Gesamtpopulation von *Streptococcus agalactiae*, dargestellt durch die 3 verschiedenen Burst-Gruppen, entnommen werden.

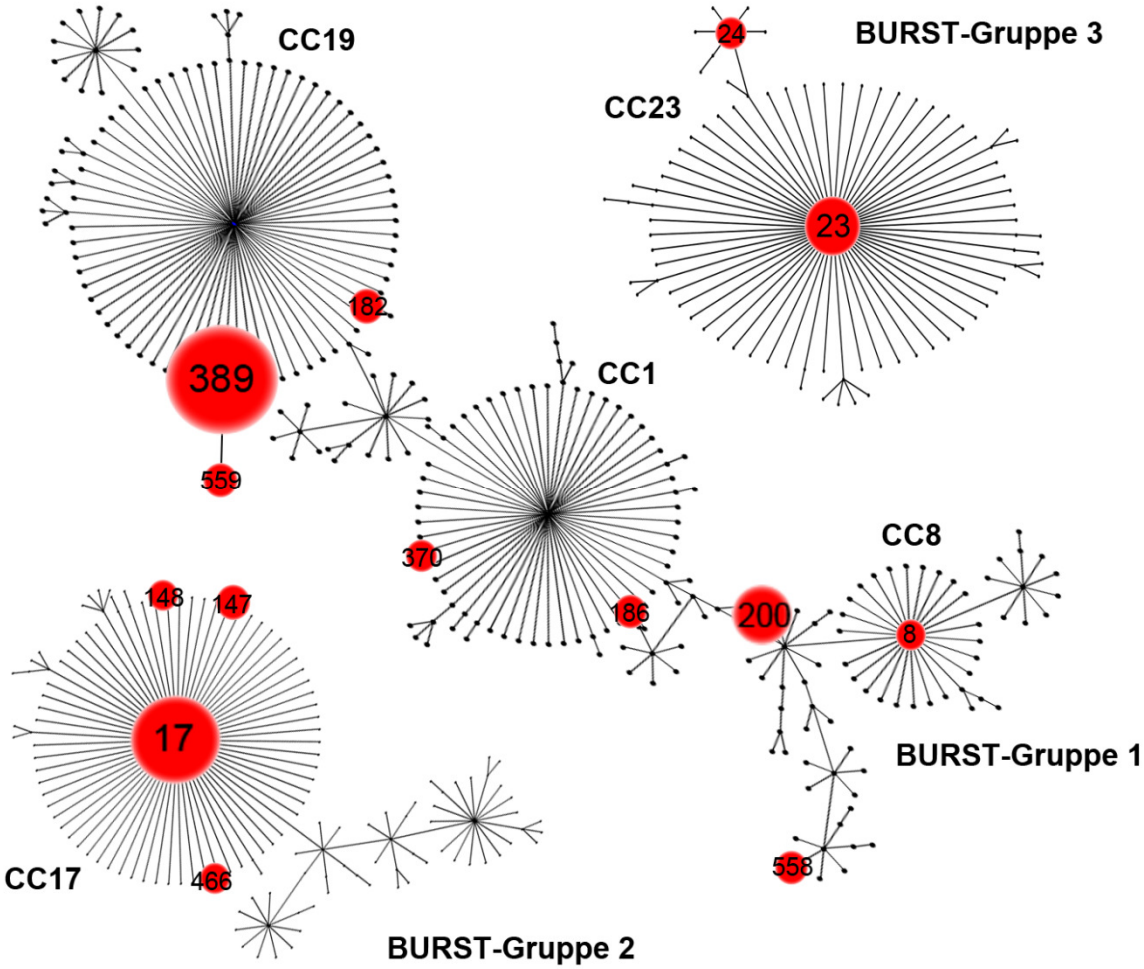


Abbildung 4: Darstellung der Gesamtpopulation von *Streptococcus agalactiae,* repräsentiert durch die 3 größten Burst-Gruppen mit ihren jeweiligen klonalen Komplexen (CC) und Verteilung der gefundenen Sequenztypen innerhalb des Burstdiagramms. Die ermittelten Sequenztypen sind dabei rot unterlegt, wobei anhand der Größe der roten Markierung deren Häufigkeit beschrieben wird.

4. Analyse der Häufigkeit von Mutationsereignissen mittels MLST

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Häufigkeit von Mutationsereignissen innerhalb der Housekeeping-Gene und somit die Stabilität, der bei der MLST untersuchten Stoffwechselgene und damit der Sequenztypen untersucht. Es wurden dabei mehrere O90R-Stämme, zwei O90S-Stämme und ein O90-Stamm aus verschiedenen Laboratorien in Dänemark, Deutschland, Italien, Russland und Tschechien mittels MLST auf eventuelle Punktmutationen und Rekombinationsereignisse untersucht. Bei den O90/O90R/S-Stämmen handelt es sich um ursprünglich genetisch identische GBS-Stämme, die von einem bestimmten Klon abstammen, vor Jahrzehnten getrennt und in verschiedenen

Laboratorien auf der ganzen Welt aufbewahrt wurden. Wenn innerhalb dieses relativ langen Zeitraums keine Mutationsereignisse stattgefunden haben und diese Stämme den völlig identischen Sequenztyp aufweisen, handelt es sich sich bei den Housekeeping-Genen um äußerst stabile Bereiche des Genoms.

Die verschiedenen O90/O90R/S-Stämme sollten untereinander verglichen werden. Insgesamt wurden 10 verschiedene Stämme untersucht: Ein O90R-Stamm aus Italien, jeweils ein O90S- und ein O90R-Stamm aus Tschechien, ein O90-Stamm aus Dänemark, ein O90S-Stamm aus Aachen sowie fünf O90R-Stämme aus Russland. Bei den italienischen Isolaten (795-797) handelt es sich um denselben Stamm von dem 3 Isolate an unser Labor geschickt wurden. Diese wurden getrennt untersucht. Beim Isolat 21 handelt es sich um einen O90S-Stamm, der ursprünglich aus dem Nationalen Referenzzentrum für Streptokokken in Aachen stammt und sich bereits seit einigen Jahren in unserer eigenen Stammsammlung befindet.

Tabelle 10 können genauere Informationen bezüglich des Ursprungslands, ursprünglicher Herkunft, sowie des Aufnahmezeitpunkts in die jeweilige Stammsammlung entnommen werden. Bei den untersuchten Stämmen handelt es sich ausschließlich um den Serotyp Ia. Das Isolat 541 entspricht dabei dem Isolat 540 nach mehreren Mauspassagen. Dadurch sollte seine Virulenz gesteigert werden.

Tabelle 10a: Informationen zu den untersuchten O90/O90R/O90S-Stämmen

Isolat	**Stamm**	**Ursprungsland**	**ursprüngliche Herkunft**	**Aufnahme in Stammsammlung**	**Serotyp**
21	O90S	Deutschland, Aachen	Lewis Wannamaker, University of Minnesota, Minneapolis St. Paul	1974	Ia
540	O90R	Russland	Dr. Christensen; Lund, Schweden	1982	Ia
541	O90R	Russland	Entspricht 540 nach mehreren Mauspassagen	Nicht bekannt	Ia
542	O90R	Russland	Dr. Elinkova; Prag	1980	Ia
543	O90R	Russland	Dr. Elinkova; Prag; ursprünglicher O90R von R. Lancefield	1980	Ia

Tabelle 10b: Fortsetzung der Informationen zu den untersuchten O90/O90R/O90S-Stämmen

Isolat	Stamm	Ursprungsland	ursprüngliche Herkunft	Aufnahme in Stammsammlung	Serotyp
544	O90R	Russland	Fosfomycin-resistenter O90R	1990	Ia
795	O90R	Italien	Rebecca Lancefield	vor einigen Jahrzehnten	Ia
796	O90R	Italien	Rebecca Lancefield	vor einigen Jahrzehnten	Ia
797	O90R	Italien	Rebecca Lancefield	vor einigen Jahrzehnten	Ia
798	O90R	Tschechien	PHLS	Januar 1960	Ia
799	O90S	Tschechien	PHLS	Juni 1970	Ia
800	O90	Dänemark	Statens Serum Institut, Copenhagen	Oktober 1998	Ia

Unter den mittels MLST untersuchten Stämmen zeigte sich eine außerordentliche Homogenität bezüglich der Sequenztypen. Nach Durchführung der MLST mittels Forward-Primer konnten zunächst einige Punktmutationen vor allem im Bereich der Allele *glnA, sdhA* und *tkt* im Vergleich zum Sequenztyp ST-25 vermutet werden, die sich jedoch bei der Durchführung mit Reverse-Primer durchgehend nicht verifizieren ließen. Somit wurde für alle Isolate nach 100%iger Allelzuweisung der Sequenztyp ST-25 ermittelt. Wie beim O90R-Stamm aus unserer Stammsammlung zeigte sich bei den untersuchten Isolaten keinerlei Abweichung bezüglich einzelner Allele oder Nukleotidpositionen im Vergleich zum ST-25. Obwohl die Isolate bereits vor Jahrzehnten getrennt und in verschiedenen Laboratorien aufbewahrt wurden, sind die einzelnen Housekeeping-Gene stabil und weisen auch Jahrzehnte später nicht einmal kleinste Veränderungen auf.

In Tabelle 11 sind alle untersuchten Isolate mit ihrer Nummer in unserer Stammsammlung sowie ihre jeweilige Allelkombination aufgeführt.

Tabelle 11: O90/O90R/O90S-Stämme und ermittelte Allele an den jeweiligen Genloci

Isolat	Serotyp	Sequenztyp	adhP	pheS	atr	glnA	sdhA	glck	tkt
21	Ia	**25**	5	4	6	3	8	1	3
540	Ia	**25**	5	4	6	3	8	1	3
541	Ia	**25**	5	4	6	3	8	1	3
542	Ia	**25**	5	4	6	3	8	1	3
543	Ia	**25**	5	4	6	3	8	1	3
544	Ia	**25**	5	4	6	3	8	1	3
795	Ia	**25**	5	4	6	3	8	1	3
796	Ia	**25**	5	4	6	3	8	1	3
797	Ia	**25**	5	4	6	3	8	1	3
798	Ia	**25**	5	4	6	3	8	1	3
799	Ia	**25**	5	4	6	3	8	1	3
800	Ia	**25**	5	4	6	3	8	1	3

IV. Diskussion

Streptococcus agalactiae ist der wichtigste Erreger invasiver Säuglingsinfektionen und Hauptverursacher schwerwiegender Infektionen wie Sepsis, Meningitis und Pneumonie bei Neugeborenen. Darüberhinaus handelt es sich um einen asymptomatischen Besiedler des menschlichen Gastrointestinal- und Urogenitaltrakts. 16 % der Erwachsenen in Deutschland sind von *S. agalactiae* besiedelt (Brimil *et al.* 2006). Bei Besiedlung der Mutter erfolgt die Übertragung auf das Kind entweder bereits vor der Geburt diaplazentar oder während der Geburt durch Aspiration von Amnionflüssigkeit. Die Besiedlung stellt den ersten Schritt auf dem Weg zur invasiven Infektion dar. Da jedoch bei weitem nicht jede Übertragung zu einer invasiven Infektion führt, sondern in der Mehrzahl der Fälle lediglich eine asymptomatische Besiedlung beim Neugeborenen resultiert, muss es entscheidende Unterschiede zwischen kolonisierenden und invasiven B-Streptokokken geben. Dies spiegelt sich auf molekulargenetischer Ebene in der ungleichen Verteilung der Sequenztypen bei den invasiven und kolonisierenden Isolaten wieder. Selbstverständlich spielt hierbei auch die immunologische Situation des Kindes eine bedeutende Rolle.

Anfangs wurden *S. agalactiae* Isolate vor allem anhand der unterschiedlichen Kapselpolysaccharide unterschieden und in verschiedene Serotypen eingeteilt. Die Trennschärfe ist dabei nur sehr gering, weshalb molekulare Methoden entwickelt wurden, um die verschiedenen Stämme genauer zu charakterisieren, virulente Stämme, die für invasive Infektionen verantwortlich sind, zu identifizieren und phylogenetische Zusammenhänge zu beschreiben (Haguenoer *et al.* 2011). Dadurch eröffnet sich möglicherweise die Option präventive Maßnahmen wie beispielsweise eine gezielte Impfstoffentwicklung selektiv für virulente Stämme zu ergreifen.

