

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität Tübingen**

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth

**Grampositive, katalasenegative Kokken in der
Rachenschleimhaut Gesunder**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
TATJANA ZUKUNFT
aus Balingen**

2005

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. U. Schumacher

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. B. Neumeister

Für Jörg.

1	Einleitung.....	1
1.1	Bakterienflora von Haut und Schleimhäuten	1
1.1.1	Grundlagen	1
1.1.2	Die Rolle der Normalflora bei Gesunden.....	1
1.1.3	Die Zusammensetzung der Normalflora von Mundhöhle und Rachen	3
1.2	Die Familie der <i>Streptococcaceae</i>	4
1.2.1	Die Gattung <i>Streptococcus</i>	7
1.2.2	Die Gruppe der nicht- β -hämolisierenden Arten	9
1.2.2.1	Die Gattungen <i>Abiotrophia</i> und <i>Granulicatella</i>	9
1.2.2.2	Die Gattungen <i>Aerococcus</i> und <i>Helcococcus</i>	10
1.2.2.3	Die Gattung <i>Gemella</i>	10
1.2.2.4	Neuere Gattungen.....	11
1.3	Antibiotikaresistenz	13
1.4	Fragestellung.....	14
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Versuchspersonen	15
2.1.1	Gruppeneinteilung.....	15
2.1.2	Vorbedingungen.....	15
2.2	Probenentnahme.....	16
2.3	Probenverarbeitung.....	16
2.4	Identifizierung.....	17
2.4.1	Gewinnung von Reinkulturen	17
2.4.2	Orientierende Identifizierung: Grampräparat und Katalase	17
2.4.3	Identifizierung.....	18
2.4.3.1	Pyrrolidonyl-Arylamidase (PYR) und Leucin-Arylamidase (LAP).....	19
2.4.3.2	Wachstum in 6,5% NaCl-Lösung, bei 10°C und 45°C.....	20
2.4.3.3	Äskulin-Reaktion	20
2.4.3.4	Identifizierungssystem api 20 STREP	21
2.4.3.5	Dextran- und Levanproduktion.....	23

2.4.3.6	Säurebildung aus Salicin.....	23
2.4.4	Penicillinempfindlichkeit	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Gattungen.....	25
3.2	Keimspektrum und Stammvielfalt.....	25
3.3	Trägerrate.....	27
3.4	Keimspektrum und Trägerrate (geschlechtsspezifisch).....	28
3.5	Keimspektrum und Trägerrate (altersabhängig).....	29
3.6	Schlüsselreaktionen	30
3.7	Penicillinempfindlichkeit	31
4	Diskussion	32
4.1	Zusammensetzung der Rachenflora	32
4.2	Streptokokken der Normalflora: ein zweiseitiges Phänomen.....	33
4.3	Alters- und geschlechtsabhängige Entwicklung des Keimspektrums .	36
4.4	Beurteilung	37
4.5	Methodenkritik	38
4.6	API 20 STREP im Vergleich mit der Referenzmethode bei den Tests PYR/LAP	40
4.7	Penicillinempfindlichkeit	40
5	Zusammenfassung	42
6	Literatur	43
7	Anhang	55
7.1	Probandendaten.....	55
7.2	Nährmedien.....	55
7.2.1	Kaninchenblutagar (KBA).....	55
7.2.2	Schafsblutagar (SBA).....	55
7.2.3	Brain-Heart-Infusion-Agar (BHIA).....	56
7.2.4	Heart-Infusion-Bouillon (HIB)	56
7.2.5	Enterococcusel-Agar (ECA)	56
7.2.6	Dextranagar (DXA).....	57

1 EINLEITUNG

1.1 Bakterienflora von Haut und Schleimhäuten

1.1.1 Grundlagen

Den Eingang des Verdauungsapparates bildet die Mundhöhle. Die Mundschleimhaut besteht aus mehrschichtig unverhorntem Plattenepithel. Der Rachen ist ein 12-15 cm langer Schlauch, der gleichzeitig Mundhöhle und Ösophagus sowie Nasenhöhle und Kehlkopf verbindet. Seine epitheliale Auskleidung zeigt Übergänge zwischen mehrschichtig unverhorntem Plattenepithel oralwärts, mehrschichtigem Flimmerepithel laryngeal- und mehrreihigem (respiratorischem) Flimmerepithel tracheawärts. Am Ringknorpel beginnt die Trachea. Der untere Respirationstrakt, das Bronchialgebiet und die Alveolen sind in der Regel keimfrei, ebenso die Nasennebenhöhlen. Hierfür sind strukturelle (Flimmerepithel) und immunologische Faktoren verantwortlich. Im Gegensatz dazu weisen Mundhöhle und Rachen eine dichte bakterielle Besiedelung auf. In 1 ml Speichel befinden sich etwa 10^9 Mikroorganismen. Dabei wirkt sich das Vorhandensein verschiedener Epithelarten auf die Zusammensetzung der jeweiligen Bakterienflora aus (BRANDIS H. und SCHAAL K.P.1988).

1.1.2 Die Rolle der Normalflora bei Gesunden

Eine Reihe von Mikroorganismen hat sich darauf spezialisiert, auf der Haut oder den Schleimhäuten des Menschen zu leben, ohne Infektionen zu verursachen. Diese „Kommensalen“ bilden die sogenannte Normal- oder Standortflora. Bei

intakten Schutzeinrichtungen sind die Bakterien der Normalflora für den Träger apathogen.

Tritt eine Schwächung der natürlichen Resistenz- oder Immunitätslage des Wirtes ein, so vermögen bestimmte Spezies jedoch eine Infektion auszulösen. Sie nutzen die Störung des Gleichgewichts aus, um sich über das physiologische Maß hinaus zu vermehren oder in Körperregionen vorzudringen, die sonst keimfrei sind. Man bezeichnet solche Bakterien daher als opportunistische Krankheitserreger oder als fakultativ pathogen. Infektionen, die von Bakterien der individuellen Normalflora ausgehen, werden als endogene Infektion bezeichnet. Eine Sonderstellung weisen Bakterien wie *Staphylococcus aureus*, β -hämolyisierende Vertreter der Gattung *Streptococcus*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae* und Vertreter der Gattung *Salmonella* auf, die als „prinzipiell pathogen“ gelten, sich aber unter bestimmten Bedingungen vermehren können, ohne zu einer Erkrankung ihres Wirtes zu führen. Menschen, die solche Bakterienbesiedelungen aufweisen, nennt man Keimträger. Erreger, die in jedem Fall eine Infektionskrankheit hervorrufen werden dagegen als „strikt pathogen“ bezeichnet. (HAHN H. und BRANDIS H. 1988; MACKOWIAK P.A. 1982; SHARP S.E. 1999).

Die Normalflora wird auch „residente Flora“ genannt, da die ihr angehörenden Spezies ein spezielles Haftvermögen (Adhäsion) für das besiedelte Epithel entwickelt haben. (ANDERSSON B. et al. 1988; BEACHEY E.H. 1981; FALKOW S. 1990; HASTY D.L. et al. 1992; JENKINSON H.F. und LAMONT R.J. 1997; VON HUNOLSTEIN C. et al. 1993) Dadurch sind sie beständig und können durch Waschen, Zähneputzen oder Spülungen nur wenig reduziert werden (BOWDEN G.H. und HAMILTON I.R. 1998). Die Bakterien der Normalflora erfüllen eine Vielzahl an Funktionen für den Makroorganismus. So verstoffwechseln manche Bakterienarten z.B. Körperausscheidungen wie Schweiß und sind durch Produktion von Milchsäure und Propionsäure am Aufbau des Säureschutzmantels der Haut beteiligt. Die Präsenz der Normalflora soll durch zahlreiche indirekte und direkte Mechanismen wie z.B. der Produktion von Bacteriocinen einer Besiedelung und Ausbreitung pathogener Keime entgegen wirken (MACKOWIAK P.A. 1982; NAIR R.G. et al. 2001). Sie

dient also in erster Linie als Schutz des Wirtes vor exogenen Infektionen. Zu den Adhäsion vermittelnden bakteriellen Strukturen und Mechanismen (Adhäsinen) werden Fimbrien bzw. Pili (SHARP S.E. 1999; OLIGINO L. und FIVES-TAYLOR P. 1993), Geißeln, Lipoteichonsäure (NEALON T.J. und MATTINGLY S.J. 1984), Kohlenhydratstrukturen (LIUKKONEN J. et al 1992) und verschiedene Proteinmoleküle der Bakterienoberfläche gezählt (HASTY D.L. et al. 1992; LAMONT R.J. et al. 1988; TART R.C. und VAN DE RIJN I. 1993; TYLEWSKA S. und HRYNIEWICZ W. 1987; VALENTIN-WEIGAND P. et al. 1993; WANG J.R. und STINSON M.W. 1994). Adhäsine können Enzymaktivität zeigen, welche als Mediator zwischen Bakterien- und Wirtszelle wirkt (SHARP S.E. 1999; VACCA-SMITH A.M. et al. 1994). Als Rezeptoren für bakterielle Adhäsine fungieren in erster Linie Glykokonjugate der Epithelien, Glykolipide und Glykoproteine, oder Proteine der extrazellulären Matrix, z.B. Fibronectin (JOH D. et al. 1999), Kollagen (SWITALSKI L.M. et al. 1993) und Laminin (SPELLERBERG B. et al. 1999).

1.1.3 Die Zusammensetzung der Normalflora von Mundhöhle und Rachen

Bei der Geburt ist die Mundhöhle keimfrei, jedoch etabliert sich bereits wenige Tage nach der Geburt eine im wesentlichen von nicht-hämolyisierenden und vergrünenden Streptokokken dominierte Flora auf den Schleimhautoberflächen (FRANSEN E.V. et al 1991). Bereits im frühen Lebensalter erweitert sich die Normalflora durch weitere Bakterienarten, insbesondere *Haemophilus*- und apathogene *Neisseria*-Arten, Vertreter der Familie der *Micrococcaceae*, apathogene Vertreter der Gattung *Corynebacterium* und *Campylobacter sputorum*. Während der Zahnung nimmt der Anteil der obligaten Anaerobier zu, die dann quantitativ stark überwiegen. Hier sind vor allem gramnegative Stäbchen der Gattung *Bacteroides* und *Fusobacterium* sowie grampositive Stäbchen der Genera *Actinomyces* und *Bifidobacterium* zu nennen.

Desweiteren gehören verschiedene Arten von *Mycoplasma* ebenso zur normalen Mundflora, wie einige apathogene Protozoen (Amöben und Trichomonaden, z.B. *Trichomonas tenax*), oder Sprosspilze, z.B. *Candida albicans*.

Auch im oberen Respirationstrakt (Nase, Epipharynx) etabliert sich kurz nach der Geburt eine überwiegend von Vertretern der *Micrococcaceae* und *Streptococcaceae*, später auch *Corynebacterium* geprägte Normalflora. Zu weiteren charakteristischen Komponenten zählen *Prevotella*, *Porphyromonas* (STINSON M.W. et al. 1991), *Branhamella*, *Neisseria* und *Haemophilus*-Arten. Diese typische Zusammensetzung der Normalflora kann in bestimmten Situationen kurzfristige Änderungen erfahren. So stieg bei Kindern nach einer Lebertransplantation der Anteil und die Anzahl bestimmter Streptokokken (*Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis* und *Streptococcus gordonii*) signifikant an. Nach 100 Tagen hatte sich jedoch das alte Gleichgewicht wieder eingestellt (SHEEHY E.C. et al. 2000).

1.2 Die Familie der *Streptococcaceae*

Bis in die 80er Jahre des vorigen Jahrhunderts wurden nahezu alle grampositiven katalasen negativen Kokken den Streptokokken zugeordnet. Der Familien- und Gattungsbegriff Streptokokken bezeichnete daher eine überaus heterogene und unübersichtliche Mischung sehr unterschiedlicher Bakterienarten. Bakterien der Familie der *Streptococcaceae* sind grampositiv, oxidase- und katalasen negativ, fakultativ anaerob oder strikt aerob. Eine der ersten grundlegenden taxonomischen Einteilungen der Streptokokken wurde 1937 durch Sherman entwickelt (SHERMAN JM 1937). Hier wurden die Streptokokken nach ihrem Hämolyseverhalten, Lancefield-Antigenen und wenigen phänotypischen Test in vier Gruppen eingeteilt:

1. Pyogene Gruppe
2. Vergrünende Gruppe
3. Milchsäure-Gruppe
4. Enterokokken.

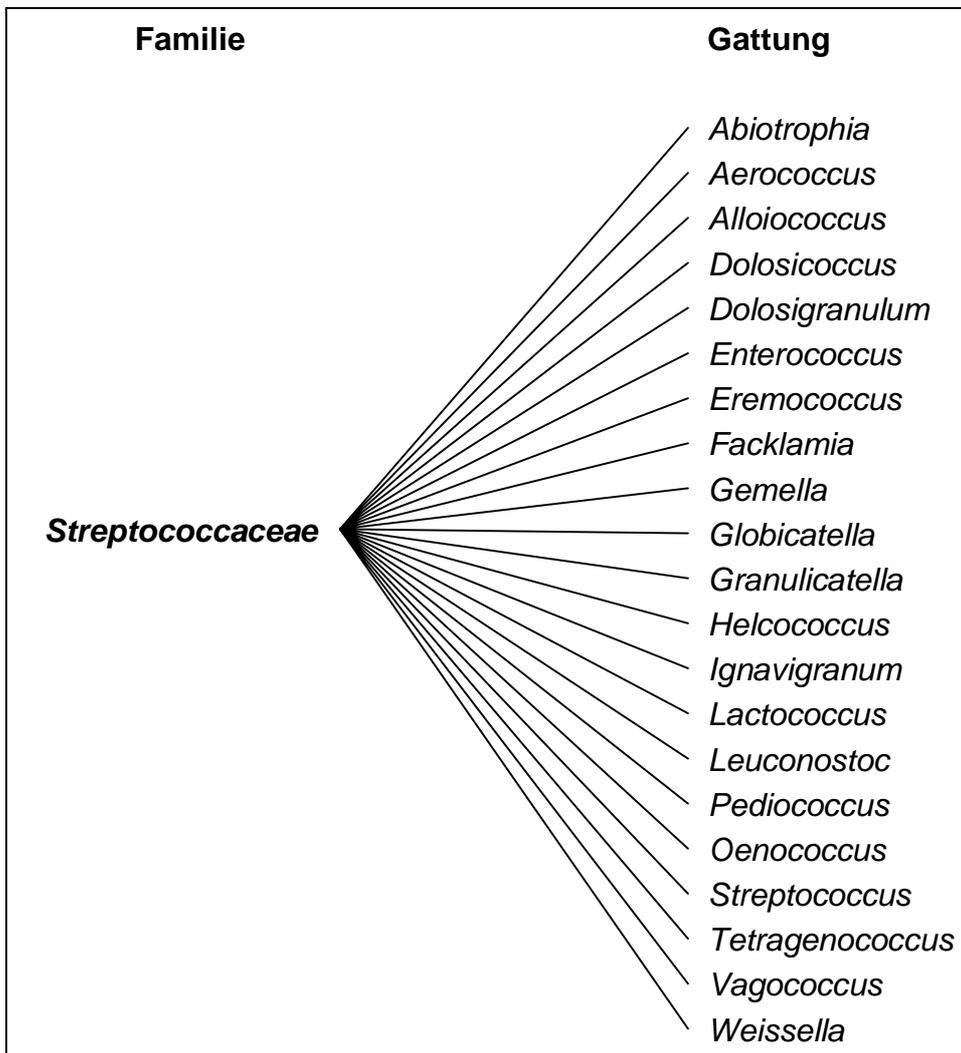
1986 wurden im Bergey's Manual of Systematic Bacteriology fünf Gattungen aufgeführt – *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* und *Gemella* –, wobei innerhalb der Gattung *Streptococcus* eine ähnliche Unterteilung wie die o.a. Gruppen beibehalten wurde.

Mit klassischen phänotypischen Verfahren und der Bestimmung der Basenverhältnisse der DNA, die als Mol% von Guanin und Cytosin (G+C-Gehalt) ausgedrückt werden, war lange nur eine relativ ungenaue Einteilung dieser heterogenen Familie möglich. Die Familie der *Streptococcaceae* ist in den letzten Jahren mit neueren molekularen Verfahren insbesondere unter taxonomischen Gesichtspunkten intensiv bearbeitet worden (KILIAN M. et al. 1989; STILES M.E. und HOLZAPFEL H. 1997; WHILEY R.A. und BEIGHTON D. 1998).

