

Aus der Universitätsklinik für Anaesthesiologie und
Intensivmedizin Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. Unertl

**Über den Einfluss von Aggregation Substance und
Binding Substance sowie Metronidazol und Cefotaxim
auf die Translokation von Enterococcus faecalis in T84-
Darmepithelzellkulturen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Anke Rembold-Schmitz, geb. Rembold

aus

Böblingen

2006

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. W. A. Krüger

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. W. Steurer

Inhaltsverzeichnis

<u>1 Einleitung.....</u>	<u>1</u>
<u>1.1 Enterokokken.....</u>	<u>1</u>
<u>1.1.1 Mikrobiologische und klinische Bedeutung</u>	<u>1</u>
<u>1.1.2 Antibiotikaresistenz und Letalität.....</u>	<u>2</u>
<u>1.2 Pathogenese der Enterokokkensepsis und Risikofaktoren.....</u>	<u>2</u>
<u>1.2.1 Virulenzfaktoren.....</u>	<u>5</u>
<u>1.3 Epithelzellkulturen.....</u>	<u>6</u>
<u>1.4 Ziele der Arbeit.....</u>	<u>7</u>
<u>2 Material und Methoden.....</u>	<u>9</u>
<u>2.1 Zellkultur.....</u>	<u>9</u>
<u>2.2 Bakterienkulturen.....</u>	<u>10</u>
<u>2.3 E. faecalis-Stämme.....</u>	<u>10</u>
<u>2.4 Antibiotika.....</u>	<u>11</u>
<u>2.5 Geräte und Reagenzien.....</u>	<u>11</u>
<u>2.6 Rezepturen.....</u>	<u>12</u>
<u>2.7 Zellpflege.....</u>	<u>13</u>
<u>2.8 Versuche zu Aggregation Substance und Binding Substance.....</u>	<u>15</u>
<u>2.8.1 Vorversuche.....</u>	<u>15</u>
<u>2.8.2 Adhärenzversuche.....</u>	<u>17</u>
<u>2.8.3 Vergleich der Translokation in Abhängigkeit von AS oder BS.....</u>	<u>18</u>
<u>2.9 Einfluss von Antibiotika auf die Translokation</u>	<u>18</u>
<u>2.9.1 Vorversuche.....</u>	<u>18</u>
<u>2.9.2 Einfluss von Antibiotika auf die Translokation von E. faecalis 12030</u>	<u>23</u>
<u>2.10 Auswertung und Statistik.....</u>	<u>24</u>
<u>3 Ergebnisse.....</u>	<u>26</u>
<u>3.1 Beurteilung der Konfluenz von T84-Zellen.....</u>	<u>26</u>
<u>3.2 Einfluss der Inkubationszeit die Translokation.....</u>	<u>26</u>
<u>3.3 Einfluss von Aggregation Substance und Binding Substance auf</u> <u>Adhärenz und Translokation.....</u>	<u>28</u>

3.3.1 Einfluss der Ultraschallbehandlung auf E. faecalis Phänotyp AS+ BS+	28
3.3.2 Einfluss der Ultraschallbehandlung auf die Translokation	30
3.3.3 Adhärenz an T84-Zellen in Abhängigkeit von Aggregation Substance und Binding Substance	33
3.3.4 Translokation der Enterokokken in Abhängigkeit von Aggregation Substance und Binding Substance	37
3.4 Einfluss von Antibiotika auf die Translokation	41
3.4.1 Wachstum von E. faecalis 12030 unter Antibiotika	41
3.4.2 Ausschluss zytotoxischer Wirkung der Antibiotika auf T84-Zellen	47
3.4.3 Translokation von Enterococcus faecalis 12030 unter Metronidazol und Cefotaxim	54
4 Diskussion	58
4.1 Bakterielle Translokation	58
4.2 T84-Zelllinie	62
4.3 Translokation in Abhängigkeit von Aggregation Substance und Binding Substance	64
4.3.1 Vorbereitung mit Ultraschall	64
4.3.2 Die Rolle von Aggregation Substance und Binding Substance als Virulenzfaktoren bei der Translokation	65
4.4 Einfluss von Antibiotika Translokation	72
4.5 Ausblick	78
5 Zusammenfassung	80
6 Anhang	83
6.1 Literaturverzeichnis	83
Schulbildung	2
Studium	2
berufliche Tätigkeit	2

1 Einleitung

1.1 Enterokokken

1.1.1 Mikrobiologische und klinische Bedeutung

Enterokokken sind Gram-positive, Katalase-negative fakultativ anaerobe Kokken. Aufgrund ihrer Anordnung in Paaren oder kurzen Ketten wurden sie früher den Streptokokken zugeordnet worden. Mitte der 80er Jahre wurden Enterokokken aufgrund von DNA-Analysen einer eigenen Gattung zugeteilt, genannt *Enterococcus* (68). Die Gattung *Enterococcus* ist im menschlichen Organismus vor allem durch *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* vertreten. Sie gehören zur residenten Flora des menschlichen Intestinaltraktes. Der Großteil der luminalen Flora im Dickdarm wird zu 99% von Anaerobiern gebildet. Enterokokken repräsentieren bei mischkosternährten Erwachsenen häufig nur Bruchteile von Prozent der im Darm vorhandenen Bakterien (53). In den letzten Jahren gewinnen sie zunehmend an Bedeutung, denn immer öfter werden sie als Erreger zum Teil schwerer nosokomialer Infektionen isoliert (70). Seit Anfang der 80er Jahre wurden Enterokokken nicht nur als Erreger von Endokarditiden, Infektionen des Urogenitaltraktes und der Gallenwege, sondern zunehmend häufiger als Ursache einer Sepsis isoliert (30).

Heute stehen Enterokokken unter den Erregern nosokomialer Infektionen bei Intensivpatienten, sowohl in Deutschland als auch in den USA, nach *Staphylococcus aureus* an zweiter Stelle (88, 89). Sie rufen 23,5% der Harnwegsinfekte, 12% der Sepsis-Fälle (88), und 5-15% der Endokarditiden hervor. Außerdem sind sie an Infektionen im Bereich des Abdomens, des Beckens, der Gallengänge und an Wundinfektionen beteiligt, zumeist als Teil einer Mischflora (60). Als Erreger einer Sepsis werden Enterokokken in der Häufigkeit an dritter bis vierter Stelle angesiedelt (36, 89, 101), in manchen Studien sogar an zweiter Stelle (85). Differenziert man die für die Infektionen verantwortlichen Enterokokken genauer, findet man in 80% der Fälle *Enterococcus faecalis*, beinahe der gesamte Rest wird durch *Enterococcus*

faecium verursacht. Andere Enterokokkenspezies werden nur selten isoliert (47, 60).

Aufgrund dieser Häufigkeitsverteilung soll in dieser Arbeit speziell auf die Translokation von *Enterococcus faecalis* eingegangen werden.

1.1.2 Antibiotikaresistenz und Letalität

Gegen Cephalosporine und Penicillinase-feste Penicilline weisen Enterokokken eine natürliche Resistenz auf. Gegen Amoxicillin und Ampicillin hingegen ist *E.faecalis* meist empfindlich. Für schwere Infektionen wird die Kombination einer Therapie von Amoxicillin oder Ampicillin mit Gentamicin empfohlen (42, 115). Besorgnis erregend ist das Auftreten vancomycinresistenter Enterokokken in Kliniken, erstmalig wird hierüber 1988 von Uttley et al. berichtet (100). Die am häufigsten isolierte Spezies mit Glykopeptidresistenz ist *Enterococcus faecium* (23, 69).

33-68% der Enterokokken-Bakteriämien verlaufen tödlich, handelt es sich um vancomycinresistente Enterokokken so vermutet man eine Letalität zwischen 17 und 100% (34). Unter Berücksichtigung der Grunderkrankung und anderer Faktoren liegt die Sterblichkeitsrate, die der Sepsis direkt zugeschrieben werden kann, bei 31%, bzw. bei 37% für vancomycinresistente Isolate (35, 58).

1.2 Pathogenese der Enterokokkensepsis und Risikofaktoren

Sepsis ist definiert als systemisches inflammatorisches Syndrom (SIRS), das mit einer Infektion, bei der Mikroorganismen und/oder ihre Toxine in den Blutstrom gelangen, assoziiert ist (15). Diese Reaktion des Körpers im Sinne eines SIRS ist Fieber ($>38,3^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($<35,6^{\circ}\text{C}$), Tachykardie (Herzfrequenz $>90/\text{min}$), Tachypnoe (mehr als 20 Atemzüge/min), Leukozytose ($>12000/\mu\text{l}$) oder Leukopenie ($<4000/\mu\text{l}$) oder Linksverschiebung ($<10\%$). Zusätzlich kann es bei der Sepsis zur Dysfunktion beziehungsweise Minderperfusion von einem oder mehreren lebenswichtigen Organen kommen. Als septischer Focus für die systemische Ausbreitung von Enterokokken wurden unter anderem Infektionen der Gallenwege, des Urogenitaltrakts, oder Endokarditiden angenommen. Häufig wird *Enterococcus faecalis* aber auch bei

Patienten mit Sepsis isoliert, bei denen keiner der genannten Herde nachgewiesen werden konnte (30). In einigen Fällen ließen sich offene Wunden oder zentrale Venenkatheter als Eintrittspforte für Enterokokken finden (16, 43, 85, 94, 101). In schätzungsweise 40% der Enterokokken-Bakteriämien kann kein Focus für *E.faecalis* gefunden werden (41). Möglicherweise ist dies dadurch erklärbar, dass manche Bakterien in der Lage sind, die Darmwand zu durchwandern und auf diese Weise die Lymphbahnen und andere Organe erreichen können (5, 6, 10, 30, 44, 62, 104, 106).

Normalerweise bildet die Darmmukosa eine natürliche Grenze zwischen Darmlumen und Lymph- oder Blutbahnen. Im gesunden Organismus verhindert sie die Invasion und systemische Ausbreitung körpereigener Bakterien aus dem Darm. Die Innenfläche der Schleimhaut ist mit Mucin überzogen, einem Glykoprotein mit hohem Molekulargewicht, und man findet Phospholipide. Die Darmzellen haben neben der Resorption von Nahrung auch wichtige immunologische Eigenschaften. Sie sezernieren eine Vielzahl von Zytokinen, sowie IgA. Zudem beinhalten die Zellen verschiedene an der Immunantwort beteiligte Leukozyten (104). So bildet die Darmwand nicht nur eine mechanische Grenze, sondern auch eine durch körpereigene Abwehr unterstützte Barriere. Unter bestimmten Umständen können Bakterien die Darmwand penetrieren, und so in extraintestinale Bereiche, wie Blut oder Lymphbahnen, gelangen (5, 7-9, 12, 92, 109). Diesen Vorgang nennt man bakterielle Translokation. Fakultativ intrazelluläre Bakterien wie Salmonellen und Listerien, aber auch Enterokokken, *Escherichia coli*, Streptokokken, Staphylokokken und Lactobacillen besitzen die Fähigkeit zur Translokation, während andere Bakterienarten nur unter ungewöhnlichen Umständen oder gar nicht translozieren (65, 66, 81, 109).

Bei der Penetration der Darmwand muss es den Bakterien möglich sein, die menschliche Immunabwehr zu umgehen. Nachweislich überlebt *E.faecalis* für einen längeren Zeitraum in peritonealen Makrophagen von Mäusen (41).

Bakterien können bei der Translokation unterschiedliche anatomische Wege benutzen: entweder werden Darmzellen selbst durchwandert, oder deren Zwischenräume. In der Darmwand befinden sich unter anderem die sogenannten M-Zellen, deren Aufgabe darin besteht, Antigene aus dem

Darmlumen an antigenpräsentierende Zellen weiterzuleiten. Es konnte nachgewiesen werden, dass auch Bakterien von M-Zellen transportiert werden, und so einen Weg in die Lymphbahn finden können (19, 20, 51, 98). Bislang existiert jedoch noch kein In-vitro-Modell für M-Zellen. In den Zellzwischenräumen sind die Zellen über tight junctions (Zonula occludens), Zonula adherens und Desmosomen verbunden. Während die Funktion von Zonula adherens und Desmosomen vor allem in der Zell-Zell-Adhäsion liegt, verleihen die tight junctions dem Zellzwischenraum selektive Permeabilität für Stoffe aus dem extrazellulären Raum von apikal nach basolateralen Bereichen. *Neisseria meningitidis* penetriert zum Beispiel in T84-Monolayern die Zellen selbst, ohne die tight junctions zu verändern (82), enterohaemorrhagische *Escherichia coli* erhöhen die Permeabilität von tight junctions in T84-Monolayern (80). Für Enterokokken sind bisher noch keine genaueren Mechanismen bekannt. Jedoch erfolgt nach der Penetration des Darmepithels die weitere systemische Ausbreitung wohl eher hämatogen (87%) als lymphogen (25%) (64).

Das Risiko einer bakteriellen Translokation, mit der möglichen Folge einer Enterokokkensepsis wird durch endogene und exogene Faktoren erhöht (3). Zu den endogenen Faktoren für die Entstehung einer Enterokokkensepsis zählen schwere Grunderkrankungen, Splenektomie (75, 91), hämorrhagischer Schock (2), Hypoxie der Darmzellen (112), Immunsuppression (13), oder Verschiebungen in der gastrointestinalen Mikroflora (11, 12). Zu den exogenen Faktoren werden die maschinelle Beatmung, Blasenkatheter (16), bakterielle Endotoxine (26), Verbrennungen (25, 62), chirurgische Eingriffe und Transplantationen sowie totale parenterale Ernährung gezählt. Auch langer Aufenthalt im Krankenhaus gilt als Risikofaktor, ohne dass dabei genauer geklärt wird, welcher Umstand das Risiko erhöht (

Einige Studien untersuchten den Verdacht, dass unter antibiotischer Therapie eine häufigere Translokation von Bakterien stattfindet. So treten Infektionen durch *E. faecalis* häufig bei Patienten auf, die wegen Peritonitis Breitspektrum-Antibiotika mit Enterokokkenlücke erhalten haben (29).

Die Studie von Caballero-Granado et al. zeigt eine Assoziation zwischen der Verabreichung von sowohl Cephalosporinen der 2. und 3. Generation, als auch

von Imipenem und einer Sepsis durch *Enterococcus faecalis* (16, 77). Auch Pellares et al. fanden einen Zusammenhang zwischen der Therapie mit Cephalosporinen der 2. und 3. Generation und Enterokokkensepsis (76). Gleiches gilt für Streptomycin (30). Gerade angesichts der steigenden Zahlen vancomycinresistenter Enterokokken ist es wichtig, die Risikofaktoren der Sepsis zu kennen. Die Ergebnisse einer Studie ließen vermuten, dass die Kombination aus Neutropenie und Antibiotikatherapie, die eventuell Veränderungen in der Zusammensetzung der Darmflora hervorruft, das Risiko der Sepsis mit vancomycinresistenten Enterokokken erhöht (67). Auch für Daptomycin (LY146032) wird ein fördernder Effekt für die Translokation von Enterokokken angenommen (30, 78).

Protektiver Effekt wird epidermal growth factor (EGF) und Mucin zugeschrieben. EGF soll Enterokokken an der Translokation und an der Infektion von zentralen Venenkathetern hindern. *Escherichia coli* wird beispielsweise an der Penetration der Darmwand durch Mucin gehemmt (30, 77).

1.2.1 Virulenzfaktoren

Es ist noch nicht viel bekannt über die Virulenzfaktoren von Enterokokken. Diskutiert werden Hämolyisin (Cytolysin), Gelatinase, Lipase, Hämagglutinin und Aggregation Substance (18, 37, 50), sowie ESP (enterococcal surface protein) (90)

Aggregation Substance findet sich hauptsächlich auf *Enterococcus faecalis*, selten auf *Enterococcus faecium* (37). Sie erleichtert die für den Austausch von Plasmiden notwendige Bakterien-Konjugation. Dabei sezerniert das Empfänger-Bakterium spezifische Pheromone für ein ihm fehlendes Plasmid. Erreichen diese ein potentiell Donor-Bakterium, welches das gewünschte Plasmid besitzt, kommt es auf diesem Plasmid zu einer Gen-Aktivierung, und eine haarähnliche Oberflächenstruktur, genannt „Aggregation Substance“ (im Folgenden abgekürzt mit AS), wird an der Bakterienoberfläche exprimiert. Diese führt zusammen mit der auf der Oberfläche von fast allen *E.faecalis* vorhandenen „Binding Substance“ (im Folgenden als BS abgekürzt), zu einer Verklumpung von Donor und Rezeptor. In einem flüssigen Nährmedium kann man sehen, wie die Zellaggregate zu Boden sinken. Nach stattgefundenem

Plasmidaustausch wird die Produktion des zugehörigen Pheromons eingestellt, um eine erneute Verklumpung zu verhindern (21, 40).

Die pathogene Bedeutung erlangt AS, da sie zum einen die Weitergabe von Antibiotikaresistenzen erleichtert, deren Gene ebenfalls auf Plasmiden kodiert sind. Zum anderen wird eine deutliche Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Aggregation Substance und der Adhärenz von *E. faecalis* an eukaryote Zellen festgestellt (40, 52, 73, 74, 89). Eine Erklärung für die verstärkte Adhärenz wird darin vermutet, dass AS strukturelle Gemeinsamkeiten in der Aminosäuresequenz mit den Integrinen besitzt (RGD-Motiv). Dies sind Moleküle, welche die Zelladhäsion eukaryoter Zellen vermitteln. Zu ihnen zählt zum Beispiel auch das Fibronectin (40, 52, 73, 89). Man stellt sich vor, dass die Darmoberfläche viele solcher Stellen besitzt, an denen Bakterien adhären können, die aber normalerweise von der residenten Flora besetzt werden. Dadurch kommt es zur sogenannten Kolonisationsresistenz, die den menschlichen Organismus vor Besiedelung mit Keimen schützt, die nicht zur Normalflora gehören. Diese Kolonisationsresistenz kann durch antimikrobielle Chemotherapie oder auch Fibronectindepletion in ihrem Gleichgewicht gestört werden, wodurch anderen Mikroorganismen Anheftungsmöglichkeiten geboten werden.

BS scheint ebenfalls die Virulenz von *E. faecalis* zu erhöhen. So wird Stämmen, die sowohl AS als auch BS bei experimenteller Endokarditis im Kaninchenmodell exprimieren, die größte Virulenz zugeschrieben (89).

Aber auch hierzu existieren verschiedene Studien unterschiedlicher Ergebnisse, so wurde in einer Studie an Mäusen festgestellt, dass weder AS noch BS die Translokation signifikant beeinflussten, sondern vielmehr die vorher oral zugeführten Antibiotika. Unter oraler antibiotischer Therapie waren Enterokokken häufiger in Lymphknoten zu finden als ohne Antibiotikagabe (55).

1.3 Epithelzellkulturen

Die Translokation von Bakterien findet am ehesten im Kolon statt (105). Somit wurde ein In-vitro-Modell benötigt, das möglichst den Epithelzellen des Kolons nahe kommt. In der Arbeit wurden Zellen der T84-Zelllinie verwendet. Diese Zelllinie wurde aus einer Lungenmetastase eines Colon-Carcinoms isoliert. Im

Aufbau entsprechen die T84-Zellen adulten Kryptenzellen des Kolons (71). Sie bilden polarisierte Einzelzellschichten, d.h. eine Basalmembran und apikal gelegene Mikrovilli aus. Die Zellen sind untereinander mit tight junctions und Desmosomen verbunden. Nachweislich findet ein Transport von Elektrolyten statt (27, 71). Es sind noch andere dem Kolonepithel ähnliche Zelllinien erhältlich, zum Beispiel Caco-2. Sie bilden ebenfalls polarisierte Einzelzellschichten mit Mikrovilli und tight junctions. Zusätzlich bilden Caco-2-Zellen jedoch bestimmte Enzyme (Hydrolase, Peptidasen, und Disaccharidasen), die typischerweise nur im Fetalstadium der Kolonzellen gebildet werden (71). Auch HT29 ist eine dem Kolonepithel ähnliche Zelllinie. Ihre Differenzierung ist durch die Zugabe oder das Weglassen bestimmter Substrate im Medium stark zu beeinflussen. Beide, HT 29 und Caco-2 besitzen eher die Eigenschaften fetaler Kolonepithelzellen (71). Für die Fragestellungen dieser Arbeit wurden deswegen T84-Zellen verwendet.

1.4 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollen in einem In-vitro-Modell Einflussfaktoren auf die Translokation von Enterokokken untersucht werden. Hierzu wurden zwei Faktoren näher untersucht: zum einen die Oberflächenmoleküle AS und BS, zum anderen die mögliche Rolle von Antibiotika am Beispiel von Metronidazol und Cefotaxim als Vertreter klinisch bedeutsamer Antibiotika. Daraus ergeben sich folgende Fragen:

1. Einfluss von AS und BS auf die Translokation von *E.faecalis* in T84-Zellen
2. Einfluss von AS und BS auf die Adhärenz von *E.faecalis* an T84-Zellen
3. Einfluss von Cefotaxim und Metronidazol auf die Translokation von *E.faecalis* in T84-Zellen

Vorab ergaben sich zur Beantwortung dieser Fragen methodische Vorversuche. Es galt mögliche unerwünschte Einflüsse von AS und BS beziehungsweise der Antibiotika auf die Versuchsergebnisse zu untersuchen, um den Versuchsablauf entsprechend zu optimieren. Unter anderem waren manche der

Versuchsergebnisse ausschlaggebend für die Wahl von Cefotaxim und Metronidazol.

4. Durch AS und BS an der Oberfläche kommt es zu Klumpungsreaktionen. Diese Klumpen können durch Behandlung mit Ultraschall gelöst werden. Durch die Anwendung von Ultraschall kommt es abhängig von der Dauer der Anwendung zur Wärmeentwicklung. Diese Wärme kann die Bakterien schädigen. Wie lange ist die Vorbehandlung mit Ultraschall nötig, um ein sicheres Lösen der Aggregate zu erreichen und trotzdem kein Hitzeschaden an den Enterokokken entsteht?
5. Ist die Behandlung mit Ultraschall vor dem Aufbringen von *E.faecalis* mit AS und/ oder BS auf die T84-Zellen notwendig? Gibt es hierdurch Einflüsse auf die Zahl der translozierten Enterokokken?
6. Hat die Vorbehandlung mit Ultraschall vor dem Aufbringen auf TSA Einfluss auf die Zahl der zählbaren Enterokokken?
7. Eine Auswahl an Antibiotika wurde dahingehend untersucht, ob sie einen Einfluss auf die T84-Zellen haben könnten. Zur Beurteilung wurde hier das Wachstum der Zellen unter verschiedenen Konzentrationen dieser Antibiotika beobachtet.
8. Die selben Antibiotika wurden auf mögliche Einflüsse auf das Wachstum der Enterokokken untersucht.

Die Ergebnisse von Punkt 7 und 8 zeigten, dass Metronidazol und Cefotaxim am besten für unser Modell geeignet waren. Deshalb wurden diese Antibiotika für weiter gehende Experimente ausgewählt und deren Einflüsse konzentrationsabhängig untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Material	Hersteller	Bezeichnung/ Katalognummer
T84-Zelllinie	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas; VA, USA	CCL-248
F-12K Nutrient Mixture (Kaighn's Modification)	GIBCO BRL, Invitrogen, Karlsruhe	21127-022
Dulbecco's MEM with Glutamax-I	GIBCO BRL	61965-026
Fetal Bovine Serum	GIBCO BRL	10270-106
L-Glutamine 200MM	GIBCO BRL	25030-024
PBS Dulbecco's	GIBCO BRL	14040-091
Trypsin-EDTA	GIBCO BRL	25300-062
DMSO cell freezing medium (Dimethylsulfoxid)	Sigma, St.Louis; MO, USA Sigma	C-6164
a) mit Serum b) ohne Serum		C-6295
BSA Albumin, Bovine Powder	Sigma	A-2058
Fibronectin Human, natural	Becton Dickinson, Heidelberg	40008
Vitrogen 100 Purified collagen	Cohesion, Palo Alto, CA, USA	CPO 701
Triton	Sigma	X-100
HEPES-Puffer, 1M	GIBCO BRL	15630-056
Salzsäure	Merck, Darmstadt	9060

Material	Hersteller	Bezeichnung/ Katalognummer
Trypanblau, solution 0,4%	Sigma	T-8154
Nutrient Mixture F10(HAM)	GIBCO BRL	41550-021

2.2 Bakterienkulturen

Material	Hersteller	Bezeichnung/ Katalognummer
TSA-Platten (Tryptone Soja Agar)	Becton Dickinson	4354086
TSB (Tryptone Soja Broth)	Oxoid, Wesel	CM 129
Schafsblutagar-Platten	Becton Dickinson	4354087
Demineralisiertes Wasser (Aqua dest.)		Eigene Herstellung mit Filteranlage: Seral, Ransbach

2.3 E.faecalis-Stämme

Enterococcus faecalis 12030

E. faecalis 12030 ist ein Patientenisolat (45) und wurde in den Versuchen zur Translokation unter Antibiotika verwendet.

Gentechnisch veränderte E.faecalis OG1SSp

Vier verschiedene Enterokokkenmutanten fanden Verwendung in den Versuchen zur Klärung der Adhärenz an T84-Zellen sowie des Translokationsverhaltens von Enterokokken in Abhängigkeit von AS und BS (siehe folgende Tabelle).

Mutante	Mutation	Phänotyp	Aggregation	Verklumpung in Kombination
OG1SSp pINY1801	Rekombinantes Plasmid vermittelt permanente Expression von AS	AS+BS+	+	+, untereinander
OG1SSp pWM401	Fragment von pCF10 geklont in den Shuttle	AS-BS+	-	zusammen mit INY 3000

	Vektor pWM401			
INY3000 pINY1801	Insertion von Tn916 in das OG1-Chromosom (unterbricht das Gen für BS) + rekombinantes Plasmid (s.o.)	AS+BS-	-	zusammen mit OG1SSp pWM401
INY3000 pWM401	Tn916 Mutante + Shuttle Vector (s.o.)	AS-BS-	-	mit keinem

(74), (99), (114)

2.4 Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller	Bezeichnung/ Katalognummer
Ampicillin	Sigma	A-0166
Gentamicin	Sigma	G-1272
Metronidazol	Sigma	M-3761
Cefotaxim	Sigma	C-7912
Cefoxitin	Sigma	C-4786
Ceftriaxon	Sigma	C-5793
Ciprofloxacin	ICN Biomedicals Inc.	199020
Material	Hersteller	Bezeichnung /Katalognummer
Meropenem	Astra Zeneca, Wedel	89677-02
Amphotericin B	Sigma	A-3187

2.5 Geräte und Reagenzien

Material	Hersteller	Bezeichnung/ Katalognummer
Zellkulturflaschen, 75cm ³	IBS (Integra Biosciences)	91015
Flaschen 12,5cm ³	Becton Dickinson	353107
Konisches Zentrifugenröhrchen, 10ml	Grainer, Frickenhausen	352068
Konisches Zentrifugenröhrchen, 50ml	Becton Dickinson	352070
Cryo-Tube, 1,8ml	Nunc, Wiesbaden	368332

96 Well Cell Culture Cluster, flat bottom	Costar, Corning, Acton, MA; USA	3596
Eppendorf- Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg	3810X
Brutschrank für Zellen	Heraeus, Stuttgart	Cytoperm 2
Zentrifuge	Heraeus	Megafuge
Zentrifuge	Heraeus	Biofuge A
Neubauer Zählkammer	Assistent, Karl Hecht Glaswaren, Sontheim, Rhön	improved 0.0025 mm ²
Bottle top filter	Costar	430513
Material	Hersteller	Bezeichnung/ Katalognummer
µStar, Spritzenfilter, 0.22µm	Costar	8110
Mikroskop	Leica, Bensheim	DM IL
Waage	A&D	HR-120-EC
Schüttelmixer	Bender-Hohbein, Wien, Österreich	Vortex Genie 2
Millipore-Elektode	Millipore, Molsheim	MERS STX 01
Zellschaber	Costar	3010
Ultraschall	Bandelin, Berlin	Sonoplus HF Generator GM 70

2.6 Rezepturen

Nährmedium für die Zellkultur

Dieses enthält DMEM und F12 im Verhältnis 1:1, außerdem FBS (foetal bovine serum) (hitzeinaktiviert, 30 Minuten bei 56°C) zu 10% und L-Glutamin zu 1%. Beim Mischen wurde sterilfiltriert.

Gentamicin-Ampicillin-Lösung

Beide Antibiotika sollten auf eine Konzentration von 400µg/ml Medium gebracht werden. Dazu wurden 2ml Gentamicin in 48ml Nährmedium gegeben. Darin wurden dann 20mg Ampicillin gelöst. Die Lösung wurde für jeden Versuch frisch hergestellt und sterilfiltriert.

HEPES-Medium

HEPES-Puffer wird mit Nährmedium im Verhältnis 1:10 vermischt.

Triton

wurde mit F10 in eine 1%ige Lösung gebracht.

Coating der 96 Well Platten

Zum besseren Anhaften der Zellen am Boden der Wells wurden die 96-Well-Platten beschichtet („Coating“). Für diese Schicht wurde 1ml Vitrogen 100 zusammen mit 1ml BSA und 1ml Fibronectin in 97ml sterilem Aqua dest. gelöst. Davon wurden dann in jedes well ca. 50µl gegeben und über Nacht unter sterilen Bedingungen getrocknet.

Flaschen für die Aufbewahrung der Medien

Die Flaschen waren im Neuzustand innen beschichtet. Da die Beschichtung die Integrität des Mediums stören könnte, wurde sie entfernt. Dazu wurde die Flasche erst mit klarem Wasser gespült, dann mit 0,1N Salzsäure bis zum Rand aufgefüllt und für 24 Stunden stehen gelassen. Nach gründlichem Ausbürsten und nachspülen mit klarem Wasser wurden die Flaschen autoklaviert. Ebenso wurden die Flaschen nach jedem Gebrauch mit Aqua dest. ausgespült und autoklaviert.

2.7 Zellpflege

Medienwechsel

Das Nährmedium wurde vor jedem Verwenden sterilfiltriert. Altes Medium wurde aus der Kulturflasche abpipettiert und durch frisches ersetzt. Je nach Zellkonfluenz war ein Medienwechsel nach zwei bis vier Tagen notwendig, erkennbar am langsamen Farbumschlag des im Medium enthaltenen Indikators von rot nach gelb.

Zell-Passage

Alle sieben Tage wurden die Zellen passagiert. Nach Abgießen des alten Mediums wurden die Zellen mit ca. 30ml PBS gespült. Dann wurden sie mit

30ml Trypsin-EDTA 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Längeres Inkubieren würde eine Zellyse verursachen, bei zu kurzer Inkubation trennen sich die einzelnen Zellen nicht sauber voneinander. Mit einem Zellschaber wurde der Zelllayer vorsichtig entfernt und mitsamt der Flüssigkeit in ein Zentrifugenröhrchen gegossen. Die Zellkulturflasche wurde mit 10ml Nährmedium nachgespült, dieses dann ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen gegeben. Zentrifugiert wurde mit 1083 x g für 10 Minuten bei 4°C.

