

**Aus der Universitätsklinik für Anaesthesiologie und
Intensivmedizin Tübingen**

Abteilung für Anaesthesiologie und Intensivmedizin

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. Unertl

**Passive und aktive Immunisierung gegen
Enterokokken-Aggregationssubstanz: Testung der
protektiven Wirkung in murinen Infektionsmodellen**

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

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

**vorgelegt von
Arne Woll
aus Böblingen
2006**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

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

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Döring

Für Nicola und Maja

I	Abkürzungsverzeichnis (in alphabetischer Reihenfolge)	4
1	EINLEITUNG	5
1.1	Klinische Bedeutung von Enterokokken-Infektionen	5
1.1.1	Enterokokken-Infektionen – ein wachsendes Problem	5
1.1.2	Epidemiologie von Infektionen bei Intensivpatienten	5
1.1.3	Risikofaktoren für VRE – Bakteriämien	7
1.1.4	Antibiotika-Resistenz	9
1.2	Aggregation Substance als Target bei <i>E. faecalis</i>	11
1.2.1	Rolle der Aggregation Substance bei der Konjugation	11
1.2.2	AS und Gewebeadhärenz	12
1.2.3	AS als Zielstruktur für Antikörper	12
1.3	Virulenzfaktoren und Tiermodelle	13
1.3.1	Endokarditis in Kaninchen-Modellen	14
1.3.2	Translokation von <i>E. faecalis</i> aus dem Intestinaltrakt im Mäuse-Modell	16
1.4	Immuntherapeutische Ansätze	17
1.5	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	19
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Methoden	20
2.1.1	ELISA	20
2.1.2	LOWRY-Test	22
2.1.3	Übernachtkultur	23
2.1.4	Bestimmung der Konzentration	25
2.1.5	Phänotypisierung	26
2.1.6	Differenzierung	27
2.1.7	Inokula	27
2.1.8	Infektion der Mäuse mit <i>E. faecalis</i> Stamm 1 und Stamm 2	28
2.1.9	Passive Immunisierung	29
2.1.10	Aktive Immunisierung	32
2.1.11	Organentnahme und Aufbereitung der Organe	34
2.1.12	Statistische Auswertung	36
2.1.12.1	Unterschied zwischen Infektion mit AS+ und AS– Mutanten	36
2.1.12.2	Unterschied zwischen der passiven Immunisierung mit NRS, IRS und der NaCl-Kontrollgruppe	36
2.1.12.3	Auswertung bei aktiver Immunisierung mit AS und der BSA-Kontrollgruppe	37

3	ERGEBNISSE	38
3.1	Vorversuche	38
3.1.1	Interaktion von AS mit BS	38
3.1.2	Resistenzverhalten gegen Chloramphenicol und Tetrazyklin	40
3.1.3	Infektion mit <i>E. faecalis</i> Stamm 1 und Stamm 2	41
3.1.4	Organmanifestation	42
3.1.4.1	IgG- und IgM-Titer	42
3.1.4.2	Blut	43
3.1.4.3	Herz	46
3.1.4.4	Lungen	48
3.1.4.5	Leber	51
3.1.4.6	Milz	54
3.1.4.7	Niere	56
3.1.4.8	Gewichtsverlust	59
3.1.4.9	Zusammenfassung der Ergebnisse der Vorversuche	61
3.2	Hauptversuche	63
3.2.1	Passive Immunisierung – Infektion mit <i>E. faecalis</i> Stamm 1 (AS+/BS–)	63
3.2.1.1	Impfseren	63
3.2.2	Organmanifestation bei passiver Immunisierung und Infektion mit AS-positiver Mutante <i>E. faecalis</i> Stamm 1	66
3.2.2.1	IgG-Titer der Mäuse	66
3.2.2.2	Blut	67
3.2.2.3	Herz	68
3.2.2.4	Lunge	69
3.2.2.5	Leber	70
3.2.2.6	Milz	71
3.2.2.7	Niere	73
3.2.2.8	Gewichtsverlust	74
3.2.2.9	Zusammenfassung der Ergebnisse der passiven Immunisierung bei Infektion mit <i>E. faecalis</i> Stamm 1 (AS+/BS–)	75
3.2.3	Organmanifestation bei passiver Immunisierung mit AS-negativer Mutante <i>E. faecalis</i> Stamm 2 - Kontrollversuche	76
3.2.3.1	IgG-Titer der Mäuse	77
3.2.3.2	Herz	78
3.2.3.3	Lunge	79
3.2.3.4	Leber	80
3.2.3.5	Milz	81
3.2.3.6	Niere	82
3.2.3.7	Gewichtsverlust	83
3.2.3.8	Zusammenfassung der Ergebnisse der passiven Immunisierung bei Infektion mit <i>E. faecalis</i> Stamm 2 (AS–/BS–)	84

3.3	Aktive Immunisierung – Infektion mit der AS-positiven Mutante <i>E. faecalis</i> Stamm 1	85
3.3.1	Aktive Immunisierung	85
3.3.2	Organmanifestation	85
3.3.2.1	IgG- und IgM-Titer	85
3.3.2.2	Herz.....	87
3.3.2.3	Lunge.....	88
3.3.2.4	Leber.....	89
3.3.2.5	Milz	90
3.3.2.6	Niere.....	91
3.3.2.7	Gewichtsverlust	92
3.3.2.8	Zusammenfassung der Ergebnisse der aktiven Immunisierung und Infektion mit <i>E. faecalis</i> Stamm 1 (AS+/BS-)... ..	93
3.4	Milzgewicht bei Injektion von Kaninchenserum	94
4	DISKUSSION	98
4.1	Methodik	98
4.2	Präformierte Antikörper	101
4.3	Immunisierungsversuche	102
4.4	Vergleich mit anderen Tiermodellen	107
4.4.1	Limitationen unseres Tiermodells	109
4.4.2	Die Rolle von Antikörpern bei Enterokokken-Infektionen.....	112
4.5	Genetische Variation der AS	113
4.6	Zusammenfassung	114
5	ANHANG.....	115
5.1	Materialien und Reagenzien.....	115
5.2	Rezepturen.....	121
5.3	Literaturverzeichnis	125
5.4	Danksagung	136
5.5	Lebenslauf	137

I Abkürzungsverzeichnis (in alphabetischer Reihenfolge)

AS = Aggregation Substance
BS = Binding Substance
BSA = bovines Serum-Albumin
ELISA = enzyme linked immuno sorbent assay
HLR = high-level Resistenz
IRS = immune rabbit serum
KBE = koloniebildende Einheit
MHK = minimale Hemmkonzentration
MRSA = Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*
MW = arithmetischer Mittelwert
NaCl = Natrium-Chlorid
NRS = normal rabbit serum
PBP = Penicillin bindende Proteine
PBS = phosphate buffered saline
Stabw = Standardabweichung
Stamm 1 = *E. faecalis* INY3000 pINY1801 (AS+/BS-)
Stamm 2 = *E. faecalis* INY3000 pWM401 (AS-/BS-)
Stamm 3 = *E. faecalis* OG1SSp pINY 1801 (AS+/BS+)
Stamm 4 = *E. faecalis* OG1SSp pINY401 (AS-/BS+)
TSB = Trypticase Soy Broth
TSA = Trypticase Soy Agar
VRE = Vancomycin-resistente Enterokokken

1 Einleitung

1.1 Klinische Bedeutung von Enterokokken-Infektionen

1.1.1 Enterokokken-Infektionen – ein wachsendes Problem

Enterokokken sind Katalase-negative, Gram-positive, fakultativ anaerobe Kokken, die ursprünglich in der Lancefield-Klassifikation Streptokokken der Gruppe D zugeordnet wurden [1]. Auf Grund genetischer Abweichungen zu Streptokokken werden Enterokokken heutzutage als eigene Gattung gezählt [2, 3]. Enterokokken kommen physiologischerweise im Darmtrakt von Menschen und Säugetieren vor. Sie verursachen u.a. Infektionen des Urogenital-Traktes, Bakteriämien und Endokarditiden [1, 2, 4]. Häufig werden sie auch aus Abstrichen im Rahmen polymikrobieller Infektionen des Abdomens, des Beckens, der Gallenwege und aus Wunden isoliert. Besondere klinische Relevanz als humanpathogene Keime kommt hierbei insbesondere den Spezies *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* zu. In bis zu 70% der Infektionen konnte *Enterococcus faecalis* als Erreger bestimmt werden, wobei in den letzten Jahren die Zahl der nosokomialen Infektionen mit *Enterococcus faecium* zugenommen hat [2].

1.1.2 Epidemiologie von Infektionen bei Intensivpatienten

In den letzten Jahren wurden zunehmend Enterokokken als Erreger bei schweren Infektionen bei Neugeborenen, Immunsupprimierten und Intensivpatienten beschrieben. In der EPIC-Studie (European Prevalence of Infection in Intensive Care) lagen bei 44,8 % der Intensivpatienten Infektionen vor, die in der überwiegenden Zahl als nosokomial klassifiziert wurden [5]. Am häufigsten fanden sich Pneumonien (46,9 %), gefolgt von anderen Infektionen

der unteren Atemwege (17,8 %) und Harnwegsinfektionen (17,6 %). Als nächstes folgten Septikämien (12 %), Wundinfektionen (6,9%) und Infektionen im Hals-Nasen-Ohren-Bereich (5,1 %) [5]. Die meisten Patienten hatten nur eine Infektion, bei 25,6 % der Patienten fanden sich jedoch zwei oder mehrere Infektionen. Während die Bedeutung von Enterokokken bei Pneumonien fraglich ist, wurden sie bei Harnwegsinfekten mit 14,8 % an vierter Stelle, bei Wundinfektionen mit 18,2 % an dritter Stelle und bei Bakteriämien mit 10,9 % ebenfalls an dritter Stelle beschrieben.

Am wichtigsten in den letzten Jahren stellte sich die Zunahme der Enterokokken als Bakteriämie-Erreger insbesondere bei Intensivpatienten heraus [4, 6-8]. So wurde von Maki und Aggers im Zeitraum von 1982 – 1983 eine Verdreifachung von Enterokokken-Bakteriämien im Vergleich zum Zeitraum von 1970 – 1973 beobachtet [4]. Wurden im Zeitraum von 1986 – 1997 noch in 12,8 % der Bakteriämien Enterokokken als Erreger gefunden [6], so zeigte die Analyse des „National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS)“ von Richards im Zeitraum von Januar 1992 bis Juli 1997 schon in 16 % der Septikämien Enterokokken als Ursache. Damit liegen sie an Platz 2 aller Infektionen auf Intensivstationen [9].

Passend zu diesen Zahlen fand sich auch eine Zunahme der Letalität bei Enterokokken-Bakteriämien. Die Studie von Landry et al. 1989 beschrieb eine Letalität von 43 %, gegenüber 12 % in der Vergleichsgruppe. Die Gesamtlealität der Enterokokken-Bakteriämien betrug zwischen 33% und 68 % [7]. Murray beschrieb im Jahr 2000 eine Letalität von bis zu 40 % [8].

Bei den in den letzten Jahren zunehmenden Infektionen mit Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) betrug diese sogar bis zu 100 % [10]. Bei Patienten die eine Infektion mit VRE überlebten, verdoppelte sich die Verweildauer im Krankenhaus [7].

Weiterhin wurden zunehmend Enterokokken als Erreger von Infekten im Urogenitalbereich und bei Wundinfektionen, insbesondere im Rahmen polymikrobieller Infektionen, isoliert [4-6, 8, 9]. Diese spielen jedoch in Hinsicht auf die Letalität eine untergeordnete Rolle.

1.1.3 Risikofaktoren für VRE – Bakteriämien

Nosokomiale Infektionen treten bei 44,8 % der Intensivpatienten auf [5]. Eine Ursache dafür liegt darin, dass das betroffene Patientenkollektiv hier aus schwerstkranken, teils immunkompromittierten Patienten und Patienten mit Malignomen besteht. Die Studie von Garbutt et al. [11] beschäftigte sich mit besonderen Risikofaktoren für *E. faecium* – Bakteriämien. So waren die Patienten, die eine *E. faecium* – Bakteriämie entwickelten schwerkrank (APACHE-II Score 18,8), hatten lange Liegezeiten im Krankenhaus (MW = 15,8 Tage), lagen auf der Intensivstation (57 %), waren maschinell beatmet (49 %) oder wurden mit mehreren Antibiotika behandelt (MW = 5,2) [11].

Risikofaktoren für einen Vancomycin-Resistenzanstieg waren weibliches Geschlecht, lange Krankenhausliegedauer, Aufenthalt auf der Intensivstation vor Auftreten der Bakteriämie, Behandlung mit unterschiedlichen Antibiotika oder Medikamenten zur Hemmung der Magensäureproduktion, Aufnahme nach 1995, enterale Ernährung, zentral-venöse Katheterisation und der Schwere der Grunderkrankung [11, 12]. Im Rahmen einer Multivarianz-Analyse von Garbutt et al. 1999 wurde kein signifikanter Unterschied zwischen Vancomycin-resistenten und –sensiblen Enterokokken bezüglich der Letalität gefunden [11]. Shay et al. identifizierten vier Hauptrisikofaktoren für Enterokokken-Bakteriämien. So wurde die Progression der Grunderkrankung, Vancomycin-Behandlung bei malignen hämatologischen Erkrankungen oder nach Knochenmarkstransplantation, Mukositis und Antibiotika-Therapie auf onkologischen Stationen [13, 14] beschrieben.

Eine besondere Rolle spielt die vorhergehende antibiotische Behandlung [13, 15-23], insbesondere mit Glycopeptiden [24]. Aber auch Hämodialyse, vorhergehende Therapie mit Kortikosteroiden oder antineoplastischen Medikamenten, ein vorhergehender chirurgischer Eingriff, Tracheotomie und jede Art der Punktion scheinen eine VRE-Bakteriämie zu begünstigen [24]. Andere Studien zeigten, dass eine AIDS-Erkrankung, positiver HIV-Status, Drogenmissbrauch, Lebertransplantation, Serum-Kreatinin-Werte > 1,1 mg/dl [25], Blasenkatheter [26], Neutropenie [27] und die Anwesenheit eines anderen Patienten mit VRE-Infektion [28] das Auftreten einer Enterokokken-Bakteriämie begünstigen (siehe auch Tabelle 1).

Prädisponierende Faktoren für nosokomiale Bakteriämien (modifiziert nach Landry et.al):

Antibiotika
Katheter
 arteriell
 ZVD
 Hickman
 Arteria pulmonalis
 Arteria umbilicalis
 Vena umbilicalis
Blasenverweilkatheter
Hämodialyse
Immunsuppression
i.v. Pyelogramm
multiple Bluttransfusionen
Magensonde
andere Infektionen
Peritonealdialyse
Bestrahlungstherapie
Intubation

Tabelle 1: prädisponierende Faktoren für nosokomiale Bakteriämien

1.1.4 Antibiotika-Resistenz

Enterokokken stellen eine besondere Herausforderung auf Grund ihrer natürlichen intrinsischen und ihrer zunehmend erworbenen Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika dar. Einige klinische Isolate sind mittlerweile resistent gegenüber β -Lactam-Antibiotika und Glycopeptiden. Weiterhin sind alle Enterokokken resistent gegenüber niedrig-dosierten Aminoglykosiden [1, 12, 29]. *E. faecalis* zeigt eine 10-100 fach höhere minimale Hemmkonzentration (MHK) gegenüber Penicillin (2-8 $\mu\text{g/ml}$) als die meisten anderen Streptokokken. Bei *E. faecium* ist diese mit 16-32 $\mu\text{g/ml}$ noch höher [1]. Um eine bessere bakterizide Wirkung bei der Bekämpfung ernsthafter Enterokokken-Infektionen zu erreichen, ist die Kombination einer zellwandaktiven Substanz, eines β -Lactam-Antibiotikums oder eines Glykopeptids mit einem Aminoglykosid sinnvoll [4, 30, 31]. Viele Stämme haben eine high-level Resistenz (HLR) gegenüber Aminoglykosiden erworben (MHK > 2000 $\mu\text{g/ml}$). Diese verhindert den synergistischen Effekt bei der Kombinationsbehandlung von Enterokokken-Infektionen. In den 70er Jahren wurde erstmals über HLR gegen Streptomycin berichtet [1, 32].

1979 berichteten Horodniceanu et al. erstmals von HLR bei Enterokokken-Isolaten gegenüber Gentamicin [1, 33]. 1983 wurde das erste Auftreten dieser Isolate in den Vereinigten Staaten beschrieben [1]. In den nächsten Jahrzehnten kam es zu einem teils dramatischen Anstieg der Prävalenz in verschiedenen Gebieten der Welt [1, 34-36]. Genauso wie bei der Resistenz gegenüber Streptomycin wird auch hier der Synergismus einer Kombinationsbehandlung ausgeschaltet. Das Gen, das diese Resistenz codiert, besitzt dieselbe DNA Sequenz, wie das Gen, das Gentamicin-Resistenz bei *Staphylococcus aureus* [1, 37, 38] bewirkt. Dieses befindet sich auf heterogenen Plasmiden [1, 36, 39].

Besonderes Augenmerk gilt den Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE). Diese wurden erstmals 1988 in Europa beschrieben [40]. Verschiedene Studien von 1990 bis 1997 haben einen Anstieg dieser und anderer Resistenzentwicklungen gezeigt. Bei den VRE kam es in diesem Zeitraum zu einem Anstieg der Prävalenz von < 1 % auf ca. 15 % [41-43].

Verschiedene Vancomycin-resistente Phänotypen wurden identifiziert, darunter van A, van B und van C. Alle 3 Phänotypen zeigen die Resistenz gegen Vancomycin, jedoch unterschiedliche Resistenzen gegenüber Teicoplanin [1, 44-47]. Am häufigsten besteht Vancomycin-Resistenz bei *E. faecium*. Am häufigsten finden sich diese Isolate [41, 43, 48] bei immunkompromittierten und schwerstkranken Patienten, wie sie auf Intensivstationen zu finden sind. Darüberhinaus finden sich zahlreiche andere Resistenzen bei Enterokokken. So findet sich β -Lactamase-vermittelte Resistenz (< 0,1 %), Ampicillin-Resistenz (> 80 % bei *E. faecium*, < 5 % bei *Enterococcus faecalis*) auf Grund veränderter Penicillin-bindender Proteine (PBP) und high-level Aminoglykosid-Resistenz (zwischen 30 – 60 %) [49]. Häufig sind Enterokokken-Spezies resistent gegen Makrolide, Fluoroquinolone, Tetrazykline und Carbapeneme [41, 42, 50].

Enterococcus faecalis verursacht ca. 60 % der nosokomialen Septikämien. Im „Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance (SCOPE)“ Programm wurde gezeigt, dass diese nur mit einer geringen Rate von Resistenz gegen Vancomycin, Teicoplanin, Penicillin und einer etwas höheren Rate an Resistenz gegen Gentamicin einhergeht. Auch zeigt sich *E. faecalis* resistent gegenüber Quinupristin-Dalfopristin. Eine mögliche Alternative bietet hier Linezolid, jedoch sind auch hier schon Resistenzen beschrieben [51].

E. faecium ist in ca. 20 % verantwortlich für nosokomiale Septikämien. Diese sind jedoch in weit höherem Maße mit Vancomycin-, Teicoplanin-, Penicillin- und high-level Gentamicin-Resistenzen behaftet. Mehr als 85 % von *E. faecium*-Isolaten zeigen eine Resistenz gegen Penicillin, mehr als 50 % haben

eine high-level Gentamicin-Resistenz. *E. faecium* zeigt sich jedoch meist sensibel gegenüber Quinupristin-Dalfopristin [51]. Das höchste Maß an Resistenz zeigt *E. raffinosus*. Dieser Keim wird jedoch nur selten als Erreger isoliert [41, 50].

1.2 Aggregation Substance als Target bei *E. faecalis*

1.2.1 Rolle der Aggregation Substance bei der Konjugation

Ein wichtiger Virulenzfaktor von *E. faecalis* ist die Aggregation Substance (AS). Enterokokken besitzen verschiedene Plasmide und können diese durch Konjugation an Plasmid-negative Stämme weitergeben. Für einige Plasmide, den sog. „sex pheromone responsive plasmids“, existiert ein spezielles Austauschsystem, welches mit einer Klumpungsreaktion der Bakterien einhergeht. Dieser Austausch ist um ein vielfaches effektiver als beim Austausch anderer Plasmide. Die „Sex Pheromone“ werden von Plasmid-negativen Stämmen sezerniert und von Plasmid-positiven Spenderzelle über ein Lipoprotein an der Zelloberfläche wahrgenommen [52, 53]. Die AS wird exprimiert, und es kommt zu einem engen Zellkontakt zwischen Donorzelle und der Binding Substance (BS) der Empfängerzelle. Dies ist im Nährmedium als Klumpung zu beobachten. Nach Abschluss der Konjugation wird ein weiteres Protein exprimiert, um den Vorgang abzuschließen. Ein Plasmid-Austausch zwischen Donorzellen wird auf diesem Wege verhindert [54-56]. Dieses „Sex Pheromone“ System ist einzigartig für *E. faecalis* [57].

Die AS besteht aus 1296 Aminosäuren mit bekannter Sequenz. Der Gen-Locus wurde auf dem pAD1-Plasmid identifiziert und ist mit hoher Homologie auf weiteren Plasmiden zu finden. Der Gen-Locus der BS befindet sich auf dem Enterokokken-Chromosom. Die Struktur ist nicht bekannt, aber es wird vermutet, dass Lipoteichonsäuren als Bindungsstellen fungieren [57-59].

Die Untersuchung klinischer *E. faecalis*-Isolate bei Endokarditiden ergab eine Inzidenz der AS von 52 %, bei anderen Infektionen waren es 72 % gegenüber 30 % bei gesunden Freiwilligen [60].

1.2.2 AS und Gewebeadhärenz

AS spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der Adhärenz an eukaryonte Zellen [61]. Kreft et al. zeigten, dass die AS Substance ein wichtiger Faktor bei der Bindung an Tubuluszellen der Niere im Schweinemodell darstellt. Hier fand eine Enterokokken-Mutante Verwendung, die durch Insertion eines Transposons im Regulations-Gen konstitutiv in hohem Maße AS exprimierte. Ob dies auf einer spezifischen Interaktion der AS mit den Tubuluszellen, oder auf einer unspezifischen Bindung einer einzelnen *E. faecalis*-Zelle mit konsekutiver Adhäsion weiterer Zellen beruhte, blieb letztendlich unklar [62]. Auch bei experimentell erzeugten Endokarditiden führte das Vorhandensein der AS und BS zum Tod der Tiere und zur Vergrößerung endokardialer Vegetationen [63]. Bei der Entschlüsselung der Aminosäure-Sequenz fielen RGD-Motive auf (Arg-Gly-Asp, RGD-Motiv). Dieses RGD-Motiv ist gut vom Fibronektin bekannt, wo es Bindungen über eine Rezeptorfamilie eukaryonter Zellen, den Integrinen, vermittelt [64]. Diese Integrine werden auf Leukozyten, Thrombozyten, Endothel des Herzens und Epithelium des Intestinaltraktes exprimiert [65-69].

1.2.3 AS als Zielstruktur für Antikörper

Antikörper gegen das N-terminale und das C-terminale Ende der AS wurden bisher nur zur Charakterisierung und elektronenmikroskopischen Darstellung verwendet [56, 70]. Hirt et al. konnten mit Hilfe von Antikörpern zeigen, dass die N-terminale Domäne der AS mehr auf der Oberfläche der Zelle exprimiert wird als die C-terminale [70].

Muscholl-Silberhorn beschrieb die Rolle der beiden Domänen bei der Zell-Aggregation. Dabei konnten Antikörper gegen die N-terminale Domäne die Aggregation der Enterokokken untereinander verhindern, während dieser Effekt bei Antikörpern gegen die C-terminale Domäne nicht zu beobachten war [61]. Es wurde bisher nicht untersucht, ob Antikörper gegen AS eine opsonisierende Wirkung besitzen.

1.3 Virulenzfaktoren und Tiermodelle

Neben AS sind in der Literatur noch weitere potenzielle Virulenzfaktoren von Enterokokken beschrieben [71, 72]. Die Rolle von AS, Cytolysin, Gelatinase und deren Synergismus wurden von Dupont et al. untersucht. Als Modell einer systemischen Infektion wurden weiblichen OF1-Mäusen verschiedene *Enterococcus faecalis* - Stämme intraperitoneal injiziert. Bei männlichen Sprague-Dawley Ratten wurde eine lokale Entzündung des Peritoneums erzeugt. Die höchste Letalität wurde bei Mäusen beobachtet, die mit Cytolysin-produzierenden Stämmen inokuliert wurden [73]. Dies wurde zuvor von Ike et al. beschrieben [74]. Gelatinase erhöhte die Letalität und senkte die LD₅₀ auf 68 % im Mäuse-Modell. Im Ratten-Modell zeigte Gelatinase nur eine geringe Pathogenität. So kam es hier zu mäßigem Gewichtsverlust und einer milden peritonealen Reaktion. AS-exprimierende Stämme beeinflussten die Letalität bei Mäusen kaum. Die adhäsive Wirkung [62, 68, 69] der AS wurde im Ratten-Modell nicht beobachtet.

Die Kombination zweier Virulenzfaktoren (Cytolysin und AS bzw. Gelatinase und AS) zeigte interessante Ergebnisse. Das gemeinsame Auftreten von Cytolysin und AS führte zur niedrigsten LD₅₀ im Mäuse-Modell. Der Mechanismus blieb jedoch unklar. Dieser synergistische Effekt wurde schon in einer früheren Arbeit beschrieben [63]. Die Kombination von AS und Gelatinase zeigte keine gesteigerte Pathogenität der Keime. Im Ratten-Modell war der

Effekt der Kombination gering, die inflammatorische Gewebereaktion jedoch gesteigert.

1.3.1 Endokarditis in Kaninchen-Modellen

Zahlreiche Arbeiten haben gezeigt, dass Hämolyisin ein wichtiger Virulenzfaktor in Tiermodellen ist, so z.B. bei Peritonitis, Endophthalmitis und Endokarditis bei Kaninchen [56, 60, 62, 63, 68]. Chow et al. haben sich mit dem Vorhandensein von AS und Hämolyisin im Endokarditismodell mit Kaninchen beschäftigt [63]. Den Tieren wurde ein Katheter über die A. carotis bis zur Aortenklappe gelegt und später über eine periphere Vene mit unterschiedlichen *E.-faecalis*-Mutanten infiziert. Verwendet wurde *E. faecalis* FA2-2 (ohne Plasmid) und FA2-2 mit Plasmid pAD1 (Hämolyisin und AS), pAM9058 (Hämolyisin inaktiviert) und pAM944 bzw. pAM947 (AS-Expriemierung inaktiviert) [75]. Alle Mutanten waren in der Lage, eine Endokarditis zu verursachen. Das mittlere Gewicht der bakteriellen Vegetationen war bei den Tieren, welche die AS-exprimierende Mutanten (AS +) erhielten signifikant höher ($p < 0,01$) als bei denen, die AS-negative Mutanten (AS -) erhielten. Darüberhinaus war die Letalität bei den Tieren, die mit FA2-2 mit pAD1 infiziert wurden, also Hämolyisin produzierten und AS exprimierten, signifikant erhöht gegenüber den anderen Mutanten ($p < 0,01$). Das Vorhandensein der AS allein und das gemeinsame Auftreten von AS mit Hämolyisin-Produktion erschienen hier als wichtige Virulenzfaktoren bei Enterokokken-Endokarditiden [63].

Die Studie von Schlievert et al. [76] untersuchte die Rolle von Enterokokken-AS und Enterokokken-BS bei Endokarditiden im Kaninchenmodell. Verwendet wurden die *E. faecalis* Mutanten INY3000 pWM401 (AS-/BS-), OG1SSp pINY401 (AS-/BS+), INY3000 pINY1801 (AS+/BS-) und OG1SSp pINY1801 (AS+/BS+) [56, 58, 77].

Den Kaninchen wurden die Enterokokken intraventrikulär injiziert und die Tiere 2 Tage beobachtet. Tiere, welche AS-/BS- Enterokokken erhielten,

entwickelten keine klinisch sichtbaren Krankheitszeichen, wie Fieber ($> 40\text{ }^{\circ}\text{C}$), Diarrhoe oder Urinverfärbungen. Alle Tiere überlebten. Tiere, die die AS-/BS+ Organismen erhielten, zeigten alle o.g. klinischen Krankheitszeichen.

Zusätzlich wurde eine Perikarditis bei Autopsie der Kaninchen festgestellt. Eines von sechs Kaninchen starb während der 2-tägigen Inkubation. Dieselben klinischen Zeichen, sowie die Perikarditis, zeigte sich bei den Kaninchen, die AS+/BS- Enterokokken erhielten.

Ein anderes Bild zeigten Kaninchen, die Enterokokken mit AS und BS erhielten (AS+/BS+). Alle Kaninchen zeigten Krankheitszeichen und gingen während des Beobachtungszeitraumes ein [78, 79]. In vitro Versuche zeigten, dass sowohl Kaninchenlymphozyten als auch menschliche Lymphozyten durch AS+/BS+ Organismen stark stimuliert wurden [78-80]. Im Gegensatz dazu verursachten die AS-/BS- Organismen nur eine schwache Lymphozyten-Proliferation.

Zusätzlich wurden Katheter-Versuche an Kaninchen durchgeführt. Die Tiere erhielten für 2 h einen transaortalen Katheter [63, 81]. Zwischendurch wurden die Enterokokken injiziert. Während die Tiere, die AS-/BS- Organismen erhielten, keine endokardialen Vegetationen oder Gewebeschäden zeigten, fanden sich bei den Kaninchen die AS-/BS+ oder AS+/BS- Organismen erhielten, kleine Vegetationen und sie entwickelten eine Splenomegalie. Alle Tiere, die AS+/BS- Organismen erhielten, hatten ausgedehnte endokardiale Vegetationen, hatten eine Splenomegalie und zeigten außerdem einen Befall der Lunge bei der Autopsie [76].

Zusammenfassend zeigen die Tierversuch die wichtige Rolle verschiedener Virulenzfaktoren und deren Synergismus. Insbesondere die wichtige Rolle der AS und der BS konnte gezeigt werden.

1.3.2 Translokation von *E. faecalis* aus dem Intestinaltrakt im Mäuse-Modell

Krüger et al. [82] beschäftigten sich mit dem Mechanismus der Translokation von *E. faecalis* aus dem Intestinal-Trakt in die Blutbahn. 6-8 Wochen alte, weibliche balb/c Mäuse wurden 7 Tage lang mit Metronidazol, Cefoxitin, Vancomycin und Gentamicin als Trinkwasserzusatz behandelt. Je 10 Mäuse erhielten während der 10 folgenden Tage einmalig 10^8 KBE/ml der schon weiter oben beschriebenen Enterokokken-Mutanten (AS-/BS-, AS+/BS-, AS-/BS+, AS+/BS+). Zugeführt wurden diese ebenfalls enteral über das Trinkwasser. Die Kontrollgruppe erhielt AS+/BS+ Enterokokken ohne vorherige antibiotische Behandlung. Nach Ablauf der 10 Tage wurden die Mäuse euthanasiert und Leber, Milz und mesenteriale Lymphknoten wurden unter aseptischen Bedingungen entnommen.

Bei den Mäusen der Antibiotika-Gruppe fanden sich keine Anaerobier und Enterobacteriaceae in Faeces. Alle waren mit 10^9 KBE/g Enterokokken in Faeces kolonisiert. Hier fanden sich in 60 – 90 % Enterokokken in den mesenterialen Lymphknoten gegenüber 20 % in der Kontrollgruppe als Zeichen der Translokation aus dem Intestinum. In 14 % der Lebern und 10 % der Milzen wurden ebenfalls Enterokokken isoliert.

Dies zeigte, dass orale Antibiotika, die gegen Anaerobier wirksam sind eine Kolonisierung durch Enterokokken begünstigt, die wiederum zur extra-intestinalen Translokation führen kann. Eine besondere Rolle von AS oder BS konnte hier nicht gefunden werden [82]. Die Studie von Saringen bestätigte dies [83].

1.4 Immuntherapeutische Ansätze

Immuntherapeutische Methoden, insbesondere passive und aktive Immunisierungen, bieten eine echte Alternative zu den konventionellen Therapien mit Antibiotika.

Huebner et al. [84] haben eine wichtige Zielstruktur für opsonierende Antikörper identifiziert. Antikörper gegen ein kapsuläres Polysaccharid (Lipoteichonsäure) von *E. faecalis* 12030 zeigten passive Protektion im Mäuse-Modell. Diese, durch Kaninchen-Antikörper erzeugte Protektion war ebenfalls wirksam gegenüber verwandten Stämmen. Adsorptionsversuche zeigten, dass die Inkubation von immunisierten Kaninchen mit *E.-faecalis*-Stämmen ohne das kapsuläre Polysaccharid auf der Oberfläche den protektiven Effekt des Serums nicht abschwächte oder eliminierte. Dagegen zeigte die Adsorption des Serums mit *E. faecalis* 12030 eine Aufhebung der Protektion. Wichtig war auch die Tatsache, dass die Antikörper in der Lage waren, die Zahl der Bakterien im befallenen Gewebe bei vorbestehender Infektion zu reduzieren. Bei diesen Versuchen wurde als Erfolgskontrolle der Immunisierung lediglich der Enterokokkenbefall pro Gramm Organewebe untersucht. Ein klinischer Parameter, wie ein Gewichtsverlust als Zeichen der Sepsis wurde hier nicht untersucht.

Die meisten immuntherapeutischen Ansätze richteten sich bisher gegen die Virulenzfaktoren der Enterokokken, wie Hämolysin, AS und BS [63, 71, 85, 86]. Kapsuläre Polysaccharide und Lipoteichonsäure als Antigen wurden schon früher beschrieben [87, 88]. Die Immunantwort dieser Antigene und deren Verwendung als Vakzine wurden nur selten untersucht [84].

Die meisten Antikörper, die in vivo zur Elimination lebender Bakterien führen, zeigten eine komplementvermittelte Immunantwort. Dabei schien die Komplementantwort mit Aktivierung neutrophiler Granulozyten eine wichtige Rolle zu spielen. Antikörper waren nur von untergeordneter Rolle [89-91].

In der Studie von McCormick et al. wurden Immunisierungsversuche im Endokarditismodell durchgeführt, die nur gegen einen Teil von AS gerichtet waren. So wurden Kaninchen gegen das N-terminale Teil der AS immunisiert und so opsonierende Antikörper gebildet. Ein protektiver Effekt im Endokarditismodell konnte nicht gezeigt werden. Das Problem bei dieser Arbeit war, dass das N-terminale Ende der AS auf den Herzklappenvegetationen nicht zugänglich für die opsonierenden Antikörper war [94].

Die Studie von Gaglani et al. beschäftigte sich mit *E.-faecalis*-spezifischen Antikörpern, die ein neutrophiles Killing fördern. Darin wurde beschrieben, dass eine zusätzliche Therapie mit spezifischen Antikörpern gegen Enterokokken-Antigen die Immunantwort bei Enterokokken-Infektionen verbessern kann [92]. Dies wurde durch die Studie von Huebner et al. 2000 bestätigt [84]. Zusätzlich zur komplementvermittelten Elimination durch opsonisierende Antikörper führte das kapsuläre Polysaccharid von *E. faecalis* 12030 zu einer Induktion der Antikörperbildung bei Mäusen [84]. Das hier verwendete Modell einer vorbestehenden Infektion zeigte eine signifikante Reduktion der Bakterienlast in Leber, Milz und Nieren bei Mäusen, die immunisiertes Kaninchenserum gegen das kapsuläre Polysaccharid erhielten, gegenüber Mäusen, die nicht-immunes Kaninchenserum erhielten. Wie schon oben beschrieben fand sich zusätzlich Protektion gegen *E. faecalis* OG1Rf und zwei Vancomycin-resistenten *E.-faecium*-Stämme [93].

In einer anderen Studie wurde die Rolle von Antikörpern, Komplementsystem und deren Interaktion mit neutrophilem Killing von Bakterien bei 11 Enterokokken-Stämmen untersucht. Die bakterizide Aktivität gegen Enterokokken war unbeeinflusst gut, aber stark herabgesetzt nach Hitzeinaktivierung des Komplements im Serum. Bei Testung der Enterokokken-Stämme mit Serum ohne Gammaglobulin oder Serum mit C4-Mangel führte dies zu einem bakteriziden Effekt durch neutrophile Granulozyten von bis zu 90 %. Spezifische Antikörper gegen Enterokokken verstärkten diesen Effekt. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass eine durch neutrophile Granulozyten

verursachte Abtötung von Enterokokken in erster Linie durch das Komplementsystem vermittelt wird und spezifische Antikörper eher eine untergeordnete Funktion haben. Ein verstärkender Effekt der Antikörper auf das Immunsystem, war jedoch zu beobachten [91].