Die Untersuchung molekulargenetischer Unterschiede zwischen invasiven und kolonisierenden Stämmen unter epidemiologischen und phylogenetischen Gesichtspunkten spielt eine bedeutende Rolle für das Verständnis der Pathogenese der GBS Infektion. Hierbei wurden in den letzten 20 Jahren eine Reihe unterschiedlicher molekularer Verfahren wie Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE), Ribotyping, Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD) und Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) entwickelt. All diese Methoden ermöglichen es Bakterienstämme untereinander zu vergleichen und bestimmte genetische Gruppen zu definieren, die eine vermehrte Invasivität aufweisen (Haguenoer *et al.* 2011). Auch mit Hilfe des Verfahrens der MLST

lassen sich genetische Unterschiede zwischen verschiedenen Stämmen beschreiben und Aussagen über die Gesamtpopulation und Abstammungsverhältnisse von *S. agalactiae* Isolaten treffen. Die MLST hat sich in den letzten Jahren weltweit etabliert, da sie eine eindeutige molekulargenetische Charakterisierung von Bakterienstämmen ermöglicht, die Ergebnisse reproduzierbar sind und problemlos zwischen verschiedenen Laboratorien ausgetauscht werden können. In der vorliegenden Arbeit wurden neonatale kolonisierende *S. agalactiae* Stämme im Rahmen einer deutschlandweiten Studie mittels MLST untersucht und mit bereits vorliegenden Ergebnissen an invasiven und kolonisierenden Stämmen verglichen, um Unterschiede auf molekulargenetischer Ebene zu identifizieren.

1. Populationsstruktur humaner *S. agalactiae* Stämme

Wie bereits in zahlreichen Untersuchungen gezeigt wurde, sind nur bestimmte Abstammungslinien der Gesamtpopulation von *S. agalactiae* in der Lage den Menschen zu besiedeln bzw. eine invasive Infektion hervorzurufen (Bohnsack *et al.* 2008). In einer globalen Kollektion an humanen Isolaten wurden mittels MLST 7 verschiedene Stammeslinien ermittelt (Jones *et al.* 2003). In einer Untersuchung von Bohnsack *et al.,* die zwischen 1995 und 1999 in den USA durchgeführt wurde, wurden unter invasiven und kolonisierenden neonatalen Stämmen 5 dominante klonale Komplexe gefunden. Hierbei waren 95 % aller untersuchten Stämme in den klonalen Komplexen CC-1, CC-12, CC-17, CC-19 und CC-23 (Bohnsack *et al.* 2008). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für invasive und neonatale und maternale kolonisierende Stämme weltweit (Bisharat *et al. 2005;* Jones *et al.* 2003; Manning *et al.* 2009).

Im Vergleich dazu scheint die bovine GBS Population deutlich homogener zu sein. Immerhin zwei Drittel aller bovinen Stämme weisen den Sequenztyp ST-67 auf, wie in einer Studie von Bisharat *et al.* gezeigt wurde (Bisharat *et al.* 2004).

MLST Analysen von humanen *Streptococcus pyogenes* Isolaten hingegen zeigten eine viel größere genetische Vielfalt als Analysen von humanen GBS Isolaten (Enright *et al.* 2001). Dies wird häufig als Argument angeführt, dass es sich bei *S. pyogenes* um eine phylogenetisch ältere Bakterienspezies handeln muss. Trotzdem weisen die beiden *Streptococcus* Spezies grundsätzlich ein sehr ähnliches genetisches Grundgerüst auf (Glaser *et al.* 2002). In Abhängigkeit vom Serotyp sind verschiedene klonale Komplexe

vorherrschend. Während ein Großteil der Stämme der Serotypen Ia, Ib und V einer einzigen klonalen Gruppe zugeordnet werden kann und somit von einem Ursprungklon abstammt, weisen die Serotypen II und III jeweils 2 verschiedene dominante Abstammungslinien und somit klonale Komplexe auf. So scheint der Serotyp Ia mit dem CC-23, der Serotyp Ib mit dem CC-12 und der Serotyp V mit dem CC-1 assoziiert zu sein. Die Serotypen II und III hingegen sind sowohl mit dem klonalen Komplex CC-17 als auch mit dem klonalen Komplex CC-19 assoziiert (Bohnsack *et al.* 2008; Jones *et al.* 2006).

Der Serotyp III von *S. agalactiae* wird häufiger bei invasiven neonatalen Infektionen gefunden als andere Serotypen (Schuchat *et al.* 1998; Davies *et al.* 2004). Ein bestimmter Klon des Serotyps III, der Sequenztyp ST-17 spielt weltweit eine besondere Rolle für invasive Infektionen bei Säuglingen (Lin *et al.* 2006; Jones *et al.* 2006, Brzychczy-Włoch *et al.* 2012). Dieser Klon scheint von bovinem Ursprung zu sein, da er eine enge genetische Verwandtschaft zum häufigsten bovinen Sequenztyp ST-67 aufweist (Bisharat *et al.* 2004; Jones *et al.* 2003).

Aufgrund ihrer außerordentlichen klinischen Bedeutung wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Stämme vom Serotyp III untersucht. Daher war entsprechend den bereits in früheren Arbeiten mehrfach nachgewiesenen Assoziationen zu erwarten vor allem Vertreter der klonalen Komplexe CC-17 und CC-19 nachzuweisen. Bereits frühere Untersuchungen zeigten, dass innerhalb des Serotyps III mittels verschiedener molekulargenetischer Verfahren verschiedene stammesgeschichtliche Linien mit unterschiedlicher Virulenz nachgewiesen werden können (Takahashi *et al.* 1998; Bohnsack *et al.* 2001; Musser *et al.* 1989; Hauge *et al.* 1996). Die vorliegende Arbeit lieferte teilweise ähnliche MLST-Ergebnisse wie frühere Untersuchungen an neonatalen Stämmen in anderen Ländern. Hierbei wurden unter invasiven und kolonisierenden Stämmen vom Serotyp III vor allem die Sequenztypen ST- 17 und ST-19 gefunden (Davies *et al.* 2004; Lin *et al.* 2006; Bohnsack *et al.* 2008). In der Studie von Bohnsack *et al.* beispielsweise konnten 41% der Serotyp III Isolate dem CC-17 und 54% dem CC-19 zugeordnet werden. Während der Sequenztyp ST- 17 häufiger unter invasiven Isolaten gefunden wurde, ist der ST-19 eher mit einer asymptomatischen Besiedlung assoziiert (Jones *et al.* 2003; Lin *et al.* 2006).

Obwohl in der vorliegenden Arbeit nur Stämme vom Serotyp III untersucht wurden, wurden auch Sequenztypen ermittelt, die eher mit anderen Serotypen assoziiert sind. So konnten beispielsweise der Sequenztyp ST-23 zweimal und der ST-24 einmal ermittelt

werden. Stämme aus dem klonalen Komplex CC-23 sind in der Regel eher mit dem Serotyp Ia assoziiert. Aufgrund der bekannten Assoiziationen wurden diese Stämme nochmals mittels Serotyp-PCR getestet, wobei sich nur bei einem Stamm der Serotyp Ia bestätigen lies, während sich die anderen als Serotyp III erwiesen. Dies bestätigt, dass Assoziationen zwischen Serotyp und Sequenztyp zwar sehr häufig, aber keineswegs absolut gültig sind.

2. Vergleich zwischen kolonisierenden und invasiven Isolaten

Unter den 49 kolonisierenden neonatalen Stämmen vom Serotyp III wurden insgesamt 14 verschiedene Sequenztypen aus 7 verschiedenen klonalen Komplexen gefunden. Da Vertreter aus allen 3 Burst-Gruppen ermittelt wurden, scheint die untersuchte Auswahl an kolonisierenden Stämmen in gewisser Weise die Gesamtpopulation von *S. agalactiae* wiederzuspiegeln. Die invasiven Stämme, die im Rahmen der Kooperation zwischen dem Robert-Koch-Institut Berlin, der Universität Freiburg und der Universität Ulm untersucht wurden, zeigten zwar dieselben klonalen Komplexe, jedoch sind dabei andere Sequenztypen vorherrschend. Insgesamt wurden unter 188 invasiven Stämmen 23 verschiedene Sequenztypen aus 5 verschiedenen klonalen Komplexen (CC-4, CC-8, CC-17, CC-19, CC-23) gefunden. Ähnlich wie in einigen vorhergehenden Untersuchungen war hierbei unter den invasiven Stämmen der Sequenztyp ST-17 mit fast 70 % aller Stämme mit Abstand am häufigsten vertreten. Relativ häufig wurde auch der Sequenztyp ST-19 mit ca. 14 % ermittelt (Fluegge *et al.* 2011). Die untersuchte Population an invasiven Stämmen kann somit als relativ homogen bezeichnet werden, da fast 85 % aller untersuchten Stämme entweder den ST-17 oder den ST-19 aufweisen. Wie sich bereits in früheren Untersuchungen gezeigt hat, sind unter den invasiven Stämmen relativ wenige Sequenztypen vorherrschend. Der Vergleich zwischen invasiven und kolonisierenden Stämmen vom Serotyp III im Rahmen der Kooperation bestätigt die bereits mehrfach beschriebene Bedeutung des ST-17 für invasive Infektionen, da der ST-17 deutlich seltener unter den kolonisierenden Stämmen gefunden wurde (29 %). Da in beiden Gruppen ausschließlich Stämme vom Serotyp III untersucht wurden, ist das gehäufte Auftreten des ST-17 unter invasiven Stämmen nicht einer übermäßigen Repräsentation des Serotyp III, sondern tatsächlich der größeren Virulenz des ST-17 zuzuschreiben Der Sequenztyp ST-17, der bisher nur unter Isolaten vom Serotyp III ermittelt wurde, scheint einerseits einen

Weg zu finden der kindlichen Immunabwehr zu entgehen, andererseits bestimmte Virulenzfaktoren aufzuweisen, die die Invasivität bei Neugeborenen begünstigen. Interessanterweise ist die erhöhte Invasivität des ST-17 spezifisch für Neugeborene, da bisher keine besondere Bedeutung für Infektionen bei Erwachsenen nachgewiesen werden konnte (Jones *et al.* 2006; Luan *et al.* 2005).

Als dominierender Sequenztyp unter den untersuchten kolonisierenden neonatalen Stämmen erwies sich der ST-389, ein SLV des ST-19. Stämme des klonalen Komplexes CC-19 wurden bereits in früheren Untersuchungen gehäuft unter kolonisierenden Isolaten vom Serotyp III gefunden. Dabei war jedoch innerhalb des CC-19 vor allem der ST-19, der Ursprungssequenztyp, vorherrschend, während Derivate nur vereinzelt ermittelt wurden. Beispielsweise wurde in einer Studie von Lin *et al.* in den USA bei ca. 57 % aller kolonisierenden neonatalen Isolate der Sequenztyp ST-19 ermittelt (Lin *et al.* 2006). Ähnliche Ergebnisse liegen für kolonisierende maternale Stämme vom Serotyp III vor (Davies *et al.* 2004).

Die einzigen Daten zur Sequenztypenverteilung von *S. agalactiae* in Deutschland stammen aus einer Studie von Eickel *et al.,* wobei jedoch kolonisierende Stämme unterschiedlicher Serotypen von gesunden Erwachsenen untersucht wurden. Die Sequenztypen ST-1, ST-8, ST-10, ST-12, ST-17, ST-19 und ST-23 zeigten sich als dominierend. Von den untersuchten Stämmen gehörten 66 % der Burstgruppe eins an. Die Isolate vom Serotyp III zeigten wiederum eine klare Dominanz der Sequenztypen ST-17 und ST-19. Der ST-389 wurde je einmal bei einem Serotyp II und einem Serotyp III Isolat ermittelt (Eickel *et al.* 2009). Eine besondere Bedeutung kam dem ST-389 bisher jedoch nicht zu.

Es ist somit umso erstaunlicher, dass dieser Sequenztyp in der vorliegenden Untersuchung derart häufig ermittelt wurde. Immerhin 45 % der untersuchten kolonisierenden Stämme weisen diesen Sequenztyp auf. Der Gründungssequenztyp des CC-19 der Sequenztyp ST-19 fand sich hingegen nicht. Unter den invasiven Stämmen wurde der ST-389 nur einmal ermittelt. Da die Stämme aus verschiedenen Regionen in ganz Deutschland stammen, ist die Dominanz des ST-389 prinzipiell nicht durch ein lokales Ausbruchsgeschehen erklärbar. Unter den kolonisierenden neonatalen *S. agalactiae* Stämmen scheint dieser Stamm deutschlandweit eine führende Rolle zu spielen. Möglicherweise zeichnet sich hier ein deutschlandweiter Trend zu einem neuen dominierenden Sequenztyp innerhalb des klonalen Komplexes CC-19 ab (Fluegge *et al.* 2011).

Der ST-389 unterscheidet sich vom ST-19 lediglich im Genlocus *tkt*, wo sich anstelle der Allelnummer 2 die Allelnummer 5 findet. Die beiden Allele wiederum unterscheiden sich

lediglich in der Nukleotidposition 460, wo das Allel 5 ein Guanin anstelle eines Adenins aufweist. Möglicherweise handelt es sich beim ST-389 um einen Stamm, der gewisse Selektionsvorteile gegenüber anderen neonatalen Stämmen aufweist. Da keine früheren Untersuchungen vorliegen, die sich mit der Sequenztypverteilung unter kolonisierenden neonatalen Stämmen in Deutschland beschäftigen, lässt sich keine Aussage darüber treffen seit wann die Dominanz des ST-389 unter diesen Stämmen vorliegt.