Auf der Grundlage von DNA-DNA-Hybridisierungsverfahren und insbesondere von Sequenzanalysen der 16S rRNA sind in den letzten Jahren einige taxonomische Änderungen in der Familie der *Streptococcaceae* vorgenommen und eine Vielzahl von neuen Gattungen und Spezies beschrieben worden (Abbildung 1) (BEHR T. et al. 2000; BENTLEY R.W. et al. 1991; COLLINS M.D. et al 1990; COLLINS M.D. et al. 1992; DEASY B.M. et al. 2000; KILPPER-BÄLZ R. et al. 1982; KLIJN N. et al. 1991; KOHLER G. et al. 1991; RODRIGUES U.M. et al. 1991; ROLPH H.J. et al. 2001; SATO S. et al. 1999; SCHLEGEL L. et al. 2000; SCHLEIFER K.H. et al. 1985; WALLBANKS S. et al. 1990; WHITNEY A.M. und O'CONNOR S.P. 1993; WOESE C.R. 1987). So beinhaltet heute die Familie der *Streptococcaceae* insgesamt 21 verschiedene Genera. Von diesen neu beschriebenen Gattungen und Spezies wie z.B. *Helcococcus* und *Facklamia* (CALIENDO A.M. et al. 1995; COLLINS M.D. et al. 1999 b,c und d), *Globicatella* und *Alloiococcus* (AGUIRRE M. und COLLINS M.D. 1992; COLLINS M.D. et al. 1992; FACKLAM R.R. und ELLIOT J.A. 1995) sind in den letzten Jahren wiederholt Isolierungen aus klinischem Untersuchungsmaterial in Zusammenhang mit verschiedenen Infektionsprozessen gelungen.

Für den Laboralltag ist jedoch die phänotypische Unterscheidung z.B. mittels biochemischer Charakteristika von größerer Bedeutung als molekulargenetische Unterscheidungen.

Abbildung 1: Taxonomisches Schaubild



Viele Parameter der klassischen Einteilung der Streptokokken in vier Gruppen haben noch heute ihre Bedeutung. So werden auch heute die Enterokokken als eigene Gattung und Gruppe abgegrenzt. Die Gattung *Enterococcus* enthält derzeit 17 sehr robuste Spezies, die ubiquitär vorkommen, in der Erde, Nahrungsmitteln, Wasser, Pflanzen oder Tieren. Beim Menschen gehören sie zur Normalflora des Gastrointestinal- und des weiblichen Genitaltraktes. Die Prävalenz und die verschiedenen Spezies variieren dabei von Mensch zu Mensch (COLLINS M.D. et al. 1989; COLLINS M.D. et al. 1991; DEVRIESE L.A. et al. 1992 a; DEVRIESE L.A. et al. 1992 b; DEVRIESE L.A. et al. 1992 c; DEVRIESE L.A. 1993; FACKLAM R.R. et al. 1999). Enterokokken sind typische

Infektionserreger des Menschen, wie z.B. von Harnwegsinfektionen (FELMINGHAM D. et al. 1992), bei intraabdominellen Wundinfektionen (NICHOLS R.L. und MUZIK A.C. 1992), bei Bakteriämien und Endokarditiden (GRANINGER W. und RAGETTE R. 1992; AWADA A. et al. 1992; MEGRAN D.W. 1992; WATANAKUNAKORN C. und BURKERT T. 1993).

Zur Gruppe der Milchsäurebakterien werden derzeit 7 Gattungen gerechnet: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* und *Weissella*. Vertreter dieser Genera sind in der Tier- und Pflanzenwelt weit verbreitet, und werden in erster Linie in der Nahrungsmittelherstellung vor allem in der Milchindustrie genutzt (BJÖRKROTH K.J. 2002; CHOI H.J. 2002; GARVIE E.I. 1986; KOBAYASHI T. et al. 2000; RUOFF K.L. et al. 1999 b; STILES M.E. und HOLZAPFEL W.H. 1997). *Leuconostoc*-, *Pediococcus*- und *Lactococcus*-Stämme werden gelegentlich auch als Infektionserreger insbesondere bei immunsupprimierten Patienten isoliert, während die anderen Gattungen bislang nicht (z.B. *Oenococcus*) oder nur selten aus humanen Untersuchungsmaterialien gewonnen wurden (AGUIRRE M. und COLLINS M.D. 1993 a; FACKLAM R.R. und ELLIOT J.A. 1995; GASSER F. 1994). Auch die Gattung *Eremococcus* wurde bislang nicht aus humanen Proben isoliert (COLLINS M.D. et al. 1999 f). Die anderen Gattungen lassen sich vereinfacht in β -hämolyzierende und nicht- β -hämolyzierende Bakterien einteilen, wobei nur bestimmte Spezies der Gattung *Streptococcus* β -Hämolyse aufweisen. Alle anderen Genera und die Mehrzahl der *Streptococcus*-Arten bilden die Gruppe der nicht- β -hämolyzierenden Arten.

1.2.1 Die Gattung *Streptococcus*

Charakteristisches und namensgebendes Merkmal der Gattung *Streptococcus* ist ihre Lagerung im mikroskopischen Bild in Ketten (der Wortteil strepto- bedeutet „gewunden, geflochten, gedreht“). Die Länge der Ketten kann selbst beim gleichen Stamm erheblich schwanken. Auf Blutagarplatten wird das

Bakterienwachstum allgemein in β -hämolyzierend, vergrünend und nicht-hämolyzierend eingeteilt. Eine β -Hämolyse zeigt sich durch eine scharfbegrenzte helle Zone um die Kolonien, in der die Erythrozyten mit Hilfe der Hämolytine aufgelöst sind und das Hämoglobin vollständig abgebaut ist, so daß ein klares Feld im sonst undurchsichtigen Blutagar entsteht. Die α -Hämolyse entspricht der Vergrünung. Um die Kolonien herum findet man grüne Höfe von unterschiedlicher Farbintensität, in deren Bereich der Blutfarbstoff zum Methämoglobin umgewandelt ist, während die Erythrozytenmembranen weitgehend erhalten sind. Die Vergrünung beruht im Wesentlichen auf der Freisetzung von H_2O_2 durch ansonsten keine Hämolytine bildende Bakterien. Die Art der Hämolyse ist außerdem von der Bebrütungsatmosphäre, der Zusammensetzung des Nährbodens (Glukosegehalt) und insbesondere von der Art des verwendeten Blutes (Schafblut, Pferdeblut oder Kaninchenblut) abhängig. Die unterschiedliche Suszeptibilität verschiedener Erythrozyten kann zu unterschiedlichen phänotypischen Beurteilungen führen. Die Einteilung des Hämolyseverhaltens bezieht sich aus diesem Grund definitionsgemäß auf Schafblut (BRANDIS H. und SCHAAL K.P. 1988; HARDIE J.M. 1986; ROTTA J. 1986; RUOFF K.L. et al. 1999 a).

β -hämolyzierende Streptokokken entsprechen der älteren sog. „pyogenen Gruppe“ und beinhalten klassische humanpathogene Infektionserreger wie *Streptococcus pyogenes* und *Streptococcus agalactiae*.

α -hämolyzierende Streptokokken (älterer Ausdruck: Viridans-Streptokokken), die vor allem in der Mundhöhle des Menschen vorkommen, werden in verschiedene Gruppen eingeteilt:

MUTANS-GRUPPE: z.B. *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*

SALIVARIUS-GRUPPE: z.B. *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus thermophilus*

MITIS-GRUPPE: z.B. *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis1*, *Streptococcus mitis2*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus sanguinis*

ANGINOSUS-GRUPPE: z.B. *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius*

BOVIS-GRUPPE: z.B. *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus infantarius*

1.2.2 Die Gruppe der nicht- β -hämolisierenden Arten

Zu der Gruppe der nicht- β -hämolisierenden Arten können neben den o.a. *Streptococcus*-Arten elf weitere Genera gezählt werden: *Abiotrophia*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Facklamia*, *Gemella*, *Globiatella*, *Granulicatella*, *Helcococcus* und *Ignavigranum*.

1.2.2.1 Die Gattungen *Abiotrophia* und *Granulicatella*

Früher wurden Vertreter der Gattungen *Abiotrophia* und *Granulicatella* als „nutritionally variant streptococci“ bezeichnet (BOUVET A. et al. 1985; COOKSEY R.C. et al. 1979; DAVIS J.M. und PEEL M.M. 1994). Sie können Vitamin B₆ (Pyridoxal) nicht selbst bilden und zeigen daher Satellitenwachstum bei Anwesenheit von *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*. (ROGGENKAMP A. et al. 1998; BOUVET A. et al. 1989). Aufgrund von 16S rRNA Analysen wurden diese Stämme zunächst in die Gattung *Abiotrophia* (*Abiotrophia para-adiacens*, *Abiotrophia defectiva*) überführt, später erfolgte eine weitere Unterteilung innerhalb dieser Gruppe mit Neugründung der Gattung *Granulicatella* (*Granulicatella adiacens*, *Granulicatella balaenoptera*, *Granulicatella elegans*) (COLLINS M.D. and LAWSON P.A. 2000; KANAMOTO T. et al. 2000; KAWAMURA Y. et al. 1995; WIJETUNGA M. et al. 2002).

Granulicatella und *Abiotrophia* spezies gehören der Normalflora der Mundhöhle, des oberen Respirationstraktes, des Urogenital- und des Intestinaltraktes an und sind opportunistische Krankheitserreger (BROUQUI P. und RAOULT D. 2001; MURRAY P.R. et al. 1999; SATO S. et al. 1999; RUOFF K.L. 1991).

1.2.2.2 Die Gattungen *Aerococcus* und *Helcococcus*

Die Gattung *Aerococcus* wurde schon sehr früh von den Streptokokken abgegrenzt. Charakteristisches Unterscheidungsmerkmal war die Lagerung der Bakterienzellen nicht in Ketten sondern in Clustern. *Aerococcus species* kommen ubiquitär in Luft- und Bodenproben vor (EVANS J.B. 1986; KONTCHOU C.Y. und BLONDEAU R. 1990). *Aerococcus* Arten gehören sowohl zur menschlichen Normalflora, werden aber auch gelegentlich im Zusammenhang mit verschiedenen Infektionsprozessen isoliert (SNEATH P.H.A. et al. 1986).

Die Gattung *Helcococcus* mit den beiden Spezies *Helcococcus kunzii* und *Helcococcus ovis* ist der Gattung *Aerococcus* sehr ähnlich. Unterschiede bestehen vor allem im Wachstumsverhalten und der Koloniemorphologie (CALIENDO A.M. et al. 1995; FACKLAM R.R. und ELLIOT J.A. 1995; COLLINS M.D. et al. 1993). *Helcococcus kunzii* ist Bestandteil der humanen Hautflora und wird gelegentlich aus Infektionsprozessen vor allem der Haut oder Hautanhangsgebilde isoliert (HAAS J. et al. 1997; PEEL M.M. et al. 1997; CALIENDO A.M. et al. 1995; CHAGLA A.H. et al. 1998; FACKLAM R.R. und ELLIOT J.A. 1995). *Helcococcus ovis* konnte von Schafen isoliert werden (COLLINS M.D. et al. 1999 d).

1.2.2.3 Die Gattung *Gemella*

Die Gattung *Gemella* beinhaltet heute sechs Spezies, von denen vier humanpathogene Bedeutung besitzen. *Gemella haemolysans* gehört zur Normalflora der Mundhöhle und der oberen Atemwege, *Gemella morbillorum* zur Normalflora des Urogenital- und des Intestinaltraktes. Beide sind opportunistische Krankheitserreger des Menschen und anderer homoiothermer Lebewesen (BROUQUI P. und RAOULT D. 2001; FACKLAM R.R. und ELLIOT J.A. 1995; RITTERBAND D. et al. 2002; WHITNEY A.M. und O'CONNOR S.P. 1993). *Gemella bergeriae* und *Gemella sanguinis* sind u.a. aus Blutkulturen von

Patienten mit Endokarditis und Bakteriämie isoliert worden (COLLINS M.D. et al. 1998 a; COLLINS M.D. et al. 1998 b).

1.2.2.4 Neuere Gattungen

In den letzten Jahren sind sechs neue Gattungen beschrieben worden, deren normales Habitat noch weitgehend unbekannt ist. Stämme dieser Gattungen wurden jedoch aus humanen Untersuchungsproben im Zusammenhang mit Infektionen isoliert. Zu diesen Genera gehören *Alloiococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Facklamia*, *Globicatella* und *Ignavigranum*.

Die Gattung *Alloiococcus* beinhaltet derzeit nur eine Spezies: *Alloiococcus otitidis*.

Alloiococcus otitidis wurde erstmals aus Mittelohrsekret bei Kindern mit chronischer Otitis media isoliert und als Entität beschrieben (FADEN H. und DRYJA D. 1989). Andere Isolate stammen aus Blutkulturen von Sepsispatienten und aus Sputum von Patienten mit Pneumonie (FACKLAM R.R. und ELLIOT J.A. 1995). Erste Untersuchungen zur Pathogenität von *Alloiococcus otitidis* wiesen ein immunstimulierendes Potential sowie eine Induktion von Interleukin-8 und Interleukin-12 in humanen Epithelzellen und Monozyten nach. (TARKKANEN J. et al. 2000; HIMI T. et al. 2000; KITA H. et al. 2000; TAKEUCHI K. et al. 1994) Vermutlich gehört die Spezies zur Normalflora des äußeren Gehörganges, da sie auch schon aus Ohrabstrichen von gesunden Kindern kultiviert werden konnte (GÓMEZ-HERNANDO C. et al. 1999). Umfangreichere Studien zur Prävalenz dieses Erregers liegen aber bislang noch nicht vor.

Vertreter der Gattung *Dolosigranulum* wurden anfangs als Gemella-ähnliche Bakterien beschrieben. Phänotypisch sind sie nah verwandt mit den Gattungen *Alloiococcus*, *Ignavigranum* und *Facklamia*. Unterscheidendes Merkmal ist, daß *Dolosigranulum pigrum*-Kulturen Äskulin hydrolysieren können. Ein Großteil der Stämme ist Erythromycin-resistent. (LaCAIRE L. und FACKLAM R.R. 2000 a). Einzig bekannte Spezies bisher ist *Dolosigranulum pigrum* (AGUIRRE M. et al.

1993 b). Es wird vermutet, dass *Dolosigranulum* zur normalen Pharyngealfloora des Menschen gehört. Da *Dolosigranulum*-Stämme aus Blutkulturen von Sepsispatienten, bei Blepharitis, aus Rückenmarkbiopsat bei einem Patienten mit Multipler Sklerose, aus Sputum, Magensekret und Urin isoliert werden konnte, werden sie auch als potentielle Pathogene gewertet (HALL G.S. et al. 2001; LaCLAIRE L. 2000 a).

Das Habitat der Gattung *Facklamia* ist noch nicht bekannt. Vertreter der Gattung *Facklamia* sind aber auch potentielle Krankheitserreger. Die bisher identifizierten Spezies (z.B. *Facklamia hominis*) konnten aus menschlichen Proben wie Blutkulturen, Abszessmaterial, Knochen, Liquor, Gallenblase, Vaginalabstrichen, aber auch aus tierischem Material - einem jungen Seelöwen - isoliert werden (COLLINS M.D. et al. 1997; COLLINS M.D. et al. 1998 c; COLLINS M.D. et al. 1999 b und c; HOYLES L. et al. 2001; LACLAIRE L. und FACKLAM R.R. 2000 b; LAWSON P.A. et al. 1999).

Globicatella sanguinis ist die bislang einzige Spezies der Gattung *Globicatella* (COLLINS M.D. et al. 1992). *Globicatella sanguinis* ist vermutlich Bestandteil der Normalflora des Menschen und wurde als opportunistischer Krankheitserreger in Blutkulturen, Liquores, infizierten Wunden und Urin nachgewiesen (FACKLAM R.R. und ELLIOT J.A. 1995). Ein weiteres Habitat scheinen Tiere wie z.B. Schafe darzustellen (VELA A.I. et al. 2000).

Die Gattung *Ignavigranum* ist phylogenetisch nah verwandt mit *Globicatella sanguinis* und *Facklamia hominis*. Einzige bisher bekannte Spezies ist *Ignavigranum ruoffinae*. Die Isolate stammten aus einer infizierten Wunde und einem Ohrabszess (COLLINS M.D. et al. 1999 a)

Auch die Gattung *Dolosicoccus* beherbergt bislang nur eine Spezies: *Dolosicoccus paucivorans*. Der natürliche Lebensraum von *Dolosicoccus* ist unbekannt. *Dolosicoccus*-Isolate wurden in Blutkulturen eines Pneumonie-Patienten nachgewiesen (COLLINS M.D. et al. 1999 e).

