
Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1 Einleitung	3
1.1 Epidemiologie und Erkrankungen von <i>S. aureus</i>	3
1.2 Virulenzfaktoren von <i>S. aureus</i>	4
1.3 Hämolsine	5
1.4 Regulation der Virulenzfaktoren von <i>S. aureus</i>	7
1.5 Resistente <i>S. aureus</i>	8
1.6 Nasenkolonisation	11
1.7 Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und Infektionen	12
1.8 Die chronische Wunde und der diabetische Fuß	13
1.9 Typisierungen von <i>S. aureus</i>	14
1.10 Ziele dieser Arbeit	16
2 Material und Methode	17
2.1 Chemikalien, Enzyme, Geräte, Materialien und Programme	17
2.1.1 Agarosen und Chemikalien	17
2.1.2 Enzyme	17
2.1.3 Molekulargewichtsstandard	17
2.1.4 Geräte, Materialien, Programme	18
2.1.5 Medien und Stammlösungen	18
2.2 Patienten und Untersuchungsmaterial	19
2.2.1 Patienten/ Untersuchungszeitraum Tübingen	19
2.2.2 Patienten/ Untersuchungszeitraum Basel	19
2.3 Isolierung und Anzucht der Bakterien	19
2.4 DNA Isolierung und PCR	20
2.5 Agarose Gel nach der PCR	21
2.6 Der Restriktionsverdau mit den Enzymen <i>AluI</i> und <i>DraI</i>	22
2.7 Zuordnung der Isolate zu den <i>agr</i> -Gruppen	23
2.8 Untersuchung der Proben auf eine MRSA Resistenz	23
2.8.1 MRSA Nachweis durch <i>mecA</i> -PCR	23
2.9 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	24
2.9.1 Dokumentation und Auswertung	25
3 Ergebnisse	27
3.1 <i>S. aureus</i> Prävalenz chronischer Wunden und Nasen bei Diabetikern ..	27
3.2 <i>S. aureus</i> Infektionsisolate von Nicht-Diabetikern	28
3.3 Phänotypische <i>S. aureus</i> Varianten in Wund- und Nasenabstrichen von Diabetikern	29
3.3.1 Charakterisierung der Pigmentierung	29
3.3.2 Charakterisierung der Hämolysemuster	30
3.3.3 Phänotypische Charakterisierung der <i>S. aureus</i> -Isolate aus Wunden und Nasen von Diabetikern	33
3.3.4 Vergleich der Hämolyse von Wund-, Nasen- und Kontrollisolaten	34
3.4 Vergleich der Nasen- und Wundisolate innerhalb eines Patienten	35
3.5 Genetische Typisierung der <i>S. aureus</i> -Isolate	36
3.5.1 <i>agr</i> -Typisierung	36
3.5.2 <i>agr</i> -Typisierung der Wund- und Nasenisolate von Diabetikern	41
3.5.3 <i>agr</i> -Typisierung der Kontrollisolate	41

3.5.4	Verteilung der <i>agr</i> -Typen in den drei Kollektiven	42
3.6	Genomtypisierung durch PFGE der drei Kollektive	44
3.6.1	Genomtypverteilung in den drei Kollektiven.....	44
3.6.2	Korrelation von Genomtypen und <i>agr</i> -Gruppen bei <i>S. aureus</i> - Isolaten	45
3.6.3	Genomtypischer Vergleich der Nasen- und Wundisolate innerhalb eines Patienten.....	47
3.6.4	Typisierung phänotypischer Varianten bei Wunden von Diabetikern.....	47
3.6.5	Persistenz von <i>S. aureus</i> in Wundisolaten	48
3.7	Nachweis und Charakterisierung von MRSA-Isolaten	49
4	Diskussion.....	51
5	Zusammenfassung.....	60
6	Literatur.....	62
7	Abkürzungsverzeichnis	69

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Erkrankungen von *S. aureus*

In der Gruppe der *Staphylococcen* können Koagulase-Positive von Koagulase-Negativen Spezies unterschieden werden. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ist ein humanpathogener, fakultativ anaerober, sich in Trauben anordnender gram-positiver Koccus, der zur Familie der *Micrococceae* gehört [18; 87]. *S. aureus* ist unbeweglich und Katalase-Positiv [36]. Die Koagulase-Positive Spezies *S. aureus* unterscheidet sich im Gegensatz zu den anderen Spezies durch seine goldene Koloniepigmentierung [51].

S. aureus ist für ein breites Spektrum von Krankheiten verantwortlich. Der pathogene Keim führt neben Bakteriämien [66] auch zur Ausbildung einer Osteomyelitis [7; 50] und zu sekundären Wundinfektionen [52], wobei die Verteilung zwischen frühen und späteren postoperativen Infektionen gleich ist [7]. *S. aureus* ist bei einer Osteomyelitis der häufigste [31], bei chirurgischen Wundinfektionen der zweithäufigste Erreger [7]. Vor allem unter der älteren Bevölkerung kann eine *S. aureus*-Infektion zu einer Endokarditis, Pneumonie, septischen Arthritis und zur Sepsis führen [9]. Die Lebensmittelintoxikation (Enterotoxine) und der Toxische Schock werden durch synthetisierte Toxine vermittelt [57]. Zum Infektionsspektrum gehören auch dermatologische, ebenfalls toxinvermittelte Erkrankungen wie das Staphylococcal-Scalded-Skin-Syndrom (SSSS) (Exfoliatintoxin A) und der Bullous impetigo [43; 53]. Im Bereich der Haut führen Entzündungen zur Zellulitis und zu pyogenen Infektionen der Haarfollikel, der Follikulitis und Karbunkeln [44; 52].

Da *S. aureus* in der Lage ist einen Biofilm auszubilden, kann es zu fremdkörperassoziierten Infektionen kommen. Das Pathogen führt neben einer Endokarditis nach Herzklappenersatz [60] zur Infektion von intravasalen Kathetern und Liquor-Shunts sowie zu Infektionen von Gelenks- und Gefäßprothesen [36]. Bei Patienten mit einer Bauchfell-Dialyse führt eine *S. aureus*-Infektion in 25-85% der Fälle zu so genannten Exit-Site-Infektions (ESI) und bei 9-40% zu Bauchfellinfektionen [27].

1.2 Virulenzfaktoren von *S. aureus*

Die Virulenzfaktoren von *S. aureus* sind für eine Reihe von Erkrankungen verantwortlich und sichern *S. aureus* das Überleben im Wirt. Seine Zellwand besteht zu 50 Gew.% aus Peptidoglycan, einer Mureinschicht, die alternierend aus den beiden Bausteinen N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure aufgebaut ist. Die negativ geladene Zellwand enthält zwei verschiedene Teichonsäuren. Die Wandteichonsäure (WTA) ist aus ~40 wiederholenden Ribitol-Phosphat-Polymeren aufgebaut, die kovalent mit Murein verbunden sind. Sie ragen über diese Schicht hinweg nach außen [10; 51; 83]. Die Lipoteichonsäure (LTA) enthält Glycerol-Phosphate und ist in der Zytoplasmamembran von gram-positiven Bakterien verankert.

S. aureus kann zwei verschiedene extrazelluläre Polysaccharide synthetisieren: Polysaccharid Intercellular Adhesin (PIA) und eine Polysaccharid-Kapsel. PIA ist verantwortlich für die Biofilmbildung, bindet an hydrophile Oberflächen und ist immunogen. Über den Biofilm erzielt *S. aureus* neben einer Adhäsion an Polymer-Oberflächen von medizinischen Implantaten auch eine intrazelluläre Adhäsion [62; 25].

Von den bekannten humanpathogenen *S. aureus*-Stämmen sind 90% in der Lage, eine Mikrokapsel aus extrazellulären Polysacchariden zu exprimieren [62]. Es sind insgesamt 11 Kapsel-Serotypen beschrieben worden, von diesen sind die Kapsel-Serotypen 5 und 8 für 75% der Infektionen verantwortlich [51].

Der erste Schritt einer *S. aureus*-Infektion ist die Adhäsion und Kolonisation des Wirtsgewebes. Die Adhäsion erreicht *S. aureus* über in der Zellwand verankerte Proteine, die an Matrixproteine eukaryontischer Gewebe binden können. Zu diesen Zellwandproteinen gehört unter anderem das Protein A [51]. Die Bindung von Protein A an den Fc-Anteil von IgG-Antikörpern [62] schützt *S. aureus* vor Phagozytose [32]. Der ebenfalls zellwandverankerte Clumpingfaktor A bindet unter anderem Fibrinogen. Dies führt zur Ausbildung eines Fibrinwalls, wodurch *S. aureus* für das Immunsystem des Wirtsorganismus unzugänglich wird [36; 62; 87]. Der Clumpingfaktor B (ClfB) bindet an das humane Cytokeratin 10 und Protein G (SasG) an einen unbekanntem Liganden von

abschuppenden nasalen Epithelzellen. Diese beiden Faktoren spielen wahrscheinlich für die Adhäsion von *S. aureus* im Nasenvorhof eine entscheidende Rolle [85].

Zudem kann *S. aureus* eine Vielzahl von extrazellulären Virulenzfaktoren wie Koagulase, Toxische-Schock-Syndrom-Toxin-1 (TSST-1), Proteasen und Hämolysin synthetisieren [18; 51]. Die sezernierte Koagulase bindet in einem Verhältnis von 1:1 mit humanem Prothrombin [3], dies führt zur Koagulation von Plasma, indem Fibrinogen in Fibrin umgewandelt wird. Das TSST-1 nimmt Einfluss auf das Immunsystem, da es an die Proteine des histokompatiblen Komplexes der Klasse II bindet. Dies führt zur Aktivierung der T-Zellen [62].

Eine weitere Möglichkeit für *S. aureus*, seine Kollektion an Virulenzfaktoren zu erweitern, liegt in phagenkodierte Virulenzfaktoren [53]. Ein Bakteriophage kann entweder sofort seine DNA kopieren und eine Lyse des Wirtsbakteriums herbeiführen, oder aber seine DNA in das bakterielle Chromosom integrieren. Bestimmte Prophagen ändern den Phänotyp des Wirtsbakteriums, dieser Prozess wird als Lysogene Konversion bezeichnet. Zu den phagenkodierte Toxinen zählen die Staphylokinase, Enterotoxin A und das Exfoliatintoxin A sowie das Panton-Valentine-Leukozidin. Die phagenkodierte Staphylokinase ist Aktivator von Plasminogen [5]. Daneben kann die Staphylokinase α -Defensine inaktivieren und dadurch die Wirtsimmunabwehr abschwächen [53]. Die durch Phagen erworbene Fähigkeit zur Toxinbildung repräsentiert die positive Lysogene Konversion. Bei der negativen Lysogenen Konversion kommt es beim Staphylokinase kodierten Phagen, infolge einer Insertion der Phagen-DNA in das *hlyB*-Gen, zum Verlust der β -Hämolysin (HlyB) Produktion [3; 53].

1.3 Hämolsine

Die vier Hämolsine α -Toxin (HlyA), β -Toxin (HlyB), γ -Toxin (HlyG) und δ -Toxin (HlyD) sind membranaktive Produkte von *S. aureus*. Die Hämolsine ermöglichen *S. aureus* in das Gewebe einzudringen. Kodiert werden die Toxine von den Genen *hlyA* (α -Toxin), *hlyB* (β -Hämolysin), *hlyG* (γ -Hämolysin) und *hlyD* (δ -

Hämolysin). Eines der am intensivsten untersuchten Hämolysine ist hierbei das α -Toxin (α -Hämolysin), ein extrazelluläres, zytotoxisches Protein. Die meisten *S. aureus*-Isolate besitzen ein *hla*-Gen, aber es wird nicht immer ein funktionsfähiges α -Toxin synthetisiert [5]. α -Toxin ist ein porenbildendes Cytolysin, es fördert die Zell-Lyse von roten Blutkörperchen und anderen Zelltypen, wie z.B. epitheliale und endotheliale Zellen [62; 5]. Für Kaninchen-Erythrozyten ist α -Toxin bereits in geringen Mengen toxisch, dagegen werden humane Erythrozyten nur durch sehr hohe α -Toxin-Konzentrationen lysiert. Das Enzym β -Hämolysin (Hlb) ist eine Sphingomyelinase. Dieses Exoprotein ist eine Typ-C-Phosphatase, die speziell Zellen lysiert, die reich an Sphingomyelin sind. Im Speziellen kommt es zur Destabilisation der Erythrozytenmembran durch eine Hydrolyse des Sphingomyelins zu Phosphorcholin und Keramid. Zudem inhibiert dieses Toxin die Fortbewegung von Monozyten und ist für diese zytotoxisch [53]. Das β -Hämolysin wirkt, bedingt durch die Bindungsstelle an der Zelloberfläche von roten Blutkörperchen, als Antagonist zum α -Toxin [5]. β -Hämolysin zeigt auf einer Schafsblutagarplatte ein Phänomen, das als *hot-cold-lysis* bezeichnet wird. Dabei wird eine klare Hämolyse sichtbar, die aufgrund von Hämolysin in eine viel hellere Zone übergeht und nach einer Inkubation bei 4°C verstärkt wird [62].

Ein besonderer Virulenzfaktor der cMRSA-Isolate (community-acquired MRSA) ist das Panton-Valentine-Leukozidin-Gen (*PV-luk*) [79], das von weniger als 5% der *S. aureus*-Stämme produziert wird [19]. Leukozidin und γ -Toxin bilden eine Familie von Toxinen, die von mehreren verschiedenen Genen kodiert werden. Darunter sind die Gene *hlg*, *luk-PV* und *lukDE* am besten charakterisiert [5]. Das Panton-Valentine-Leukozidin besitzt eine leukozytolytische Aktivität [62] und führt zur Lyse von Makrophagen und zu Gewebenekrosen [13]. Das γ -Toxin ist stark hämolytisch und 90-fach weniger leukotoxisch [5].

1.4 Regulation der Virulenzfaktoren von *S. aureus*

Da *Staphylococci* unterschiedlichen Milieubedingungen ausgesetzt sind, müssen sie in der Lage sein, die Expression der Virulenzfaktoren diesen Bedingungen anzupassen und speziell zu steuern. Es wurden verschiedene, in die Regulation eingebundene Loci beschrieben, die die Expression von Virulenzgenen diverser *Staphylococci*-Gruppen kontrollieren [51]. Gen-Regulatoren wie *sar*, *sae*, *sigB* und *agr* spielen in der Koordination der Virulenzfaktoren eine Rolle [57].

Der stressinduzierte alternative Sigmafaktor SigmaB führt zur direkten Aktivierung verschiedener Gene. Seine Aktivität ist für die typische goldene Pigmentierung des Bakteriums notwendig. Die Pigmentierung führt zur Resistenz gegen oxidativen Stress. Da H₂O₂ während der Infektion einen enormen Stressfaktor darstellt, wird postuliert, dass *sigB* einen wichtigen Faktor während der späten stationären Phase darstellt, um die hohen H₂O₂ Konzentrationen zu überleben [25].

Viele extrazelluläre Virulenzfaktoren werden durch das *agr*-System (accessory gene regulator) aktiviert. Das *agr*-System besteht aus fünf Genen (*agrA*, *agrC*, *agrD*, *agrB*, und *hld*) [56]. Das *agr*-Operon (Abb. 1) besteht aus zwei divergenten Transkriptionseinheiten RNAII und RNAIII, die ausgehend von den zwei Promotoren P2 und P3 transkribiert werden [29]. RNAII kodiert vier Proteine (AgrA, AgrC, AgrB und AgrD) [14]. Die RNAIII kodiert für das Peptid δ -Hämolyisin (*hld*) [56; 58; 62]. Das Quorum sensing (Bakteriendichte abhängige Aktivierung) des *agr*-Systems wird durch Synthese und Sekretion eines von *agrD* kodierten und von AgrB prozessierten Octapeptids vermittelt. Das extrazelluläre autoinduzierende Peptid (AIP) bindet an das membranständige Sensorprotein AgrC, welches über eine Phosphorylierungsreaktion AgrA aktiviert. Die Aktivität von AgrA führt in der späten Wachstumsphase zu einer außerordentlichen Zunahme der P2- und P3-Transkription. Die erhöhte Transkription des P3-Operons führt zu einer dramatischen Erhöhung des intrazellulären RNAIII-Level und zu einer vermehrten δ -Hämolyisin Freisetzung [54; 58]. Die RNAIII inhibiert die Synthese von Protein A [33] und aktiviert die

Transkription von α -Toxin (*hla*) und Serin-Protease [70]. Andere sekretierte Toxine wie die Enterotoxine B, C, und D werden nur teilweise von RNAIII aktiviert [58].

Sequenzvariationen in *agrB*, *agrD*, und *agrC* im *agr*-Lokus führten zur Identifikation von mindestens vier *S. aureus* spezifischen *agr*-Gruppen (I- IV), in denen von einer Gruppe AIP produziert wird, welches die *agr*-Expression anderer Gruppen inhibiert [30; 33; 58]. Die spezifischen AIP führen innerhalb einer Gruppe zur Aktivierung der AIP-Antwort und zur Cross-Inhibition der AIP-Antwort anderer Stämme [57]. Diese Cross-Inhibition der Gene repräsentiert die bakterielle Interferenz zwischen einzelnen *S. aureus*-Stämmen. So inhibiert beispielsweise die *agr*-Gruppe III die *agr*-Gruppe I [30; 33].