Der Überstand wurde abgegossen und die so vom Trypsin gereinigten Zellen in Nährmedium resuspendiert. 2ml dieser Zellsuspension wurden in eine neue Kulturflasche gegeben und mit ca. 25ml Nährmedium aufgefüllt. Der nächste Medienwechsel war spätestens am vierten Tag nach Passage notwendig, sollte aber auch nicht am ersten Tag stattfinden, da den Zellen noch Zeit zum Anhaften am Flaschenboden gegeben werden sollte.

Grundsätzlich musste bei der Pflege der Zellen sehr auf sterile Bedingungen geachtet werden, da die Medien weder Antibiotika noch Antimykotika enthielten.

Anzucht der Zellen auf 96 Well-Platten

Die Vorgehensweise war bis zum Resuspendieren der Zellen die gleiche wie oben unter „Zell-Passage“ beschrieben. Aus der Zellsuspension entnahm man 20µl und färbte sie mit 80µl Trypanblau an. Mit Hilfe der Neubauer Zählkammer erfolgte die Bestimmung der Zellzahl pro ml, dann verdünnte man die Suspension auf eine Konzentration von 10^6 Zellen pro ml. In jedes Well wurden dann 100µl dieser Suspension gegeben, um eine ungefähre Zahl von 10^5 Zellen pro well zu erhalten.

Der Medienwechsel von Nährmedium auf den Platten erfolgte durch zügiges Abschütten des alten Mediums auf Eis. Damit konnten Spritzer vermieden, und somit das Kontaminationsrisiko vermindert werden. Anschließend wurden 200µl frisches Medium in jedes well gegeben. Die Zellen waren bei regelmäßigem Medienwechsel nach sechs bis sieben Tagen konfluent.

2.8 Versuche zu Aggregation Substance und Binding Substance

2.8.1 Vorversuche

2.8.1.1 Ultraschallbehandlung des Phänotyp AS+ BS+

Beim Phänotyp AS+BS+ kommt es automatisch zu Klumpungsreaktionen. Um diese verklumpten Keime voneinander zu trennen, ist der Einsatz von Ultraschall (20kHz) notwendig. Allerdings kommt es unter der Ultraschallanwendung abhängig von der Dauer auch zur Wärmeentwicklung. Diese Wärme kann zu einer Hitzeschädigung der Bakterien führen. Wird Ultraschall zu kurz verwendet, so werden die Enterokokken nicht alle voneinander getrennt. Es galt also die Zeit zu finden, in der die Enterokokken suffizient getrennt werden, und trotzdem keine Hitzeschädigung erleiden.

Beim Auszählen der Kolonien auf Agarplatten sollte vermieden werden, dass aufgrund der Zellaggregate aus dem Phänotyp AS+BS+ falsch niedrige Koloniezahlen bestimmt wurden.

Es wurden Emulsionen mit einer Zahl von 10^7 KBE/ml *E.faecalis* Og1SSp pINY 1801 (AS+ BS+) hergestellt. Zunächst wurde diese 10sec. auf dem Vortex-Mischer durchmischt. Dann wurde verschieden lange mit Ultraschall behandelt, indem der Schallkopf in die Bakterienemulsion getaucht wurde. 10 μ l der Bakterienmischung wurden dann auf einen Objektträger gegeben und abfotografiert, einmal sofort und einmal nachdem keine Bewegungen mehr beobachtet wurden. Dazu wurde in zwei Verdünnungen sofort nach der Ultraschallbehandlung auf TSA ausplattiert (je 10 μ l). Die Objektträger waren mit crystal violet vorgefärbt.

2.8.1.2 Einfluss von Ultraschall auf die Translokation von Phänotyp AS+ BS+

Diese Versuche sollten klären, ob es für die Translokation der Bakterien wichtig ist, dass diese nicht in Konglomeraten sondern einzeln vorliegen. Theoretisch wäre es ja denkbar, dass einzeln vorliegende Enterokokken leichter von den Zellen aufgenommen werden, als ganze Bakterienkonglomerate. In diesen

Versuchen sollte also geklärt werden, ob sich etwas an der Zahl der translozierten Bakterien ändert, wenn sie vor dem aufgeben auf die T84-Zellen mit Ultraschall behandelt wurden.

Dazu kamen zwei Inokula zur Verwendung, eines wurde vor dem Inokulieren mit Ultraschall behandelt, was verklumpte Bakterien voneinander trennen sollte. Das andere Inokulum gab man nach gründlichem Mischen direkt auf die Zellen. Verwendet wurde eine 96 Well Platte mit sieben Tage alten Zellen. Das Medium wurde gegen frisches Hepes-Nährmedium ausgetauscht. Dann stellte man zwei Inokula her, die Bakterien in einer Konzentration von 5×10^6 KBE/ml enthielten. Beide Inokula wurden gründlich gemischt. Inokulum A gab man direkt nach dem Mischen auf die Zellen, Inokulum B behandelte man nach dem Mischen noch 60 Sekunden mit Ultraschall. Mit jedem Inokulum wurde eine Reihe, bestehend aus zwölf Wells, bestückt, eine weitere Reihe mit jeweils dem halben Inokulum. Nun folgte die Inkubation über 4 Stunden bei 37°C.

Dann wurde aus zwei Wells pro Reihe Proben entnommen, daraus eine Verdünnungsreihe erstellt, und auf TSA (Tryptone Soja Agar) ausplattiert. Unmittelbar vor dem Ausplattieren wurde 10 Sekunden lang mit Ultraschall behandelt.

Danach gab man auf jedes Well 100µl Ampicillin-Gentamicin-Lösung, und inkubierte für 20 Minuten. Danach wurde erneut auf Eis abgeschüttet, es folgten drei Waschgänge wie oben beschrieben, dann wurden die Wells mit 250µl der Ampicillin-Gentamicin-Lösung aufgefüllt, und für weitere 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wusch man nochmals drei Mal, entnahm vom dritten Waschgang aus vier Wells pro Reihe Proben, und verteilte diese auf TSA, zur Kontrolle des „Killings“. Das Medium wurde abgeschüttet.

Jetzt folgte die Inkubation der Zellen mit 1%iger Triton-Lösung für 5 Minuten wodurch es zur Zelllyse kam. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren mischte man die Zellfragmente und die Bakterien durch, sechs der zwölf Replikate jedes Inokulums wurden direkt ausplattiert, die anderen sechs wurden 10 Sekunden lang mit Ultraschall behandelt, bevor sie auf TSA aufgebracht wurden.

Die TSA-Platten mussten dann 24 Stunden bei 37°C inkubieren, bevor die Kolonien bildenden Einheiten (KBE) ausgezählt werden konnten.

2.8.2 Adhärenzversuche

Je nach Oberflächenstruktur kommt es zu Klumpungsreaktionen der Enterokokken untereinander. In diesen Versuchen sollte nun überprüft werden, ob die Oberflächenstrukturen auch einen Einfluss auf das Anhaften, also die Adhärenz, von Enterokokken an T84-Zellen haben. Durch kurze Inkubationszeit wollte man vermeiden, dass zu große Zahlen von Enterokokken translozieren, das heißt in die Zelle einwandern. Zur Beurteilung des Einflusses der Oberflächenstrukturen auf die Translokation sollten spätere Versuche dienen. Hier sollte gezielt nur geklärt werden, ob AS und BS die Zahl der an T84-Zellen adhätierenden Enterokokken verändern.

Es wurde von jeder Mutante ein Inokulum hergestellt, gut gemischt und mit Ultraschall behandelt, bevor man es auf eine sieben Tage alte 96 Well Platte mit konfluenten Zellen gab.

Wieder wurden sechs Replikate des ganzen Inokulums mit 5×10^5 KBE/ml, und sechs Replikate des halben Inokulums erstellt. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C entnahm man aus einem von jeweils sechs Replikaten eine Probe, brachte sie in eine Verdünnungsreihe und dann auf TSA. So ließ sich die Menge der Enterokokken im Medium nach einer Stunde ermitteln.

Das Medium wurde abgeschüttet und frisches dazugegeben, diesen Vorgang wiederholte man 12x, die Zellen wurden auf diese Art „gewaschen“. Aus dem sechsten Waschgang entnahm man aus zwei Wells pro Replikatreihe Proben, verdünnte sie zur Bestimmung der Keimzahl, und brachte sie auf TSA. Das gleiche wurde nach dem achten Mal Waschen wiederholt. Nach dem zehnten und zwölften Mal Waschen wurden alle 6 Wells einer Replikatreihe verdünnt und ausplattiert. Die TSA-Platten wurden 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Mit 1%iger Triton-Lösung fand in fünf Minuten langer Inkubation die Zelllyse statt. Direkt vor dem Auftragen auf TSA wurde jedes Well mit der Pipette nochmals gemischt, und 10 Sekunden lang mit Ultraschall behandelt. Die TSA-Platten inkubierte man dann ebenfalls wieder bei 37°C über 24 Stunden, bevor die auf den TSA-Platten gewachsenen KBE ausgezählt werden konnten.

Durch das Waschen sollten die frei im Medium schwimmenden Bakterien entfernt werden. Auf die zweimalige Inkubation mit Ampicillin und Gentamicin, wie in 2.8.1.2 beschrieben wurde hier gezielt verzichtet. Bei der Frage nach der

Adhärenz waren ja gerade die extrazellulär anhaftenden Enterokokken gefragt. Um in anderen Versuchen die Zahl der translozierten, also intrazellulär vorhandenen, Enterokokken zu ermitteln, war es notwendig alle extrazellulären Bakterien abzutöten. Dies sollte dabei durch die Inkubation mit Ampicillin und Gentamicin erreicht werden. In den Versuchen zur Adhärenz wurde also nur mehrfach gewaschen, um frei im Medium schwimmende Enterokokken zu eliminieren, und zuletzt nur die an den Zellen adhärenen übrig zu haben.

Nach Lyse ausplattiertes Material enthielt also sowohl intrazelluläre *E.faecalis*, als auch eventuell an der Zellwand adhärierende Enterokokken.

2.8.3 Vergleich der Translokation in Abhängigkeit von AS oder BS

Die Versuche hierzu sollten klären, ob es Unterschiede in der Anzahl intrazellulärer *E.faecalis* der vier Mutantenstämme gibt, oder ob die Oberflächenstruktur keine Relevanz für die Ausmaße der Translokation eines Bakterium hat.

Der Versuchsablauf war der gleiche wie in 2.8.2 beschrieben. Ein Unterschied lag jedoch im Inokulum, hier wurde von jeder Mutante eine Emulsion mit 5×10^6 KBE/ml hergestellt, und sechs Wells einer Reihe mit dem ganzen Inokulum, das heißt 5×10^5 KBE/well, belegt, die übrigen sechs Wells wurden nur mit der Hälfte der Keimzahl inokuliert. Zur genauen Keimzahlbestimmung erstellte man von jedem eine Verdünnungsreihe und gab definierte Mengen davon auf TSA.

Unmittelbar vor Inkubieren und Ausplattieren behandelte man im Verlauf des gesamten Versuches immer alle vier Inokula nach gründlichem Mischen noch 10 Sekunden mit Ultraschall. Waschen, Killing und Zellyse verliefen wie oben beschrieben.

Nach Ultraschallbehandlung wurde direkt auf TSA ausplattiert, und 24 Stunden bei 37°C inkubiert, dann konnten die KBE ausgezählt werden.

2.9 Einfluss von Antibiotika auf die Translokation

2.9.1 Vorversuche

Wachstum der Zellen unter Antibiotika, Konfluenzbeurteilung

Zuerst untersuchte man, ob sich die gewählten Antibiotika nachteilig auf das Wachstum von T84-Zellen auswirken. Dazu wurden Zellen wie oben beschrieben auf 96 Well-Platten ausgesät. Dazu kam Nährmedium zur Verwendung, in welchem ein Antibiotikum in einer bestimmten Konzentration gelöst war. Dann wurde das Wachstum der Zellen hinsichtlich der Konfluenz über mehrere Tage beobachtet und beurteilt.

Hierzu fertigte man die unten gezeigten Abbildungen. Sie zeigen das normale Wachstum der T84-Zellen, bis sie nach ca. einer Woche vollständige Konfluenz erreichen. Jedes einzelne Well wurde dann in der Gesamtübersicht bei 3,5facher Vergrößerung mit den Tafeln verglichen. Zur abschließenden Beurteilung der Konfluenz sah man die einzelnen Wells nochmals bei 10facher Vergrößerung systematisch durch, um auch kleine Lücken in der Zellschicht nicht zu übersehen.

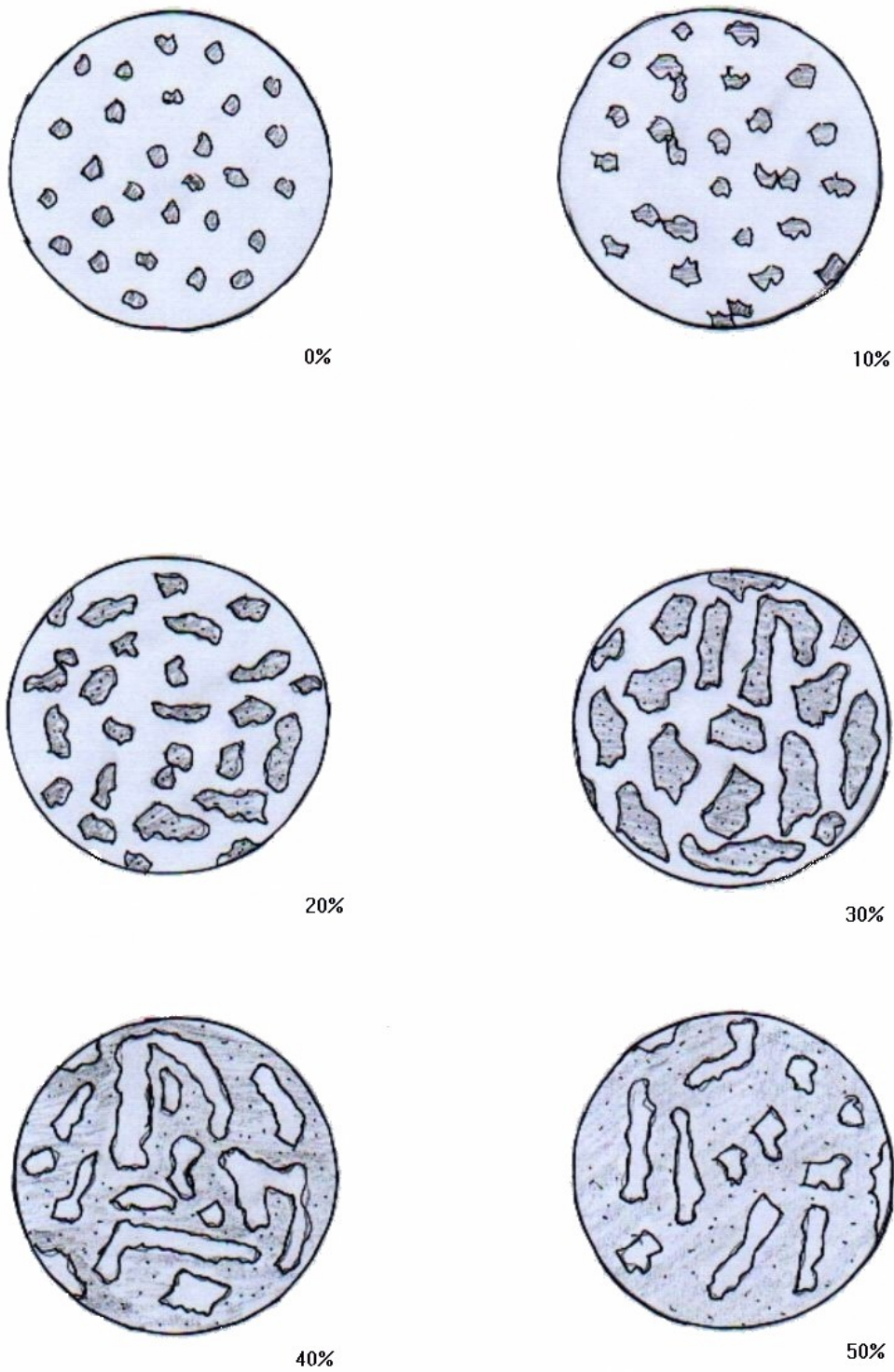
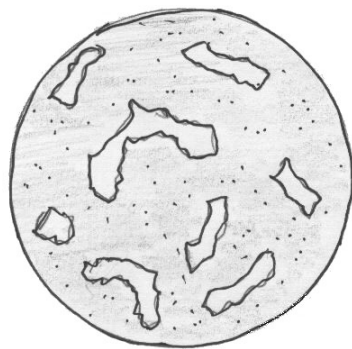
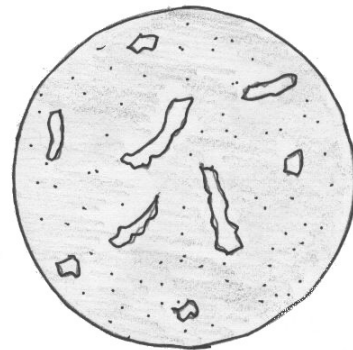


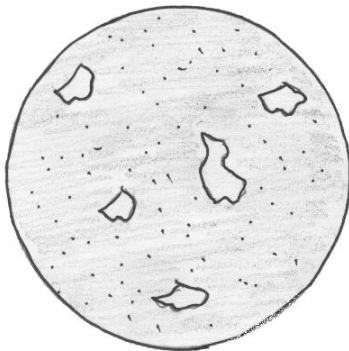
Abbildung 2.1 : Konfluenz von T84-Zellen in % in verschiedenen Stadien, mikroskopisches Gesichtsfeld bei 10facher Vergrößerung



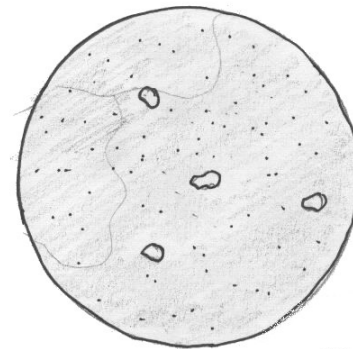
60%



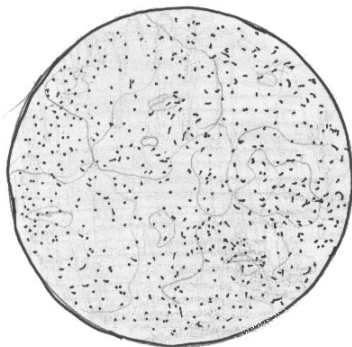
70%



70%



90%



100%

Abbildung 2.2: Konfluenz von T84-Zellen in % in verschiedenen Stadien, mikroskopisches Gesichtsfeld bei 10facher Vergrößerung, Fortsetzung

Erläuterungen zu den Tafeln (Abb. 2.1 und 2.1):

- 0%** Zellen liegen einzeln, keinerlei Berührungen.
- 10%** einzelne Zellen berühren sich, insgesamt sind die Zellen etwas größer und bilden einzelne Ausläufer.
- 20%** mehrere Zellen berühren sich, sind größer
- 30%** es sind einzelne "Zellketten" und zu Gruppen konfluierende Zellen zu finden
- 40%** Zellwachstum so weit, dass die unbewachsenen Zwischenräume „Straßen“ ausbilden, trotzdem noch einige freie Flächen.
- 50%** weniger freie Flächen, noch deutlichere „Straßenbildung“
- 60%** die „Straßen“ werden dünner und kleiner
- 70%** „Straßen“ sind zum Teil schon zu einzelnen Punkten reduziert
- 80%** kaum noch „Straßen“ erkennbar, aber mehrere kleine unbewachsene Flächen vorhanden
- 90%** eine bis wenige kleine unbewachsene Flächen
- 100%** keine freie Fläche mehr, lückenlose Zellschicht

Zur Objektivierung dieser Vorgehensweise wurde die Konfluenz von verschiedenen Personen beurteilt und die Ergebnisse miteinander verglichen. Außerdem wurde kontrolliert, ob der einzelne Untersucher bei mehrmaliger Beurteilung des gleichen Wells auch immer zum gleichen Ergebnis kommen würde. Dazu wählte eine andere Person zufällig Wells aus, von denen der Untersucher nicht wusste, wo sie sich auf der Platte befanden, und legte sie ihm zur Beurteilung vor. Auch dieses wurde mehrmals wiederholt, und die Ergebnisse miteinander verglichen.

Mögliche Einflüsse von Antibiotika auf das Wachstum von *Enterococcus faecalis*

Das Wachstum von *E.faecalis* sollte nach Möglichkeit von den Antibiotika weitgehend unbeeinträchtigt bleiben. Dieses sicherzustellen züchtete man *E.faecalis* unter verschiedenen Konzentrationen jedes Antibiotikums. Dazu wurde TSB verwendet, in dem Antibiotikum in einer bestimmten Konzentration

gelöst war. Dann folgte die Inokulation mit Enterokokken. Die angestrebte Konzentration lag bei 10^6 KBE/100 μ l. Zur Kontrolle dieser Anfangskonzentration wurde das Inokulum in einer Verdünnungsreihe auf TSA ausplattiert.

Das inokulierte TSB inkubierte man dann unter ständigem Mischen bei 37°C. Nach vier Stunden wurde die erste Probe entnommen, davon eine Verdünnungsreihe erstellt und auf TSA ausplattiert, um die Bakterienkonzentration zu bestimmen. Die zweite Probe entnahm man nach sieben Stunden, die dritte nach 24 Stunden.

Die Dokumentation der Bakterienkonzentrationen erfolgte in einem Diagramm in KBE/ml.

2.9.2 Einfluss von Antibiotika auf die Translokation von *E.faecalis* 12030

Nachdem in den Vorversuchen negative Einflüsse durch Cefoxitin, Ceftriaxon, Ciprofloxacin und Meropenem sowie Amphotericin B auf das Wachstum der T84-Zellen bzw. der Enterokokken festgestellt worden waren (siehe Ergebnisse in Kap. 3.4.2 und 3.4.1), wurden die Versuchsreihen mit Cefotaxim und Metronidazol durchgeführt.

Hierbei sollte untersucht werden, ob durch Zugabe von Metronidazol oder Cefotaxim ins Nährmedium der Zellen die Aufnahme von Bakterien in die Zelle gefördert oder gemindert wird.

Einen Tag vor Versuchsbeginn wurde auf die konfluenten Zelllayer das zu untersuchende Antibiotikum gegeben. Dazu löste man das Antibiotikum in verschiedenen Konzentrationen im Nährmedium, und gab es dann im Rahmen eines Medienwechsels auf die Zellen.

Nach ca. 16 Stunden fand eine Erneuerung des antibiotikumhaltigen Nährmediums statt, dann wurde *Enterococcus faecalis* auf die Zellen gegeben. Um in jedem Well eine Konzentration von ca. 10^6 Enterokokken pro 100 μ l zu erhalten, entnahm man Bakterien aus einer Lösung mit bekannter Konzentration und gab sie in das Nährmedium. Die so erhaltene Suspension wurde als Inokulum verwendet. Zur Kontrolle der Bakterienkonzentration

erstellte man daraus eine Verdünnungsreihe und brachte sie auf TSA. Das Inokulum wurde dann in gleicher Menge in jedes Well verteilt.

Nach vier Stunden Inkubation bei 37° wurde nochmals die Bakterienzahl unter jeder Antibiotikakonzentration bestimmt.

Um verbleibende extrazelluläre Enterokokken abzutöten, inkubierte man 20 Minuten mit 100µl der Ampicillin-Gentamicin-Lösung bei 37°C. Das gesamte Medium wurde danach abgegossen und die Zellen wurden dreimal mit 250µl Nährmedium „gewaschen“, d.h. dreimal gab man 250µl Nährmedium auf die Zellen, und schüttete es dann wieder, wie oben beschrieben, auf Eis ab. Danach wurde das Medium abgegossen und jedes Well mit 250µl der Ampicillin-Gentamicin-Lösung aufgefüllt, dieses „Killing“ der Enterokokken war nach 90 Minuten Inkubation bei 37°C abgeschlossen. Jetzt fand abermals ein dreimaliges Waschen mit 250µl Nährmedium statt. Aus dem dritten Waschgang wurden, als Kontrolle, aus vier Wells pro Reihe Proben auf TSA ausplattiert. Durch diese Kontrolle sollte sichergestellt werden, dass extrazellulär jetzt alle Bakterien entfernt waren.

War auch der letzte Waschgang abgeschüttet, wurden 100µl der 1%igen Tritonlösung auf die Zellen gegeben. Nach 5 Minuten Inkubation waren diese lysiert. Dadurch kamen die intrazellulären Enterokokken frei. Jedes Well wurde noch mal durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren kräftig gemischt, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Bakterien zu bekommen und dann zügig auf TSA ausplattiert.

Die Auszählung der KBE konnte nach 24 Stunden Inkubation der TSA-Platten bei 37°C erfolgen.

2.10 Auswertung und Statistik

Die aus einem einzelnen Bakterium entstandenen Kolonien bildenden Einheiten (KBE) wurden auf Agar ausgezählt. Diese Anzahl wurde entsprechend der entnommenen Probe auf das gesamte Well hochgerechnet, und bezeichnete die Zahl der intrazellulären Enterokokken, beziehungsweise, je nach Versuch, auch die Zahl der adhärennten *E. faecalis*.

Schwankungen der KBE/ml in den anfangs auf die Zellen gegebenen Inokula ließen sich nicht vermeiden. Um diese auszugleichen, wurde die ermittelte

Anzahl Bakterien pro Well als prozentualer Anteil des Inokulums berechnet. Damit ließen sich die Versuche unabhängig von der Zahl der zu Versuchsbeginn auf die Zellen gegebenen Bakterien miteinander vergleichen.

In jedem Versuch waren von jeder Variante jeweils sechs Replikate erstellt worden. Es wurde jeweils ein Mittelwert und eine Standardabweichung berechnet. Für die statistische Analyse wurde das Statistik-Programm JMP® (statistics made visual™, SAS Institute, Inc., Altura Software Inc.) verwendet. Die Ergebnisse, berechnet in % des Startinokulums, wurden übertragen in log 10, bevor sie dieser zugeführt wurden.

Die Signifikanz von Unterschieden wurde durch eine Analysis of Variance (ANOVA) ermittelt. Paarweise Vergleiche von Daten fanden über Tukey's HSD (honestly significant different) Test statt.

3 Ergebnisse

3.1 Beurteilung der Konfluenz von T84-Zellen

Bei den Versuchen sollten nur zu 100% konfluente Zellen verwendet werden. Außerdem wurde die Konfluenz der Zellen in einzelnen Versuchen auch als untersuchtes Kriterium für einzelne Versuchsergebnisse herangezogen. Dafür war es notwendig, die Konfluenz möglichst objektiv beurteilen zu können. Dies ist um so schwieriger, wenn der Zellschicht nicht vollständig geschlossen ist, das heißt nicht 100% konfluent ist. Hier wurden die in 2.10.1 gezeigten Tafeln (Abb. 2.1 und 2.2) zu Hilfe genommen. Mit ihnen wurden die Zellschichten unter dem Mikroskop verglichen, damit konnte die Konfluenz in Schritten von 10% bestimmt werden. Um die Objektivität dieses Verfahrens zu beweisen, wurden 48 unterschiedlich alte Zellschichten zwei Mal von zwei Untersuchern unabhängig voneinander beurteilt, das heißt insgesamt handelte es sich um 96 Einzelbeurteilungen. Davon wurden 48 (51,04%) Wells gleich beurteilt, 44 Wells (45,83%) wurden mit einem Unterschied von 10% und 3 Wells (3,12%) mit einem Unterschied von 20% beurteilt. Toleriert man eine Differenz von 10%, dann fand man eine Übereinstimmung von 96,87%. Beurteilungsunterschiede von mehr als 20% gab es keine. Einzelne Wells wurden mehrfach dem gleichen Untersucher vorgelegt, in 10% der Fälle wurde die Konfluenz um 10% unterschiedlich beurteilt, in 90% der Fälle wurden die gleichen Wells vom gleichen Untersucher auch gleich beurteilt.

3.2 Einfluss der Inkubationszeit die Translokation

In diesem Versuch wurde untersucht, ob eine unterschiedliche Länge der Inkubationszeit die Ergebnisse entscheidend verändern würde. Dabei zeigte sich, dass nach vier Stunden Inkubation ungefähr fünfmal mehr Bakterien transloziert sind als nach zwei Stunden. Eine Inkubationszeit von vier Stunden liefert höhere Zahlen an KBE und wurde zur besseren Auswertbarkeit und Minimierung der Fehlerquellen eingehalten.

Hierzu wurden zwei Versuche mit jeweils sechs Replikaten durchgeführt. Vor dem Ausplattieren auf Agar wurde jeweils mit Ultraschall behandelt. Während

nach zwei Stunden 0,36% (Versuch 1) bzw. 0,41% (Versuch 2) der Zahl der Enterokokken des Startinokulum transloziert waren, fanden sich nach vier Stunden 2,42% (Versuch 1) bzw. 2,19% (Versuch 2) translozierte Enterokokken. Das bedeutet, dass nach vier Stunden die ca. fünf- bis sechsfache Zahl *E.faecalis* intrazellulär gefunden werden konnte.

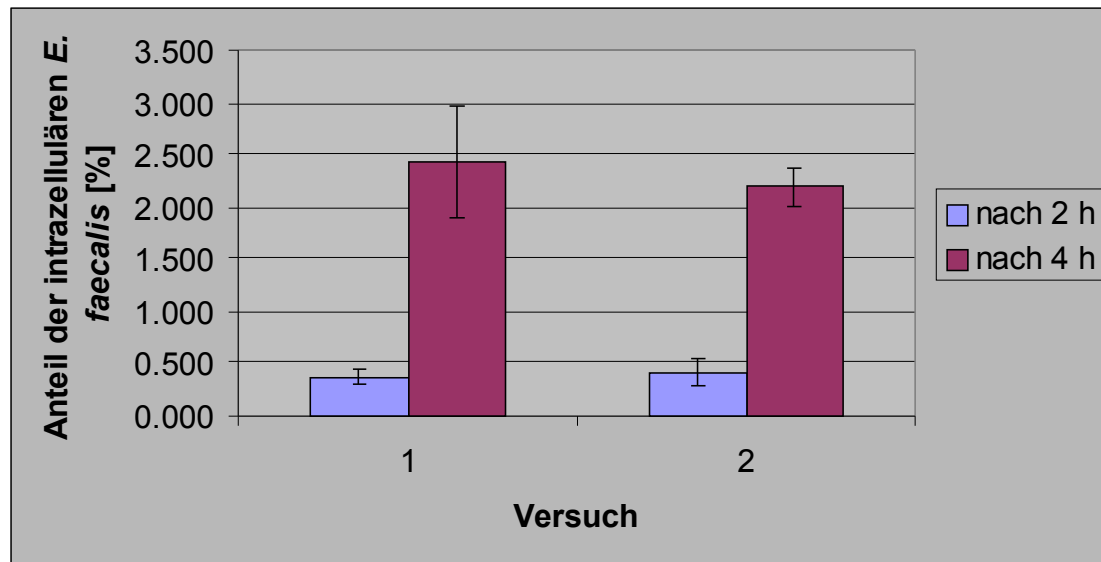


Abbildung 3.1: Anteil der intrazellulären *E.faecalis* (AS+/BS+) in % des Startinokulums nach zwei und vier Stunden Inkubation mit Standardabweichungen, n=12.