Unter kolonisierenden Stämmen bei gesunden Erwachsenen kommt dem ST-389 wohl keine besondere Bedeutung zu, wie die Studie von Eickel *et al.* vermuten lässt. Seine Dominanz scheint daher auf neonatale Stämme beschränkt zu sein. Möglicherweise wird dieser Sequenztyp besonders gut auf Säuglinge übertragen und siedelt sich erfolgreicher bei Neugeborenen an als andere Stämme. Seine Fähigkeit invasive Infektionen zu verursachen scheint jedoch nur gering ausgeprägt zu sein, da er beinahe ausschließlich unter den kolonisierenden Isolaten gefunden wurde.

Der oft mit invasiven Infektionen assoziierte Sequenztyp ST-17 wurde in der vorliegenden Arbeit relativ häufig unter den kolonisierenden neonatalen Stämmen ermittelt (29 %) und stellt dabei den zweithäufigsten Sequenztyp dar. Es wurden alle Stämme als kolonisierend eingeordnet, die von Säuglingen isoliert wurden, bei denen aufgrund negativer Blut- und Liquorkulturen keine invasive Infektion nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise waren einige der Kulturen falsch negativ, während in Wirklichkeit eine invasive Infektion vorlag, die sich allerdings aufgrund der bekannt niedrigen Sensitivität von Blutkulturen nicht nachweisen ließ. Ohne diese fälschlicherweise als nicht-invasiv eingestuften Isolate wäre der Anteil an ST-17 unter den kolonisierenden Stämmen eventuell geringer.
Eine weitere Erklärung besteht darin, dass nur Stämme vom Serotyp III untersucht wurden, die wie in zahlreichen Studien beschrieben mit dem ST-17 assoziiert sind und somit ein relativ hoher Anteil an ST-17 grundsätzlich zu erwarten war.
Der ST-17 scheint zwar mit invasiven Infektionen assoziiert zu sein, wurde jedoch keineswegs ausschließlich unter invasiven Stämmen ermittelt. Bereits in früheren Untersuchungen erwies sich der ST-17 neben dem ST-19 sowohl bei kolonisierenden maternalen als auch bei kolonisierenden neonatalen Stämmen als häufigster Sequenztyp (Davies *et al.* 2004; Lin *et al.* 2006). In der Studie von Davies *et al.* machte der Sequenztyp ST-17 mit 29,1 % einen vergleichbaren Anteil der untersuchten kolonisierenden maternalen Stämme aus wie in der vorliegenden Arbeit. Lin *et al* ermittelten sogar einen Anteil von 38 % unter den neonatalen kolonisierenden Isolaten.

Der ST-17 mag gewisse Virulenzfaktoren aufweisen, die eine invasive Infektion begünstigen. Ob es jedoch zu einer invasiven Infektion kommt oder bei der asymptomatischen Besiedlung bleibt, ist letztendlich auch von der immunologischen Situation des jeweiligen Neugeborenen abhängig.
Es erscheint plausibel unter kolonisierenden Stämmen relativ häufig den ST-17 zu ermitteln, da sich invasive Stämme durch bestimmte Selektionsvorgänge vom Pool der kolonisierenden ableiten.
Die Ergebnisse zeigen, dass man anhand des Sequenztyps nicht eindeutig auf die Invasivität eines Stamms schließen kann, da zwar bestimmte Sequenztypen entweder unter den invasiven oder unter den kolonisierenden Stämmen vorherrschend sind, die Assoziationen jedoch nicht absolut gültig sind. Anhand des ermittelten Sequenztyps kann nur angegeben werden, ob es sich wahrscheinlicher um einen invasiven oder um einen kolonisierenden Stamm handelt.

Bei der relativ geringen und inhomogenen Anzahl an Isolaten kann keine Aussage bezüglich sich abzeichnender Trends vorherrschender Sequenztypen bezogen auf Ursprungsstadt beziehungsweise Region, Abstrichlokalisation und Isolationsdatum getroffen werden. Um diesbezüglich Aussagen machen zu können, müssten weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen erfolgen.
Da die Stämme aus insgesamt 16 verschiedenen Städten in ganz Deutschland stammen und die Anzahl an Isolaten pro Stadt sehr unterschiedlich ist, kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob sich der dominante Sequenztyp ST-389 von einer bestimmten Lokalisation aus ausgebreitet hat. Wahrscheinlich ist jedoch, dass örtlich unabhängig voneinander ablaufende Selektionvorgänge zu einer deutschlandweiten Dominanz dieses Sequenztyps geführt haben. Interessant wäre, ob es sich hierbei ledglich um eine temporäre Erscheinung handelt oder ob sich die Dominanz des ST-389 reproduzieren liese. Um die dynamische Entwicklung der B-Streptokokken Population in Deutschland zu beschreiben, müssten Untersuchungen über einen längeren Zeitraum erfolgen, da sich die Zeit von April 2001 bis März 2003 hierfür als zu kurz erwies und lediglich eine Momentaufnahme darstellt.

Insgesamt zeigt sich in der Population der kolonisierenden neonatalen *S. agalactiae* Stämme eine große genetische Vielfalt. Obwohl nur Stämme vom Serotyp III untersucht wurden, fanden sich wie aus Abbildung 4 ersichtlich Vertreter aus der Gesamtpopulation des Bakteriums. Unter 49 kolonisierenden Stämmen ließen sich Vertreter aus 7 klonalen

Komplexen und somit allen 3 Burst-Gruppen ermitteln, während sich unter den parallel in Freiburg untersuchten 188 invasiven Stämmen trotz deutlich größerer Fallzahl nur 5 verschiedene klonale Komplexe zeigten. Die invasiven Stämme stellen nur einen kleinen Anteil in der Gesamtpopulation dar und leiten sich durch bestimmte Selektionvorgänge vom großen Pool der kolonisierenden Stämme ab.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter den kolonisierenden neonatalen Stämmen vom Serotyp III eine größere genetische Vielfalt und andere Sequenztypen vorherrschen als unter den invasiven Stämmen. Wie in früheren Untersuchungen weltweit hat auch die vorliegende Arbeit gezeigt, dass Stämme des klonalen Komplexes CC-19 mit einer asymptomatischen Besiedlung assoziiert sind. In Deutschland scheint jedoch zumindest unter neonatalen Isolaten ein bisher unbedeutender Sequenztyp innerhalb des CC-19 eine besondere Rolle zu spielen. Bakterienpopulationen unterliegen permanenten dynamischen Veränderungen, weshalb weitere Untersuchungen nötig sein werden.

3. Kritik am Verfahren der MLST

Die Methode der MLST ist eine seit Jahren etablierte Standardmethode um die Epidemiologie von *S. agalactiae* auf molekulargenetischer Ebene zu beschreiben. Zunehmend kommt jedoch Kritik an diesem Verfahren auf.

In einer Studie von Soerensen *et al.* wird dargestellt, dass die 7 MLST-Loci nur ungleichmäßig über das bakterielle Genom verteilt sind und rund ein Drittel des Gesamtgenoms beim standardmäßigen MLST-Schema von *S. agalactiae* nicht berücksichtigt wird. In dieser Untersuchung wurden 8 zusätzliche Gene untersucht um sicherzustellen, dass alle Bereiche des Genoms abgedeckt werden. Unter 55 Stämmen ergaben sich dabei 33 verschiedene Allelprofile, während mittels konventioneller MLST lediglich 24 verschiedene Sequenztypen ermittelt werden konnten. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass klinisch wichtige GBS Populationen mit verschiedenen Serotypen und Wirtsspezifität nicht notwendigerweise durch das derzeitige MLST-Schema unterschieden werden können und eine enge Verwandtschaft zwischen Stämmen angenommen wird, die bei einer umfangreicheren Abdeckung des Genoms geringere Beziehungen zueinander aufweisen. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die klonalen Komplexe CC-17 und CC-67, die wie bisher angenommen von demselben bovinen Vorläufer abstammen, möglicherweise eine weniger nahe Verwandtschaft

aufweisen, da sich die beiden Komplexe in 7 von 8 zusätzlich untersuchten Genen unterscheiden (Soerensen *et al.* 2010).
Desweiteren lassen MLST-Analysen unter bovinen GBS Stämmen nur eine geringe genetische Vielfalt vermuten. Mit anderen molekularen Verfahren wie der PFGE (Bassegio *et al.* 1997) oder der RAPD (Martinez *et al.* 2000) konnten jedoch viele verschiedene genetische Linien ermittelt werden. Diese Verfahren zeigen möglicherweise eine größere Variabilität und sind in der Lage feinere Unterschiede aufzudecken, die mittels MLST, die auf der Analyse von Housekeeping-Genen beruht, übersehen werden. Es wäre interessant, ob sich diese größere genetische Variabilität die mittels PFGE und RAPD unter bovinen Stämmen ermittelt wurde in wiederholten Untersuchungen reproduzieren ließe.

Aufgrund dieser Erkenntnisse müssen MLST-Ergebnisse jedoch neu überdacht werden. Man muss sich die Frage stellen, ob das derzeitige Schema ausreichend ist um die Vielfältigkeit der Bakterienstämme auf molekulargenetischer Ebene zu beschreiben, Stammeslinien unterschiedlicher Virulenz ausreichend zu unterscheiden und Verwandtschaftsverhältnisse anzugeben.
Bereits das Verfahren der MLST ist ein sehr kosten- und zeitintensives Verfahren. Kosten- und Zeitaufwand wären bei dem in der Studie von Soerensen *et al.* beschriebenem Schema mit 15 Genloci noch größer, weshalb dieses Verfahren unter ökonomischen Gesichtspunkten deutlich ineffektiver erscheint.
Eine relativ neue Methode, die diesbezüglich von Vorteil wäre, ist das Verfahren der MLVA (Multiple-Locus Variant-Repeat Assay), welches als sehr einfach anwendbar bei moderatem Kosten- und Zeitaufwand beschrieben wird (Radtke *et al.* 2010). Repeats sind dabei kurze sich wiederholende DNA-Abschnitte. Durch Vergleich der Anzahl der Wiederholungen verschiedener Repeat-Regionen können Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Erregern der gleichen Spezies untersucht werden. Dieses Verfahren wurde bereits für zahlreiche Bakterienspezies entwickelt, um stammspezifische Profile zu ermitteln, die miteinander verglichen und zwischen verschiedenen Laboratorien ausgetauscht werden können. In der Studie von Radtke *et al.* wurde eine 5-Locus MLVA entwickelt, die eine größere Trennschärfe unter den untersuchten Stämmen zeigte als mittels MLST erreicht werden konnte.

Letztendlich könnte lediglich die Sequenzierung des Gesamtgenoms eine absolut eindeutige molekulargenetische Charakterisierung der verschiedenen Bakterienstämme

liefern, was jedoch mit einem ungleich größeren Kosten- und Zeitaufwand im Vergleich zu allen anderen molekulargenetischen Charakterisierungsmöglichkeiten verbunden wäre.

Trotz aller Kritik ist das Verfahren der MLST jedoch seit Jahren weltweit etabliert und es liegen Untersuchungsergebnisse aus zahlreichen Studien vor, die die Epidemiologie der *S. agalactiae* Population beschreiben. Die Methode der MLST hat bereits viele wertvolle Hinweise zur genetischen Inhomogenität von invasiven und kolonisierenden Stämmen geliefert. Ein neueres Verfahren müsste sich erst in diesem Ausmaß etablieren, um vergleichbare Aussagen über die Gesamtpopulation, Evolutionsvorgänge und Abstammungsverhältnisse treffen zu können.