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Enterokokkeninfektionen stellen somit ein immer größer werdendes Problem dar und ihre Therapie stößt schon heute auf immer mehr Hindernisse. Auf Grund dessen wollen wir untersuchen, ob Antikörper gegen den mutmaßlichen Virulenzfaktor AS eine Effekt haben. Hierzu sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Gibt es Unterschiede in der Organpersistenz der Enterokokken-Stämme *E. faecalis* INY3000 pINY1801 (Phänotyp AS+/BS-) und INY3000 pWM401 (Phänotyp AS-/BS-) ?
2. Kann durch passive Immunisierung die Bakterienlast in den einzelnen Organen nach Infektion mit *E. faecalis* INY3000 pINY1801 (AS+/BS-) oder *E. faecalis* INY3000 pWM401 (AS-/BS-) reduziert werden ? Hierzu soll ein vorbeschriebenes Tiermodell mit weiblichen balb/c Mäusen verwendet werden und bzgl. der Messung des Gewichtsverlustes während der Infektion erweitert werden.
3. Kann eine aktive Immunisierung die Bakterienlast in den Organen nach Infektion mit *E. faecalis* INY3000 pINY1801 (AS+/BS-) oder *E. faecalis* INY3000 pWM401 (AS-/BS-) reduzieren ? Auch hier benutzen wir ein vorbeschriebenes Tiermodell mit weiblichen balb/c Mäusen, ergänzt um die Messung des Gewichtsverlustes der Tiere.

In allen Teilen wird die Immunreaktion der Wirtstiere (Kaninchen- bzw. Mäuseantikörper) auf ASA1 mittels IgG - bzw. IgM-Titer Bestimmung im ELISA untersucht.

2 Material und Methoden

Sämtliche Materialien, Reagenzien und Rezepturen sind im Anhang in Kapitel 5.1 und 5.2 zusammengestellt.

2.1 Methoden

2.1.1 ELISA

- *Beschichten der Assay-Platten:*

Zur Messung der Antikörper-Titer bei den Versuchstieren wurden ELISA-Platten hergestellt. Lyophilisierte AS wurde im Rahmen einer thematisch verknüpften Doktorarbeit aufbereitet und für die Versuche freundlicherweise von Markus Escher zur Verfügung gestellt.

24 Stunden vor Beginn des ELISAs wurde die Assay-Platte beschichtet. Dazu wurde die lyophilisierte Aggregationssubstanz in 1 ml Sensitizing Puffer aufgelöst. Der Proteingehalt dieser Lösung wurde mit Hilfe des LOWRY-Tests (s.u.) bestimmt. Es wurde so weit verdünnt, bis man eine Konzentration von 1 mg AS / 1 ml Sensitizing Puffer erhielt. Von dieser Proteinlösung wurden 12 µl mit 12 ml Sensitizing Puffer versehen, danach gut geschüttelt. Die Assay-Platte wurde dann mit 100 µl pro Loch befüllt und 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Um ein Austrocknen der Platte zu verhindern, wurde sie in einem fest verschließbaren Behälter mit feuchten Papiertüchern (Wet Chamber) gelagert. Nach 24 Stunden Inkubation wurde der Inhalt der Platte verworfen, die Platte auf Papiertüchern trockengeklopft und schließlich mit einer Abdeckfolie verschlossen. Aus praktischen Gründen wurde immer eine größere Anzahl von Platten beschichtet und diese bei -20 °C gelagert.

- *Ablauf des ELISA:*

Zu Beginn wurden 200 µl Magermilch ohne TWEEN 20 pro Well pipettiert und 1 Stunde bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurde die Platte in einer feuchten Kammer gelagert. Danach wurde der Assay 3 Mal im ELISA-Washer mit PBS + Calcium gewaschen, dann 100 µl verdünnte Testseren pro Loch pipettiert (1. Antikörper). Als Kontrolle lief immer ein sicher positives, ein sicher negatives Kontrollserum, sowie Magermilch zur Festlegung des Schwellenwerts mit. Jede Verdünnungsstufe wurde in 2 Wells pipettiert. Dann folgte wieder 1 Stunde Inkubation bei 37 °C. Die Verdünnungsreihen der zu prüfenden Seren wurden während der ersten Stunde Inkubation hergestellt. Je nach verfügbarer Menge des Serums wurde eine 1:25, 1:50 oder 1:100 Ausgangsverdünnung erzeugt. Verdünnt wurden die Seren mit Magermilch mit TWEEN 20. Da meistens nur geringe Mengen des Serums zur Verfügung standen, wurden die Verdünnungsreihen folgendermaßen hergestellt:

1:25 Verdünnung: 480 µl Magermilch + 20 µl Serum
1:50 Verdünnung: 250 µl der 1:25 Verdünnung + 250 µl Magermilch
1:100 Verdünnung: 250 µl der 1:50 Verdünnung + 250 µl Magermilch
1:200 Verdünnung: 250 µl der 1:100 Verdünnung + 250 µl Magermilch
etc.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Assay-Platte erneut 3 Mal mit PBS + Calcium gewaschen.

Danach wurde der 2. Antikörper pipettiert: 100 µl einer 1:1000 Verdünnung pro Loch. Verdünnt wurde wieder mit Magermilch mit TWEEN 20. Als Antikörper wurde je nach zu testendem Serum bzw. Immunglobulin anti-rabbit IgG, goat-anti-mouse IgG oder goat-anti-mouse IgM verwendet. Es folgte wieder 1 Stunde Inkubation bei 37 °C, dann dreimal Waschen mit PBS plus.

Zum Schluss wurden von 100 µl Enzymlösung pro Loch dazu pipettiert (15 mg p-Nitrophenyl-Phosphat in 15 ml Substrate Puffer).

Abgelesen wurde der ELISA nach 30 und 60 Minuten bei einer Wellenlänge von 405 nm. Als Titer zählten Werte oberhalb der optischen Dichte von 0,25, was einem 2,5-fachen des Schwellenwerts entsprach. Der exakte Wert wurde durch die Berechnung des Schnittpunktes der linearen Regressionsgeraden mit $y = 0,25$ bestimmt (EXCEL) (siehe Abb. 1).

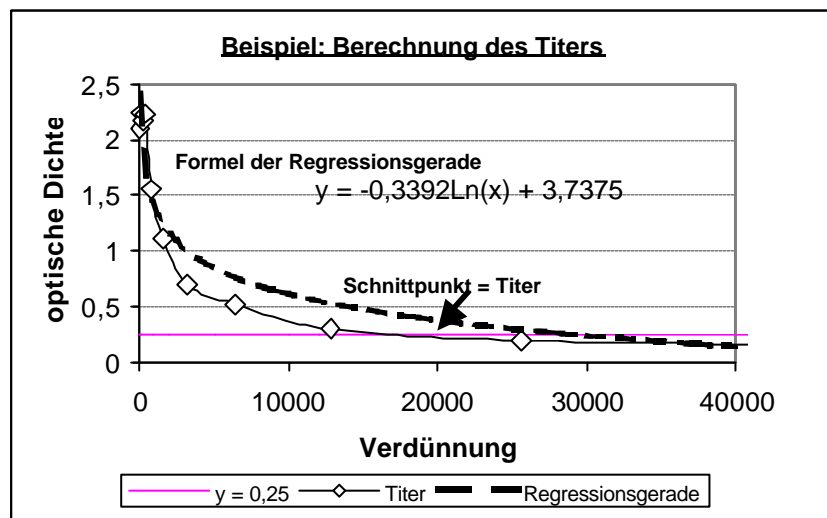


Abbildung 1: Beispiel einer Titerberechnung mit Hilfe der Regressionsgeraden (EXCEL)

2.1.2 LOWRY-Test

Der LOWRY-Test dient zur Messung des Proteingehaltes in einer Lösung. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass die Versuchstiere eine genau definierte Menge der AS bei der passiven Immunisierung erhielten.

- *Vorbereiten der Reagenzien:*

Als Standard wurden 5 Proteinlösungen und ein Nullwert wie folgt hergestellt:
 10 µg/ml, 30 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 75 µg/ml (µg BSA / ml Sensitizing Puffer), außerdem ein Nullwert ohne BSA (bovines Serumalbumin).

- *Ablauf des LOWRY-Tests:*

Zuerst wurden 100 µl der Proteinstandards, des Nullwerts und der Testlösung(en) in je ein 15 ml Röhrchen pipettiert, dann 500 µl Reagenz A hinzugefügt und beides auf dem Schüttelmixer durchmischt. Danach wurden 4,0 ml Reagenz B in jedes Röhrchen pipettiert und sofort auf dem Schüttelmixer durchmischt. Die Lösungen waren mindestens 1 Stunde stabil.

Die Absorption wurde nach 15 Minuten mit dem Spectrophotometer bei 750 nm Wellenlänge abgelesen. Der Spectrophotometer gibt die Konzentration in mg/ml an.

2.1.3 Übernachtkultur

In unseren Versuchen wurden 4 isogene Enterokokken-Mutanten verwendet. Es sind die *E.-faecalis*-Stämme INY3000 pINY1801 (Stamm 1) und INY3000 pWM401 (Stamm 2), OG1SSp pINY1801 (Stamm 3) und OG1SSp pWM401 (Stamm 4). Alle OG1SSp Stämme exprimieren die auf den Chromosomen kodierte BS. *E. faecalis* INY3000 ist ein Tn916 Transposon Mutant von OG1SSp ohne Expressierung der BS [55]. Beim Transposon Tn916 wurde durch eine Tetrazyklin-Resistenzkassette sichergestellt, dass es weiterhin im Genom verbleibt und somit das Gen für die BS ausschaltet. Durch Zugabe von Tetrazyklin (10µg/ml) zum Kulturmedium kann also auf diese Weise sichergestellt werden, dass das Transposon nicht verloren geht und BS ausgeschaltet bleibt. Diese Stämme wurden entweder mit dem Plasmid pWM401 oder mit dem Plasmid pINY1801 kombiniert. Bei dem Plasmid pWM401 handelt es sich um das leere Vektorplasmid, in das beim Plasmid pINY1801 das Gen für asc10 eingefügt wurde. Um sicher zu stellen, dass dieses Plasmid nicht verloren geht, beinhaltet das Vektorplasmid eine Resistenz gegenüber Chloramphenicol. Asc10 ist eine AS, die dem pCF10-Plasmid von *E. faecalis* entstammt. Das pCF10-Plasmid beinhaltet zusätzlich Chloramphenicol-Resistenz, welches dem Wachstumsmedium zugegeben wird

(10µg/ml) [55]. *E. faecalis* OG1SSp pINY1801 (Stamm 3) hat somit den Phänotyp AS+/BS+, *E. faecalis* OG1SSp pWM401 (Stamm 4) den Phänotyp AS-/BS+, *E. faecalis* INY3000 pINY1801 (Stamm 1) den Phänotyp AS+/BS- und schliesslich *E. faecalis* INY3000 pWM401 (Stamm 2) den Phänotyp AS-/BS-. Das unterschiedliche Verhalten bei Vorhandensein von AS und BS beim Wachstum in der Nährlösung machten wir uns bei der Phänotypisierung zu Nutze. So zeigt sich eine Klumpungsreaktion bei Wachstum von *E. faecalis* Stamm 3 alleine (AS+/BS+), aber auch bei gemeinsamem Wachstum der AS+/BS- Mutante Stamm 1 mit der AS-/BS+ Mutante Stamm 4. Bei Wachstum von *E. faecalis* Stamm 2 (AS-/BS-) alleine oder in Kombination mit den o.g. Mutanten kommt es zu keiner Klumpung [76].

Die Enterokokkenstämme wurden auf Grund des Resistenzverhaltens auf folgenden Selektiv-Nährböden 24 h bei 37 °C im Wärmeschrank angezüchtet (Tabelle2):

<i>E.- faecalis</i>-Stamm	Agar + Antibiotikum
Stamm 1	TSA + Chloramphenicol + Tetrazyklin (10µg/ml)
Stamm 2	TSA + Chloramphenicol + Tetrazyklin (10µg/ml)
Stamm 3	TSA + Chloramphenicol (10µg/ml)
Stamm 4	TSA + Chloramphenicol (10µg/ml)

Tabelle 2: Wachstum der vier *E.-faecalis*-Stämme auf TSA bei Zugabe von Chloramphenicol und ggf. in Kombination mit Tetrazyklin

Danach wurde jeder Stamm in einen Erlenmeyer-Kolben mit TSB und dem entsprechenden Antibiotikum (siehe Tabelle 2) überimpft und 24 h auf dem Thermorüttler bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert, mit sterilem Aqua bidest. resuspendiert und wieder abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 3-4 mal wiederholt bis die Pellets farblos und frei von TSB erschienen. Die gewaschenen Pellets wurden in Gefriermedium resuspendiert (entweder TSB + 10% Glycerol, oder Freeze Medium DMSO), eine Verdünnungsreihe zur Konzentrationsbestimmung angefertigt und bei -80 °C aufbewahrt (Stammlösung). Die Stammlösungen der jeweiligen Mutanten waren jeweils Ausgangspunkt der diversen Inokula.

Die vier Enterokokken-Stämme sind in der Literatur beschrieben [76] und wurden freundlicherweise von G. Dunny, Minneapolis, MN, USA zur Verfügung gestellt.

2.1.4 Bestimmung der Konzentration

Zur Bestimmung der Bakterienkonzentrationen wurden Verdünnungsreihen in TSB angefertigt. Zuerst wurden 225 µl TSB in je ein Glasröhrchen vorgelegt, dann folgte die Zugabe von 25 µl Bakteriensuspension (1:10 Verdünnung), von 25 µl 1:10 Verdünnung in 225 µl TSB (1:100 Verdünnung). In dieser Weise wurde weiter verfahren.

Von jeder Verdünnung wurden 2 x 10 µl auf TSA-Platten ausplattiert und 24 Stunden bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Dann folgte das Auszählen und das Berechnen der Ausgangskonzentration je nach ausgezählter Verdünnungsstufe. Es wurde die Verdünnungsstufe ausgezählt, in der mindestens 20 KBE gewachsen waren.

2.1.5 Phänotypisierung

Die Phänotypisierung dient zur Überprüfung der Eigenschaften der angezüchteten Bakterienstämme. Man macht sich hier das unterschiedliche Klumpungsverhalten und Resistenzverhalten der verschiedenen Stämme gegenüber Chloramphenicol und Tetrazyklin zu Nutze (Tabelle 3).

<i>E.-faecalis</i> -Stamm	Phänotyp	Klumpung	Antibiotikum
Stamm 3	AS + / BS +	+ + +	Chloramphenicol 10µg/ml
Stamm 4	AS – / BS +	–	Chloramphenicol 10µg/ml
Stamm 1	AS + / BS –	–	Chloramphenicol 10µg/ml + Tetrazyklin 10µg/ml
Stamm 2	AS – / BS –	–	Chloramphenicol 10µg/ml + Tetrazyklin 10µg/ml
Stamm 4 & Stamm 1	AS – / BS + & AS + / BS –	+ +	Chloramphenicol 10µg/ml
Stamm 4 & Stamm 2	AS – / BS + & AS – / BS –	–	Chloramphenicol 10µg/ml
Stamm 1 & Stamm 2	AS + / BS – & AS – / BS –	–	Chloramphenicol 10µg/ml + Tetrazyklin 10µg/ml

Tabelle 3: Klumpungsverhalten und Wachstum bei Chloramphenicol und Tetrazyklin der vier *E.-faecalis*-Mutanten

Die Bakterien wurden von der Platte in 5 ml TSB (steriles Glasröhrchen mit Schraubverschluss) überimpft. Auf Grund der verschiedenen Resistenzen wurde auch hier jeweils das passende Antibiotikum in das Nährmedium gegeben (siehe Tabelle 9, 10 µl Chloramphenicol und/oder Tetrazyklin pro ml TSB). Danach wurden die Röhrchen 24 Stunden bei 37 °C auf dem Thermorüttler inkubiert. Anschliessend folgte die Beurteilung der Klumpung:

- ⇒ keine Klumpung, homogene Trübung des Nährmediums, Schlieren
- + ⇒ leichte Klumpung, nicht wegschüttelbar
- ++ ⇒ starke Klumpung, nicht wegschüttelbar
- +++ ⇒ sehr starke Klumpung, nicht wegschüttelbar

2.1.6 Differenzierung

Zur weiteren Differenzierung der Bakterienkulturen von Organen wurden stichprobenartig Bakterien von Enterococcosel-Platten, sowie Bakterien, die makroskopisch suspekt oder sicher keine Enterokokken waren, insbesondere von den Blutplatten, nach Gram gefärbt und mikroskopisch beurteilt.

Zur weiteren Differenzierung wurden die Kolonien auf Mannit-Agar (Wachstum stickstoffbindender Bakterien) und Sabouraud-Agar (Spezialagar für Pilze) ausgestrichen und 24 h bei 37 °C inkubiert.

2.1.7 Inokula

Es wurden je nach Versuch diverse Inokula mit den Mutanten *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-) und *E. faecalis* Stamm 2 (AS-/BS-) zur Infektion der Mäuse hergestellt. Verwendet wurde eine Suspension aus der Bakterien-Stammlösung (Bakterien + Freeze Medium DMSO) und PBS + Calcium. Pro Versuch wurde eine Gesamtmenge von 5 - 8 ml hergestellt, die Konzentration bestimmt (siehe Verdünnungsreihen) und die Mäuse infiziert. Die injizierten I

Inokula hatten Konzentrationen von $3,2 \times 10^7$ – $1,5 \times 10^9$ koloniebildenden Einheiten.

In den Versuchsreihen sollte erarbeitet werden, ob durch Antikörper gegen AS protektive Wirkungen zu erzielen sind. Als Kontrollversuche dienten Infektionen mit dem isogenen AS-/BS- *E. faecalis* Stamm 2.

2.1.8 Infektion der Mäuse mit *E. faecalis* Stamm 1 und Stamm 2

Alle Tierversuche wurden vorab von der Tierschutzkommission begutachtet und durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Tierversuchs-Nr. A 1/99, A/10). Die Haltung der Tiere wurde gemäß den allgemeinen Vorschriften des Tierschutzgesetzes in Bezug auf Haltung, Betreuung, Ernährung und Pflege (§§1 und 2, TierSchG) und die besonderen Vorschriften für die Durchführung der Tierversuche (§§ 9 und 9a), sowie §12 der Gentechnik Sicherheitsverordnung für gentechnische Laborbereiche der Sicherheitsstufe S2 gehalten.

Als Versuchstiere wurden weibliche balb/c Mäuse mit durchschnittlichem Gewicht von 20 g verwendet (Alter: 6-8 Wochen).

Zur Infektion wurde jeder Maus 100 µl - 200 µl der Bakteriensuspension ($3,2 \times 10^7$ – $1,5 \times 10^9$) intravenös in eine Schwanzvene injiziert. Von den ersten 60 Mäusen erhielten 30 Mäuse jeweils 100 µl und 30 Mäuse 200 µl Bakteriensuspension. Die Mäuse 61 – 250 erhielten 200 µl Bakteriensuspension (entsprechend einem hohen und einem niedrigen Inokulum). Die Mäuse wurden unmittelbar nach der Infektion, täglich danach und unmittelbar vor Organentnahme gewogen. Der Gewichtsverlust wurde als klinisches Zeichen der Infektion gewertet, da insbesondere bei diesen juvenilen,

noch im Wachstum befindlichen Mäuse, ein Gewichtsverlust besonders schwerwiegend ist. Bei einem Gewichtsverlust von $> 20\%$ des Ausgangsgewichtes wurden die Mäuse mit Kohlenmonoxid euthanasiert.

Zur Injektion wurden Tuberkulinspritzen mit Einmal-Injektionskanülen 0,45 x 25 mm (oder 0,5 x 25 mm) verwendet.

Während der Injektion wurde die Maus in eine lichtundurchlässige Plastikbox gesetzt, aus der nur der Schwanz herausschaute. Um eine maximale Vasodilatation der Venen zu erreichen wurden die Mäuse vor der Injektion unter eine Infrarot-Wärmelampe gesetzt. Nach 2-3 maliger Desinfektion des Schwanzes mit Alkoholspray und Abtupfen mit einem Zellstofftupfer wurde injiziert.

2.1.9 Passive Immunisierung

Als Versuchstiere wurden ebenfalls weibliche balb/c Mäuse mit durchschnittlichem Gewicht von 20 g und einem Alter von 6-8 Wochen verwendet.

Zur passiven Immunisierung erhielt die Testgruppe, bestehend aus 5 Mäusen pro Versuch, an 3 aufeinanderfolgenden Tagen immunes Kaninchenserum (immun gegen AS, im weiteren IRS = immune rabbit serum) (siehe Abbildung 2). Bei 25 Mäusen wurde Serum mit einem Titer von 1:125002 verwendet, 15 Tiere erhielten Serum mit einem Titer von 1:40010 und 5 Mäuse erhielten Serum mit einem Titer von 1:19791. Ein Serum wurde von Herrn Dr. A. Muscholl-Silberhorn, Institut für Mikrobiologie, Universität Regensburg, hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die anderen wurden von der Firma EUROGENTEC BEL S.A., B-4040 Herstal, Belgien hergestellt. Dort wurde ein Kaninchen mit 500 μ l Antigen-Lösung (hergestellt aus aufgereinigtem His-Asa1-Protein) zusammen mit 500 μ l *Freunds*-Adjuvans immunisiert. Dieses Protein wurde uns freundlicherweise von M. Escher, der

zeitgleich an einer thematisch verwandten Doktorarbeit arbeitete, zur Verfügung gestellt. Zuvor wurde dem Kaninchen Blut abgenommen (prä-immunes Serum). Dieses wurde vor der Immunisierung des Kaninchens von uns auf das Vorhandensein präformierter Antikörper gegen AS untersucht. Weitere Injektionen mit dem His-Asa1-Protein folgten nach 14, 28, 56, 66 und 80 Tagen. Blutabnahmen erfolgten laut Standardprotokoll vor Immunisierung, nach 38 (2 ml), nach 66 (22 ml) und nach 80 Tagen (letzte Blutabnahme 50-60 ml). In Abweichung vom Standardprotokoll wurde nach 80 Tagen weiter immunisiert. Weitere Blutabnahmen folgten am Tag 94, 108, 168 und die letzte Blutabnahme am Tag 250. Als Kontrollgruppe bekamen 5 Mäuse Natriumchlorid (NaCl) und 5 Mäuse normales Kaninchenserum (im weiteren NRS = normal rabbit serum, nicht gepooltes Serum, von einem Kaninchen, keine präformierten Antikörper gegen AS). Präformierte Antikörper gegen AS wurden zuvor im ELISA ausgeschlossen. Vor Beginn der Versuche liessen wir uns verschiedene Kaninchenseren von der Firma EUROGENTEC zusenden, und testeten diese im ELISA auf evtl. schon bestehende Antikörper gegen AS. Als NRS wurde ein Kaninchenserum ohne Antikörper gegen AS ausgewählt. Dieses Tier wurde auch für die spätere Herstellung des IRS verwendet. Die Infektion mit der *E.-faecalis*-Mutante Stamm 1 bzw. Stamm 2 erfolgte 24 Stunden nach der ersten Immunisierung.

Es wurden pro Maus und Immunisierung je 150 µl Serum bzw. NaCl intravenös in die Schwanzvene injiziert. Hier waren die Kanülen mit 0,45 mm Durchmesser und 25 mm Länge am besten geeignet.

Die Mäuse wurden 5 Tage nach der Infektion zur Organentnahme getötet.

Schema passive Immunisierung:

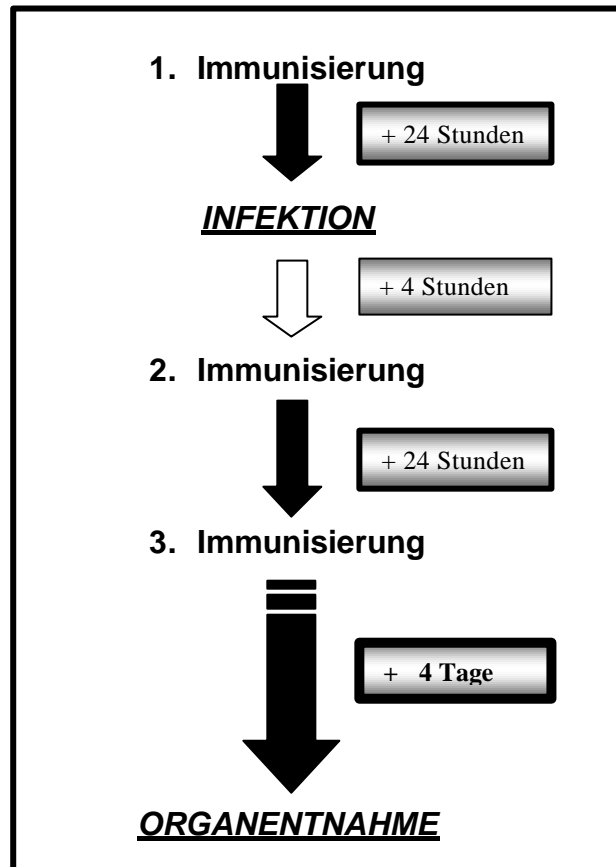


Abbildung 2: Schema passive Immunisierung

2.1.10 Aktive Immunisierung

Als Versuchstiere dienten wiederum weibliche balb/c Mäuse mit durchschnittlichem Gewicht von 20 g und einem Alter von 6-8 Wochen.

Pro Immunisierung erhielt die Testgruppe (10 Mäuse) ca. 10 µg AS in 200 µl PBS + Calcium gelöst. Die Kontrollgruppe (10 Mäuse) erhielt ca. 10 µg BSA in 200 µl PBS + Calcium gelöst.

Bei der ersten Versuchsreihe wurde 4 mal, jeweils im Abstand von 5 Tagen, intraperitoneal injiziert. Die Blutabnahmen zur Titerkontrolle (IgG, IgM) erfolgten nach der 3. und 4. Immunisierung: nach 2-3 maliger Desinfektion des Schwanzes mit Alkoholspray und Abtupfen mit einem Zellstofftupfer wurde die Schwanzvene mit einer Rasierklinge quer inzidiert und mit einer Glaskapillare ca. 70 – 100 µl Blut abgenommen. Danach wurde das Blut in der Zentrifuge zentrifugiert, das Serum abpipettiert und bei –20 °C gelagert.

Bei den übrigen Versuchsreihen wurde in gleicher Weise verfahren. Die Injektionen wurden allerdings intravenös in die Schwanzvenen durchgeführt.

Die Mäuse wurden 5 Tage nach der 4. Immunisierung intravenös mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS–) infiziert und nach weiteren 5 Tagen zur Organentnahme getötet (Abbildung 3).

Schema aktive Immunisierung:

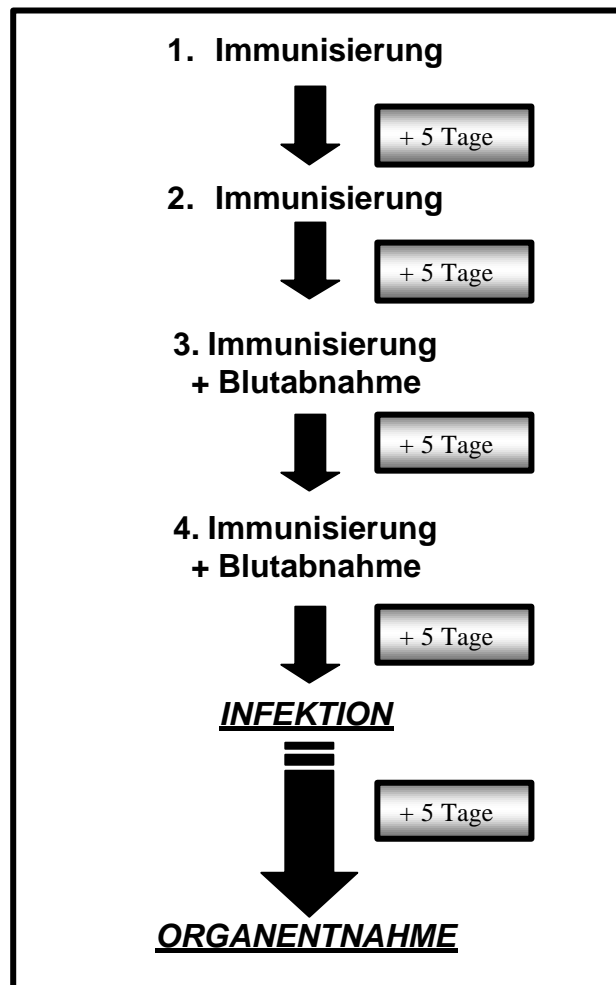


Abbildung 3: Schema aktive Immunisierung

2.1.11 Organentnahme und Aufbereitung der Organe

In Übereinstimmung mit den Vorschriften der Tierschutzkommission wurde zum Töten der Versuchstiere CO₂ verwendet. Es wurde eine Plastiktüte mit CO₂ gefüllt, die Maus in die Tüte gesetzt und diese fest verschlossen. Nach 34 Minuten wurden die Tiere gewogen und mit der Organentnahme begonnen. Dazu wurde die Maus auf einer Styroporplatte, die zuvor mit einer Plastik-Krankenunterlage abgedeckt wurde, mit Einmalkanülen an jeder Extremität fixiert. Vor Eröffnung der Maus wurde das Fell mit 80 %igem Ethanol getränkt um die Gefahr einer Kontamination mit der natürlichen Flora des Mäusefells möglichst klein zu halten. Die Dermis und das subkutane Gewebe wurde nun, beginnend von der Leistenregion der Maus eröffnet, und danach mit der Pinzette über den Kopf des Tieres gezogen. Die Organentnahme erfolgte unter sterilen Kautelen: nach jedem Schritt wurden die zuvor autoklavierten Instrumente in 80 %igen Ethanol getaucht und über dem Bunsenbrenner abgeflammt. Außerdem wurden während der Entnahme Mundschutz, Kopfschutz, Schutzkittel und Latexhandschuhe getragen.

Das Peritoneum wurde mit einem Längsschnitt eröffnet und abpräpariert. Es folgte die Thorakotomie und Blutabnahme aus dem Herzen durch Punktion in einen Ventrikel mit einer 0,45 x 25 mm Einmal-Injektionskanüle. Das Blut wurde in ein steriles 500 µl Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und 10 Minuten in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert und in ein neues, steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und bei – 4 °C eingefroren. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde es mit Hilfe des ELISAs auf Antikörper gegen AS untersucht.

Nun folgte die Entnahme des kompletten Herzens und eines Stückes der rechten Lunge. Die Organe wurden separat in 500 µl steriles TSB gegeben und steril abgedeckt. Danach wurden ein Stück des linken Leberlappens, die

gesamte Milz und die linke Niere entfernt und ebenfalls in 500 µl steriles TSB mit 0,5 g/L Polyanetholsulfonsäure gegeben und steril abgedeckt.

Nach der Sektion der Mäuse wurden die Kadaver, das Tierfutter und die Streu autoklaviert und gemäß den Richtlinien zur Entsorgung von S2-Müll entsorgt.

Zum Homogenisieren der Organe wurde die Spitze des Homogenisators in Ethanol getaucht und abgeflammt. Danach wurde jedes Organ separat homogenisiert. Die Spitze des Homogenisators wurde nach jedem Organ in autoklaviertes H₂O + Spülmittel getaucht, danach folgte ein erneutes Abflammen mit Ethanol über dem Bunsenbrenner.

Anschließend wurden 100 µl dieses TSB-Organ-Gemisches auf Enterococcosel- und TSB + 5% Schafblut-Platten ausgestrichen und 48 h bei 37 °C inkubiert. Die Lunge wurde nur bei den ersten Versuchen auf beiden Platten ausgestrichen. Später hingegen wurden nur noch Enterococcosel-Platten verwendet, da auf den Schafblut-Platten auch die natürliche Flora des Respirationstraktes anwuchs und so die Auswertung unmöglich machte bzw. diese verfälschte. Die Organ-Suspensionen wurden bei 4 °C im Kühlschrank bis zur endgültigen Auswertung aufbewahrt, danach wie die Kadaver entsorgt.

Nach Inkubation wurden die koloniebildenden Einheiten (KBE) auf den Platten ausgezählt und für die spätere Auswertung auf ein Gramm Organgewicht (KBE/g) hochgerechnet. War das Auszählen auf Grund zu zahlreichen Wachstums nicht möglich, wurden weitere Verdünnungsreihen (s.o.) hergestellt und so die Anzahl der KBE bestimmt. Ergaben sich unterschiedliche KBE bei der Auszählung der Enterococcosel- und der Schafblutplatten, so verwendeten wir das Ergebnis der Enterococcoselplatte, da hier ein Wachstum anderer Spezies bis auf wenige Ausnahmen i.S. einer sekundären Verunreinigung nicht vorkommt.

2.1.12 Statistische Auswertung

2.1.12.1 Unterschied zwischen Infektion mit AS+ und AS– Mutanten

In einer Varianzanalyse (ANOVA) wurde untersucht, ob der Organbefall der Nieren (\log_{10} (KBE+1/g)) sich bei Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 und mit *E. faecalis* Stamm 2 bzw. bei der Höhe des gewählten Inokulums (\log_{10} 2×10^7 und \log_{10} 4×10^7) voneinander unterscheidet. Außerdem wurde eine Wechselwirkung zwischen dem Inokulum (\log_{10}) und der jeweiligen Mutante berücksichtigt. Als signifikant wurden Werte mit $p \leq 0,05$ erachtet.

2.1.12.2 Unterschied zwischen der passiven Immunisierung mit NRS, IRS und der NaCl-Kontrollgruppe

In einer Varianzanalyse (ANOVA) wurde untersucht ob sich der Organbefall der Leber, der Milz und der Nieren (\log_{10} (KBE+1/g)) bei Immunisierung mit IRS und NRS und der NaCl-Kontrollgruppe unterscheidet. Mit dem non-parametrischen Mann-Whitney U-Test wurde der Unterschied im Organbefall in Herz und Lunge (\log_{10} (KBE+1/g)) bei den verschiedenen passiven Immunisierungen berechnet, da hier keine Normalverteilung der Werte vorlag (Signifikanz bei $p \leq 0,05$).

Weiterhin wurde mit dem ANOVA-Test der Unterschied im Organbefall bei Infektion der Mäuse mit hohem bzw. niedrigem Inokulum und der Gewichtsverlust der Tiere als Prozent des Ausgangsgewichts berechnet. Auch hier galten p-Werte $\leq 0,05$ als signifikant.

Für die graphische Darstellung des Organbefalls wurde der Median und der \log_{10} (KBE+1/g) der Absolutwerte der koloniebildenden Einheiten pro Gramm Organgewicht verwendet.

Bei der graphischen Darstellung der Körpergewichte am Tag der Infektion und am Tag der Organentnahme wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen verwendet.

2.1.12.3 Auswertung bei aktiver Immunisierung mit AS und der BSA-Kontrollgruppe

In einer Varianzanalyse (ANOVA) wurde untersucht ob sich der Organbefall der Leber, der Milz und den Nieren ($\log_{10} (\text{KBE}+1/\text{g})$) bei der aktiven Immunisierung mit AS und BSA als Kontrollgruppe unterscheidet. Mit dem non-parametrischen Mann-Whitney U-Test wurde der Unterschied im Organbefall in Herz und Lunge ($\log_{10} (\text{KBE}+1/\text{g})$) bei den verschiedenen aktiven Immunisierungen berechnet, da hier, wie auch bei der passiven Immunisierung, keine Normalverteilung der Werte vorlag. Als signifikant galten wiederum p-Werte $\leq 0,05$.

Die graphische Darstellung erfolgte wie unter 2.1.12.2 beschrieben.

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche

3.1.1 Interaktion von AS mit BS

Das Klumpungsverhalten der verschiedenen Mutanten unterscheidet sich auf Grund der Expression der Oberflächenproteine AS und BS. Die Exprimierung der AS ist abhängig vom Vorhandensein des Plasmids pINY1801 mit dem Gen für die AS, bzw. dem Vektorplasmid pWM401 ohne das Gen für die AS. Die BS wird von den *E. faecalis* OG1SSp-Stämmen exprimiert. Bei den *E. faecalis* INY3000 – Stämmen fehlt das Gen für die BS [55]. Bei Vorhandensein von nur einem bzw. keinem der Proteine kam es bei Wachstum in der Nährlösung TSB zu keiner Klumpung [76]. Dies war bei den Mutanten *E. faecalis* Stamm 1, Stamm 2 und Stamm 4 der Fall.

<i>E.-faecalis</i> -Stamm	Ausgangskonzentration Stammlösungen [cfu/ml]	Phänotyp
Stamm 1	$5,07 \cdot 10^9$	AS+ BS–
Stamm 2	$3,97 \cdot 10^9$	AS– BS–
Stamm 3	$2,94 \cdot 10^9$	AS+ BS+
Stamm 4	$3,27 \cdot 10^9$	AS– BS+

Tabelle 4: Konzentration der Stammlösungen

Die Bakterien sedimentierten nach 24 h Inkubation bei 37 °C auf dem Thermorüttler an der Basis der Glasröhrchen. Durch leichtes Schütteln erhielt man eine homogene Trübung der Nährlösung. Es kam zu keiner Klumpungsreaktion. Im Gegensatz dazu kam es bei Anzüchten von *E. faecalis* Stamm 3 unter denselben Bedingungen zur Ausfällung dicker Flocken, die auch

durch starkes Schütteln nicht zur homogenen Trübung des TSB führten. Auch im Nativpräparat unter dem Lichtmikroskop ließ sich die unterschiedliche Klumpung beobachten. So fanden sich bei *E. faecalis* Stamm 3 Konglomerate von zusammengelagerten Bakterien. Die anderen Mutanten lagen vereinzelt und locker verteilt. Somit wurde wiederholt sichergestellt, dass die korrekten Mutanten für die Experimente verwendet wurden.

Um eine homogene Verteilung der Bakterien (insbesondere bei *E. faecalis* Stamm 3) bei Herstellung der verschiedenen Aliquots, Inokula, etc. zu erreichen, wurde nun versucht, die Klumpung durch Verdünnung der Stammlösung auf 1:10 mit TSB und anschließender Behandlung mit dem Schüttelmixer und/oder Behandlung mit dem Ultraschall-Homogenisator zu verhindern bzw. aufzulösen.

