

Aus der Abteilung Neurologie
(Prof. Dr. med. Mathias Bähr)
im Zentrum Neurologische Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**UNTERSUCHUNG DER KOMBINATIONSBEHANDLUNG RIFAMPICIN/CEFTRIAXON
IM VERGLEICH ZUR CEFTRIAXON-MONOTHERAPIE BEI DER
EXPERIMENTELLEN BAKTERIELLEN MENINGITIS**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Valeska Kunst

aus

Northeim

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. J. Gerber

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med., Dr. rer. nat. H. Eiffert

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. dent. R. Mausberg

Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2011

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
1.1	SCHRIFTTUMSÜBERSICHT	2
1.1.1	<i>Erregerspektrum der bakteriellen Meningitis</i>	2
1.1.2	<i>Infektionsmodus</i>	5
1.1.3	<i>Klinik</i>	7
1.1.4	<i>Morphologie</i>	10
1.1.4.1	<i>Neuronaler Schaden und Spätfolgen</i>	10
1.1.4.2	<i>Nekrose</i>	10
1.1.4.3	<i>Apoptose</i>	11
1.1.5	<i>Bakteriologie der Streptococcus pneumoniae-Infektion</i>	11
1.1.6	<i>Mechanismen der Schädigung</i>	12
1.1.7	<i>Therapie der bakteriellen Meningitis</i>	12
1.2	ZIEL DER ARBEIT	14
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	TESTORGANISMEN	15
2.2	KANINCHENMODELL	15
2.3	GEWEBEENTNAHME UND FIXATION	18
2.3.1	<i>Herstellung der Schnitte</i>	18
2.3.2	<i>Färbung: In situ-Tailing</i>	19
2.3.3	<i>Färbung: Hämatoxylin-Eosin</i>	21
2.3.4	<i>Quantifizierung apoptotischer Neurone</i>	22
2.4	LIQUORANALYSE	22
2.4.1	<i>Entzündungsparameter</i>	22
2.4.2	<i>Lipoteichonsäure</i>	24
2.5	DATENAUSWERTUNG UND STATISTIK	25
3	ERGEBNISSE	28
3.1	KÖRPERTEMPERATUR	28
3.2	BAKTERIENTITER	29
3.3	ENTZÜNDUNGSPARAMETER IM LIQUOR	32
3.3.1	<i>Protein</i>	32
3.3.2	<i>Laktat</i>	33
3.3.3	<i>Zellzahl</i>	34

3.3.4	<i>Lipoteichonsäure</i>	36
3.4	DICHTE APOPTOTISCHER NEURONE.....	39
4	DISKUSSION	41
5	ZUSAMMENFASSUNG	49
6	ANHANG	50
6.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	50
6.2	TABELLENVERZEICHNIS.....	51
6.3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	52
7	LITERATURVERZEICHNIS	54

1 Einleitung und Problemstellung

Als Meningitis wird jeder entzündliche Prozess an den membranösen Häuten von Hirn und Rückenmark (Meningen) bezeichnet. In den meisten Fällen liegt der Meningitis kausal eine Infektion durch Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze) zugrunde, die auf verschiedenen Wegen in den Liquorraum eindringen können (REED 1986). Seltene Ursachen solcher Entzündungen können toxisch-allergisch, Insolation, Strahlenexposition sowie karzinomatöse und sarkomatöse Veränderungen an den Hirnhäuten sein.

Im Sektionsgut ist die Meningitis als Todesursache zwar in der antibiotischen Ära stark zurückgegangen (ROGNER 1971; HAACK und WEIGEL 1972); nichtsdestoweniger stellt sie bis heute eine häufige, schwere und unter Umständen lebensgefährliche Krankheit dar. Aufgrund ständig verbesserter diagnostischer Verfahren, neuer Antibiotika und intensivmedizinischer Betreuung der Erkrankten gelang es, die Letalität um 50 % zu reduzieren. Dennoch sterben ca. 5-10 % der infizierten Kinder und ca. 25 % der erkrankten Erwachsenen. Bei 10 % der Überlebenden sind Folgeerscheinungen wie Konzentrationsschwäche, Schwindel, Hirnabszesse, Ependymbildungen, *Hydrocephalus occlusus*, Epilepsie sowie schwere Hirn- und Nervenschädigungen – besonders des *N. acusticus* – feststellbar (DELANK 1994). Die Ursache neurologischer Langzeitschäden sind u. a. Neuronenschäden im Neocortex und in der *Formatio hippocampi* (ZYSK et al. 1996; NAU et al. 1999 a, b; WELLMER et al. 2000).