4. Stabilität der Sequenztypen

Obwohl das Verfahren der MLST weit verbreitet und etabliert ist, gab es bisher nur wenige Untersuchungen bezüglich der Stabilität der Sequenztypen im Laufe der Zeit. Es ist nur wenig darüber bekannt, ob es im Bereich der bei der MLST sequenzierten Housekeeping-Gene zu spontanen oder durch bestimmte Faktoren provozierten genetischen Veränderungen kommt oder, ob es sich um Bereiche des Genoms handelt, die auch über Jahre hinweg stabil sind und unverändert bleiben. Bisher wurde die Stabilität der Sequenztypen nur bei sequenziellen Isolaten untersucht, sprich Isolaten die zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei denselben Probanden isoliert wurden.
Hierbei wurde vor allem die Dynamik der Kolonisation von Schwangeren vor und nach der Geburt untersucht. Es wurde dabei ermittelt, inwiefern sich Kolonisationsraten an sich verändern und ob sich Serotyp und molekulargenetische Eigenschaften der besiedelnden Stämme, zum Beispiel auch unter dem Einfluss einer Antibiotikaprophylaxe, verändern (Manning *et al.* 2008). Dabei sind Bakterienstämme jedoch dem ständigen Einfluss von Umweltfaktoren wie der menschlichen Immunabwehr oder dem Selektionsdruck unter einer Antibiotikatherapie unterworfen. Es kommt häufig vielmehr zum Verlust bzw. Erwerb eines neuen Klones, der den entsprechenden Gegebenheiten besser standhalten kann, anstatt zu molekulargenetischen Veränderungen des bereits vorhandenen Klones. Klinische Isolate eignen sich somit nicht die Stabilität des Sequenztyps eines bestimmten Klones, sowie subtile molekulargenetische Veränderungen im zeitlichen Verlauf zu untersuchen. Isolate, die in Stammsammlungen aufbewahrt werden scheinen dafür geeigneter zu sein.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden wie stabil die Sequenztypen von Stämmen sind, die ursprünglich von einem bestimmten Klon abstammen und theoretisch genetisch identisch sein müssten, jedoch bereits vor Jahrzehnten getrennt und in den Stammsammlungen verschiedenster Laboratorien aufbewahrt wurden. Bei den untersuchten Stämmen handelt es sich um humane Isolate, die ursprünglich als *Streptococcus Aronson* bezeichnet wurden (Griffith 1935, Howie 1938). Die Stämme wurden von Rebecca Lancefield den B-Streptokokken zugeordnet und von ihr als O90-Stämme bezeichnet (Lancefield 1932). Die Stämme vom Typ O90R sind nicht-virulente, unbekapselte Abkömmlinge des O90S mit veränderter Kolonieform. Sie können durch viele Passagen aus dem O90S gewonnen werden.

Die MLST-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die untersuchten Stämme auch nach jahrzehntelanger Trennung in den 7 MLST-Loci konstant geblieben sind, da sowohl der untersuchte O90 Stamm, als auch die O90R und O90S Stämme den Sequenztyp ST-25 aufweisen. Es ist erstaunlich, dass diese Stämme nicht einmal kleinste Veränderungen wie Punktmutationen in den Housekeeping-Genen zeigen. Obwohl die O90S-Stämme durch multiple Passagen aus den O90R-Stämmen gewonnen wurden und sich in ihrer Virulenz und ihren mikrobiologischen Eigenschaften unterscheiden, sind beide Typen im Bereich der MLST-Loci vollständig genetisch identisch.

Bei den 7 Genloci des MLST-Schemas von *S.agalactiae* scheint es sich daher um äußerst stabile Bereiche des bakteriellen Genoms zu handeln. Auch Mauspassagen und Fosfomycinpassagen, die einen enormen Stress und Selektionsdruck auf die Bakterienstämme ausüben, führten zu keinerlei Veränderung im Bereich der Housekeeping-Gene. Es wäre interessant, inwiefern sich die untersuchten Stämme im restlichen Genom unterscheiden. Möglicherweise kam es im Laufe der Jahrzehnte zu Mutationen in weniger stabilen Bereichen des bakteriellen Genoms, welche nicht durch das Verfahren der MLST erfasst werden können. Die Sequenzierung des Gesamtgenoms würde diese potentiellen Veränderungen aufdecken und die Möglichkeit eröffnen die Stabilität im Bereich der MLST-Genloci mit der Stabilität des restlichen Genoms zu vergleichen.

Darüberhinaus sind weitere Untersuchungen nötig um Veränderungen der MLST-Loci unter spezifischen realen Umwelteinflüssen wie zum Beispiel Temperaturschwankungen, UV-Bestrahlung, verschiedener Antibiotikakonzentrationen oder Nährstoffmangel zu ermitteln.

V. Zusammenfassung

Streptococcus agalactiae gilt als bedeutender Verursacher schwerwiegender Neugeboreneninfektionen wie Sepsis, Meningitis und Pneumonie und stellt gleichzeitig einen häufigen asymptomatischen Besiedler des menschlichen Gastrointestinal- und Urogenitaltrakts dar. Nicht jede Übertragung von der Mutter auf das Kind führt zwangsläufig zu einer invasiven Infektion. Bestimmte serologische und molekulargenetische Typen scheinen mit einer erhöhten Invasivität assoziiert zu sein. Bereits in zahlreichen Untersuchungen ließen sich mit dem Verfahren der MLST (Multi Locus Sequence Typing) unterschiedliche vorherrschende Sequenztypen unter invasiven und kolonisierenden Stämmen ermitteln. In der vorliegenden Arbeit sollten kolonisierende neonatale Stämme einer deutschlandweiten Untersuchung mittels MLST charakterisiert werden und die Ergebnisse mit einer Gruppe von invasiven Stämmen und den Ergebnissen früherer Untersuchungen weltweit verglichen werden. Es wurden nur Stämme vom Serotyp III untersucht, um unabhängig von der Dominanz eines bestimmten Serotyps die vorherrschenden Sequenztypen zu ermitteln. Die MLST-Analyse ergab eindeutige Unterschiede der kolonisierenden im Vergleich zu invasiven Stämmen. In Korrelation zu früheren Ergebnissen weltweit dominierten unter den kolonisierenden *Streptococcus agalactiae* Stämmen Stämme des klonalen Komplexes (CC) CC-19, wobei jedoch ein bisher unbedeutender Sequenztyp (ST), der ST-389, mit Abstand am häufgsten vertreten war. Möglicherweise zeichnet sich hier der Trend zu einem neuen deutschlandweit dominierenden Sequenztyp innerhalb des CC-19 ab. Insgesamt zeigten die untersuchten Stämme eine große genetische Vielfalt, da Vertreter aller 3 Burst-Gruppen und somit der Gesamtpopulation von *Streptococcus agalactiae* ermittelt wurden. Die kolonisierenden Stämme scheinen ein Reservoir darzustellen von dem sich invasive Stämme, die nur einen kleinen Anteil der Gesamtpopulation ausmachen, ableiten.

Die vorliegende Arbeit bestätigt, dass anhand des Sequenztyps nicht eindeutig auf die Invasivität eines Stammes geschlossen werden kann, da der mit invasiven Infektionen assoziierte Sequenztyp ST-17 auch unter den kolonisierenden Stämmen ermittelt wurde.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Stabilität der Sequenztypen ermittelt, in dem Stämme vom Typ O90, O90R und O90S untersucht wurden, die vom selben Ursprungsklon abstammen und genetisch identisch sein müssten, jedoch vor Jahrzehnten getrennt und in verschiedenen Stammsammlungen aufbewahrt wurden. Es wurde dabei ausschließlich der

Sequenztyp ST-25 ermittelt. Die Stämme wiesen nicht einmal kleinste Veränderungen in Form von Punktmutationen innerhalb der Housekeeping-Gene auf. Bei den 7 Genloci des MLST-Schemas von *Streptococcus agalactiae* handelt es sich somit um außerordentlich stabile Bereiche des bakteriellen Genoms.

VI. Literaturverzeichnis

1. **Aanensen, D.M., Spratt, B.G.** (2005) The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Research* **33:** 728-733.
2. **Apgar, B.S.,** und andere Autoren (2005). Prevention of Group B Streptococcal Disease in the Newborn. *Am Fam Physician.* **71**: 903-910.
3. **Badri, M.S., Zawaneh, S., Cruz, A.C., Mantilla, G., Baer, H., Spellacy, W.N., und andere Autoren** (1977) Rectal colonization with group B *Streptococcus*: relation to vaginal colonization of pregnant women. *J Infect Dis* **135**: 308-312.
4. **Bisharat, N., Crook, D.W., Leigh, J., Harding, R.M., Ward, P.N., Coffey, T.J., Maiden, M.C., Peto, T., Jones, N.** (2004) Hyperinvasive Neonatal Group B Streptococcus Has Arisen from a Bovine Ancestor. *J Clin Microbiol* **42**: 2161-2167.
5. **Bisharat, N., Jones, N., Marchaim, D., Block, C., Harding, R.M., Yagupsky, P., Peto, T., Crook, D.W.** (2005). Population structure of group B streptococcus from a low-incidence region for invasive neonatal disease. *Microbiol* **151**: 1875-1881.
6. **Bliss, S.J., Manning, S.D., Tallman, P., Baker, C.J., Pearlman, M.D., Marrs, C.F., Foxman, B.** (2002). Group B *Streptococcus* colonization in male and nonpregnant female university students: a cross-sectional prevalence study. *Clin Infect Dis* **34**: 184-190.
7. **Baseggio, N., Mansell, P.D., Browning, J.W., Browning, G.F.** (1997) Strain differentiation of isolates of streptococci from bovine mastitis by pulsed-field gel electrophoresis. *Mol Cell Probes.* **11**: 349-354.
8. **Blumberg, H.M., Stephens, D.S., Modansky, M. und andere Autoren** (1996) Invasive group B streptococcal disease: the emergence of serotype V. *J Infect Dis* **173**: 365–373.
9. **Bohnsack, J.F., Takahashi, S., Detrick, S.R., Pelinka, L.R., Hammitt, L.L., Aly, A.A., Whiting, A.A., Adderson, E.E.** (2001) Phylogenetic Classification of Serotype III Group B Streptococci on the Basis of *hyl*B Gene Analysis and DNA Sequences Specific to Restriction Digest Pattern Type III-3. *J Infect Dis* **183**: 1694-1697.
10. **Bohnsack, J.F., Whiting, A., Gottschalk, M., Dunn, D.M., Weiss, R., Azimi, P.H., Philips, J.B., Weisman, L.E., Rhoads, G.G., Lin, F.Y.** (2008) Population structure of invasive and colonizing strains of Streptococcus agalactiae from neonates of six U.S. Academic Centers from 1995 to 1999. *J Clin Microbiol* **46**: 1285-1291.

11. **Brimil, N., Barthell, E., Heindrichs, U., Kuhn, M., Lütticken, R. und Spellerberg, B.** (2006) Epidemiology of Streptococcus agalactiae colonization in Germany. *Int J Med Microbiol* **296**: 39-44.
12. **Brzychczy-Włoch, M., Gosiewski, T., Pawlik, D., Szumała-Kakol, A., Samead, A., Heczko, P.B.** (2012) Occurrence of the hypervirulent ST-17 clone of Streptococcus agalactiae in pregnant women and newborns. *Przegl Epidemiol* **66**: 395-401.
13. **Colebrook, L. und Purdie, A.W.** (1937). Treatment of 106 cases of puerperal fever by sulphanilamide. *Lancet* **2**: 1237-1242.
14. **Davies, H.D., Adair, C., McGeer, A., Ma, D., Robertson, S., Mucenski, M., Kowalsky, L., Tyrell, G., Baker, C.J.** (2001) Antibodies to Capsular Polysaccharides of Group B *Streptococcus* in Pregnant Canadian Women: Relationship to Colonization Status and Infection in the Neonate. *J Infect Dis* **184**: 285-291.
15. **Davies, H.D., Jones, N., Whittam, T.S., Elsayed, S., Bisharat, N., Baker, C.J.** (2004). Multilocus sequence typing of serotype III group B streptococcus and correlation with pathogenic potential. *J Infect Dis* **189**: 1097–1102.
16. **Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie, Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin.** Prophylaxe der Neugeborenensepsis (frühe Form) durch Streptokokken der Gruppe B. AWMF Leitlinien-Register, Nr 024/020 http://www.awmf.org
17. **Dillon, H.C., Gray, E., Pass, M.A., Gray, B.M.** (1982) Anorectal and vaginal carriage of group B streptococci during pregnancy. *J Infect Dis* **145**: 794-799.
18. **Easmon, C.S., Hastings, M.J., Deeley, J., Bloxham, B., Rivers, R.P., Marwood, R.**(1983**).** The effect of intrapartum chemoprophylaxis on the vertical transmission of group B streptococci. *Br J Obstet Gynaecol* **90**: 633-635.
19. **Edwards, M.S. und Baker, C.J.** (2005). Group B Streptococcal Infections in Elderly Adults. *Clin Infect Dis* **41**: 839-847.
20. **Eickel, V., Kahl, B., Reinisch, B., Dübbers, A., Küster, P., Brandt, C., Spellerberg, B.** (2009) Emergence of Respiratory *Streptococcus agalactiae* Isolates in Cystic Fibrosis Patients *PLOS ONE* **4**: e4650.
21. **Enright, M.C., Spratt, B.G., Kalia, A., Cross, J.H., Bessen, D.E.** (2001) Multilocus sequence typing of Streptococcus pyogenes and the relationships between emm type and clone. *Infect Immun* **69**: 2416-2427.

