

**Charakterisierung von *Staphylococcus aureus*-Isolaten
von Patienten mit atopischer Dermatitis**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn**

**vorgelegt von Dipl.-Biol. Sonja Margaretha Bonness
aus Bergneustadt**

2008

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Bierbaum
2. Gutachter: PD Dr. J. Wenzel

Tag der Mündlichen Prüfung: 06.02.2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Aus dem Universitätsklinikum Bonn

**Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und
Parasitologie**

-Direktor: Prof. Dr. med. Hörauf-

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	7
1 Einleitung	9
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	9
1.2 Virulenzfaktoren von <i>Staphylococcus aureus</i>	11
1.3 Infektionen durch <i>S. aureus</i>	11
1.4 Das Resistenzproblem bei <i>S. aureus</i>	14
1.5 Atopie	17
1.6 Atopische Dermatitis	18
1.7 Ziel der Arbeit	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Chemikaliennachweis	22
2.2 Gerätenachweis	23
2.3 Bakterienstämme	23
2.4 Stammhaltung und Medien	24
2.5 Sterilisationsverfahren	24
2.6 Photometrische Bestimmung der optischen Dichte	24
2.7 DNA-Analyse mittels der Agarosegelelektrophorese	24
2.8 Isolierung von genomischer DNA mittels Genomic Tip 20/G-Säulen	24
2.9 Isolierung von genomischer DNA mittels Insta-Gene Matrix	26
2.10 Vermessung der DNA	26
2.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
2.12 Primer	28
2.13 <i>Staphylococcus aureus</i> Typisierung durch Pulsfeldgelelektrophorese	29
2.14 <i>Staphylococcus aureus</i> Resistenzbestimmung	32

3	Ergebnisse	35
3.1	Besiedlung der Patienten mit <i>Staphylococcus aureus</i>	35
3.2	PFGE der isolierten <i>Staphylococcus aureus</i> -Stämme	37
3.3	Resistenzen der isolierten <i>Staphylococcus aureus</i> -Stämme	43
3.4	Nachweis der Gene für Enterotoxine der isolierten <i>Staphylococcus aureus</i> -Stämme	46
4	Diskussion	49
4.1	Besiedlung der Patienten mit <i>Staphylococcus aureus</i>	49
4.2	PFGE der isolierten <i>Staphylococcus aureus</i> -Stämme	49
4.3	Resistenzen der isolierten <i>Staphylococcus aureus</i> -Stämme	52
4.4	Vergleich verschiedener Methoden zur DNA-Isolierung	54
4.5	Enterotoxingenanalyse der isolierten <i>Staphylococcus aureus</i> -Stämme	54
4.6	Die Bedeutung von <i>Staphylococcus aureus</i> -Superinfektionen für die Pathogenese der atopischen Dermatitis	56
4.7	Ausblick	59
5	Zusammenfassung	60
6	Literaturverzeichnis	62
7	Lebenslauf	73

Abkürzungen

ad	auffüllen auf ... mit ...
aq. dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
BHI	Brain Heart Infusion, Hirn Herz Dextrose (Komplexmedium)
bp	Basenpaare
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
et al.	et alii, und andere
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
g	Erdbeschleunigung
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
Lsg.	Lösung
MilliQ	Reinstwasser
min	Minuten
mM	Millimolar
MRSA	Methicillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NCCLS	National Committee for Clinical Standards (USA)
Nm	Nanometer
OD ₅₇₈	optische Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von 578 nm
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit, Einheit
üN	über Nacht

UV	Ultraviolett
V	Volt
VISA	Vancomycin intermediär-resistenter <i>S. aureus</i>
VRSA	Vancomycin resistenter <i>S. aureus</i>
VSSA	Vancomycin empfindlicher <i>S. aureus</i>
(v/v)	volume per volume, Volumenprozent

Physikalische Einheiten, Nukleotide und Aminosäuren wurden nach den IUPAC-Regeln abgekürzt.

1 Einleitung

1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus ist ein nicht-sporenbildendes, unbewegliches, Gram-positives, kokkoides Bakterium mit einem niedrigen GC-Gehalt. Die Zugehörigkeit zu den *Micrococcaceae* wurde nach molekulargenetischen Untersuchungen revidiert, jetzt werden die Staphylokokken zur Familie der *Staphylococcaceae*, Abteilung Bacillen und Lactobacillen, Ordnung Bacillales, gezählt (GARRITY et al., 2001).

Die Gattung *S. aureus* umfasst bis dato 35 Spezies und 17 Subspezies (MURRAY, 2003). Diese sind an Mensch und Tier adaptiert, jedoch äußerst resistent gegenüber Umwelteinflüssen, so dass auch unbelebte Gegenstände als Überträger fungieren können. Die molekulargenetisch nicht bestätigte Einteilung nach V. DARÁNYI (1955) in plasmakoagulasepositive (*S. aureus*-Gruppe) und plasmakoagulasenegative Staphylokokken wird aufgrund klinischer Relevanz immer noch verwendet (KÖHLER et al., 2001).

Die Bakterienzellen besitzen einen Durchmesser von 1-2 µm. Sie sind in traubenförmigen Haufen (griechisch: staphyle = Traube) angeordnet, da die Teilung in mehreren Ebenen erfolgen kann, im Gegensatz zu den Streptokokken, die sich nur in einer Ebene teilen und daher kettenförmig angeordnet sind. Die Koloniefarbe von *Staphylococcus aureus* variiert von weiß bis goldgelb, daher der Speziesname *aureus* (lateinisch: aureus = golden). Die Pigmente gehören zur Familie der Karotinoide und dienen, wie auch bei vielen Luftkeimen, zum Schutz vor Photooxidation durch Licht und UV-Strahlung (SCHLEGEL, 1992).

Die Zellwand von Gram-positiven Bakterien besteht zu 30-70% des Trockengewichtes aus Murein, einem Peptidoglykan (SCHLEGEL, 1992). Zusätzlich findet man in der Zellwand noch Proteine und andere Polymere, wie Teichon- und Teichuronsäuren. Die Zellwand ist wichtig für die Stabilität der Bakterienzelle, deshalb ist sie oft die Zielstruktur von Antibiotika. Im Gegensatz zu Gram-negativen Bakterien, die nur eine dünne Mureinschicht aufweisen, besteht die Zellwand bei Gram-positiven Bakterien aus 30-40 Schichten Murein.

Bausteine des Mureins sind N-Acetyl-D-Glucosamin und N-Acetyl-D-Muraminsäure, die abwechselnd glykosidisch miteinander verbunden sind. An der Carboxylgruppe

der Muraminsäure befindet sich eine Peptidseitenkette aus vier Aminosäuren (L-Alanin, D-Glutamin, L-Lysin und D-Alanin), und an diesen Peptidketten findet die Verknüpfung zu einem Mureingerüst statt. Charakteristisch für das Peptidoglykan von *S. aureus* sind die Pentaglycinbrücken, die die verschiedenen Peptidseitenketten verbinden. Das Murein von *S. aureus* ist resistent gegen Lysozym, dies liegt an der O-Acetylierung des Mureins, dem Vorhandensein der Teichonsäuren (Wall Teichoic Acid (WTA)) und einer hohen Zahl von Querverbindungen (BERA et al., 2006). Deshalb wird zur Zelllyse Lysostaphin eingesetzt. Lysostaphin wird aus Kulturüberständen von *Staphylococcus simulans* gewonnen und arbeitet als Glycyl-Glycyl-Endopeptidase (SCHINDLER & SCHUHARDT, 1964; ZYGMUNT et al., 1967).

S. aureus ist in der Lage, sich auf vielen Nährböden zu vermehren, auch relativ hohe Kochsalzkonzentrationen (bis 10%) und ein weiter pH-Wert Bereich können toleriert werden und machen die Anzucht unkompliziert. Auf Blutagarplatten lässt sich meistens eine β -Hämolyse erkennen, die durch mindestens eins von vier bekannten Hämolysinen verursacht wird (MADIGAN et al., 2000). Das Wachstumsoptimum liegt, an den Menschen adaptiert, bei 30-37 °C, die Kokken sind aber in der Lage, sich bei Temperaturen von 10-45 °C zu vermehren.

Man findet *S. aureus* als normalen Bestandteil der Bakterienflora des Menschen, und dort vor allem im Nasenvorhof bei bis zu 40% der Bevölkerung (NOBLE, 1997), weiterhin aber auch im Kolon und der Vagina. Der Trägerstatus hängt zwar auch von der Virulenz des Erregerstammes ab, aber PEACOCK et al. (2003) postulieren, dass die Wirtseigenschaften ausschlaggebend sind. Es wird oft betont, dass Träger von *S. aureus* eine höhere Infektionsrate aufweisen (LUZAR et al., 1999; WEINSTEIN, 1959). Allerdings zeigen neuere Untersuchungen, dass Patienten mit Trägerstatus eine bessere Prognose bei schweren Infektionen, z. B. *S. aureus*-Sepsis, haben, da anscheinend gebildete Antikörper u.a. gegen die Superantigen-Toxine gerichtet sind und so einen protektiven Effekt aufweisen (HOLTFRETER, 2006; VAN BELKUM, 2006). Die meisten der *S. aureus*-Stämme sind fakultativ anaerob, und die Kohlenhydratverwertung kann von ihnen auf fermentativem Weg durchgeführt werden (HAHN et al., 2004).

1.2 Virulenzfaktoren von *Staphylococcus aureus*

S. aureus exprimiert viele potenzielle Virulenzfaktoren. Es existieren Oberflächenmoleküle, die die Kolonisierung des Wirtes unterstützen, wie WTA (Wall Teichoic Acid) (WEIDENMAIER et al., 2004). Die Produktion von Invasinen unterstützt die Ausbreitung der Bakterien im Wirtsgewebe (Leukocidin, Kinasen, Hyaluronidase, Lipasen, Nukleasen, Proteasen). Verschiedene Oberflächenfaktoren verhindern die Phagozytose (11 Kapseltypen, Protein A) und biochemische Eigenschaften sichern das Überleben in Phagozyten (Produktion von Karotinoiden, Katalase). Eine immunologische Tarnung schützt vor dem Erkennen durch das Immunsystem (Protein A, Koagulase, Clumpingfaktor) (KÖHLER et al., 2001). Weiterhin ist *S. aureus* in der Lage, intrazellulär zu persistieren. Dies geschieht in Form eines besonderen Phänotyps, der Small Colony Variants (SCV). Dies sind langsam wachsende Subpopulationen mit einem reduzierten Metabolismus (PROCTOR, 1994). Die SCV können aber wieder zu dem schnell wachsenden Phänotyp revertieren und sind oft der Grund für rezidivierende Infektionen (VESGA et al., 1996). Die Induktion dieses SCV-Phänotyps wird u.a. durch Gentamicin ausgelöst und kann Mutationen involvieren (SCHAAFF et al., 2003).

Als weitere Virulenzfaktoren werden viele Toxine produziert (α -, β -, γ -, δ - Hämolysin, Leukotoxin, Leukocidin, Enterotoxine, TSST, s.u.).

1.3 Infektionen durch *S. aureus*

Die Infektionen des Menschen durch *S. aureus* kann man aufteilen in Krankheiten, die durch direkten, invasiven Bakterienbefall oder durch Bakterienprodukte, z. B. Toxine bei Lebensmittelvergiftungen, ausgelöst werden.

Symptome durch invasiven Bakterienbefall:

Zu Krankheitssymptomen, die durch die Bakterien selber hervorgerufen werden, kommt es oft durch endogene Infektionen. Dies geschieht bei gestörtem lokalen oder systemischen Immunstatus und wird deshalb als opportunistische Infektion bezeichnet. Die Invasion geht auch meistens sekundär über vorbestehende Wunden

oder präexistente Dermatosen vonstatten. Allerdings kann es auch bei exogener Übertragungsweise im Rahmen einer nosokomialen Infektion zu schweren Krankheitssymptomen bei ohnehin immunsupprimierten Patienten im Krankenhaus kommen. Diese Stämme sind dann meistens schwieriger zu therapieren, da die Zahl der Resistenzen, aufgrund des höheren Selektionsdrucks durch Antibiotikagabe, im Krankenhaus größer ist. *S. aureus* kann im Krankenhaus auch durch unbelebte Gegenstände übertragen werden, der häufigste Weg ist jedoch über das Pflege- und ärztliche Personal.

Zum Spektrum der invasiven Erkrankungen gehören die oberflächlichen und die tiefen Prozesse. Bei Infektionen der Haut unterscheidet man follikelgebundene und nicht-follikuläre Infektionen. Als Follikulitis bezeichnet man oberflächliche, meist eitrige Entzündungen der Haarfollikel, die recht häufig sind. Außer *S. aureus* kommen als Erreger auch *Malassezia furfur*, koryneforme und Gram-negative Bakterien in Frage. Ist der gesamte Haarfollikel betroffen, spricht man von einem Furunkel, einer sehr schmerzhaften, nekrotisierenden Entzündung. Sind benachbarte Follikel betroffen, können diese zu einem Karbunkel verschmelzen. Furunkel und Karbunkel können ohne erkennbare Disposition auftreten, aber auch im Rahmen von Dermatosen wie Follikulitis, Seborrhoe, Acne vulgaris oder bei systemischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder systemischer Immunsuppression. Auch die apokrinen und ekkrinen Schweißdrüsen können betroffen sein.

Bei den nicht follikulären Pyodermien unterscheidet man die großblasige Impetigo contagiosa und Entzündungen der Finger und Zehen in Form von Paronychien oder Panaritien (FRITSCH, 2004).

Als Beispiele für tiefe Infektionen durch *S. aureus* sind die Parotitis, die Mastitis puerperalis, Abszesse in allen Organen und Weichteilen, die Osteomyelitis und Empyeme zu nennen. Werden Bakterien in die Blutbahn verschleppt, kann es sowohl zu einer Endokarditis als auch zu einer Sepsis kommen. Als Superinfektionen bei einer Viruserkrankung (z.B. Influenza) kann sich eine Pneumonie ausbilden und einen schweren Verlauf nehmen (KÖHLER, 2001).

Symptome durch Bakterienprodukte:

Staphylococcus aureus ist der Produzent von vielen verschiedenen Toxinen. Die

entstehenden Krankheitsbilder werden nicht durch das Bakterium selbst verursacht, sondern von Bakterienprodukten, die ausgeschieden werden. Deshalb werden diese als Exotoxine bezeichnet. Die Toxine bewirken Erscheinungen an der Haut (Blasenbildung durch exfoliative Toxine), im Gastrointestinaltrakt (Übelkeit und Erbrechen durch Enterotoxine) und generalisierte Symptome (z.B. bei TSST-1).

Ein wichtiges Beispiel ist das TSST-1 (Toxic Shock Syndrome Toxin), das früher als SEF (staphylococcal enterotoxin F) bezeichnet wurde (BERGDOLL et al., 1981; SCHLIEVERT et al., 1981; DINGES et al., 2000). Das durch TSST-1 verursachte ernstzunehmende Krankheitsbild äußert sich mit hohem Fieber, Hypotonie, diffuser Hautrötung und Hautschuppung der Handflächen und Fußsohlen. Die Symptome ähneln dem Scharlach, aber die Patienten sind meistens weiblich und zwischen 20 und 40 Jahre alt. Es stellte sich heraus, dass das Krankheitsbild meistens während der Menstruation auftritt und ein erhöhtes Risiko bei dem Gebrauch von Tampons besteht (DAVIS et al., 1980; SHANDS et al., 1980). Das unter bestimmten Umständen von *S. aureus* gebildete Toxin TSST-1 gelangt in den Blutkreislauf und führt zu Symptomen, die in 5-8 % tödlich enden (HILL et al., 2005). Ein nicht-menstruelles TSST tritt auch auf, ist aber viel seltener (KÖHLER et al., 2001).

Ein weiteres wichtiges Krankheitsbild ist das SSSS (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome), das auch Morbus Ritter von Rittershain genannt wird, und vorwiegend bei Säuglingen beobachtet wird. Exfoliative Toxine, die von *S. aureus* gebildet werden, spalten ein Adhäsionsmolekül der Haut, das Desmoglein 1, und führen so zu einer intraepidermalen Spaltbildung (HANAKAWA & STANLEY, 2004). Histologisch abzugrenzen ist das medikamenteninduzierte Lyell-Syndrom, bei dem die Spaltbildung subepidermal erfolgt (KÖHLER et al., 2001).

Staphylococcus aureus ist auch eine wichtige Ursache von Lebensmittelvergiftungen. Die hitzestabilen Enterotoxine, die in Lebensmitteln wie Mayonnaise gebildet werden können, stimulieren wahrscheinlich den Nervus Vagus (X) und führen zu heftigem Erbrechen. Außerdem agieren sie, wie das TSST-1, als Superantigene und stimulieren eine T-Zell-Proliferation (SALYERS, 1994).

Normalerweise prozessieren die APC (Antigen Präsentierende Zellen) das Antigen und präsentieren es den T-Zellen an das MHC II- (Major Histocompatibility Complex) Molekül gebunden. Wird das Antigen vom T-Zell-Rezeptor erkannt, kommt es zu

einer Aktivierung der T-Zelle. Ein Superantigen hingegen aktiviert die T-Zelle, ohne dass ein spezifisches Antigen erkannt wird. Es bindet unspezifisch seitlich an das MHC-II-Molekül und an den T-Zell-Rezeptor und verbindet diese, ohne dass das Antigen von dem T-Zell-Rezeptor erkannt wird. Da die Superantigene bis zu 5 % aller T-Zell-Klone aktivieren können, ist die Immunantwort stark ausgeprägt.

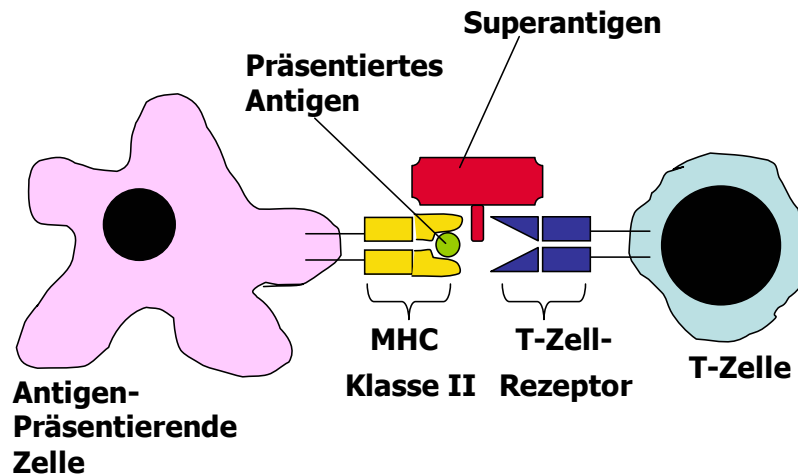


Abb. 1: Ein Superantigen bindet unspezifisch seitlich an den T-Zell-Rezeptor und das MHC-II-Molekül, dadurch wird die T-Zelle aktiviert ohne dass ein passendes präsentiertes Antigen erkannt wurde (modifiziert nach JANEWAY et al. 1999)

Bis dato sind 18 verschiedene Enterotoxine beschrieben. Die Enterotoxine SEA (Staphylococcal Enterotoxin A), SEB, SEC (SEC₁, SEC₂, SEC₃), SED und SEE sind schon länger bekannt (BETLEY, 1987; MARR et al., 1993). Weiterhin wurden noch die Toxine SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER und SEU beschrieben (MUNSON et al., 1998; SU et al., 1998; Zhang et al., 1998; LETERTRE et al., 2003; BAKER et al., 2004). Neuren Datums sind auch die „Enterotoxin-like toxins“ (SEI), die keine emetischen Reaktionen in Primaten auslösen, aber mit den Enterotoxinen strukturell verwandt sind, z.B. SEIP (OMOE et al. 2005).

1.4 Das Resistenzproblem bei *S. aureus*

S. aureus bildet schnell Resistenzen gegen Antibiotika und besitzt ein großes akzessorisches Genom in Form von Plasmiden, Bakteriophagen, Transposons, chromosomalen Kassetten und genetischen Inseln. Dort sind meist die Gene, die für die Virulenz verantwortlich sind, kodiert (LINDSAY & HOLDEN 2004). Kurz nach der Einführung des Penicillins in die Klinik wurden schon die ersten resistenten *S. aureus*-Stämme beschrieben (BARBER 1947; NORTH & CHRISTIE 1946). Diese Resistenz beruht

auf der Bildung von β -Lactamasen, die den β -Lactam Ring des Penicillins zu spalten vermögen.

Nach der Entwicklung und dem Einsatz von β -Lactamase-festen Antibiotika, z.B. Methicillin, zeigte sich jedoch auch hier eine Resistenzbildung.

Der erste Methicillin-resistente Stamm (MRSA) wurde 1960 beschrieben (BARBER 1961). Diese Resistenz entsteht allerdings durch einen anderen Mechanismus als jene gegen Penicillin. Bei *S. aureus* sind vier Enzyme, die so genannten Penicillin-bindenden-Proteine (PBP1-4), an der Zellwandsynthese beteiligt. Die resistenten Stämme bilden ein weiteres PBP, das PBP2a, das eine geringere Affinität für β -Lactame besitzt und deshalb von Methicillin nicht inaktiviert werden kann. Die genetische Information für das PBP2a befindet sich auf dem *mecA*-Gen.

In den vergangenen Jahren ließ sich ein Anstieg der MRSA-Prävalenz beobachten. Man unterscheidet zwischen den so genannten hospital-acquired (HA)-MRSA- und den community-acquired (CA)-MRSA-Stämmen.

Zwischen den verschiedenen Ländern und Krankenhäusern und sogar innerhalb der Krankenhäuser lassen sich große Unterschiede in der HA-MRSA-Prävalenz erkennen (GASTMEIER et al. 2002). Diese Stämme weisen meistens eine Multiresistenz gegen viele verschiedene Antibiotika auf. In Japan, den USA und einigen südeuropäischen Ländern geht man von einer MRSA-Rate von 30-80 % aus, in Dänemark und Finnland unter 1 % und in den Niederlanden von unter 0,5 % (PANLILIO et al. 1992, SALMENLINNA et al. 2000, VERHOEF et al. 1999, VOSS et al. 1994).

