

Aus dem Institut
für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

**Nachweis und diagnostische Wertigkeit von Antikörpern
gegen das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsिन bei Patienten
mit Endoprotheseninfektionen durch *Staphylococcus aureus*
und *Staphylococcus epidermidis***

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin (Dr. med.)
vorgelegt beim Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

von

Jumi Klettke

aus Bonn

Hamburg, 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 01.12.2008

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss: der/die Vorsitzende: Prof. Dr. med. I. Sobottka

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. P.M. Kaulfers

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. med. W. Lehmann

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Staphylokokken	3
1.2	Diagnostik bei endoprothesenassoziierten Infektionen.....	4
1.3	Pathogenese von fremdmaterialassoziierten Infektionen durch <i>S. epidermidis</i> und <i>S. aureus</i>	5
1.4	Primäre Bindung von Staphylokokken an Polymeroberflächen.....	7
1.5	Funktionelle Faktoren bei der Biofilm-Akkumulation.....	8
1.6	Zielsetzung	12
2	Material.....	13
2.1	Laborgeräte.....	13
2.2	Chemikalien.....	14
2.3	Medien	14
2.4	Polysaccharide	15
2.5	Lösungen	15
2.6	Bakterienstämme	16
2.7	Antikörper.....	16
2.8	Blutspendeseren.....	17
2.9	Patientenseren.....	18
3	Methoden	19
3.1	Biofilmtestung	19
3.2	Koagglutinationstest.....	19
3.3	PIA-Präparation	20
3.3.1	Herstellung von dialysiertem TSB.....	20
3.3.2	Präparation eines PIA-Rohextraktes.....	20
3.3.3	Gelfiltrationschromatographie.....	21
3.3.4	Anionenaustauschchromatographie.....	22

3.4	Hexosaminassay	23
3.5	Proteinnachweis nach Bradford.....	24
3.6	ELISA (<i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>).....	24
	3.6.1 Plattenbeschichtung	25
	3.6.2 Durchführung des ELISA	27
	3.6.3 Kompetitionstest.....	27
3.7	Statistische Auswertung	28
4	Ergebnisse.....	29
4.1	Etablierung eines ELISA zum spezifischen Nachweis von Anti-PIA-Antikörpern.....	29
	4.1.1 Reinigung von PIA	29
	4.1.2 ELISA	31
	4.1.3 Spezifitätsnachweis.....	37
4.2	Messung von Anti-PIA-Antikörpern in Patienten- und Blutspendenserum 42	
	4.2.1 Nachweis von Anti-PIA I-Antikörpern bei Blutspendern	43
	4.2.2 Nachweis von Anti-PIA I-Antikörpern in Patientenserum	44
	4.2.3 Untersuchung zu Anti-PIA II-Antikörpern.....	51
	4.2.4 Untersuchung zum natürlichen Verlauf der Anti-PIA-Antikörperbildung.....	51
5	Diskussion.....	53
6	Zusammenfassung	64
7	Literaturverzeichnis	65
8	Lebenslauf.....	77
9	Publikation.....	78
10	Erklärung	79
11	Danksagung	80
12	Anhang.....	81

Abkürzungsverzeichnis

A

A ₄₀₅	Absorption gemessen bei einer Wellenlänge von 405nm
A ₅₇₀	Absorption gemessen bei einer Wellenlänge von 570nm
AtIE	Autolysin
AaP	Accumulation-associated-protein

B

BSA	Rinderserumalbumin (englisch: <i>bovine serum albumin</i>)
BaP	Biofilm-assoziiertes Protein

C

cm	Zentimeter
CRP	C-reaktives Protein

D

dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: <i>desoxyribonucleic acid</i>)

E

ELISA	englisch: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ECM	extrazelluläre Matrix (englisch: <i>extracellular matrix</i>)
Efb	<i>extracellular fibrinogen binding protein</i>
Emp	<i>Extracellular matrix binding protein</i>
Eap	<i>extracellular adhesive protein</i>

G

g Gramm
°C Grad Celsius

H

h Stunde

I

ica interzelluläre Adhäsion (englisch: *intercellular adhesion*)

K

KNS koagulase negative Staphylokokken

L

l Liter

M

MSCRAMM *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*

M Mol

mM Millimol

min Minute

ml Milliliter

µl Mikroliter

µm Mikrometer

ms Millisekunden

N

nm Nanometer

O

OD₆₅₀ optische Dichte bestimmt bei einer Wellenlänge von 650nm

P

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (englisch: <i>phosphate buffered saline</i>)
PIA	interzelluläres Polysaccharid Adhäsion (englisch: <i>polysaccharide intercellular adhesion</i>)
PS/A	Kapselpolysaccharid (englisch: <i>capsular polysaccharide/adhesion</i>)
PNAG/PNSG	Poly-N-Acetyl Glukosamin/Poly-N-Succinyl Glukosamin

S

Ssp 1	englisch: <i>staphylococcal surface protein</i>
SERAM	<i>secretable expanded repertoire adhesive proteins</i>
s	Sekunde
SAA	englisch: <i>slime-associated antigen</i>

T

TSB _{BBL}	Trypton Soja Brühe (englisch: <i>trypticase soy broth</i>)
--------------------	--

U

U	Enzymatische Einheit (englisch: <i>unit</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (englisch: <i>rounds per minute</i>)

V

vol/vol	Volumen pro Volumen
---------	---------------------

W

wt/vol	Gewicht pro Volumen
--------	---------------------

1 Einleitung

Die Fortschritte der modernen Medizin innerhalb der letzten Jahrzehnte haben dazu geführt, dass heute in fast allen Fachrichtungen der Einsatz von Fremdkörpern zu einem integralen Bestandteil der Patientenversorgung gehört. Sowohl als therapeutisches als auch als diagnostisches Instrument sind implantierte Fremdmaterialien wie zentrale Venenkatheter, künstliche Herzklappen oder Gelenkprothesen integraler Bestand der Patientenversorgung (Rupp *et al.*, 1995). So werden allein in Deutschland jährlich etwa 2.500.000 Fremdmaterialien implantiert (Mack *et al.*, 2006b) (Tabelle 1-1).

Tabelle 1-1: Medizinische Instrumente und die Häufigkeit ihrer Anwendung^a

Implantat / Instrument	Anzahl der verwendeten Fremdmaterialien ^b
Intravaskuläre Katheter peripher und zentralvenös	150-200 Millionen/Jahr
Blasen-Katheter	4-5 Millionen/Jahr
Liquorableitungen	> 80.000/Jahr
Herzschrittmacher	115.000- 130.000/Jahr
Gefäßprothesen	> 60.000/Jahr
Prothetische Herzklappen	> 100.000/Jahr
Künstliche Herzen	230 (1969-1991)
Urogenitale Prothesen	150.000, total
Totale Hüftgelenksendoprothesen	222.000/Jahr
Totale Kniegelenksendoprothesen	110.000/Jahr
Zahnimplantate	436.000/Jahr

^aNach Anderson J., Marchant R. *Biomaterials: Factors Favoring Colonization and Infection*. Aus: Waldvogel F, Bisno A, Herausgeber. *Infection associated with indwelling medical devices*. 3rd edition. Washington: American Society for Microbiology Press; 2000. P. 173-209

^bDie Zahlen basieren auf Daten aus den USA.

Trotz des großen Fortschrittes auf den Gebieten der Implantationstechniken und der verwendeten Materialien ist der Einsatz von Fremdmaterialien aufgrund der Gefahr einer Infektion weiterhin risikoreich. Trotz einer relativ niedrigen Infektionsrate von 0,5 %–2 % sind aufgrund der großen absoluten Zahl der jährlich durchgeführten

Gelenkersatzoperationen weltweit tausende von Menschen betroffen (Darouiche, 2004). Das Auftreten einer Infektion des Gelenkersatzes führt zu einer signifikanten Zunahme der Morbiditäts- und Mortalitätsrate (2,7-18 %) (Berbari *et al.*, 1998). Hieraus folgt, dass trotz ihrer insgesamt niedrigen Inzidenz endoprothesenassoziierten Infektionen aufgrund der mit ihnen in Verbindung stehenden Zunahme von Morbidität und Mortalität eine große Bedeutung zukommt (Lentino, 2003).

Endoprothesenassoziierte Infektionen werden potentiell durch eine Vielzahl verschiedener Erreger ausgelöst (Tabelle 1-2). Die am häufigsten isolierten Spezies sind jedoch *Staphylococcus aureus* und koagulasenegative Staphylokokken (KNS) (Emori and Gaynes, 1993).

Tabelle 1-2: Häufigkeit der isolierten Bakterien bei Endoprotheseninfektionen^a

Bakterienspezies	Häufigkeit (%)
Koagulase negative Staphylokokken	20-30
<i>S. aureus</i>	20-25
Streptokokken	8-10
Polymikrobiell	12-19
Gram-negative Bakterien	6-11
Streptokokken	8-10
<i>Enterococcus</i> -Spezies	3
Andere oder Unbekannt	2-11

^a Nach Steckelberg J., Osmon D. *Prosthetic joint infection*. Aus:Waldvogel F, Bisno A, Herausgeber. *Infection associated with indwelling medical devices. 3rd edition*. Washington: American Society for Microbiology Press; 2000. P. 173-209; und Widmer AF. *New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants. Clin Infect Dis* 2001; 33:1.

1.1 Staphylokokken

Staphylokokken sind grampositive Kokken von etwa 1 µm Durchmesser. Anhand der Koagulasereaktion wird die koagulasepositive Spezies *S. aureus* von den übrigen koagulasenegativen Spezies unterschieden (Kloos and Schleifer, 1975). Koagulasenegative Staphylokokken bilden als kommensale Organismen in der Hautflora des Menschen eine Gruppe mit geringem pathogenen Potential (Rupp and Archer, 1994). Sie besiedeln bevorzugt Areale der Haut und Schleimhäute. Die höchsten Populationsdichten finden sich mit 10^3 - 10^6 CFU/cm² an den Ausgängen von Schweißdrüsen, Haartalgdrüsen und den Nasenschleimhäuten. Geringere Populationsdichten von bis zu 10^3 CFU/cm² können an trockeneren Habitaten wie beispielsweise den Außenseiten der Extremitäten nachgewiesen werden (Kloos and Bannerman, 1994; Kloos, 1997). Besonders *S. epidermidis* kommt auf der gesamten Körperoberfläche vor und bildet mit etwa 60-95 % die größten Populationen der isolierten Staphylokokkenspezies. In vielen Studien erwies sich *S. epidermidis* als die häufigste aus klinischen Materialien isolierte koagulase negative Staphylokokkenspezies (Chaves *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2004; Singhal *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu *S. epidermidis* ist *S. aureus* hingegen nur bei 20–40 % der Menschen, vor allem auf den Nasenschleimhäuten, zu finden (Kloos and Bannerman, 1994; Noble, 1997). Die Fähigkeit von *S. aureus*, invasive Infektionen oder toxinvermittelte Krankheitsbilder zu verursachen, ist lange bekannt. Gelingt es im Rahmen einer Infektion *S. aureus* in einem klinischen Material zu isolieren, kann in der Regel davon ausgegangen werden, dass der infektionsverursachende Erreger gefunden wurde. Der Nachweis von *S. epidermidis* in klinischen Untersuchungsmaterialien hingegen wurde in der Vergangenheit in der Regel als Kontamination angesehen. Das pathogene Potential von *S. epidermidis* in spezifischen klinischen Situationen wurde erst in der jüngeren Vergangenheit klar. Insbesondere wurde deutlich, dass *S. epidermidis* die Hauptursache nosokomial erworbener Bakteriämien und Fremdkörperinfektionen darstellt (Kloos and Bannerman, 1994; Rupp and Archer, 1994; Vacheethasane *et al.*, 1998). Hieraus erwächst das Problem, bei Nachweis von *S. epidermidis* in Untersuchungsmaterialien zwischen Infektionserreger und einfacher Kontaminante zu unterscheiden (Becker *et al.*, 2005). Dies kann angesichts der Gefahr, die Probe bei der Materialgewinnung insbesondere mit menschlicher Hautflora zu kontaminieren, im

Einzelfall schwierig sein. Dies wird anhand der Tatsache deutlich, dass 75–90 % der aus Patientenmaterial isolierten Koagulase-negativen Staphylokokken als Kontamination zu betrachten sind (Fidalgo *et al.*, 1990;Herwaldt *et al.*, 1990;Sheagren, 1985). Aus diesem Grunde ist insbesondere die Diagnose einer Endoprotheseninfektion durch *S. epidermidis* oder andere KNS als eine der großen Herausforderungen der klinischen Mikrobiologie zu betrachten (Geipel and Herrmann, 2005).

1.2 Diagnostik bei endoprothesenassoziierten Infektionen

Der derzeitige Goldstandard zur Diagnose einer Endoprotheseninfektion ist der direkte Erregernachweis in dem infizierten Gelenk, zum Beispiel anhand eines Gelenkpunktates oder eines intraoperativ gewonnenen Abstriches. Der Erregernachweis liefert nicht nur den definitiven Beweis einer Infektion, sondern ist aufgrund der Möglichkeit einer Resistenztestung von großer Bedeutung für die Planung einer gezielten Antibiotikatherapie. Der direkte Erregernachweis ist jedoch problematisch, da geeignete Materialien in der Regel invasiv gewonnen werden müssen. Zudem ist es durch das vorherrschende Erregerspektrum bei Gelenkprothesen-Infektionen häufig schwierig, zwischen einem relevanten Isolat und einer einfachen Kontamination, wie sie beispielsweise im Rahmen der Materialgewinnung auftreten kann, zu unterscheiden (von Eiff *et al.*, 2002). So sind gerade KNS die häufigste Ursache einer Kontamination bei positiven Blutkulturen (58-83 %) (Rupp and Archer, 1994;Fidalgo *et al.*, 1990;Herwaldt *et al.*, 1990;Ringberg *et al.*, 1991). Aus diesem Grunde kann derzeit nur dann sicher von einem klinisch signifikanten Isolat gesprochen werden, wenn ein distinkter Bakterienklon mehrfach in unabhängig gewonnenen Materialien nachgewiesen werden kann (Rupp and Archer, 1994). Dieses Kriterium ist im Routinebetrieb nur selten zu erfüllen. Daher wird zurzeit bei Verdacht auf eine fremdkörperassoziierte Infektion eine Kombination aus weiteren diagnostischen Methoden herangezogen. Neben klinischen Aspekten spielen Blutlaborwerte (Leukozytenzahlen, CRP), Laborwerte aus der Synovialflüssigkeit des Gelenks (Leukozytenzahlen mit Differenzierung der Leukozyten) sowie bildgebende Verfahren zur Diagnosestellung eine Rolle. In keinem Fall ist bei Anwendung dieser Parameter

aber eine sichere Diagnose oder der Ausschluss einer Protheseninfektion möglich (Cuckler *et al.*, 1991;Wang *et al.*, 1996;Sanzen and Sundberg, 1997;Spangehl *et al.*, 1999;Spangehl *et al.*, 1998).

Aus diesem Grund ist ein zentrales Ziel der molekularen Analyse von Mechanismen, die zur Entstehung von fremdmaterialassoziierten *S. epidermidis* und *S. aureus* Infektionen führen, die Identifikation neuer Strategien zur sicheren Diagnose einer Staphylokokken-assoziierten Endoprotheseninfektion.

1.3 Pathogenese von fremdmaterialassoziierten Infektionen durch *S. epidermidis* und *S. aureus*

Die enge Assoziation zwischen Fremdkörperimplantation und Staphylokokken-Infektionen liegt in der Fähigkeit dieser Erreger begründet, an Kunstoberflächen eine mehrschichtige hochstrukturierte Bakterienzellorganisation zu etablieren. Dieses Phänomen wurde zunächst als Schleimbildung bezeichnet, wird heute jedoch als Biofilmbildung bezeichnet (Götz, 2002;Mack *et al.*, 2006b). Bei einem bakteriellen Biofilm handelt es sich um eine Gruppe von Bakterien, welche von einer selbst synthetisierten, polymeren Matrix umgeben und fest an einer Oberfläche haftend organisiert sind (Costerton *et al.*, 1995;Hall-Stoodley *et al.*, 2004) (siehe Abbildung 1-1). Die Fähigkeit zur Biofilmbildung kann im Kontext fremdmaterialassoziiierter Infektionen als wesentlicher Pathogenitätsmechanismus von *S. epidermidis* und *S. aureus* aufgefasst werden (Mack *et al.*, 2006a;Götz, 2002).

Die Fähigkeit zur Biofilmbildung ist direkt mit dem persistierenden Verlauf von *S. aureus* und *S. epidermidis* Endoprotheseninfektionen verbunden. So konnten neue Arbeiten den Nachweis erbringen, dass Biofilme als Barriere für das Wirts-Immunsystem fungieren, die Phagozytoseaktivität herabsetzen, sowie B- und T-Zellproliferation inhibieren (Thylefors *et al.*, 1998;Vuong *et al.*, 2004b). Zudem weisen Erreger, welche in Biofilmen organisiert sind, eine im Vergleich zu planktonisch gewachsenen Zellen signifikant reduzierte Empfindlichkeit gegenüber antibiotisch wirksamen Substanzen auf (Srinivasan *et al.*, 2002;Schulin and Voss, 2001). Dies führt,

gemeinsam mit der zunehmenden Ausbreitung resistenter *S. epidermidis* und *S. aureus* Stämme wie zum Beispiel MRSA, zu einem regelhaften Versagen einer antibiotischen Therapie und macht zur definitiven Versorgung eines Patienten einen Austausch des Implantats notwendig.

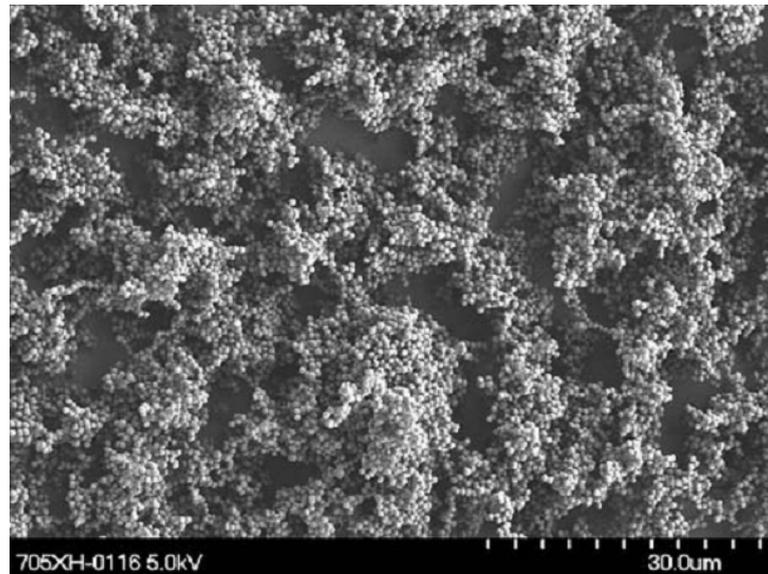


Abbildung 1-1: Elektronenmikroskopisches Bild eines von *S. epidermidis* 1457 synthetisierten Biofilms auf rostfreiem Stahl nach 18 stündiger Inkubation (Mack *et al.*, 2006b).

Heute wird der Prozess der *S. epidermidis* Biofilmbildung in mindestens 2 Phasen unterteilt. Zunächst kommt es zur schnellen Bindung von einzelnen, planktonischen Bakterienzellen an die zu besiedelnde Polymeroberfläche. Dieser Prozess wird als primäre Adhärenz bezeichnet. In einer zweiten proliferativen Phase vermehren sich die Bakterien und akkumulieren in mehreren Zellschichten. Darauf folgend entwickeln sich diese Zellschichten zu einem komplexen Biofilm. Hierbei sind die Zellen in einer extrazellulären Matrix eingebettet, die häufig als Schleim oder Glykokalix bezeichnet wird. Die Mehrzahl der in den Biofilm integrierten Zellen hat keinen direkten Kontakt zur Fremdkörperoberfläche. In dieser Situation wird die Biofilmarchitektur ausschließlich durch die Expression interzellulär adhäsiver Mechanismen stabilisiert. Sowohl in der Phase der primären Adhärenz als auch in der akkumulativen Phase konnten spezifische beteiligte Faktoren dargestellt werden.

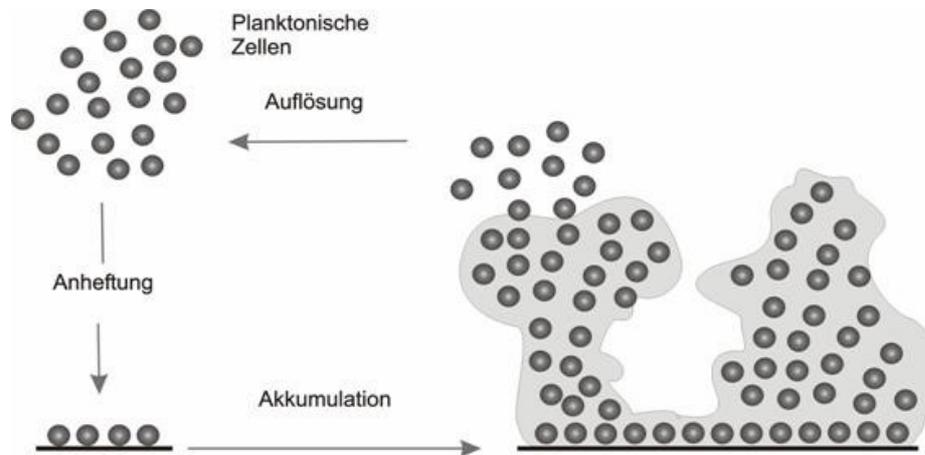


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Biofilmbildung von Staphylokokken. Nach der primären Adhäsion erfolgt die Akkumulation der Mikroorganismen auf der Oberfläche, d.h. es kommt zur Proliferation und zur Ausbildung einer mehrschichtigen Zellmatrix. Des Weiteren sind Staphylokokken in der Lage, sich aus diesem Verband abzulösen und an anderer Stelle die Bildung eines neuen Biofilms anzuregen.

1.4 Primäre Bindung von Staphylokokken an Polymeroberflächen

Eine Reihe von Untersuchungen hat gezeigt, dass es sich bei der primären Bindung von Bakterienzellen an Fremdmaterialien um einen sehr komplexen Prozess handelt. Zum einen wird die Adhärenz von Bakterien durch die physikochemischen Eigenschaften des implantierten Materials bestimmt. Aus dieser Erkenntnis leitete sich die Überlegung ab, Fremdmaterialinfektionen durch die Entwicklung von anti-adhäsiven Oberflächen zu verhindern. Diese Strategie scheiterte jedoch, da implantierte Oberflächen in der Regel schnell durch wirtseigene Matrixmoleküle wie zum Beispiel Fibronectin, Fibrinogen, Vitronectin bedeckt oder „konditioniert“ werden (Fuller and Rosen, 1986; Gristina, 1987; Foster and Hook, 1998). Insbesondere bei *S. aureus* konnte eine Vielzahl von spezifischen Oberflächenproteinen beschrieben werden, die mit extrazellulären Matrixmolekülen des Wirts interagieren. Sie werden in den Gruppen der sogenannten MSCRAMM (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) (Foster and Hook, 1998) und SERAM (*secretable expanded repertoire adhesive*

proteins) zusammengefasst (Chavakis *et al.*, 2005). Auch bei *S. epidermidis* konnten, wenn auch in geringerer Zahl (Gill *et al.*, 2005), Oberflächenproteine mit fibrinogen-, fibronectin-, vitronectin- und kollagenbindender Aktivität dargestellt werden (Williams *et al.*, 2002). Sie sind entscheidend an der frühen Phase der Biofilmbildung beteiligt (Mack *et al.*, 2006b).

1.5 Funktionelle Faktoren bei der Biofilm-Akkumulation

Die Mehrzahl der Zellen eines Biofilms hat keinen direkten Kontakt zur Fremdoberfläche. Demnach sind Faktoren notwendig, welche eine Adhäsion der Bakterienzellen untereinander bewirken. In diesem Zusammenhang wurden vor allem Polysaccharide, zu einem kleinen Anteil auch Proteine isoliert, welche für eine Zell-Zell-Adhäsion verantwortlich gemacht werden.

Durch einen kombinierten genetischen und biochemischen Ansatz gelang es Mack und Mitarbeitern, das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsion (PIA) als funktionell bedeutsamen Bestandteil von *S. epidermidis* Biofilmen darzustellen. PIA ist essentiell für die *S. epidermidis* Biofilmbildung, während die primäre Bindung an Fremdoberflächen nicht beeinflusst wird (Mack *et al.*, 2006b; Götz, 2002).