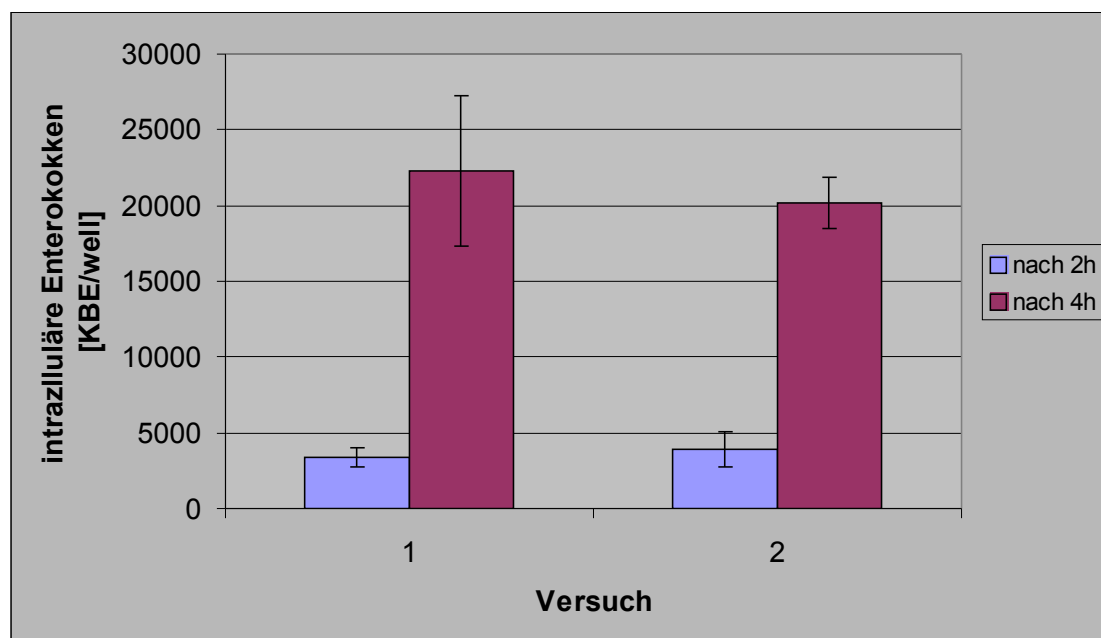


Abbildung 3.2: intrazelluläre *E.faecalis* in KBE/well nach zwei / vier Stunden Inkubation, n=12

3.3 Einfluss von Aggregation Substance und Binding Substance auf Adhärenz und Translokation

Mit diesen Versuchen wollte man herausfinden, ob neben exogenen Faktoren, wie z.B. Antibiotika auch potentielle bakterielle Virulenzfaktoren eine Rolle bei der Translokation der Keime in das Darmepithel spielen. Hierzu wurden vier Mutanten des Stammes *E.faecalis* OG1 Ssp. verwendet, die unterschiedliche Oberflächenstrukturen besitzen.

Mutanten des Stammes:

Phänotyp AS⁺BS⁺ (OG1SSp pINY1801)

Phänotyp AS⁻BS⁺ (OG1SSp pWM401)

Phänotyp AS⁺BS⁻ (INY3000 pINY1801)

Phänotyp AS⁻BS⁻ (INY 3000 pWM401)

Zunächst wurde untersucht, ob methodische Fehler durch Autoaggregation entstehen können. Dazu wurde geprüft, ob und wann die Benutzung von Ultraschall notwendig ist.

Anschließend wurde untersucht, ob

die Zahl der nach intrazellulär gewanderten Enterokokken abhängig von der Oberflächenstruktur ist

die Oberflächenstruktur die Zahl der an die Zelle adhärierenden Enterokokken beeinflusst.

3.3.1 Einfluss der Ultraschallbehandlung auf *E.faecalis*

Phänotyp AS⁺ BS⁺

Verwendet wurde eine Bakterienzahl von 10^7 KBE/ml. Dabei ließ sich unter dem Mikroskop eine Vereinzellung der Bakterien schon ab 5sek. Ultraschall (20kHz) erkennen, denn allein durch die geringe Bakterienzahl im Medium ist die Klumpungsmöglichkeit nicht mehr gegeben, 2er Pärchen wurden jedoch immer wieder beobachtet.

Die Bakterienzahl nimmt durch die Ultraschallbehandlung kontinuierlich ab (KBE in % bei 30sec. US = 70,6%). Auch sind ab einer Länge von 30 bis

35sec. Ultraschall die Kolonien auf TSA sichtbar kleiner als bei kürzerer Ultraschallzeit. Dies lässt darauf schließen, dass die Ultraschallbehandlung durch Wärmeentwicklung einen negativen Einfluss auf die Vitalität der Bakterien nimmt.

Letztlich entschied man sich für eine 10 Sekunden dauernde Behandlung mit Ultraschall.

C	Soll (10µl)	10V/ 5US	10V/ 10US	10V/ 15US	10V/ 20US	10V/ 30US	10V/ 35US	10V/ 40US	10V/ 45US
- 2	1000x 1,09	1042	1119	938	962	738	655	617	415
- 3	100 x1,09	122	129	97	86	81	73	79	56
Mittel- wert/ ml		1,13 x 10 ⁷	1,20 x 10 ⁷	0,95 x 10 ⁷	0,91 x 10 ⁷	0,77 x 10 ⁷	0,69 x 10 ⁷	0,70 x 10 ⁷	0,49 x 10 ⁷
Mittel- wert/ ml	Soll	1,09 x 10 ⁷	1,09 x 10 ⁷	1,09 x 10 ⁷	1,09 x 10 ⁷	1,09 x 10 ⁷	1,09 x 10 ⁷	1,09 x 10 ⁷	1,09 x 10 ⁷
in %		103,7%	110,1%	87,2%	83,5%	70,6%	63,3%	64,2%	45,0%

Tabelle 1: Anzahl der gezählten Enterokokken (AS+ BS+) nach unterschiedlich langer Ultraschallbehandlung in Sekunden (US), aber immer 10 Sekunden Vortex-Mischer (V). Endergebnis in Prozent der erwarteten Anzahl.

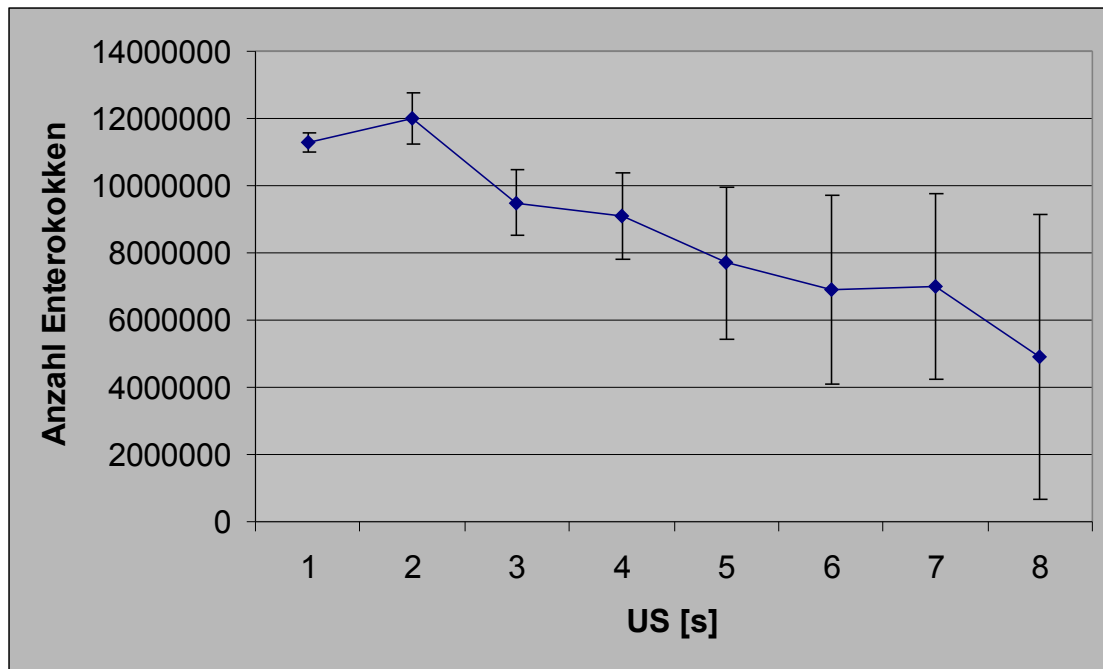


Abbildung 3.3: Anzahl *E. faecalis* (AS+ BS+) nach unterschiedlich langer Ultraschallbehandlung, n=2, erwartete Anzahl $1,09 \times 10^7$

3.3.2 Einfluss der Ultraschallbehandlung auf die Translokation

Die Versuche wurden jeweils mit und ohne Behandlung mit Ultraschall durchgeführt. Anhand der Zahl der KBE wurde dann verglichen, ob diese Behandlung Einfluss auf die Ergebnisse hat. So kann durch zu lange Ultraschallbehandlung eine zu große Erwärmung stattfinden, die zu thermischen Schäden an den Bakterien führen können (siehe Kap. 3.3.1). Dazu musste nun auch geprüft werden, welchen Einfluss die Autoaggregation auf das Ergebnis der translozierten Enterokokken haben kann. Dabei stellten sich zwei Fragen:

Werden einzelne Bakterien in unterschiedlichen Zahlen aufgenommen als Bakterienkonglomerate?

Ist vor dem Verteilen auf den Agar-Platten eine Lösung der Bakterien voneinander notwendig, um wirklich ein Bakterium als KBE zu erhalten, und nicht falsch niedrigere Enterokokkenzahlen durch Bakterienaggregate als Ursprung einer KBE zu erhalten?

Die Zahl der intrazellulären Bakterien wurde anteilig am Startinokulum in Prozent berechnet. Es fanden 5 Versuche statt. Hierbei wurden jeweils 6

Replikate erstellt, bei denen das Inokulum vorher mit Ultraschall behandelt wurde, und 6 Replikate, bei denen das Inokulum nach nur vorsichtigem Mischen auf die Zellen gegeben wurde. Insgesamt wurden 120 Wells ausgezählt, zwei Werte wurden jedoch aus der Berechnung ausgeschlossen, da es sich hierbei um eindeutige Ausreißer handelt. Mit Sicherheit kann hier gesagt werden, dass es sich nicht um methodisch bedingte Fehler handelt. Eine Erklärung könnte sein, dass z.B. die Zellen aufgrund äußerer Einflüsse in Einzelfällen unterschiedlich viele Bakterien aufnehmen. Möglich ist auch, dass das Inokulum andere Keimzahlen aufwies als geplant. Bei diesen damit insgesamt 118 Wells, die ausgewertet wurden, translozierten bei Ultraschallbehandlung des Inokulums im Mittel aller Versuche 0,537% der Bakterien des Startinokulums, ohne Ultraschallbehandlung waren es 0,489%. Es fand sich mit einem p-Wert von 0.9376 kein signifikanter Unterschied. Man kann also auf die Behandlung des Inokulums mit Ultraschall verzichten, da die Bakterien in gleichen Zahlen in die Zellen aufgenommen werden, egal ob sie einzeln darauf gebracht wurden, oder ob sie möglicherweise in Klumpen vorlagen.

In der folgenden Abbildung 3.4 sind die Ergebnisse aller Versuche im Mittelwert zusammengefasst mit Standardabweichung.

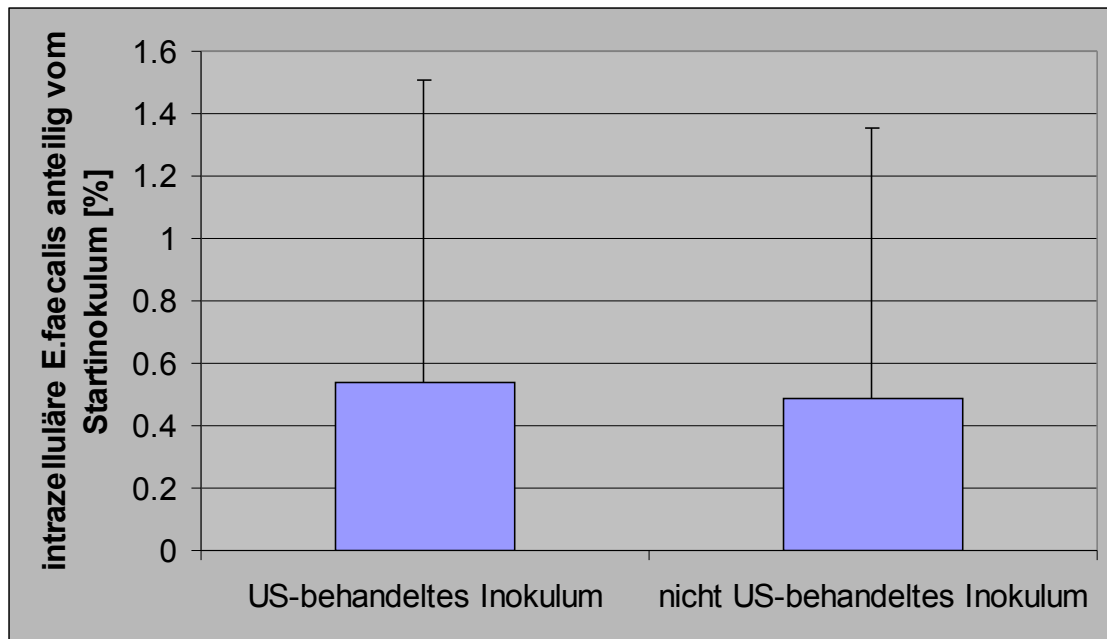


Abbildung 3.4: Anzahl intrazellulärer *E. faecalis* (AS+/BS+) in % des Startinokulums nach Behandlung des Inokulums mit Ultraschall bzw. ohne, mit Standardabweichungen, n=59, p 0,9376

Ob also das Inokulum mit Ultraschall behandelt wurde oder nicht machte keinen signifikanten Unterschied. Auffallend im obigen Diagramm (Abb. 3.3) ist die hohe Standardabweichung. Sie kommt durch die Zusammenfassung aller Versuche zustande, innerhalb jedes einzelnen Versuchs ist sie deutlich geringer. Wodurch diese großen Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchen entstehen mag mit den jeweiligen Zellkulturen zusammenhängen oder an äußeren Faktoren liegen.

Als zweites wurde der Einfluss von Ultraschall vor dem Aufbringen der Enterokokken auf Agar untersucht.

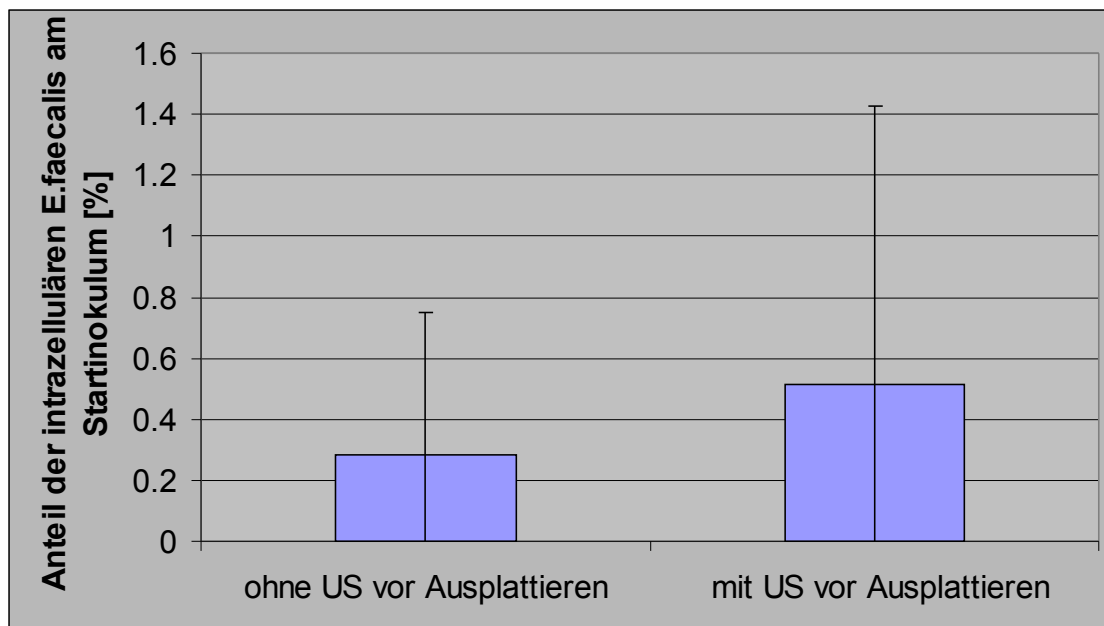


Abbildung 3.5: Anzahl intrazellulärer KBE in % des Startinokulums mit und ohne Ultraschallbehandlung vor dem Ausplattieren auf TSA, mit Standardabweichungen, $n=59$, $p=0,2044$

Die Ultraschallbehandlung vor dem Ausplattieren erbrachte ca. 1,8 mal so viele KBE, als wenn man darauf verzichtete (siehe Abb. 3.5). Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Da im Trend jedoch deutliche Unterschiede zu erkennen waren, wurde die Ultraschallbehandlung vor dem Ausplattieren vorgenommen.

3.3.3 Adhärenz an T84-Zellen in Abhängigkeit von Aggregation Substance und Binding Substance

In dieser Versuchsreihe wurde verglichen, ob die vier Mutanten von *E. faecalis* in unterschiedlichem Umfang an die T84-Zellen adhären. Im Unterschied zur Translokation werden hier die Keime erfasst, die außen an den Zellen adhären, aber nicht in sie aufgenommen wurden.

Nach einer Stunde Inkubation wurden die Enterokokken von den Zellen gewaschen. Dieses Waschen wurde zwölf Mal wiederholt. Aus einzelnen Waschgängen entnommene Proben zeigen, dass die Zahl der abgewaschenen Keime sich einem bestimmten Wert annähert, und dann nicht mehr weiter sinkt. In der folgenden Abbildung 3.6 ist die Anzahl der abgewaschenen KBE/well im

Rahmen eines Versuchs dargestellt. Insgesamt wurden sechs Versuche dieser Art durchgeführt.

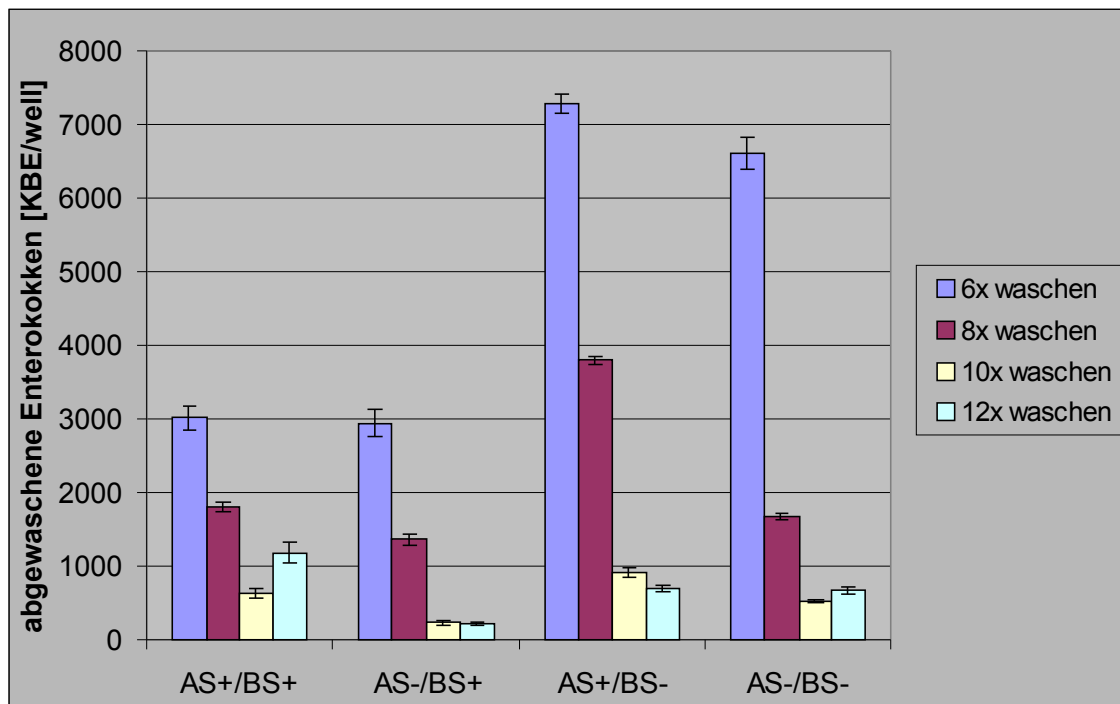


Abbildung 3.6: Nach sechs-, acht-, zehn- und zwölfmal Waschen entfernte Mutanten von *E.faecalis* OG1 Ssp.; für 6x und 8x waschen n=4, für 10x und 12x waschen n=12, mit Standardabweichungen

Da für die Versuchsergebnisse vor allem die letzten Waschdurchgänge entscheidend sind, wurden bei den ersten nur zwei Proben pro Mutante entnommen. Nach zehn und zwölf Mal waschen wurden dann aus jedem Well Proben entnommen.

Danach wurden die Zellen lysiert und Proben aus jedem Well auf TSA ausplattiert. Dies ergab pro Versuch 6 Replikate. Methodisch bedingt wurden dabei auch die intrazellulären *E.faecalis* mitgezählt, was angesichts der kurzen Inkubationszeit keinen zu großen Einfluss auf das Ergebnis hat (siehe 3.2).

In der folgenden Abbildung 3.7 ist die Zahl der adhärennten *E.faecalis* (AS+/BS+) dargestellt.

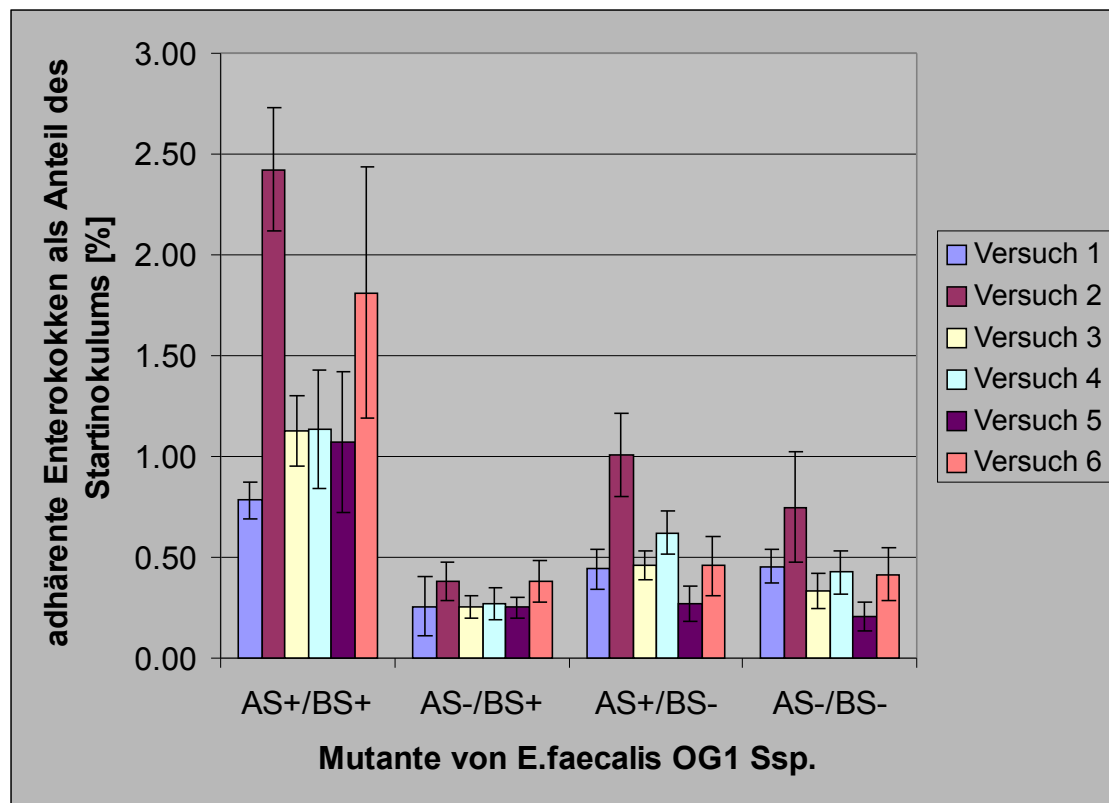


Abbildung 3.7: Adhärenz Mutanten von *E. faecalis* OG1 Ssp. in Prozent des Startinokulums. Dargestellt alle sechs Versuche mit Standardabweichungen, je Versuch und Mutante n=6. Innerhalb der Versuchsreihen ergaben sich für alle Mutanten hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,001$), siehe Tab. 2 S.36)

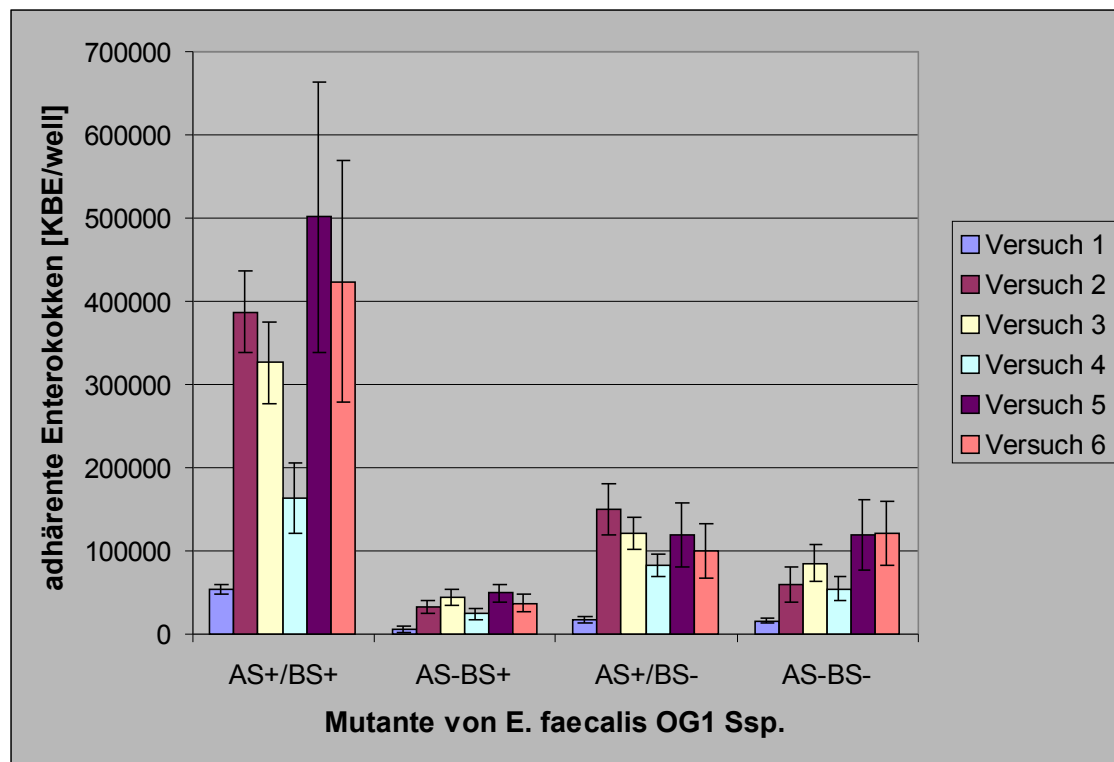


Abbildung 3.8: Adhärenz Mutanten von *E. faecalis* OG1 Ssp. in KBE/well. Dargestellt alle sechs Versuche mit Standardabweichungen, je Versuch und Mutante n=6.

Beim Betrachten der Diagramme in Abbildung 3.7 und 3.8 lässt sich bereits erkennen, dass Phänotyp AS+/BS+ stärker an die Zelle adhärert als die anderen Phänotypen. Die statistische Auswertung mittels ANOVA zeigte, AS-positive Phänotypen in signifikant höherer Zahl an T84-Zellen adhärerten, als AS-negative. Bei der statistischen Auswertung zeigte sich aber auch, dass jeder einzelne Phänotyp von *E. faecalis* OG1 Ssp. in signifikant unterschiedlicher Menge an T84-Zellen anhaftete. Die Reihung nach der Stärke der Adhärenz ergab folgendes Ergebnis: AS+/BS+ >> AS+/BS- > AS-/BS- > AS-/BS+. Im Rahmen der ANOVA über alle Ergebnisse ergaben sich hierfür jeweilige $p < 0,0001$. Durch Tukey's HSD-Test wurde diese Signifikanz bestätigt. Die Ergebnisse der ANOVA sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Analysis of Variance

Quelle	Freiheit sgrad	Quadratsumme	Mittl. Abweichungsquadrat	F-Quotient
Modell	8	11,487390	1,43592	45,1392
Fehler	135	4,294485	0,03181	P-Wert
Gesamt	143	15,940929		<0,0001

Tabelle 2.0: Die Gesamtvarianz wird in Komponenten aufgeteilt (Modell und Fehler), aus deren mittlerem Abweichungsquadrat der F-Quotient berechnet wird. Dieser macht eine Aussage über die Signifikanz, ebenso wie der p-Wert.

Merkmal	Schätzwert	Standardabweichung	t-Test	P-Wert
Abschnitt	-0,307028	0,063246	-4,85	<0,0001
AS[0]	-0,197409	0,014863	-13,28	<0,0001
AS[1]	0,1974091	0,014863	13,28	<0,0001
BS[0]	-0,065128	0,014863	-4,38	<0,0001
BS[1]	0,065128	0,014863	4,38	<0,0001

Tabelle 2.1: AS[0]: hier wurde geprüft, ob das Fehlen der Aggregation Substance, so wie dies bei den Mutanten mit dem leeren Vektorplasmid pWM401 der Fall war, sich von den Mutanten mit dem für AS kodierenden Plasmid pINY1801 (AS[1]) unterscheidet. Analog wurde BS untersucht.

Merkmal	Schätzwert	Standardabweichung	t-Test	P-Wert
AS[0]*BS[0]	0,1329118	0,014863	8,94	<0,0001
AS[0]*BS[1]	-0,132912	0,014863	-8,94	<0,0001
AS[1]*BS[0]	-0,132912	0,014863	-8,94	<0,0001
AS[1]*BS[1]	0,1329118	0,014863	8,94	<0,0001

Tabelle 2.2: Ergebnisse der ANOVA für die Adhärenz der verschiedenen Mutanten von *E. faecalis* OG1 Ssp. AS[0]*BS[0]: hier wurde geprüft, ob die Mutante, die weder AS noch BS exprimiert sich signifikant von den anderen drei Mutanten unterscheidet. Analog wurde mit den anderen Mutanten verfahren.