Sehr niedrige Infektionsraten in den Niederlanden sind durch den vorsichtigen Umgang mit Risikopatienten zu begründen. Dort werden die Patienten mit einem erhöhten Risiko von MRSA-Infektionen direkt isoliert, bevor eine MRSA-Diagnostik erfolgt. Die Stationen werden komplett abgeriegelt und das Pflegepersonal darf die Station nur zu Dienstschluss verlassen. Allerdings sehen VAN BEIJNUM et al (2006) darin auch Gefahren für den Patienten, die zu schlechterer Pflege und möglichem Tod führen können.

In Deutschland stieg der HA-MRSA-Anteil an den *Staphylococcus aureus*-Infektionen von 1,7 % im Jahre 1990 auf 15,2 % in 1998 und schließlich auf 20,7 % in 2001 (KIPP et al. 2004, KRESKEN et al. 2003). In Europa ist dies derzeit die höchste Zuwachsrate (TIEMERSMA et al. 2004).

Auch die Zahl der CA-MRSA-Stämme ist steigend. Diese Stämme können u.a. zu Weichteilinfektionen führen, sind meist aber nicht multiresistent (DREWS et al. 2006). Zur Therapie der multiresistenten Stämme sind noch einige wenige Antibiotika geeignet, z.B. die Glykopeptide, wie Vancomycin und Teicoplanin, und neuere Substanzen, wie das Linezolid oder Daptomycin (AMMERLAAN et al. 2006).

Vancomycin wird seit 1956 in der Klinik verwendet und es haben sich vergleichsweise wenige Resistenzen entwickelt. Die Isolation von VISA- (Vancomycin intermediär resistente *S. aureus*) (HIRAMATSU et al. 1997) und VRSA- (Vancomycin resistente *S. aureus*) (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION 2002) Stämmen macht aber eine Suche nach Alternativen in der antibiotischen Behandlung von Staphylokokken notwendig. Der Begriff Vancomycin-resistenter *S. aureus* wird unterschiedlich definiert. Meistens angewandt wird eine Klassifizierung nach CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, früher NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)), diese gilt für die USA und teilweise für Deutschland. Danach ist ein *S. aureus*-Stamm gegenüber Vancomycin empfindlich, bei einer MHK $\leq 4 \mu\text{g/ml}$, intermediär resistent (VISA) bei einer MHK = $8-16 \mu\text{g/ml}$ und resistent (VRSA) bei einer MHK $> 16 \mu\text{g/ml}$.

Den Resistenzen bei VISA- und VRSA-Stämmen liegen unterschiedliche Mechanismen zugrunde. Bei den kürzlich isolierten VRSA-Stämmen ist wahrscheinlich ein von Enterokokken erworbenes Gencluster, *van*, für die Resistenz verantwortlich (CHANG et al. 2003). Dieses Gencluster codiert drei Enzyme, die das Ende der Peptidketten bei der Zellwandsynthese so verändern, dass das Vancomycin nicht mehr in die Zellwandsynthese eingreifen kann. Bei den VISA-Stämmen spielen vermutlich viele Mutationen eine Rolle, die zu einer veränderten Zellwandstruktur und einer verstärkten Zellwandsynthese (HIRAMATSU 1998, GEISEL 2001), sowie zu einem veränderten Autolyseverhalten (HANAKI 1998) und einer veränderten PBP-Expression führen (FINAN 2001, SIERADZKI 1999).

Die Grenzwerte für Resistenzen sind je nach Richtlinien auch bei allen anderen Antibiotika unterschiedlich. Wie auch im Staphylokokkenreferenzlabor, Bonn, werden in dieser Arbeit die Richtwerte nach CLSI und DIN verwendet (siehe 2.14).

1.5 Atopie

Definition: „...Der Begriff „Atopie“ bezeichnet eine genetisch determinierte Bereitschaft, gegen bestimmte exogene, möglicherweise aber auch endogene Substanzen ohne klar ersichtlichen Grund sensibilisiert zu werden und in der Folge klinische Erscheinungsbilder wie Inhalationsallergien (...) und Ekzeme zu entwickeln...“ (FRITSCH 2004).

Allergische Erkrankungen gehören zu den häufigsten Erkrankungen des Menschen überhaupt, und in den Industrieländern leidet mehr als ein Viertel der Bevölkerung unter allergischen Symptomen.

Derzeitige Prävalenz in Europa (BACHERT et al. 2001):

Allergische Rhinitis (saisonal)	10-20 %
Allergische Rhinitis (perennial)	10-15 %
Atopische Dermatitis	10-12 %
Asthma	5-10 %
Kontaktdermatitis	1-2 %

Meistens liegt bei den Patienten eine Kombination der verschiedenen allergischen Erkrankungen vor, oft geht z.B. dem Asthma eine Rhinitis voraus („Etagenwechsel“). Die Pathogenese der Atopie ist noch nicht geklärt. Genetische Faktoren allein können nicht erklären, dass die Prävalenz in den westlichen Ländern zunehmend ist oder dass Einwanderer das Risiko einer allergischen Erkrankung des neuen Lebensraums annehmen. Neuere Studien zeigen allerdings, dass auch in den Entwicklungsländern wie in Ecuador und anderen südamerikanischen Ländern die Anzahl von atopischen Patienten besonders in den städtischen Ballungsgebieten stark ansteigt (COOPER et al. 2006). Nachdem bei Mäusen durch Vitamin D eine TH2-gewichtete (s.u.) Immunantwort ausgelöst werden konnte, wurde in einer Studie in Finnland ein erhöhtes Risiko von atopischen Erkrankungen nach der Gabe von Vitamin D bei Kindern zur Rachitisprophylaxe beobachtet (HYPPONEN et al. 2004). HUSSAIN & SMITH 2003 postulieren, dass Mikroorganismen beim gesamten atopischen Formenkreis eine wichtige Bedeutung zukommt, da besonders Viren und bakterielle Produkte die Überlebenszeit von TH2-Zellklonen verlängern (s.u.).

1.6 Atopische Dermatitis

Psoriasis und atopische Dermatitis sind die häufigsten chronischen entzündlichen Hauterkrankungen in der allgemeinen Bevölkerung (NOMURA et al. 2003).

Die atopische Dermatitis manifestiert sich meist im Kindesalter und ist bei 10 % aller Schulanfänger zu finden (BACHERT et al. 2001). Sie ist eine multifaktoriell bedingte chronische Entzündungsreaktion der Haut, bei der genetische Prädispositionen und eine kutane Hyperreaktivität auf bestimmte Umwelteinflüsse eine grundlegende Rolle spielen (CORK et al. 2006).

Die T-Helferzellen des adaptierten Immunsystems werden in TH1- und TH2-Zellen unterteilt, die sich durch eine unterschiedliche Zytokinproduktion auszeichnen. Durch die Produktion der Zytokine werden andere Zellen in verschiedener Weise beeinflusst. TH1-Zytokine aktivieren Makrophagen, während TH2-Zellen Makrophagen hemmen und dafür B-Zellen aktivieren, die daraufhin Antikörper produzieren.

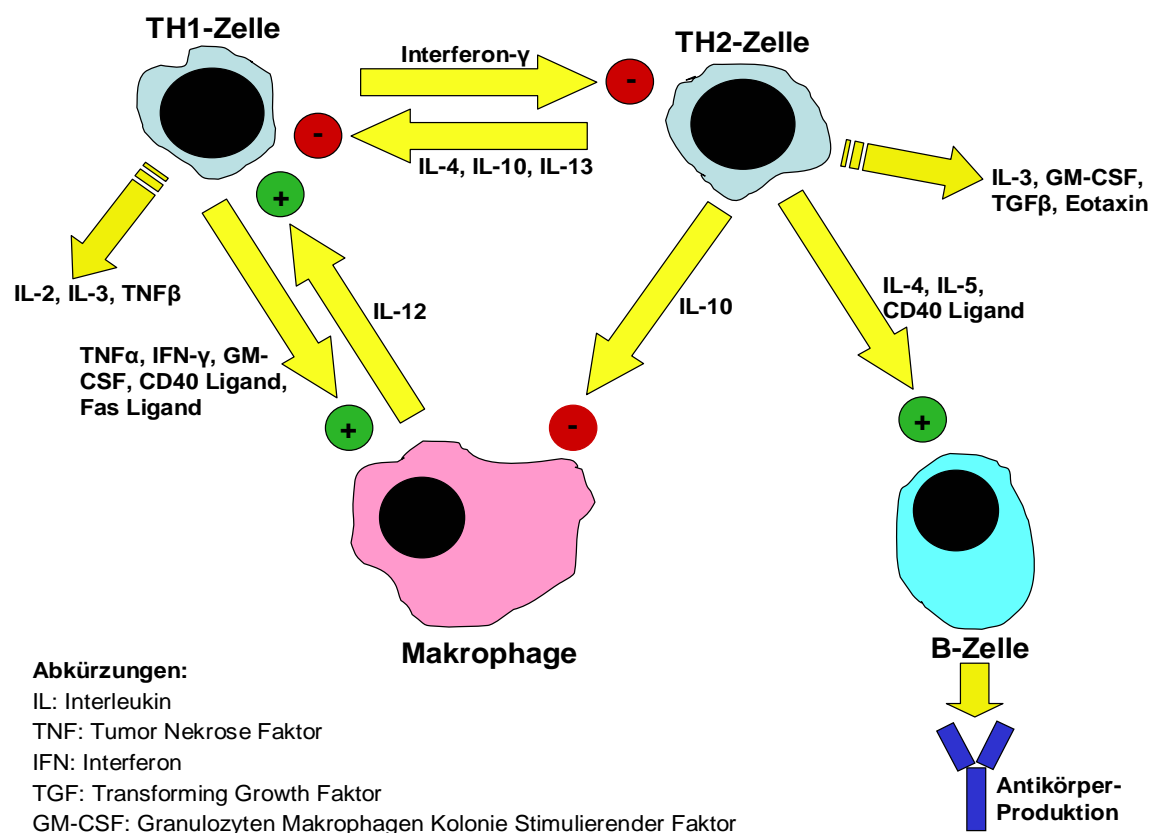


Abb. 2: TH1- und TH2-Zellen produzieren unterschiedliche Zytokine und beeinflussen sich damit gegenseitig und haben weiterhin eine aktivierende oder hemmende Wirkung auf andere Zelltypen, wie Makrophagen und B-Zellen (BACHERT et al. 2001, JANEWAY 1999)

Die oben erwähnte Dichotomie spielt eine wichtige Rolle bei der atopischen Diathese und bei der Psoriasis. Während bei der Psoriasis angenommen wird, dass das Gleichgewicht in Richtung der TH1-Zellen verschoben ist, geht man bei atopischer Diathese von vermehrter TH2-Zellaktivität aus.

Die Allergene werden bei der atopischen Dermatitis über die Haut oder den Gastrointestinaltrakt aufgenommen und provozieren Ekzemreaktionen. Dabei spielen die Langerhanszellen eine wichtige Rolle, die die Allergene präsentieren und zusätzlich über IgE-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche binden. Sie induzieren eine deutlich verstärkte TH2-gerichtete Immunantwort in der akuten Reaktion (BACHERT et al. 2001).

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen der Psoriasis und der atopischen Dermatitis ist die Häufigkeit der Superinfektionen. Während bei der Psoriasis nur in 6.7% Superinfektionen zu beobachten sind, findet man in der Literatur immer wieder Angaben, dass bei über 90% der Patienten mit atopischer Dermatitis *Staphylococcus aureus* von der Haut isoliert werden kann (CHRISTOPHERS & HENSELER 1987, LEYDEN et al. 1974). Die Adhäsion von *S. aureus* ist bei Atopikern durch das TH2-Cytokinmilieu erleichtert und wird durch Fibronektin und Fibrinogen vermittelt (CHO et al. 2001).

Andere Mikroorganismen, wie der Pilz *Malassezia furfur* und Viren sind allerdings auch auf atopischen Läsionen zu finden. Besonders ausgeprägt ist die Infektion von Atopikern mit Herpesviren (Eczema herpeticum). HOWELL et al. (2006) postulieren, dass eine verminderte Bildung des Peptids Cathelicidins LL-37 und eine damit einhergehende Erhöhung des IgE-Titers die Gefahr eines Eczema herpeticum bei Atopikern erhöht. *Vaccinia*-Viren können ein Eczema vaccinatum auslösen, das nach Pockenimpfung auftreten kann. Da aus Angst vor Terroranschlägen nach dem 11. September große Teile der US Armee und der Bevölkerung geimpft werden sollten, stellte diese Impfkomplication ein großes Problem dar (MAURER et al. 2003, ENGLER et al. 2002).

Auch das angeborene Immunsystem weist bei der atopischen Dermatitis im Gegensatz zur Psoriasis Funktionsstörungen auf und begünstigt eine Besiedlung mit *S. aureus*. Die antimikrobiellen Peptide des angeborenen Immunsystems stellen eine erste Abwehr gegen Mikroorganismen dar und werden bei Entzündungen von den Keratinocyten in höheren Konzentrationen gebildet (GALLO et al. 2003). ONG et al.

(2002) zeigten, dass die Produktion von Defensinen und Cathelicidinen (LL-37) bei Atopikern im Vergleich zu Psoriatikern stark verringert ist. NOMURA et al. (2003) ergänzten dies und beschrieben, dass bei atopischer Dermatitis die Expression des humanen β -Defensin 2 (HBD-2) im Vergleich zur Psoriasis vermindert ist und die Cytokinproduktion Unterschiede erkennen lässt. Die TH2-Cytokinproduktion ist erhöht und andere Cytokine, wie TNF- α (Tumor Necrosis Factor α), IFN- γ (Interferon γ) und IL-1 β (Interleukin 1 β) sind nur in geringen Konzentrationen nachweisbar. Außerdem verringern die TH2-Cytokine (besonders IL-4, -10 und -13) die Induktion von dem humanen β -Defensin 3 (HBD-3) (HOWELL et al. 2006, HOWELL et al. 2005), dessen Bildung durch TNF- α und IFN- γ induziert wird. HBD-3 zeigt die beste bakteriozide Wirkung gegen *S. aureus* (SCHIBLI et al. 2002, HARDER et al. 2001, GARCIA et al. 2001), während HBD-2 nur in Gegenwart von dem Cathelicidin LL-37 gegen *S. aureus* wirksam ist (ONG et al. 2002).

Liegt eine Superinfektion mit *S. aureus* vor, kommt es durch die Produktion von Superantigenen zu einer Verstärkung der entzündlichen Veränderungen (KIM et al. 2006). LAOUINI et al. (2003) zeigten auch in einem Mausmodell, dass die Stimulation mit SEB in der Maus eine TH2-gerichtete Immunantwort mit erhöhten IgE-Spiegeln, wie bei der atopischen Dermatitis auslöst. Die Staphylokokken kolonisieren vorwiegend die Hornschicht von ekzematös veränderter Haut. Dermal lässt sich SEB in der Nähe des Infiltrats nachweisen. Außerdem induzieren SEA und SEB die Expression von ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) und HLA-DR (Human Leucocyte Antigen DR) auf humanen Keratinozyten (MORISHITA et al. 1999). Die Keratinozyten aus der Haut von Atopikern produzieren weiterhin nach Stimulation mit TSST-1, SEA und SEB vermehrt die Cytokine IL-1 α , IL-1 β und TNF- α und reagieren somit anders auf die externen Reize als die Keratinozyten aus der Haut von Kontrollpersonen (KIM et al. 2006). Oft wurde versucht, die Serumspiegel der spezifischen IgE gegen Entertoxine (meist SEA und SEB) mit dem klinischen Erscheinungsbild und dem SCORAD (Score of Atopic Dermatitis) zu korrelieren. Meist wurde gezeigt, dass der Serum-IgE-Spiegel von atopischen und nicht-atopischen Patienten ähnlich ist, aber bei schwerwiegenden Hautbefunden auch die spezifischen IgE-Antikörper gegen SEA und SEB erhöht waren (IDE et al. 2004, LIN et al. 2000).

LEYDEN & KLINGMANN (1977) zeigten, dass eine kombinierte Therapie aus Antibiotika

und Kortikosteroiden effektiver ist, als eine alleinige Therapie mit Steroiden. Allerdings zeigten GONG et al. (2006), dass auch eine alleinige Steroidtherapie die *S. aureus*-Kolonisation vermindert und empfehlen eine antibiotische Therapie nur bei früher Therapie der Hautläsionen. Trotz des anscheinenden Widerspruchs ist damit gesichert, dass eine Superinfektion maßgeblich an der Ausprägung der atopischen Dermatitis beteiligt ist. Es bleibt aber die Frage, wie die verschiedenen pathologischen Veränderungen zusammenspielen und letztendlich zur Pathogenese der atopischen Dermatitis beitragen.

1.7 Ziel der Arbeit

Ziel dieser vorliegenden Arbeit war es, die Besiedlung von Patienten mit atopischer Dermatitis mit *Staphylococcus aureus* zu untersuchen und die isolierten Stämme näher zu charakterisieren. Es wurden Patienten ausgewählt, die mit ihren Eltern oder anderen Familienmitgliedern die Atopie-Sprechstunde der Hautklinik der Universität Bonn besuchten, um auch Abstriche von den Angehörigen zu erhalten. Die Stämme sollten mittels PFGE analysiert werden, um zu sehen, ob die Familienmitglieder Träger des gleichen *S. aureus*-Stammes sind. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob es sinnvoll wäre mit Atopikern zusammen lebende besiedelte Familienmitglieder mittels lokaler Antibiose zu behandeln, um den Trägerstatus zu beeinflussen und eventuelle Reinfektionen auszuschließen. Außerdem sollte untersucht werden, ob die isolierten Stämme Bildner von Enterotoxinen sind, da diese als Superantigene vermutlich einen wichtigen Teil der Pathogenese der atopischen Dermatitis ausmachen (KIM et al. 2006). Dabei sollten die Enterotoxine A, B, C, D, E, G, H, I, J nachgewiesen und deren Frequenz verglichen werden. Weiterhin sollten die isolierten Stämme auf Antibiotika-Resistenzen untersucht werden, da in der Literatur beschrieben wird, dass z.B. die Zahl der CA-MRSA (Community Acquired Methicillin Resistenter *Staphylococcus aureus*) und auch anderer resistenter Stämme, z.B. VISA (Vancomycin Intermediär resistenter *Staphylococcus aureus*) und VRSA (Vancomycin resistenter *Staphylococcus aureus*), ansteigt (DREWS et al. 2006). Dies könnte ein verändertes Patientenmanagement von Risikopatienten notwendig machen, wie es in anderen europäischen Ländern, z.B. den Niederlanden, schon praktiziert wird.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikaliennachweis

Chemikalien	Hersteller
Agar	Becton & Dickinson, Heidelberg
Agarose, pulse field certified	BioRad, München
Agarose Top Vision™, LE GQ	Fermentas, St. Leon-Rot / Biozym, Oldendorf
Antibiotikaresistenzplättchen	Oxoid, Hampshire, England
BHI-Medium (Brain-Heart-Infusion)	Difco (Becton & Dickinson), Heidelberg
Blutagar, Columbia mit 5% Schafblut	Becton & Dickinson, Heidelberg
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Instagene Matrix	BioRad, München
Küvetten (10x4x45mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Lysostaphin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lysozym	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mastaswab™ – Abstrichröhrchen	Mast Group Ltd, Brescia, Italien
Molekulargewichtstandards	Biorad, München / Fermentas, St. Leon-Rot
Müller-Hinton Agar	Becton & Dickinson, Heidelberg
Nukleotide (dNTPs)	Fermentas, St. Leon-Rot
Primer	Metabion, Martinsried
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Qiagen Genomic-tip 20/G Kit	Qiagen, Hilden
Reaktionsgefäße 0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Restriktionsenzyme und Puffer	Roche, Mannheim
<i>Taq</i> -Polymerase, 5 U/μl + Reaktionspuffer	Bioline, Luckenwalde
TSB-Medium (Tryptic Soy Broth)	Difco (Becton & Dickinson), Heidelberg

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Fa. Merck (Darmstadt) im Reinheitsgrad per analysis bezogen.

2.2 Gerätenachweis

Gerät	Hersteller
Agarosegelelektrophoresekammer (60 ml)	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Antibiotikaplättchendispenser Mark II	Oxoid, Hampshire, England
Brutschrank	Heraeus, Langenselbold
Dampfsterilisator, Varioklav 75S	H + P Labortechnik AG, Oberschleißheim
Electrophoresis Cell (PFGE, Elektrophoresegelkammer)	BioRad, München
Electrophoresis Powersupply	Renner, Dannstadt
Gefrierschrank HFU 86 (-70 °C)	Heraeus (Kendro Lab.), Langenselbold
Nanodrop, ND 1000	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Photometer, UV-160	Shimadzu, Duisburg
Schüttler, Certomat U	B. Braun, Melsungen
Thermocycler, PCR Express	Hybaid, Engelsbach
Tischzentrifuge 2K15 (Rotor SW40)	Sigma, Osterode
UV-Imager, Image Master VDS	Amersham Biosciences, Freiburg

2.3 Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8325	Kontrollstamm	NOVICK (1963)
<i>Staphylococcus aureus</i> Mu50	Enterotoxine A, G, I	HIRAMATSU et al. (1997)
<i>Staphylococcus aureus</i> 10654, 243 ATCC 14456	Enterotoxin B	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i> SEC+ aus Phagenlabor Bonn	Enterotoxin C	Enterotoxin C mit Latex-agglutination nachgewiesen
<i>Staphylococcus aureus</i> 10656, 494 ATCC 23235	Enterotoxin D, J	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i> 326	Enterotoxin E	ATCC

Die Patientenstämme wurden in der Sprechstunde für atopische Dermatitis der Hautklinik Universität Bonn gesammelt. Die Abstriche wurden von Hautläsionen oder aus der Nase mittels MastaswabTM-Abstrichröhrchen genommen und innerhalb von 24 Stunden auf Blutplatten ausgestrichen und üN bei 37 °C bebrütet.