1.3 Antibiotikaresistenz

Bei neutropenischen Patienten gehören α -hämolyisierende Streptokokken derzeit zu den häufigsten Isolaten aus Blutkulturen. Benzylpenicillin (Penicillin G) galt bislang als Mittel der ersten Wahl, mit dem Infektionen mit α -hämolyisierenden und nicht-hämolyisierenden Streptokokken allgemein problemlos therapierbar waren. In den letzten Jahren wurden jedoch zunehmend mehr Resistenzen gegen Penicillin G auch in dieser Bakteriengruppe beobachtet (ALCAIDE F. et al. 1995 und 1996; DOERN G.V. et al. 1996; JAING T.H. et al. 2002; TUNKEL A.R. und SEPKOWITZ K.A. 2002). Ein weiteres Beispiel sind die durch Penicillin-Resistenz eingeschränkten Therapiemöglichkeiten bei *Abiotrophia*-Infektionen (BROUQUI P. und RAOULT D. 2001; TUOHY M.J. et al. 2000). Bei *Alloiococcus otitidis* -Kulturen aus Ergußmaterial von Patienten mit Otitis media zeigte sich mäßige Antibiotikaresistenz gegenüber β -Lactam-Antibiotika (BOSLEY G.S. et al. 1995).

Penicilline gehören zu den β -Laktam-Antibiotika. Ihr Angriffsort ist die bakterielle Zellwand. Durch die Ähnlichkeit des β -Laktamgerüsts mit N-Acetylmuraminsäure werden bakterielle Transpeptidasen (Penicillin-Binde-Proteine, PBP) irreversibel blockiert. Es resultieren Defekte im Zellwandaufbau, die im Rahmen der Zellteilung zur Bakteriolyse führen (ROSIN H. und HENSCHLER D. 1998; LÜTTICKEN R. 1988; MUTSCHLER E. 1997). Mehrere Mechanismen können zur Ausbildung einer bakteriellen Resistenz gegen Penicillin führen: erstens die Produktion von Enzymen (β -Laktamasen), die eine extrazelluläre Spaltung des Wirkstoffes bedingen und zweitens die Veränderung von PBPs (SPRATT B. G. 1994).

Wie Resistenzen entstehen und weitergegeben werden, ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Genetische Ursachen können Resistenzen gegen Gyrasehemmer, Makrolide und Tetrazykline zugrundeliegen. POUTANEN S.M. et al. konnten 1999 mit molekularbiologischen Studien beweisen, dass

bestimmte Genabschnitte einer Spezies mit ihrem Resistenzmuster korrelieren. Der genetische Transfer von Resistenzen gegenüber Benzylpenicillin, Erythromycin oder Fluoroquinolonen von *Streptococcus mitis* auf *Streptococcus pneumoniae* konnte nachgewiesen werden (GONZÁLEZ I. et al. 1998; HAKENBECK R. et al. 1998; King A. et al. 2002; SPRATT B. G. 1994).

1.4 Fragestellung

In den letzten Jahren ist die Familie der *Streptococcaceae* taxonomisch intensiv bearbeitet worden und eine Vielzahl neuer Genera und Spezies sind beschrieben und abgegrenzt worden. Einige dieser neuen Entitäten zeigen phänotypisch große Ähnlichkeit mit den unter dem Sammelbegriff subsummierten „vergrünenden Streptokokken“. Das normale Habitat dieser Spezies ist aber weitgehend unbekannt. Viele dieser Bakterien wurden bislang aus Infektionsprozessen isoliert, die häufig eine endogene Infektionsentstehung besitzen. Es ist daher möglich, dass einige dieser neuen Entitäten zur Normalflora des humanen Oropharynx gehören könnten.

Es war die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, in Rachenabstrichen eines Normalkollektives α -hämolyzierende und nicht-hämolyzierende grampositive, katalasenegative Kokken unter Einschluß dieser neu beschriebenen Genera und Spezies zu identifizieren.

Da bestimmte α -hämolyzierende Streptokokken mit Penicillinresistenz zunehmend bei immunsupprimierten Patienten als Infektionserreger isoliert werden und bisher nur wenig Daten zur Penicillinresistenz bei den neueren Genera der *Streptococcaceae* vorliegen, sollten die Isolate hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegen Penicillin getestet werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchspersonen

2.1.1 Gruppeneinteilung

In die Untersuchung wurden Rachenabstriche von 21 Probanden aufgenommen, wobei auf eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Geschlechter geachtet wurde. So wurden 11 Frauen und 10 Männer im Alter von 6 Monaten bis 57 Jahren in die Studie einbezogen. Die Probanden wurden in drei Altersgruppen eingeteilt. (Weitere Probandendaten siehe Anhang.)

Tabelle 1: Probanden

Gruppe	Alter	Anzahl der Personen
I	<20 Jahre	3
II	20-40Jahre	12
III	>40 Jahre	6

2.1.2 Vorbedingungen

Die Aufnahme in diese Studie war von der Erfüllung folgender Bedingungen abhängig:

- Einwilligung in die Abstrichentnahme zu Studienzwecken
- Reizfreier Rachen ohne Entzündungszeichen wie z.B. Fieber zur Zeit der Abstrichentnahme und in den letzten zwei Wochen zuvor
- Innerhalb dieses Zeitraumes keine Einnahme von Antibiotika oder Anwendung von Rachenspüllösungen

2.2 Probenentnahme

Für die Abstrichentnahme wurden sterile Wattetupfer aus Baumwolle (MSP Schmeiser) verwendet. Der Rachenabstrich wurde immer von derselben Person und immer nach derselben Technik entnommen, um Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Es wurde ein Areal bestehend aus hinterer Rachenwand und weichem Gaumen abgestrichen.

2.3 Probenverarbeitung

War ein sofortiger Ansatz nicht möglich, wurde der Tupfer in ein Transportmedium (Port-A-Cul, Fa. Becton Dickinson, 43-21607) gegeben und innerhalb von maximal 6 Stunden verarbeitet.

Mit dem Tupfer wurden eine Columbia-Blut-Agar-Platte mit 5% Schafblut (SBA) und einer Kaninchenblutagarplatte (KBA) beimpft und das aufgebrachte Material mit der Öse fraktioniert. (Nährmedien siehe Anhang).

Alle Platten wurden bei 37°C im 2,5 l-Anaerobiertopf inkubiert. Eine erhöhte CO₂-Spannung (ca. 8-10 Vol.% CO₂) und sauerstoffreduzierte Atmosphäre (5-7 Vol.% O₂) wurden durch Verwendung von Anaerocult[®] C- Beuteln (Fa. Merck, Best.Nr. 1.16275) erreicht. Nach Zugabe von Wasser wird eine bestimmte Menge Sauerstoff an ein feinverteiltes Eisenpulver chemisch gebunden und gleichzeitig CO₂ aus Natriumcarbonat freigesetzt. Anaerocult[®] C erleichtert die Anzüchtung von anspruchsvollen, fakultativ anaeroben Mikroorganismen.

Anaerobes Milieu wurde mit AnaeroGen[™] (OXOID System der Fa. UNIPATH) hergestellt. Die chemische Reaktion wird beim Kontakt mit Luft aktiviert. AnaeroGen reduziert den atmosphärischen Sauerstoffgehalt im geschlossenen Anaerobiertopf innerhalb von 30 Minuten auf unter 1 %. Der Kohlendioxidgehalt liegt zwischen 9-13 %, der Druck sinkt in der Regel auf ca. -0,2 bar.

2.4 Identifizierung

2.4.1 Gewinnung von Reinkulturen

Der SBA und der KBA wurden nach 24 h und nach 48 h Inkubation beurteilt. Kolonien mit einem Durchmesser unter 2 mm mit Vergrünung oder ohne Hämolyse wurden weiter subkultiviert. Nach zwei bis vier Tagen lagen entsprechende Reinkulturen vor. Kulturen mit einer KoloniegroÙe unter 1mm nach einer Inkubationsdauer von mehr als 24 Stunden wurden auf Brain-Heart-Infusion-Agar (BHIA) weiter kultiviert. Parallel dazu wurden schlechtwachsende Stämme in einer anaeroben Atmosphäre inkubiert. Die optimalen Wachstumsbedingungen (KBA, SBA, BHIA, sauerstoffreduzierte oder anaerobe Atmosphäre) wurden festgelegt und bei nachfolgenden Subkulturen beibehalten.

2.4.2 Orientierende Identifizierung: Grampräparat und Katalase

Gemäß der Fragestellung wurden nur grampositive, katalasenegative Kokken weiter differenziert. Die Katalase ist ein Atmungskettenenzym, dessen Nachweis differentialdiagnostische Bedeutung hat. Im Grampräparat jeden Isolates wurde Morphologie und Lagerung der Bakterien beurteilt. Die Katalase-Aktivität einer Kultur wurde mit 3%iger H₂O₂-Lösung überprüft. Bei Kontakt von Koloniemasse mit einigen Tropfen der Lösung zeigen aufsteigende Sauerstoff-Gasblasen die Anwesenheit des Enzyms an.

2.4.3 Identifizierung

Bei der Identifizierung und Differenzierung von Gattungen der Familie der *Streptococcaceae* stellen bestimmte Tests Schlüsselreaktionen für die Zuordnung zu einer Gattung dar (Tabelle 2) (FACKLAM R.R. und ELLIOT J.A. 1995). Zur Identifizierung auf Gattungs- und Speziesebene wurden daher sowohl Prüfungen von definierten Schlüsselreaktionen in Einzeltestverfahren durchgeführt als auch kommerzielle Identifizierungskits, die eine Palette biochemischer Tests beinhalten, eingesetzt. Die Datenbasis zur Auswertung der kommerziellen Identifizierungskits enthält jedoch nicht alle der u.a. Gattungen der Familie der *Streptococcaceae*.

Tabelle 2: Schlüsselreaktionen zur Identifizierung von Gattungen der Familie der *Streptococcaceae* (nach FACKLAM R.R. und ELLIOT J.A. 1995)

Genus	Präparat	PYR	LAP	6,5% NaCl	Äskulin	Wachstum bei 10°C	Wachstum bei 45°C	Datenbasis des api strep
<i>Abiotrophia</i>	K+D	+	+	-	-	-	v	+
<i>Aerococcus</i>	H+T	v	v	+	+	-	-	+
<i>Alloiococcus</i>	H+T	+	+	+	+	-	-	-
<i>Dolosicoccus</i>	K+D	+	-	-	-	-	-	-
<i>Dolosigranulum</i>	H+T	+	+	v	+	-	-	-
<i>Enterococcus</i>	K*	+	+	+	+	+	+	+
<i>Eremococcus</i>	D+K	n.d.	-	+	-	-	n.d.	-
<i>Facklamia</i>	H+K	+	+	+	-	-	-	-
<i>Gemella</i>	H,T+K	+	v	-	-	-	-	+
<i>Globicatella</i>	K	+	-	+	+	-	-	-
<i>Granulicatella</i>	K+D	+	+	n.d.	n.d.	-	-	-
<i>Helcococcus</i>	H+T	+	-	+	+	-	-	-
<i>Ignavigranum</i>	H+K	+	+	+	-	-	+	-
<i>Lactococcus</i>	K+D	+	+	v	+	+	v	+
<i>Leuconostoc</i>	K+D	-	-	v	v	+	+	+
<i>Pediococcus</i>	H+T	-	+	v	+	-	+	-
<i>Oenococcus</i>	K+D	n.d.	n.d.	n.d.	+	-	-	-
<i>Streptococcus</i>	K	-	+	v	v	-	v	+
<i>Tetragenococcus</i>	H+T	-	+	+	+	-	-	-
<i>Vagococcus</i>	D+K	+	+	+	+	+	-	-
<i>Weissella</i>	K	-	-	+	n.d.	v	v	-

H=Lagerung in Haufen, K = Kettenlagerung, D = Diploform, T = Tetraden,
 + =positiv, - =negativ, v =variabel, * =Ausnahmen möglich, n.d. = nicht durchgeführt

2.4.3.1 Pyrrolidonyl-Arylamidase (PYR) und Leucin-Arylamidase (LAP)

Der Nachweis der Schlüsselenzyme Pyrrolidonyl-Arylamidase (PYR) und Leucin-Arylamidase (LAP) beruht auf der enzymatischen Freisetzung von β -Naphthylamin aus dem entsprechenden Aminosäurekonjugat, wobei freies β -

Naphtylamin unter Hinzufügen von Cinnamaldehydreagenz zu einem roten Farbstoff reagiert. Als Positivkontrolle diente *Enterococcus faecalis* (ATCC-Stamm 29212). Zum Nachweis wurden sowohl Reagenzien der Fa. Carr-Scarborough Microbiologicals. Inc. (Cat.No. 23-1172 für PYR und 23-1416 für LAP) als auch der Fa. ROSCO DIAGNOSTICA (Best.Nr. 470-21 für PYR und 468-21 für LAP) verwendet.

2.4.3.2 Wachstum in 6,5% NaCl-Lösung, bei 10°C und 45°C

Jeder Stamm wurde in Heart-Infusion-Bouillon (HIB) der Prüfung auf das Wachstum bei 10°C, bei 45°C und in 6,5% NaCl bei 35°C unterzogen. Bei jedem Testlauf wurde ein unbeimpftes Röhrchen als Leerwert sowie eine Positivkontrolle (*Enterococcus faecalis*, ATCC 29212) mitgeführt. Die Bouillon wurde mit reichlich Koloniematerial beimpft und bis zu 14 Tagen in Töpfen bebrütet, um sie so vor Austrocknung zu schützen.

2.4.3.3 Äskulin-Reaktion

Der Nachweis der Äskulinbildung ist von diagnostischer Bedeutung bei der Abgrenzung verschiedener Gattungen innerhalb der Familie der *Streptococcaceae*, aber auch bei der Diagnostik grampositiver Stäbchen (Listerien) und gramnegativer Stäbchenbakterien.

Bei der enzymatischen Spaltung des Glykosids Äskulin reagiert das abgespaltene Aglykon Äskuletin mit dem im Medium vorhandenen Eisensalz (Eisen-III-Citrat) unter Bildung einer braunschwarzen Komplexverbindung.

Die Äskulin-haltige Testplatte (Enterococcosel-Agar) wurde bis zu sieben Tage bei 35°C inkubiert. Als positiv wurde Kolonie-Wachstum mit einer Schwarzfärbung des Mediums gewertet. Alleiniges Kolonie-Wachstum ohne Schwarzfärbung oder kein Wachstum wurde als negativ gewertet.

2.4.3.4 Identifizierungssystem api 20 STREP

Grundlage der Identifizierung der isolierten Stämme auf Speziesebene bildete das api 20 STREP. Dieses System ist ein kommerzielles, miniaturisiertes Verfahren, das die Identifizierung der meisten human- und veterinärmedizinisch relevanten Streptokokken ermöglicht. Es besteht aus 20 Reaktionskammern, die mit einer Bakteriensuspension beimpft und nach 18stündiger Inkubation abgelesen werden. Die Testergebnisse werden mit Hilfe einer Farbbablesetabelle ausgewertet und in Form einer Zahlenkodierung notiert. Die Kombination vieler Reaktionen ermöglicht mit Hilfe der Wahrscheinlichkeitsrechnung die Identifikation. Zu jeder Zahlenkombination gibt es mit einer angegebenen Wahrscheinlichkeit eine Speziesidentifikation. Getestet werden zehn verschiedenen Enzymaktivitäten sowie die Fermentation von zehn verschiedenen Kohlenhydraten (Tabelle 3).

Tabelle 3: Reaktionen des api 20 STREP

Voges-Proskauer	Acetoin-Produktion
Hippurat	Hippurat-Hydrolyse
Äskulin	β -Glucosidase
PYRA	Pyrrolindonyl-Arylamidase
α Gal	α -Galactosidase
β Gur	β -Glucuronidase
β Gal	β -Galactosidase
PAL	alkalische Phosphatase
LAP	Leucin-Arylamidase
ADH	Arginin-Dihydrolase
Fermentation von:	Ribose, L-Arabinose, Mannit, Sorbit, Lactose, Trehalose, Inulin, Raffinose, Stärke, Glycogen

Tabelle 4a: Nachweis Extrazellulärer Polysaccharide

Morphologie	Bewertung
kein Wachstum oder Wachstum von kleinen, nicht durchscheinenden Kolonien	keine Produktion von Levan oder Dextran
Wachstum von kleinen (bis 2 mm), glänzenden Kolonien, die im Agar haften (Test mit der Öse)	Dextran (Glukan) positiv
Wachstum von großen, weißlichen, schleimigen, mit der Öse verschieblichen Kolonien	Levan (Fruktan) positiv

Tabelle 4b: Extrazelluläre Polysacchide verschiedener Spezies

<i>Streptococcus sanguinis</i>	Dextran positiv. Die Kolonien sehen wie ineinander verschmolzene Glasperlen aus (wasserlösliche und unlösliche Glukane).
<i>Streptococcus mutans</i> -Gruppe	Dextran positiv. Die Kolonien ähneln denen des <i>S. sanguinis</i> , sind jedoch kleiner (bis ca 1,5 mm groß). Manche Stämme produzieren auch Levan und bilden größere, schleimige, tautropfenartige Kolonien.
<i>Streptococcus oralis</i>	Dextran positiv.
<i>Streptococcus bovis</i>	Dextran positiv. Wachstum von besonders großen, durchsichtigen, feuchten, tautropfenartigen Kolonien.
<i>Enterococcus faecalis</i>	Levan positiv.
<i>Streptococcus salivarius</i>	Levan positiv. Manche Stämme bilden zusätzlich auch ein Glukan.