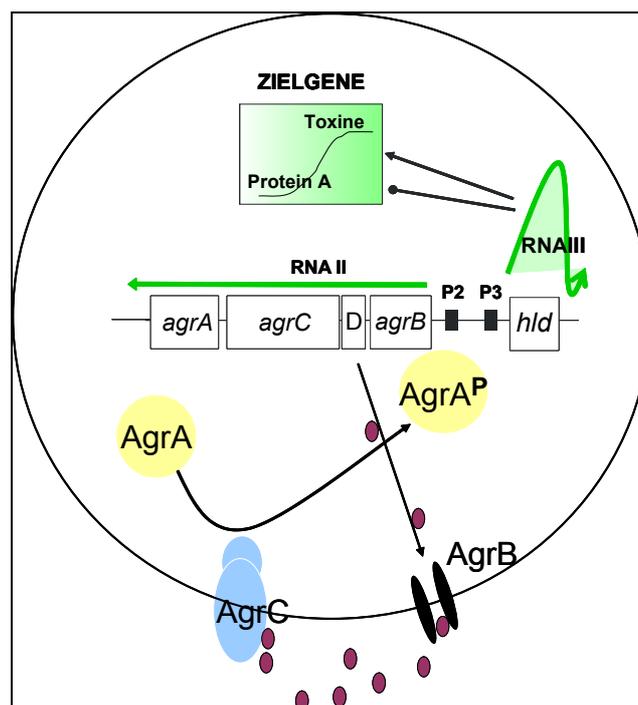


Abb. 1 : Regulation der Virulenzfaktoren durch das *agr*-Operon

1.5 Resistente *S. aureus*

Die Ausbildung von Antibiotika-Resistenzen ist ein weiterer Mechanismus von *S. aureus*, seinen Fortbestand zu sichern. Das nosokomiale Pathogen kann über Mutation eines existierenden bakteriellen Gens oder über horizontalen

Transfer von Bakterium zu Bakterium eine Resistenz erreichen [26; 43]. Beim horizontalen Transfer werden Resistenz oder Virulenzgene zwischen verschiedenen Bakterienstämmen ausgetauscht. Die Methicillin-Resistenz ist auf einer solchen transferierbaren genomischen Insel kodiert. Diese wurde von verschiedenen *S. aureus*-Stämmen erworben. Bei MRSA (Methicillin-resistente *S. aureus*) wird zwischen community-acquired (cMRSA) und hospital-acquired (nosokomialen) (haMRSA) MRSA-Infektionen differenziert [63]. In den letzten 7 Jahren ist die Zahl der cMRSA bedingten Infektionen deutlich angestiegen [91]. Diese Patienten weisen in ihrer Anamnese keinen direkten vorherigen Kontakt zu stationären medizinischen Einrichtungen auf [79]. Infektionen mit dem cMRSA-Stamm stehen überwiegend im Zusammenhang mit tiefgehenden und nekrotisierenden Haut- und Weichteilinfektionen, insbesondere Furunkulose [91], sowie einer besonderen Form einer nekrotisierenden, oft letal verlaufenden Pneumonie [79]. Im Vergleich zu haMRSA-Epidemiestämmen besitzen cMRSA einen schmalen Resistenzphänotyp (Oxacillin allein oder zusätzlich ein bis zwei weitere Resistenzen) [91]. Dagegen zeichnen sich die haMRSA-Stämme neben einer Resistenz gegenüber allen β -Lactam-Antibiotika und Cephalosporinen auch gegenüber anderen Antibiotika wie Carbapeneme aus [51].

Zurückzuführen ist die Methicillin-Resistenz auf ein zusätzliches penicillinbindendes Protein PBP2a mit nur geringer Affinität für β -Lactam-Antibiotika. Dies führt zu einer Kreuzresistenz des Bakteriums gegen alle Präparate dieser Substanzklasse [90]. PBP2 wird durch das *mec*-Gen kodiert. Die Resistenzdeterminante stellt ein mobiles genetisches Element, die sogenannte *Staphylococcus cassette chromosome mec* (SCCmec), dar. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten fünf polymorphe *mec*-Typen identifiziert werden. Die Typen (*mec*-Inseln I-V) unterscheiden sich im Hinblick auf die Ausdehnung der Antibiotika-Resistenz. Die Typen II und III enthalten viele Gene für Antibiotika-Resistenzen in integrierten Plasmiden oder Transposomen. Die Typen I, IV und V enthalten außer dem *mecA* keine weiteren Gene für Antibiotika-Resistenzen [26]. Wenn Bakterien in der Gegenwart von β -Lactam

wachsen, wird die Produktion von PBP2a induziert und auf der bakteriellen Oberfläche exponiert [24].

Die MRSA breiten sich weltweit primär als nosokomiale Pathogene aus [24]. Von 1998 bis 2001 stieg der Anteil von MRSA-Infektionen in Krankenhäusern von ~15% auf ~20% an [89]. In Deutschland liegt die aktuelle Prävalenz von MRSA bei 20,7% [37]. Eine aktuelle Studie über MRSA-Isolate aus 21 Ländern zeigt, dass eine Resistenz gegen die Mehrzahl der weit verbreiteten Medikamente wie Tetracycline, Clindamycin, Trimethoprim, aber auch gegen Rifampin und Ciprofloxacin besteht [28]. In Mitteleuropa sind etwa 25,4% aller *S. aureus* und 72% aller MRSA resistent gegen Erythromycin, 56% sind resistent gegen Clindamycin [89]. Antibiotikaresistente Organismen, insbesondere MRSA, werden häufig bei Patienten isoliert, die zuvor eine Antibiotikatherapie erhalten haben; sie werden oft (aber nicht immer) während eines Krankenhausaufenthaltes erworben [72].

Bei den MRSA nimmt die Resistenz gegen Vancomycin, Substanzgruppe der Glycopeptide, immer mehr zu. Differenziert wird zwischen dem so genannten GISA (Glycopeptid intermediate-level *S. aureus*) und den VRSA (Vancomycin resistente *S. aureus*). Die GISA besitzen eine nur geringe Resistenz gegenüber Vancomycin, deren molekulare Ursache noch weitgehend unklar ist [63]. Viele GISA zeichnen sich durch den Verlust der δ -Hämolysin-Expression aus und sind *agr*-defizient. Hinzu kommt, dass diese Stämme besser Biofilm bilden können [67]. Die MRSA Isolate mit einer hohen Vancomycin-Resistenz (VRSA) erlangten diese durch das *vanA*-Element von vancomycinresistenten *Enterococccen* [26].

1.6 Nasenkolonisation

Rund 60% der Bevölkerung sind nur periodisch mit diesem Bakterium in der Nase kolonisiert, 20% sind keine Träger von *S. aureus* [60; 71]. 20% der Bevölkerung sind permanent und asymptomatisch mit *S. aureus* kolonisiert. Sie tragen ihn als harmlosen Kommensalen im vorderen Nasenrachenraum, seinem natürlichen Reservoir. Damit verbunden ist das Infektionsrisiko, z.B. einer Wunde, bei einer Kolonisation von *S. aureus* höher [40].

30% bis 50% der permanenten Träger können zusätzlich flüchtig auch im Achselbereich und in der Vagina mit *S. aureus* kolonisiert sein [71]. Untersuchungen haben gezeigt, dass Patienten mit Cystischer Fibrose, Dialysepatienten, Diabetiker, Drogenabhängige und HIV-positive Patienten häufiger mit *S. aureus* kolonisiert sind [20; 71].

S. aureus kann ausgehend vom Vestibulum nasi auch zumindest vorübergehend die Haut, das Perineum, den Pharynx und den Gastrointestinaltrakt besiedeln [85]. Das Nasenepithel im anterioren Nasenraum ist geschichtet, keratinisiert und ohne Flimmerepithel. Im Gegensatz hierzu sind der Rest der Nasenhöhle und der weitere Respirationstrakt mit Flimmerepithel ausgekleidet [80]. Die höchste *S. aureus*-Konzentration bei nosokomialen Trägern wurde unmittelbar distal des anterioren Flimmerepithels bestimmt. In diesem Bereich der Nase fehlen, neben dem Flimmerepithel, auch Cilien und Mikrovilli und das Epithel enthält kaum antimikrobielle Peptide und Immunglobuline [20]. Im anterioren Bereich der Nase ist die Immunabwehr geringer; ausgeglichen wird dies über das Nasensekret, da dieses Immunglobulin A und G, Lysozyme, Lactoferrin und antimikrobielle Peptide enthält [85]. Auf der Oberfläche von Epithelzellen werden verschiedene Glykoproteine, Glykolipide und Proteoglykane exprimiert, die für die spezifische Bindung von *S. aureus* an diese Zelle verantwortlich sein können [61; 62]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Wandteichonsäuren von *S. aureus* wesentlich für diese Adhäsion an Nasenepithelzellen sind [83].

1.7 Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und Infektionen

Der manifeste Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, die durch einen erhöhten Blutzuckerspiegel gekennzeichnet ist. Einige Aspekte der Immunität sind bei Patienten mit Diabetes mellitus verändert. Die Funktion der polymorphkernigen Leukozyten ist unterdrückt, insbesondere dann, wenn eine Azidose vorliegt. Die Adhäsion der Leukozyten, die Chemotaxis und die Phagozytose können beeinträchtigt sein [55]. Die Patienten mit qualitativen oder quantitativen Defekten der Leukozytenfunktion haben ein erhöhtes Risiko einer *Staphylococccen*-Erkrankung [80], da die Immunantwort bei Infektionen reduziert ist [86]. Zu den Folgeerkrankungen eines manifesten Diabetes mellitus zählen im Hinblick auf das diabetische Fußsyndrom unter anderem die autonome Neuropathie, die periphere diabetische Polyneuropathie, Makroangiopathie und die diabetische Mikroangiopathie [11; 75]. Die autonome Neuropathie führt zur Störung der Schweißsekretion (Sudomotorenparese) und damit zu einer trockenen, rissigen Haut [46]. Die periphere diabetische Polyneuropathie ist eine Störung des peripheren sensomotorischen und autonomen Nervensystems und tritt im Rahmen der diabetischen Erkrankung früher oder später auf [74]. Die Makroangiopathie (arterielle Verschlusskrankheit) und die Mikroangiopathie haben eine Schädigung oder Änderung des Endothels, welche die Durchblutung beeinträchtigt, zur Folge [75]. Bei einer gestörten statischen Belastung, z.B. des Fußes, kommt es zur Bildung einer Hyperkeratose. In der vorgeschädigten Haut bilden sich anschließend Rhagaden [11; 78], ausgehend von diesen oder kleineren Verletzungen kommt es zur Ausbreitung von Infektionen.

S. aureus bedingte Infektionen und Entzündungen des Respirationstraktes konnten bei Diabetikern nachgewiesen werden [55]. Patienten mit einem manifesten Diabetes mellitus haben ein signifikant höheres Risiko für Haut- oder Weichteilinfektionen, je höher die *S. aureus*-Besiedlung des vorderen Nasenrachenraumes und der Haut ist, insbesondere präoperativ [8; 38].

1.8 Die chronische Wunde und der diabetische Fuß

Eine chronische Wunde liegt vor, wenn eine Verletzung eines Gewebes nicht systematisch und in einer angemessenen Zeit verheilt [15]. Im Vergleich zwischen einer akuten und einer chronischen Wunde vollzieht sich der Heilungsprozess einer akuten Wunde innerhalb von Tagen oder Wochen, während der Prozess bei einer chronischen Wunde über Monate oder Jahre dauern kann. Neben nicht heilenden, sekundären Wunden werden Ulzera wie der Druckkulkus, der infizierte Ulcus, diabetische und arterielle Ulzera als chronische Wunden bezeichnet [41].

Generell kommt es zur Infektion, wenn die Virulenzfaktoren der pathogenen Keime in einer Wunde überwiegen. Die Immunabwehr des Wirtes kann die Invasion und Vermehrung der Organismen, deren Produkte und Toxine sowie die lokale Gewebeerstörung nicht abwehren [16]. Von den zahlreichen Organismen, die chronische Wunden kolonisieren und eine Wundheilungsstörung hervorrufen, wurde *S. aureus* mit 52% am häufigsten aus Wunden isoliert und nachgewiesen [18]. Bei Diabetikern ist *S. aureus* der häufigste pathogene Keim, der eine chronische Fußinfektion verursacht [45; 46; 48].

Eine Infektion im lokalen Gewebe präsentiert normalerweise die klassischen Entzündungssymptome: Erythema, Überwärmung, Ödem, Schmerz und purulentes Exsudat [6]. Ungeachtet der hohen Keimkolonisation in der Wunde zeigen viele chronische Wunden kaum klinische Entzündungszeichen [17], wie die klassischen Signale dolor, rubor, calor und tumor, sie können sogar fehlen [54; 86]. Aus diesem Grund muss eine Differenzierung zwischen infizierten und kolonisierten Ulcera anhand der Tabelle der Infectious Disease Society of America stattfinden [64].

Der Fuß scheint für chronische Wundinfektionen prädestiniert zu sein. Chronische Wundinfektionen der Füße sind mit 47% an der Fußsohle am häufigsten, gefolgt von der Ferse mit 28% [48]. In der Ätiologie der Mehrzahl diabetischer Fußulcera spielen mechanische Faktoren eine Rolle. Wichtige Faktoren für die Entstehung einer chronischen Infektion sind die Ausbildung

eines Ulkus und der erhöhte Druck auf die Fußsohle [78]. Im Verlauf der diabetischen Manifestation erkranken Diabetiker an der peripheren diabetischen Polyneuropathie [78], dem prädisponierenden Hauptfaktor für die Entstehung von Fußulcera [64]. Die sensorische Neuropathie führt zum Verlust der Wahrnehmung schädigender Stimuli oder Traumata. Die fehlende Sensibilität, die im Laufe der Zeit kontinuierlich zunimmt [35; 78], bewirkt neben einer Einschränkung der Tiefsensibilität auch eine eingeschränkte Empfindung von Schmerz und Temperatur. Bedingt durch wiederholte Einwirkung von erhöhtem plantarem Druck während des Gehens entstehen Druckstellen, die vom Patienten nicht registriert werden. Eine unbemerkte Ausbreitung von Entzündungen und Ulzerationen ist die Folge [11; 78]. Typischerweise entsteht ein Ulcus an Stellen, die wiederholt hohen mechanischen Belastungen ausgesetzt sind [77]. Das diabetische Fußsyndrom wird des Weiteren durch Störungen im Bereich der distalen Neurone begünstigt. Die Atrophie der kleinen Fußmuskeln bei der motorischen Neuropathie führt zur Flexionsdeformität der Zehen, daraus resultiert eine anatomisch bedingte Zehenfehlstellung mit einer charakteristischen Klauenzehenstellung [75]. Eine Fehlbelastung des Fußes ist unausweichlich, aufgrund einer erhöhten punktuellen Druckerhöhung entsteht nachfolgend ein Hautulkus [46]. Um einen Heilungsprozess der neuropathisch bedingten diabetischen Fußulzeration zu erreichen, muss eine adäquate Behandlung erfolgen. Diese schließt eine Wundausschneidung und eine adäquate Druckentlastung ein [2]. Bei einer inadäquaten oder fehlenden Therapie erfahren 10% bis 30% der Diabetiker mit Fußulzera eine Amputation [47]. Studien haben gezeigt, dass Diabetiker gegenüber nicht Diabetikern ein etwa 15-fach höheres Risiko für eine Amputation haben [74].

1.9 Typisierungen von *S. aureus*

Um *S. aureus*-Stämme unterscheiden zu können, werden im Rahmen der Infektionsüberwachung, insbesondere nosokomialer Krankheitserreger, unterschiedliche Verfahren angewendet.

Die Typisierung über Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) hat sich als eine molekulare Typisierungsmethode mit guter Reproduzierbarkeit und hoher Diskriminierungsfähigkeit etabliert [88; 91]. Die chromosomale DNA wird durch ein selten schneidendes Restriktionsenzym (z.B. *Sma*I) verdaut und im Agarosegel, welches einer Wechselfeldspannung ausgesetzt wird, aufgetrennt. Die entstandenen Bandenmuster ermöglichen eine Einteilung in bestimmte Genomtypen [1]. Sequenzbasierte Typisierungsmethoden werden daneben vermehrt in den letzten Jahren angewendet. Durch die Teilsequenzierung einzelner konservierter Genabschnitte können verschiedene Typen durch den Sequenzpolymorphismus eindeutig definiert werden. Dies erlaubt eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus verschiedenen Laboratorien und eine präzise Benennung der einzelnen Typen. Durch die Multilokus-Sequenz-Typisierung (MLST, Teilsequenzierung von Genen, die für Enzyme des Primärstoffwechsels kodieren) können außerdem auch klonale Linien innerhalb einer Spezies aufgedeckt werden [82]. Die Ergebnisse der PFGE decken sich im Allgemeinen mit denen, die durch MLST gewonnen werden [85]. So sind epidemisch auftretende MRSA sowohl durch bestimmte *Sma*I-Makrorestriktionsmuster als auch durch definierte MLST-Typen auffällig.

Eine weitere *S. aureus* spezifische Typisierungsmethode stellt die *agr*-Typisierung (PCR) dar. Dieses Verfahren erlaubt eine Unterscheidung unterschiedlicher *S. aureus*-Stämme [91] auf Grund des Polymorphismus im *agr*-Operon. Dabei lassen sich *S. aureus*-Stämme in 4 verschiedene *agr*-Interferenzgruppen einteilen [33]. Es wurde diskutiert, dass die 4 *agr*-Gruppen eine frühe Unterartbildung innerhalb von *S. aureus* darstellen könnten. Bei der *agr*-Typisierung wird ein *agr*-spezifisches PCR-Fragment mit den Restriktionsenzymen *Dra*I und *Alu*I verdaut. Unter Nutzung dieser Restriktionsenzyme können die *agr*-Hauptgruppen (I-IV) klassifiziert werden. Diese lassen sich weiter in zehn verschiedene Untergruppen einteilen. Die *agr*-Gruppe I kann in vier Untergruppen (Ia, Ib, Ic und Id) aufgeteilt werden. Die Untergruppen Ia, Ib und Ic lassen sich sehr leicht schon beim *Alu*I-Restriktionsverdau nachweisen. Die *agr*-Id ist hingegen erst nach der Anwendung beider Enzyme, *Dra*I und *Alu*I, unterscheidbar: *agr*-Id weist im *Dra*I-

Restriktionsverdau ein *agr*-Ib-Fragment und im *AluI*-Restriktionsverdau ein *agr*-Ia-Fragment auf [21]. Durch die *agr*-Typisierung wird eine Zuordnung der *S. aureus*-Stämme zu einer bestimmten *agr*-Gruppe ermöglicht.

In verschiedenen Studien ist versucht worden, bestimmte Krankheitsbilder einer bestimmten *agr*-Gruppe zuzuordnen. Ein Zusammenhang zwischen *agr*-Gruppen und Erkrankungen konnte in wenigen Fällen nachgewiesen werden. Gelungen ist dies beim Toxic-Shock-Syndrom-Toxin (TSST) [33] und bei der durch Leukozidin bedingten nekrotisierenden Pneumonie [59]. Beide Erkrankungen scheinen vorwiegend vom *S. aureus*-Stamm der *agr*-Gruppe III ausgelöst zu werden [33; 59]. Eine weitere Erkrankung ist das Scalded-Skin-Syndrom, verursacht durch Exfoliatin-produzierende *S. aureus*-Stämme, die zum größten Teil der *agr*-Gruppe IV angehören. Es gibt jedoch auch andere Stämme, die das Exfoliatintoxin produzieren, aber den *agr*-Gruppen I und II zugeordnet werden können [30].