2.4 Stammhaltung und Medien

Von allen verwendeten Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen angelegt (50 % (v/v) Glycerin) und bei -70°C eingelagert. Zum Versuch erfolgte ein Ausstrich der Bakterien auf Blutagar und üN-Bebrütung bei 37 °C. Für Flüssigkulturen wurden 5 ml TSB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und üN bei 37 °C im Schüttler inkubiert.

2.5 Sterilisationsverfahren

Nährmedien, Lösungen, Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden durch Autoklavieren bei 121 °C für 20 min sterilisiert. Leere Kolben, Glasröhrchen, Glasspatel und Messzylinder wurden 3 h bei 180 °C im Sterilisator sterilisiert.

2.6 Photometrische Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte (OD_{578}) wurde im Photometer (Shimadzu) bei $\lambda=578$ nm vermessen. Als Leerwert diente 1 ml A. dest.

2.7 DNA-Analyse mittels Agarosegelelektrophorese

Zur Bestimmung der Größe und Reinheit der PCR-Produkte wurde eine elektrophoretische Auftrennung durchgeführt (SAMBROOK et al. 1989). Da die DNA negativ geladen ist, wandert sie in einem elektrischen Feld in Richtung der positiv geladenen Anode. Als Standard werden DNA-Fragmente mit bekannter Größe aufgetragen, die genau wie die zu untersuchende DNA im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Laufstrecke der DNA ist umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl der Basenpaare, und so wandern die kurzen DNA-Fragmente schneller, als die längeren DNA-Fragmente. Außer der Größe bestimmen noch andere Faktoren, wie die Konzentration des Agarosegels, die angelegte Spannung, die DNA-Konformation, die Basenzusammensetzung und der Puffer das Laufverhalten. In dieser Arbeit wurden 60 ml Agarosegele verwendet, die entweder 1%, 2% oder 2,5% Agarose enthielten und mit Tris-Acetat-EDTA-Puffer

hergestellt wurden. Die DNA-Proben wurden mit 5fachem Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen gegeben. Nach circa 3 Stunden bei einer Spannung von ungefähr 100 Volt wurde das Gel für eine halbe Stunde in Ethidiumbromid gefärbt und anschließend im UV-Licht bei 366 nm fotografiert. Ethidiumbromid lagert sich in die Doppelhelix ein und macht die DNA im UV-Licht sichtbar.

Lösungen:

TAE-Puffer (50fach):	121,14 g Tris
(Tris-Acetat-EDTA-Puffer)	27 ml Eisessig
pH=8,5	9,31 g Na ₂ EDTA(2H ₂ O)
	ad 500 ml mit A. dest.
Ethidiumbromid:	1 µg/ml Ethidiumbromid
Ladepuffer:	Na-Acetat 5 mM
	SDS (Natriumdodecylsulfat) 0,1 % (w/v)
	Bromphenolblau 0,05 % (w/v)
	Saccharose 25 % (w/v)

2.8 Isolierung von genomischer DNA mittels Genomic Tip 20/G-Säulen

Die Isolierung der DNA aus den Referenzstämmen wurde mit Hilfe von Genomic Tip 20/G-Säulen der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt (Handbook, 2001). Zur Lyse der Zellen wurde zum Puffer bei *S. aureus* noch Lysostaphin [5 mg/ml] zugegeben, und die Suspension solange bei 37 °C inkubiert bis die Lösung eine klare und visköse Konsistenz aufwies. Danach wurden in verschiedenen Puffern die RNA durch RNase [100 mg/ml] und die Proteine durch Proteinase K [20 mg/ml] abgebaut. Anschließend wurde der Ansatz über eine Säule gegeben, deren Membran die DNA bindet. Nach der Elution der DNA erfolgte die Präzipitation mit Isopropanol. Anschließend wurde mit Ethanol gewaschen, um verbliebenes Salz zu entfernen. Die DNA wurde in MilliQ-Wasser gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

2.9 Isolierung von genomischer DNA mittels Insta-Gene Matrix

Die Insta-Gene Matrix funktioniert ähnlich wie ein Ionenaustauscher. Die Matrix ist ein Chelatbildner mit einer hohen Affinität zu polyvalenten Metallionen. Der stark alkalische pH-Wert der Matrix und die Einwirkung von Hitze beim Kochen zerstören die Zellwand. Auf diese Weise wird die DNA aus der Zelle freigesetzt. Während des Kochvorgangs wird außerdem die enzymatische Degradation der DNA durch die Chelierung von Metallionen verhindert. Eine Trennung der DNA von Verunreinigungen (Proteinen, Zelldetritus) wird nicht vorgenommen (WALSH et al. 1991, BERNAL et al. 1997, DE LAMBALLERIE et al. 1992, SANTURDE et al. 1996).

Die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers und die gewonnene DNA wurde vermessen und bei -20 °C gelagert. Zum Versuch wurden je 20 µl für die Multiplex-PCR eingesetzt.

2.10 Vermessung der DNA

Die Vermessung der DNA erfolgte mit dem Nanodrop 1000-Gerät von Peqlab. Dazu wurden jeweils 2 µl der DNA aufgetragen, nachdem ein Leerwert mit MilliQ bestimmt wurde. Die DNA-Vermessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Die erhaltenen Konzentrationen der DNA nach Isolierung mit der Insta-Gene Matrix lagen zwischen 177 ng/µl und 706 ng/µl, der Durchschnitt lag bei ungefähr 400 ng/µl. Der Faktor 260/280 lag zwischen 2,05 und 2,25. Die Vermessung der DNA, die mit den Genomic Tips 20 isoliert wurde, ergab Konzentrationen zwischen 25 ng/µl und 70 ng/µl. Der Faktor 260/280 lag hier zwischen 1,96 und 2,26.

2.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)

1983 beschrieb Kary Mullis erstmals die PCR, die eine Methode darstellt, mit der man gezielt bestimmte DNA-Abschnitte vervielfältigen und sichtbar machen kann. Die *Taq*-Polymerase wurde in einem Kit der Firma Bioline mit 10-fachem Reaktionspuffer, der NH₄ enthält, und einer 50 mM MgCl₂-Lösung geliefert. Bei der durchgeführten Multiplex-PCR wurden mehrere Primer zum Reaktionsgemisch hinzugegeben, so dass in zwei Ansätzen die Enterotoxine SEA, SEB, SEC, SED, SEE,

SEG, SEH, SEI und SEJ nachgewiesen werden konnten. Als Kontrolle, ob die PCR erfolgreich war, diente ein Abschnitt der 16S rRNA, der in jedem untersuchten *S. aureus*-Stamm vorhanden sein muss. Die PCR-Anleitung wurde, leicht verändert, inklusive der notwendigen Primersequenzen den Veröffentlichungen von MONDAY & BOHACH (1999) und in überarbeiteter Fassung von LØVSETH et al. (2004) entnommen. Da die PCR mit ganzen Zellen keine zuverlässigen Ergebnisse zeigte, wurde die DNA mittels der Genomic Tip-Säulen oder der Insta-Gene Matrix isoliert.

Reagenz	Volumen [Konzentration]
DNA	20 µl [mindestens 160 ng/µl] (1 µl bei DNA aus Genomic Tips)
Taq-Polymerase	0,25 µl [5 U/µl]
dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	2 µl [0,2 mM]
10x-Puffer	5 µl
MgCl ₂	5 µl [4 mM]
Primer: Ansatz 1: Primer für <i>sed, see, seg, sei</i> und <i>16S rRNA</i> Ansatz 2: Primer für <i>sea, seb, sec, seh,</i> <i>sej</i> und <i>16S rRNA</i>	Enterotoxin Primer 1µl [600 nM] 16S rRNA Primer 1 µl [120 nM]: ⇒ Ansatz 1: 5 µl ⇒ Ansatz 2: 6 µl
Milli Q	Ansatz 1: 12,75 µl Ansatz 2: 11,75 µl

Wurde die DNA verwendet, die mittels der Insta-Gene Matrix isoliert worden war, musste mehr DNA eingesetzt werden, da der Reinheitsgrad geringer ist, als bei anderen DNA-Isolierungs-Methoden. Die isolierte DNA aus jedem *S. aureus*-Stamm wurde in je 2 Ansätzen mit den verschiedenen Primern und den restlichen Reagenzien versetzt, und die PCR in 0,2 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt.

Folgendes Protokoll wurde für die Amplifizierung verwendet:

- 1) 1 Zyklus: Denaturieren: 95 °C, 10 min
- 2) 20 Zyklen: Denaturieren: 95 °C, 1 min
Primer-Anlagerung: 68 °C, 45 sec
Elongation: 72 °C, 1 min
- 3) 30 Zyklen: Denaturieren: 95 °C, 1 min
Primer-Anlagerung: 62 °C, 45 sec
Elongation: 72 °C, 1 min
- 4) 1 Zyklus: Elongation: 72 °C, 10 min
- 5) 1 Zyklus: Abkühlen: 4 °C, 10 min

Die Elongationszeit wurde nach der Produktgröße bestimmt (1 min pro kb Größe) und die Primer-Anlagerungstemperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur des Primers mit der niedrigsten Temperatur.

2.12 Primer

Die Primersequenzen wurden wie durch MONDAY & BOHACH (1999), und in überarbeiteter Version nach LØVSETH et. al (2004) beschrieben, verwendet.

Primername	Enterotoxin	Sequenz	Produktgröße [bp]	Ansatz
<i>sea</i> hin <i>sea</i> rück	A	GCA GGG AAC AGC TTT AGG C GTT CTG TAG AAG TAT GAA ACA CG	521	2
<i>seb-c</i> hin <i>seb</i> rück	B	ACA TGT AAT TTT GAT ATT CGC ACT G TGC AGG CAT CAT GTC ATA CCA	667	2
<i>sec</i> hin <i>sec</i> rück	C	CTT GTA TGT ATG GAG GAA TAA CAA TGC AGG CAT CAT ATC ATA CCA	284	2
<i>sed</i> hin <i>sed</i> rück	D	GTG GTG AAA TAG ATA GGA CTG C ATA TGA AGG TGC TCT GTG G	385	1
<i>see</i> hin <i>see</i> rück	E	TAC CAA TTA ACT TGT GGA TAG AC CTC TTT GCA CCT TAC CGC	171	1
<i>seg</i> hin <i>seg</i> rück	G	CGT CTC CAC CTG TTG AAG G CCA AGT GAT TGT CTA TTG TCG	328	1
<i>seh</i> hin <i>seh</i> rück	H	CAA CTG CTG ATT TAG CTC AG GTC GAA TGA GTA ATC TCT AGG	359	2
<i>sei</i> hin <i>sei</i> rück	I	CAA CTC GAA TTT TCA ACA GGT ACC CAG GCA GTC CAT CTC CTG	466	1
<i>sej</i> hin <i>sej</i> rück	J	CAT CAG AAC TGT TGT TCC GCT AG CTG AAT TTT ACC ATC AAA GGT AC	142	2
<i>16S rRNA</i> hin <i>16SrRNA</i> rück	Kontrolle	GTA GGT GGC AAG CGT TAT CC CGC ACA TCA GCG TCA G	228	1+2

2.13 *Staphylococcus aureus* Typisierung durch Pulsfeldgelelektrophorese

Um unterschiedliche Stämme innerhalb der Art *Staphylococcus aureus* voneinander abzugrenzen wird die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) verwendet. Nachdem die genomische DNA isoliert und gereinigt war, wurde ein enzymatischer Verdau mit *Sma*I durchgeführt. *Sma*I erkennt und schneidet die Sequenz GGG↓CCC. Bei *S. aureus* entstehen so ungefähr 17 Fragmente des ca. 2800 kb großen Genoms, da der GC-Gehalt sehr gering ist. Die entstehenden Fragmente haben eine Größe von 10 bis 700 kb. In einem normalen Agarosegel wäre eine Auftrennung der Fragmente problematisch, da der Siebeffekt der Agarose Fragmente über 20 kb nicht auftrennt. Bei der PFGE wechselt die Richtung des elektrischen Feldes in einem anfangs schnellen und später langsameren Rhythmus (Pulszeit). Nach jedem Wechsel richten sich die negativ geladenen DNA-Fragmente neu im elektrischen Feld aus. Die Laufrichtung der DNA-Fragmente schließt einen Winkel von 120° ein. Die Laufgeschwindigkeit der Fragmente ist abhängig von Pulszeit, der Spannung und dem Winkel zwischen den Polen. Da die Pulszeit am Anfang sehr gering ist, wandern große Fragmente zu Beginn nicht, da nach der Ausrichtung im elektrischen Feld keine Zeit mehr für eine Bewegung entlang des Spannungsgradienten verbleibt. Kleinere Fragmente wandern schneller, die Laufstrecke verlängert sich zwar auch durch den Richtungswechsel, aber meistens sind sie auf dem Gel nicht mehr sichtbar. Die Pulszeiten werden dann kontinuierlich verlängert, so dass auch die großen Fragmente in Reihenfolge ihres Molekulargewichtes mit der Wanderung durch das Gel beginnen. Als Standard wird immer ein bekannter Stamm verwendet, in diesem Fall *S. aureus* NCTC 8325 (NOVICK 1963). Die Isolierung und der Verdau der genomischen DNA wurde nach GOERING & DUENSING (1990) durchgeführt.

Lösungen:

PIV (1l):	5 ml 2 M Tris-HCl	=> Endkonzentration:	10 mM
	200 ml 5 M NaCl	=> Endkonzentration:	1 M
	ad 1000 ml mit A. dest.	pH = 8,0; autoklavieren	
Lysisstamm- lösung (300 ml)	60 ml 5 M NaCl	=> Endkonzentration:	1 M
	60 ml 0,5 M EDTA	=> Endkonzentration:	100 mM
	(pH = 8,0)		

	900 µl 2 M Tris-HCl	=> Endkonzentration:	6 mM
	(pH = 8,0)		
	600 mg N-Lauroylsarkosin		
	ad 300 ml mit A. dest.	pH = 8,0; sterilfiltrieren	
LMP-Agarose:	60 mg in 5 ml PIV lösen		
Lysostaphin:	5 mg/ml in A. dest.		
Lysozym:	10 mg/ml in A. dest.		
RNase:	10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl		
Lysis-Lösung:	15 ml Lysis-Stammlösung		
	90 µl RNase		
	165 µl Lysozym		
	165 µl Lysostaphin		
ES-Lösung:	0,5 M EDTA II (73,1 g)		
	(pH = 9,0)		
	5 g N-Lauroylsarkosin		
	ad 500 ml mit A. dest.	pH = 9,0; sterilfiltrieren	
Proteinase K-Lösung (10x):	130 mg in 13 ml ES-Lösung auflösen		
ESP-Lösung:	1,6 ml Proteinase K-Lösung ad 16 ml mit ES-Lösung		
<i>Sma</i>I-Puffer:	Trisacetat 5,98 g	=> Endkonzentration:	33 mM
(10x, 100 ml)	Mg-Acetat 2,15 g	=> Endkonzentration:	10 mM
	K-Acetat 6,50 g	=> Endkonzentration:	66 mM
	Dithiothreitol 0,08 g	=> Endkonzentration:	0,5 mM
	Ad 100 ml mit A. dest.	pH = 7,9; autoklavieren	
<i>Sma</i>I-Verdau:	64 µl Enzym, 80 µl Puffer A von Boehringer, 720 µl Milli Q		
TE-Puffer (4l):	20 ml 2 M Tris-HCl	=> Endkonzentration:	10 mM
	8 ml 0,5 M EDTA	=> Endkonzentration:	1 mM
	(pH = 8,0)		
	ad 4 l mit A. dest.	pH = 7,5; autoklavieren	
Ladepuffer:	200 mg Na ₂ -EDTA		
(50 ml)	20 g Saccharose		
	15 mg Bromphenolblau (Merck)		
	ad 50 ml mit A. dest	.	
TBE-Puffer:	145,36 g Tris	=> Endkonzentration:	1 M

(10x, 1200 ml) 74,20 g Borsäure => Endkonzentration: 1 M
1,40 g EDTA II => Endkonzentration: 4 mM
ad 1200 ml mit A. dest. pH = 8,5; autoklavieren

Ethidiumbromid: 1 mg/ml in A. dest.

Durchführung:

Am ersten Tag wurde die Lysis durchgeführt. Nachdem der zu untersuchende Stamm üN bei 37 °C auf einer Blutplatte bebrütet worden war, wurden mehrere Kolonien in 5 ml BHI (Brain Heart Infusion)-Flüssigmedium suspendiert und ca. 3 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde 1 ml der Kultur abgeerntet (1 min, 15300 rpm, Bremse 9, 4 °C) und das Pellet mit 1 ml eiskaltem PIV gewaschen. Das Pellet wurde in ca. 700 µl PIV resuspendiert und die optische Dichte bei $\lambda = 578$ nm bestimmt. Diese wurde dann mit PIV so eingestellt, dass sie zwischen 1 und 2,5 lag. Nach Optimierung der optischen Dichte wurden 50 µl der PIV-Zellsuspension mit 50 µl aufgekochter und bei 41 °C temperierter LMP-Agarose (1,2%) vermischt und in eine Gießform gefüllt. Die Gießform wurde für 5 min bei -20 °C und dann für 20 min bei 4 °C abgekühlt. Die entstandenen Blöckchen wurden mit 1 ml Lysis-Lösung in 1,5 ml Reaktionsgefäßen üN bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Am nächsten Tag folgte dann die Deproteinisierung. Die Lysislösung wurde entfernt und autoklaviert und die Blöckchen zweimal für mindestens 30 min mit ES-Lösung gespült. Anschließend wurde 1 ml ESP-Lösung hinzu gegeben und die Blöckchen darin üN (mindestens 17 h) bei 50 °C inkubiert.

Am 3. Tag erfolgte eine Restriktase-Spaltung. Die Agarose-Blöckchen wurden dreimal in ca. 14 ml TE-Puffer jeweils 30-120 min gewaschen und anschließend 30 min bei Raumtemperatur in 1 ml *Sma*I-Puffer äquilibriert. Der Puffer wurde vollständig entfernt und zu den Blöckchen 54 µl des Enzym-Puffer-Gemischs gegeben. Der Verdau erfolgte üN bei Raumtemperatur.

Am 4. Tag erfolgte dann die eigentliche Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE). In die

Reaktionsgefäße wurden 60 µl Ladepuffer gegeben, um den Verdau zu stoppen. Das 100 ml Agarosegel (1%) wurde mit 0,5fachem TBE-Puffer hergestellt und polymerisierte mindestens für 30 min bei Raumtemperatur. Die Blöckchen wurden halbiert und in die Geltaschen gegeben. Das Verschließen der Geltaschen erfolgte mit 1 %iger Agaroselösung, die aufgekocht und bei 50 °C temperiert wurde. Nach 15 min wurde das Gel in die Kammer gelegt, in der der 0,5fache TBE-Puffer schon auf 14 °C gekühlt war. Anschließend folgte der Lauf mit folgendem Programm:

Block 1:	Pulszeit zu Beginn (initial switch time):	5 s
	Pulszeit gegen Ende (final switch time):	15 s
	Laufzeit (run time):	7 h
	Feldstärke [Spannung]:	6 V/cm [200 V]
	Winkel (included angle):	120°

Block 2:	Pulszeit zu Beginn (initial switch time):	15 s
	Pulszeit gegen Ende (final switch time):	60 s
	Laufzeit (run time):	19 h
	Feldstärke [Spannung]:	6 V/cm [200 V]
	Winkel (included angle):	120°

Nach Beendigung des PFGE-Laufes erfolgten die Färbung und die Auswertung. Nach ca. 26 h Laufzeit wurde das Gel aus der Kammer entnommen und mindestens für 30 min in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt. Anschließend wurde das Gel im UV-Imager fotografiert.

2.14 *Staphylococcus aureus* Resistenzbestimmung

In dieser Arbeit wurden die Resistenzen nach CLSI (2003/2005) und DIN 58940-4 (1989) ausgewertet. Dazu wurde jeweils 1 Kolonie des zu untersuchenden Isolates in 5 ml NaCl-Lösung gut verrieben und die 5 ml auf 3 Müller-Hinton Platten verteilt. Die überschüssige Flüssigkeit wurde abgesaugt und die Platten getrocknet. Anschließend wurden mit dem Antibiotikaplättchendispenser der Firma Oxoid die Antibiotikaplättchen auf die Platten aufgelegt und diese bei 37 °C üN bebrütet.

Die Auswahl der Antibiotika wurde entsprechend der Standardtherapien für *S. aureus* vorgenommen.

Am nächsten Tag wurden die Durchmesser der Hemmhöfe erfasst und nach der folgenden Tabelle die Resistenzen bestimmt.

Folgenden Antibiotika wurden getestet:

Antibiotikum	Ø Hemmhöfe [mm]			Dosis [µg]
	resistent	intermediär	sensibel	
Penicillin	≤ 28 ¹		≥ 29 ¹	10
Methicillin	≤ 9 ¹	10-13 ¹	≥ 14 ¹	5
Oxacillin	≤ 15 ²		≥ 16 ²	5
Cephazolin	≤ 19 ² (14 ¹)	15-17 ¹	≥ 22 ² (18 ¹)	30
Cefoxitin	≤ 20 ² (14 ¹)	15-17 ¹	≥ 26 ² (18 ¹)	30
Gentamicin	≤ 14 ² (12 ¹)	13-14 ¹	≥ 21 ² (15 ¹)	10
Netilmycin	≤ 16 ²		≥ 22 ²	10
Fusidinsäure	≤ 19 ²		≥ 20 ²	10
Erythromycin	≤ 16 ² (13 ¹)	14-22 ¹	≥ 21 ² (23 ¹)	15
Clindamycin	≤ 14 ²		≥ 17 ²	10
Doxycyclin	≤ 12 ¹	13-15 ¹	≥ 16 ¹	30
Imipenem	≤ 19 ² (13 ¹)	14-15 ¹	≥ 24 ² (16 ¹)	10
Ciprofloxacin	≤ 18 ² (15 ¹)	16-20 ¹	≥ 23 ² (21 ¹)	5
Fosfomycin	≤ 13 ²		≥ 20 ²	50

Antibiotikum	Ø Hemmhöfe [mm]			Dosis [µg]
	resistent	intermediär	sensibel	
Teicoplanin	$\leq 10^1$	11-13 ¹	$\geq 14^1$	30
Mupirocin	$\leq 9^1$			5
Linezolid			$\geq 21^1$	30
Levofloxacin	$\leq 13^1$	14-16 ¹	$\geq 17^1$	5
Vancomycin			$\geq 15^1$	

Die Resistenzwerte wurden bestimmt:

¹ nach CLSI (NCCLS) (2002/2005)

² nach DIN 58940-4 (1989)

3 Ergebnisse

3.1 Besiedlung der Patienten mit *Staphylococcus aureus*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 158 Abstriche ausgewertet. Diese stammten von 45 Patienten und 76 Angehörigen, die weitgehend aus Eltern und Geschwistern der Patienten bestanden. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 6 Jahre, 24 Patienten waren zwischen 2 und 4 Jahren alt. Insgesamt konnten von 30 Patienten 45 *S. aureus*-Isolate gewonnen werden, es konnte also nicht bei jedem Patienten ein *S. aureus* isoliert werden. 24 Isolate stammten von den Angehörigen. Folglich wurden bei 30 Patienten (67 %) mit atopischer Dermatitis *S. aureus*-Stämme nachgewiesen. Von jedem Patienten wurde ein Abstrich aus der Nase und einer von der Haut ausgewertet. Bei den Angehörigen wurden nur Abstriche aus der Nase entnommen und untersucht.

