

Aus dem Institut
für Medizinische Mikrobiologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Klaus Pfeffer

Systemische Infektionen mit *Streptococcus pneumoniae*

-

Epidemiologische Auswertung und Analyse der
humoralen Immunantwort gegen
Pneumokokkenproteine

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Mukaddes Öksüz

2004

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf
gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Heinz
Koreferent: PD Dr. med. Schulze-Röbbecke

Inhaltsverzeichnis

1.0. Einleitung der Dissertation	6
1.1. Mikrobiologie der Pneumokokken.....	6
1.2. Epidemiologie der Pneumokokkenerkrankungen	8
1.3. Pneumokokkenerkrankungen	9
1.3.1. Pneumokokkenmeningitis	9
1.3.2. OPSI-Syndrom	9
1.3.3. Pneumokokkenpneumonie	10
1.3.4. Otitis media	11
1.3.5. Sinusitis	11
1.4. Virulenzfaktoren	12
1.4.1. Kapsel	12
1.4.2. Pneumolysin.....	12
1.4.3. Autolysin	13
1.4.4. PavA	13
1.4.5. PspA	14
1.4.6. IgA ₁ -Protease	14
1.4.7. Hyaluronidase	14
1.5. Therapie und Antibiotikaresistenz der Pneumokokkeninfektionen....	15
1.6. Prophylaxe der Pneumokokkeninfektionen	16
1.7. Unspezifische Bindung von Antikörpern an Oberflächenmolekülen von Bakterien	18
1.8. Fragestellung	19
2.0. Materialien und Methoden	20
2.1. Isolierung und Identifizierung der Pneumokokken aus Blut- bzw. Liquorkultur	20
2.1.1. Blutkultur	20
2.1.2. Liquorkultur	20
2.1.3. Typische kulturelle Merkmale von Pneumokokken	21
2.1.4. Optochintest	21
2.1.5. Kapseltypisierung	21

2.1.6. Lagerung der Isolate.....	22
2.2. Sammlung der Seren	22
2.3. Herstellung der Pneumokokkengesamtzelllysate für die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.....	23
2.4. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	24
2.4.1. Polyacrylamidgele.....	24
2.4.2. Gießen der Gele.....	25
2.4.3. Elektrophorese	26
2.4.4. Färbung des Gels.....	26
2.4.5. Trocknung des Gels.....	27
2.5. Westernblot	27
2.5.1. Dot-Blot	27
2.5.2. Aufbau und Durchführung des Westernblots.....	28
2.5.3. Entwicklung mit Luminol®	29
2.6. Aufstellung der verwendeten Pneumokokkenstämme	30
2.7. Aufstellung der verwendeten Antikörper	30
2.7.1. Verwendete Primärantikörper	30
2.7.2. Verwendete Sekundärantikörper	31
2.8. Verwendete Reagenzien, Lösungen und Puffer.....	31
3.0. Ergebnisse.....	33
3.1. Epidemiologische Auswertung der Patientendaten.....	33
3.2. Gesammelte Seren	40
3.3. Ergebnisse der Westernblotanalyse.....	40
4.0. Diskussion	56
4.1. Diskussion der epidemiologischen Ergebnisse.....	56
4.2. Diskussion der experimentellen Ergebnisse.....	59
5.0. Anhang	64
5.1. Tabelle 1: Serotyp des Kapselpolysaccharids der gesammelten Pneumokokkenstämme.....	64
5.2. Tabelle 2: Gesammelte Seren	65
6.0. Literaturverzeichnis	66
7.0. Danksagung.....	75

8.0. Lebenslauf.....	76
9.0. Zusammenfassung.....	77

1.0. Einleitung der Dissertation

1.1. Mikrobiologie der Pneumokokken

Streptococcus pneumoniae (Pneumokokken) sind grampositive, ovale bis lanzettförmige Diplokokken, die meist paarförmig angeordnet sind. Jeweils ein Pärchen wird von einer Polysaccharidkapsel umgeben.

Die Bakterienkultur erfolgt auf Blutagar, wo Pneumokokken als glatte, oft schleimige Kolonien mit einer zentralen Eindellung wachsen. Das Wachstums- und Temperaturoptimum liegt bei 37°C. 5-10%ige CO₂-Atmosphäre bzw. anaerobe Bedingungen begünstigen das Wachstum (fakultativer Anaerobier). Pneumokokken zeigen auf Blutagar eine α-Hämolyse. Als differenzierendes Kriterium zur Abgrenzung von anderen α-hämolisierenden Streptokokken besteht eine Empfindlichkeit gegen Optochin.

Pneumokokken haben einen Durchmesser von 1,2-1,8 µm. Die Zellwand ist, je nach Stamm, 16-25 nm dick und besteht, wie die Zellwand der meisten grampositiven Bakterien, aus Peptidoglykanen. An diese Peptidoglykanschicht ist Phosphorylcholin gebunden, das mit Teichonsäure verbunden ist. Dieses Phosphorylcholin fungiert als Andockstelle für eine Reihe weiterer Oberflächenproteine. Die Teichonsäuren sind wiederum mit dem sogenannten C-Polysaccharid verknüpft, welches die Peptidoglykanschicht der Zellwand durchdringt und an der Innen- und Außenseite der Zellwand nachweisbar ist (C-Antigen). Pneumokokken besitzen des Weiteren ein sogenanntes F-Antigen, die Lipoteichonsäuren.

Pneumokokken werden durch eine unterschiedlich dicke Kapsel aus Polysacchariden umgeben.

Aufgrund der verschiedenen Antigenität der Kapsel können heute über 90 verschiedene Serotypen unterschieden werden. Die Kapsel ist in besonderem Maße für die Pathogenität verantwortlich: sie behindert die Phagozytose des Keimes. Unbekapselte Stämme besitzen eine geringe Virulenz und werden aus klinisch relevanten Materialien nur selten isoliert.

Neben der Kapsel besitzt der Pneumokokkus eine Reihe weiterer wichtiger Virulenzfaktoren, von denen dem Pneumolysin, Autolysin, PavA PspA, SpsA (CbpA), den Neuraminidasen und der Hyaluronidase in der Vergangenheit besondere Bedeutung beigemessen wurde.

Seit seiner Identifizierung 1881 durch Pasteur und Sternberg ist der Pneumokokkus ein Hauptpathogen für den Menschen geblieben. Pneumokokken treten als Erreger der akuten bakteriellen Meningitis, Sepsis, Lobärpneumonie, akuter und chronischer Bronchitis, Sinusitis, Otitis media, Ulcus corneae serpens, Mastoiditis und Peritonitis auf. Die Pneumokokkeninfektion erfolgt primär über Tröpfcheninfektion. Bis zu 70% aller Menschen sind zeitweise asymptomatische Träger virulenter Pneumokokken. Jedoch ist nicht geklärt warum es bei manchen Menschen nicht zur Trägerschaft kommt.

Der Sitz des Pneumokokkus bei gesunden Trägern ist im oberen Respirationstrakt. Der Mechanismus wie es von der nasopharyngealen Pneumokokkenkolonisation zur invasiven Infektion kommt, ist nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt und verstanden. Nach lang andauernden Besiedlungsepisoden kommt es selten zur Invasion. Meist sind die invasiven Serotypen erst kürzlich erworben.^{1,2} Dies legt die Überlegung nahe, dass der Immunstatus zum Zeitpunkt der Kolonisation sowie die Virulenz des Stammes entscheidend sind darüber, ob es nur zur asymptomatischen Trägerschaft im Nasen-Rachenraum kommt oder zur einer invasiven Erkrankung. Des Weiteren ist bekannt, dass gewisse klimatische Bedingungen, insbesondere geringe Luftfeuchtigkeit, eine Infektion begünstigen. Prädisponierend sind ebenfalls virale Atemwegsinfektionen sowie Rauchen für die Invasion der Pneumokokken.

Pneumokokken sind penicillinempfindliche Bakterien. Jedoch stellt die weltweit zunehmende Penicillin- und Makrolidresistenz ein ernsthaftes Problem dar. Zur Prophylaxe invasiver Pneumokokkeninfektionen steht

seit 1977 Pneumokokkenvakzine zur Verfügung. Die zuerst eingeführte Vakzine, die die Kapselpolysaccharide von 14 verschiedenen Serotypen enthielt, wurde 1983 von der 23-valenten Vakzine abgelöst. Seit Mai 2001 ist in Deutschland auch eine 7-valente Konjugatvakzine zugelassen.

1.2. Epidemiologie der Pneumokokkenerkrankungen

Insbesondere Kinder unter 2 Jahren und Menschen jenseits des 65. Lebensjahres sind gefährdet, eine Pneumokokkeninfektion zu erleiden. Des Weiteren gibt es eine Reihe von Erkrankungen die eine gewisse Prädisposition für eine Pneumokokkeninfektion schaffen. Neben Erkrankungen die direkt mit einer Störung des Immunsystems einhergehen wie AIDS, Morbus Hodgkin, Multiples Myelom, systemischem Lupus erythematodes u.a., sind Menschen mit metabolischen Störungen wie Diabetes mellitus oder alkoholtoxische Leberzirrhose ebenfalls prädisponiert an einer Infektion zu erkranken.³ Bei Patienten mit Sichelzellanämie, insbesondere bei Kindern, stellt die Pneumokokkenbakteriämie eine sehr ernsthafte Bedrohung dar. Trotz intensivster Forschung auf diesem Gebiet ist der immunpathologische Mechanismus, der dieses erheblich erhöhte Risiko bedingt, nicht völlig geklärt. Dysfunktionale IgG- und IgM-Antikörperantwort, das Fehlen bzw. die Mangelhaftigkeit der Milzfunktion und Defekte im alternativen Komplementfixationsweg sowie opsonophagozytäre Dysfunktionen dürften eine große Rolle spielen.^{13, 41} Sjögren Syndrom und nephrotisches Syndrom bedingen ebenfalls eine erhöhte Anfälligkeit. Bei Erwachsenen sind chronisch obstruktive Atemwegserkrankungen die häufigste Ursache für eine Pneumokokkeninfektion der Atemwege.³ Weiterhin sind Patienten nach Knochenmarkstransplantationen und hämodialysierte Patienten betroffen. Eine besondere Gruppe stellen Patienten mit Hypo- oder Asplenismus unterschiedlicher Genese dar. Bei diesen Patienten kann es zu einer Sepsis mit besonders foudroyantem Verlauf und hoher Letalität kommen (OPSI-Syndrom).^{11, 17, 42}

Bezüglich der Verteilung und Häufigkeit der Serotypen gibt es Unterschiede zwischen entwickelten Ländern und Ländern der Dritten

Welt. Während eine Pneumonie bei Kindern in den entwickelten Ländern mit abnehmender Häufigkeit durch die Serotypen 14, 6, 19, 18, 9, 23, 7, 4, 1, und 15 verursacht wird, findet man in Entwicklungsländern folgende Reihenfolge der Häufigkeit der Serotypen: 6, 14, 8, 5, 1, 19, 9, 23, 18, 15, und 7.^{6, 7, 24, 41}

Bei Erwachsenen in Europa führten am ehesten folgende Serotypen zu einer Bakteriämie bzw. Meningitis: 3, 1, 14, 7, 4, 6, 8, 23, 9, und 19.^{8, 24} Pneumokokkeninfektionen zeigen eine saisonale Verteilung: Die Morbidität steigt im Frühjahr und ist besonders niedrig im September.^{12, 16}

1.3. Pneumokokkenerkrankungen

1.3.1. Pneumokokkenmeningitis

Streptokokkus pneumoniae ist der häufigste Erreger der akuten bakteriellen Meningitis bei Kindern. Seit dem Einsatz der *Haemophilus influenzae* Typ B -Impfung tritt *H. influenzae* als Erreger der bakteriellen Meningitis kaum mehr auf.³³ Meningokokken-Meningitiden häufen sich bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen. In Deutschland erkranken jährlich durchschnittlich 200 Kinder unter 16 Jahren an einer akuten Pneumokokkenmeningitis.³⁴ Trotz Verbesserung der antibiotischen und supportiven Therapie ist die Pneumokokkenmeningitis bei Kindern weiterhin assoziiert mit einer hohen Mortalität (zwischen 4-17%).⁴

Bei älteren Erwachsenen ist die Mortalität der Pneumokokkenmeningitis wesentlich höher als bei Kindern. In der Gruppe über 70 Jahren wird die Rate mit über 50% angegeben. Bei Kindern werden neurologische Folgeschäden wie Hörschäden, Hydrozephalusbildung, Krampfanfälle und geistige Retardierung bei 29-56 % beobachtet, wobei Hörschäden mit 19-51% am häufigsten festzustellen sind.⁴ Bei Erwachsenen beträgt der Anteil mit neurologischen Folgeschäden in manchen Studien bis zu 72 %.⁵

1.3.2. OPSI-Syndrom

Overwhelming postsplenectomy infection (OPSI) nennt man die bei Asplenie oder Hyposplenie unterschiedlicher Genese auftretende,

foudroyant verlaufende bakterielle Infektion und Sepsis durch bekapselte Bakterien. Der häufigste Erreger ist der Pneumokokkus, an zweiter Stelle findet man *Haemophilus influenzae*. Das höchste Risikopotential haben funktionell oder anatomisch asplenische oder hyposplenische Säuglinge und Kleinkinder, jedoch auch Erwachsene dieser Gruppe haben ein wesentlich höheres Risiko an einer derartigen Infektion zu erkranken.¹¹ Entscheidend für das Risiko ein OPSI-Syndrom zu entwickeln ist ebenfalls die Grunderkrankung, die zur Asplenie führte. Akzidentiell Splenektomierte (z.B. im Rahmen einer Gastrektomie) haben ein geringeres Risiko als Splenektomierte mit entsprechender Vorerkrankung (z.B. idiopathischer Thrombozytopenia purpura, hereditärer Sphärozytose, Thalassämie). Dennoch ist dieses Risiko immer noch 35fach höher als in der normalen Population.¹¹ Wenn es zu einem OPSI-Syndrom kommt, ist der Verlauf unabhängig von der Ursache der Asplenie und die Letalität beträgt durchschnittlich 50%.¹⁷ Der Pathomechanismus des OPSI-Syndroms ist nicht richtig verstanden. Möglicherweise sind der Verlust der Phagozytosefunktion der Milz, Erniedrigung des Serum IgM-Levels, eine mögliche Unterdrückung der lymphozytären Reaktionsfähigkeit und Veränderungen des Komplementsystems u.a. verantwortlich für das Entstehen des OPSI.^{17, 42}

1.3.3. Pneumokokkenpneumonie

Bei den ambulant erworbenen bakteriellen Pneumonien steht der Pneumokokkus als Erreger an erster Stelle. Jährlich werden in Deutschland annähernd 150.000 Pneumokokkenpneumoniefälle registriert, 63.000 – 105.000 dieser Patienten müssen hospitalisiert werden.³⁴ Typischerweise kommt es bei der Infektion zur Lobärpneumonie, jedoch können Pneumokokken auch Bronchopneumonien hervorrufen. Typisch für die durch Pneumokokken hervorgerufene Lobärpneumonie ist der plötzliche Beginn, meist mit Schüttelfrost und anschließend hohem Fieber, sowie erhebliche Schmerzen bei Atmung und Husten. Typisch ist auch das zunächst rostfarbene Sputum, das später eitrig wird. Bakteriämische

Pneumonien haben einen schweren Verlauf und gehen häufig mit Komplikationen einher wie Pleuraerguss, Pleura- oder Perikardempyem, respiratorisches Versagen, Meningitis und einer wesentlich höheren Letalität.^{9, 10, 18, 19} Die Letalität wird angegeben mit 7-36%.⁹ Auffällig ist, dass häufiger das männliche Geschlecht betroffen ist.^{47, 48}

1.3.4. Otitis media

Streptokokkus pneumoniae ist der häufigste Erreger der Otitis media, gefolgt von *Haemophilus influenzae* und *Moraxella catarrhalis*.

Die wiederkehrenden akuten Entzündungen zeigen sich bei 20-30% der kindlichen Bevölkerung in den ersten Lebensjahren und bergen viele Risiken. 5-10% der erkrankten Kinder entwickeln eine chronische Otitis media mit Ergussbildung. Dies kann zur chronischer Gewebsschädigung wie Granulation der Mukosa, Erosion und Fixation der Gehörknöchelchen, zur Mastoiditis und zum Cholesteatom führen.³⁸ Vor allem bei Kindern nehmen Meningitiden aufgrund der anatomischen Gegebenheiten ihren Ausgang häufig von einer Otitis media.

Insbesondere bei sehr häufig wiederkehrenden und persistierenden akuten Otitiden spielen antibiotikaresistente *Streptococcus pneumoniae*- und Betalaktamase-produzierende *Haemophilus influenzae*-Stämme eine sehr große Rolle.¹⁵

1.3.5. Sinusitis

Neben *Moxarella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* und *Staphylococcus aureus* sind Pneumokokken die wichtigsten Bakterien im Erregerspektrum der ambulant erworbenen Sinusitis.^{26, 27} Bei nosokomial erworbener Sinusitis spielen Pseudomonaden ebenfalls eine bedeutende Rolle.²⁵

Aufsteigende und absteigende Infektionen können zu schwerwiegenden Komplikationen wie Meningitis, Frontalhirnabszess oder Bronchitis und Pneumonie führen.

1.4. Virulenzfaktoren

Der Pathogenität der Pneumokokken werden verschiedenen Strukturen zugeschrieben, die meistens auf der Oberfläche des Bakteriums lokalisiert sind. Die Ursachen für die hohe Morbidität und Mortalität der Pneumokokkeninfektionen, ist sicher noch nicht vollständig verstanden und die Liste der bekannten Virulenzfaktoren kann kaum Anspruch auf Vollständigkeit erheben.