2.4.3.5 Dextran- und Levanproduktion

Die Bildung von extrazellulären Polysacchariden (EPS) (Dextrane=Polyglukosen; Levane=Polyfruktosen) kann durch Wachstum auf Saccharose-haltigem Agar (5% Saccharose, Nährmedium siehe Anhang) nachgewiesen werden. Hier formen zur extrazellulären Polysaccharidbildung befähigte Stämme nach 2-4 tägiger Inkubation in anaerober oder CO₂-haltiger Atmosphäre charakteristische Kolonien (Tabelle 4a, Tabelle 4b).

2.4.3.6 Säurebildung aus Salicin

Die Fähigkeit eines Isolates, aus Salicin Säure zu bilden, wurde in HIB mit dem Zusatz von 1% Salicin geprüft. Die beimpfte Bouillonkultur wurde bei 35°C bis zu 14 Tage inkubiert und die Säureproduktion durch Umschlag des Bromcresolpurpur-Indikators nachgewiesen (Tabelle 5).

Tabelle 5: Diagnostische Bedeutung der Salicin-Reaktion

Spezies	Anteil (%) der Stämme einer Spezies mit Fähigkeit zur Säurebildung aus Salicin
<i>Streptococcus salivarius thermophilus</i>	100%
<i>Streptococcus salivarius salivarius</i>	95%
<i>Streptococcus sanguinis</i>	95%
<i>Streptococcus mitis</i>	75%
<i>Streptococcus adjacens</i>	49%
<i>Gemella haemolysans</i>	5%
<i>Leuconostoc species</i>	5%
<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	1%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1%
<i>Gemella morbillorum</i>	1%
<i>Streptococcus oralis</i>	0%

2.4.4 Penicillinempfindlichkeit

Die Empfindlichkeit eines Isolates gegen Penicillin G (PG) wurde durch die Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) mittels Etest[®] geprüft. Der Etest[®] besteht aus einem unporösen Plastikstreifen von 5 mm Breite und 60 mm Länge. Eine Seite des Streifens ist kalibriert mit einer MHK-Ablese skala in $\mu\text{g/ml}$. Auf der anderen Seite ist der Wirkstoff aufgetragen. In diesem speziellen, patentierten Verfahren wird durch den wirkstoffbeladenen Plastikstreifen in einem geeigneten Agarmedium ein stabiler Wirkstoffgradient erzeugt. Beim PG-Etest[®] beträgt der Gradient Konzentrationen von 0,002 bis 32 $\mu\text{g/ml}$. Auf der mit dem Teststamm beimpften Agarplatte bildet sich dann nach entsprechender Inkubation ein ellipsenförmiger Hemmhof um den Streifen. Die minimale Hemmkonzentration (MHK) des Stammes kann auf einer auf dem Streifen aufgebrauchten Skala am Schnittpunkt der Hemmhofellipse mit dem Streifen abgelesen werden.

Die Stämme wurden auf SBA getestet und nach 24 - 48 Stunden Inkubation bei 35°C ausgewertet. Gemäß den Kriterien des National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1998) wurden MHKs $\leq 0,125 \mu\text{g/ml}$ als sensibel, 0,25 - 2,0 $\mu\text{g/ml}$ als mäßig sensibel und MHKs $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ als resistent bewertet (NCCLS, 1998).

3 ERGEBNISSE

3.1 Gattungen

Insgesamt wurden bei 21 Probanden 180 Stämme grampositiver, katalasenegativer Kokken isoliert, die sich morphologisch und biochemisch unterschieden. Diese Isolate ließen sich vier Gattungen zuordnen, wobei Vertreter der Gattung *Streptococcus* mit 153 Isolaten (85,0%) deutlich über *Gemella* (11,1%), *Granulicatella* (3,3%) und *Aerococcus* (0,6%) dominierten (Tabelle 6).

Tabelle 6: Gattungen

Gattung	Anzahl der Spezies	Anzahl Isolate	%-Anteil der Isolate
<i>Aerococcus</i>	1	1	0,6
<i>Gemella</i>	2	20	11,1
<i>Granulicatella</i>	1	6	3,3
<i>Streptococcus</i>	10	153	85,0

3.2 Keimspektrum und Stammvielfalt

Unter Keimspektrum wird die Anzahl unterschiedlicher Spezies pro Proband verstanden. Bei 21 Probanden wurden 180 verschiedene Stämme isoliert. Dabei waren zwei bis sieben verschiedene Spezies pro Patient nachweisbar, im Durchschnitt 4,3 Spezies. Die Isolate innerhalb einer Spezies zeigten daneben auch morphologische und biochemische Unterschiede. So konnten bis zu zehn verschiedene Isolate einer Spezies bei einem Patienten nachgewiesen werden. Die Stammvielfalt variierte zwischen fünf bis dreizehn unterschiedlichen Isolaten pro Proband mit einem Durchschnitt von 8,6 Isolaten (Tabelle 7).

Tabelle 7: Keimspektrum und Stammvielfalt

Gruppe	I			II												III						
	7	16	17	2	3	4	5	6	8	9	11	12	13	15	21	1	10	14	18	19	20	
<i>Aerococcus viridans</i>															1							
<i>Gemella haemolysans</i>		1			2	2		1	2	1	1	1				2			1			
<i>Gemella morbillorum</i>				1	1	1	1				1		1									
<i>Streptococcus acidominus</i>													1	3				1				
<i>Granulicatella adjacens</i>						1						3									2	
<i>Streptococcus equinus</i>																		1				
<i>Streptococcus intermedius</i>																					1	
<i>Streptococcus mitis 1</i>	6	2	3	2	2	3	2	10	2	6	3			6	3	2	1	2	3	2	5	
<i>Streptococcus mitis 2</i>	4	3	1	4	3	1	1	1		2	2		1		2	1	3	4		2		
<i>Streptococcus oralis</i>					1	2			1			1										
<i>Streptococcus sanguinis</i>		1		2	3		2					1	2		2		2	2	2	3		
<i>Streptococcus salivarius salivarius</i>		1			1		1		1	1	1	1	1		2				1		1	
<i>Streptococcus salivarius thermophilus</i>			3								1			1								
<i>Streptococcus species</i>														2								
Anzahl Stämme	10	8	7	9	13	10	7	12	6	10	9	7	6	12	10	5	6	10	7	10	6	
Anzahl Spezies	2	5	3	4	7	6	5	3	4	4	6	5	5	4	5	3	3	5	4	5	2	

Unter den isolierten Spezies dominierten *Streptococcus mitis* 1 und 2 mit 100 Stämmen. *Streptococcus mitis* 1 stellte mit 65 Isolaten einen Anteil von 36,1%, *Streptococcus mitis* 2 mit 35 Isolaten einen Anteil von 19,4%. Alle anderen Spezies zeigten Prozentanteile von maximal 12% (Tabelle 8). Wenig bekannte und potentiell pathogene Spezies wie *Globicatella sanguinis* oder *Alloiococcus otitidis* konnten bei keinem der Probanden isoliert werden.

Tabelle 8: Übersicht Keimspektrum

Stämme	Anzahl Isolate	Anteil der Isolate (%)
<i>Streptococcus mitis</i> 1	65	36,1
<i>Streptococcus mitis</i> 2	35	19,4
<i>Streptococcus sanguinis</i>	22	12,2
<i>Gemella haemolysans</i>	14	7,8
<i>Streptococcus salivarius salivarius</i>	12	6,7
<i>Gemella morbillorum</i>	6	3,3
<i>Granulicatella adjacens</i>	6	3,3
<i>Streptococcus acidominus</i>	5	2,8
<i>Streptococcus oralis</i>	5	2,8
<i>Streptococcus salivarius thermophilus</i>	5	2,8
<i>Streptococcus species</i>	2	1,1
<i>Aerococcus viridans</i>	1	0,6
<i>Streptococcus equinus</i>	1	0,6
<i>Streptococcus intermedius</i>	1	0,6

3.3 Trägerrate

Die dominierenden Spezies *Streptococcus mitis* 1 und 2 zeigten eine Trägerrate von 90% bzw. 75% (Tabelle 9). *Streptococcus salivarius salivarius*, *Streptococcus sanguinis* und *Gemella haemolysans* waren jeweils noch bei

mindestens 50% der Probanden nachweisbar. Alle anderen Spezies zeigten eine Trägerrate von maximal 30%.

Tabelle 9: Trägerrate

Species	Anzahl Probanden	Trägerrate in %
<i>Streptococcus mitis 1</i>	18	90
<i>Streptococcus mitis 2</i>	15	75
<i>Streptococcus salivarius salivarius</i>	11	55
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10	50
<i>Gemella haemolysans</i>	10	50
<i>Gemella morbillorum</i>	6	30
<i>Streptococcus oralis</i>	4	20
<i>Granulicatella adjacens</i>	3	15
<i>Streptococcus acidominus</i>	3	15
<i>Streptococcus salivarius thermophilus</i>	2	10
<i>Streptococcus species</i>	1	5
<i>Aerococcus viridans</i>	1	5
<i>Streptococcus equinus</i>	1	5
<i>Streptococcus intermedius</i>	1	5

3.4 Keimspektrum und Trägerrate **(geschlechtsspezifisch)**

Insgesamt zeigten männliche und weibliche Probanden keine wesentlichen Unterschiede im Keimspektrum und Stammvielfalt: männliche und weibliche Probanden wiesen 4,3 unterschiedliche Spezies bei durchschnittlich 8,3 bzw. 8,8 verschiedenen Stämmen auf (Tabelle 10). Frauen zeigten tendenziell eine etwas höhere Trägerrate und prozentualen Anteil der Isolate an *Streptococcus mitis 1* und *2* sowie *Gemella haemolysans*, während bei Männern

Streptococcus salivarius salivarius und *Streptococcus sanguinis* häufiger isoliert wurde.

Tabelle 10: Geschlechtsbezogene Auswertung

	Männer (n=10)		Frauen (n=11)	
	Trägerrate	Anteil Isolate	Trägerrate	Anteil Isolate
<i>S.mitis 1</i>	80%	31,3%	100%	40,2%
<i>S.mitis 2</i>	60%	15,7%	91%	22,7%
<i>S.salivarius</i>	60%	8,4%	45,5%	5,2%
<i>S.sanguinis</i>	70%	15,7%	36,4%	9,3%
<i>G.haemolysans</i>	30%	3,6%	63,6%	11,3%

3.5 Keimspektrum und Trägerrate **(altersabhängig)**

Auch in der altersbezogenen Auswertung zeigten sich keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich Keimspektrum und Stammvielfalt zwischen den verschiedenen Altersgruppen. So war das Keimspektrum in der jüngsten Altersgruppe (unter 20 Jahren) 3,3 Spezies pro Person, in der mittleren Altersgruppe (20-40 Jahre) 4,8 und in der ältesten Gruppe (älter als 40 Jahre) 3,6 bei durchschnittlich 8,3, 9,25 und 7,3 unterschiedlichen Stämmen pro Proband. Tendenziell zeigte sich eine etwas höhere Nachweisrate von *Streptococcus mitis* in den jüngeren und von *Streptococcus sanguinis* in den höheren Lebensjahren (Tabelle 11).

Tabelle 11: Altersbezogene Auswertung

	Gruppe I (n=3)		Gruppe II (n=12)		Gruppe III (n=6)	
	Träger- rate	Anteil Isolate	Träger- rate	Anteil Isolate	Träger- rate	Anteil Isolate
<i>S.mitis 1</i>	100%	44%	83,3%	35,1%	100%	34%
<i>S.mitis 2</i>	100%	32%	75%	15,3%	66,6%	22,7%
<i>S.salivarius</i>	33,3%	4%	66,6%	8,1%	33,3%	4,5%
<i>S.sanguinis</i>	33,3%	4%	50%	10,8%	66,6%	20,4%
<i>G.haemolysans</i>	33,3%	4%	58,3%	9%	33,3%	6,8%

3.6 Schlüsselreaktionen

Die Schlüsselreaktionen für die Identifizierung von fakultativ anaeroben, grampositiven, katalasenegativen Kokken sind Pyrrolidonyl-Arylamidase (PYR) und Leucin-Arylamidase (LAP) sowie das Wachstum in NaCl, die Äskulin-Hydrolyse und Wachstum bei 10°C und 45°C. Sie erlauben eine Identifizierung auf Gattungsebene.

Für die Identifizierung auf Speziesebene wurde das api 20 STREP herangezogen, mit dem 101 von 180 Isolate bis auf Speziesebene identifiziert werden konnten. Bei 79 Stämmen mußten insgesamt 225 zusätzliche Tests angelegt werden, um die Spezies zu identifizieren.

Bei 138 Isolaten wurden die Schlüsselreaktionen PYR und LAP ebenfalls im api 20 STREP geprüft und mit den Ergebnissen des Plättchentests als Referenzmethode verglichen (Tabelle 12). Beim PYR-Test stimmten 132 Ergebnisse überein (95,7%). Falsch positiv fielen vier (2,9%), falsch negativ zwei (1,4%) Testergebnisse aus. Beim LAP-Test stimmten 129 Ergebnisse überein (93,5%). Falsch positiv fielen fünf (3,6%), falsch negativ vier (2,9%) der Testergebnisse aus.

PYR		Plättchentest		
		positiv	negativ	
api 20	positiv	9	4	13
STREP	negativ	2	123	125
		11	127	138

Tabelle 12: Vergleich der Ergebnisse von PYR- und LAP-Reaktionen im Plättchentest und api 20 STREP.

LAP		Plättchentest		
		positiv	negativ	
api 20	positiv	114	5	119
STREP	negativ	4	15	19
		118	20	138

3.7 Penicillinempfindlichkeit

121 Stämme wurden mit dem Etest® auf ihre Penicillinempfindlichkeit getestet (Tabelle 13). 116 Stämme (95,9%) zeigten sich mit MHKs von kleiner 0,125 µg/ml als Penicillin sensibel. vier Isolate (3,3%) wurden als mäßig empfindlich eingestuft mit MHKs zwischen 0,125 und 2 µg/ml. Nur ein Stamm (0,8%) erwies sich mit einer MHK von mehr als 2 µg/ml als resistent.

Tabelle 13: Kumulative Darstellung der Penicillinempfindlichkeit

MHK (µg/ml)	≤ 0,016	0,023	0,032	0,047	0,064	0,094	0,125	0,19	0,25	0,38	3,5
Anzahl	38	59	73	87	97	105	116	117	119	120	121

Zu den mäßig empfindlichen Isolaten gehörten je ein Stamm von *Streptococcus mitis 1*, *Streptococcus mitis 2*, *Streptococcus sanguinis* und *Streptococcus salivarius*. Das resistente Isolat war ebenfalls ein *Streptococcus mitis 1*. Herkunft des Isolates war ein sechs Monate altes Kind.

4 DISKUSSION

In den letzten Jahren ist die Familie der *Streptococcaceae* durch neuere molekulargenetische Methoden taxonomisch revidiert und um eine Vielzahl neuer Genera und Spezies erweitert und differenziert worden. Einige dieser neuen Entitäten wie *Alloiococcus*, *Globicatella* oder *Facklamia* zeigen phänotypisch große Ähnlichkeit mit den sogenannten „vergrünenden Streptokokken“. Das normale Habitat dieser Spezies ist aber weitgehend unbekannt. Da eine Vielzahl von Isolierungen dieser neuen Entitäten aus humanen Infektionsprozessen wie Otitis media gelangen, ist es denkbar, dass einige dieser neuen Entitäten zur Normalflora des humanen Oropharynx gehören könnten.

Es war die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, in Rachenabstrichen gesunder Versuchspersonen verschiedenen Alters α -hämolyisierende und nicht-hämolyisierende grampositive, katalasenegative Kokken zu identifizieren. Die Verfahren sollten dabei auch eine Identifizierung dieser neu beschriebenen Genera und Spezies ermöglichen können.

4.1 Zusammensetzung der Rachenflora

Insgesamt wurden 21 Probanden im Alter zwischen sechs Monaten und 57 Jahren untersucht. Bei diesen Probanden konnten 180 morphologisch und biochemisch unterschiedliche Isolate grampositiver, katalasenegativer Kokken gewonnen werden. Alle Isolate ließen sich einer von vier Gattungen zuordnen. Quantitativ dominierend waren *Streptococcus*-Arten mit 85% der Isolate (153 von 180) aus 10 Spezies. 11% der Isolate stammten aus zwei *Gemella*-Arten und jeweils eine Spezies von *Aerococcus* und *Granulicatella* waren nachweisbar.