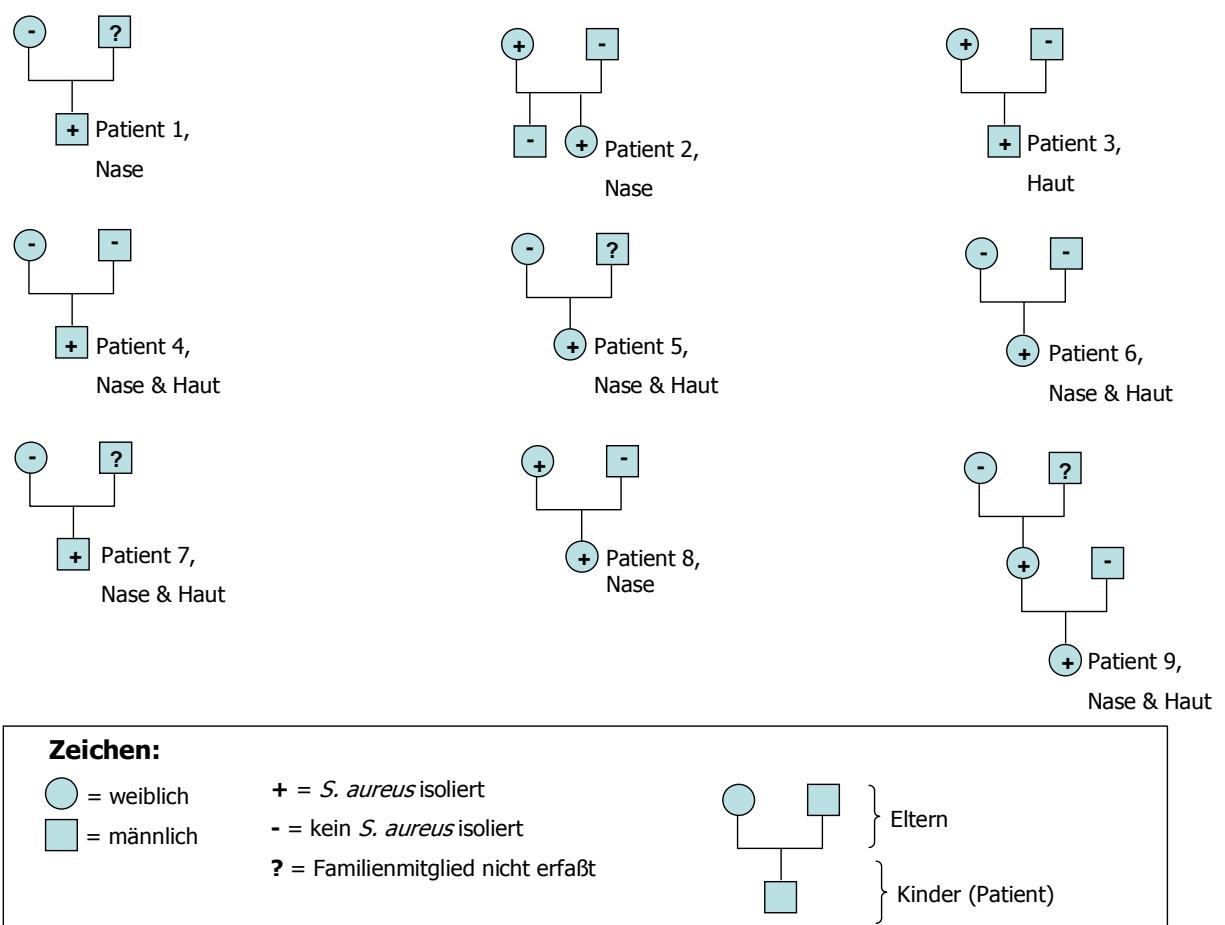
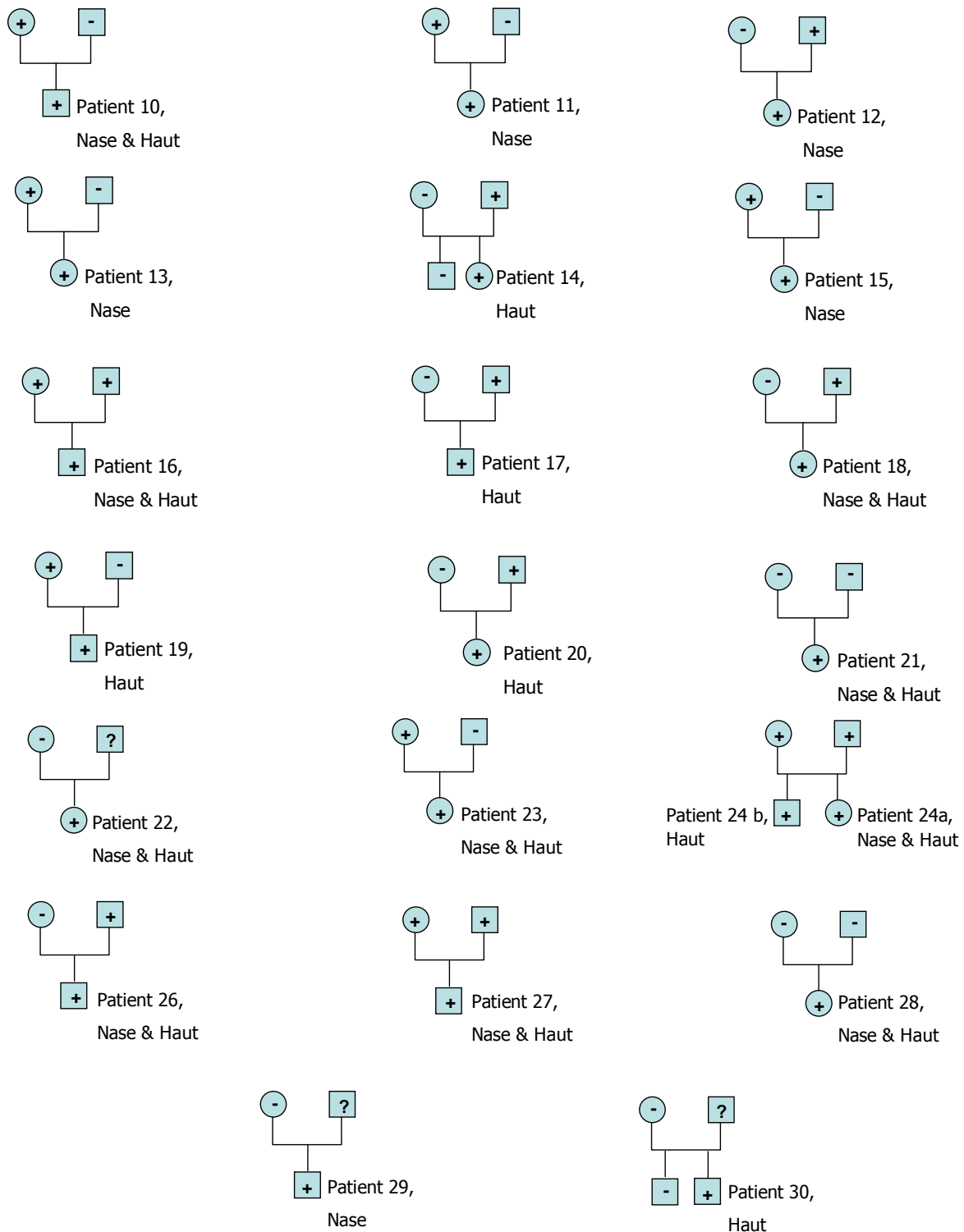
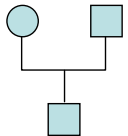


Abb. 3: Stammbäume der Patienten mit *Staphylococcus aureus*-Besiedlung, dargestellt sind die einzelnen Patienten mit den untersuchten Familienmitgliedern



Zeichen:

- = weiblich
- = männlich
- + = *S. aureus* isoliert
- = kein *S. aureus* isoliert
- ? = Familienmitglied nicht erfaßt



} Eltern

} Kinder (Patient)

Abb. 3: Stammbäume der Patienten mit *Staphylococcus aureus*-Besiedlung, dargestellt sind die einzelnen Patienten mit den untersuchten Familienmitgliedern (fortgesetzt)

Wie in Abb. 3 zu sehen, wurden die Familienangehörigen von 29 Patienten untersucht. Bei Familie 24 zeigten beide Kinder atopische Ekzeme und wurden als Patient 24a und 24b bezeichnet. Bei 6 Familien konnte kein Abstrich vom Vater erlangt werden. Bei den 23 Familien, bei denen beide Elternteile untersucht wurden, zeigte sich, dass bei 13 Familien (57 %) auch ein *S. aureus*-Stamm von der Mutter und in 9 Familien (39 %) ein Stamm von dem Vater isoliert werden konnte. Dieses Verhältnis ist in Abb. 4 dargestellt.

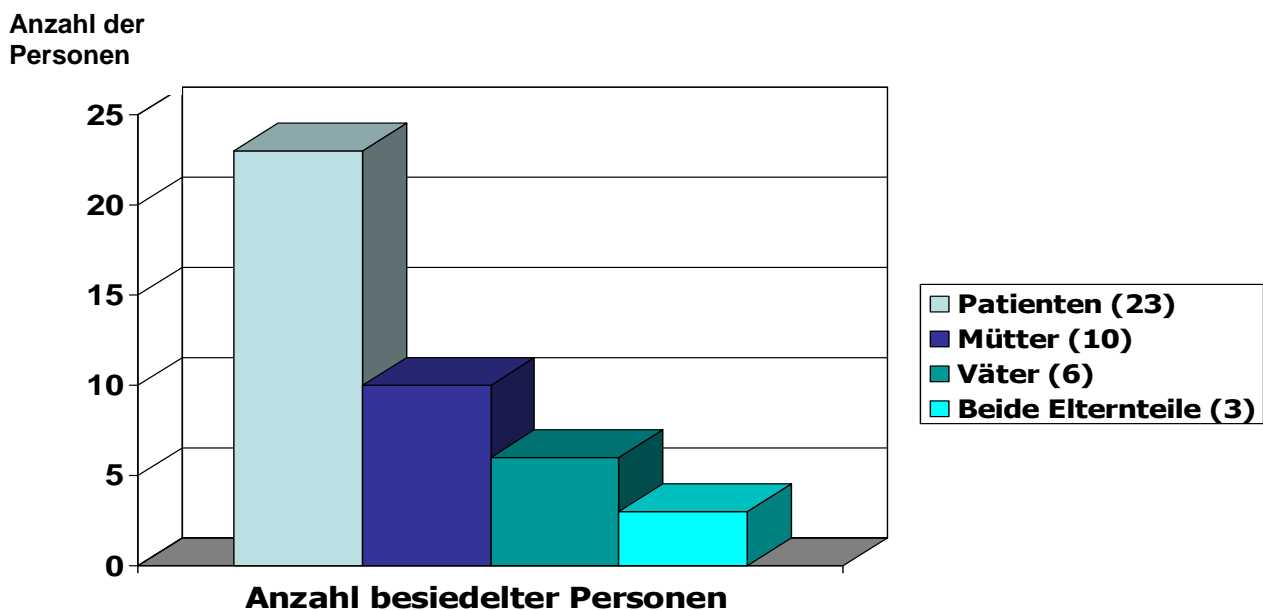
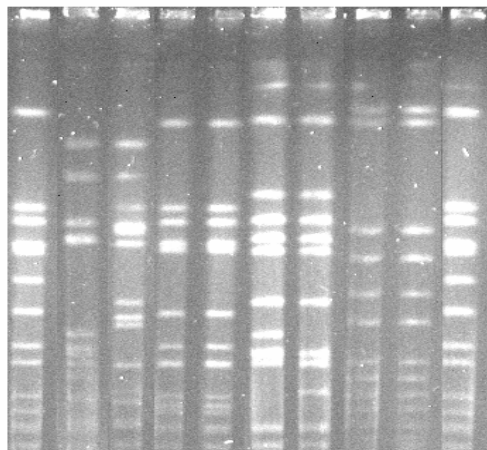


Abb. 4: Vergleich der Anzahl der mit *S. aureus* besiedelten Personen, dargestellt sind die 23 Patienten bei denen auch die Eltern untersucht wurden. In 10 Familien war nur die Mutter besiedelt, in 6 Familien nur der Vater und in 3 Familien beide Elternteile.

3.2 PFGE-Analyse der isolierten *Staphylococcus aureus*-Stämme

Die PFGE (Pulsfeldgelelektrophorese) ist eine Methode, um Bakterienisolate miteinander zu vergleichen. Besonders bei *S. aureus* und im speziellen in der MRSA- (Methicillin resistenter *S. aureus*) Diagnostik spielt sie eine wichtige Rolle, um nosokomiale Ausbrüche zu verfolgen und Infektionsketten nachzuweisen. Als Kontrolle wird meistens der Stamm *S. aureus* NCTC 8325 verwendet. Die MRSA-Stämme können dann einem bestimmten Typ zugeordnet werden. In dieser Arbeit war es das Ziel, die Isolate der verschiedenen Familienangehörigen miteinander zu vergleichen, um Träger des gleichen Stammes zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden 6 Pulsfeldgelelektrophoresen durchgeführt (Abb.5).

PFGE Nr. 1:

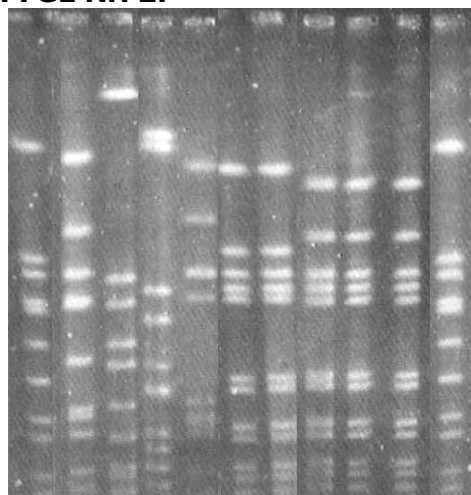


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 ≠ ≈ ≈ ≈

1+10: *S. aureus* NCTC 8325
 2 : Patient 2 »D2
 3 : Patient 2, Mutter »D3
 4 : Patient 4, Nase »D6
 5 : Patient 4, Ekzem »D6
 6 : Patient 5, Nase »D7
 7 : Patient 5, Kniekehle »D8
 8 : Patient 6, Nase »D9
 9 : Patient 6, Knie »D9

≠ verschieden
 ≈ verwandt
 } gleich

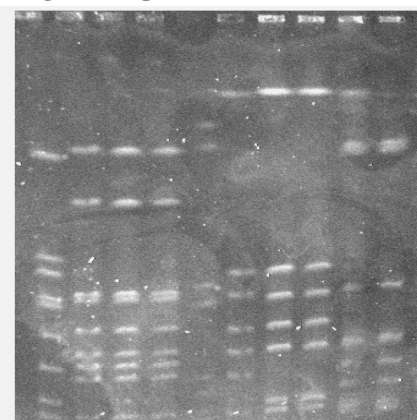
PFGE Nr. 2:



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
 ≠ ≠ ≈ ≈

1+11: *S. aureus* NCTC 8325
 2: Patient 3 »D4
 3: Patient 3, Mutter »D5
 4: Patient 7, Nase »D10
 5: Patient 7, Bein »D11
 6: Patient 8 »D12
 7: Patient 8, Mutter »D12
 8: Patient 9, Nase »D13
 9: Patient 9, Fuß »D13
 10: Patient 9, Mutter »D13

PFGE Nr. 3:

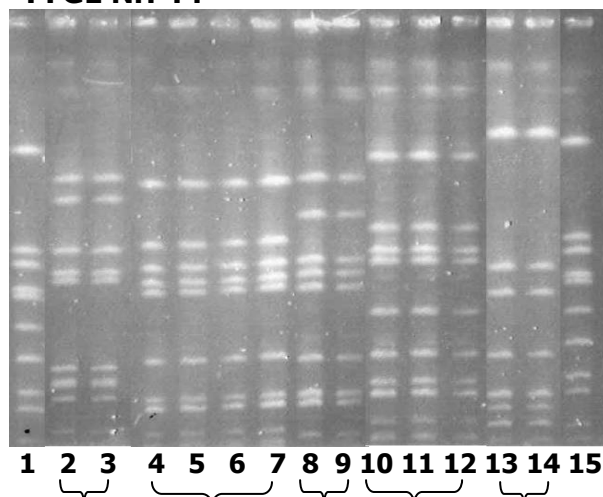


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 ≈ ≠ ≈ ≈

1: *S. aureus* NCTC 8325
 2: Patient 10, Nase »D14
 3: Patient 10, Augenlid »D14
 4: Patient 10, Mutter »D14
 5: Patient 11 »D15
 6: Patient 11, Vater »D16
 7: Patient 12 »D17
 8: Patient 12, Vater »D17
 9: Patient 13 »D18
 10: Patient 13, Mutter »D18

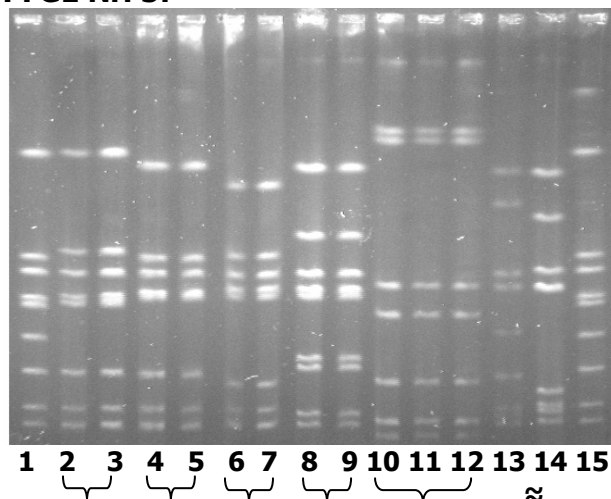
Abb. 5 : Die einzelnen durchgeführten Pulsfeldgelelektrophoresen für jedes einzelne Isolat, insgesamt zusammengefaßt auf 6 verschiedenen Gelen, sind in dieser Abbildung dargestellt.

PFGE Nr. 4 :



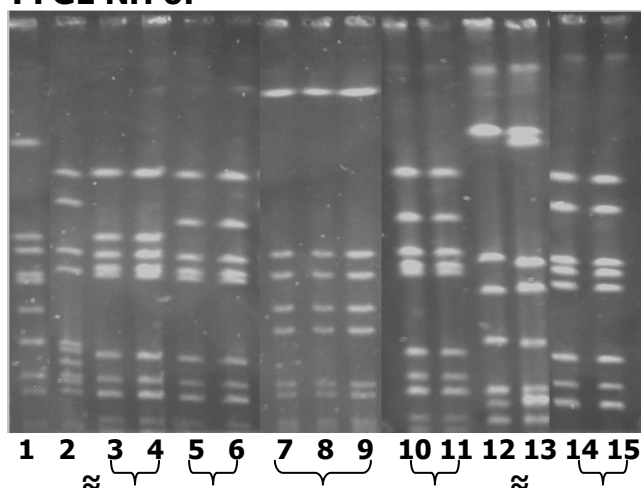
- 1+15: *S. aureus* NCTC 8325
 2: Patient 14 »D19
 3: Patient 14, Vater »D19
 4: Patient 16, Nase »D21
 5: Patient 16, Hand »D21
 6: Patient 16, Vater »D21
 7: Patient 16, Mutter »D21
 8: Patient 17 »D22
 9: Patient 17, Vater »D22
 10: Patient 18, Nase »D23
 11: Patient 18, Stirn »D23
 12: Patient 18, Vater »D23
 13: Patient 19 »D24
 14: Patient 19, Mutter »D24

PFGE Nr. 5:



- 1+15: *S. aureus* NCTC 8325
 2: Patient 15 »D20
 3: Patient 15, Mutter »D20
 4: Patient 20 »D25
 5: Patient 20, Vater »D25
 6: Patient 21, Nase »D26
 7: Patient 21, Unterarm »D26
 8: Patient 22, Nase »D27
 9: Patient 22, Fuß »D27
 10: Patient 23, Nase »D28
 11: Patient 23, Arm »D28
 12: Patient 23, Mutter »D28
 13: Patient 25, Nase »D32
 14: Patient 25, Perioral »D33

PFGE Nr. 6:



- 1: *S. aureus* NCTC 8325
 2: Patient 24, Vater »D31
 3: Patient 24b, Nase »D30
 4: Patient 24, Mutter »D30
 5: Patient 24b, Gesicht »D29
 6: Patient 24a, Hand »D29
 7: Patient 26, Vater »D34
 8: Patient 26, Nase »D34
 9: Patient 26, Hand »D34
 10: Patient 27, Mutter »D36
 11: Patient 27, Nacken »D36
 12: Patient 27, Vater »D37
 13: Patient 27, Nase »D35
 14: Patient 28, Nase »D38
 15: Patient 28, Perioral »D38

Die Stämme aus den Laufbahnen 3,4,5 und 6 sind eng verwandt, der Stamm aus Bahn 2 könnte außerdem mit Isolat 3,4 und 5 verwandt sein.