Weltweit erkranken etwa 1,2 Millionen Menschen pro Jahr an bakterieller Meningitis. Etwa 70 % aller Erkrankungsfälle und 90 % der Erkrankungen bei Kindern treten im Alter von unter 5 Jahren auf. Nach Schätzungen erkranken in den USA jährlich 20.000 bis 40.000 Kinder, das Risiko einer Neugeborenenmeningitis liegt bei 0,2 – 2,7 Fälle/1000 Lebendgeborene (REED 1986; HARVEY et al. 1999). Wie bei den meisten anderen Infektionskrankheiten wird ein Überwiegen des männlichen Geschlechts unter den Erkrankten angegeben (HANDRICK et al. 1988; SCHUT et al. 2008). Die bakterielle Meningitis zählt auch in der antibiotischen Ära noch zu den 10 häufigsten Todesursachen im Kindesalter (MATHERS et al. 2006). Die jährliche Inzidenz der *Pneumokokkenmeningitis* in den USA schwankt zwischen 1,1 und 1,5 Krankheitsfälle pro 100.000 Einwohner. Betroffen sind vor allem Säuglinge im Alter von 1 bis 23 Monaten und Er-

wachsene jenseits des 29. Lebensjahres. Die allgemeine Letalitätsrate liegt bei 20-25 %, wobei Patienten über 60 Jahre eine deutlich höhere Sterblichkeit aufweisen als jüngere (DURAND et al. 1993; SCHUCHAT et al. 1997).

1.1 Schrifttumsübersicht

1.1.1 Erregerspektrum der bakteriellen Meningitis

Die bakterielle Ätiologie ist für die deutliche Mehrzahl der Fälle mit geklärtem Erreger verantwortlich; unter den viralen Formen dominieren Mumps- und – in zweiter Linie – Enteroviren als Erreger (WEISE 1982; HVIID et al. 2008; LOGAN und MACMAHON 2008).

Die häufigsten Erreger der außerhalb des Krankenhauses erworbenen bakteriellen Meningitis sind ohne Berücksichtigung der Altersgruppen (PELTOLA 1999)

1. *Neisseria meningitidis*
2. *Streptococcus pneumoniae*
3. *Haemophilus influenzae*
4. *Mycobakterium tuberculosis*
5. *Listeria monocytogenes*
6. *Escherichia coli*.

Für die verschiedenen Lebensabschnitte lassen sich dabei bestimmte typische Erregerspektren demonstrieren (Tabelle 1; nach NETTER 1986 und REED 1986):

Tabelle 1: Erregerspektrum bei der bakteriellen Meningitis (NETTER 1986 und REED 1986)

Lebensabschnitt	Erreger
Früh- und Neugeborene	50 % gramnegative Bakterien (<i>E. coli</i> , andere <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>H. influenzae</i>) 20 % Streptokokken (<i>S. agalactiae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>E. faecalis</i>) Andere: <i>S. aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>
Säuglinge und Kinder	50 % <i>Hämophilus influenzae</i> Typ b [‡] 25 % <i>Neisseria meningitidis</i> Andere: <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Erwachsene	30 % <i>S. pneumoniae</i> 15 % <i>N. meningitidis</i> Andere: gramnegative Erreger, Listerien, Staphylokokken

‡ Seit Einführung der Hib-Schutzimpfung bei Kleinkindern heute nicht mehr von Bedeutung

Insgesamt sind nach der vorliegenden Literatur die drei Erreger *H. influenzae*, *N. meningitidis* (synonym Meningokokken) und *S. pneumoniae* (synonym Pneumokokken) für etwa 95 % aller Erkrankungsfälle im Kindesalter verantwortlich, wobei bis zur Einführung der Hib-Impfung bis zum 5. Lebensjahr *H. influenzae*, danach Meningo- und Pneumokokken das Erregerspektrum dominierten. Bei der Neugeborenenmeningitis stehen Streptokokken der Gruppe B, *Enterobacteriaceae* und Listerien im Vordergrund. In seltenen Fällen kann der Erreger postoperativ oder posttraumatisch in den Liquorraum eindringen bzw. sich bei geschwächter Abwehrlage des Patienten dort ausbreiten (REED 1986; ARDA et al. 2008).