1.10 Ziele dieser Arbeit

In einer vorangegangenen Arbeit konnte dokumentiert werden, dass Isolate von CF-Patienten mit 51% und Kontrollisolate von Gesunden mit 41% der *agr*-Gruppe I angehörten. Isolate aus chronischen Wunden von Diabetikern gehörten hingegen signifikant häufiger der *agr*-Gruppe II (62% der Isolate) an [20]. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit sich ein Zusammenhang zwischen *agr*-Gruppe II Isolaten und Diabetes bestätigen lässt. Hierfür sollten Nasen- und Wundisolate von Diabetikern typisiert und mit Infektionsisolaten eines anderen Patientenkollektivs verglichen werden. Daneben sollte bei Diabetikern die *S. aureus*-Kolonisation von Nase und Wunde verglichen werden. Hierzu sollte zunächst die Prävalenz von *S. aureus* bei diesen Patienten erfasst werden. Weiterhin sollte untersucht werden, inwieweit diese Patienten gleichzeitig mit verschiedenen Stämmen besiedelt sein können.

2 Material und Methode

2.1 Chemikalien, Enzyme, Geräte, Materialien und Programme

2.1.1 Agarosen und Chemikalien

DNA Agarose		Biozym, Hess, Oberndorf
Small DNA Agarose		Biozym, Hess, Oberndorf
Staphaurex		Murex, Burgwedel
Ethidiumbromid	10mg/ml	Appli Chem, Darmstadt
Albumin (BSA)	20mg/ml	Roche, Mannheim
dNTPs	10mM	Roche, Mannheim
Primer (PCR)		Invitrogen, Karlsruhe
Nuclease freies Wasser		Ambion, Wiesbaden
PCR- Purification- Kit		Qiagen, Hilden
H ₂ O Aqua bidest Ampuwa		Fresenius Kabi, Deutschland

2.1.2 Enzyme

Ambicin L (Lysostaphin)	10mg/ml	Ambi Products LLC, New York
Proteinase K	10mg/ml	Appli Chem, Darmstadt
Polymerase Taq Hot Star	5U/μl	Qiagen, Hilden
<i>DraI</i>	10U/μl	Roche, Mannheim
<i>AluI</i>	10U/μl	Roche, Mannheim
<i>SmaI</i>		Roche, Mannheim

2.1.3 Molekulargewichtsstandard

100 bp DNA Ladder	250μg (1,0μg/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
-------------------	------------------	-----------------------

2.1.4 Geräte, Materialien, Programme

Columbia-Blutagar	heipha, Heidelberg
Columbia-Blutagar mit CNA	heipha, Heidelberg
Mannit-Kochsalz-Phenolrot- Agar	heipha, Heidelberg
Oxacillinplatten	heipha, Heidelberg
BBL Cultureswab Plus	Becton Dickinson AG, Basel- CH
PCR-Maschine	Hybaid, Heidelberg
WINCAM 2.2	Cybertech, Berlin
Photometer	Milton Roy, USA

2.1.5 Medien und Stammlösungen

blue juice	50% Glycerin, 1mM EDTA, 0,25% Bromphenolblau, pH 8,0
TSB	30g TSB für 1l
10x TBE	10mM Tris, 0,9ml Borat, 0,01ml EDTA, pH 8,0
50x TAE	2 M Tris- HCL, 1 M Essigsäure, 0,1 M EDTA pH 8,2
10x TE	10mM Tris, 10mM EDTA, Aqua bidest auf 1l, pH 8,0
Proteolysepuffer	0,25M EDTA, 20mM EGTA, 1% Laurylsarcosin pH 9,0
Lysepuffer	6mM Tris, 100mM EDTA, 1M NaCl, 0,5% Brig 58, 0,2% Na Desoxycholat, 0,5% Laurylsarosin pH 7,6
Waschlösung	10mM Tris- HCL, 10mM EDTA, 10mM EGTA, 1M NaCl pH 7,5

2.2 Patienten und Untersuchungsmaterial

2.2.1 Patienten/ Untersuchungszeitraum Tübingen

Von März 2003 bis zum August 2003 wurden Patienten im Rahmen der Wundsprechstunde in der Abteilung für Allgemeine Chirurgie und Poliklinik der Universitätsklinik Tübingen, unter der Leitung von Prof. Dr. Becker und Prof. Dr. Coerper, Wund- und Nasenabstriche entnommen. Das Patientenkollektiv umfasste 50 Diabetiker mit einer chronischen Wundinfektion.

2.2.2 Patienten/ Untersuchungszeitraum Basel

In einem Baseler Krankenhaus wurden von Patienten aufgrund eines akuten Entzündungsgeschehens im Rahmen normaler Krankenhausabstriche Wundabstriche entnommen. Die Abstriche wurden vom Januar 2001 bis zum September 2002 gewonnen. Das Baseler Kollektiv diente für die vorliegende Arbeit als Kontrollgruppe.

2.3 Isolierung und Anzucht der Bakterien

Die Proben der Nasen- und Wundabstriche von Diabetikern, sowie die Proben der Kontrollgruppe wurden auf Schafsblutagar und auf Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agar-Platten ausgestrichen und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Mithilfe des Staphaurex Testes wurden die Bakterien als *S. aureus* identifiziert. Die *S. aureus*-Kolonien wurden im Hinblick auf phänotypische Varianten untersucht. Die Pigmentierung und das Hämolyseverhalten wurden differenziert betrachtet. Beim Vorliegen von phänotypischen Varianten einer Probe wurden die *S. aureus*-Kolonien vereinzelt und getrennt in TSB:Glycerin (3:1) bei -75°C eingefroren.

2.4 DNA Isolierung und PCR

Zur Isolierung der DNA wurden die Isolate in 5ml TSB ÜN bei 37°C inkubiert. Von der Lösung wurden 1000µl bei 10.000upm für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Dem so gewonnenen Pellet wurde 100µl 1x TE und 3µl Lysostaphin (5µl/ml) zugefügt und bei 37°C für 20 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 400µl Proteolysepuffer und 10µl Proteinase K (5µl/ml) mit weiterer Inkubation für 1 Stunde bei 55°C im Wasserbad. Die Proteinase K wurde danach bei 95°C für 10 Minuten inaktiviert. Die so gewonnene DNA wurde, je nach Konsistenz, in einem Verhältnis 1:10 oder 1:100 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Für die Gesamtmenge des Ansatzes für 50µl *agr*-PCR (Tab. 1) wurden folgende Reagenzien verwendet:

Tab. 1: Für den *agr*-PCR-Ansatz verwendete Reagenzien. Gesamtmenge des Ansatzes: 50µl

Reagenz	Menge
10x Puffer	5µl
dNTP Mix	4µl
MgCl ₂	2µl
Primer 1	1µl
Primer 2	1µl
Nuclease-freies H ₂ O	34,5µl
Polymerase Taq Hot Star	0,5µl
DNA- Template	2µl
Gesamt	50µl

*Primer bei *agr*-PCR und *mecA*- PCR unterschiedlich.

Je Probe wurde 48µl des Mastermix und 2µl Template verwendet. Für die DNA-Amplifikation wurde das in Tabelle 2 beschriebene Temperaturprofil für eine PCR verwendet.

Tab. 2: Temperaturprofil für die DNA-Amplifikation in der *agr*-PCR

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

Für die Polymerase-Kettenreaktion wurden folgende zwei Primer verwendet:

agr 1801 5`-ACC AGT TTG CCA CGT ATC-3`

agr 3668 5`-TAA ACC ACG ACC TTC ACC-3`

Das vervielfältigte PCR-Produkt hat eine Länge von 1884 bp.

2.5 Agarose Gel nach der PCR

Ein 1%iges Agarose Gel (0,70g Agarose auf 70 ml 1x TAE-Puffer) und 7µl Ethidiumbromid. 5µl der PCR und 3µl blue juice wurde auf das Gel aufgetragen, als Referenz wurde 3µl von dem 100 base-paar Ladder aufgetragen. Das Gel wurde 45 Minuten einer Spannung von 120V ausgesetzt. Anschließend wurde dieses Gel unter einer UV-Lampe fotografiert (Abb. 2).

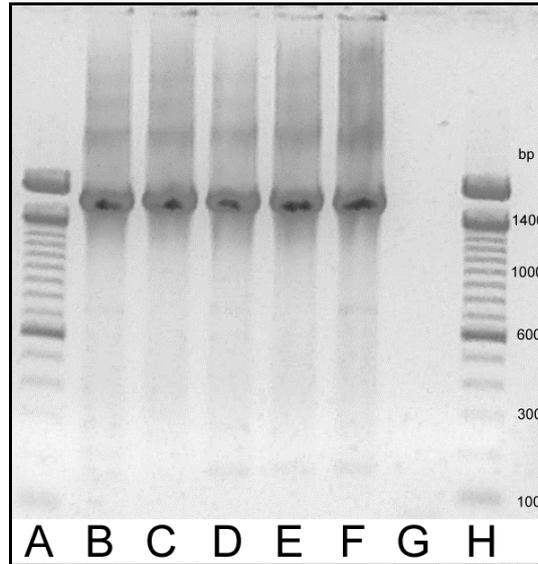


Abb. 2: *agr*-PCR-Produkte auf 1%-igem Agarose Gel. Spur A und H: Marker 100bp DNA Ladder mit Beschriftung in bp. Spur B bis F: PCR-Produkte. Spur G: Negativkontrolle Wasser

2.6 Der Restriktionsverdau mit den Enzymen *AluI* und *DraI*

Aus der Tabelle 3 geht die Zusammensetzung für den Ansatz des Restriktionsverdaus mit den Enzymen *AluI* und *DraI* hervor.

Tab. 3: Für den Ansatz des Restriktionsverdaus verwendete Reagenzien. Gesamtmenge des Ansatzes: 20 μ l

Reagenz	Menge
DNA aus PCR	7 μ l
10xPuffer	2 μ l
Restriktionsenzym	1 μ l
BSA	1 μ l
Nuklease-freies H ₂ O	9 μ l
Gesamt	20 μ l

Die Inkubationszeit betrug 4 Stunden bei 37°C.

Nach dem Restriktionsverdau wurde der Ansatz auf ein 3%iges Agarosegel (Small DNA) aufgetragen. (Abb.8, *AluI*-/ und *DraI*-Restriktionsverdau, Seite 42)

2.7 Zuordnung der Isolate zu den *agr*-Gruppen

Die DNA-Banden wurden nach dem *AluI*- und *DraI*-Restriktionsverdau digitalisiert aufgenommen. Die Auswertung der Restriktionsverdau-Gele, sowie die Zuordnung zu den *agr*-Gruppen erfolgte visuell, indem bekannte Restriktionsmuster von bereits charakterisierten *agr*-Typen mit den vorliegenden *agr*-Bandenmustern verglichen wurden. Beim Vorliegen von unklaren Ergebnissen wurde die DNA erneut vervielfacht und erneut auf ein Gel aufgetragen und ausgewertet. In den Gelen der PCR zeigten sich alle Isolate einheitlich mit einer Bandengröße von 1,8 kb.

Ein *AluI*- und *DraI*-Restriktionsverdau-Gel ist in Abbildung 8 (Seite 42) dargestellt.

2.8 Untersuchung der Proben auf eine MRSA Resistenz

Alle Proben des Tübinger Patientenkollektivs wurden auf Oxacillinplatten ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Bei einem *S. aureus* Wachstum auf den Platten wurde eine DNA-Isolierung vorgenommen, um mithilfe der *mecA*-PCR das Ergebnis erneut zu überprüfen.

2.8.1 MRSA Nachweis durch *mecA*-PCR

Um eine Methicillin-Resistenz bei *S. aureus* festzustellen wurde eine *mecA*-PCR mit folgenden Primern durchgeführt:

mecA-P7 5'-CCA CTT CAT ATC TTG TAA CG- 3'

mecA-P4 5'-TCC AGA TTA CAA CTT CAC CAG G- 3'

Das vervielfältigte PCR-Produkt hat nach der DNA-Amplifikation eine Länge von 162 bp. Das Temperaturprofil für die *mecA*-PCR ist in der Tabelle 4 aufgeführt.

Tab. 4: Temperaturprofil für die DNA-Amplifikation in der *mecA*-PCR

Temperatur	Zeit		Anzahl Zyklen
94°C	15 min	Polymerase Aktivierung	
94°C	30s	Denaturierung	35 Zyklen
53°C - 49°C pro Zyklus	30s	Annealing	
72°C	30s	Verlängerung	
72°C	10 min	Verlängerung	

2.9 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die Isolate wurden in einer ÜNK in 5ml TSB bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 3 Minuten bei 10.000upm zentrifugiert. Dem Pellet wurde anschließend 1000µl Waschlösung zugegeben. Erneutes zentrifugieren und absaugen des Überstandes. Zugabe von 100µl Waschlösung und 2% low melting point Agarose, auf 55°C erwärmt. Beides wurde in kleine vorgefertigte Gusskammern zum aushärten pipettiert. Diese Agaroseblöckchen wurden in 1000µl Lysepuffer und 5µl Lysostaphin (10mg/ml) als ÜNK bei 4°C auf einer Bewegungsplatte inkubiert.

Der Lysepuffer wurde am darauf folgenden Tag abgesaugt. Den Proben wurde 1000µl Proteolysepuffer und 50µl Proteinase K (10mg/ml) zugegeben, anschließend wurden die Proben in ein Wasserbad bei 50°C gestellt. Nach 8 Stunden erfolgte ein erneuter Wechsel der Lösung und die Proben wurden im Wasserbad belassen. Am dritten Tag erneutes absaugen der Lösung. Zugabe von 1000µl 1x TE-Puffer. Die Proben wurden je eine Stunde bei 4°C auf einem Bewegungstisch gewaschen. Nach (insgesamt 5 Mal) wurde der 1x TE-Puffer erneuert. Ein etwa 0,5x 0,5mm großes Stück des Blöckchens wurde abgeschnitten und ÜN bei Raumtemperatur im Ansatz von je 200µl verdaut. Aus der Tabelle 5 geht die Zusammensetzung des Ansatzes für den PFGE-Verdau hervor.

Tab. 5: Für den Ansatz des PFGE-Verdaus. Gesamtmenge des Ansatzes: 200µl

Reagenz	Menge
DNA	
Aqua bidest	78µl
Puffer A	20µl
BSA	1µl
<i>Smal</i>	1µl
Gesamt	200µl

Der Ansatz des Verdaus wurde abgesaugt und nach Zugabe von 500µl 1x TE-Puffer gestoppt. Die in Agarose eingebetteten Proben wurden auf einen Trägerkamm aufgetragen und anschließend von einer flüssigen Gellösung aus 1,2g Agarose auf 120ml 0,5 TBE umgeben. Das Gel wurde mit 0,5x TBE als Laufpuffer für 24 Stunden einem Spannungsfeld von 200V ausgesetzt. Die Auftrennung der DNA erfolgte mit Pulszeiten von einer bis zu 45 Sekunden bei einer konstanten Temperatur von 12°C. Nach Abschluss des Programms wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt.

2.9.1 Dokumentation und Auswertung

Das gefärbte Agarosegel wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht und digitalisiert aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mithilfe des Computerprogramms Kodak 1DLE 35. Die Berechnung des Verwandtschaftsgrades der Isolate erfolgte mit dem Computerprogramm WINCAM 2.2 mithilfe des Dice-Koeffizienten (s). Dieser Koeffizient wurde durch die Auszählung von gleichen und ungleichen Banden innerhalb einer Irrtumswahrscheinlichkeit von gleichen und ungleichen Banden nach folgender Formel berechnet:

$$s = \frac{2a}{(2a + b + c)}$$

- s = Ähnlichkeit bzw. Distanz zwischen beiden Bandenmustern
- a = Anzahl der Banden, die in beiden Bandenmustern vorliegen
- b = Anzahl der Banden im 1. Bandenmuster, die nicht im 2. Bandenmuster vorliegen
- c = Anzahl der Banden im 2. Bandenmuster, die nicht im 1. Bandenmuster vorliegen

Isolate gehörten dann einem gemeinsamen Genomtyp an, wenn der Verwandtschaftsgrad der Isolate im Rahmen von 87% bis 100% übereinstimmte. Bei unklaren Ergebnissen wurden die Proben erneut auf ein Gel aufgetragen und nochmals ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 *S. aureus* Prävalenz chronischer Wunden und Nasen bei Diabetikern

Um die Prävalenz von *S. aureus* bei Diabetikern mit chronischen Wunden bestimmen zu können, wurden im Rahmen der Wundsprechstunde der Abteilung für Allgemeine Chirurgie und Poliklinik der Universität Tübingen bei 50 Diabetikern insgesamt 100 Wund- und Nasenabstriche gesammelt. Insgesamt konnte bei 38 Proben mithilfe des Staphaurex Tests *S. aureus* nachgewiesen werden: 50% (25/50) der Wundabstriche und 26% (13/50) der Nasenabstriche waren *S. aureus* positiv. 20% (10/50) der Patienten waren gleichzeitig in der Nase und der Wunde positiv für *S. aureus*. 44% (22/50) der Patienten waren sowohl in Wunde als auch Nase *S. aureus* negativ.

Eine *S. aureus*-Kolonisation nur in der Wunde konnte bei 30% (15/50) der Patienten dokumentiert werden, nur 6% (3/50) der Patienten waren ausschließlich in der Nase mit *S. aureus* besiedelt. Demnach war bei den Patienten die Besiedlung durch *S. aureus* in der Wunde häufiger als in der Nase. Die Prävalenz von *S. aureus* bei Diabetikern ist in Abbildung 3 dargestellt.

Unter allen auf eine *S. aureus*-Kolonisation getesteten Diabetikern waren 33 Männer und 17 Frauen. Eine *S. aureus* positive Kolonisation wurde bei 45,45 % (15/33) der Männer und 58,82% (10/17) der Frauen dokumentiert. Das Durchschnittsalter der Männer lag bei 68,0 Jahren, das der Frauen bei 69,9 Jahren.