Nach Reinigung des Polysaccharids PIA durch Gelfiltrationschromatographie gelang es, die Zusammensetzung und Struktur von PIA darzustellen. Bei PIA handelt es sich um ein lineares Homoglykan, welches aus durchschnittlich 130 β -(1,6)-verknüpften 2-Desoxy-2-amino-D-glucopyranosyl-Einheiten aufgebaut ist. Durch Anionenaustauschchromatographie lassen sich zwei Polysaccharidfraktionen voneinander trennen (Mack *et al.*, 1996a). Bei 80 % des Polysaccharids handelt es sich um PIA I. PIA I trägt ca. 15 % deacetylierte Reste und Ester-gebundene Succinate sowie Phosphatreste und trägt somit negative als auch positive Ladung (Mack *et al.*, 1996a). Das gleichzeitige Auftreten von positiven und negativen Ladungen ist offensichtlich von funktioneller Relevanz für die interzellulären Adhäsionseigenschaften von PIA I. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass bei Synthese von nicht de-acetyliertem PIA keine Biofilmbildung vermittelt wird (Vuong *et al.*, 2004a). Das Polysaccharid II ist strukturell eng mit Polysaccharid I verwandt und

hat einen leicht anionischen Charakter durch den höheren Gehalt an Phosphat und Succinat. Zudem sind im Mittel mehr Glucosamin-Reste acetyliert als bei Polysaccharid I. Unabhängige Untersuchungen konnten diese Ergebnisse im wesentlichen bestätigen (Sadovskaya *et al.*, 2005a).

Ein erster wichtiger Anhalt für die direkte funktionelle Beteiligung von PIA an der *S. epidermidis* Biofilmbildung ergab sich aus der Beobachtung, dass von 179 klinischen *S. epidermidis*-Isolaten 86,8 % der Biofilm-bildenden *S. epidermidis* Stämme PIA synthetisieren, während 88,6 % der Biofilm-negativen Stämme kein PIA produzieren. Zudem konnte eine positive Korrelation zwischen quantitativer PIA-Synthese und Stärke der Biofilmbildung gefunden werden (Mack *et al.*, 1996a;Muller *et al.*, 1993).

Heilmann und Mitarbeitern gelang es, ein Operon zu identifizieren, welches nach *in trans* Expression zur Produktion von PIA und Zellaggregation führt (Heilmann *et al.*, 1996). Diese wurde als intercellular adhesion (*ica*)ADBC bezeichnet. Die Sequenzanalyse des Operons zeigte, dass es aus vier *open reading frames* besteht (Gerke *et al.*, 1998;Heilmann *et al.*, 1996). *IcaA* besitzt N-Acetylglucosaminyl-Transferaseaktivität mit UDP-N-Acetylglucosamin als Substrat. Optimale Aktivität gewinnt *IcaA* durch Ko-expression mit *icaD*, welches zum Beispiel für ein Chaperon kodieren könnte. *IcaB* ist verantwortlich für die Deacetylierung von PIA (Vuong *et al.*, 2004a) und das hypothetische Transmembranprotein *icaC* ist eventuell in den Export und die Verlängerung des wachsenden Polysaccharids involviert. Vor *icaADBC* befindet sich das Gen *icaR*, welches für einen negativen Regulator von *icaADBC* kodiert (Conlon *et al.*, 2004;Knobloch *et al.*, 2004;Mack *et al.*, 2006b).

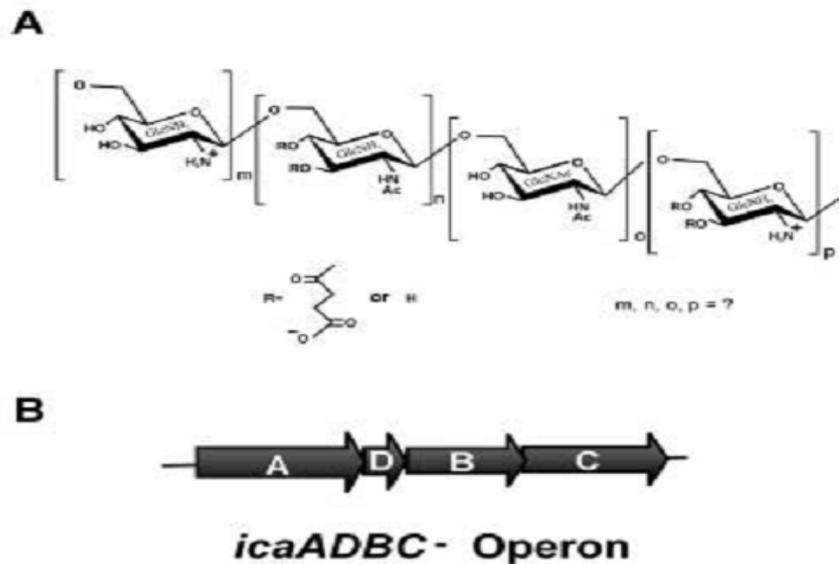


Abbildung 1-3: (A) Schematische Darstellung des interzellulären Polysaccharid-Adhäsins (*polysaccharid intercellular adhesin* PIA). Das Rückgrat des unverzweigten Polysaccharids besteht aus durchschnittlich 130 β -(1,6)-verknüpften N-Acetylglucosaminyl-Resten. PIA trägt ca. 15 % deacetylierte Reste und Ester-gebundene Succinate. Die Präsenz von sowohl negativen als auch positiven Ladungen ist offensichtlich für die interzelluläre Adhäsionseigenschaften von PIA I von funktioneller Relevanz. (B) Schematische Darstellung des *ica*-Lokus, der den PIA-Syntheseapparat kodiert. Nur die Expression aller 4 Gene führt zur Synthese eines funktionell aktiven Moleküls (Mack et al., 2006b).

Tatsächlich konnte in verschiedenen Tiermodellen unter Verwendung definierter Mutanten gezeigt werden, dass *icaADBC* und PIA-Bildung Einfluss auf die Virulenz und Fähigkeit zur Etablierung persistierender *S. epidermidis* Infektionen nehmen (Götz, 2002; Begun et al., 2007). Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass bei *S. epidermidis* auch Polysaccharid-unabhängige Mechanismen der Biofilmmakumulation, zum Beispiel vermittelt durch das *accumulation associated protein* (Aap) existieren (Hussain et al., 1997; Rohde et al., 2005a; Rohde et al., 2005b; Sun et al., 2005; Rohde et al., 2007).

IcaADBC konnte bei einer Vielzahl von anderen KNS dargestellt werden (Allignet et al., 2001; Götz, 2002; Mack et al., 2006b). Somit scheinen *icaADBC* und PIA von breiter Relevanz zu sein. Dies wird dadurch unterstrichen, dass auch bei *S. aureus* ein

icaADBC-Homolog gefunden werden konnte, welches eine essentielle Rolle in der Biofilmbildung spielt (Cramton *et al.*, 1999). Durch Analyse einer vom *S. aureus* Stamm MN8N gebildeten, hochmolekularen Substanz zeigte sich, dass *icaADBC* bei *S. aureus* für den Syntheseapparat eines β -1,6-verknüpften Polysaccharids aus N-Acetylglukosaminresten kodiert (McKenney *et al.*, 1999;McKenney *et al.*, 1998). Dieses Polysaccharid wird als Poly-N-Acetyl- β -1,6 Glukosamin (PNAG) bezeichnet (Joyce *et al.*, 2003). Weitere Untersuchungen zeigten dann, dass dieses Polysaccharid dem von *S. epidermidis* gebildeten PIA strukturell ähnlich, wenn nicht sogar identisch ist (Joyce *et al.*, 2003;Sadovskaya *et al.*, 2005b). Darüber hinaus wurden selbst bei gramnegativen Bakterien wie *E. coli*, *Y. pestis* und *A. actinomycetemcomitans* *icaADBC*-homologe Genorte beschrieben, welche bei *E. coli* und *Y. pestis* den Apparat für die Synthese eines strukturell mit PIA praktisch identischen Polysaccharid kodiert (Wang *et al.*, 2004;Kaplan *et al.*, 2004).

Als Konsequenz aus diesen Befunden wurde angenommen, dass die PIA-vermittelte interzelluläre Adhäsion als ein generelles Prinzip bakterieller Biofilmbildung gilt. Im Hinblick auf die Pathogenese von *S. epidermidis*-assoziierten Fremdmaterialinfektionen wurde diese Sicht durch epidemiologische Studien gestützt. Hier zeigte sich, dass *icaADBC* in klinischen *S. epidermidis* Populationen bei etwa 50–80 % der Isolate nachgewiesen werden kann (Rohde *et al.*, 2001a;Gelasia *et al.*, 2001;Arciola *et al.*, 2001a;Arciola *et al.*, 2002b;de Silva *et al.*, 2002;Vandecasteele *et al.*, 2003b;Chaieb *et al.*, 2005;Kozitskaya *et al.*, 2005;Ninin *et al.*, 2006;Klingenberg *et al.*, 2007;Ziebuhr *et al.*, 1997a). Im Gegensatz dazu waren kommensale *S. epidermidis* von gesunden Probanden ohne Kontakt zum Krankenhaus nur in 13–52 % *icaADBC*-positiv (Miyamoto *et al.*, 2003;Rohde *et al.*, 2004a;Ziebuhr *et al.*, 1997b). Dies führte zu dem Rückschluss, dass *icaADBC*-negative *S. epidermidis* Stämme im wesentlichen als apathogen gelten können (Zhang *et al.*, 2003;Yao *et al.*, 2005;Li *et al.*, 2005) und der Nachweis von *icaADBC* somit geeignet ist, um im klinischen Alltag invasive, signifikante *S. epidermidis* von kommensalen Isolaten, also Kontaminaten, zu unterscheiden (Mack *et al.*, 2006a;Yao *et al.*, 2005;Ziebuhr *et al.*, 1997c).

IcaADBC lässt sich bei fast allen *S. aureus* Stämmen nachweisen (Cramton *et al.*, 1999). Gleichwohl auch bei *S. aureus* PIA-unabhängige Mechanismen der Biofilmbildung beschrieben wurden (Cucarella *et al.*, 2001;Toledo-Arana *et al.*,

2005;Beenken *et al.*, 2004;Lasa and Penades, 2006), wurde unter der Annahme, dass es sich bei PIA um den zentralen Virulenzfaktor handelt, versucht, PIA als Basis eines Impfstoffes nicht nur zur Prävention von *S. aureus*-Infektionen, sondern auch von *S. epidermidis*-Infektionen zu verwenden (Götz, 2004;Mckenney *et al.*, 2000;Maira-Litran *et al.*, 2005;Maira-Litran *et al.*, 2004). Die Nutzbarkeit von PIA als diagnostisches Antigen wurde jedoch bislang nicht eingehend untersucht.

1.6 Zielsetzung

Die Anzucht des Erregers ist bei dem Verdacht auf eine Endoprotheseninfektion derzeit der entscheidende Schritt zur sicheren Diagnose. Hierbei stehen sowohl der klinisch tätige Arzt sowie der Mikrobiologe vor grundlegenden Problemen. Zum einen sind zur Gewinnung geeigneten Materials zur Isolierung des verursachenden Erregers meist invasive Verfahren wie beispielsweise eine Gelenkpunktion notwendig. Dies steigert die Morbidität der Patienten erheblich. Zum anderen kann im mikrobiologischen Labor die Unterscheidung zwischen einfacher Kontaminante und relevantem Erreger schwierig sein. Aus diesem Grund erscheint der Einsatz serologischer Verfahren zur Diagnostik von Endoprotheseninfektionen als wünschenswert. Bei Endoprotheseninfektionen erscheint zudem aufgrund des meist chronischen Verlaufs der Einsatz serodiagnostischer Verfahren möglich. Vor diesem Hintergrund können die zentralen Ziele dieser Arbeit wie folgt formuliert werden.

1. Mit dem Ziel, in humanen Seren Anti-PIA-Antikörper nachzuweisen, sollte ein spezifischer *enzym linked immuno sorbent assay* (ELISA) aufgebaut werden.
2. *IcaADBC* und somit die grundsätzliche Fähigkeit zur PIA-Synthese sind bei klinischen *S. aureus* und *S. epidermidis* Isolaten weit verbreitet. Unter Verwendung des spezifischen ELISA sollten in Seren von Patienten mit definierten *S. aureus* und *S. epidermidis* Endoprotheseninfektionen wie auch in einem Kollektiv gesunder Blutspender nach Anti-PIA-Antikörper gesucht werden. Hierüber sollte die Frage beantwortet werden, ob PIA *in vivo* exprimiert wird und der Nachweis von Anti-PIA-Antikörpern geeignet ist, durch *S. aureus* oder *S. epidermidis* verursachte Endoprotheseninfektionen zu diagnostizieren.

2 Material

2.1 Laborgeräte

Im Verlauf der Arbeit wurden die im Folgenden aufgeführten Laborgeräte verwendet.

Tabelle 2-1: Laborgeräte

	Gerätebezeichnung	Hersteller
Zentrifugen	Biofuge pico	Heraeus, Osterode
	Megafuge 1.0 R	Heraeus, Osterode
	Megafuge 3.0 R, Rotor 8074	Heraeus, Osterode
	Sorvall RC-5B, Rotor GS-3, Rotor SS-34	Kendro, Hanau
Photometer	DU® 530	Beckmann, München
	Smart Spec™ 3000	BioRad, Hercules, USA
	ELISA Processor II	Behring, Marburg
Thermoinkubator	Blockthermostat BT 100	Kleinfeld
Schüttelinkubator		New Brunswick Scientific Co. New Brunswick, USA
Waage	PC 4400	Mettler, Giessen, Schweiz
Feinwaage	Sartorius 2432	Sartorius, Lübeck
Digital-pH-Meter	Digital-pH-Meter 646	Knick, Berlin
Chromatographie-System (Äkta-Prime)		Amersham Biosciences, Freiburg

Chromatographiesäulen	C16/100 und C16/20	Amersham Biosciences, Freiburg
Konzentrierer	Centriprep 10, Ultra-Cell YM-10, 10000 MWCO	Millipore Amicon, Beverly MA, USA
Sterilfilter 0,22µm	Spritzenvorsatzfilter	Merck, Darmstadt
Ultraschallgerät	Digital Sonifier [®]	Branson, Danbury, USA
Zellschaber		Nunc, Roskilde
96-Loch Mikrotiterplatten	NunclonΔ	Nunc, Roskilde
96-Loch Mikrotiterplatten	Maxi Sorp	Nunc, Roskilde
96-Loch Mikrotiterplatten	Mikroplatte PS F-Form	Greiner, Nürtingen
96-Loch Mikrotiterplatten	CovaLink [®] NH	Nunc, Roskilde

2.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, analyserein von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Taufkirchen) bezogen.

2.3 Medien

Trypticase soya broth (TSB)

TSB_{BBL} pH 7,3±0,5 (Becton Dickinson, Cockseyville, MD, USA)

2.4 Polysaccharide

Tabelle 2-2: Polysaccharide

Pneumokokken Impfstoff Pneumovax [®] 23 (0,5 ml mit 23 Kapseltypen à 25 µg, Kapseltypen: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F,14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F, 33F)	Pasteur Mérieux MSD
Meningokokken Impfstoff (0,5 ml mit je 50 µg Polysacchrid der Gruppe A+C)	Meningokokken-Impfstoff A+C Mérieux [®] , Pasteur Mérieux MSD GmbH
Lipoteichonsäure, <i>S. aureus</i>	Sigma, Deisenhofen
Lipopolysaccharid (LPS), <i>E. coli</i> O55:B5	Sigma, Deisenhofen

2.5 Lösungen

Alle Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit entionisiertem Wasser angesetzt und durch 15-minütiges Autoklavieren sterilisiert.

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS; pH 7,4):

NaCl	8,00 g/l
KCl	0,20 g/l
Na ₂ HPO ₄	1,44 g/l
KH ₂ PO ₄	0,24 g/l

Natriumphosphatpuffer (pH 7,5):

1M Na ₂ HPO ₄	80,95 ml
1M NaH ₂ PO ₄	19,05 ml

2.6 Bakterienstämme

Alle verwendeten Bakterienstämme wurden in Cryo-Reaktionsgefäßen bei -80°C gelagert und in der Regel auf Blutagarplatten kultiviert.

Tabelle 2-3: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Charakteristika	Referenz
<i>S. epidermidis</i> 1457	Blutkulturisolat, biofilmpositiv, <i>ica</i> -positiv	(Mack <i>et al.</i> , 1992)
<i>S. epidermidis</i> 1457-M10	<i>icaA</i> : Tn917 biofilm-negativ	(Mack <i>et al.</i> , 1994)
<i>S. aureus</i> Cowan I	Protein A überexprimierender Stamm	J. Heesemann, München

2.7 Antikörper

Tabelle 2-4: Übersicht über die verwendeten Antikörper

Antikörper	Eigenschaften	Hersteller
Anti-Kaninchen- IgG	Alkalische Phosphatase konjugiert	Sigma, Deisenhofen
Anti-Human IgM	Alkalische Phosphatase konjugiert	Dianova, Hamburg
Anti-Human IgG	Alkalische Phosphatase konjugiert	Dianova, Hamburg

Anti-Human IgA	Alkalische Phosphatase konjugiert	Dianova, Hamburg
Rheumafaktor-Absorbent		Dade Behring, Marburg
Anti-PIA Antiserum ¹	Antiserum gegen gereinigtes PIA	Mack, 1994
Präimmunserum ¹	Zum Anti-PIA-Antiserum korrespondierendes Präimmunserum	
Anti-PIA-Antiserum, absorbiert ²	Anti-PIA-Antiserum, absorbiert an <i>S. epidermidis</i> 1457 und <i>S. epidermidis</i> 1457-M10	

¹Bei dem Anti-PIA-Antiserum handelt es sich um ein spezifisches Serum gegen gereinigtes PIA. Das Präimmunserum wurde vor der Immunisierung der Kaninchen gewonnen, so dass es keine Antikörper gegen PIA enthält.

²Zur Serumabsorption wurde eine 200 ml Übernachtkultur des Stammes *S. epidermidis* 1457 und des Stammes *S. epidermidis* 1457 - M10 angesetzt. Nach Zentrifugation der beiden Vorkulturen zum Ernten der Zellen (5500 rpm bei 4°C, 15 min.), wurden diese in PBS gewaschen. Es folgte eine zweite Zentrifugation. Das Pellet wurde in 1 ml des 1:1000 vorverdünnten Anti-PIA-Antiserums resuspendiert. Nach der Zugabe von 0,05 % (wt/vol) NaN₃ wurde die Suspension für 2-3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Gewinnung des Serums nach erfolgter Absorption, konnte die Suspension in der Zentrifuge Sorvall RC-5B (Rotor SS - 34) zentrifugiert werden (45 min, 14000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet verworfen. Das gewonnene absorbierte Serum konnte bei -20°C gelagert werden.

2.8 Blutspendeseren

Das Blutspendezentrum Hamburg Eppendorf stellte 63 Seren gesunder Blutspender zur Verfügung. Die Seren wurden in Cryo-Reaktionsgefäßen bei -80°C gelagert.

2.9 Patientenseren

Die in dieser Arbeit verwendeten Patientenseren sind im Anhang tabellarisch aufgeführt und wurden uns von Herrn Dr. Siemssen (ENDO-Klinik, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um ein Patientenkollektiv mit mikrobiologisch gesicherten Infektionen nach Hüft- oder Kniegelenkersatz mit *S. aureus* oder *S. epidermidis* (Rohde *et al.*, 2007). Die Seren wurden in Cryo-Reaktionsgefäßen bei -80°C gelagert.

3 Methoden

3.1 Biofilmtestung

Die Fähigkeit zur Biofilmbildung von *S. epidermidis* wurde mit Hilfe eines semiquantitativen Tests bestimmt (Mack *et al.*, 2001). Die Einzelkolonie eines Stammes wurde in 2 ml TSB_{BBL} suspendiert und für ca. 6 Stunden bei 200 rpm und 37°C inkubiert. Die Vorkultur wurde in 2 ml desselben Nährmediums im Verhältnis 1:100 verdünnt. 4 Näpfe einer Mikrotiterplatte (Nunclon Δ , Nunc) wurden pro Stamm mit je 200 μ l der verdünnten Suspension beschickt. Es folgte eine Inkubation der Platte im Brutschrank bei 37°C für etwa 20 Stunden. Danach wurde die Platte ausgeschlagen, viermal mit PBS gewaschen und im Brutschrank für 4 Stunden bei 37°C getrocknet. Der anheftende Biofilm konnte mit 50 μ l Kristallviolett pro Napf angefärbt werden. Die Einwirkzeit des Farbstoffes betrug 5 min. Die Platte wurde vorsichtig mit Leitungswasser gespült und anschließend erneut getrocknet. Die Quantifikation erfolgte durch Bestimmung der Absorption im ELISA Processor II (Behring) bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 405 nm. Nach Mittelwertbildung der Vierfachbestimmung konnte die Biofilmbildung beurteilt werden. Hierbei lag der cut-off zur Unterscheidung von Biofilm-positiven und Biofilm-negativen Stämmen bei $A_{570} \geq 0,1$. Als Positivkontrolle wurde der Stamm *S. epidermidis* 1457 und als Negativkontrolle *S. epidermidis* 1457-M10 verwendet.

3.2 Koagglutinationstest

Ein Koagglutinationstest dient dem Nachweis spezifischer Antigene. Er beruht auf einer Antigen-Antikörperreaktion, wobei zuvor Antikörper an einen Partikel oder an Bakterienzellen gebunden werden. Hier wurde zur Bindung PIA-spezifischer Antikörper *S. aureus* Cowan I verwendet (Mack *et al.*, 1992). *S. aureus* Cowan I ist ein Protein A überexprimierender Stamm. Protein A wiederum bindet humanes IgG über das Fc-Fragment. Hierdurch wurden Anti-PIA-Antikörper auf der Bakterienoberfläche fixiert.

Zur Herstellung des Koagglutinationsreagenzes wurde eine tiefgefrorene Cowan I-Präparation aufgetaut und dreimal mit 1 ml PBS gewaschen. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation für eine Minute bei 13.000 rpm. Anschließend wurde das Bakterienpellet in 900 µl PBS aufgenommen. 100 µl Anti-PIA-Antiserum wurden hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Nach einer erneuten dreimaligen Waschung der Zellen erfolgte eine Resuspension in 900 µl PBS und das Reagenz wurde auf 10 ml mit PBS aufgefüllt.

Zur Durchführung des Koagglutinationstests wurden 5 µl einer Probe mit 15 µl Reagenz auf einem Objektträger zu einem Tropfen vermengt. Der Objektträger wurde für 3 min vorsichtig geschwenkt. Als Negativkontrolle wurde Natriumphosphatpuffer verwendet.

Um Antigentiter bestimmen zu können, wurden die Proben in geometrischen Verdünnungsreihen untersucht. Als Titer wurde die Verdünnungsstufe bezeichnet, bei der noch eine positive Koagglutination zu erkennen war.

3.3 PIA-Präparation

3.3.1 Herstellung von dialysiertem TSB

Zur Vermeidung einer eventuellen Kontamination von PIA durch hochmolekulare Substanzen aus dem Wachstumsmedium war es erforderlich, diese durch einen Dialysevorgang aus dem Medium zu entfernen (Mack *et al.*, 1994; Mack *et al.*, 2001). Hierfür wurden die zu verwendenden Dialyseschläuche (Ø 21 mm) über eine Stunde in entionisiertem Wasser gekocht. 200 ml zehnfach konzentriertes TSB wurden in einen Dialyseschlauch gefüllt, in einen Kolben mit 1,8 l *Aqua bidest.* gegeben, autoklaviert und über Nacht bei Raumtemperatur dialysiert. Während des Dialysevorgangs wurde das Medium durch einen Magnetrührer in Bewegung gehalten. Anschließend wurden die Dialyseschläuche samt Inhalt verworfen.