Abb. 5 : Die einzelnen durchgeführten Pulsfeldgelelektrophoresen für jedes einzelne Isolat, insgesamt zusammengefaßt auf 6 verschiedenen Gelen, sind in dieser Abbildung dargestellt (fortgesetzt).

Die folgenden Tabellen 1 und 2 zeigen die Ergebnisse der durchgeführten Pulsfeldgelelektrophoresen der 69 Isolate. Zeigten die Isolate das gleiche PFGE-Muster, wurden sie als gleicher Stamm eingeordnet und ein Name vergeben (*S. aureus* D1-D40), der in dieser Arbeit weiterhin verwendet wird. Tabelle 1 zeigt die Analyse der Isolate der verschiedenen Familienmitglieder und Tabelle 2 die Analyse von den Isolaten an verschiedenen Körperstellen.

Die Patienten 1 (Stamm *S. aureus* D1), 29 (Stamm *S. aureus* D 39) und 30 (Stamm *S. aureus* D40) sind in den Tabellen nicht erfasst, da von ihnen nur jeweils ein *S. aureus*-Isolat erhalten werden konnte.

Tab. 1: Analyse der *S. aureus*-Stämme mittels PFGE von unterschiedlichen Familienmitgliedern

Patient	Lokalisation	<i>S. aureus</i> -Isolat	Stamm-Name <i>S. aureus</i>
Patient 2	Nase	Verwandte Stämme	D2
Patient 2, Mutter	Nase		D3
Patient 3	Hand	Verschiedene Stämme	D4
Patient 3, Mutter	Nase		D5
Patient 8	Nase	Gleiche Stämme	D12
Patient 8, Mutter	Nase		
Patient 9	Nase	Gleiche Stämme	D13
	Fuß		
Patient 9, Mutter	Nase		
Patient 10	Nase	Gleiche Stämme	D14
	Augenlid		
Patient 10, Mutter	Nase		
Patient 11	Nase	Verschiedene Stämme	D15
Patient 11, Mutter	Nase		D16
Patient 12	Nase	Gleiche Stämme	D17
Patient 12, Vater	Nase		
Patient 13	Nase	Gleiche Stämme	D18
Patient 13, Mutter	Nase		
Patient 14	Hand	Gleiche Stämme	D19
Patient 14, Vater	Nase		

Patient	Lokalisation	<i>S. aureus</i> -Isolat	Stamm-Name <i>S. aureus</i>
Patient 15	Nase	Gleiche Stämme	D20
Patient 15, Mutter	Nase		
Patient 16	Nase	Gleiche Stämme	D21
	Hand		
Patient 16, Mutter	Nase		
Patient 16, Vater	Nase		
Patient 17	Wange	Gleiche Stämme	D22
Patient 17, Vater	Nase		
Patient 18	Nase	Gleiche Stämme	D23
	Stirn		
Patient 18, Vater	Nase		
Patient 19	Wange	Gleiche Stämme	D24
Patient 19, Mutter	Nase		
Patient 20	Ohr	Gleiche Stämme	D25
Patient 20, Vater	Nase		
Patient 23	Nase	Gleiche Stämme	D28
	Arm		
Patient 23, Mutter	Nase		
Patient 24a	Hand	Gleiche Stämme	D29
Patient 24b	Gesicht		
	Nase	Gleiche Stämme	D30
Patient 24, Mutter	Nase		
Patient 24, Vater	Nase	Verwandte Stämme	D31
Patient 26	Nase	Gleiche Stämme	D34
	Hand		
Patient 26, Vater	Nase		
Patient 27	Nase	Verwandter Stamm	D35
	Nacken	Gleiche Stämme	D36
Patient 27, Mutter	Nase		
Patient 27, Vater	Nase	Verwandter Stamm	D37

Neben den Abstrichen von unterschiedlichen Familienmitgliedern wurden auch die Isolate von verschiedenen Abstrichorten der Patienten miteinander verglichen. Dies ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 2: Analyse der *S. aureus*-Isolate von unterschiedlichen Abstrichorten

Patient	Lokalisation	<i>S. aureus</i> -Isolat	Stamm-Name <i>S.aureus</i>
Patient 4	Nase	Gleiche Stämme	D6
	Ekzem		
Patient 5	Nase	Verwandte Stämme	D7
	Kniekehle		D8
Patient 6	Nase	Gleiche Stämme	D9
	Knie		
Patient 7	Nase	Verschiedene Stämme	D10
	Bein		D11
Patient 9	Nase	Gleiche Stämme	D13
	Fuß		
Patient 10	Nase	Gleiche Stämme	D14
	Augenlid		
Patient 16	Nase	Gleiche Stämme	D21
	Hand		
Patient 18	Nase	Gleiche Stämme	D23
	Stirn		
Patient 21	Nase	Gleiche Stämme	D26
	Unterarm		
Patient 22	Nase	Gleiche Stämme	D27
	Fuß		
Patient 23	Nase	Gleiche Stämme	D28
	Arm		
Patient 24b	Gesicht	Verwandte Stämme	D29
	Nase		D30
Patient 25	Nase	Verwandte Stämme	D32
	Perioral		D33
Patient 26	Nase	Gleiche Stämme	D34
	Hand		
Patient 27	Nase	Verschiedene Stämme	D35
	Nacken		D36
Patient 28	Nase	Gleiche Stämme	D38
	Perioral		

Die PFGE-Ergebnisse zeigen, dass bei den 19 Familien, bei denen bei einem Elternteil ein *S. aureus*-Isolat nachgewiesen wurde, in 16 Familien (84 %) der gleiche Stamm bei einem oder zwei Elternteilen und Patient nachgewiesen werden konnte. In neun Familien konnte der Stamm der Mutter, in sechs der des Vaters und bei einer Familie der gleiche Stamm bei allen Familienmitgliedern nachgewiesen werden.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei den 16 atopischen Patienten, bei denen sowohl in der Nase als auch in den Hautläsionen ein *S. aureus*-Stamm nachgewiesen werden konnte, es sich in 11 Fällen (69 %) um den gleichen Stamm handelte.

Dieses Verhältnis wird in der folgenden Abbildung dargestellt.

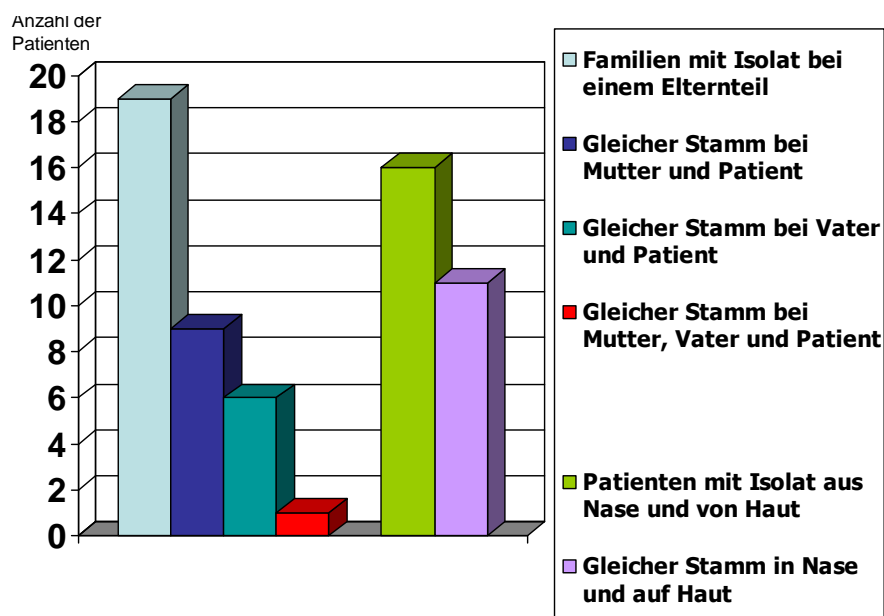


Abb 6: Verteilung der gleichen *S. aureus*-Stämme, einmal sind die Patienten dargestellt, bei deren Eltern der gleiche Stamm gefunden wurde und weiterhin sind die Patienten dargestellt, bei denen der gleiche Stamm in Nase und auf der Haut bestimmt wurden.

3.3 Resistenzen der isolierten *Staphylococcus aureus*-Stämme

69 Isolate (40 *S. aureus*-Stämmen) wurden in Bezug auf ihre Empfindlichkeit gegenüber den gängigen Antibiotika, wie unter 2.14 beschrieben, getestet. Die Isolate mit dem gleichen PFGE-Muster zeigten auch das gleiche Resistenzmuster. Es konnte kein MRSA, VRSA oder VISA detektiert werden. Ein Stamm zeigte 4 Resistenzen, nämlich gegen Penicillin, Mupirocin, Erythromycin und Fusidinsäure. Ein Stamm wies drei Resistenzen gegen Penicillin, Gentamicin und Netilmycin, auf. Die

meisten Isolate zeigten aber nur ein bis zwei Antibiotikaresistenzen gleichzeitig, meist gegenüber Penicillin.

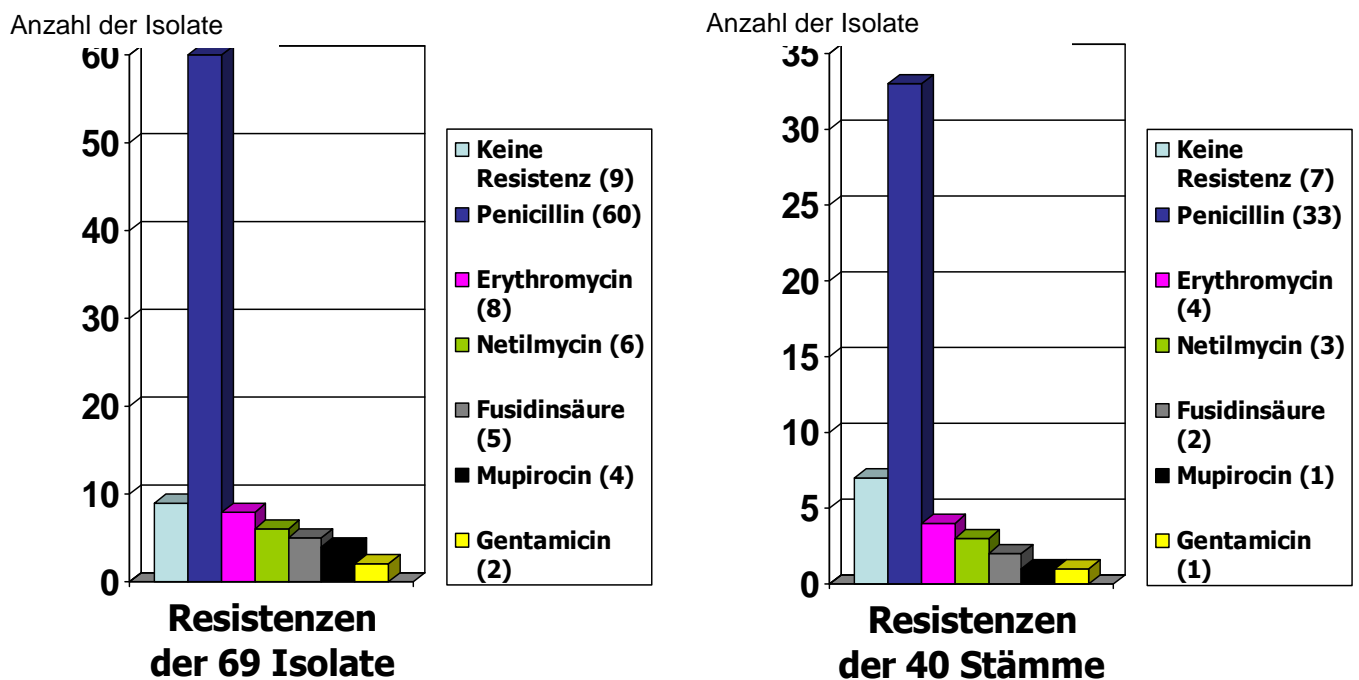


Abb. 7: Dargestellt ist die Anzahl der Resistenzen von 69 Isolaten, die 40 *S. aureus*-Stämmen entsprechen, die für Penicillin, Erythromycin, Netilmycin, Fusidinsäure, Mupirocin und Gentamicin bestimmt wurden. Alle anderen getesteten Antibiotika zeigten volle Wirksamkeit.

In Abb. 7 sind die Resistenzen einmal für die 69 Isolate und einmal für die 40 Stämme dargestellt. 7 Stämme (17,5 %), dies entsprach 9 Isolaten (13 %), waren gegenüber allen getesteten Antibiotika empfindlich. 60 Isolate (87 %) (33 Stämme (83 %)) zeigten eine Resistenz gegen Penicillin. 8 Isolate (12 %) waren nicht empfindlich gegenüber Erythromycin, 6 (9 %) Isolate gegenüber Netilmycin. Gegen die topisch verwendeten Antibiotika Fusidinsäure und Mupirocin waren 5 (7 %) und 4 (6 %) Isolate resistent. 2 Isolate (3 %) zeigten keine Empfindlichkeit gegenüber Gentamicin.

Die folgende Tabelle zeigt die Resistenzen der einzelnen Stämme und die nachgewiesenen Enterotoxingene (siehe Kapitel 3.4).

Tab. 3: Resistenzen und Enterotoxine der isolierten *S. aureus*-Stämme

Stämme <i>S. aureus</i> $\Sigma=40$	Patient	Antibiotikaresistenzen	Enterotoxine	Anzahl Isolate $\Sigma=69$
D1	1	Keine	Keine	1
D2	2	Keine	Keine	1
D3	2	Penicillin	Keine	1
D4	3	Penicillin, Fusidinsäure	Keine	1
D5	3	Penicillin	Keine	1
D6	4	Keine	D, J	2
D7	5	Penicillin	Keine	1
D8	5	Penicillin	B, I	1
D9	6	Penicillin	G	2
D10	7	Keine	I	1
D11	7	Keine	G	1
D12	8	Penicillin	A, B, C	2
D13	9	Penicillin, Netilmycin	A, G	3
D14	10	Penicillin	I	3
D15	11	Penicillin	I	1
D16	11	Penicillin	D, I	1
D17	12	Penicillin	I	2
D18	13	Penicillin	I	2
D19	14	Penicillin	Keine	2
D20	15	Penicillin, Erythromycin	B, E, H	2
D21	16	Penicillin, Mupirocin, Erythromycin, Fusidinsäure	B, G, I	4
D22	17	Penicillin	B, I	2
D23	18	Penicillin	B	3
D24	19	Penicillin	G, I	2
D25	20	Penicillin	B, H	2
D26	21	Penicillin	E	2
D27	22	Penicillin	Keine	2
D28	23	Penicillin	A, C, I	3
D29	24a/b	Penicillin	B	2
D30	24a/b	Penicillin	Keine	2
D31	24a/b	Keine	Keine	1
D32	25	Penicillin, Erythromycin	B	1
D33	25	Penicillin, Erythromycin	B, I	1
D34	26	Penicillin	B, I	3
D35	27	Penicillin	Keine	1
D36	27	Keine	I	2
D37	27	Penicillin, Netilmycin	B, I, G	1
D38	28	Penicillin, Gentamicin, Netilmycin	D, I, J	2
D39	29	Penicillin	Keine	1
D40	30	Penicillin	Keine	1

3.4 Nachweis der Gene für Enterotoxine der isolierten *Staphylococcus aureus*-Stämme

Um die Bakterien auf das Vorhandensein von Enterotoxingenen zu untersuchen, wurde eine PCR durchgeführt. Diese Multiplex-PCR wurde in zwei Reaktionsgefäßen mit unterschiedlichen Primern angesetzt. Als Kontrolle für den Erfolg der PCR diente ein Gen, das 16S rRNA codiert und in jedem *Staphylococcus aureus*-Stamm nachweisbar sein muss.

Tab 4: Nachgewiesene Enterotoxingene und deren Produktgröße

Enterotoxingene	Produktgröße [bp]	Ansatz
<i>sea</i>	521	1
<i>seb</i>	667	1
<i>sec</i>	284	1
<i>sed</i>	385	2
<i>see</i>	171	2
<i>seg</i>	328	2
<i>seh</i>	359	1
<i>sei</i>	466	2
<i>sej</i>	142	1
<i>16S rRNA</i>	228	1+2

Die PCR wurde mit den Referenzstämmen durchgeführt und die einzelnen Enterotoxingene nachgewiesen (Abb. 8, 9, 10). Außerdem sind noch exemplarisch einige Patientenproben zu sehen. Die PCR-Produkte wurden in einem 2,5 %igen Agarosegel aufgetrennt.

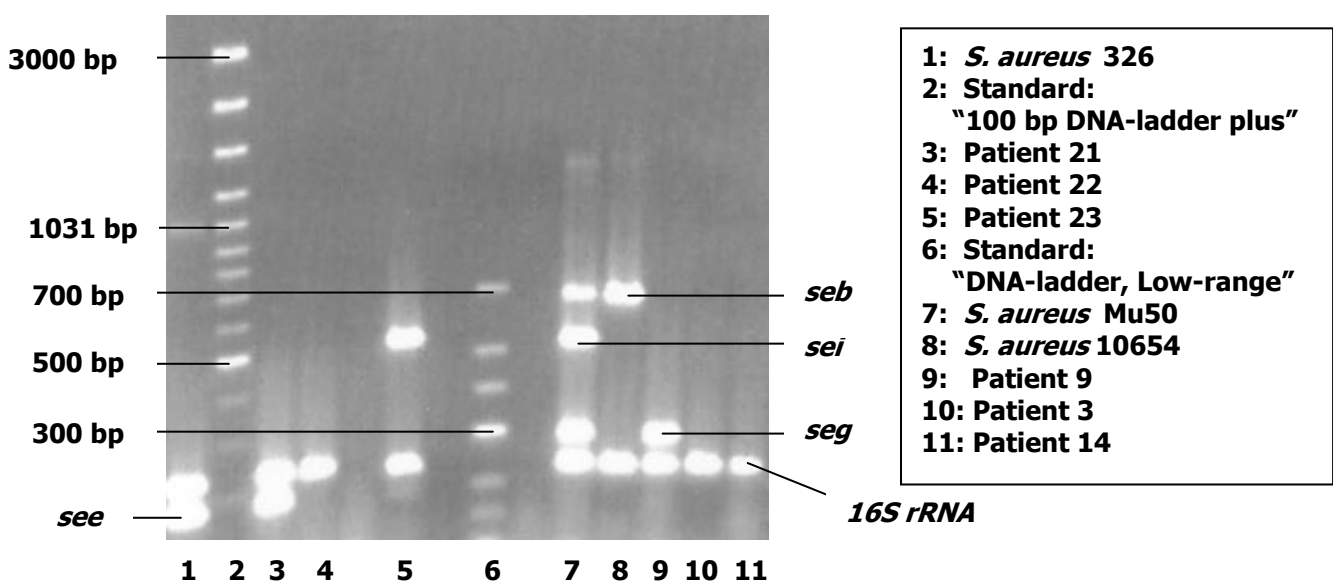


Abb. 8: Nachweis der Enterotoxingene *seb*, *see*, *seg* und *sei*, dargestellt sind exemplarisch einige Patientenproben und die Positivkontrollen für die angegebenen Gene



Abb. 9: Nachweis der Enterotoxingene *sed* und *sei*, dargestellt sind neben der Positivkontrolle noch der Standard und zwei Patienten

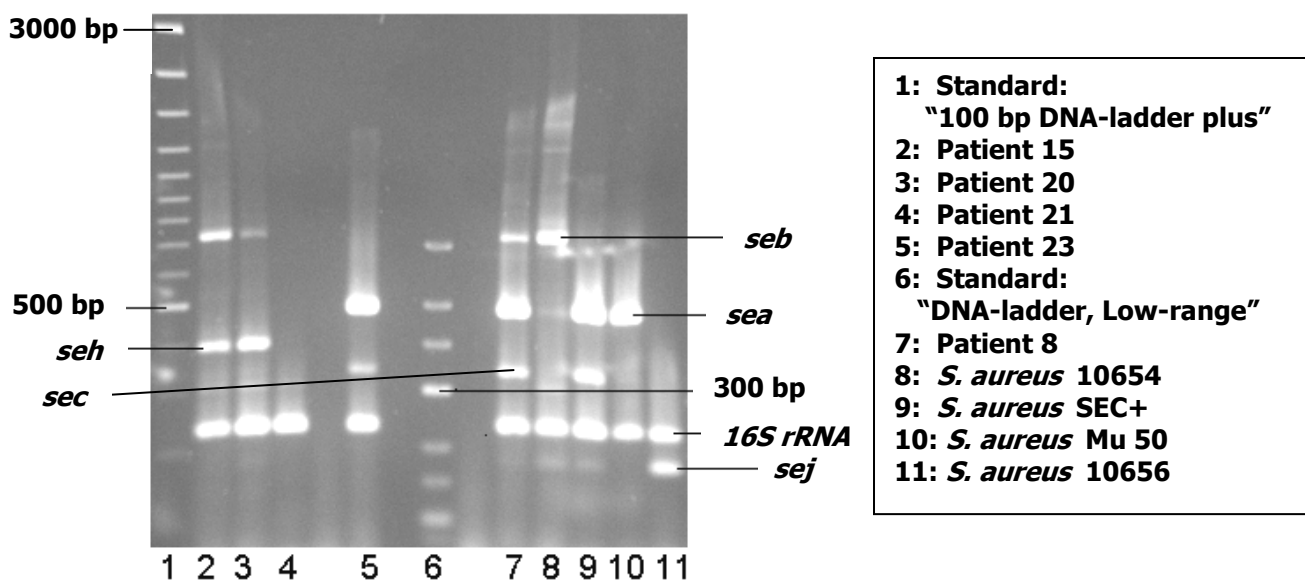


Abb. 10: Nachweis der Enterotoxingene *sea*, *seb*, *sec*, *seh* und *sej*, wiederum dargestellt sind die Positivkontrollen, zwei verschiedene DNA-Standards und exemplarisch einige Patienten.