Zuerst wurden die Mutanten unverdünnt 2 Minuten auf dem Schüttelmixer durchmischt. Bei allen 4 Mutanten war das lichtmikroskopische Bild danach unverändert: *E. faecalis* Stamm 3 lag in Klumpen, die anderen Mutanten immer noch vereinzelt.

Die Behandlung der unverdünnten Stammlösungen je 2, 4 und 6 Minuten mit dem Ultraschall-Homogenisator zeigte wiederum das gleiche Bild.

Nun wurde die Stammlösung im Verhältnis 1:10 mit sterilem TSB verdünnt und wiederum 2 Minuten auf dem Schüttelmixer durchmischt. Auch hier kam es nicht zum Auflösen der Klumpen bei *E. faecalis* Stamm 3.

Schließlich wurden die verdünnten Stammlösungen je 2, 4 und 6 Minuten mit dem Ultraschall-Homogenisator behandelt. Es zeigte sich, dass schon 2 Minuten Ultraschall ausreichten um bei *E. faecalis* Stamm 3 die Verklumpung aufzulösen.

Danach wurde erneut eine Verdünnungsreihe angelegt, um zu zeigen, dass die Bakterien auch nach Behandlung mit Ultraschall weiterhin vital und vermehrungsfähig waren, und nicht durch die Hitzeentwicklung bei der Behandlung abgetötet wurden. Die Ausgangskonzentrationen stimmten danach

weiterhin mit den bereits ermittelten Konzentrationen überein (auf Grund der 1:10 Verdünnung um eine Zehnerpotenz niedriger). Dies war bei allen Mutanten der Fall.

Das Klumpungsverhalten der einzelnen Mutanten untereinander machte man sich bei der Phänotypisierung zu Nutze. So fand sich bei gemeinsamer 24-stündiger Inkubation von *E. faecalis* Stamm 4 und Stamm 1, entsprechend dem Vorhandensein beider für die Klumpung benötigter Oberflächenproteine AS und BS, eine Klumpung, die annähernd der von *E. faecalis* Stamm 3 allein entsprach.

Zusammenfassend zeigten die Vorversuche, dass das Schütteln auf dem Schüttelmixer für 2 Minuten, gefolgt von einer 2-minütigen Behandlung mit dem Ultraschallhomogenisator ausreichten, die Klumpungsreaktion der AS+/BS+ Mutante aufzulösen. Während der Ultraschallbehandlung kam es nicht zu einer thermischen Schädigung und somit zu einer Abnahme der Ausgangskonzentration. Dieses Verfahren wurde standardisiert in den folgenden Versuchen beibehalten.

3.1.2 Resistenzverhalten gegen Chloramphenicol und Tetrazyklin

Durch das unterschiedliche Klumpungsverhalten, zusammen mit dem Resistenzverhalten bei Anwesenheit der Antibiotika Chloramphenicol und Tetrazyklin, ließen sich die einzelnen Mutanten phänotypisch bestimmen.

Die Resistenz der *E. faecalis*-INY3000 Stämme gegen Tetrazyklin beruht auf dem Vorhandensein des Transposons Tn916 [55].

Das beste Ergebnis erhielten wir bei Zugabe von 10µl Chloramphenicol bzw. 5µl Tetrazyklin pro ml TSB und nachfolgender 24-stündiger Inkubation bei

37 °C auf dem Thermorüttler. Bei höheren Antibiotika-Konzentrationen kam es zum Teil zur Hemmung des gesamten Wachstums der Bakterien und zu uneinheitlichen Ergebnissen.

Auf diese Art und Weise wurden nach jedem Tierversuch die aus den Organen angezüchteten Enterokokken inkubiert und das Klumpungsverhalten beurteilt.

In den folgenden Tierversuchen wurden die AS+/BS- Mutante *E. faecalis* Stamm 1 und als Kontrolle die AS-/BS- Mutante *E. faecalis* Stamm 2 zur Infektion der Mäuse verwendet. Stichprobenartig wurden einzelne koloniebildende Einheiten (KBE) zur Phänotypisierung verwendet. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass es sich um die injizierten Enterokokken-Mutante handelte. Entsprechend der obigen Tabelle ließen sich die einzelnen Stämme identifizieren. Bei Ausbleiben des jeweils typischen Klumpungsverhaltens wurde eine weitere Differenzierung zur Bestimmung des Phänotyps durchgeführt. Dieses wurde durch unterschiedliche Kombinationen der *E.-faecalis*-Mutanten mit jeweils unterschiedlicher Expressierung der AS und BS erreicht. Erbrachte dies keine weitere Klärung folgte die mikroskopische Beurteilung nach Gram-Färbung und Anzüchten auf verschiedenen Selektivnährmedien zur Klärung ob es sich überhaupt um Enterokokken handelte

3.1.3 Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 und Stamm 2

Die Infektion mit den Mutanten *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-) und Stamm 2 (AS-/BS-) diente um herauszufinden, ob eine Infektion mit der AS+ und der AS- Mutante zu unterschiedlichen Organmanifestationen bzw. Organpersistenzen und zu unterschiedlichem Gewichtsverlust führen. Dies ist für die folgenden Versuche zum Vergleich der Immunisierungen wichtig, denn die AS- Mutante dient hier als Kontrollgruppe. Außerdem sollte untersucht werden, ob innerhalb der Versuchsperiode eine eigene Antikörperantwort der Mäuse als IgM- bzw. IgG-Antikörperproduktion erfolgt.

Weiterhin sollte der Unterschied bei Gabe eines hohen und eines niedrigen Inokulums untersucht werden. Beim niedrigen Inokulum wurden Konzentrationen von $3,2 \times 10^7$ bis $8,4 \times 10^8$, beim hohen Inokulum Konzentrationen von $6,4 \times 10^7$ bis $1,8 \times 10^9$ verwendet. Dies geschah im Hinblick auf die späteren Immunisierungsversuche.

Untersucht wurde bei jeder Maus Blut, die rechte Lunge, das Herz, ein Stück des linken Leberlappens, die Milz und die linke Niere. Die Bakterien wurden auf Enterococcosel- und TSB mit 5 % Schafblut-Agar angezüchtet. Die Untersuchung der Lunge ergab dabei, dass auf dem TSB + 5% Schafblut-Agar die Beurteilung des Enterokokken-Wachstums auf Grund der normalen Flora des Respirationstraktes nicht mehr möglich war. Auf Grund dessen wurde das Lungengewebe nur noch auf Enterococcosel-Platten ausplattiert.

Neben den injizierten Enterokokken fanden sich *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* ssp., *Bacillus* ssp., nicht weiter differenzierte *Micrococcus* ssp. sowie bei 8 Mäusen *Candida* ssp., insbesondere in den Lungen.

Mäuse, bei denen es Probleme bei der intravenösen Gabe des Inokulums gab, wurden aus der Versuchsreihe genommen. Dies beinhaltete Tiere, bei denen es trotz wiederholter Injektion nicht gelang, die Vene zu punktieren und somit das Inokulum intravenös zu injizieren. So wurden 27 Mäuse mit *E. faecalis* Stamm 1 und 26 Mäuse mit *E. faecalis* Stamm 2 infiziert.

3.1.4 Organmanifestation

3.1.4.1 IgG- und IgM-Titer

Bei jeder Maus wurde unmittelbar vor der Infektion, sowie unmittelbar vor Organentnahme Blut aus der Schwanzvene abgenommen und mittels ELISA auf IgM-, bei 5 Mäusen zusätzlich auf IgG-Antikörper gegen AS untersucht.

Bei der AS+/BS- Mutante *E. faecalis* Stamm 1 und bei der AS-/BS- Mutante *E. faecalis* Stamm 2 wurden weder IgM- noch IgG-Antikörper gegen AS gefunden (Verdünnung <1:50).

3.1.4.2 Blut

Nach Infektion mit AS+/BS- Mutante *E. faecalis* Stamm 1 fanden sich bei 7 von 27 Mäusen (26 %) Enterokokken in der Blutbahn. Die Anzahl der Bakterien differierte zwischen 7 und 360 KBE / ml Blut (Median=0).

Bei Infektion mit der AS-/BS- Mutante *E. faecalis* Stamm 2 fanden sich bei 6 von 26 Mäusen (23 %) Enterokokken. Hier fanden sich zwischen 7 und 750 KBE /ml Blut (Median=0). Es fand sich beim Vergleich der \log_{10} (KBE+1/ml) im Blut kein signifikanter Unterschied zwischen Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 und Stamm 2 ($p=0,8588$, Mann-Whitney U, siehe Abbildung 4).

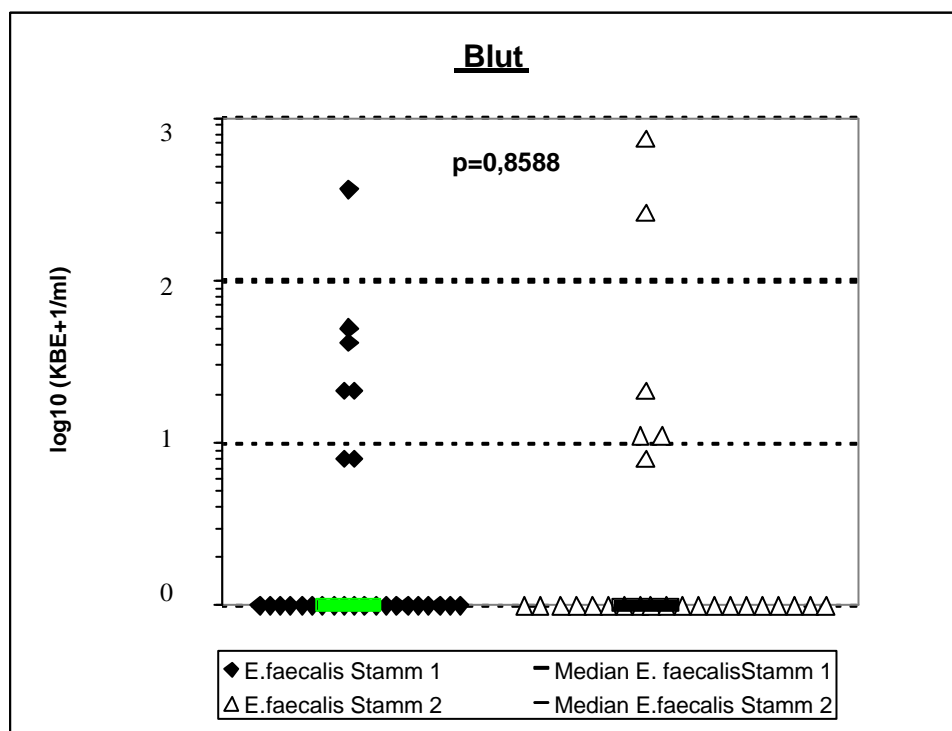


Abbildung 4: Vergleich der \log_{10} (KBE+1/ml) Blut nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-) und Stamm 2 (AS-/BS-)

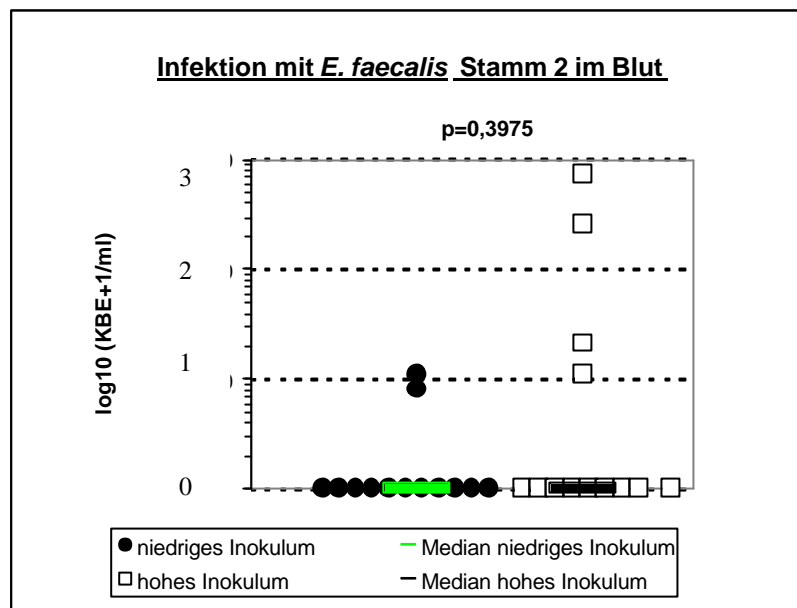


Abbildung 6: Vergleich der log₁₀ (KBE+1/ml) Blut bei Infektion mit verschieden hohen Inokula von *E. faecalis* Stamm 2 (AS-/BS-)

Weiterhin fanden sich bei 3 Mäusen, die mit *E. faecalis* Stamm 1 infiziert wurden andere Bakterienspezies. Zweimal handelte es sich um jeweils 1 KBE nicht weiter differenzierter Mikrokokken und einmal fanden sich 36 KBE *Staphylococcus aureus*, jeweils bezogen auf 100 μ l Blut.

Bei den mit *E. faecalis* Stamm 2 infizierten Mäusen, fanden sich bei zwei Mäusen je 1 KBE nicht weiter differenzierter Mikrokokken. Es muss offen bleiben, ob dies auf eine Kontamination bei der Infektion zurückzuführen war. Dafür spricht, dass nach den Vorversuchen, und somit auch nach Verfeinerung und Verbesserung der Technik, das Problem von Fremdkeimen nicht mehr aufgetreten ist.

3.1.4.3 Herz

Im Herz fanden wir bei den mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-) infizierten Tieren 15 (56 %) mit und 12 (44 %) ohne Enterokokken im Herz. Unter den 15 Mäusen mit Nachweis von *E. faecalis* Stamm 1 befanden sich 3 Tiere bei denen, neben der Enterokokken-Mutante, zwischen 1 und 74 KBE Mikrokokken gefunden wurden (Median=0). Bei 2 Tieren wurden 2 bzw. 4 KBE Mikrokokken gefunden. Bei den mit *E. faecalis* Stamm 2 (AS-/BS-) infizierten Mäusen hatten 15 Mäuse (58 %) Enterokokken im Herz, bei 11 Mäusen (42 %) fand sich kein Bakterienwachstum. Die Spannweite lag zwischen 50 und $1,6 \times 10^5$ KBE/g Organgewicht (Median=54, siehe Abbildung 9). Hier fanden sich keine anderen, außer den injizierten Bakterien.

Bei der Untersuchung der Herzen ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den \log_{10} (KBE+1/g) der *E. faecalis*-Mutanten Stamm 1 und Stamm 2 ($p=0,4822$, Mann-Whitney U, siehe Abbildung 7).

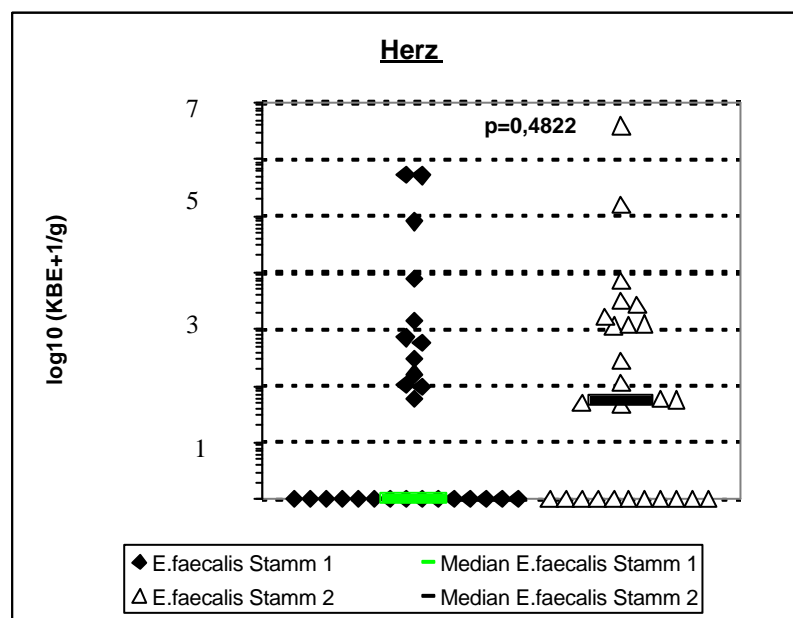


Abbildung 7: Vergleich der \log_{10} (KBE+1/g) im Herz nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-) und Stamm 2 (AS-/BS-)

Der Unterschied bei der Infektion mit dem niedrigem und dem hohen Inokulum war mit $p=0,9611$ bei Vorhandensein der AS für *E. faecalis* Stamm 1 (Mann-Whitney U) nicht signifikant. Der Median betrug für das niedrige, sowie das hohe Inokulum 0 (siehe Abbildung 8).

Bei Mutante *E. faecalis* Stamm 2 ohne Expressierung der AS war der Unterschied ebenfalls nicht signifikant ($p=0,1910$, Mann-Whitney U, Median niedriges Inokulum=280, Median hohes Inokulum=0, siehe Abbildung 9).

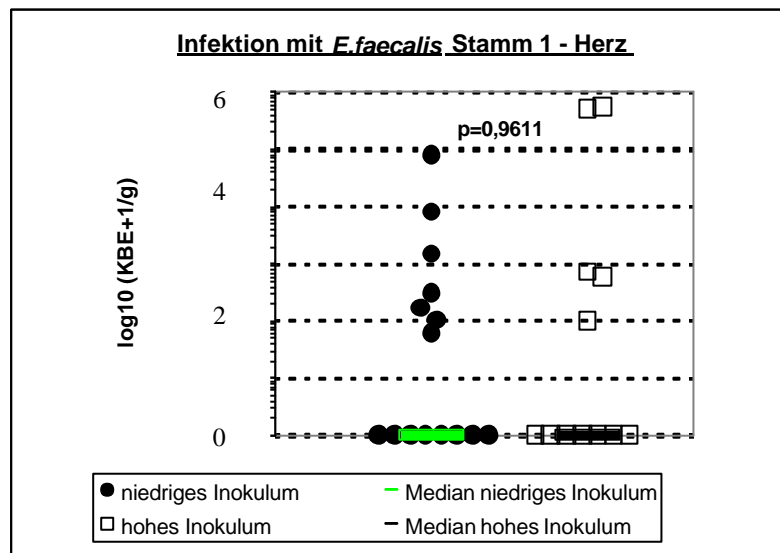


Abbildung 8: Vergleich der log₁₀ (KBE+1/g) im Herz bei Infektion mit verschieden hohen Inokula von *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-)

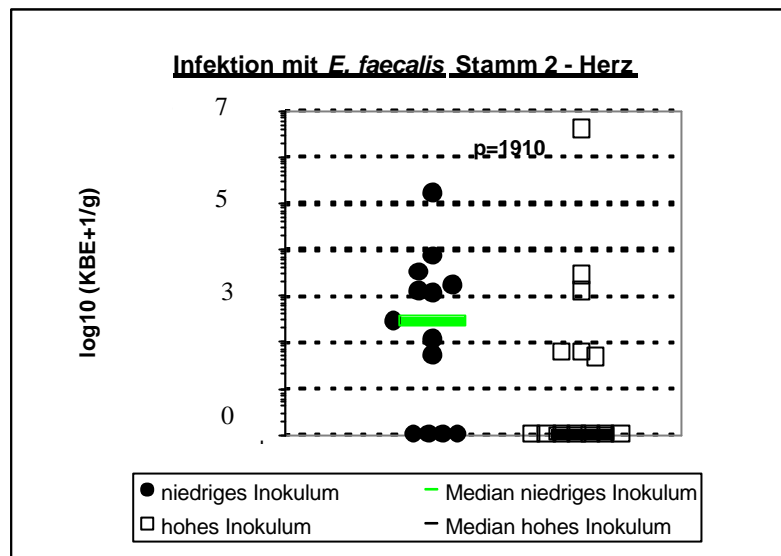


Abbildung 9: Vergleich der $\log_{10}(\text{KBE}+1/\text{g})$ im Herz bei Infektion mit verschiedenen hohen Inokula von *E. faecalis* Stamm 2 (AS-/BS-)

3.1.4.4 Lungen

Untersucht wurde jeweils ein Stück des rechten Lungenflügels. Die AS+/BS- Mutante *E. faecalis* Stamm 1 wuchs bei 21 Mäusen (78 %). 6 Mäuse (22 %) hatten keine Enterokokken in der Lunge. Die absoluten Zahlen an KBE/g Organengewicht betrug bei den Tieren mit Organbefall zwischen 30 und 5×10^3 (Median=198).

Bei den Tieren, die mit *E. faecalis* Stamm 2 (AS-/BS-) infiziert wurden, fanden sich die Bakterien bei 12 Tieren (46 %) in der Lunge wieder. Bei 14 Tieren (54%) waren keine Enterokokken zu finden. Hier belief sich die Zahl der gewachsenen KBE/g Organengewicht zwischen 90 und 4×10^3 (Median=98).

Wiederum war hier kein signifikanter Unterschied zwischen den $\log_{10}(\text{KBE}+1/\text{g})$ von *E. faecalis* Stamm 1 und Stamm 2 zu finden (siehe Abbildung 10). Der Unterschied betrug $p=0,3021$ (Mann-Whitney U).

Als Nebenbefund wuchsen auf dem TSB + 5 % Schafblut-Agar häufig zahlreiche andere Bakterienkolonien, deren Differenzierung *Staphylococcus*

aureus, *Staphylococcus epidermidis* und weitere nicht näher differenzierte Mikrokokken ergab.

Dies führte dazu, dass die Lungen im weiteren nur noch auf Enterococcusel-Platten ausplattiert wurden.

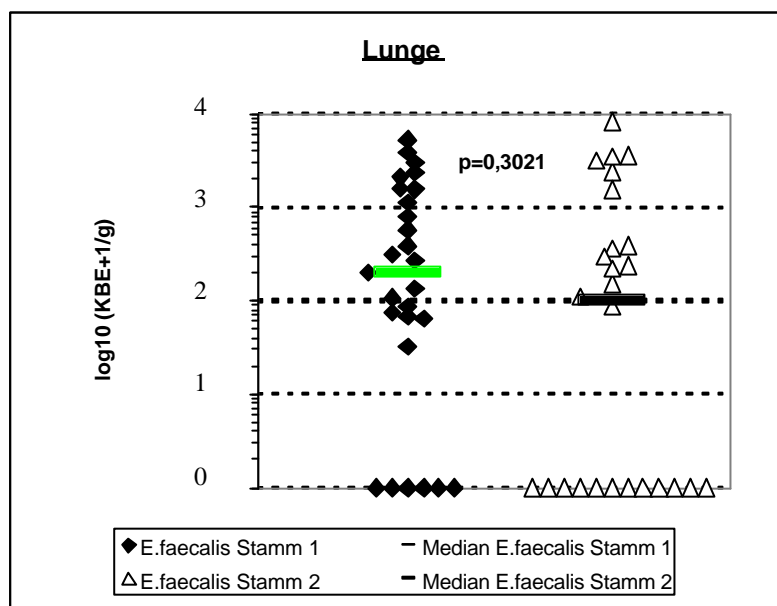


Abbildung 10: Vergleich der $\log_{10}(\text{KBE}+1/\text{g})$ in der Lunge nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-) und Stamm 2 (AS-/BS-)

Auch der Vergleich der $\log_{10}(\text{KBE}+1/\text{g})$ zwischen hohem und niedrigem Inokulum ergab keinen signifikanten Unterschied (siehe Abbildung 11). Bei *E. faecalis* Stamm 1 betrug der Unterschied $p=0,1073$ (Mann-Whitney U, Median niedriges Inokulum=110, Median hohes Inokulum=0). Bei *E. faecalis* Stamm 2 betrug der Unterschied $p=0,7196$ (Mann-Whitney U, Median niedriges Inokulum=66, Median hohes Inokulum=419, siehe Abbildung 12).

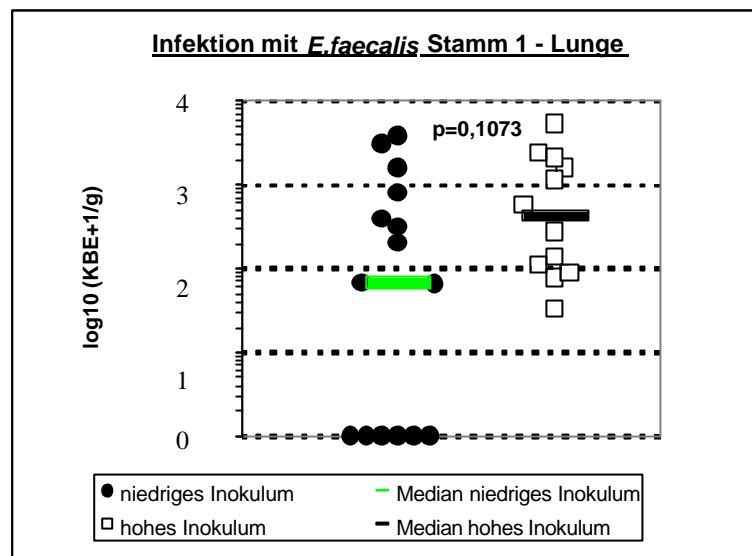


Abbildung 11: Vergleich der $\log_{10} (\text{KBE}+1/\text{g})$ in der Lunge bei Infektion mit verschiedenen hohen Inokula von *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-)

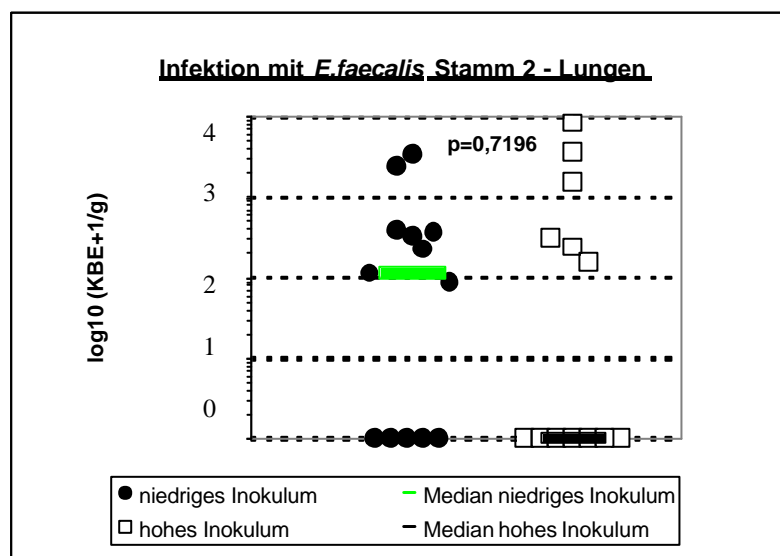


Abbildung 12: : Vergleich der $\log_{10} (\text{KBE}+1/\text{g})$ in der Lunge bei Infektion mit verschiedenen hohen Inokula von *E. faecalis* Stamm 2 (AS-/BS-)

3.1.4.5 Leber

Es fand sich bei Infektion mit der AS+/BS- Mutante *E. faecalis* Stamm 1 bei 23 Tieren (85 %) ein Organbefall. Dieser betrug zwischen 100 und 9×10^3 KBE/g Organgewicht (Median=952). Bei 4 von 27 Mäusen (15 %) war das untersuchte Lebergewebe steril.

Bei Infektion mit der AS-/BS- Mutante *E. faecalis* Stamm 2 war nur in einem Fall das Gewebe steril. Bei 25 Tieren (96 %) war ein Organbefall mit der Mutante nachzuweisen. Diese Mäuse hatten zwischen 30 und 2×10^5 KBE/g Organgewicht (Median=2886). Die \log_{10} (KBE+1/g) in der Leber unterschied sich somit mit $p=0,1007$ zwischen beiden Mutanten nicht signifikant (ANOVA, siehe Abbildung 13).

Wiederum fanden sich in geringem Maße andere Mikroorganismen. Bei den mit *E. faecalis* Stamm 1 fanden sich Candida (1 KBE/100 μ l), Streptokokken (16 KBE/100 μ l), Bacillus (1 KBE/100 μ l) und *Staphylococcus aureus* (1 KBE/100 μ l).

Bei den mit *E. faecalis* Stamm 2 infizierten Tieren fanden sich Candida (1 KBE/100 μ l) und *Staphylococcus aureus* (1 KBE/100 μ l).

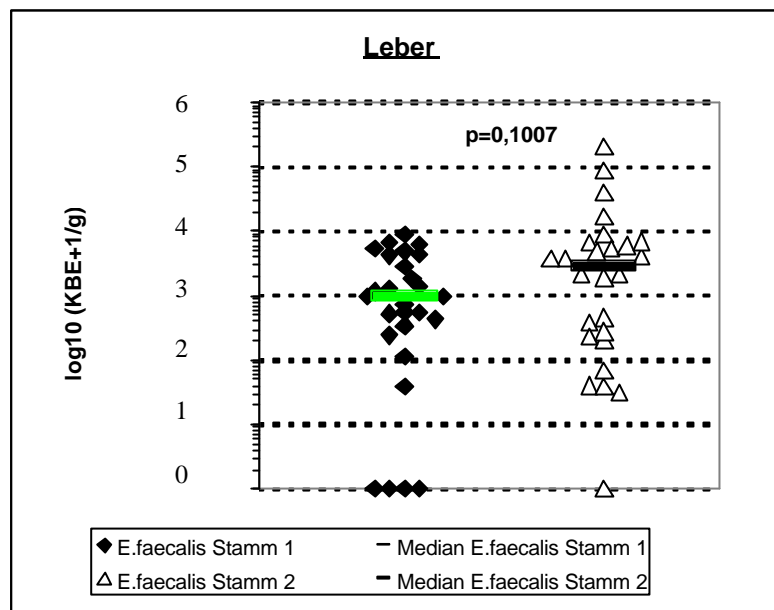


Abbildung 13: Vergleich der $\log_{10}(\text{KBE}+1/\text{g})$ in der Leber nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-) und Stamm 2 (AS-/BS-)

Der Unterschied bei Gabe eines hohen und eines niedrigen Inokulums ergab bei Vergleich der $\log_{10}(\text{KBE}+1/\text{g})$ bei beiden Mutanten keinen signifikanten Unterschied. Bei *E. faecalis* Stamm 1 betrug dieser $p=0,9272$ (ANOVA, Median niedriges Inokulum=1253, Median hohes Inokulum=549, siehe Abbildung 14) bei *E. faecalis* Stamm 2 $p=0,1147$ (ANOVA, Median niedriges Inokulum=1900, Median hohes Inokulum=4821, siehe Abbildung 15).

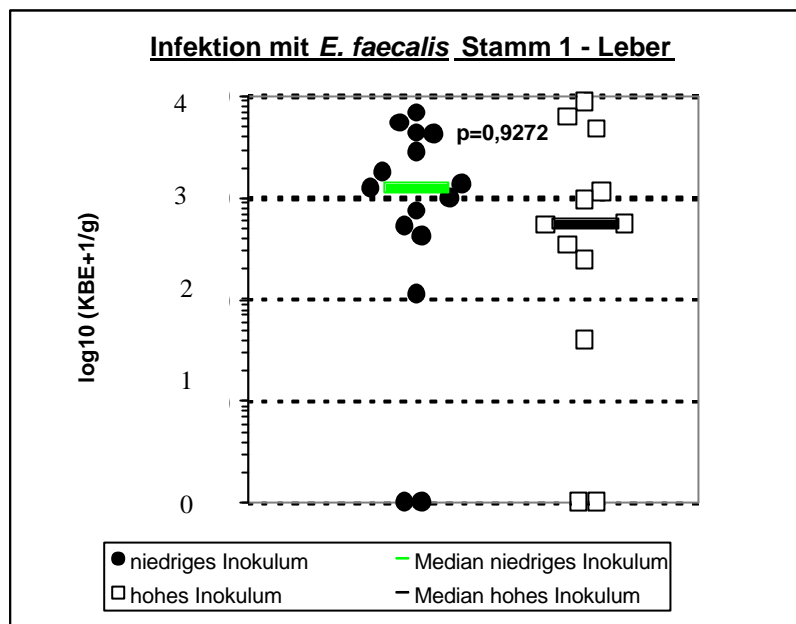


Abbildung 14: Vergleich der $\log_{10} (\text{KBE}+1/\text{g})$ in der Leber bei Infektion mit verschiedenen hohen Inokula von *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-)

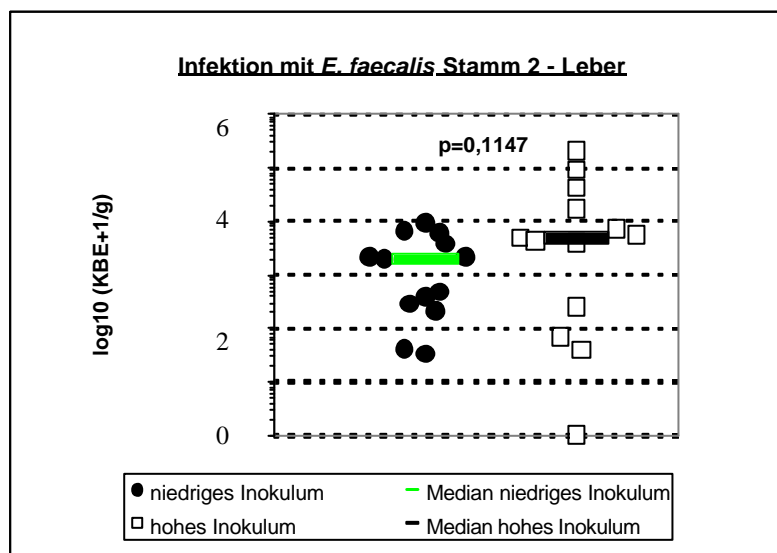


Abbildung 15: Vergleich der $\log_{10} (\text{KBE}+1/\text{g})$ in der Leber bei Infektion mit verschiedenen hohen Inokula von *E. faecalis* Stamm 2 (AS-/BS-)

3.1.4.6 Milz

Nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-) fanden sich bei 21 Tieren (78 %) Enterokokken in der Milz wieder. Es fanden sich zwischen 40 bis $1,3 \times 10^6$ KBE/g Organgewicht (Median=167). Bei 6 Tieren (22 %) wurden keine Bakterien gefunden. Bei zwei Mäusen fanden sich Gram-positive Kokken (1 KBE bzw. 15 KBE), die aber kein Wachstum auf dem Enterococcosel-Agar zeigten.

Die Infektion mit *E. faecalis* Stamm 2 (AS-/BS-) zeigte in 19 Fällen (73 %) Organabsiedlungen in der Milz. Hier wuchsen zwischen 30 und 8×10^4 KBE/g Organgewicht (Median=105). Bei 7 Mäusen (27 %) war die Milz steril. Andere Mikroorganismen wuchsen hier nicht.

Somit unterschied sich das Wachstum der \log_{10} (KBE+1/g) in den Milzen nicht signifikant voneinander. Der ANOVA-Test ergab für den Unterschied einen p-Wert von 0,3523 (siehe Abbildung 16).

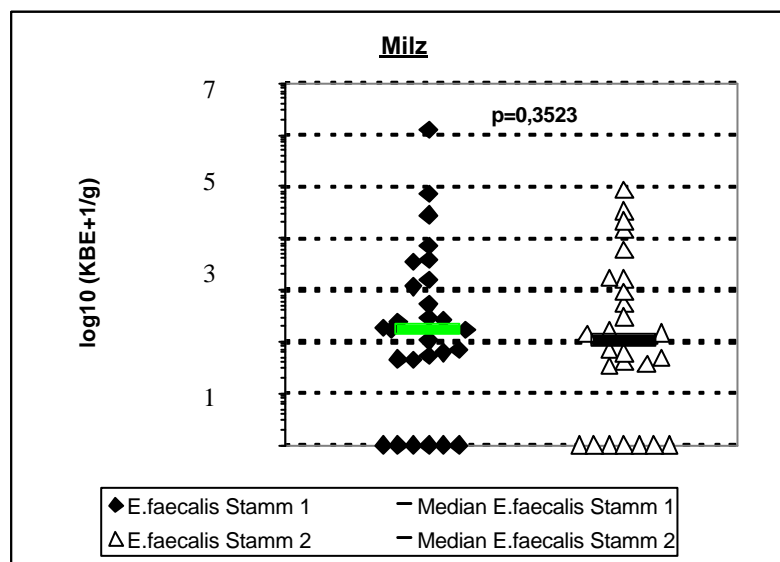


Abbildung 16: Vergleich der \log_{10} (KBE+1/g) in der Milz nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-) und Stamm 2 (AS-/BS-)

Der statistische Unterschied zwischen hohem und niedrigem Inokulum betrug bei Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 $p=0,2831$ (ANOVA, Median niedriges Inokulum=105, Median hohes Inokulum=402, siehe Abbildung 17), bei Infektion mit *E. faecalis* Stamm 2 $p=0,5406$ (ANOVA, Median niedriges Inokulum=165, Median hohes Inokulum=33, siehe Abbildung 18). Somit gab es bei beiden Mutanten keinen signifikanten Unterschied bei Injektion eines hohen bzw eines niedrigen Inokulums.