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht einiger epidemiologischer Arbeiten zur Häufigkeit der einzelnen Erreger; dabei zeigen sich relativ starke regionale und zeitliche Schwankungen, wobei die Pneumokokkenmeningitis typischerweise zwischen 10 und 20 % der

Fälle ausmacht, in einigen, vor allem neueren Studien aber auch deutlich mehr (KYAW et al. 2002; VAN DE BEEK et al. 2004; ARDA et al. 2008; MONTAGNANI et al. 2008).

Tabelle 2: Übersicht zur Erregerhäufigkeit bei bakterieller Meningitis (Auswahl)

Autor	n	Region/ Altersgruppe	<i>H. influenzae</i>	Meningokokken	Pneumokokken	sonst.
GEISELER et al. 1980	1316	USA/ alle	34,8 %	30,1 %	13,5 %	21,6 %
MCCABE 1983	611	USA/ alle	42,0 %	19,0 %	21,0 %	18,0 %
MCCRACKEN 1983	1615	USA/ Säuglinge/ Kleinkinder	63,8 %	13,3 %	9,4 %	13,5 %
BEAM 1984	173	USA/ Erwachsene	16,1 %	18,6 %	11,9 %	53,4 %
GUGGENBICHLER et al. 1989	605	Österreich/ Kinder	24,3 %	33,6 %	11,2 %	30,9 %
CHOO et al. 1990	58	Malaysia/ Kinder	50,0 %	5,2 %	22,4 %	22,4 %
TYSKI und GRZYBOWSKA 1998	164	Polen/ alle	17,1 %	59,1 %	23,8 %	-
CAMPAGNE et al. 1999	7078	Niger/ alle	9,5 %	57,7 %	13,2 %	19,6 %
SKOCZYNSKA et al. 2000	220	Polen/ alle	26,4 %	40,9 %	20,9 %	11,8 %
VAN DE BEEK et al. 2004	696	Niederlande/ alle	4,3 %	36,9 %	50,6 %	8,2 %
FARAG et al. 2005	202	Ägypten/ Kinder	32,2 %	21,8 %	21,3 %	24,8 %
AL KHORASANI und BANAJEH 2006	153	Jemen/ Kinder	15,0 %	52,9 %	30,1 %	2,0 %
THEODORIDOU et al. 2007	2477	Griechenland/ Kinder	10,2 %	50,5 %	7,5 %	31,8 %

Heute wird davon ausgegangen, dass *S. pneumoniae* als ätiologisches Agens bei der bakteriellen Meningitis verhältnismäßig zugenommen hat und mittlerweile den häufigsten Erreger darstellt; der Rückgang der epidemiologischen Bedeutung von *H. influenzae* ist nicht zuletzt der seit Anfang der 1990er Jahre verfügbaren Impfung zu verdanken (PELTOLA 2000; CDC 2002; SÁEZ-LLORENS und MCCRACKEN 2003): Während 1991/98 Fälle *H. influenzae*-bedingter Meningitiden bei Kindern von 0-5 Jahren in den neuen Bundesländern und Berlin registriert wurden, kamen 1999 im gleichen Gebiet nur noch vier Erkrankungsfälle zur Meldung (ROBERT KOCH INSTITUT 2000).

In den letzten Jahren finden sich zunehmend antibiotikaresistente Stämme von *S. pneumoniae*, die immer häufiger das Ausweichen auf Reserveantibiotika notwendig machen (COLLIGNON und TURNIDGE 2000).