1.4.1. Kapsel

Die Kapsel ist als Hauptvirulenzfaktor des Pneumokokkus bekannt. Der experimentelle Beweis wurde im Tierversuch durch Bestimmung der LD₅₀ von bekapselten und unbekapselten Pneumokokkenstämmen erbracht. Unbekapselte Stämme zeigten eine mindestens 105fach höhere LD₅₀ als bekapselte Stämme. 1925 zeigten Avery und Mitarbeiter dass die lösliche Substanz, die den Pneumokokkus umgibt, aus Polysacchariden zusammengesetzt ist.^{21, 22} Aufgrund der Unterschiedlichkeit der Antigenität der kapsulären Polysaccharide werden heute über 90 Serotypen unterschieden. Die Funktion der Kapsel beruht vor allem auf der Verhinderung der Phagozytose. Die Kapsel scheint jedoch keine nennenswerte Rolle bei Adhärenz, Invasion oder Induktion der Entzündungsreaktion zu spielen.²³

1.4.2. Pneumolysin

Das Zytotoxin Pneumolysin trägt zur inflammatorischen Reaktion bei und schädigt Zellen. Das Toxin ruft die Bildung von großen oligomeren Poren in cholesterinhaltigen Membranen von eukaryontischen Zellen hervor.^{14, 20} Dieses Protein stimuliert des Weiteren die Freisetzung von Tumor Necrosis Factor (TNF) und Interleukinen durch Makrophagen.⁴⁰ Es bindet unspezifisch IgG und aktiviert so die Komplementkaskade,¹⁴ es aktiviert Phospholipase A2 und stimuliert so die Entzündungsreaktion.²⁰ Durch direkten inhibitorischen Effekt auf Zellen des Immunsystems und der

Entzündungsreaktion sowie durch Aktivierung des Komplements inhibiert Pneumolysin die Eliminierung der Bakterien aus dem Interstitium der Alveolen und aus der Blutbahn.^{29, 30, 31}

In den Lungen inhibiert Pneumolysin die Ziliarbewegungen und erhöht die vaskuläre Permeabilität durch Schädigung des Gefäßendotheliums.³⁹ Durch seine Zytotoxizität auf das respiratorische Epithel und das Endothel zerstört Pneumolysin Gewebebarrieren, die dem mechanischen Widerstand dienen und erleichtert dem Pneumokokkus so die Penetration und Verbreitung.²⁹

Weiterhin konnte experimentell gezeigt werden, dass Pneumolysin die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke bewirkt und entscheidend zur Penetration der Pneumokokken aus dem Blutbahn ins Gehirn sowie zur Entwicklung des Hirnödems beiträgt.³⁶

1.4.3. Autolysin

Das Oberflächenprotein Autolysin gehört zur Familie der Cholin-Bindende-Proteine. Autolysin trägt zur Gewebeschädigung durch Lysierung der Pneumokokken und somit zur Freisetzung von schädigenden Substanzen aus der Zellwand und dem Intrazellularraum bei. Das Autolysin Lyt A, eine Amidase, ist verantwortlich für die Freisetzung von Lipoteichonsäure und Teichonsäure, die als Mediatoren der Immunantwort dienen.⁴⁵ Für die anderen Autolysine Lyt B und Lyt C konnten Effekte bei Kolonisation und Pathogenität im Rattenmodell gezeigt werden.

Mutanten ohne Pneumolysin oder Autolysin zeigen eine reduzierte Virulenz und Antikörper gegen einen dieser Substanzen sind partiell protektiv.²⁸

1.4.4. PavA

PavA ist ein Fibronectin-bindendes Oberflächenprotein. Durch diese Eigenschaft bewirkt PavA die Adhäsion von *Streptococcus pneumoniae* an Epithelzellen und trägt somit zur Pathogenese von Pneumokokken-

infektionen bei. Mutanten mit einer Inaktivierung des PavA-Gens zeigen eine wesentlich schwächere Virulenz.⁵⁷

1.4.5. PspA

PspA ist ebenfalls ein Cholin-bindendes Oberflächenprotein des *Streptococcus pneumoniae*. Dieses Protein trägt zur Virulenz bei indem es die Anlagerung von Komplement C3b reduziert bzw. verhindert und so die Aktivierung des alternativen Komplementaktivierungsweges verhindert. Dadurch wird die komplementvermittelte Eliminierung bzw. Phagozytose eingedämmt.^{43,44} Des Weiteren fungiert PspA als Laktoferrin-Bindungsprotein. Laktoferrin, ein eisenspeicherndes Glycoprotein, vorherrschend in Schleimhautsekreten, führt durch Bindung des freien Eisens zu einer niedrigen Konzentration dessen in der Extrazellulärmatrix. Dies wiederum führt zu einer Eindämmung des Bakterienwachstums in diesem Milieu, da freies Eisen ein essentielles Substrat für Bakterienwachstum und Vermehrung ist. Durch Bindung von PspA an Laktoferrin wird dieser dem Extrazellularraum entzogen sodass die Konzentration des freien Eisens im Extrazellularraum steigen kann und wieder optimale Bedingungen für das Bakterienwachstum gegeben sind.⁵⁸

1.4.6. IgA₁-Protease

IgA₁-Proteasen werden neben *Streptococcus pneumoniae* auch von den anderen häufigen Erregern der Meningitis (*Haemophilus influenzae* und *Neisseria meningitidis*) produziert. Dieses Enzym spaltet humanes IgA₁, welches die Immunbarriere der Mukosa darstellt. Die Enzymaktivität bewirkt eine Schwächung der IgA-bedingten Immunabwehr, wodurch den Bakterien die Kolonisation der Mukosa des oberen Respirationstraktes erleichtert wird.⁵⁶

1.4.7. Hyaluronidase

Die Hyaluronidase trägt zur Virulenz bei, indem sie Gewebeverbindungen spaltet und so die Invasion der Pneumokokken erleichtert.

1.5. Therapie und Antibiotikaresistenz der Pneumokokkeninfektionen

Streptococcus pneumoniae sind penicillinempfindliche Bakterien. Mittel der Wahl zur Therapie von Pneumokokkeninfektionen sind Penicilline, alternativ Erythromycin oder Cephalosporine der 3. Generation.

In den letzten Jahren treten jedoch zunehmend penicillinresistente Stämme auf. Die Prävalenz dieser Stämme in Deutschland ist im Vergleich relativ gering, bis vor wenigen Jahren wurden von Resistenzraten um 1% berichtet.^{24,49} In den letzten Erhebungen zeigt sich jedoch eine deutliche Zunahme dieser Stämme, im Jahre 2000 wird von verminderter Penicillinempfindlichkeit bei 5,8 der Pneumokokkenstämme berichtet.³⁵ Die Prävalenz der penicillinempfindlichen Stämme erreichen in manchen südeuropäischen Staaten regional Raten um 60%!³⁷ In den USA werden von Resistenzraten bis zu 32%.^{26,51} In einer Untersuchung von Bandak et al. im Jahre 2000, die die Penicillinempfindlichkeit von Pneumokokkenisolaten in 13 Ländern verteilt auf allen Kontinente analysierte, wurde dennoch im Mittel eine Sensibilität von 96,3% der Stämme ermittelt. In dieser Studie zeigten sich die höchsten Resistenzraten in Neuseeland (10,9%), Kanada (10,0%), und Mexiko (9,1%). Die niedrigsten Resistenzraten wurden in Russland (0%), Türkei (0%), Brasilien (0,5%) und Deutschland (0,6%) gefunden.⁵⁰

Resistenzentwicklungen gegen Makrolide zeigen sich in Spanien und USA bei bis zu 36% der isolierten Stämme.^{26,37} Die Makrolidresistenzentwicklung schreitet auch in Deutschland voran: Bis zum Jahr 2000 war die Rate an Erythromycin-resistenten Pneumokokken auf über 15% angestiegen.³⁵

1.6. Prophylaxe der Pneumokokkeninfektionen

Die systemische Infektion durch Pneumokokken wird trotz sofortiger Therapie von einer hohen Letalität begleitet. Als Konsequenz aus diesem Sachverhalt ergab sich die Notwendigkeit einer wirksamen Prophylaxe gegen diese Infektionen insbesondere bei Patienten, die eine Prädisposition für derartige Infektionen haben.

Bereits 1945 konnten McLeod und Mitarbeiter zeigen, dass eine Immunisierung mit den Kapselpolysacchariden effektiven Schutz gegen weitere Infektionen durch denselben Serotypen bietet.⁴⁶

In epidemiologischen Studien zeigte sich zudem, dass eine begrenzte Anzahl von Serotypen für die überwiegende Anzahl der Infektionen verantwortlich ist.

Anhand dieser Daten wurden die für eine Vakzine in Frage kommenden Serotypen zusammengestellt. 1977 erschien erstmals eine kommerziell erhältliche Vakzine gegen Pneumokokken, die das Kapselantigen von 14 verschiedenen Serotypen enthielt. Es stellte sich jedoch in den danach durchgeführten Untersuchungen heraus, dass diese Vakzine lediglich etwa 70% der in Frage kommenden Serotypen erfasste.

Daraufhin wurde 1983 Pneumovax® eingeführt. Ein Impfstoff, der nun Kapselpolysaccharide von 23 verschiedenen Serotypen enthielt (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F und 33F).

Sehr bald stellten sich die Schwächen dieser Vakzine heraus. Sie bewirkte eine sehr gute Immunantwort bei jungen Erwachsenen, die jedoch keine Zielgruppe darstellen. Bei Erwachsenen jenseits des 65. Lebensjahres und bei Kindern war der Immunschutz eher mäßig. Bei Kleinkindern unter 2 Jahren zeigte die Vakzine keine Wirkung; diese Gruppe wurde deswegen aus der Indikationsliste herausgenommen.

Danach konzentrierte sich die Impfstoffforschung auf Proteinbestandteile des Pneumokokkus. Es konnten viele Proteine isoliert und identifiziert werden, die serotypenunabhängig vorkamen und gute Immunantwort hervorrufen konnten.

Weiterhin wurde in Anlehnung an die *Hämophilus-influenzae*-Vakzine die Forschung auf dem Gebiet der Konjugatvakzine vorangetrieben. Im Mai 2001 wurde nun die 7-valente Konjugatvakzine auch in Deutschland zugelassen. Der Proteinanteil dieser Vakzine besteht aus einem nicht toxischen Analogon des Diphtherietoxins an dem die antigenen Determinanten von 7 Polysaccharidtypen gebunden vorliegen. Die Vakzine zeigte in den durchgeführten Studien gute Wirksamkeit und Schutz in der Gruppe der Kinder unter 2 Jahren, für die bisher kein Impfstoff zur Verfügung stand.⁵⁴

Die Immunisierung von splenektomierten Patienten, bei denen der 23-valente Polysaccharidimpfstoff häufig nicht zu einer befriedigenden Immunantwort führte, scheint insbesondere nach Gabe einer 2. Dosis des Konjugatimpfstoffes ausreichend erfolgreich zu sein.⁵⁵ Auch für HIV-infizierten Kindern konnte eine gute Immunogenität dieses Impfstoffes gezeigt werden.³² Jedoch zeigt auch die Konjugatvakzine wesentliche Schwächen: Kritisiert wird, dass die aktuelle Zusammensetzung der Konjugatvakzine die Mehrheit der invasiven Kapselserotypen der USA abdeckt, nicht aber die anderer Weltregionen. Des Weiteren haben Pneumokokken die Fähigkeit, Kapseltypen durch Transformation zu wechseln. Es wird befürchtet, dass bei einem breiten Einsatz dieser Vakzine diese Eigenschaft dazu führt, dass es zu Veränderungen in der Serotypenverteilung bei Trägern und invasiven Erkrankungen kommt.⁵³

Nach wie vor scheint deswegen eine Forschung nach immunogenen Oberflächenproteinen, die bei allen Serotypen konserviert sind und die Entwicklung eines Impfstoffes basierend auf diesen Proteinen zur Eindämmung der Bedrohung durch Pneumokokken Gültigkeit zu haben.

1.7. Unspezifische Bindung von Antikörpern an Oberflächenmolekülen von Bakterien

Von vielen Gruppe A Streptokokken ist bekannt, dass sie IgG und IgA über deren Fc-Fragment in unspezifischer Weise binden können.⁵⁹

Untersuchungen bezüglich dieser Eigenschaften zeigen, dass es große Variationen zwischen verschiedenen Stämmen gibt. Für *Streptococcus pyogenes* z.B. sind seit längerem sogenannte M-Proteine und M-like Proteine bekannt, die diese Eigenschaft besitzen.⁶⁰ Weiterhin ist diese Eigenschaft für das Fibronektin-Bindungsprotein SfbI des *Streptococcus pyogenes* beschrieben: Dieses Protein ist in der Lage, humanes Immunglobulin G über das Fc-Fragment unspezifisch zu binden.⁶² Für die Streptokokkenproteine Arp, Sir und Protein H, die von vielen Stämmen der Streptokokken der Gruppe A exprimiert werden, ist diese Immunglobulinbindungseigenschaft ebenfalls bekannt.⁶³ Es wird angenommen, dass diese Funktion zur Virulenz beiträgt, in dem es die Opsonophagozytose verhindert und so dem Bakterium hilft, die Immunabwehr abzuwehren.⁶¹

1.8. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit galt es die mikrobiologisch gesicherten septikämischen Pneumokokkeninfektionen im Einzugsgebiet der Diagnostik des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Universität Düsseldorf während des Zeitraumes von einem Jahr (Oktober 1996 bis September 1997) zu erkennen, die Krankengeschichten der Betroffenen zu sammeln und auszuwerten. Hauptaufgabe war es jedoch, sowohl die die Erkrankung verursachenden Pneumokokkenstämme als auch Serumproben dieser Patienten, die zum Zeitpunkt der akuten Infektion sowie im Anschluß daran entnommen wurden, zusammenzutragen. Anhand der Serumproben sollte die vorbestehende bzw. die sich nach invasiver Infektion entwickelnde Immunantwort auf Proteinbestandteile von Pneumokokken anhand von Westernblots untersucht und ausgewertet werden.

2.0. Materialien und Methoden

2.1. Isolierung und Identifizierung der Pneumokokken aus Blut- bzw. Liquorkultur

Untersucht wurden die vom 01. Oktober 1996 bis 30. September 1997 vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Düsseldorf kulturell gesicherten invasiven Pneumokokkeninfektionen bei Patienten, die in den entsprechenden einsendenden Krankenhäusern stationär behandelt wurden. Die primäre Anzucht der Pneumokokken erfolgte aus Blut bzw. Liquor mit mikrobiologischen Standardmethoden.

2.1.1. Blutkultur

In den einsendenden Kliniken wurden Kulturflaschen mit 5 – 10 ml Blut beimpft und in dem Institut für Medizinische Mikrobiologie (Universität Düsseldorf) in dem Kulturflaschenautomat BacT/Alert® (Organon Teknika) bei 36°C bebrütet. Bei Detektion von Keimwachstum wurde eine Subkultur auf bluthaltigen, festen Nährmedien angelegt und die Spezieszugehörigkeit der Isolate, wie unten beschrieben, bestätigt.

2.1.2. Liquorkultur

Liquor wurde von den Kliniken in aller Regel nativ eingesandt. Die Primärkultur wurde auf bluthaltigen festen Nährmedien sowie zur Anreicherung eine Kultur in Brain-Heart-Infusion (BHI) durchgeführt. Bei positivem Bakterienwachstum wurden die Erreger in ihrer Spezieszugehörigkeit wie unten beschrieben bestätigt. In Ausnahmefällen wurden auch in Kulturflaschen eingebrachte Liquores eingesandt. Vor Bebrütung in den Kulturautomaten wurden die Flaschen mit einem Anreicherungsmedium (BBL® Fildes Enrichment, Becton Dickinson) supplementiert und im Folgenden wie Blutkulturen weiter bearbeitet.

Subkulturen von *Streptococcus pneumoniae* wurden auf modifiziertem Columbia-Agar (CCH-Agar) bei 5% CO₂ und 36°C bebrütet.

2.1.3. Typische kulturelle Merkmale von Pneumokokken

Nach 24 Stunden Bebrütungszeit zeigen sich auf bluthaltigen festen Nährböden charakteristische vergrünende Kolonien (α -Hämolyse). Schon nach 48 Stunden Bebrütung setzt bei den Kolonien eine Autolyse ein, die als zentrale Eindellung sichtbar wird.

2.1.4. Optochintest

Die Abgrenzung der Pneumokokken von anderen vergrünenden Streptokokken erfolgt anhand der Optochin-Empfindlichkeit. Optochin (Äthyl-Dihydrocuprein) aktiviert die Muraminidase der Pneumokokken, die autolytisch die Mureinschicht der Zellwand zur Auflösung bringt.

Von den fraglichen Kolonien erfolgt eine Aufschwemmung in Traubenzuckerbrühe. Als Inokulationsdichte sollte eine Trübung von 0,5 MacFarland angestrebt werden; dichtere Inokula (bis 2,0 MacFarland) beeinflussen das Ergebnis des Optochin-Empfindlichkeitstests allerdings nicht signifikant. Die Suspension wird auf eine Columbia- (CCH-) Agarplatte aufgebracht. Überschüssiges Material wird abgesaugt. Wenn die Suspension auf dem Agar getrocknet ist, wird ein Optochin-Testblättchen (beschickt mit 5 µg Optochin, Becton Dickinson) mit einer sterilen Kanüle aufgelegt. Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wird die Columbia- (CCH-) Agarplatte bei 36°C und 5% CO₂ übernacht bebrütet und anschließend beurteilt.

Pneumokokken bilden einen deutlichen Hemmhof um das Optochin-Blättchen aus. Bei positivem Ausfall des Tests wird ein Durchmesser des Hemmhofs von ≥ 14 mm erreicht.

2.1.5. Kapseltypisierung

Alle als Pneumokokken bestätigten Isolate wurden einer Kapseltypisierung mittels Kapselquellungsreaktion durch das Nationale Referenzzentrum für

Streptokokken am Institut für Mikrobiologie der RWTH Aachen unterzogen. Die Reaktion von Kapselpolysaccharid von Pneumokokken mit spezifischem Antiserum führt zu verstärkter Lichtbrechung der Kapsel, die dadurch besser sichtbar werden und wie gequollen erscheinen. Diese Erscheinung kann zur Identifizierung bzw. Typisierung nutzbar gemacht werden.