3.3.2 Präparation eines PIA-Rohextraktes

Eine Kolonie des biofilmbildenden Stammes *S. epidermidis* 1457 wurde in 30 ml dialysiertem TSB suspendiert und 3-6 h bei 200 rpm inkubiert (Mack *et al.*, 1996a). Mit

dieser Vorkultur wurde die Hauptkultur im Verhältnis 1:100 beimpft. Es wurde jeweils 2 l Kulturansatz für eine Präparation verwendet. Die Hauptkultur wurde auf fünf große Bechergläser verteilt und 22 h bei 37°C und 100 rpm inkubiert. Die Zellen wurden quantitativ in Zentrifugenbecher à 400 ml überführt und bei 6000 rpm in der Zentrifuge Sorvall RC-5B (GS-3 Rotor) für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml PBS+0,05 % (wt/vol) Natriumazid aufgenommen. Es folgte eine Ultraschallbehandlung für viermal 30 sec unter Verwendung eines Branson Ultraschallgerätes. Um die Zellen zu entfernen, wurden diese zweimal 10 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Mit dem Überstand erfolgte anschließend die letzte Zentrifugation in der Zentrifuge Sorvall RC-5B (Rotor SS-34) für 1 h bei 14.000 rpm und 4°C. Der so gewonnene Rohextrakt konnte nach Sterilfiltration bei 4°C gelagert werden.

Zur Vorbereitung auf die Gelfiltrationschromatographie musste der Rohextrakt aufkonzentriert werden. Hierfür wurden Centriprep 10 Filter verwendet, in welchen der Rohextrakt bei 3500 rpm und 4°C in der Zentrifuge Haereus Megafuge 3.0 R (Rotor 8074) zentrifugiert wurde. Der Rohextrakt wurde in mehreren Aufkonzentrationsschritten zentrifugiert. Am Ende der Aufkonzentration lag der PIA-Titer bei mindestens 1:10000.

3.3.3 Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltration beruht auf der unterschiedlichen Verteilung von Molekülen aufgrund ihrer Größe und Form zwischen einem Gelkompartiment, einem Material mit konstanter molekularer Porenweite, und dem umgebenden Medium. Lässt man eine Lösung, welche Moleküle unterschiedlicher Größe enthält, durch diese Matrix sickern, durchwandern kleinere Moleküle das Säulenbett langsamer, da sie in den Poren des Gelkompartiments zurückgehalten werden. Diese Chromatographieform diente der Aufreinigung des PIA-Rohextraktes nach Größe.

250 ml Sephacryl S 200 wurden mit 100 ml 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,5 + 0,05 % (wt/vol) Natriumazid in einem sterilen Becherglas suspendiert (Mack *et al.*, 1996a). Diese Suspension konnte kontinuierlich über einen Glasstab in eine C16/100 Säule gefüllt werden. Durch Ausleiten von Puffer senkte sich das Gelbett. Hatte sich dieses vollständig gesenkt, wurde mit Hilfe eines Stempels die Säule von oben luftdicht

verschlossen. Die Säule wurde an das Pumpsystem Äkta Prime angeschlossen. Die Säule wurde vor Verwendung mit 400 ml Natriumphosphatpuffer äquilibriert.

Pro Aufreinigung wurden je 2,5 ml des aufkonzentrierten Rohextraktes auf die Säule gegeben. Die Fraktionierung der Probe erfolgte mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,3 ml/min. 94 Fraktionen à 1,5 ml wurden gesammelt. Nach jedem Probendurchlauf wurde die Säule mit 400 ml Natriumphosphatpuffer äquilibriert. Die spezifische Antigenkonzentration der einzelnen Fraktionen konnte mit Hilfe des Koagglutinationstests bestimmt werden. Alle Fraktionen mit einem Antigentiter >1:16 wurden vereinigt und mit Hilfe von Centriprep 10 auf ein Volumen von ca. 2,5 - 3 ml konzentriert.

3.3.4 Anionenaustauschchromatographie

Die Anionenaustauschchromatographie wurde zur ladungsabhängigen Aufreinigung der gelchromatographisch gereinigten PIA-Proben herangezogen (Mack *et al.*, 1996a). Das Prinzip der Ionenaustauschchromatographie beruht auf Ladung und ist unabhängig von der Molekülgröße. Die auf die Säule aufgetragene Substanz bindet an die Säulenmatrix durch elektrostatische Interaktion. Die Stärke dieser Wechselwirkung ist abhängig von der Salzkonzentration des Puffers. Durch einen kontinuierlichen Gradienten mit steigender Anionenkonzentration werden gebundene Moleküle wieder von der Matrix gelöst und eluiert. Bei der Anionenaustauschchromatographie binden negativ geladenen Moleküle an die Gelmatrix. Durch Anionenaustauschchromatographie kann eine mäßig geladene (PIA I) und eine zweite Polysaccharidspezies mit einem höheren Anteil an geladenen Teilchen (PIA II) dargestellt werden (Mack *et al.*, 1996a).

Zur Präparation der Säule wurden 30 ml Q-Sepharose mit 30 ml Natriumphosphatpuffer pH 7,5 + 0,05 % (wt/vol) Natriumazid in einem sterilen Becherglas suspendiert. Diese Suspension konnte kontinuierlich über einen Glasstab in eine C16/20 Säule gefüllt werden. Durch Ausleiten von Puffer senkte sich das Gelbett. Hatte sich dieses vollständig gesenkt, wurde mit Hilfe eines Stempels die Säule von oben luftdicht verschlossen. Die Säule wurde an das Äkta Prime Pumpsystem angeschlossen. Es folgte eine Äquilibrierung mit 120 ml Natriumphosphatpuffer pH 7,5. Pro Aufreinigung konnten 2,5 ml der Probe aufgetragen werden. Nach Auftragen der Probe wurde die Säule mit 40 ml Natriumphosphatpuffer pH 7,5 eluiert. Um auch die leicht anionischen

Moleküle, in diesem Fall das PIA II, von der Säulenmatrix zu lösen, erfolgte die Zugabe von Natriumchlorid in Form eines kontinuierlichen Gradienten von 0 bis 1000 mM über ein Volumen von $87 \times 2,4$ ml, um die elektrostatische Bindung zur Säulenmatrix zu schwächen. Die Fraktionierung erfolgte bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,3 ml/min. Es wurden 87 Fraktionen à 2,4 ml gesammelt. Nach jedem Probendurchlauf wurde die Säule mit 60 ml Natriumphosphatpuffer + 1 M NaCl eluiert und anschließend mit 100 ml Natriumphosphatpuffer gewaschen. Die spezifische Antigenkonzentration der einzelnen Fraktionen konnte mit Hilfe des Koagglutinationstests bestimmt werden. Getrennt nach PIA I und PIA II wurden alle Fraktionen mit einem Antigentiter > 1:16 vereinigt.

3.4 Hexosaminassay

Lösungen:

Reagenz 1	2,5 % (wt/vol) Natriumnitrit
Reagenz 2	12,5 % (wt/vol) Ammoniumsulfamat
Reagenz 3	0,25 % (wt/vol) 3-Methyl-2-Benzo-Thiazolinone Hydrozone (MBTH)
Reagenz 4	0,5 % (wt/vol) FeCl ₃

Da man davon ausgehen kann, dass PIA überwiegend aus N-acetyliertem Glucosamin besteht, ist es möglich, unter Verwendung des Hexosaminassays eine Orientierung über die PIA-Menge in wässrigen Lösungen zu erhalten (Lane-Smith and Gilkerson, 1979). Als Standard wurden definierte N-Acetylglucosaminkonzentrationen verwendet.

Zur Deacetylierung wurden 250 µl Probe mit der gleichen Menge 1 M HCl vermischt und 120 min bei 110°C in einem fest verschlossenen Reaktionsgefäß inkubiert. Zu je 200 µl Lösung werden vorsichtig 400 µl Reagenz 1 hinzu gegeben. Aufgrund der entstehenden Gasbildung wurde das Reaktionsgefäß offen gelassen. Nach etwa 15 min war keine Blasenbildung mehr zu erkennen. Anschließend wurde je Lösung 200 µl

Reagenz 3 hinzugefügt, gut gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. 200 µl Reagenz 4 wurden hinzu gegeben, die Probe erneut gründlich gemischt und 5 min bei 37°C stehen gelassen. Direkt im Anschluss wurde die OD₆₅₀ gemessen.

3.5 Proteinnachweis nach Bradford

Mit Hilfe des Bradfordassays ist es möglich, Proteinkonzentrationen zu bestimmen (Bradford, 1976). Dabei wurde das Protein Assay Farbstoffkonzentrat (Biorad) verwendet. Der Versuch erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm im DU[®] 530 nm (Beckmann). Anhand eines Abgleichs mit einer Standardkurve definierter BSA-Konzentrationen konnte die Proteinkonzentration in der zu untersuchenden Probe bestimmt werden.

3.6 ELISA (*enzyme-linked immuno sorbent assay*)

Lösungen:

Tween 20-Waschpuffer

Tween 20 in PBS 0,5 % (vol/vol), mindestens 1 h bei Raumtemperatur mischen

Bovines Serum Albumin (BSA)

BSA in Tween-Waschpuffer 0,5 % (wt/vol)

Substratlösung für alkalische Phosphatase

14,1 mg alkalische Phosphatase Substrat mit unten genannten Puffer auf 10 ml (Sigma) Endvolumen auffüllen

Puffer zur Herstellung der Substratlösung

101 mg MgCl wurden in 200 ml *Aqua bidest.* gelöst. Nach Zugabe von 97 ml Diethanolamin wurde der pH mit 1 M HCl auf pH 9,8 eingestellt. 200 mg NaN₃ wurden zugegeben, und mit *Aqua bidest.* wurde das Volumen auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lagerung des Puffers erfolgte im Dunklen bei 4°C.

Der ELISA ist ein immunologisches Verfahren zur semiquantitativen Bestimmung spezifischer Antikörper. Das Prinzip des ELISA basiert darauf, dass Antikörper aus einer Proben durch ein am Boden eines Mikrotiternapfes adsorbiertes, korrespondierendes Antigen gebunden werden. Nach Entfernen ungebundener Antikörper durch Waschen werden die gebundenen Antikörper durch enzymgekoppelte Zweit-Antikörper dargestellt. Hierbei ist die Menge gebundener, spezifischer Antikörper direkt proportional zur gemessenen Absorption.

3.6.1 Plattenbeschichtung

Es stehen kommerziell erhältliche Mikrotiterplatten mit einer Vielzahl unterschiedlicher Oberflächen als Antigen-träger zur Verfügung. Verschiedene Oberflächen können hierbei Biomoleküle unterschiedlich gut binden. Da die Bindung des Antigens entscheidend für die Sensitivität und Spezifität eines ELISA ist, müssen bei der Etablierung eines neuen Assays verschiedene Oberflächen und Strategien zur effizienten Antigenbindung getestet werden. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit getesteten Systeme beschrieben.

PIA-Bindung an eine Maxi Sorp-Oberfläche

Die Bindung von Antigen an eine Maxi Sorp-Oberfläche beruht auf physikalischen Prinzipien. Die Polyesterloberfläche hat eine hohe Affinität zu Molekülen mit hydrophilen und hydrophoben Bereichen. Diese Platten wurden ohne weitere Modifikation der Oberfläche zur Durchführung des ELISA wie unter 3.6.2 beschrieben herangezogen.

PIA-Bindung an eine CovaLink®NH-Oberfläche

Das Prinzip der CovaLink-Oberfläche besteht in der Möglichkeit einer chemischen Bindung des Antigens an der Kunststoffoberfläche. Dafür sind die Platten mit reaktiven Aminogruppen beschichtet, an denen eine chemische Reaktion stattfinden kann, über die das Antigen kovalent an die Oberfläche gebunden wird (Zielen *et al.*, 1996).

Um dieses Prinzip zu nutzen, wurde das Antigen mit 1 % (wt/vol) EDC (N-(3-dimethylaminopropyl)-N-Ethylkarbodiimidhydrochlorid, Merck-Schuchardt, Darmstadt) auf die gewünschte Konzentration 0,25 µg/100 µl, 0,125 µg/100 µl und 0,0625 µg/100 µl verdünnt. Die Platte wurde mit 100 µl pro Napf beschickt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend konnte der ELISA wie unter 3.6.2 beschrieben durchgeführt werden.

PIA-Bindung an eine mit Poly-L-Lysin vorbehandelte Oberfläche

Poly-L-Lysin ist ein positiv geladenes Polypeptid, welches aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften gut auf Polyesteroberflächen haftet. Poly-L-Lysin kann die Bindung von Polysacchariden an eine Oberfläche fördern.

Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde mit je 200 µl Poly-L-Lysin (20 µg/ml) pro Napf beschickt und bei 37°C für 120 min inkubiert. Anschließend konnte der ELISA, wie unter 3.6.2 beschrieben, durchgeführt werden.

Kopplung von PIA an Poly-L-Lysin

Bei diesem Versuch sollte das PIA an Poly-L-Lysin gebunden werden, um die Haftung an Polyesteroberflächen zu fördern (Gray, 1979; Messina *et al.*, 1985).

Es wurden drei Reaktionsgefäße vorbereitet.

Reaktionsgefäß 1 enthielt 0,5 ml 0,01 N NaOH mit 0,001 % (wt/vol) Phenophtalein

Reaktionsgefäß 2 enthielt 0,5 mg Cyanurchlorid

Reaktionsgefäß 3 enthielt 0,1 ml 0,1 % (vol/vol) Poly-L-Lysin

1 ml der PIA-Präparation (6,2 µg/100 µl) wurde zum Reaktionsgefäß 1 hinzu gegeben und für 10 s vermischt. Zu diesem Zeitpunkt war die Farbe der Lösung rosa. Der Inhalt

des Reaktionsgefäß 1 wurde in das Reaktionsgefäß 2 überführt. Nach gründlichem Mischen entfärbte sich die Lösung durch das Cyanchlorid. Nach dieser Vorbereitung des Antigens erfolgte die Kopplung an Poly-L-Lysin. Hierfür wurde der Inhalt des Reaktionsgefäßes 2 in das Reaktionsgefäß 3 pipettiert, vermischt und für 2 h bei 4°C inkubiert. Danach erfolgten die Beschichtung der Platten mit dem PIA-Poly-L-Lysin-Konjugat sowie die Durchführung des ELISA wie unter 3.6.2 beschrieben.

3.6.2 Durchführung des ELISA

Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde je nach Bedarf mit unterschiedlichen PIA Konzentrationen mit je 100 µl pro Napf beschickt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde ausgeschlagen und dreimal mit *Aqua bidest.* gewaschen. Anschließend wurde die Platte mit 0,5 % (wt/vol) BSA 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend konnte die Platte nach dreimaligem Waschen mit Tween-Waschpuffer mit je 50 µl Antiserum pro Napf beschickt werden. Dabei wurden die Antiseren in Verdünnungsreihen in Doppelbestimmung aufgebracht. Die Randlöcher wurden nicht verwendet. Die Inkubation mit den Antikörpern dauerte 90 min bei 37°C und erfolgte in einer feuchten Kammer. Danach wurde die Platte dreimal mit 200 µl Tween-Waschpuffer pro Napf gewaschen. Anschliessend wurde das Anti-Kaninchen-IgG konjugiert mit alkalischer Phosphatase 1:5000 in Tween-Waschpuffer verdünnt und die Platte mit 50 µl pro Napf beschickt und für 60 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde die Platte erneut dreimal mit Tween-Waschpuffer gewaschen. Anschliessend wurden 100 µl alkalische Phosphatase Substratlösung je Napf zugegeben und die Platte 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von 50 µl 2 M NaOH pro Napf gestoppt. In einem Photometer konnte die OD₄₀₅ bei einer Referenzwellenlänge von 492 nm gemessen werden.

3.6.3 Competitionstest

Mit Hilfe des folgenden Tests sollten mögliche Kreuzreaktionen mit PIA-unspezifischen Antikörpern ausgeschlossen werden. Hierbei kommen zum Beispiel Antikörper gegen PIA-unabhängige, bakterielle Polysaccharide in Frage. Verwendet wurden daher ein Pneumokokken-Polysaccharid Impfstoff (0,5 ml mit den 23

häufigsten Kapseltypen von *S. pneumoniae* à 25 µg), ein Meningokokken-Polysaccharid Impfstoff (0,5 ml mit je 50 µg gereinigtes Polysaccharids von *N. meningitidis* der Gruppe A und Gruppe C), *E. coli* (Stamm O55:B5) Lipopolysaccharid und *S. aureus* Lipoteichonsäure, mit welchen das Anti-PIA-Antiserum präinkubiert wurde. Der sich anschließende ELISA sollte prüfen, ob diese Maßnahme als Ausdruck der Anwesenheit kreuzreagierender Antikörper Einfluss auf den Anti-PIA-Titer nimmt. Die Konstanten dieses ELISA waren die Antigenkonzentration für die Beschichtung der Mikrotiterplatte (0,25 µg/100 µl) und die Serumvorverdünnung von 1:2000. Die Variablen des Experiments stellten die beiden Impfstoffe, das Lipopolysaccharid und die Lipoteichonsäure dar, die dem Antiserum in 100-fachem Überschuss (im Vergleich zu 0,25 µg/100 µl PIA) und von dieser Konzentration ausgehend 1:10, 1:100, 1:1000 zugegeben wurden. Als Kontrolle wurde dem Serum jeweils PBS hinzu gegeben. Zudem erfolgte ein analoger Versuchsansatz, bei welchem eine Präabsorption mit PIA erfolgte. Antiserum und die jeweiligen Polysaccharide wurden für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach folgte der ELISA wie unter 3.6.2 beschrieben.

3.7 Statistische Auswertung

Alle statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe von SPSS 13.0 für Windows durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha=0,05$ (zweiseitig) festgelegt.

Alle Gruppenvergleiche wurden mit dem t-Test für unabhängige Stichproben nach Student berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung eines ELISA zum spezifischen Nachweis von Anti-PIA-Antikörpern

Ziel der Arbeit war es, spezifische Anti-PIA-Antikörper mittels eines neu zu entwickelnden ELISA in Seren von Patienten mit kulturell bestätigten Hüft- und Kniegelenksendoprotheseninfektionen durch *S. aureus* oder *S. epidermidis* zu detektieren. Hierbei sollte ein spezifischer ELISA entwickelt werden. Als Antigen sollte bei der Etablierung des ELISA zunächst das Polysaccharid PIA I des Stammes *S. epidermidis* 1457 genutzt werden. Da PIA von *S. epidermidis* und *S. aureus* strukturell keine signifikanten Unterschiede aufweisen (Maira-Litran *et al.*, 2002a), kann davon ausgegangen werden, dass Antikörper, welche mit PIA von *S. epidermidis* reagieren, auch an PIA von *S. aureus* binden.

4.1.1 Reinigung von PIA

Zur Herstellung des Antigens für die Etablierung des ELISA sollte das von dem Stamm *S. epidermidis* 1457 gebildete PIA gereinigt und in das Polysaccharid I und II aufgetrennt werden. Hierfür wurde der durch Ultraschallbehandlung erzeugte PIA-Rohextrakt zunächst mittels Gelfiltration über eine Sephacryl S-200 Säule aufgereinigt. Dieses Verfahren erlaubt es, hochmolekulares PIA mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ca. 200 kDa von niedermolekularen Bestandteilen (z.B. Teichonsäuren, zellwandassoziierte Proteine) abzutrennen (Mack *et al.*, 1996a). In Abbildung 4-1 ist ein typisches Elutionsprofil des PIA-Rohextraktes nach Gelfiltration zu sehen.

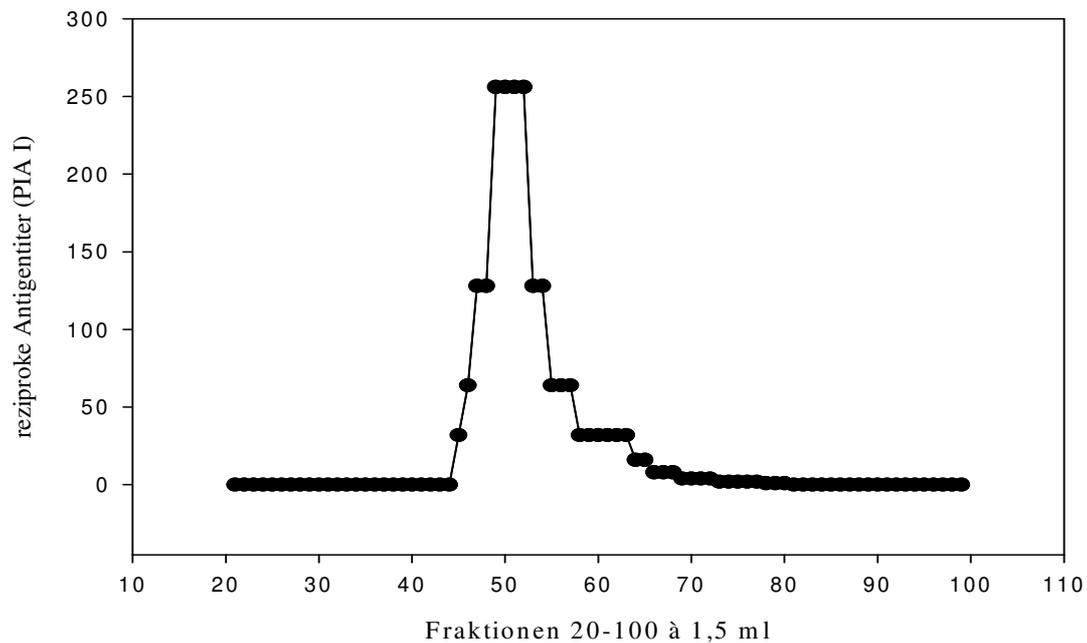


Abbildung 4-1: Typisches Elutionsprofil von PIA nach Aufreinigung durch die Gelfiltration über eine Sephacryl S-200 Säule. Dargestellt sind die Fraktionen 20-100. Die Elution der Probe erfolgte mit 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,5. Der Antigentiter wurde in den Fraktionen durch einen Koagglutinationsassay unter Verwendung eines PIA-spezifischen, präabsorbierten Antiserums bestimmt. Alle Fraktionen mit einem Antigentiter > 1:16 wurden als PIA-positive Fraktion gewertet. Das immunogene Material eluiert nahe des Ausschlussvolumens der Säule (entsprechend einem Molekulargewicht von etwa 200 kDa).

Das auf diese Weise gereinigte PIA wurde mittels Anionenaustauschchromatographie in die unterschiedlich geladenen Polysaccharid-Isoformen PIA I und PIA II aufgetrennt (Mack *et al.*, 1996a). Dies erschien daher notwendig, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass es im Verlauf einer Staphylokokkeninfektion zur differentiellen Bildung von Antikörpern gegen diese strukturell unterschiedlichen Polysaccharid-Isoformen kommt. Die Abbildung 4-2 zeigt ein typisches Elutionsprofil, wobei Peak I das weniger geladene Polysaccharid PIA I und Peak II das stärker anionische Polysaccharid PIA II repräsentiert.

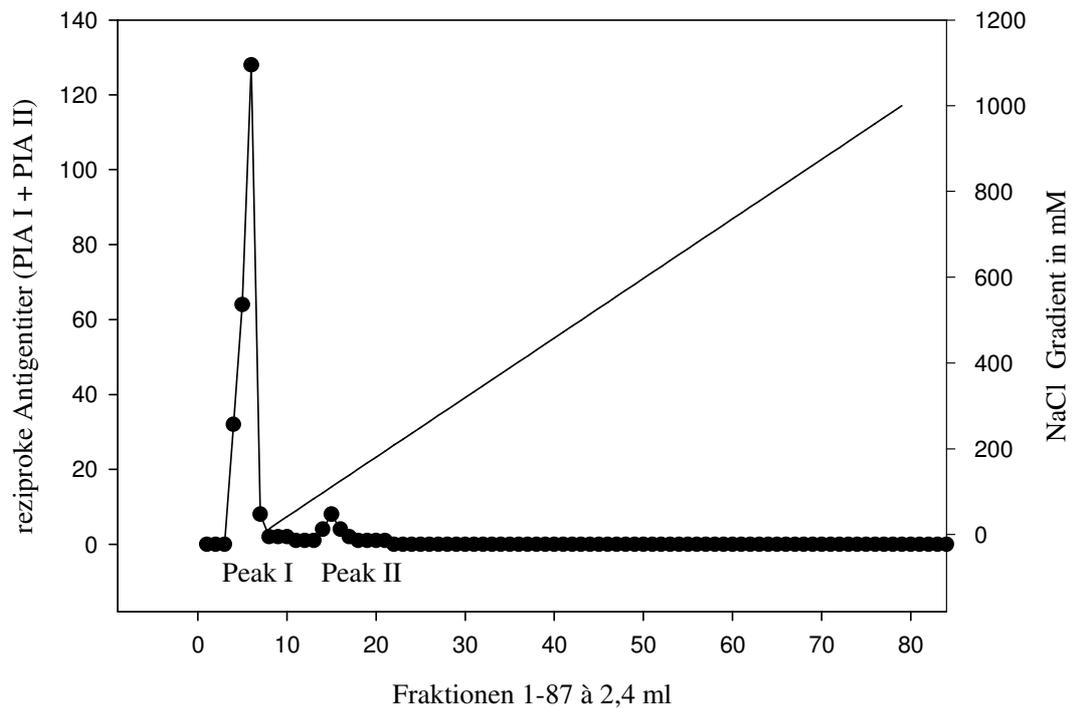


Abbildung 4-2: Das antigenreaktive Material aus der Gelfiltrationschromatographie wurde mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie in PIA I und PIA II aufgetrennt. Die Elution des Materials erfolgte durch einen kontinuierlichen NaCl-Gradienten (0 – 1000 mM). Es können zwei Peaks dargestellt werden, wobei der erste Peak PIA I und der zweite Peak PIA II repräsentiert (Mack *et al.*, 1996a). Die PIA-positiven Fraktionen wurden mithilfe des spezifischen PIA-Koagglutinationsassays semi-quantitativ detektiert.