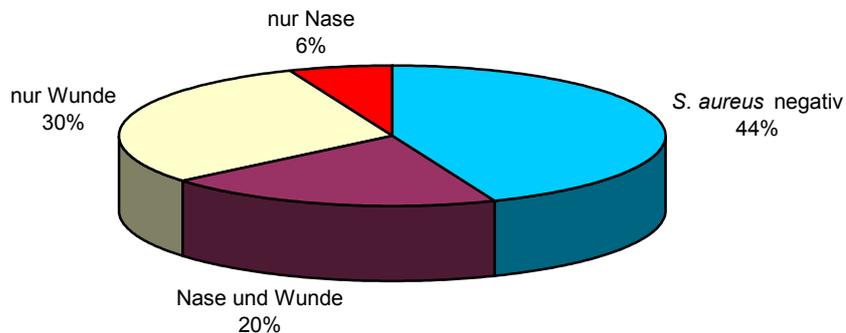


Abb. 3 Prävalenz von *S. aureus* bei 50 Diabetikern

3.2 *S. aureus* Infektionsisolate von Nicht-Diabetikern

In einem Baseler Krankenhaus wurden im Rahmen normaler Krankenhausuntersuchungen von Patienten Abstriche (z.B. Punktate aus der Hüfte, Liquor-Proben, Abszessabstriche und Biopsien) genommen. Aus diesem Patientenkollektiv standen 46 *S. aureus* positive Isolate als Kontrollisolate zur Verfügung. Unter den auf *S. aureus* positiv getesteten Patienten waren 63,04% (29/46) Männer und 36,96% (17/46) Frauen. Das Durchschnittsalter der Männer lag bei 44,74 Jahren, das der Frauen bei 50,72 Jahren. Zum Patientenkollektiv gehörten neben Erwachsenen auch wenige Tage alte Säuglinge und Kleinkinder. Alle Patienten hatten eine durch *S. aureus* verursachte Infektion mit entsprechenden klinischen Symptomen.

3.3 Phänotypische *S. aureus* Varianten in Wund- und Nasenabstrichen von Diabetikern

In früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe war aufgefallen, dass insbesondere von infizierten Materialien (z.B. Sputumproben von Patienten mit Mukoviszidose) *S. aureus*-Kolonien innerhalb einer Probe unterschiedliche Morphologie, Farbe und/oder Hämolysemuster aufwiesen. In der vorliegenden Arbeit wurden daher alle Proben auf das Auftreten solcher Varianten untersucht.

Um phänotypische Varianten einer Probe selektieren zu können, wurde jede Probe auf einer Schafsblutagarplatte ausgestrichen und die Pigmentierung und Hämolyse der Einzelkolonien nach einer Inkubationszeit von 48h beurteilt. Einzelkolonien mit unterschiedlicher Ausprägung der Pigmentierung und/oder Hämolyse wurden getrennt subkultiviert und durch den Staphaurex Test identifiziert. Die Subkulturen wurden entsprechend der Patientenummer bezeichnet und verschiedene Varianten einer Probe durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet.

3.3.1 Charakterisierung der Pigmentierung

Insgesamt konnten die Koloniepigmentierungen in vier Farbnuancen unterteilt werden:

1. grau
2. weiß
3. gelb
4. weiß-gelb

S. aureus-Kolonien, die weiß-gelb pigmentiert waren, zeigten, ähnlich wie bei einem Spiegelei, eine weiße Unterfläche und mittig oben aufgesetzt einen gelben Punkt.

3.3.2 Charakterisierung der Hämolysemuster

Um das Hämolyseverhalten der einzelnen Proben beurteilen zu können, wurden alle Proben auf Schafsblutagar-Platten ausgestrichen und nach 48h visuell beurteilt. Das Hämolyseverhalten der *S. aureus*-Kolonien wurde nach folgenden fünf Kriterien charakterisiert: 1. β -Hämolyse positiv (Hlb)

2. keine Hämolyse (-)

3. wenig ausgeprägte Hämolyse (+/-)

4. Hämolyse vorhanden (+)

5. starke Hämolyse (++)

Die folgenden Abbildungen (Abb. 4-7) von *S. aureus* positiven Proben, die aus Nasen- und Wundabstrichen gewonnen wurden, zeigen anschaulich die unterschiedlichen Hämolysereaktionen. Dargestellt sind *S. aureus*-Kolonien auf Blutagarplatten. Die durch Hlb verursachte Hämolyse lässt sich eindeutig durch einen diffusen Hof, der durch Inkubation bei 4°C verstärkt wird, identifizieren (Heiß-Kalt-Lyse) (siehe Abb. 6). Davon unterschieden wurde ein klarer Hämolysehof direkt um die Kolonien (verursacht wahrscheinlich durch α -Hämolyse). Die Kolonien wurden semi-quantitativ je nach Größe dieses Hämolysehofs klassifiziert.



Abb. 4: Blutagarplatte mit *S. aureus*-Ausstrich. Der linke Ausstrich zeigt Kolonien, die keine Hämolysebildung aufweisen. Der rechte Ausstrich zeigt Kolonien mit einer wenig ausgeprägten (+/-) Hämolysereaktion.



Abb. 5: Blutagarplatte mit *S. aureus*-Ausstrich. Die Kolonien beider Plattenhälften zeigen eine starke Hämolysereaktion (++).



Abb. 6: Blutagarplatte mit *S. aureus*-Ausstrich. Die linke Plattenhälfte zeigt Kolonien mit einer durch β -Hämolytin hervorgerufenen Hämolyse (H_{2b}) im Zusammenhang mit einer fehlenden Hämolyse (-). Rechts liegt eine Kolonie mit einer wenig ausgeprägten Hämolyse (+/-) vor.



Abb. 7: Blutagarplatte mit *S. aureus*-Ausstrich. Die linke Plattenhälfte zeigt Kolonien mit einer Hämolyse (+). Rechts liegt eine wenig ausgeprägte Hämolyse (+/-) vor.

3.3.3 Phänotypische Charakterisierung der *S. aureus*-Isolate aus Wunden und Nasen von Diabetikern

Die Wundabstriche wurden auf die Existenz von phänotypischen Varianten einer Probe visuell untersucht. Bei 24% (6/25) der *S. aureus* positiven Wundabstrichproben waren mindestens zwei phänotypisch unterscheidbare *S. aureus*-Varianten nachweisbar. Bei 4 der Patienten konnten zwei unterschiedliche Kolonien, bei zwei Patienten jeweils 3 unterschiedliche Kolonien detektiert werden. Daher wurden insgesamt 33 Wundisolate von 25 Patienten charakterisiert.

Bei der visuellen Auswertung der 13 Nasenabstriche konnten keine phänotypischen Varianten einer Probe festgestellt werden. Obwohl heterogene Proben ausschließlich bei Wundabstrichen nachgewiesen werden konnten, (6/25) zeigt die Auswertung durch den Fisher Exact Test, auf Grund der zu kleinen Stichprobe, keine ausreichende Signifikanz ($p=0.07$).

Im Folgenden werden die *S. aureus*-Isolate der 6 Patienten mit heterogenen Wundisolaten beschrieben (Tab. 8 und 9)

Patient 8 (Isolate W8c, W8d, N8b): Diese beiden Wundisolate fielen durch eine unterschiedliche Pigmentierung (gelb und grau) auf. Das Hämolyseverhalten der beiden Kolonien war identisch. Das Nasenisolat dieses Patienten (N8b) ähnelt im Hämolyseverhalten und der Pigmentierung dem Wundisolat W8d.

Patient 18 (Isolate W18a und W18 b): Der Unterschied lag im Pigmentierungs- und Hämolyseverhalten. Auffällig war vor allem die Hlb-Hämolyse beim Isolat W18a. Das Isolat W18b zeigt keine Hlb-Hämolyse.

Patient 22 (Isolate W22a und W22b): Beide *S. aureus*-Kolonien unterscheiden sich in der Pigmentierung und der Hämolyse.

Patient 48 (Isolate W48a und W48b): Hier lag kein Unterschied in der Pigmentierung vor, beide Kolonien waren grau. Die Kolonien unterschieden sich jedoch deutlich hinsichtlich der Hlb-Hämolyse.

Patient 16 (Isolate W16a, W16b und W16c): Diese drei Kolonien zeigten eine phänotypische Variante im Pigmentierungs- und Hämolyseverhalten. Neben einer weiß-gelben Pigmentierung (W16a) konnte zweimal eine gelbe Pigmentierung dokumentiert werden. Das Hämolyseverhalten zweier Kolonien (W16a und W16c) war mit einem schwachen und bei einer Kolonie (W16b) mit einem deutlichen Hämolysehof verbunden.

Patient 32 (Isolate W32a, W32b und W32c): Die phänotypische Variante einer Probe lag im Bereich der Pigmentierung und im Hämolyseverhalten. Die Kolonie (W32a) zeigte eine deutliche Hlb-Hämolyse mit einer (+) Hämolyse und war weiß-gelb pigmentiert. Zwei weitere *S. aureus*-Kolonien zeigten eine weiße (W32b) und eine graue (W32c) Pigmentierung und in beiden Fällen eine schwache Hämolyse.

3.3.4 Vergleich der Hämolyse von Wund-, Nasen- und Kontrollisolaten

Es wurde untersucht, inwieweit sich Wund- und Nasenisolat der Diabetiker hinsichtlich der Hämolyse von den Kontrollisolaten aus Basel unterscheiden (Tab. 7).

Tab. 7: Vergleich der drei Kollektive hinsichtlich Hämolysereaktionen

	Wunde	Nase	Basel	p-Wert ^a	p-Wert ^b	p-Wert ^c
Hlb	8/33	0/13	9/46	0,08	0,18	0,78
keine Hämolyse (-)	2/33	1/13	12/46	1,0000	0,2602	0,0342
starke Hämolyse (++)	7/33	1/13	6/46	0,4088	1,0000	0,3699
Hämolyse (+)	13/33	6/13	25/46	0,7463	0,7552	0,2544

p-Wert^a: Vergleich zwischen Nase/Wunde

p-Wert^b: Vergleich zwischen Basel/Nase

p-Wert^c: Vergleich zwischen Basel/Wunde

Interessanterweise konnte Hlb-Hämolyse nur bei Wund- oder Kontrollisolaten nachgewiesen werden. Die 13 Nasenisolat der Diabetiker waren alle Hlb-

negativ. Auf Grund der wenigen Nasenisolate kann hier jedoch kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Ähnliches gilt für weitere Vergleiche der Nasenisolate hinsichtlich anderer Kriterien. Auffallend war jedoch, dass die Isolate aus dem Baseler Kontrollkollektiv signifikant häufiger nichthämolytisch im Vergleich zu den diabetischen Wundisolaten waren ($p^c = 0,0342$).

3.4 Vergleich der Nasen- und Wundisolate innerhalb eines Patienten

Verglichen wurden die phänotypischen Ausprägungen zwischen den Wund- und Nasenisolaten bei den zehn Patienten, die sowohl in der Wunde als auch in der Nase *S. aureus* positiv sind.

Bei nur 1/10 Patienten wurden die jeweiligen Isolate aus Wunde und Nase gleich hinsichtlich der Hämolyse und Pigmentierung beschrieben. Bei 4 Patienten ist die Hämolysereaktion der Wundisolate stärker im Vergleich zum gleichzeitig gewonnenen Nasenisolat. Bei 5 Patienten jedoch umgekehrt. Bei 4 Patienten unterschieden sich die Wund- und Nasenisolate hinsichtlich der Pigmentierung.

Die unterschiedliche phänotypische Beschreibung bei Nasen- und Wundisolaten eines Patienten könnte auf die Besiedlung mit unterschiedlichen Stämmen hindeuten. Dies sollte durch genetische Typisierung der Isolate überprüft werden (siehe Punkt 3.6.3).

3.5 Genetische Typisierung der *S. aureus*-Isolate

3.5.1 *agr*-Typisierung

Die Isolate aus den drei Patientenkollektiven wurden mithilfe der PCR und dem *AluI*- und *DraI*-Restriktionsverdau auf ihren *agr*-Typ untersucht. Alle Isolate konnten nach dem Restriktionsverdau visuell einer der bekannten *agr*-Hauptgruppen (I-IV) zugeordnet werden. Damit sollte geklärt werden, ob ein Patient mit *S. aureus*-Stämmen unterschiedlicher *agr*-Typen besiedelt ist und ob bestimmte *agr*-Typen gehäuft bei Diabetikern auftreten.

Aus den Tabellen 8, 9 und 10 gehen die *agr*-Gruppen, Genomtypen sowie die Hämolysereaktion und die Pigmentierung der drei Kollektive hervor.

Tab. 8: Wundisolate von Diabetikern. Aufgelistet sind die *agr*-Untergruppen (Ia-IIIa), die Hauptgruppen (I-III), die dazugehörenden Genomtypen und das Hämolyseverhalten sowie die Pigmentierung

Patienten Nr.	Isolat Nr.	<i>DraI</i> Typ	<i>AluI</i> Typ	<i>agr</i> UG ¹	<i>agr</i> HG ²	GT ³	Hämolyse	Hlb- Hämolyse	Pigmen- tierung
4	W 4	II	IIa		IIa	31	++		grau
7	W 7	Ia	Ia		Ia	19	++		grau
8	W 8c	II	IIa		IIa	31	+		gelb
	W 8d	II	IIa		IIa	31	+		grau
9	W 9b	III	III*		IIIa	2	-	Hlb	weiß-gelb
16	W 16a	II	IIb		IIb	36	+/-		weiß-gelb
	W 16b	II	IIb		IIb	36	+		gelb
	W 16c	II	IIb		IIb	36	+/-		gelb
18	W 18a	Ia	Ia		Ia	109	+/-	Hlb	weiß- gelb
	W 18b	Ia	Ia		Ia	109	+/-		grau
22	W 22a	Ia	Ia		Ia	109	+		gelb
	W 22b	Ia	Ia		Ia	109	+/-		grau
24	W 24	Ib	Ib		Ib	7	+/-		grau

32	W 32a	la	la	la	19	+	Hlb	weiß- gelb	
	W 32b	la	la	la	19	+/-		weiß	
	W 32c	la	la	la	19	+/-		grau	
33	W 33	II	IIa	IIa	31	+		grau	
34	W 34	la	la	la	19	+		grau	
35	W 35	la	la	la	121	-	Hlb	grau	
36	W 36a	III	IIIa	IIIa	2	+		grau	
37	W 37a	II	IIb	IIb	36	+		weiß- gelb	
38	W 38	la	la	la	126	++		grau	
39	W 39a	la	la	la	126	++	Hlb	weiß- gelb	
40	W 40	III	IIIa	IIIa	2	+/-		weiß- gelb	
42	W 42	la	la	la	19	++	Hlb	gelb	
43	W 43	la	la	la	126	++		weiß	
44	W 44	lb	lb	lb	7	+		grau	
45	W 45	III	IIIa	IIIa	2	+		grau	
48	W 48a	lb	la	Id	Id	54	+/-	Hlb	grau
	W 48b	lb	la	Id	Id	54	++		grau
49	W 49	III	IIIa	IIIa	2	+	Hlb	gelb	
50	W 50	lb	lb	lb	7	+		grau	
10	W 10	IIb	IIb	IIb	36	+/-		grau	
Gesamt		33							

Untergruppe (UG)¹, Hauptgruppe (HG)², Genomtyp (GT)³

* Isolat W9b zeigt im *AluI*-Restriktionsverdau ein abweichendes *agr*-Fragment.
Der *agr*-Typ III kann nicht eindeutig bestimmt werden.

Tab. 9: Nasenisolate von Diabetikern. Aufgelistet sind die *agr*-Untergruppen (Ia-IIIa), die Hauptgruppen (I-III), die dazugehörigen Genomtypen und das Hämolyseverhalten sowie die Pigmentierung

Patienten Nr.	Isolat Nr.	<i>DraI</i> Typ	<i>AluI</i> Typ	<i>agr</i> HG ¹	GT ²	Hämolyse	Pigmentierung
8	N 8b	II	IIa	IIa	31	+	grau
18	N 18	Ia	Ia	Ia	109	+	grau
24	N 24	Ib	Ib	Ib	7	+	grau
35	N 35	Ia	Ia	Ia	121	+	grau
36	N 36	III	IIIa	IIIa	2	+/-	grau
37	N 37a	II	IIb	IIb	36	+/-	weiß- gelb
40	N 40	Ia	Ia	Ia	121	+	gelb
49	N 49	III	IIIa	IIIa	2	++	gelb
50	N 50	Ib	Ib	Ib	7	+/-	grau
10	N 10	II	IIb	IIb	36	-	weiß- gelb
21	N 21	III	IIIa	IIIa	2	+/-	weiß- gelb
26	N 26	II	IIb	IIb	36	+	gelb
29	N29	II	IIa	IIa	31	+/-	grau
Gesamt	13						

Hauptgruppe (HG)¹, Genomtyp (GT)²

Tab. 10: Isolate der Kontrollgruppe aus Basel. Aufgelistet sind die *agr*-Haupt- und Untergruppen (Ia-IV), die dazugehörigen Genomtypen und das Hämolyseverhalten sowie die Pigmentierung

Patienten Nr.	Isolat Nr.	Dral Typ	Alul Typ	<i>agr</i> UG ¹	<i>agr</i> HG ²	GT ³	Hämolyse	Hlb- Hämolyse	Pigmen- tierung
SD1	T3963	III	IIIb		IIIb	108	+		grau
SD2	T4588	IV	IVa		IVa	128	+/-	Hlb	grau
SD3	T4696	Ib	Ib		Ib	7	+		grau
SD5	T4892	Ia	Ia		Ia	19	+		grau
SD6	T4910	Ia	Ia		Ia	19	+		grau
SD7	T4979	Ic	Ic		Ic	132	++	Hlb	grau
SD8	T5034	II	IIa		IIa	31	+		grau
SD11	M4407	IIb	IIb		IIb	133	+		grau
SD12	T5530b	IV	IVb		IVb	134	+		weiß
SD13	T5540	II	IIb		IIb	133	+		weiß
SD14	T5690	Ib	Ic	le	le	129	+/-	Hlb	weiß
SD19	T6789	II	IIb		IIb	36	+		weiß
SD21	M5005	Ia	Ia		Ia	16	-	Hlb	weiß
SD23	T7077	III	IIIa		IIIa	127	-		weiß
SD25	T7890	Ia	Ia		Ia	19	-		weiß
SD26	T7973	Ia	Ia		Ia	130	++	Hlb	weiß
SD27	T7993	Ib	Ib		Ib	7	+		weiß
SD28	T8192	Ib	Ib		Ib	7	+		weiß
SD29	T8330	II	IIa		IIa	31	+		weiß
SD30	T8599	Ib	Ib		Ib	7	+		weiß
SD31	T8816	Ib	Ic	le	le	129	++	Hlb	weiß
SD32	T8840	III	IIIa		IIIa	2	-		weiß
SD33	T8856a	IIb	IIb		IIb	36	-		weiß
SD34	T9188	Ia	Ia		Ia	19	+		weiß
SD35	T9247	Ib	Ib		Ib	7	-		weiß
SD38	T9270	Ib	Ib		Ib	7	-		weiß
SD39	T9287	Ia	Ia		Ia	19	+		weiß

Ergebnisse

SD40	T9364	II	IIa		IIa	31	-		weiß
SD41	T9415	II	IIb		IIb	36	-	Hlb	gelb
SD42	T9940	Ib	Ia	Id	Id	54	-		weiß
SD43	T922	III	IIIa		IIIa	2	+		weiß-gelb
SD44	T1072	III	IIIa		IIIa	2	+		gelb-grau
SD45	T1127	II	IIa		IIa	31	+		gelb
SD46	T2114	II	IIb		IIb	36	+		weiß
SD47	T2189	Ia	Ia		Ia	19	-		weiß
SD48	T2600	II	IIb		IIb	36	-	Hlb	weiß
SD49	T2781	II	IIa		IIa	131	+		weiß
SD50a	T3003-1	II	IIa		IIa	131	+		weiß
SD50b	T3003-2	II	IIa		IIa	131	+		weiß
SD51	T4876	II	II *		IIc	178	++	Hlb	weiß
SD52	T4875	Ib	Ib		Ib	7	++		weiß
SD53	T4858	Ia	Ia		Ia	16	++		weiß
SD54	T4859	Ia	Ia		Ia	16	+		weiß
SD55a	T4804-1	Ia	Ia		Ia	16	+		weiß
SD55b	T4804-2	Ia	Ia		Ia	16	+		weiß
SD57	T4868	II	IIa		IIa	31	+		weiß
Gesamt	46								

Untergruppe (UG)¹, Hauptgruppe (HG)², Genomtyp (GT)³

* Isolat T4876 zeigt im *AluI*-Restriktionsverdau aufgrund unbekannter Mutation ein abweichendes Muster, das Isolat wurde als agr-Typ IIc bezeichnet (Abb. 8).