2.1.6. Lagerung der Isolate

Die Pneumokokkenstämme wurden in Todd-Hewitt-Medium mit 0,5% Hefeextrakt bis zum Erreichen der stationären Phase angezogen und nach Zusatz von 10% Glycerin bei -80°C gelagert.

In Tabelle 1 sind die gesammelten Pneumokokkenstämme aufgelistet.

2.2. Sammlung der Seren

Da zunächst die Antikörperproduktion der an einer Pneumokokkeninfektion erkrankten Patienten im Zeitverlauf untersucht werden sollte, war es notwendig, von diesen Patienten mehrere Seren zu gewinnen, die zu verschiedenen Zeiten abgenommen wurden:

1. Serum 1. Woche nach Erregerisolierung
2. Serum 2 bis 4 Wochen nach Erregerisolierung
3. Serum 2 bis 6 Monate nach Erregerisolierung

Die Entnahme von Serumproben zu Forschungszwecken wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich Heine Universität Düsseldorf genehmigt (Studien-Nr. 1097). Zur Aufklärung der Patienten über Studieninhalte und zur Dokumentation der Einwilligungserklärung wurde ein Formblatt entworfen, das ggf. den Patienten ausgehändigt wurde.

Unmittelbar nach Erregerisolierung wurde mit den behandelnden Stationsärzten Kontakt aufgenommen. Es wurden ihnen die Ziele der Studie erklärt und sie gebeten, für Studienzwecke Blut abzunehmen und an das Institut zu verschicken. Ggf. wurde den behandelnden Ärzten das Formblatt zur Aufklärung über Studieninhalte zur Verfügung gestellt. In aller Regel erfolgte dies prompt. Um von den Patienten die 2. bzw. 3.

Serumprobe zu erhalten, war es mitunter notwendig, die weiterbehandelnden Hausärzte zu kontaktieren, durch welche die Blutentnahme erfolgte. Die Kooperationsbereitschaft der Hausärzte war sehr unterschiedlich. Ein kleiner Teil war sehr hilfsbereit und erledigte dies prompt, die meisten jedoch mussten mehrfach kontaktiert werden, trotzdem war der Erfolg mäßig. Erfolgreicher war es, die Patienten direkt zu kontaktieren, ihnen die Ziele der Studie zu erklären und sie bitten, bei ihrem Hausarzt Blut abnehmen zu lassen. Bis auf eine Ausnahme waren alle Patienten mit der Blutentnahme einverstanden. Die Seren wurden nach Eingang im Institut zentrifugiert, portioniert und bei -20°C tiefgefroren.

Die Anschriften der Hausärzte und der Patienten wurden aus den Entlassungsbriefen der Patienten entnommen, die von den erstbehandelnden Kliniken zur Verfügung gestellt wurden. Anhand dieser Entlassungsbriefe war es möglich die Krankengeschichte der Patienten zu erheben.

In Tabelle 2 sind die gesammelten Seren aufgelistet.

2.3. Herstellung der Pneumokokkengesamtzelllysate für die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die Herstellung der Pneumokokkengesamtzelllysate erfolgte, wie im Folgenden beschrieben:

- die in 10% Glycerin bei -80°C gelagerten Bakterienstämme auftauen
- 5 ml Todd-Hewitt-Medium mit 0,5% Hefeextrakt mit $50\mu\text{l}$ des Glycerinstocks beimpfen
- bei 36°C und 5% CO_2 über Nacht bebrüten, bis die Pneumokokkenkultur eine OD von 0,4 – 0,6 (gemessen bei 623nm) erreicht hat.
- 1ml der Pneumokokkenkultur 30s bei $12000\times g$ (Mikrozentrifuge) abzentrifugieren (4°C)
- Überstand möglichst vollständig entfernen

- Pellet in 0,5 ml eiskaltem 50 mM Tris-Puffer (pH 7,4) resuspendieren
- 30s bei 12000xg (Mikrozentrifuge) abzentrifugieren (4°C)
- Überstand möglichst vollständig entfernen
- In 25µl destilliertem Wasser resuspendieren
- 25µl 2x SDS Gel-Lade-Puffer zusetzen, für 20s vortexen
- Für 5 min im Wasserbad kochen
- 30s Ultraschallbehandlung
- 10 min bei 12000xg (Mikrozentrifuge) abzentrifugieren
- Pellet verwerfen, Überstand bei -20°C aufbewahren bzw. für SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese einsetzen

2.4. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die elektrophoretische Trennung der Proteine nach ihrer molekularen Größe und elektrischer Ladung erfolgte nach der Methode von Laemmli:⁶⁴

Um eine Trennung nur nach der Größe zu erhalten, wird Natriumdodecylsulfat (SDS) bei der Elektrophorese verwendet. Das negativ geladene SDS lagert sich an die Proteine und überdeckt deren positive Ladungen, so dass bei der Elektrophorese die Proteine zur Anode wandern und aufgrund ihres Molekulargewichtes getrennt werden.

2.4.1. Polyacrylamidgele

Polyacrylamidgele sind zusammengesetzt aus Ketten von polymerisiertem Acrylamid, die durch ein bifunktionales Agens wie N,N'-Methylenbisacrylamid querverbunden sind. Der effektive Trennungsbereich von SDS-Polyacrylamid ist abhängig von der Konzentration des Polyacrylamids, das beim Gießen des Gels verwendet wird sowie von der Menge der Querverbindungen. Diese Querverbindungen geben dem Gel Rigidität und Dehnbarkeit und formen Poren, durch die die SDS-Polypeptidkomplexe durchwandern müssen. Die Trennfähigkeit des Gels wird determiniert durch die Porengröße, die wiederum von der absoluten Konzentration des verwendeten Acrylamids abhängig ist.

Das diskontinuierliche Acrylamidgel besteht aus einem niederprozentigen Sammelgel, in dem die Proben zunächst aufkonzentriert werden, und einem höherprozentigen Trenngel, in dem die einzelnen Proteine dann aufgetrennt werden. Die Prozentigkeit des Trenngels wird aufgrund der Größe des Proteins und der Auftrennungsweite gewählt. Dabei gilt, dass im niederprozentigen Gel die Auftrennung großer Proteine besser ist und umgekehrt.

2.4.2. Gießen der Gele

Für unsere Untersuchungen wurden Gele mit 9,5% Acrylamid verwendet.

- Vorschrift für 20 ml Trenngel:
 - 6,3ml Lösung A
 - 5,0ml Lösung B
 - 0,2ml Lösung C
 - 8,5ml Aqua destillata
 - 180µl Ammoniumpersulfat-Lösung
 - 20µl TEMED
- Lösungen laut Vorschrift zusammengeben, zuletzt TEMED zusetzen
- alles leicht schwenken und sofort in ein vorbereitetes Glasplattengestell füllen
- bis zum Rand mit Aqua destillata auffüllen
- mindestens 30 min polymerisieren lassen

- Lösungen für das Sammelgel wie folgt pipettieren:
 - 1ml Lösung A
 - 2,5ml Lösung D
 - 100µl Lösung C
 - 6,5ml Aqua destillata
 - 100µl Ammoniumpersulfat-Lösung
 - 10 µl TEMED

- leicht schwenken, auf das erste Gel schichten
- Kamm einstecken
- 30 min polymerisieren lassen

2.4.3. Elektrophorese

Verwendet wurde für die Elektrophorese ein Vertikal-Elektrophorese-System der Firma Bethesda Research Laboratories.

Das bereits polymerisierte Gel wird an die Elektrophoresekammer festgeklammert, die obere und untere Kammer des Gerätes werden mit Elektrophoresepuffer gefüllt und die Taschen des Sammelgels mit den Proben gefüllt. Zuvor wurde die optimale Probenmenge durch Austestung ermittelt. Anschließend wird eine elektrische Spannung angelegt: Während des Laufs der Proteine im Sammelgelbereich 100 V, im Trenngelbereich 200 V.

2.4.4. Färbung des Gels

Um die aufgetrennten Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde das Gel im Anschluss an die Elektrophorese mit Coomassie® Brilliant Blue R 250 Färbelösung unter leichtem Schwenken 30 min gefärbt:

Herstellung der Färbelösung:

- 250 mg Coomassie® Brilliant Blue R 250 in einer Mischung aus je 45ml Methanol und Aqua destillata sowie 10ml Eisessig lösen
- Lösung durch Whatman-Papier-Filter (No.1) filtern, um nicht gelöste Partikel zu entfernen

Nach Beendigung der Färbezeit wird die Färbelösung in den Vorratsbehälter zurückgegossen und das Gel in Entfärbelösung (30% Ethanol + 10% Eisessig + 60 % Aqua destillata) unter leichtem Schwenken bis zur Aufhellung des Hintergrundes und Sichtbarwerden der Proteinbanden unter mehrmaligem Austausch der Entfärbelösung entfärbt.

2.4.5. Trocknung des Gels

Das Gel wird auf ein entsprechend großes Stück Whatmann–Papier No 1 gelegt und in einem Vakuumtrockner getrocknet.

2.5. Westernblot

Die im Agarosegel elektrophoretisch nach Größe und Ladung getrennten Antigene (Proteine) werden hierbei ebenfalls elektrophoretisch auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Diese Membranen können mit Patientenserum inkubiert werden. Wenn Antikörper gegen die einzelnen Antigene (Proteine) vorhanden sind, so werden diese an die jeweiligen Antigenbanden gebunden. Mittels enzymmarkiertem Antihuman-Immunglobulin-Antikörper können die gebundenen Antikörper dargestellt werden.

Um ein optimales Ergebnis zu erhalten, wurde zuvor die günstige Konzentration des primären Antikörpers (Patientenserum) und die einzusetzende Konzentration des sekundären Antikörpers mittels Dot-Blot (siehe unten) austitriert:

2.5.1. Dot-Blot

Verwendet wurde ein Gerät der Firma OWL®:

- 2x Whatmann-Papier No 1 und 1x Nitrocellulose (NY 13 N der Firma Schleicher und Schuell) gemäß Schablone des Gerätes zuschneiden
- Whatman-Papier mit PBS durchtränken, auf das Dot-Blot-Gerät legen
- Nitrocellulose kurz in Ethanol schwenken, mit PBS durchtränken, auf das Whatman-Papier legen
- Dot-Blot-Gerät zusammenbauen, Wasserstrahlpumpe anschließen
- 1:10 Verdünnung des Bakterienlysats mit PBS herstellen
- 40 µl/well auftragen
- 2x mit PBS/Tween spülen

- Nitrocellulose beschriften, 15 min auf trockenem Whatman-Papier unter Flow trocknen
- Mit 10% fettfreier Milch in PBS/Tween für 1 h blocken, anschließend abgießen.
- Dots ausschneiden
- Verdünnungsreihe (1:10³; 1:10⁴; 1:10⁵) des entsprechenden humanen Serums in 1% BSA (PBS/Tween) herstellen
- Je drei der ausgeschnittenen Blots mit den mit der jeweiligen Serumverdünnung 1h inkubieren, danach abgießen
- 3 x 15 min auf dem Rüttler mit PBS/Tween waschen
- Sekundärantikörper-Verdünnungsreihe (1:10³; 1:10⁴; 1:10⁵) herstellen, jedes Stück der ausgeschnittenen Blots mit einer anderen Kombination aus Verdünnung des Patientenserums und der Verdünnung des Sekundärantikörpers inkubieren (es ergeben sich 9 verschiedene Möglichkeiten), abgießen
- 3 x 15 min auf dem Rüttler mit PBS/Tween waschen
- mit Luminol® (ECL-Westernblotting Detection Reagent 1&2, Amersham Life Science) Photoreaktion darstellen.

Im Dot-Blot zeigte sich, dass eine Verwendung des primären und sekundären Antikörpers in einer Verdünnung von 10⁴ optimal war. Orientierend an diesen Ergebnissen wurden dann alle Seren in einer Verdünnung von 1: 10⁴ eingesetzt.

2.5.2. Aufbau und Durchführung des Westernblots

Verwendet wurde ein Blotgerät der Firma OWL®:

- Bakterienlysat auf Polyacrylamidgel auftragen und elektrophoretisch auftrennen
- Blot vorbereiten: Nitrocellulose und 2x Whatman-Papier auf Gel-Größe zuschneiden.

- Gel und eine Lage Whatman-Papier in Trisborat-Puffer mit 0,1% SDS 10 min equilibrieren
- Nitrozellulosemembran kurz in Ethanol Schwenken und mit dem anderen Filterpapier in Trisborat-Puffer ohne SDS 10 min equilibrieren
- Blot-„Sandwich“ im Gerät wie folgt zusammenbauen:



- Gerät anschließen und blotten mit 1 mA/cm^2 über 45 min
- Nach dem Blotten Nitrocellulose mit 10% fettfreier Milch in PBS/Tween für 1 h blocken
- 2x 10 min mit PBS/Tween waschen
- mit der $1:10^4$ - Verdünnung des Serums über 1 h bei Raumtemperatur inkubieren. Abgießen
- 3x 10 min mit PBS/Tween waschen
- mit dem Sekundärantikörper (Anti-IgG von der Ziege mit Peroxidase konjugiert (Dianova) ebenfalls in einer $1:10^4$ -Verdünnung 1 h inkubieren
- erneut 3x 10 min mit PBS/Tween waschen
- mit Luminol® (ECL-Westernblotting Detection Reagent 1&2, Amersham Life Science) entwickeln.

2.5.3. Entwicklung mit Luminol®

- Im Fotolabor (Dunkelraum) Nitrozellulosemembran 1min in Luminolbad legen
- Luminol® abgießen, Nitrozellulosemembran kurz in PBS/Tween waschen

- Nitrozellulose in Frischhaltefolie einwickeln, in eine Filmkassette einlegen und Film 30s belichten

2.6. Aufstellung der verwendeten Pneumokokkenstämme

- 1.L Institut für Medizinische Mikrobiologie, Düsseldorf
- 16.B Institut für Medizinische Mikrobiologie, Düsseldorf
- 20.B Institut für Medizinische Mikrobiologie, Düsseldorf
- 25.B Institut für Medizinische Mikrobiologie, Düsseldorf
- 27.B Institut für Medizinische Mikrobiologie, Düsseldorf
- 28.B Institut für Medizinische Mikrobiologie, Düsseldorf
- 31.B Institut für Medizinische Mikrobiologie, Düsseldorf
- 34.B Institut für Medizinische Mikrobiologie, Düsseldorf
- 8.B Institut für Medizinische Mikrobiologie, Düsseldorf
- 9.L Institut für Medizinische Mikrobiologie, Düsseldorf

Aa6 Referenzzentrum für Streptokokken, Institut für Mikrobiologie, RWTH Aachen

2.7. Aufstellung der verwendeten Antikörper

2.7.1. Verwendete Primärantikörper

- Patientenserum:
 - 1.S, 1.S.2, 1.S.3, 16.S, 16.S.2, 20.S, 20.S.2, 25.S, 25.S.2, 27.S, 27.S.2, 28.S, 28.S.2, 31.S, 31.S.2, 34.S, 34.S.2, 8.S, 8.S.2, 9.S, 9.S.2
- Kontrollserum: G1 (Gesunder Proband, anamnestisch keine invasive Pneumokokkeninfektion) (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Düsseldorf)
- Rattenserum (Pool) gesunder Ratten (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Düsseldorf)

- Rattenserum 7 Tage nach intratrachealer Infektion der Ratte mit Pneumokokken (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Düsseldorf)
- Dianova IgG-Pool (aus Seren von Blutspendern)
- Serum eines Patienten mit Multiplem Myelom und monoklonaler IgG-Bildung (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Düsseldorf)

2.7.2. Verwendete Sekundärantikörper

Anti-Human IgG von der Ziege, Peroxidase konjugiert, Fc-Fragment spezifisch (Dianova)

Anti-Human IgA von der Ziege, Peroxidase konjugiert, Fc-Fragment spezifisch (Dianova)

Anti-Human IgM von der Ziege, Peroxidase konjugiert, Fc-Fragment spezifisch (Dianova)

Anti-Ratten IgG von der Ziege, Peroxidase konjugiert, Fc-Fragment spezifisch (Dianova)

2.8. Verwendete Reagenzien, Lösungen und Puffer

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), Oxoid (Wesel) und Merck (Darmstadt) bezogen. Plastik- und Einwegartikel stammten von den Firmen Greiner (Nürtingen), Becton Dickenson (Heidelberg) und Eppendorf (Hamburg).

- Lösung A: 30% Acrylamid
- Lösung B: 1,5m Tris-HCl pH 8,8

Rp:

1g Tris in ca. 800ml Aqua destillata auflösen
mit HCl (12M) auf pH 8,8 einstellen
mit Aqua destillata auf 1000 ml auffüllen
entgasen, bei 4°C lagern

- Lösung C: 10 % SDS in Aqua destillata
- Lösung D: 0,5m Tris-HCl pH 6,8

Rp:

60g Tris in ca 800ml Aqua destillata lösen
mit HCl (12M) auf pH 6,8 einstellen
mit Aqua destillata auf 1000 ml auffüllen
entgasen

- TEMED (N,N;N',N'-Tetramethylethyldiamin)
- Ammoniumpersulfat
- Elektrophoresepuffer:

Rp:

25 mM Tris
250mM Glycin
0,1% SDS

- Puffer zum Resuspendieren der Bakterien:
Tris-Puffer 50mM, pH 7,4
- 2x Gelladepuffer:

Rp:

100 mM Tris Cl (pH 6,8)
200 mM Dithiothreitol
4 % SDS
0,2 % Bromophenol blue
20 % Glycerol

- Trisborat-Puffer(5x Stock-Lösung):
54 g Trisbase, 27,5g Borsäure in 1l Aqua destillata
- PBS (PBS-Puffer pH 7,3)
- PBS+Tween: 1ml Tween in 500ml PBS
- 10% fettfreie Milch

3.0. Ergebnisse

3.1. Epidemiologische Auswertung der Patientendaten

Im Zeitraum von Oktober 1996 bis September 1997 wurden 49 invasive Pneumokokkeninfektionen aufgrund der kulturellen Isolierung der Bakterien aus dem Blut bzw. Liquor der betroffenen Patienten festgestellt. Der kulturelle Nachweis erfolgte im Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf. Zu den in dieses diagnostische Labor einsendenden Krankenhäusern zählen neben dem Universitätsklinikum verschiedene externe Krankenhäuser Düsseldorfs und Umgebung. Zur Analyse der Krankengeschichte standen die Entlassungsberichte der betroffenen Patienten in 46 Fällen zur Verfügung.