4.1.2 ELISA

Ziel war es, einen ELISA zu etablieren, welcher erlaubte, reproduzierbar mit hoher Sensitivität und Spezifität Anti-PIA I-Antikörper in Patientenseren zu detektieren. Hierfür war es erforderlich, PIA I in optimaler Menge am Boden eines Mikrotiternapfes zu adsorbieren. Grundsätzlich steht eine Vielzahl unterschiedlicher Oberflächen als Antigenträger zur Verfügung, die ihrerseits durch Beschichtung einfach modifiziert werden konnten. Zunächst sollte eine Oberfläche gefunden werden, die eine zuverlässige und gleichmäßige Bindung des Antigens aufweist, um somit den Test reproduzierbar unter identischen Bedingungen durchführen zu können.

Zunächst sollte die optimale, zur Beschichtung der ELISA-Platten zu verwendende Antigenkonzentration von PIA I gefunden werden. Hierzu wurde PIA I in den Konzentrationen 0,03125 µg/100 µl, 0,0625 µg/100 µl, 0,125 µg/100 µl, 0,25 µg/100 µl und 0,5 µg/100 µl auf die unterschiedlichen, im Folgenden detailliert beschriebenen 96-Loch-Mikrotiterplatten aufgebracht. Es folgte ein spezifisches Anti-PIA-Kaninchenantiserum (Mack *et al.*, 1996a), welches in geometrischen Verdünnungsreihen (1:64-1:32000) auf die Platten gegeben wurde. Als optimale Beschichtung wurde die Konstellation angenommen, bei welcher trotz starker Verdünnung des Anti-PIA I-Antiserums ein starkes ELISA-Signal erzielt wurde, ohne dass mit dem als Negativkontrolle eingesetzten Präimmunserum ein positives Signal erhalten wurde. Der Cut-Off zur Definition positiver Verdünnungsstufen wurde hierbei auf einen Absorptionwert A_{405} (Referenzwellenlänge A_{495}) von 0,3 festgelegt.

Bindung von PIA I an eine MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Dänemark) Oberfläche

Die Bindung von Antigen an eine MaxiSorp-Oberfläche beruht auf physikalischen Prinzipien. Die Polyesteroberfläche hat eine hohe Affinität zu Molekülen mit hydrophilen bzw. hydrophoben Bereichen. Da PIA I sowohl positive als auch negative Ladung enthält, erschien eine suffiziente Bindung des Polysaccharids an dieser Oberfläche möglich.

In den Verdünnungsstufen 1:64-1:512 des Anti-PIA-Antiserums konnte unabhängig von der auf die Oberfläche aufgebrachte PIA-Menge eine Absorption von größer 2,5, dem maximalen Messwert, festgestellt werden. Ab einer Verdünnung des Anti-PIA-Antiserums von 1:1024 ließ sich dann ein von der Verdünnung abhängiger Abfall der Absorption von A_{405} 2,4 bis 0,8 beobachten. Die ermittelten Absorptionswerte unter Verwendung des Kaninchen-Präimmunserums fielen ab einer Verdünnung von 1:1024 unter den vorher festgelegten Cut-off ($A_{405} \leq 0,3$). Interessanter Weise fand sich bei einer Verdünnung des Anti-PIA-Antiserums von 1:1024 kein entscheidender Unterschied in der Absorption zwischen mit 0,25 µg/100 µl PIA I und 0,5 µg/100 µl PIA I beschichteten Platten (A_{405} 2,31 vs. A_{405} 2,37). Zusammengefasst konnte somit eine Beschichtung der Maxi-Sorp Oberfläche mit 0,25 µg/100 µl PIA I als die optimale PIA-Menge angenommen werden, bei der ein maximales Signal mit dem Anti-PIA-

Antiserum bei gleichzeitig negativem Ergebnis des Präimmunserums erzielt werden konnte.

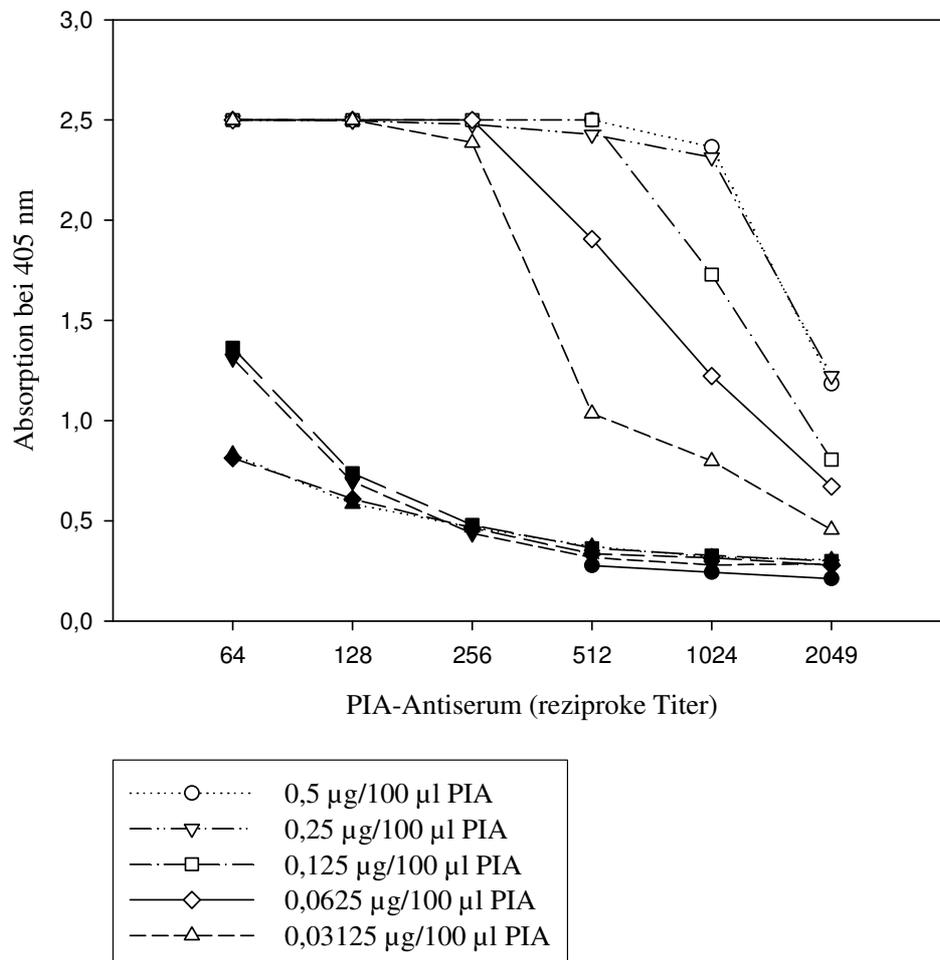


Abbildung 4-3: Untersuchung der Kopplung von PIA I an eine MaxiSorp Oberfläche. Es konnte eine Abhängigkeit der Stärke des ELISA-Signals von der eingesetzten Antigenkonzentration (PIA I in µg/100µl) und der Verdünnungsstufe des Anti-PIA-Antiserums gefunden werden. Die Kurven mit den weiß unterlegten Symbolen beschrieben die erzielten Absorptionswerte, die für definierte Verdünnungsstufen des Anti-PIA-Antiserums und den mit unterschiedlichen PIA I-Mengen beschichteten Oberflächen erzielt wurden. Die Kurve mit den schwarz unterlegten Symbolen beschreibt die mit dem Präimmunserum ermittelten Absorptionswerte. Die Datenpunkte sind jeweils Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung.

Modifizierung der Mikrotiterplatte mit Poly-L-Lysin

Poly-L-Lysin ist ein positiv geladenes Polypeptid, welches aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften gut auf Polyesteroberflächen haftet. Unter der Annahme, dass durch die Modifikation einer Maxi-Sorp Oberfläche mit Poly-L-Lysin eine effizientere PIA-Bindung erzielt werden könnte, wurden Mikrotiterplatten zunächst mit Poly-L-Lysin beschickt und erst daraufhin mit PIA I inkubiert. Diese Maßnahme erbrachte jedoch ein unbefriedigendes Ergebnis. Bei einer Beschichtung der mit Poly-L-Lysin vorbehandelten Platte mit 0,25 µg/100 µl PIA I konnten selbst bei einer niedrigen Verdünnung des Anti-PIA-Antiserum von 1:64 nur Absorptionen unterhalb der maximalen Absorption von 2,5 beobachtet werden. Bereits bei einer Verdünnung des Anti-PIA-Antiserums von 1:4096 lag die Absorption im ELISA unterhalb des Cut-off von 0,3. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte nicht ausgeschlossen werden, dass im Rahmen der serologischen Untersuchung von Patientenproben niedrige Anti-PIA-Antikörpertiter als falsch-negativ angegeben werden. Die deutlich schlechtere Sensitivität dieses Systems im Vergleich zur unbehandelten Maxi-Sorp-Mikrotiterplatte ließen es somit als für die geplante Untersuchung ungeeignet erscheinen.

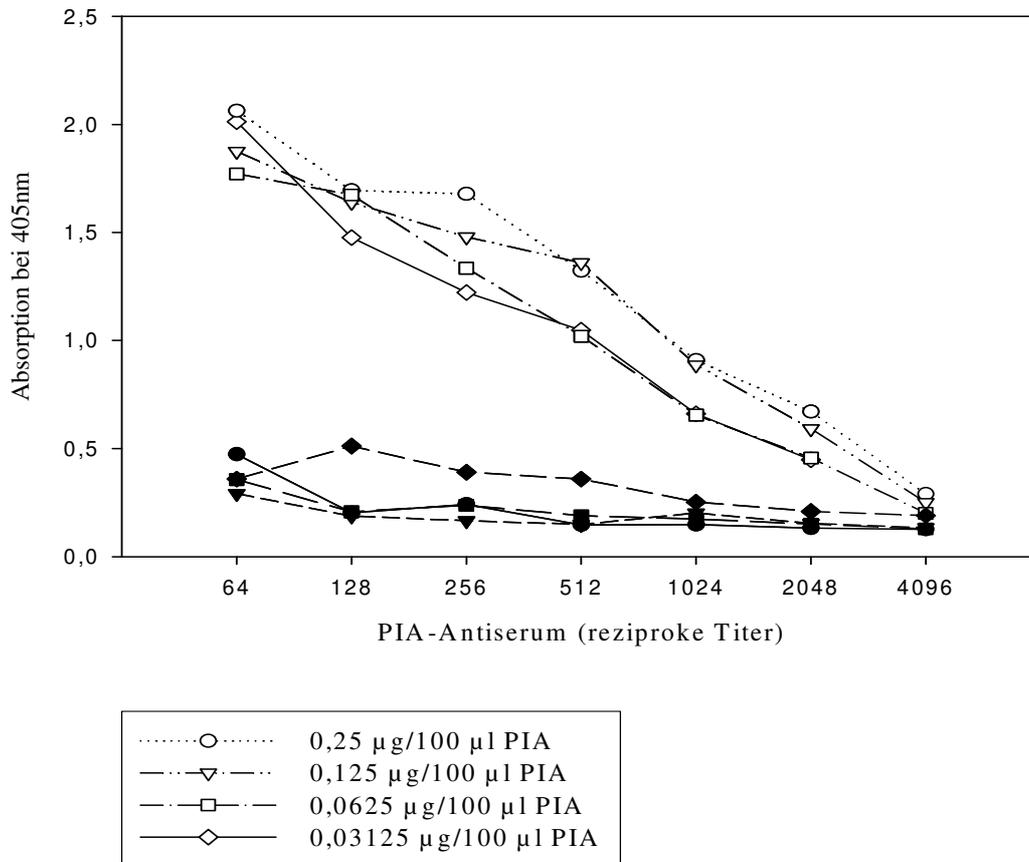


Abbildung 4-4: Untersuchung der PIA I-Bindung an mit Poly-L-Lysin beschichteten Platten. Die unter Verwendung des Ant-PIA-Antiserums erhobenen Absorptionswerte sind durch die Kurven mit den weiß unterlegten Symbolen beschrieben. Die Kurve mit den schwarz unterlegten Symbolen beschreibt die mit dem Präimmuns serum ermittelten Absorptionswerte. Die Datenpunkte sind jeweils Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung.

Kopplung von PIA I an Poly-L-Lysin

Analog zur Modifizierung der Oberfläche mit Poly-L-Lysin erschien es durch Konjugation von Poly-L-Lysin mit PIA I möglich, einen Antigen-Proteinkomplex zu erstellen, welcher eine bessere Haftung an der Polyesteroberfläche aufweist. Durch kovalente Kopplung eines Polysaccharids an Poly-L-Lysin ist es möglich, größere Mengen Polysaccharid nicht-kovalent an eine Polyesteroberfläche zu koppeln (Gray, 1979; Messina *et al.*, 1985). Nach Kopplung von PIA I an Poly-L-Lysin wurden Maxi-Sorp Mikrotiterplatten mit dem resultierenden PIA-Poly-L-Lysin-Konjugat beschichtet.

Jedoch auch dieses System erbrachte kein befriedigendes Ergebnis. Bei einer Beschichtung der Platte mit $0,25 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ PIA I lag bei einer Verdünnung des Anti-PIA-Antiserums von 1:128 die erzielte Absorption bei 2,47. Im Vergleich mit den Ergebnissen der Beschichtung der nativen Maxi-Sorp-Platte mit PIA I war zu sehen, dass die Kopplung von PIA I an Poly-L-Lysin keine bessere Haftung des Antigens an eine Mikrotiterplatte erbrachte. Die Kopplung von PIA I an Poly-L-Lysin zeigte bei einer Serumverdünnung von 1:1024 eine Absorption von 1,1, wogegen bei der Beschichtung einer nativen Maxi-Sorp Mikrotiterplatte mit der unmodifizierten PIA I-Präparation noch eine Absorption von 2,4 zu messen war.

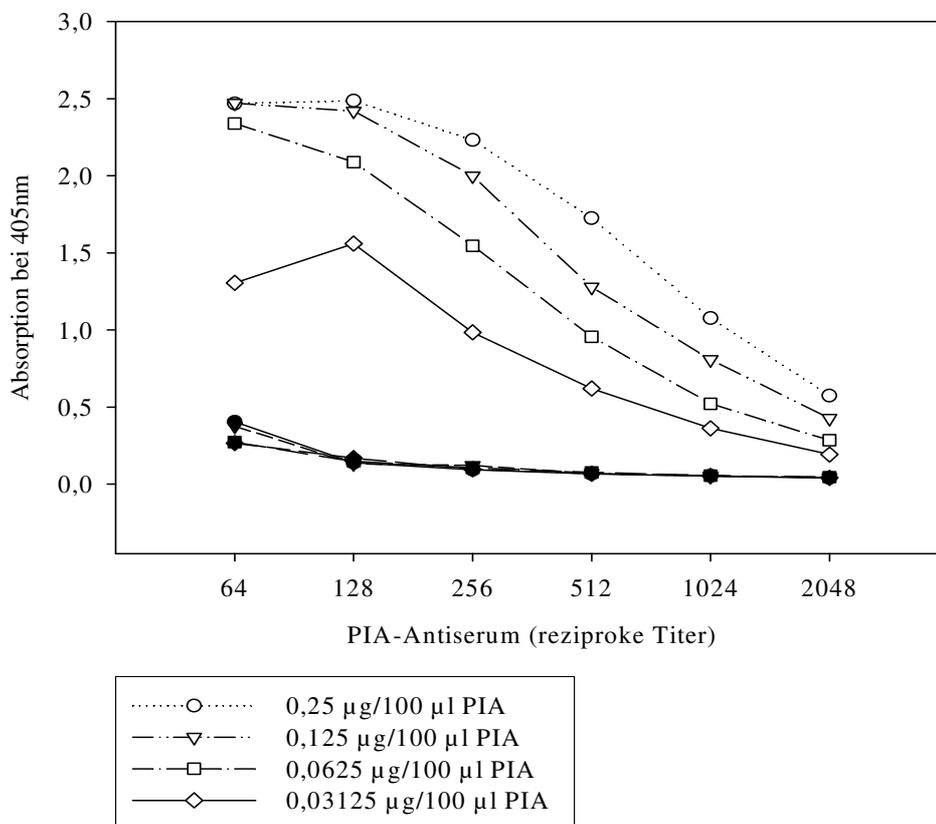


Abbildung 4-5: Untersuchung zur Beschichtung von MaxiSorp-Mikrotiterplatten mit PIA I-Poly-Lysin-Konjugat. Es konnte die Abhängigkeit des ELISA- Signals von der Antigenkonzentration und der Verdünnungsstufe des Anti-PIA-Antiserums gezeigt werden (weisse Symbole). Die Kurve mit den schwarz unterlegten Symbolen repräsentiert die mit dem Präimmenserum erzielte Absorption. Die Datenpunkte sind jeweils Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung.

Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass die höchste Sensitivität bei Beschichtung einer nativen MaxiSorp-Mikrotiterplatten mit 0,25 µg/100 µl PIA I erreicht wurde. In diesem Fall war noch bei einer Anti-PIA-Antiserumverdünnung von 1:1024 annähernd der maximale Absorptionswert zu erreichen, wobei gleichzeitig die Negativkontrolle mit dem Präimmenserum unter den Cut-off von 0,3 abfiel. Bei anderen Testsystemen lag die Absorption bei gleicher Serumverdünnung unter 1,0, so dass zu erwarten war, dass Patientenseren mit niedrigen Anti-PIA-Antikörpertitern als falsch negativ angegeben werden. Somit konnten die mit Poly-L-Lysin beschichteten Platten sowie die Vorinkubation von PIA I mit Poly-L-Lysin für den gewünschten Anwendungsbereich des ELISA ausgeschlossen werden.

4.1.3 Spezifitätsnachweis

Eine hohe Spezifität ist eine Grundvoraussetzung für den gewünschten Anwendungsbereich des Anti-PIA-ELISA, da ausschließlich Anti-PIA-Antikörpertiter aus Patientenseren nachgewiesen werden sollen. Da zum einen auch andere kommensale Bakterien Polysaccharidstrukturen aufweisen, sowie *S. aureus* und *S. epidermidis* selbst PIA-unabhängige Polysaccharidstrukturen beinhalten, erschien es jedoch möglich, dass mittels des PIA I basierten ELISA kreuzreagierende, jedoch nicht PIA I-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Es muss also untersucht werden, ob falsch-positive Ergebnisse aufgrund einer Kreuzreaktion von gereinigtem PIA I mit unspezifischen Antikörpern erhoben werden.

Spezifitätsnachweis durch Präabsorption des Anti-PIA-Antiserums

Um nachzuweisen, dass durch die gewählte Methode Anti-PIA-Antikörper und keine Anti-Staphylokokken-Antikörper nachgewiesen werden, wurde das spezifische Anti-PIA-Kaninchenantiserum an den Stämmen *S. epidermidis* 1457 (PIA-positiv) und *S. epidermidis* 1457-M10 (PIA-negativ) absorbiert. Zu erwarten war, dass der PIA produzierende Stamm *S. epidermidis* 1457 während der Absorptionsphase die Anti-PIA-Antikörper des Antiserums spezifisch bindet und durch Abzentrifugation der Bakterienzellen aus dem Serum entfernt werden. Dem gegenüber sollte die Absorption

am PIA-negativen Stamm *S. epidermidis* 1457-M10 keine Auswirkungen auf den im ELISA bestimmten Anti-PIA-Antikörpertiter haben.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-6 dargestellt. Es wird deutlich, dass die Präabsorption mit den beiden genutzten Stämmen einen differentiellen Effekt auf die Signalintensität des ELISA hat. Während die Präabsorption mit *S. epidermidis* 1457 im Vergleich zum nicht absorbierten Anti-PIA-Antiserum eine Reduktion des Signals um 72,88 % bewirkt, liegt die Reduktion durch Präabsorption an *S. epidermidis* 1457-M10 lediglich bei 9,7 %. Dies weist darauf hin, dass tatsächlich spezifisch Anti-PIA-Antikörper nachgewiesen werden. Um diesen Sachverhalt auch für ein humanes Serum zu prüfen, wurde das Serum einer Patientin aus der Akutphase einer kulturell bestätigten *S. epidermidis* Kunstklappenendokarditis untersucht. In diesem Serum war bereits in früheren Untersuchungen (Mack und Mitarbeiter, nicht publizierte Daten) ein hoher Anti-PIA-Antikörpertiter nachgewiesen worden. Dieses Serum wurde ebenfalls an *S. epidermidis* 1457 und *S. epidermidis* 1457-M10 präabsorbiert. Die Präabsorption mit dem PIA-produzierenden Stamm *S. epidermidis* 1457 reduzierte die ELISA-Signalstärke des Patientenserums um 92,9 %, wogegen *S. epidermidis* 1457-M10 nur eine Reduktion von 6,9 % erbrachte (Abbildung 4-6). Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass durch den ELISA Anti-PIA-Antikörper und nicht unspezifisch Anti-Staphylokokken-Antikörper detektiert werden.

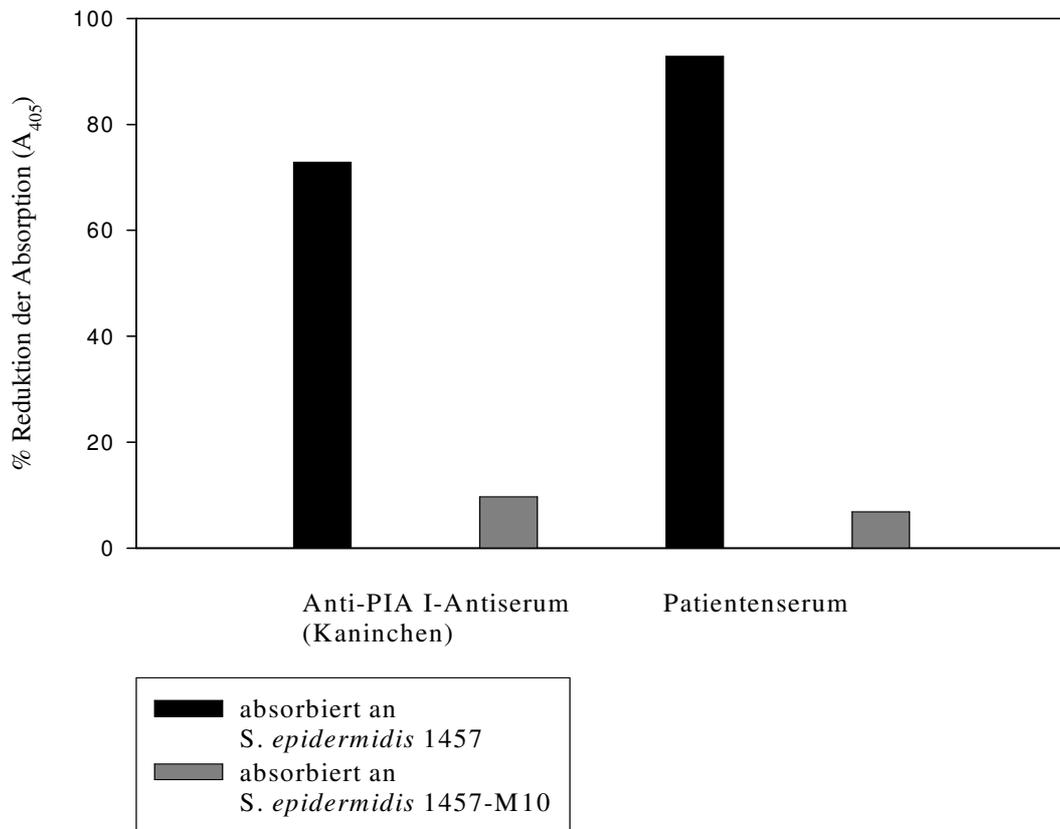


Abbildung 4-6: Dieses Säulendiagramm zeigt in Prozent die Reduktion der ELISA-Signalstärke durch Präabsorption des Anti-PIA-Antiserums und eines definierten Patientenserums mit den Stämmen *S. epidermidis* 1457 (PIA-positiv; schwarz unterlegte Säule) und *S. epidermidis* 1457-M10 (PIA-negativ; grau unterlegte Säule) im Vergleich zum nicht präabsorbierten Serum. Die Graphik stellt die Ergebnisse der so vorbehandelten Seren bei einer Verdünnung von 1:8000 dar. Die Reduktion der Absorption wurde unter Verwendung der Formel $[(1-A_{405} \text{ nach Absorption})/A_{405} \text{ vor Absorption}] \times 100$ berechnet. Es wird deutlich, dass die Präabsorption mit unterschiedlichen Stämmen einen differentiellen Effekt auf die ELISA-Signalstärke hat. Im Gegensatz zur Absorption mit dem PIA-negativen Stamm *S. epidermidis* 1457-M10 führte nur die Absorption an dem PIA-positiven Stamm *S. epidermidis* 1457 zu einer deutlichen Reduktion der ELISA-Signalstärke.