3.5.2 *agr*-Typisierung der Wund- und Nasenisolate von Diabetikern

Nach dem *AluI*- und *DraI*-Restriktionsverdau wurden die Isolate 6 verschiedenen Bandenmustern (Ia, Ib, Id, IIa, IIb, IIIa) zugeordnet (Tab. 8 und 9). Zwei Isolate wurden der *agr*-Untergruppe Id zugeordnet. Diese Bandenmuster zeigten im *AluI*-Restriktionsverdau ein Fragment *agr*-Ia und im *DraI*-Restriktionsverdau ein Fragment *agr*-Ib. Nicht dokumentiert werden konnten der *agr*-Typ IV und eine neue *agr*-Gruppe.

3.5.3 *agr*-Typisierung der Kontrollisolate

Die 46 Baseler Isolate (Tab. 10) wurden nach dem *AluI*- und *DraI*-Restriktionsverdau neben den *agr*-Typen I, II, und III zusätzlich in zwei Fällen (Isolate 2/T4588, 12/T5530b) dem *agr*-Typ IV zugeordnet. Bei der Auswertung der Bandenmuster wurden insgesamt 11 unterschiedliche (Ia, Ib, Ic, Id, Ie, IIa, IIb, IIIa, IIIb, IVa und IVb) Bandenmuster dokumentiert. Im Gegensatz zu den Isolaten der Diabetiker konnte bei den Baseler Isolaten noch der *agr*-Typ Ic sowohl im *AluI*- als auch im *DraI*-Restriktionsverdau (Isolat 7/T4979) dokumentiert werden. Die neue *agr*-Gruppe Ie wurde zweimal (Isolate 14/T5690 und 31/T8816) dokumentiert. Die *agr*-Gruppe Ie zeigt im *AluI*-Restriktionsverdau ein Fragment *agr*-Ic und im *DraI*-Restriktionsverdau ein Fragment *agr*-Ib (Abb. 8). In dieser Abbildung ist auch die *agr*-Gruppe Id dargestellt (Isolat 42/T9940). Im *AluI*-Restriktionsverdau zeigt diese *agr*-Gruppe ein Fragment *agr*-Ia und im *DraI*-Verdau ein Fragment *agr*-Ib.

Isolat 51/T4876 zeigt im *AluI*-Restriktionsverdau eine *agr*-II Bande die im Vergleich mit den anderen Banden dieser Gruppe nicht bei 600bp sondern erst bei 700bp beginnt. Dies ist vermutlich auf eine Punktmutation zurückzuführen.

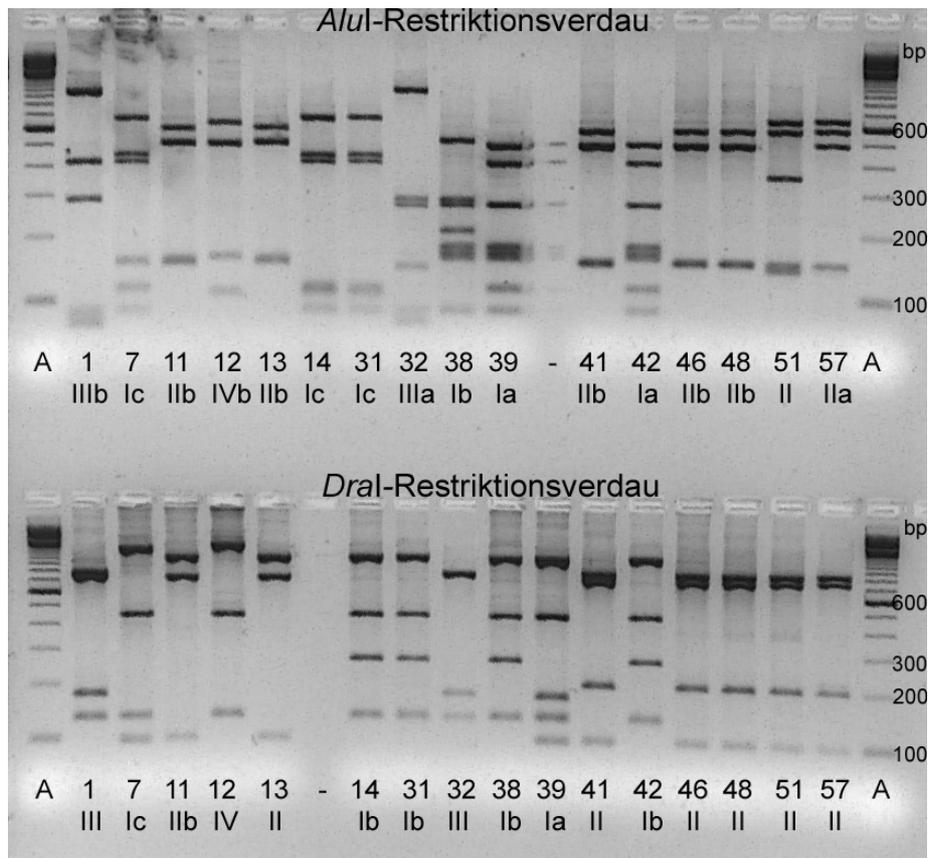


Abb. 8: Durch den *Alul*- und *Dral*-Restriktionsverdau entstandne *agr*-Bandenmuster. Isolatnummern und *agr*-Typen sind entsprechend angegeben. Spur A: Marker 100bp DNA-Ladder. Im *Alul*- und *Dral*-Verdau ist je eine Spur nicht belegt.

3.5.4 Verteilung der *agr*-Typen in den drei Kollektiven

Da in vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe gefunden wurde, dass Wundisolate von Diabetikern in 62% der Fälle der *agr*-Gruppe II zuzuordnen waren, sollte hier geklärt werden, ob dies auch für die hier gewonnenen Isolate zutrifft. Die Abbildung 9 hebt die prozentuale Verteilung der *agr*-Hauptgruppen der Tübinger und Baseler Isolate hervor. Im Säulendiagramm wird unterschieden zwischen den 25 Patienten mit einer chronischen Wundinfektion sowie den 46 Patienten aus Basel.

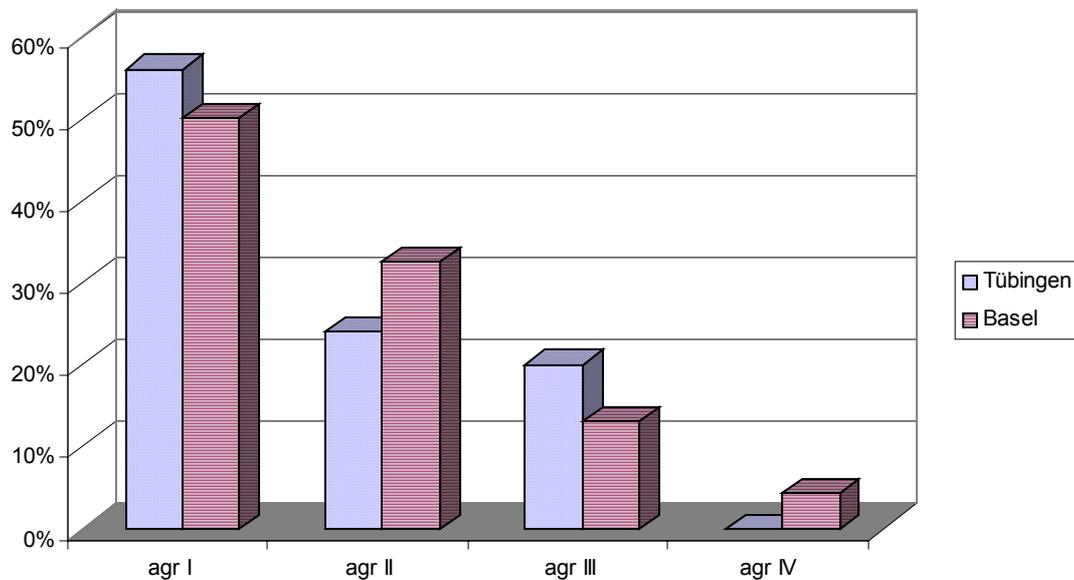


Abb. 9: Säulendiagramm zur prozentualen Verteilung der agr-Hauptgruppen (I-IV) der Wundisolate aus chronischen Wunden bei Diabetiker- (Tübingen) und Kontrollisolaten (Basel)

Tab. 11: Prozentuale Verteilung der ermittelten agr-Hauptgruppen (I-IV) der Tübinger Wundisolate und der Baseler Kontrollisolate. Mit Abbildung 9, Säulendiagramm vergleichbar

	<i>agr I*</i>	<i>agr II*</i>	<i>agr III*</i>	<i>agr IV*</i>
Tübingen	56% (14/25)	24% (6/25)	20% (5/25)	0%
Basel	50% (23/46)	32,61% (15/46)	13,04% (6/46)	4,35% (2/46)

*agr** in %, Anzahl der Patienten

In beiden Kollektiven waren die meisten Isolate der *agr*-Gruppe I zuzuordnen. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der *agr*-Gruppenverteilung der Isolate aus Tübingen (Diabetiker) und Basel (andere Infektionsisolate) nachgewiesen werden.

3.6 Genomtypisierung durch PFGE der drei Kollektive

Zur weiteren molekularen Charakterisierung wurden alle *S. aureus*-Isolate mithilfe der PFGE genetisch typisiert und mithilfe des Computerprogramms WINCAM 2.2 einem Genomtyp zugeordnet. Die Isolate der drei Kollektive konnten in allen Fällen einem Genomtyp zugeordnet werden.

Die Abbildung 10 zeigt exemplarisch einen PFGE-Verdau mit dem *Sma*I-Restriktionsenzym.

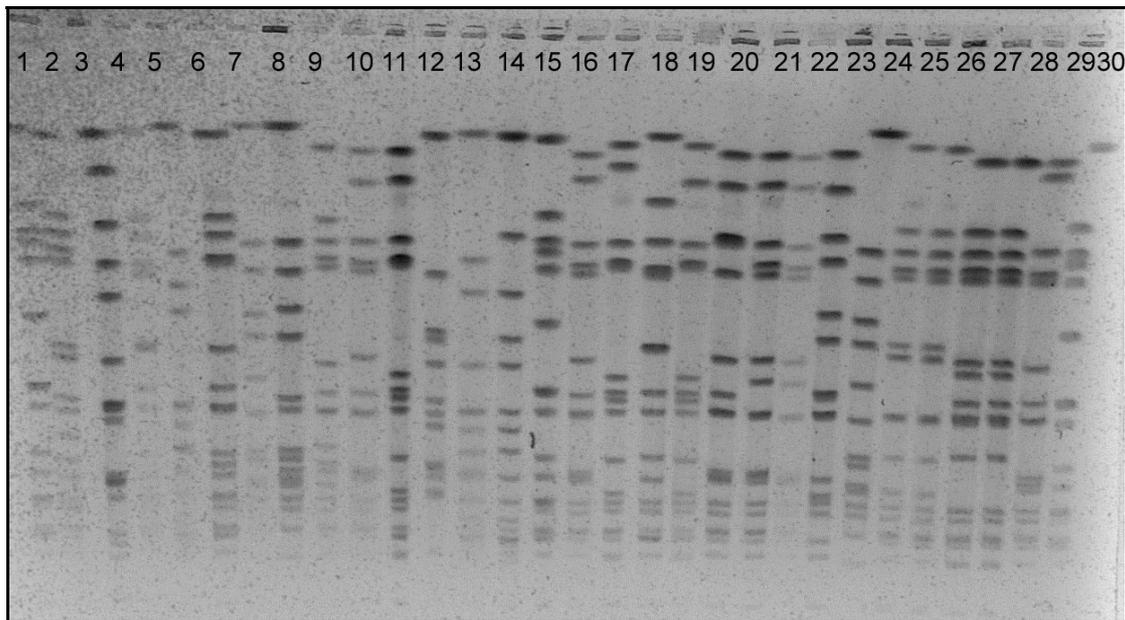


Abb. 10: PFGE-Verdau. Spuren 1, 15 und 30 Col. Exemplarisch zeigen die Spuren 4, 6 und 18 den GT 19, die Spuren 20- 22 den GT 131 und die Spuren 25- 28 den GT 16

3.6.1 Genomtypverteilung in den drei Kollektiven

Durch die PFGE konnten die Isolate 20 verschiedenen Genomtypen zugeordnet werden. Die Isolate von 28 Diabetikern gehörten 9 verschiedenen Genomtypen an, die 46 Isolate von Patienten aus Basel gehörten 17 verschiedenen Genomtypen an. Die Diversität der Kontrollisolate (17/46) und die der Tübinger Wundisolate (9/25) liegt in beiden Kollektiven bei 36%, somit ist die Diskriminierung der Genomtypen gleich. Dies ist weder ein Hinweis auf ein

erhöhtes Übertragungsrisiko bei Diabetikern, noch auf eine besondere Disposition dieser Patienten für gewisse *S. aureus*-Stämme.

Es konnten prävalente und sporadisch auftretende Genomtypen in allen drei Kollektiven ermittelt werden. Die häufigsten Genomtypen (GT) waren 121, 126, 16, 109 und 131. Die vier häufigsten GT 31, 2, 7 und 36 waren sowohl bei den Diabetikern als auch bei den Patienten aus Basel nachweisbar (Tab. 12).

Die Prävalenz dieser Genomtypen liegt bei:

11,90% (10/84) GT 31

13,09% (11/84) GT 36 / GT 2

14,28% (12/84) GT 7

Da die Genomtypen 31, 36, 2 und 7 in allen drei Kollektiven ermittelt wurden, liegt keine besondere Affinität für *S. aureus*-Stämme mit einem spezifischen Genomtyp für Diabetiker vor.

3.6.2 Korrelation von Genomtypen und *agr*-Gruppen bei *S. aureus*-Isolaten

Beide hier verwendeten genetischen Typisierungsmethoden sollten hinsichtlich der Korrelation von Genomtypen und *agr*-Gruppen bei *S. aureus*-Isolaten verglichen werden. Aus der Tabelle 12 geht die Korrelation der Genomtypen und *agr*-Gruppen der drei Kollektive nach der PFGE- und *agr*-Typisierung hervor. Es wurden insgesamt 20 verschiedene Genomtypen und 12 verschiedene *agr*-Typen detektiert. Dargestellt ist die Aufteilung der Genomtypen und *agr*-Gruppen in der Tabelle 12. Isolate mit dem gleichen Genomtyp gehörten in jedem Fall dem gleichen *agr*-Typ an. Umgekehrt konnten die *agr*-Typen auf Grund der PFGE-Typisierung weiter diskriminiert werden. Die beiden Isolate, die der neuen *agr*-Untergruppe le angehören, konnten in beiden Fällen dem Genomtyp 129 zugeordnet werden.

Tab. 12: Korrelation der *agr*-Untergruppen und Genomtypen (GT) der Kontrollisolate aus Basel und der Wund- und Nasenisolate aus Tübingen der insgesamt 84 *S. aureus* positiven Isolate

<i>agr</i> - Gruppe	GT *	Kontrollgruppe	Wund Isolate	Nasen Isolate	Gesamtzahl Isolate
Ia	19	6	4	0	10
	121	0	1	2	3
	126	0	3	0	3
	16	5	0	0	5
	130	1	0	0	1
	109	0	2	1	3
Ib	7	7	3	2	12
Ic	132	1	0	0	1
Id	54	1	1	0	2
Ie	129	2	0	0	2
IIc	178	1	0	0	1
	131	3	0	0	3
IIa	31	5	3	2	10
	36	5	3	3	11
IIb	133	2	0	0	2
	127	1	0	0	1
IIIa	2	3	5	3	11
	108	1	0	0	1
IIIb	108	1	0	0	1
IVa	128	1	0	0	1
IVb	134	1	0	0	1
Gesamt		46	25	13	84

Genomtyp* (GT)

3.6.3 Genomtypischer Vergleich der Nasen- und Wundisolate innerhalb eines Patienten

Bei 35,71% (10/28) der Diabetiker wurde eine *S. aureus*-Kolonisation sowohl der Nase als auch der Wunde festgestellt (Tab. 13). 9/10 Patienten waren in der Wunde und in der Nase mit dem identischen *S. aureus*-Stamm besiedelt. In einem einzigen Fall lag keine Korrelation zwischen Wund- und Nasenisolat in Bezug auf den Genomtyp und die *agr*-Gruppe vor. Ermittelt wurde für den Patienten Nr. 40 ein Stamm des GTs 2/*agr* IIIa im Wundisolat und ein Stamm des GTs 121/*agr* Ia im Nasenisolat.