Alle Pneumokokkenisolate waren gegenüber Optochin - einem wichtigem Charakteristikum der Spezies *Streptococcus pneumoniae* – empfindlich. Von den Stämmen wurde mittels Kapselquellungsreaktion im Institut für medizinische Mikrobiologie der RWTH Aachen der Kapseltyp bestimmt (siehe Tabelle 1). Die Serotypenverteilung sah wie folgt aus:

Jeweils 7 Stämme waren den Serotypen 1 und 14 zuzuordnen, jeweils 3 den Serotypen 3, 4, 6B, 7F, und 19F, jeweils 2 den Serotypen 6A, 9V, 18B, 18F und 23A. Von den Serotypen 5, 8, 9A, 10A, 12F, 23F, 24F und 33F wurde jeweils ein Stamm nachgewiesen. 40 (83,3%) der nachgewiesenen Stämme sind in der 23-valenten Polysaccharidvakzine Pneumovax® enthalten (siehe Abb. 1).

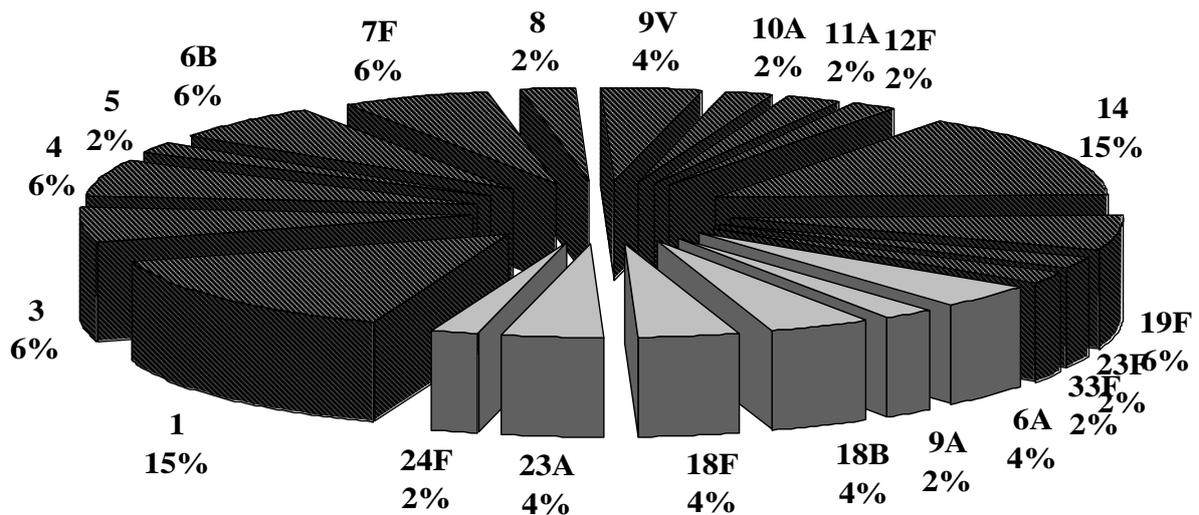


Abb.1: Verteilung der Kapselserotypen. Der Anteil der in Pneumovax® enthaltenen Serotypen ist schraffiert dargestellt. Die Prozentzahl gibt an, für wie welchen Anteil der Infektionen der jeweilige Serotyp verantwortlich war.

Das mediane Alter der Patienten betrug 56,5 Jahre, der jüngste Patient war 4 Wochen alt, der älteste Patient 89 Jahre (Abb. 3).

Unter diesen Patienten befanden sich insgesamt 8 Kinder (16.3%), davon 2 Säuglinge im Alter von 4 Wochen und 8 Wochen. Das älteste Kind war 13 Jahre alt. Drei der Kinder erlitten eine Meningitis, 2 dieser behielten Folgeschäden in Form zerebralen Bewegungsstörungen und zentralen Koordinationsstörungen. Vier Kinder erlitten eine Pneumonie und ein Kind eine Pneumokokkensepsis. Keines der Kinder verstarb. Drei dieser Infektionen wurden durch Pneumokokken des Kapseltyps 1 verursacht, jeweils einmal wurden die Serotypen 5, 14, 19F, 23A und 33F nachgewiesen. Die seit Mai 2001 auf dem Markt befindliche für Säuglinge und Kleinkinder verwendbare Vakzine Prevenar® hätte lediglich 12,5% (1 Fall) dieser Infektionen abgedeckt. (siehe Abb 2)

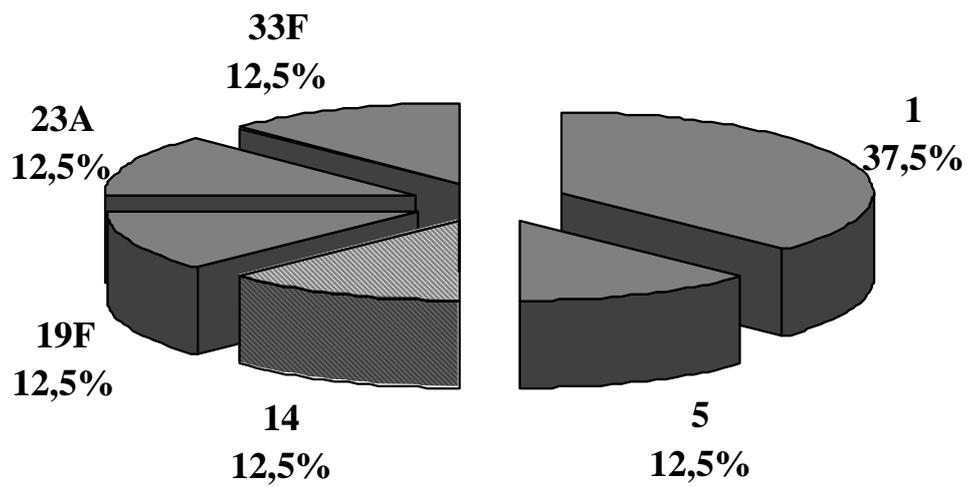


Abb 2: Serotypenverteilung der Stämme die bei Kindern zu Infektionen geführt haben: Lediglich ein Stamm (Serotyp 14, 12,5% der Fälle) wäre in der 7-valenten Konjugatvakzine Prevnar® enthalten

23 Patienten (46,9%) waren älter als 60 Jahre (siehe Abb. 3).

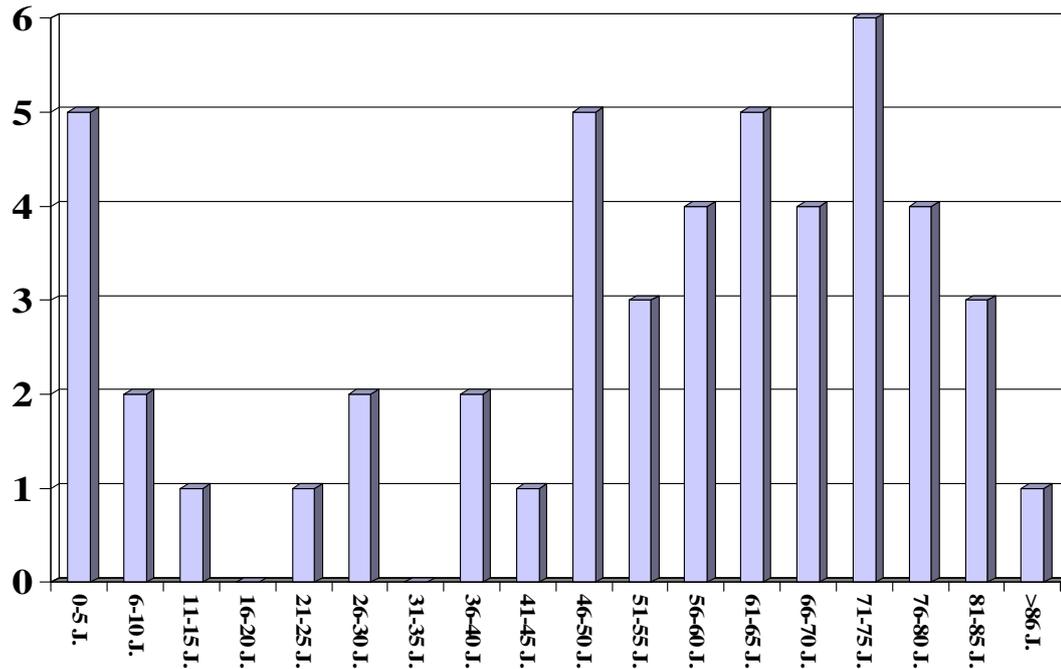


Abb. 3: Altersverteilung der Patienten

Die häufigsten Pneumokokkenstämme in dieser Altersgruppe gehörten dem Serotyp 14 an mit 4 Isolaten. Danach folgten die Serotypen 3 und 4 mit jeweils 3 Isolaten. Den Serotypen 7F, 18F und 18B konnten jeweils 2 Patienten zugeordnet werden. Serotyp 1, 6A, 6B, 9A, 23A, 23F und 24F waren mit jeweils einem Isolat vertreten. 15 dieser Stämme (65,2%) sind in der 23 valenten Polysaccharidimpfstoff Pneumovax® enthalten.

(Abb. 4)

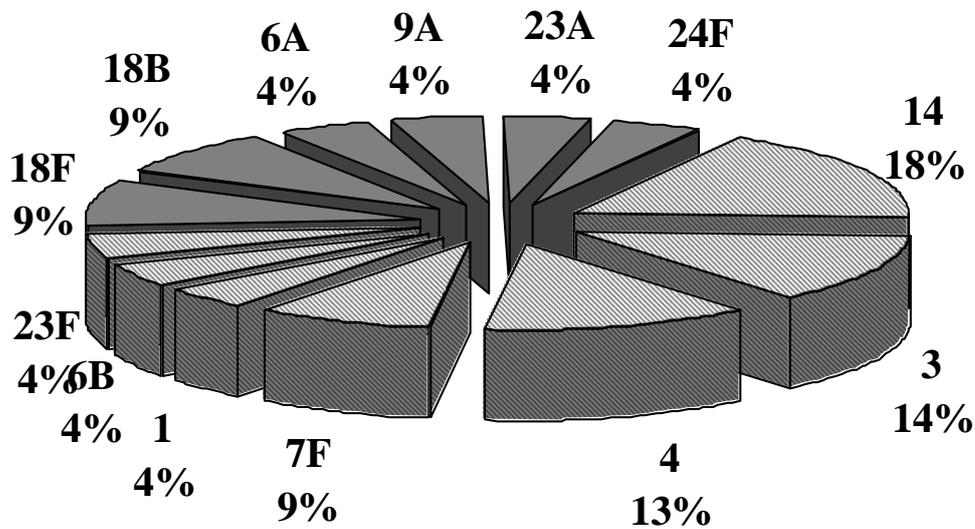


Abb. 4: Serotypenverteilung der Infektionen bei Patienten > 60Jahre. Der Anteil der in der 23 valenten Polysaccharidvaccine Pneumovax® enthaltenen Serotypen (65,2% aller Infektionen in dieser Altersgruppe ist schraffiert dargestellt.

Aus dieser Altersgruppe verstarben 4 Patienten (17,4%) an den Folgen der Infektion.

Die invasiven Pneumokokkeninfektionen zeigten die typische saisonale Verteilung mit einer Häufung in den Wintermonaten Januar und Februar (jeweils 9 Fälle) und einer geringen Inzidenz in den Sommer- und Herbstmonaten (0-3 Fälle). (siehe Abb. 5)

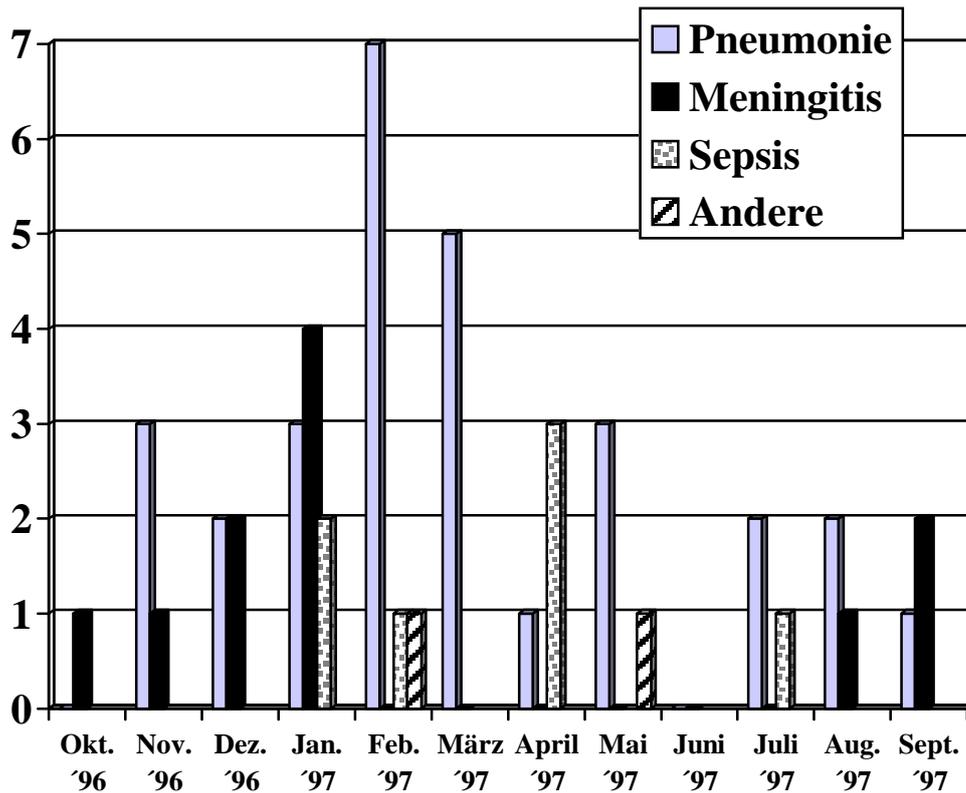


Abb. 5: Saisonale Verteilung der Infektionen

11 Patienten waren an einer Pneumokokkenmeningitis erkrankt, 29 an einer bakteriämischen Pneumokokkenpneumonie, wobei bei einem Patienten sowohl eine Meningitis als auch eine manifeste Pneumonie nachweisbar war. 6 Patienten erlitten eine Pneumokokkensepsis ohne vorausgehende oder begleitende Pneumonie oder Meningitis. Bei 2 Patienten konnte eine Pneumokokkenpleuritis ohne Pneumonie diagnostiziert werden. Bei einem Patienten wurde eine Pneumokokkenperitonitis diagnostiziert.

Die Meningitisfälle zeigten bei der saisonalen Verteilung eine Häufung im Januar mit 4 Fällen in diesem Monat. Im September und Dezember gab es jeweils 2 Fälle. In den Monaten August, September, Oktober und November jeweils nur einen Fall. In den Monaten Februar bis Juli wurden keine Pneumokokkenmeningitisfälle registriert (Abb. 5)

Das mediane Alter der Meningitispatienten war 50 Jahre.

Lediglich ein Meningitispatient verstarb an den Folgen der Erkrankung, 4 überlebten die Infektion mit bleibenden Folgeschäden in Form von hochgradiger Hypakusis, zentralen Koordinationstörungen, zerebralen Bewegungsstörungen und intellektuellen Defiziten.

Die Gesamtmortalität der beobachteten invasiven Pneumokokkeninfektionen lag bei 10,2 % (5 von 49 Patienten), das mediane Alter der verstorbenen Patienten betrug 68 Jahre. Der jüngste Patient in dieser Gruppe war 48 Jahre alt. Ein Patient verstarb an den Folgen einer Meningitis, drei Patienten nach Pneumonie und ein Patient in einer Pneumokokkensepsis. In 2 Fällen waren prädisponierende Erkrankungen bekannt wie Diabetes mellitus, Alkoholabusus oder starker Nikotinabusus. Keiner der verstorbenen Patienten war immunsupprimiert.

Soweit die Informationen aus den Entlassungsberichten hervorgingen, wurden prädisponierende Lebensgewohnheiten und Vor- bzw. Begleiterkrankungen erfasst.

Bei 27 Patienten (55%) waren in den Entlassungsberichten Vorerkrankungen bzw. Begleiterkrankungen genannt, die bekanntermaßen zu einer Pneumokokkeninfektion prädisponieren: Zu diesen zählen alkoholtoxische Leberzirrhose, Diabetes mellitus, COPD, Malignome oder therapeutische Immunsuppression.

3.2. Gesammelte Seren

Von allen Patienten, die an septikämischer Pneumokokkeninfektion erkrankten, wurden Seren gesammelt. Die Seren wurden nach dem Entnahmezeitpunkt nach Diagnosestellung (Isolierung des Erregers aus Blut oder Liquor) in verschiedene Kategorien eingeteilt:

Kategorie 1: Entnahme 1.- 14. Tag nach Erregerisolierung

Kategorie 2: Entnahme 2 - 4 Wochen nach Erregerisolierung

Kategorie 3: Entnahme 2 - 6 Monate nach Erregerisolierung

(siehe Tabelle 2 im Anhang)

Von 2 Patienten konnten Seren aller drei Kategorien gewonnen werden. Von 20 Patienten standen Seren zur Verfügung, die zwei verschiedenen Kategorien angehörten, davon 2 Patienten mit Seren aus Kategorie 1 und 2, 13 Patienten mit Seren aus Kategorie 1 und 3 und 5 Patienten mit Seren aus Kategorie 2 und 3.

3.3. Ergebnisse der Westernblotanalyse

Von den 22 Serumpaaren, die im Verlauf der Pneumokokkeninfektion entnommen werden konnten, wurden 12 Serumpaare mit Westernblotanalysen auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen Pneumokokkenproteine untersucht. Abbildung 6 zeigt exemplarisch ein solches Serumpaar.