Spezifitätsnachweis durch Konkurrenz

Polysaccharidstrukturen lassen sich bei vielen, unter anderem auch kommensalen Bakterien nachweisen. Die im Weiteren beschriebenen Untersuchungen hatten daher zum Ziel, auszuschließen, dass es sich bei den gemessenen Anti-PIA-Antikörpertitern eigentlich um kreuzreagierende Antikörper mit primärer Spezifität für PIA-unabhängige Polysaccharide handelt. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde ein kompetitiver ELISA verwendet, bei welchem das spezifische anti-PIA-Antiserum mit Meningokokken-Polysaccharid (Meningokokken-Impfstoff A + C Mérieux[®], Pasteur Mérieux MSD GmbH), Pneumokokken-Kapselpolysaccharid (Pneumokokken Impfstoff Pneumovax[®]23, Pasteur Mérieux MSD GmbH), *E. coli*-Lipopolysaccharid und *S. aureus*-Lipoteichonsäure präinkubiert wurde. Gereinigtes PIA I diente als Positivkontrolle. Wie in Abbildung 4-7 dargestellt, führte die Präinkubation von Anti-PIA-Antiserum mit gereinigtem PIA I im Vergleich zur Kontrolle ohne Präinkubation zu einer Reduktion des ELISA-Signals um 78 %. Demgegenüber führte die Präinkubation mit den oben genannten Polysacchariden nicht zu einer signifikanten Abnahme des ELISA-Signals (Die Reduktion der ELISA-Signalstärke lag zwischen 0 %-9,4 %, Abbildung 4-7). Strukturell PIA I-unabhängige Polysaccharide, wie die im Versuch verwendeten, zeigen somit keine Kreuzreaktivität mit den im ELISA nachgewiesenen Anti-PIA-Antikörpern. Dieser Befund ist ein weiterer Hinweis dafür, dass der hier entwickelte ELISA tatsächlich Anti-PIA-Antikörper misst.

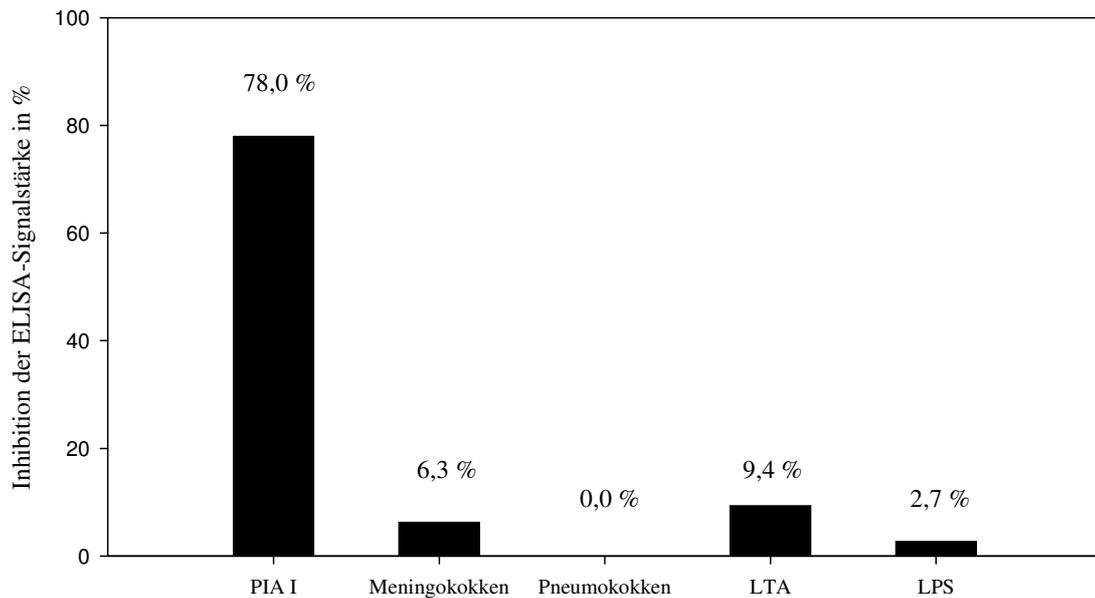


Abbildung 4-7: Die Graphik zeigt die Inhibition der ELISA-Signalstärke durch Vorinkubation des Anti-PIA-Antiserums mit gereinigtem PIA I sowie dem PIA-unabhängigen Meningokokken-Kapselpolysaccharid (Meningokokken-Impfstoff A + C Mériex[®], Pasteur Mériex MSD GmbH), Pneumokokken-Kapselpolysaccharid (Pneumokokken Impfstoff Pneumovax[®]23, Pasteur Mériex MSD GmbH), *S. aureus*-Lipoteichonsäure (LTA) sowie *E. coli*-Lipopolysaccharid (LPS). Die Inhibition in Prozent wurde unter Verwendung der Formel $[(1 - A_{405 \text{ nach Absorption}}/A_{405 \text{ vor Absorption}}) \times 100]$ berechnet. Durch die Präinkubation des Anti-PIA-Antiserums mit PIA I wurde die ELISA-Signalstärke um 78 % inhibiert. Andere Polysaccharide dagegen erreichen eine Inhibition von 0 %-9,4 % und haben damit einen deutlich geringeren Effekt auf die im ELISA nachgewiesene Signalstärke.

4.2 Messung von Anti-PIA-Antikörpern in Patienten- und Blutspenderseren

Im Rahmen einer Kooperation mit der ENDO-Klinik Hamburg wurden 59 Seren von Patienten mit Hüft- und Kniegelenksprotheseninfektion zur Verfügung gestellt, welche zwischen 2001 bis 2004 in diesem Zentrum behandelt wurden. Das Material stammte von 27 Frauen und 32 Männer. Das Alter der Patienten lag zwischen 23 und 84 Jahren (Median 65). Alle Patienten wiesen zum Zeitpunkt der Behandlung typische Symptome einer Endoprothesen-Infektion auf. Zudem wurden bei jedem Patienten in unabhängigen klinischen Materialien (präoperatives Gelenkpunktat sowie intraoperativer Abstrich) klonal identische Bakterien isoliert, so dass sowohl klinische wie auch mikrobiologische Kriterien zur Diagnose einer Endoprotheseninfektion erfüllt wurden. Als Erreger konnten *S. aureus* (n=13) sowie *S. epidermidis* (n=46) identifiziert werden. Alle *S. aureus* Stämme waren Biofilm- sowie *icaADBC*-positiv. Die *S. epidermidis* Stämme beinhalteten 21 Biofilm-positive sowie 25 Biofilm-negative Stämme. Das Verhältnis *icaADBC*-positiv zu *icaADBC*-negativ betrug 28 zu 18 (Rohde *et al.*, 2007). 38 Patienten wiesen eine infizierte Hüftendoprothese (32 *S. epidermidis*, 6 *S. aureus*) auf, 21 Patienten eine infizierte Knieendoprothese (14 *S. epidermidis*, 7 *S. aureus*).

Der etablierte ELISA sollte nun das Vorhandensein und gegebenenfalls die Titerhöhe von spezifischen Anti-PIA I-Antikörpern in diesen 59 Patientenseren ermitteln. Da von jedem Patienten nur zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Seren gewonnen wurden, konnten keine serologischen Verlaufskontrollen durchgeführt werden. Hierdurch konnten klassische serologische Kriterien zur serologischen Diagnose einer aktiven Infektion (signifikanter Titeranstieg oder Titerabfall) nicht angewendet werden. Als Kontrollgruppe wurden daher 63 Blutspenderseren herangezogen. Das Blutspenderzentrum Hamburg-Eppendorf stellte 63 Seren von Blutspendern zur Verfügung (Frauen n=17; Männer n=46), welche im Jahr 2003 im Blutspenderzentrum des UKE (Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf) untersucht worden waren. Das Alter dieses gesunden Kollektivs lag zwischen 19 und 68 Jahren (Median 44 Jahre). Die erhobenen Daten zur Prävalenz von Anti-PIA I-Antikörpern der Isotypen IgG, IgA und

IgM in Blutspendenserien sollten dann mit den Anti-PIA I-Antikörpertitern der Patienten mit Endoprotheseninfektionen verglichen werden.

4.2.1 Nachweis von Anti-PIA I-Antikörpern bei Blutspendern

Mit Hilfe des etablierten ELISA wurden 63 Blutspendenserien auf Anti-PIA I-Antikörper untersucht. In allen 63 Blutspendenserien konnten Antikörper gegen PIA I nachgewiesen werden. Die mittlere IgG-Titerhöhe betrug 1:5473 (Median 1:4000), jedoch zeigte sich eine große Streuung der Titerhöhen mit Werten zwischen 1:256-1:26000 (siehe Tabelle 4-1, Abbildung 4-8), die sich auch in einer erheblichen Standardabweichung widerspiegelt (siehe Tabelle 4-1). Die Titer der Antikörperisoformen IgA und IgM bewegten sich zwischen 1:64 und 1:1024.

Tabelle 4-1: Mittelwert, Median und Standardabweichung der erhobenen Anti-PIA I-Antikörpertiter aus 63 Blutspendenserien (IgG, IgA, IgM).

Blutspender (n=63)	IgG*	IgA*	IgM*
Mittelwert	5472,7	309,8	193,0
Median	4000	256	128
Standardabweichung	5560,5	229,3	191,5

*Angabe als reziproker Titer

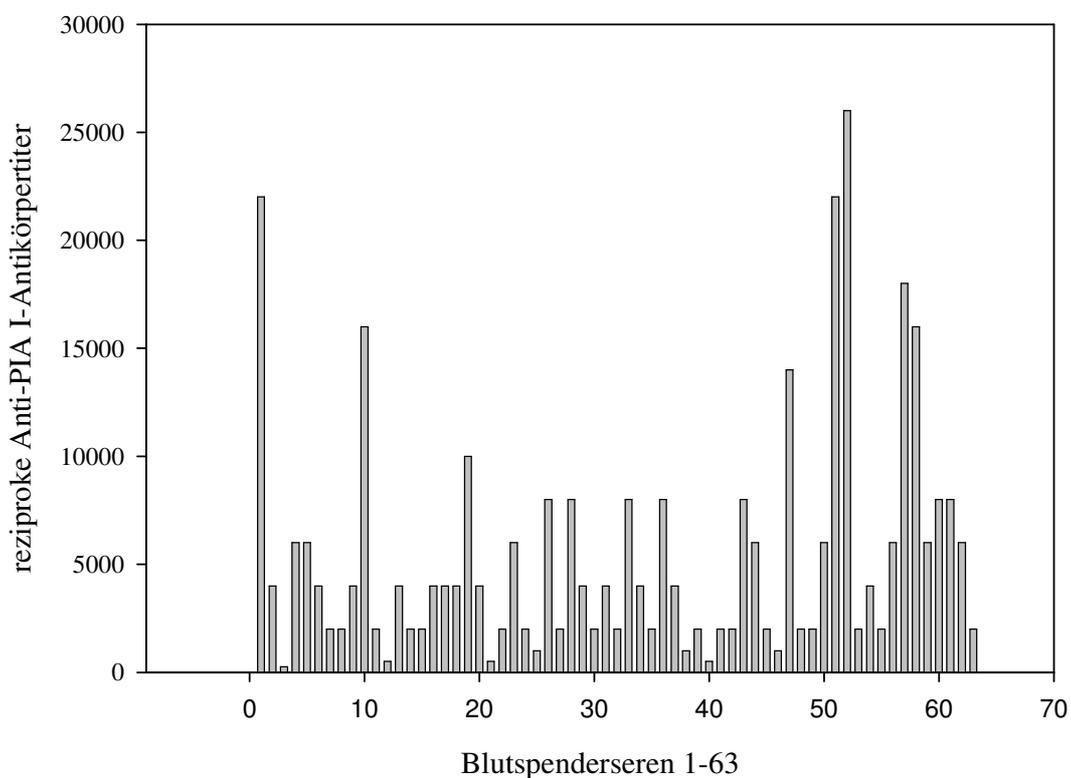


Abbildung 4-8: Nachweis von Anti-PIA-IgG in Seren gesunder Blutspender. Diese Abbildung zeigt die absoluten Titer der Antikörperisomere IgG. In allen Blutspenderseren wurden Antikörper gegen das gereinigte Antigen PIA I nachgewiesen.

4.2.2 Nachweis von Anti-PIA I-Antikörpern in Patientenseren

In den Patientenseren konnten ebenfalls in allen Fällen Antikörper gegen PIA I nachgewiesen werden. Die mittlere Titerhöhe lag bei 1:12000 (Median 1:10000), wobei deutliche Unterschiede in der Titerhöhe bei einzelnen Patienten (minimal 1:1000 bis maximal 1:30000) beobachtet werden konnten (siehe Tabelle 4-2, Abbildung 4-9). Die Titer der Antikörperisomere IgA und IgM bewegten sich zwischen 1:16 und 1:1024.

Tabelle 4-2: Mittelwert, Median und Standardabweichung der erhobenen Anti-PIA I-Antikörpertiter in 59 Patientenseren (IgG, IgA, IgM)

Patienten	IgG*	IgA*	IgM*
n=59			
Mittelwert	12000,0	337,9	121,4
Median	10000	256	64
Standardabweichung	8012,9	300,9	146,7

* Angabe als reziproker Titer

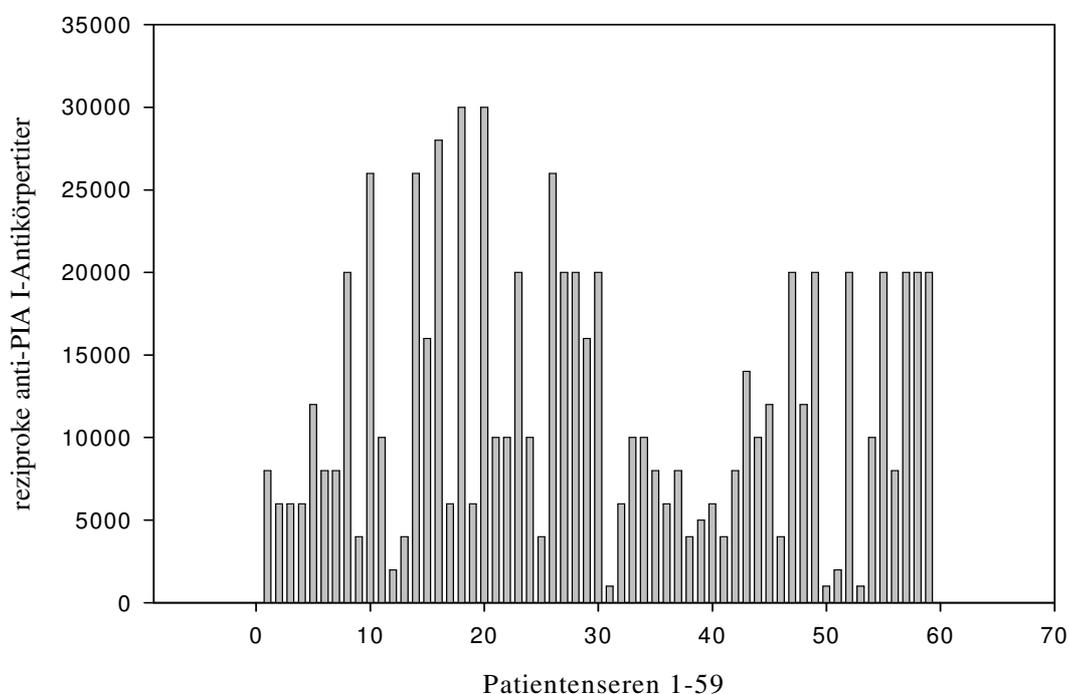


Abbildung 4-9: Nachweis von Anti-PIA-IgG in Patientenseren. Seren von 59 Patienten wurden mittels ELISA auf Anti-PIA I-Antikörper untersucht. In diesem Kollektiv waren in allen Seren Antikörper gegen PIA I nachweisbar. Analog zur Anti-PIA I-Antikörperbestimmung in Blutspenderseren ist auch hier eine große Variabilität in der Höhe der Antikörpertiter festzustellen (siehe auch Tabelle 4-1 und Abbildung 4-8).

Der Nachweis von Anti-PIA I-IgG-Antikörpern in Blutspender- und Patientenseren zeigt, dass PIA I offensichtlich *in vivo* gebildet wird. Interessanterweise konnte in keiner der untersuchten Populationen relevante Anti-PIA I-IgM oder -IgA Antikörpertiter dargestellt werden. Beim Vergleich der Anti-PIA I-IgG Titer zeigte sich, dass in Patientenseren im Mittel statistisch signifikant ($p < 0,001$, T-Test) höhere Anti-PIA I-IgG Antikörpertiter als in den Seren der gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen werden konnten. Dies ist auch anhand der folgenden Abbildung (Abbildung 4-10) zu sehen.

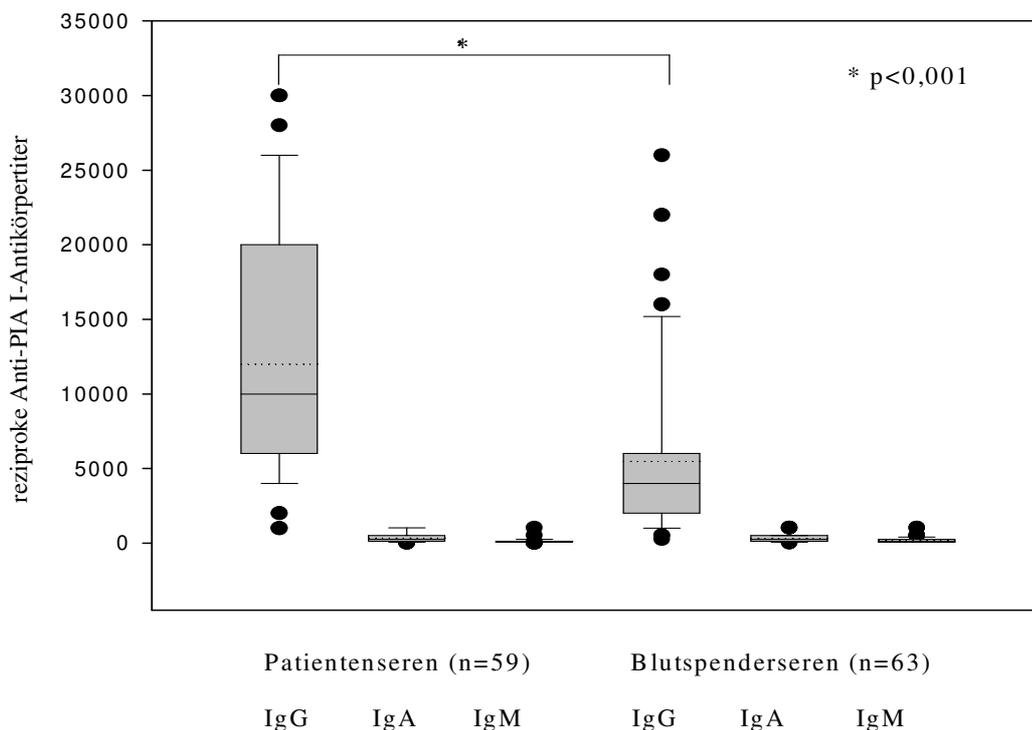


Abbildung 4-10: Darstellung der Verteilung der Anti-PIA I-Antikörpertiter bei Patienten- und Blutspenderseren im Boxed-Plot. Die Box in dieser Form der Darstellung wird durch das 25 %- und 75 %-Quantil begrenzt. In der Box wird der Median als durchgezogene und der Mittelwert als gestrichelte Linie dargestellt. Die beiden anderen waagerechten Linien unterhalb und oberhalb der Box bezeichnen das 10 %-und das 90 %-Quantil. Die außerhalb dieses Bereiches liegenden Extremwerte werden als separate Punkte eingezeichnet. Es wurden die Titer der Antikörper-Isoformen IgG, IgA und IgM bestimmt und zum Vergleich herangezogen. Bei den Patienten konnte ein signifikant höherer Anti-PIA I-IgG Antikörpertiter nachgewiesen werden als bei den gesunden Probanden ($p < 0,001$). Allerdings zeigt sich, dass es einen breiten Überschneidungsbereich der IgG Titerhöhen bei Patienten und gesunden Blutspendern gibt. Bei den Antikörperisofomern IgA und IgM konnten keine Unterschiede zwischen den Populationen dargestellt werden.

Dieses Ergebnis ließ sich auch bei einer isolierten Betrachtung der Patienten mit einer *S. aureus* oder *S. epidermidis* verursachten Endoprotheseninfektion nachvollziehen: Patienten beider Gruppen wiesen signifikant höhere Anti-PIA-I IgG Antikörpertiter als die Blutspender auf ($p=0,032$ und $p<0,001$; Abbildung 4-11). Beim Vergleich der Patienten IgG Titer wiesen die Patienten mit *S. epidermidis* induzierten Infektionen im Durchschnitt etwas höhere Titer auf als Patienten mit *S. aureus* induzierten Infektionen. Der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (siehe Abbildung 4-11).

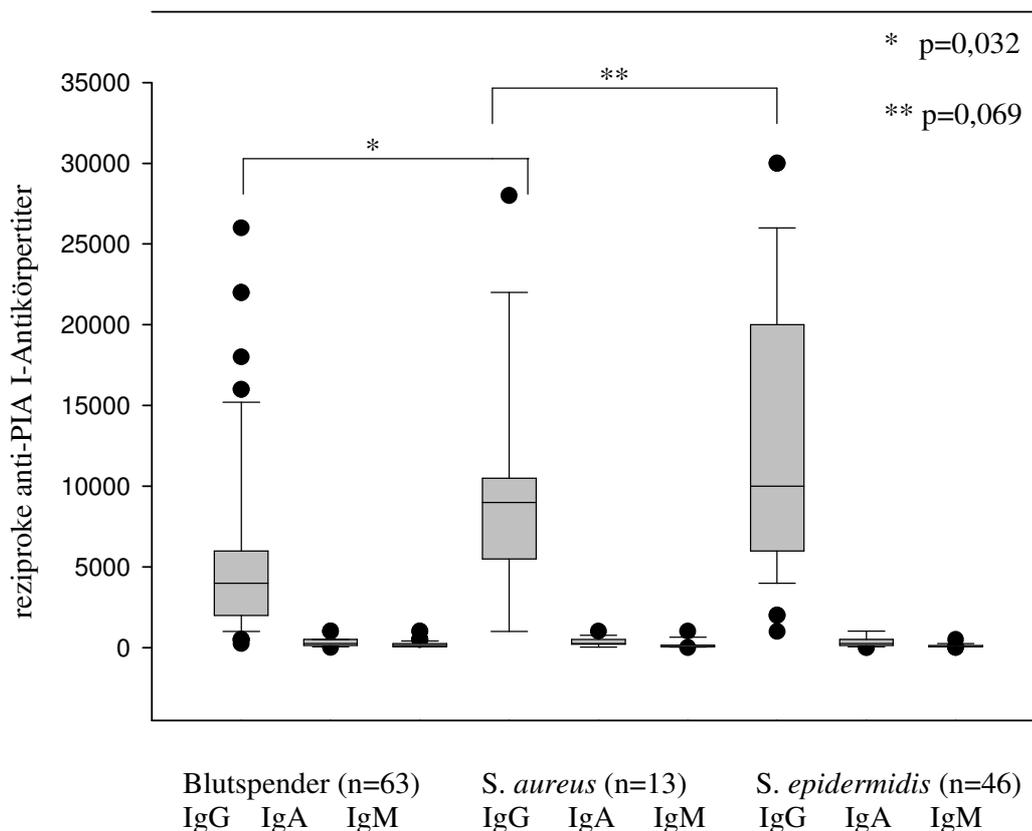


Abbildung 4-11: In dieser Abbildung werden Anti-PIA I-Antikörpertiter verglichen zwischen Patientenserien mit Infektion der Endoprothesen durch *icaADBC*-positive und *icaADBC*-negative Bakterienstämme (*S. aureus*, *S. epidermidis*) und der gesunden Kontrollgruppe. Anti-PIA I-Antikörpertiter aller drei Antikörper-Isoformen werden zum Vergleich herangezogen. Bei den Patientenserien konnten unabhängig vom auslösenden Erreger stets signifikant höhere Anti-PIA I-IgG-Antikörpertiter als bei den Blutspendern gemessen werden, wobei parallel immer ein sehr großer Überschneidungsbereich der Titerhöhen zu beobachten war.