22. **Farley, M.M., Harvey, R.C., Stull, T., Smith, J.D., Schuchat, A., Wenger, J.D., Stephens, D.S.** (1993). A population-based assessment of invasive disease due to group B Streptococcus in nonpregnant adults. *N Engl. J. Med* **328**: 1807-1811.
23. **Farley, M.M.** (1995) Group B streptococcal infection in older patients. Spectrum of disease and management strategies. *Drugs and aging* **6**: 293-300.
24. **Feil, E.J., Li, B., Aanensen, D.M., Hanage, W.P., Spratt, B.G.** (2004) eBURST: Inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J. Bacteriol* **186:** 1518-1530.
25. **Feng-Ying, L., Philips, J.B., Azimi, P.H., Weisman, L.E., Clark, P., Rhoads, G.G., Regan, J., Concepcion, N.F., Frasch, C.E., Troendle, J., Brenner, R.A., Gray, B.M., Bhushan, R., Fitzgerald, G., Moyer, P., Clemens, J.D.** (2001) Level of maternal antibody required to protect neonates against early-onset disease caused by group B Streptococcus type Ia: a multicenter, seroepidemiology study. *J Infect Dis* **184**: 1022-1028.
26. **Fluegge, K., Supper, S., Siedler, A. und Berner, R.** (2005). Serotype Distribution of Invasive Group B Streptococcal Isolates in Infants: Results from a Nationwide Active Laboratory Surveillance Study over 2 Years in Germany. *Clin Infect Dis* **40**: 760-763.
27. **Fluegge, K., Siedler, A., Heinrich, B., Schulte-Moenting, J., Moennig, M.J., Bartels, D.B., Dammann, O., von Kries, R. und Berner, R.; for the German Pediatric Surveillance Unit Study Group** (2006). Incidence and Clinical Presentation of Invasive Neonatal Group B Streptococcal Infections in Germany. *Pediatrics* **117**: e1139-e1145.
28. **Fluegge, K., Wons, J., Spellerberg, B., Swoboda, S., Siedler, A., Hufnagel, M., Berner, R.** (2011) Genetic differences between invasive and noninvasive neonatal group B streptococcal isolates. *Pediatr Infect Dis J* **30**: 1027-1031.
29. **Foxman, B., Gillespie, B., Manning, S.D., Howard, L.J., Tallman, P., Zhang, L., Marrs, C.F.** (2006). Incidence and duration of group B *Streptococcus* by serotype among male and female college students living in a single dormitory. *Am J Epidemiol* **163**: 544-551.
30. **Fry, R.M.** (1938). Fatal infections by hemolytic streptococcus group B. *Lancet* **1:** 199-201.
31. **Glaser, P., Rusniok, C., Buchrieser, C., Chevalier, F., Frangeul, L., Msadek, T., Zouine, M., Couvé, E., Lalioui, L., Poyart, C., Trieu-Cuot, P., Kunst, F.** (2002)

Genome sequence of Streptococcus agalactiae, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Mol Microbiol* **45**: 1499-1513.

32. **Grifftih, F.** (1935) The Aronson Streptococcus. *J Hyg (Lond).* **35**: 23–37.
33. **Haguenoer, E., Baty, G., Pourcel, C., Lartigue, M.F., Domelier, A.S, Rosenau, A., Quentin, R., Mereghetti, L., Lanotte, P.** (2011) A multi locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) scheme for Streptococcus agalactiae genotyping. *BMC Microbiol* **11**: 171.
34. **Hahn, H., Miksits, S. und Gaterman, S.** (2004). Streptokokken. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 5. Aufl., Springer Medizin Verlag Heidelberg. S. 199.
35. **Harrison, L.H., Elliott, J.A., Dwyer, D.M., Libonati, J.P., Ferrieri, P., Billmann, L., Schuchat, A.** (1998). Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in Maryland: implications for vaccine formulation. *J Infect Dis* **177**: 998-1002.
36. **Hauge, M., Jespersgaard, C., Poulsen, K., Kilian, M.** (1996) Population structure of *Streptococcus agalactiae* reveals an association between specific evolutionary lineages and putative virulence factors but not disease. *Infect Immun* **64**: 919-925.
37. **Hickman, M.E., Rench, M.A., Ferrieri, P., Baker, C.J.** (1999). Changing epidemiology of group B streptococcal colonization. *Pediatrics* **104**: 203-209.
38. **Howie, J.W.** (1938) Aronson's streptococcus: an experimental study. *J Pathol* **46**: 367-377.
39. **Jackson, L.A., Hilsdon, R., Farley, M.M., Harrison, L.H., Reingold, A.L., Plikaytis, B.D., Wenger, J.D. und Schuchat, A.** (1995). Risk Factors for Group B Streptococcal Disease in Adults *Ann Intern Med* **123**: 415-420.
40. **Jolley, K.A., Chan, M.S., Maiden, M.C.** (2004) mlstdbNet – distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics* **5**: 86.
41. **Jones, N., Bohnsack, J.F., Takahashi, S., Oliver, K.A., Chan, M.S., Kunst, F., Glaser, P., Rusniok, C., Crook, D.W., Harding, R.M., Bisharat, N., Spratt, B.G.** (2003) Multilocus sequence typing system for group B streptococcus. *J Clin Microbiol* **41**: 2530-2536.
42. **Jones, N., Oliver, K.A., Barry, J., Harding, R.M., Bisharat, N., Spratt, B.G., Peto, T., Crook, D.W.; Oxford Group B Streptococcus Consortium.** (2006) Enhanced invasiveness of bovine-derived neonatal sequence type 17 group B streptococcus is independent of capsular serotype. *Clin Infect Dis* **42**: 915-924.
43. **Jones, F.S.** (1918) Studies in bovine mastitis: IV: the sources of infection in streptococcic mastitis. *J Exp Med* **28**: 735-748.

44. **Kieran, E., Matheson, M., Mann, A.G., Efstratiou, A., Butler, K., Gorman, W.** (1998) Group B streptococcus (GBS) colonisation among expectant Irish mothers. *Ir Med J* **91**: 21–22.
45. **Kong, F., Gowan, S., Martin, D., James, G., Gilbert, G.L.** (2002). Molecular profiles of group B streptococcal surface protein antigen genes: relationship to molecular serotypes. *J Clin Microbiol* **40**: 620-626.
46. **Kunze, M., Ziegler, A., Fluegge, K., Hentschel, R., Proempeler, H., Berner, R.** (2011). Colonization, serotypes and transmission rates of group B streptococci in pregnant women and their infants born at a single University Center in Germany. *J Perinat Med* **39**: 417-422.
47. **Lachenauer, C.S., Kasper, D.L., Shimada, J., Ichiman, Y., Ohtsuka, H., Kaku, M., Paoletti, L.C., Ferrieri, P., Madoff, L.C.** (1999) Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women. *J Infect Dis* **179**: 1030-1033.
48. **Lachenauer, C.S., Creti, R., Michel, J.L., Madoff, L.C.** (2000). Mosaicism in the alpha-like protein genes of group B streptococci. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9630-9635.
49. **Lancefield, R.C.** (1933). A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med* **57**: 571-595.
50. **Lancefield, R. C. und Hare, R.** (1935). The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic streptococci from parturient women. *J Exp Med* **61**:335.
51. **Lancefield, R.C., McCarty, M., Everly, W.N**. (1975). Multiple mouse-protective antibodies directed against group B streptococci. *J Exp Med* **142**: 165-179.
52. **Levine, E.M., Ghai, V., Barton, J.J., Strom, C.M.** (1999). Intrapartum antibiotic prophylaxis increases the incidence of gram-negative neonatal sepsis. *Infect Dis Obstet Gynecol* **7**: 210-213.
53. **Lin, F.Y., Whiting, A., Adderson, E., Takahashi, S., Dunn, D.M., Weiss, R., Azimi, P.H., Philips, J.B., Weisman, L.E., Regan, J., Clark, P., Rhoads, G.G., Frasch, C.E., Troendle, J., Moyer, P., Bohnsack, J.F.** (2006) Phylogenetic Lineages of Invasive and Colonizing Strains of Serotype III Group B Streptococci from Neonates: a Multicenter Prospective Study *J Clin Microbiol* **44**: 1257-1261.
54. **Lindahl, G., Stalhammar-Carlemalm, M., Areschoug, T.** (2005) Surface proteins of Streptococcus agalactiae and related proteins in other bacterial pathogens. *J Clin Microbiol Rev* **18**: 102-127.

55. **Luan, S.L., Granlund, M., Sellin, M., Lagergård,. T., Spratt, B.G., Norgren, M.** (2005) Multilocus Sequence Typing of Swedish Invasive Group B Streptococcus Isolates Indicates a Neonatally Associated Genetic Lineage and Capsule Switching. *J Clin Microbiol* **43**: 3727-3733.
56. **Madigan, M.T., Martinko, J.M.** (2009). Brock Mikrobiologie. Pearson Education.
57. **Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B.G.** (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3140-3145.
58. **Manning, S.D., Neighbors, K., Tallman, P.A., Gillespie, B., Marrs, C.F., Borchardt, S.M., Baker, C.J., Pearlman, M.D. und Foxman, B.** (2004). Prevalence of Group B Streptococcus Colonization and Potential for Transmission by Casual Contact in Healthy Young Men and Women. *Clin Infect Dis* **39**: 380-388.
59. **Manning, S.D., Lewis, M.A., Springman, A.C., Lehotzky, E., Whittam, T.S., Davies, D.** (2008) Genotypic Diversity and Serotype Distribution of Group B *Streptococcus* Isolated from Women Before and After Delivery. *Clin Infect Dis* **46**: 1829-1837.
60. **Manning, S.D., Springman, A.C., Lehotzky, E., Lewis, M.A., Whittam, T.S., Davies, H.D.** (2009) Multilocus sequence types associated with neonatal group B streptococcal sepsis and meningitis in Canada. *J Clin Microbiol* **47**: 1143-1148.
61. **Martinez, G., Harel, J., Higgins, R., Lacouture, S., Daignault, D., Gottschalk, M.** (2000) Characterization of *Streptococcus agalactiae* isolates of bovine and human origin by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* **38**: 71–78.
62. **Martins, E.R., Pessanha, M.A., Ramirez, M., Melo-Cristino, J. und the Portuguese Group for the Study of Streptococcal Infections** (2007). Analysis of Group B Streptococcal Isolates from Infants and Pregnant Women in Portugal Revealing Two Lineages with Enhanced Invasiveness. *J Clin Microbiol* **45**: 3224-3229.
63. **Mouly, S., Berenbaum, F., Kaplan, G**. (1999) Group B streptococcal vertebral osteomyelitis with bacteraemia in an adult with no debilitating condition. *Scand J Infect Dis* **31**: 316-317.
64. **Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H**. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**: 263-273.

65. **Musser, J.M., Mattingly, S.J., Quentin, R., Goudeau, A., Selander, R.K.** (1989) Identification of a high-virulence clone of type III Streptococcus agalactiae (group B Streptococcus) causing invasive neonatal disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**: 4731-4735.

66. **Nocard, E. et Mollereau, A.** (1887) Sur une mammite contagieuse des vaches laitières. *Ann Inst Pasteur* **1**: 109-126.

67. **Phares, C.R., Lynfield, R., Farley, M.M., Mohle-Boetani, J., Harrison, L.H., Petit, S., Craig, A.S., Schaffner, W., Zansky, S.M.** und andere Autoren (2008). Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999–2005 *JAMA* **299**: 2056–2065.

68. **Poyart, C., Réglier-Poupet, H., Tazi, A., Billoët, A., Dmytruk, N., Bidet, P., Bingen, E., Raymond, J., Trieu-Cuot, P.** (2008) Invasive group B streptococcal infections in infants, France. *Emerg Infect Dis* **14**: 1647-1649.

69. **Quentin, R., Huet, H., Wang, F.S., Geslin, P., Goudeau, A., Selander, R.K.** (1995) Characterization of *Streptococcus agalactiae* Strains by Multilocus Enzyme Genotype and Serotype: Identification of Multiple Virulent Clone Families That Cause Invasive Neonatal Disease. *J Clin Microbiol.* **33:** 2576-2581.

70. **Radtke, A., Lindstedt, B.A., Afset, J.E., Bergh, K.** (2010) Rapid Multiple-Locus Variant-Repeat Assay (MLVA) for Genotyping of *Streptococcus agalactiae. J Clin Microbiol.* **48**: 2502-2508.

71. **Reguera, A., González, M.Á., Sánchez, A., Aguayo, C.** (2011) Streptococcus agalactiae meningitis in an immunocompetent male. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **29**: 707-708.

72. **Rolland, K., Marois, C., Siquier, V., Cattier, B., Quentin, R. (1999)** Genetic Features of *Streptococcus agalactiae* Strains Causing Severe Neonatal Infections, as Revealed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and *hylB* Gene Analysis. *J Clin Microbiol* **37**: 1892-1898.

73. **Ross, P. W.** (1984)**:** Occasional review: group B *Streptococcus* – profile of an organism. *J Med Microbiol* **18:** 139-166.

74. **Rubens, C.E., Wessels, M.R., Heggen, L.M. und Kasper, D.L.** (1987). Transposon mutagenesis of type III group B Streptococcus: correlation of capsule expression with virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 7208-7212.

75. **Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491

76. **Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**: 5463-5467.

77. **Schrag, S.J., Zywicki, S., Farley, M.M., Reingold, A.L., Harrison, L.H., Lefkowitz, L.B., Hadler, J.L., Danila, R., Cieslak, P.R., Schuchat, A.** (2000). Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N Engl J Med* **342**: 15–20.