Die 69 Isolate (40 Stämme) wurden mittels PCR auf das Vorhandensein von Enterotoxingenen untersucht. Die Toxingene der einzelnen Stämme sind in Tabelle 3 dargestellt.

Wie auch bei den Antibiotikaresistenzen wurde das Ergebnis einmal für die Isolate und einmal für die Stämme in Abb. 11 dargestellt.

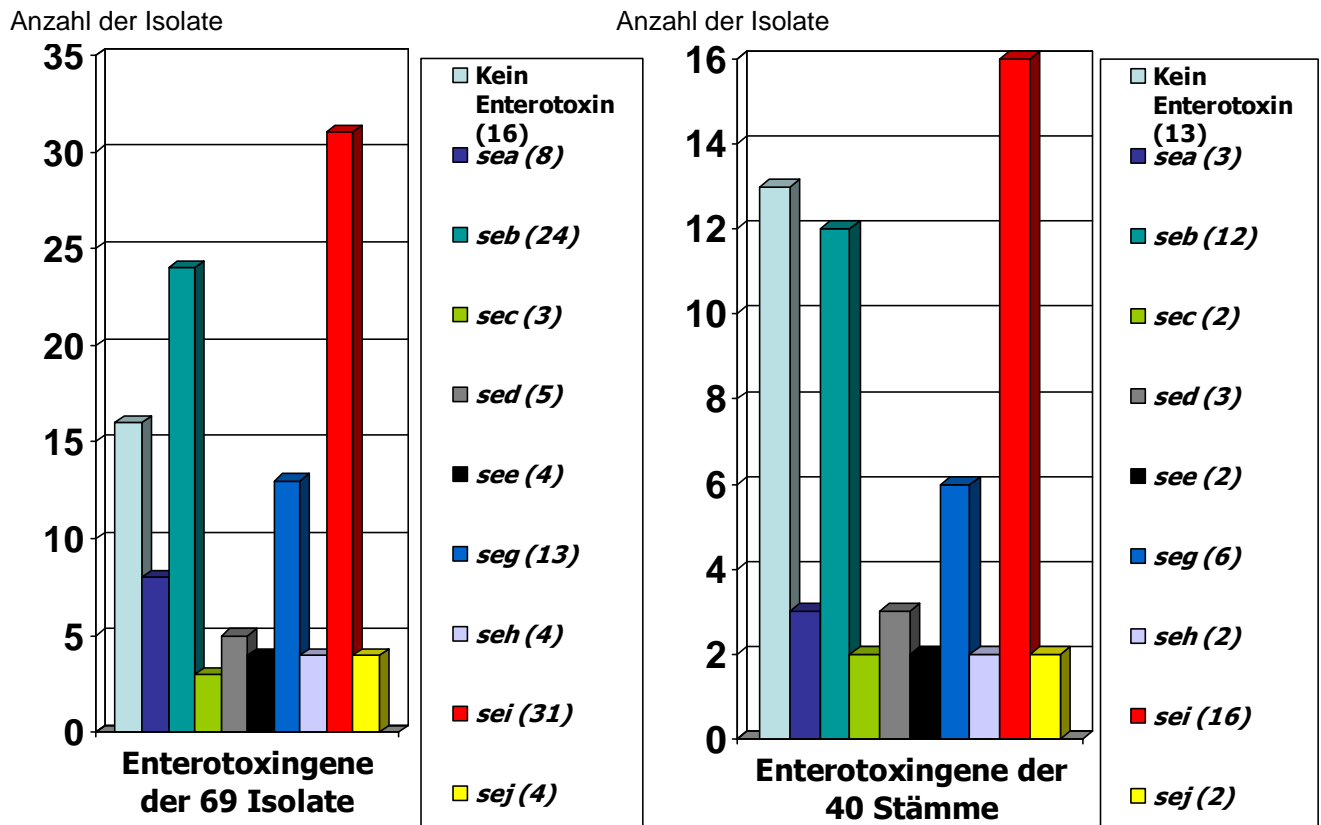


Abb. 11: Anzahl der nachgewiesenen Enterotoxingene der 69 Isolate, die 40 *S. aureus*-Stämme entsprechen. Getestet wurde das Vorhandensein der Gene *sea-sej* und die Anzahlen graphisch dargestellt.

Bei 31 Isolaten (45 %), dies entspricht 16 Stämmen (40 %) ließ sich das Gen für die Bildung von Enterotoxin I nachweisen. Weiterhin enthielten 24 Isolate (35 %) (12 Stämme (30 %)) das Gen *seb* für die Bildung von Enterotoxin B. Bei 13 Isolaten (6 Stämmen) konnte *seg* nachgewiesen werden und die restlichen Enterotoxine (*sea*, *sec*, *sed*, *see*, *seh* und *sej*) bei 3 (4 %) bis 8 Isolaten (12 %). Bei 16 Isolaten (23 %) (13 Stämmen (32 %)) ließ sich keins der untersuchten Enterotoxine nachweisen.

Bei den Stämmen mit mehreren Toxingenen ließen sich auch meistens mehrere Antibiotikaresistenzen beobachten. So konnten bei dem Stamm D21 vier Antibiotikaresistenzen, nämlich gegen Penicillin, Mupirocin, Erythromycin und Fusidinsäure, nachgewiesen werden und dieser Stamm enthielt die Gene für die Bildung von SEB, SEG und SEI. Ein weiteres Beispiel ist der Stamm D38, bei dem die Gene für die Bildung von SED, SEI und SEJ vorlagen und Resistenzen gegenüber Penicillin, Netilmycin und Gentamicin bestanden.

4 Diskussion

4.1 Besiedlung der Patienten mit *Staphylococcus aureus*

In der Literatur findet man immer wieder Angaben, dass bei Patienten mit atopischer Dermatitis in über 90 % eine Superinfektion mit *Staphylococcus aureus* zu finden ist ((CHRISTOPHERS & HENSELER, 1987; LEYDEN et al., 1974). Bei der Auswertung der Patienten in Bonn zeigte sich nur bei 67 % der Patienten eine Besiedlung mit *S. aureus*. RICCI et al. (2003) untersuchten Kinder mit atopischer Dermatitis in Bologna, Italien, und konnten eine Besiedlung in 64,2 % der Fälle nachweisen. Auch SZAKOS et al. (2004) konnten in Ungarn bei 57 % der Kinder eine Superinfektion zeigen. In Hong Kong, China ergab eine Studie bei Kindern mit atopischer Dermatitis eine Superinfektion in 58 % der Fälle (HONG et al., 2005). Diese neueren Studien konnten die Zahlen von über 90 % Superinfektionen also nicht bestätigen. GONG et al. (2006) beobachteten in einer klinischen Studie, dass die Schwere der atopischen Läsionen mit der Rate der isolierbaren *S. aureus*-Kolonien positiv korreliert. Um einen Grund für die erhöhte Besiedlungsrate mit *S. aureus* zu finden, untersuchten CHO et al. (2001) an einem murinen Modell die Bindung der Bakterien an die Haut. Diese Studie ergab, dass ein TH2-Cytokin-Milieu, wie es bei der atopischen Dermatitis zu finden ist (besonders Interleukin-4), die Bindung von *S. aureus* mit Hilfe von Fibronectin und Fibrinogen fördert.

Daher müsste die Zahl der Superinfektionen auch von der Auswahl des Patientenkollektivs abhängen und besonders hoch ausfallen, wenn sich unter den Patienten viele Kinder mit schwerwiegender Hautbeteiligung finden. In der Studie von GONG et al. (2006) wurden in 80 % der Fälle *S. aureus*-Stämme bei atopischen Patienten gefunden, und die Autoren untersuchten weiterhin die Wirksamkeit von Mupirocin in Kombination mit Hydrocortison im Vergleich zur alleinigen Anwendung von Hydrocortison bei der Behandlung der Hautläsionen.

Beide Behandlungsmethoden zeigten eine Reduktion der Kolonisation mit *S. aureus*, wobei eine Kombinationstherapie mit Antibiotikum im frühen Stadium des Hautbefalls einen größeren Benefit für die Patienten bringt. Also hängt die Rate der nachgewiesenen Superinfektionen sowohl von der Schwere der Hautläsionen, als

auch von einer eventuellen Vorbehandlung mit Steroiden und/oder Antibiotika ab. Da die Kinder mit atopischer Dermatitis heutzutage meist engmaschig dermatologisch betreut werden, liegt die Vermutung nahe, dass eine Vorbehandlung durch die Eltern stattgefunden hat, bevor die Abstriche für die unterschiedlichen Studien genommen wurden. Dies würde einen Rückgang der nachgewiesenen Superinfektionen erklären, obwohl die Inzidenz der Superinfektionen selber wahrscheinlich nicht gesunken ist, sondern nur der Zeitraum der nachweisbaren Infektion verkürzt ist.

Bei 23 untersuchten Familien der Patienten mit positivem *S. aureus*-Nachweis, von denen beide Elternteile untersucht wurden, zeigte sich in 19 Familien (83 %), dass ein *S. aureus*-Stamm min. bei einem Elternteil nachgewiesen werden konnte. Auch die Besiedlungsquote der Eltern liegt über der Norm (NOBLE, 1997), was dadurch erklärt werden kann, dass bei Kindern mit atopischer Dermatitis meist einer der Elternteile eine atopische Diathese aufweist. Bei den untersuchten Familien fand sich aber nur ein Elternteil mit noch bestehenden Hautveränderungen im Sinne einer atopischen Dermatitis. In 6 Familien konnte jedoch kein Abstrich vom Vater durchgeführt und ausgewertet werden. Die nähere Untersuchung des Verwandtheitsgrades der *S. aureus*-Isolate erfolgte dann mittels PFGE.

4.2 PFGE der isolierten *Staphylococcus aureus*-Stämme

Die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) wird benutzt, um Bakterienstämme und insbesondere *S. aureus*-Stämme miteinander zu vergleichen (TENOVER et al., 1995). Normalerweise wird dieses Verfahren z.B. beim Vergleich von MRSA-Stämmen angewendet, um bei einem nosokomialen Ausbruch eine Infektionsquelle zu identifizieren und die Verbreitung der MRSA-Stämme zu überwachen und zu verhindern. Dabei ist die PFGE der Multilocus-Sequenz-Typisierung und der *spa*-Typisierung gleichwertig (PEACOCK et al., 2002), obwohl die PFGE noch als Goldstandard gilt (VAN BELKUM, 2006).

In dieser Arbeit ging es nicht um die Identifikation der Stämme, sondern um die Frage, ob bei Familienmitgliedern von atopischen Patienten der gleiche Stamm wie bei den Patienten zu finden ist. Außerdem sollte überprüft werden, ob bei den atopischen Patienten die Isolate von Haut und Nase übereinstimmen. Bei der Analyse der Familien ergab sich, dass bei 16 von 19 Familien (84 %) der gleiche Stamm beim

Patienten und einem Elternteil nachgewiesen werden konnte. Bei einer Familie (Patient 27) konnte man erkennen, dass der Stamm von der Haut des Patienten mit dem der Mutter übereinstimmte, wohingegen in der Nase des Patienten ein anderer *S. aureus*-Stamm nachgewiesen wurde. Bei den atopischen Patienten handelte es sich in 11 von 16 Fällen (69 %) um den gleichen Stamm in der Nase und auf der Haut.

Auch wenn die Stämme der Familienmitglieder nicht übereinstimmen, so kann man dennoch eine Verwandtschaft erkennen, da sich die PFGE-Muster sehr ähnlich sehen. Dies ist der Fall bei den Patienten 2, 3, 5, 25 und bei der Familie von den Patienten 24 a und 24 b. Die PFGE-Muster zeigen nur wenige unterschiedliche Banden, so dass anzunehmen ist, dass die verschiedenen Stämme bei Familienangehörigen durch Mutationen hervorgegangen sind. Dabei ist zu sehen, dass die Stämme auf der Haut der Patienten mehr Resistenzen und Enterotoxingene aufweisen als die Stämme aus den Nasen der Patienten und den Nasen der Angehörigen. Bei Patient 3 zeigt der Stamm D4, der von der Haut isoliert wurde, eine Resistenz gegen Fusidinsäure und Penicillin, während der Stamm D5 aus der Nase der Mutter nur eine Resistenz gegen Penicillin aufweist. Bei Patient 5 konnte bei dem Stamm D7 aus der Nase kein Enterotoxigen nachgewiesen werden, jedoch beim Stamm D8, dem Isolat von der Haut, die Enterotoxingene *seb* und *sei*. Auch bei Patient 25 enthielt das Isolat von der Haut, D33, ein zusätzliches Enterotoxin, *sei*, im Vergleich zu dem Stamm D32 aus der Nase. Bei der Familie der Patienten 24 a und 24 b sieht sich das PFGE-Muster aller 5 Isolate sehr ähnlich. Die Isolate von der Haut der beiden Patienten, Stamm D29, zeigt im Vergleich zu den anderen zwei Stämmen D30 und D31, ein zusätzliches Enterotoxigen, nämlich *seb*. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Bakterienisolate von der Haut der Patienten mehr Virulenzfaktoren und Resistenzen besitzen und diese durch Mutationen entstanden sein könnten (Resistenzen) oder eventuell durch horizontalen Gentransfer akquiriert wurden (Enterotoxingene). Auf jeden Fall findet innerhalb der Familien eine Übertragung von Bakterien statt.

Da die Schwere der atopischen Läsionen mit der Anzahl der Bakterien auf der Haut korreliert, führt eine Bakterienreduktion auch zu einer Verbesserung des Hautbildes und sollte ein Behandlungsziel darstellen (GUZIK et al., 2005; GONG et al., 2006). GILANI et al. (2005) beschreiben drei Mechanismen, die zu einer Rekolonisation der Haut bei Atopikern durch *S. aureus* führen. Dazu zählen Antibiotikaresistenz, eine

Besiedlung der Nase und eine Kontamination der Behandlungsmittel. BREUER et al. (2002) untersuchten die antibakterielle Behandlung von Atopikern und deren engeren Kontakten und stellten fest, dass enge Kontaktpersonen topisch mitbehandelt werden sollten, und dass eine antibiotische Behandlung eine klare Verbesserung für den Patienten darstellt und eine Rekolonisation verzögert wird.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bei 84 % der untersuchten Patienten der gleiche Stamm gefunden wurde wie bei einem Elternteil, so dass die Bakterien aus den Nasen der Eltern definitiv eine Quelle für eine Reinfektion darstellen. Außerdem stellt auch die Nase der Atopiker eine endogene Quelle für eine Reinfektion dar, da bei 69 % der Patienten der gleiche Stamm in der Nase und auf der Haut gefunden wurde. Es wäre daher sinnvoll, bei Superinfektion der Haut auch die Nase bei positivem *S. aureus*-Nachweis topisch mit einem Antibiotikum zu sanieren. Dies sollte nicht nur bei den atopischen Patienten selbst, sondern auch bei engen Kontaktpersonen durchgeführt werden. Als topisches Antibiotikum wird meist Mupirocin verwendet (BREUER et al., 2005), wie man im folgenden Kapitel sieht, sollte aber eine Antibiotikaresistenztestung durchgeführt werden.

4.3 Resistenzen der isolierten *Staphylococcus aureus*-Stämme

Besonders *Staphylococcus aureus* ist ein Bakterium, bei dem viele Antibiotikaresistenzen beschrieben wurden und oft als „Problemkeim“ bezeichnet wird. Grund dafür sind die hohe Toleranz gegenüber Umwelteinflüssen und das Überleben auf unbelebten Gegenständen. Außerdem kann *S. aureus* zur residenten Mikroflora des Menschen gehören und stellt so ein Reservoir für Infektionen dar. Schon kurz nach der Einführung des Penicillins wurden Resistenzen bei *S. aureus* beschrieben (BARBER, 1947; NORTH & CHRISTIE, 1946). Auch Antibiotika, wie Methicillin (BARBER, 1961) und Vancomycin (HIRAMATSU et al., 1997) zeigen schon Wirkverluste bei bestimmten Stämmen. Die Entwicklung neuer Antibiotika gestaltet sich als sehr langwierig. Aus diesem Grunde ist es eine wichtige Maßnahme im Kampf gegen die Resistenzen, die Verbreitung von resistenten Stämmen zu verhindern. Da VRSA (Vancomycin Resistente *Staphylococcus aureus*) erst in wenigen Fällen isoliert wurden ((CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2002), sind diese Stämme noch nicht relevant für den täglichen Klinikbetrieb. Anders hingegen verhält

es sich mit MRSA-Stämmen (Methicillin resistenter *Staphylococcus aureus*). Die infizierten Patienten müssen in Deutschland bei einem stationären Aufenthalt isoliert werden, und diese Maßnahmen sind sehr zeit- und geldaufwendig. Da nicht nur die Zahl nosokomialer Infektionen mit MRSA (hospital acquired MRSA) zunimmt, sondern auch die Besiedlung von ambulanten Patienten (community acquired MRSA), wird oft diskutiert, ob in Deutschland eine Veränderung der MRSA-Politik, wie ein Eingangsscreening bei stationärer Aufnahme, sinnvoll wäre.

BEAM & BUCKLEY (2006) führten eine Pubmed-Recherche durch und kamen zu dem Ergebnis, dass die Prävalenz von CA-MRSA in der Bevölkerung gering ist. Allerdings ist die Zahl der Patienten mit positivem Eingangsscreening bei stationärer Aufnahme dagegen sehr hoch und diese Patienten weisen bestimmte Risikofaktoren auf. Dazu gehören Aufenthalte in Krankenhäusern und Pflegeheimen, Antibiotikatherapie, chronische Krankheiten, intravenöser Drogenabusus, enger Kontakt zu Personen mit Risikofaktoren und ambulante Behandlungen.

Deshalb lag die Vermutung nahe, dass auch Patienten, die regelmäßig eine Atopie-Sprechstunde besuchen, ein erhöhtes Risiko für eine CA-MRSA-Besiedlung aufweisen. Allerdings führten VON EIFF et al. (2006) eine Untersuchung von 1753 MRSA-Isolaten durch und fanden nur bei 1,1 % das Gen für die Bildung des Panton-Valentin Leukozidin, einem Toxingen. Da dieses Toxingen meistens bei CA-MRSA-Stämmen in Deutschland vorkommt, ist wahrscheinlich nur ca. 1 % der hier isolierten MRSA-Stämme ein CA-MRSA.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch nicht bestätigt werden, dass bei Atopikern ein erhöhtes Risiko für eine MRSA-Besiedlung vorliegt. Unter den 69 *S. aureus*-Isolaten befand sich kein MRSA und auch kein VISA oder VRSA. Bei einer Studie in China wurden 55 atopische Kinder untersucht und auch dort fand sich nur ein MRSA-Stamm unter den Isolaten (HON et al., 2005).

Im Gegenteil dazu waren die Isolate aus Bonn empfindlich gegenüber den meisten Antibiotika. 9 Isolate (13 %) wiesen gar keine Resistenzen gegenüber den getesteten 19 Substanzen auf. Die häufigste Resistenz (60 Isolate (87 %)) bestand gegen Penicillin.

In Hamburg wurde eine Studie bei Kindern mit atopischer Dermatitis durchgeführt und bei 18 % der *S. aureus*-Isolate eine Resistenz gegen Erythromycin gefunden, das als Mittel der ersten Wahl bei Kindern mit Hautbeteiligung verwendet wird

(HOEGGER, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit aus Bonn zeigten sich 8 Isolate (12 %) resistent gegenüber Erythromycin. Da die topische Therapie und besonders die Sanierung der Nasenflora mit Mupirocin oder Fusidinsäure durchgeführt werden, ist noch besonders zu erwähnen, dass sich 5 Isolate (7 %) resistent gegenüber Fusidinsäure zeigten und 4 Isolate (6 %) gegenüber Mupirocin. Weiterhin wurden bei 6 Isolaten (9 %) Resistenzen gegen Netilmycin, bei 2 Isolaten (3 %) gegen Gentamicin festgestellt. Alle anderen Antibiotika wirkten gegen alle Isolate. Obwohl diese Stämme keine besonders erhöhte Resistenzbildung gegen die gängigen Antibiotika aufweisen, wäre es aber unbedingt empfehlenswert, auch bei topischer Behandlung eine Antibiotikaresistenztestung bei ambulanten Patienten durchzuführen, um eine Reinfektion zu verhindern.

4.4 Vergleich verschiedener Methoden zur DNA-Isolierung

Nach Rücksprache mit LØVSETH et al. (2004) ist es für den Erfolg der Multiplex-PCR, die in dieser Arbeit durchgeführt wurde, unabdingbar, dass die DNA vorab isoliert wird. Da die Isolierung mittels der Genomic Tips 20 relativ aufwendig ist, wurde als alternative Methode die Insta-Gene Matrix verwendet. Diese Methode ist schnell und preisgünstig, und die PCR mit der so gewonnenen DNA zeigte den gleichen Erfolg wie die PCR mit DNA aus der Genomic Tip-Isolation. Bei der Vermessung der DNA mit dem Nanodrop 1000 zeigte sich unerwarteterweise, dass der Faktor 260/280 im gleichen Bereich lag, und dass die Konzentration der gewonnenen DNA mittels der Insta-Gene Matrix scheinbar viel höher war. Im PCR-Ansatz wurde trotzdem die 20fache Menge an Eluat eingesetzt, da der Reinheitsgrad laut Herstellerangaben bei der Genomic Tip-Methode höher ist als bei der Insta-Gene Matrix. Wahrscheinlich ist der Grund für die hohe Konzentration der DNA nach der Insta-Gene Matrix Methode darauf zurückzuführen, dass die erhaltene DNA noch viele andere Bestandteile enthält, die die Messung beeinflussen. Obwohl sich die eingesetzten Volumina stark unterschieden, erwiesen sich in Bezug auf die Multiplex-PCR beide Methoden zur Isolierung von DNA als gleichwertig.