3.3.4 Translokation der Enterokokken in Abhängigkeit von Aggregation Substance und Binding Substance

Es sollte untersucht werden, ob Enterokokken in Abhängigkeit von ihrer Oberflächenstruktur in unterschiedlicher Zahl von den T84-Zellen aufgenommen werden (translozieren). Dazu wurden die vier oben genannten Mutanten von *E. faecalis* verwendet. Nach der Inkubationszeit von 4 Stunden wurden die extrazellulären *E. faecalis* abgewaschen und die restlich

verbliebenen Enterokokken mit Ampicillin und Gentamicin abgetötet und abermals abgewaschen. Ausplattierte Proben des Mediums nach dem Killing und Waschen bestätigten, dass dieses mit durchschnittlich zwei KBE pro Well so gut wie keine extrazellulären Enterokokken mehr enthielt. Somit wurde sichergestellt, dass sich extrazellulär keine *E.faecalis* mehr befanden, die später möglicherweise fälschlich als intrazelluläre Bakterien mitgezählt wurden. Um Unterschiede der Bakterienkonzentration im Inokulum auszugleichen wurde auch hier die Zahl der intrazellulären Enterokokken in Prozent der *E.faecalis* im Medium berechnet.

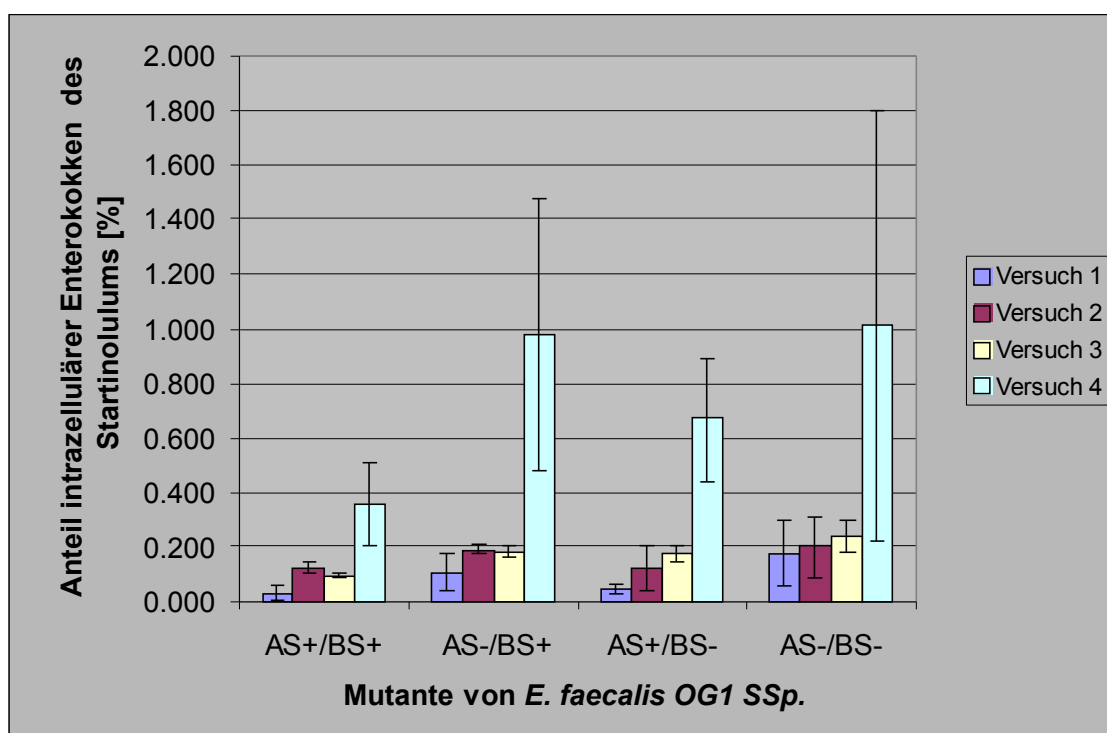


Abbildung 3.9: Abhängig von der Oberflächenstruktur in T84-Zellen translozierte Enterokokken, Werte in % des Startinokulums, Versuch 2 bis 4, n=6, bei Versuch 1 n=12, mit Standardabweichungen

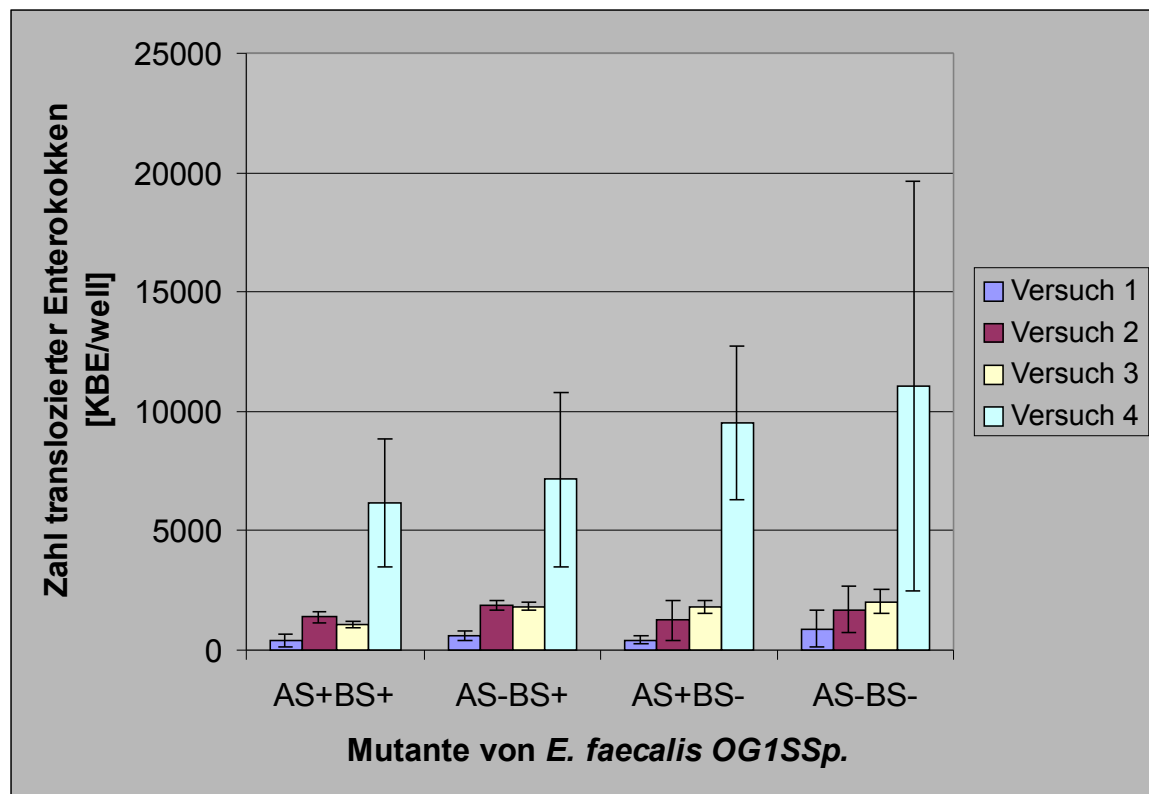


Abbildung 3.10: Translozierte Enterokokken in KBE/well

Die im Rahmen der vier Versuche (jeweils 6 Replikate pro Mutante, Versuch 1 mit 12 Replikaten) erhobenen Ergebnisse sind in obigem Diagramm zu sehen. Beim Betrachten des Diagramms könnte man meinen, dass es keinerlei Unterschied zwischen den einzelnen Phänotypen bezüglich der Translokation in T84-Zellen gäbe, eine niedrigere Aufnahme von Phänotyp AS+/BS+ lässt sich maximal erahnen. Deutlich zu erkennen ist jedoch, dass AS nicht zu einer vermehrten Translokation führte.

Hier brachte auch die statistische Auswertung weitere Aufschlüsse. Es konnte mittels ANOVA gezeigt werden, dass AS die Aufnahme signifikant verringert ($p < 0,0001$). Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.3 gezeigt.

	Freiheitsgrad	Quadratsumme	F-Quotient	p-Wert
AS?	1	5,4128860	17,8302	<0,0001
BS?	1	0,4291269	1,4136	0,2369
BS?*AS?	1	0,1045252	0,3443	0,5585

Tabelle 2.3: Effekte von AS und BS auf die Zahl der translozierten Enterokokken, sowie mögliche Interaktion von AS und BS

Hierbei ist aber nur eine allgemeine Aussage bezüglich AS möglich und noch kein Vergleich der einzelnen Mutanten untereinander erfolgt. Um diesen zu ermöglichen, wurden noch die Konfidenzintervalle berechnet. Diese sind nun in der folgenden Tabelle 2.4 aufgeführt. Intervalle welche die „1“ enthalten, beziehen sich auf Vergleiche die nicht signifikant sind. Dabei erkennt man nun, dass Phänotyp AS+/BS+ (OG1SSp pINY1801) signifikant weniger translozierte als die anderen Mutanten. Unter der anderen Phänotypen finden sich aber keine signifikanten Unterschiede.

Konfidenzintervalle

Tabelle 2.4: Konfidenzintervalle: Intervalle, welche die „1“ enthalten beziehen sich auf

	Verglichene Phänotypen	Quotient	Intervall unter 95%	Intervall über 95%
1	(AS+BS-)/(AS-BS-)	1.18	0.73	1.89
2	(AS-BS-)/(AS-BS+)	1.25	0.78	2.01
3	(AS+BS-)/(AS-BS+)	1.47	0.92	2.37
4	(AS-BS+)/(AS+/BS+)	2.26	1.41	3.64
5	(AS-BS-)/(AS+/BS+)	2.83	1.76	4.55
6	(AS+BS-)/(AS+/BS+)	3.34	2.07	5.36

Vergleiche, die nicht signifikant sind. Hier: Vergleich 4, 5 und 6 erbringt signifikante Unterschiede. Quotient: aus den einzelnen Phänotypen.

Zusammenfassend zeigte sich also, dass Phänotyp AS+BS+ in signifikant geringerer Anzahl in T84-Zellen translozierte, dennoch aber AS-positive Mutanten in signifikant höherer Zahl an die Zellen adhärten.

Methodisch unvermeidbar waren bei den Adhärenzversuchen auch intrazelluläre Enterokokken mitgezählt worden. Durch eine kürzere Inkubationszeit von nur einer Stunde wurde die Translokation aber vernachlässigbar gering gehalten (siehe Kap.3.2). Es handelte sich um Zahlen von nur mehreren Hundert bis wenige Tausend Enterokokken, was wenigen Anteilen eines % des Startinokulums entsprach (siehe Kap. 3.2), wohingegen bei der Adhärenz viele Tausend pro Well ausgezählt werden konnten, was bis zu 2,5% des Startinokulums entsprach (siehe Kap. 3.3.3). Dabei war das Startinokulum bei beiden Versuchen in ähnlichen Größenordnungen gehalten worden (Soll des Startinokulums bei den Adhärenzversuchen 1×10^6 KBE/well, bei den Versuchen zur Translokation 5×10^5 KBE/well). Somit kann man davon ausgehen, dass nach einer Inkubationszeit von nur einer Stunde bei den Versuchen zur Adhärenz mitgezählte intrazelluläre Keime keinen relevanten Einfluss auf das Ergebnis hatten. Zusätzlich ist zu bedenken, dass die Versuchsreihen gegensätzliche Ergebnisse bezüglich des Phänotyps AS+BS+ brachten. Er translozierte in signifikant geringerer Zahl als die anderen, die Adhärenz war jedoch signifikant höher. Somit sollten die bei den Versuchen zur Adhärenz intrazellulär gelegenen mitgezählten Enterokokken einen noch unwesentlicheren Einfluss auf das Ergebnis gehabt haben.

3.4 Einfluss von Antibiotika auf die Translokation

3.4.1 Wachstum von *E.faecalis* 12030 unter Antibiotika

Des weiteren sollte eine repräsentative Auswahl von Antibiotika, die aufgrund epidemiologischer und klinischer Daten getroffen wurde, dahingehend genauer untersucht werden, ob sie einen Einfluss auf das Translokationsverhalten von *Enterococcus faecalis* 12030 (46, 97) haben.

Dafür musste zunächst ausgeschlossen werden, dass sie einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *E.faecalis* 12030 haben. Dazu wurde die

Vermehrung der Bakterien über 24 Stunden unter dem Einfluss jeweils eines Antibiotikums beobachtet, und an drei Zeitpunkten die Zahl der KBE bestimmt. Zum Vergleich wurde jeweils zu den gleichen Zeitpunkten die KBE in TSB als Wachstumsmedium ohne den Zusatz eines Antibiotikums bestimmt. Gewählt wurden:

Metronidazol

Cefotaxim

Cefoxitin

Ceftriaxon

Amphotericin B

Meropenem

Ciprofloxacin.

Metronidazol wird als Risikofaktor für die Entstehung einer Enterokokkensepsis genannt (4, 43), gleiches gilt für Cephalosporine der dritten Generation (16, 43, 77), Imipenem (16, 35, 43, 96) und Ciprofloxacin (43). Sie wurden in absteigender Dosierung untersucht. Begonnen wurde mit 1mg/ml, weiter wurde dann mit dem Faktor 10 verdünnt, wodurch man Konzentrationen von 0,1mg/ml, 0,01mg/ml usw. bis 0,0001mg/ml (=1µg/ml) erhielt.

Folgende Abbildungen 3.11 bis 3.13 zeigen das Wachstum von *Enterococcus faecalis* 12030 mit Metronidazol, Cefotaxim, Cefoxitin, Ceftriaxon und Amphotericin B, sowie ohne Antibiotikum in TSB als Wachstumsmedium.

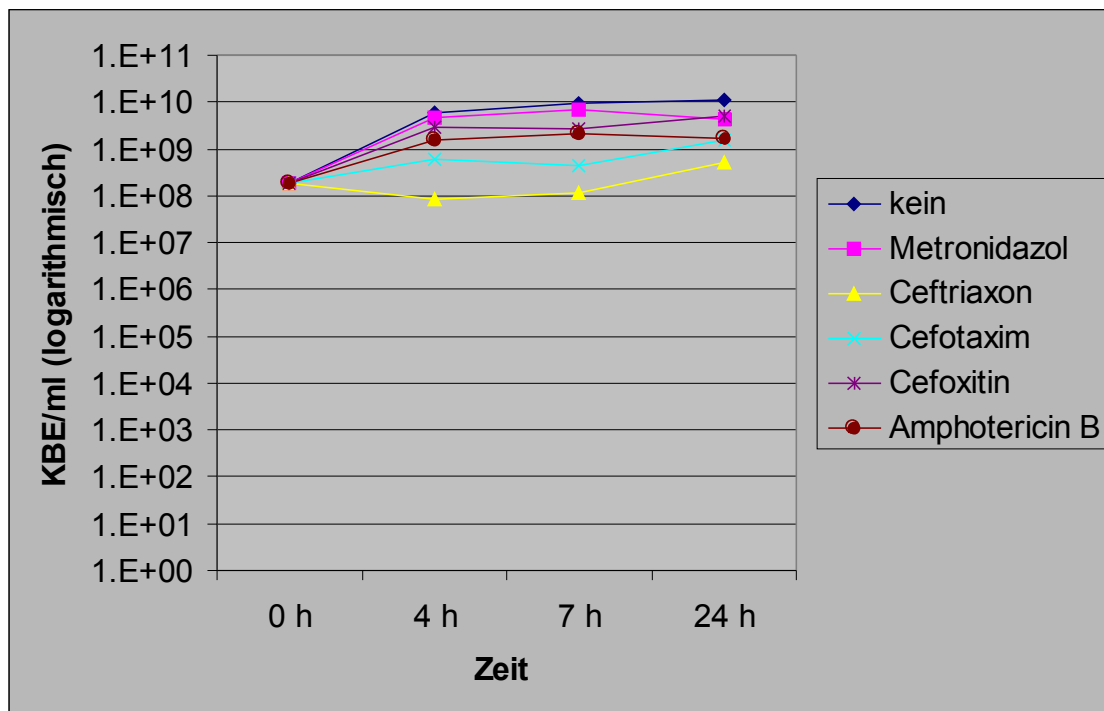


Abbildung 3.11: Wachstum von *E. faecalis* 12030 unter verschiedenen Antibiotika bei einer Konzentration von 0,1mg/ml, logarithmische Skalierung, n=6

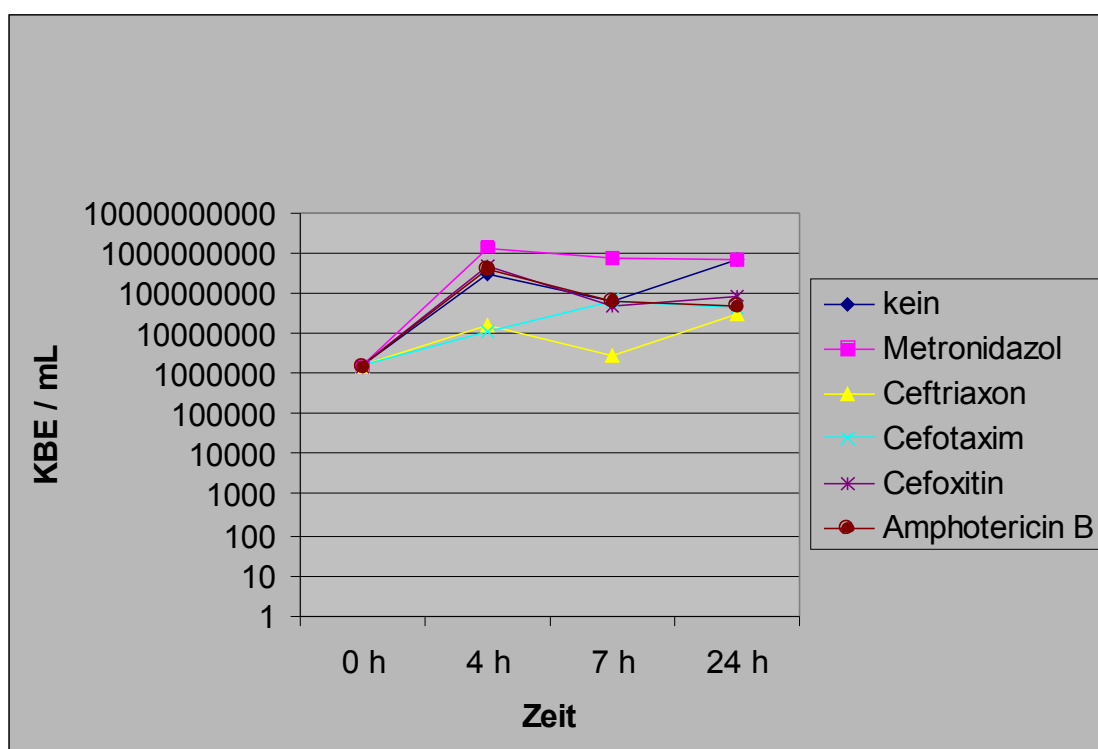


Abbildung 3.12: Wachstum von *E. faecalis* 12030 unter verschiedenen Antibiotika bei einer Konzentration von 0,01 mg/ml, logarithmische Skalierung, n=6

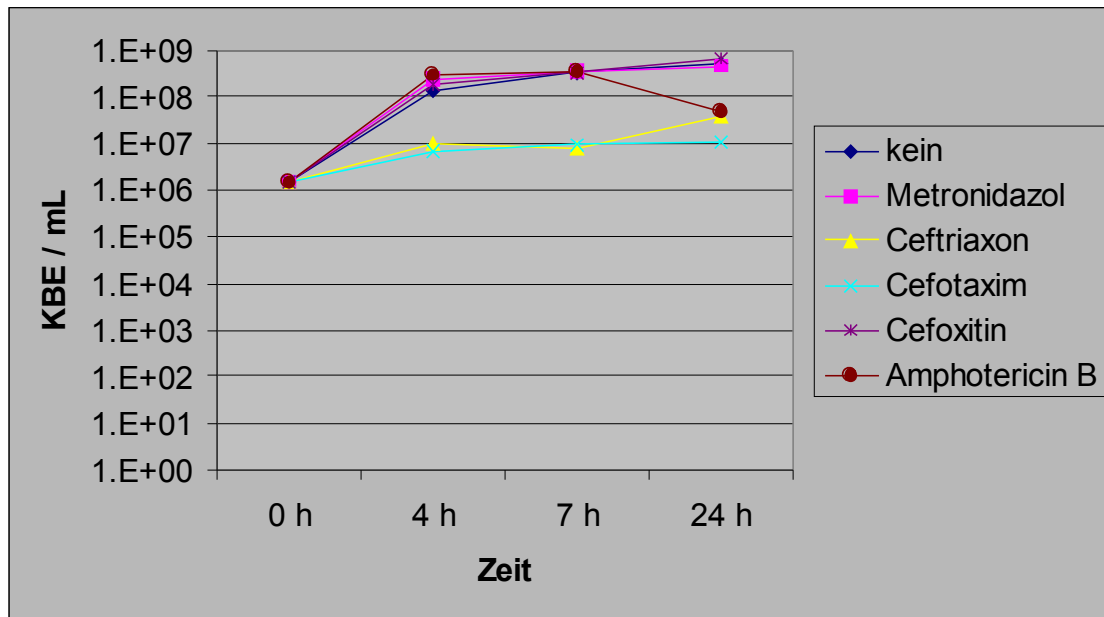


Abbildung 3.13: Wachstum von *Enterococcus faecalis* 12030 unter verschiedenen Antibiotika mit einer Konzentration von 0,001mg/ml, logarithmische Skalierung, n=6

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass Metronidazol in keiner der gewählten Konzentrationen das Wachstum der Enterokokken beeinträchtigte, sondern die Zahl der KBE weitgehend mit der Anzahl der Bakterien der Kontrollgruppe, d.h. der Gruppe ohne Antibiotikum im Medium, übereinstimmte. Unter den anderen Antibiotika konnte eine Beeinträchtigung des Wachstums beobachtet werden, wenn diese sich auch zum Teil als relativ gering erwies. Unter Cefoxitin verhielt sich das Wachstum ähnlich wie bei Metronidazol. Ceftriaxon und Cefotaxim beeinträchtigten das Wachstum dahingehend, dass vor allem die nach 24 Stunden erreichte Zahl der Enterokokken kleiner ist, als ohne Antibiotika. Bei Amphotericin B konnte in niedriger Dosierung zwischen 7 Stunden und 24 Stunden ein Rückgang der Enterokokkenzahl beobachtet werden, obwohl das von einem Antimykotikum nicht zu erwarten war.

Im Weiteren wurden auch noch Meropenem und Ciprofloxacin in den selben Konzentrationen wie die anderen Antibiotika untersucht. Beide Substanzen zeigten vor allem in den höheren Konzentrationen deutliche Aktivität gegen *Enterococcus faecalis* 12030. Darum wurden sie in den weiteren Versuchen nicht mehr verwendet.

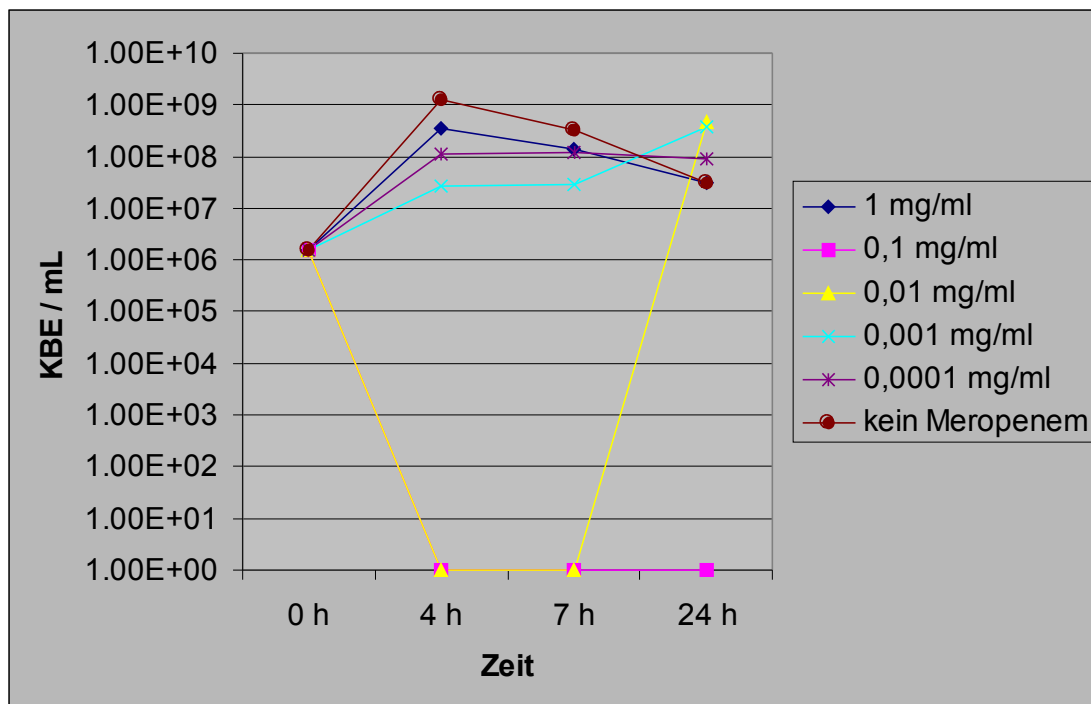


Abbildung 3.14: Wachstum von *E. faecalis* 12030 unter Meropenem in verschiedenen Konzentrationen, logarithmische Skalierung, n=6

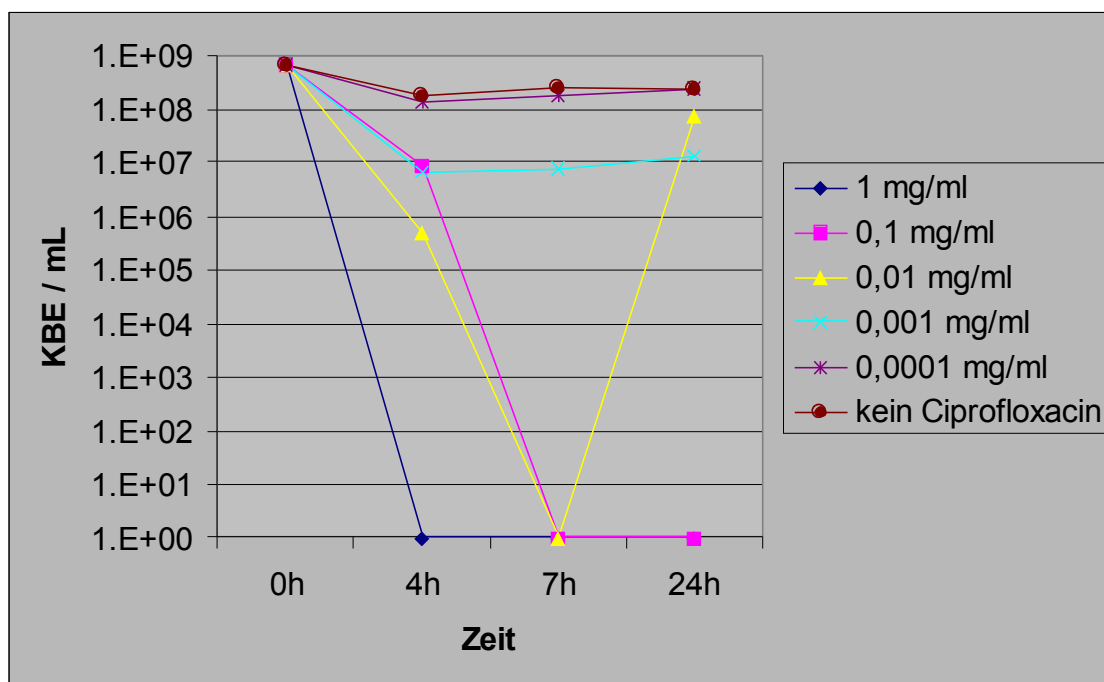


Abbildung 3.15: Wachstum von *E. faecalis* 12030 unter Ciprofloxacin in verschiedenen Konzentrationen, logarithmische Skalierung, n=6

Aus unklaren Gründen waren aus manchen Proben, die nach vier oder sieben Stunden entnommen wurden, keine Enterokokken gewachsen, obwohl nach 24 Stunden wieder einige *E.faecalis* nachweisbar waren.

Freundlicherweise bestimmte das Mikrobiologische Institut der Universität Tübingen für diese Arbeit die Minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) für die verwendeten Antibiotika für *E.faecalis* 12030 (Cefotaxim wurde vertretend für alle Cephalosporine gewertet). Damit wurden einige der obigen Ergebnisse noch bekräftigt. Zudem zeigte sich die Wirksamkeit von Ampicillin und Gentamicin gegen *E.faecalis* 12030, wodurch die Methode des Killing bestätigt wurde. Wie der folgenden Tabelle zu entnehmen ist, ist *E.faecalis* 12030 sensibel für Ampicillin, Gentamicin, Ciprofloxacin, Meropenem und Vancomycin. Gegen Cefotaxim besteht Resistenz mit einer MHK >256.

Antibiotikum	Meropenem	Gentamicin	Ampicillin	Ciprofloxacin	Cefotaxim	Vancomycin
MHK	8	16	0,75	1,5	>256	3

Tabelle 3: Minimale Hemmkonzentrationen für *E.faecalis* 12030

Aufgrund der bereits in subinhibitorischen Konzentrationen der Antibiotika beobachtete Wachstumshemmung auf *E.faecalis* 12030 wählten wir für die weiteren Versuche, in denen die Translokation unter dem Einfluss von Antibiotika untersucht werden sollte, Metronidazol, da es die geringsten Einflüsse aufwies, sowie Cefotaxim als Vertreter der Cephalosporine. Auf Amphotericin B wurde aufgrund der zu hohen toxischen Wirkung auf die T84-Zellen verzichtet (s.u.). Cephalosporine der dritten Generation werden in einigen Studien als Risikofaktor für die Entstehung einer Enterokokkensepsis bezeichnet (16, 43, 77), ebenso wird auch Metronidazol genannt (4, 43). Da beide Antibiotika zusätzlich nur einen geringen bis keinen Einfluss auf *E.faecalis* 12030 und T84-Zellen hatten, erschienen gerade diese Substanzen sinnvoll und interessant für die weitere Untersuchung im Rahmen der Versuche zur Translokation von Enterokokken in T84-Zellen.