Gesamtzelllysat	18.B	18.B	18.B	18.B	Standard
Primärantikörper	18.S	18.S	18.S.2	18.S.2	
Sekundärantikörper	Anti Human IgG von der Ziege	Anti Human IgA von der Ziege	Anti Human IgG von der Ziege	Anti Human IgA von der Ziege	

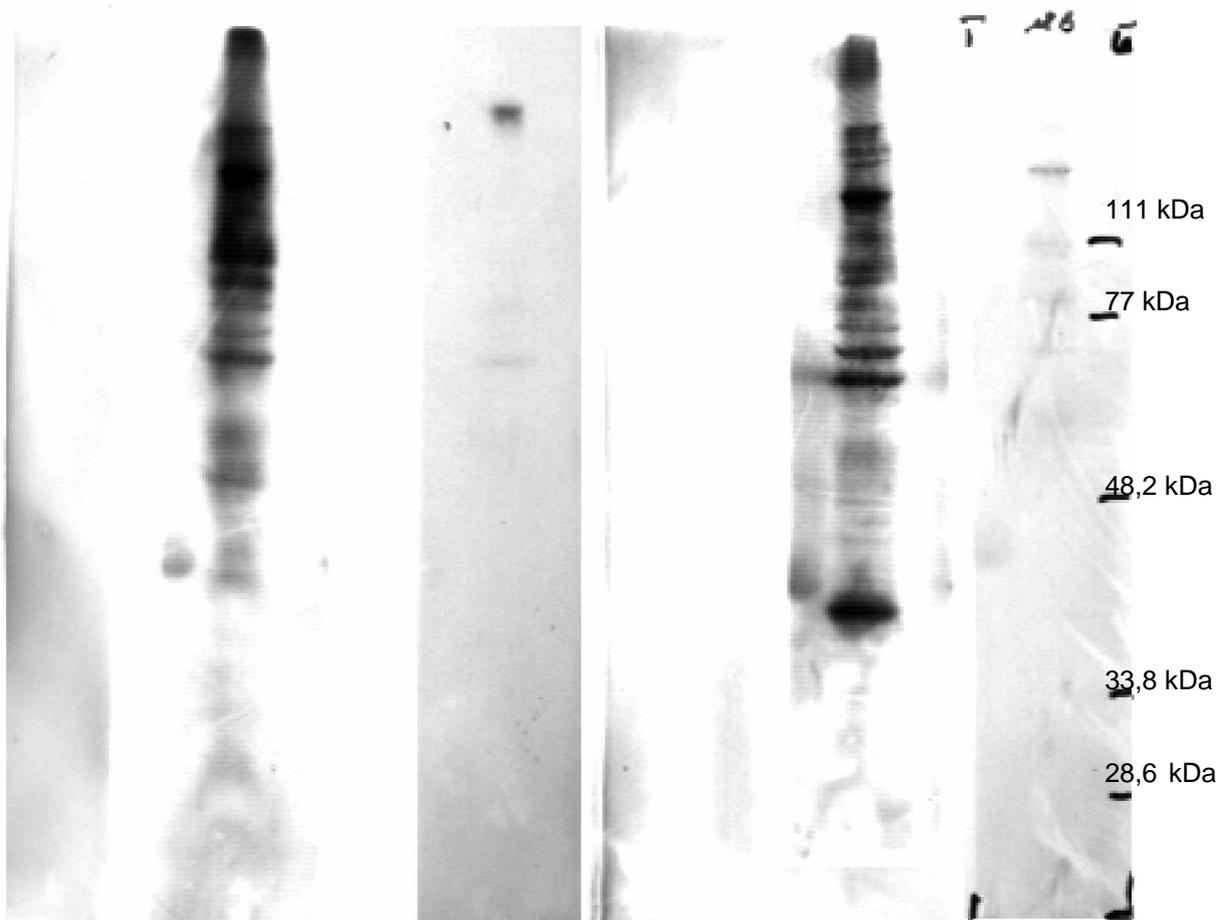


Abb.6. Westernblot von Pneumokokkengesamtzelllysat (Stamm 18.B) und Serumproben des Patienten, von dem dieser Stamm isoliert wurde. Das Serum 18.S wurde 13 Tage und das Serum 18.S.2 210 Tage nach Erregerisolierung entnommen. In den untersuchten Serumproben zeigte sich jeweils eine deutliche Präsenz von IgG, während Antikörper der Klasse IgA kaum und

der Klasse IgM (Daten nicht gezeigt) im Westernblott nicht nachzuweisen waren. Die IgG-Bandenmuster variierten im Verlauf nach der Infektion nur gering. Die meisten Proteinbanden waren bereits bei der zuerst entnommenen Serumprobe zu erkennen. Einige Banden traten in der zu einem späteren Zeitpunkt entnommenen Probe deutlicher hervor.

Die Abbildung ist repräsentativ für die im Verlauf gewonnenen Seren.

Die übrigen untersuchten 11 Serumpaare werden in tabellarische Form gezeigt (Tab.1).

PK-Stamm	25		27		28		31		34		18	
Serotyp	14		33F		18F		14		8		7F	
Alter des Pat. (Jahre)	77		2		74		1		38		30	
Sepsis +	Pneumonie		Pneumonie		Pneumonie		Pneumonie		Pneumonie		Pneumonie	
Serum- bezeichnung	25.S.	25.S.3	27.S.	27.S.2	28.S.	28.S.2	31.S.	31.S.2	34.S.	34.S.2	18.S.	18.S.2
Tage nach Infektion	16	170	15	169	7	153	7	164	7	144	13	210
kDa	Anzahl der Proteinbanden											
>111	11	1	6	4	12	13	7	6	9	9	3	4
111-77	5	4	8	8	4	5	4	4	5	4	3	3
77-48,2	5	3	6	6	7	5	2	2	6	5	3	3
48,2-33,8	6	0	1	0	3	4	0	0	2	2	2	1
33,8-28,6	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
<28.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gesamtzahl Der Proteinbanden	27	8	21	18	27	28	13	12	22	20	11	11
Intensität	(+++)	(++)	(++)	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)

PK-Stamm	1		8		9		16		20		23	
Serotyp	9A		14		1		5		1		1	
Alter des Pat. (Jahre)	71		63		0(1 Monat)		0(1 Monat)		54		39	
Sepsis +	Meningitis		Pneumonie		Mningitis		Meningitis		Pneumonie		Pneumonie	
Serum- bezeichnung	1.S.	1.S.3	8.S.	8.S.2	9.S.	9.S.2	16.S.	16.S.2	20.S.	20.S.2	23.S	23.S.2
Tage nach Infektion	2	137	6	232	13	201	5	193	10	188	14	183
kDa	Anzahl der Proteinbanden											
>111	8	11	6	4	8	0	12	2	13	15	3	2
111-77	5	5	4	3	8	1	6	5	6	5	0	0
77-48,2	6	9	5	2	7	1	6	0	3	3	5	4
48,2-33,8	0	1	2	1	0	0	2	0	3	0	2	1
33,8-28,6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<28.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gesamtzahl der Proteinbanden	20	26	17	10	23	2	26	7	25	23	10	7
Intensität	(+++)	(+++)	(+++)	(++)	(++)	(+)	(++)	(+)	(+++)	(++)	(+++)	(++)

Tab.1. IgG-Bindung bei zwölf für die Westernblotanalyse verwendete Pneumokokkenstämme und homologe Patientenserum. Die Zahl der Proteinbanden wurde in Abhängigkeit des Molekulargewichtes bestimmt und die Intensität der Gesamt-IgG-Bindung abgeschätzt.

In allen untersuchten Seren waren Antikörper der Klasse IgG vorhanden, die mit einer Anzahl von Pneumokokkenproteinen reagierten. Das Bandenmuster eines früh entnommenen Serums ähnelte sehr dem eines später entnommenen Serums bei Erwachsenen und Kindern jenseits des ersten Lebensjahres. Bis auf zwei Ausnahmen waren bei diesen Patienten auch in den früh entnommenen Seren (Kategorie 1 und 2) geringfügig mehr Banden detektiert als in den später entnommenen Seren (Kategorie 3). Die Anzahl der detektierten Banden und das Bandenmuster waren unabhängig vom Serotyp. So wurden beispielsweise 3 Stämme (Stamm-Nr. 25; 31 und 8), die dem Serotyp 14 angehörten untersucht; Bei Stamm-Nr. 25 wurden im frühen Serum 25 Proteinbanden detektiert, im späten Serum 8, bei Stamm-Nr. 31 wurden im frühen Serum 13, im späten Serum 12 Proteinbanden detektiert, und bei Stamm-Nr. 8 sah man im Westernblot mit dem frühen Serum 17 detektierte Proteinbanden, durch das spätere Serum wurden lediglich 10 Banden dargestellt.

Die Bindung von IgA-Antikörpern war wesentlich schwächer als die von IgG-Antikörpern; auch wurden nur wenige Banden von geringer Intensität detektiert. Eine Reaktion mit IgM-Antikörpern konnte in sämtlichen untersuchten Seren nicht dargestellt werden.

Es wurden 2 Serumpaare von Säuglingen untersucht, die innerhalb des ersten Lebensmonats eine Pneumokokkenmeningitis entwickelt hatten (Fall 9 und 16). In den früh entnommenen Seren (2. Lebensmonat; erste bzw. zweite Woche nach Beginn der Erkrankung) war die Zahl der durch IgG gebundene Proteine mit dem Bandenmuster, das im Westernblot durch Seren von Erwachsenen erzeugt wurde, vergleichbar. Eine

Verlaufskontrolle zeigte jedoch, dass 200 Tage nach Infektion die Anzahl der erkannten Proteine des Pneumokokkenstammes, der zu der Infektion im Säuglingsalter geführt hatte, deutlich abgenommen hatte. Dieses Phänomen war bei Patienten, die jenseits des ersten Lebensjahres die Pneumokokkeninfektion durchlitten hatten, nicht zu sehen.

Um festzustellen, ob Seren verschiedener Patienten ähnliche IgG-Bindungsmuster aufweisen, wurde das Pneumokokkengesamtzelllysate des Stammes 3.B verwendet und als primäres Antiserum nicht nur das Serum des Patienten verwendet, aus dessen Blut dieser Stamm isoliert wurde, sondern auch Seren verschiedener anderer Patienten, u.a. auch das Serum eines Probanden, bei dem keine invasive Pneumokokkeninfektion in der Anamnese bekannt war. Es stellt sich bei den untersuchten Seren ein sehr ähnliches, nicht aber identisches Proteinbandenmuster dar. (Abb. 7)

Gesamtzelllysat	3.B	3.B	3.B	3.B	3.B	3.B	3.B	3.B
Primärantikörper	28.S.2	Prob.*	20.S.1	18.S.2	3.S.2	34.S.1	1.S.2	Ohne
Sekundärantikörper	Ant-Human IgG von der Ziege							

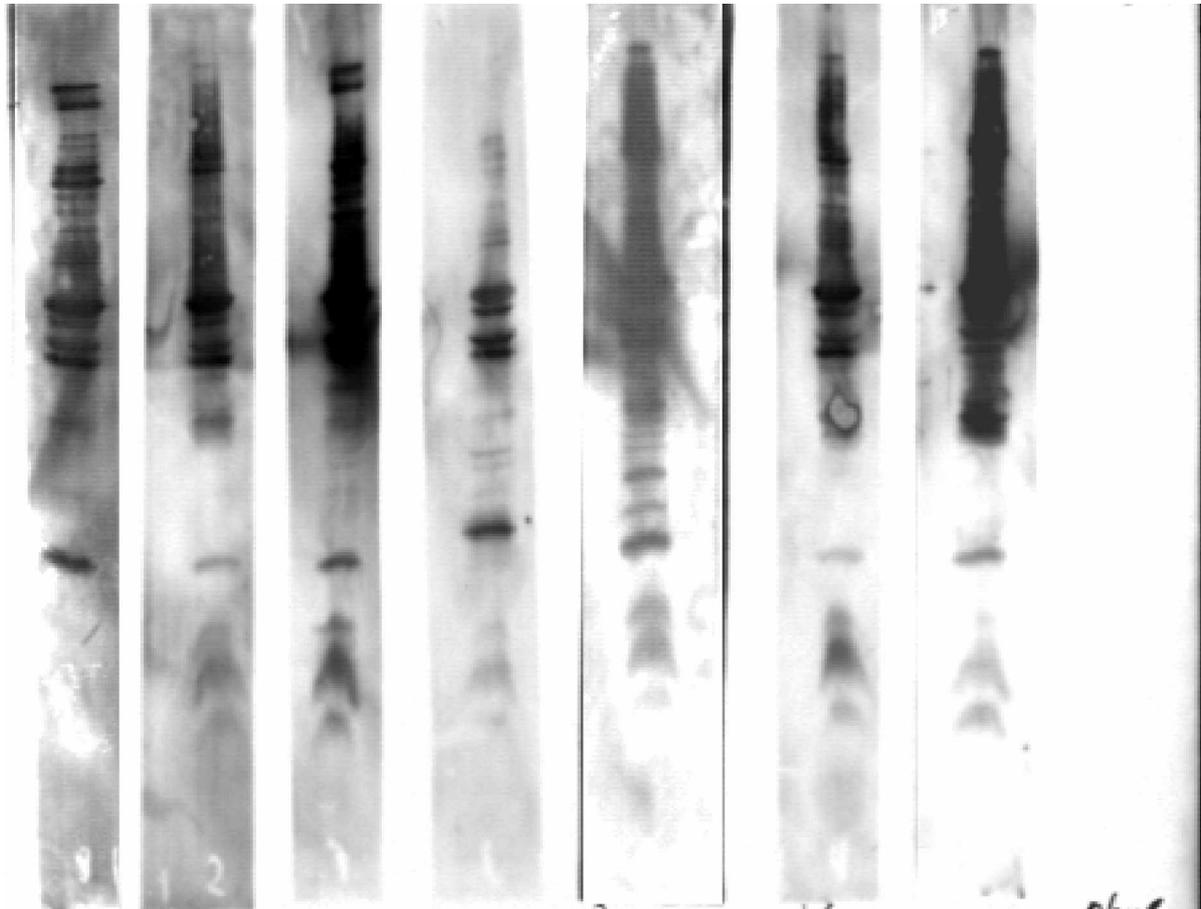


Abb. 7. Westernblot mit dem Stamm 3.B und verschiedenen nicht homologen Seren. Bei diesem Westernblot wurde in allen Spuren dasselbe Pneumokokkengesamtzelllysat aufgetragen. Als primäres Antiserum wurden jedoch diesmal verschiedene, nicht homologe Seren verwendet; unter anderem das Serum eines Probanden ohne Pneumokokkeninfektion in der Anamnese.

Das durch IgG-Bindung erzeugte Bandenmuster war bei allen Seren ähnlich. Sechs verschiedene Proteinbanden unterschiedlicher Molekulargröße wurden durch alle Seren detektiert. Durch 2 Seren wurde eine Vielzahl weiterer Banden erzeugt (28.S.2 und 20.S.1) Durch das

Serum 18.S.2 kamen lediglich die „Hauptproteinbanden“, die jeweils durch die anderen Seren auch dargestellt wurden, zur Darstellung.

Anschließend wurde die „umgekehrte Kreuzprobe“ durchgeführt: 13 verschiedene Pneumokokkenstämme (z.T. gleichen Serotyps) wurden aufgetragen und jeweils mit demselben Serum detektiert. (Abb.8).

Gesamtzelllysate	28.B	9L	16.B	34.B	27.B	25.B	13.L	8.B	31.B	20.B	23.B	18.B	Lo	3.B
Serotyp	18F	1	5	8	33F	14	19F	14	14	1	1	7F		1
Primärantikörper	Serum 3.S.2													
Sekundärantikörper	Anti- Human Ig G von der Ziege													



Abb. 8. Westernblot mit verschiedenen Pneumokokkenstämmen und immer demselben Serum als Primärantikörper. Hier wurden 13 verschiedene Pneumokokkenstammlysate aufgetragen. Als primäres Antiserum wurde diesmal immer dasselbe Patientenserum verwendet (3.S.2) Jeder Pneumokokkenstamm zeigt ein anderes Bandenmuster.

Es zeigt sich folgendes Ergebnis: Von jedem Stamm werden mehrere Banden detektiert, jedoch zeigt jeder Stamm ein anderes, serotypenunabhängiges Bandenmuster.