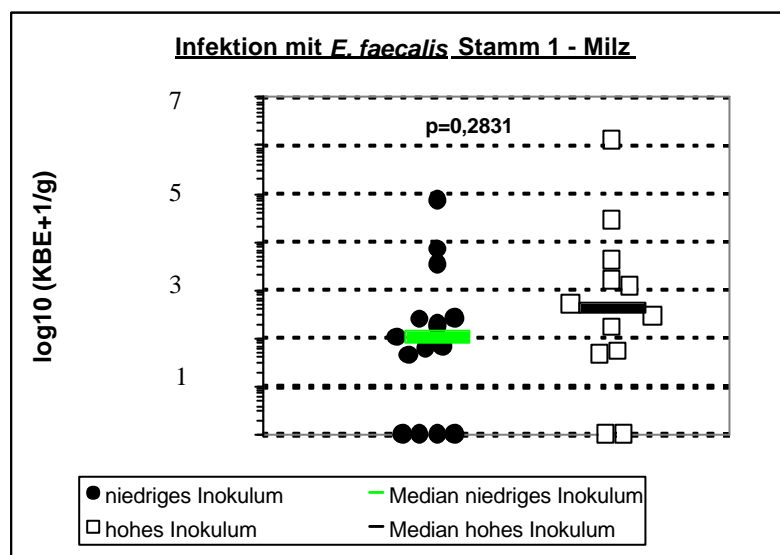


Abbildung 17: Vergleich der \log_{10} (KBE+1/g) in der Milz bei Infektion mit verschiedenen hohen Inokula von *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-)

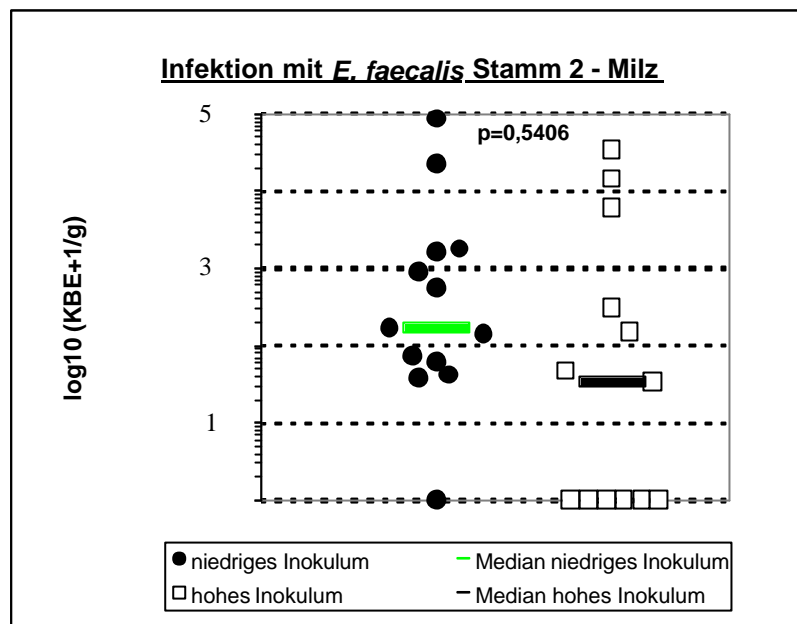


Abbildung 18: : Vergleich der log₁₀ (KBE+1/g) in der Milz bei Infektion mit verschiedenen hohen Inokula von *E. faecalis* Stamm 2 (AS-/BS-)

3.1.4.7 Niere

Nach Infektion mit den AS-exprimierenden *E. faecalis* Stamm 1 waren nur 3 Mäuse (11 %) ohne bakterielle Absiedlungen in der Niere. Bei den anderen 24 (89 %) fanden sich zwischen 70 als niedrigster Befall, und $1,2 \times 10^7$ KBE/g Organgewicht als höchster Organbefall (Median=126699). Andere Mikroorganismen wuchsen hier nicht.

Die Infektion mit *E. faecalis* Stamm 2, also ohne Expressierung des AS, ergab nur ein Tier ohne Nierenbefall. 25 Tiere (96 %) hatten die Mutante im Nierengewebe. Das Tier mit den wenigsten Bakterien hatte 30 KBE/g Organgewicht, das Tier mit der höchsten Anzahl an Bakterien $2,5 \times 10^7$ KBE/g Organgewicht (Median=129636). Bei einer Maus fanden sich 3 Kolonien *Staphylococcus aureus*.

Der Unterschied der log₁₀ (KBE+1/g) zwischen beiden Mutanten war nicht signifikant (p=0,916, ANOVA, siehe Abbildung 19).

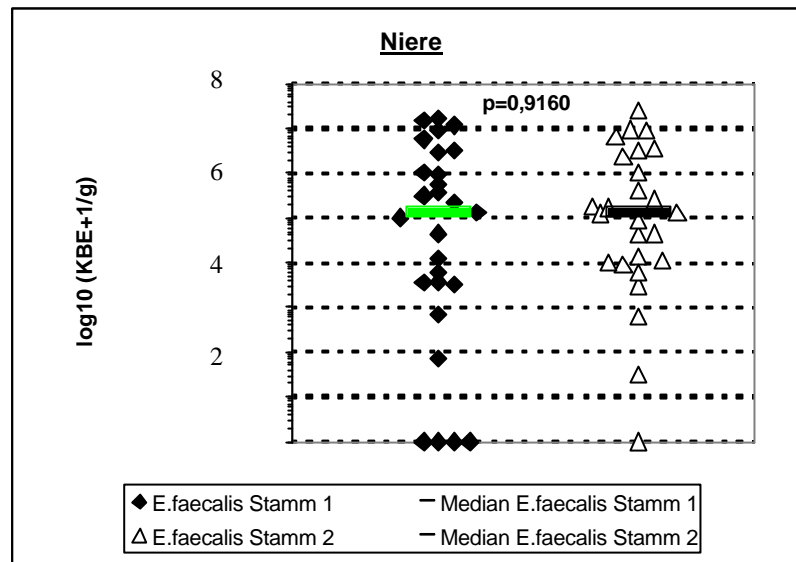


Abbildung 19: Vergleich der $\log_{10}(\text{KBE}+1/\text{g})$ in den Nieren nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-) und Stamm 2 (AS-/BS-)

Der Unterschied zwischen hohem und niedrigem Inokulum bei *E. faecalis* Stamm 1 war mit $p=0,5273$ (ANOVA, Median niedriges Inokulum=101684, Median hohes Inokulum=256040) nicht signifikant (siehe Abbildung 20).

Ebenfalls nicht signifikant war der Unterschied bei *E. faecalis* Stamm 2 mit $p=0,9267$ (ANOVA, Median niedriges Inokulum=184856, Median hohes Inokulum=125403, siehe Abbildung 21).

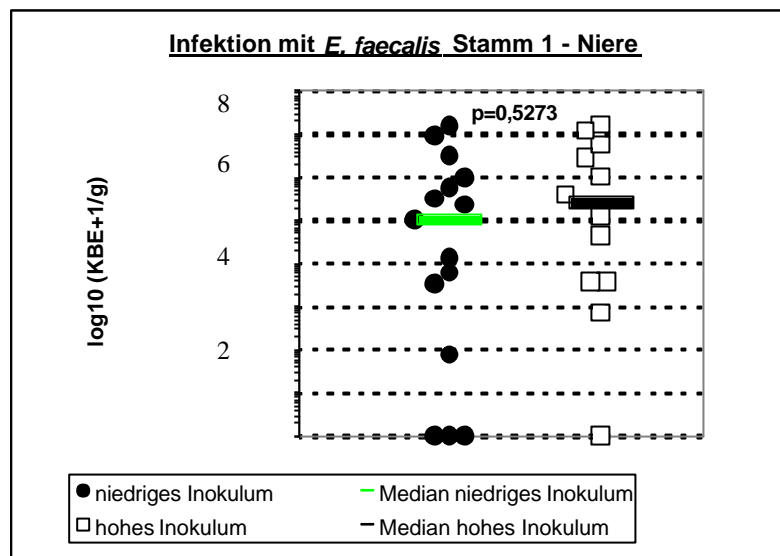


Abbildung 20: Vergleich der log₁₀ (KBE+1/g) in der Nieren bei Infektion mit verschiedenen hohen Inokula von *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-)

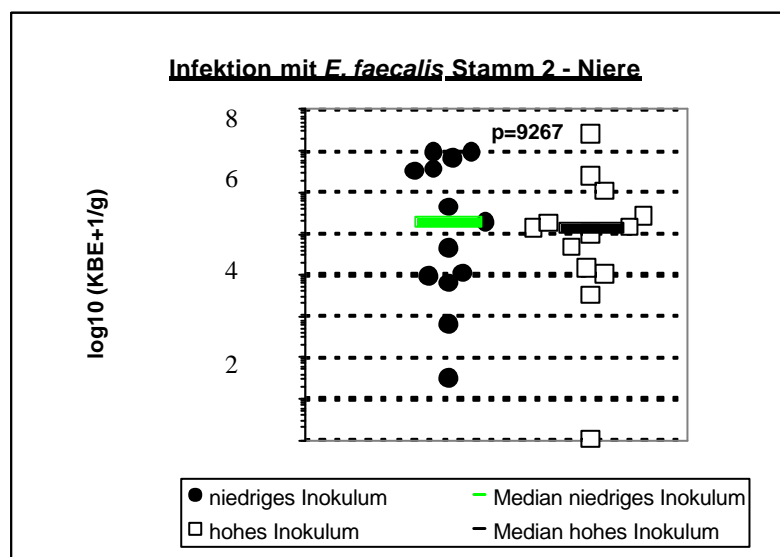


Abbildung 21: Vergleich der log₁₀ (KBE+1/g) in der Nieren bei Infektion mit verschiedenen hohen Inokula von *E. faecalis* Stamm 2 (AS-/BS-)

3.1.4.8 Gewichtsverlust

Als weiterer Parameter diente der Gewichtsverlust der Mäuse während der 5-tägigen Infektion.

Wie in Abbildung 22 beschrieben, war der Unterschied zwischen der AS+ und der AS- Mutante mit $p=0,2929$ nicht signifikant (ANOVA, Mittelwert *E. faecalis* Stamm 1 = 94,0 +/- 5,4 %, Mittelwert *E. faecalis* Stamm 2 = 92,1 +/- 7,7 %).

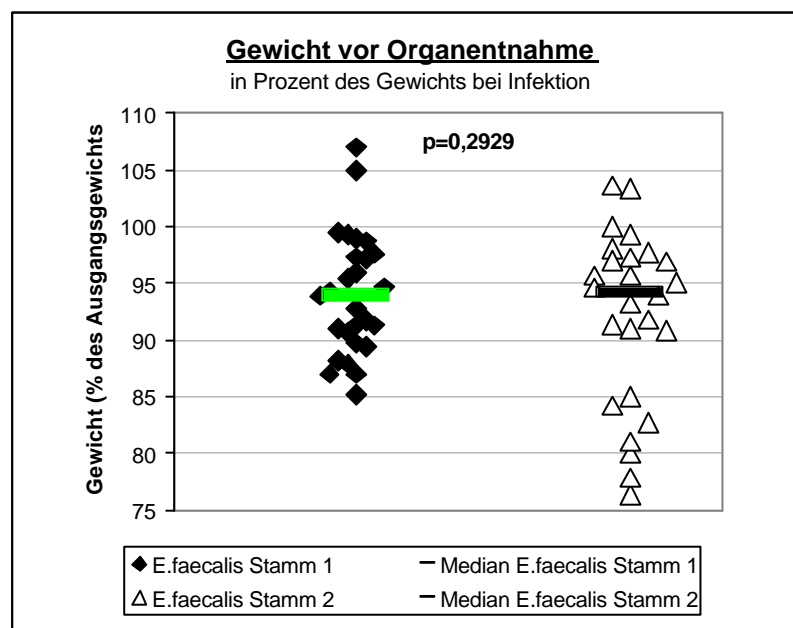


Abbildung 22: Gewichtsverlust in Prozent des Ausgangsgewichts nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-) und Stamm 2 (AS-/BS-)

Bei Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-) wogen die Tiere, die ein niedriges Inokulum erhielten, nach 5 Tagen im Durchschnitt noch 94,7 % (SD=6,3 %, Mittelwert) des Ausgangsgewichtes.

Tiere, die das hohe Inokulum erhielten wogen noch 93,1 % (SD=4,1 %, Mittelwert) des Ausgangsgewichtes. Dieser Unterschied war mit $p=0,4431$ nicht signifikant (ANOVA, siehe Abbildung 23).

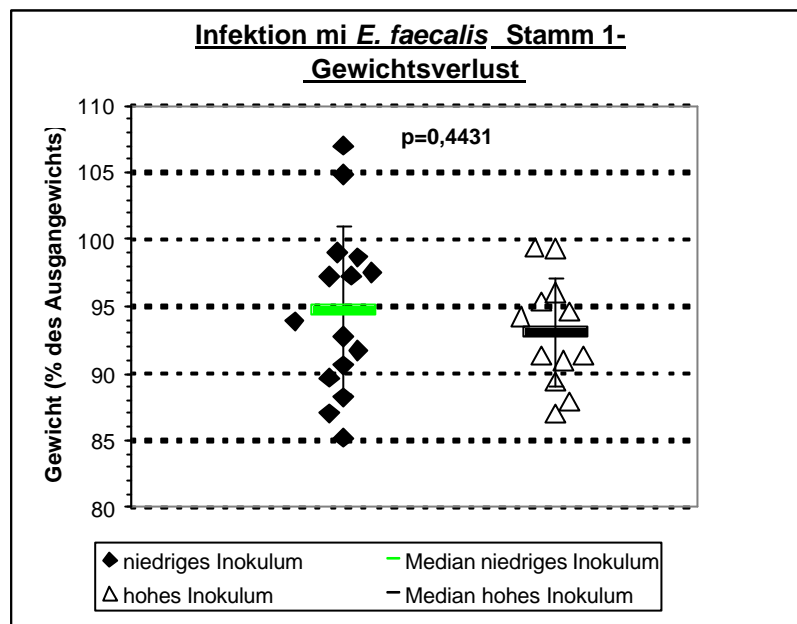


Abbildung 23: Gewichtsverlust in Prozent des Ausgangsgewichts nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-) – Vergleich bei Infektion mit verschiedenen Inokula

Die mit *E. faecalis* Stamm 2 (AS-/BS-) infizierten Mäuse mit niedrigem Inokulum wogen am Tag der Organentnahme noch 94,5 % (SD=5,4%, Mittelwert) des Ausgangsgewichtes.

Die Tiere, denen das hohe Inokulum injiziert wurde, wogen nur noch 89,6 % (SD=9,1 %, Mittelwert) des ursprünglichen Gewichts. Der Unterschied war jedoch mit $p=0,1112$ nicht signifikant (ANOVA, siehe Abbildung 24).

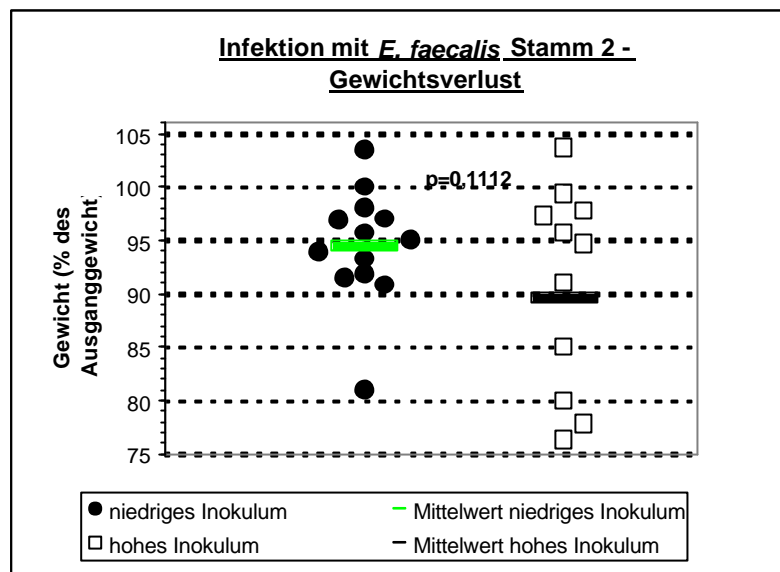


Abbildung 24: Gewichtsverlust in Prozent des Ausgangsgewichts nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 2 (AS-/BS-) – Vergleich bei Infektion mit verschiedenen Inokula

3.1.4.9 Zusammenfassung der Ergebnisse der Vorversuche

In den Vorversuchen konnte zunächst das Klumpungsverhalten der Mutanten *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-), Stamm 2 (AS-/BS-), Stamm 3 (AS+/BS+) und Stamm 4 (AS-/BS+), unter anderem zur späteren Phänotypisierung, reproduziert werden. So bildeten sich bei Anzüchten von *E. faecalis* Stamm 3 (AS+/BS+) in TSB Klumpen, die für das Vorhandensein von AS und BS sprachen. Bei Anzüchten der anderen Mutanten wurde dies nur bei Kombination zweier Mutanten erreicht, wobei eine Mutante AS und die andere BS exprimierten (z.B. *E. faecalis* Stamm 4 **und** Stamm 1). Für die AS-/BS- *E. faecalis* Mutante Stamm 2 wurde schließlich sichergestellt, dass sie weder in Kombination mit anderen Mutanten, noch alleine angezüchtet, Klumpen bildete. Somit lagen reproduzierbare, klar definierte Bedingungen für die späteren Versuchsreihen vor.

Weiterhin wurde das Resistenzverhalten der Mutanten bei Vorhandensein der Antibiotika Chloramphenicol und Tetrazyklin untersucht. Hier zeigte sich je nach Vorhandensein des dafür verantwortlichen Gens (z.B. Tn 916 bei *E. faecalis* INY3000 SSp), das entsprechende Resistenzverhalten gegen Chloramphenicol und Tetrazyklin, mit der besten Dosierung von 10 µl/ml. Auch dies diente uns später zur erneuten Phänotypisierung.

Für die Anzüchtung der Bakterien zeigten sich die selektiven Enterococcosel-Platten die Schafblutplatten als am besten geeignet. In den Immunisierungsversuchen verzichteten wir auf das Anzüchten des Lungengewebes auf den Schafblutplatten, da es auf Grund der großen Vielfalt der normalen Flora des Respirationstraktes zu einem starken Wachstum verschiedenster Bakterien kam, so dass eine sinnvolle Auswertung der Enterokokkenzahl nicht mehr möglich war.

Schließlich wurde die Organmanifestation der Mutanten *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-) und Stamm 2 (AS-/BS-) bei intravenöser Injektion in weibliche balb/c-Mäuse untersucht. Bei der Untersuchung von Blut, Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere fand sich kein signifikanter Unterschied im Organbefall bei Vorhandensein bzw. Fehlen der AS. Auch der Gewichtsverlust zwischen beiden Gruppen war nicht signifikant. Auf Grund der Vergleichbarkeit dieser Daten benutzten wir in den Immunisierungsversuchen die AS-/BS- Mutante *E. faecalis* Stamm 2 als Kontrollgruppe. Auch konnte keine Dosisabhängigkeit im Gewichtsverlust bei Injektion eines hohen bzw. eines niedrigen Inokulums gefunden werden.

Um auszuschliessen, dass eine Reduktion der Enterokokkenzahl durch eine Immunantwort der Wirtstiere ausgelöst wird, untersuchten wir das Blut der Mäuse auf eigene Antikörper gegen AS. Es wurden weder IgG- noch IgM-Antikörper gegen AS gefunden (Verdünnung <1:50, ELISA).

3.2 Hauptversuche

3.2.1 Passive Immunisierung – Infektion mit *E.faecalis* Stamm 1 (AS+/BS–)

3.2.1.1 Impfseren

Die Firma EUROGENTEC Bel S.A. wurde von uns beauftragt immunes Kaninchen-Seren gegen AS von Kaninchen herzustellen. 2 Kaninchen wurden hierfür vor Beginn der Immunisierung von uns ausgesucht. Zum Ausschluss präformierter Antikörper untersuchten wir zuvor mehrere Seren unterschiedlicher Tiere im ELISA, bei denen wir z.T. leicht erhöhte Titer gegen AS fanden. Für die Immunisierungen nahmen wir schließlich die Kaninchen ohne vorbestehenden Titer. Vor Beginn der Immunisierung wurde prä-immunes Serum abgenommen, welches wir im weiteren als Vergleichsserum ohne Antikörper gegen AS (NRS) verwendeten. Wir erhielten vom ersten Kaninchen schließlich 8 Seren mit ansteigenden Titern gegen AS, abgenommen immer am Tag einer neuen Immunisierung.

Der maximale Titer des immunen Serums beim ersten Kaninchen betrug 1:40000. Der Titerverlauf während 8 passiven Immunisierungen wurde mittels ELISA bestimmt und ist nachfolgend in Abbildung 25 dargestellt. Beim zweiten Kaninchen fanden wir einen schnelleren und höheren Anstieg des IgG-Titers auf 1:70000 schon nach der 4. Immunisierung (siehe Abbildung 26). Der Vergleich beider Titerverläufe ist in Abbildung 27 dargestellt.

Ein zusätzliches immunes Serum mit einem Titer von 1: 125000 wurde uns freundlicherweise von A. Muscholl-Silberhorn, Regensburg, zur Verfügung gestellt. Dieses verwendeten wir aus Zeitgründen in den ersten Mäuse-Versuchen, da es in der Herstellung des IRS durch EUROGENTEC zu leichter zeitlicher Verzögerung gekommen ist.

Die verwendeten immunen Kaninchenserum (IRS) wurden vor der Immunisierung der Mäuse im ELISA auf IgG-Antikörper gegen AS getestet. In den ersten Versuchen wurde ein Serum mit einem IgG-Titer von 1:125000 verwendet. Dieses Serum wurde bei 25 Mäusen verwendet. 15 Mäuse erhielten IRS mit einem Titer von 1:70000, 5 Mäuse IRS mit einem Titer von 1:20000. Im folgenden wurden diese 3 Gruppen zusammengefasst. Der jeweils erreichte Titer im Mäuseblut wurde bei jeder Maus separat bestimmt.

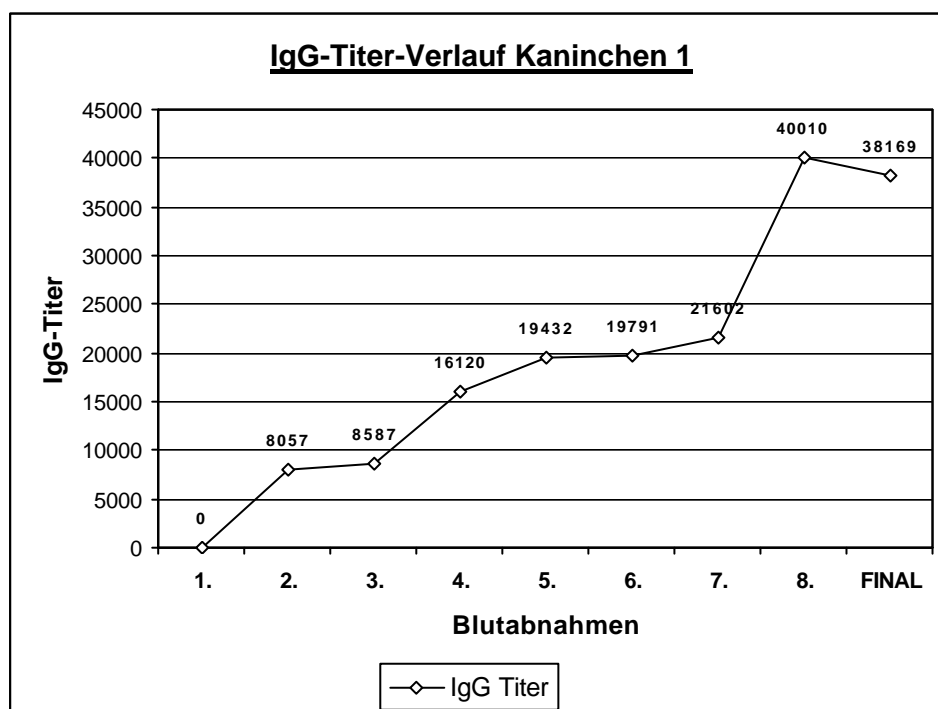


Abbildung 25: IgG-Titerverlauf gegen AS des ersten immunisierten Kaninchens im ELISA

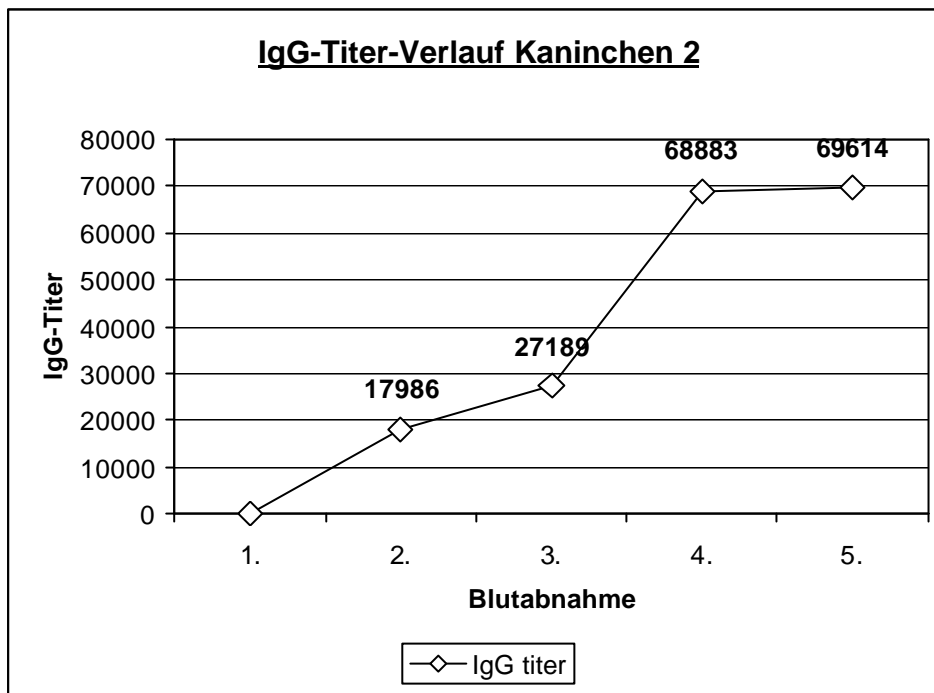


Abbildung 26: IgG-Titerverlauf gegen AS des zweiten immunisierten Kaninchens im ELISA

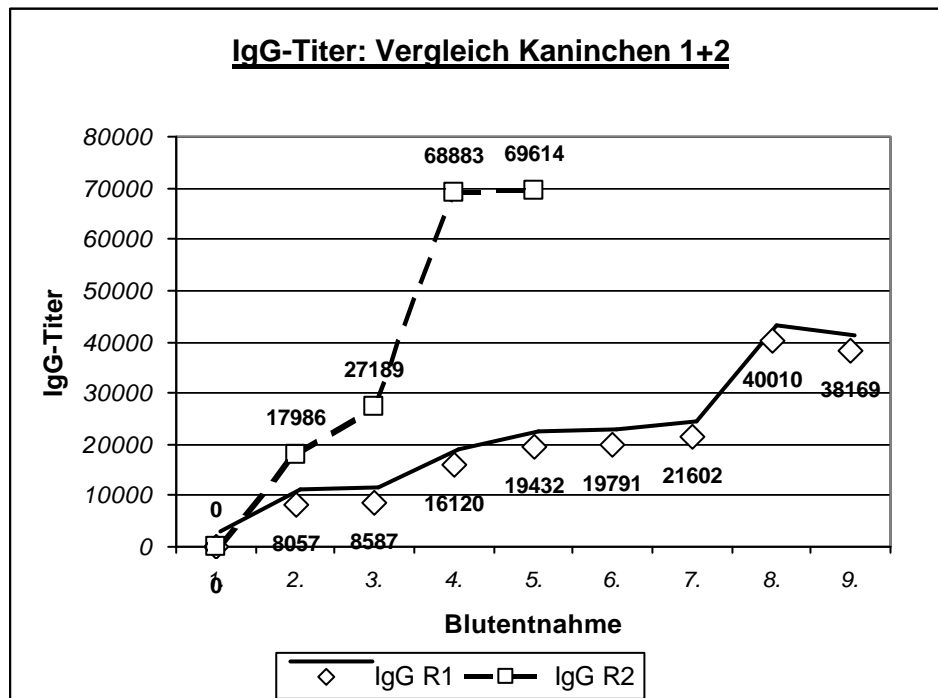


Abbildung 27: Vergleich der IgG-Titerverläufe beider gegen AS immunisierter Kaninchen im ELISA

Als Vergleichsgruppe wurden Mäuse mit gleicher Menge nicht-immunen Kaninchenserums immunisiert (NRS, von einem Kaninchen, bei dem zuvor im ELISA präformierte Antikörper ausgeschlossen wurden). Die Kontrollgruppe erhielt dieselbe Menge NaCl.

3.2.2 Organmanifestation bei passiver Immunisierung und Infektion mit AS-positiver Mutante *E. faecalis* Stamm 1

3.2.2.1 IgG-Titer der Mäuse

Eine Kontrolle des Impferfolges erfolgte durch Bestimmung des Kaninchen-IgG-Antikörper-Titers im Mäuseblut. Dazu wurde Blut aus dem Herzen der toten Mäuse entnommen und mittels ELISA der Titer bestimmt.

Während bei der NaCl- und der NRS-Gruppe erwartungsgemäß kein Kaninchen-IgG-Titer gegen AS gefunden wurde (Titer<1:50), fanden sich in der IRS-Gruppe bei alle Tieren ein IgG-Titer. Sie lagen zwischen 1:7000 und 1:34000 (Mittelwert 1:20391+/-8252) (siehe Abbildung 28).

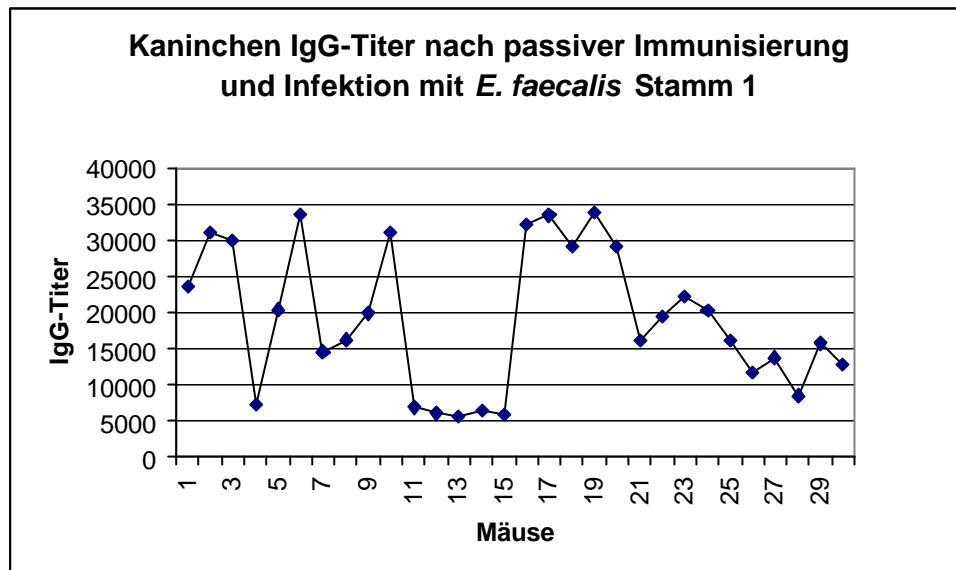


Abbildung 28: IgG-Titerverlauf nach passiver Immunisierung und Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-)

3.2.2.2 Blut

Auf eine mikrobiologische Blutuntersuchung wurde bei den passiven Immunisierungen verzichtet, da nicht genug Blut zur Verfügung stand und die Vorversuche ergeben hatten, dass nur sehr selten Enterokokken im Blut zu finden waren. Wir entschlossen uns deshalb das entnommene Blut zur Titerbestimmung zu verwenden (bei 10 Mäusen pro Gruppe wurde das Blut untersucht. Hier fand sich jeweils nur ein Tier mit 1 KBE/100 μ l Blut). Weiterhin wurde stichprobenartig immer wieder der Phänotyp der verwendeten *E. faecalis*-Mutante Stamm 1, also die Exprimierung der AS ohne Vorhandensein der BS, überprüft. Der korrekte Phänotyp konnte in allen Fällen bestätigt werden.

3.2.2.3 Herz

In der NaCl-Gruppe waren bei 15 von 30 Mäusen (50 %) *E. faecalis* Stamm 1 - Kolonien im Herzen zu finden. Die Anzahl der KBE/g Organgewicht belief sich zwischen 50 und $1,1 \times 10^6$ (Median=17).

In der NRS-Gruppe fand sich bei 9 von 30 (33 %) Tieren ein Organbefall (zwischen 44 und 125242 KBE/g, Median=0).

In der IRS-Gruppe hatten nur 7 Tiere von 30 (23 %) Bakterien im Herzen. Hier war der niedrigste Befall 50, der höchste Befall $2,6 \times 10^3$ KBE/g (Median=0).

Der statistische Unterschied zwischen IRS und NRS betrug $p=0,6898$, zwischen IRS und NaCl $p=0,0635$ und zwischen NRS und NaCl $p=0,1393$ (Mann-Whitney U).

Insgesamt zeigte sich also ein niedrigerer Nachweis der Enterokokken in der IRS-Gruppe, dieser war jedoch mit $p>0,0635$ statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney U). Das Ergebnis ist nachfolgend in Abbildung 29 dargestellt.

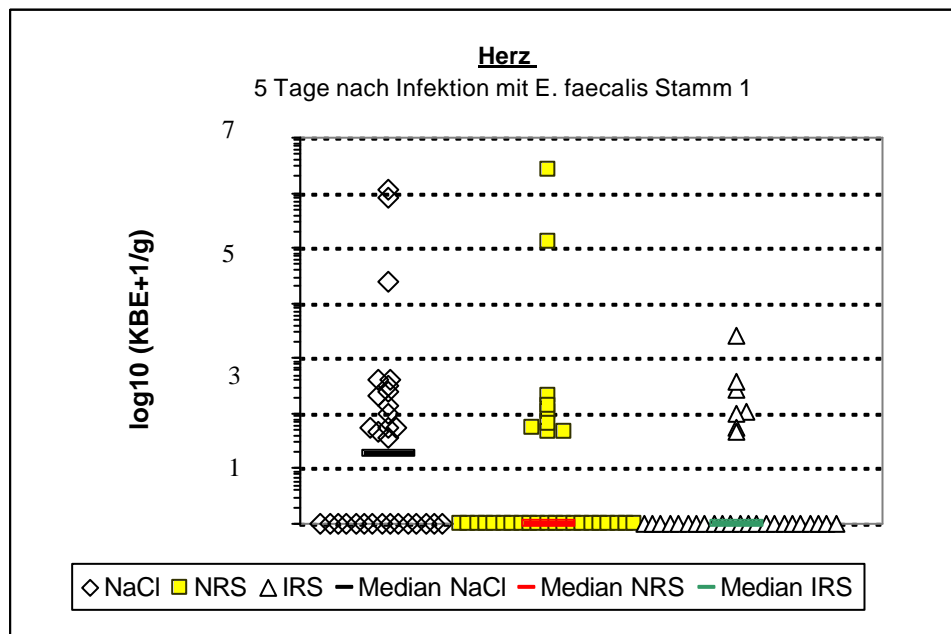


Abbildung 29: Vergleich der \log_{10} (KBE+1/g) im Herz bei den Immunisierungsgruppen und der Kontrollgruppe nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-)

3.2.2.4 Lunge

Hier fanden sich im Vergleich mit den anderen Geweben insgesamt eine sehr niedrige Anzahl an KBE/g Organgewicht. Der Unterschied der \log_{10} (KBE+1/g) war nicht signifikant ($p > 0,6100$, Mann-Whitney U).

In der NaCl-Gruppe fanden sich 9 Mäuse (30 %) mit *E. faecalis* Stamm 1 Kolonien im untersuchten Gewebe. Es fanden sich zwischen 140 und $2,4 \times 10^4$ KBE/g (Median=0).

Die NRS-Gruppe zeigte bei 10 von 30 Mäusen (33 %) einen Lungenbefall, wobei hier die Zahlen zwischen 60 und 10^3 KBE/g variierten (Median=0).

In der IRS-Gruppe hatten 9 Tiere (30 %) Enterokokken in der Lunge (zwischen 60 und 300 KBE/g, Median=0).

Die Unterschiede waren mit $p = 0,6152$ zwischen der IRS- und NRS-Gruppe, $p = 0,6100$ zwischen der IRS- und NaCl-Gruppe und $p = 0,8825$ zwischen der NRS- und NaCl-Gruppe nicht signifikant (Mann-Whitney U). Siehe hierzu auch die Abbildung 30.

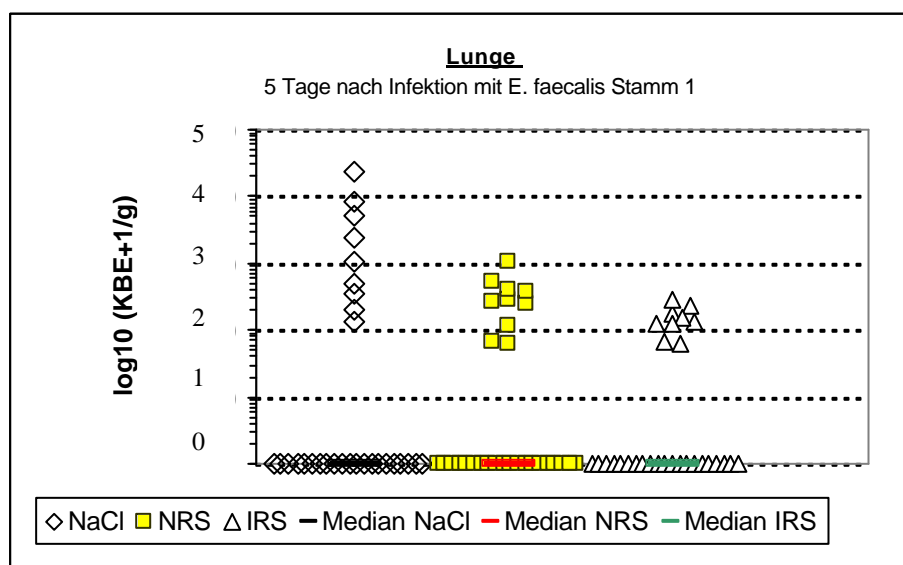


Abbildung 30: Vergleich der \log_{10} (KBE+1/g) in der Lunge bei den Immunisierungsgruppen und der Kontrollgruppe nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-)

3.2.2.5 Leber

Die NaCl-Gruppe zeigte in 28 von 30 Fällen (93 %) ein Wachstum der Enterokokken-Mutante. Nur 2 Tiere (7 %) hatten sterile Lebern. Bei den Tieren mit Leberbefall waren zwischen 30 und $2,3 \cdot 10^4$ KBE/g (Median=562) zu finden.