3.4.2 Ausschluss zytotoxischer Wirkung der Antibiotika auf T84-Zellen

Zuerst wurde untersucht, ob die gewählten Antibiotika die T84-Zellen beeinträchtigen. Das Wachstum der Zellen wurde bis zu ihrer vollständigen Konfluenz oder maximal zehn Tage lang beobachtet. Unter normalen Umständen, das heißt Wachstum mit Medium ohne Antibiotikum, wäre eine vollständige Konfluenz nach maximal sieben Tagen zu erwarten gewesen. Wurde in diesem Zeitraum keine vollständige Konfluenz erreicht, konnte von einem inhibitorischen Effekt auf das Zellwachstum bzw. einem negativen Einfluss auf die Viabilität der Zellen ausgegangen werden.

Das Wachstum der Zellen mit Antibiotika in verschiedenen Konzentrationen im Medium wurde verglichen mit dem Wachstum der Kontrollgruppe, der kein Antibiotikum zugegeben wurde. Jede Gruppe war durch sechs Replikate vertreten.

Dabei kamen folgende Antibiotika zur Anwendung:

Metronidazol

Cefotaxim

Cefoxitin

Ceftriaxon

Amphotericin B

Auf die Untersuchung von Ciprofloxacin und Meropenem wurde verzichtet, da hier *in vitro* bereits eine zu hohe Wirksamkeit gegenüber *E.faecalis* 12030 beobachtet wurde (siehe Kap.3.4.1). Die Untersuchungen oben genannter Substanzen ergaben, dass unter anderem Metronidazol und Ceftriaxon in keiner der gewählten Konzentrationen das Wachstum der Zellen beeinträchtigten. Im Folgenden wird dies für Metronidazol in einem Diagramm verdeutlicht.

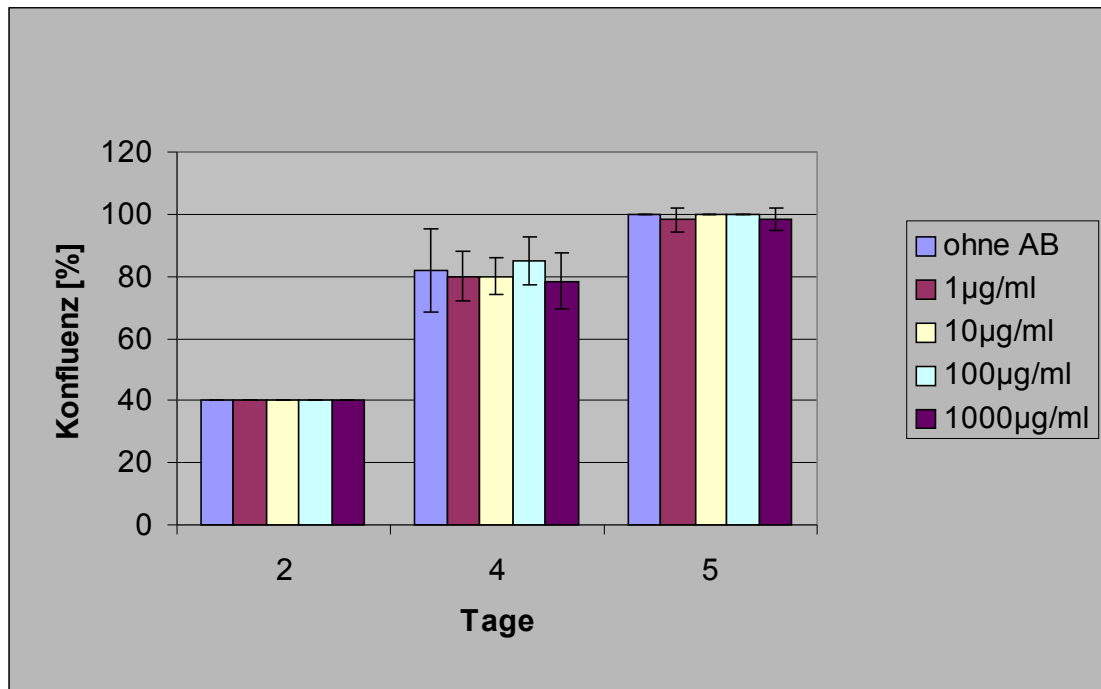


Abbildung 3.16: Konfluenz der T84-Zellen unter Metronidazol

Metronidazol hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen (vgl. Abb.3.16). Nach fünf Tagen waren die Zellen unter jeder gewählten Konzentration von Metronidazol konfluent. Die Wachstumskurven verlaufen fast übereinander.

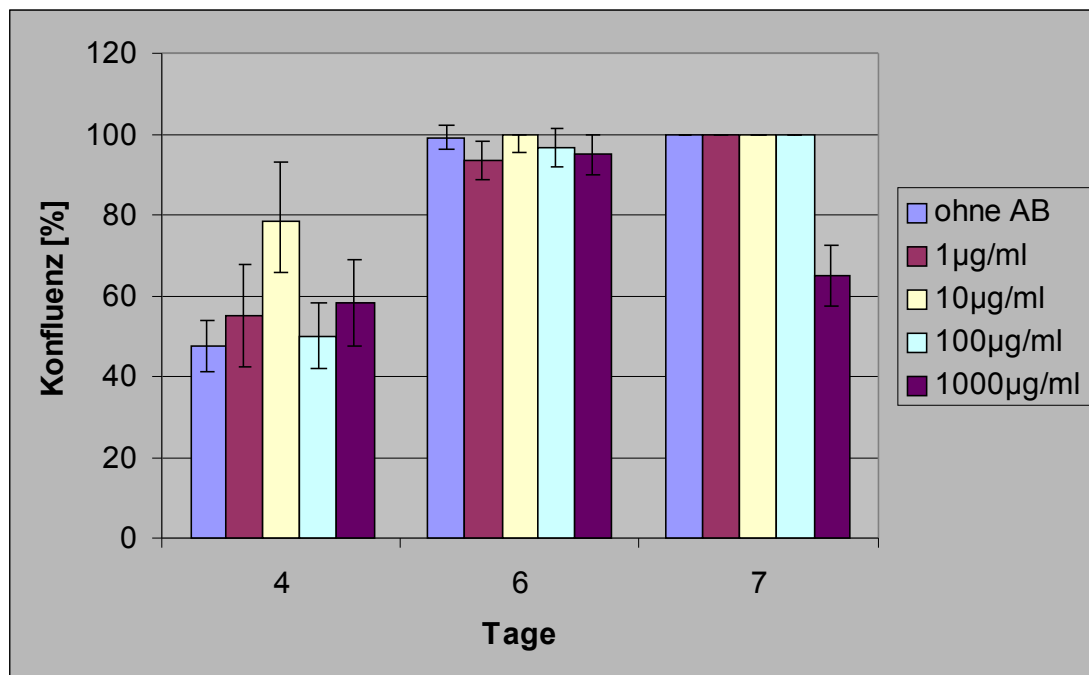


Abbildung 3.17: Konfluenz der T84-Zellen unter Cefotaxim

Unter Cefotaxim zeigte sich nach vier Tagen in der Gruppe ohne Antibiotikum eine Konfluenz von ca. 47%, was die niedrigste war. Die meiste Konfluenz nach vier Tagen war unter 10 µg/ml zu beobachten, mit 78%, die restlichen Werte lagen dazwischen. In den ersten sechs Tagen ließen sich sonst noch keine großen Unterschiede zwischen den Reihen erkennen. Am siebten Tag waren die Zellen bis zu einer Antibiotikakonzentration von 100 µg/ml konfluent. Nur unter 1 mg/ml waren sie von einer Konfluenz von 95% am sechsten Tag auf 65% am siebten Tag reduziert, was auf einen toxischen Einfluss schließen lässt. Abbildung 3.17 zeigt das Wachstum der T-84 Zellen über mehrere Tage unter dem Einfluss von Cefotaxim.

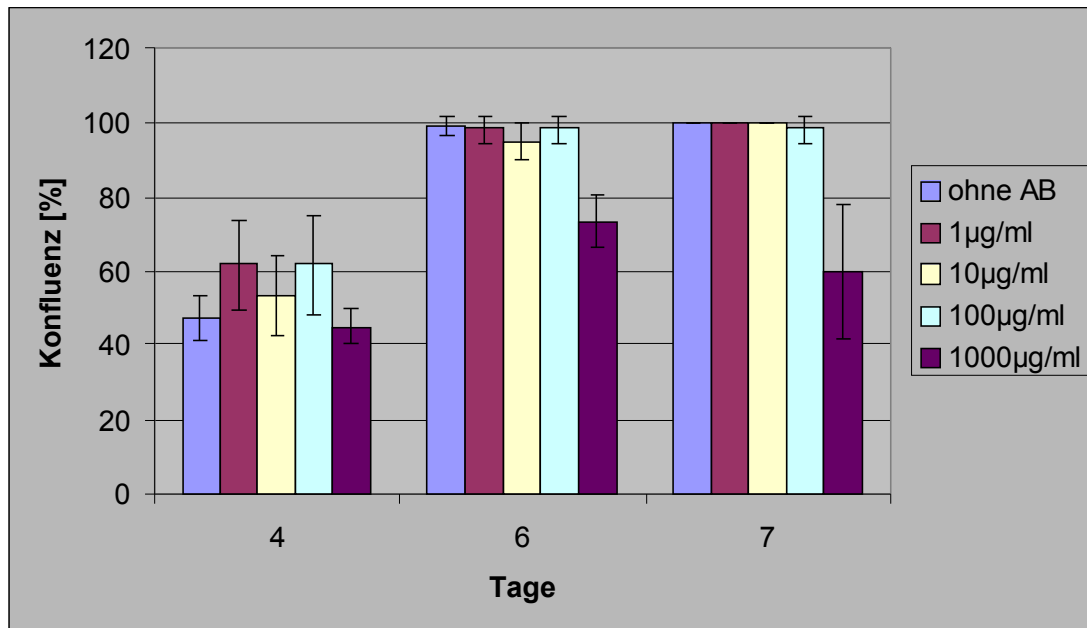


Abbildung 3.18: Konfluenz der T84-Zellen unter Cefoxitin

Bei Cefoxitin blieb die Konfluenz vom sechsten auf den siebten Tag unter der Konzentration von 100 µg/ml bei 98%. Unter 1 mg/ml wurde ein Absterben der Zellen, nämlich von 73,3% am sechsten, auf 60% am siebten Tag, beobachtet. Konzentrationen unter 100 µg/ml hatten auf das Wachstum keinen Einfluss (siehe hierzu Abb. 3.18).

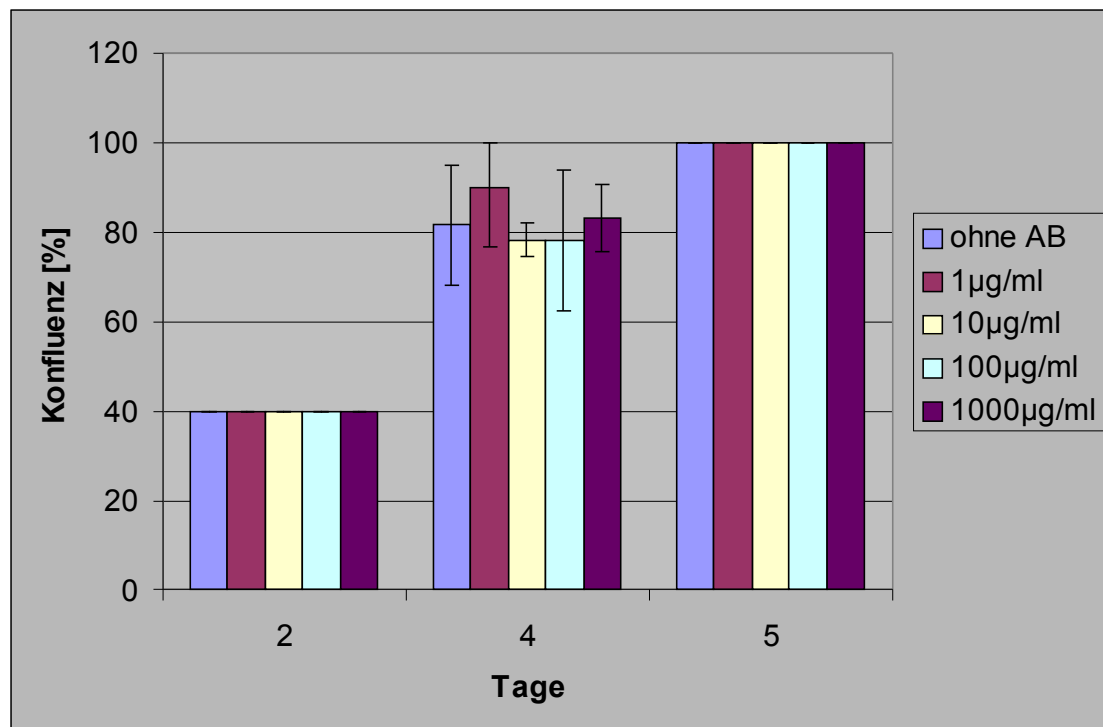


Abbildung 3.19: Konfluenz der T84-Zellen unter Ceftriaxon

Unter Ceftriaxon zeigte sich bereits nach 5 Tagen unter allen Konzentrationen eine vollständige Konfluenz der T84-Zellschichten. Das Wachstum war unbeeinträchtigt durch dieses Antibiotikum, dargestellt in Abbildung 3.19.

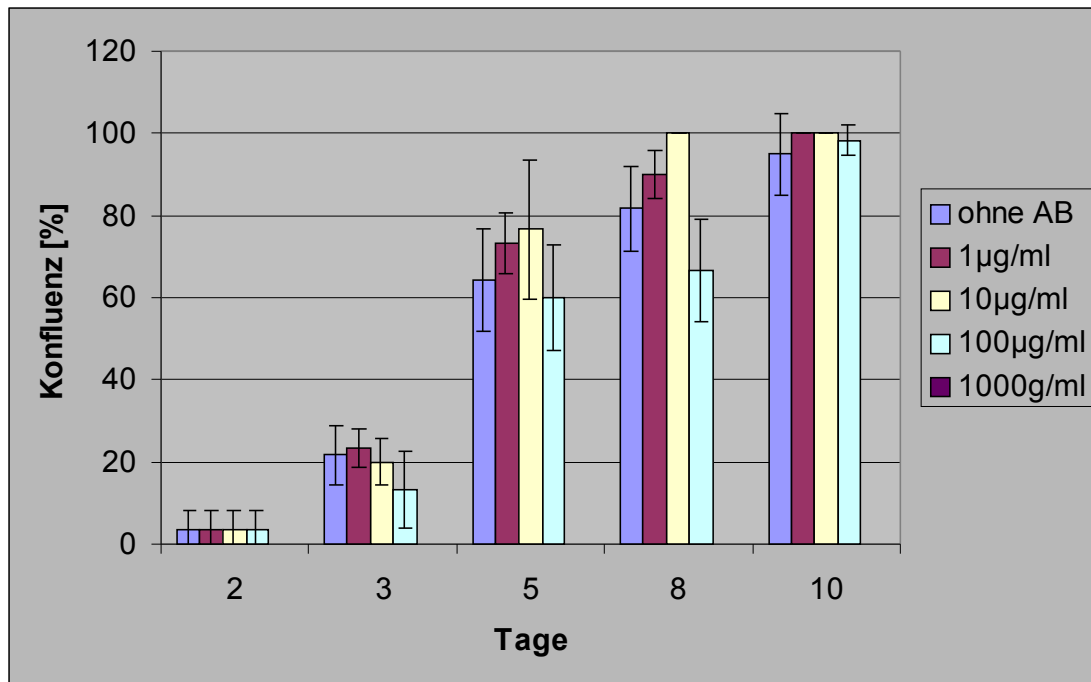


Abbildung 3.20: Konfluenz der T-84 Zellen unter Amphotericin B

Unter Amphotericin B (vgl. Abb. 3.20) wuchsen die Zellen insgesamt unter allen Konzentrationen langsamer, erreichten aber spätestens am 10. Tag annähernd vollständige Konfluenz. Bei einer Konzentration von 1mg Amphotericin B pro ml Medium wuchsen die T84-Zellen überhaupt nicht.

Zuletzt wurde die Zahl der mit Trypanblau angefärbten toten Zellen nach vollständiger Konfluenz verglichen. In Abbildung 3.21 und 3.22 sind die Ergebnisse hierzu dargestellt. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Zellen gefunden werden, die mit Antibiotika vorbehandelt wurden und denen, die im Medium frei von Antibiotika wuchsen. Nur unter Amphotericin B zeigte sich eine deutlich verringerte Zahl toter Zellen, die Kontrollgruppe allerdings zeigte eine höhere Anzahl toter Zellen als die Kontrollgruppen anderer Versuche. Man muss beachten, dass die toten Zellen erst nach vollständiger Konfluenz gezählt wurden. Da diese, je nach Antibiotikum, nach einer unterschiedlichen Zeit erreicht wurde, lassen sich keine Vergleiche der Versuche untereinander anstellen, man kann nur innerhalb eines Versuchs zu einer Beurteilung kommen.

Die beiden folgenden Diagramme zeigen die Zahl der toten Zellen exemplarisch unter Metronidazol, die anderen Antibiotika zeigten ähnliche Auswirkungen, Amphotericin B wies als einziges einen deutlichen Unterschied auf.

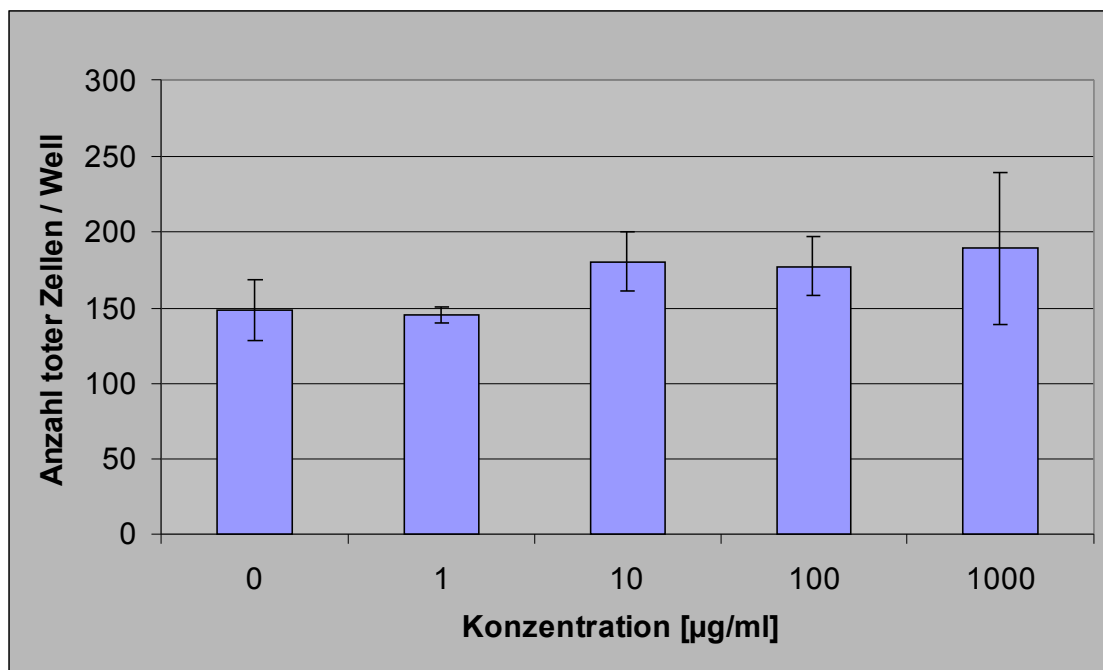


Abbildung 3.21: Anzahl toter Zellen unter Metronidazol

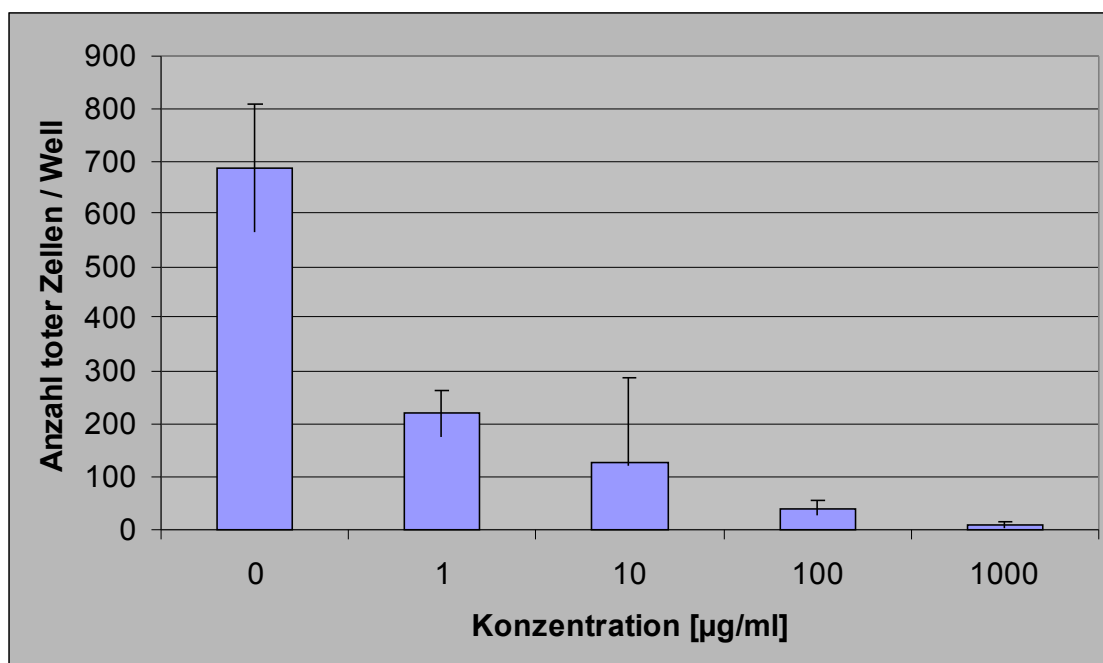


Abbildung 3.22: Anzahl toter Zellen unter Amphotericin B

Zusammenfassend war also unter Metronidazol der geringste Einfluss auf die T84-Zellen zu verzeichnen, gefolgt von den Cephalosporinen. Diese beeinträchtigten die Zellen aber entweder nur in geringem Ausmaß, oder unter sehr hohen Konzentrationen. Eindeutig zelltoxisch wirkte Amphotericin B. Das Zählen der abgestorbenen Zellen erbrachte nicht die gewünschte Aussagekraft und wurde deshalb auch nicht weiter ausgewertet. Insgesamt wurde Amphotericin B nicht weiter untersucht, da es zytotoxische Effekte auf die T84-Zellen zeigte. Bei Meropenem als Vertreter der Carbapeneme und Ciprofloxacin als Vertreter der Fluorchinolone war auch in subinhibitorischen Konzentrationen ein negativer Effekt auf das Enterokokkenwachstum zu verzeichnen. Für diese spezielle Fragestellung des Einflusses von Antibiotika auf die Translokation wurde deshalb Metronidazol und, stellvertretend für die Cephalosporine, Cefotaxim gewählt. Für beide ist aus epidemiologischen und experimentellen Arbeiten ein begünstigender Effekt auf Enterokokkeninfektionen bekannt (16).

3.4.3 Translokation von *Enterococcus faecalis* 12030 unter Metronidazol und Cefotaxim

Die Antibiotika Metronidazol und Cefotaxim wurden in drei Versuchen in den Konzentrationen 10µg/ml, 1µg/ml, und 0,1µg/ml auf die Zellen gegeben. Nur beim ersten Versuch mit Metronidazol wurden die Konzentrationen 10µg/ml, 100µg/ml und 1000µg/ml verwendet. Dazu kam jedes Mal eine Vergleichsreihe, der kein Antibiotikum zugegeben wurde. In jeweils drei Versuchen an verschiedenen Tagen gab es von jeder Antibiotikakonzentration sowie vom Vergleichswert sechs Replikate. Auf die hohen Konzentrationen wurde bei Cefotaxim verzichtet, da hier die Toxizität nicht vollkommen ausgeschlossen werden konnte. Außerdem liegen die Serumkonzentrationen, die unter Therapie mit dem entsprechenden Antibiotikum erreicht werden können und dürfen, unter diesen Werten.

Unter Metronidazol sind in der anteilmäßigen Berechnung der intrazellulären Enterokokken vom Gesamtwert keine signifikante Unterschiede zu erkennen. Bei der statistischen Auswertung durch ANOVA war ein extrem niedriger Wert ausgeschlossen worden. Dies erschien möglich, da es sich hier nur um einen

Messfehler, möglicherweise auch Fehler bei der Entnahme der Probe handeln kann. Zellen, die kein Antibiotikum im Medium hatten, nahmen ähnlich viele Enterokokken auf, wie Zellen, die mit Metronidazol vorbehandelt worden waren ($p=0,121$). Hierzu können die Abbildungen 3.23 und 3.24 verglichen werden.

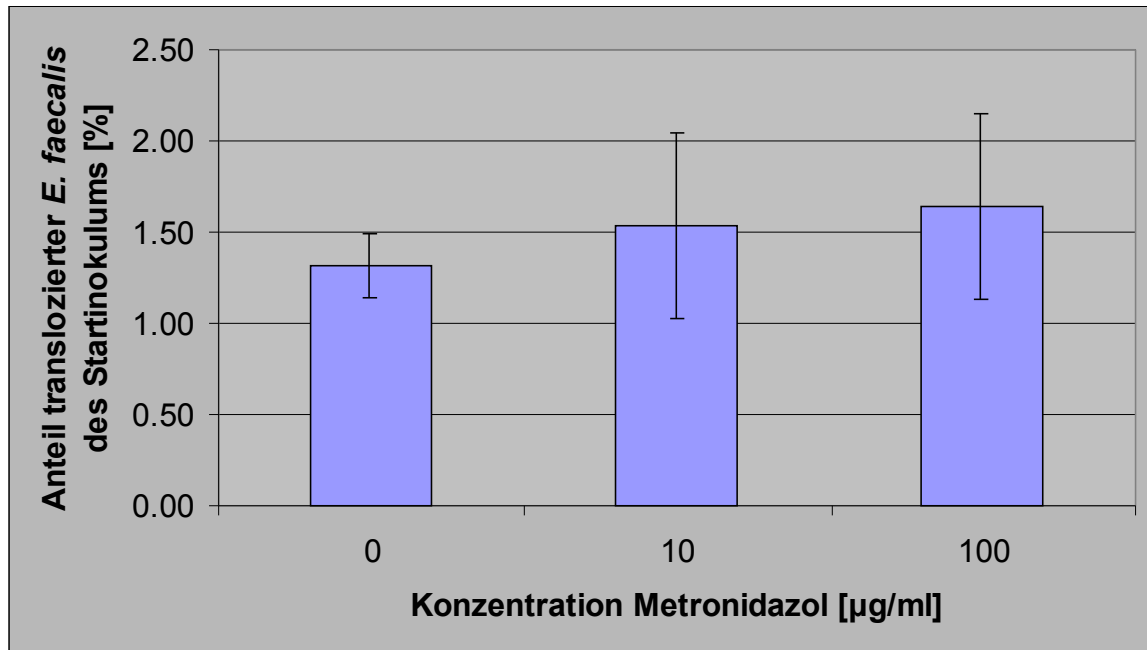


Abbildung 3.23: Unter Metronidazol in den Konzentrationen 0, 10, 100 µg/ml translozierte *E.faecalis* 12030 (in Prozent des Startinokulums mit Standardabweichungen, Versuch 1, n=6)

In Abbildung 3.23 ist die Translokation von *E.faecalis* 12030 in Prozent des Startinokulums bei einer Metronidazol-Konzentration von 10, 100 und 1000 µg/ml gezeigt. Diese hohen Konzentrationen wurden nur in diesem einen Versuch gewählt. Zum besseren Vergleich mit Cefotaxim, das wegen der potentiellen Toxizität auf *E.faecalis* 12030 in höheren Konzentrationen nicht verwendet wurde, sondern nur mit 0,1, 1 und 10 µg/ml wurde auch Metronidazol in den weiteren Versuchen in diesen Konzentrationen verwendet. Die Ergebnisse, d.h. die Mittelwerte der Versuche und der beiden weiteren sind in der folgenden Abbildung 3.24 dargestellt.