Diese Befunde lassen die Annahme zu, dass Anti-PIA I-Antikörper tatsächlich zur Diagnose einer fremdmaterialassoziierten *S. aureus* oder *S. epidermidis* Infektion geeignet sein könnten. Hiergegen spricht jedoch das Fehlen einer klaren, bimodalen Titerverteilung zwischen Patienten und Blutspendern. Als Ursache für diesen Sachverhalt kam die Heterogenität der untersuchten Patientenpopulation in Frage, da 39 % der isolierten *S. epidermidis* Stämme *icaADBC*-negativ waren (Rohde *et al.*, 2007) und somit kein PIA synthetisieren können. Bei den korrespondierenden Patienten sollte es dementsprechend bei einer Infektion nicht zur Induktion einer Anti-PIA-Antikörpersynthese kommen. Die gemeinsame Betrachtung aller Patienten könnte also eine eventuell vorhandene bimodale Verteilung verfälschen. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden die Patienten mit Infektionen durch *icaADBC* positive *S. aureus* (n=13) und *S. epidermidis* (n=28) gesondert mit den Blutspendern verglichen. Der Vergleich der Anti-PIA I-IgG Titer zwischen Blutspendern und Patienten nach Bereinigung von *icaADBC*-negativen *S. epidermidis* Stämmen zeigt allerdings keine wesentliche Änderung der Situation (Abbildung 4-12). Zwar ist weiterhin ein signifikanter Unterschied der Titerhöhen zwischen Patienten und Blutspendern erkennbar, aber es findet sich ebenso weiterhin ein breiter Überschneidungsbereich der Titerhöhen zwischen beiden Kollektiven. Zudem fand sich kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der Titerhöhen zwischen Patienten mit Infektionen durch *icaADBC*-positive oder *icaADBC*-negative *S. epidermidis* Stämmen. Dieser wird in Abbildung 4-12 dargestellt.

4.2.3 Untersuchung zu Anti-PIA II-Antikörpern

Alle vorausgegangenen Vergleiche beinhalten ausschließlich Antikörper-Titer gegen PIA I. Die Trennung beider Polysaccharid-Isoformen erfolgte aufgrund der Möglichkeit einer differentiellen Immunantwort gegen beide Polysaccharide. Daher wurden bei 27 Seren Anti-PIA II-Antikörpertiter bestimmt. Hierbei zeigten sich im Vergleich zu den mit PIA I erhobenen Daten keine signifikanten Unterschiede. Es konnte somit keine differentielle immunogene Wirkung von PIA II zu PIA I nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

4.2.4 Untersuchung zum natürlichen Verlauf der Anti-PIA-Antikörperbildung

Unter der Annahme, dass ein wiederholtes Auseinandersetzen mit PIA I-positiven Bakterienstämmen zu einem Anstieg der Anti-PIA I-Antikörpertiter führt, kann der signifikante Unterschied der Anti-PIA I-Antikörpertiter zwischen Blutspendern und Patienten im unterschiedlichen medianen Lebensalter der Kollektive begründet sein. Um den Beginn der immunologischen Auseinandersetzung mit PIA zu beleuchten, wurden bei drei Kindern Anti-PIA-Antikörpertiter in einem Zeitraum zwischen 1 – 12 Monaten nach der Geburt untersucht. Bei allen Kindern konnte ein Monat nach der Geburt ein durchschnittlicher Anti-PIA-Antikörpertiter von 1:1000 ermittelt werden. Nach einem initialen Abfall des Titers kam es bei allen drei Kindern zwischen dem dritten und achten Monat wieder zu einem Anstieg des Titers (Abbildung 4-13). Diese Verläufe weisen darauf hin, dass es nach einem Abfall der Leihimmunität schon frühzeitig zu einer immunologischen Auseinandersetzung mit PIA und zu dem Aufbau einer spezifischen Immunität kommt.

Verlauf der Anti-PIA I -Antikörpertiter über 12 Monate nach Geburt

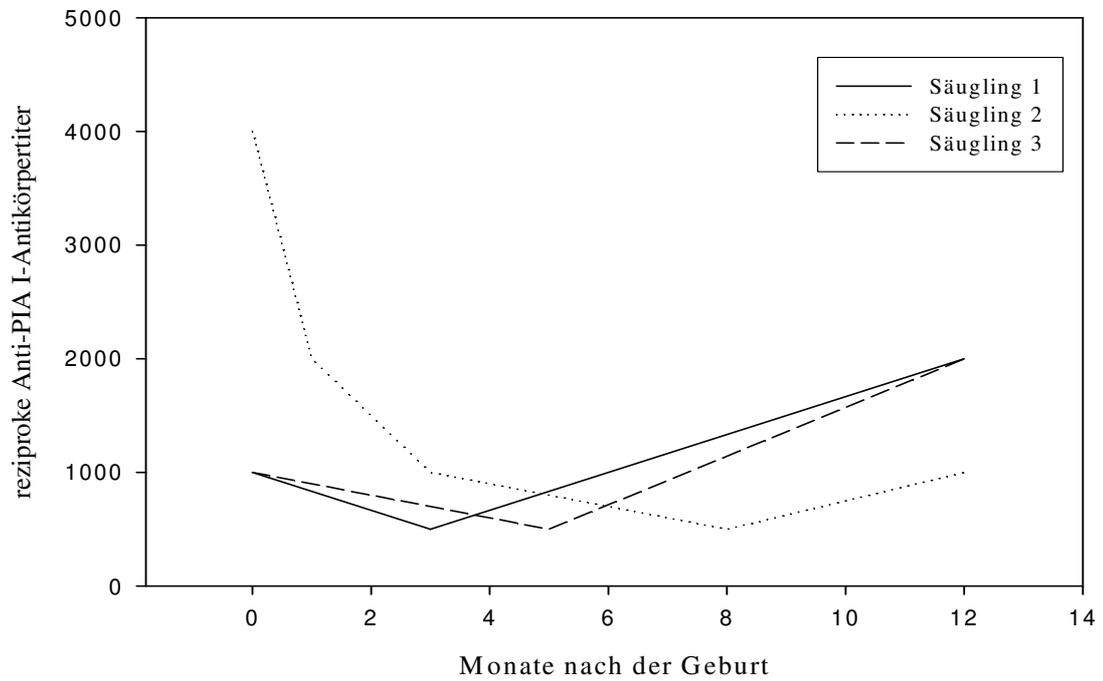


Abbildung 4-13: Verlaufsuntersuchung zur Titerdynamik von Anti-PIA-Antikörpertitern zwischen dem 1. und 12. Monat nach Geburt. Dieses Kurvendiagramm beschreibt den Verlauf der Anti-PIA I-Antikörpertiter bei drei Neugeborenen über 12 Monate.

5 Diskussion

Fremdmaterialassoziierte Infektionen stellen heute ein herausragendes Problem der modernen Medizin dar. Typischerweise können bei diesen Infektionen *S. aureus* und *S. epidermidis* isoliert werden (Emori and Gaynes, 1993; Kloos and Bannerman, 1994; Pfaller and Herwaldt, 1988; Rupp and Archer, 1994). Die Ursache für die enge Assoziation von Fremdmaterialimplantation und Infektion durch *S. aureus* oder *S. epidermidis* liegt in der Fähigkeit dieser Erreger begründet, mehrschichtige Biofilme auf Polymeroberflächen auszubilden (Mack *et al.*, 2006b; Götz, 2002). *S. aureus* und *S. epidermidis* Biofilmbildung ist hierbei direkt mit den unbefriedigenden therapeutischen, diagnostischen wie auch prophylaktischen Möglichkeiten bei implantatassoziierten Infektionen in Verbindung zu bringen. Daher wurden in den letzten zwei Jahrzehnten große Anstrengungen unternommen, durch ein tieferes Verständnis der molekularen Pathogenese neue, innovative Ansatzpunkte für diagnostische, therapeutische wie auch prophylaktische Strategien zu identifizieren. Das interzelluläre Polysaccharid-Ädhäsion (PIA) konnte als essentieller Faktor der Biofilmbildung nicht nur von *S. epidermidis*, sondern auch von *S. aureus* dargestellt werden (Mack *et al.*, 2006b; Götz, 2002). Da PIA-produzierende Staphylokokken in klinischen Bakterien-Populationen weit verbreitet sind, erscheint diese Struktur als attraktive Basis prophylaktischer wie auch diagnostischer Konzepte. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war daher die vergleichende Untersuchung der Prävalenz von Anti-PIA-Antikörpern bei Patienten mit Endoprotheseninfektionen und in einem gesunden Normalkollektiv. Hierdurch sollten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob (1.) PIA *in vivo* exprimiert wird und (2.) ob es eine differentielle Verteilung der Antikörpertiter bei den unterschiedlichen Populationen gibt. Diese Aspekte sind von zentraler Bedeutung in Hinblick auf die Nutzbarkeit von PIA als Vakzinebasis oder diagnostisches Antigen.

Es ist schon seit den frühen 80ern bekannt, dass im Rahmen fremdkörperassoziiierter Infektionen isolierte koagulasenegative Staphylokokken *in vitro* Biofilme produzieren (Christensen *et al.*, 1982; Tojo *et al.*, 1988; Mack *et al.*, 1992). Es stellte sich heraus, dass diese in der Mehrzahl der Fälle durch PIA vermittelt werden. So konnte zum

Beispiel für *S. epidermidis* ein direkter linearer Zusammenhang zwischen der quantitativen PIA-Produktion und der Stärke der Biofilmbildung gefunden werden (Mack *et al.*, 1996b). PIA wurde erstmals unter Einsatz einer kombinierten, genetischen wie auch biochemischen Strategie bei *S. epidermidis* isoliert und strukturell charakterisiert (Mack *et al.*, 1996a; Heilmann *et al.*, 1996). Ein strukturell verwandtes Polysaccharid wurde später auch bei *S. aureus* beschrieben. McKenney und Mitarbeiter fanden jedoch, dass im Gegensatz zu PIA von *S. epidermidis* bei *S. aureus* ein Großteil der Aminoreste succinyliert waren (McKenney *et al.*, 1999). Daher gaben sie der Struktur den Namen Poly-N-Succinylglucosamin (PNSG). Dieser Befund stellte sich jedoch später als Folge eines Artefakts bei der Antigenpräparation heraus. Eine erneute strukturelle Untersuchung zeigte dann, dass *S. aureus* ein β -1,6-verknüpftes Homoglykan bestehend aus N-Acetylglucosaminresten (PNAG) produziert (Mair-Litran *et al.*, 2002b). Dies wurde von unabhängigen Arbeitsgruppen in der Folge bestätigt (Vinogradov *et al.*, 2006; Joyce *et al.*, 2003). Heute existiert ein Konsensus, dass abgesehen von unterschiedlichen Molekulargewichten PIA und PNAG chemisch identisch sind. Auch bei *S. aureus* ist PIA wesentlich an der Biofilmbildung beteiligt (Rohde *et al.*, 2007; Cramton *et al.*, 1999).

Durch Heilmann und Mitarbeiter erfolgte die Identifikation des bei *S. epidermidis* für die Biosynthese von PIA verantwortlichen Genortes (Heilmann *et al.*, 1996). Das Vorhandensein dieses als *icaADBC* bezeichneten Operons bei *S. aureus* wie auch die Produktion von PIA/PNAG wurde erstmals von Cramton und Mitarbeitern beschrieben (Cramton *et al.*, 1999). Epidemiologische Untersuchungen zeigten, dass klinische *S. epidermidis* Isolate in bis zu 95 % *icaADBC*-positiv sind (Ziebuhr *et al.*, 1997d; Rohde *et al.*, 2001a; Galdbart *et al.*, 2000; Frebourg *et al.*, 2000; Vandecasteele *et al.*, 2003a; Klug *et al.*, 2003; Rohde *et al.*, 2004b). In Analogie konnte *icaADBC* bei *S. aureus* in nahezu allen Fällen gefunden werden (Cramton *et al.*, 1999; Fowler, Jr. *et al.*, 2001; Rohde *et al.*, 2001b; Knobloch *et al.*, 2002; Arciola *et al.*, 2001b; Rohde *et al.*, 2007). Diese epidemiologische Situation führte zu der Annahme, dass es sich, vor allem bei *S. epidermidis*, bei *icaADBC*-negativen Stämmen in der Regel um apathogene Besiedlungsstämme handelt (Li *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2003).

In diesem epidemiologischen Kontext wurde PIA zu einem interessanten Ziel für die Entwicklung neuer prophylaktischer und diagnostischer Strategien. Grundvoraussetzung

für die tatsächliche Nutzung von PIA hierfür ist jedoch, dass das Polysaccharid *in vivo* gebildet wird. Vorangegangene Untersuchungen unter Verwendung von Tiermodellen zeigten widersprüchliche Ergebnisse. Indirekte Hinweise für eine *in vivo* PIA Synthese kamen erstmalig von Untersuchungen an einem Fremdkörperinfektionsmodell in der Ratte beziehungsweise der Maus (Rupp *et al.*, 1999a). In einem subkutanen Katheterinfektionsmodell der Maus verursachte der Wildtyp *S. epidermidis* 1457 signifikant häufiger Abszesse und wurde signifikant seltener von den Abwehrmechanismen des Wirts vom Infektionsort eliminiert als die isogene, PIA- und biofilmnegative *icaADBC* Transposon-Mutante 1457-M10 (Rupp *et al.*, 1999a). In einem intravasalen Katheterinfektionsmodell in der Ratte, bei dem ein Katheter in die *Vena cava superior* eingeführt und dort infiziert wurde, verursachte der biofilmbildende Wildtyp *S. epidermidis* 1457 mit 71 % signifikant häufiger eine Venenkatheterinfektion als der biofilmnegative Stamm 1457-M10 (14 %) (Rupp *et al.*, 1999b). Damit konnte erstmals mit gut charakterisierten Mutantenpaaren gezeigt werden, dass die Fähigkeit zur PIA Synthese für die Etablierung einer *S. epidermidis* Infektion notwendig ist und PIA damit ein wichtiger Pathogenitätsfaktor von fremdkörperassoziierten *S. epidermidis* Infektionen darstellt. In der Folge brachten weitere Arbeiten Hinweise auf eine *in vivo* Expression des *icaADBC*-Genlocus, welcher für die Bildung von PIA verantwortlich ist. *IcaADBC* Expression (Vandecasteele *et al.*, 2003c) und PIA-Synthese (Fluckiger *et al.*, 2005) wurden *in vivo* in einem subkutanen Kathetermodell in Ratten und in einem *tissue cage infection* Modell gesehen. Begun und Mitarbeiter konnten in einem Infektionsmodell bei *Caenorhabditis elegans* zeigen, dass die Möglichkeit von *S. epidermidis*, eine für die Nematode tödliche Infektion zu verursachen, auf der Anwesenheit von *ica* und damit auf der Fähigkeit zur PIA Synthese beruht (Begun *et al.*, 2007).

Widersprüchliche Daten lieferte jedoch die Untersuchung von *S. epidermidis* 1457 und der isogenen Mutante 1457-M10 sowie dem *S. aureus* Stamm SA113 und der korrespondierenden *icaADBC*-Mutante SA113ica in einem *tissue cage* Modell im Meerschweinchen (Francois *et al.*, 2003). Es zeigten sich hierbei zwischen Wildtyp und der entsprechenden Mutanten keine Unterschiede in der Fähigkeit, Infektionen zu etablieren. Diese Befunde wurden unter Verwendung von *icaADBC*-positiven und –

negativen *S. epidermidis* Stämmen in einem *tissue cage infection* Modell im Meerschweinchen bestätigt (Chokr *et al.*, 2007).

Zusammenfassend ergibt sich bei Betrachtung der Ergebnisse aus tierexperimentellen Untersuchungen kein einheitliches Bild bezüglich der Frage, ob PIA tatsächlich im Rahmen einer fremdmaterialassoziierten Infektion *in vivo* exprimiert wird. Zumindest muss bezweifelt werden, dass PIA in jedem Fall essentiell für die Etablierung einer fremdmaterialassoziierten Infektion ist. Zudem bestehen aufgrund der heterogenen Ergebnisse berechtigte Zweifel, ob tierexperimentelle Daten zwanglos auf den Menschen übertragbar sind. Aus diesem Grunde ist es von größter Bedeutung, Anhalt dafür zu gewinnen, dass beim Menschen *in vivo* PIA synthetisiert wird. Erste Hinweise auf eine *in vivo* Produktion von PIA bzw. PNSG ergaben sich in Versuchen von McKenney und Mitarbeiter 1999, welche Lungengewebe von zwei mit *S. aureus* infizierten zystische Fibrose Patienten untersuchten (McKenney *et al.*, 1999). In diesem Gewebe konnte mit Hilfe eines spezifischen Kaninchen-Immunsersums PNSG nachgewiesen werden. Zusätzlich ließ sich durch Untersuchung von Sputumproben von mit *S. aureus* infizierten zystische Fibrose Patienten in der Immunfluoreszenz eine PNSG-Produktion zeigen (McKenney *et al.*, 1999).

Ein zentrales Ziel dieser Arbeit war, Hinweise für eine *in vivo* PIA Synthese im Allgemeinen und speziell bei Endoprotheseninfektionen durch *S. epidermidis* und *S. aureus* zu finden. Hierbei wurde von der Annahme ausgegangen, dass im Falle einer *in vivo* Synthese das Wirtsimmunsystem spezifische Antikörper bildet und somit der Nachweis spezifischer Antikörper als indirekter Hinweis auf eine tatsächliche PIA Synthese zu werten ist. Für den Nachweis von Anti-PIA-Antikörpern wurde ein spezifischer ELISA entwickelt. Es wurden 59 Seren von Patienten mit Hüft- und Knieendoprotheseninfektionen untersucht. Als verursachende Erreger wurde *S. aureus* (n=13) und *S. epidermidis* (n=46) identifiziert. Diese Erreger wurden alle genetisch charakterisiert. Sämtliche *S. aureus* Stämme waren Biofilm- sowie *icaADBC*-positiv und produzierten PIA *in vitro* (Rohde *et al.*, 2007). Die *S. epidermidis* Stämme umfassten 21 Biofilm-positive sowie 25 Biofilm-negative Stämme. Hierbei waren 28 Stämme *icaADBC*-positiv und 18 Stämme *icaADBC*-negativ (Rohde *et al.*, 2007). Als Kontrollkollektiv dienten die Seren von 63 gesunden Blutspendern. In allen untersuchten Patienten- wie auch Kontrollseren konnten PIA-spezifische Antikörper

nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass PIA offenbar *in vivo* gebildet wird und immunogen ist. Diese Tendenzen zeigte auch eine Arbeitsgruppe um Sadovskaya. Es wurde auch hier anhand eines ELISA Antikörper gegen PNAG in 10 Patientenseren mit Endoprotheseninfektionen ermittelt. Als verursachende Erreger wurden *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. hominis* sowie *S. aureus* isoliert. Auch hier wurde die Vermutung geäußert, dass PNAG *in vivo* produziert wird und immunogen ist. Einschränkend ist allerdings auf das sehr kleine Kollektiv zu verweisen (n=10).

Damit stellt sich die Frage, ob PIA als diagnostisches Antigen geeignet ist. Grundsätzlich müssen die derzeitigen Möglichkeiten zur Diagnose einer Endoprotheseninfektion als unbefriedigend angesehen werden. Weder gibt es eindeutige klinische Zeichen, noch sind die mikrobiologischen Kriterien in Form des wiederholten Nachweises klonal identischer Bakterienstämme aus relevanten Materialien immer erfüllbar. Daher erscheinen immunologische Tests zum Nachweis spezifischer, infektionsassoziiertes Antikörper besonders attraktiv (Lamari *et al* 2003). Ein gängiges technisches Verfahren zum Nachweis spezifischer Antikörper ist der *Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent Assay* (ELISA). Dieses Verfahren ist einfach in der Durchführung und der konventionellen Bakterienkultur insbesondere unter zeitlichen Gesichtspunkten überlegen. Vor allem sind serologische Verfahren ohne die Durchführung invasiver Maßnahmen zum Beispiel in Form einer Gelenkpunktion möglich. Ebenso werden falsch negative Ergebnisse einer konventionellen Anzucht durch eine vorangegangene antibiotische Therapie umgangen. Selbiges gilt für falsch-positive Kulturen durch Kontamination, die im Rahmen einer Probengewinnung ein regelhaftes Problem darstellen und, da es sich bei den Kontaminanten häufig um koagulasenegative Staphylokokken handelt, erhebliche interpretatorische Probleme aufwerfen.

Zurzeit werden im klinisch-mikrobiologischen Routinelabor noch keine Immunoassays zur Diagnostik von Infektionen mit KNS genutzt, obwohl eine Reihe von Arbeitsgruppen in den vergangenen Jahrzehnten verschiedene Antigene in Immunoassays zur Diagnose von Staphylokokkeninfektionen getestet haben (Lamari *et al.*, 2004). Bei den verschiedenen Ansätzen können solche, bei welchen Proteinantigene zur Anwendung kommen, von solchen, die auf Polysaccharide zurückgreifen, unterschieden werden. Zudem wurden die Assays entweder im Tiermodell oder anhand humaner Seren evaluiert (Lamari *et al.*, 2000). Im Folgenden sollen kurz die Studien

beschrieben werden, bei welchen Polysaccharide als Zielstruktur in Immunoassays zur Diagnose fremdkörperassoziierter Infektionen Verwendung fanden.

Unter anderem entwickelte die Arbeitsgruppe um Selan 2002 einen ELISA zur Erfassung von Antikörpern gegen das *staphylococcal slime polysaccharide antigen* (SSPA) bei Spätinfektionen von Gefäßprothesen (Selan *et al.*, 2002). Als Vergleichskollektiv dienten Patienten mit einer Staphylokokken-unabhängigen Spätinfektion von Gefäßprothesen, Patienten mit einer stattgehabten Infektion ihrer Gefäßprothese und erfolgreichen Prothesenexplantation, Patienten mit einer vor etwa 14-78 Monaten implantierten Gefäßprothese ohne Anzeichen einer Infektion derselben und einer Auswahl an Patienten ohne jegliche Prothesen. In dieser Studie wurden bei Patienten mit infizierten Gefäßprothesen durch verschiedenen Staphylokokken-Spezies, aber auch bei Patienten mit infizierten Gefäßprothesen mit Mischinfektionen mit Enterokokken, *Pseudomonas aeruginosa* und *E. coli*, im Vergleich zu allen oben beschriebenen Kontrollkollektiven signifikant erhöhte IgM-Antikörpertiter gegen SSPA gefunden. Gleichwohl diese Ergebnisse ermutigend waren, so bestehen doch Zweifel an der tatsächlichen Nutzbarkeit von SSPA. Auffällig ist, dass anti-SSPA-Antikörper nicht nur bei Infektionen durch Staphylokokken, sondern durch phylogenetisch weit entfernte, gramnegative Erreger nachweisbar waren. Somit ist die Spezifität der Untersuchung im Hinblick auf den infektionsverursachenden Erreger nicht sicher abzuschätzen. Zudem ist die Struktur des Antigens nicht geklärt und nichts über die genetischen Determinanten der Synthese bekannt. Hieraus folgt, dass derzeit SSPA nicht in unabhängigen Kollektiven getestet werden kann.