Um zu prüfen, es sich bei der IgG-Bindung um eine spezifische oder möglicherweise auch um eine wie bei anderen Streptokokkenspezies beschriebene unspezifische IgG-Bindung handelt, wurde folgender Versuch durchgeführt: Dieselben Pneumokokkenstammlysate wurden aufgetragen und diesmal die IgG-Bindung an die Pneumokokkenproteine aus einem Serum eines Patienten mit einer monoklonalen Gammopathie dargestellt (Patient mit einem Plasmozytom mit monoklonaler IgG-Bildung. Abb. 9):

Gesamtzelllysat	28.B	9L	16.B	34.B	27.B	25.B	13.L	8.B	31.B	20.B	23.B	18.B	Lo	3.B
Serotyp	18F	1	5	8	33F	14	19F	14	14	1	1	7F		1
Primärantikörper	Serum 3.S.2													
Sekundärantikörper	Anti- Human Ig G von der Ziege													

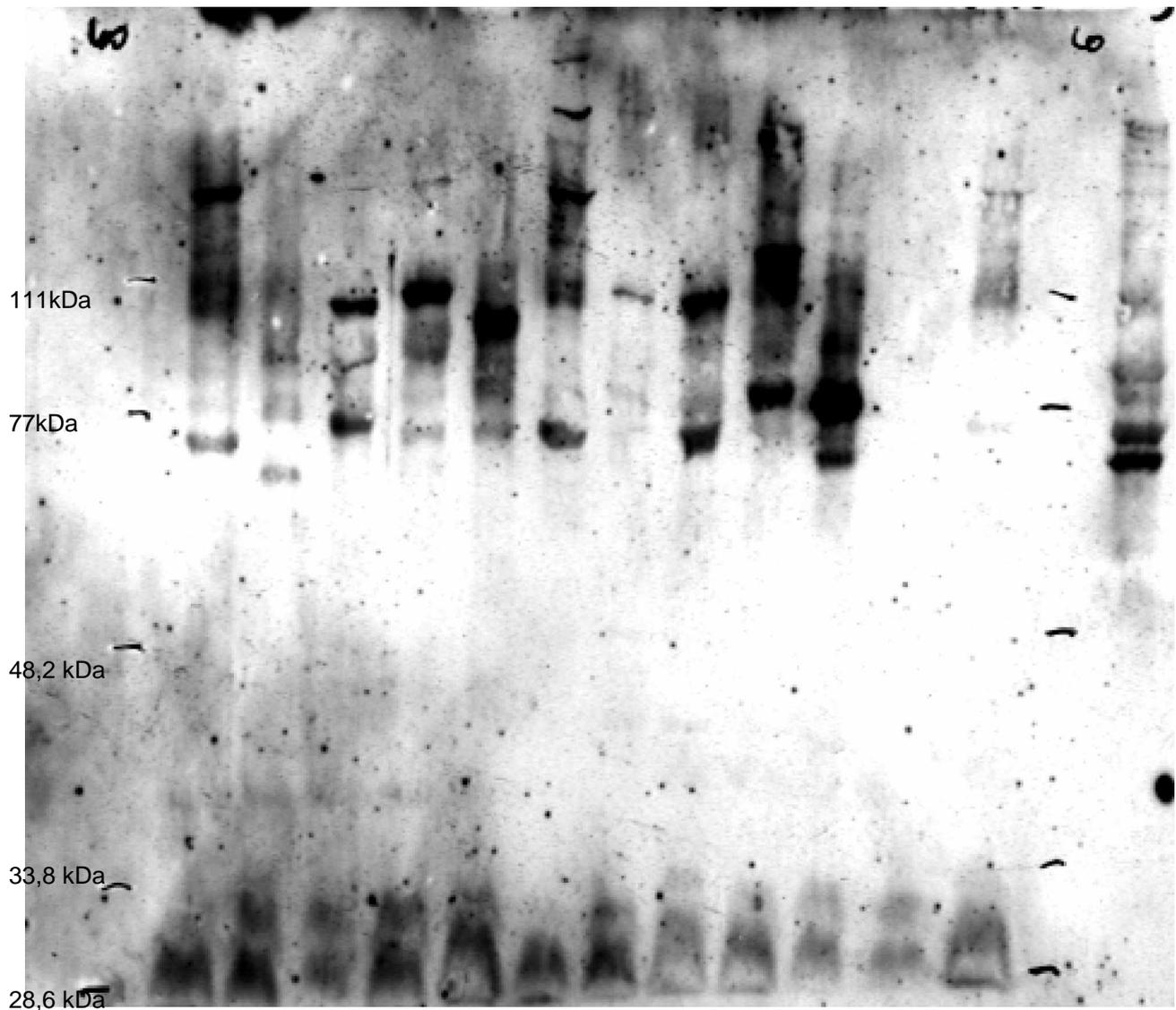


Abb.9. Blot mit dem Serum eines Patienten mit monoklonaler Gammopathie
Bei diesem Blot wurde als Primärantikörper das Serum eines Patienten
mit einem monoklonalen Plasmozytom verwendet. Es werden außer bei
einem Stamm (Stamm 23B) ein bis mehrere Banden detektiert.

Es werden bei allen Pneumokokkenlysaten ein bis mehrere Banden durch die Immunglobuline in diesem Serum dargestellt. Auffällig ist, dass diese Banden stark dominieren und die Anzahl der reaktiven Proteine gering ist. Die Größe der Proteine wie auch die Anzahl der positiven Banden ist stammabhängig. Das vom jeweiligen Pneumokokkenstamm abhängige Bandenmuster war bereits bei Verwendung der Patientenseren deutlich, nur dass die Seren von Patienten wie auch von gesunden Probanden eine Vielzahl von IgG-reaktiven Pneumokokkenproteinen ähnlicher Intensität darstellten.

Dieser Versuch wurde wiederholt mit einer aufgereinigten IgG-Fraktion aus einem Blutspenderpool (Dianova). Es zeigte sich das bekannte Bandenmuster, das bei Verwendung von Patientenseren sich darstellte, jedoch treten im Gegensatz zu diesen einige Banden deutlicher hervor (Abb. 10). Auch hier war das Bandenmuster stammabhängig und unabhängig vom Serotyp.

Lysat	28.B	9L	16.B	34.B	27.B	25.B	13.L	8.B	31.B	20.B	23.B	18.B	Lo	3.B
Primärantikörper	Dianova Serum aus Blutspenderpool													
Sekundärantikörper	Anti- Human Ig G von der Ziege													

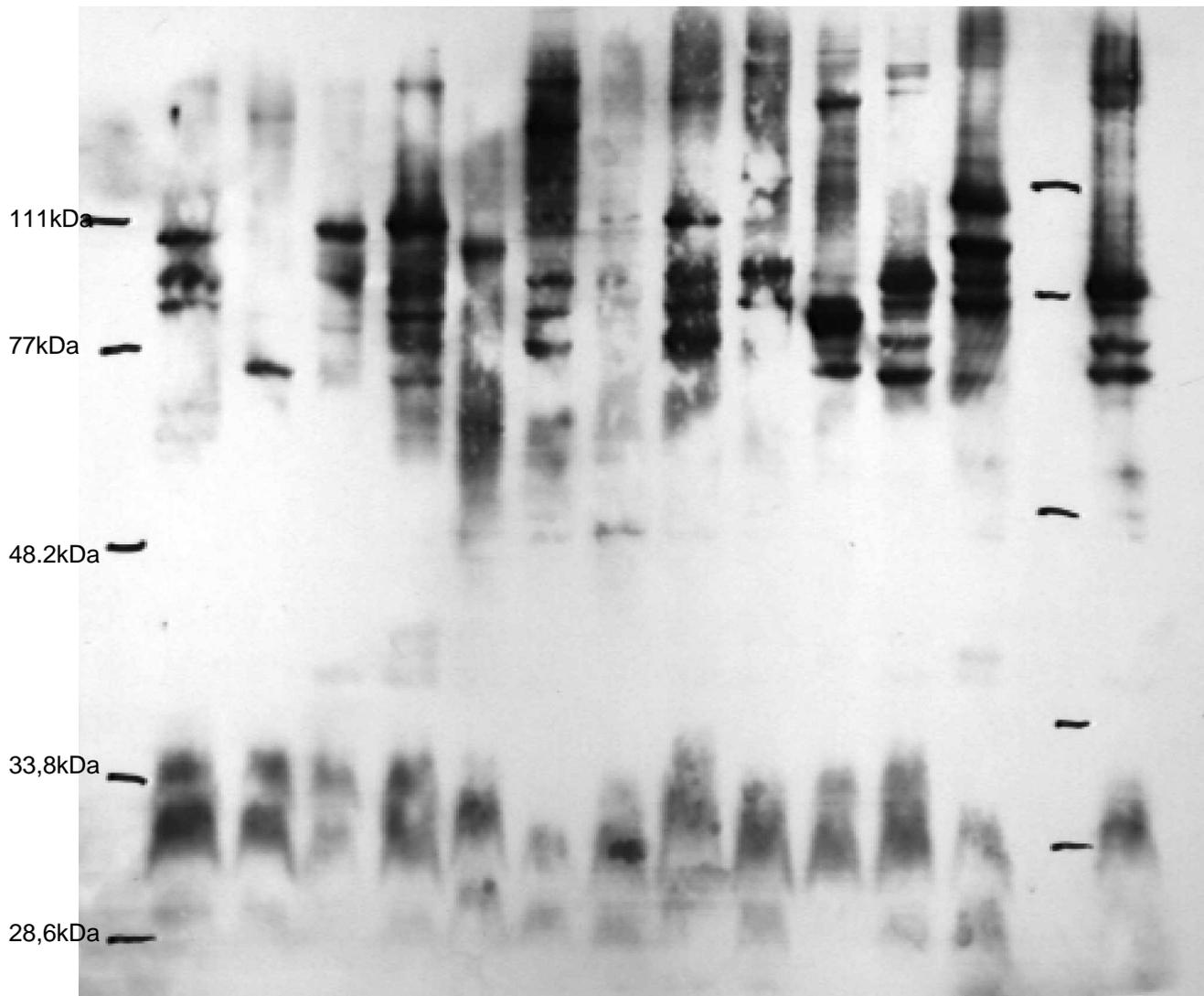


Abb.10. Westernblot mit 13 verschiedenen Stämmen und Serum aus einem Blutspenderpool als Primärantikörper. Es wurden verschiedene Stämme unterschiedlichen Serotyps aufgetragen und mit einer kommerziell erhältlichen, aufgereinigten IgG-Fraktion aus einem Blutspenderpool detektiert. Bei jedem Stamm werden Banden detektiert, jedoch sind die Bandenmuster jeweils unterschiedlich.

Um eindeutig spezifische IgG Bindungen an Pneumokokkenproteine darzustellen wurde der folgende Versuch durchgeführt: Ein Gesamtzelllysat von dem Pneumokokkenstamm, mit dem Ratten zuvor intrapulmonal infiziert worden waren, wurde im SDS-Page aufgetrennt und in üblicherweise geblottet. Als primäres Antiserum wurde ein Serum eines Patienten aus unserem Kollektiv (3.S.2), eines gesunden Probanden, ein Rattenserum vor Infektion und ein Rattenserum nach experimenteller Pneumokokkeninfektion verwendet (Abb. 11).

Gesamtzelllysat	Aa6	Aa6	Aa6	Aa6	Aa6
Primärantikörper	3.S.2	Proband	Ratte 7 Tage n.Inf.	Ratte vor Inf.	Ohne Serum
Sekundärantikörper	Anti-Human IgG von der Ziege	Anti-Human IgG von der Ziege	Anti-Ratten IgG vom Schaf	Anti-Ratten IgG vom Schaf	Anti-Ratten IgG vom Schaf

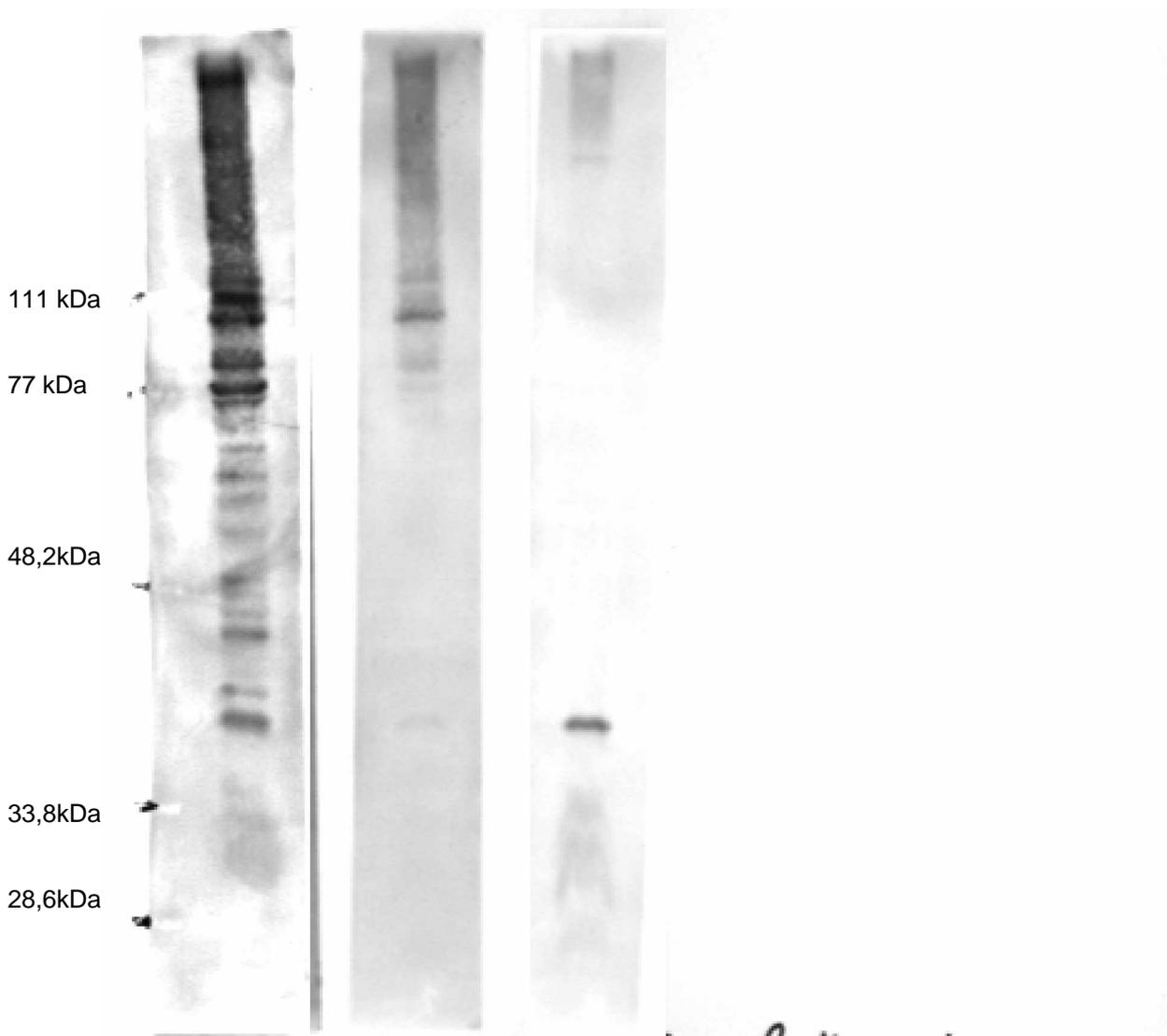


Abb. 11. Westernblot mit Rattenserum. Aufgetragen wurde Stamm Aa6. In der ersten Spur wurde mit Patientenserum detektiert, 2. Spur Serum eines gesunden Probanden, 3. Spur Rattenserum nach Infektion, 4. Spur Rattenserum vor Infektion (kommt nicht zur Darstellung)

Mit dem Patientenserum wurden viele Proteinbanden detektiert, mit dem Serum des gesunden Probanden einige, mit dem Rattenserum vor Infektion der Ratte wurden keine Banden detektiert, jedoch zwei deutliche Banden mit dem Rattenserum 7 Tage nach intrapulmonaler Infektion der Ratte. Diese neu entstandenen Banden sind wahrscheinlich auf spezifische Bindung von IgG an Pneumokokkenproteine zurückzuführen.

4.0. Diskussion

4.1. Diskussion der epidemiologischen Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die invasiven Infektionen mit *Streptococcus pneumoniae* im Einzugsgebiet der mikrobiologischen Diagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Universität Düsseldorf während des Zeitraums Oktober 1996 bis September 1997 zunächst epidemiologisch ausgewertet.

Die Altersverteilung in diesem Kollektiv entsprach weitgehend der für Pneumokokkeninfektion bekannten Verteilung: insbesondere Kleinkinder und Erwachsene jenseits des sechzigsten Lebensjahres waren vor allem von Pneumokokkeninfektionen betroffen. Bezüglich der Verteilung der Kapselserotypen gab es ebenfalls Übereinstimmung gegenüber anderen Erhebungen in Europa. Die in der epidemiologischen Untersuchung von Pneumokokkeninfektionen in den Niederlanden von Spanjaard et al. aufgestellte Reihenfolge bezüglich der Häufigkeit der Serotypen entspricht weitgehend der Serotypenreihenfolge, die in diesem Kollektiv festgestellt wurde.²⁴

19 Patienten (38,8%) waren älter als 65 Jahre. 60 % der Todesfälle (3 von 5 Patienten) entfielen ebenfalls auf diese Altersgruppe. In der Auswertung von Butler et al., der die Pneumokokkeninfektionen im Jahre 1997 in 7 Großstadtgebieten in den USA epidemiologisch untersuchte, entfielen 29% aller Pneumokokkeninfektionen auf diese Gruppe. Die Letalität war in seiner Erhebung in der Gruppe > 65 Jahre mit 55% etwas geringer.⁶⁵

Die Gruppe um Kirkpatrick, die 77 Fälle von Pneumokokkenmeningitis in England retrospektiv epidemiologisch untersuchte, verzeichnete eine Gesamtletalität von 13%. In diesem Untersuchungskollektiv war das Durchschnittsalter jedoch 19 Jahre. Der Anteil der >60 jährigen betrug

lediglich 15,6 %. Auch in diesem Untersuchungskollektiv war in dieser Altersgruppe eine signifikant höhere Letalität zu verzeichnen.⁶⁶ Hohes Lebensalter stellt in allen Untersuchungen ein Risikofaktor für Letalität durch Pneumokokkeninfektionen dar.