4.5 Enterotoxingenanalyse der isolierten *Staphylococcus aureus*-Stämme

Die Produktion von Enterotoxinen von *Staphylococcus aureus*-Stämmen, die von atopischen Patienten isoliert wurden, ist schon mehrfach untersucht worden. Allerdings beschränkten sich diese Untersuchungen meist auf die Enterotoxine SEA, SEB, SEC und das TSST-1 (TOMI et al., 2005; YAGI et al., 2004). In den meisten dieser Studien wurde *seb* als häufigstes Toxingen bei Isolaten von Patienten mit atopischer Dermatitis nachgewiesen (YAGI et al., 2004). Auch in dieser Arbeit wurde bei 24 Isolaten (35 %) *seb* als zweithäufigstes Toxingen nachgewiesen.

OMOE et al. (2002) zeigten in Japan bei einer Studie von 146 Isolaten aus Lebensmittelvergiftungen, von gesunden Menschen, von Kühen mit Mastitis und aus Rohmilch, dass bei 77 % der Stämme ein Enterotoxingen (*sea-sei*) nachweisbar war. Dies entspricht den Zahlen in dieser Arbeit, da bei 77 % der Isolate ein Enterotoxingen (*sea-sei*) nachgewiesen werden konnte.

EL-HUNEIDI et al. (2006) untersuchten 100 klinische Isolate in Jordanien auf die Enterotoxingene *seg*, *seh*, *sei* und *sej* und fanden mindestens eines dieser Gene bei 39 % der Isolate. MEMPEL et al. (2003) untersuchten nur das Vorhandensein des *egc*-Genclusters bei Isolaten von Patienten mit atopischer Dermatitis und fanden dies bei 48 % der Isolate. In den in dieser Arbeit untersuchten 69 Isolaten aus Bonn fanden sich bei 43 Isolaten (62 %) eins oder mehrere der Enterotoxingene *seg*, *seh*, *sei* oder *sej*. Weiterhin gaben EL-HUNEIDI et al. (2006) an, dass bei allen *sei*-positiven Stämmen auch *seg* nachgewiesen werden konnte, und dass *seg* das häufigste nachgewiesene Enterotoxin in dieser Studie darstellte. Dies konnte in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden, da *sei* (45 % der Isolate) das häufigste Enterotoxingen darstellte und auch unabhängig von *seg*, das bei 13 Isolaten (19 %) nachgewiesen wurde, zu finden war.

Die anderen Enterotoxingene wurden nicht häufig nachgewiesen. Das Gen *sea* ließ sich bei 8 Isolaten (12 %), *sec* bei 3 Isolaten (4 %), *sed* bei 5 Isolaten (7 %), *see* bei 4 Isolaten (6 %), *seh* bei 4 Isolaten (6 %) und *sej* auch bei 4 Isolaten (6 %) zeigen. MEMPERT et al. (2003) konnten *sej* bei 7,5 %, aber *see* und *seh* bei keinem Isolat nachweisen. Bisher wurden *S. aureus*-Isolate von Patienten mit atopischer Dermatitis noch nicht explizit auf das Vorhandensein von dem Enterotoxingen *sei* untersucht. Dieses Gen scheint eine wichtige Rolle in der Pathogenese der

atopischen Dermatitis zu spielen, da gerade die Patienten mit dieser Atopie-Manifestation mit *S. aureus*-Stämmen besiedelt sind, die das Enterotoxigen *sei* besitzen. Allerdings gibt es auch noch keine Zahlen über die Häufigkeit von *sei* bei *S. aureus*-Stämmen und BLAIOTTA et al. (2006) vermuten, dass *seg* und *sei* häufiger im Genom von Staphylokokken zu finden ist, als bisweilen angenommen. Diese Autoren postulieren auch, dass *sei* und *seg* immer beide im Genom vorhanden sind und die PCR falsch negativ ausfallen kann, da die Primer für die PCR aufgrund polymorpher Bindungsstellen nicht am Enterotoxigen binden können. Dies müsste also noch weiterhin untersucht werden. Die zweithäufigste Detektion von *seb* stimmt mit den Angaben aus der Literatur überein (YAGI et al., 2004).

4.6 Die Bedeutung von *Staphylococcus aureus*-Superinfektionen für die Pathogenese der atopischen Dermatitis

Die Pathogenese der Atopie ist noch nicht geklärt. Es gibt viele Hypothesen, z. B. die Hygiene-Hypothese, bei der eine fehlende Auseinandersetzung mit Mikroorganismen in der Kindheit für die Entstehung der atopischen Diathese verantwortlich gemacht wird (BAKER, 2006). Die Theorie, dass nur in den Industrieländern die Anzahl von Atopie-Erkrankungen steigt, scheint nicht mehr aktuell zu sein, aber einig sind sich die Autoren, dass in städtischen Ballungsgebieten höhere Erkrankungsraten zu finden sind, als in ländlicher Umgebung (COOPER et al., 2006; YAZDANKBAKSH & WAHYUNI, 2005, VON HERTZEN, 2006). Infektionen durch Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten scheinen auch tatsächlich eine große Rolle zu spielen. Wurminfektionen werden oft mit Atopie in Verbindung gebracht, da sie eine TH2-gerichtete Immunantwort auslösen. YAZDANKBAKSH & WAHYUNI (2005) verglichen mehrere Studien, um den protektiven Effekt von Infektionen mit Helminthen zu untersuchen und bemerkten, dass sich die verschiedenen Ergebnisse widersprechen und noch weiter vertieft werden müssen. In Südafrika wurden Kinder aus einem verarmten Stadtviertel untersucht und die Daten deuteten auf eine erhöhte Atopie-Neigung bei Infektionen mit *Ascaris*, einem Nematoden, und ein verringertes Atopie-Risiko bei Infektionen mit *Mycobacterium tuberculosis* hin (OBIHARA et al., 2006). Weiterhin postulierten CARVALHO et al. (2006), dass bei Wurminfektionen das Stadium der Krankheit und die

Quantität des Wurmbefalls einen Einfluss auf die Stärke der negativen Regulation des Immunsystems haben und beachtet werden müssen.

Infektionen spielen auch bei der atopischen Dermatitis, die zum Formenkreis der Atopie zählt, eine wichtige Rolle. Immer wieder werden Sekundärinfektionen durch Pilze, wie *Malassezia spp.*, Viren, wie *Herpes simplex*, oder Bakterien, wie *Staphylococcus aureus* beschrieben und für die pathologische Entzündungsreaktion mit verantwortlich gemacht (LUBBE, 2003; BAKER, 2006).

Von der Wirtsseite aus zeichnet sich beim Atopiker sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem durch pathologische Reaktionsmuster aus. Die antimikrobiellen Peptide werden nur vermindert exprimiert, und vor allem T-Zellen, dendritische Zellen, Mastzellen und deren Einfluss auf Keratinozyten sind für die pathologischen Reaktionen der Haut verantwortlich (GOMBERT et al., 2005). Deshalb stellen dendritische Zellen und auch Monozyten ein mögliches Ziel für eine Immuntherapie dar (NOVAK, 2006; JOCKERS & NOVAK, 2006). Therapeutische Ansätze werden auch durch die Gabe von Probiotika (*Lactobacillus spp.*) versucht. KOLLIOMAKI et al. (2001) zeigten, dass eine perinatale Gabe bei Schwangeren und deren Kindern mit hohem Atopierisiko das Auftreten einer atopischen Dermatitis bei den Kindern um fast 50 % senkt.

Einig sind sich die Autoren, dass die Besiedlung mit *Staphylococcus aureus* eine wichtige Bedeutung, nicht nur als Sekundärinfektion, haben muss. In der Literatur findet man Angaben, dass die Exazerbation von atopischer Dermatitis mit der Bildung von Enterotoxinen von *S. aureus* zusammenhängt (YAGI et al., 2004; ZOLLNER et al., 2000). TOMI et al. (2005) zeigten, dass auch bei Psoriasis die Schwere der Hautläsionen mit einer Enterotoxinproduktion von *S. aureus* korreliert. TASKAPAN & KUMAR (2000) beschreiben 5 mögliche Wirkweisen der Enterotoxine in der Pathogenese der atopischen Dermatitis, (i) wie eine direkte Aktivierung der Antigen-präsentierenden Zellen und Keratinozyten, (ii) direkte Stimulation der T-Zell-Proliferation, (iii) Induktion von Apoptose der T-Zellen, (iv) eine Erhöhung der Zahl von CLA- (cutaneous lymphocyte antigen) positiven T-Zellen und (v) eine Rolle der Superantigene als Allergene.

DAUWALDER et al. (2006) zeigten, dass SEA eine höhere proinflammatorische Wirkung hat als SEG, und dass ein septischer Schock häufiger mit SEA-Bildnern in Verbindung steht. Allerdings konnte in dieser Arbeit aus Bonn nur bei 8 Isolaten *sea*

nachgewiesen werden. Anders verhält sich dagegen *seb*, das bei 24 Isolaten gefunden wurde. Es ist für SEB bekannt, dass es bei Mäusen eine TH2-gewichtete lokale Entzündungsreaktion der Haut hervorruft (LAOUINI et al., 2003). MANDRON et al. (2006) konnten auch für humane dendritische Zellen mit der Provokation durch SEB eine TH2-Polarisierung auslösen und nachweisen, dass SEB den TLR2- (Toll like receptor) Signalweg induziert. Bei Zellkulturen von atopischen Patienten zeigten sich die T-Zellen resistenter gegenüber SEB-induzierter Apoptose, aber die Induktion der Apoptose konnte durch die Inhibition von IL-4 verstärkt ausgelöst werden (LIN et al., 2003). KEDZIERSKA et al. (2005) bewiesen, dass die Apoptose-Induktion von T-Zellen durch SEB auch abhängig von der Kolonisation mit *S. aureus* ist. LEHMANN et al. (2004) zeigten, dass mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut nach Stimulation mit SEB vermehrt IL-5 und IL-13 bilden. Auch die Keratinozyten aus Hautläsionen von Patienten mit atopischer Dermatitis weisen ein verändertes Reaktionsmuster im Vergleich mit Keratinozyten von Kontrollpersonen oder aus unauffälliger Haut von Atopikern auf. Nach der Stimulation mit SEA, SEB und TSST-1 sezernierten die Keratinozyten größere Mengen von IL-1 α , IL-1 β und TNF- α (KIM et al., 2006). Durch die Vielfalt der Studien zum Effekt der Enterotoxine auf die unterschiedlichen Zelltypen, lässt sich erkennen, wie komplex sich die Pathogenese der atopischen Dermatitis gestaltet und dass die Enterotoxine der Staphylokokken einen großen proinflammatorischen Teil dazu beitragen.

Auch die Sensibilisierung gegenüber den Superantigenen und die Bildung von spezifischen IgE-Antikörpern ist auffällig. IDE et al. (2004) untersuchten Patienten mit atopischer Dermatitis auf spezifisches IgE gegen SEA und SEB und fanden bei 33,6 % der Patienten diese Antikörper (34 % bei BUNIKOWSKI et al., 1999). Bei Patienten mit allergischer Rhinitis wurden am häufigsten, nämlich bei 24,7 % der Patienten, IgE-Antikörper gegen TSST-1 gefunden und bei 24,2 % IgE gegen SEA und SEB. Außerdem ließen sich Antikörper gegen SEC bei 22 % und SED bei 5 % der Patienten nachweisen (ROSSI & MONASTEROLO, 2004). Antikörper gegen andere Enterotoxine wurden noch nicht untersucht, aber die Daten zeigen schon einmal, dass in den meisten Fällen eine Sensibilisierung gegen die Enterotoxine SEA, SEB, SEC und dem TSST-1 stattgefunden hat, während SED-Antikörper seltener nachgewiesen wurden. Für SEB wurde gezeigt, dass es einen starken Einfluss auf die verschiedenen Zelltypen ausübt. Da *sei* noch häufiger als *seb* in dieser Arbeit detektiert wurde,

scheint auch SEI eine wichtige Rolle bei der Exazerbation der atopischen Dermatitis zu spielen. Daher müsste die Wirkungsweise von SEI noch näher untersucht werden.

4.7 Ausblick

Die Faktoren, die zur Besiedlung mit *Staphylococcus aureus* von Patienten mit atopischer Dermatitis führen, und die Folgen dieser Besiedlung werden weiterhin Grundlage vieler Forschungsprojekte sein, da sie einen wichtigen Teil der Pathogenese der atopischen Dermatitis darstellen. Bei Folgeuntersuchungen wäre es sinnvoll, den SCORAD (Severity Scoring of Atopic Dermatitis) der Patienten zu erfassen, da eine bessere Auswertung in Bezug auf die Bakteriendichte möglich wäre.

Da die Multiplex-PCR zwar die Enterotoxingene nachweisen kann, aber nicht die Bildung der Enterotoxine, müsste die tatsächliche Bildung der Enterotoxine noch mit weiteren Tests nachgewiesen werden, die allerdings noch nicht käuflich verfügbar sind.

Weiterhin könnten die IgE-Spiegel für die spezifischen Enterotoxine, besonders für SEI gemessen werden, da derzeit nur die IgE-Spiegel für die Enterotoxine SEA, SEB, SEC und SED bestimmt werden. Auch die Wirkung von SEI auf die Cytokinproduktion, wie für SEB geschehen, wäre eine interessante Untersuchung. Da immer noch neue Enterotoxine beschrieben werden, gibt es vielleicht noch andere Toxine, die eine Rolle in der Pathogenese der atopischen Dermatitis spielen. Dazu könnten auch die „Enterotoxin-like toxins“, die keine emetischen Reaktionen in Primaten auslösen, ansonsten aber mit den Enterotoxinen strukturell verwandt sind, zählen (OMOE et al., 2005).

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Abstriche von Patienten mit atopischer Dermatitis und deren Angehörigen genommen und in Hinblick auf das Vorhandensein von *Staphylococcus aureus* ausgewertet. Die gewonnenen *S. aureus*-Isolate wurden näher charakterisiert. Mittels Pulsfeldgelelektrophorese wurden die Isolate von den einzelnen Familienmitgliedern verglichen. Außerdem wurden die Isolate auf Antibiotikaresistenzen und Enterotoxingene untersucht.

- In dieser Arbeit wurden 158 Abstriche ausgewertet. 67 % der Patienten mit atopischer Dermatitis zeigten eine Besiedlung mit *Staphylococcus aureus*.
- 69 *Staphylococcus aureus*-Isolate wurden untersucht. Die Pulsfeldgelelektrophorese ergab, dass es sich dabei um 40 *S. aureus*-Stämme handelte.
- Bei 84 % der Familien konnte der gleiche Stamm bei Patient und einem Elternteil nachgewiesen werden. Bei 69 % der Patienten stimmten der Stamm, der aus der Nase isoliert wurde, mit dem vom der Haut überein. Folglich sollte bei Behandlung die Nase des Patienten und eventuell der Angehörigen auch saniert werden.
- Es wurde kein MRSA (Methicillin resistenter *Staphylococcus aureus*), kein VISA (Vancomycin intermediär resistenter *S. aureus*) und kein VRSA (Vancomycin resistenter *S. aureus*) detektiert, obwohl der Besuch der atopischen Sprechstunde für die Patienten einen Risikofaktor für die Besiedlung mit einem MRSA-Stamm darstellt
- Die *S. aureus*-Isolate zeigten meist eine Empfindlichkeit in Hinblick auf die getesteten 19 Antibiotika. 13 % der Isolate waren gegenüber allen Substanzen empfindlich. Am häufigsten, bei 87 % der Isolate, wurde eine Resistenz gegen Penicillin festgestellt. 8 Isolate (12 %) waren nicht mehr empfindlich gegenüber Erythromycin, 5 Isolate (7 %) zeigten eine Resistenz gegen Fusidinsäure und 4 Isolate (6 %) gegen Mupirocin. 6 Isolate (9 %) zeigten keine Empfindlichkeit gegenüber Netilmycin und 2 Isolate (3 %) wiesen eine Gentamicin-Resistenz auf.

- Bei 77 % der Isolate wurde ein Gen der Enterotoxine *sea-sej* detektiert. 31 Isolate (45 %) enthielten das Gen für die Bildung von SEI. 24 Isolate (35 %) wurden positiv für *seb* und 13 Isolate (19 %) positiv für *seg* getestet. Das Gen *sea* ließ sich bei 8 Isolaten (12 %), *sec* bei 3 Isolaten (4 %), *sed* bei 5 Isolaten (7 %), *see* bei 4 Isolaten (6 %), *seh* bei 4 Isolaten (6 %) und *sej* auch bei 4 Isolaten (6 %) nachweisen.

6 Literaturverzeichnis

- Ammerlaan H S, Bonten M J.** Daptomycin: graduation day. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12 Suppl 8: 22-28.
- Bachert C, Kardorff B, Virchow C.** Allergische Erkrankungen in der Praxis. Bremen: Uni-Med Verlag, 2001.
- Baker B S.** The role of microorganisms in atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol.* 2006; **144**: 1-9.
- Baker M D, Acharya K R.** Superantigens: structure-function relationships. *Int J Med Microbiol.* 2004; **293**: 529-537.
- Barber M.** Staphylococcal infections due to penicillin resistant strains. *British Medical Journal.* 1947; **2**: 863-865.
- Barber M.** Methicillin-resistant staphylococci. *J. Clin. Pathol.* 1961; **14**: 385-393.
- Beam J W, Buckley B.** Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Prevalence and Risk Factors. *J Athl Train.* 2006; **41**: 337-340.
- Bera A, Biswas R, Herbert S, Kulauzovic E, Weidenmeier C, Peschel A, Gotz F.** Influence of wall teichoic acid on lysozyme resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2007; **189**: 280-283.
- Bergdoll M S, Crass B A, Reiser R F, Robbins R N, Davis J P.** A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet* 1981; **1**:1017-1021.
- Bernal M, Baquero-Mezence M I, Provost F, Laurent F, Martinez-Machin F, Boiron P.** A one-step *Candida albicans* DNA extraction method using "Chelex Ò 100 resin" suitable for DNA amplification (PCR). *J. Mycol. Med.* 1997; **7**: 53-54.
- Betley M J, Mekalanos J J.** Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. *J. Bacteriol.* 1987; **170**: 34-41.
- Blaiotta G, Fusco V, von Eiff C, Villani F, Becker K.** Biotyping of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* by enterotoxin gene cluster (egc) polymorphism and spa typing analyses. *Appl Environ Microbiol.* 2006; **72**: 6117-6123.
- Breuer K, Haussler S, Kapp A, Werfel T.** *Staphylococcus aureus*: colonizing features and influence of an antibacterial treatment in adults with atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2002; **147**: 55-61.
- Bunikowski R, Mielke M, Skarabis H, Herz U, Bergmann R L, Wahn U, Renz H.** Prevalence and role of serum IgE antibodies to the *Staphylococcus aureus*-derived superantigens SEA and SEB in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; **103**: 119-124.
- Carvalho E M, Bastos L S, Araujo M I.** Worms and allergy. *Parasite Immunol.* 2006; **28**: 525-534.

- Centers for Disease Control and Prevention.** *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin. United States. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 2002; **51**: 565-567.
- Centers for Disease Control and Prevention.** Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. Pennsylvania. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 2002; **51**: 902-903.
- Chang S, Sievert D M, Hageman J C, Boulton M L, Tenover F C, Downes F P, Shah S, Rudrik J T, Pupp G R, Brown W J, Cardo D, Fridkin S K; Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus Investigative Team.** Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. N Engl J Med. 2003; **348**: 1342-1347.
- Cho S H, Strickland I, Tomkinson A, Fehring A P, Gelfand E W, Leung D Y.** Preferential binding of *Staphylococcus aureus* to skin sites of Th2-mediated inflammation in a murine model. J Invest Dermatol. 2001; **116**: 658-663.
- Christophers E, Henseler T.** Contrasting disease patterns in psoriasis and atopic dermatitis. Arch Dermatol Res. 1987; **279** Suppl: S48-51.
- Cooper P J, Chico M E, Vaca M G, Rodriguez A, Alcantara-Neves N M, Genser B, de Carvalho L P, Stein R T, Cruz A A, Rodrigues L C, Barreto M L.** Risk factors for asthma and allergy associated with urban migration: background and methodology of a cross-sectional study in Afro-Ecuadorian school children in Northeastern Ecuador (Esmeraldas-SCAALA Study). BMC Pulm Med. 2006; **6**: 24.
- Cork M J, Robinson D A, Vasilopoulos Y, Ferguson A, Moustafa M, Macgowan A, Duff G W, Ward S J, Tazi-Ahni R.** New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: Gene-environment interactions. J Allergy Clin Immunol. 2006; **118**: 3-21.
- Dauwalder O, Thomas D, Ferry T, Debard A L, Badiou C, Vandenesch F, Etienne J, Lina G, Monneret G.** Comparative inflammatory properties of staphylococcal superantigenic enterotoxins SEA and SEG: implications for septic shock. J Leukoc Biol. 2006; **80**: 753-758.
- Davis J P, Chesney P J, Wand P J, and LaVenture M.** Toxic-shock syndrome: epidemiologic features, recurrence, risk factors, and prevention. N Engl J Med, 1980; **303**: 1429-1435.
- De Lamballiere X, Zandotti I C, Vignoli C, Bollet C, De Micco P.** A one-step microbial DNA extraction method using "Chelex 100" suitable for gene amplification. Res. Microbiol. 1992; **143**: 785-790.
- Dinges M M, Orwin P M, Schlievert P M.** Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev. 2000; **13**: 16-34.
- Drews T D, Temte J L, Fox B C.** Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: review of an emerging public health concern. WMJ. 2006; **105**: 52-57.
- El-Huneidi W, Bdour S, Mahasneh A.** Detection of enterotoxin genes seg, seh, sei, and sej and of a novel aroA genotype in Jordanian clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2006; **56**: 127-132.