Die Mäuse, die mit NRS immunisiert wurden, hatten alle Enterokokken (30 von 30) in der Leber. Das niedrigste Wachstum waren 30 KBE/g, das höchste $2,3 \cdot 10^3$ KBE/g (Median=464).

Der Unterschied der \log_{10} (KBE+1/g) zwischen der NaCl- und der NRS-Gruppe war mit $p=0,7356$ (ANOVA) nicht signifikant.

Auch die IRS-Gruppe zeigte bei allen Tieren ein Wachstum in der Leber (zwischen 30 und 2644 KBE/g, Median=541).

Der Unterschied zwischen Immunisierung mit IRS und NaCl war mit $p=0,7912$, der Unterschied zwischen Immunisierung mit IRS und NRS mit $p=0,9418$ nicht signifikant (ANOVA).

In allen 3 Immunisierungsgruppen fand somit sich ein vergleichbar hohes Enterokokken-Wachstum im Lebergewebe statt ($p>0,7356$, ANOVA). Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 dargestellt.

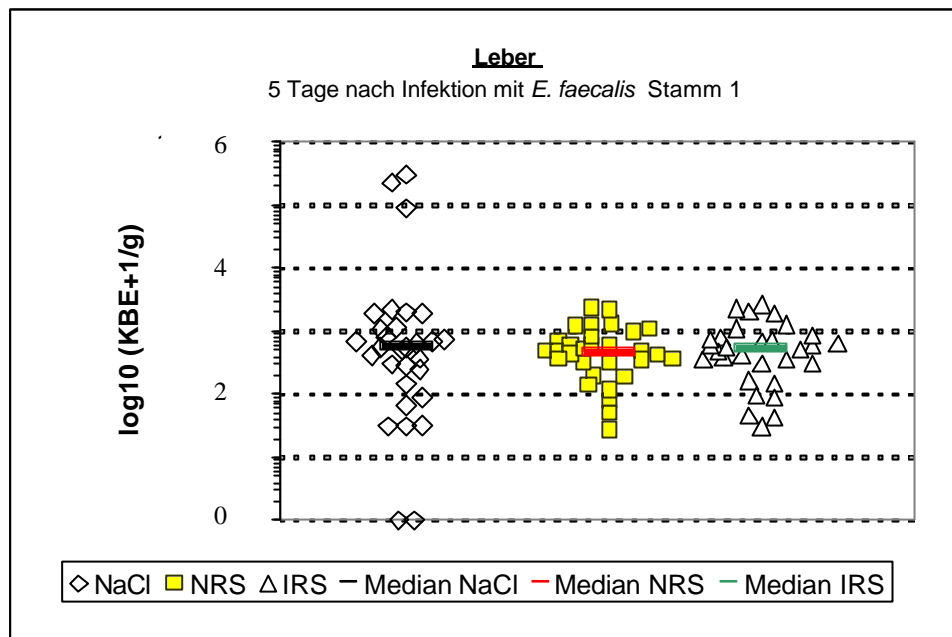


Abbildung 31: Vergleich der log₁₀ (KBE+1/g) in der Leber bei den Immunisierungsgruppen und der Kontrollgruppe nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-)

3.2.2.6 Milz

Die NaCl-Gruppe zeigte 13 Tiere (43 %) mit, und 17 Tiere (57 %) ohne Milzbefall. Es wuchsen zwischen 40 und $4,7 \times 10^6$ KBE/g (Median=42).

15 Mäuse (50 %) der NRS-Gruppe hatten die *E. faecalis*-Mutante in der Milz. Die absoluten Zahlen schwankten hier zwischen 30 und $1,7 \times 10^3$ KBE/g (Median=12).

Die IRS-Gruppe hatte 13 Mäuse (43 %) mit einem Milzbefall von *E. faecalis* Stamm 1. Hier fanden sich zwischen 20 und $1,5 \times 10^3$ KBE/g (Median=25, siehe Abbildung 32).

Der Unterschied im Milzbefall zeigte signifikante Unterschiede im Vergleich der log₁₀ (KBE+1/g) zwischen der IRS- und NaCl-Gruppe ($p=0,0332$, ANOVA), sowie zwischen der NRS- und der NaCl-Gruppe ($p=0,0094$, ANOVA). Zwischen

der IRS- und der NRS-Gruppe betrug der Unterschied $p=0,6243$ (ANOVA) und war somit nicht signifikant.

Im Gegensatz zu den anderen Organen deuteten schon die Vorversuche auf eine Korrelation der Koloniezahlen von der Höhe des Inokulums hin. Deshalb wurde hier zusätzlich eine getrennte Analyse bei Infektion mit einem hohen und einem niedrigen Inokulum vorgenommen. Diese Analyse ergab signifikante Werte für die Tiere, die mit einem niedrigen Inokulum infiziert wurden (IRS gegen NaCl-Gruppe $p= 0,0079$, ANOVA, NRS gegen NaCl-Gruppe $p=0,0106$, ANOVA). Die Unterschiede bei den Tieren mit hohem Inokulum ergab hier keine Signifikanz ($p>0,2549$).

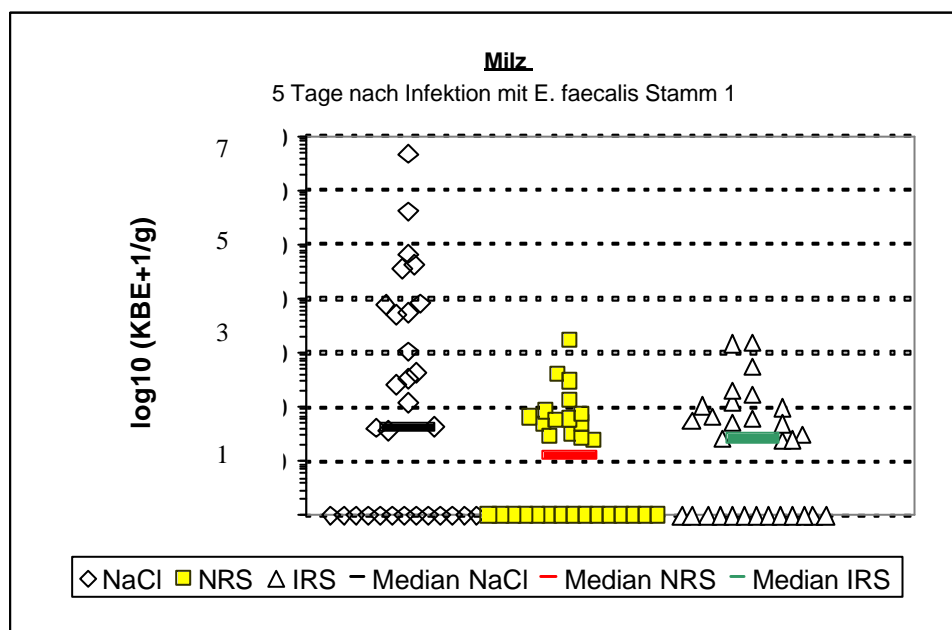


Abbildung 32: Vergleich der log₁₀ (KBE+1/g) in der Milz bei den Immunisierungsgruppen und der Kontrollgruppe 5 Tage nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-)

3.2.2.7 Niere

Wie schon in den Vorversuchen wurden hier die mit Abstand höchsten Koloniezahlen gefunden. 22 Mäuse (73 %) der NaCl-Gruppe hatten ein Wachstum von 10^2 bis $5,4 \times 10^7$ KBE/g (Median=7030).

Im Nierengewebe der NRS-Gruppe wurden bei 26 Mäusen (87 %) zwischen 40 und $1,9 \times 10^7$ KBE/g (Median=112840) gefunden.

Die IRS-Gruppe zeigte 19 Tiere (63 %) mit einem Nierenbefall. Es wurden zwischen 80 und $2,8 \times 10^7$ KBE/g gefunden (Median=4241, siehe Abbildung 33).

Die Gruppen unterschieden sich hier z.T. signifikant. Während der Nierenbefall ($\log_{10}(\text{KBE}+1/\text{g})$) zwischen der NRS- und der IRS-Gruppe mit $p=0,0331$ (ANOVA) signifikant war, zeigte sich der Unterschied zwischen IRS- und NaCl-Gruppe bzw. NRS- und NaCl-Gruppe als nicht signifikant ($p=0,1136$ und $p=0,5725$, ANOVA).

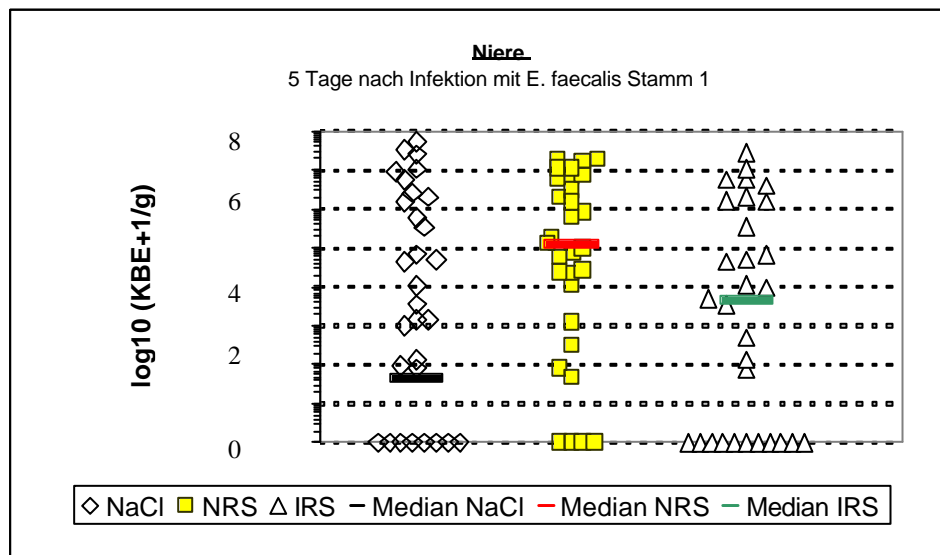


Abbildung 33: Vergleich der $\log_{10}(\text{KBE}+1/\text{g})$ in der Niere bei den Immunisierungsgruppen und der Kontrollgruppe 5 Tage nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-)

3.2.2.8 Gewichtsverlust

Als klinischer Parameter wurde das Gewicht der Mäuse während der 5 tägigen Infektion bestimmt (Mittelwert des prozentualen Anteils vom Gewicht zu Versuchsbeginn +/- Standardabweichung). 5 Tiere der NaCl-Gruppe, 9 der IRS-Gruppe und 15 der IRS-Gruppe nahmen während der Infektion an Gewicht zu oder blieben konstant.

Wurden alle Mäuse zusammen untersucht, war der Gewichtsverlust in der IRS-Gruppe signifikant niedriger als in den anderen Gruppen ($p=0,015$, ANOVA). Die Tiere der IRS-Gruppe wogen noch $98,8 \pm 4,2$ % vom Ausgangsgewicht. Noch stärker sahen wir den Gewichtsverlust nach Infektion mit einem hohen Inokulum, verglichen mit einem niedrigen Inokulum in der NRS- und der NaCl-Gruppe ($p=0,01$ und $p=0,044$, ANOVA). Nach Infektion mit dem hohen Inokulum war der Gewichtsverlust signifikant niedriger in der IRS-Gruppe, die noch $97,9 \pm 3,6$ wogen, verglichen mit der NRS-Gruppe, die noch $95,3 \pm 2,9$ % ($p=0,0364$, ANOVA) wogen und verglichen mit der NaCl-Gruppe, die noch $93,3 \pm 3,3$ % ($p=0,0004$, ANOVA) wogen. Dahingegen war der Unterschied zwischen der NRS- und der NaCl-Gruppe nicht signifikant ($p=0,1053$, ANOVA). Dies ist nachfolgend in Abbildung 34 dargestellt.

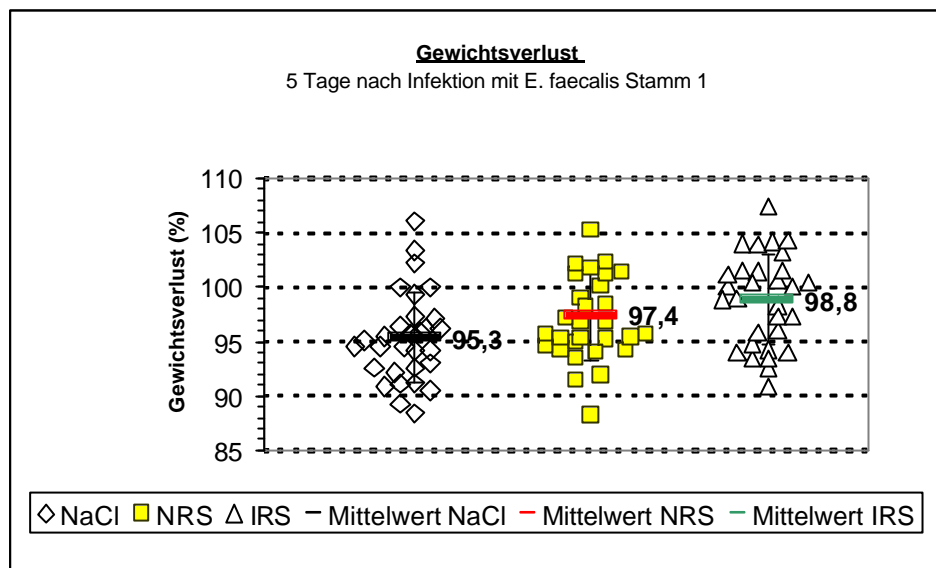


Abbildung 34: Vergleich des Gewichtsverlust bei den Immunisierungsgruppen und der Kontrollgruppe 5 Tage nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (in Prozent des Ausgangsgewichts)

3.2.2.9 Zusammenfassung der Ergebnisse der passiven Immunisierung bei Infektion mit *E.-faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-)

In den Versuchsreihen zur Organmanifestation bei passiver Immunisierung und Infektion mit der AS+/BS *E.-faecalis*-Mutante Stamm 1 wurden Kaninchen-IgG-Titer von 1:20000 +/- 8252 (Mittelwert) gefunden.

Die Unterschiede in der Organmanifestation bei den Organen Herz, Lunge und Leber waren nicht signifikant in der IRS-Gruppe gegenüber den Kontrollgruppen. Signifikant niedriger war das Wachstum in den Milzen der IRS-Gruppe gegenüber der NaCl-Gruppe ($p=0,0332$, ANOVA), sowie zwischen der NRS- und der NaCl-Gruppe ($p=0,0094$, ANOVA). Bei den Nieren waren die Koloniezahlen (\log_{10} (KBE+1/g)) in der IRS-Gruppe mit $p=0,0331$ (ANOVA) signifikant niedriger gegenüber der NRS-Gruppe.

Auch der Gewichtsverlust zeigte signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Wurden alle Mäuse zusammen untersucht, war der Gewichtsverlust in der IRS-Gruppe signifikant niedriger als in den anderen Gruppen ($p=0,015$, ANOVA). Die Tiere wogen noch $98,8 \pm 4,2$ % vom Ausgangsgewicht. Noch stärker war der Gewichtsverlust nach Infektion mit einem hohen Inokulum, verglichen mit einem niedrigen Inokulum in der NRS- und der NaCl-Gruppe ($p=0,01$ und $p=0,044$, ANOVA). Nach Infektion mit dem hohen Inokulum war der Gewichtsverlust signifikant niedriger in der IRS-Gruppe. Die Tiere wogen noch $97,9 \pm 3,6$ (in Prozent des Ausgangsgewichtes) verglichen mit der NRS-Gruppe, die noch $95,3 \pm 2,9$ % wog ($p=0,0364$, ANOVA) und verglichen mit der NaCl-Gruppe, bei der Tiere noch $93,3 \pm 3,3$ ($p=0,0004$, ANOVA) wogen. Der Unterschied zwischen der NRS- und der NaCl-Gruppe nicht signifikant ($p=0,1053$, ANOVA).

3.2.3 Organmanifestation bei passiver Immunisierung mit AS-negativer Mutante *E. faecalis* Stamm 2 - Kontrollversuche

Um auszuschliessen, dass durch IRS unspezifische Effekte vermittelt werden, wurden weitere Versuchsreihen mit der AS-/BS- Mutante *E. faecalis* Stamm 2 durchgeführt. Diese Kontrollversuche führten wir unter exakt denselben Bedingungen durch wie die passiven Immunisierungen mit der AS+/BS- Mutante *E. faecalis* Stamm 1.

Es ist in dieser Versuchsreihe kein Unterschied zwischen den Gruppen zu erwarten, da die Zielstruktur der Antikörper des IRS bei *E. faecalis* Stamm 2 nicht exprimiert wird, und somit auch kein Effekt auftreten dürfte.

Auch hier wurde immer wieder stichprobenartig eine Phänotypisierung der *E. faecalis* – Mutante Stamm 2 (AS-/BS-) durchgeführt.

3.2.3.1 IgG-Titer der Mäuse

Wie zuvor bei der passiven Immunisierung und Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1; wurde wieder der Kaninchen-IgG-Titer gegen AS im Mäuseblut mittels ELISA bestimmt. Der Titer in der NaCl und der NRS-Gruppe war erwartungsgemäß <1:50.

In der IRS-Gruppe wurde bei allen Tieren ein Kaninchen-IgG-Titer gegen AS gefunden. Die Spannweite lag zwischen 1:16000 und 1:27000 (Mittelwert 1:20385+/-4152). Die Titerhöhe war somit gut vergleichbar mit den Titern bei Infektion mit der AS+ Mutante *E. faecalis* Stamm 1. Hier betrug der Mittelwert 1:20391 +/- 8252 (siehe Abbildung 35).

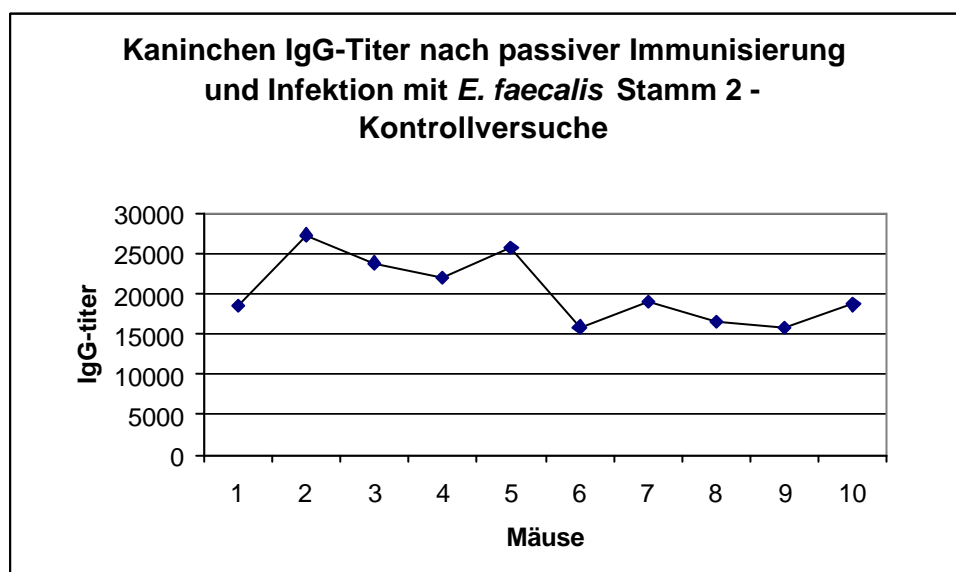


Abbildung 35: IgG-Titerverlauf nach passiver Immunisierung und Infektion mit *E. faecalis* Stamm 2 (AS-/BS-)

3.2.3.2 Herz

In der NaCl-Gruppe hatten nur 2 von 10 Tieren (20 %) die Mutante *E. faecalis* Stamm 2 im Herzen. Bei einer Maus wurden 50 KBE/g, bei der anderen $6,9 \times 10^4$ KBE/g Organgewicht gefunden (Median=0).

Von der NRS-Gruppe zeigte nur eine Maus von 10 (10%) Bakterienwachstum im Herzen. Hier fanden sich 660 KBE/g (Median=0).

3 von 10 Tieren (30 %) der IRS-Gruppe zeigten einen Befall des Herzens. Die Koloniezahlen variierten hier zwischen 50 und $2,2 \times 10^5$ KBE/g (Median=0, siehe Abbildung 36).

Der Mann-Whitney U-Test ergab im Vergleich der \log_{10} (KBE+1/g) zwischen der IRS- und der NaCl-Gruppe einen p-Wert von 0,6501, zwischen der IRS- und der NRS-Gruppe $p=0,7055$ und schließlich zwischen der NRS- und der NaCl-Gruppe $p=0,4274$. Erwartungsgemäß zeigte sich also keine Signifikanz zwischen den unterschiedlichen Gruppen ($p>0,7055$, Mann-Whitney U).

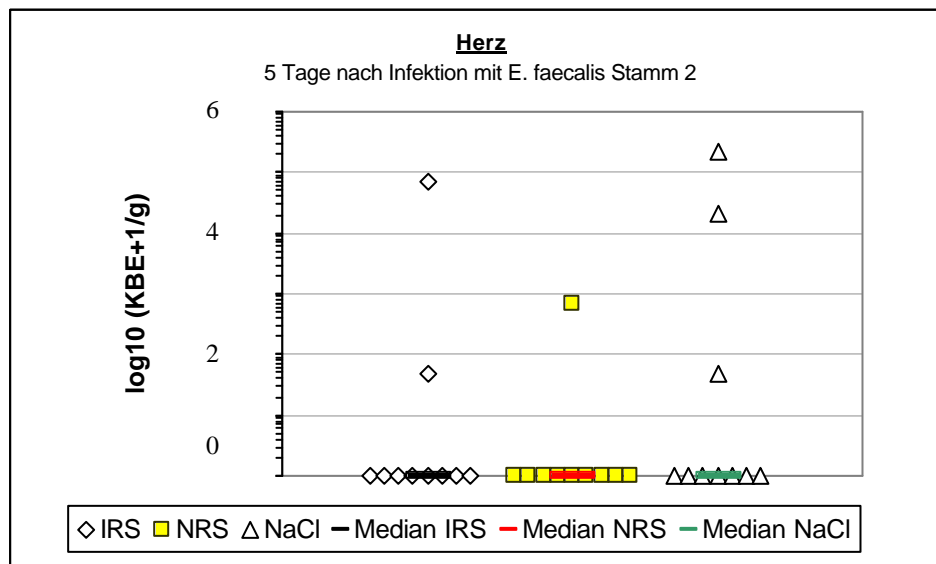


Abbildung 36: Vergleich der \log_{10} (KBE+1/g) im Herz/g Herzgewebe bei den Immunisierungsgruppen und der Kontrollgruppe 5 Tage nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 2 (AS-/BS-)

3.2.3.3 Lunge

Die NaCl-Gruppe hatte in 2 Fällen (20 %) einen Lungenbefall (840 bzw. 90 KBE/g, Median=0).

Bei der NRS-Gruppe wurde bei 3 von 10 Mäusen (30 %) die Mutante in der Lunge gefunden. Die Koloniezahlen schwankten zwischen 60 und 250 KBE/g.

Bei einem von 10 Versuchstieren (10 %) der IRS-Gruppe war *E. faecalis* Stamm 2 im Lungengewebe nachweisbar (150 KBE/g, Median=0, siehe Abbildung 37).

Die Unterschiede der \log_{10} (KBE+1/g) waren, wie erwartet, auch hier nicht signifikant. Die IRS-Gruppe verglichen mit der NaCl-Gruppe ergab einen p-Wert von 0,7055, die IRS-Gruppe verglichen mit der NRS-Gruppe einen p-Wert von 0,4727 und schließlich die NRS-Gruppe verglichen mit der NaCl-Gruppe einen p-Wert von 0,7624 (Mann-Whitney U). Die absoluten Zahlen der KBE/g lagen vergleichbar hoch wie bei der Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1.

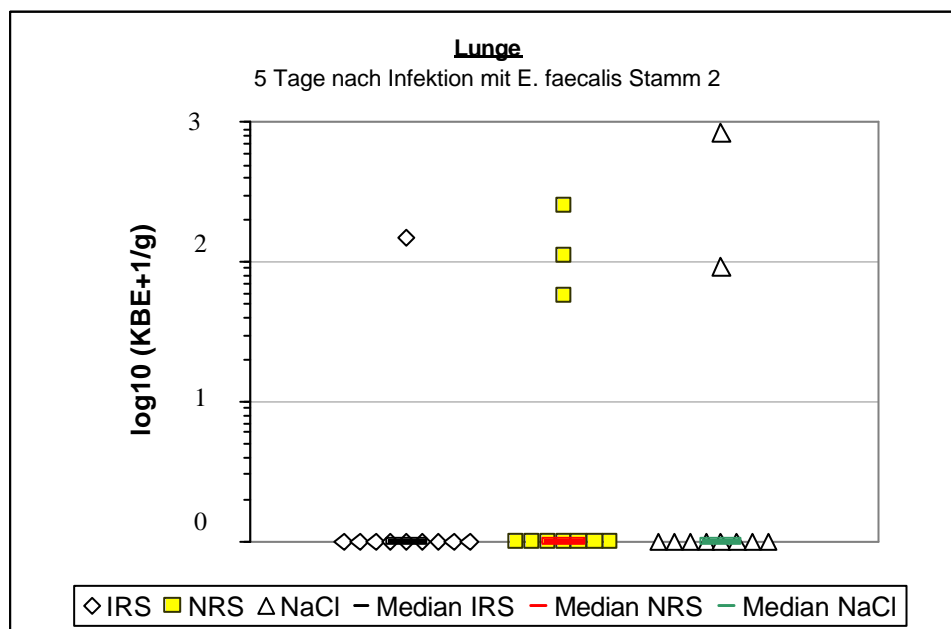


Abbildung 37: Vergleich der \log_{10} (KBE+1/g) in der Lunge bei den Immunisierungsgruppen und der Kontrollgruppe 5 Tage nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 2 (AS-/BS-)

3.2.3.4 Leber

Wie auch bei Infektion mit der AS-positiven Mutante, fand sich in den Kontrollversuchen eine gleichmäßige Verteilung des Bakterienbefalls in der Leber bei allen 3 Versuchsgruppen (siehe Abbildung 38).

Die Mäuse der NaCl-Gruppe hatten in 9 von 10 Fällen (90 %) einen Leberbefall. Die absoluten Zahlen schwankten zwischen 70 KBE/g und $2,5 \times 10^5$ KBE/g (Median=156).

In der NRS-Gruppe fand sich bei allen 10 Mäusen (100 %) ein Befall (zwischen 470 und $6,6 \times 10^3$ KBE/g, Median=3629).

Auch in der IRS-Gruppe hatten alle Mäuse (100 %) die Mutante in der Leber (zwischen 980 und $4,3 \times 10^3$ KBE/g, Median=2108).

Die Unterschiede \log_{10} (KBE+1/g) der zwischen der IRS- und der NaCl-Gruppe ($p=0,6053$), der IRS- und der NRS-Gruppe ($p=0,2305$), sowie der NRS- und der NaCl-Gruppe ($p=0,3647$) waren, wie zu erwarten, nicht signifikant (ANOVA).

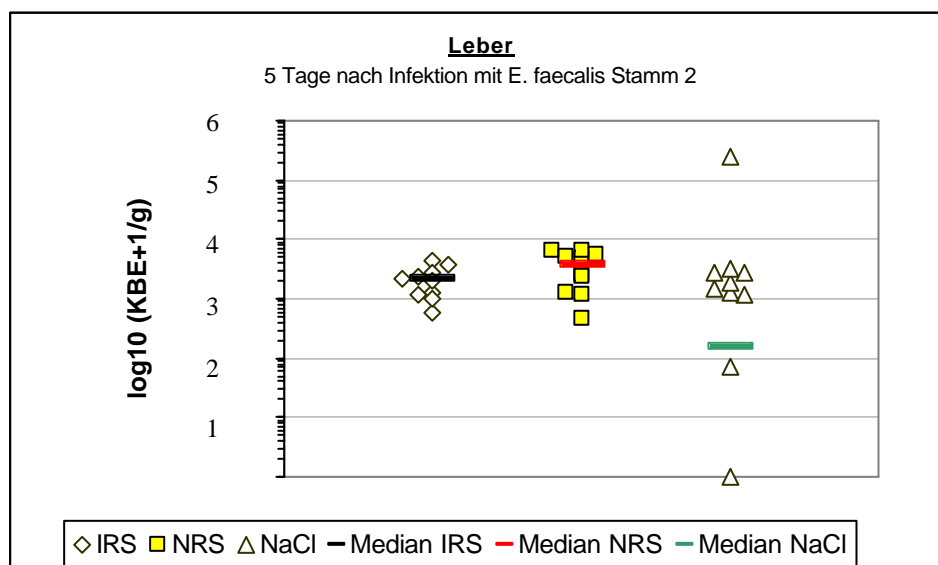


Abbildung 38: Vergleich der \log_{10} (KBE+1/g) in der Leber bei den Immunisierungsgruppen und der Kontrollgruppe 5 Tage nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 2 (AS-/BS-)

3.2.3.5 Milz

Die Kontrollversuche ergaben auch hier bei fast allen Tieren einen Organbefall. In der NaCl-Gruppe fand sich bei 4 von 10 Mäusen (40 %) die Mutante *E. faecalis* Stamm 2. Der niedrigste Befall betrug 30 KBE/g, der höchste Befall fand sich bei einer Maus mit $1,8 \times 10^3$ KBE/g (Median=156).

Die NRS-Gruppe hatte in der Hälfte der Fälle (5 von n=10) einen Milzbefall. Hier variierten die absoluten Zahlen zwischen 20 KBE/g und $1,2 \times 10^3$ KBE/g (Median=10).

In der IRS-Gruppe hatten sogar 9 von 10 Mäusen (90 %) einen Milzbefall (zwischen 20 und 310 KBE/g, Median=56, siehe Abbildung 39).

Der Unterschied der \log_{10} (KBE+1/g) zwischen den einzelnen Gruppen war wiederum nicht signifikant (IRS- gegen NaCl-Gruppe $p=0,3081$, IRS- gegen NRS-Gruppe $p=0,0989$, NRS- gegen NaCl-Gruppe $p=0,5920$, ANOVA).

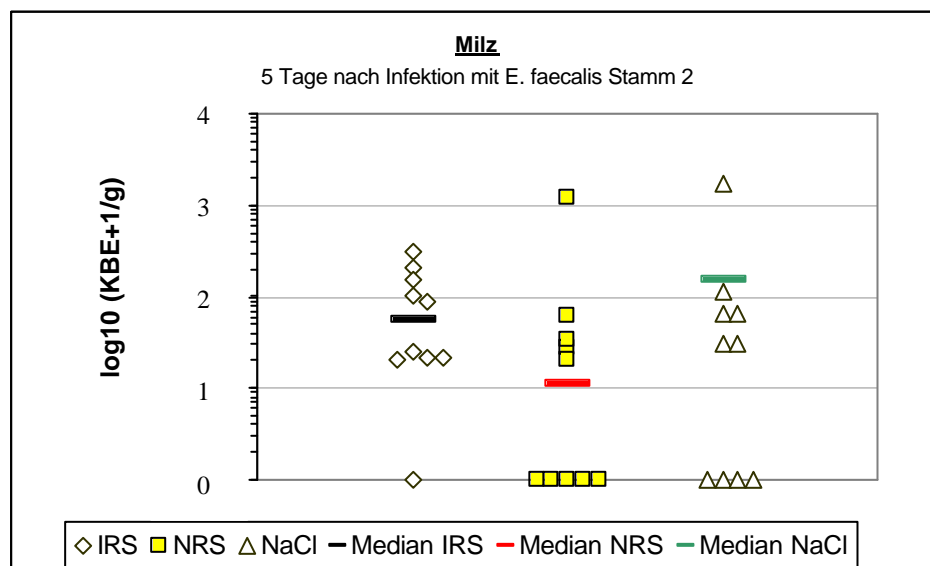


Abbildung 39: Vergleich der \log_{10} (KBE+1/g) in der Milz bei den Immunisierungsgruppen und der Kontrollgruppe 5 Tage nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 2 (AS-/BS-)

3.2.3.6 Niere

Die NaCl-Gruppe zeigte in allen Fällen (n=10) einen Nierenbefall. Dieser betrug zwischen 160 KBE/g und $2,4 \times 10^7$ KBE/g (Median=45823).

In der NRS-Gruppe fanden sich 6 von 10 Tieren (60 %) mit der Mutante im Nierengewebe (zwischen $2,1 \times 10^4$ und 3×10^8 KBE/g, Median=22068).

In der IRS-Gruppe war schließlich bei 8 von 10 Tieren (80 %) ein Nierenbefall nachzuweisen. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro Gramm Organgewicht schwankte hier zwischen $1,8 \times 10^4$ und 45×10^6 (Median=32837, siehe Abbildung 40). Verglichen mit dem Median von 4241 KBE/g der IRS-Gruppe bei Infektion mit der AS+/BS- Mutante *E. faecalis* Stamm 1, lagen die Werte in den Kontrollversuchen um ein Vielfaches höher. Auch war der Nierenbefall in der Immunisierungsgruppe mit 80 % in den Kontrollversuchen gegenüber 63 % bei Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1.

Der Unterschied der \log_{10} (KBE+1/g) zwischen der IRS- und der NaCl-Gruppe betrug $p=0,3257$, zwischen der IRS- und der NRS-Gruppe $p=0,5995$ und zwischen der NRS- und der NaCl-Gruppe $p=0,1805$ (ANOVA).

Erwartungsgemäß erbrachte die Untersuchung des Nierengewebes somit ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p>0,1805$, ANOVA).

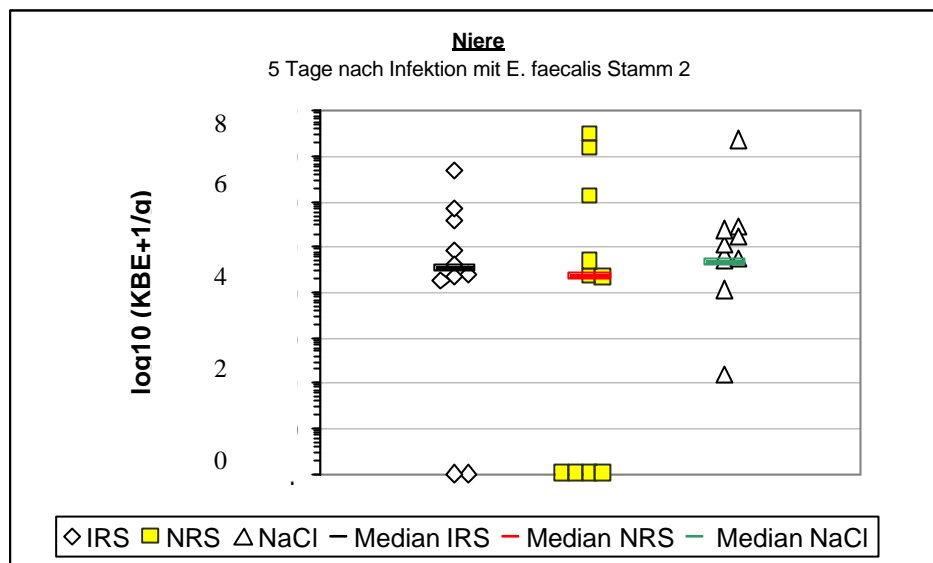


Abbildung 40: Vergleich der \log_{10} (KBE+1/g) in den Nieren bei den Immunisierungsgruppen und der Kontrollgruppe 5 Tage nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 2 (AS-/BS-)

3.2.3.7 Gewichtsverlust

Wie auch schon bei Infektion mit der AS+ Mutante *E. faecalis* Stamm 1 wurde in den Kontrollversuchen der Gewichtsverlauf während der 5-tägigen Infektion beobachtet. Das Gewicht wird jeweils als Mittelwert des prozentualen Anteils vom Gewicht zu Versuchsbeginn +/- Standardabweichung angegeben.

Das mittlere Gewicht der NaCl-Gruppe betrug am Tag der Organentnahme noch 91,1 +/- 7,2 %, das mittlere Gewicht der NRS-Gruppe noch 92,4 +/- 5,5 % und das mittlere Gewicht der Mäuse der IRS-Gruppe noch 91,3 +/- 3,7 % des Ausgangsgewichts. Die Tiere der NaCl-Gruppe nahmen alle an Gewicht ab. Die Tiere der NRS- Gruppe hatten in 2 Fällen (20 %), die der IRS-Gruppe in einem Fall (10 %) eine Gewichtszunahme bzw. Gewichtskonstanz (siehe Abbildung 41).