Bei 55% der Patienten in dem untersuchten Kollektiv war zumindest eine Vorerkrankung bzw. Begleiterkrankung genannt, die bekanntermaßen eine Prädisposition für Pneumokokkeninfektion darstellt. In der Auswertung von Kirkpatrick et al. waren es 53,2 % der Patienten. In der Studie von Davey et al. hatten ebenfalls 55 % der Patienten einen prädisponierenden Faktor.⁶⁷

In der 23-valenten Polysaccharidvakzine Pneumovax enthaltenen Kapseltypen sind aufgrund von epidemiologischen Untersuchungen in den USA zusammengestellt worden und sollen 85%-90% der Serotypen repräsentieren, die dort invasive Pneumokokkeninfektionen bei Erwachsenen und Kindern hervorrufen.⁶⁸ 83,3 % der im untersuchten Kollektiv enthaltenen Pneumokokkenstämme waren in der 23-valenten Polysaccharidvakzine Pneumovax® enthalten. In der Gruppe der > 60 jährigen waren lediglich 15 Stämme (65,3%) in Pneumovax® enthalten, was bedeuten würde, dass nach unseren Daten gerade in Altersgruppe, für die eine Impfung mit der 23-valenten Polysaccharidvakzine empfohlen wird, nur etwa zwei Drittel der gefährdeten durch die Impfung potentiell geschützt werden würden. Andere Studien jedoch zeigten, dass die in Pneumovax® enthaltenen Serogruppen für bis zu 92 % der Infektionen verantwortlich ist.^{69,70}

Auffällig ist, dass nur einer (12,5%) von den 8 Stämmen, die für die Pneumokokkeninfektionen bei Kindern in diesem Kollektiv verantwortlichen waren, in der neuen 7-valenten Konjugatvakzine Prevenar® enthalten ist. Aufgrund der geringen Anzahl der Fälle ist wohl kaum eine repräsentative Aussage möglich, jedoch ist diese Tendenz auch in anderen Erhebungen festzustellen. In der Untersuchung von Von Kries

et al., welche die durch die Konjugatvakzine vermeidbaren Pneumokokkeninfektionen bei deutschen Kindern untersuchten, wurde gezeigt, dass 52% der Serotypen, die diese Infektionen verursachten, in Prevenar® enthalten sind.⁷¹ In der Studie von Kaltoft et al., in welcher die invasiven Pneumokokkeninfektionen bei Kindern im Alter von 0-6 Jahren in Dänemark untersucht wurden, deckte der heptavalente Konjugatimpfstoff 60% der verantwortlichen Serotypen ab.⁷² Eine weitere Studie in Spanien zeigte, dass lediglich 34 % der bei Kindern Pneumonie verursachenden Stämme in Prevenar® enthalten sind.⁷³ Dies ist ein Punkt der weltweit kritisiert wird. Die in Prevenar® enthaltenen Serotypen deckt zwar einen Großteil der invasiven Stämme in den USA ab, häufig nicht aber die anderer Weltregionen.

4.2. Diskussion der experimentellen Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden Serumproben, die in der Akutphase sowie in der Rekonvaleszenzphase nach invasiver Pneumokokkeninfektion entnommen wurden, anhand von Westernblotanalysen auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen Proteinbestandteile von *Streptococcus pneumoniae* untersucht. Unabhängig davon zu welchem Zeitpunkt nach akuter Infektion die Seren entnommen wurden, fanden sich in allen Seren Antikörper der Klasse IgG, die mit einer Anzahl von Proteinbanden reagierten. Das im Westernblot erhaltene Bandenmuster war stammspezifisch und unabhängig vom Serotyp.

Renneberg et al., die Immunglobulin G Antikörper gegen Proteinantigene von *Streptococcus pneumoniae* bei gesunden Erwachsenen anhand von Westernblots untersuchten, sahen ebenfalls große Unterschiede bei den einzelnen Serotypen bezüglich Anzahl der Banden und Bandenmuster.⁷⁴ Padiukov et al., die Proteinpräparationen von drei verschiedenen Stämmen des *Streptococcus pneumoniae*, die verschiedenen Serotypen angehörten, durch Immunoblotting sowohl mit Poolseren von an Pneumokokkeninfektionen erkrankten Patienten, als auch durch individuelle Seren dieser Patienten untersuchten, fanden ebenfalls mehrere serologisch aktive Proteine.⁷⁵

Bei der Untersuchung der Gruppe um Renneberg wurde zugleich analysiert, ob eine Kovarianz zwischen der Anzahl der Proteinbanden und typspezifischer Antipolysaccharid-Antikörper sowie C-Polysaccharid-Antikörper existiert. Es zeigte sich eine offene Korrelation. Aufgrund dieser Tatsachen wurde vermutet, dass das Vorhandensein von Antikörpern gegen Proteinbestandteile des Pneumokokkus eine vorherige Exposition bzw. stattgefundene Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* anzeigt. Diese Vermutung wird durch unsere Ergebnisse gestützt.

Unter den Patienten in unserem Untersuchungskollektiv befanden sich zwei Serumpaare von Säuglingen, die innerhalb des ersten Lebensmonats eine Pneumokokkenmeningitis entwickelt hatten. In den früh entnommenen Seren (2. Lebensmonat, erste bzw. zweite Woche nach Beginn der Erkrankung) war die Anzahl der durch IgG erkannten Proteine mit dem Bandenmuster, das im Westernblot durch Seren von Erwachsenen erzeugt wurde, vergleichbar. Eine Verlaufskontrolle zeigte jedoch, dass 200 Tage nach Infektion die Anzahl der erkannten Proteine des Pneumokokkenstammes, der zu der Infektion im Säuglingsalter geführt hatte, deutlich abgenommen hatte. Dieses Phänomen war bei Patienten, die jenseits des ersten Lebensjahres die Pneumokokkenerkrankung durchlitten hatten, nicht zu sehen. Es liegt die Vermutung nahe, dass aus dem frühen Serum der Neugeborenen in erster Linie mütterliche Antikörper mit den Pneumokokkenproteinen reagierten.

Im untersuchten Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei Patienten jenseits des ersten Lebensjahres nahezu keine Veränderung bezüglich der Reaktivität zwischen relativ früh nach Diagnose der Pneumokokkeninfektion entnommenen Seren (in der Regel <14 Tage nach Infektion) und später (4 Wochen bis 6 Monate) nach Infektion entnommenen Seren. Widererwarten war es sogar so, dass durch die „frühen“ Seren, bis auf zwei Ausnahmen, geringfügig mehr Proteinbanden detektiert wurden als durch die „späteren“ Seren.

Wurden Seren von verschiedenen, nicht homologen Patienten für die Antigendetektion eines Stammes verwendet, so zeigte sich immer ein sehr ähnliches Bandenmuster. Wenn Seren gesunder Personen für die Antigendetektion verschiedener Stämme verwendet wurden, wurde ebenso eine deutliche Reaktivität der Pneumokokkenproteine mit dem IgG dieser Personen gefunden. Es zeigte sich ein Pneumokokkenstamm-spezifisches Bandenmuster, das unabhängig vom Serotyp war.

Aus diesen Ergebnissen ist zu entnehmen, dass in Seren von gesunden Personen eine Vielzahl von IgG enthalten sind, die sich gegen Proteinepitope von Pneumokokken richten.

Für diese Beobachtungen können zwei Erklärungsansätze diskutiert werden: Zum einen könnte dies, wie durch Renneberg et al. bei ihren Untersuchungen vermutet, aufgrund von spezifischen Antikörpern durch vorherige Exposition zustande gekommen sein.

Möglicherweise handelt es sich jedoch bei der detektierten Antigen-Antikörperbindung nicht unbedingt um eine ausschließliche spezifische Bindung von IgG. Möglicherweise besitzt *Streptococcus pneumoniae* ebenfalls die Fähigkeit zur unspezifischen Bindung, wie bereits für viele andere Bakterienspezies gezeigt:

Für Gruppe B Streptokokken zeigten Jurgens et al. 1987, dass das Cocytolysin dieser Bakterien unspezifisch über das Fc-Fragment IgG und IgM vieler Säuger und auch des Menschen binden kann.⁷⁶ Die oberflächlich gebundenen M und M-like Proteine des *Streptococcus pyogenes*, die die Eigenschaft der unspezifischen Immunglobulinbindung besitzen, sind seit längstem bekannt und am besten charakterisiert.⁷⁷

Medina et al. zeigten, dass das Fibronectin-Bindungsprotein I (Sfbl) des *Streptococcus pyogenes* ebenfalls in der Lage ist, humane Immunglobuline unspezifisch über Fc zu binden.⁷⁸ Dieselbe Gruppe zeigte im Jahre 2000, dass dieses Protein ebenfalls eine nichtimmune Interaktion mit dem F(ab) Fragment des Immunglobulin G eingehen kann.⁷⁹ Für einige Oberflächenproteine des *Escherichia coli* konnten ebenfalls unspezifische Bindungseigenschaften nachgewiesen werden.⁸⁰ Weiterhin konnten diese Eigenschaften für *Staphylococcus aureus* sowie Gruppe C und G Streptokokken gezeigt werden.⁸¹

Um der Fragestellung der unspezifischen Bindung von IgG durch Pneumokokkenproteine nachzugehen, wurden Proteinpräparationen von verschiedenen Pneumokokkenstämmen unterschiedlichen Serotyps anhand eines Serums im Westernblot untersucht, welches von einem Patienten

mit einem multiplen Myelom mit monoklonaler IgG-Bildung stammte. Bei dem Serum war davon auszugehen, dass der überwiegende Teil der IgG in diesem Serum vom Myelom stammt. Würden unspezifische IgG-Bindungen im Vordergrund stehen, müssten sich diese mit einem solchen Serum deutlich darstellen. Nach Auswertung der durchgeführten Westernblotanalysen ist zu vermuten, dass neben einer Bindung von Pneumokokkenantigen-spezifischen Bindung auch eine unspezifische IgG-Bindung bei Pneumokokken auch unter den gewählten denaturierenden Bedingungen festzustellen ist: Bei fast allen verwendeten Pneumokokkenstämmen stellten sich ein bis mehrere Proteinbanden deutlicher dar als es mit den Seren der an Pneumokokkeninfektionen Erkrankten der Fall war.

Neben der vermuteten unspezifischen IgG-Bindung, ist aber bei diesem Serum nicht auszuschließen, ob auch im Hintergrund spezifisch-bindende anti-Pneumokokken-IgG vorliegen. Um die Frage einer unspezifischen IgG-Bindung an Pneumokokkenprotein eindeutig zu klären, wäre es günstig, aufgereinigtes monoklonales IgG zu verwenden. Leider waren solche Präparationen zum Zeitpunkt der durchgeführten Untersuchungen nicht verfügbar.

Wir gehen davon aus, dass es sich bei den Westernblots mit Patienten- und Probandenseren um, eine Mischung von spezifischen und unspezifischen IgG-Proteinbindungen handelt. Dass nach Infektion es rasch zu einer Ausbildung von spezifischen IgG kommt, wurde in der vorliegenden Arbeit dadurch gezeigt, dass mit Serum von Ratten nach experimenteller Pneumokokkeninfektion eindeutig Proteinbanden im Westernblot dargestellt werden konnten, die mit Rattenserum vor Infektion nicht zur Darstellung kamen. Insbesondere kam besonders deutlich eine Bande bei ca. 38 kDa zur Darstellung. Muneimne et al, die die Antikörperantwort auf Pneumokokkenproteine in einem Rattenpneumoniemodell anhand von Westernblotanalysen untersuchten,

fanden ebenfalls in allen reaktiven Rattenseren nach intratrachealer Pneumokokkeninfektion eine deutliche Bandenbildung bei dieser Proteingröße.⁸²

Diese vor Ratteninfektion nicht dargestellte, jedoch nach Infektion deutlich zur Darstellung kommende Bande ist sehr wahrscheinlich auf spezifische Bindung von Ratten-IgG an Pneumokokkenproteine zurückzuführen.

5.0. Anhang

5.1. Tabelle 1: Serotyp des Kapselpolysaccharids der gesammelten Pneumokokkenstämme

Stamm- bezeichnung	Serotyp	Stamm- bezeichnung	Serotyp
1.L	9A	29.B	18F
2.L	11A	30.B	6A
3.B	1	31.B	14
4.B	4	33.B	3
5.T	10A	34.B	8
6.B	12F	35.B	1
7.B	14	36.B	7F
8.B	14	37.B	3
9.L	1	38.B	1
10.B	18B	39.B	19F
11.B	9V	40.B	18B
12.L	6B	41.B	6B
13.L	19.F	42.B	24F
14.B	23.F	43.B	3
15.B	6A	45.B	6B
16.B	5	46.B	4
18.B	7F	47.B	14
20.B	1	48.B	7F
23.B	1	49.B	23A
24.B	14	50.B	1
25.B	14	51.L	23A
26.B	9V	52.B	19F
27.B	33F	53.L	14
28B	18F	54.B	4

5.2. Tabelle 2: Gesammelte Seren

Serum- bezeichnung	Entnahmetag nach Diagnosestellung	Kate- gori	Serum- bezeichnung	Entnahmetag nach Diagnosestellung	Kate- gori
1.S	2	1	23.S.2	183	3
1.S.2	18	2	24.S	158	3
1.S.3	137	3	25.S	16	2
3.S	2	1	25.S.2	170	3
3.S.2	19	2	27.S	15	2
3.S.3	28	2	27.S.2	169	3
3.S.4	282	3	28.S	7	1
4.S	5	1	28.S.2	153	3
4.S.2	12	1	29.S	138	3
5.S	0	1	30.S	1	1
5.S.2	11	1	31.S	7	1
6.S	1	1	31.S.2	164	3
6.S.2	4	1	33.S	8	1
7.S	5	1	34.S	7	1
8.S	6	1	34.S.2	144	3
8.S.2	232	3	35.S	160	3
9.S	13	1	36.S	7	1
9.S.2	201	3	37.S	10	1
10.S	19	2	37.S.2	193	3
10.S.2	287	3	38.S	2	1
11.S	0	1	39.S	126	3
11.S.2	11	1	40.S	0	1
12.S	4	1	41.S	9	1
12.S.2	6	1	41.S.2	144	3
12.S.3	17	2	42.S	16	2
13.S	1	1	42.S.2	112	3
13.S.2	14	1	43.S	4	1
13.S.3	196	3	46.S	27	2
14.S	0	1	46.S.2	117	3
14.S.2	3	1	47.S	3	1
14.S.3	14	1	47.S.2	13	1
15.S	5	1	47.S.3	34	2
16.S	5	1	48.S	9	1
16.S.2	193	3	48.S.2	47	3
18.S	13	1	49.S	14	1
18.S.2	210	3	50.S	7	1
20.S	10	1	51.S	5	1
20.S.2	188	3	52.S	6	1
23.S	14	1	53.S	1	1
			54.S	7	1

6.0.Literaturverzeichnis

¹ B.M. Gray , G.M. Converse, and H.C. Dillon jr. 1980. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 month of life. J Infect Dis 142: 923- 933.

² R.B. Jonston jr. 1991: Phathogenesis of pneumococcal pneumonia. Rev Infect Dis 13(Suppl. 6): 509-517.

³ S. H. Gillespie 1989: Aspects of pneumococcal infection including bacterial virulence, host response and vaccination. J. Med Microbiol 28: 237-248.

⁴ R. F. Kornelisse, C. M. L. Westerbeek, A. B. Spoor, B. Van der Heijde, L. Spanjaard, H. J. Neijens, R. de Groot 1995: Pneumococcal meningitis in children: prognostic indicators and outcome. Clin Infect Dis, 21: 1390-1397.

⁵ G. A. W. Bruyn, H .P. H. Kremer, S. de Marie, G .W. Padberg, J. Hermanns, R. van Furth 1989: Clinical evaluation of pneumococcal meningitis in adults over a twelve year period. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 8: 695-700.

⁶ D. H. Sniadack, B. Schwartz, H. Lipman, J. Bogaerts, J. C. Buttler, R. Dagan, G. Echaniz-Aviliez, N. Lloyd-Evans, A. Fenoll, N. I. Girgis 1995. Potential interventions for the prevention of childhood pneumonia: geograhic and temporal differences in serotype and serogroup distribution of sterile site pneumococcal isolates from children-implication for vaccine strategies. Pediatr Infect Dis J, 14(6): 503-510.

⁷ J. C. Buttler, R. F. Breiman, H. B. Lipman, J. Hofmann, R. R. Facklam 1995: Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* infections among preschool children in the United States, 1978-1994: Implications for development of a conjugate vaccine. J Infect Dis 171 (4): 885-889.

⁸ S. V. Nielsen, J. Henrichsen 1992: Capsular types of *Streptococcus pneumoniae* isolated from blood and CSF during 1982-1987. Clin Infec. Dis; 15(5): 794-798

- ⁹ T. J. Marrie 1999: Pneumococcal Pneumonia: epidemiology and clinical features. *Semin Respir Infect* 14(3): 227-236
- ¹⁰ J. A. Brandenburg, T. J. Marrie, C. M. Coley, D. E. Singer, D. S. Obrowsky, W. N. Kapoor, M. J. Fine 2000: Clinical presentation, processes and outcomes of care for patients with pneumococcal pneumonia. *J Gen Intern Med* 15(9): 638-646
- ¹¹ K. Hansen, D. B. Singer 2001: Asplenic- hyposplenic overwhelming sepsis: postsplenectomy sepsis revisited. *Pediatr Dev Pathol* 4(2): 105-121
- ¹² P. Kalima, F. X. Emmanuel, T. Riordan 1999: Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* infections at the Edinburgh City Hospital. *Epidemiol Infect* 122 (2): 251-257
- ¹³ G. D. Overturf 1999: Infections and immunizations of children with sickle cell disease. *Adv Pediatr Infect Dis* 14: 191-218
- ¹⁴ J. Rossjohn, R. J. Gilbert, D. Crane, P. J. Morgan, T. J. Mitchell, A. J. Rowe, P. W. Andrew, J. C. Paton, R. K. Tweten, M. W. Parker 1998: The molecular mechanism of pneumolysin, a virulence factor from *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol* 27; 284(2): 449-461
- ¹⁵ M. E. Pichichero 2000: Recurrent and persistent otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 19(9): 911-916
- ¹⁶ B. R. Totapally, W. T. Walsh 1998: Pneumococcal bacteremia in childhood: a 6-year experience in a community hospital. *Chest* 113(5): 1207-1214
- ¹⁷ W. Krivit 1977: Overwhelming postsplenectomy Infektion. *Am J Hematol* 2(2): 193-201
- ¹⁸ D. M. Musher, I. Alexandraki, E. A. Graviss, N. Yanbeiy, A. Eid, L. A. Inderias, H. M. Phan, E. Salomon 2000: Bacteremic and nonbacteremic pneumococcal pneumonia. A prospective study. *Medicine (Baltimore)* 79(4): 210-221
- ¹⁹ R. von Moos, R. Inderbitzi B. Risti, B. Carduff 2000: Das Perikardempyem als seltene Komplikation der Pneumokokken-Pneumonie. *Sweiz Med Wochenschr* 130(36): 1259-1264