- Engler R J, Kenner J, Leung D Y.** Smallpox vaccination: Risk considerations for patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; **110**: 357-365.
- Finan J E, Archer G L, Pucci M J, Climo M W.** Role of penicillin-binding protein 4 in expression of vancomycin resistance among clinical isolates of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; **45**: 3070-3075.
- Fritsch P.** *Dermatologie Venerologie.* Berlin: Springer, 2004.
- Gallo R L, Murakami M, Ohtake T, Zaiou M.** Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; **110**: 823-831.
- Garcia J R, Jaumann F, Schulz S, Krause A, Rodriguez-Jimenez J, Forssmann U, Adermann K, Kluver E, Vogelmeier C, Becker D, Hedrich R, Forssmann W G, Bals R.** Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res.* 2001; **306**: 257-264.
- Garrity G, Boone D R, Castenholz R W.** Klassifikation nach "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". 2001, Vorabdruck in: Madigan, Martinko und Parker, Brock Mikrobiologie, 2. Auflage, Anhang 2.
- Gastmeier P, Sohr D, Geffers C, Nassauer A, Dettenkofer M, Ruden H.** Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in German intensive care units. *Infection* 2002; **30**: 198-202.
- Geisel R, Schmitz F J, Fluit A C, Labischinski H.** Emergence, mechanism, and clinical implications of reduced glycopeptide susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001; **20**: 685-697.
- Gilani S J, Gonzalez M, Hussain I, Finlay A Y, Patel G K.** *Staphylococcus aureus* re-colonization in atopic dermatitis: beyond the skin. *Clin Exp Dermatol.* 2005; **30**: 10-13.
- Goering R V, Duensing T D.** Rapid field inversion gel electrophoresis in combination with an rRNA gene probe in the epidemiological evaluation of staphylococci. *J Clin Microbiol.* 1990 ; **28**: 426-429. Erratum in: *J Clin Microbiol* 1990; **28**: 1088.
- Gombert M, Dieu-Nosjean M C, Winterberg F, Bunemann E, Kubitza R C, Da Cunha L, Haahtela A, Lehtimaki S, Muller A, Rieker J, Meller S, Pivarcsi A, Koreck A, Fridman W H, Zentgraf H W, Pavenstadt H, Amara A, Caux C, Kemeny L, Alenius H, Lauerma A, Ruzicka T, Zlotnik A, Homey B.** CCL1-CCR8 interactions: an axis mediating the recruitment of T cells and Langerhans-type dendritic cells to sites of atopic skin inflammation. *J Immunol.* 2005; **174**: 5082-5091. Erratum in: *J Immunol.* 2005; **174**: 8219.
- Gong J Q, Lin L, Lin T, Hao F, Zeng F Q, Bi Z G, Yi D, Zhao B.** Skin colonization by *Staphylococcus aureus* in patients with eczema and atopic dermatitis and relevant combined topical therapy: a double-blind multicentre randomized controlled trial. *Br J Dermatol.* 2006; **155**: 680-687.

- Guzik T J, Bzowska M, Kasproicz A, Czerniawska-Mysik G, Wojcik K, Szmyd D, Adamek-Guzik T, Pryjma J.** Persistent skin colonization with *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis: relationship to clinical and immunological parameters. *Clin Exp Allergy*. 2005; **35**: 448-455.
- Hahn H, Falke, Kaufmann, Ullmann.** Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Berlin: Springer, 2004.
- Hanakawa Y, Stanley JR.** Mechanisms of blister formation by staphylococcal toxins. *J Biochem*. 2004; **136**: 747-750.
- Hanaki H, Kuwahara-Arai K, Boyle-Vavra S, Daum R S, Labischinski H, Hiramatsu K.** Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *J Antimicrob Chemother*. 1998; **42**: 199-209.
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder J M.** Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem*. 2001; **276**: 5707-5713.
- Hill D R, Brunner M E, Schmitz D C, Davis C C, Flood J A, Schlievert P M, Wang-Weigand S Z, Osborn T W.** In vivo assessment of human vaginal oxygen and carbon dioxide levels during and post menses. *J Appl Physiol*. 2005; **99**: 1582-1591.
- Hiramatsu K.** Vancomycin resistance in staphylococci. *Drug Resist Updat*. 1998; **1**: 135-150.
- Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover F C.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother*. 1997; **40**: 135-136.
- Hoeger P H.** Antimicrobial susceptibility of skin-colonizing *S. aureus* strains in children with atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol*. 2004; **15**: 474-477.
- Holtfreter S, Roschack K, Eichler P, Eske K, Holtfreter B, Kohler C, Engelmann S, Hecker M, Greinacher A, Broker B M.** *Staphylococcus aureus* carriers neutralize superantigens by antibodies specific for their colonizing strain: a potential explanation for their improved prognosis in severe sepsis. *J Infect Dis*. 2006; **193**: 1275-1278.
- Hon K L, Lam M C, Leung T F, Kam W Y, Li M C, Ip M, Fok T F.** Clinical features associated with nasal *Staphylococcus aureus* colonisation in Chinese children with moderate-to-severe atopic dermatitis. *Ann Acad Med Singapore*. 2005; **34**: 602-605.
- Howell M D, Wollenberg A, Gallo R L, Flaig M, Streib J E, Wong C, Pavicic T, Boguniewicz M, Leung D Y.** Cathelicidin deficiency predisposes to eczema herpeticum. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; **117**: 836-841.
- Howell M D, Boguniewicz M, Pastore S, Novak N, Bieber T, Girolomoni G, Leung D Y.** Mechanism of HBD-3 deficiency in atopic dermatitis. *Clin Immunol*. 2006; **121**: 332-338.

Howell M D, Novak N, Bieber T, Pastore S, Girolomoni G, Boguniewicz M, Streib J, Wong C, Gallo R L, Leung D Y. Interleukin-10 downregulates anti-microbial peptide expression in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2005 Oct; **125**(4):738-45. Erratum in: *J Invest Dermatol.* 2005; 125:1320.

Hussain I, Smith J. Evidence for the transmissibility of atopy: hypothesis. *Chest.* 2003; **124**: 1968-1974.

Hypponen E, Sovio U, Wjst M, Patel S, Pekkanen J, Hartikainen A L, Jarvelinb M R. Infant vitamin d supplementation and allergic conditions in adulthood: northern Finland birth cohort 1966. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; **1037**: 84-95.

Ide F, Matsubara T, Kaneko M, Ichiyama T, Mukouyama T, Furukawa S. Staphylococcal enterotoxin-specific IgE antibodies in atopic dermatitis. *Pediatr Int.* 2004; **46**: 337-341.

Janeway C A, Travers P, Walport M, Capra J D. *Immunobiology.* New York: Garland Publishing, 1999.

Jockers J J, Novak N. Different expression of adhesion molecules and tetraspanins of monocytes of patients with atopic eczema. *Allergy.* 2006; **61**: 1419-22.

Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2001; **357**: 1076-1079.

Kedzierska A, Kaszuba-Zwoinska J, Slodowska-Hajduk Z, Kapinska-Mrowiecka M, Czubak M, Thor P, Wojcik K, Pryjma J. SEB-induced T cell apoptosis in atopic patients--correlation to clinical status and skin colonization by *Staphylococcus aureus*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2005; **53**: 63-70.

Kim K H, Han J H, Chung J H, Cho K H, Eun H C. Role of staphylococcal superantigen in atopic dermatitis: influence on keratinocytes. *J Korean Med Sci.* 2006; **21**: 315-323.

Kipp F, Friedrich A, Becker K, von Eiff C. Bedrohliche Zunahme Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* Stämme: Strategien zur Kontrolle und Prävention in Deutschland. *Dtsch Arztebl* 2004; 101: A- 2045/B-1708/C-1640.

Köhler W, Eggers H J, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G. *Medizinische Mikrobiologie.* Berlin: Urban und Fischer Verlag, 2001.

Kresken M, Hafner D, Schmitz F, Wichelhaus T. Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und im Mitteleuropäischen Raum. Paul Ehrlich Gesellschaft für Chemotherapie e.V. 2003.

Laouini D, Kawamoto S, Yalcindag A, Bryce P, Mizoguchi E, Oettgen H, Geha R S. Epicutaneous sensitization with superantigen induces allergic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; **112**: 981-987.

Lehmann H S, Heaton T, Mallon D, Holt P G. Staphylococcal enterotoxin-B-mediated stimulation of interleukin-13 production as a potential aetiologic factor in eczema in infants. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004; **135**: 306-312.

- Lertertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P.** Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. J. Appl. Microbiol. 2003; **95**: 38-43.
- Leyden J J, Marples R R, Kligman A M.** Staphylococcus aureus in the lesions of atopic dermatitis. Br J Dermatol 1974; **90**: 525-530.
- Leyden J J, Kligman A M.** The case for steroid antibiotic combinations. Br J Dermatol 1977; **96**: 179-187.
- Lin Y T, Wang C T, Hsu C T, Wang L F, Shau W Y, Yang Y H, Chiang B L.** Differential susceptibility to staphylococcal superantigen (SsAg)-induced apoptosis of CD4+ T cells from atopic dermatitis patients and healthy subjects: the inhibitory effect of IL-4 on SsAg-induced apoptosis. J Immunol. 2003; **171**: 1102-1108.
- Lin Y T, Shau W Y, Wang L F, Yang Y H, Hwang Y W, Tsai M J, Tsao P N, Chiang B L.** Comparison of serum specific IgE antibodies to staphylococcal enterotoxins between atopic children with and without atopic dermatitis. Allergy. 2000; **55**: 641-646.
- Lindsay J A, Holden M T.** *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? Trends Microbiol. 2004; **12**: 378-385.
- Løvseth A, Loncarevic S, Berdal K G.** Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates. J. Clin. Microbiol. 2004; **42**: 3869-3872.
- Lubbe J.** Secondary infections in patients with atopic dermatitis. Am J Clin Dermatol. 2003; **4**: 641-654.
- Luzar M A, Coles G A, Faller B, Slingeneyer A, Dah G D, Briat C, Wone C, Knefati Y, Kessler M, Peluso F.** *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. N. Engl. J. Med. 1990; **322**: 505-509.
- Madigan M T, Martinko J M, Parker J.** Brock "Biology of Microorganisms". New York: Prentice Hall, 2000.
- Mandron M, Aries M F, Brehm R D, Tranter H S, Acharya K R, Charveron M, Davrinche C.** Human dendritic cells conditioned with Staphylococcus aureus enterotoxin B promote TH2 cell polarization. J Allergy Clin Immunol. 2006; **117**: 1141-1147.
- Marr J C, Lyon J D, Roberson J R, Lupher M, Davis W C, Bohach G A.** Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins: biological and evolutionary implications. Infect. Immun. 1993; **61**: 4254-4262.
- Maurer D M, Harrington B, Lane J M.** Smallpox vaccine: contraindications, administration, and adverse reactions. Am Fam Physician. 2003; **68**: 889-896.
- Mempel M, Lina G, Hojka M, Schnopp C, Seidl H P, Schafer T, Ring J, Vandenesch F, Abeck D.** High prevalence of superantigens associated with the *egc* locus in Staphylococcus aureus isolates from patients with atopic eczema. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2003; **22**: 306-309.
- Monday S R, Bohach G A.** Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in Staphylococcal isolates. J. Clin. Microbiol. 1999; **37**: 3411-3414.

- Morishita Y, Tada J, Sato A, Toi Y, Kanzaki H, Akiyama H, Arata J.** Possible influences of *Staphylococcus aureus* on atopic dermatitis-- the colonizing features and the effects of staphylococcal enterotoxins. *Clin Exp Allergy*. 1999; **29**:1110-1117.
- Munson S H, Tremaine M T, Betley M J, Welch R A.** Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun*. 1998; **66**: 3337-3348.
- Murray P R, Baron E J, Jorgensen J H, Pfaller M A, Tenover F C, Tenover J.** Manual of Clinical Microbiology. Washington: ASM Press, 2003.
- Noble W.** Staphylococcal carriage and skin and soft tissue infection. In: Crossely KB, Archerr GL. Microbiology. New York: Churchill Livingstone, 1997.
- Nomura I, Goleva E, Howell M D, Hamid Q A, Ong P Y, Hall C F, Darst M A, Gao B, Boguniewicz M, Travers J B, Leung D Y.** Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol*. 2003; **171**: 3262-3269.
- North E A, Christie, R.** Aquired resistance of staphylococci to the action of penicillin. *Med. J. Australia* 1946; **1**: 176-179.
- Novak N.** Targeting dendritic cells in allergen immunotherapy. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2006; **26**: 307-319.
- Novick R P.** Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. *Virology* 1963; **33**: 155-166.
- Obihara C C, Beyers N, Gie R P, Hoekstra M O, Fincham J E, Marais B J, Lombard C J, Dini L A, Kimpfen J L.** Respiratory atopic disease, Ascaris-immunoglobulin E and tuberculin testing in urban South African children. *Clin Exp Allergy*. 2006; **36**: 640-648.
- Omoe K, Imanishi K, Hu D L, Kato H, Fugane Y, Abe Y, Hamaoka S, Watanabe Y, Nakane A, Uchiyama T, Shinagawa K.** Characterization of novel staphylococcal enterotoxin-like toxin type P. *Infect Immun*. 2005; **73**: 5540-5546.
- Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu D L, Ueda S, Shinagawa K.** Detection of seg, seh, and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates Harboring seg, seh, or sei genes. *J Clin Microbiol*. 2002; **40**: 857-862.
- Ong P Y, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo R L, Leung D Y.** Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med*. 2002; **347**: 1151-1160.
- Panlilio A L, Culver D H, Gaynes R P, Banerjee S, Henderson T S, Tolson J S, Martone W J.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992; **13**: 582-586.
- Peacock S J, Justice A, Griffiths D, de Silva G D, Kantzanou M N, Crook D, Sleeman K, Day N P.** Determinants of acquisition and carriage of *Staphylococcus aureus* in infancy. *J Clin Microbiol*. 2003; **41**: 5718-5725.

- Peacock S J, de Silva G D, Justice A, Cowland A, Moore C E, Winearls C G, Day N P.** Comparison of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis as tools for typing *Staphylococcus aureus* isolates in a microepidemiological setting. J. Clin. Microbiol. 2002; **40**: 3764–3770.
- Pivarcsi A, Gombert M, Dieu-Nosjean M C, Lauerma A, Kubitza R, Meller S, Rieker J, Muller A, Da Cunha L, Haahtela A, Sonkoly E, Fridman W H, Alenius H, Kemeny L, Ruzicka T, Zlotnik A, Homey B.** CC chemokine ligand 18, an atopic dermatitis-associated and dendritic cell-derived chemokine, is regulated by staphylococcal products and allergen exposure. J Immunol. 2004; **173**: 5810-5817.
- Proctor R A.** Microbial pathogenic factors: Small Colony Variants. In: Infections with indwelling medical Devices. Edited by A. L. Bisno and F. A. Waldvogel, Washington DC: Published by American Society for Microbiology, 1994.
- Ricci G, Patrizi A, Neri I, Bendandi B, Masi M.** Frequency and clinical role of *Staphylococcus aureus* overinfection in atopic dermatitis in children. Pediatr Dermatol. 2003; **20**: 389-392.
- Rossi R E, Monasterolo G.** Prevalence of serum IgE antibodies to the *Staphylococcus aureus* enterotoxins (SAE, SEB, SEC, SED, TSST-1) in patients with persistent allergic rhinitis. Int Arch Allergy Immunol. 2004; **133**: 261-266.
- Salmenlinna S, Lyytikäinen O, Kotilainen P, Scotford R, Siren E, Vuopio-Varkila J.** Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Finland. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; **19**: 101-107.
- Salyers A, Whitt D D.** Bacterial Pathogenesis-A molecular approach. Washington: ASM Press, 1994.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T.** Molecular Cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor, 1989.
- Sandturde G, Da Silva N, Villare R, Tabarès E, Solana A, Bautista J M, Castro J M.** Rapid and high sensitivity test for the direct detection of bovine herpesvirus – 1 genome in clinical samples. Vet. Microbiol. 1996; **49**: 81-92.
- Schaaff F, Bierbaum G, Baumert N, Bartmann P, Sahl H G.** Mutations are involved in emergence of aminoglycoside-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol. 2003; **293**: 427-435.
- Schibli D J, Hunter H N, Aseyev V, Starner T D, Wiencek J M, McCray P B Jr, Tack B F, Vogel H J.** The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem. 2002; **277**: 8279-8289.
- Schindler C A, Schuhardt V T.** Lysostaphin: a new bacteriolytic agent for the staphylococcus. Proc.Natl. Acad.Ci.U.S.A. 1964; **51**: 414-421.
- Schlegel, H G.** Allgemeine Mikrobiologie. Stuttgart: Thieme Verlag, 1992.

- Schlievert P M, Shands K N, Dan B B, Schmid G P, Nishimura R D.** Identification and characterization of an exotoxin from *Staphylococcus aureus* associated with toxic-shock syndrome. J. Infect. Dis. 1981; **143**: 509-516.
- Shands K N, Schmid G P, Dan B B, Blum D, Guidotti R J, Hagrett N T, Anderson R L, Hill D L, Broome C V, Band J D, and Fraser D W.** Toxic-shock syndrome in menstruating women: association with tampon use and *Staphylococcus aureus* and clinical features in 52 cases. N Engl J Med, 1980; **303**: 1436–1442.
- Sieradzki K, Pinho M G, Tomasz A.** Inactivated pbp4 in highly glycopeptide-resistant laboratory mutants of *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem. 1999; **274**: 18942-18946.
- Su Y C, Wong A C L.** Production of staphylococcal enterotoxin H under controlled pH and aeration. Int. J. Food. Microbiol. 1998; **39**: 87–91.
- Szakos E, Lakos G, Aleksza M, Hunyadi J, Farkas M, Solyom E, Sipka S.** Relationship between skin bacterial colonization and the occurrence of allergen-specific and non-allergen-specific antibodies in sera of children with atopic eczema/dermatitis syndrome. Acta Derm Venereol. 2004; **84**: 32-36.
- Taskapan M O, Kumar P.** Role of staphylococcal superantigens in atopic dermatitis: from colonization to inflammation. Ann Allergy Asthma Immunol. 2000; **84**: 3-10.
- Tenover F C, Arbeit R D, Goering R V, Mickelsen P A, Murray B E, Persing D H, Swaminathan B.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995; **33**: 2233-2239.
- Tiemersma E W, Bronzwaer S L, Lyytikäinen O, Degener J E, Schrijnemakers P, Bruinsma N, Monen J, Witte W, Grundman H.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. Emerg Infect Dis 2004; **10**: 1627-1634.
- Tomi N S, Kränke B, Aberer E.** Staphylococcal toxins in patients with psoriasis, atopic dermatitis, and erythroderma, and in healthy control subjects. J Am Acad Dermatol. 2005; **53**: 67-72.
- Van Beijnum J, Woerdeman P A, Tulleken C A.** The current MRSA policy in the Netherlands is doing more harm than good. Ned Tijdschr Geneesk. 2006; 150: 1885.
- Van Belkum A.** Staphylococcal colonization and infection: homeostasis versus disbalance of human (innate) immunity and bacterial virulence. Curr Opin Infect Dis 2006; **19**: 339-344.
- Verhoef J, Beaujean D, Blok H, Baars A, Meyler A van d, Weersink A.** A Dutch approach to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; **18**: 461-466.
- Vesga O, Groeschel M C, Otten M F, Brar D W, Vann J M, Proctor R A.** *Staphylococcus aureus* small colony variants are induced by the endothelial cell intracellular milieu. J Inf Dis. 1996; **173**:739-742.
- V. Darányi J.** Mechanism of infection and epidemiology in staphylococci. Arch Hyg Bakteriol. 1955; **139**: 3-11.

Von Eiff C, Hasenberg F, Friedrich A W, Kipp F, Mellmann A, Anders A, Peters G, Gatermann S G, Becker K. P.142: Characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Germany. Poster at the 12th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections 2006 (ISSSI).

Von Hertzen L, Haahtela T. Disconnection of man and the soil: reason for the asthma and atopy epidemic? *J Allergy Clin Immunol.* 2006; **117**: 334-344.

Voss A, Milatovic D, Wallrauch-Schwarz C, Rosdahl V T, Braveny I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; **13**: 50-55.

Walsh P S, Metzger D A, Higuchi R. Chelex^R 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 1992; **10**: 506-513

Weidenmaier C, Kokai-Kun J F, Kristian S A, Chanturiya T, Kalbacher H, Gross M, Nicholson G, Neumeister B, Mond J J, Peschel A. Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nat Med.* 2004; **10**: 243-245.

Weinstein H J. The relationship between the nasal staphylococcal carrier state and the incidence of post-operative complications. *N. Engl J Med* 1959; **260**: 1303–1308.

Yagi S, Wakaki N, Ikeda N, Takagi Y, Uchida H, Kato Y, Minamino M. Presence of staphylococcal exfoliative toxin A in sera of patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy.* 2004; **34**: 984-993.

Yazdanbakhsh M, Wahyuni S. The role of helminth infections in protection from atopic disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2005; **5**: 386-391.

Zhang S, Iandolo J J, Stewart G C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). *FEMS Microbiol. Lett.* 1998; **168**:227–233.

Zollner T M, Wichelhaus T A, Hartung A, Von Mallinckrodt C, Wagner T O, Brade V, Kaufmann R. Colonization with superantigen-producing *Staphylococcus aureus* is associated with increased severity of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy.* 2000; **30**: 994-1000.

Zygmunt W A, Browder H P, Tavormina P A. Lytic action of lysostaphin on susceptible and resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Can. J. Microbiol.* 1967; **13**: 845-853

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. G. Bierbaum für die Überlassung des spannenden Themas, für die immer konstruktive Kritik, die Motivation, die Geduld und die Betreuung über die gesamte Dauer der Arbeit.

Herrn PD Dr. J. Wenzel danke ich für die bereitwillige Übernahme des Koreferates.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau PD Dr. N. Novak für die Diskussionsbereitschaft und bei dem Team der atopischen Sprechstunde Dr. T. Hagemann, C. Bussmann und Dr. L. Maintz.

Frau Dr. rer. nat. Andrea Jansen und Frau Dr. rer. nat. Ulrike Pag danke ich für die große Hilfs- und die stete Diskussionsbereitschaft.

Frau Marion Oedenkoven danke ich herzlich für die Benutzung und die Hilfe bei der PFGE und Antibiotikatestungen.

Bei Frau Christiane Szekat möchte ich mich sehr für die Vorarbeit an dem Thema und ständige Hilfsbereitschaft bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei der ganzen Arbeitsgruppe für die nette Atmosphäre und die berühmten nie endenden Kuchenvorräte bedanken!

Vielen Dank auch an meine Familie, die mich immer motiviert und unterstützt hat.

Und auch bei meinen Freunden möchte ich mich für die nötige Motivation und Diskussionsbereitschaft bedanken!!!