Ein weiteres Antigen wurde im Rahmen von Endoprotheseninfektionen mit *S. epidermidis* untersucht (Lambert *et al.*, 1996). Es handelte sich dabei um ein extrazelluläres Kohlenhydrat mit einem Molekulargewicht zwischen 24 und 32 kDa. Eine weitere biochemische Charakterisierung liegt nicht vor, allerdings spekulieren die Autoren, dass es sich um Polysaccharide oder Teichonsäuren handeln muss. Unter Verwendung dieses Antigens konnten in Seren von Patienten mit Endoprotheseninfektionen mittels ELISA erhöhte IgG-Titer im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv ermittelt werden. Von den Autoren selbst wurde jedoch eingeräumt, dass die signifikant höher gemessenen IgG-Titer bei Patienten mit

infizierten Endoprothesen nicht spezifisch für *S. epidermidis*-Infektionen waren, sondern auch bei Infektionen mit Streptokokken gefunden werden konnten.

In weiteren Studien traten näher charakterisierte Antigene in den Vordergrund. Lambert und Mitarbeiter verwendeten Lipid S (Glycerophosphoglycolipid), ein Bestandteil von Lipoteichonsäure, welche von *S. epidermidis*, aber auch anderen grampositiven Erregern gebildet wird (Lambert *et al.*, 2000). Antikörpertiter gegen Lipid S wurden im Rahmen unterschiedlicher Studien mittels ELISA nachgewiesen. Die Patientenkollektive umfassten hierbei *S. epidermidis* Infektionen von zentralen Venenkathetern (Lambert *et al.*, 2000), katheterassoziierten Sepsis durch KNS (Worthington *et al.*, 2002), Gelenkprotheseninfektionen durch Staphylokokken (Rafiq *et al.*, 2000), Staphylokokken-Endokarditis (Connaughton *et al.*, 2001), sowie *S. aureus* Osteomyelitiden nach Sternotomie (Casey *et al.*, 2006). Bei allen Untersuchungen zeigten sich signifikante Unterschiede in den Antikörpertiterverteilungen zwischen Patientenseren und Kontrollgruppen, so dass Lipid S ein geeignetes Antigen zur Diagnostik von Infektionen mit KNS und *S. aureus* zu sein scheint. Verschiedene Aspekte schränken die Nutzung von Lipid S als diagnostisches Antigen jedoch ein. So ist die Spezifität der nachgewiesenen Antikörper nicht sicher abschätzbar, da Lipid S nicht nur von Staphylokokken, sondern auch anderen grampositiven Erregern gebildet wird (Lambert *et al.*, 2000). Diese Tatsache kann auch Ursache für den Nachweis großer Überschneidungsbereiche der Anti-Lipid S Antikörpertiter zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv sein (Wergeland *et al.*, 1989).

Vor dem Hintergrund dieser Studien wird deutlich, dass die Evaluation von PIA als Basis der Serodiagnostik von fremdkörperassoziierten Infektionen von übergeordnetem Interesse ist. Gerade epidemiologische Aspekte motivieren die Annahme, dass PIA zur Diagnose von *S. epidermidis* oder *S. aureus* Infektionen genutzt werden kann, da *icaADBC* in klinischen *S. epidermidis* Populationen weit verbreitet ist (Frebourg *et al.*, 2000; Ziebuhr *et al.*, 1999; Arciola *et al.*, 2002a). Bei *S. aureus* beträgt die Prävalenz dieses Genortes sogar 100 % (Rohde *et al.*, 2001b; Peacock *et al.*, 2002).

In der hier vorgestellten Studie war es erstmals möglich, auf ein großes Kollektiv von 59 Patienten, bei welchen nicht nur mikrobiologisch und klinisch bestätigte Endoprotheseninfektionen vorliegen, sondern auch die ursächlichen Erreger genetisch

und phänotypisch dezidiert charakterisiert sind, zurückzugreifen. In der hier untersuchten Population von *S. aureus* Stämmen betrug die *icaADBC*-Prävalenz 100 %, bei *S. epidermidis* allerdings nur 61 % (Rohde *et al.*, 2007). In unserer Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Unterschied in der Titerhöhe zwischen den Seren von infizierten Patienten und Blutspendern ($p < 0,001$, T-Test) besteht. Der breite Überschneidungsbereich der nachgewiesenen Titer machte jedoch die Festlegung eines Grenztiters zur spezifischen Unterscheidung von beiden Kollektiven unmöglich. Somit muss festgestellt werden, dass der nachgewiesene, signifikante Unterschied nicht die Schlussfolgerung zulässt, PIA I sei als diagnostisches Antigen geeignet. Zudem muss darauf hingewiesen werden, dass die Gruppe der Blutspender nur bedingt als Kontrollkollektiv geeignet ist, da der Altersmedian beider Gruppen sehr unterschiedlich ist (Altersmedian Patienten: 70 Jahre; Altersmedian Blutspender: 44 Jahre) und zudem die Personen der Kontrollgruppe keine implantierten Endoprothesen aufweisen. Um Anti-PIA-Antikörpertiter in hinsichtlich dieses Unterschieds bereinigten Kollektiven zu vergleichen, wurden die Patienten mit Infektionen durch *icaADBC*-positive und –negative *S. epidermidis* Stämme betrachtet. Hier sollten die Anti-PIA-Antikörpertiter bei Patienten mit Infektionen durch *icaADBC*-negative *S. epidermidis* signifikant niedriger sein als bei Patienten mit Infektionen durch *icaADBC*-positive *S. epidermidis* Stämme. Diese Annahme ließ sich leider nicht betätigen, da im Vergleich der beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede der Anti-PIA-Antikörpertiter nachgewiesen werden konnte. Offensichtlich führt also eine Endoprotheseninfektion mit *icaADBC*-positiven *S. epidermidis* nicht zu einer mittels ELISA im Serum messbaren Induktion spezifischer Anti-PIA-Antikörper. Die hier ermittelten Antikörpertiter sowohl bei den Patienten wie auch den gesunden Blutspendern müssen daher als Durchseuchungstitern interpretiert werden. Solche können zum Beispiel durch einen vorausgegangenen Kontakt mit PIA-produzierenden *S. epidermidis* oder *S. aureus* Stämmen resultieren. Diese gehören zur natürlichen Normalflora des Menschen. Zudem ist heute bekannt, dass nicht nur pathogene und kommensale Staphylokokken, sondern auch *E. coli*, Yersinien und weitere gram-negative Erreger wie *Bordetella sp.*, *Actinobacillus sp.* PIA-verwandte Polysaccharide synthetisieren können (Wang *et al.*, 2004). Damit existieren im Verlaufe des Lebens potentiell viele Möglichkeiten einer PIA-Exposition und damit einer immunologischen Auseinandersetzung. Tatsächlich beginnt die

Antikörpersynthese wohl bereits früh nach der Geburt. Hinweise hierauf geben die in dieser Arbeit gewonnenen Daten bei Neugeborenen, bei welchen mit zunehmendem Alter, nach Abfall maternaler Leih-titer, ansteigende Antikörpertiter gegen PIA gemessen werden konnten. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die höheren Anti-PIA-Antikörpertiter bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten im Vergleich zu den Blutspendern nichts anderes als eine Folge des höheren Lebensalters und damit einer verbundenen größeren Zahl von PIA-Expositionereignissen darstellt. Dass das Lebensalter Einfluss auf die Höhe von Anti-PNAG-Antikörper hat, wurde auch von Kelly-Quintos und Mitarbeiter beschrieben (Kelly-Quintos *et al.*, 2005). Der Unterschied der Titer zwischen Blutspendern und Patienten kann also als Ausdruck wiederholter PIA-Exposition und damit einer endogenen Boosterung und nicht zwangsläufig als Ausdruck einer Infektion gewertet werden. Somit muss zusammenfassend festgestellt werden, dass der Nachweis von Anti-PIA-Antikörpertitern zur Diagnose einer Endoprotheseninfektion durch *S. epidermidis* oder *S. aureus* ungeeignet sind.

Die hier präsentierten Daten werfen die Frage auch nach der Nutzbarkeit von PIA als Basis eines Impfstoffs auf. 1990 wurden die ersten Immunisierungsversuche mit PS/A (wahrscheinlich demnach PIA/PNAG) durchgeführt. Bei dieser Studie wurde ein Modell für katheterassoziierte Bakteriämie durch KNS (*S. epidermidis* RP62A und *S. epidermidis* RP12) im Kaninchen verwendet. Durch die aktive Immunisierung der Kaninchen mit PS/A konnte im Vergleich zu nicht-immunisierten Kaninchen eine reduzierte Zahl von positiven Blutkulturen gefunden werden. Ebenso verlieh eine passive Immunisierung mit polyklonalen und monoklonalen Antikörpern gegen PS/A Schutz vor einer Kolonisation des Katheters mit dem Stamm *S. epidermidis* RP62A sowie Schutz vor einer Bakteriämie (Kojima *et al.*, 1990). Es folgte die Studie von Takeda und Mitarbeitern aus dem Jahre 1991. In einem Kaninchen-Endokarditis-Modell konnten durch *S. epidermidis* verursachte Vegetationen auf den Aortenklappen durch eine aktive wie auch passive Immunisierung gegen PS/A reduziert werden. Ebenso kam es zu einer Reduktion der Anzahl positiver Blutkulturen (Takeda *et al.*, 1991). Mc Kenney und Mitarbeiter beschrieben 1999 ähnliches für *S. aureus* in einem Maus-Infektionsmodell der Nieren. Hier konnte durch aktive Immunisierung mit PNAG eine Reduktion der *S. aureus* Keimlast im Nierengewebe erreicht werden (McKenney *et*

al., 1999). Aktuellere Studien von 2004 beschreiben den Effekt einer passiven Immunisierung mit anti-PNAG von Ratten in einem Endokarditismodell. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Immunsrum die Bakterienlast in den Vegetationen auf der Herzklappe bei Infektion mit einem *icaADBC*-positiven *S. aureus* Wildtyp-Bakterienstamm 10833 reduzieren konnte. Im Gegensatz dazu hatte die passive Immunisierung mit Anti-PNAG-Immunsrum bei einer Infektion mit einem *icaADBC*-negativen Stamm keine Auswirkungen auf die Bakterienmenge in den Herzklappen-Vegetationen (Maira-Litran *et al.*, 2004). Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass in Tiermodellen PNAG in Hinblick auf die Entwicklung neuer prophylaktischer Möglichkeiten ein viel versprechendes Antigen darstellt. Eine Beurteilung zur Verwendung von PIA als Basis eines Impfstoffes beim Menschen ist derzeit nicht sicher möglich. So konnten in dieser Arbeit wie auch in anderen Studien Anti-PIA-Antikörper bei gesunden Blutspendern gefunden werden. Unter der Annahme, dass somit auch Patienten vermutlich bereits zum Zeitpunkt der Implantation von Fremdmaterialien PIA I-spezifische Antikörper aufweisen, muss die schützende Wirkung solcher Antikörper angezweifelt werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die im Rahmen einer natürlichen Immunantwort gebildeten Antikörper nicht gegen funktionell relevante PIA-Epitope gerichtet sind und somit keine schützende Wirkung aufweisen. Diese Frage stellt sich insbesondere vor dem Hintergrund, dass variable PIA-Isoformen existieren, die sich hinsichtlich ihres Deacetylierungsgrades unterscheiden (PIA I: 80-85 % acetyliert; PIA II: >85 % acetyliert; PNAG: 95-100 % acetyliert; dPNAG: 15 % acetyliert). Maira-Litran und Mitarbeiter konnten zeigen, dass dPNAG in Tiermodellen eine deutlich erhöhte immunogene Wirkung zeigt als PNAG. Die passive Immunisierung von Mäusen mit Antikörpern gegen dPNAG schützte vor einer letalen Dosis dreier *S. aureus* Stämme im Gegensatz zu Mäusen, welche nur mit einem Präimmunsrum geimpft wurden (Maira-Litran *et al.*, 2005). Auch die Arbeit von Kelly-Quintos gibt Hinweise darauf, dass humane Antikörper gegen die deacetylierte PNAG Isoform eine größere schützende Wirkung haben könnten als gegen die acetylierte PNAG Isoform gerichtete Antikörper. Diese Annahme stützt sich auf einen Vergleich der Phagozytose von mit anti-PNAG und anti-dPNAG opsonisierten Bakterien (Kelly-Quintos *et al.*, 2005). Hier wurden

S. aureus nach Opsonisierung mit anti-dPNAG signifikant besser phagozytiert als nach Opsonisierung mit Anti-PNAG-Antikörpern.

In der Annahme, das PIA II, durch den zum PIA I differentiellen Gehalt an acetylierten Resten, eine stärkere immunogene Wirkung zeigen könnte, wurden in dieser Arbeit Antikörpertiter auch gegen dieses Antigen ermittelt. Allerdings konnten hier kein Unterschied in der Antikörpertiterverteilung gesehen werden. Unsere Ergebnisse zeigen keinen Unterschied in den erhobenen IgG-Titern. Im Menschen scheint PIA II keine stärkere immunogene Wirkung zu zeigen als PIA I.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine aktive wie auch passive Immunisierung gegen *S. aureus* und *S. epidermidis* im Tiermodell viel versprechende Ansätze zeigt. Der Nutzen dieser Strategien beim Menschen kann zum jetzigen Zeit jedoch nicht abschließend bewertet werden. Auch die in dieser Arbeit erhobenen Daten lassen in Hinblick auf die Verwendbarkeit von PIA I als Basis einer Vakzine noch keine definitive Aussage zu. Prospektive Studien unter Verwendung definierter, in ihrer immunogenen Wirkung optimierter Antigene müssen in der Zukunft diese Frage klären.

6 Zusammenfassung

Fremdmaterialassoziierte *S. epidermidis* und *S. aureus* Infektionen stellen sowohl hinsichtlich der Diagnostik wie auch Therapie und Prävention weiterhin ein herausragendes Problem der modernen Medizin dar. Zentraler Aspekt der Pathogenese von *S. epidermidis* und *S. aureus* fremdmaterialassoziierten Infektionen ist die Fähigkeit des Erregers, auf der Oberfläche implantierter Fremdkörper mehrlagige Biofilme auszubilden. In den letzten Jahrzehnten wurden große Anstrengungen unternommen, die Entstehung von Biofilmen besser zu verstehen, um daraus neue diagnostische sowie therapeutische Möglichkeiten abzuleiten. Insbesondere im Rahmen der Diagnostik von Endoprotheseninfektionen existieren zurzeit nur unbefriedigende Ansätze, welche in keinem Fall eine sichere Diagnose oder einen Ausschluss einer Protheseninfektion ermöglichen. In dieser Arbeit sollte die Nutzbarkeit des interzellulären Polysaccharid-Adhäsins (PIA) als diagnostisches Antigen untersucht werden. PIA wird eine wichtige Rolle in der Entstehung Biofilm-assoziiierter *S. epidermidis* und *S. aureus* Infektionen beigemessen. Unter Verwendung eines hier etablierten, spezifischen ELISA wurden PIA-spezifische Antikörper in Seren von 59 Patienten mit definitiven *S. aureus* und *S. epidermidis* Hüft- und Knie-Endoprotheseninfektionen wie auch in einem Kollektiv gesunder Blutspender quantifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Unterschied in der Titerhöhe zwischen den Seren von infizierten Patienten und Blutspendern ($p < 0,001$, T-Test) besteht. Dies weist darauf hin, dass PIA *in vivo* gebildet wird. Eine fehlende bimodale Verteilung der Titerhöhen macht allerdings eine konkrete Unterscheidung der Gruppen unmöglich. Hieraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass der Nachweis von Anti-PIA-Antikörpern zur Diagnose einer Endoprotheseninfektion durch *S. epidermidis* oder *S. aureus* ungeeignet ist. Zukünftig müssen PIA-unabhängige, funktionell an der Biofilmbildung beteiligte Faktoren hinsichtlich ihrer Potenz als diagnostisches Antigen evaluiert werden.

7 Literaturverzeichnis

Allignet,J., Aubert,S., Dyke,K.G., and El Solh,N. (2001) *Staphylococcus caprae* strains carry determinants known to be involved in pathogenicity: a gene encoding an autolysin-binding fibronectin and the *ica* operon involved in biofilm formation. *Infect Immun* **69**: 712-718.

Arciola,C.R., Baldassarri,L., and Montanaro,L. (2001a) Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* **39**: 2151-2156.

Arciola,C.R., Baldassarri,L., and Montanaro,L. (2002a) In catheter infections by *Staphylococcus epidermidis* the intercellular adhesion (*ica*) locus is a molecular marker of the virulent slime-producing strains. *J Biomed Mater Res* **59**: 557-562.

Arciola,C.R., Collamati,S., Donati,E., and Montanaro,L. (2001b) A rapid PCR method for the detection of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in periprostheses infections. *Diagn Mol Pathol* **10**: 130-137.

Becker,K., von,E.C., Keller,B., Bruck,M., Etienne,J., and Peters,G. (2005) Thermonuclease gene as a target for specific identification of *Staphylococcus intermedius* isolates: use of a PCR-DNA enzyme immunoassay. *Diagn Microbiol Infect Dis* **51**: 237-244.

Beenken,K.E., Dunman,P.M., McAleese,F., Macapagal,D., Murphy,E., Projan,S.J. *et al.* (2004) Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* **186**: 4665-4684.

Begun,J., Gaiani,J.M., Rohde,H., Mack,D., Calderwood,S.B., Ausubel,F.M., and Sifri,C.D. (2007) Staphylococcal Biofilm Exopolysaccharide Protects against *Caenorhabditis elegans* Immune Defenses. *PLoS Pathog* **3**: e57.

Berberi,E.F., Hanssen,A.D., Duffy,M.C., Steckelberg,J.M., Ilstrup,D.M., Harmsen,W.S., and Osmon,D.R. (1998) Risk factors for prosthetic joint infection: case-control study. *Clin Infect Dis* **27**: 1247-1254.

Bradford,M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Casey,A.L., Worthington,T., Bonser,R.S., Lambert,P.A., and Elliott,T.S. (2006) Rapid serodiagnosis of *Staphylococcus aureus* surgical site infection following median sternotomy. *J Infect* **52**: 276-281.

Chaieb,K., Mahdouani,K., and Bakhrouf,A. (2005) Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. *J Hosp Infect* **61**: 225-230.

Chavakis,T., Wiechmann,K., Preissner,K.T., and Herrmann,M. (2005) *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb Haemost* **94**: 278-285.

Chaves,F., Garcia-Alvarez,M., Sanz,F., Alba,C., and Otero,J.R. (2005) Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. novobiosepticus strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* **43**: 4877-4879.

Chokr,A., Leterme,D., Watier,D., and Jabbouri,S. (2007) Neither the presence of *ica* locus, nor *in vitro*-biofilm formation ability is a crucial parameter for some *Staphylococcus epidermidis* strains to maintain an infection in a guinea pig tissue cage model. *Microb Pathog* **42**: 94-97.

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

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

Connaughton,M., Lang,S., Tebbs,S.E., Littler,W.A., Lambert,P.A., and Elliott,T.S. (2001) Rapid serodiagnosis of gram-positive bacterial endocarditis. *J Infect* **42**: 140-144.

Costerton,J.W., Lewandowski,Z., Caldwell,D.E., Korber,D.R., and Lappin-Scott,H.M. (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**: 711-745.

Cramton,S.E., Gerke,C., Schnell,N.F., Nichols,W.W., and Götz,F. (1999) The Intercellular Adhesion (*ica*) Locus Is Present in *Staphylococcus aureus* and Is Required for Biofilm Formation. *Infect Immun* **67**: 5427-5433.

Cucarella,C., Solano,C., Valle,J., Amorena,B., Lasa,I., I, and Penades,J.R. (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. *J Bacteriol* **183**: 2888-2896.

Cuckler,J.M., Star,A.M., Alavi,A., and Noto,R.B. (1991) Diagnosis and management of the infected total joint arthroplasty. *Orthop Clin North Am* **22**: 523-530.

Darouiche,R.O. (2004) Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med* **350**: 1422-1429.

de Silva,G.D., Kantzanou,M., Justice,A., Massey,R.C., Wilkinson,A.R., Day,N.P., and Peacock,S.J. (2002) The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative Staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* **40**: 382-388.

Emori,T.G., and Gaynes,R.P. (1993) An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* **6**: 428-442.

Fidalgo,S., Vazquez,F., Mendoza,M.C., Perez,F., and Mendez,F.J. (1990) Bacteremia due to *Staphylococcus epidermidis*: microbiologic, epidemiologic, clinical, and prognostic features. *Rev Infect Dis* **12**: 520-528.

Fluckiger,U., Ulrich,M., Steinhuber,A., Doring,G., Mack,D., Landmann,R. *et al.* (2005) Biofilm formation, *icaADBC* transcription, and polysaccharide intercellular adhesin synthesis by staphylococci in a device-related infection model. *Infect Immun* **73**: 1811-1819.

Foster,T.J., and Hook,M. (1998) Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* **6**: 484-488.

Fowler,V.G., Jr., Fey,P.D., Reller,L.B., Chamis,A.L., Corey,G.R., and Rupp,M.E. (2001) The intercellular adhesin locus *ica* is present in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **189**: 127-131.

Francois,P., Tu Quoc,P.H., Bisognano,C., Kelley,W.L., Lew,D.P., Schrenzel,J. *et al.* (2003) Lack of biofilm contribution to bacterial colonisation in an experimental model of foreign body infection by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**: 135-140.

Frebourg,N.B., Lefebvre,S., Baert,S., and Lemeland,J.F. (2000) PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J Clin Microbiol* **38**: 877-880.

Fuller,R.A., and Rosen,J.J. (1986) Materials for medicine. *Sci Am* **255**: 118-125.

Galdbart,J.O., Allignet,J., Tung,H.S., Ryden,C., and El Solh,N. (2000) Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. *J Infect Dis* **182**: 351-355.

Garcia,P., Benitez,R., Lam,M., Salinas,A.M., Wirth,H., Espinoza,C. *et al.* (2004) Coagulase-negative staphylococci: clinical, microbiological and molecular features to predict true bacteraemia. *J Med Microbiol* **53**: 67-72.

Geipel,U., and Herrmann,M. (2005) [The infected implant: bacteriology]. *Unfallchirurg* **108**: 961-975.

Gelosia,A., Baldassarri,L., Deighton,M., and van,N.T. (2001) Phenotypic and genotypic markers of *Staphylococcus epidermidis* virulence. *Clin Microbiol Infect* **7**: 193-199.

Gerke,C., Kraft,A., Süssmuth,R., Schweitzer,O., and Götz,F. (1998) Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem* **273**: 18586-18593.

Gill,S.R., Fouts,D.E., Archer,G.L., Mongodin,E.F., Deboy,R.T., Ravel,J. *et al.* (2005) Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol* **187**: 2426-2438.

Götz,F. (2002) *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* **43**: 1367-1378.

Götz,F. (2004) Staphylococci in colonization and disease: prospective targets for drugs and vaccines. *Curr Opin Microbiol* **7**: 477-487.

Gray,B.M. (1979) ELISA methodology for polysaccharide antigens: protein coupling of polysaccharides for adsorption to plastic tubes. *J Immunol Methods* **28**: 187-192.

Gristina,A.G. (1987) Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* **237**: 1588-1595.

Hall-Stoodley,L., Costerton,J.W., and Stoodley,P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**: 95-108.

Heilmann,C., Schweitzer,O., Gerke,C., Vanittanakom,N., Mack,D., and Götz,F. (1996) Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* **20**: 1083-1091.

Herwaldt,L.A., Boyken,L.D., and Pfaller,M.A. (1990) Biotyping of coagulase-negative staphylococci. 108 isolates from nosocomial bloodstream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* **13**: 461-466.

Hussain,M., Herrmann,M., von Eiff,C., Perdreau-Remington,F., and Peters,G. (1997) A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun* **65**: 519-524.

Joyce,J.G., Abeygunawardana,C., Xu,Q., Cook,J.C., Hepler,R., Przysiecki,C.T. *et al.* (2003) Isolation, structural characterization, and immunological evaluation of a high-molecular-weight exopolysaccharide from *Staphylococcus aureus*. *Carbohydr Res* **338**: 903-922.