Der Vergleich zwischen den Immunsierungsgruppen ergab auch hier keine signifikanten Unterschiede ($p=0,8612$, ANOVA).

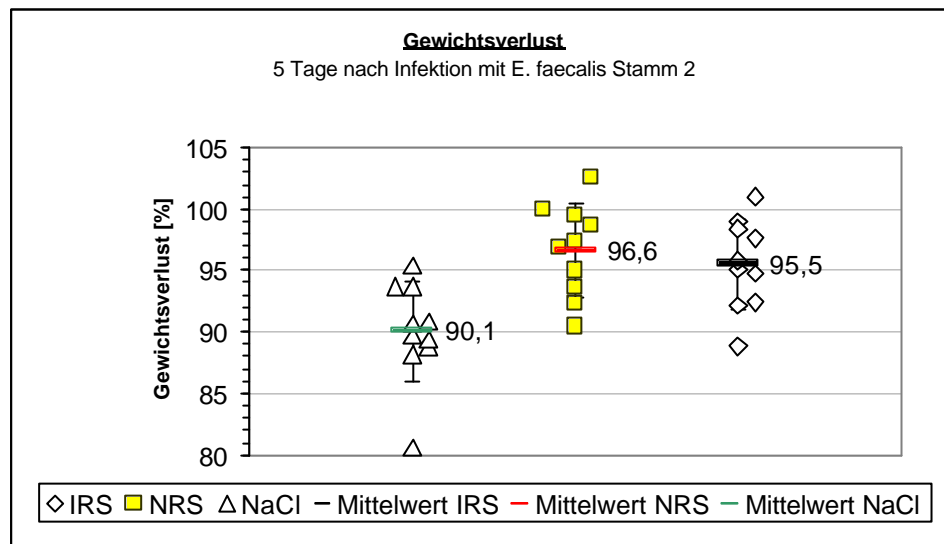


Abbildung 41: : Vergleich des Gewichtsverlust bei den Immunsierungsgruppen und der Kontrollgruppe 5 Tage nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 2 (in Prozent des Ausgangsgewichts)

3.2.3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse der passiven Immunisierung bei Infektion mit *E.-faecalis* Stamm 2 (AS–/BS–)

Zusammenfassend zeigte sich bei der passiven Immunisierung und Infektion mit der AS–/BS– Mutante *E. faecalis* Stamm 2 ein vergleichbares Ausmaß des Organbefalls und des Gewichtsverlustes wie bei der AS+/BS– Mutante *E. faecalis* Stamm 2. Erwartungsgemäß war hier jedoch kein Effekt des IRS zu entdecken. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten sich somit nicht.

3.3 Aktive Immunisierung – Infektion mit der AS-positiven Mutante *E. faecalis* Stamm 1

3.3.1 Aktive Immunisierung

Insgesamt wurden 30 Mäuse aktiv mit AS immunisiert. Als Vergleichsgruppe erhielten 30 Mäuse BSA. Zusätzlich erhielten 10 Mäuse als Kontrollgruppe NaCl nach demselben Schema. Ziel war es, den Mäusen pro Immunisierung 10 µg der jeweiligen Substanz zu verabreichen. Von den Tieren der AS-Gruppe erhielten 10 Tiere 1,85 µg AS pro Immunisierung intraperitoneal, 20 erhielten 9,5 µg AS pro Immunisierung intravenös. 10 Tiere der BSA-Gruppe erhielten 12,7 µg BSA pro Immunisierung intraperitoneal, 20 Tiere erhielten 13,6 µg BSA pro Immunisierung. Die intraperitoneale Injektion bei einigen Tieren mussten wir als Alternative zu Injektion in die Schwanzvenen nehmen, da die Punktion der Schwanzvenen auf Grund der multiplen Injektionen z.T. unmöglich geworden war. Die Proteine wurden in 200 µl sterilem PBS + Calcium gelöst. Die NaCl-Gruppe als Äquivalenzdosis 200 µl sterile NaCl-Lösung. Infiziert wurden 10 Mäuse mit $9,6 \times 10^8$ KBE, 10 Mäuse mit $7,6 \times 10^8$ KBE und 10 Mäuse mit $7,5 \times 10^7$ KBE.

3.3.2 Organmanifestation

3.3.2.1 IgG- und IgM-Titer

Bei allen Mäusen wurde nach der zweiten Immunisierung venöses Blut aus der Schwanzvene abgenommen. Mittels ELISA wurde von allen Tieren der IgG-Titer gegen AS mit Anti-Maus-IgG-Antikörpern bestimmt. Bei 20 Mäusen wurde zusätzlich der IgM-Titer mit Anti-Maus-IgM-Antikörpern bestimmt. Bei 10 Mäusen wurde nach der 3. Immunisierung Blut abgenommen und jeweils der

IgG- bzw. der IgM-Titer bestimmt. Die Titerbestimmung bei den Mäusen der NaCl-Gruppe beschränkte sich auf den Tag der Organentnahme. Die Titer sind als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben.

Es wurden Verdünnungsstufen von 1:50 bzw. 1:100 hergestellt, wenn nicht ausreichende Mengen Blut für diese Verdünnungsstufe gewonnen werden konnte. Die Bestimmung der IgM-Titer erbrachte in der BSA-Gruppe bei 20 Mäusen Titer < 1:50 und bei 10 Mäusen < 1:100 bei allen Blutabnahmen (siehe Abbildung 42).

Die Mäuse der AS-Gruppe hatten bei der ersten Blutabnahme IgM-Titer von 1:220 +/- 304. Am Tag der Organentnahme wurden dann IgM-Titer von 1:300 +/- 683 bestimmt. Der IgG-Titer zu denselben Zeitpunkten betrug 1:17000 +/- 23769 bei der ersten Blutabnahme, 1:20000 +/- 146943 bei der zweiten Blutabnahme und schließlich 1:150000 +/- 191622 am Tag der Organentnahme (siehe Abbildung 43). Die Titer der NaCl-Gruppe am Tag der Organentnahme betrug in 8 Fällen <1:25 und in 2 Fällen <100, da auch hier nur diese niedrigste Verdünnungsstufe möglich war.

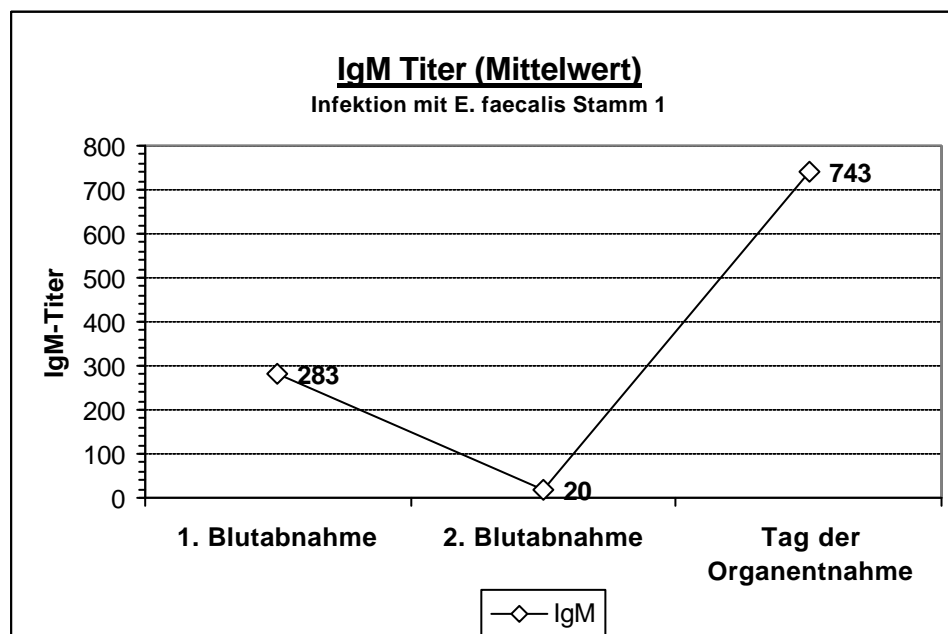


Abbildung 42: IgM-Titerverlauf als Mittelwert während der aktiven Immunisierung und Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-)

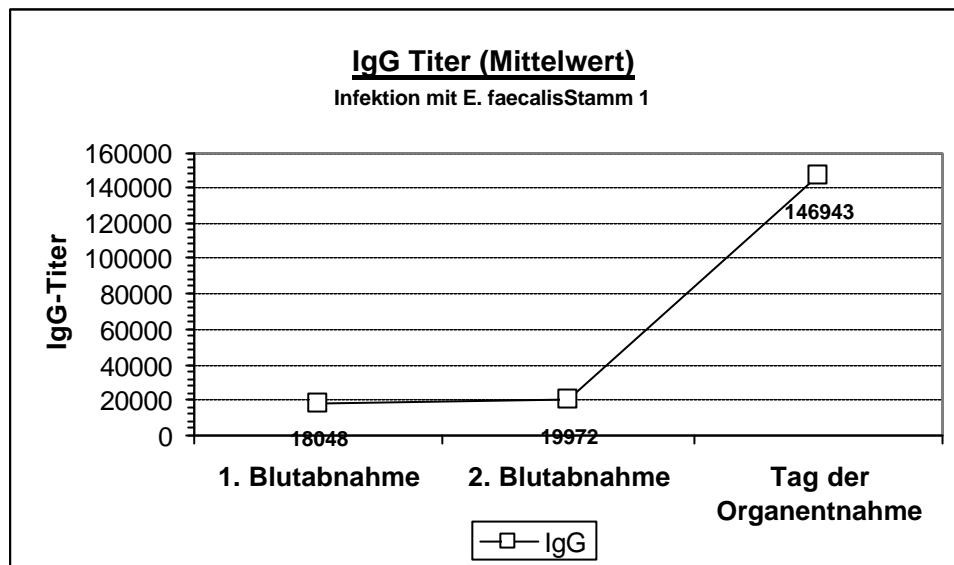


Abbildung 43: IgG-Titerverlauf als Mittelwert während der aktiven Immunisierung und Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-)

3.3.2.2 Herz

Die BSA-Gruppe zeigte in 10 von 30 (30 %) einen Enterokokken-Befall (zwischen 40 und $1,2 \times 10^6$ KBE/g Organgewicht, Median=1), die AS-Gruppe in 14 von 30 Tieren (46 %, 35 bis $7,6 \times 10^5$ KBE/g Organgewicht, Median=1) und die NaCl-Gruppe in 4 von 10 (40 %, 50 bis $7,4 \times 10^3$ KBE/g Organgewicht, Median=1, siehe Abbildung 44). Der Unterschied der \log_{10} (KBE+1/g) war nicht signifikant ($p > 0,3281$, Mann-Whitney U).

Der Vergleich der Gruppen untereinander ergab bei Vergleich der \log_{10} (KBE+1/g) der AS- gegen die BSA-Gruppe einen p-Wert von $0,3281$, AS- gegen die NaCl-Gruppe $p = 0,6619$ und BSA- gegen die NaCl-Gruppe $p = 0,6759$ (Mann-Whitney U).

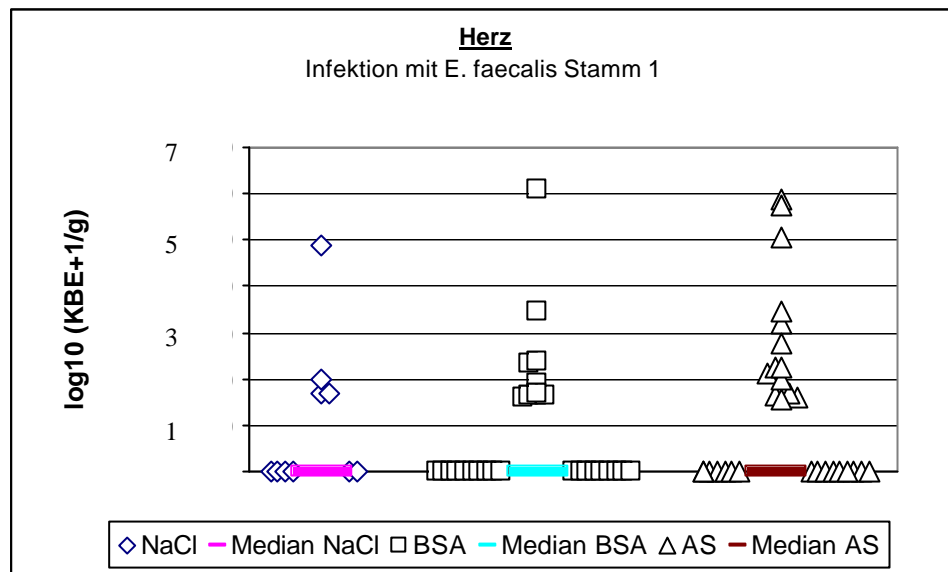


Abbildung 44: Vergleich der log₁₀ (KBE+1/g) Herz der aktiven Immunisierungsgruppen und der Kontrollgruppe 5 Tage nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-)

3.3.2.3 Lunge

In der BSA-Gruppe hatten 11 von 30 (37 %, 35-596 KBE/g Organgewicht, Median=1), in der AS-Gruppe 11 von 30 (37 %, 40 bis 7,6 x 10⁶ KBE/g Organgewicht, Median=1) und in der NaCl-Gruppe 2 von 10 (20 %, 120 bis 560 KBE/g Organgewicht, Median=1) einen Befall des Lungengewebes mit *E. faecalis* Stamm 1 (siehe Abbildung 45). Auch hier fand sich kein signifikanter Unterschied in den log₁₀ (KBE+1/g) ($p > 0,2003$, Mann-Whitney U).

Der Vergleich der log₁₀ (KBE+1/g) der AS- mit der BSA-Gruppe mit dem Mann-Whitney U-Test ergab mit $p = 0,4529$ keine Signifikanz. Ebenso der Vergleich der AS- mit der NaCl-Gruppe ($p = 0,2003$) und der BSA- mit der NaCl-Gruppe ($p = 0,7247$).

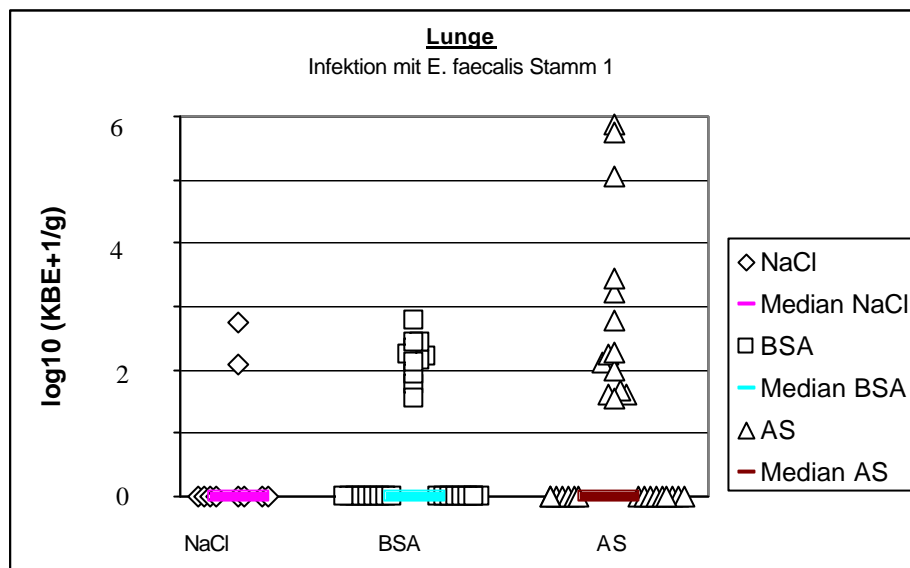


Abbildung 45: Vergleich der \log_{10} (KBE+1/g) Lunge der aktiven Immunisierungsgruppen und der Kontrollgruppe 5 Tage nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-)

3.3.2.4 Leber

In der Leber fand sich eine homogene Verteilung der bakteriellen Absiedlung. So fanden sich bei fast allen Mäusen, mit Ausnahme von 2 Mäusen (7 %) in der AS-Gruppe, die Mutante *E. faecalis* Stamm 1. Die Zahl der KBE/g Organgewicht schwankte zwischen 80 und $1,1 \times 10^3$ (Median=1121) in der BSA-Gruppe, zwischen 50 und 2×10^4 (Median=356) in der AS-Gruppe und zwischen 100 und 930 (Median=324) in der NaCl-Gruppe (siehe Abbildung 46). Der Vergleich der \log_{10} (KBE+1/g) in den Immunisierungsgruppen, ergab auch hier keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,3827$, ANOVA).

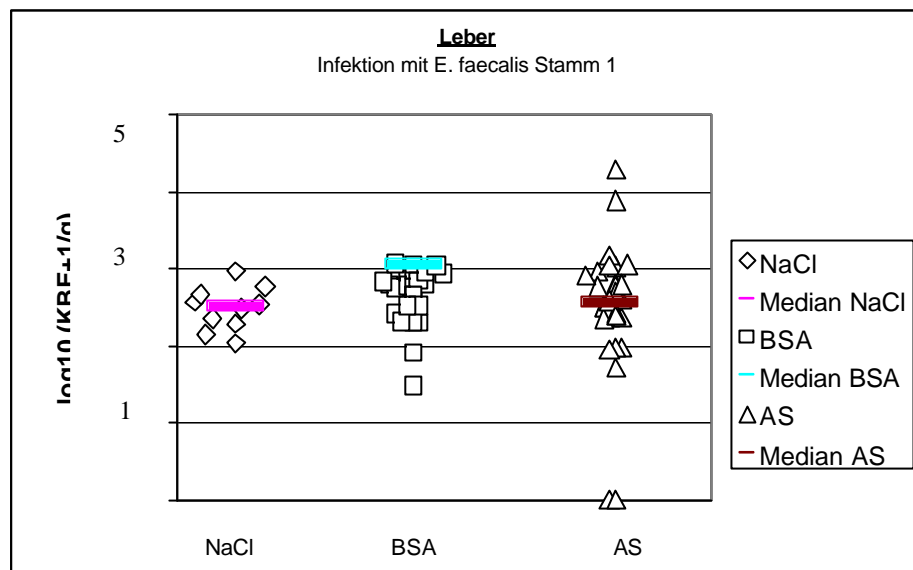


Abbildung 46: Vergleich der $\log_{10}(\text{KBE}+1/\text{g})$ Leber der aktiven Immunisierungsgruppen und der Kontrollgruppe 5 Tage nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-)

3.3.2.5 Milz

In der BSA-Gruppe fand sich bei 19 von 30 Mäusen (63 %) die Mutante *E. faecalis* Stamm 1. Die Zahl der KBE/g Organgewicht schwankte hier zwischen 30 und $1,6 \times 10^4$ (Median=40).

In der AS-Gruppe hatten 21 Mäuse von 30 (70 %) die Mutante in der Milz. Der niedrigste Befall betrug 30, der höchste $1,4 \times 10^4$ KBE/g Organgewicht (Median=57).

In der NaCl-Gruppe schließlich hatten 9 von 10 (90 %) einen Organbefall. Die absoluten Zahlen schwankten hier zwischen 30 und 110 KBE/g Organgewicht (Median=52, siehe Abbildung 47).

Mit dem ANOVA-Test wurden die $\log_{10}(\text{KBE}+1/\text{g})$ der einzelnen Gruppen untereinander verglichen. Der Vergleich der AS- mit der BSA-Gruppe ergab einen p-Wert von 0,6115, der Vergleich der AS- mit der NaCl-Gruppe p=0,8004

und schließlich der Vergleich der BSA- mit der NaCl-Gruppe $p=0,913$. Damit ergaben sich wiederum keine signifikanten Unterschiede.

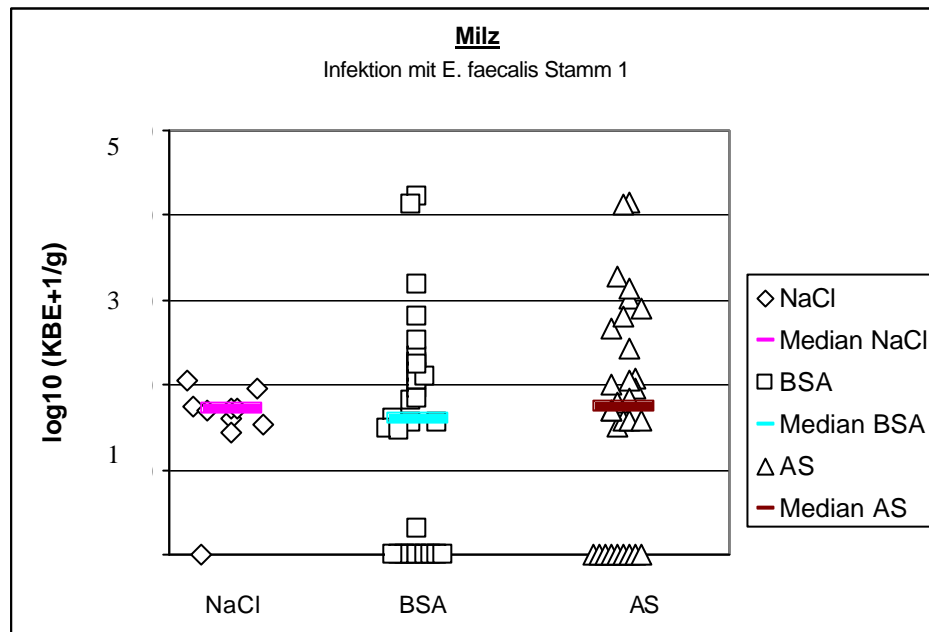


Abbildung 47: Vergleich der log₁₀ (KBE+1/g) Milz der aktiven Immunisierungsgruppen und der Kontrollgruppe 5 Tage nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-)

3.3.2.6 Niere

Wie schon bei der passiven Immunisierung und den Vorversuchen fanden sich hier mit Abstand die höchsten Keimzahlen. In der BSA-Gruppe hatten 24 von 30 Mäusen (80 %) Enterokokken im Nierengewebe (60 bis $1,5 \times 10^7$ KBE/g Organgewicht, Median=47056), in der AS-Gruppe waren es 27 von 30 (90 %, 30 bis $1,9 \times 10^7$ KBE/g Organgewicht, Median=102422) und in der NaCl-Gruppe waren es 6 von 10 Mäusen (60 %, $3,9 \times 10^4$ bis $4,8 \times 10^6$ KBE/g Organgewicht, Median=15274, siehe Abbildung 48).

Der Unterschied der \log_{10} (KBE+1/g) bei Vergleich der AS- mit der NaCl-Gruppe war mit $p=0,05$, ANOVA, signifikant. Beim Vergleich der restlichen Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p>0,1293$, ANOVA). Eine Abhängigkeit des Nierenbefalls von der Höhe der IgG-Titer fand sich nicht ($R^2=0,0134$).

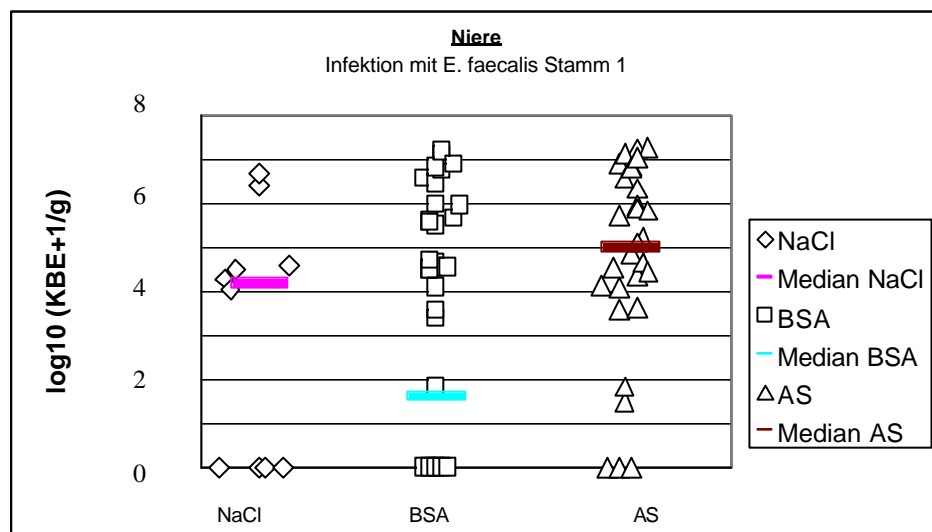


Abbildung 48: Vergleich der \log_{10} (KBE+1/g) Niere der aktiven Immunisierungsgruppen und der Kontrollgruppe 5 Tage nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-)

3.3.2.7 Gewichtsverlust

Die Mäuse in der BSA-Gruppe hatten am Tag der Organentnahme noch ein Gewicht von $94,8 \pm 4,2$ % (Mittelwert \pm Standardabweichung) des Ausgangsgewichts vor der Infektion. Vier Tiere zeigten eine Gewichtszunahme. In der AS-Gruppe hatten die Tiere noch ein Gewicht von $96,2 \pm 2,5$ % wobei eine Maus im Gewicht konstant blieb. Die Mäuse der NaCl-Gruppe hatten noch ein Gewicht von $94,6 \pm 3,8$ % (siehe Abbildung 49).

Der Gewichtsverlust der Mäuse während der 5-tägigen Infektion unterschied sich nicht signifikant voneinander. Der ANOVA-Test ergab im Vergleich der AS-

mit der BSA-Gruppe einen p-Wert von 0,4557, im Vergleich der AS- mit der NaCl-Gruppe $p=0,2174$ und schließlich im Vergleich der BSA- mit der NaCl-Gruppe $p=0,8764$.

Eine Abhängigkeit des Gewichtsverlustes mit der der Höhe der IgG-Titer bestand nicht ($R^2=0,0241$).

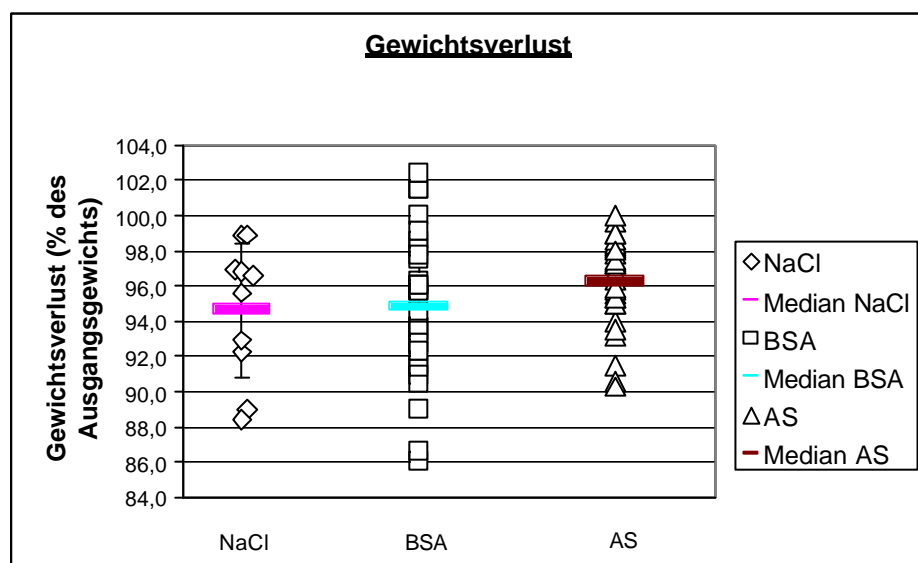


Abbildung 49: Gewichtsverlust der Mäuse nach aktiver Immunisierung, 5 Tage nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-) in Prozent des Ausgangsgewichts

3.3.2.8 Zusammenfassung der Ergebnisse der aktiven Immunisierung und Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-)

Die Versuche zur aktiven Immunisierung und Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 zeigten einen vergleichbaren Organbefall in den unterschiedlichen Versuchsreihen. Die IgM-Titer waren am Tag der Organentnahme im Mittel 1:300 +/- 683, die IgG-Titer 1:150000 +/- 191622.

Als Ausdruck des protektiven Effektes der Antikörper in den Nieren konnten wir signifikante Reduktion der Bakterienzahl bei der AS-Gruppe gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe beobachten ($p=0,05$, ANOVA). Die Anzahl der KBE in den übrigen Organen und der Gewichtsverlust unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

3.4 Milzgewicht bei Injektion von Kaninchenserum

Im Laufe der Versuche fiel auf, dass die Milzgröße und auch das Milzgewicht der Mäuse in den unterschiedlichen Gruppen zum Teil erheblich differierten. Bei gemeinsamer Betrachtung aller Gruppen, also der Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 und Stamm 2 hatten die Mäuse der NaCl-Gruppen nach Infektion mit einer der beiden Mutanten im Mittel ein Milzgewicht von 0,155 g \pm 0,031, die der NRS-Gruppen ein Milzgewicht von 0,223 g \pm 0,056 und die der IRS-Gruppen ein Milzgewicht von 0,21 g \pm 0,052 (siehe Abbildung 50).

Bei Betrachtung der Gruppen nach Infektion mit einem hohen Inokulum von *E. faecalis* Stamm 1 hatten die Mäuse der NaCl-Gruppe im Mittel ein Milzgewicht von 0,157 g \pm 0,027, die der NRS-Gruppe ein Milzgewicht von 0,226 g \pm 0,040 und die der IRS-Gruppe ein Milzgewicht von 0,225 g \pm 0,028 (siehe Abbildung 51). Auch der makroskopische Aspekt zeigte eine deutliche Größenzunahme des gesamten Organes bei den Tieren, die zuvor mit Kaninchenserum immunisiert wurden. Der statistische Unterschied zwischen der IRS- und der NaCl-Gruppe, sowie zwischen der NRS- und der NaCl-Gruppe war mit $p<0,001$ statistisch signifikant (ANOVA). Dahingegen unterschieden sich die Mäuse der IRS-Gruppe nicht signifikant von den Mäusen der NRS-Gruppe ($p=0,3535$, ANOVA).

Nach dieser Beobachtung untersuchten wir noch den Unterschied des Milzgewichtes bei Gabe eines niedrigen Inokulums. Bei Gabe eines hohen

Inokulums betrug das Milzgewicht in der IRS-Gruppe 0,225 g +/- 0,028 gegenüber 0,154 g +/- 0,032 bei Gabe des niedrigen Inokulums. Dieser Unterschied war signifikant niedriger ($p < 0,0001$, ANOVA). Vergleicht man nun die Gabe des niedrigen Inokulums in der IRS-Gruppe noch mit der NaCl-Gruppe ergibt sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,1379$, ANOVA).

In der NRS-Gruppe betrug das Milzgewicht nach Gabe des niedrigen Inokulums noch 0,185 g +/- 0,061. Dies war ebenfalls signifikant niedriger gegenüber der Gabe des hohen Inokulums ($p = 0,0004$, ANOVA). Bei Vergleich der NRS-Gruppe mit niedrigem Inokulum mit NaCl-Gruppe zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0003$, ANOVA).

Diese Beobachtungen führte dazu, jeweils 5 Mäuse dreimal mit NRS zu immunisieren und als Kontrollgruppe 5 Mäusen dreimal NaCl zu injizieren, ohne diese Tiere jedoch zu infizieren. Nach der 5-tägigen Inkubationszeit nach der letzten Immunisierung wurde das Milzgewicht bestimmt.

Hierbei ergab sich in der NaCl-Gruppe ein durchschnittliches Milzgewicht von nur 0,07 g +/- 0,011 und in der NRS-Gruppe von nur 0,139 g +/- 0,027 (siehe Abbildung 52). Dieser Unterschied war mit $p = 0,0046$ (ANOVA) ebenfalls signifikant. Das Gesamtkörpergewicht war bei allen Mäusen vergleichbar und zufällig ausgewählt.

Zusammenfassend zeigte sich bei Mäusen, denen Kaninchenserum gespritzt eine deutliche Splenomegalie. Noch ausgeprägter war diese bei den Tieren, die zusätzlich mit Enterokokken infiziert wurden.

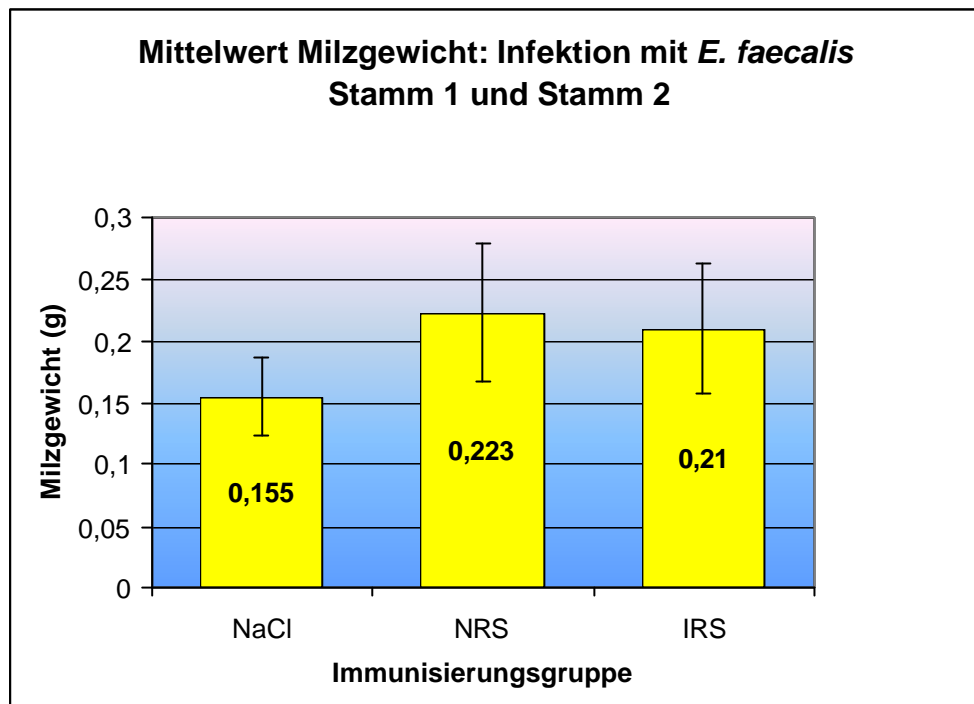


Abbildung 50: Mittelwert des Milzgewichts nach passiver Immunisierung und nach Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 und Stamm 2

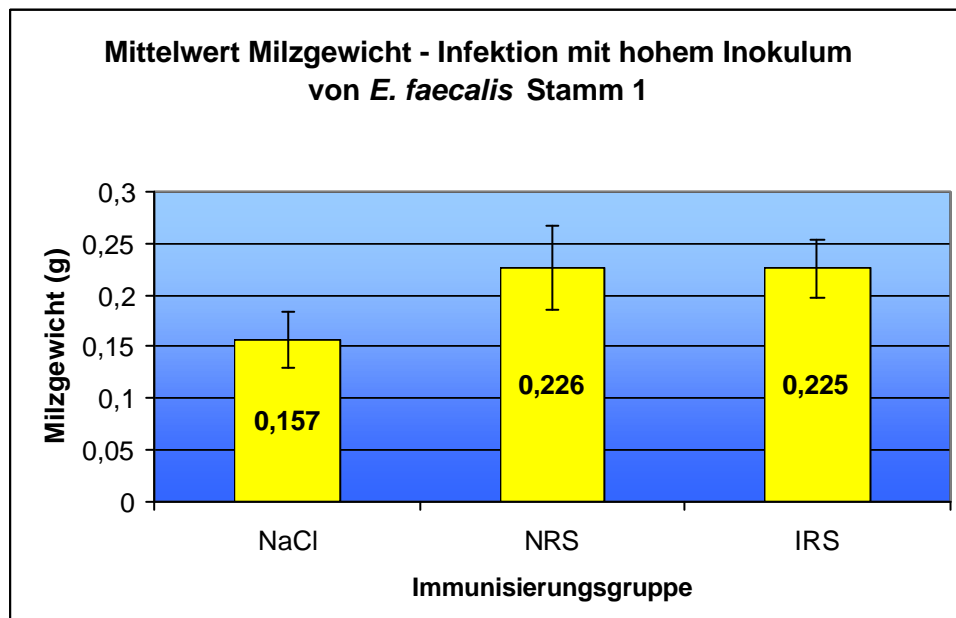


Abbildung 51: Mittelwert des Milzgewichts nach passiver Immunisierung und nach Infektion mit einem hohen Inokulum von *E. faecalis* Stamm 1

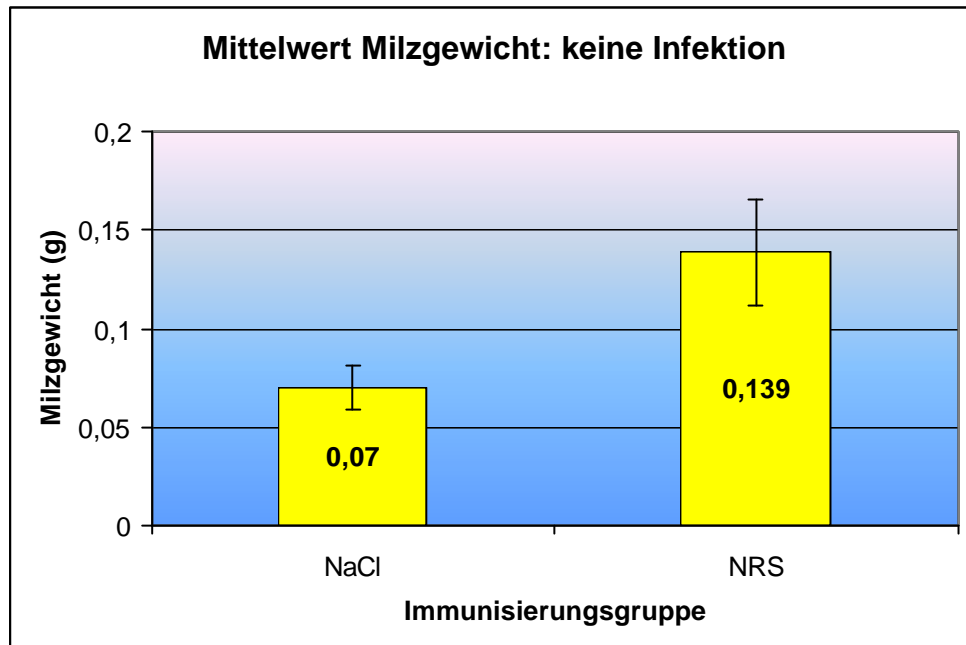


Abbildung 52: Mittelwert des Milzgewichts nach passiver Immunisierung ohne nachfolgende Infektion

4 Diskussion

Enterokokken-Infektionen gehören zu den wachsenden Problemen insbesondere bei Intensivpatienten, immunsupprimierten Patienten und bei Neugeborenen [5]. Die Letalität der Enterokokken-Bakteriämien wird mittlerweile mit über 40 % beziffert, und die Therapie-Optionen sind insbesondere bei multiresistenten Enterokokken deutlich eingeschränkt [8, 29].