Tab. 13: GT und *agr*-Gruppe der Wund- und Nasenisolate bei 10 Diabetikern

Patienten-Nr.	Nase	Wunde	Korrelation der GT*	Nase	Wunde	Korrelation der <i>agr</i> -Typen
8	31	31	ja	II	II	ja
18	109	109	ja	I	I	ja
24	7	7	ja	I	I	ja
35	121	121	ja	I	I	ja
36	2	2	ja	III	III	ja
37	36	36	ja	II	II	ja
40	121	2	nein	I	III	nein
49	2	2	ja	III	III	ja
50	7	7	ja	I	I	ja
10	36	36	ja	II	II	ja

3.6.4 Typisierung phänotypischer Varianten bei Wunden von Diabetikern

Durch die *agr*-Typisierung sollte zunächst untersucht werden, ob die 6 Diabetiker, bei denen phänotypisch unterschiedliche Kolonien innerhalb des Wundabstriches gefunden wurden, mit Stämmen unterschiedlicher *agr*-Gruppenzuordnung besiedelt sind. Bei allen 6 Patienten gehörten die variant erscheinenden Isolate jeweils der gleichen *agr*-Gruppe an. Die Isolate von 2 Patienten konnten der *agr*-Gruppe II, die von 4 Patienten der *agr*-Gruppe I zugeordnet werden.

Es ist daher anzunehmen, dass diese Patienten mit nur einem Stamm oder mit verschiedenen Stämmen der gleichen *agr*-Gruppe besiedelt sind.

Jede Probe mit einer zwei- bzw. dreifachen phänotypischen Variante aus den Wundabstrichen der Diabetiker gehörte innerhalb einer Variante demselben Genomtyp an. Jeder Patient war daher nur mit einem Stamm besiedelt – unabhängig vom unterschiedlichen phänotypischen Auftreten hinsichtlich Pigmentierung oder Hämolyse.

3.6.5 Persistenz von *S. aureus* in Wundisolaten

Beim Vergleich mit einer früheren Untersuchung der Arbeitsgruppe, die im Rahmen einer Dissertation vorgenommen worden war, fiel auf, dass 2 Patienten zufällig auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht worden sind. Dabei kam es bei beiden Patienten offensichtlich zum Stammwechsel über die Zeit (Tab. 14).

Patient 1: Im Jahr 2001 konnte der GT 109 ohne Vorliegen einer Methicillin-Resistenz dokumentiert werden. Im Jahr 2005 lag bei diesem Patienten eine zweifache phänotypische Variante einer Probe vor. Beide Isolate konnten dem GT 31 zugeordnet und eine Methicillin-Resistenz nachgewiesen werden.

Patient 2: Hier konnte zwischen 2001 und 2005 ein Wechsel des Genomtyps von GT 31 auf GT 36 dokumentiert werden.

Tab. 14: Persistenz von *S. aureus* bei zwei Patienten. Vergleich der Jahre 2001/2005

Patient	Isolat Nr.	2001		2005		
		GT	MRSA	Isolat Nr.	GT	MRSA
1	W576	109	nein	W8c	31	ja
				W8d	31	ja
2	W589	31	nein	W37a	36	nein

Von beiden Patienten konnten Nasenisolat gewonnen werden. Das Isolat N8b (Bezug zu W8c, W8d) ist dem GT 31 zugeordnet worden, es liegt keine Methicillin-Resistenz vor. Das Nasenisolat N37a hat ebenfalls den GT 36 und keine Methicillin-Resistenz. Bei beiden Patienten kam es zu einem Wechsel des

S. aureus-Stammes und bei Patient 1 zusätzliche zur Ausbildung einer Methicillin-Resistenz.

3.7 Nachweis und Charakterisierung von MRSA-Isolaten

Alle Proben aus Wund- und Nasenabstrichen aus dem Tübinger Patientengut wurden auf Oxacillinplatten ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Es kam in insgesamt 17 Fällen (5 Nasenisolate, 12 Wundisolate) zu einem *S. aureus*-Wachstum auf den Oxacillinplatten. Diese 17 Isolate wurden der *mecA*-PCR auf das Vorhandensein des *mecA*-Gens, kodierend für das alternative Penicillinbindeprotein, überprüft. Bei 6 Isolaten konnte *mecA* nachgewiesen und damit die Methicillin-Resistenz genetisch bestätigt werden. Anschließend wurden durch die PFGE drei unterschiedliche Genomtypen ermittelt und wie folgt zugeordnet: Die 6 *mecA* positiven Isolate (Tab. 15) wurden den GT31, GT19 und GT121 zugeordnet. Ein Patient (Nr. 40) war gleichzeitig MRSA und MSSA positiv. Im Nasenisolat lag eine Methicillin-Resistenz vor, im Wundisolat dagegen keine.

Eine Methicillin-Resistenz wurde bei 15,15% (5/33) der Wundisolate und 7,70% (1/13) der Nasenisolate nachgewiesen. Insgesamt waren 10% (5/50) der Diabetiker mit MRSA besiedelt.

Tab. 15: Wund- und Nasenisolate von Diabetikern mit Methicillin-resistenten *S. aureus*-Stämmen. Aufgezeigt ist neben den Patienten und Isolat-Nummern der GT und die *agr*-Hauptgruppe

Patienten Nr.	Isolat Nr.	GT*	<i>agr</i> - HG°	MRSA
4	W 4 ¹	31	II	ja
7	W 7	19	I	ja
8	W 8c	31	II	ja
	W 8d	31	II	ja
33	W 33	31	II	ja
40	N 40 ²	121	I	ja
Gesamt		6		

*Genomtyp (GT), °Hauptgruppe (HG), ¹ Wundisolat (W),

²Nasisolat (N)

Bei Patient Nr. 8 liegt im Nasenisolat (N8b) trotz des GT 31 keine Methicillin-Resistenz vor.

4 Diskussion

S. aureus Prävalenz bei Diabetikern

Mithilfe der vorliegenden Stammsammlung wurde zunächst die Prävalenz von *S. aureus* in der Nase und auf Wunden bei 50 Diabetikern bestimmt. 50% (25/50) der Wundabstriche und 26% (13/50) der Nasenabstriche waren *S. aureus* positiv. Die nasale *S. aureus*-Trägerrate variiert bei gesunden Erwachsenen zwischen 15% und 40% [91]. Damit konnte in dieser Studie bei Diabetikern kein Hinweis für eine höhere Prävalenz von *S. aureus* in Bezug auf eine Nasenkolonisation gefunden werden. In der Literatur wurde verschiedentlich beschrieben, dass Diabetiker häufiger mit *S. aureus* in der Nase besiedelt sind [51; 71; 85]. Tamer et al. [69] fanden in ihrer Untersuchung, dass die nasale *S. aureus*-Trägerrate bei Patienten mit einem insulinpflichtigen Typ II Diabetes gegenüber gesunden Individuen signifikant ansteigt. Tuazon et al. [76] wiesen nach, dass insulinpflichtige Patienten mit Diabetes mellitus häufiger mit *S. aureus* kolonisiert sind als nicht insulinpflichtige Diabetiker. Die *S. aureus*-Kolonisationsraten bei insulinpflichtigen Diabetikern und drogenabhängigen Individuen sind mit 34% und 35% nahezu identisch. Nur 11% der nicht insulinpflichtigen Diabetiker waren laut seiner Studie *S. aureus* positiv [76]. Neuere Untersuchungen kommen zu dem Ergebnis, dass die Prävalenz bei insulinpflichtigen Diabetikern bei 56,4% und bei nicht insulinpflichtigen bei 29% liegt [39]. Als Gründe für die in dieser Arbeit ermittelte geringe Prävalenz für Nasenabstriche können eine geringe Patientenanzahl sowie die Auswahlkriterien angenommen werden. In dieser Arbeit wurde nicht zwischen insulinpflichtigen Diabetikern und solchen, die über orale Antidiabetika therapiert werden, differenziert. Möglicherweise ist ein Großteil der untersuchten Diabetiker nicht insulinpflichtig. Das Patientenkontingent umfasst ältere Individuen mit einem Durchschnittsalter von 69,9 Jahren bei Frauen und 68 Jahren bei Männern. Es ist anzunehmen, dass diese Diabetiker hauptsächlich den Diabetes mellitus Typ II aufweisen. Dieser wird in der Regel über orale Antidiabetika therapiert. Zudem werden Patienten häufig antibiotisch

therapiert, dies führt möglicherweise zur Elimination von *S. aureus* aus der Nase.

Für die vorliegende Untersuchung wurden nur Diabetiker mit chronischen Wundinfektionen, welche nicht weiter klassifiziert worden sind, ausgewählt. Aus einer aktuellen Studie geht hervor, dass 54,6% der Infektionen im Bereich von Haut, Weichgewebe, Knochen und Gelenken bei Krankenhauspatienten von *S. aureus* verursacht wurden [49]. Dang et al. [12] konnten nachweisen, dass die *S. aureus*-Prävalenz in diabetischen Ulcera von 1998 bis 2001 signifikant von 28,8% auf 48,3% ($P < 0,005$) gestiegen ist. Sotto et al. [68] konnten bei Diabetikern zeigen, dass 51,4% (37/72) der Wunden *S. aureus* positiv waren. Damit liegt die hier beobachtete Prävalenz von 50% der *S. aureus* positiven Ulcera in der gleichen Größenordnung, wie sie auch in anderen Studien gefunden wurde.

MRSA bei Diabetikern

Die Wund- und Nasenisolate der Diabetiker wurden in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich einer Methicillin-Resistenz untersucht. Nach der *mecA*-PCR waren 5 der 50 Diabetiker mit MRSA besiedelt (4 Wundisolate und ein Nasenisolat). Bei 3 Patienten wurde MRSA (Genomtyp 31) [18] der klonalen Linie ST05 (Rheinessen) nachgewiesen. Ermittelt wurde in der vorliegenden Untersuchung eine MRSA-Prävalenz von 10%. In Deutschland liegt die Prävalenz für MRSA bei einem mittleren Anteil von 20,7%. Auf Intensivstationen liegt dieser Anteil, bezogen auf alle *S. aureus*-Infektionen - bei 36,6% (KISS Stand 2005) [91]. Aus einer aktuellen französischen Studie geht hervor, dass Diabetiker mit einer chronische Wunde zu 31% MRSA positiv waren [42]. Im Vergleich mit Studien aus Griechenland und Frankreich liegen diese Ergebnisse deutlich unter den von Tentolouris et al. [73] mit 50% und von Sotto et al. [68] mit 48,6% beschriebenen MRSA-Prävalenzen in diabetischen Fußulcera. Tentolouris et al. [73] beschrieben, dass MRSA-Isolate aus Fußulcera häufiger bei Patienten mit infizierten als mit nicht infizierten Ulcera auftraten. MRSA

positive Ulcera wurden zu 47,8% und MSSA positive Wunden zu 52,6% antibiotisch behandelt [73].

Als Risikofaktoren für eine MRSA-Kolonisation wird neben einem Krankenhausaufenthalt auch die ambulante Pflege durch qualifiziertes Personal angegeben [4]. In der Tübinger Universitätsklinik werden MRSA positive Diabetiker isoliert in ambulanten Zimmern versorgt. Diese Hygienemaßnahme kann ein Grund für die geringe MRSA-Prävalenz bei Diabetikern in Tübingen sein.

Agr-Typverteilung Diabetiker/Kontrollgruppe

Aus vorangegangenen Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe geht hervor, dass chronische Wunden signifikant häufiger mit *S. aureus* der *agr*-Gruppe II (62% der Isolate) kolonisiert waren [20]. In der vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung von *agr*-spezifischen Primern eine *agr*-Typisierung der Stammsammlung vorgenommen. Die Isolate konnten den bekannten *agr*-Gruppen (I-IV) zugeordnet werden. 56% der Isolate von Diabetikern mit chronischen Wundinfektionen und 50% der Isolate der Kontrollgruppe gehörten der *agr*-Gruppe I an. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Isolaten von Diabetikern im Vergleich zu infektiösen Stämmen anderer Patientenkollektive gefunden werden. Es ist daher anzunehmen, dass die früher beobachtete Häufung von *agr*-Gruppe II Isolaten durch nosokomiale Übertragung verursacht war. Hierfür spricht, dass damals Patienten vorwiegend mit GT31 (*agr*-II) Isolaten besiedelt waren. MRSA-Stämme dieses Genomtyps (sogenannter Rheinhessen-Klon) sind im Universitätsklinikum Tübingen weit verbreitet und stellen den predominantesten MRSA-Stamm in Tübingen und Umgebung dar (Wolz, persönliche Mitteilung). Zwischen den zwei Studien wurden ein Patientenscreening und Isolierungsmaßnahmen für MRSA-Patienten eingeführt. Diese Maßnahmen haben den Ausbruch wahrscheinlich unterbrochen und eine Häufung tritt nicht mehr auf.

Die Auswertung der vorliegenden Ergebnisse zeigte eine deutliche Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren auf. Die *agr*-

Interferenz-Gruppen I-III sind auch in der vorliegenden Arbeit die häufigsten drei *agr*-Gruppen [21]. Die *agr*-Gruppen II-IV konnten nach dem *AluI*-Restriktionsverdau identifiziert und in zwei Untergruppen eingeteilt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit korrelieren mit den für die *agr*-Gruppen II-IV in der Literatur beschriebenen prozentualen Verteilung [21].

Die *agr*-Gruppe I weist nach dem *AluI*- und *DraI*-Restriktionsverdau die größten Sequenz-Variationen auf. Sie umfasst die Untergruppen Ia, Ib, Id [21] und Ic. Die *agr*-Untergruppe Ia war in beiden Kollektiven am häufigsten [21]. Im Baseler Kollektiv (Kontrollgruppe) konnte die neue *agr*-Gruppe Ie identifiziert werden. Die Bandenmuster der *agr*-Gruppe Ie zeigten nach der *agr*-PCR im *AluI*-Restriktionsverdau ein Fragment *agr*-Ic, und im *DraI*-Verdau ein Fragment *agr*-Ib. Die *agr*-Gruppe I kann aufgrund dieser Untersuchung nun in 5 Untergruppen (Ia, Ib, Ic, Id und Ie) eingeteilt werden.

In der vorliegenden Untersuchung konnte ein Fall einer vorliegenden Interferenz zwischen der *agr*-Gruppe I im Nasenisolat und der *agr*-Gruppe III im Wundisolat ermittelt werden. Die *agr*-Gruppe III inhibiert die *agr*-Gruppe I [30; 33].

Die *agr*-Gruppe II konnte in der vorliegenden Arbeit gleichwertig in die *agr*-Untergruppen IIa und IIb unterteilt werden [21]. Ein Isolat des Baseler Kollektivs zeigt aufgrund einer unbekanntes Mutation im *AluI*-Restriktionsverdau ein abweichendes Bandenmuster. Dieses Isolat wurde als *agr*-Typ IIc charakterisiert. 32,6% (15/46) der Kontrollisolate und 24% (6/25) der Isolate von Diabetikern gehörten zur *agr*-Gruppe II. Diese Werte sind vergleichbar mit der Untersuchung von Goerke et al. [21], welche 32% (71/219 aller Isolate) dem *agr*-Typ II zuordneten. 13% (6/46) der Kontrollisolate und 20% (5/25) der Isolate von Diabetikern gehörten zur *agr*-Gruppe III. Goerke et al. [21] zeigten in ihrer Untersuchung, dass 19% (41/219) aller Isolate der *agr*-Gruppe III angehören. In der vorliegenden Arbeit konnte dokumentiert werden, dass die *agr*-Untergruppe IIIb (1/84) selten und Isolate der Untergruppe IIIa (12/84) häufiger nachweisbar waren [21].

Die Auswertung zeigte auch in dieser Arbeit, dass die *agr*-Gruppe IV selten vorkommt.

Korrelation der Typisierungsergebnisse

In dieser Arbeit sollten die Ergebnisse der *agr*-Typisierung und der Genomtypisierung korreliert werden. Die *agr*- und PFGE-Typisierung zeigen eine hohe Übereinstimmung, da Stämme mit einem bestimmten Genomtyp immer der gleichen *agr*-Untergruppe zugeordnet werden konnten. Innerhalb einer *agr*-Gruppe konnten jedoch verschiedene Genomtypen auftreten. Dieses Ergebnis zeigt eine Übereinstimmung mit Arbeiten von Goerke et al. [21], die bereits gezeigt haben, dass die Genomtypisierung mittels PFGE eine höhere Diskriminierungskapazität gegenüber der *agr*-Typisierung aufzeigt. Trotzdem traten auch bei der Genomtypisierung prävalente und sporadische Genomtypen auf. Sowohl in dieser Arbeit als auch in einer vorangegangenen wurden die Genomtypen 7, 2, 36 und 31 als prävalent beschrieben. In dieser Arbeit konnte für die aufgeführten Genomtypen eine Prävalenz zwischen 11% und 14% ermittelt werden. Das vorliegende Ergebnis macht deutlich, dass Diabetiker keine besondere Affinität für *S. aureus*-Stämme mit einem spezifischen Genomtyp haben. Die frühere auffällige Häufung einiger Genomtypen bestätigt die Vermutung, dass in der früheren Studie eine Übertragung der *S. aureus*-Stämme innerhalb der Klinik stattfand.

In der *agr*-Gruppe I (Ia-Ie) war die Genomvielfalt mit 10 unterschiedlichen Genomtypen am größten. Im Speziellen konnten der *agr*-Gruppe Ia 6 verschiedene Genomtypen zugeordnet werden. Ermittelt wurden für die *agr*-Gruppen IIa, IIb und IIIa je zwei unterschiedliche Genomtypen. Die *agr*-Gruppen IIIb, IVa und IVb konnten je einem Genomtyp zugeordnet werden.