Im Durchschnitt konnte bei den Probanden vier bis fünf verschiedene Spezies nachgewiesen werden mit einer Streuung zwischen zwei und sieben Spezies.

Bei Berücksichtigung morphologisch und biochemisch unterschiedlicher Stämme einer Spezies konnten acht bis neun verschiedene Stämme pro Proband isoliert werden mit einer Streuung von fünf bis dreizehn unterschiedlichen Stämmen.

Unter den isolierten Spezies dominierte *Streptococcus mitis* mit 55% aller Isolate (100 von 180) und einer Trägerrate von 95%. Biochemisch kann zwischen zwei *Streptococcus mitis* Typen (1 und 2) unterschieden werden. Typ 1 dominierte mit 36,1% aller Isolate und einer Trägerrate von 90% über Typ 2 mit einem Anteil der Isolate von 19,4% und einer Trägerrate von 75%. Innerhalb des Typs 1 zeigte sich auch eine größere Variationsbreite an morphologisch und biochemisch unterscheidbaren Stämmen. 18 von 19 *Streptococcus mitis 1* Trägern wiesen mindestens zwei Untertypen auf mit einem Maximum von 10 Untertypen. Bei *Streptococcus mitis 2* Trägern waren nur bei 10 von 16 Personen mehr als ein Typ und maximal vier Untertypen nachweisbar. Eine ähnliche Variationsbreite konnte bei keiner anderen nachgewiesenen Spezies gezeigt werden.

Bei 50% der Probanden waren *Streptococcus salivarius salivarius*, *Streptococcus sanguinis* und *Gemella haemolysans* nachweisbar mit einem Prozentanteil der Isolate von jeweils 6,7%, 12,2% und 7,8%. Während *Granulicatella adjacens* bei drei Probanden isoliert werden konnte, waren neuere Gattungen und Spezies wie *Globicatella sanguinis* oder *Alloiococcus otitidis* nicht nachweisbar.

4.2 Streptokokken der Normalflora: ein zweiseitiges Phänomen

Vergrünende und nicht-hämolisierende Streptokokken werden als eine dominierende Komponente der Normalflora des Menschen und von Säugetieren angesehen (DEVRIESE L.A. et al. 1992 a; DEVRIESE L.A. et al. 1992 b; RUOFF K.L. et al. 1999 a; SNEATH P.H.A. et al. 1986). Mehrere

Arbeiten weisen auf eine wichtige Funktion der α -hämolyisierenden Streptokokken in der Infektionsabwehr hin (MACKOWIAK P.A. 1982; NAIR R.G. et al. 2001). So konnten Patienten mit durch β -hämolyisierende Streptokokken der Gruppe A verursachten rekurrierenden Tonsillitiden durch Rekolonisation des Epipharynx und der pharyngotonsillären Region mit α -hämolyisierenden Streptokokken ohne Antibiotika erfolgreich therapiert werden (ROOS K. et al. 1989; ROOS K. et al. 1993 a; ROOS K. et al. 1993 b).

Der Arbeitsgruppe von Kitten gelang es, Ratten durch Immunisierung mit einem Protein von *Streptococcus parasanguis* effektiv vor einer Endokarditis durch α -hämolyisierende Streptokokken zu schützen (KITTEN T. et al. 2002). Bei einem Vergleich der Normalflora von Kindern mit häufigen Otitis media-Episoden und einem gesunden Vergleichskollektiv konnte bei der Otitis media-Gruppe eine deutliche Abnahme der α -hämolyisierenden Streptokokken und Zunahme der Besiedelung durch *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* und *Moraxella catarrhalis* beobachtet werden. Gesunde Kinder wiesen allgemein eine höhere Anzahl von α -hämolyisierenden Streptokokken in ihren Rachenabstrichen auf als Otitis-anfällige Kinder. Die Autoren folgerten aus diesen Ergebnissen, dass α -hämolyisierende Streptokokken inhibitorische Effekte auf die Ansiedelung und Ausbreitung einer Reihe pathogener Organismen wie z.B. *Streptococcus pneumoniae*, β -hämolyisierende Streptokokken und *Staphylococcus aureus* besitzen. Eine Otitis media wird demnach durch eine Störung des Gleichgewichts der Normalflora hervorgerufen, wodurch opportunistische Erreger in der Ausbreitung begünstigt werden und zur Auslösung der Otitis media führen (BERNSTEIN et al. 1993).

Dieses Phänomen der unspezifischen Infektionsabwehr durch die Normalflora wird auch mit dem Begriff „Kolonisationsresistenz“ beschrieben. α -hämolyisierende Streptokokken der oropharyngealen Normalflora sind als wesentliche kolonisationsresistenz-vermittelnde Komponenten des Oropharynx zu bezeichnen. Es ist anzunehmen, dass die Fähigkeit zur Kolonisationsresistenz auf hoch spezifischen Mechanismen wie Adhäsion an orale Epithelzellen und Adaptation an die Wirtsnische beruht. Von der Vielzahl der zur Gruppe der α -hämolyisierenden Streptokokken gehörigen bakteriellen

Spezies scheinen jedoch nur wenige über diese spezifischen Fähigkeiten zu verfügen, da im wesentlichen nur vier Spezies (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis* und *Gemella haemolysans*) regelhaft (Trägerrate $\geq 50\%$) bei gesunden Probanden nachweisbar waren. Die hohe Stammvariation bei *Streptococcus mitis* (bis zu 10 phänotypische Variationen pro Proband) könnte darüber hinaus auf differenzierte Adaptationsmechanismen hindeuten. Über spezifische epithelzellwirksame Adhäsine ist jedoch bei diesen Spezies bislang nichts bekannt.

Die zweite Seite des Phänomens der Besiedelung des Oropharynx durch α -hämolisierenden Streptokokken liegt darin, dass diese Bakterien selbst als Erreger von einer Vielzahl von Infektionsprozessen fungieren können (ECHEVERRÍA M.J. et al. 1998; SERRAT C. et al. 1998; STALNIKOWICZ R. und BLOCK C. 2001). Einige Spezies sind schon lange als typische Erreger bei der Pathogenese der bakteriellen Endokarditis sowie der Karies beteiligt. Als Erreger der Endocarditis lenta spielen vor allem *S. sanguinis* und dextranbildende *S. mitis*-Stämme eine dominierende Rolle. Gemeinsam mit *S. bovis* und *S. mutans* sind sie für mehr als 50% aller bakteriellen Endokarditiden nativer Herzklappen verantwortlich. Auch bei den Spätinfektionen künstlicher Herzklappen ist *S. mitis* einer der typischen Erreger (BRANDIS H. und SCHAAL K.P. 1988; PARKER M.T. und BALL L.C. 1976; WATANAKUNAKORN C. und BURKERT T. 1993).

Bei neutropenischen Patienten sind in den letzten Jahren α -hämolisierende Streptokokken als Infektionserreger zunehmend häufiger isoliert worden (ARNING M. et al. 1990; AWADA A. et al. 1992; BEIGHTON D. et al. 1994; BURDEN A.D. et al. 1991; DEVAUX Y. et al. 1992; ELTING L.S. et al. 1992; HENSLEE J. et al. 1984; JACOBS J.A. et al. 1995). Bei dieser Patientengruppe hat sich das Spektrum von Infektionserregern in den letzten Jahrzehnten stark verändert. Während vor 20-30 Jahren mehr als 70% der Infektionen durch gramnegative Erreger ausgelöst wurde, hat insbesondere dank effektiver Antibiotika-Prophylaxeregime in den letzten Jahren die Rate der von gramnegativen Erregern ausgelösten Bakteriämien kontinuierlich bis auf 31%

abgenommen. Im Zuge dieser Entwicklung nahm die Letalität erheblich ab. Im gleichen Zeitraum nahm dagegen die Häufigkeit von Infektionen durch grampositive Erreger deutlich zu. Seit etwa 10 Jahren dominieren α -hämolsierende Streptokokken als Bakteriämieerreger (35-40% der Blutkulturisolate), vor allem die Spezies *Streptococcus mitis* und *Streptococcus sanguinis*. Diese Bakterien spielen besonders bei Leukämie- oder Lymphom-Patienten eine wesentliche Rolle im Hinblick auf die Morbidität (Sepsis- und ARDS-Entwicklung), wie auch die Letalität. Während der Phase der intensiven Chemotherapie scheinen sie die Hauptverursacher der Mortalität zu sein (BERNER R. et al. 1998; HANAGE W.P. und COHEN J. 2002; McWHINNEY P.H. et al. 1991; VALTEAU D. et al. 1991).

Da neutropenische Patienten häufig an zytostatikainduzierter Mukositis leiden, die ein Risikofaktor für eine Bakteriämieentwicklung darstellt, wird davon ausgegangen, dass die Erreger oft über die entzündete Mundschleimhaut zur Infektion führen. Molekulargenetische Untersuchungen konnten belegen, dass eine Übertragung von Mensch zu Mensch bei einem neutropenischen Patienten als selten einzustufen ist (WISPLINGHOFF H. et al. 1999). Das bedeutet, dass die Schleimhautflora selber eine Bakteriämie begünstigt oder sogar verursacht. (BLIJLEVENS N.M. et al 2001; BOCHUD P.Y. et al. 1994 a; BOCHUD P.Y. et al. 1994 b; BURDEN A.D. et al. 1991; TUNKEL A.R. und SEPKOWITZ K.A. 2002; VAN DER LELIE H. et al. 1991; VAN DER LELIE H. et al. 2001).

4.3 Alters- und geschlechtsabhängige Entwicklung des Keimspektrums

Unter Keimspektrum wird die Anzahl unterschiedlicher Arten von Mikroorganismen pro untersuchten Proband verstanden.

Angesichts der unterschiedlichen Gruppengrößen und der geringen Anzahl an Probanden können nur Tendenzen beobachtet werden. Die Theorie, dass die Speziesvielfalt mit dem Alter steigt, bestätigt sich in der vorliegenden Arbeit: In

Gruppe I (Alter <20 Jahre) herrschen *Streptococcus mitis* 1 und 2 mit 76 % eindeutig vor. In Gruppe II (20-40 Jahre) und III (>40 Jahre) ist der Anteil der beiden Leitkeime auf 50,5%, bzw. 56,8% gesunken. Die Speziesvielfalt aber ist gestiegen.

Eine geschlechtsbezogene Abhängigkeit war bei der Auswertung des Keimspektrums nicht feststellbar. Es lagen Isolate von 10 männlichen und 11 weiblichen Probanden vor, die sich hinsichtlich des Keimspektrums und der Stammvielfalt nur geringfügig unterschieden.

4.4 Beurteilung

Die Rachenabstriche der 21 untersuchten Personen (180 Isolate) wurden ausschließlich auf grampositive, katalasenegative Kokken untersucht. Es zeigte sich bei allen Probanden ein Keimspektrum der typischen Schleimhautbesiedelung mit Schwerpunkt auf den beiden Spezies *Streptococcus mitis* 1 und 2 (55,5% aller Isolate). Des weiteren konnten Spezies wie *Gemella haemolysans*, *Streptococcus salivarius salivarius* u.a. problemlos mit den vorhandenen diagnostischen Mitteln differenziert werden. Dieses Ergebnis spiegelt die allgemein bekannten Erkenntnisse über die Zusammensetzung der Normalflora des Menschen wider.

Spezies anspruchsvoller und seltener Gattungen wie *Alloiococcus*, *Globicatella* oder *Facklamia* konnten nicht oder nur in sehr begrenzter Anzahl isoliert werden, dies waren sechs Isolate der Spezies *Granulicatella adiacens*.

Für solche Spezies könnte möglicherweise mit Einsatz molekularbiologischer Verfahren eine höhere Nachweisrate erreicht werden. Bei diesen empfindlichen Bakterien ist Koloniewachstum – wenn überhaupt – teilweise erst nach einer Woche sichtbar. Für die Routinediagnostik wird es dadurch problematisch, für Patienten in angemessener Zeit einen Erreger zu identifizieren und ein Antibiogramm zu erstellen. Eine Vielzahl von Arbeiten unterstreicht nun die Vorzüge der molekularbiologischen Diagnostik für die Identifizierung. In einigen Studien konnten beispielsweise durch die Anwendung PCR-basierter Methoden

Erreger im Mittelohrsekret bei an Otitis media Erkrankten nachgewiesen werden, obwohl parallel angelegte mikrobiologische Kulturen kein Wachstum ergaben. Es erwies sich, dass fast immer Bakterien die Ursache der Otitis media sind und *Alloiococcus otitidis* dabei eine wichtige Rolle spielt. In den verschiedenen Studien wurde bei 18,5% bis 50% der untersuchten Patienten im Ergußmaterial des Mittelohres *Alloiococcus otitidis* nachgewiesen. *Alloiococcus otitidis* kam allein oder in Kombination mit anderen Bakterien, z.B. *Haemophilus influenzae* vor (BESWICK A.J. et al. 1999; FRAISE A.P. et al. 2001; HENDOLIN P.H. et al. 1997, 1999 und 2000; KALCIOGLU M.T. et al. 2002).

Dass anspruchsvollere Gattungen in der vorliegenden Arbeit nicht oder nur in sehr begrenzter Anzahl isoliert wurden, kann auch bedeuten, dass sie ihre Habitat außerhalb der Rachenschleimhaut haben. So wäre es möglich, dass *Alloiococcus otitidis* nur in Ohren vorkommt und nicht in der Rachenschleimhaut. Wo keine Bakterien sind, kann man auch keine nachweisen. Sie könnten auch überhaupt nicht zur „residenten Flora“ des Menschen gehören und nur an „exogenen“ Infektionen beteiligt sein. Diese These deckt sich mit einem der Einschlusskriterien für diese Studien, denn die Abstrichentnahme erfolgte nur von gesunden Probanden mit einem reizfreien Rachen ohne Entzündungszeichen.

4.5 Methodenkritik

Viele Spezies der Familie der Streptococcaceae sind mit Sicherheit, einige nur vermutlich der menschlichen Normalflora angehörig. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden Mitglieder dieser Familie anhand mikrobiologischer Methoden in Rachenabstrichen differenziert. Von den bisher bekannten 20 Gattungen konnten vier gefunden werden.

Nach einem ersten Ansatz auf Schafblut- und Kaninchenblutagar wurden einzelne Kolonien nach bestimmten Auswahlkriterien subkultiviert und differenziert. Es ist fraglich, ob diese subjektive Auswahl das Keimspektrum des

jeweiligen Probanden adäquat abbildet. Es besteht die Möglichkeit, dass langsam wachsende und anspruchsvolle Spezies unterrepräsentiert blieben. Die einmal gewonnen Reinkulturen konnten problemlos mit den beschriebenen Testverfahren differenziert werden, wobei die in Anlehnung an FACKLAM R.R. und ELLIOT J.A. (1995) zusätzlich durchgeführten Testreihen keine zusätzliche Differenzierung der gesuchten Spezies ermöglichten. Insofern kann das API 20 STREP als geeignetes Identifizierungssystem sowohl für die hier beschriebenen, als auch für die bisher in der medizinischen Diagnostik als relevant angesehenen Streptokokken angesehen werden. Es erhebt sich jedoch die Frage, ob es zukünftig für die Diagnostik ausreichend ist, wenn nicht alle für eine Infektion potentiell ursächlichen Bakterienspezies gefunden werden können. Für die klinische Anwendung ist allein die erfolgreiche Therapie eines Patienten ausschlaggebend. Die genaue Kenntnis der Antibiotikaresistenzen des jeweiligen Erregers ist dafür sehr wichtig, was eine sorgfältige Diagnostik voraussetzt (STALNIKOWICZ R. und BLOCK C. 2001). JACOBS J.A. et al (1995) und FRAISE A.P. et al. (2001) bezeichnen das API 20 STREP für die Identifikation von „Viridans-Streptokokken“, bzw. die Gattung *Alloiococcus* als nicht ausreichend. RUOFF K.L. (2002) meint, die Diagnostikmöglichkeiten im üblichen Routine-Labor seien nicht darauf ausgerichtet, Mitglieder der großen Familie der Streptococcaceae zu differenzieren. Die anspruchsvolleren Spezies können leicht verwechselt werden mit häufiger vorkommenden, weniger aufwendig differenzierbaren Spezies. Viele Vertreter dieser Familie können nur von Speziallaboratorien genau identifiziert werden. NIEDERMAN M.S. (2001) verlangt nach verbesserter Methodik bei klinischen Studien: Zahlreiche Veröffentlichungen präsentieren widersprüchliche Ergebnisse, worunter nicht nur die Patienten zu leiden haben; auch der Kostenaufwand ist hoch. Es ist notwendig, das Wissen über die aktuellen problematischen klinischen Fälle vor Ort (Erreger samt Sensibilitäts-Muster) ständig auf dem neuesten Stand zu halten. So kann das Auftreten oder die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen so niedrig wie möglich gehalten werden.