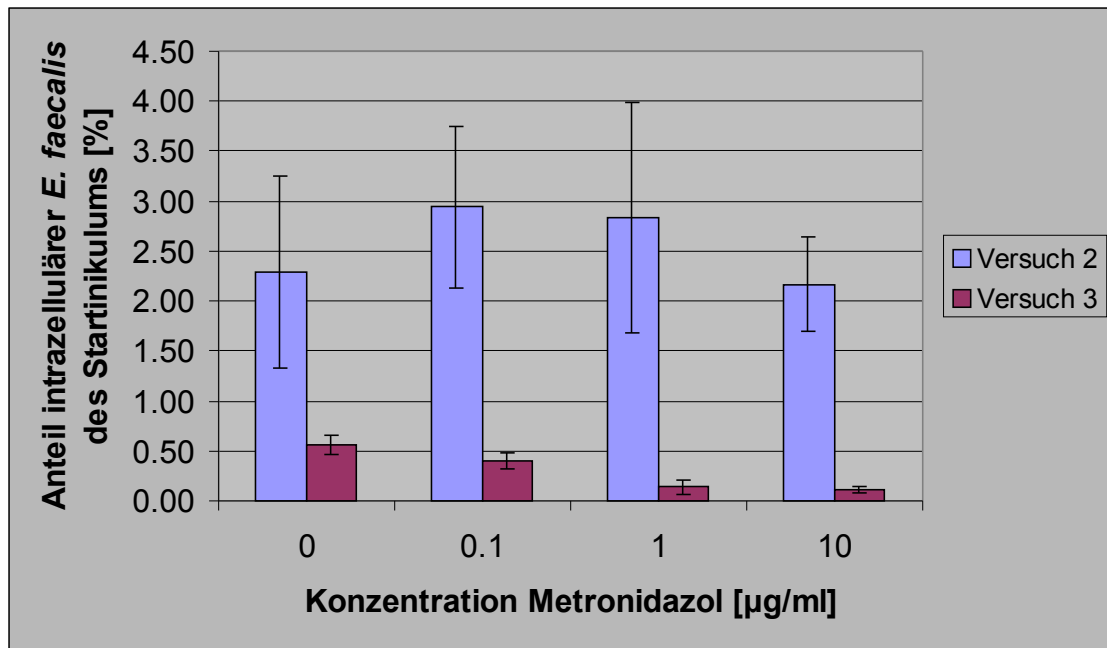


Abbildung 3.24: Unter Metronidazol in Konzentrationen 0, 0,1, 1 und 10µg/ml translozierte *E.faecalis* 12030 (in Prozent des Startinokulums mit Standardabweichungen, Versuche 2 und 3 mit je n=6)

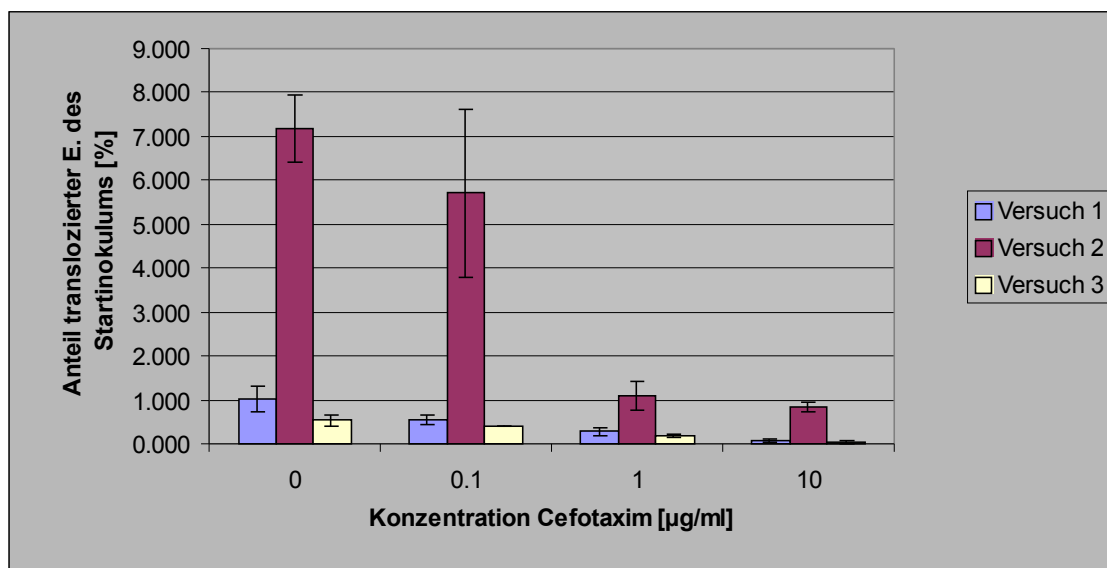


Abbildung 3.25: Unter Cefotaxim in T84-Zellen translozierte *E.faecalis* 12030 (in Prozent des Startinokulums mit Standardabweichungen, Versuche 1 bis 3 mit je n=6)

Unter Cefotaxim hingegen sank die Aufnahme von Enterokokken in die Zelle, abhängig von der steigenden Antibiotikakonzentration im Medium, in hochsignifikantem Ausmaß (vergleiche Abbildung 3.25). Hier hatte sich über alle Versuche für den Vergleich der Konzentrationen 0 und 0,1 µg/ml mit 1 und

10µg/ml einen p-Wert von <0,0001 ergeben. In niedriger Konzentration von 0,1 µg/ml war zur Vergleichsreihe ohne Antibiotikum kein signifikanter Unterschied gefunden worden (p=0,2909). Auch der Vergleich der Konzentrationen 1 µg/ml und 10µg/ml erbrachte keinen signifikanten Unterschied (p=0,1095). Unter den beiden hohen Konzentrationen waren also signifikant weniger *E.faecalis* 12030 in die T84-Zellen aufgenommen worden als unter den Konzentrationen 0,1µg/ml bzw. 0µg/ml. Da die Zahl der intrazellulären Enterokokken als prozentualer Anteil der gesamten Bakterienanzahl im Medium berechnet wurde, kann man die sinkende intrazelluläre Enterokokkenzahl auch nicht der Toxizität von Cefotaxim gegen *E.faecalis* 12030 mit steigender Konzentration zuschreiben. Denn die berechneten Werte sind unabhängig davon, ob die Gesamtzahl der Enterokokken nun fällt oder steigt.

Zusammenfassend verhielten sich T84-Zellen, die Metronidazol egal welcher Konzentration im Medium hatten, in der Aufnahme von Enterokokken wie solche mit normalem Zellmedium, also ohne antibiotischen Zusatz. Es konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (p=0,1210). Cefotaxim dagegen hatte einen signifikanten Einfluss auf die Aufnahme von *E.faecalis* 12030 in die Zelle (p<0,0001). In niedriger Konzentration von 0,1µg/ml war noch kein Unterschied zu Zellen mit antibiotikafreiem Nährmedium zu erkennen. Mit höheren Konzentrationen von 1 und 10µg/ml Cefotaxim im Medium nahmen die T84-Zellen jedoch signifikant weniger *E.faecalis* 12030 auf.

4 Diskussion

Die Arbeit kann in zwei Hauptteile unterteilt werden. In beiden ging es um die Translokation von Enterokokken in T84-Zellen unter verschiedenen Einflüssen. Zum einen wurden als extrinsische Faktoren die beiden Antibiotika Metronidazol und Cefotaxim hinsichtlich der Beeinflussung der Translokation untersucht. Zum anderen AS und BS als intrinsische Einflussfaktoren auf die Translokation. Im Rahmen der Untersuchung von AS und BS wurde zusätzlich noch deren Einfluss auf die Adhärenz an T84-Zellen ermittelt.

Die wichtigsten Ergebnisse waren, dass der Phänotyp AS+BS+ in signifikant geringerer Zahl in die Zellen wanderten, als die anderen. Demgegenüber war die Adhärenz von AS-tragenden *E.faecalis* an T84-Zellen signifikant höher als die der anderen.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass Metronidazol keinen Einfluss auf die Zahl der translozierten Enterokokken hat, wohl aber Cefotaxim. Hier konnte beobachtet werden, dass mit steigender Konzentration des Antibiotikums die Zahl der intrazellulären *E.faecalis* 12030 sank. Dies zeigt, dass Cefotaxim als Vertreter der Cephalosporine die Invasion von Enterokokken in Darmepithelzellen konzentrationsabhängig beeinflusst.

4.1 Bakterielle Translokation

Lange Zeit wurde *Enterococcus faecalis* einzig als Erreger von Infektionen der Gallenwege, des Urogenitaltraktes und der Herzklappen verkannt. In den letzten Jahren wurden Enterokokken zunehmend als ursächlicher Keim von Bakteriämien und Sepsis isoliert (30). Die Häufigkeit der Sepsis durch Enterokokken wird zwischen 11% und 17% der Gesamtzahl dieser Erkrankungen angesiedelt (36, 85, 101). In einer retrospektiven Studie von Landry et al. wurde die Mortalitätsrate der Enterokokkensepsis mit 31% erfasst (58). Gerade aufgrund der Schwere dieser Erkrankung ist es von enormer Wichtigkeit, mehr über die Pathomechanismen in Erfahrung zu bringen, um dann eventuell durch entsprechende Maßnahmen einer Sepsis vorbeugen zu können.

Das Risiko, an einer Sepsis zu erkranken, wird durch verschiedene Faktoren erhöht. Dazu zählen Splenektomie (91), hämorrhagischer Schock (2), hypoxische Bedingungen für die Darmzellen (112) und Immunsuppression (13, 75, 76). Außerdem werden maschinelle Beatmung, Blasendauerkatheter (16), bakterielle Endotoxine (26), Verbrennungen (25, 62), Transplantationen sowie totale parenterale Ernährung (1), aber auch das Liegen eines zentralen Venenkatheters (58) und langer Aufenthalt im Krankenhaus zu den Risikofaktoren gezählt (17).

Es wurde beobachtet, dass durch *E.faecalis* hervorgerufene Infektionen ebenfalls gehäuft bei Patienten auftreten, die wegen Peritonitis Breitspektrum-Antibiotika erhalten haben, welche gegen die meisten Bakterien der Darmflora wirken, mit Ausnahme von Enterokokken (29). Auch andere Untersuchungen nennen Antibiotika als Risikofaktor für die Entstehung einer Enterokokkensepsis, hier speziell Cephalosporine und Imipenem (16). Es stellt sich die Frage, worin der Kausalzusammenhang zwischen der Verabreichung von Antibiotika und dem Auftreten einer Enterokokkensepsis besteht.

Es ist bekannt, dass die Therapie mit Antibiotika, entsprechend ihrem Wirkspektrum, die Normalflora des Darmes verändern kann. Man stellte in diesem Zusammenhang fest, dass die Verabreichung, vor allem von Cephalosporinen, zu einer Reduzierung von Enterobacteriaceae und der Vermehrung von Enterokokken führt (32, 33). Aber auch unter anderen Bedingungen kann es zur Vermehrung eines einzelnen Darmkeimes kommen, womit das Gleichgewicht der Darmflora gestört wird. Es ist naheliegend, dieses bakterielle Ungleichgewicht für die Entstehung einer Sepsis verantwortlich zu machen (7, 9, 92).

Trotzdem wurden Fälle erhöhter bakterieller Translokation beobachtet, bei denen man diese Verschiebungen im Gleichgewicht nicht feststellen konnte. Bei Tumorerkrankungen und unter Immunsuppression zum Beispiel wurde eine vermehrte Translokation nachgewiesen, die eindeutig ohne eine bakterielle Überwucherung des Darmes stattfand (79). Andere Untersuchungen zeigten eine erhöhte Permeabilität der Darmwand unter bestimmten Bedingungen für verschiedene Substrate, zum Beispiel im Rahmen von Verbrennungsverletzungen, Polytrauma, hämorrhagischem Schock,

Indomethazinbehandlung und bei intensivmedizinisch betreuten Patienten (104).

Durch diese erhöhte Durchlässigkeit der Darmwand ist es auch Bakterien möglich, diese zu durchwandern und auf diesem Weg in mesenteriale Lymph- oder Blutbahnen zu gelangen und sich in Leber oder Milz anzusiedeln. Diese bakterielle Translokation ist unter anderem an Mäusen und Ratten bereits nachgewiesen worden (106), und ist auch unter oben genannten klinischen Bedingungen neben der erhöhten Permeabilität der Darmwand vermehrt beobachtet worden (104).

Es werden auch synergistische Effekte zwischen Immunsuppression und der Gabe bestimmter Antibiotika beschrieben, in diesem Falle Clindamycin und Penicillin G, die zu vermehrter bakterieller Translokation führen (12).

Nicht alle Bakterien der Darmflora scheinen die Darmwand gleich häufig zu passieren (93). *Enterococcus faecalis* besitzt nachweislich die Fähigkeit zur Translokation (106). Die Beobachtung, dass dieser Organismus auch bei Patienten mit Sepsis isoliert wurde, bei denen weder Zeichen einer Endokarditis, einer Erkrankung der Gallenwege, noch ein Eiterherd oder Enterokokken im Urogenitaltrakt als septischer Focus gefunden werden konnten (30), legen die Vermutung nahe, dass die Keime aus einer anderen Region des Körpers die Sepsis unterhalten, nämlich möglicherweise über die Translokation aus dem Darmlumen. Es stellt sich also die Frage, ob eine antibiotische Therapie zu einer vermehrten Permeabilität der Darmwand führen kann und damit eine Translokation von Bakterien induzieren kann.

In dieser Arbeit konnte in der Zellkultur gezeigt werden, dass die Translokation von Enterokokken durch Cefotaxim beeinflusst werden kann. Sicherlich können vom Zellmodell keine direkten Rückschlüsse auf die Komplexität des menschlichen Gastrointestinaltraktes gezogen werden. Trotzdem untermauern diese Ergebnisse die Vermutung, dass antibiotische Substanzen die Translokation von Bakterien aus dem Darm beeinflussen können. In dieser Arbeit sind schließlich an einer der kleinsten Einheiten des Darmes, an den Epithelzellen, translozierte Enterokokken nachgewiesen worden, ebenso ist hier der Einfluss von antibiotischen Substanzen nachgewiesen worden. Schon das eingeschränkte Wachstum der T84-Zellen unter Cefoxitin und Amphotericin B

kann als Einfluss auf Darmepithelien gewertet werden, wobei hier die Translokation von Enterokokken aus methodischen Gründen nicht näher untersucht werden konnte.

Die Permeabilität von Epithelzellen für Bakterien und ihre Aufnahme in die Zelle kann sich nachweislich auch durch Toxine ändern, z.B. Enterotoxin von *Bacteroides fragilis* erhöht die Aufnahme einzelner Bakterienstämme in die Zelle, darunter auch *Enterococcus faecalis* (111). Ähnliches wurde bei *Clostridium difficile* beobachtet, dessen Toxin A und B Bakterien die Adhärenz an und Penetration durch Darmepithelien erleichtert (38). Auch bei Enterokokken werden Virulenzfaktoren beschrieben, dazu gehören Hämolyisin, Gelatinase, Lipase, Hämagglutinin und Aggregation Substance (18, 37, 50). Auf das Oberflächenmolekül AS soll später genauer eingegangen werden (siehe Kap. 4.3).

Bislang ist nicht geklärt, ob Enterokokken auf transzellulärem oder parazellulärem Weg die Darmwand penetrieren. Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen ist gezeigt worden, dass Enterokokken von Mukosazellen des Dickdarms aufgenommen werden (108). Endgültig gesichert ist dieser Weg allerdings nicht.

Der genaue Weg der Translokation hat in Versuchsansatz und Fragestellung dieser Arbeit letztlich keinen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse. Ob die gezählten Bakterien nun intrazellulär oder an der basalen Seite der Epithelzellschicht im Zellzwischenraum lagen, war hier nicht von Bedeutung. Bakterien, die sich oberhalb der Zellschicht befanden, wurden nachweislich abgetötet. Es wurden also nur Bakterien gezählt, die auf irgendeine Weise die Zellschicht penetriert haben.

Zusammenfassend stehen die oben genannten Faktoren, die eine bakterielle Translokation fördern sollen, größtenteils miteinander in Verbindung. Sie können einzeln oder gemeinsam eine Bakteriämie provozieren. Die Barrierefunktion des Darmes wird mechanisch durch die Darmwand aufrecht erhalten, und bei Störung dieser ist es Bakterien möglich sie zu durchwandern. Des weiteren ist die Immunabwehr für eine ausreichende Abschirmung des

Körpers gegen die Keime des eigenen Darmes verantwortlich. Denn, wie oben erwähnt, es kommt auch durch eine Suppression des Immunsystems, und diese kann durch verschiedenste Ursachen haben, zu einem erhöhten Sepsisrisiko. Zuletzt wird auch in einer Verschiebung im Gleichgewicht der Normalflora des Darmes ein Risikofaktor gesehen (5, 7, 9, 12, 13).

4.2 T84-Zelllinie

Untersuchungen an Tiermodellen geben Grund zur Annahme, dass die Translokation der Enterokokken bevorzugt in Kolon und Caecum stattfindet (105). Darum wurden in den Versuchen Zellen eingesetzt, die den Epithelzellen des Kolons und Caecums möglichst ähnlich sind. Verschiedene aus Adenokarzinomen des menschlichen Intestinaltraktes gezüchtete Zelllinien sind erhältlich (71). Dazu zählen unter anderem Caco-2, HT29 und T84. Caco-2 und HT29 besitzen aufgrund der Expression bestimmter Enzyme (wie z.B. Hydrolase der Caco-2- und Alkalische Phosphatase und Isomaltase der HT29-Zellen) die Eigenschaften fetaler Kolonepithelzellen (71). T84-Zellen, die aus einer Lungenmetastase eines Kolonkarzinoms gewonnen wurden, entsprechen in Morphologie, elektrischen Parametern und Ionentransport-Aktivität adulten Kryptenzellen des Kolons (71). Durch Zugabe von bestimmten Substraten, wie Kollagen oder Fibronectin, bilden T84-Zellen sehr homogene und polarisierte Monolayer, das heißt die apikale Membran weist nach oben (27, 71). Aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit adulten Kryptenzellen des Kolons und der Differenzierungsfähigkeit schienen T84-Zellen für die Versuche und Fragestellung dieser Arbeit am besten geeignet.

Die Zellen wurden für die Versuche auf 96-well-Platten angezüchtet, die mit Kollagen und Fibronectin beschichtet worden waren. Dadurch wurde eine vermehrte Polarisierung und ein besseres Anhaften der Zellen an den Boden der einzelnen Wells erreicht. Die stärkere Haftung vermied das Verlieren von Zellschichten beim Abschütten der Medien auf Eis. Man hätte die Nährmedien auch abpipettieren können, dabei besteht jedoch das Risiko, die Zellschicht mit der Pipettenspitze zu zerstören. Das Abschütten des Mediums ist hier die sicherere Variante, sofern man dabei nicht die ganze Zellschicht verliert. Das

wurde durch die bessere Haftung vermieden. Das Abschütten auf Eis war nötig, um ein Zurückspritzen der Medien zu vermeiden, was wiederum eine potentielle Kontaminationsquelle dargestellt hätte.

Verschiedene Untersucher berichten, dass AS die Adhärenz von *E.faecalis* an extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin, Vitronectin, und Kollagen Typ I vermittelt (48, 86). Da immer auf die vollständige Konfluenz der Zellen geachtet wurde, wurde sichergestellt, dass eventuelle Interaktionen zwischen Enterokokken und Kollagen, bzw. Fibronectin, durch die Barriere der dazwischenliegenden Zellschicht verhindert wurden.

Grundsätzlich muss bei allen Ergebnissen bedacht werden, dass gewisse Abweichungen, auch bei noch so guter Standardisierung und genauer Arbeit, nicht zu vermeiden waren. Mögliche Ursachen hierfür sind ein unterschiedlich schnelles Wachstum der Zellen, auch wenn die Bedingungen die gleichen waren, oder auch schwankende Zahlen der intrazellulär aufgenommenen Bakterien. Hier spielt unter anderem auch das Alter der Zelllinie mit hinein. Je nachdem, wie oft die Kulturen bereits passagiert wurden, das heißt um wie viele Generationen man sie schon weiter gezüchtet hatte, konnte es vorkommen, dass die Zellen etwas langsamer wuchsen. Dieses unterschiedliche Zellwachstum zeigte sich auch in den Versuchen zur Konfluenz unter Antibiotika, hier war zum Teil bereits nach fünf statt nach sieben Tagen eine 100%ige Konfluenz zu sehen. Möglicherweise haben auch äußere Faktoren, wie die Länge der Zeit, welche die Zellen bei Raumtemperatur verarbeitet wurden, oder auch die Luftfeuchtigkeit einen Einfluss auf das Zellleben.

Unter diesen Bedingungen war es schwer, die einzelnen Versuche direkt miteinander zu vergleichen, denn es wurden jedes Mal andere Zellen verwendet. Um innerhalb eines Versuchs einen Vergleich treffen zu können, erstellte man immer eine Vergleichsreihe, zum Beispiel ohne Antibiotika im Nährmedium oder Enterokokken ohne AS oder BS. Zudem wurden die Ergebnisse bei jedem Versuch auch als Anteile der am Anfang auf die Zellen gegebenen Zahl Enterokokken berechnet, hier als „Startinokulum“ bezeichnet. Damit konnten dann die Versuche auch untereinander verglichen werden, unabhängig von der absoluten Zahl der gezählten KBE.

4.3 Translokation in Abhängigkeit von Aggregation Substance und Binding Substance

4.3.1 Vorbereitung mit Ultraschall

Aggregation Substance (AS) und Binding Substance (BS) führen beim Zusammentreffen von Enterokokken zu einer Verklumpungsreaktion (68). Diese Verklumpung führt zu einem erleichterten Austausch von Plasmiden und wird über Pheromone gesteuert (68).

Züchtet man solche verklumpten Keime auf TSA an, dann entstehen große koloniebildende Einheiten (KBE), die nicht aus einem einzelnen Bakterium hervorgegangen sind, wie man unter optimalen Bedingungen erwarten würde. Zählt man die KBE zur Auswertung der Versuche, dann stellte sich diese Methode als ungeeignet heraus, da man nur die Klumpen zählen würde, und somit eine viel kleinere als die eigentliche Menge an Bakterien erhielte. Um die genaue Anzahl der einzelnen Enterokokken zu erfassen, muss sorgfältig darauf geachtet werden, dass eine Einzelzell-Suspension ausplattiert wurde, und keine Bakterienzellaggregate.

Diese Zellaggregate wurden mit Ultraschall gelöst. Gerade bei *E.faecalis* Og1SSp pINY1801 (Phänotyp AS+/BS+), ist eine Vorbereitung mit Ultraschall unverzichtbar. Es zeigte sich als ausreichend, die lysierten T84-Zellen, mit den in ihnen beinhalteten Bakterien, vor dem Ausplattieren auf TSA mit Ultraschall zu behandeln. Das Inokulum, welches zu Versuchsbeginn auf die Zellen gegeben wurde, musste nicht mit Ultraschall behandelt werden, da die nach intrazellulär aufgenommene Zahl Enterokokken nicht anders war, wenn man die Aggregate vorher gelöst hatte. T84-Zellen nahmen die Bakterien in gleicher Zahl auf, egal, ob sie in kleinen Klumpen oder einzeln vorlagen. Angesichts der verglichen mit den anderen signifikant geringeren Translokation von Phänotyp AS+BS+, könnte man auch meinen, dass *E.faecalis* vielleicht einzeln eher von den T84-Zellen aufgenommen wird, als in Klumpen.

10 Sekunden Ultraschall scheinen auszureichen, um die Aggregate zu trennen. Dies ergaben eigene Versuche (siehe Kap. 3.3.1). Diese Zeitangaben sind von der Menge des Materials abhängig, denn kleine Aliquots lösen sich schneller. Dabei muss jedoch darauf geachtet werden, dass die Bakteriensuspensionen

unter längerer Ultraschallbehandlung auch schnell sehr heiß werden können, was eine thermische Schädigung der Bakterien zur Folge hätte. Des Weiteren muss das geschallte Material unbedingt zügig verarbeitet werden, denn innerhalb kürzester Zeit bilden sich die Aggregate neu. Mikroskopisch konnte man dies sofort nach dem Stillstand der Bakteriensuspension beobachten.

4.3.2 Die Rolle von Aggregation Substance und Binding

Substance als Virulenzfaktoren bei der Translokation

Aggregation Substance ist ein Oberflächenmolekül von *E.faecalis*. Es erleichtert die bakterielle Konjugation, bei der Plasmide ausgetauscht werden können. Hierbei sendet ein potentiell Rezeptor-Bakterium Pheromone, also Geruchsbotenstoffe aus, die in einem potentiellen Donor-Bakterium die Expression von Aggregation Substance (AS) induzieren. Binding Substance (BS), die sich ebenfalls an der Oberfläche von *E.faecalis* befindet, führt zusammen mit AS zu einer Zell-Zell-Adhäsion, die Bakterien sinken dann im Reagenzglas sichtbar als kleine Klümpchen nach unten. Die Fähigkeit, AS zu exprimieren wird auf dem Plasmid an das Rezeptor-Bakterium weitergegeben, (21, 69) und wurde in diesen Versuchsreihen durch das rekombinante Plasmid pINY 1801 vermittelt, das zur permanenten Expression von AS führt.

An der Oberfläche von *E.faecalis* finden sich auch andere Strukturen, wie Hämolyisin, Hämagglutinin, Gelatinase und Lipase. Gemeinsam mit AS zählen sie zu den Virulenzfaktoren von *E.faecalis* (18), (37). AS ist jedoch in seiner Bedeutung als Virulenzfaktor von *E.faecalis* umstritten (14, 87).

Enterokokken gehören mit einem Anteil von 10% zu den dritthäufigsten Erregern der bakteriellen Endokarditis (102). Es existiert eine Reihe von Arbeiten, welche die Häufigkeit der Entwicklung einer Endokarditis durch Enterokokken in Abhängigkeit von diesen potentiellen Virulenzfaktoren untersuchen. Hierbei wurde eine vermehrte Entwicklung von Endokarditiden durch AS- und Hämolyisin-positive Enterokokken beim Kaninchen beschrieben (18). Tiere, die mit AS- und Hämolyisin-bildenden Enterokokken infiziert wurden, zeigten eine höhere Letalitätsrate, und das Gewicht der Vegetationen war höher als das von Tieren, die mit Enterokokken ohne AS infiziert wurden. Die ebenfalls am Kaninchen durchgeführte Arbeit von Schlievert et al. (89)

untersuchte die Virulenz von AS und BS für die Ausbildung einer Endokarditis. Dabei wurde den Enterokokken, die beide Oberflächenmoleküle aufwiesen, die höchste Virulenz zugeschrieben, während Enterokokken, die nur AS oder BS besaßen eine mittlere Virulenz zeigten. In Relation zu diesen Bakterien beinahe avirulent, erschienen in dieser Arbeit Stämme, die weder AS noch BS besaßen.

Andere Untersuchungen liefern jedoch Hinweise, dass die Translokation von *E.faecalis* möglicherweise doch unabhängig von diesen beiden Oberflächenmolekülen stattfindet (55). Mäuse, die unterschiedliche Antibiotika mit Enterokokkenlücke erhielten, wurden mit *E.faecalis* gefüttert, die AS und BS, eine der beiden allein, oder keine von beiden Substanzen besaßen. Abhängig von der Oberflächenstrukturen zeigte sich kein Unterschied in der Zahl der translozierten *E.faecalis*. Die Gruppe der mit Antibiotika behandelten Mäuse zeigte allerdings eine deutlich erhöhte Menge translozierter Enterokokken.

Statistische Untersuchungen von Elsner et al. weisen bei Patientenisolaten eine Häufigkeit von 63% AS-positiver Enterokokken in den Blutkulturen nach (37). Von Coque et al. durchgeführte Vergleiche von Enterokokken-Isolaten von Patienten mit Endokarditis oder anderen Infektionen, mit Enterokokken von Gesunden zeigten, dass mehr als 45% sogar weder AS noch Hämolyse oder Gelatinase aufwiesen (23). Man kann hier also nicht von AS als alleinigem Virulenzfaktor ausgehen.

Ein weiteres, unter anderem durch Enterokokken verursachtes Krankheitsbild ist die Peritonitis. Untersuchungen an Mäusen und Ratten zeigten bezüglich dieser Erkrankung keine erhöhte Virulenz für AS positive Stämme (31). Die Mortalität und die Dauer der Infektion unterschieden sich ebenfalls nicht von denen durch *E.faecalis* ohne AS hervorgerufenen, weswegen man hier davon ausgehen kann, dass AS für die Schwere der Infektion möglicherweise nur eine untergeordnete Rolle spielt. Zusammenfassend zeigt sich, dass die Rolle der AS als Virulenzfaktor nur unzureichend geklärt ist und die verschiedenen epidemiologischen und tierexperimentellen Arbeiten zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen kamen.

Unter der Vorstellung der bakteriellen Translokation von *E.faecalis* ausgehend vom Darmlumen in die Blut- oder Lymphbahn, ist es interessant zu wissen, ob AS Einfluss auf die Aufnahme von Enterokokken in die Darmwand hat. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit die Epithelzelle als kleinste Einheit der Darmwand für die Untersuchungen herangezogen. An T84-Zellen, als In-vitro-Modell des Darmepithels, wurde zunächst untersucht, ob sich Unterschiede in der Zahl der translozierten *E.faecalis* zeigten, die in Zusammenhang mit den exprimierten Oberflächenstrukturen stehen. Verwendung fanden Mutanten von *E.faecalis*, die 1) AS und BS an der Oberfläche aufwiesen, 2) BS allein zeigten, 3) AS allein exprimierten, 4) weder AS noch BS an der Oberfläche besaßen, sonst aber genetisch identisch waren.

Die Versuche erbrachten keine Ergebnisse, die darauf hinweisen würden, dass Enterokokken mit AS in größerer Zahl aufgenommen wurden, als andere. Im Gegenteil wurde der Phänotyp AS+BS+ in signifikant geringerem Ausmaß von den T84-Zellen aufgenommen, als die anderen Mutanten. Dieses Ergebnis stellt damit die Bedeutung von AS und BS als Virulenzfaktoren deutlich in Frage. Darum gilt es die Unterschiede dieser zu anderen Arbeiten hervorzuheben, um diese konträren Ergebnisse zu erklären.

In der Mehrzahl der anderen Arbeiten wurden andere Zelllinien verwendet. Möglicherweise ermöglichen andere Eigenschaften der Zellen unterschiedliche Invasionsbedingungen. Hierzu existieren Untersuchungen von Sartingen et al.. Diese Arbeitsgruppe führte ebenfalls Versuche zur Translokation durch (87). Dabei wurden Zellen aus verschiedenen Darmabschnitten verwendet, und in ihren Eigenschaften, bezüglich der Aufnahme von Bakterien in das Zellinnere miteinander verglichen. Zellen, die aus dem Ileum stammen (HCT-8), zeigten keine erhöhte Aufnahme von AS exprimierenden Enterokokken. Aus dem Kolon (HT 29 und T84) und dem Duodenum (Hutu 80) stammende Zelllinien zeigten eine um ein Vielfaches erhöhte intrazelluläre Aufnahme von *E.faecalis*, die AS an der Oberfläche aufweisen. Verschiedene Zelllinien nehmen Enterokokken also in unterschiedlichen Mengen auf. Für T84-Zellen wurde allerdings eine erhöhte Aufnahme von *E.faecalis* mit AS nachgewiesen, was also wieder im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit steht. Somit kann der Unterschied nicht an der verwendeten Zelllinie gelegen haben.

Auch Olmsted et al. erreichten bezüglich des Translokationsverhaltens abhängig von den Oberflächenstrukturen andere Ergebnisse als hier. Auch sie beobachteten an Epithelzellen des Darmes eine verstärkte Invasion durch AS-positive Enterokokken, die sich in ihrem Ausmaß mit der von invasiven Keimen, wie *Salmonella typhimurium* und *Listeria monocytogenes* vergleichen ließ. *E. faecalis* die AS nicht besaßen, wurden in ähnlichen Zahlen wie *Escherichia coli* oder *Proteus mirabilis* vom Darmepithel aufgenommen (73). Isenmann et al. wiesen an einem Ex-vivo-Modell der Kolonmukosa von Ratten ebenfalls eine erhöhte Invasion durch Enterokokken nach, die AS besitzen (49).

Die drei Arbeiten lassen sich mit der vorliegenden recht gut vergleichen, da sie ebenfalls am Zellmodell durchgeführt wurden, und auch im methodische Ablauf zeigten sie untereinander keine zu großen Abweichungen. Der genaue Vergleich zeigt, dass Sartingen et al. ebenfalls T84-Zellen verwendeten, Olmsted et al. setzten in ihren Versuchen HT 29-Zellen ein. Beide Zelllinien ähneln Kolonepithel und nehmen *E. faecalis* in die Zellen auf (87). Bei Isenmann et al. kamen Kolonzellen von Ratten zum Einsatz. Die Inkubationszeit mit AS exprimierenden *E. faecalis* betrug bei Olmsted et al. eine Stunde, bei Sartingen et al. zwei, und bei Isenmann et al. 2,5 Stunden. In dieser Arbeit wurde vier Stunden lang inkubiert. Wie eigene Versuche zeigten, führt eine kürzere Inkubationszeit zu einer gleichmäßig geringeren Zahl intrazellulärer Keime. Dies muss nicht unbedingt für alle Zellen gleichermaßen gelten. Möglicherweise werden durch eine kürzere Inkubationszeit bevorzugt AS-positive *E. faecalis* aufgenommen. Dies ist jedoch nicht erwiesen und hätte auch keinerlei klinische Relevanz, da man im Darm in vivo mit noch viel längeren Inkubationszeiten rechnen muss. Um durch diese längere Inkubationszeit bedingten möglichen Änderungen in den Ergebnissen durch die weiterhin stattfindende Bakterienvermehrung auszuschließen, wurden die Zahlen der intrazellulären Enterokokken in der hier vorliegenden Arbeit auf zwei Arten berechnet und bewertet. Sie wurden zum einen als prozentualer Anteil des Inokulums berechnet, zum anderen als prozentualer Anteil der nach vier Stunden Inkubation im Medium vorhandenen Bakterien. Hierzu waren nach vier Stunden erneut Proben aus den Wells entnommen worden und die KBE bestimmt worden. Die auf diese zwei Arten berechneten Ergebnisse erbrachten

in der statistischen Auswertung kaum Unterschiede. Beide Male konnte gezeigt werden, dass AS und BS exprimierende Stämme in signifikant geringeren Mengen in die Zellen einwanderten als die anderen. Somit ist also eine möglicherweise durch eine längere Inkubationszeit auftretende Fehlerquelle auch ausgeschlossen.