Die Zunahme an multiresistenten Enterokokkenstämmen erfordert ein Umdenken in der Therapie und das Erarbeiten effektiver Alternativen. Viele Arbeiten beschäftigten sich mit der Prävention, sowie mit medikamentös antibiotischen Therapien der Infektionen. In dieser Arbeit wurde die Möglichkeit von aktiven und passiven Immunisierungen gegen das Oberflächenprotein AS von *E. faecalis* in vivo getestet.

Wir entwickelten ein Maus-Sepsis-Modell in dem wir zeigen wollten, dass die Rolle opsonierender Antikörper bei Enterokokkeninfektionen bisher unterschätzt wurde [77-79]. Durch intravenöse Infektion der Versuchstiere mit AS-exprimierenden *E.-faecalis*-Mutanten (*E. faecalis* Stamm 1) und vorhergehende passive Immunisierung mit Kaninchenserum konnte eine signifikante Reduktion der Bakterienlast in den Nieren der infizierten Tiere und eine Reduktion des Gewichtsverlustes beobachtet werden. Die aktiven Immunisierungen erbrachten einen signifikanten Unterschied in der Reduktion der Enterokokkenzahl in den Nieren, jedoch keine Verringerung des Gewichtsverlustes.

In den Lungen, Lebern und Herzen der Tiere beobachteten wir weder bei den passiven noch bei den aktiven Immunisierungen eine signifikante Reduktion der Enterokokkenzahl.

4.1 Methodik

Zunächst mussten jedoch methodische Fragestellungen in speziellen Versuchen bearbeitet werden. So wussten wir schon zu Beginn der Arbeit, dass die Interaktion von AS und BS zu einer Klumpungsreaktion im Nährmedium

fürhte. Dies machten wir uns zum einen bei der Phänotypisierung der einzelnen Mutanten zu Nutze, zum anderen stellte es uns vor das Problem, dass das Auszählen der Kolonien auf den Agarplatten möglicherweise zu falsch-niedrigen Ergebnissen führt. Verwendet wurden die Stämme *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-), Stamm 2 (AS-/BS), Stamm 3 (AS+/BS+) und Stamm 4 (AS-/BS+). Diese sind schon in früheren Arbeiten zu biochemischen Fragestellungen, insbesondere der Expression ihrer Oberflächenproteine und Virulenzfaktoren AS und BS verwendet worden [56, 58, 77].

Die Expressierung der AS und der BS führt zu verbesserten Zell-zu-Zell-Kontakten [52-56, 58, 77]. Makroskopisch zeigt sich dieser Kontakt als eine Klumpungsreaktion in der Nährlösung. Als Methoden, diese Reaktion aufzuheben verwendeten wir das Rütteln auf dem Schüttelmixer, die Behandlung mit dem Ultraschall-Homogenisator und die Verdünnung der konzentrierten Stammlösung. Es zeigte sich, dass die Klumpung allein durch eine dieser Methoden nicht reversibel war. Das beste Resultat erhielten wir nach Behandlung einer 1:10-Verdünnung der Stammlösung 2 Minuten auf dem Schüttelmixer und anschließender 2-minütiger Behandlung mit dem Ultraschall-Homogenisator. Getestet wurde dieses Verfahren bei Kombination von Mutanten, die jeweils eine der beiden Strukturen AS oder BS exprimierten, und der AS+/BS+ -Mutante *E. faecalis* Stamm 3, die schon zuvor bei alleinigem Wachstum die stärkste Klumpung zeigt. Der Erfolg wurde jeweils unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Wichtig war, dass es auch nach 2 Minuten Ultraschall zu keiner thermischen Schädigung der Bakterien kam. Der Erfolg wurde durch vorhergehende und nachfolgende Konzentrationsbestimmungen mittels Verdünnungsreihen überprüft. Dieses Vorgehen wurde standardisiert für alle Versuche beibehalten. Ein weiteres Problem stellte das Einfrieren der Bakterien-Stammlösungen dar. Um sicher zu gehen, dass die Bakterienstämme in den späteren Versuchen auch nach Auftauen aus -80 °C noch vital waren, wurden diese nach dem Auftauen erneut angezüchtet und die erhaltenen

Konzentrationen mit den ursprünglichen verglichen. Diese stimmten vorher und nachher überein.

Durch diese Versuche konnten wir sicherstellen, dass alle nachfolgenden Versuche bezüglich Auszählung koloniebildender Einheiten richtig sind, und dass keine Interferenzen oder Störfaktoren, wie ein Absterben der Enterokokken durch wiederholtes Einfrieren oder Klumpungsreaktionen zu erwarten waren.

Weiterhin beschäftigten wir uns mit der Organmanifestation der Enterokokkenstämme *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-) und Stamm 2 (AS-/BS-), um festzustellen, welche Mutante uns in den späteren Versuchen als Vergleichsgruppe ohne Exprimierung der AS dienen konnte. Untersucht wurden Blut, Herz, Lunge, Leber, Milz und Nieren der Versuchstiere auf Enterokokkenwachstum nach intravenöser Infektion. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Stämmen, weder bei Verabreichung eines hohen, noch bei Verabreichung eines niedrigen Inokulums. Die höchsten Zahlen fanden sich bei beiden Gruppen in den Nieren unabhängig davon ob AS exprimiert wurde oder nicht. Dies entspricht auch der klinischen Relevanz, da Enterokokken bevorzugt Harnwegsinfekte bzw. Infekte im Urogenitaltrakt auslösen können [4-6, 8, 9]. Dies deckt sich nicht mit früheren Beobachtungen *in vitro*, dass eine erleichterte Adhärenz an Nierentubuluszellen bei Vorhandensein von AS zu bestehen scheint. In der Arbeit von Kreft et al. wurde die Rolle der AS bei der Bindung an eukaryote Zellen untersucht. Verwendet wurden Tubuluszellen von Schweinen, die zuvor mit Formalin als Einzelschicht fixiert wurden. Zwei Erklärungsmodelle wurden hierfür geliefert. Die favorisierte Erklärung ist, dass die Adhärenz als Folge spezifischer Interaktionen zwischen dem Adhäsin AS und den Tubuluszellen zu sehen ist. Ein anderes Erklärungsmodell sieht die Adhärenz als Folge einer unspezifischen Bindung von *E. faecalis* mit konsekutiver Bindung an schon adhärenente Bakterien über die AS. Es wurde gezeigt, dass *E.-faecalis*-Stämme mit AS-Exprimierung sich

in höherem Maße an Nierentubuluszellen anlagern als *E.-faecalis*-Stämme ohne AS-Exprimierung [62].

Eine Erklärung für den hohen Befall der Nieren in allen Infektionsgruppen wäre ein Dosiseffekt bei Injektion eines sehr hohen Inokulums, und die sicherlich anderen Grundvoraussetzungen bei unserem Modell in vivo gegenüber den in vitro-Versuchen an einer Formalin-fixierten Zellschicht. Eine Veränderung der Oberflächenrezeptoren der Tubuluszellen wurde schon damals diskutiert [62].

Um eine Exprimierung von AS bei der AS- -Mutante *E. faecalis* Stamm 2 während der Versuche auszuschliessen, testeten wir die aus den Organen angezüchteten Stämme erneut auf ihren Phänotyp. Es ergab sich hierbei jedoch in keinem Fall ein Nachweis der AS.

Wichtig für uns war, dass die verschiedenen Phänotypen einerseits gleichermassen in den Organen wiederzufinden sind, und dass andererseits sichergestellt ist, dass sich der Phänotyp der *E. faecalis*-Mutanten im Laufe der Zeit nicht ändert; beides konnte bestätigt werden.

Auf Grund dieser Ergebnisse entschlossen wir uns für die Immunisierungsversuche die beiden Mutanten *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-) und als Vergleichsgruppe *E. faecalis* Stamm 2 (AS-/BS-) zu verwenden, da hier eindeutig auszuschliessen war, dass der Phänotyp bei allen Versuchen unverändert blieb und die Ergebnisse vergleichbar blieben.

4.2 Präformierte Antikörper

Da Enterokokken zur physiologischen Darmflora von Menschen und Tieren gehören [1, 3, 4] mussten wir ausschliessen, dass das von uns verwendete NRS für die Vergleichsgruppe schon präformierte Antikörper gegen Enterokokken-AS besaß, bzw. dass das Kaninchen für die spätere Herstellung des IRS schon Antikörper gegen AS besaß. Als NRS diente uns das Serum des Kaninchens, das wir später für die Immunisierung gegen AS verwendeten. Vor

Beginn der Versuche liessen wir uns Serum von 10 unterschiedlichen Kaninchen zusenden, um diese im ELISA

auf das Vorhandensein präformierter Antikörper gegen AS zu testen. Es zeigten sich in der Tat bei einigen Individuen leicht erhöhte Antikörper-Titer von bis zu 1:25. Für die spätere Herstellung des IRS suchten wir ein Individuum ohne Antikörper gegen AS aus.

Ebenfalls grossen Wert legten wir auf die Tatsache, dass das verwendete NRS nur von einem Individuum stammte. Bei Verwendung von gepooltem Kaninchenserum, wie es sonst im Handel angeboten wird, erschien uns die Gefahr zu groß, eine unüberschaubare Vielfalt von Antikörpern mit folgender Kreuzreaktivität und unspezifischen Bindungen zu erhalten. Dieses Serum wurde im ELISA vorher auf Antikörper gegen AS untersucht, und keine Antikörper gegen AS gefunden. Nicht ausschliessen lässt sich in unserem Versuchsaufbau jedoch das Vorhandensein von Antikörpern gegen andere Enterokken-Oberflächenantigene.

4.3 Immunisierungsversuche

Nach Ausschluss methodischer Störfaktoren beschäftigten wir uns mit den eigentlichen passiven Immunisierungsversuchen. Als Erweiterung zu den Arbeiten von Huebner et. al [84] überprüften wir als Erfolgskontrolle die Mäuseseren auf präformierte Antikörper bzw. ausreichende Antikörper-Titer gegen AS nach Immunisierung mit heterologem Serum. So wurde nach der dritten und letzten Immunisierung den Mäusen Blut entnommen, und mittels ELISA die Höhe der Titer bestimmt. Auf diese Weise stellten wir sicher, dass alle Tiere einen Titer von Kaninchen-IgG-Antikörpern gegen AS hatten. Alle Tiere zeigten hohe Titer mit Werten von bis zu 1:33917 (Mittelwert 1:20391 +/- 8252). Auf diese Weise konnten wir sicherstellen, dass ein möglicher Effekt allein auf die Interaktion der Antikörper mit AS zurückzuführen wäre.

Wie schon bei den Versuchen zu den Organmanifestationen, fanden wir auch bei den Immunisierungsversuchen die höchsten Koloniezahlen von Enterokokken in den Nieren. In unseren Immunisierungsversuchen erreichten wir eine signifikante Reduktion der Bakterienzahl in den Nieren der Tiere, die immunes Kaninchenserum (IRS-Gruppe) erhielten, gegenüber der NRS-Gruppe.

Ebenfalls signifikant war die Reduktion der Bakterienzahl in den Milzen bei Injektion eines niedrigen Inokulums. Es fanden sich signifikant weniger Bakterien pro Gramm Organ in der IRS-Gruppe gegenüber der NRS-Gruppe., Bei Gabe eines hohen Inokulums jedoch zeigten sich in der IRS-Gruppe und NRS-Gruppe vergleichbare Ergebnisse.

Schon zu Beginn der Immunisierungsversuche fiel nebenbefundlich eine erhebliche Diskrepanz der makroskopisch erkennbaren Milzgröße, sowie des Milzgewichtes der Versuchstiere auf. Schnell fand sich der Zusammenhang zwischen der Milzgröße und der vorherigen Immunisierung mit IRS und NRS. Insbesondere die Tiere, die ein hohes Inokulum erhalten haben und mit einem der Kaninchenseren immunisiert worden sind, zeigten eine Splenomegalie gegenüber den Tieren die nur NaCl oder ein niedriges Inokulum erhalten haben. Noch ausgeprägter zeigte sich die Zunahme des Milzgewichtes bei Immunisierung bzw. Injektion mit einem Kaninchenserum (IRS oder NRS) und zusätzlicher Infektion mit *E. faecalis*. Diese Beobachtung wurde zuvor schon in Endokarditis-Versuchen mit Kaninchen gemacht [76, 94]. Eine Erklärung dafür wurde jedoch nicht gegeben und die Splenomegalie als allgemeines Krankheitsmerkmal gewertet. Auf Grund dieser Beobachtung entschlossen wir uns, eine kleine Versuchsreihe mit 10 Mäusen durchzuführen, bei denen wir 5 Tieren Kaninchenserum und 5 Tieren NaCl als Kontrollgruppe injizierten und die Milzen ohne Infektion untersuchten. Es konnte hier zwar eine leichte Zunahme der Milzgröße beobachtet werden, das Ausmaß der Splenomegalie nach einer Enterokokken-Infektion konnte jedoch längst nicht beobachtet werden. Die Injektion des Kaninchenserals kann den Effekt auf die Milzgröße somit

teilweise erklären. Ob dies darüber hinaus auf eine spezielle Rolle der Milz bei Enterokokken-Infektionen hinweist muß offen bleiben. Auffallend war jedoch, dass die Zunahme der Milzgröße am stärksten nach der Infektion mit Enterokokken zu sehen war.

In den Herzen der Versuchstiere fanden wir bei etwa einem Viertel der Tiere ein Enterokokkenwachstum. Bei zwei Tieren fanden wir sehr hohe Zahlen koloniebildender Einheiten im Herzen. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass *E. faecalis* in der Lage ist, sich auf dem Endokard von Herzklappen anzusiedeln und somit eine Prädilektionsstelle für *E. faecalis* zu bilden. Der Verdacht auf eine Endokarditis bzw. Perimyokarditis liegt daher nahe [56, 60, 62, 63, 68]. Einen histologischen Beweis dafür haben wir nicht, da unsere Studie für diese Untersuchungen nicht ausgelegt war. Bei den früher durchgeführten Studien zur Endokarditisentwicklung im Kaninchenmodell wurde zuvor eine Läsion an den Herzklappen gesetzt [76], was bei unseren Versuchen nicht der Fall war. Der Befall des Herzens in der IRS-Gruppe war in der Tendenz niedriger als in den Kontrollgruppen, erwies sich jedoch als statistisch nicht signifikant.

In den Lebern der Tiere fanden sich durchgehend hohe Zahlen von Enterokokken. Diese Beobachtung in unseren Tierversuchen steht derzeit noch im Widerspruch zu früher gemachten klinischen Beobachtungen, die dem Leberbefall, außer bei Cholangitiden, bisher keine grössere Rolle zumaßen. Obwohl auch hier der Unterschied bei den passiven Immunisierungen sich als nicht signifikant erwies, deutete der Trend daraufhin, dass die geringste Anzahl an Enterokokkenkolonien in der IRS-Gruppe zu finden war.

Der Lunge wurde bisher aus klinischer Sicht ebenfalls eine untergeordnete Rolle Zielorgan bei Enterokokkeninfektionen beigemessen [4-7, 9]. Wir fanden in unseren Experimenten immerhin bei etwa einem Drittel der Mäuse niedrige Zahlen von Enterokokken in den Lungen. Vereinzelt wurde in früheren Arbeiten auch schon ein Befall der Lungen im Tierversuch, bis hin zu Nekrosenbildung, bei Vorhandensein von AS beschrieben [76]. Wie schon in der Leber konnte

auch hier keine signifikante Reduktion der Zahl der Enterokokken durch die Antikörper gegen AS erreicht werden.

Aus diesen Beobachtungen müssen wir den Schluss ziehen, dass im Tierversuch die Antikörper gegen AS nicht in der Lage waren die Gesamtzahl der Enterokokken im Organismus zu reduzieren.

Von Anfang an züchteten wir alle Organe auf speziellen Enterokokken-Nährböden und auf Blutagar. Auf den Blutplatten mit Lungengewebe zeigte sich dabei eine große Anzahl von verschiedensten Bakterien. Auf Grund des streng sterilen Vorgehens muss dies als Wachstum der residenten Flora des Respirationstraktes gesehen werden. Wir beschlossen aus Gründen der Praktikabilität, uns auf die Auswertung der Kolonien auf dem Enterokokken-Selektivagar zu beschränken.

Als „klinischen“ Verlaufsparemeter fügten wir unseren Versuchen ebenfalls in Erweiterung zum Maus-Sepsis-Modell von Huebner et al. [84] die Untersuchung des Gewichtsverlusts, bzw. die Gewichtsveränderungen in den 5 Tagen nach der Infektion hinzu. Dieser im Tierversuch gut zu untersuchende Parameter zeigte sich als sehr gutes Zeichen der Sepsis und Schwere der Infektion. Diese Tatsache ist umso wichtiger, da es sich bei unseren Mäusen um noch heranwachsende Individuen handelte, für die ein Gewichtsverlust noch schwerwiegender war, als für ausgewachsene Individuen.

Es gelang uns in den passiven Immunisierungsversuchen, den Gewichtsverlust in der IRS-Gruppe signifikant gegenüber der Vergleichs- bzw. der Kontrollgruppe zu reduzieren. Somit nahm die Infektion bei den immunisierten Tieren klinisch einen leichteren Verlauf, als bei den nicht-immunen Individuen. Als Extrembeispiel während der passiven Immunisierungsversuche starb eine Maus der NaCl-Kontrollgruppe vorzeitig am 4. Tag nach Infektion. Diese hatte zuletzt noch 88,4 % ihres ursprünglichen Gewichtes und es fanden sich sehr hohe Zahlen von Bakterien in allen Organen. Ob dies Zufall war oder Ausdruck eines besonders schweren Krankheitsverlaufes bleibt offen.

Unterstrichen wurden die o.g. Beobachtungen durch unsere Kontrollversuche mit *E.-faecalis*-Stämmen ohne Expression der AS (*E. faecalis* Stamm 2). Hier wurde keine signifikante Reduktion des Organbefalls durch die Enterokokken oder des Gewichtsverlustes bei Vorhandensein von Kaninchen-Antikörpern gegen AS beobachtet.

Die Untersuchung der Höhe Bakterienbefalls in den einzelnen Organen erbrachte keine Aussage über die Schwere der Infektion in Abhängigkeit von der Höhe des applizierten Inokulums. Diese zeigten sich unabhängig davon ob ein niedriges oder ein hohes Inokulum injiziert wurde.

Insgesamt konnten wir somit methodisch eindeutig nachweisen, dass Antikörper gegen AS eine Reduktion des Gewichtsverlustes sowie eine Reduktion der Anzahl von Enterokokken in den Nieren und Milzen bei passiver Immunisierung bewirken. Eine Reduktion der Enterokokken in Lunge, Herzen und Lebern und somit im Gesamtorganismus konnte jedoch nicht erreicht werden. Im klinischen Alltag kommt diesen Organen bei Enterokokkeninfektionen bisher weniger Bedeutung zu, da sie beim Menschen bisher kein Zielorgan für Enterokokken darstellen. Im Widerspruch dazu stehen jedoch unsere Beobachtungen im Tierversuch wo wir z.T. eine hohe Besiedlung mit Enterokokken in diesen Organen beobachteten. Ob dies ein Dosis-Effekt bei Gabe von hohen Inokula ist oder eine andere Ursache hat muss unklar bleiben, da unser Versuchsaufbau darauf nicht ausgelegt war.

Weiterhin führten wir eine Versuchsreihe zum Thema aktive Immunisierung gegen AS im Maus-Sepsis-Modell durch. Zwanzig Tage vor der intravenösen Infektion mit *E. faecalis* Stamm 1 (AS+/BS-) wurde begonnen die Tiere aktiv mit AS (Asa1) zu immunisieren. Insgesamt erhielten die Tiere 4 Immunisierungen. Nach der 3. und 4. Immunisierung und unmittelbar vor der Organentnahme erfolgte eine Blutabnahme zur IgM- und IgG-Titerbestimmung. Es liessen sich IgG-Antikörper-Titer von bis zu 1:146943 +/- 191622 finden.

Dies stimmte mit dem Titerverlauf der für unsere passiven Immunisierungsversuche verwendeten Kaninchen überein, bei denen ebenfalls

hohe IgG-Titer von bis zu 1:68883 bzw. 1:125002 erreicht wurden. Eine Frühreaktion der Mäuse sahen wir mit der Bildung allerdings niedrigerer IgM-Titer von 1:297 +/- 683, allerdings mit einer grossen Spannweite.

Auch hier konnten wir eine signifikante Reduktion der Bakterienzahl in den Nieren bei der AS-Gruppe gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe beobachten. Analog zu den passiven Immunisierungen fand sich bei 3 Mäusen eine hohe Bakterienlast im Herzen als mögliches Zeichen einer Enterokokken-Endokarditis. Die Ergebnisse bei Lunge, Leber und Milz entsprachen im wesentlichen denen der passiven Immunisierungen. Auch hier war keine Keimzahlreduktion durch die AS-Antikörper in diesen Organen zu finden.

Eine Splenomegalie wie bei den Mäusen der passiven Immunisierungsversuche wurde nicht gesehen.

Auch ein signifikanter Unterschied im Gewichtsverlust konnte hier nicht beobachtet werden.

4.4 Vergleich mit anderen Tiermodellen

Die zuvor von Huebner et al. [84] gemachten Versuche zum Kapselpolysaccharid von *E. faecalis* 12030 als Ziel opsonierender Antikörper bei passiven und aktiven Immunisierungsversuchen zeigten eine antigene Wirkung des Polysaccharids. Eine signifikante Reduktion des Bakterienbefalls in Leber, Milz und Nieren bei Tieren die IRS erhielten im Gegensatz zu den Tieren die NRS erhielten, konnte hier gezeigt werden. Die Gabe von Antikörpern zeigte darüber hinaus eine signifikante Reduktion der Enterokokkenzahl in Leber, Milz und Nieren bei serologisch verwandten Enterokokkenstämmen im Mausmodell. Das Ausmaß der Variabilität dieser Oberflächen-Kapselpolysaccharide ist jedoch bis dato nicht geklärt. Zusätzlich wurde die Therapie einer schon bestehenden Enterokokken-Infektion mittels passiver Immunisierung versucht. Auch hier zeigte sich eine signifikante

Reduktion der Enterokokkenzahl durch Antikörper gegen das kapsuläre Polysaccharid [84].

In einer anderen Arbeit von Huebner et al. zeigte sich, dass Antikörper gegen eine Glycerol-Lipoteichonsäure auf *E. faecalis* 12030 ebenfalls protektiv gegen den *E. faecalis*-Stamm OG1 waren. Bei den immunisierten Mäusen konnten in Leber, Milz und Nieren signifikant weniger Enterokokken gefunden werden als in der Kontrollgruppe. Zudem zeigte sich dieser Effekt auch gegenüber den Vancomycin-resistenten Stämmen *E. faecium* 838970VRE und 805370VRE [97].

Hufnagel et al. veröffentlichten 2004 eine Studie zur Verteilung verschiedener Serotypen bei *E. faecalis*. Aus früher gemachten Studien, wie der Studie von Huebner et al. schlossen sie, dass nur eine begrenzte Anzahl unterschiedlicher Serotypen bei Enterokokken existieren würde. Sie konnten mittels ELISA und Phagozytoseassays vier Serotypen unterscheiden (bezeichnet als CPS-A bis CPS-D), die mehr als 60 % klinisch relevanter *E. faecalis*-Isolate beinhalteten. Diese Untersuchungen wurden in Hinblick auf die Möglichkeit einer Nutzung von Antikörpern gegen Kapselpolysaccharide in immunotherapeutischen Therapieansätzen gemacht. Hufnagel et al. zogen die Schlussfolgerung, dass die Einteilung in unterschiedliche Serotypen helfen könnte, die wichtigsten Serotypen herauszufinden. Diese könnten die Grundlage für eine wirksame Immunisierung gegen die wichtigsten Enterokokken-Polysaccharide darstellen. Die beschränkte Anzahl von Serotypen macht die Möglichkeit der Entwicklung einer Enterokokken-Vakzine wahrscheinlich [100].

In unseren Immunisierungsversuchen hatten wir die Möglichkeit, genetisch vollkommen identische Bakterienstämme zu verwenden, die sich lediglich in der Expression der AS unterschieden. Auf diese Weise konnten wir Störfaktoren wie die Kreuzreaktivität anderer Oberflächenproteine oder unterschiedliche Organmanifestationen anderer Enterokokkenstämme ausschliessen. In anderen Arbeiten konnten signifikante Ergebnisse nur erreicht werden, nachdem die Seren der Kaninchen zuvor mit einem anderen Enterokokkenstamm absorbiert

wurden [97]. Bei uns war die Reduktion der Anzahl koloniebildender Einheiten pro Gramm Organengewicht auch ohne vorhergehende Absorption signifikant unterschiedlich.

McCormick et al. führten Immunisierungsversuche im Endokarditismodell mit Antikörpern durch, die nur gegen einen Teil der AS gerichtet waren. Sie immunisierten Kaninchen gegen den N-terminalen Teil der AS und erhielten so ebenfalls opsonierende Antikörper. Dieser N-terminale Teil spielt eine wichtige Rolle bei der Konjugation der Enterokokken. Eine Reduktion der Bakterienzahl im Endokarditismodell bei Kaninchen konnte jedoch nicht gezeigt werden. Das Problem hierbei war, dass das N-terminale Ende der AS auf den Herzklappenvegetationen nicht zugänglich für Antikörper war [94]. Dies legt nahe, einen anderen Angriffspunkt für Antikörper zu suchen, was wir mit unserem Tiermodell versucht haben.

Wir beschränkten uns nicht nur auf den isolierten Befall eines Organs, wie z.B. dem Endokard der Mäuse, sondern auf die Untersuchung verschiedener Organe. So konnten wir klar zeigen, dass der Gewichtsverlust als Zeichen der Sepsis und der Befall der Nieren als Zeichen eines Harnwegsinfektes, im Einklang mit klinischen Prädilektionsstellen, zu deuten waren. Im Herzen der Mäuse wurden entweder gar keine Enterokokken gefunden oder sehr hohe Koloniezahlen. Dies könnte Hinweis auf eine Endokarditis sein.

4.4.1 Limitationen unseres Tiermodells

Das von uns verwendete Maus-Sepsis-Modell zur passiven Immunisierung gegen das Oberflächenprotein AS sollte eine prophylaktische Immuntherapie mit nachfolgender Bakteriämie simulieren, wie sie bei Patienten im Krankenhaus vorkommt [84]. Das überwiegend von solchen schweren Enterokokken-Infektionen betroffene Patientengut umfasst schwerstkranke Patienten, wie Intensivpatienten, onkologische Patienten, Neugeborene, Dialysepatienten etc. [5, 11, 12, 24-28]. Die in unserem Modell verwendeten

Mäuse waren jedoch allesamt junge, gesunde und vor allem immunkompetente Individuen, die aus vollster Gesundheit einer schweren Infektion ausgesetzt wurden. Die erste Immunisierung ist schon vor der Infektion erfolgt, so dass die Enterokokken schon auf ein immunisiertes Individuum trafen. Der Grund hierfür war, dass wir auf diese Weise am ehesten ein Ergebnis erwarteten, falls es überhaupt einen Effekt geben würde. In Wirklichkeit wird der Weg wohl ein anderer sein, so dass die Bakteriämie vor der Immunisierung steht. Denkbar wäre also für einen sinnvollen klinischen Einsatz, eine prophylaktische Immunisierung für Patienten mit einem besonders hohen Risiko für Enterokokkeninfektionen.

Im Gegensatz zu den oben gemachten Beobachtungen sahen wir, dass das Vorhandensein von AS im Tierversuch mit Ratten nicht im Zusammenhang mit der Ausbildung einer Endokarditis bei den Tieren stand [99] und so wohl auch Spezies-spezifische Faktoren eine Rolle zu spielen scheinen. Die bei uns gemachte Beobachtung darf also nicht ohne weiteres auf andere Spezies übertragen werden und muss noch Gegenstand weiterer Untersuchung sein. Ein weiterer wichtiger Punkt bei unseren Versuchen ist das Fehlen der BS und anderer Virulenzfaktoren in den von uns verwendeten *E.-faecalis*-Stämmen [63]. Eine Potenzierung der Virulenz durch Vorhandensein der AS mit der BS und der somit geschaffenen Möglichkeit der erleichterten Konjugation mit Plasmidaustausch war bei unseren Versuchen nicht gegeben [52-56, 58, 77]. So konnte früher gezeigt werden, dass nach Induktion einer experimentellen Endokarditis mit AS und BS exprimierenden Enterokokkenstämmen diese zum Tod der Versuchstiere und zu grösseren Vegetationen an den Herzklappen führten, was bei alleinigem Vorhandensein einer dieser Virulenzfaktoren nicht der Fall war [76]. Wir verzichteten dennoch auf die Kombination der AS mit der BS, da es bei Vorhandensein beider Proteine zu einer Vielzahl methodischer Probleme, wie z.B. der Autoaggregation kommt.

Ebenso verzichteten wir auf die Kombination mit mehreren Faktoren, die z.B. erbracht hatten, dass eine im Mausmodell induzierte Peritonitis bei

Vorhandensein von AS und Cytolysin verschlechtert wurde, oder die Kombination von AS und Gelatinase bei Ratten mit polymikrobieller abdomineller Sepsis zu verstärktem Gewichtsverlust als Zeichen des komplizierten Verlaufes führten [73]. Unser Ziel war es vielmehr allein die Rolle der AS als Ziel opsonierender Antikörper zu untersuchen.

Bei unseren aktiven Immunisierungsversuchen konnte im Gegensatz zu den passiven Immunisierungen kein signifikanter Unterschied im Gewichtsverlust gefunden werden. Ursache für den geringeren Gewichtsverlust bei den passiven Immunisierungen könnten Antikörper im Kaninchenserum gegen uns noch nicht bekannte Enterokokken-Oberflächenstrukturen sein. Diese könnten schon von vornherein in den als IRS benutzten Seren vorhanden gewesen sein, und den geringeren Gewichtsverlust bewirkt haben.

Dies jedoch spricht wiederum dafür, dass die Immuntherapie prinzipiell ein gangbarer Weg sein könnte, auch wenn die AS wohl nicht das optimale Target zu sein scheint.

In unserem Tiermodell wird ein sehr schneller und fulminanter Sepsisverlauf imitiert, bei dem die Tiere auf einmal einer grossen Menge der Bakterien ausgesetzt werden. Dies könnte im klinischen Alltag allenfalls bei kritisch kranken Patienten vorstellbar sein, deren intestinale Barrierefunktion bei Schock schlechter wird und damit eine Vielzahl von Enterokokken aus dem Darm in die Blutbahn übertreten könnten. Bei der Mehrheit der Patienten im Krankenhaus dürfte es wohl eher ein schleichender Verlauf mit langsamem Beginn der Erkrankung und begleitender Immunantwort des eigenen Organismus sein [73]. Auch die Rolle der Bildung eigener Antikörper bei einem solch langsamen Beginn bleibt unbeantwortet. Andererseits sprechen die klinisch/epidemiologischen Daten dafür, dass offenbar keine ausreichende Immunantwort gegen Enterokokken vorhanden ist. Bei unseren Mäusen bei den passiven Immunisierungsversuchen fand sich während der 5 Tage dauernden Infektion noch keine eigene Immunantwort im Sinne einer Frühreaktion mit IgM-Antikörpern, geschweige denn einer Spätreaktion mit IgG-Antikörpern auf die

Enterokokken-Bakteriämie. Umso wichtiger sehen wir trotzdem den Stellenwert unserer Arbeit gegenüber den o.g. Arbeiten zur Immunisierung gegen Polysaccharide. Im Gegensatz zu den Polysacchariden, gegen die der Mensch nur IgM-Antikörper entwickelt, werden gegen Proteine wie die AS auch IgG-Antikörper gebildet. Dies könnte bei protrahiertem Krankheitsverlauf vorteilhaft sein, sofern eine dauerhafte Protektion gegeben wäre.

4.4.2 Die Rolle von Antikörpern bei Enterokokken-Infektionen

Versuche zu Immuntherapien waren immer wieder gegen Virulenzfaktoren der Enterokokken, wie Kapselpolysaccharide, Lipoteichonsäure, Hämolyisin etc. gerichtet [63, 85, 97]. In unseren Versuchen diente die AS der Enterokokken erstmalig allein als Zielsubstanz opsonierender Antikörper.

In früheren Arbeiten wurde davon ausgegangen, dass das durch neutrophile Granulozyten verursachte Abtöten der Enterokokken komplementvermittelt ist und Antikörper eine eher untergeordnete Rolle zu spielen scheinen [89-91]. Brenda Harvey et al. zeigten, dass das Komplementsystem eine wichtige Rolle bei der Abtötung von Enterokokken hat. Sie konnte in Versuchen mit polymorphkernigen Leukozyten von Erwachsenen und gesunden Neugeborenen zeigen, dass das Abtöten der Enterokokken durch neutrophile Granulozyten mit gleicher Effizienz funktionierte. Um diesen Effekt auszuschließen wurden die Kaninchenserum in unseren Versuchen vor Injektion zunächst hitzeinaktiviert und somit der Einfluss des Komplementsystems für die späteren Versuche ausgeschaltet [91]. Eine andere Studie belegte zumindest den verstärkenden Effekt von Antikörpern bei der Immunantwort der neutrophilen Granulozyten. Die Autoren diskutierten die Möglichkeit einer adjuvanten Therapie mit Enterokokken Antikörpern, um die Wirtsantwort des betroffenen Organismus zu verstärken [92].

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass Antikörpern gegen AS in unserem Maus-Sepsis-Modell eine gewisse Rolle zukam. Die signifikante Reduktion der

Enterokokkenzahl in den Nieren und die Abnahme des Gewichtsverlustes könnten ein Hinweis auf ein direktes Abtöten von Enterokokken durch spezifische Antikörper gegen AS sein.

4.5 Genetische Variation der AS

Die Kaninchen zur Gewinnung des IRS in unserer Arbeit wurden mit der AS Asa1 aktiv immunisiert. Diese AS ist auf dem Plasmid pAD1 codiert [57]. Die Infektion der Mäuse bei den passiven Immunisierungsversuchen fand jedoch mit Enterokokkenstämmen statt, die die AS Asc10 exprimierten, welche sich auf dem pCF10 Plasmid befindet [56]. Es gibt mehr als 20 pheromon-sensible Plasmide bei *E. faecalis* und mindestens 17 der AS-Proteine auf diesen Plasmiden sind immunologisch miteinander verwandt [70]. Nur eine kleine Region von etwa 20 % sind variabel, wohingegen der Großteil der Sequenz auf den Plasmiden konstant festgelegt ist. Eine Ausnahme bildet hier die AS Asa373, welche eine andere Struktur besitzt [61].

AS wird häufiger bei *E. faecalis*-Isolaten von Kranken mit klinisch relevanten Infektionen gefunden, als bei gesunden Individuen. Die Untersuchung klinischer *E. faecalis*-Isolate z.B. bei Endokarditiden ergab eine Inzidenz der AS von 52 %, bei anderen Infektionen waren es 72 % gegenüber 30 % bei gesunden Freiwilligen [60]. Somit hatten wir in unserer Arbeit die Möglichkeit ein klinisch relevantes Oberflächenprotein auf seine Rolle als Antigen zu untersuchen. Entsprechend diesen Beobachtungen, dass häufiger AS+ -Enterokokken in klinischen Isolaten gefunden werden, konnten wir hier einen Extremfall mit ausschliesslich AS-exprimierenden Enterokokken simulieren [60, 99]. Man kann also davon ausgehen, dass die in unserer Arbeit beobachtete Verringerung des Gewichtsverlustes und Reduktion der Enterokokkenzahl in den Nieren nicht nur auf einen speziellen Enterokokken-Stamm beschränkt ist, der eine bestimmte AS exprimiert, sondern auf verschiedene Stämme mit unterschiedlichen AS genauso zutrifft.

4.6 Zusammenfassung

In unseren Experimenten versuchten wir einen möglichen Weg in der Entwicklung von therapeutischen Alternativen und in der Prävention von Enterokokken-Infektionen aufzuzeigen.