78. **Schrag, S., Gorwitz, R., Fultz-Butts, K. und Schuchat, A.** (2002). Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. *MMWR Recomm Rep* **51**: 1-22.

79. **Schuchat, A. und Wenger, J.D.** (1994). Epidemiology of Group B Streptococcal Disease: Risk Factors, Prevention Strategies, and Vaccine Development. *Epidemiol Rev* **16**: 374-402.

80. **Schuchat, A.** (1998). Epidemiology of Group B Streptococcal Disease in the United States: Shifting Paradigms. *Clin Microbiol Rev* **11**: 497-513.

81. **Slotved, H.C., Kong, F., Lambertsen, L., Sauer, S. und Gilbert, G.L.** (2007). Serotype IX, a Proposed New Streptococcus agalactiae Serotype. *J Clin Microbiol* **45**: 2929-2936.

82. **Soerensen, U.B., Poulsen, K., Ghezzo, C., Margarit, I., Kilian, M..** (2010) Emergence and Global Dissemination of Host-Specific *Streptococcus agalactiae* Clones. *mBio* **1:** e00178-10.

83. **Spellerberg, B.** (2000). Pathogenesis of neonatal Streptococcus agalactiae infections. *Microbes Infect* **2**: 1733-1742.

84. **Sunkara, B., Bheemreddy, S., Lorber, B., Lephart, P.R., Hayakawa, K., Sobel, J.D., Kaye, K.S., Marchaim, D.** (2012) Group B Streptococcus infections in non-pregnant adults: the role of immunosuppression. *Int J Infect Dis* **16**: 182-186.

85. **Takahashi, S., Adderson, E.E., Nagano, Y., Nagano, N., Briesacher, M.R., Bohnsack, J.F.** (1998) Identification of a highly encapsulated, genetically related group of invasive type III group B streptococci. *J Infect Dis.* **177**: 1116-1119.

86. **Takahashi, S., Detrick, S., Whiting, A.A., Blaschke-Bonkowksy, A.J., Aoyagi, Y., Adderson, E.E. und Bohnsack, J.F.** (2002). Correlation of Phylogenetic Lineages of Group B Streptococci, Identified by Analysis of Restriction-Digestion Patterns of

Genomic DNA, with infB Alleles and Mobile Genetic Elements. *J Infect Dis* **186**: 1034-1038.

87. **Waitkins, S.**A. (1980) Evaluation of rapid methods of identifying group B streptococci. *J Clin Pathol* **33**: 302-305.

VII. Anhang

1. Basenabfolge der ermittelten Allele der einzelnen Genloci

1.1. adhP

1.1.1. adhP-1

CCAGGACGCATTTTGGGTCACGAAGGCATTGGTATAGTAGAAGAAATTGGAGAAGGCGTA
ACGTCTTTGAGGGTTGGTGATCGTGTCTCTATTGCATGGTTCTTTGAAGGGTGCGGTCAT
TGCGAATACTGTACTACAGGACGTGAGACACTTTGTCGTAGTGTTAAAAATGCTGGATAC
AGTGTTGATGGTGGTATGAGTGAATACGCTATTGTTACCGCGGACTATGCGGTTAAGGTT
CCTGAGGGATTAGACCCAGCTCAAGCATCATCAATCACTTGTGCTGGAGTAACAACATAC
AAGGCTATCAAAGAAGCTGGAGCTGCTCCTGGTCAGTGGATTGCAGTGTATGGTGCAGGT
GGTCTTGGAAACTTAGCAGTCCAATATGCAAAAAAAGTATTCAATGCTCATGTTGTAGCT
GTTGATATTAACGCAGATAAACTTCAATTAGCTAAAGAGGTTGGAGCAGATTTGACAGTT
AATGGCAAAGAAATAAAA

1.1.2. adhP-2

CCAGGACGCATTTTGGGTCACGAAGGCATTGGTATAGTAGAAGAAATTGGAGAAGGCGTA
ACGTCTTTGAGGGTTGGTGATCGTGTCTCTATTGCATGGTTCTTTGAAGGGTGCGGTCAT
TGCGAATACTGTACTACAGGACGTGAGACGCTTTGTCGTAGTGTTAAAAATGCTGGATAC
AGTGTTGATGGTGGTATGAGTGAATACGCTATCGTTACCGCGGACTATGCGGTTAAGGTT
CCTGAGGGATTAGATCCAGCTCAAGCATCATCAATCACTTGTGCTGGAGTAACAACATAC
AAGGCTATCAAAGAAGCTGGAGCTGCTCCTGGTCAGTGGATTGCAGTGTATGGTGCAGGT
GGTCTTGGAAACTTAGCAGTCCAATATGCAAAAAAAGTATTCAATGCTCATGTTGTAGCT
GTTGATATTAACGCAGATAAACTTCAATTAGCTAAAGAGGTTGGAGCAGATTTGACAGTT
AATGGCAAAGAAATAAAA

1.1.3. adhP-4

CCAGGACGCATTTTGGGTCACGAAGGCATTGGTATAGTAGAAGAAATTGGAGAAGGCGTA
ACGTCTTTGAGGGTTGGTGATCGTGTCTCTATTGCATGGTTCTTTGAAGGATGCGGTCAT
TGCGAATACTGTACTACAGGACGTGAGACGCTTTGTCGTAGTGTTAAAAATGCTGGATAC
AGTGTTGATGGTGGTATGAGTGAATACGCTATTGTTACCGCGGACTATGTGGTTAAGGTT
CCTGAGGGATTAGATCCAGCTCAAGCATCATCAATCACTTGTGCTGGAGTAACAACATAC
AAGGCTATCAAAGAAGCTGGAGCTGCTCCTGGTCAGTGGATTGCAGTGTATGGTGCAGGT
GGTCTTGGAAACTTAGCAGTCCAATATGCAAAAAAAGTATTCAATGCTCATGTTGTAGCT
GTTGATATTAACGCAGATAAACTTCAATTAGCTAAAGAGGTTGGAGCAGATTTGACAGTT
AATGGCAAAGAAATAAAA

1.1.4. adhP-5

CCAGGACGCATTTTGGGTCACGAAGGCATTGGTATAGTAGAAGAAATTGGAGAAGGCGTA
ACGTCTTTGAGGGTTGGTGATCGTGTCTCTATTGCATGGTTCTTTGAAGGGTGCGGTCAT
TGCGAATACTGTACTACAGGACGTGAGACGCTTTGTCGTAGTGTTAAAAATGCTGGATAC
AGTGTTGATGGTGGTATGAGTGAATACGCTGTCGTTACCGCGGACTATGCGGTTAAGGTT
CCTGAGGGATTAGATCCAGCTCAAGCATCATCAATCACTTGTGCTGGAGTAACAACATAC
AAGGCTATCAAAGAAGCTGGAGCTGCTCCTGGTCAGTGGATTGCAGTGTATGGTGCAGGT
GGTCTTGGAAACTTAGCAGTCCAATATGCAAAAAAGGTATTCAATGCTCATGTTGTAGCT
GTTGATATTAACGCAGATAAACTTCAATTAGCTAAAGAGGTTGGAGCAGATTTGACAGTT
AATGGCAAAGAAATAAAA

1.1.5. adhP-9

CCAGGACGCATTTTGGGTCACGAAGGCATTGGTATAGTAGAAGAAATTGGAGAAGGCGTA
ACGTCTTTGAGGGTTGGTGATCGTGTCTCTATTGCATGGTTCTTTGAAGGATGCGGTCAT
TGCGAATACTGTACTACAGGACGTGAGACGCTTTGTCGTAGTGTTAAAAATGCTGGATAC
AGTGTTGATGGTGGTATGAGTGAATACGCTATTGTTACCGCGGACTATGCGGTTAAGGTT
CCTGAGGGATTAGATCCAGCTCAAGCATCATCAATCACTTGTGCTGGAGTAACAACATAC
AAGGCTATCAAAGAAGCTGGAGCTGCTCCTGGTCAGTGGATTGCAGTGTATGGTGCAGGT
GGTCTTGGAAACTTAGCAGTCCAATATGCAAAAAAAGTATTCAATGCTCATGTTGTAGCT
GTTGATATTAACGCAGATAAACTTCAATTAGCTAAAGAGGTTGGAGCAGATTTGACAGTT
AATGGCAAAGAAATAAAA

1.1.6. adhP-10

CCAGGACGCATTTTGGGTCACGAAGGCATTGGTATAGTAGAAGAAATTGGAGAAGGCGTA
ACGTCTTTGAGGGTTGGTGATCGTGTCTCTATTGCATGGTTCTTTGAAGGATGCGGTCAT
TGCGAATACTGTACTACAGGACGTGAGACGCTTTGTCGTAGTGTTAAAAATGCTGGATAC
AGTGTTGATGGTGGTATGAGTGAATACGCTATTGTTACCGCGGACTATGCGGTTAAGGTT
CCTGAGGGATTAGATCCAGCTCAAGCATCATCAATCACTTGTGCTGGAGTAACAACATAC
AAGGCTATCAAAGAAGCTGGAGCTGCTCCTGGTCAGTGGATTGCAGTGTATGGTGCAGGT
GGTCTTGGAAACTTAGCAGTCCAGTATGCAAAAAAAGTATTCAATGCTCATGTTGTAGCT
GTTGATATTAACGCAGATAAACTTCAATTAGCTAAAGAGGTTGGAGCAGATTTGACAGTT
AATGGCAAAGAAATAAAA

1.2. pheS

1.2.1. pheS-1

ATGACTGGGAACCACACTAAAGAATTACAAGACTTACGTGTACAAGTTTTAGGAAAAAAA
GGTTCTCTAACAGAATTACTAAAAGGTCTGAAAGATTTATCTAATGATTTACGACCAGTT
GTTGGAAAACAAGTCAATGAAGTACGTGATATTTTAACAAAAGCGTTTGAGGAACAAGCT
AAAGTAGTGGAAGCTGCGAAGATTCAAGCACAGTTAGAGTCTGAGAGTGTCGACGTTACC
TTGCCTGGTCGTCAAATGACATTAGGTCACCGTCATGTCTTAACACAAACTAGCGAAGAG

ATTGAAGATATCTTTTTAGGTATGGGATTCCAAGTGGTTGATGGTTTTGAAGTTGAGAAA
GACTACTATAATTTTGAACGAATGAATTTACCAAAAGATCATCCAGCCCGTGATATGCAA
GATACTTTTTATATTACAGAAGAAATCTTGCTACGTACTCATACTTCGCCTGTTCAAGCA
CGAACAATGGACCAACATGAT

1.2.2. pheS-4

ATGACTGGGAACCACACTAAAGAATTACAAGACTTACGTGTACAAGTTTTAGGAAAAAAA
GGTTCTCTAACAGAATTACTAAAAGGTCTGAAAGATTTATCTAATGATTTACGACCAGTT
GTTGGAAAACAAGTCAATGAAGTACGTGATATTTTAACAAAAGCGTTTGAGGAACAAGCT
AAAGTAGTGGAAGCTGCGAAGATTCAAGCACAGTTAGAGTCTGAGAGTGTTGACGTTACC
TTGCCTGGTCGTCAAATGACATTAGGTCACCGTCATGTCTTAACACAAACTAGTGAAGAG
ATTGAAGATATCTTTTTAGGTATGGGATTCCAAGTGGTTGGTGGTTTTGAAGTTGAGAAA
GACTACTATAATTTTGAACGAATGAATTTACCCAAAGATCATCCAGCCCGTGATATGCAA
GATACTTTTTATATTACAGAAGAAATCTTGCTACGTACTCATACTTCGCCTGTTCAAGCA
CGAACAATGGACCAACATGAT

1.3. atr

1.3.1. atr-1

GGCATTGACTTGGATATTCATCAAGGAGAAGTGGTGGTTATTATTGGCCCTTCTGGCTCT
GGTAAGTCAACATTTTTAAGAACAATGAATCTCTTGGAAGTACCAACAAAGGGAACAGTG
ACTTTTGAAGGGATTGATATAACAGACAAAAAGAATGATATTTTTAAAATGCGCGAAAAA
ATGGGCATGGTTTTTCAACAGTTCAATCTATTTCCCAATATGACTGTACTAGAAAATATT
ACTTTATCACCTATTAAGACAAAGGGACTTTCTAAGCTTGATGCTCAGACAAAAGCATAC
GAGCTACTTGAAAAAGTTGGACTCAAAGAGAAGGCTAATGCTTATCCAGCAAGCTTATCT
GGAGGACAACAACAACGGATTGCTATTGCAAGAGGTCTTGCAATGAATCCTGATGTCCTT
CTTTTTGATGAACCTACTTCAGCTCTTGATCCTGAAATGGTAGGTGAAGTCTTGACTGTT
ATGCAAGATTTAGCTAAATCT