Die Dauer des Killings wurde bei allen mit 2,5 Stunden angegeben. Nur in dieser Arbeit war sie mit insgesamt 110 Minuten kürzer. Dies kann nicht der verantwortliche Faktor sein, denn es fanden in dieser Arbeit bei jedem Versuch Kontrollen statt, die das vollständige Abtöten extrazellulärer Keime bewiesen. Der vielleicht entscheidend unterschiedliche Schritt im Versuchsablauf, der in allen zitierten Arbeiten nicht durchgeführt wurde, sondern nur in der hier vorliegenden, war das auf zwei Etappen durchgeführte Killing. Hierbei wurde zunächst für eine halbe Stunde mit der Ampicillin-Gentamicin-Lösung inkubiert und nachfolgend dreimal gewaschen. Dann folgte das eigentliche Killing mit den selben Antibiotika für weitere 90 Minuten, wonach wieder mehrfach gewaschen wurde. Dies geschah unter der Vorstellung, dass durch die nicht unbeträchtliche Menge Bakterien, die auf den Zellen liegt, die unterste Bakterenschicht eventuell gegen die Wirksamkeit des von oben zugegebenen Antibiotikums abgeschirmt sein könnte. Es sollte erreicht werden, dass erst einmal der oberste Bakterienrasen entfernt würde, und danach die dadurch noch nicht abgeschwemmten, möglicherweise noch adhärenen Enterokokken mit dem eigentlichen Killing abgetötet würden. Möglicherweise ist dies die entscheidende Maßnahme, welche die abweichenden Ergebnisse dieser Arbeit von denen der anderen erklärt.

Setzt man voraus, dass durch einmaliges Killing nur die oberste Schicht der Bakterien, und durch das anschließende Waschen nur die nicht adhärenen Enterokokken von den Zellen entfernt werden, dann bleiben die Keime übrig, die an den Epithelzellen haften. Werden diese nun nach der Lyse mitgezählt, so erhielte man falsch hohe Zahlen für Enterokokken, die an den Zellen haften. Deswegen folgte in dieser Arbeit eine Versuchreihe, die untersuchen sollte, wie sich das Adhärenzverhalten der Enterokokken an T84-Zellen abhängig von der Oberflächenstruktur ändert.

Kreft et al. berichten, dass Enterokokken, die AS besitzen, in vitro eine verstärkte Adhärenz an renalen Tubuluszellen aufweisen (52). Möglicherweise lässt sich dies auch an der Mukosa des Kolons zeigen. Eine Erklärung für die verstärkte Adhärenz wird darin vermutet, dass AS strukturelle Gemeinsamkeiten in der Aminosäuresequenz (RGD-Motiv) mit den Integrinen besitzt. Dies sind Moleküle, welche die Zelladhäsion eukaryoter Zellen vermitteln. Zu ihnen zählt zum Beispiel auch das Fibronectin (40, 52, 73, 89).

Die Ergebnisse unserer Versuche zur Adhärenz der Enterokokken an die Darmwand zeigten mit aller Deutlichkeit, dass die Adhärenz AS-positiver *E. faecalis* (OG1SSp pINY1801 und INY3000 pINY1801) gegenüber der anderer Mutanten massiv höher ist. Noch um ein vielfaches höher war die Zahl der adhärierenden Enterokokken, die sowohl AS, als auch BS (OG1SSp pINY 1801) an der Oberfläche exprimierten. Mutanten mit AS aber ohne BS zeigten verglichen zu Phänotyp AS+BS+ eine geringere Adhärenz. Hier muss doch angenommen werden, dass die Autoaggregation eine erhebliche Rolle bei der Adhärenz spielt. Die schwächste Adhärenz zeigte *E. faecalis* INY3000 pINY1801, der nicht AS aber BS besitzt. Dies lässt vermuten, dass die Präsenz von BS die Adhärenz abschwächt. Eine Erklärung für einen solchen Zusammenhang gibt es derzeit noch nicht.

Diese Ergebnisse geben den Anschein, als sei die Anwesenheit von BS in Kombination mit AS ein multiplizierender Faktor für die Adhärenz. Diesen Schluss zogen auch Schlievert et al., die als eine der wenigen Arbeitsgruppen ebenfalls vier Mutanten von *E. faecalis* untersuchten, unter denen auch eine Mutante enthalten war, die nur AS ohne BS besaß. Somit konnte ein direkter Vergleich zu Phänotyp AS-/BS- gezogen werden. Von Schlievert et al. wurde die Vermutung angestellt, dass nicht AS allein für die Virulenz verantwortlich ist, und unter Umständen sogar die Pathogenität von *E. faecalis* durch die Anwesenheit von AS und BS gemeinsam noch erhöht wird (89). Die meisten anderen Studien zu diesem Thema beschäftigen sich mit zwei oder drei Mutanten, bei denen meistens der Vergleich von AS allein zu AS und BS an der Oberfläche entfällt.

Auch andere Arbeitsgruppen bewerteten AS als ein für die Adhärenz von Enterokokken an das Darmepithel verantwortliches Oberflächenmolekül.

Sartingen et al., die ihre Untersuchungen ebenfalls an T84-Zellen durchführten, kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass AS-positive Stämme verstärkt an die Zellen adhärten. Wie oben bereits erwähnt zeigten sie außerdem eine erhöhte Aufnahme von *E.faecalis* mit AS in die Zelle, nur konnte kein vermehrtes Durchwandern der Zellschicht beobachtet werden.

Der Nachweis einer vermehrten Adhärenz von Enterokokken, die AS besitzen, lässt sich gut mit der Vermutung überein bringen, dass möglicherweise ein einmaliges Killing bei der Untersuchung auf intrazelluläre Keime nicht ausreicht und gegebenenfalls hierdurch auch ein erheblicher Einfluss auf die Ergebnisse entstehen kann. Denn prüft man das Medium nach dem Killing auf Keimfreiheit, so wird die Probe mit möglichst geringem, aber doch sicheren Abstand zur Zellschicht entnommen, um diese nicht zu zerstören. Keime die nun direkt auf den Zellen haften werden dabei nicht erfasst, sondern nur solche, die noch frei im Medium schwimmen. Die adhärenen Bakterien befinden sich in einer im Rahmen o.g. Versuchsabläufe nur schwer erfassbaren Grauzone. Diese potentiell anhaftende Schicht würde also die Zahl vermeintlich intrazellulärer Bakterien vor allem bei Enterokokken erhöhen, die ein Oberflächenmolekül besitzen, das eine vermehrte Adhärenz aufweist, wie zum Beispiel AS. Die Arbeit von Schlievert et al. untermauert diese Vermutung, da sie ebenfalls eine vermehrte Adhärenz nachweist. Somit kann es möglich sein, dass die bisherige Annahme, AS würde zu einer vermehrten Translokation führen, dadurch zustande kam, dass an der Oberfläche adhärenen *E.faecalis* fälschlich mitgezählt wurden. Wurden die adhärenen Enterokokken, welches dann solche mit AS an der Oberfläche sind, im Rahmen des Killings nämlich nicht ausreichend entfernt, dann werden diese als vermeintlich intrazellulär mitgezählt. Es werden also mehr AS-positive Keime gezählt, als tatsächlich intrazellulär zu finden sind, woraus die falsche Schlussfolgerung gezogen werden kann, dass Enterokokken mit AS vermehrt translozieren.

Methodisch bedingt wurden in der vorliegenden Arbeit bei Versuchen zur Adhärenz auch die Enterokokken mitgezählt, die nach intrazellulär gelangt waren. Um diese Zahl klein zu halten wurde die Inkubationszeit mit einer Stunde bewusst kurz gewählt, denn es hatte sich ja in vorangegangenen

Versuch gezeigt, dass die Zahlen der aufgenommenen Enterokokken mit der Länge der Inkubationszeit steigen.

In den Versuchen dieser Arbeit erscheint die Anzahl der in das Epithel eingedrungenen *E.faecalis* ziemlich gering. In vivo kann es sich dabei aber um eine beachtliche Menge translozierter Enterokokken handeln, denn was in vitro mit wenigen cm² Zellkultur untersucht wird, muss auf eine Darmmukosa mit einer Gesamtoberfläche von 200-300 m² übertragen werden. Hinzu kommt, dass *E.faecalis* eigentlich zu den nicht-invasiven Keimen gezählt werden muss. Eine Translokation, wie sie in den Versuchen gezeigt werden konnte, und ist sie auch noch so gering, hat wahrscheinlich für die Situation in vivo doch eine gewisse Relevanz. Vor allem wenn das Immunsystem nicht in der Lage ist, die eingedrungenen Keime abzutöten und sich damit eine initiale Bakteriämie zu einer Sepsis ausweiten kann. Es ist also wichtig, die Entstehungsmechanismen und die Virulenzfaktoren besser zu verstehen. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit zu urteilen, muss die etablierte Ansicht, dass AS als Virulenzfaktor zu werten ist, doch deutlich in Frage gestellt werden.

4.4 Einfluss von Antibiotika Translokation

Untersuchungen an Mäusen zeigten, dass bestimmte Antibiotika zu vermehrter Translokation von *E.faecalis* führen können (30, 54). Möglicherweise führt auch der prophylaktische Einsatz von Antibiotika mit Enterokokkenlücke zur Häufung von Enterokokkensepsis (54, 104).

Um die Integrität der T84-Zellen sicherzustellen, sollten diese von den in dieser Arbeit untersuchten Antibiotika möglichst nicht beeinflusst werden. Als Parameter für eine Schwächung der Zellen wurde ihr Wachstum und Absterben unter verschiedenen konzentrierten Antibiotikallösungen beobachtet, und mit dem gesunder, unbehandelter Zellen verglichen.

Dem Nährmedium für die Zellkultur wurden weder ein Antibiotikum noch ein Antimykotikum zugegeben. Denn nur so konnte gewährleistet werden, dass eventuelle Auswirkungen auch wirklich der untersuchten Substanz zuzuschreiben waren. Zudem sollten die Antibiotika gegen Enterokokken eine primäre Resistenz aufweisen. Es wurden Vertreter verschiedener Gruppen

ausgesucht und in verschiedenen Konzentrationen auf ihre Wirkung gegen Enterokokken getestet.

Zu einer untersuchten Substanz gehört Ciprofloxacin. Hiergegen liegt keine primäre Resistenz vor. Da es aber bei intravenöser Verabreichung in signifikanter Mengen von der Darmmukosa aktiv sezerniert wird (56, 57), erschien es anfangs für die Frage der Störung des Darmepithels sehr interessant. In vivo werden Enterokokken nicht durch Ciprofloxacin beeinträchtigt (56). Die In-vitro-Aktivität gegen *E.faecalis* war aber in den eigenen Versuchen selbst in subinhibitorischen Konzentrationen zu groß, daher konnten die hier angewandten Untersuchungen zur Translokation leider nicht durchgeführt werden.

Imipenem gehört zu der Gruppe der Carbapeneme. Unter einer Therapie mit Imipenem scheint das Risiko der Enterokokkensepsis zu steigen (24). Als anderer Vertreter der Carbapeneme war Meropenem ausgewählt worden, welches aber in den Vorversuchen eine zu starke bakterizide Wirkung auf *E.faecalis* 12030 zeigte, weshalb auf weitere Versuche der hier angewandten Methode verzichtet werden musste.

Zusammenfassend gab es also zwei Einflussgrößen, welche die Wahl der Antibiotika für die Hauptversuche beeinflussten. Zum einen toxische Effekte einer Substanz auf das Wachstum der Zellen (im Falle von Amphotericin B) und zum anderen Wirkung der Antibiotika auch in subinhibitorischen Konzentrationen auf *E.faecalis* 12030, wie sie unter anderem auch bei Ciprofloxacin und Meropenem aufgetreten war.

So wurden Metronidazol und Cefotaxim gewählt, die beide als Risikofaktor für die Entstehung einer Enterokokkensepsis gewertet werden (4, 16, 43, 77, 95, 96), und keinen oder geringen Einfluss auf T84-Zellen und *E.faecalis* 12030 hatten.

Metronidazol wird wegen seiner zuverlässigen Wirkung gegen Anaerobier häufig im klinischen Alltag verwendet (39). Außerdem findet es in systemischer Gabe erfolgreich Verwendung in der Prophylaxe von Wundinfektionen im Rahmen von operativen Eingriffen im Bereich des Kolons (28). Dennoch wird die Metronidazoltherapie zu den Risikofaktoren für die Kolonisation mit

Vancomycin-resistenten Enterokokken gerechnet (61). Metronidazoltherapie kann zu einem übermäßigen Wachstum von Enterokokken in der Darmflora führen. Die Zahl der Anaerobier wird reduziert, konsekutiv können vor allem Enterokokken das Darmlumen überwuchern, und man findet sie, nach Translokation, vermehrt in der Lymphbahn (107). Zudem zeigte sich bei Patienten, die perioperativ, im Rahmen von Hysterektomien, prophylaktisch Metronidazol erhielten, eine Kolonisation der Vagina mit Enterokokken. Der Aufenthalt im Krankenhaus wurde dadurch verlängert, auch konnte die Zahl der postoperativen Infektionen hier nicht gesenkt werden (103).

Warum diese einzelnen Faktoren die Gefahr einer Sepsis erhöhen, ist nicht bekannt. Erstellt man nun eine Verknüpfung der vermeintlichen Ursachen der Sepsistentstehung mit den Risikofaktoren, dann lassen sich hier mehrere Hypothesen bilden. Entweder handelt es sich um eine Beeinflussung des Immunsystems, oder ein verschobenes Gleichgewicht in der Darmflora, aber auch eine Störung der physikalischen, zellulären Barriere der Darmwand ist denkbar. Die Fragestellung für die Untersuchungen dieser Arbeit widmete sich letzterer Theorie, nämlich, ob Antibiotika in der Lage sind, die Permeabilität der Darmwand für Enterokokken zu erhöhen. Die Ergebnisse der Arbeit weisen hierauf hin. Als Zellmodell hierfür wurden T84-Zellen eingesetzt.

In den eigenen Versuchen zeigt Metronidazol weder eine Beeinträchtigung von *E.faecalis* 12030 noch der T84-Zellen in ihrem Wachstum, die Auswahlkriterien zum Einsatz in den Versuchen sind also erfüllt. Die Ergebnisse zeigten, dass Metronidazol keinen Einfluss auf die Translokation von *E.faecalis* 12030 in T84-Zellen hat. Das Darmepithel scheint durch das Antibiotikum nicht beeinträchtigt worden zu sein.

Die Zellen wurden einen Tag vor der Inkubation mit *E.faecalis* 12030 mit verschiedenen Konzentrationen des zu untersuchenden Antibiotikums inkubiert. In diesem Zeitraum wurde erwartet, dass eventuelle Einflüsse der Substanzen auf die Zellschicht zur Wirkung kommen würden. Die dann dazugegebenen Bakterien wurden nach der Inkubation wieder abgewaschen. Sollten nun noch Bakterien an der Zelle anhaften, so wurden diese in einer weiteren Inkubation

mit Ampicillin und Gentamicin abgetötet. Es ist sichergestellt, dass diese Antibiotika nicht in die Zelle eindringen (84, 113). Denn dadurch käme es zu falsch niedrigen Zahlen intrazellulärer Enterokokken. Gentamicin ist gegen *E. faecalis* bedingt wirksam, die Wirkung entfaltet sich nur gemeinsam mit einem Beta-Lactam-Antibiotikum in ausreichender Weise. Deshalb wurde eine kombinierte Gabe von Gentamicin und Ampicillin gegen Enterokokken gewählt (59, 72).

Danach wurde wieder mehrfach gewaschen, abgewaschenes Medium wurde ausplattiert, um sicherzustellen, dass extrazelluläre *E. faecalis* abgetötet waren. Es wurden meist gar keine und wenn, dann nie mehr als 20 KBE/Well nachgewiesen. Dies liegt bezüglich der Zahlen der intrazellulär ermittelten Keimen im Promillebereich, womit ein ausreichendes Killing und Waschen belegt ist. Alle außerhalb der Zelle vorhandenen *E. faecalis* 12030 hätte man mitgezählt und wären von den intrazellulären nicht zu unterscheiden gewesen. Darum war es wichtig, bei jedem Versuch zu kontrollieren, ob das Medium vor der Zelllyse möglichst frei von Enterokokken war.

Die Zahl der intrazellulären Enterokokken wurde zusätzlich in Prozent der Gesamtzahl der am Anfang mit dem Inokulum zugegebener *E. faecalis* 12030 berechnet. Diese Zahlen geben dann die intrazelluläre Bakterianreicherung unabhängig von der Gesamtzahl der Bakterien im Medium wieder. Dadurch waren die einzelnen Versuche bei unterschiedlichen Zahlen KBE im Inokulum besser zu vergleichen.

Mit Metronidazol behandelte Zellen zeigten, verglichen zu solchen, die kein Antibiotikum im Medium hatten, keinen Unterschied in der Zahl der aufgenommenen Bakterien. Obwohl einige Daten darauf hinweisen, dass die Translokation von Enterokokken in vivo unter Metronidazoltherapie ansteigt (107), konnte dies in vitro nicht nachvollzogen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich selbstverständlich nicht direkt auf die Verhältnisse in vivo übertragen. Metronidazol kann damit nicht als Risikofaktor widerlegt werden, genauso wenig wie eine Bestätigung hierfür möglich ist. Allerdings zeigten sich keine Auffälligkeiten, die auf eine Veränderung der Darmwand auf zellulärer Ebene hinweisen.

Die Therapie mit Cephalosporinen der 2. und 3. Generation gilt ebenso als Risikofaktor für die Entwicklung einer Enterokokkensepsis (16, 77). Das Wirkspektrum der Cephalosporine ist zwar sehr breit, erstreckt sich aber nicht auf Enterokokken. Die Therapie mit diesen Substanzen kann zu einer konsekutiven Überwucherung mit Enterokokken führen (32, 33). Als Beispiel für ein Cephalosporin der dritten Generation wurde Cefotaxim ausgesucht, und wie Metronidazol auf die Fragestellung hin untersucht, ob es Auswirkungen auf die Zellen des Darmepithels in der Aufnahme von *E.faecalis* 12030 zeigt.

Cefotaxim wurde verwendet, obwohl in den beschriebenen Vorversuchen eine geringgradige Wirksamkeit gegen *E.faecalis* 12030 nachgewiesen wurde. Es war entgegen der Erwartungen in vitro eine Beeinträchtigung des Wachstums der Enterokokken beobachtet worden. Diese Wachstumshemmung wurde unter allen verwendeten Konzentrationen festgestellt. Hoch konzentrierte Antibiotika können zelltoxisch wirken, ohne dass dies auf einem spezifisch antibiotischen Effekt beruht. Doch hier wurde diese Wirkung bis zu einer Konzentration von 0,1µg/ml unter Cefotaxim und Cefoxitin beobachtet. Eine Erklärung für die geringe wachstumshemmende Wirkung von Cefotaxim und Cefoxitin, die auch unter niedrigen Konzentrationen beobachtet wurde, konnte nicht gefunden werden. Man kann vermuten, dass die Wirksamkeit von Antibiotika durch äußere Faktoren in vitro beeinflusst werden können. Exogen zugegebenes NaCl beispielsweise, scheint die Resistenz von *E.faecalis* gegen Cefotaxim zu erhöhen (63). Möglicherweise spielen auch in dieser Arbeit exogene, nicht bekannte Faktoren hinein, welche die Empfindlichkeit gegen Cefotaxim erhöhen.

Es konnte gezeigt werden, dass T84-Zellen die mit Cefotaxim vorbehandelt wurden, signifikant weniger Enterokokken aufnahmen, als Zellen ohne Antibiotikum im Nährmedium. Dies zeigt einen Einfluss des Antibiotikums auf die T84-Zellen.

Die Vorversuche erbrachten, dass Cefotaxim auch in subinhibitorischen Konzentrationen eine geringe Wirkung auf *E.faecalis* zeigte. Die Versuche zur Translokation ergaben sinkende Zahlen intrazellulärer Enterokokken mit steigender Konzentration von Cefotaxim. Dieses Ergebnis lässt sich nicht der Toxizität zuschreiben, denn die intrazellulären Enterokokken wurden als

prozentualer Anteil der gesamten Bakterienzahl im Medium berechnet. Damit sind die Werte unabhängig davon, ob die Gesamtzahl der Enterokokken nun steigt oder fällt.

Vor den Versuchen wurde die Konfluenz der T84-Zellschichten nochmals beurteilt, und diese war immer bei 100%, was nur gesunde Zellen erreichen. Eine unvollständige Konfluenz galt als Ausschlusskriterium für die Verwendung der Zellen.

Es konnte klar gezeigt werden, dass antibiotische Substanzen einen Einfluss auf die Interaktion von Enterokokken mit Darmepithelien haben. Cefotaxim veränderte dosisabhängig signifikant die Aufnahme von Enterokokken in T84-Zellen, Metronidazol dagegen zeigte keinen Einfluss.

Es sind nicht nur Verschiebungen im Gleichgewicht der Darmflora oder Immunsuppression, die zu einer vermehrten Translokation von Enterokokken führen können, sondern auch Einschränkungen der Barrierefunktion der Darmwand. Dies lässt sich von den hier gewonnenen Ergebnissen untermauern, auch wenn sich nur Aussagen über die Funktion auf zellulärer Ebene machen lassen. Die Aufnahme von Enterokokken in die Mucosazelle kann durch äußere Einflüsse verändert werden. Im Gegensatz zu Zellen, die Metronidazol oder gar kein Antibiotikum erhielten, zeigte sich in T84-Zellen, die mit Cefotaxim vorbehandelt worden waren, eine geringere Translokation von *E.faecalis* 12030. Die Aufnahme von Erregern scheint eine normale, physiologische Funktion der Enterozyten zu sein, die möglicherweise mit einer Antigenpräsentation gekoppelt ist, und damit die Immunabwehr unterstützt (110). Eine reduzierte Keimaufnahme könnte als ein pathologisches Zeichen gewertet werden, das hier durch den Kontakt mit einem bestimmten Antibiotikum hervorgerufen wurde. Möglicherweise kann dieser Mechanismus auf zellulärer Ebene eine Erklärung dafür geben, dass Cephalosporine der dritten Generation als Risikofaktoren für die Enterokokkensepsis gelten (16). Anhand der Daten dieser Arbeit ist gezeigt worden, dass sich die Einflüsse von Antibiotika auf die bakterielle Translokation nicht nur auf die Verschiebung der intestinalen Flora beschränken, sondern auch die Interaktion der Enterokokken mit den Epithelzellen verändern.

4.5 Ausblick

Enterokokken gehören zur natürlichen Bakterienflora des menschlichen Darmes. Trotzdem können sie schwere Infektionen, zum Beispiel in Form einer Sepsis, hervorrufen, die häufig letal endeten. Man darf nicht außer Acht lassen, dass bereits Stämme mit zunehmender Multiresistenz existieren, unter anderem gegen Vancomycin, wodurch die Behandlung einer Infektion durch Enterokokken massiv erschwert wird, und gerade im Falle einer Sepsis den Krankheitsverlauf doch entscheidend beeinflussen kann. Wichtig ist es, die Risiken zu kennen, die den Weg der Bakterien in die Blutbahn erleichtern, denn nur dann ist eine suffiziente Prävention möglich. In der Arbeit wurde gezeigt, dass Enterokokken unter experimentellen Bedingungen in Darmepithelzellen translozieren und dass Antibiotika die Aufnahme von Enterokokken in T84-Zellen modulieren können. Dies zeigte sich in unterschiedlichem Wachstumsverhalten abhängig von der Substanz mit der sie vorher in Kontakt kamen, und sie wiesen ein verändertes Verhalten in der Aufnahme von *E.faecalis* auf, wurden sie vorher mit Cefotaxim behandelt. Es stellt sich die Frage, ob Antibiotika auch einen Einfluss auf die Darmwand in vivo haben und mit einer antibiotischen Therapie eventuell die Entstehung einer Sepsis forciert werden kann.

Der andere Ansatzpunkt dieser Arbeit sind Oberflächenstrukturen von *E.faecalis*, welche nach verschiedenen Studienergebnissen die Invasion von Enterokokken in Darmzellen erleichtern sollen. Dies konnte in dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden, im Gegenteil, es ließ sich ein signifikant entgegengesetzter Effekt zeigen. AS erhöht zwar die Adhärenz an Darmepithelien, nicht aber die Translokation von Enterokokken in die Zelle. Es ließ sich sogar eine signifikant niedrigere Zahl intrazellulärer Enterokokken nachweisen, die AS und BS an der Oberfläche exprimieren, verglichen zu den anderen Phänotypen. Dies lässt jedoch noch keine Aussage über die Virulenz der Erreger zu. Ein möglicher Erklärungsansatz für das häufigere Auffinden von AS-positiven Stämmen in Patientenisolaten (22) ist vielleicht die

Beobachtung, dass *E.faecalis* mit AS an der Oberfläche resistenter gegen die Abtötung durch humane Neutrophile sind als andere Enterokokken (83). Möglicherweise sind aufwendigere und genauere Untersuchungen notwendig, um diesen Sachverhalt vollständig zu klären. Ein denkbare Beispiel dafür wäre die Elektronenmikroskopie, wodurch die exakte Bestimmung der intrazellulären Bakterienzahl ermöglicht wäre, und gegebenenfalls sogar die Mechanismen der Translokation genauer zu eruieren sind.

Auffallend im Rahmen dieser Untersuchungen war die Diskrepanz zwischen der durch AS zwar verstärkten Adhärenz an T84-Zellen, aber trotzdem nachgewiesenen verminderten Translokation von Phänotyp AS+BS+. Auch die vorherige Trennung der Enterokokkenkonglomerate durch Ultraschall hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Translokation. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die verminderte Aufnahme nicht damit zusammenhängt, dass diese Mutante in Konglomeraten vorlag und nicht einzeln wie die anderen Phänotypen.

Eine verminderte Aufnahme von Phänotyp AS+BS+ muss nicht unbedingt auf eine geringere Virulenz hinweisen. Denn wie bereits erwähnt gehört die Aufnahme von Bakterien in die Zelle zur physiologischen Funktion des Darmepithels (110). Eine verminderte Aufnahme kann als ein pathologisches Zeichen gewertet werden. Somit muss AS durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht in seiner Rolle als Virulenzfaktor angezweifelt werden.

Angesichts der zunehmenden klinischen Bedeutung von *E.faecalis* und der zunehmend nachweisbaren Resistenz gegen Vancomycin, besteht die Chance vor allem in der bewussten und gezielten Vermeidung von Infektionen durch Enterokokken, wenn die therapeutischen Möglichkeiten zunehmend schlechter werden. Hier kann ein noch besseres Verständnis der Pathogenese von Enterokokken-Bakteriämien und ihrer Einflussfaktoren – wie es in ausgewählten Aspekten in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde – in Zukunft hoffentlich wertvolle Beiträge leisten.

5 Zusammenfassung

Enterococcus faecalis ist ein Bestandteil der residenten Flora des Darmes. Er ist als Erreger schwerer nosokomialer Infektionen bekannt, unter anderem ist er für bis zu 17% der Sepsisfälle verantwortlich, mit häufig letalem Ausgang.

Man vermutet verschiedene Wege, wie die Enterokokken in die Blutbahn gelangen, z. B. über Kontamination von Wunden oder von zentralen Venenzugängen. Es sind aber auch endogene Infektionswege denkbar, indem sie unter bestimmten Voraussetzungen die Darmwand penetrieren und somit in die Lymph- und Blutbahnen gelangen. Mit letzterem Weg, der bakteriellen Translokation, beschäftigt sich diese Arbeit in einem In-vitro-Modell.

Zu einem möglichen Virulenzfaktor von *E.faecalis* wird die Aggregation Substance (AS) gezählt, ein Oberflächenmolekül, das gemeinsam mit Binding Substance (BS) zu einer Verklumpungsreaktion führt, wodurch den Bakterien der Austausch von Plasmiden erleichtert wird. AS soll die Adhäsion an Epithelzellen steigern und ebenso die Invasion in humane Epithelzellen erleichtern. Bezüglich der Translokation ergaben sich in verschiedenen Studien unterschiedliche Ergebnisse.

Die Translokation von Enterokokken scheint vor allem im Dickdarm statt zu finden, daher fanden Kulturen der T84-Zelllinie Verwendung, die mit ihren Eigenschaften denen des Kolonepithels sehr ähnlich sind.

Es wurde untersucht, in welcher Zahl Enterokokken abhängig von ihrer Oberflächenstruktur von T84-Zellen aufgenommen werden, und ob sie eine unterschiedliche Adhärenz an die Zellen zeigen. Man verwendete vier verschiedene Mutanten von *E.faecalis*, die durch gentechnische Manipulation dahingehend verändert sind, dass sie entweder ausschließlich AS (INY3000 pINY1801) oder BS (OG1 SSp pWM401) an der Oberfläche exprimierten, oder beide zusammen (OG1 SSp pINY1801), oder gar keine dieser Strukturen (INY3000 pWM401).

Die Zellen wurden bei den Versuchen zur Translokation vier Stunden, bei Untersuchungen zur Adhärenz eine Stunde mit den jeweils unterschiedlichen Enterokokkenmutanten inkubiert. Die Ergebnisse zeigten eine signifikant erhöhte Adhärenz für Enterokokken, die AS besitzen ($p < 0,001$).

Die Translokation von Enterokokken des Phänotyps AS+BS+ in T84-Zellen zeigte sich in dieser Arbeit sogar signifikant reduziert ($p < 0,0001$) verglichen zur Aufnahme der anderen Phänotypen. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Methodisch wurde in den Versuchen dieser Arbeit etwas anders vorgegangen als in denen der anderen Arbeitsgruppen, wodurch diese Abweichung erklärt werden könnten. Die vermehrte Adhärenz durch AS-positive Enterokokken an T84-Zellen könnte zu einem unvollständigen Abtöten der extrazellulären Bakterien und so zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit dadurch vermieden, dass zunächst eine kürzere Inkubation mit Ampicillin und Gentamicin vorgenommen wurde gefolgt von mehrmaligem „Waschen“. Dann erst fand das eigentliche Killing der extrazellulären Enterokokken statt, bei dem die gleichen antibiotischen Substanzen mit einer längeren Inkubationszeit verwendet wurden.