Genotypische Bestimmungen von *S. aureus*-Stämmen konnten in Untersuchungen zeigen, dass 80% der durch *S. aureus* verursachten Bakteriämien endogenen Ursprungs waren [81; 84]. Eine kausale Beziehung zwischen einer nasalen *S. aureus*-Kolonisation und Infektionen, wird durch die Tatsache unterstützt, dass der nasale *S. aureus*-Stamm und der die Infektion verursachende *S. aureus*-Stamm einen gemeinsamen Phagen- oder Genomtyp haben [85].

Übertragung Nase - Wunde oder umgekehrt

Interessanterweise waren in der vorliegenden Arbeit nur 20% (10/50) der Patienten gleichzeitig mit *S. aureus* in der Nase und in der Wunde besiedelt. Bei 90% (9/10) dieser Patienten konnte der gleiche *S. aureus*-Genomtyp ermittelt werden. Aufgrund der Typisierungsergebnisse hat bei 9 Diabetikern nachweislich ein Austausch von *S. aureus* zwischen der Nase und der Wunde stattgefunden. Der Infektionsweg und damit verbunden die Infektionsquelle kann in der vorliegenden Untersuchung nicht genau definiert werden. Den Diabetikern wurde in dieser Untersuchung nur einmalig ein Nasen- und Wundabstrich entnommen. Der Zeitpunkt der Erstbesiedlung durch *S. aureus* konnte aufgrund dieser Einmaligkeit der Untersuchung nicht dokumentiert werden. Diese Fragestellung des Infektionsweges und der Infektionsquelle kann nur in einer Longitudinalstudie untersucht werden, in die Diabetiker einbezogen sind, die zum Zeitpunkt der Untersuchung nachweislich *S. aureus* negative Individuen sind. Eine solche Untersuchung kann eine Antwort auf eine mögliche endogene oder exogene Infektionsquelle gegeben.

Im Falle einer endogenen Wundinfektion kämen die Hände des Patienten als Übertragungsquelle in Betracht [84]. Eine exogene Infektion kann durch kontaminierte Handschuhe des Pflegepersonals innerhalb des Klinikums herbeigeführt werden [71]. Auch Familienangehörige kämen als exogene Infektionsquellen in Betracht. Eine Untersuchung konnte zeigen, dass bis zu 65% der Menschen, die in einem Haushalt zusammenleben, einen gemeinsamen, genomtypisch identischen *S. aureus*-Stamm aufweisen [85]. In Bezug auf eine klar definierte Antwort hinsichtlich der Infektionsquelle müssen neben den Diabetikern auch deren Familienangehörige sowie das Pflegepersonal in die Untersuchung eingebunden werden. Nasenabstriche von allen im Zusammenhang stehenden Individuen über einen längeren Zeitraum müssen analysiert und in einen Zusammenhang gebracht werden.

In der vorliegenden Untersuchung war ein Patient mit zwei unterschiedlichen *S. aureus*-Stämmen besiedelt. Ein Austausch zwischen Nase und Wunde hat aufgrund der Typisierungsergebnisse nicht stattgefunden. Dieser Diabetiker

kann ein intermittierender *S. aureus*-Träger sein, der im Laufe der Zeit eine Kolonisation mit unterschiedlichen *S. aureus*-Stämmen erfahren hat [85]. Unklar ist aber auch hier die zeitliche Reihenfolge der Kolonisation.

30% (15/50) der Patienten waren ausschließlich in der Wunde mit *S. aureus* besiedelt. Dies spricht gegen die Nase als primäres Reservoir. Eine ähnliche Beobachtung wurde in einer Studie von Ridder-Schaphorn et al. gemacht [65]. Sie fanden, dass bei Patienten mit Cystischer Fibrose signifikant häufiger eine Oropharynx-Kolonisation mit *S. aureus* vorlag, als eine Nasenkolonisation [65].

Eine weitere Kontrolle der Patienten, die ausschließlich in der Wunde mit *S. aureus* kolonisiert sind ist sinnvoll. Hier stellt sich die Frage, inwieweit überhaupt eine Kolonisation der Nase stattfinden wird. Immerhin sind 20% der Bevölkerung keine Träger von *S. aureus* [60; 71].

Varianten in Wunden

Die *S. aureus*-Primärkulturen von Diabetikern mit chronischen Wundinfektionen wurden visuell auf das Vorliegen von phänotypischen Varianten untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Nasenisolate der Diabetiker ausnahmslos homogen waren. Dieses Ergebnis wird durch andere Untersuchungen bestätigt, da *S. aureus*-Kolonien von Nasenabstrichen gesunder Probanden meist homogen sind [23]. Heterogene Proben von Diabetikern konnten bei 24% (6/25) der Wundabstriche dokumentiert werden. Darunter waren 4 Patienten mit einer zweifachen und 2 Patienten mit einer dreifachen phänotypischen Variante in einer Probe. Die untersuchten heterogenen Isolate zeigten Unterschiede in der Hämolyse, gefolgt von Unterschieden in der Pigmentierung [23]. In der vorliegenden Untersuchung war demnach die Bakterienpopulation von Wunden tendentiell heterogen im Vergleich zu den Nasenisolaten. Auf Grund der wenigen Nasenisolate war der Unterschied jedoch nicht signifikant ($p=0,07$ Fisher's Exact Test). Die Tendenz bestätigt jedoch die Hypothese, dass sich Bakterien unter eher infektiösen Bedingungen schneller verändern. Goerke et al. [23] konnten in ihrer Untersuchung von Patienten mit Cystischer Fibrose zeigen, dass phänotypische

Varianten im Sputum von chronischen Lungeninfektionen im Vergleich zu Nasenisolaten signifikant häufiger vorkommen.

HLB in Wunden

Isolate der drei Kollektive sollten durch Inspektion der Primärkultur phänotypisch bezüglich des Hämolyseverhaltens, insbesondere der Hlb-Hämolyse der einzelnen *S. aureus*-Kolonien, differenziert werden. Eine Hlb-Hämolyse konnte bei Nasenisolaten von Diabetikern in keinem Fall (0/13) dokumentiert werden. Aus anderen Untersuchungen geht hervor, dass 96% der Nasenisolate gesunder Patienten infolge einer Phageninsertion einen Hlb-negativen Typ zeigten. Dagegen waren 33% der Sputumisolate von CF-Patienten und 30% von Bakteriämieisolaten Hlb-positiv [22]. In der vorliegenden Arbeit zeigten die Primärkulturen der diabetischen Wundisolate im Vergleich mit den Baseler Wundisolaten (Kontrollisolate) nicht signifikant mehr Hlb-Hämolysen ($p=0,0342$ Fisher's Exact Test). In einer Untersuchung von Goerke et al. [22] konnten signifikant mehr Hlb-positive Isolate bei infektiösen Isolaten detektiert werden als bei Nasenisolaten.

Der Verlust der Hlb-Produktion steht in direktem Zusammenhang mit dem Erwerb des *sak*-Gens (Hlb^- , sak^+) infolge einer Phageninsertion in das chromosomale *hly*-Gen [22]. Die fehlende Hlb-Hämolyse in Nasenisolaten deutet auf eine Staphylokinase-Produktion hin [34]. Die diabetischen Wundisolate sind häufiger Hlb-positiv und daraus schlussfolgernd Staphylokinase-negativ. Jin et al. [34] wiesen in ihrer Studie nach, dass die Staphylokinase-Produktion allgemein signifikant geringer ist bei Isolaten von Patienten mit einer letal verlaufenden Bakteriämie, als bei nicht letal verlaufenden Bakteriämien oder bei Isolaten von nosokomialen Trägern [34]. In Bezug auf die Kontrollisolate muss *S. aureus* aufgrund einer Phageninsertion im Besitz des *sak*-Gens sein, da diese Isolate häufiger Hlb-negativ waren. Hämolsine ermöglichen *S. aureus* das Eindringen ins Gewebe; bei den Kontrollisolaten scheint eine Kolonisation der Wunde durch Staphylokinase möglich zu sein.

Bei 3 Diabetikern konnte gezeigt werden, dass *S. aureus* seinen Phagen zugunsten einer Hlb-Hämolyse wieder abgegeben hat, da im Gegensatz zum Nasenisolat eine Hlb-Hämolyse im Wundisolat nachgewiesen werden konnte. *S. aureus* adaptiert seine Virulenzfaktoren im Bezug auf seine Umgebung und kann sich so seinen Kolonisationsbedingungen anpassen.

Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine *S. aureus*-Prävalenz für Wundabstriche von 50% und für Nasenabstriche von 26% dokumentiert. Die Nase stellt bei Diabetikern für *S. aureus* kein primäres Reservoir dar. Die molekulare Charakterisierung der Diabetiker Isolate wies nach, dass diese Patientengruppe keine besondere Affinität zu einem *S. aureus*-Stamm einer spezifischen *agr*-Gruppe und einem besonderem Genomtyp hat.

Ein systematisches Screening von Diabetikern im Hinblick auf eine nosokomiale *S. aureus*-Kolonisation ist sinnvoll. Davon unabhängig müssen alle chronischen Wunden in Bezug auf eine *S. aureus*-Kolonisation im Hinblick auf MSSA und MRSA untersucht werden. Isolierungsmaßnahmen bei MRSA-Patienten führen zum Rückgang von MRSA-Infektionen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Untersuchung sollten *S. aureus* positive Wund- und Nasenisolate von Diabetikern mithilfe von molekularen Typisierungsmethoden charakterisiert werden. Ziel war die Ermittlung einer genetischen Disposition bei Diabetikern in Bezug auf einen spezifischen *S. aureus*-Stamm.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die *S. aureus*-Prävalenz von 50% (25/50) bei Wundabstrichen und 26% (13/50) bei Nasenabstrichen ermittelt. Dabei tritt eine selektive Kolonisation der Wunde mit 30% (15/50) häufiger auf als eine gleichzeitige Besiedlung von Wunde und Nase mit 20% (10/50). Chronische Wunden sind beim Diabetiker zu einem Drittel häufiger mit *S. aureus* kolonisiert als die Nase.

MRSA konnte in dieser Arbeit durch die *mecA*-PCR insgesamt bei 10% (5/50) der Diabetiker dokumentiert werden. Eine Methicillin-Resistenz liegt in Wundisolaten mit 15,15% (5/33) häufiger vor als bei Nasenisolaten mit 7,70% (1/13). Dieses Ergebnis veranschaulicht einen Rückgang von Methicillin-Resistenzen bei Diabetikern in Tübingen, gegenüber den aus der Literatur bekannten Werten. Dies ist auf die vorgenommene Patientenisolierung innerhalb des Klinikums zurückzuführen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Phänotypische Varianten einer Probe durch das Hämolyseverhalten und die Pigmentierung der *S. aureus*-Kolonien bestimmt. Es konnte kein signifikant ($p=0,07$ Fisher's Exact Test) häufigeres Vorkommen von heterogenen Wundproben von Diabetikern mit einer zwei- bzw. dreifachen phänotypischen Variante einer Probe im Vergleich zu den Kontrollisolaten festgestellt werden. Die H1b-Hämolyse wurde nur bei diabetischen Wundisolaten und bei Kontrollisolaten dokumentiert. Die Wundisolate der Baseler Kontrollgruppe waren signifikant häufiger ($p= 0,0342$ Fisher's Exact Test) H1b-negativ.

Die in dieser Arbeit beschriebenen molekularen Typisierungsmethoden, die Genomtypisierung durch PFGE und die *agr*-Typisierung, korrelieren miteinander. Zudem konnte eine Zuordnung der Isolate zu den unterschiedlichen Genomtypen und definierten *agr*-Gruppen (I-IV) erfolgen.

Die Genomvielfalt zeigt in beiden Kollektiven (Baseler Kontrollisolate und Diabetiker Isolate) eine annähernd gleiche Diskriminierung der Genomtypen. Neben sporadisch vorkommenden Genomtypen konnten prävalente Genomtypen (GT 7, 2, 36 und 31) dokumentiert werden. Dieses Ergebnis veranschaulicht, dass Diabetiker keine besondere Affinität zu einem spezifischen Genomtyp haben.

In der vorliegenden Arbeit konnte die *agr*-Ie Untergruppe als neuer *agr*-Typ definiert werden. Diese *agr*-Gruppe zeigt im *AluI*-Restriktionsverdau ein *agr*-Fragment *agr*-Ic und im *DraI*-Restriktionsverdau ein Fragment *agr*-Ib (Abb 8).

Isolate von Diabetikern gehören nach der Auswertung der *agr*-Typisierung zu 56% und Kontrollisolate zu 50% der *agr*-Gruppe I an. Das vorliegende Ergebnis dieser Untersuchung erbringt den Nachweis, dass keine Krankheitsspezifität des *agr*-Typs I und damit verbunden keine genetische Disposition beim Diabetiker für einen spezifischen *S. aureus*-Stamm vorliegt.

6 Literatur

1. **Arbeit R.D.** 1997. *Laboratory Procedures for Epidemiologic Analysis*. In: Crossley K.B., Archer G.L. (Eds.). *The staphylococci in human disease*. Churchill Livingstone. New York, Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, San Francisco, Tokyo; 253-286
2. **Armstrong D.G., Lavery L.A., Nixon B. P., and Boulton A.J.** 2004. It's Not What You Put On, but What You Take Off: Techniques for Debriding and Off-Loading the Diabetic Foot Wound. *Clinical Infectious Diseases* 39:92-9
3. **Arvidson S.** Extracellular Enzymes. 2006. In: Gram-positive Pathogens. P 478-485. 2nd edition, edited by Fischetti V.A. et al. ASM Press, Washington, D.C.
4. **Beam J., Buckley B.** 2006. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Prevalence and Risk Faktors. *Journal of Athletic Training* 41(3): 337-340.
5. **Bohach G.A.** *Staphylococcus aureus* Exotoxins. 2006. In: Gram-positive Pathogens. P 464-477. 2nd edition, edited by Fischetti V.A. et al. ASM Press, Washington, D.C.
6. **Bowler PG, Duerden BL, Armstrong DG.** 2001. *Wound microbiology and associated approaches to wound management*. *Clin Microbiol Rev* 14(2):244-69.
7. **Bradley S. F.** 2002. *Staphylococcus aureus* Infections and Antibiotic Resistance in Older Adults. *Clinical Infectious Diseases* 34:211-6
8. **Breen JD, Karchmer AW.** 1995. *Staphylococcus aureus* infections in diabetic patients. *Infect Dis Clin North Am* 9 :11-24.
9. **Bryan CS, Dew CE, Reynolds KL.** 1983. *Bacteremia associated with decubitus ulcers*. *Arch Intern Med* 143:2093-5.
10. **Casewell M.W.** Dulwich Public Health Laboratory and King`s College School of Medicine and Dentistry. 1998. *The nose: an underestimated source of Staphylococcus aureus causing wound infection*. In *New advances in preventing serious infections with Staphylococcus aureus during surgery and dialysis*. *J. Hospital Infect.* 40:3-11.
11. **Cicmir I., Berger M., Gries F. A.** 1985. *Die diabetische Polyneuropathie*. In *Diabetes Mellitus*. Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, Köln. P. 226-283.
12. **Dang C.N., Prasad Y.D., Boulton A.J., and JudenE.B.** 2003. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the diabetic foot clinic: a worsening problem. *Diabetes Medicine*. 20:159-161.
13. **Diederer B., Kluytmans J.** 2006. The emergence of infections with community-associated Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Infection* 52: 157-168.

14. **Dufour P., S. Jarraud, F. Vandenesch, T. Greenland, RP. Novick, M. Bes, J. Etienne, and G. Lina.** 2002. *High Genetic Variability of the agr Locus in Staphylococcus aureus Species.* Journal of Bacteriology. 184:1180-1186
15. **Eaglstein W, Falagna V.** 1997. *Chronic wound.* Surg Clin North Am 77(3):689-700.
16. **Galpin JE, Chow AW, Bayer AS, Guze LB.** 1976. *Sepsis associated with decubitus ulcers.* Am J Med 61(3):346-50.
17. **Gardner SE, Frantz RA, Doebbeling BN.** 2001. *The validity of the clinical signs and symptoms used to identify localized chronic wound infection.* Wound Repair Regen 9(3):178-86
18. **Gardner, S.E., Frantz, R. A., Saltzman, C. L., Dodgson K. J.** 2004. *Staphylococcus aureus is associated with high microbial load in chronic wounds.* Health Management Publications, Inc. 16(8):251-257
19. **Gillet Y., Issartel B., Vanhems P., Fournet J-C., Lina G., Bes M., Vandenesch F., Piémont Y., Brousse N., Floret D., and Etienne J.** 2002. *Association between Staphylococcus and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients.* Lancet 359: 753-759.
20. **Goerke C., Kümmel M., Dietz K., Wolz C.** 2003. *Evaluation of Intraspecies Interference Due to agr Polymorphism in Staphylococcus aureus during Infection and Colonization.* The Journal of Infectious Diseases 188:250-6
21. **Goerke C., Esser S., Kümmel M., Wolz C.** 2005. *Staphylococcus aureus strain designation by agr and cap polymorphism typing and delineation of agr diversification by sequence analysis.* IJMM 295 (2005) 67- 75.
22. **Goerke C., Wirtz C., Flückiger U., and Wolz C.** 2006. *Extensive phage dynamics in Staphylococcus aureus contributes to adaptation to the human host during infection.* Molecular Microbiology (2006) 61(6), 1673-1685.
23. **Goerke C., Gressinger M., Endler K., Breitkopf C., Wardecki K., Stern M., Wolz C., Kahl B.** 2007. *High phenotypic diversity in infecting but not in colonizing Staphylococcus aureus populations.* Environmental Microbiology 9(12): 3134-3142.
24. **González-Zorn B., Senna J. P., Fiette L., Shorte S., Testard A., Chingard M., Courvalin P., and Grillot- Courvalin C.** 2005. *Bacterial and Host Factors Implicated in Nasal Carriage of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Mice.* Infection and Immunity. 73:1847-1851.
25. **Götz F., Bannerman T. and Schleifer K-H.** 2006. *The Genera Staphylococcus and Micrococcus.* In: Prokaryotes 4:5-75. DOI: 10.1007/0-387-30744-3_1.
26. **Grundmann H., Aires-de-Sousa M., Boyce J., Tiemersma E.** 2006. *Emergence and resurgence of Methicillin- resistant Staphylococcus aureus as a public- health threat.* Lancet 368: 874-85
27. **Herwaldt L.A.** 1998. *Reduction of Staphylococcus aureus nasal carriage and infection in dialysis patients.* Journal of Hospital Infections. 40: 13-23