4.6 API 20 STREP im Vergleich mit der Referenzmethode bei den Tests PYR/LAP

Bei 138 Isolaten wurden die Schlüsselreaktionen der Pyrrolidonyl-Arylamidase (PYR) und Leucin-Arylamidase (LAP) sowohl im API 20 STREP, als auch mit dem sogenannten Plättchentest durchgeführt. 94,9% der PYR-Reaktionen und 93,5% der LAP-Reaktionen stimmten überein. Legt man den Plättchentest als Referenzmethode zugrunde, so fielen im API 20 STREP vier von dreizehn (30,8%) Reaktionen auf PYR falsch positiv aus. Die falsch positiv bewerteten Isolate waren jeweils zwei Stämme der Spezies *Granulicatella adiacens* und *Gemella haemolysans*. Bei der Reaktion auf LAP fielen vier von 19 (21,1%) Ergebnissen beim API 20 STREP falsch negativ aus. Es handelte sich um jeweils ein Stamm der Spezies *Granulicatella adiacens*, *Gemella haemolysans* sowie zwei Streptokokkenstämme. Eine mögliche Ursache der abweichenden Ergebnisse kann das schlechte Wachstum dieser anspruchsvollen Spezies und die damit verbundene geringe Enzymproduktion darstellen.

4.7 Penicillinempfindlichkeit

In der vorliegenden Arbeit wurden 121 Stämme auf ihre Penicillinempfindlichkeit getestet. 116 Stämme (95,9%) waren sensibel und vier Stämme (3,3%) mäßig sensibel. Ein Stamm (0,8%) erwies sich als resistent gegen Penicillin G.

Die mäßig sensiblen Isolate waren *Streptococcus mitis 1* (aus der Altersgruppe I), *Streptococcus mitis 2* und *Streptococcus sanguinis* (aus der Altersgruppe III), sowie *Streptococcus salivarius* (aus der Altersgruppe II). Der resistente Stamm war *Streptococcus mitis 1* (aus der Altersgruppe I). Dass drei der Spezies *Streptococcus mitis* sind, deckt sich mit den in der Einleitung beschriebenen Arbeiten, die *Streptococcus mitis* am häufigsten als resistente Spezies nachwiesen.

Dieses Ergebnis suggeriert auf den ersten Blick ein günstiges Resistenzprofil. Zu bedenken ist jedoch, dass hier ein Kollektiv von Gesunden untersucht wurde, also keine Blutkulturen bei Bakteriämie, sondern Rachenabstriche von reizfreier Schleimhaut. Ebenso war die Schleimhautflora keinem Selektionsdruck durch vorhergehende Antibiosen ausgesetzt. Unter diesem Aspekt ist der beobachtete Anteil von Trägern mäßig sensibler bis resistenter Isolate von 23,8% (fünf von 21 Probanden) bedenklich. Ein mäßig sensibler und der resistente Stamm - beide ein *Streptococcus mitis 1* - waren zudem von zwei Kindern im Alter von sechs und zwölf Monaten entnommen worden. Beide hatten bis zur Abstrichentnahme noch keine längeren Krankenhausaufenthalte, prophylaktische oder therapeutische Antibiotikagaben in der Anamnese. Es ist daher eher unwahrscheinlich, dass sich die Resistenz auf dem Boden eines primär sensiblen Stammes entwickelt hat. Für eine Penicillinresistenz in grampositiven Streptokokken bedarf es nicht nur einer Punktmutation, sondern einer verminderten Affinität mehrerer PBPs gegenüber β -Laktamantibiotika (SPRATT B. G. 1994). Die beiden resistenten *Streptococcus mitis*-Stämme in der vorliegenden Arbeit sind daher vermutlich eher schon als resistente Stämme von den Eltern auf die Kinder übertragen worden.

KING A. et al. konnten 2002 feststellen, dass in der Normalflora des Nasen-Rachen-Raumes Gesunder immer ein Pool von Streptokokken mit der genetischen Eigenschaft der Makrolid-Resistenz vorkommt, die auf andere Spezies übertragen werden kann. Ebenso kann Penicillinresistenz nachweislich durch genetische Rekombination von *Streptococcus mitis* auf *Streptococcus pneumoniae* übertragen werden (HAKENBECK R. et al. 1998). Die Rachenflora des Menschen kann so als Reservoir für Resistenzen dienen, die speziesübergreifend übertragen werden. Dadurch besteht die Gefahr, dass nicht nur die durch die resistenten Streptokokken verursachten Infektionen eine schlechtere Behandelbarkeit und ungünstigere Prognose zeigen. Primär nicht resistente Bakterien könnten bei einer opportunistischen Infektion Resistenzen von anderen Stämmen der residenten Flora erwerben und dadurch zu problematischen Krankheitsverläufen führen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Mundhöhle des Menschen ist von zahlreichen Bakterien besiedelt, die als „residente Flora“ bezeichnet wird und sich durch ein breites Keimspektrum auszeichnet. Grampositive Streptokokken gewinnen in den letzten Jahren als Krankheitserreger von opportunistischen Infektionen vor allem bei immunsupprimierten Patienten zunehmend an Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurden die Mitglieder der Familie der *Streptococcaceae* aus Rachenabstrichen von 21 gesunden Probanden charakterisiert. Das Abstrichmaterial wurde durch mikrobiologische Kultivierung weiterverarbeitet und differenziert. Die so gewonnen Reinkulturen wurden mit dem API 20 STREP und weiteren Zusatzreaktionen bis auf Speziesebene identifiziert und auf Penicillinresistenz untersucht. Von insgesamt 180 charakterisierten Isolaten stellten die Spezies *Streptococcus mitis* 1 und 2 sowie *Streptococcus sanguinis* den Hauptanteil mit jeweils 36,1%, 19,4% und 12,2%. Andere Spezies entstammten den Gattungen *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Gemella* und *Granulicatella*. Geschlechtsabhängige Unterschiede in der Zusammensetzung der Rachenflora konnten nicht nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich mit zunehmendem Alter ein tendentiell breiter gefächertes Keimspektrum. Vier Isolate erwiesen sich als mäßig sensibel gegenüber Penicillin G mit einer MHK zwischen 0,125 und 2 µg/ml, ein Isolat aus einem sechs Monate alten Kind als resistent mit einer MHK >2 µg/ml.

6 LITERATUR

- AGUIRRE M., COLLINS M.D. (1992): Phylogenetic analysis of *Alloiococcus otitis* gen.nov., sp.nov., an organism from human middle ear fluid, Int-J-Syst-Bacteriol. 1992 Jan; 42 (1) : 79-83
- AGUIRRE M., COLLINS M.D. (1993 a): Lactic acid bacteria and human clinical infection, J. Appl. Bacteriol. 75 (2) : 95-107
- AGUIRRE M., MORRISON D., COOKSON B.D., GAY F.W., COLLINS M.D. (1993 b): Phenotypic and phylogenetic characterization of some Gemella-like organisms from human infections: description of *Dolosigranulum pigrum* gen. nov., sp. nov., J. Appl. Bacteriol. 75 (6) : 608-12
- ALCAIDE F., LIÑARES J., PALLARES R., CARRATALA J., BENITEZ M.A., GUDIOL F., MARTIN R. (1995): In vitro activities of 22 β -lactam antibiotics against penicillin-resistant and penicillin-susceptible *Viridans Group Streptococci* isolated from blood, Antimicrob-Agents-Chemother. 1995 Oct : 2243-2247
- ALCAIDE F., CARRATALA J., LIÑARES J., GUDIOL F., MARTIN R. (1996): In vitro activities of eight macrolide antibiotics and RP-59500 (Quinupristin-Dalfopristin) against *Viridans Group Streptococci* isolated from blood of neutropenic cancer patients, Antimicrob-Agents-Chemother. 1996 Sept : 2117-2120
- ANDERSSON B., BEACHEY E.H., TOMASZ A., TUOMANEN E., SVANBORG-EDEN C. (1988): A sandwich adhesion on *Streptococcus pneumoniae* attaching to human oropharyngeal epithelial cells in vitro, Microb. Pathog. 1988 Apr ; 4(4) : 267-78
- ARNING M., GEHRT A., AUL C., RUNDE V., HADDING U., SCHNEIDER W. (1990): Septicemia due to *Streptococcus mitis* in neutropenic patients with acute leukemia, Blut 61 (6) : 364-8
- AWADA A., VAN DER AUWERA P., MEUNIER F., DANEAU D., KLASTERSKY J. (1992): Streptococcal and enterococcal bacteremia in patients with cancer, Clin. Infect. Dis. 15 : 33-48
- BEACHEY E.H. (1981): Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating attachment of bacteria to mucosal surfaces, J. Infect. Dis. 143 (3) : 325-45
- BEHR T., KOOB C., SCHEDL M., MEHLEN A., MEIER H., KNOPP D., FRAHM E., OBST U., SCHLEIFER K., NIESSER R., LUDWIG W. (2000): A nested array of rRNA targeted probes for the detection and identification of *enterococci* by reverse hybridization, Syst. Appl. Microbiol. 23 (4) : 563-72
- BEIGHTON D., CARR A.D., OPPENHEIM B.A. (1994): Identification of viridans streptococci associated with bacteraemia in neutropenic cancer patients, J. Med. Microbiol. 40 (3) : 202-4
- BENTLEY R.W., LEIGH J.A., COLLINS M.D. (1991): Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences, Int. J. Syst. Bacteriol. 41 (4) : 487-94

- BERNER R., SAUTER S., DUFFNER U., BRANDIS M., NIEMEYER C.M. (1998): Bakteriämie-Episoden bei pädiatrisch-onkologischen Patienten, insbesondere durch Streptokokken der Viridans-Gruppe, *Klin. Pädiatr.* 210 (4) : 256-60
- BERNSTEIN J.M., FADEN H.F., DRYJA D.M., WACTAWSKI-WENDE J. (1993): Micro-ecology of the nasopharyngeal bacterial flora in otitis-prone and non-otitis-prone children, *Acta-Otolaryngol.* 113 (1) : 88-92
- BESWICK A.J., LAWLWEY B., FRAISE A.P., PAHOR A.L., BROWN N.L. (1999): Detection of *Alloiococcus otitidis* in mixed bacterial populations from middle-ear effusions of patients with otitis media, *Lancet* 354 (9176) : 386-9
- BJÖRKROTH K.J., SCHILLINGER U., GEISEN R., WEISS N., HOSTE B., HOLZAPFEL W.H., KORKEALA H.J., VANDAMME P. (2002): Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. non., detected in food and clinical samples, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 (Pt 1) : 141-8
- BLIJLEVENS N.M., DONNELLY J.P., DE-PAUW B.E. (2001): Empirical therapy of febrile neutropenic patients with mucositis: challenge of risk-based therapy, *Clin. Microbiol. Infect.* 7 Suppl. 4 : 47-52
- BOCHUD P.Y., CALANDRA T., FRANCIOLI P. (1994 a): Bacteremia due to *viridans streptococci* in neutropenic patients: a review, *Am. J. Med.* 97 (3) : 256-64
- BOCHUD P.Y., EGGIMAN P.H., CALANDRA T., VAN MELLE G., SAGHAFI L., FRANCIOLI P. (1994 b): Bacteremia due to viridans streptococcus in neutropenic patients with cancer: clinical spectrum and risk factors, *Clin. Infect. Dis.* 18 (1) : 25-31
- BOSLEY G.S., WHITHNEY A.M., PRUCKLER J.M., MOSS C.W., DANESHVAR M., SIH T., TALKINGTON D.F. (1995): Characterization of ear fluid isolates of *Alloiococcus otitidis* from patients with recurrent otitis media, *J. Clin. Microbiol.* 33 (11) : 2876-80
- BOUVET A., VILLEROY F., CHENG. F., LAMESCH C., WILLIAMSON R., GUTMANN L. (1985): Characterization of nutritionally variant *streptococci* by biochemical tests and penicillin-binding proteins, *J. Clin. Microbiol.* 22 (6) : 1030-4
- BOUVET A., GRIMONT F., GRIMONT P.A.D. (1989): *Streptococcus defectivus* sp.nov. and *Streptococcus adjacens* sp.nov., Nutritionally variant Streptococci from human clinical specimens, *Int-J-Syst-Bacteriol.* 39 (3) : 290, 293
- BOWDEN G.H., HAMILTON I.R. (1998): Survival of oral bacteria, *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 9 (1) : 54-85
- BRANDIS H., SCHAAL K.P. (1988): Taxonomie der Bakterien, 38-46, in: BRANDIS H., PULVERER G.: *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*, 6. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- BROUQUI P., RAOULT D. (2001): Endocarditis due to rare and fastidious bacteria, *Clin. Microbiol. Rev.* 14 (1) : 177-207

- BURDEN A.D., OPPENHEIM B.A., CROWTHER D., HOWELL A., MORGENSTERN G.R., SCARFFE J.H., THATCHER N. (1991): Viridans streptococcal bacteraemia in patients with haematological and solid malignancies, *Eur. J. Cancer* 27 (4) : 409-11
- CALIENDO A.M., JORDAN C.D., RUOFF K.L. (1995): *Helcococcus*, a new genus of catalase-negative, gram-positive cocci isolated from clinical specimens, *J-Clin-Microbiol.* 1995 Jun : 1638-1639
- CHAGLA A.H., BORCZYK A.A., FACKLAM R.R., LOVGREN M. (1998): Breast abscess associated with *Helcococcus kunzii*, *J. Clin. Microbiol.* 36 (8) : 2377-9
- CHOI H.J., CHEIGH C.I., KIM S.B., LEE J.C., LEE D.W., CHOI S.W., PARK J.M., PYUN Y.R. (2002): *Weissell kimchii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium from kimchi, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 (Pt 2) : 507-11
- COLLINS M.D., FACKLAM R.R., FARROW J.A., WILLIAMSON R. (1989): *Enterococcus raffinosus* sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov. and *Enterococcus pseudoavium* sp. nov., *FEMS. Microbiol. Lett.* 48 (3) : 283-8
- COLLINS M.D., RODRIGUES U.M., PIGOTT N.E., FACKLAM R.R. (1991): *Enterococcus dispar* sp. nov. a new *Enterococcus* species from human sources, *Lett. Appl. Microbiol.* 12 (3) : 95-8
- COLLINS M.D., AGUIRRE M., FACKLAM R.R., SHALLCROSS J., WILLIAMS A.M. (1992): *Globicatella sanguis* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive catalase- negative bacterium from human sources, *J. Appl. Bacteriol.* 73 (5) : 433-7
- COLLINS M.D., FACKLAM R.R., RODRIGUES U.M., RUOFF K.L. (1993): Phylogenetic analysis of some *Aerococcus*-like organisms from clinical sources: description of *Helcococcus kunzii* gen. nov., sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 : 425-429
- COLLINS M.D., FALSEN E., LEMOZY J., ÅKERVALL E., SJÖDÉN B., LAWSON P.A. (1997): Phenotypic and phylogenetic characterization of some *Globicatella*-like organisms from human sources: description of *Facklamia hominis* gen nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (3) : 880-882
- COLLINS M.D., HUTSON R.A., FALSEN E., SJÖDÉN B., FACKLAM R.R. (1998 a): *Gemella bergeriae* sp. nov., isolated from human clinical specimens, *J. Clin. Microbiol.* 36 (5) : 1290-3
- COLLINS M.D., HUTSON R.A., FALSEN E., SJÖDÉN B., FACKLAM R.R. (1998 b): Description of *Gemella sanguinis* sp. nov., isolated from human clinical specimens, *J. Clin. Microbiol.* 36 (10) : 3090-3
- COLLINS M.D., LAWSON P.A., MONASTERIO R., FALSEN E., SJÖDÉN B., FACKLAM R.R. (1998 c): *Facklamia ignava* sp. nov., isolated from human clinical specimens, *J. Clin. Microbiol.* 36 (7) : 2146-8
- COLLINS M.D., LAWSON P.A., MONASTERIO R., FALSEN E., SJÖDÉN B., FACKLAM R.R. (1999 a): *Ignavigranum ruoffinae* sp. nov., isolated from human clinical specimens, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 : 97-101