1.3.2. atr-2

GGCATTGACTTGGATATTCATCAAGGAGAAGTAGTGGTTATTATTGGCCCTTCTGGCTCT
GGTAAGTCAACATTTTTAAGAACAATGAATCTCTTGGAAGTACCAACAAAGGGAACAGTG
ACTTTTGAAGGGATTGATATAACAGACAAAAAGAATGATATTTTTAAAATGCGCGAAAAA
ATGGGCATGGTTTTTCAACAGTTCAATCTATTTCCCAATATGACTGTACTAGAAAATATT
ACTTTATCACCTATTAAGACAAAGGGGCTTTCTAAGCTTGATGCTCAGACAAAAGCATAT
GAGCTACTTGAAAAAGTTGGACTCAAAGAGAAGGCTAATACTTATCCAGCTAGCTTATCT
GGAGGACAACAACAACGAATTGCTATTGCAAGAGGTCTTGCAATGAATCCTGATGTCCTT
CTTTTTGATGAACCTACTTCAGCTCTTGATCCTGAAATGGTAGGTGAAGTCTTGACTGTT
ATGCAAGATTTAGCTAAATCT

1.3.3. atr-3

GGCATTGACTTGGATATTCATCAAGGAGAAGTAGTGGTTATTATTGGCCCTTCTGGCTCT
GGTAAGTCAACATTTTTAAGAACAATGAATCTCTTGGAAGTACCAACAAAGGGAACAGTG
ACTTTTGAAGGGATTGATATAACAGACAAAAAGAATGATATTTTTAAAATGCGCGAAAAA
ATGGGCATGGTTTTTCAACAGTTCAATCTATTTCCCAATATGACTGTACTAGAAAATATT
ACTTTATCACCTATTAAGACAAAGGGGCTTTCTAATCTTGATGCTCAGACAAAAGCATAT
GAGCTACTTGAAAAAGTTGGACTCAAAGAGAAGGCTAATACTTATCCAGCTAGCTTATCT
GGAGGACAACAACAACGAATTGCTATTGCAAGAGGTCTTGCAATGAATCCTGATGTCCTT
CTTTTTGATGAACCTACTTCAGCTCTTGATCCTGAAATGGTAGGTGAAGTCTTGACTGTT
ATGCAAGATTTAGCTAAATCT

1.3.4. atr-4

GGCATTGACTTGGATATTCATCAAGGAGAAGTGGTGGTTATTATTGGCCCTTCTGGCTCT
GGTAAGTCAACATTTTTAAGAACAATGAATCTCTTGGAAGTACCAACAAAGGGAACAGTG
ACTTTTGAAGGGATTGATATAACAGACAAAAAGAATGATATTTTTAAAATGCGCGAAAAA
ATGGGCATGGTTTTTCAACAGTTCAATCTATTTCCCAATATGACTGTACTAGAAAATATT
ACTTTATCACCTATTAAGACAAAGGGACTTTCTAAGCTTGATGCTCAGACAAAAGCATAC
GAGCTACTTGAAAAAGTTGGACTCAAAGAGAAGGCTAATGCTTATCCAGCTAGCTTATCT
GGAGGACAACAACAACGAATTGCTATTGCAAGAGGTCTTGCAATGAATCCTGATGTCCTT
CTTTTTGATGAACCTACTTCAGCTCTTGATCCTGAAATGGTAGGTGAAGTCTTGACTGTT
ATGCAAGATTTAGCTAAATCT

1.3.5. atr-6

GGCATTGACTTGGATATTCATCAAGGAGAAGTGGTGGTTATTATTGGCCCTTCTGGCTCT
GGTAAGTCAACATTTTTAAGAACAATGAATCTCTTGGAAGTACCAACAAAGGGAACAGTG
ACTTTTGAAGGGATTGATATAACAGACAAAAAGAATGATATTTTTAAAATGCGCGAAAAA
ATGGGCATGGTTTTTCAACAGTTCAATCTATTTCCCAATATGACTGTACTAGAAAATATT
ACTTTATCACCTATTAAGACAAAGGGACTTTCTAAGCTTGATGCTCAGACAAAAGCATAC
GAGCTACTTGAAAAAGTTGGACTCAAAGAGAAGGCTAATGCTTATCCAGCTAGCTTATCT
GGAGGGCAACAACAACGAATTGCTATTGCAAGAGGTCTTGCAATGAATCCTGATGTCCTT
CTTTTTGATGAACCTACTTCAGCTCTTGATCCTGAAATGGTAGGTGAAGTCTTGACTGTT
ATGCAAGATTTAGCTAAATCT

1.3.6. atr-16

GGCATTGACTTGGATATTCATCAAGGAGAAGTGGTGGTTATTATTGGCCCTTCTGGCTCT
GGTAAGTCAACATTTTTAAGAACAATGAATCTCTTGGAAGTACCAACAAAGGGAACAGTG
ACTTTTGAAGGGATTGATATAACAGACAAAAAGAATGATATTTTTAAAATGCGCGAAAAA
ATGGGCATGGTTTTTCAACAGTTCAATCTATTTCCCAATATGACTGTACTAGAAAATATT
ACTTTATCACCTATTAAGACAAAGGGACTTTCTAAGCTTGATGCTCAGACAAAAGCATAC
GAGCTACTTGAAAAAGTTGGACTCAAAGAGAAGGCTAATGCTTATCCAGCTAGCTTATCT

GGAGGACAACAACAACGGATTGCTATTGCAAGAGGTCTTGCAATGAATCCTGATGTCCTT
CTTTTTGATGAACCTACTTCAGCTCTTGATCCTGAAATGGTAGGTGAAGTCTTGACTGTT
ATGCAAGATTTAGCTAAATCT

1.4. glnA

1.4.1. glnA-1

ATGTATTTATATCCTGATTTAGATACTTGGATTGTCTTTCCTTGGGGAGATGAAAATGGA
GCTGTTGCAGGTCTAATCTGTGATATCTATACAGCAGAAGGAGAACCTTTTGCCGGAGAT
CCACGTGGAAATCTTAAGCGTAATATGAAACGTATGCAAGAGATGGGCTATAAGTCATTT
AACTTAGGACCAGAACCTGAATTTTTCCTATTTAAAATGGATGAAAATGGTAACCCAACA
CTTGATGTTAATGACAAAGGAGGCTACTTTGACTTAGCTCCAACAGACTTAGCAGATAAT
ACACGTCGTGAAATTGTTAATGTCTTAACACAAATGGGCTTTGAAGTTGAAGCTAGTCAT
CATGAAGTAGCAGTTGGACAGCATGAAATTGACTTTAAATATGATGATGTTTTAAAAGCC
TGTGACAATATTCAATTATTTAAATTGGTTGTTAAAACAATTGCTCGTAAGCATGGTTTA
TATGCTACTTTTATGGCA

1.4.2. glnA-2

ATGTATTTATATCCTGATTTAGATACTTGGATTGTCTTTCCTTGGGGAGATGAAAATGGA
GCTGTTGCAGGTCTAATCTGTGATATCTATACAGCAGAAGGAGAACCTTTTGCCGGAGAT
CCACGTGGAAATCTTAAGCGTAATATGAAACGTATGCAAGAGATGGGCTATAAGTCATTT
AACTTAGGACCAGAACCTGAATTTTTCCTATTTAAAATGGATGAAAATGGTAACCCAACA
CTTGATGTTAATGACAAAGGAGGCTACTTTGACTTAGCTCCAACAGACTTAGCAGATAAT
ACACGTCGTGAAATTGTTAATGTCTTAACACAAATGGGCTTTGAAGTTGAAGCTAGTCAT
CATGAAGTAGCAGTTGGACAGCATGAAATTGACTTTAAATATGATGATGTTTTAAAAGCC
TGTGACAACATTCAATTATTTAAATTGGTTGTTAAAACAATTGCTCGTAAGCATGGTTTA
TATGCTACTTTTATGGCA

1.4.3. glnA-3

ATGTATTTATATCCTGATTTAGATACTTGGATTGTTTTTCCTTGGGGAGATGAAAATGGA
GCTGTTGCAGGTCTAATCTGTGATATCTATACAGCAGAAGGAGAACCTTTTGCCGGAGAT
CCACGTGGAAATCTTAAGCGTAATATGAAACGTATGCAAGAGATGGGCTATAAGTCATTT
AACTTAGGACCAGAACCTGAATTTTTCCTATTTAAAATGGATGAAAATGGTAACCCAACA
CTTGATGTTAATGACAAAGGAGGCTACTTTGACTTAGCTCCAACAGACTTAGCAGATAAT
ACACGTCGTGAAATTGTTAATGTCTTAACACAAATGGGCTTTGAAGTTGAAGCTAGTCAT
CATGAAGTAGCAGTTGGACAGCATGAGATTGACTTTAAATATGATGATGTTTTAAAAGCC
TGTGACAACATTCAATTATTTAAACTGGTTGTTAAAACAATTGCTCGTAAGCATGGTTTA
TATGCTACTTTTATGGCA

1.4.4. glnA-22

ATGTATTTATATCCTGATTTAGATACTTGGATTGTCTTTCCTTGGGGAGATGAAAATGGA
GCTGTTGCAGGTCTAATCTGTGATATCTATACAGCAGACGGAGAACCTTTTGCCGGAGAT
CCACGTGGAAATCTTAAGCGTAATATGAAACGTATGCAAGAGATGGGCTATAAGTCATTT
AACTTAGGACCAGAACCTGAATTTTTCCTATTTAAAATGGATGAAAATGGTAACCCAACA
CTTGATGTTAATGACAAAGGAGGCTACTTTGACTTAGCTCCAACAGACTTAGCAGATAAT
ACACGTCGTGAAATTGTTAATGTCTTAACACAAATGGGCTTTGAAGTTGAAGCTAGTCAT
CATGAAGTAGCAGTTGGACAGCATGAAATTGACTTTAAATATGATGATGTTTTAAAAGCC
TGTGACAACATTCAATTATTTAAATTGGTTGTTAAAACAATTGCTCGTAAGCATGGTTTA
TATGCTACTTTTATGGCA

1.4.5. glnA-24

ATGTATTTATATCCTGATTTAGATACTTGGATTGTCTTTCCTTGGGGAGATGAAAATGGA
GCTGTTGCAGGTCTAATCTGTGATATCTATACAGCAGAAGGAGAACCTTTTGCCGGAGAT
CCACGTGGAAATCTTAAGCGTAATATGAAACGTATGCAAGAGATGGACTATAAGTCATTT
AACTTAGGACCAGAACCTGAATTTTTCCTATTTAAAATGGATGAAAATGGTAACCCAACA
CTTGATGTTAATGACAAAGGAGGCTACTTTGACTTAGCTCCAACAGACTTAGCAGATAAT
ACACGTCGTGAAATTGTTAATGTCTTAACACAAATGGGCTTTGAAGTTGAAGCTAGTCAT
CATGAAGTAGCAGTTGGACAGCATGAAATTGACTTTAAATATGATGATGTTTTAAAAGCC
TGTGACAACATTCAATTATTTAAATTGGTTGTTAAAACAATTGCTCGTAAGCATGGTTTA
TATGCTACTTTTATGGCA

1.5. sdhA

1.5.1. sdhA-1

GAAATGACTGGTAGAAGTCGTGAAGAAATTCGTTATATTATGTCCCGAAACCTTGAGGTT
ATGAAAGCTTCTGTTATTGATGGATTGACCCCTAGTAAATCAATCAGTGGTTTAACAGGC
GGTGATGCTGTCAAGATGGATCAATATTTACAATCAGGAAAAACTATTTCAGATACCACA
ATCCTAGCTGCCGTTAGGAATGCTATGGCTGTTAATGAGTTAAATGCTAAGATGGGACTG
GTCTGTGCAACACCAACTGCAGGTAGTGCAGGATGTTTACCAGCTGTGATTTCTACAGCC
ATTGAAAAGCTTAATTTAACAGAAGAAGAGCAACTTAATTTTCTATTTACAGCCGGCGCA
TTTGGTCTTGTCATTGGTAATAATGCCTCTATCTCAGGTGCAGAAGGAGGTTGCCAAGCT
GAAGTTGGGTCAGCTAGTGCTATGGCTGCGGCTGCTTTAGTTATGGCTGCTGGAGGTACT
CCTTTCCAAGCTAGCCAAGCTATAGCATTTGTTATTAAA

1.5.2. sdhA-2

GAAATGACTGGTAGAAGTCGTGAAGAAATTCGTTATATTATGTCCCGAAATCTTGAAGTC
ATGAAAGCTTCTGTTATTGATGGATTAACCCCTAGTAAATCAATCAGTGGTTTAACAGGC
GGTGATGCTGTCAAGATGGATCAATATTTACAATCAGGAAAAACTATTTCAGATACCACA
ATCCTAGCTGCCGTTAGGAATGCTATGGCTGTTAATGAGTTAAATGCTAAGATGGGACTG
GTCTGTGCAACACCAACTGCAGGTAGTGCAGGATGTTTACCAGCTGTGATTTCTACAGCC