28. Heczko P.B., Bulanda M., and Hoeffler U. 1990. *Nasal Carriage of Staphylococcus aureus and its Influence on Hospital Infections Caused by Methicillin-Resistant Strains*. Zbl. Bakt. 274, 333-341. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/New York.
29. Janzon L, Arvidson S. 1990. The role of the delta- lysin gene (hld) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (agr) in Staphylococcus aureus. EMBO J. 9:1391-9.
30. Jarraud S., Lyon G.J., Figueiredo A.M.S., Gerard L., Vandenesch F., Etienne J., Muir T.W., and Novick R.P. 2000. *Exfoliatin- Producing Strains Define a Fourth agr Specificity Group in Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol p. 6517-6522.
31. Jeffcoate W. J., Lipsky B. A. 2004. *Controversies in diagnosing and managing Osteomyelitis of the foot of Diabetes*. Clinical Infectious Diseases 39: S115-22
32. Jeremy M., Yarwood and Slievert PM. 2003. Quorum sensing in Staphylococcus infections. J. Clin. Invest. 112:1620-1625
33. Ji G., Beavis R., and Novick R.P. 1997. *Bacterial Interference Caused by Autoinducing Peptide Variants*. Science 276: 2027-2030.
34. Jin T., Bokarewa M., McIntyre L., Farkowski A., Corey G. R., Reller L. B., and Fowler V. G., Jr. 2003. *Fatal outcome of bacteraemic patients caused by infection with Staphylokinase-deficient Staphylococcus aureus strain*. Journal of Medical Microbiology (2003) 52:919-923.
35. Jörgens V., Grüsser M. 1992. *Diabetes in der Praxis*. P. 63, 67. Deutscher Ärzte-Verlag Köln.
36. Kayser F.H. , Bienz K., Eckert J., Lindenmann J. 1993. Medizinische Mikrobiologie. Immunologie, Bakteriologie, Mykologie, Virologie, Parasitologie. *Erreger bakterieller Infektionskrankheiten*. P. 153-155. 8. Auflage. Thieme.
37. Kipp F., Friedrich A.W., Becker K., von Eiff C. 2004. *Bedrohliche Zunahme Methicillin-resistenter Staphylococcus-aureus-Stämme*. Deutsches Ärzteblatt 101: A 2045-2050 (Heft 28-29)
38. Kluytmans, J., Mouton J.W., Ijzerman E.P.F., Vandenbroucke-Graus C.M.J.E., Maat A.W.P.M., Wagenvoort J.H.T., and Verburgh H.A. 1995. *Nasal carriage of Staphylococcus aureus as a Major Risk Faktor for Wound Infactions after Cardiac Surgery*. J. Infect. Dis. 171:216-9.
39. Kluytmans J., van Belkum A., and Verburgh H. 1997. Pathogenesis of Endogenous infections. In *Nasal Carriage of Staphylococcus aureus: Epidemiology, Underlying Mechanisms, and Associated risks*. Clinical Microbiology Reviews. P.505-520. Vol.10, No.3.
40. Kluytman J., Wertheim H. 2005. *Nasal Carriage of Staphylococcus aureus and Prevention of Nosocomial Infections*. Infection 33: 3-8.

41. **Krasner D, Rodeheaver G, Sibbald G, (eds).** 2001. *Chronic wound care: A clinical sourcebook for healthcare professionals*, Third Edition. Wayne, PA: HMP Communications
42. **Lecornet E., Robert J., Jacqueminet S., Ha Van Georges, Jeanne S., Bouilloud F., Veyrie C., Jarlier V., Grimaldi A., Hartemann-Heurtier A.** 2007. Pre-emptive isolation to prevent methicillin resistant *Staphylococcus aureus* cross-transmission in diabetic foot. *Diabetes Care* Vol. 30 No. 9, 2007.
43. **Lindsay J.A. and Holden M.T.G.** 2004. *Staphylococcus aureus: superbug, super genome?* Elsevier Vol.12 No. 8.
44. **Lipsky BA, Pecoraro RE, Ahroni JH.** 1990. *Foot ulceration and infections in elderly diabetics.* *Clin Geriatr Med* 6:747-69.
45. **Lipsky BA, Pecoraro RE, Wheat LJ.** 1990. *The diabetic foot: soft tissue and bone infection.* *Infect Dis Clin North Am* 4:409-32.
46. **Lipsky B. A.,** 1997. Osteomyelitis of the foot in Diabetic Patients. *Clinical Infectious Diseases* 25: 1318- 26
47. **Lipsky B. A.** 2004. *Medical Treatment of Diabetic foot Infections.* *Clinical Infectious Diseases* 39:104-14
48. **Lipsky B. A., Itani K., Norden C., and the Linezolid Diabetic Foot Infections Study Group.** 2004. *Treating foot infections in Diabetic Patients: A randomized, multicenter, open-label trial of Linezolid versus Ampicillin-Sulbactam / Amoxicillin- Clavulanate.* *Clinical Infectious Diseases* 38: 17-24
49. **Lipsky B.A., Weigelt J.A., Gupta V., Killian A., Peng M.M:** 2007. Skin, Soft Tissue, Bone, and Joint Infections in Hospitalized Patients: Epidemiology and Microbiological, Clinical, and Economic Outcomes. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, volume 28, p. 1290-1298.
50. **Lookingbill DP, Miller SH, Knowles RC.** 1978. *Bacteriology of chronic leg ulcers.* *Arch Dermatol* 114(12):1765-8.
51. **Lowy, F. D.** 1998. *Staphylococcus aureus Infections.* *N Engl J Med* 339:520-532.
52. **Mader JT, Shirliff ME, Bergquist S, et. al.** 2000. *Bone and joint infections in the elderly: practical treatment guidelines.* *Drugs Aging* 16:67-80.
53. **Matthews, A.M., and Novick, R.P.** 2005. *Staphylococcal phages.* In *Phages. Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology.* Waldor, M.K., Friedman, D.I., and Adhya, S.L. (eds). Washington, DC : American Society for Microbiology Press, pp. 297-318.
54. **Newman LG.** 1995. *Imaging techniques in the diabetic foot.* *Clin Podiatr Med Surg* 12:75-85
55. **Nirmal Joshi, M.D., Gregory M., Caputo, M.D., Michael R. Weitekamp, M.D., und A.W. Karchmer, M.D.** 1999. *Infections in Patients with Diabetes Mellitus.* *N Engl J Med.* 1906-1912.

- 56. Novick RP., SJ. Projan, J. Kornblum, HF. Ross, G. Ji, BN. Kreiswirth, F. Vandenesch, and SL. Moghazeh.** 1995. *The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in Staphylococcus aureus.* Mol. Gen. Genet. 248:446-458.
- 57. Novick, RP.** 2000. *Pathogenicity Factors and their regulation.* p. 392-407. In Fischetti V.A., Novick R.P., Ferretti J.J., Portnoy D.A., and Rood J.I. (eds.), Gram-Positive Pathogens. ASM press, Washington.
- 58. Novick RP.** 2003. *Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence.* Mol. Microbiol. 48: 1429-1449.
- 59. Novick RP.** 2006. Staphylococcal Pathogenesis and Pathogenicity Faktors: Genetics and Regulation. In: Gram-positive Pathogens. P 496-516. 2nd edition, edited by Fischetti V.A. et al. ASM Press, Waschington, D.C.
- 60. Papakyriacou, H., Vaz, D., Simor, A., Louie, M., and McGavin M.J.** 2000. *Molecular Analysis of the Accessory Gene Regulator (agr) Locus and Balance of Virulence Factor Expression in Epidemic Methicillin- Resistant Staphylococcus aureus.* The Journal of Infectious Diseases. 181:990-1000.
- 61. Peacock S. J., Ishani de Silva and Lowy F. D.** 2001. *What determines nasal carriage of Staphylococcus aureus?* Trends in Microbiology. Vol. 9 No. 12:605- 610
- 62. Projan S. J., Novick R. P.** 1997. The Molecular Basis of Pathogenicity. In: *The Staphylococci in Human Disease, edited by Kent B. Crossley / Gordon L. Archer.* Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, San Francisco, Tokyo. P. 55-81
- 63. Projan S.J. and Ruzin A.** 2006. *Antibiotic Resistance in the Staphylococci.* In: Gram-positive Pathogens. P. 587-598. 2nd edition, edited by Fischetti V.A. et al. ASM Press, Waschington, D.C.
- 64. Rao N. and Lipsky B.A.** 2007. Optimising Antimicrobial Therapy in Diabetic Foot Infections. Drugs 67(2) :195-214, 2007.
- 65. Ridder-Schaphorn S., Ratjen F., Dübbers A., Häberle J., falk S., Küster P., Schuster A., Mellies U., Löwe B., Reintjes R., Peters G., and kahl B.** 2007. Nasal Staphylococcus aureus Carriage Is Not a Risk Factor for Lower-Airway Infection in Young Cystic Fibrosis Patients. Journal of Clinical Microbiology. P. 2979-2984. Vol.45, No.9.
- 66. Robson MC, Sternberg BD, Hegggers JP.** 1990. *Wound healing alterations caused by infection.* Clin Plast Surg 17(3):485-92.
- 67. Savelkoul PMH., Aarts HJM., DeHaas J., Dijkshoorn L., et.al.** 1999. *Amplified fragment length polymorphism analysis: the state of the art.* J. Clin. Microbiol 37:3083-91.
- 68. Sotto A., Richard J-L., Jourdan N., Combescure C., Bouziges N., and Lavigne J-P.** 2007. Miniaturized oligonucleotide arrays: a new tool for discriminating colonisation from infection due to *Stapylococcus aureus* in diabetic foot ulcers. Diabetes Care In Press, published online May 11, 2007. Page 1-12.

-
69. **Tamer A., Karabay O. and Ekerbicer H.** 2006. *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage and Associated Faktors in Typ II Diabetic Patients. *Jpn. J. Infect. Dis.* 59, 10-14,2006.
70. **Tegmark K., Morfeldt E., und Arvidson S.** 1998. *Regulation of agr-Dependent Virulence Genes in Staphylococcus aureus by RNAIII from Coagulase- Negative Staphylococci.* *Journal of Bacteriology* 3181-3186.
71. **Tenover, F. C. and Gaynes R. P.** 2000. *The Epidemiologie of Staphylococcus Infections.* p. 414. In V.A. Fischetti, R.P. Novick, J.J. Ferretti, D.A. Portnoy, and J.I. rood (eds.), *Gram-positive pathogenes.* ASM press, Waschington.
72. **Tentolouris N., Jude EB, Smirnof I, Knowles EA, Boulton AJM.** 1999. *Methicillin- resistant Staphylococcus aureus: an increasing problem in a diabetic foot clinic.* *Diabet Med*; 16:767-71.
73. **Tentolouris N., Petrikkos G., Vallianou N., Zachos C., Daikos G.L., Tsapogas P., Markou G. and Katsilmbros.** 2006. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in infected and uninfected diabetic foot ulcers. *CMI* 12: 186-189.
74. **Tögel, E.** 2003 a. *Pathogenese, Diagnostik und Therapie der diabetesassoziierten Begleit- und Folgeerkrankungen.* Kap.3.7. Diabetes und Neuropathie. P 97. In Rosak C, Bachmann W, Grünklee D, Haupt E, Petzoldt R, Sailer D, Schwedes U, Tögel E. *Angewandte Diabetologie*, 3. Auflage. Rosak C. Uni-Med Verlag AG, Bremen, Germany.
75. **Tögel, E.** 2003 b. *Pathogenese, Diagnostik und Therapie der diabetesassoziierten Begleit- und Folgeerkrankungen.* Kap. 3.8 Das diabetische Fußsyndrom. P. 104 - 106. In Rosak C, Bachmann W, Grünklee D, Haupt E, Petzoldt R, Sailer D, Schwedes U, Tögel E *Angewandte Diabetologie*, 3. Auflage. Rosak C. Uni-Med Verlag AG, Bremen, Germany.
76. **Tuazon C.U., Perez A., Kishaba T., Sheagren J.N.** 1975. *Staphylococcus aureus* Among Insulin-Injecting Diabetic Patients. An Increased Carrier Rate. *JAMA* 231:1272.
77. **Ulbrecht J.S., Cavanagh P.R., and Caputo G. M.** 2004. *Foot Problems in Diabetes: An Overview.* *Clinical Infectious Diseases* 39: S 73-82
78. **van Deursen.** 2004. *Mechanical Loading and off- loading of the plantar surface of the Diabetic foot.* *Clinical Infectious Diseases* 39:87-91
79. **Vandenesch F., Naimi T., Engright MC., Lina G., Nimmo GR., Heffernan H., Liassine N., Bes M., Greenland T., Reverdy ME. and Etienne J.** 2003. *Community- aquired methicillin- resistant Staphylococcus aureus carrying Panton- Valetine leukocidin genes: worldwide emergence.* *Emerg. Infect. Dis.* 9:978-984.
80. **Verdrengh M, Tarkowski A.** 1997. *Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by Staphylococcus aureus.* *Infect Immun* 65:2517-21.

81. von Eiff, C., Becker K., Machka K., Stammer H., Peters G. 2001. *Nasal Carriage as a Source of Staphylococcus aureus Bacteremia*. N Engl J Med. 334:11-16.
82. Wannet W.J., Spalburg E., Heck M. E., Pluister G. N., Willems R. J., De Neeling A. J. 2004. Widespread dissemination in The Netherlands of the epidemic Berlin Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* clone with low-level resistance to oxacillin. J Clin Microbiol 42:3077-3082.
83. Weidenmeier C., Kokai-Kun J.F., Kristian S.A., Chanturiya T., Kalbacher H., Gross M., Nicholson G., Neumeister B., Mond J.J., and Peschel A. 2004. Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* colonisation, a major risk factor in nosocomial infections. *Nature Medicine*. Doi:10.1038/nm991.
84. Wertheim H., Vos M.C., Ott A., van Belkum A., Voss A., Kluytmans J., van Keulen P., Vandenbroucke-Graus C., Meester M., Verburgh H. 2004. *Risk and outcome of Staphylococcus aureus bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers*. Lancet 364:703-05
85. Wertheim H., Melles C., Vos M.C., van Leeuwen W., van Belkum A., Verburgh H., Nouwen J. 2005. *The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections*. Lancet Infect Dis 5:751-62.
86. Williams D.T., Hilton J.R., and Harding K.G. 2004. Diagnosing Foot Infection in Diabetes. Clinical Infectious Diseases 39:83-6
87. Witte W. 2000. *Diagnostics, Typing, and Taxonomy*. In Fischetti V.A., Novick R.P., Ferretti J.J., Portnoy D.A., and Rood J.I. (eds.), Gram-Positive Pathogens. ASM press, Washington. p. 309-315
88. Witte, W. 2002. *Molekulare Typisierung bakterieller Infektionserreger*. Chemotherapie Journal 11. Jahrgang (Heft 3/2002) S.95-101
89. Witte, W. 2003. *Staphylococccen- Erkrankungen, insbesondere Infektionen durch MRSA*. Robert Koch Institut Ratgeber Infektionskrankheiten-Merkblätter für Ärzte. Epid. Bull. 08/2000. Aktualisiert November 2003.
90. Witte,W., Strommenger, B., Klare I., Werner G. 2004. *Bakterielle Erreger von Krankenhausinfektionen mit besonderen Resistenzen und Multiresistenzen*. Bundesgesundheitsbl.-Gesundheitsforsch-Gesundheitschutz 47:352-362
91. Witte, W. 2007 *Staphylococccen- Erkrankungen, insbesondere Infektionen durch MRSA*. Robert Koch Institut Ratgeber Infektionskrankheiten-Merkblätter für Ärzte. Epid. Bull. 08/2000. Ergänzt und aktualisiert Februar 2007.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>agr</i>	Acessory gene regulator
AIP	Autoinduzierendes Peptid
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CF	Cystische Fibrose
cMRSA	community acquired Methicillin-resistente <i>S. aureus</i>
GISA	Glycopeptide intermediate-level resistant <i>S. aureus</i>
GT	Genomtyp
h	Stunde
HG	Hauptgruppe
kb	Kilobasenpaare
LTA	Lipoteichonsäure
min	Minute
ml	Milliliter
MRSA	Methicillin-resistente <i>S. aureus</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MSCRAMM	microbial-surface components recognizing adhesive matrix molecules
N	Nasenisolat
NTP	Nucleosidtriphosphat
OD _x	optische Dichte
P	Promotor
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Abkürzungsverzeichnis

PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PIA	Polysaccharide Intracellular Adhesin
PV-luk	Panton-Valentine-Leukocidin
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Tab.	Tabelle
UG	Untergruppe
ÜN	über Nacht
ÜNK	über Nacht Kultur
upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VRSA	Vancomycin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
W	Wundisolat
WTA	wall teichoic acid
µl	Mikroliter

Danksagung

Meinen herzlichen Dank möchte ich im folgenden allen aussprechen, die mich bei der Entstehung dieser Dissertation auf unterschiedliche Art und Weise unterstützt haben.

Ich bedanke mich ganz besonders bei Frau PD Dr. rer. nat. habil. Christiane Wolz für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete, und intensive wissenschaftliche Betreuung die letztendlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen hat.

Frau Dr. rer. nat. Christiane Goerke danke ich für die Hilfe bei der computergestützten Auswertung der PFGE Ergebnisse.

Bei Frau Prof. Dr. Ursula Flückiger (Kantonspital Basel) bedanke ich mich für das freundliche überlassen der Infektionsisolate aus Basel.

Meinen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Stephan Coerper (Martha Maria, Nürnberg) ehemals Leiter der Abteilung für allgemeine Chirurgie und Poliklinik der Universitätsklinik Tübingen aussprechen. Ihm und seiner Mitarbeiterin Schwester Claudia Halm-Nill sind die Wund- und Nasenabstriche von Diabetikern zu verdanken.

Ein herzlicher Dank gilt den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Simone Esser und Frau Vittoria Bisanzio für Hilfestellungen im Labor.

Bei Herrn Volker Hollmann bedanke ich mich herzlich für das wiederauffinden meiner Dr.-Arbeit auf der defekten Festplatte meines Laptops.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern Jan und Irene Dziurka die mich stets während des Studiums und der Entstehung dieser Arbeit mental und finanziell unterstützt haben.

Meinem Bruder Rafael danke ich für die Eliminierung von Trojanischen Pferden von meinem Rechner.

Meinem Lebenspartner Herrn Markus Brockmann danke ich für seine Geduld und für das Layout dieser Arbeit.