- COLLINS M.D., HUTSON R.A., FALSEN E., SJÖDÉN B. (1999 b): *Facklamia sourekii* sp.nov., isolated from human sources, Int-J-Syst-Bacteriol. 49 : 635-638
- COLLINS M.D., HUTSON R.A., FALSEN E., SJÖDÉN B. (1999 c): *Facklamia tabacinasalis* sp. nov., from powdered tobacco, Int. J. Syst. Bacteriol. 49 : 1247-50
- COLLINS M.D., FALSEN E., FOSTER G., MONASTERIO L.R., DOMINGUEZ L., FERNANDEZ-GARAZABAL J.F. (1999 d): *Helcococcus ovis* sp.nov., a gram-positive organism from sheep, Int. J. Syst. Bacteriol. 49 : 1429-32
- COLLINS M.D., RODRIGUEZ-JOVITA M., HUTSON R.A., FALSEN E., SJÖDÉN B., FACKLAM R.R. (1999 e): *Dolosicoccus paucivorans* gen. nov., sp. nov., isolated from human blood, Int. J. Syst. Bacteriol. 49 : 1439-42
- COLLINS M.D., RODRIGUEZ-JOVITA M., LAWSON P.A., FALSEN E., FOSTER G. (1999 f): Characterization of a novel gram-positive, catalase-negative coccus from horses: description of *Eremococcus coleocola* gen. nov., sp. nov., Int. J. Syst. Bacteriol. 49 : 1381-5
- COLLINS M.D., LAWSON P.A. (2000): The genus *Abiotrophia* (Kawamura et al.) is not monophylogenetic: proposal of *Granulicatella* gen.nov., *Granulicatella adiacens* comb.nov. and *Granulicatella balaenopterae* comb. nov., Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50 : 365-369
- COOKSEY R.C., THOMPSON F.S., FACKLAM R.R. (1979): Physiological characterization of nutritionally variant streptococci, J. Clin. Microbiol. 10 (3) : 326-30
- DAVIS J.M., PEEL M.M. (1994): Identification of ten clinical isolates of *nutritionally variant streptococci* by commercial streptococcal identification systems, Aust. J. Med. Sci. 15 : 52-55
- DEASY B.M., REA M.C., FITZGERALD G.F., COGAN T.M., BERESFORD T.P. (2000): A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*, Syst. Appl. Microbiol. 23 (4) : 510-22
- DEVAUX Y., ARCHIMBAUD E., GUYOTAT D., PLOTTON C., MAUPAS J., FLEURETTE J., FIERE D. (1992): Streptococcal bacteremia in neutropenic adult patients, Nouv. Rev. Fr. Hematol. 34 (2) : 191-5
- DEVRIESE L.A., CRUZ CLOQUE J.I., DE HERDT P., HAESBROUCK F. (1992 a): Identification and composition of the tonsillar and anal enterococci and streptococcal flora of dogs and cats, J. Appl. Bacteriol. 73 (5) : 421-5
- DEVRIESE L.A., LAURIER L., DE HERDT P., HAESBROUCK F. (1992 b): Enterococcal and streptococcal species isolated from faeces of calves, young cattle and dairy cows, J. Appl. Bacteriol. 72 (1) : 29-31
- DEVRIESE L.A., COLLINS M.D., WIRTH R. (1992 c): The genus *Enterococcus*, 1465-1481 in: BALOWS A., TRUPER H.G., DWORKIN M., HARDER W., SCHLEIFER K.H.: The Prokaryotes. A Handbook on

- the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, N.Y.
- DEVRIESE L.A., POT B., COLLINS M.D. (1993): Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of distinct enterococcal species and species groups, J. Appl. Bacteriol. 75 (5) : 399-408
- DOERN G.V., FERRARO M.J., BRUEGGEMANN A.B., RUOFF K.L. (1996): Emergence of high rates of antimicrobial resistance among *viridans group streptococci* in the United States, Antimicrob. Agents. Chemother. 40 (4) : 891-4
- ECHEVERRÍA M.J., LÓPEZ DE GOICOECHEA M.J., AYARZA R., BERDONCES P., AUDICANA J., FENÁNDEZ R., SORIANO F. (1998): Meningitis caused by *Streptococcus mitis* in a cocaine addict, Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 1998 Nov; 16 (9) : 441-2
- ELTING L.S., BODEY G.P., KEEFE B.H. (1992): Septicemia and shock syndrome due to viridans streptococci: a case-control study of predisposing factors, Clin. Infect. Dis. 14 (6) : 1201-7
- EVANS J.B. (1986): Genus *Aerococcus*, Bergey's manual of systematic bacteriology; vol. 2; Williams & Wilkins; Baltimore, London, Los Angeles, Sydney. : 1080
- FACKLAM R.R., ELLIOT J.A. (1995): Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the *Streptococci* and *Enterococci*, Clin. Microbiol. Rev. 1995 Oct; 8(4) : 480-495
- FACKLAM R.R., SAHM D.F., TEIXEIRA L.M. (1999): Enterococcus, Manual of Clinical Microbiology, 7th Edition, ASM PRESS, Washington, D.C.: 297-305
- FADEN H., DRYJA D. (1989): Recovery of a unique bacterial organism in human middle ear fluid and its possible role in chronic otitis media, J. Clin. Microbiol. 27 (11) : 2488-91
- FALKOW S. (1990): The „Zen“ of bacterial pathogenicity, 3-9 in: IGLEWSKI B.H., CLARK V.L.: Molecular basis of bacterial pathogenesis, Academic Press, Inc., New York
- FELMINGHAM D., WILSON A.P.R., QUINTANA A.I., GRUNEBERG R.N. (1992): *Enterococcus species* in urinary tract infection, Clin. Infect. Dis. 15 : 295-301
- FRANSEN E.V., PEDRAZZOLI V., KILIAN M. (1991): Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx, Oral Microbiol. Immunol. 6 (3) : 129-33
- FRAISE A.P., PAHOR A.L., BESWICK A.J. (2001): Otitis media with effusion: the role of *Alloiococcus otitidis*, Ann. Med. 33 (1) : 1-3
- GARVIE E.I. (1986): Genus *Leuconostoc* van Tieghem 1878; Genus *Pediococcus* Claussen 1903. In: Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. (editors), Bergey's manual of systematic bacteriology; Vol. 2; Williams & Wilkins; Baltimore, London, Los Angeles, Sydney. : 1071-1079
- GASSER F. (1994): Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections, Bull. Inst. Pasteur 92 : 45-67

- GÓMEZ-HERNANDO C., TORO C., GUTIÉRREZ M., ENRÍQUEZ A., BAQUERO M. (1999): Isolation of *Alloiococcus otitidis* from the external ear in children, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18 (1) : 69-70
- GONZÁLEZ I., GEORGIU M., ALCAIDE F., BALAS D., LIÑARES J., DE LA CAMPA A.G. (1998): Fluorquinolone resistance mutations in the *parC*, *parE* and *gyrA* genes of clinical isolates of *Viridans group streptococci*, *Antimicrobiol. Agents and Chemotherapy* 42 (11) : 2792-8
- GRANINGER W., RAGETTE R. (1992): Nosocomial bacteremia due to *Enterococcus faecalis* without endocarditis, *Clin. Infect. Dis.* 15 : 49-57
- HAAS J., JERNICK S.L., SCARDINA R.J., TERUYA J., CALIENDO A.M., RUOFF K.L. (1997): Colonization of skin by *Helcococcus kunzii*. *J. Clin. Microbiol.* 35 (11) : 2759-61
- HAHN H., BRANDIS H. (1988): Infektion und Infektabwehr, 65-92, in: BRANDIS H., PULVERER G.: *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*; 6. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- HAKENBECK R., KÖNIG A., KERN I., VAN DER LINDEN M., KECK W., BILLOT-KLEIN D., LEGRAND R., SCHOOT B., GUTMANN L. (1998): Acquisition of five high-M_r penicillin-binding protein variants during transfer of high-level β-lactam resistance from *Streptococcus mitis* to *Streptococcus pneumoniae*, *J. of Bacteriol.* 180 : 1831-40
- HALL G.S., GORDON S., SCHROEDER S., SMITH K., ANTHONY K., PROCOP G.W. (2001): Case of synovitis potentially caused by *Dolosigranulum prigrum*, *J. Clin. Microbiol.* 39 (3) : 1202-3
- HANAGE W.P., COHEN J. (2002): Stimulation of cytokine release and adhesion molecule expression by products of *Viridans Streptococci*, *J. Infect. Dis.* 185 (3) : 357-67
- HARDIE J.M. (1986): Genus *Streptococcus*, *Bergey's manual of systematic bacteriology*; vol. 2; Williams & Wilkins; Baltimore, London, Los Angeles, Sydney. : 1043-7, 1054-63
- HASTY D.L., OFEK I., COURTNEY H.S., DOYLE R.J. (1992): Multiple adhesins of *streptococci*, *Infect. Immun.* 60 (6) : 2147-52
- HENDOLIN P.H., MARKKANEN A., YLIKOSKI J., WAHLFORS J.J. (1997): Use of Multiplex PCR for simultaneous detection of four bacterial species in middle ear effusions, *J. Clin. Microbiol.* 35 (11) : 2854-8
- HENDOLIN P.H., KARKKANEN U., HIMI T., MARKKANEN A., YLIKOSKI J. (1999) : High incidence of *Alloiococcus otitidis* in otitis media with effusion, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 18 (10) : 860-5
- HENDOLIN P.H., PAULIN L., YLIKOSKI J. (2000): Clinically applicable multiplex PCR for four middle ear pathogens, *J. Clin. Microbiol.* 38 (1) : 125-32
- HENSLEE J., BOSTROM B., WEISDORF D., RAMSAY N., McGLAVE P., KERSEY J (1984): Streptococcal sepsis in bone marrow transplant patients, *Lancet* 1 (8373) : 393

- HIMI T., KITA H., MITSUZAWA H., HARIMAYA A., TARKKANEN J., HENDOLIN P., YLIKOSKI J., FUJII N. (2000) : EFFECT OF *Alloiococcus otitidis* and three pathogens of otitis media in production of interleukin-12 by human monocyte cell line, FEMS Immunol. Med. Microbiol. 29 (2) : 101-6
- HOYLES L., FOSTER G., FALSEN E., THOMSON L.F., COLLINS M.D. (2001): *Facklamia miroungae* sp. nov., from a juvenile southern elephant seal (*mirounga leonina*), Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51 (Pt 4) : 1401-3
- JACOBS J.A., SCHOUTEN H.C., STOBBERINGH E.E., SOETERS P.B. (1995): *Viridans streptococci* isolated from the bloodstream. Relevance of species identification, Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 22 (3) : 267-73
- JAING T.H., CHIU C.H., HUNG I.J. (2002): Successful treatment of meningitis caused by highly-penicillin-resistant *Streptococcus mitis* in a leukemic child, Chang Gung Med. J. 25 (3) : 190-3
- JENKINSON H.F., LAMONT R.J. (1997): Streptococcal adhesion and colonization, Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 8 (2) : 175-200
- JOH D., WANN E.R., KREIKEMEYER B., SPEZIALE P., HOOK M. (1999): Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells, Matrix-Biol. 1999 Jun; 18 (3) : 211-223
- KALCIOGLU M.T., ONCEL S., DURMAZ R., OTLU B., MIMAN M.C., OZTURAN O. (2002): Bacterial etiology of otitis media with effusion; focusing on the high positivity of *Alloiococcus otitidis*, New Microbiol. 25 (1) : 31-5
- KANAMOTO T., SATO S., INOUE M. (2000): Genetic heterogeneities and phenotypic characteristics of strains of the genus *Abiotrophia* and proposal of *Abiotrophia para-adiacens* sp. nov., J. Clin. Microbiol. 38 (2) : 492-8
- KAWAMURA Y., HOU X.G., SULTANA F., LIU S., YAMAMOTO H., EZAKI T. (1995): Transfer of *Streptococcus adiacens* and *Streptococcus defectivus* to *Abiotrophia* gen. nov. as *Abiotrophia adiacens* comb. nov. and *Abiotrophia defectiva* comb. nov., respectively, Int. J. Syst. Bacteriol. 45 : 798-803
- KILIAN M., MIKKELSEN L., HENRICHSEN J. (1989): Taxonomic study of Viridans Streptococci: description of *Streptococcus gordonii* sp. nov. and emended descriptions of *Streptococcus sanguis* (White and Sneath 1982), and *Streptococcus mitis* (Andrewes and Horder 1906), Int. J. Syst. Bacteriol. 39 : 471-484
- KILPPER-BÄLZ R., FISCHER G., SCHLEIFER K.H. (1982): Nucleic acid hybridization of group N and group D streptococci, Curr. Microbiol. 7 : 245-250
- KING A. BATHGATE T., PHILLIPS I. (2002): Erythromycin susceptibility of viridans streptococci from the normal throat flora of patients treated with azithromycin or clarithromycin, Clin. Microbiol. Infect. 8 (2) : 85-92
- KITA H., HIMI T., FUJII N., YLIKOSKI J. (2000): Interleukin-8 secretion of human epithelial and monocytic cell lines induced by middle ear pathogens, Microbiol. Immunol. 44 (6) : 511-7

- KITTEN T., MUNRO C.L., WANG A., MACRINA F.L. (2002): Vaccination with FimA from *Streptococcus parasanguis* protects rats from endocarditis caused by other *Viridans Streptococci*, *Infect. Immun.* 70 (1) : 422-5
- KLIJN N., WEERKAMP A.H., DE VOS B.M. (1991): Identificaton of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction – amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes, *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (11) : 3390-3
- KOBAYASHI T., KIMURA B., FUJII T. (2000): Differentiation of Tetragenococcus populations occurring in products and manufacturing process of puffer fish ovaries fermented with rice-bran, *Int. J. Food Microbiol.* 56 (2-3) : 211-8
- KOHLER G., LUDWIG W., SCHLEIFER K.H. (1991): Differentiation of *lactococci* by rRNA restriction analysis, *FEMS Microviol. Lett.* 68 (3) : 307-12
- KONTCHOU C.Y., BLONDEAU R. (1990): Isolation and characterisation of hydrogen peroxide producing *Aerococci* sp. from soil samples, *FEMS Microbiol. Lett.* 68 : 323-328
- LaCLAIRE L., FACKLAM R.R. (2000 a): Antimicrobial susceptibilities and clinical sources of *Dolosigranulum pigrum* cultures, *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44 (7) : 2001-3
- LaCLAIRE L., FACKLAM R.R. (2000 b): Antimicrobial susceptibilities and clinical sources of *Facklamia species*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (8) : 2130-2
- LAMONT R.J., ROSAN B., BAKER C.T., NELSON G.M. (1988): Characterization of an adhesion antigen of *Streptococcus sanguis* G9B, *Infect. Immun.* 56 (9) : 2417-23
- LAWSON P.A., COLLINS M.D., FALSEN E., SJÖDÉN B., FACKLAM R.R. (1999): *Facklamia languida* sp. nov., isolated from human clinical specimens, *J. Clin. Microbiol.*; 37 (4) : 1161-4
- LIUKKONEN J., HAATAJA S., TIKKANEN K., KELM S., FINNE J. (1992): Identification of N-acetylneuraminyl alpha 2 →3 poly-N-acetyllactosamine glycans as the receptors of sialic acid-binding *Streptococcus suis* strains, *J. Biol. Chem.* 1992 Oct 15; 267 (29) : 21105-11
- LÜTTICKEN R. (1988): Die Familie der Streptococcaceae, 290-302, in: BRANDIS H., PULVERER G., N.: *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*, 6. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- MACKOWIAK P.A. (1982): The normal microbial flora, *N. Engl. J. Med.* 307 (2) : 83-93
- McWHINNEY P.H., GILLESPIE S.H., KIBBLER C.C., HOFFBRAND A.V., PRENTICE H.G. (1991): *Streptococcus mitits* and ARDS in neutropenic patients, *Lancet* 337 (8738) : 429
- MEGRAN D.W. (1992): Enterococcal endocarditis, *Clin. Infect. Dis.* 15 : 63-71
- MUTSCHLER E., SCHÄFER-KORTING M. (1997): *Arzneimittelwirkungen*, 658-68. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