Eine Möglichkeit scheinen passive und aktive Immunisierungen darzustellen. In Übereinstimmung mit klinischen Beobachtungen erreichten wir insbesondere signifikante Ergebnisse bei der Reduktion der Zahl der Enterokokken-Kolonien in den Nieren. Auch der klinische Verlauf, im Sinne eines geringeren Gewichtsverlustes nach Infektion, schien bei vorhergehender passiver Immunisierung milder zu sein. Die Versuche zu aktiven Immunisierungen gegen AS erbrachten ebenfalls eine Reduktion der Enterokokkenzahl in den Nieren. Wir konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Reduktion der Keimzahl in den Lebern, den Herzen und Lungen der Mäuse finden. Die Immunisierungen waren somit also nicht in der Lage die Zahl der Enterokokken im Gesamtorganismus zu reduzieren. Es scheint, dass die Gabe von spezifisch gegebenen Antikörpern allein gegen AS bei einer *E. faecalis* – Sepsis im Tiermodell nicht ausreichend schützt.

Grundsätzlich deutet vieles daraufhin, dass prophylaktische Immunisierungen eine Alternative in der Behandlung von Enterokokken-Septikämien sein könnten, auch wenn Untersuchungen zu einer Vielzahl von Oberflächenstrukturen als Ziel experimenteller Impfstoffe im Tierexperiment bisher keine überzeugenden Ergebnisse erbracht haben. Eine geeignete Zielstruktur als Ziel opsonierender Antikörper mit dem Effekt einer signifikanten Reduktion der Keimzahl im befallenen Organismus, muss noch gefunden werden. Die Übertragung dieser Ergebnisse auf andere Spezies bis hin zum Menschen und die Möglichkeit einer Immunisierung von Risikopatienten als sinnvolle Prävention vor Enterokokken-Septikämien, wird noch Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben.

5 Anhang

5.1 Materialien und Reagenzien

Chemikalien und Medikamente

Chemikalie / Medikament	Katalog Nr. / Bezeichnung	Firma
Albumin, Bovine Fraction V Solution (7,5 %)	A-8412	Sigma, Taufkirchen
Bio-Rad Dc Protein Assay Reagent A	500-0113	Bio-Rad, München
Bio-Rad Dc Protein Assay Reagent B	500-0114	Bio-Rad
Bio-Rad Dc Protein Assay Reagent S	500-0115	Bio-Rad
Chloramphenicol	C-0378	Sigma
Ethanol	100971	Merck, Darmstadt
Glycerol	G-8773	Sigma
Gram Stain Kit and Reagent	212539	Becton Dickinson, Heidelberg
Kohlendioxid	0458	Messer Griesheim GmbH, Krefeld
Magermilchpulver	Naturaflor 009	Töpfer GmbH, Dietmannsried
MgCl ₂ (wasserfrei)	8.147.336.100	Merck
Na ₂ HPO ₄	6580	Merck
NaH ₂ PO ₄	6346	Merck
NaN ₃	S-8083	Sigma

PBS plus	14040-091	GibcoBRL, Karlsruhe
p-Nitrophenyl-Phosphat-Tabletten	N 2640 (100x15mg)	Sigma
Streptomycin	S-9137	Sigma
Tetrazyklin	T-3383	Sigma
TWEEN 20	822184	Merck

Tabelle 5

Geräte

Produkt	Katalog Nr. / Bezeichnung	Firma
Autoklav	Hiclave HV 25	Laborgeräte Vögtle, Deutschland
ELISA-Reader	MRX Microplate Reader 2CXA1135	Dynatech Laboratories, GB-Guernsey
Bunsenbrenner	Fireboy plus	Integra Biosciences, Deutschland
ELISA-Washer	F109104 Columbus	SLT Laboratories, Crailsheim
Homogenisator	Miccra D13	ART-Labortechnik, Müllheim
Infrarot-Lampe	230 V, 100W	Philips, Deutschland
Schüttelmixer	Reax top	Heidolph, Deutschland
Schüttelmixer	K-550-GE	Bender & Hobein AG, CH- Zürich
Spectrophotometer	Ultrospec 3000 pro	Amersham Pharmacia Biotech, USA
Thermorüttler	AK 82	Infors AG, CH-Bottmingen

Ultraschall-Homogenisator	Sonopuls HD 70	Bandelin Electronics, Berlin
Waage	HR 120-EL	Sartorius AG, Süd/West
Waage	PK 4800 Delta Range	Mettler Waagen GmbH, Giessen
Wärmebad	1083	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Wärmeschrank	51000370	Heraeus, Stuttgart
Wärmeschrank	Kelvitron t	Heraeus
Zentrifuge	Biofuge fresco 750055100	Heraeus

Tabelle 6

Antikörper

Produkt	Katalog Nr. / Bezeichnung	Firma
Anti-rabbit IgG, konjugiert mit alkalischer Phosphatase	A-0418	Sigma
Goat-anti-mouse IgG, konjugiert mit alkalischer Phosphatase	M30108	Caltag Laboratories, Hamburg
Goat-anti-mouse IgM, konjugiert mit alkalischer Phosphatase	M31508	Caltag Laboratories

Tabelle 7

Mikrobiologie

Produkt	Katalog Nr. / Bezeichnung	Firma
Cell Freezing Medium DMSO	D-5879	Sigma
Enterococcosel-Agar	4354019	Becton Dickinson
Mannit-Kochsalz-Agar	4354079	Becton Dickinson
Sabouraud-Glucose-Agar	4354083	Becton Dickinson
Trypticase-Soja-Agar (Platten)	4354086	Becton Dickinson,
Trypticase-Soja-Agar + 5% sheep blood	4354087	Becton Dickinson
Trypticase –Soy-Agar	4311043	Becton Dickinson
Trypticase-Soy-Broth	211768	Becton Dickinson

Tabelle 8*Zubehör*

Produkt	Katalog Nr. / Bezeichnung	Firma
Abdeckfolien (für Assay Platten)	391H3399	Merck
Assay Platte mit Flachboden, 96 wells	3915	Becton Dickinson
Combitips 2,5 ml	14099	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Combitips 5 ml	11449	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH

Cryotubes	347597	Nunc Brand Products, Dänemark
Cryotubes	375418	Nunc Brand Products
Cryotubes	337516	Nunc Brand Products
Einmal-Hauben (Barrett)	4263	Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Einmal-Injektionskanülen	Sterican 100, 0,40x20 mm	B. Braun, Melsungen
Einmal-Injektionskanülen	Sterican100, 0,45x25 mm	B. Braun
Einmal-Mikropipetten 100/200 µl	9600222	Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
Einweg-Kulturröhrchen mit Gewinde	99445-12	Corning Inc., USA-New York
Gaskartuschen	CV 360	Camping Gaz, Frankreich
Gesichtsmasken	4289	Johnson & Johnson Medical GmbH
Hakenpinzette	2861.1	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Krankenunterlagen	161600/5	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Latex- Untersuchungshandschuhe	SP 2330 E	Safeskin Corp., USA-San Diego
Mehrkanal-Pipette	Modell Tittermann 612B7805	Merck
Mikrokuvetten, 1,5 ml	223-9955	Bio-Rad
Multipette plus	612B7465	Merck
Parafilm F	4 x 250	American National Can, USA-Menasha
Petrischalen, steril	1029	Becton Dickinson

Pinzette, gerade-spitz	2802.1	Carl Roth GmbH & Co.
Pipette 0,5-10 µl	612B7116	Merck
Pipette 100-1000 µl	612B7135	Merck
Pipette 10-100 µl	612B7126	Merck
Pipettenspitzen 100-1000 µl	Eppendorf 100-1000 µl	Carl Roth GmbH & Co.
Pipettenspitzen 1-200 µl	Eppendorf 100 µl	Carl Roth GmbH & Co.
Pipettierhilfe	L.468.1	Carl Roth GmbH & Co.

Rasierklingen (mit Griffschutz)	Ever-Sharp	Apollo, Solingen
Reaktionsgefäße 0,65 ml	7060.1	Carl Roth GmbH & Co.,
Röhrchen (konisch), 15 ml	2096	Becton Dickinson
Rotilabo Aufbewahrungsboxen	N 195.1	Carl Roth GmbH & Co.
Rotilabo Kombi-Racks	K 082.1	Carl Roth GmbH & Co.
Rotilabo Reaktionsgefäßständer	K 136.1	Carl Roth GmbH & Co.
Rotilabo Wägeschiffchen	1920.1	Carl Roth GmbH & Co.
Schere, spitz-spitz	3581.1	Carl Roth GmbH & Co
Serologische Pipetten 10 ml	7551	Becton Dickinson
Serologische Pipetten 25 ml	7525	Becton Dickinson
Serologische Pipetten 5 ml	7543	Becton Dickinson
Serologische Pipetten 50 ml	7550	Becton Dickinson
Sicherheitsbehälter	Sekuroka, E329.1	Carl Roth GmbH & Co.
Softasept N Alkoholspray	3887138	B. Braun

Superfrost Objektträger	H 867.1	Carl Roth GmbH & Co.
Tuberkulinspritzen	Plastipak 1ml, 300013	Becton Dickinson
Zellstofftupfer	13353	Lohmann GmbH & Co.KG, Neuwied

Tabelle 9

5.2 Rezepturen

- ELISA:

Sensitizing Puffer:

2,4 g NaH_2PO_4 wurden in 100 ml Aqua bidest. gelöst → Monobasic Puffer (0,2 M).

14,2 g Na_2HPO_4 wurden in 100 ml Aqua bidest. gelöst → Dibasic Puffer (0,2 M).

3,9 ml Monobasic Puffer + 6,1 ml Dibasic Puffer + 50 ml Aqua bidest. ergeben den Sensitizing Puffer.

Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

Zum Beschichten der Assay-Platten: 12 μg AS wurden in 12 ml Sensitizing Puffer gelöst.

Substrate Puffer:

795 mg Na_2CO_3 + 1,465 g NaHCO_3 + 100 mg NaN_3 + 50 mg MgCl_2 (wasserfrei) wurden in 500 ml Aqua bidest. gelöst.

Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

Magermilch:

50 g Magermilchpulver wurden in 1 l Aqua bidest. gelöst → 5 %ige Magermilch.

Es wurden 2 x 1l hergestellt und diese 90 Minuten bei 65 °C im Wärmeschrank pasteurisiert. Benötigt wurde Magermilch mit und ohne TWEEN 20. Deshalb

Zugabe von 500 µl TWEEN 20 bei einem Liter nach dem Pasteurisieren.
Aufbewahrung bei 4 °C.

Serum-Verdünnungsreihen:

Hergestellt wurden Verdünnungsreihen der Seren in Magermilch mit Tween von 1:25 (wenn zu wenig Serum vorhanden war, auch 1:50 oder 1:100) bis 1:819200.

Antikörperlösung:

Es wurde eine 1:1000 Verdünnung in Magermilch mit Tween hergestellt (12 ml wurden pro ELISA benötigt).

Enzymlösung:

1 Tablette p-Nitrophenyl-Phosphat (15 mg) wurde in 15 ml Substrate Puffer gelöst.

- LOWRY-Test

Standard-Proteinlösungen:

Es wurden 5 Verdünnungen in folgenden Konzentrationen hergestellt (µg BSA / ml PBS plus): 10 µg/ml, 30 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 75 µg/ml.

Aufbewahrung bei 4 °C.

Reagenz A'

Falls die zu überprüfende Lösung Detergentien enthält muß ein Reagenz A hergestellt werden: pipettieren von 20 µl Reagenz S zu einem ml Reagenz A → Reagenz A'.

- Antibiotika:

Chloramphenicol:

100 mg Chloramphenicol wurden in 10 ml Ethanol gelöst.

Aufbewahrung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tetrazyklin:

100 mg Tetrazyklin wurden in 5 ml Aqua bidest. + 5 ml Ethanol gelöst.

Tetrazyklin ist in 100 % Ethanol nicht löslich

Aufbewahrung lichtgeschützt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Selektivmedien:

Trypticase-Soja-Agar wurde hergestellt, in dem 40 g TSA-Pulver in einem Liter Aqua bidest. gelöst wurden. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert und bei $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Vor Herstellung der Selektivmedien wurde der TSA in der Mikrowelle erhitzt und somit wieder verflüssigt. Nach Zugabe von 10 g Chloramphenicol und / oder Tetrazyklin pro Liter wurde der Agar in sterile Petrischalen gegeben. Nach Abkühlen und Verfestigen des Agars, Aufbewahrung bei $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Nährmedien:

Trypticase Soy Broth (Standardmedium):

30 g TSB wurden in einem Liter Aqua bidest. aufgelöst und danach autoklaviert.

Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

Trypticase Soy Broth (selektiv):

Verwendung bei der Phänotypisierung. Je nach Mutante 5 ml TSB + 10 μl Tetrazyklin und/oder Chloramphenicol. Jeweils vor Gebrauch hergestellt.

Trypticase Soy Broth (zum Einfrieren):

Es wurden 50 ml Glycerol mit 450 ml TSB versehen.

Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

5.3 Literaturverzeichnis

1. Chenoweth CE, Schaberg DR. 1995. *Enterococcus species.*, in *Hospital epidemiology and infection control.*, Mayhall GE, Editor. Williams & Wilkins: Baltimore. 334-345.
2. McGraw Hill Healthcare Informations, Karchmer A, Gold HS, Thornsberry C, Sahm D, Breiman RF, Butler JC, Stevens DL, Wessels MR, Crossley K. 1998. *Severe gram-positive coccal infections.* The McGraw-Hill companies, Minneapolis.
3. Devriese LA, Collins MD, Wirth R. 1991. *The Genus Enterococcus*, Chapter 66 in *The Procaryotes: "a handbook on the biology of bacteriae ecophysiology, isolation, identification."* 2nd Edition, Springer. 1465-1481
4. Murray BE. 1990. *The life and times of the enterococcus.* Clin. Microbiol. Rev., **3**: 46-65.
5. Krueger WA, Unertl KE. 2000. *Epidemiologie grampositiver Infektionen auf Intensivstationen.* Chemotherapie Journal, **19**: 2-4.
6. Weber DJ, Raasch R, Rutala WA. 1999. *Nosocomial Infections in the ICU - The Growing Importance of Antibiotic-Resistant Pathogens.* Chest, **115**: 34S-41S.
7. Landry SL, Kaiser DL, Wenzel RP. 1989. *Hospital stay and mortality attributed to nosocomial enterococcal bacteremia: a controlled study.* Am. J. Infect. Control, **17**: 323-329.
8. Murray BE. 2000. *Vancomycin-resistant enterococcal infections.* New Engl. J. Med., **342**: 710-721.
9. Richards JM, Edwards JR, MS, Culver DH, PhD, Gaynes RP, MD. 1999. *Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States.* Crit. Care Med., **27**: 887-892.
10. Lam S, Singe C, Tucci V, Morthland VH, Pfaller MA, Isenberg HD. 1995. *The challenge of vancomycin-resistant enterococci: a clinical and epidemiologic study.* Am. J. Infect. Control., **23**: 170-180.

11. Garbutt JM, Ventrapragada M., Littenberg B, Mundy LK. 1999. *Association between resistance to vancomycin and death cases of Enterococcus faecium bacteremia*. Clin. Infect. Dis., **30**: 466-472.
12. Huycke MM, Sahm DF., Gilmore MS. 1998. *Multiple-drug resistant Enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future*. Emerg. Infect. Dis., **4**: 239-49
13. Shay DK, Maloney SA, Montecalvo M, Banerjee S, Wormser GP, Arduino MJ, Bland LA, Jarvis WR. 1995. *Epidemiology and mortality risk of vancomycin-resistant enterococcal bloodstream infections*. J. Infect. Dis. **172**: 993-1000.
14. Padiglione A. 2001. *Enterococci resistant to vancomycin*. Internal Medicine Journal, **31**: 5-6.
15. Karanfil LV, Murphy M, Josephson A, et al. 1992. *A cluster of vancomycin-resistant Enterococcus faecium in an intensive care unit*. Infect. Control Hosp. Epidemiol., **13**: 195-200.
16. Rubin LG, Tucci V, Cercenado E, Eliopoulos G, Isenberg HD. 1992. *Vancomycin-resistant Enterococcus faecium in hospitalized children*. Infect. Control Hosp. Epidemiol., **13**: 700-705.
17. Handwerger S, Raucher B, Altarac D, et al. 1993. *Nosocomial outbreak due to Enterococcus faecium highly resistant to vancomycin, penicillin, and gentamicin*. Clin. Infect. Dis., **16**: 750-755.
18. Montecalvo MA, Horowitz H, Gedris C, et al. 1994. *Outbreak of vancomycin-, ampicillin-, and aminoglycoside-resistant Enterococcus faecium bacteremia in an adult oncology unit*. Antimicrob. Agents Chemother., **38**: 1363-1367.
19. Livornese LL, Dias S, Samel C, et al. 1992. *Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant Enterococcus faecium transmitted by electronic thermometers*. Ann. Intern. Med., **117**: 112-116.
20. Edmond MB, Ober JF, Weinbaum DL, et al. 1995. *Vancomycin-resistant Enterococcus bacteremia: risk factors for infection*. Clin. Infect. Dis., **20**: 1126-1133.

21. Wells VD, Wong ES, Murray BE, Coudron PE, Williams DS, Markow SM. 1992. *Infections due to beta-lactamase-producing, high-level gentamicin-resistant Enterococcus faecalis*. Ann. Intern. Med., **116**: 285-292.
22. Morris JG, Shay DK., Hebden JN, et al. 1995. *Enterococci resistant to multiple antimicrobial agents, including vancomycin*. Ann. Intern. Med., **123**: 250-256.
23. Nichols RL, Muzik AC. 1992. *Enterococcal infections in surgical patients: mystery continues*. Clin. Infect. Dis., **15**: 72-76.
24. Peset V, Tallon P, Sola C, Sanchez E, Sarrion A, Perez-Belles C, Vindel A, Canton E, Gobernado M. 2000. *Epidemiological, microbiological, clinical, and prognostic factors of bacteremia caused by high-level vancomycin-resistant Enterococcus species*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., **19**: 742-749.
25. Bhavnani SM, Drake JA, Forrest A, Deinhart JA, Jones RN, Biedenbach DJ, Ballow CH. 2000. *A nationwide, multicenter, case-control study comparing risk factors, treatment, and outcome for vancomycin-resistant and susceptible enterococcal bacteremia*. Diag. Microbiol. Infect. Dis., **36**: 145-158.
26. Viagappan M, Holliman RE. 1999. *Risk factors for acquisition of gentamicin-resistant enterococcal infection: a case-controlled study*. Postgrad. Med. J., **75**: 342-345.
27. Lautenbach E, Wilker WB, Brennan PJ. 1999. *Enterococcal bacteremia: risk factors for vancomycin resistance and predictors of mortality*. Infect. Control. Hosp. Epidemiol., **29**: 318-323.
28. MacIntyre CR, Empson M., Boardman C, Sindhusake D, Lokan J, Brown GV. 2001. *Risk factors for colonization with vancomycin-resistant enterococci in a Melbourne hospital*. Infect. Control. Hosp. Epidemiol., **22**: 624-629.
29. Spera RV, Farber BF. 1994. *Multidrug-resistant Enterococcus faecium - an untreatable nosocomial pathogen*. Drugs, **48**: 678-688.

30. Moellering RC. 1991. *The enterococcus: a classic example of the impact of antimicrobial resistance on therapeutic options*. J. Antimicrob. Chemother., **28**: 1-12.
31. Herman DJ, Gerding DN. 1991. *Antimicrobial resistance among enterococci*. Antimicrob. Agents Chemother., **35**: 226-235.
32. Eliopoulos GM, Farber BF, Murray BE, Wennersten C, Moellering RC. 1984. *Ribosomal resistance of clinical enterococcal isolates to streptomycin*. Antimicrob. Agents Chemother., **25**: 398-399.
33. Horodniceanu T, Bouqueleret T, El-Solh N, Bieth G, Delbos F. 1979. *High-level, plasmid-borne resistance to gentamicin in Streptococcus faecalis subsp. zymogenes*. Antimicrob. Agents Chemother., **16**: 686-689.
34. Gross PA, Harkavy LM, Barden GE, Flower MR. 1976. *The epidemiology of nosocomial enterococcal urinary tract infections*. Am. J. Med. Sci., **272**: 75-81.
35. Zervos MJ, Kauffmann CA, Therasse PM, Bergman AG, Mikesell TS, Schaberg DR. 1987. *Nosocomial infections by gentamicin-resistant Streptococcus faecalis: an epidemiologic study*. Ann. Intern. Med., **106**: 687-691.
36. Patterson JE, Masecar BL, Kauffman CA, Schaberg DR, Hierholzer WR, Jervos MJ. 1988. *Gentamicin resistance plasmids of enterococci from diverse geographic areas are heterogenous*. J. Infect. Dis., **158**: 212-216.
37. Ferreti JJ, Gilmore KS, Courvalin P. 1986. *Nucleotide sequence analysis of the gene specifying the bifunctional 6'-aminoglycoside-acetyltransferase 2''-aminoglycoside-phosphotransferase enzyme in Streptococcus faecalis and identification and cloning of gene regions specifying the two activities*. J. Bacteriol., **167**: 631-638.
38. Ounissi H, Derlot E, Carlier C, Courvalin P. 1990. *Gene homogeneity for aminoglycoside-modifying enzymes in gram-positive cocci*. Antimicrob. Agents Chemother., **34**: 2164-2168.

-
39. Zervos MJ, Mikesell TS, Schaberg DR. 1986. *Heterogeneity of plasmids determining high-level resistance to gentamicin in clinical isolates of Streptococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother., **30**: 78-81.
 40. LeClercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. 1988. *Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in Enterococcus faecium*. New Engl. J. Med., **319**: 157-161.
 41. Jones RN, Pfaller MA. 1998. *Bacterial resistance: a worldwide problem*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., **31**: 379-388.
 42. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, et al. 1999. *Survey of bloodstream infections attributable to gram-positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada and Latin America from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., **33**: 283-297.
 43. Center for Disease Control and Prevention. 1993. *Nosocomial enterococci resistant to vancomycin - United States, 1989-1993*. MMWR Morb. Mortal Wkly Rep., **42**: 597-599.
 44. Center for Disease Control and Prevention. 1994. *Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance: recommendations of the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC)*. MMWR Morb. Mortal Wkly Rep., **44**: 1-13.
 45. Vincent S, Minker P, Binziewski B, Etter L, Shlaes DM. 1992. *Vancomycin resistance in Enterococcus gallinarum*. Antimicrob. Agents Chemother., **36**: 1392-1399.
 46. Vincent S, Knight RG, Green M, Sahm DF, Shlaes DM. 1991. *Vancomycin susceptibility and identification of motile enterococci*. J. Clin. Microbiol., **29**: 2335-2337.
 47. Murray BE, *Diversity among multidrug-resistant enterococci*. 1998. Emerg. Infect. Dis., **4**: 423-436.
 48. Archibald L, Phillips L, Monnet D, et al. 1997. *Antimicrobial resistance in isolates from inpatients and outpatients in the United States: increasing importance of the intensive care unit*. Clin. Infect. Dis., **24**: 211-215.

-
49. Murray BE, Mederski-Samoraj B. 1983. *Transferable beta-lactamase: a new mechanism for in vitro penicillin resistance in Streptococcus faecalis*. J. Clin. Invest., **72**: 1168-1171.
 50. Jones RN. 2001. *Resistance patterns among nosocomial pathogens - trends over the past few years*. Chest, **119**: 397S-404S.
 51. Werner G, Klare I, Witte W. 1998. *Association between quinupristin/dalfopristin resistance in glycopeptide resistant Enterococcus faecium and the use of additives in animal feed*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., **17**: 401-402.
 52. Leonard BAB, Podbielski A, Dunny GM. 1996. *Enterococcus faecalis pheromone binding protein, PrgZ, recruits a chromosomal oligopeptide permease system to import sex pheromone cCF10 for induction of conjugation*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**: 260-264.
 53. Nakayama J, Takanami Y., Horii T, Sakuda S, Suzuki A. 1998. *Molecular mechanisms of peptide-specific pheromone signaling in Enterococcus faecalis: functions of pheromone receptor TraA and pheromone-binding protein TraC encoded by plasmid pPD1*. J. Bacteriol., **180**: 449-456.
 54. Galli D, Wirth R, Wanner G. 1989. *Identification of aggregation substances of Enterococcus faecalis cells after induction by sex pheromones. An immunological and ultrastructural investigation*. Arch. Microbiol., **151**: 486-490.
 55. Munkenbeck, Trotter K, Dunny GM. 1990. *Mutants of Enterococcus faecalis deficient as recipients in mating with donors carrying pheromone-inducible plasmids*. Plasmid, **24**: 57-67.
 56. Olmsted SB, Kao SM, van Putte LJ, Gallo JC, Dunny GM. 1991. *Role of pheromone-inducible surface protein Asc10 in mating aggregate formation and conjugal transfer of the Enterococcus faecalis plasmid pCF10*. J. Bacteriol., **173**: 7665-7672.
 57. Galli D, Lottspeich F, Wirth R. 1990. *Sequence analysis of Enterococcus faecalis aggregation substance encoded by the sex pheromone plasmid pAD1*. Mol. Microbiol., **4**: 895-904.

58. Bensing BA, Dunny G. 1993. *Cloning and molecular analysis of genes involved in expression of binding substance, the recipient-encoded receptor(s) mediating mating aggregation formation in Enterococcus faecalis*. J. Bacteriol., **175**: 7421-7429.
59. Galli D, Wirth R. 1991. *Comparative analysis of Enterococcus faecalis sex pheromone plasmids identifies a single homologous DNA region which codes for aggregation substance*. J. Bacteriol., **173**: 3029-3033.
60. Coque TM, Patterson JE, Steckelberg JM, Murray BE. 1995. *Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections from feces of hospitalized and community-based persons*. J. Infect. Dis., **171**: 1223-1229.
61. Muscholl-Silberhorn A. 1998. *Analysis of the clumping-mediating domain(s) of sex pheromone plasmid pAD1-encoded aggregation substance*. Eur. J. Biochem., **258**: 515-520.
62. Kreft B, Marre R, Schramm U, Wirth R. 1992. *Aggregation Substance of Enterococcus faecalis mediates adhesion to cultural renal tubular cells*. Infect. Immun., **60**: 25-30.
63. Chow JW, Thal LA, Perri MB, Vazquez JA, Donabedian SM, Clewell DB, Zervos MJ. 1993. *Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis*. Antimicrob. Agents Chemother., **37**: 2474-2477.
64. Ruoshlati E, Pierschbacher MD. 1987. *New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins*. Science, **238**: 491-197.
65. Hynes RO. 1992. *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell, **69**: 11-25.
66. Ruoshlati E. 1991. *Integrins*. J. Clin. Invest, **87**: 1-5.
67. Springer TA. 1990. *Adhesion receptors of the immune system*. Nature, **346**: 425-434.

68. Olmsted SB, Dunny G, Erlandsen SL, Wells CL. 1994. *A plasmid-encoded surface protein on Enterococcus faecalis augments its internalization by cultured intestinal epithelial cells.* J. Infect. Dis., **170**: 1549-1556.
69. Guzman CA, Pruzzo C, Lipira G, Calegari L. 1989. *Role of adherence in pathogenesis of Enterococcus faecalis urinary tract infection and endocarditis.* Infect. Immun., **57**: 1834-1838.
70. Hirt H, Wanner G, Galli D, Wirth R. 1993. *Biochemical, immunological and ultrastructural characterization of aggregation substances encoded by Enterococcus faecalis sex-pheromone plasmids.* Eur. J. Biochem., **277**: 711-716
71. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. 1994. *Virulence of enterococci.* Clin. Microbiol., **7**: 462-478.
72. Johnson AP. 1994. *The pathogenicity of enterococci.* J. Antimicrob. Chemother., **33**: 1083-1089.
73. Dupont H, Montravers P, Mohler J, Carbon C. 1998. *Disparate findings on the role of virulence factors of Enterococcus faecalis in mouse and rat models of peritonitis.* Infect. Immun., **66**: 2570-2575.
74. Ike Y, Hashimoto H, Clewell D. 1984. *Hemolysin of Streptococcus faecalis subspecies zymogenes contributes to virulence in mice.* Infect. Immun., **45**: 528-530.
75. Ehrenfeld EE, Clewell DB. 1987. *Transfer functions of the Streptococcus faecalis plasmid pAD1: organization of plasmid DNA encoding response to sex pheromone.* J. Bacteriol., **169**: 3473-3481.
76. Schlievert PM, Gahr PJ, Assimacopoulos AP, Dinges MM, Stoehr JA, Harmala JW, Hirt H, Dunny GM. 1998. *Aggregation and Binding substances enhance pathogenicity in rabbit models of Enterococcus faecalis endocarditis.* Infect. Immun., **66**: 218 - 223.
77. Trotter KM, Dunny G. 1990. *Mutants of Enterococcus faecalis deficient as recipients in mating with donors carrying pheromone-inducible plasmids.* Plasmid, **24**: 57-67.

78. Fast DJ, Schlievert P, Nelson RD. 1988. *Nonpurulent response to toxic shock syndrome toxin-1 producing Staphylococcus aureus: relationship to toxin-stimulated production of tumor necrosis factor*. J. Immunol., **40**: 949-953.
79. Fast DJ, Schlievert P, Nelson RD. 1989. *Toxic shock syndrome-associated staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins are potent inducers of tumor necrosis factor production*. Infect. Immun., **57**: 291-294.
80. Nelson RD, Fast DJ, Schlievert PM. 1990. *Pyrogenic toxin stimulation of TNF production by human mononuclear leukocytes and effect of TNF on neutrophil chemotaxis*. B. Bonavida and G. Granger (ed.), Tumor necrosis factor: structure, mechanism of action, role in disease and therapy. S. Karger, Basel Switzerland, 177-186.
81. Bayer AS, Tu J. 1990. *Chemoprophylactic efficiency against experimental endocarditis caused by beta-lactamase-producing, aminoglycoside-resistant enterococci is associated with prolonged serum inhibitory activity*. Antimicrob. Agents Chemother., **34**: 1068-1074.
82. Krueger WA, Huebner J, Goldmann D, Pier GB. 2004. *Assessment of the role of antibiotics and enterococcal virulence factors in a mouse model of extraintestinal translocation*. Crit. Care Med., **32**: 467-471
83. Saringen S, Rozdzinski E, Muscholl-Silberhorn A, Marre R. 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.
84. Huebner J, Quaas A, Krueger WA, Goldman DA, Pier GB. 2000. *Prophylactic and therapeutic efficacy of antibodies to a capsular polysaccharide shared among vancomycin-sensitive and -resistant enterococci*. Infect. Immun., **68**: 4631-4636.
85. Ike Y, Hashimoto H, Clewell DB. 1987. *High incidence of hemolysin production by Enterococcus (Streptococcus) faecalis strains associated with human parenteral infections*. J. Clin. Microbiol., **25**: 1524-1528.

-
86. Stevens SX, Jensen HG, Jett BD, Gilmors MS. 1992. *A hemolysin-encoding plasmid contributes to bacterial virulence in experimental Enterococcus faecalis endophthalmitis*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **33**: 1650-1656.
 87. Bleiweis AS, Young FE, Krause RM. 1967. *Cell walls of group D streptococci. II. Chemical studies on the type 1 antigen purified from the autolytic digest of cell walls*. J. Bacteriol., **94**: 1381-1387.
 88. Pazur JH. 1982. *beta-d-Glucose-phosphate: a structural unit and an immunological determinant of a glycan from streptococcal cell walls*. J. Biol. Chem., **257**: 589-591.
 89. Arduino RC, Murray BE, Rakita RM. 1994. *Roles of antibodies and complement in phagocytic killing of enterococci*. Infect. Immun., **62**: 987-993.
 90. Arduino RC, Jacques-Palaz K, Murray BE, Rakita RM. 1994. *Resistance of Enterococcus faecium to neutrophil-mediated phagocytosis*. Infect. Immun., **62**: 5587-5594.
 91. Harvey BS, Baker CJ, Edwards MS. 1992. *Contributions of complement and immunoglobulin to neutrophil-mediated killing of enterococci*. Infect. Immun., **60**: 3635-3640.
 92. Gaglani MJ, Baker CJ, Edward MS. 1992. *Contribution of antibody to neutrophil-mediated killing of Enterococcus faecalis*. J. Clin. Immunol., **17**: 478-484.
 93. Huebner J, Wang Y, Krueger WA, Madoff LC, Martirosian G, Boisot S, Goldmann DA, Kasper DL, Tzianabos AO, Pier GB. 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**: 1213 - 1219.
 94. McCormick JK, Hirth H, Waters CM, Tripp TJ, Dunny GM, Schlievert PM. 2001. *Antibodies to a surface-exposed, N-terminal domain of aggregation substance are not protective in the rabbit model of Enterococcus faecalis infective endocarditis*. Infect. Immun., **69**: 3305-3314.

95. Wells CL, Jechorek RP, Maddaus MA, Simmons RL. 1988. *Effects of clindamycin and metronidazole on the intestinal colonization and translocation of enterococci in mice.* Antimicrob. Agents. Chemother., **32**: 1769-75.
96. Wells CL, Jechorek RP, Erlandsen SL. 1990. *Evidence for the translocation of Enterococcus faecalis across the mouse intestinal tract.* J. Infect. Dis., **162**: 82-90.
97. Huebner J, Krueger WA, Quaas A, Madoff L, Goldmann DA, Pier GB. 1999. *Protection by antibodies against enterococcal capsular polysaccharide in a mouse model of enterococcal infection.* 12 th Annual Congress, European Society of Intensive Care Medicine, Berlin, October 3-6.
98. Berti M, Candiani G, Kaufhold A, Muscholl A, Wirth R. 1998. *Does aggregation substance of Enterococcus faecalis contribute to development of endocarditis ?* Infect. Immun., **26**: 48-57.
99. Elsner HA, Sobottka I, Mack D, Claussen M, Laufs R, Wirth R. 2000. *Virulence factors of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium blood culture isolates.* Eur. J. Clin. Microb. Infect. Dis., **19**: 39-42.
100. Hufnagel M, Hancock LE, Koch S, Theilacker C, Gilmore MS, Huebner J. 2004. *Serological and genetic diversity of capsular polysaccharides in Enterococcus faecalis.* J. Clin. Microbiol., **42**: 2548-2557.

5.4 Danksagung

Die vorliegende Dissertation wäre nicht zustande gekommen, wenn ich nicht Unterstützung und Hilfe gehabt hätte.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Priv. Doz. Dr. Wolfgang A. Krüger bedanken, der mir während der Entstehung der Arbeit jederzeit mit Rat und Tat, konstruktiver Kritik und Anregungen zur Seite stand.

Ferner möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. K. Unertl bedanken, für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Abteilung zu erstellen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. M. Groß, Institut für mikrobielle Genetik, und bei meinem Kommilitonen und Doktorand einer thematisch verbundenen Arbeit Herrn M. Escher, für die mikrobiologische Vorarbeit und Bereitstellung der lyophilisierten Aggregation Substance.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. A. Muscholl-Silberhorn, Institut für Mikrobiologie der Universität Regensburg, für die Bereitstellung des ersten immunen Kaninchenserums.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Dr. G. Pier, Channing Laboratory, Department of Medicine, Brigham and Womens`s Hospital, Harvard Medical School, Boston, für zahlreiche Anregungen und die Möglichkeit der Diskussion. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. M. Eichner, Institut für medizinische Biometrie, für die ersten statistischen Berechnungen bedanken.

Für die stets angenehme Atmosphäre und tatkräftige Hilfe im Labor möchte ich mich beim gesamten Team des ZMF der Abteilung für Anästhesiologie herzlichst bedanken.

Ich möchte mich bei meinen Eltern Erika und Elmar Woll bedanken, die mir dies alles ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank geht an meine Frau Nicola und an meine Tochter Maja, die mich während der verschiedenen Arbeitsphasen inspiriert, motiviert und immer wieder aufgebaut haben.

5.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Arne Woll
 Geburtsdatum: 07.01.1974
 Geburtsort: Böblingen
 Konfession: evangelisch
 Familienstand: verheiratet

Schulbildung

08/1981 – 06/1984 Eduard-Mörrike-Grundschule, Böblingen
 08/1984 – 06/1993 Otto-Hahn-Gymnasium, Böblingen
 05/1993 Abitur

Zivildienst

8/1993 – 11/1994 Mobiler sozialer Dienst, Deutsches Rotes Kreuz,
 Ortsverband Sindelfingen
 11/1994 – 4/1995 Häuslicher Pflegedienst, Deutsches Rotes Kreuz,
 Ortsverband Sindelfingen

Hochschulausbildung

4/1995 - 8/1997 Vorklinisches Studium an der Eberhard-Karls-
 Universität Tübingen
 8/1997- 4/2001 Kinisches Studium an der Eberhard-Karls-Universität
 Tübingen
 4/2001 - 4/2002 Praktisches Jahr im Kreiskrankenhaus Böblingen,
 Wahlfach: Anaesthesiologie
 16.05.2002 3. Staatsexamen - Ärztliche Prüfung, Eberhard-Karls-
 Universität Tübingen - Abschluß des Studiums

Beruf

6/2002 – 12/2003 Arzt im Praktikum, Kreiskrankenhaus Böblingen,
 Medizinische Klinik
 seit 12/2003 Assistenzarzt, Kreiskrankenhaus Böblingen,
 Medizinische Klinik

Publikationen

Krueger WA, Escher M, Woll A, Gross M, Muscholl-Silberhorn AB, Vollmer I, Krueger-Rameck S, Unertl KE, Götz F, Pier GB.
Enterococcal aggregation substance as target for opsonic antibodies in vitro and in murine sepsis.
Critical Care 2003;7(Suppl.2):S20.
Abstract P41 (Poster)
23rd International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine, Brüssel, 18.-21.3.03.

Gärtringen, den 02.02.2006
Arne Woll