Kaplan,J.B., Velliyagounder,K., Ragunath,C., Rohde,H., Mack,D., Knobloch,J.K., and Ramasubbu,N. (2004) Genes involved in the synthesis and degradation of matrix

polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *J Bacteriol* **186**: 8213-8220.

Kelly-Quintos,C., Kropec,A., Briggs,S., Ordonez,C.L., Goldmann,D.A., and Pier,G.B. (2005) The role of epitope specificity in the human opsonic antibody response to the staphylococcal surface polysaccharide poly N-acetyl glucosamine. *J Infect Dis* **192**: 2012-2019.

Klingenberg,C., Ronnestad,A., Anderson,A.S., Abrahamsen,T.G., Zorman,J., Villaruz,A. *et al.* (2007) Persistent strains of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: virulence factors and invasiveness. *Clin Microbiol Infect* **13**: 1100-1111.

Kloos,W.E. (1997) Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. In *The staphylococci in human disease*. Crossley,K.B., and Archer,G.L. (eds). New York: Churchill Livingstone, pp. 113-137.

Kloos,W.E., and Bannerman,T.L. (1994) Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* **7**: 117-140.

Kloos,W.E., and Schleifer,K.H. (1975) Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol* **1**: 82-88.

Klug,D., Wallet,F., Kacet,S., and Courcol,R.J. (2003) Involvement of adherence and adhesion *Staphylococcus epidermidis* genes in pacemaker lead-associated infections. *J Clin Microbiol* **41**: 3348-3350.

Knobloch,J.K., Horstkotte,M.A., Rohde,H., and Mack,D. (2002) Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **191**: 101-106.

Knobloch,J.K., Jager,S., Horstkotte,M.A., Rohde,H., and Mack,D. (2004) RsbU-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor sigmaB by repression of the negative regulator gene *icaR*. *Infect Immun* **72**: 3838-3848.

Kojima,Y., Tojo,M., Goldmann,D.A., Tosteson,T.D., and Pier,G.B. (1990) Antibody to the capsular polysaccharide/adhesin protects rabbits against catheter-related bacteremia due to coagulase-negative staphylococci. *J Infect Dis* **162**: 435-441.

Kozitskaya,S., Olson,M.E., Fey,P.D., Witte,W., Ohlsen,K., and Ziebuhr,W. (2005) Clonal analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying or lacking biofilm-mediating genes by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* **43**: 4751-4757.

Lamari,F., Anastassiou,E.D., Stamokosta,E., Photopoulos,S., Xanthou,M., Dimitracopoulos,G., and Karamanos,N.K. (2000) Determination of slime-producing *S. epidermidis* specific antibodies in human immunoglobulin preparations and blood sera

by an enzyme immunoassay: correlation of antibody titers with opsonic activity and application to preterm neonates. *J Pharm Biomed Anal* **23**: 363-374.

Lamari,F.N., Anastassiou,E.D., Kolonitsiou,F., Dimitracopoulos,G., and Karamanos,N.K. (2004) Potential use of solid phase immunoassays in the diagnosis of coagulase-negative staphylococcal infections. *J Pharm Biomed Anal* **34**: 803-810.

Lambert,P.A., Van Maurik,A., Parvatham,S., Akhtar,Z., Fraise,A.P., and Krikler,S.J. (1996) Potential of exocellular carbohydrate antigens of *Staphylococcus epidermidis* in the serodiagnosis of orthopaedic prosthetic infection. *J Med Microbiol* **44**: 355-361.

Lambert,P.A., Worthington,T., Tebbs,S.E., and Elliott,T.S. (2000) Lipid S, a novel *Staphylococcus epidermidis* exocellular antigen with potential for the serodiagnosis of infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* **29**: 195-202.

Lane-Smith,R., and Gilkerson,E. (1979) Quantitation of glycosaminoglycan hexosamine using 3-methyl-2- benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Anal Biochem* **98**: 478-480.

Lasa,I., and Penades,J.R. (2006) Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol* **157**: 99-107.

Lentino,J.R. (2003) Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. *Clin Infect Dis* **36**: 1157-1161.

Li,H., Xu,L., Wang,J., Wen,Y., Vuong,C., Otto,M., and Gao,Q. (2005) Conversion of *Staphylococcus epidermidis* strains from commensal to invasive by expression of the *ica* locus encoding production of biofilm exopolysaccharide. *Infect Immun* **73**: 3188-3191.

Mack,D., Bartscht,K., Fischer,C., Rohde,H., de Grahl,C., Dobinsky,S. *et al.* (2001) Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation. *Meth Enzymol* **336**: 215-239.

Mack,D., Fischer,W., Krokotsch,A., Leopold,K., Hartmann,R., Egge,H., and Laufs,R. (1996a) The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* **178**: 175-183.

Mack,D., Haeder,M., Siemssen,N., and Laufs,R. (1996b) Association of biofilm production of coagulase-negative *staphylococci* with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. *J Infect Dis* **174**: 881-884.

Mack,D., Horstkotte,M.A., Rohde,H., and Knobloch,J.K.M. (2006a) Coagulase-Negative *Staphylococci*. In *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy*. Pace,J.L., Rupp,M.E., and Finch,R.G. (eds). Boca Raton: CRC Press, pp. 109-153.

Mack,D., Nedelmann,M., Krokotsch,A., Schwarzkopf,A., Heesemann,J., and Laufs,R. (1994) Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect Immun* **62**: 3244-3253.

Mack,D., Rohde,H., Harris,L.G., Davies,A.P., Horstkotte,M.A., and Knobloch,J.K. (2006b) Biofilm formation in medical device-related infection. *Int J Artif Organs* **29**: 343-359.

Mack,D., Siemssen,N., and Laufs,R. (1992) Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect Immun* **60**: 2048-2057.

Maira-Litran,T., Kropec,A., Abeygunawardana,C., Joyce,J., Mark,G., III, Goldmann,D.A., and Pier,G.B. (2002a) Immunochemical properties of the *staphylococcal* poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect Immun* **70**: 4433-4440.

Maira-Litran,T., Kropec,A., Goldmann,D., and Pier,G.B. (2004) Biologic properties and vaccine potential of the *staphylococcal* poly-N-acetyl glucosamine surface polysaccharide. *Vaccine* **22**: 872-879.

Maira-Litran,T., Kropec,A., Goldmann,D.A., and Pier,G.B. (2005) Comparative opsonic and protective activities of *Staphylococcus aureus* conjugate vaccines containing native or deacetylated *Staphylococcal* Poly-N-acetyl-beta-(1-6)-glucosamine. *Infect Immun* **73**: 6752-6762.

McKenney,D., Hübner,J., Muller,E., Wang,Y., Goldmann,D.A., and Pier,G.B. (1998) The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. *Infect Immun* **66**: 4711-4720.

Mckenney,D., Pouliot,K., Wang,Y., Murthy,V., Ulrich,M., Doring,G. *et al.* (2000) Vaccine potential of poly-1-6 beta-D-N-succinylglucosamine, an immunoprotective surface polysaccharide of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Biotechnol* **83**: 37-44.

McKenney,D., Pouliot,K.L., Wang,Y., Murthy,V., Ulrich,M., Doring,G. *et al.* (1999) Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an *in vivo*-expressed antigen. *Science* **284**: 1523-1527.

Messina,J.P., Hickox,P.G., Lepow,M.L., Pollara,B., and Venezia,R.A. (1985) Modification of a direct enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of immunoglobulin G and M antibodies to pneumococcal capsular polysaccharide. *J Clin Microbiol* **21**: 390-394.

Miyamoto,H., Imamura,K., Kojima,A., Takenaka,H., Hara,N., Ikenouchi,A. *et al.* (2003) Survey of nasal colonization by, and assessment of a novel multiplex PCR method for detection of biofilm-forming methicillin-resistant staphylococci in healthy medical students. *J Hosp Infect* **53**: 215-223.

Muller,E., Takeda,S., Shiro,H., Goldmann,D., and Pier,G.B. (1993) Occurrence of capsular polysaccharide/adhesin among clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J Infect Dis* **168**: 1211-1218.

Ninin,E., Caroff,N., Espaze,E., Marailac,J., Lepelletier,D., Milpied,N., and Richet,H. (2006) Assessment of ica operon carriage and biofilm production in *Staphylococcus epidermidis* isolates causing bacteraemia in bone marrow transplant recipients. *Clin Microbiol Infect* **12**: 446-452.

Noble,W.C. (1997) Staphylococcal carriage and skin and soft tissue infection. In *The staphylococci in human disease*. Crossley,K.B., and Archer,G.L. (eds). New York: Churchill Livingstone, pp. 401-412.

Peacock,S.J., Moore,C.E., Justice,A., Kantzanou,M., Story,L., Mackie,K. *et al.* (2002) Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **70**: 4987-4996.

Pfaller,M.A., and Herwaldt,L.A. (1988) Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* **1**: 281-299.

Rafiq,M., Worthington,T., Tebbs,S.E., Treacy,R.B., Dias,R., Lambert,P.A., and Elliott,T.S. (2000) Serological detection of Gram-positive bacterial infection around prostheses. *J Bone Joint Surg Br* **82**: 1156-1161.

Ringberg,H., Thoren,A., and Bredberg,A. (1991) Evaluation of coagulase-negative staphylococci in blood cultures. A prospective clinical and microbiological study. *Scand J Infect Dis* **23**: 315-323.

Rohde,H., Burandt,E.C., Siemssen,N., Frommelt,L., Burdelski,C., Wurster,S. *et al.* (2007) Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* **28**: 1711-1720.

Rohde,H., Burdelski,C., Bartscht,K., Hussain,M., Buck,F., Horstkotte,M.A. *et al.* (2005b) Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol* **55**: 1883-1895.

Rohde,H., Kalitzky,M., Kroger,N., Scherpe,S., Horstkotte,M.A., Knobloch,J.K. *et al.* (2004a) Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol* **42**: 5614-5619.

Rohde,H., Knobloch,J.K., Horstkotte,M.A., and Mack,D. (2001a) Correlation of biofilm expression types of *Staphylococcus epidermidis* with polysaccharide intercellular adhesin synthesis: evidence for involvement of *icaADBC* genotype-independent factors. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **190**: 105-112.

Rohde,H., Knobloch,J.K., Horstkotte,M.A., and Mack,D. (2001b) Correlation of *Staphylococcus aureus* *icaADBC* genotype and biofilm expression phenotype. *J Clin Microbiol* **39**: 4595-4596.

Rohde,H., Kallitzky,M., Krüger,N., Scherpe,S., Horstkotte,M.A., Knobloch,J.K.M. *et al.* Hospital environment selects virulent *icaADBC*-positive *Staphylococcus epidermidis* populations causing catheter-related infections. *J.Clin.Microbiol.* 2004b. Ref Type: In Press

Rupp,M.E., and Archer,G.L. (1994) Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis* **19**: 231-243.

Rupp,M.E., Sloat,N., Meyer,H.G., Han,J., and Gattermann,S. (1995) Characterization of the hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* **172**: 1509-1518.

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

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

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

Sanzen,L., and Sundberg,M. (1997) Periprosthetic low-grade hip infections. Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in 23 cases. *Acta Orthop Scand* **68**: 461-465.

Schulin,T., and Voss,A. (2001) Coagulase-negative staphylococci as a cause of infections related to intravascular prosthetic devices: limitations of present therapy. *Clin Microbiol Infect* **7 Suppl 4:1-7.**: 1-7.

Selan,L., Passariello,C., Rizzo,L., Varesi,P., Speciale,F., Renzini,G. *et al.* (2002) Diagnosis of vascular graft infections with antibodies against staphylococcal slime antigens. *Lancet* **359**: 2166-2168.

Sheagren,J.N. (1985) Staphylococcal infections of the skin and skin structures. *Cutis* **36**: 2-6.

Singhal,R., Dhawan,S., Mohanty,S., Sood,S., Dhawan,B., Das,B., and Kapil,A. (2006) Species distribution & antimicrobial susceptibility of coagulase negative Staphylococci in a tertiary care hospital. *Indian J Med Res* **123**: 569-570.

Spangehl,M.J., Masri,B.A., O'Connell,J.X., and Duncan,C.P. (1999) Prospective analysis of preoperative and intraoperative investigations for the diagnosis of infection at the sites of two hundred and two revision total hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg Am* **81**: 672-683.

Spangehl,M.J., Younger,A.S., Masri,B.A., and Duncan,C.P. (1998) Diagnosis of infection following total hip arthroplasty. *Instr Course Lect* **47:285-95.**: 285-295.

Srinivasan,A., Dick,J.D., and Perl,T.M. (2002) Vancomycin resistance in staphylococci. *Clin Microbiol Rev* **15**: 430-438.

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

Takeda,S., Pier,G.B., Kojima,Y., Tojo,M., Muller,E., Tosteson,T., and Goldmann,D.A. (1991) Protection against endocarditis due to *Staphylococcus epidermidis* by immunization with capsular polysaccharide/adhesin. *Circulation* **84**: 2539-2546.

Thylefors,J.D., Harbarth,S., and Pittet,D. (1998) Increasing bacteremia due to coagulase-negative staphylococci: fiction or reality? *Infect Control Hosp Epidemiol* **19**: 581-589.

Tojo,M., Yamashita,N., Goldmann,D.A., and Pier,G.B. (1988) Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis* [published erratum appears in J Infect Dis 1988 Jul;158(1):268]. *J Infect Dis* **157**: 713-722.

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

Vacheethasanee,K., Temenoff,J.S., Higashi,J.M., Gary,A., Anderson,J.M., Bayston,R., and Marchant,R.E. (1998) Bacterial surface properties of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* strains determine adhesion on polyethylene. *J Biomed Mater Res* **42**: 425-432.

Vandecasteele,S.J., Peetermans,W.E., Merckx,R., Rijnders,B.J., and Van,E.J. (2003b) Reliability of the *ica*, *aap* and *atlE* genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infections. *Clin Microbiol Infect* **9**: 114-119.

Vandecasteele,S.J., Peetermans,W.E., Merckx,R., and Van Eldere,J. (2003c) Expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus epidermidis* during *in vitro* and *in vivo* foreign body infections. *J Infect Dis* **188**: 730-737.

Vinogradov,E., Sadovskaya,I., Li,J., and Jabbouri,S. (2006) Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of *Staphylococcus aureus* MN8m, a biofilm forming strain. *Carbohydr Res* **341**: 738-743.

von Eiff,C., Peters,G., and Heilmann,C. (2002) Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis* **2**: 677-685.

Vuong,C., Kocianova,S., Voyich,J.M., Yao,Y., Fischer,E.R., DeLeo,F.R., and Otto,M. (2004a) A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem* **279**: 54881-54886.

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

Wang,J.Y., Tsukayama,D.T., Wicklund,B.H., and Gustilo,R.B. (1996) Inhibition of T and B cell proliferation by titanium, cobalt, and chromium: role of IL-2 and IL-6. *J Biomed Mater Res* **32**: 655-661.

Wang,X., Preston,J.F., III, and Romeo,T. (2004) The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J Bacteriol* **186**: 2724-2734.

Wergeland,H.I., Haaheim,L.R., Natas,O.B., Wesenberg,F., and Oeding,P. (1989) Antibodies to staphylococcal peptidoglycan and its peptide epitopes, teichoic acid, and lipoteichoic acid in sera from blood donors and patients with staphylococcal infections. *J Clin Microbiol* **27**: 1286-1291.

Williams,R.J., Henderson,B., Sharp,L.J., and Nair,S.P. (2002) Identification of a Fibronectin-Binding Protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **70**: 6805-6810.

Worthington,T., Lambert,P.A., Traube,A., and Elliott,T.S. (2002) A rapid ELISA for the diagnosis of intravascular catheter related sepsis caused by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* **55**: 41-43.

Yao,Y., Sturdevant,D.E., Villaruz,A., Xu,L., Gao,Q., and Otto,M. (2005) Factors characterizing *Staphylococcus epidermidis* invasiveness determined by comparative genomics. *Infect Immun* **73**: 1856-1860.

Zhang, Y.Q., Ren, S.X., Li, H.L., Wang, Y.X., Fu, G., Yang, J. *et al.* (2003) Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol Microbiol* **49**: 1577-1593.

Ziebuhr, W., Heilmann, C., Gotz, F., Meyer, P., Wilms, K., Straube, E., and Hacker, J. (1997c) Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect Immun* **65**: 890-896.

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

Zielen, S., Broker, M., Strnad, N., Schwenen, L., Schon, P., Gottwald, G., and Hofmann, D. (1996) Simple determination of polysaccharide specific antibodies by means of chemically modified ELISA plates. *J Immunol Methods* **193**: 1-7.

8 Lebenslauf

Name: Jumi-Elvira Klettke
Geburtsdatum: 08. August 1979
Geburtsort: Bonn
Familienstand: ledig
Konfession: evangelisch
E-mail: jklettke@hotmail.com

Schulbildung

Grundschule am Schraberg, Herdecke	1986–1990
Friedrich Harkort Schule (Gymnasium), Herdecke	1991–1992
Gymnasium im Bildungszentrum Mettenhof, Kiel	1992–1999

Studium

Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg	2000-2006
Ärztliche Vorprüfung	März 2002
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung	März 2003
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung	September 2005
Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung	November 2006
Erteilung der Approbation	November 2006

Promotion

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene	2003-2008
---	-----------

Berufliche Laufbahn

Assistenzärztin im Katholischen Marienkrankenhaus Hamburg Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Krankheiten	seit Januar 2007
--	------------------

9 Publikation

Publizierte Abstracts

Rohde,H., **Klettke,J.**, Siemssen,N., Frommelt,L., Horstkotte,M.A., Burdelski,C. *et al.* (2005). Development of an enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) specifically detecting anti-polysaccharide intercellular-adhesin (PIA) antibodies. Clin.Microbiol.Infect. 11 (Supplement 2): 486.

10 Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Universität Hamburg zur Promotion eingereichten Dissertation mit dem Titel:

Nachweis und diagnostische Wertigkeit von Antikörpern gegen das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsion bei Patienten mit Endoprotheseninfektionen durch *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*

in der Arbeitsgruppe des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene unter der Leitung von Prof. Dr. med. Aepfelbacher ohne sonstige Hilfe durchgeführt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hamburg, 24.07.2008

J. Klettke

11 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. R. Laufs und Herrn Prof. Dr. med. M. Aepfelbacher möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Geräte bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. D. Mack, dem Leiter der Arbeitsgruppe, danke ich für die Überlassung des Themas. Hervorheben möchte ich seine stete Bereitschaft zum kritischen Gedankenaustausch, die mir immer wieder wertvolle Impulse beim Erstellen dieser Arbeit gegeben hat. Herrn PD Dr. med. I. Sobottka danke ich für die Übernahme der Aufgaben des Doktorvaters nach der Berufung von Herrn Prof. Mack an die Universität von Wales, Swansea.

Herrn Dr. med. Holger Rohde gilt mein besonderer Dank für die umfassende und uneingeschränkte wissenschaftliche Betreuung und unglaubliche, unermüdliche Unterstützung, welche immer von sehr viel Freude geprägt war.

Frau Dr. med. Gefion Franke, Herrn Martin Christner und Herrn Christoph Burdelski sei für ein hervorragendes Arbeitsklima und ihre stete Hilfsbereitschaft gedankt.

Herrn Dr. med. N. Siemssen (ENDO-Klinik, Hamburg) danke ich für die Bereitstellung der Patientenseren.

Frau Christine Reich danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung von Daten.

Besonderer Dank gilt meiner Mutter Jyung-Ym Klettke, meiner Schwester Juha-Olivia Hart und Harry Parotat. Durch sie wurden das Studium und diese Promotion ermöglicht.

Für den privaten Rückhalt danke ich Dr. med. Daniel Appel, Diane Ripperger und meinem Freund Jan Ikels.

12 Anhang

Tabelle: Übersicht über die in dieser Studie untersuchten Patienten.

Nr.	Alter	Geschlecht	Gelenk	Keim	<i>icaADBC</i>	Biofilm	Rez.Titer IgA	Rez.Titer IgM	Rez.Titer IgG
1	53	männlich	Knie	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Negativ	512	256	8000
7	51	männlich	Knie	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Positiv	256	128	6000
8	83	männlich	Knie	<i>S. aureus</i>	Positiv	Positiv	1024	128	6000
9	73	weiblich	Hüfte	<i>S. aureus</i>	Positiv	Positiv	512	64	6000
11	65	weiblich	Knie	<i>S. aureus</i>	Positiv	Positiv	256	64	12000
12	69	weiblich	Knie	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Positiv	1024	64	8000
13	73	weiblich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Negativ	Negativ	1024	64	8000
14	58	männlich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Positiv	1024	128	20000
15	73	männlich	Hüfte	<i>S. aureus</i>	Positiv	Positiv	256	128	4000
19	76	weiblich	Knie	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Negativ	512	64	26000
24	42	weiblich	Hüfte	<i>S. aureus</i>	Positiv	Positiv	256	256	10000
25	65	männlich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Negativ	256	32	2000
26	56	weiblich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Negativ	Negativ	64	128	4000
28	78	weiblich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Negativ	Negativ	512	256	26000
29	60	männlich	Knie	<i>S. aureus</i>	Positiv	Positiv	512	256	16000
32	67	männlich	Hüfte	<i>S. aureus</i>	Positiv	Positiv	256	256	28000
33	60	weiblich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Negativ	Negativ	128	1024	6000
35	23	männlich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Positiv	512	64	30000
36	62	männlich	Knie	<i>S.epidermidis</i>	Negativ	Negativ	512	256	6000
37	67	weiblich	Knie	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Negativ	512	256	30000
38	67	weiblich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Negativ	Negativ	512	128	10000
39	61	männlich	Knie	<i>S. aureus</i>	Positiv	Positiv	1024	64	10000
41	65	männlich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Negativ	Positiv	512	128	20000
42	67	männlich	Knie	<i>S. aureus</i>	Positiv	Positiv	512	32	10000
43	58	männlich	Knie	<i>S.epidermidis</i>	Negativ	Negativ	128	64	4000
45	58	männlich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Negativ	Negativ	1024	128	26000
48	74	weiblich	Knie	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Positiv	512	512	20000
51	75	männlich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Negativ	Negativ	256	64	20000

Nr.	Alter	Geschlecht	Gelenk	Keim	icaADBC	Biofilm	Rez.Titer IgA	Rez.Titer IgM	Rez.Titer IgG
54	77	weiblich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Negativ	256	128	16000
56	64	männlich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Negativ	Negativ	512	128	20000
57	84	männlich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Negativ	Negativ	128	16	6000
59	78	männlich	Knie	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Positiv	512	32	6000
60	66	weiblich	Knie	<i>S.epidermidis</i>	Negativ	Negativ	1024	64	22000
62	68	weiblich	Knie	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Negativ	1024	128	10000
63	77	männlich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Positiv	512	64	8000
66	75	weiblich	Knie	<i>S. aureus</i>	Positiv	Positiv	1024	64	6000
68	63	männlich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Negativ	Negativ	128	128	8000
73	42	männlich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Positiv	128	64	4000
74	55	männlich	Knie	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Positiv	128	64	20000
76	75	weiblich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Positiv	0	64	6000
77	71	weiblich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Negativ	Positiv	64	64	4000
78	83	männlich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Negativ	128	64	8000
79	65	männlich	Knie	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Negativ	128	32	14000
80	58	männlich	Hüfte	<i>S. aureus</i>	Positiv	Positiv	512	64	10000
82	74	männlich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Positiv	64	64	12000
83	69	männlich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Negativ	Positiv	256	64	4000
84	64	männlich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Negativ	Positiv	128	64	20000
85	78	weiblich	Knie	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Negativ	256	64	12000
88	67	weiblich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Positiv	64	64	20000
90	84	weiblich	Hüfte	<i>S. aureus</i>	Positiv	Positiv	256	64	6000
93	61	weiblich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Positiv	128	64	2000
97	76	weiblich	Knie	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Positiv	128	64	20000
98	63	weiblich	Knie	<i>S. aureus</i>	Positiv	Positiv	32	64	6000
99	82	weiblich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Positiv	256	64	10000
100	82	weiblich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Positiv	256	64	20000
101	60	weiblich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Negativ	128	128	8000
103	67	weiblich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Negativ	128	128	20000
104	72	männlich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Negativ	64	64	20000
105	42	männlich	Hüfte	<i>S.epidermidis</i>	Positiv	Positiv	256	256	20000