- NAIR R.G., ANIL S., SAMARANAYAKE L.P. (2001): The effect of oral bacteria on *Candida albicans* germ-tube formation, 109 (2) : 147-54
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (1998): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Eighth informational supplement. M100-S8. NCCLS Wayne, Pa.
- NEALON T.J., MATTINGLY S.J. (1984): Role of cellular lipoteichoic acids in mediating adherence of serotype III strains of group B *Streptococci* to human embryonic, fetal, and adult epithelia cells, *Infect. Immun.* 43 (2) : 523-30
- NICHOLS R.L., MUZIK A.C. (1992): Enterococcal infections in surgical patients: the mystery continues, *Clin. Infect. Dis.* 15 : 72-76
- NIEDERMAN M.S. (2001): Impact of antibiotic resistance on clinical outcomes and the cost of care, *Crit. care med.*, 29 (4 Suppl) : N114-20
- OLIGINO L., FIVES-TAYLOR P. (1993): Overexpression and purification of a fimbria-associated adhesin of *Streptococcus parasanguis*, *Infect. Immun.* 1993 Mar; 61(3) : 1016-22
- PARKER M.T., BALL L.C. (1976): *Streptococci* and *Aerococci* associated with systemic infection in man, *J. Med. Microbiol.* 9 : 275-302
- PEEL M.M., DAVIS J.M., GRIFFIN K.J., FREEDMAN D.L. (1997): *Helcococcus kunzii* as sole isolate from an infected sebaceous cyst, *J. Clin. Microbiol.* 35 (1) : 328-9
- POUTANEN S.M., AZAVEDO J.de, WILLEY B.M., LOW D.E., MacDONALD K. (1999): Molecular characterisation of multidrug resistance in *Streptococcus mitis*, *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1999 Jun : 1505-1507:
- RITTERBAND D., SHAH M., KRESLOFF M., INTAL M., SHABTO U., SEEDOR J. (2002) : *Gemella haemolysans* keratitis and consecutive endophthalmitis, *Am. J. Ophthalmol.* 133 (2) : 268-9
- RODRIGUES U.M., AGUIRRE M., FACKLAM R.R., COLLINS M.D. (1991): Specific and intraspecific molecular typing of *Lactococci* based on polymorphism of DNA encoding rRNA, *J. Appl. Bacteriol.* 71 (6) : 509-16
- ROGGENKAMP A., ABELE-HORN M., TREBESIU S. K.-H., TRETTER U., AUTENRIETH I.B., HEESEMANN J. (1998): *Abiotrophia elegans* sp.nov., a possible pathogen in patients with culture-negative endocarditis, *J-Clin-Microbiol.* 1998 Jan; 36 (1) : 100-104
- ROLPH H.J., LENNON A., RIGGIO M.P., SAUNDERS W.P., MacKENZIE D., COLDERO L., BAGG J. (2001): Molecular identification of microorganisms from endodontic infections, *J. Clin. Microbiol.* 39 (9) : 3282-9
- ROOS K., GRAHN E., LIND L., HOLM S., (1989): Treatment of recurrent streptococcal tonsillitis by recolonization with alpha-streptococci, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8 : 318-19
- ROOS K., GRAHN E., JOHANSSON H., HOLM S.E., LIND L. (1993 a): Interfering alpha-streptococci as a protection against recurrent streptococcal tonsillitis in children, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 25 (1-3) : 141-8

- ROOS K., HOLM S.E., GRAHN E., LIND L., (1993 b): Alpha-streptococci as supplementary treatment of recurrent streptococcal tonsillitis: a randomized placebo-controlled study, *Scand. J. Infect. Dis.* 25 (1) : 31-5
- ROSIN H., HENSCHLER D. (1998): β -Laktam-Antibiotika, 689-98, in: FORTH W., HENSCHLER D., RUMMEL W., STARKE K., N: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
- ROTTA J. (1986): Genus *Streptococcus*, Bergey's manual of systematic bacteriology; vol. 2; Williams & Wilkins; Baltimore, London, Los Angeles, Sydney. : 1047-54
- RUOFF K.L. (1991): Nutritionally variant streptococci, *Clin. Microbiol. Rev.* 4 : 184-190
- RUOFF K.L., WHILEY R.A., BEIGHTON D. (1999 a): Streptococcus, Manual of Clinical Microbiology, 7thEdition, ASM PRESS, Washington, D.C. : 283-296
- RUOFF K.L. (1999 b): Leuconostoc, Pediococcus, Stomatococcus and miscellaneous gram-positive cocci that grow aerobically, Manual of Clinical Microbiology, 7thEdition, ASM PRESS, Washington, D.C. : 306-315
- RUOFF K.L. (2002): Miscellaneous catalase-negative, gram-positive cocci: emerging opportunists, *J. Clin. Microbiol.* 40 (4) : 1129-33
- SATO S., KANAMOTO T., INQUE M. (1999): *Abiotrophia elegans* strains comprise 8% of the Nutritionally Variant Streptococci isolated from the human mouth, *J-Clin-Microbiol.* 1999 Aug; 37 (8) : 2553-2556
- SCHLEGEL L., GRIMONT F., COLLINS M.D., REGNAULT B., GRIMONT P.A., BOUVET A. (2000): *Streptococcus infantarius* sp.nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food, *Int. J. Evol. Microbiol.* 50 Pt. 4 : 1425-34
- SCHLEIFER K.H. , KRAUS J., DVORAK C., KILPPER-BÄLZ R., COLLINS M.D., FISCHER W. (1985): Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov., *Syst. Appl. Microbiol.* 6 : 183-95
- SERRAT C., BERBEGAL J., BARRANCO M.J., MARTINEZ P. (1998): Pleural empyema by *Streptococcus mitis*, *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 1998 Dec; 16 (10) : 489-90
- SHARP S.E. (1999): Commensal and Pathogenic Microorganisms of Humans , Manual of Clinical Microbiology, 7thEdition, ASM PRESS, Washington, D.C. : 23-32
- SHEEHY E.C., BEIGHTON D., ROBERTS G.J. (2000): the oral microbiota of children undergoing liver transplantation, *Oral Microbiol. Immunol.* 15 (3) : 203-10
- SHERMAN J.M. (1937): The streptococci, *Bacteriol. Rev.* 1 : 3-97
- SNEATH P.H.A., MAIR N.S., SHARPE M.E., HOLT J.G.(1986): Bergey's manual of systematic bacteriology; vol. 2; Williams & Wilkins; Baltimore, London, Los Angeles, Sydney. : 1063-1065, 1071-1082

- SPELLERBERG B., ROZDZINSKI E., MARTIN S., WBER-HEYNE MANN J., SCHNITZLER N., LUTTICKEN R., PODBIELSKI A. (1999): Lmb, a protein with similarities to the Lral adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin, *Infect. Immun.*; 67 (2) : 871-8
- SPRATT B. G. (1994): Resistance to antibiotics mediated by target alterations, *Science* 264 : 388-393
- STALNIKOWICZ R., BLOCK C. (2001): The yield of blood cultures in a department of emergency medicine, *Eur. J. Emerg. Med.* 8 (2) : 93-7
- STILES M.E., HOLZAPFEL W.H. (1997): Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy, *Int. J. Food. Microbiol.* 36 (1) : 1-29
- STINSON M.W., SAFULKO K., LEVINE M.J. (1991): Adherence of *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* to *Streptococcus sanguis* in vitro, *Infect. Immun.* 1991 Jan; 59 (1) : 102-8
- SWITALSKI L.M., BUTCHER W.G., CAUFIELD P.C., LANTZ M.S. (1993): Collagen mediates adhesion of *Streptococcus mutans* to human dentin, *Infect. Immun.* 1993 Oct; 61 (10) : 4119-25
- TAKEUCHI K., MAESAKO K., YUTA A., SAKAKURA Y. (1994): Interleukin-8 gene expression in middle ear effusions, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*; 103 (5 Pt 1) : 404-7
- TARKKANEN J., HIMI T., ATSHUSHI H., CARLSON P., YLIKOSKI J., MATTILA P.S. (2000): Stimulation of adenoidal lymphocytes by *Alloiococcus otitidis*, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 109 (10 Pt 1) : 958-64
- TART R.C., VAN DE RIJN I. (1993): Identification of the surface component of *Streptococcus defectivus* that mediates extracellular matrix adherence, *Infect. Immun.* 1993 Dec; 61 (12) : 4994-5000
- TUNKEL A.R., SEPKOWITZ K.A. (2002): Infections caused by *viridans streptococci* in patients with neutropenia, *Clin. Infect. Dis.* 34 (11) : 1524-9
- TUOHY M.J., PROCOP G.W., WASHINGTON J.A. (2000): Antimicrobial susceptibility of *Abiotrophia adiacens* and *Abiotrophia defectiva*, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*; 38 (3) : 189-91
- TYLEWSKA S., HRYNIEWICZ W. (1987): *Streptococcus pyogenes* cell wall protein responsible for binding to pharyngeal epithelial cells, *Zentralbl. Bakteriolog. Microbiol. Hyg. A.* 1987 Jun; 265 (1-2) : 146-50
- VACCA-SMITH A.M., JONES C.A., LECINE M.J., STINSON M.W. (1994): Glucosyltransferase mediates adhesion of *Streptococcus gordonii* to human endothelial cells in vitro, *Infect. Immun.* 1994 Jun; 62 (6) : 2187-94
- VALENTIN-WEIGAND P., TALAY S.R., TIMMIS K.N., CHHATWAL G.S. (1993): Identification of a fibronectin-binding protein as adhesin of *Streptococcus pyogenes*, *Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.* 1993 Apr; 278 (2-3) : 238-45
- VALTEAU D., HARTMANN O., BRUGIERES L., VASSAL G., BENHAMOU E., ANDREMONT A., KALIFA C., LEMMERLE J. (1991):

- Streptococcal septicaemia following autologous bone marrow transplantation in children treated with high-dose chemotherapy, *Bone Marrow Transplant.* 7 (6) : 415-9
- VAN DER LELIE H., VAN KETEL R.J., CON DEM BORNE A.E., VAN OERS R.H., THOMAS B.L., GOUDSMIT R. (1991): Incidence and clinical epidemiology of streptococcal septicemia during treatment of acute myeloid leukemia, *Scand. J. Infect. Dis.* 23 (2) : 163-8
- VAN DER LELIE H., THOMAS B.L., VAN OERS R.H., EK POST M., SJAMSOEDIN S.A., VAN DIJK OVERTOOM M.L., TIMMER J.G., VON DE, BORNE A.E. (2001): Effect of locally applied GM-CSF on oral mucositis after stem cell transplantation: a prospective placebo-controlled double-blind study, *Ann. Hematol.* 2001 80 (3) : 150-4
- VELA A.I., FERNANDEZ E., LAS HERAS A., LAWSON P.A., DOMINGUEZ L., COLLINS M.D., FERNANDEZ-GARAYZABAL J.F. (2000): Meningoencephalitis associated with *Globicatella sanguinis* infection in lambs, *J. Clin. Microbiol.* 38 (11) : 4254-5
- VON HUNOLSTEIN C., RICCI M.L., OREFICI G. (1993): Adherence of glucan-positive and glucan-negative strains of *Streptococcus bovis* to human epithelial cells, *J. Med. Microbiol.* 1993 Jul; 39 (1) : 53-7
- WALLBANKS S., MARTINEZ-MURCIA A.J., FRYER J.L., PHILLIPS B.A., COLLINS M.D. (1990): 16 S rRNA determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40 (3) : 224-30
- WANG J.R., STINSON M.W. (1994): M protein mediates streptococcal adhesion to HEp-2 cells, *Infect. Immun.* 1994 Feb; 62 (2) : 442-8
- WATANAKUNAKORN C., BURKERT T. (1993): Infective endocarditis at a large community teaching hospital, 1980-1990. A review of 210 episodes, *Medicine- (Baltimore)* 72 (2) : 90-102
- WHILEY R.A., BEIGHTON D. (1998): Current classification of the oral streptococci, *Oral Microbiol. Immunol.* 13 (4) : 195-216
- WHITNEY A.M., O'CONNOR S.P. (1993): Phylogenetic relationship of *Gemella morbillorum* to *Gemella haemoysans*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 (4) : 832-8
- WIJETUNGA M., BELLO E., SCHATZ I. (2002): *Abiotrophia* endocarditis: a case report and review of literature, *Hawaii Med. J.* 61 (1) : 10-2
- WISPLINGHOFF H., REINERT R.R., CORNLEY O., SEIFERT H. (1999): Molecular relationships and antimicrobial susceptibilities of *Viridans Group Streptococci* isolated from blood of neutropenic cancer patients, *J. Clin. Microbiol.* 1999 Jun : 1876-1880
- WOESE C.R. (1987): Bacterial evolution, *Microbiol. Rev.* 51 (2) : 221-71

7 ANHANG

7.1 Probandendaten

Die Probanden (P) wurden in zeitlicher Reihenfolge durchnummeriert. In der folgenden Tabelle sind das Alter in Jahren und das Geschlecht aufgeschlüsselt.

Gruppe I		Gruppe II		Gruppe III	
Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen
P16 (4)	P7 (1)	P12 (23)	P2 (25)	P14 (48)	P1 (44)
P17 (0,5)		P13 (24)	P3 (31)	P18 (43)	P10 (55)
		P15 (24)	P4 (25)	P19 (57)	
		P21 (38)	P5 (32)	P20 (41)	
			P6 (23)		
			P8 (24)		
			P9 (25)		
			P11 (27)		

7.2 Nährmedien

7.2.1 Kaninchenblutagar (KBA)

-Spezialpepton	23,0 g/l
-Stärke	1,0 g/l
-Natriumchlorid	5,0 g/l
-Agar	10,0 g/l
-Kaninchenblut	5,0 %
pH 7,3 +/- 0,2	

7.2.2 Schafsblutagar (SBA)

Columbia-Blut-Agar mit 5% Schafblut (OXOID Best.Nr. CM 331)

7.2.3 Brain-Heart-Infusion-Agar (BHIA)

OXOID Best.Nr. CM 375

-Kalbshirnininfusion	12,5 g/l
-Rinderherzinfusion	5,0 g/l
-Proteose-Pepton	10,0 g/l
-Natriumchlorid	5,0 g/l
-Glukose	2,0 g/l
-Dinatriumhydrogencarbonat	2,5 g/l
-Agar	10,0 g/l
-Schafsblut	5,0 %
-Zusatz von Isovitalex (Firma BBL ,Best.Nr.4311876)	

7.2.4 Heart-Infusion-Bouillon (HIB)

DIFCO Best.Nr.1.10493

1. für die 10° und 45°C-Bebrütung:

-Indikator Bromcresolpurpur (0,48%)	2,0 % V/V
-Dextrose	0,1 %
-Rinderinfusion	500 g/l
-Tryptose	10 g/l
-Natriumchlorid	5 g/l

2. für die Natriumchlorid-Toleranz:

-Indikator Bromcresolpurpur (0,48%)	2,0 % V/V
-Glukose	0,5 %
-Natriumchlorid	6,5 %
-Rinderinfusion	500 g/l
-Tryptose	10 g/l

7.2.5 Enterococcosel-Agar (ECA)

BBL Best.Nr. 4312205

-Caseinpepton, pankreatisch verdaut	17,0 g/l
-tierisches Gewebelysat	3,0 g/l
-Hefeextrakt	5,0 g/l
-Rindergalle, (dehydriert)	10,0 g/l
-Natriumchlorid	5,0 g/l
-Natriumcitrat	1,0 g/l
-Äskulin	1,0 g/l
-Eisen-Ammonium-Citrat	0,5 g/l
-Konservierungsstoff NaN ₃	0,25g/l
-Agar	13,5 g/l

pH bei 25°C 7,1 +/- 0,2

7.2.6 Dextranagar (DXA)

eigene Herstellung

-Tryptose	15 g
-Sojapepton	5 g
-NaCl	5 g
-Saccharose	50 g
-Agar	20 g
-A. dest.	1000 ml
pH 7,4 +/- 0,2	

Danksagungen

Herzlich bedanken möchte ich mich im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit bei

PD Dr. Ulrike Schumacher für ihre große Geduld, ihre guten Ratschläge und dafür, dass sie immer für mich da war;

Andrea Schäfer, Birgit Manncke und Lydia Häußermann, die mir bei meinen Experimenten mit Rat und Tat stets freundlich zur Seite standen;

meiner Mutter Heide für ihr aufopferungsvolles Babysitten;

meinem Mann Jörg, ohne dessen Computerkenntnisse ich das alles nicht geschafft hätte.

Lebenslauf

Name: Tatjana Zukunft
 Geburtsdatum: 26.10.1970
 Geburtsort: Balingen
 Eltern: Heidegund und Hans-Jürgen Zukunft
 Familienstand: verheiratet mit Jörg Zukunft, geb. Stütz, ein Kind

1981-1986 Deutsche Schule Madrid
 1986-1991 Friedrich-List Gymnasium Reutlingen, Abitur
 1992-1994 Ausbildung zur MTA am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Tübingen
 1994-2001 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
 Famulaturen : Innere Medizin, Kinderheilkunde, Geburtshilfe, Anästhesie
 8. Nov. 2001 3. Staatsexamen
 2001-2002 Doktorarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Tübingen
 2002-2004 AiP im Klinikum Ludwigsburg: 13 Monate an der Frauenklinik und 5 Monate an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie/Psychosomatik
 14. Mai 2004 Geburt des Sohnes Richard Johannes
 1. Okt. 2004 Erhalt der Approbation als Ärztin
 2. Mai 2005 Wiederaufnahme der Arbeit als Ärztin in einer Gemeinschaftspraxis in Reutlingen