Die Rolle von AS bleibt also weiterhin unklar. Anhand der Daten dieser Arbeit zeigen sich, zumindest an der Zellkultur, keine Hinweise auf eine verstärkte Translokation von *E.faecalis* die AS exprimieren, sondern im Gegenteil, eine signifikante Reduktion der Aufnahme dieser Bakterien.

Vor dem Hintergrund, dass man verschiedenen Antibiotika eine Rolle als Risikofaktor für die Entstehung einer Enterokokkensepsis zuschreibt, wurden einige antibiotisch wirkende Substanzen, die auch im klinischen Alltag häufig Verwendung finden, auf ihren Einfluss auf die Translokation von *E.faecalis* 12030 in T84-Zellen untersucht.

Dazu sollte eine Resistenz der Keime gegenüber der antibiotischen Substanz bestehen. Verwendung fanden zunächst Metronidazol, Ceftriaxon, Cefoxitin, Cefotaxim, Amphotericin B, Ciprofloxacin und Meropenem. Die Substanzen wurden aufgrund ihrer häufigen Verwendung im klinischen Alltag gewählt, und weil sie bereits als Risikofaktoren für die Entstehung einer Enterokokkensepsis beschrieben wurden. Unter Amphotericin B, Ciprofloxacin und Meropenem war das Wachstum von *E.faecalis* 12030 selbst in subinhibitorischen Konzentrationen in vitro stark beeinträchtigt, so dass man deshalb auf die Verwendung dieser Substanzen in weiteren Versuchen verzichten musste.

Normalerweise besteht bei Enterokokken gegenüber Cephalosporinen eine natürliche Resistenz, trotzdem zeigte sich *in vitro* eine geringe Beeinträchtigung von *E.faecalis* 12030 durch Cefoxitin und Cefotaxim.

Außerdem wurde das Wachstumsverhalten von T84-Zellen unter Metronidazol, Cefotaxim, Cefoxitin, Ceftriaxon und Amphotericin B über sieben Tage beobachtet. Unter Amphotericin B kam es sogar zu einem Absterben der Zellen, wohingegen die anderen Substanzen keinen oder nur sehr geringen Einfluss hatten. Deswegen fand Amphotericin B keine weitere Anwendung in den weiteren Versuchen.

Im nächsten Schritt sollte die Translokation unter dem Einfluss von Antibiotika konzentrationsabhängig untersucht werden. Dazu wurde den Zellkulturmedien jeweils ein Antibiotikum in verschiedener Konzentration dazugegeben, und am nächsten Tag mit *E.faecalis* für vier Stunden inkubiert. Man wählte Metronidazol und Cefotaxim, die zum Medium gegeben wurden. Die Zellkulturen, denen Metronidazol zugegeben wurde, nahmen gleich viele *E.faecalis* 12030 auf, wie solche, die mit keinem Antibiotikum in Verbindung gebracht wurden. Die Zellen, denen Cefotaxim ins Medium gegeben wurde, zeigten eine signifikant reduzierte Aufnahme von Enterokokken. Ein Einfluss von Cefotaxim auf T84-Zellen in ihrer Interaktion mit Enterokokken konnte hier eindeutig nachgewiesen werden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass sowohl exogene Faktoren, in diesem Fall die Zugabe von Cefotaxim, als auch endogene Faktoren – Phänotyp AS+BS+ – eine reduzierte Aufnahme von *E.faecalis* in T84-Zellen bewirkten. Da es zu den physiologischen Funktionen der Enterozyten im Rahmen der Immunabwehr gehört, Bakterien aufzunehmen, mit konsekutiver apoptotischer Abschilferung der Epithelzellen, könnte die geringere Aufnahme allerdings auch als Pathogenitätsmerkmal interpretiert werden.

Zusammenfassend konnte die Translokation von Enterokokken in Darmepithelzellen in unserem In-Vitro-Modell gut reproduzierbar nachvollzogen werden. Darüber hinaus zeigte sich, dass das Ausmaß der Translokation sowohl bakterieneigene Faktoren (hier: Aggregationssubstanz), als auch exogene Faktoren – am Beispiel des Drittgenerationscephalosporins Cefotaxim – einen modulierenden Einfluss haben.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

1. **Alverdy JC, Aoys E, Moss GS** . 1988. Total parenteral nutrition promotes bacterial translocation from the gut. *Surgery* **104**:185-190.
2. **Baker, J. W., E. A. Deitch, M. Li, R. D. Berg, R. D. Specian.** 1988. Hemorrhagic shock induces bacterial translocation from the gut. *J.Trauma* **28**:896-906.
3. **Berg, R. D.** 1980. Inhibition of *Escherichia coli* translocation from the gastrointestinal tract by normal cecal flora in gnotobiotic or antibiotic-decontaminated mice. *Infect.Immun.* **29**:1073-1081.
4. **Berg, R. D.** 1981. Promotion of the translocation of enteric bacteria from the gastrointestinal tracts of mice by oral treatment with penicillin, clindamycin, or metronidazole. *Infect.Immun.* **33**:854-861.
5. **Berg, R. D.** 1985. Bacterial translocation from the intestines. *Jikken Dobutsu* **34**:1-16.
6. **Berg, R. D.** 1992. Translocation of enteric bacteria in health and disease. *Curr.Stud.Hematol.Blood Transfus.* 44-65.
7. **Berg, R. D.** 1995. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol.* **3**:149-154.
8. **Berg, R. D.** 1995. Inhibition of bacterial translocation from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes in specific pathogen-free mice but not gnotobiotic mice by non-specific macrophage activation. *Adv.Exp.Med.Biol.* **371A:447-52**.:447-452.
9. **Berg, R. D.** 1999. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv.Exp.Med.Biol.* **473:11-30**.:11-30.

10. **Berg, R. D., A. W. Garlington.** 1979. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect.Immun.* **23**:403-411.
11. **Berg, R. D., W. E. Owens.** 1979. Inhibition of translocation of viable *Escherichia coli* from the gastrointestinal tract of mice by bacterial antagonism. *Infect.Immun.* **25**:820-827.
12. **Berg, R. D., E. Wommack, E. A. Deitch.** 1988. Immunosuppression and intestinal bacterial overgrowth synergistically promote bacterial translocation. *Arch.Surg.* **123**:1359-1364.
13. **Berg, R.** 1983. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract of mice receiving immunosuppressive chemotherapeutic agents. *Curr.Microbiol.* **8**:285-292.
14. **Berti, M., G. Candiani, A. Kaufhold, A. Muscholl, R. Wirth.** 1998. Does aggregation substance of *Enterococcus faecalis* contribute to development of endocarditis? *Infection* **26**:48-53.
15. **Bone, R. C., C. J. Fisher, Jr., T. P. Clemmer, G. J. Slotman, C. A. Metz, R. A. Balk.** 1989. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med.* **17**:389-393.
16. **Caballero-Granado, F. J., B. Becerril, J. M. Cisneros, L. Cuberos, I. Moreno, J. Pachon.** 2001. Case-control study of risk factors for the development of enterococcal bacteremia. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* **20**:83-90.
17. **Caballero-Granado, F. J., B. Becerril, L. Cuberos, M. Bernabeu, J. M. Cisneros, J. Pachon.** 2001. Attributable mortality rate and duration of hospital stay associated with enterococcal bacteremia. *Clin.Infect.Dis.* **32**:587-594.

18. **Chow, J. W., L. A. Thal, M. B. Perri, J. A. Vazquez, S. M. Donabedian, D. B. Clewell, M. J. Zervos.** 1993. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:2474-2477.
19. **Clark, M. A., M. A. Jepson.** 2003. Intestinal M cells and their role in bacterial infection. *Int J. Med. Microbiol.* **293**:17-39.
20. **Clark, M. A., M. A. Jepson.** 2003. Intestinal M cells and their role in bacterial infection. *Int J. Med. Microbiol.* **293**:17-39.
21. **Clewell, D. B., K. E. Weaver.** 1989. Sex pheromones and plasmid transfer in *Enterococcus faecalis*. *Plasmid* **21**:175-184.
22. **Coque, T. M., J. E. Patterson, J. M. Steckelberg, B. E. Murray.** 1995. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *J. Infect. Dis.* **171**:1223-1229.
23. **Coque, T. M., J. F. Tomayko, S. C. Ricke, P. C. Okhyusen, B. E. Murray.** 1996. Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2605-2609.
24. **Davis, D. R., J. B. McAlpine, C. J. Pazoles, M. K. Talbot, E. A. Alder, C. White, B. M. Jonas, B. E. Murray, G. M. Weinstock, B. L. Rogers.** 2001. *Enterococcus faecalis* multi-drug resistance transporters: application for antibiotic discovery. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**:179-184.
25. **Deitch, E. A., R. D. Berg.** 1987. Endotoxin but not malnutrition promotes bacterial translocation of the gut flora in burned mice. *J. Trauma* **27**:161-166.

26. **Deitch, E. A., L. Ma, W. J. Ma, M. B. Grisham, D. N. Granger, R. D. Specian, R. D. Berg.** 1989. Inhibition of endotoxin-induced bacterial translocation in mice. *J.Clin.Invest* **84**:36-42.
27. **Dharmasathaphorn, K., J. A. McRoberts, K. G. Mandel, L. D. Tisdale, H. Masui.** 1984. A human colonic tumor cell line that maintains vectorial electrolyte transport. *Am.J.Physiol* **246**:G204-G208.
28. **Dion, Y. M., G. K. Richards, J. J. Prentis, E. J. Hinchey.** 1980. The influence of oral versus parenteral preoperative metronidazole on sepsis following colon surgery. *Ann.Surg.* **192**:221-226.
29. **Dougherty S.H., Flohr A.B., Simmons R.L.** 1983. "Breakthrough" enterococcal septcemia in surgical patients: 19 cases and a reiew of the literature. *Arch.Surg.* **118**:232-237.
30. **Dougherty, S. H., D. J. Hentges, S. W. Casey, W. R. Thal.** 1988. Impact of LY146032 on Streptococcus (Enterococcus) faecalis translocation in mice. *Antimicrob.Agents Chemother.* **32**:337-340.
31. **Dupont, H., P. Montravers, J. Mohler, C. Carbon.** 1998. Disparate findings on the role of virulence factors of Enterococcus faecalis in mouse and rat models of peritonitis. *Infect.Immun.* **66**:2570-2575.
32. **Edlund, C., L. Barkholt, B. Olsson-Liljequist, C. E. Nord.** 1997. Effect of vancomycin on intestinal flora of patients who previously received antimicrobial therapy. *Clin.Infect.Dis.* **25**:729-732.
33. **Edlund, C., C. E. Nord.** 2000. Effect on the human normal microflora of oral antibiotics for treatment of urinary tract infections. *J.Antimicrob.Chemother.* **46 Suppl A:41-48**.:41-48.
34. **Edmond, M. B., J. F. Ober, J. D. Dawson, D. L. Weinbaum, R. P. Wenzel.** 1996. Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: natural history and attributable mortality. *Clin.Infect.Dis.* **23**:1234-1239.

35. **Edmond, M. B., J. F. Ober, D. L. Weinbaum, M. A. Pfaller, T. Hwang, M. D. Sanford, R. P. Wenzel.** 1995. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia: risk factors for infection. *Clin.Infect.Dis.* **20**:1126-1133.
36. **Edmond, M. B., S. E. Wallace, D. K. McClish, M. A. Pfaller, R. N. Jones, R. P. Wenzel.** 1999. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin.Infect.Dis.* **29**:239-244.
37. **Elsner, H. A., I. Sobottka, D. Mack, M. Claussen, R. Laufs, R. Wirth.** 2000. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* **19**:39-42.
38. **Feltis, B. A., A. S. Kim, K. M. Kinneberg, D. L. Lyerly, T. D. Wilkins, S. L. Erlandsen, C. L. Wells.** 1999. *Clostridium difficile* toxins may augment bacterial penetration of intestinal epithelium. *Arch.Surg.* **134**:1235-1241.
39. **Freeman, C. D., N. E. Klutman, K. C. Lamp.** 1997. Metronidazole. A therapeutic review and update. *Drugs* **54**:679-708.
40. **Galli, D., R. Wirth, G. Wanner.** 1989. Identification of aggregation substances of *Enterococcus faecalis* cells after induction by sex pheromones. An immunological and ultrastructural investigation. *Arch.Microbiol.* **151**:486-490.
41. **Gentry-Weeks, C. R., R. Karkhoff-Schweizer, A. Pikis, M. Estay, J. M. Keith.** 1999. Survival of *Enterococcus faecalis* in mouse peritoneal macrophages. *Infect.Immun.* **67**:2160-2165.
42. **Gold, H. S.** 2001. Vancomycin-resistant enterococci: mechanisms and clinical observations. *Clin.Infect.Dis.* **33**:210-219.
43. **Graninger, W., R. Ragette.** 1992. Nosocomial bacteremia due to *Enterococcus faecalis* without endocarditis. *Clin.Infect.Dis.* **15**:49-57.

44. **Howerton, E. E., S. N. Kolmen.** 1972. The intestinal tract as a portal of entry of *Pseudomonas* in burned rats. *J.Trauma* **12**:335-340.
45. **Huebner J, Y. Wang, W. A. Krüger, L. C. Madoff, G. Martirosian, S.Boisot, D.A. Goldmann, D.L. Kasper, A. O. Tzianabos, G. B. Pier.** 1999. Isolation and chemical characterization of a capsular polysaccharide antigen shared by clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun.* **67(3)**:1213-1219.
46. **Huebner, J., A. Quaas, W. A. Krueger, D. Goldmann, G. B. Pier.** 2000. Prophylactic and therapeutetic efficacy of antibodies to a capsular polysaccharide shared among vancomycin-sensitive and -resistant enterococci. *Infect Immun.* **68**:4631-4636.
47. **Huycke, M. M., D. F. Sahn, M. S. Gilmore.** 1998. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg.Infect.Dis.* **4** :239-249.
48. **Isenmann, R., M. Schwarz, E. Rozdzinski, C. Christ, E. Schmidt, P. Augat, R. Marre, H. G. Beger.** 2002. Interaction of fibronectin and aggregation substance promotes adherence of *Enterococcus faecalis* to human colon. *Dig.Dis.Sci.* **47**:462-468.
49. **Isenmann, R., M. Schwarz, E. Rozdzinski, R. Marre, H. G. Beger.** 2000. Aggregation substance promotes colonic mucosal invasion of *Enterococcus faecalis* in an ex vivo model. *J.Surg.Res.* **89**:132-138.
50. **Jett, B. D., H. G. Jensen, R. E. Nordquist, M. S. Gilmore.** 1992. Contribution of the pAD1-encoded cytolysin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect.Immun.* **60**:2445-2452.
51. **Kerneis, S., A. Bogdanova, J. P. Kraehenbuhl, E. Pringault.** 1997. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science* **277**:949-952.

52. **Kreft, B., R. Marre, U. Schramm, R. Wirth.** 1992. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect.Immun.* **60**:25-30.
53. **Kreutz, C.** 1994. Adherence properties of *Bacteroides vulgatus*, the preponderant colonic organism of adult humans. *Zentralbl.Bakteriol.* **281**:225-234.
54. **Krueger, W. A., J. Huebner, D. Goldmann, G. B. Pier.** 1999. Testing the Pathogenetic Role of Antibiotics and Enterococcal Virulence Factors in a Mouse Model of Extra-Intestinal Translocation. *Intensive Care Medicine*, 12th Annual Congress **25**:536.
55. **Krueger, W. A., S. Krueger-Rameck, S. Koch, V. Carey, G. B. Pier, J. Huebner.** 2004. Assessment of the role of antibiotics and enterococcal virulence factors in a mouse model of extraintestinal translocation. *Crit Care Med.* **32**:467-471.
56. **Krueger, W. A., G. Ruckdeschel, K. Unertl.** 1997. Influence of intravenously administered ciprofloxacin on aerobic intestinal microflora and fecal drug levels when administered simultaneously with sucralfate. *Antimicrob.Agents Chemother.* **41**:1725-1730.
57. **Krueger, W. A., G. Ruckdeschel, K. Unertl.** 1999. Elimination of fecal Enterobacteriaceae by intravenous ciprofloxacin is not inhibited by concomitant sucralfate--a microbiological and pharmacokinetic study in patients. *Infection* **27**:335-340.
58. **Landry, S. L., D. L. Kaiser, R. P. Wenzel.** 1989. Hospital stay and mortality attributed to nosocomial enterococcal bacteremia: a controlled study. *Am.J.Infect.Control* **17**:323-329.
59. **Lefort, A., M. Arthur, L. Garry, C. Carbon, P. Courvalin, B. Fantin.** 2000. Bactericidal activity of gentamicin against *Enterococcus faecalis* in vitro and in vivo. *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**:2077-2080.

60. **Low, D. E., N. Keller, A. Barth, R. N. Jones.** 2001. Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of enterococci: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin.Infect.Dis.* **32 Suppl 2:S133-45.**:S133-S145.
61. **MacIntyre, C. R., M. Empson, C. Boardman, D. Sindhusake, J. Lokan, G. V. Brown.** 2001. Risk factors for colonization with vancomycin-resistant enterococci in a Melbourne hospital. *Infect.Control Hosp.Epidemiol.* **22**:624-629.
62. **Maejima, K., E. A. Deitch, R. D. Berg.** 1984. Bacterial translocation from the gastrointestinal tracts of rats receiving thermal injury. *Infect.Immun.* **43**:6-10.
63. **Mainardi, J. L., D. Billot-Klein, A. Coutrot, R. Legrand, B. Schoot, L. Gutmann.** 1998. Resistance to cefotaxime and peptidoglycan composition in *Enterococcus faecalis* are influenced by exogenous sodium chloride. *Microbiology* **144**:2679-2685.
64. **Mainous, M. R., P. Tso, R. D. Berg, E. A. Deitch.** 1991. Studies of the route, magnitude, and time course of bacterial translocation in a model of systemic inflammation. *Arch.Surg.* **126**:33-37.
65. **McDonald T.T., Carter P.B.** 1980. Cell-mediated immunity to intestinal infection. *Infect.Immun.* **28**:516-523.
66. **Melo Maltos, S. M., A. P. Ribeiro Sobrinho, F. V. Silva, J. R. Nicoli, M. A. Roque de Carvalho, L. Q. Vieira, F. L. de Macedo.** 2003. Bacterial concentrations determine the ability to implant in the root canal system and translocate to lymph nodes in germ-free mice. *J.Endod.* **29**:24-27.
67. **Miyazaki, S., T. Fujikawa, I. Kobayashi, T. Matsumoto, K. Tateda, K. Yamaguchi.** 2001. Development of systemic bacteraemia after oral inoculation of vancomycin-resistant enterococci in mice. *J.Med.Microbiol.* **50**:695-701.

68. **Murray, B. E.** 1990. The life and times of the Enterococcus. *Clin.Microbiol.Rev.* **3**:46-65.
69. **Murray, B. E.** 1998. Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerg.Infect.Dis.* **4**:37-47.
70. **Murray, B. E.** 2000. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N.Engl.J.Med.* **342**:710-721.
71. **Neutra, M., D. Louvard.** 1989. Differentiation Of Intestinal Cells In Vitro. *Functional Epithelial Cells In Culture* 363-398.
72. **Noskin, G. A., M. Till, B. K. Patterson, J. T. Clarke, J. R. Warren.** 1991. High-level gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis* bacteremia. *J.Infect.Dis.* **164**:1212-1215.
73. **Olmsted, S. B., G. M. Dunny, S. L. Erlandsen, C. L. Wells.** 1994. A plasmid-encoded surface protein on *Enterococcus faecalis* augments its internalization by cultured intestinal epithelial cells. *J.Infect.Dis.* **170**:1549-1556.
74. **Olmsted, S. B., S. M. Kao, L. J. van Putte, J. C. Gallo, G. M. Dunny.** 1991. Role of the pheromone-inducible surface protein Asc10 in mating aggregate formation and conjugal transfer of the *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10. *J.Bacteriol.* **173**:7665-7672.
75. **Owens, W. E., R. D. Berg.** 1980. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract of athymic (nu/nu) mice. *Infect.Immun.* **27**:461-467.
76. **Owens, W., Berg RD.** 1982. Bacterial translocation from the gastrointestinal tracts of thymectomized mice. *Curr.Microbiol.* **7**:169-174.
77. **Pallares, R., M. Pujol, C. Pena, J. Ariza, R. Martin, F. Gudiol.** 1993. Cephalosporins as risk factor for nosocomial *Enterococcus faecalis* bacteremia. A matched case-control study. *Arch.Intern.Med.* **153**:1581-1586.

78. **Papanicolaou, G. A., B. R. Meyers, J. Meyers, M. H. Mendelson, W. Lou, S. Emre, P. Sheiner, C. Miller.** 1996. Nosocomial infections with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in liver transplant recipients: risk factors for acquisition and mortality. *Clin.Infect.Dis.* **23**:760-766.
79. **Penn, R. L., R. D. Maca, R. D. Berg.** 1985. Increased translocation of bacteria from the gastrointestinal tracts of tumor-bearing mice. *Infect.Immun.* **47**:793-798.
80. **Philpott, D. J., D. M. McKay, Mak W., Perdue M.H., Sherman P.M.** 1998. Signal Transduction Pathways Involved in Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*-Induced Alterations in T84 Epithelial Permeability. *Infect.Immun.* **66**:1680-1687.
81. **Popiel I., Turnbull P.C.B.** 1985. Passage of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella thompson* through chick ileocecal mucosa. *Infect.Immun.* **47**:786-792.
82. **Pujol, C., E. Eugène, L. de Saint Martin, X. Nassif.** 1997. Interaction of *Neisseria meningitidis* with a Polarized Monolayer of Epithelial Cells. *Infect.Immun.* **65**:4836-4842.
83. **Rakita, R. M., N. N. Vanek, K. Jacques-Palaz, M. Mee, M. M. Mariscalco, G. M. Dunny, M. Snuggs, W. B. Van Winkle, S. I. Simon.** 1999. *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. *Infect.Immun.* **67**:6067-6075.
84. **Ranaldi G., Islam K., Sambuy Y.** 1992. Epithelial cells in culture as a model of the intestinal transport of antimicrobial agents. *Antimicrob.Agents Chemother.* **36**:1374-1381.
85. **Richards, M. J., J. R. Edwards, D. H. Culver, R. P. Gaynes.** 2000. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect.Control Hosp.Epidemiol.* **21**:510-515.

86. **Rozdzinski, E., R. Marre, M. Susa, R. Wirth, A. Muscholl-Silberhorn.** 2001. Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. *Microb.Pathog.* **30**:211-220.
87. **Sartingen, S., E. Rozdzinski, A. Muscholl-Silberhorn, R. Marre.** 2000. Aggregation substance increases adherence and internalization, but not translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells in vitro. *Infect.Immun.* **68**:6044-6047.
88. **Schaberg, D. R., D. H. Culver, R. P. Gaynes.** 1991. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am.J.Med.* **91**:72S-75S.
89. **Schlievert, P. M., P. J. Gahr, A. P. Assimacopoulos, M. M. Dinges, J. A. Stoehr, J. W. Harmala, H. Hirt, G. M. Dunny.** 1998. Aggregation and binding substances enhance pathogenicity in rabbit models of *Enterococcus faecalis* endocarditis. *Infect.Immun.* **66**:218-223.
90. **Shankar, V., A. S. Baghdayan, M. M. Huycke, G. Lindahl, M. S. Gilmore.** 1999. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect.Immun.* **67**:193-200.
91. **Spaeth, G., R. D. Specian, R. D. Berg, E. A. Deitch.** 1990. Splenectomy influences endotoxin-induced bacterial translocation. *J.Trauma* **30**:1267-1272.
92. **Steffen, E. K., R. D. Berg.** 1983. Relationship between cecal population levels of indigenous bacteria and translocation to the mesenteric lymph nodes. *Infect.Immun.* **39**:1252-1259.
93. **Steffen, E. K., R. D. Berg, E. A. Deitch.** 1988. Comparison of translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node. *J.Infect.Dis.* **157**:1032-1038.

94. **Steinbrecher, E., D. Sohr, S. Hansen, A. Nassauer, F. Daschner, H. Ruden, P. Gastmeier.** 2002. Surveillance postoperativer Wundinfektionen - Referenzdaten des Krankenhaus-Infektions-Surveillance-Systems (KISS). [Surveillance of surgical site infections - reference data of the Hospital Infection Surveillance System (KISS)]. *Chirurg* **73**:76-82.
95. **Stroud, L., J. Edwards, L. Danzing, D. Culver, R. Gaynes.** 1996. Risk factors for mortality associated with enterococcal bloodstream infections. *Infect.Control Hosp.Epidemiol.* **17**:576-580.
96. **Suppola, J. P., A. Kuikka, M. Vaara, V. V. Valtonen.** 1998. Comparison of risk factors and outcome in patients with *Enterococcus faecalis* vs *Enterococcus faecium* bacteraemia. *Scand.J.Infect.Dis.* **30**:153-157.
97. **Theilacker, C., W. A. Krueger, J. Kropec, J. Huebner.** 2004. Rationale for the development of immunotherapy regimens against enterococcal infections. *Vaccine* **22(Suppl.1)**:31-38.
98. **Tlaskalova-Hogenova, H., M. A. Farre-Castany, R. Stepankova, H. Kozakova, L. Tuckova, D. P. Funda, R. Barot, B. Cukrowska, J. Sinkora, L. Mandel.** 1995. The gut as a lymphoepithelial organ: the role of intestinal epithelial cells in mucosal immunity. *Folia Microbiol.(Praha)* **40**:385-391.
99. **Trotter, K. M., G. M. Dunny .** 1990. Mutants of *Enterococcus faecalis* deficient as recipients in mating with donors carrying pheromone-inducible plasmids. *Plasmid* **24**:57-67.
100. **Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC.** 1988. Vancomycin-resistant enterococci [letter]. *Lancet* **1**:57-58.
101. **Valles, J., C. Leon, F. Alvarez-Lerma.** 1997. Nosocomial bacteremia in critically ill patients: a multicenter study evaluating epidemiology and prognosis. Spanish Collaborative Group for Infections in Intensive Care

Units of Sociedad Espanola de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias (SEMIUC). Clin.Infect.Dis. **24**:387-395.

102. **van der Meer, J. T. M., W. van Vianen, W. B. van Leeuwen, H. A. Valkenburg, J. Thompson, M. F. Michel.** 1991. Distribution, antibiotic susceptibility, and tolerance of bacterial isolates in culture positive cases of endocarditis in The Netherlands. Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis. **10**:728-734.
103. **Vincelette, J., F. Finkelstein, F. Y. Aoki, R. I. Ogilvie, G. K. Richards, R. J. Seymour.** 1982. Double-blind trial of perioperative intravenous metronidazole prophylaxis for abdominal hysterectomy. Can.Med.Assoc.J. **127**:119-123.
104. **Wells, C. L.** 1996. Colonization and translocation of intestinal bacterial flora. Transplant.Proc. **28**:2653-2656.
105. **Wells, C. L., S. L. Erlandsen.** 1991. Localization of translocating Escherichia coli, Proteus mirabilis, and Enterococcus faecalis within cecal and colonic tissues of monoassociated mice. Infect.Immun. **59**:4693-4697.
106. **Wells, C. L., R. P. Jechorek, S. L. Erlandsen.** 1990. Evidence for the translocation of Enterococcus faecalis across the mouse intestinal tract. J.Infect.Dis. **162**:82-90.
107. **Wells, C. L., R. P. Jechorek, M. A. Maddaus, R. L. Simmons.** 1988. Effects of clindamycin and metronidazole on the intestinal colonization and translocation of enterococci in mice. Antimicrob.Agents Chemother. **32**:1769-1775.
108. **Wells, C. L., R. P. Jechorek, S. B. Olmsted, S. L. Erlandsen.** 1994. Bacterial translocation in cultured enterocytes: magnitude, specificity, and electron microscopic observations of endocytosis. Shock **1**:443-451.

109. **Wells, C. L., O. D. Rotstein, T. L. Pruett, R. L. Simmons.** 1986. Intestinal bacteria translocate into experimental intra-abdominal abscesses. *Arch.Surg.* **121**:102-107.
110. **Wells, C. L., E. M. van de Westerlo, R. P. Jechorek, S. L. Erlandsen.** 1996. Intracellular survival of enteric bacteria in cultured human enterocytes. *Shock* **6**:27-34.
111. **Wells, C. L., E. M. van de Westerlo, R. P. Jechorek, B. A. Feltis, T. D. Wilkins, S. L. Erlandsen.** 1996. *Bacteroides fragilis* enterotoxin modulates epithelial permeability and bacterial internalization by HT-29 enterocytes. *Gastroenterology* **110**:1429-1437.
112. **Wells, C. L., E. M. VandeWesterlo, R. P. Jechorek, S. L. Erlandsen.** 1996. Effect of hypoxia on enterocyte endocytosis of enteric bacteria. *Crit Care Med.* **24**:985-991.
113. **Wilson C.B., Jacobs R.F., Smith A.L.** 1982. Cellular antibiotic pharmacology. *Semin Perinatol* **6**:205-213.
114. **Wirth, R., F. Y. An, D. B. Clewell.** 1986. Highly efficient protoplast transformation system for *Streptococcus faecalis* and a new *Escherichia coli*-*S. faecalis* shuttle vector. *J.Bacteriol.* **165**:831-836.
115. **Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy.** 1998. Antibiotic Treatment of Streptococcal and Staphylococcal Endocarditis. *Heart* **79**:207-210.

Danksagung

Mein größter Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. med. Wolfgang Krüger für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit. Er stand mir immer freundlich, mit Geduld, fachlichem und persönlichem Rat und unermüdlichem Engagement zur Seite. Hierfür mein herzlichster Dank.

Herrn Prof. Unertl danke ich für die anfängliche Überlassung des Themas.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern des Forschungslabors, insbesondere Irene Vollmer, Alice Mager und Michaela Hoch-Gutbrod, für ihre Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. rer. nat. Dietz für die Hilfe bei der statistischen Aufarbeitung der Ergebnisse bedanken.

Herrn Dr. Zabel vom Mikrobiologischen Institut danke ich für die Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentrationen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Anke Rembold-Schmitz

geb. Rembold

geboren am 13. Januar 1977 in Böblingen

seit dem 23.04.2004 verheiratet mit Andreas Schmitz

Schulbildung

1983 – 1987 Grundschule Sommerhofen Sindelfingen

1987 – 1996 Gymnasium in den Pfarrwiesen Sindelfingen

Studium

10.1996 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

02.09.1998 Physikum

31.08.1999 1.Staatsexamen

26.3.2002 2.Staatsexamen

15.5.2003 3. Staatsexamen

berufliche Tätigkeit

seit 1.8.2003 Facharztausbildung Innere Medizin

davon:

01.08.2003 bis 1.10.2004 als Ärztin im Praktikum in der Abteilung Innere Medizin am Kreiskrankenhaus Böblingen

Seit 1.10.2004 Assistenzärztin in der Abteilung Innere Medizin am Kreiskrankenhaus Böblingen