ATTGAAAAGCTTAATTTAACAGAAGAAGAGCAACTTGATTTTCTATTTACAGCCGGCGCA
TTTGGTCTCGTCATTGGTAATAATGCCTCTATCTCAGGTGCAGAAGGAGGTTGCCAAGCT
GAAGTTGGGTCAGCTAGTGCTATGGCTGCGGCTGCTTTAGTTATGGCTGCTGGAGGTACT
CCTTTCCAAGCTAGCCAAGCTATAGCATTTGTTATTAAA

1.5.3. sdhA-3

GAAATGACTGGTAGAAGTCGTGAAGAAATTCGTTATATTATGTCCCGAAACCTTGAAGTT
ATGAAAGCTTCTGTTATTGATGGATTAACCTCTAGTAAATCAATCAGTGGCTTAACAGGC
GGTGATGCTGTCAAGATGGATCAATATTTACAATCAGGAAAAACTATTTCAGATACCACA
ATCCTAGCTGCCGTTAGGAATGCTATGGCTGTTAATGAGTTGAATGCTAAGATGGGACTG
GTCTGTGCAACACCAACTGCAGGTAGTGCAGGATGTTTACCAGCCGTGATTTCTACAGCC
ATTGAAAAGCTTAATTTAACAGAAGAAGAGCAACTTGATTTTCTATTTACAGCCGGCGCA
TTTGGTCTCGTCATTGGTAATAATGCCTCTATCTCAGGTGCAGAAGGAGGTTGCCAAGCT
GAAGTTGGGTCAGCTAGTGCTATGGCTGCGGCTGCTTTAGTTATGGCTGCTGGAGGTACT
CCTTTCCAAGCTAGCCAAGCTATAGCATTTGTTATTAAA

1.5.4. sdhA-18

GAAATGACTGGTAGAAGTCGTGAAGAAATTCGTTATATTATGTCCCGAAATCTTGAAGTC
ATGAAAGCTTCTGTTATTGATGGATTAACCCCTAGTAAATCAATCAGTGGTTTAACAGGC
GGTGATGCTGTCAAGATGGATCAATATTTACAATCAGGAAAAACTATTTCAGATACCACA
ATCCTAGTTGCCGTTAGGAATGCTATGGCTGTTAATGAGTTAAATGCTAAGATGGGACTG
GTCTGTGCAACACCAACTGCAGGTAGTGCAGGATGTTTACCAGCTGTGATTTCTACAGCC
ATTGAAAAGCTTAATTTAACAGAAGAAGAGCAACTTGATTTTCTATTTACAGCCGGCGCA
TTTGGTCTCGTCATTGGTAATAATGCCTCTATCTCAGGTGCAGAAGGAGGTTGCCAAGCT
GAAGTTGGGTCAGCTAGTGCTATGGCTGCGGCTGCTTTAGTTATGGCTGCTGGAGGTACT
CCTTTCCAAGCTAGCCAAGCTATAGCATTTGTTATTAAA

1.6. glck

1.6.1. glck-1

GGAAGACATATCGTTTCTGATATCGTTGAATCTCTCAAACATCGTTTGAGCCTCTATGGA
TTAACAAAAGATGACTTTCTCGGTATCGGTATGGGTTCTCCAGGAGCTGTTGATAGAACT
AGTAAAACAGTAACAGGTGCTTTTAATCTAAATTGGGCTGATACTCAAGAAGTAGGTTCG
GTTATTGAAAAAGAAGTTGGAATTCCATTTTTTATTGATAACGATGCTAATGTTGCAGCA
CTTGGTGAACGCTGGGTAGGTGCTGGTGCCAATAATCCCGATGTTGTTTTCGTAACCCTC
GGAACAGGAGTAGGTGGAGGTGTTATCGCAGATGGTAACCTCATCCATGGTGTTGCAGGA
GCAGGTGGAGAAATTGGGCATATGATTGTTGATCCAGAAAATGGATTTACGTGCACATGT
GGTAACAAAGGCTGTCTTGAGACAGTTGCATCAGCGACA

1.6.2. glck-2

GGAAGACATATCGTTTCTGATATCGTTGAATCTCTCAAACATCGTTTGAGCCTCTATGGA
TTAACAAAAGATGACTTTCTCGGTATCGGTATGGGTTCTCCAGGAGCTGTTGATAGAACT
AGTAAAACAGTAACAGGTGCTTTTAATCTAAATTGGGCTGATACTCAAGAAGTAGGTTCA
GTTATTGAAAAAGAAGTTGGAATTCCATTTTTTATTGATAACGATGCTAATGTTGCAGCA
CTTGGTGAACGCTGGGTAGGTGCTGGTGCCAATAATCCCGACGTTGTTTTCGTAACCCTC
GGAACAGGAGTAGGTGGAGGTGTTATCGCAGATGGTAACCTCATCCATGGTGTTGCAGGA
GCAGGTGGAGAAATTGGGCATATGATTGTTGATCCAGAAAATGGATTTACGTGCACATGT
GGTAACAAAGGCTGCCTTGAGACAGTTGCATCAGCGACA

1.6.3. glck-3

GGAAGACATATCGTTTCTGATATCGTTGAATCTCTCAAACATCGTTTGAGCCTCTATGGA
TTAACAAAAGATGACTTTCTCGGTATCGGTATGGGGTCTCCAGGAGCTGTTGATAGAACT
AGTAAAACAGTAACAGGTGCTTTTAATCTAAATTGGGCTGATACTCAAGAAGTAGGTTCA
GTTATTGAAAAAGAAGTTGGAATTCCATTTTTTATTGATAACGATGCTAATGTTGCAGCA
CTTGGTGAACGCTGGGTAGGTGCTGGTGCCAATAATCCCGACGTTGTTTTCGTAACCCTC
GGAACAGGAGTAGGTGGAGGTGTTATCGCAGATGGTAACCTCATCCATGGTGTTGCAGGA
GCAGGTGGAGAAATTGGGCATATGATTGTTGATCCAGAAAATGGATTTATGTGCACATGT
GGTAACAAAGGCTGTCTTGAGACAGTTGCATCAGCGACA

1.7. tkt

1.7.1. tkt-1

GGACACTTAAAACTTGGTAAATTGGTCCTTCTTTATGATTCAAATGATATCTCACTTGAT
GGTCCAACGTCTCAATCATTTACAGAAGATGTTAAAGGGCGTTTTGAATCATATGGTTGG
CAACATATCTTAGTTAAAGATGGTAATGATTTAGAAGCGATTGCTGCAGCAATTGAAGCT
GCTAAAGCTGAAACTGATAAACCAACCATTATTGAAGTTAAAACTATTATTGGATTTGGC
GCAGAGAAACAGGGAACATCTTCAGTTCATGGAGCGCCACTTGGTGCAGAAGGTATTACT
TTTGCCAAGAAGGCTTATGGATGGGAATATCCAGACTTTACTGTTCCTGCTGAAGTTGCA
GCTCGATTTGCCTCAGATCTTCAAGCGCGTGGTGCGAAGGCAGAAGAGGCATGGAATGAT
CTTTTTGCTAAATATGAAGTTGAGTATCCAGAATTAGCAGCTGAATACAAAGAAGCTTTT

1.7.2. tkt-2

GGACACTTAAAACTTGGTAAATTGGTCCTTCTTTATGATTCAAATGATATCTCACTTGAT
GGTCCAACATCTCAATCATTTACAGAAGATGTTAAAGGACGTTTTGAATCATATGGTTGG
CAACATATCTTAGTTAAAGATGGTAATGATTTAGAAGCGATTGCTGCAGCAATTGAAGCT
GCTAAAGCTGAAACTGATAAACCAACCATTATTGAAGTTAAAACTATTATTGGATTTGGC
GCAGAGAAACAGGGAACATCTTCAGTTCATGGAGCGCCACTTGGTGCAGAAGGTATTACT
TTTGCCAAGAAGGCTTATGGATGGGAATATCCAGACTTTACTGTTCCTGCTGAAGTTGCA
GATCGATTTGCCTCAGATCTTCAAGCGCGTGGTGCGAAGGCAGAAGAGGCATGGAATGAT

CTTTTTGCTAAATATGAAGTTGAGTATCCAGAATTAGCAACTGAATACAAAGAAGCTTTT

1.7.3. tkt-3

GGACACTTAAAACTTGGTAAATTGGTCCTTCTTTATGATTCAAATGATATCTCACTTGAT
GGTCCAACGTCTCAATCATTTACAGAAGATGTTAAAGGGCGTTTTGAATCATATGGTTGG
CAACATATCTTAGTTAAAGATGGTAATGATTTAGAAGCGATTGCTGCAGCAATTGAAGCT
GCTAAAGCTGAAACTGATAAACCAACCATTATTGAAGTTAAAACTATTATTGGATTTGGC
GCAGAGAAACAGGGAACATCTTCAGTTCATGGAGCGCCACTTGGTGCAGAAGGTATTACT
TTTGCCAAGAAGGCTTATGGATGGGAATATCCAGACTTTACTGTTCCTGCTGAAGTTGTA
GCTCGATTTGCCTCAGATCTTCAAGCGCGTGGTGCGAAGGCAGAAGAGGCATGGAATGAT
CTTTTTGCTAAATATGAAGTTGAGTATCCAGAATTAGCAGCTGAATACAAAGAAGCTTTT

1.7.4. tkt-5

GGACACTTAAAACTTGGTAAATTGGTCCTTCTTTATGATTCAAATGATATCTCACTTGAT
GGTCCAACATCTCAATCATTTACAGAAGATGTTAAAGGACGTTTTGAATCATATGGTTGG
CAACATATCTTAGTTAAAGATGGTAATGATTTAGAAGCGATTGCTGCAGCAATTGAAGCT
GCTAAAGCTGAAACTGATAAACCAACCATTATTGAAGTTAAAACTATTATTGGATTTGGC
GCAGAGAAACAGGGAACATCTTCAGTTCATGGAGCGCCACTTGGTGCAGAAGGTATTACT
TTTGCCAAGAAGGCTTATGGATGGGAATATCCAGACTTTACTGTTCCTGCTGAAGTTGCA
GATCGATTTGCCTCAGATCTTCAAGCGCGTGGTGCGAAGGCAGAAGAGGCATGGAATGAT
CTTTTTGCTAAATATGAAGTTGAGTATCCAGAATTAGCAGCTGAATACAAAGAAGCTTTT

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben…

…ganz besonders bei Prof. Dr. Barbara Spellerberg für die hevorragende und unkomplizierte Betreuung

…bei Prof. Dr.Christian Sinzger für die Erstellung des Zweitgutachtens

…bei Stephanie Mauerer, Ulrike Simnacher, Corinna Foddis und Daniela Asam für die großartige Hilfsbereitschaft im Labor

…bei Judith Kappenschneider für die endgültige Absegnung der Arbeit

…bei meinen Eltern für die liebevolle und geduldige Unterstützung während des gesamten Studiums

Publikationsliste

Fluegge, K., Wons, J., Spellerberg, B., Swoboda, S., Siedler, A., Hufnagel, M., Berner, R. (2011) Genetic differences between invasive and noninvasive neonatal group B streptococcal isolates. *Pediatr Infect Dis J* **30**: 1027-1031.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name:	Sabrina Johanna Swoboda
Geburtsdatum:	15.07.1986
Geburtsort:	Memmingen
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulausbildung

1992-1996	Grundschule Babenhausen
1996-2005	Bernhard-Strigel-Gymnasium Memmingen
24.06.2005	Abitur am Bernhard-Strigel-Gymnasium Memmingen Notendurchschnitt: 1,6

Akademische Ausbildung

2005-2012	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
08.April 2008	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Note: sehr gut (1,5)
24. Mai 2012	2.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Note: sehr gut (1,0)
05. Juni 2012	Erhalt der Approbation

Arbeitserfahrung

<u>Pflegepraktika</u>

März 2006	Klinik für Allgemeinchirurgie am Klinikum Memmingen
September 2006	Klinik für Innere Medizin am Klinikum Memmingen
März 2007	Klinik für Gynäkologie am Kreiskrankenhaus Krumbach

<u>Famulaturen</u>

März 2009	Klinik für Neurologie am RKU Ulm
August 2009	Allgemeinmedizinische Praxis Dres. Held/Weirather Babenhausen
März 2010	Klinik für Innere Medizin am Universitätsklinikum Ulm

September 2010	Abteilung Anästhesie und Intensivmedizin an der Donauklinik Neu-Ulm
September 2010	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Ulm

Praktisches Jahr

Februar 2011-Januar 2012	1. Tertial: Klinik für Dermatologie am Universitätsklinikum Ulm
	2. Tertial: Klinik für Innere Medizin am Universitätsklinikum Ulm
	3. Tertial: Klinik für Chirurgie am Universitätsklinikum Ulm

Assistenzarztstellen

12/2012-01/2013: Abteilung Innere I Gastroenterologie am Universitätsklinikum Ulm

03/2013-heute: Abteilung Dermatologie am Universitätsklinikum Freiburg