- ²⁰ J. B. Rubins, D. Charboneau, C. Fasching, A. M. Berry, J. C. Paton, J. E. Alexander, P. W. Andrew, T. J. Mitchell, E. N. Janoff 1996: Distinct roles for pneumolysin's cytotoxic and complement activities in the pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 153(4 Pt 1) 1339-1346
- ²¹ O. T. Avery, M. Heidelberger 1925: Immunological relationships of cell constituents of pneumococcus. *J Exp Med* 42: 367-376
- ²² O. T. Avery, H. J. Morgan 1925: Immunological reactions of the isolated carbohydrate and protein of pneumococcus. *J Exp Med* 42: 347-353
- ²³ E. Tuomanen, R. Rick, O. Zack 1987: Induction of pulmonary inflammation by component of the pneumococcal cell surface. *Am Rev Respir Dis* 135(4): 869-874
- ²⁴ L. Spanjaard, A. van der Ende, H. Rumke, J. Dankert, L. van Alpen 2000: Epidemiology of meningitis and bacteremia due to streptococcus pneumoniae in The Netherlands. *Acta Paediatr Suppl* 89(435) 22-26
- ²⁵ D. Fasquelle, M. Alami, G. Dumas, F. Fockenier, J. P. Sibille 1998: Epidemiology of sinusitis seen in hospitalized people. Apropos of episodes of sinusitis among 72 patients between 1993 und 1996. *Pathol Biol(Paris)* 46(10): 751-759
- ²⁶ W. Sokol 2001: Epidemiology of Sinusitis in the primary care setting: results from the 1999-2000 respiratory surveillance program. *Am J med* 111 Suppl 9A: 19-24
- ²⁷ J. Chan, J. Hadley 2001: The microbiology of chronic rhinosinusitis: results of a community surveillance study. *Ear Nose Throat J* 80(3): 143-145
- ²⁸ A. M. Berry, R. A. Lock, D. Hansman J. C. Paton 1989: Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 57(8): 2324-2330
- ²⁹ J .B. Rubins, E. N. Janoff 1998: Pneumolysin: a multifunctional pneumococcal virulence factor. *J Lab Clin Med* 131(1): 21- 27
- ³⁰ J. B. Rubins, D. Charboneau, J. C. Paton, T. J. Mitchell, P. W. Andrew,

E. N. Janoff 1995: Dual function of pneumolysin in the early pathogenesis of murine pneumococcal pneumonia. *J Clin Invest* 95(1): 142-150

³¹ T. J. Mitchell, P. W. Andrew 1997: Biological properties of pneumolysin. *Bicrob Drug Resist* 3(1): 19-26

³² S. Nachman, S. Kim, J. King, E.J. Abrams, D. Margolis, A. Petru, W. Shearer, E. Smith, J. Moye, S. Blanchard, E. Hawkins, P. Bouquin, P. Vink, M. Benson, S. Estep, F. Malinowski 2003: Safety and immunogenicity of heptavalent Pneumococcal conjugate Vaccine in infants with human immunodeficiency virus type 1 infection. *Pediatr* (112) 66-73

³³ W. R. Short, A. R. Tunkel 2000: Changing epidemiology of bacterial meningitis in the United States. *Curr Infect Dis Rep* 2(4): 327-331

³⁴ C. Ziebold, R. van Kries, A. Siedler, H. J. Schmitt 2000: Eoidemiology of pneumococcal disease in children in Germany. *Acta Pediatr Suppl* 89(435): 17-21

³⁵ R. R. Reinert, A. Al- Lahham, M. Lemperle, C. Tenholte, C. Briefs, S. Haupt, H. H. Gerards, R. Lutticken 2002: Emergence of macrolide and penicillin resistance among invasive pneumococcal isolates in Germany. *J Antimicrobiol Chemother.* 49(1): 61-68

³⁶ G. Zysk, B. K. Schneider-Wald, J. H. Hwang, L. Bejo, K. S. Kim, T. J. Mitchell, R. Hakenbeck, H. P. Heinz 2001: Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by streptococcus pneumoniae. *Infect Immun* 69(2): 845-852

³⁷ J. Linares, A. Dominguez: Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Spain: An overview of the 1990´s. Alexander Tomasz 2000, *Streptococcus pneumoniae*: 399-407

G. Scott Giebink 1999: Otitis media: The chinchilla model. *Microbiol Drug Resistance* Vol 5, No. 1,

³⁸ G. Scott Giebink 1999: Otitis media: the chinchilla model. *Microbiol Drug Resistance* Vol 5, No. 1,

³⁹ C. Feldmann, T. J. Mitchell, P. W. Andrew, G. J. Boulnois, R. C. Read,

H. C. Todd, P. J. Cole, R. Wilson 1990: The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium in vitro. *Microb Patogen* 9: 275-284

⁴⁰ S. Houldsworth, P. W. Andrew, T. J. Mitchell 1994: Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1-beta by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 62: 1501-1503

⁴¹ W. Y. Wong, G. D. Overturf, D. E. Powars 1992: Infection caused by *Streptococcus pneumoniae* in children with sickle cell disease: epidemiology, immunologic mechanisms, prophylaxis and vaccination. *Clin Infect* 14(5): 1124-1136

⁴² D. W. Wara 1981: Host defense against *Streptococcus pneumoniae*: the role of the spleen. *Rev Infect* 3(2): 299-309

⁴³ D. E. Briles, S. K. Hollingshead, E. Switalo, A. Brooks-Walter, A. Szalai, A. Virolainen, L. S. Mc Daniel, K. A. Benton, P. C. Aerts, H. van Dijk, M. J. Crain 2000: Pneumococcal Proteins PspA und PspC: their potential for use as vaccine. *Streptococcus pneumoniae*. 253-260

⁴⁴ A. H. Tu, R. L. Fulgham, M. A. Mclvory, D. E. Briles, A. J. Szalai 1999: Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*

⁴⁵ E. Varon 2001: Severe pneumococcal infections virulence aspects. *Arch Pediatr* 8 Suppl. 4: 752- 756

⁴⁶ C. M. MacLeod, R. G. Hodges, M. Heidelberger, W. G. Bernhard 1945: Prevention of pneumococcal pneumonia by immunization with specific capsular polysaccharides. *J Exp Med* 82: 445-465

⁴⁷ H. Georges, O. Leroy, C. Vandebussche, B. Guery, S. Alfandari, L. Tronchon, G. Beaucaire 1999: Epidemiological features and prognosis of severe community acquired pneumococcal pneumonia. *Intensive Care Med* 25(2): 198-206

⁴⁸ M. Watari, M. Ohe, E. Kunimoto, R. Tsukamoto, H. Komagata 2000: Community acquired pneumococcal pneumonia: a comparative study of bacteremic and nonbacteremic patients. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 38(4): 253-258

- ⁴⁹ S. J. Korn, S. M. Raufi, E. J. K. Rosenthal, P. M. Shah 2000: Susceptibility pattern of *Streptococcus pneumoniae* in outpatients in Germany. *Clin Microbiol and Inf* 6(10): 563
- ⁵⁰ S. I. Bandak, M. R. Turnak, B. S. Allen, L. D. Bolzon, D. A. Preston 2000: Assesement of susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to cefaclor and loracarbef in 13 countries. *J Chemother* 12(4): 299-305.
- ⁵¹ D. Hoban, K. Waites, D. Felmingham 2003: Antimicrobial susceptibility of community- acquired respiratory tract pathogens in North America in 1999-2000: findings of the PROTECT surveillance study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 45(4): 251-259
- ⁵³ J. McCullers, E. I. Tuomanen 2001: Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Front in Bios* 6, 877-889
- ⁵⁴ M. L. Joloba, A. Windau, S. Bajaksouzian, P. C. Appelbaum, W. P. Hausdorff, M. R. Jacobs 2001: Pneumococcal conjugate vaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates and the antimicrobial suceptibility of such isolates in children with otitis media. *Clin Infect Dis* 33(9): 1489-1494
- ⁵⁵ M. A. Breukels, A. Zandvoort, G. P. van den Dobbelsteen, A. van den Muijsenberg, M. E. Lodewijk, M. Beurret, P. A. Klok, W. Timens, G.T. Rijkers 2001: Pneumococcal conjugate vaccine overcome splenic dependency of antibody response to pneumococcal saccharides. *Infect Immun* 69(12):7583-7587
- ⁵⁶ M. Kilian, J. Reinholdt, H. Lomholt, K. Poulsen, E. V. Frandsen 1996: Biological significance of Ig A1 proteases in bacterial colonisation and pathogenesis: Critical evaluation of experimental evidence. *APMIS* 104(5) 321-338
- ⁵⁷ A. R. Holmes, R. McNab, K. W. Millsap, M. Rohde, S. Hammerschmidt, J. L. Mawdsley, H. F. Jenkinson 2001:The *pavA* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol Microbiol* 41(6): 1395-1408

- ⁵⁸ S. Hammerschmidt, G. Bethe, P. H. Remane, G. S. Chhatwal 1999: Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 67(4): 1683- 1687
- ⁵⁹ L. Steneberg, P. O´Toole, G. Lindahl 1992: Many group A streptococcal strains express two different immunoglobulin-binding proteins, encoded by closely linked genes: characterization of the proteins, expressed by four strains of different M-type. *Mol Microbiol* 6(9): 1185-1194
- ⁶⁰ V. Katerov, C. Schalen, A.pA. Totolian 1994: M-Like Immunoglobulin-binding Protein of *Streptococcus pyogenes* Type M15. *Current Microbiol* 29: 31-36
- ⁶¹ A. Podbielski, N. Schnitzler, P. Behys, M. D. Boyle 1996: M-related protein (mrp) contributes to group A streptococcal resistance to phagocytosis by human granulocytes
- ⁶² E. Medina, G. Molinari, M. Rohde, B. Haase, G. S. Chhatwal, C. A. Guzman 1999: Fc-mediated nonspecific binding between fibronectin binding protein I of *Streptococcus pyogenes* and human immunoglobulins. *J Immunol* 15;163(6): 3396-3402
- ⁶³ L. Stenberg, P. W. O´Toole, J. Mestecky, G. Lindahl 1994: Molecular characterization of protein Sir, a streptococcal cell surface protein that binds both immunoglobulin A and immunoglobulin G. *J Biol Chem* 269(18):13458-13464
- ⁶⁴ J. Sambrook, 1989: *Molecular cloning: a laboratory manual-2nd ed.*, 18.47-18.54
- ⁶⁵ J. C. Butler, A. Schuchat 1999: Epidemiology of pneumococcal infections in the elderly. *Drugs and Aging* 15(1): 11-19
- ⁶⁶ B. Kirkpatrick, D. S. Reeves, A. P. McGowan 1994: A review of the clinical presentation, laboratory features, antimicrobial therapy and outcome of 77 episodes of pneumococcal meningitis occurring in children and adults. *J Infect* (24) 171-182
- ⁶⁷ P. G. Davey, J. K. Cruikshank, I. C. McManus, B. Mahood, M. H. Snow, A. M. Geddes 1982: Bacterial meningitis – ten years experience. *J Hyg Camp* 88: 383-401

- ⁶⁸ J. C. Butler, E. D. Shapiro, G. M. Carlone 1999: Pneumococcal vaccines: History, current status, and future directions. *Am J Med* 107: 69-76
- ⁶⁹ H. B. Konradsen, M. S. Kalsoft 2002: Invasive pneumococcal infections in Denmark from 1995 to 1999; epidemiology, serotypes and resistance. *Clin Diagn Lab Immunol* 9(2): 358-365
- ⁷⁰ D. Esel, B. Sumerkan, S. Kocagöz 2001: Epidemiology of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates in Kayseri, Turkey. *Clin Microbiol Infect* 7(10): 548-552
- ⁷¹ R. von Kries, A. Siedler, H. J. Schmitt, R. R. Reinert 2000: Proportion of invasive pneumococcal infections in German children preventable by pneumococcal conjugate vaccines. *Clin Infect Dis* 31: 482-487
- ⁷² M.S. Kalsoft, N. Zeuthen, H.B. Konradsen 2000: Epidemiology of invasive pneumococcal infections in children aged 0-6 years in Denmark: a 19-year nationwide surveillance study. *Acta Paediatr Suppl* 89(435): 3-10
- ⁷³ V. Pinedas Solas, A. Perez Benito, M. Domingo Puiggros, H. Larramona Carrera, F. Segura Porta, D. Fontanals Aymerich 2002: Bacteremic pneumococcal pneumonia. *An Esp Paediatr*; 57(5): 408-413
- ⁷⁴ J. Renneberg, M. Svinhufvud, K. Prellner, P. Christensen 1991: Western blot analysis of immunoglobulin G antibodies to pneumococcal protein antigens in healthy adults. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 10: 73-76
- ⁷⁵ L. N. Pediukov, N. L. Pugacheva 1995: The protein antigens of *Streptococcus pneumoniae*. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* (2): 26-30
- ⁷⁶ D. Jurgens, B. Sterzik, F. J. Fehrenbach 1987: Unspecific binding of group B streptococcal coxylolysin (CAMP factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity. *J Exp Med* ; 165(3): 720-732
- ⁷⁷ P. O'Toole, L. Stenberg, M. Rissler, G. Lindendahl 1992: Two major classes in the M protein family in group A streptococci. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8661-8665
- ⁷⁸ E. Medina, G. Molinari, M. Rohde, B. Haase, G. S. Chhatwal, C. A. Guzman 1999: Fc-mediated nonspecific binding between fibronectin-binding protein I of *Streptococcus pyogenes* and human immunoglobulins. *J Immunol* 163(6): 3396-3402

- ⁷⁹ E. Medina, K. Schulze, G. S. Chhatwal, C. A. Guzmán 2000: Nonimmun interaction of the SfbI protein of *Streptococcus pyogenes* with the immunoglobulin G F(ab')₂ fragment. *Infect Immun*: 68(8): 4786-4788
- ⁸⁰ C. H. Sandt, C. W. Hill 2001: Nonimmune binding of human immunoglobulin A (IgA) and IgG Fc by distinct sequence segments of the Eib F cell surface protein of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 69(12): 7293-7303
- ⁸¹ M. Erntell, E. B. Myhre, G. Kronvall 1986: Non-Immune F(ab')₂- and Fc-mediated interactions of mammalian immunoglobulins with *S. Aureus* and group C and G streptococci. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand (B)* 94(6): 377-385
- ⁸² H. Mouneimne, M. Juvin, J. L. Beretti, E. Azoulay-Dupuis, E. Valle, P. Geslin, P. Petitpretz, P. Berche, J. L. Gaillard 1997: Westernblot analysis of antibody response to pneumococcal protein antigens in a murine model of pneumonia. *Clin Diagn Lab Immunol* (6): 778-782

7.0. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. H. P. Heinz danke ich für die Überlassung des Themas sowie für seine Ratschläge und die stetige Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. med. Gregor Zysk für die sehr gute Betreuung und Begleitung, für die vielfältigen Anregungen und die ständige Motivation bei der Erstellung dieser Dissertation .

Mein Dank gilt auch Frau Gaby Zysk, die die Serotypisierung der Pneumokokkenstämme am nationalen Referenzzentrum für Streptokokken am Institut für medizinische Mikrobiologie der RWTH Aachen durchgeführt hat und mir stets mit Rat und Hilfe bei der Durchführung der experimentellen Untersuchungen zur Seite stand.

Ebenso danke ich Herrn Winni Schwippert für die tatkräftige Unterstützung bei den experimentellen Untersuchungen.

Abschließend möchte ich allen Freunden danken, die auf diese oder jene Weise bei der Erstellung dieser Dissertation mir geholfen haben.

8.0. Lebenslauf

Name: Mukaddes Öksüz
Geburtsdatum: 20. März 1972
Geburtsort: Rize, Türkei

Anschrift: Suitbertusstr. 16
40223 Düsseldorf

Schulbesuch: August 1979- Juli 1983
Grundschule Sandberg in Monheim am Rhein
August 1983 – Juni 1992
Otto-Hahn-Gymnasium in Monheim am Rhein
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung: September 1992 – September 1993
Schule für Metalltechnik und Chemie in
Düsseldorf
Ausbildung zur Chemisch Technischen
Assistentin

Studium: Oktober 1993 – Mai 2000
Studium der Humanmedizin an der Heinrich
Heine Universität Düsseldorf

Beruflicher Werdegang: Juli 2000 – Dezember 2001
Ärztin im Praktikum in der Frauenklinik des
Evangelischen Krankenhauses Bethesda zu
Duisburg
Januar 2002 – August 2002
Assistenzärztin in der Frauenklinik des Ev.
Krankenhauses Bethesda zu Duisburg
Seit August 2002
Assistenzärztin in der Frauenklinik des
Klinikum Krefeld

9.0. Zusammenfassung

Die septikämischen Pneumokokkeninfektionen im Einzugsgebiet der medizinischen Mikrobiologie während des Zeitraums von einem Jahr sollten im Hinblick auf Epidemiologie und serologische Immunantwort der betroffenen Patienten auf Proteinbestandteile des *Streptococcus pneumoniae* untersucht und ausgewertet werden.

Dafür wurden die Pneumokokkenstämme, die die Erkrankung verursacht hatten, aus Blut oder Liquor, welches zur Diagnostik der medizinischen Mikrobiologie zugesandt wurde, isoliert und im nationalen Referenzzentrum am Institut für medizinische Mikrobiologie in Aachen serotypisiert.

Zur Untersuchung der Immunantwort wurden Seren, die zu verschiedenen Zeiten nach Erregerisolierung gewonnen wurden, gesammelt.

Für die epidemiologische Auswertung wurden die Entlassungsberichte der Patienten aus den jeweiligen Krankenhäusern besorgt.

Die Immunantwort wurde anhand von Westernblots untersucht.

Dabei zeigte sich, dass Seren von gesunden Erwachsenen eine Anzahl gegen verschiedene Proteinepitope von Pneumokokken gerichtete IgG enthielten. Es zeigte sich weiterhin, dass sich das Muster der nachweisbaren IgG nach systemischer Pneumokokkeninfektion nicht wesentlich änderte. Verschiedene Pneumokokkenstämme wiesen ein unterschiedliches Antigenpektrum auf, das unabhängig vom Serotyp war. Im Laufe der Untersuchungen mehrten sich Hinweise für das Vorhandensein von unspezifisch IgG bindenden Proteinantigenen bei *Streptococcus pneumoniae*.

Hiermit bestätige ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe

Düsseldorf, 15.09.2003

Mukaddes Öksüz