1.1.2 Infektionsmodus

Die Infektion des Liquors kann auf unterschiedliche Arten erfolgen: Durch fortgeleitete Tröpfcheninfektion, hämatogen oder *per continuitatem* über angrenzende Strukturen. Sie kommt zum Ausbruch, wenn die Erreger eine Vielzahl physiologischer Barrieren des Körpers überwunden haben, wie z. B. das Mukosaepithel der Oro- und Nasopharynx und zuletzt die Blut-Hirn-Schranke. Die Bakterien dringen entweder durch einen Entzündungsreiz aus unmittelbar angrenzenden Strukturen (Mittelohrentzündung, Entzündung der Orbita, Nasennebenhöhlenentzündung) oder aus dem Blut in den Liquor ein, wobei sie im letztgenannten Fall die Blut-Hirn-Schranke passieren müssen (NETTER 1986; REED 1986; LESNAKOVA et al. 2007). Eine Besiedlung des oberen Respirationstraktes mit pathogenen Erregern, insbesondere solchen mit IgA-Proteasen, Pili und Polysaccharidkapseln, kann dabei als Erregerreservoir fungieren (STEPHENS und MCGEE 1981; KAPLAN und FEIGIN 1983; KILLIAN und THOMSEN 1983; ZWAHLEN et al. 1983; STEPHENS 1985; CRAIG et al. 1999).

Neben dem hämatogenen Infektionsmodus ist auch die direkte Fortleitung einer Infektion aus benachbarten Geweben (*Sinus paranasales*, *Proc. mastoideus*, maxillärer Zahn-

halteapparat, Innenohr), über dermale Sinus sowie durch Trauma oder Operation möglich (NETTER 1986; REED 1986).

Nach Penetration der Blut-Hirn-Schranke befinden sich die Erreger in einem Körperkompartiment, in dem die physiologischen Abwehrmechanismen nur eingeschränkt vorhanden sind. Im normalen Liquor finden sich normalerweise weder ausreichende Mengen humoraler Abwehrstoffe (Komplement, Antikörper) noch Leukozyten. SCHELD (1984) prägte für diese Situation den Begriff der regionalen Abwehrschwäche („regional host defense deficiency“), die dem Angehen der Infektion im Liquorraum Vorschub leistet (vgl. KAINS und THYS 1985).

Obwohl umstritten ist, inwieweit die Defizienz insbesondere der komplementabhängigen opsonischen Aktivität im Infektionszustand ausgeglichen werden kann (REED 1986), ist zu Beginn der Infektion von einer relativen Insuffizienz der oben genannten Abwehrmechanismen auszugehen. Aufgrund dieser Insuffizienz entwickelt sich bei einer bakteriellen Besiedlung des Liquorraumes rasch eine purulente Entzündung der Leptomeningen. In unbehandeltem Zustand kann dies eine Thrombophlebitis des *Sinus sagittalis superior* verursachen. Ferner kann es zum Übergreifen der purulenten Infektion in die inneren Liquorräume und das Hirnparenchym kommen. Die entzündliche Verlegung der Kommunikationswege zwischen inneren und äußeren Liquorräumen kann schließlich zum *Hydrocephalus internus* mit Hirndrucksteigerung führen (NETTER 1986).

Innerhalb des *Liquor cerebrospinalis* vermehren sich die Bakterien und setzen durch Autolyse und/oder Sekretion toxische und proinflammatorische Substanzen frei. Unter der Infektion werden Zytokine und Chemokine von meningealen Makrophagen, Ependymzellen, vom Epithel des *Plexus choroideus* und später auch von eingewanderten Leukozyten und Mikrogliazellen gebildet.

Diese interzellulären Mediatoren rufen die Einwanderung von Granulozyten und Monozyten sowie eine Aktivierung von Gliazellen hervor; diese setzen wiederum Substanzen frei, die das Nervengewebe schädigen, Vasospasmus und Vaskulitis verursachen können (ZYSK et al. 1996; BRAUN et al. 1999). Solche Entzündungsreaktionen werden unter anderem durch Lipopolysaccharide (gram-negative Bakterien), Peptidoglykan und Lipoteichonsäure (gram-positive Bakterien) oder durch prokaryotische bakterielle DNA (DENG et al. 2001) stimuliert. Neben dieser proinflammatorischen Wirkung bakterieller

Bestandteile ist auch eine direkte neurotoxische Wirkung bakterieller Bestandteile, u. a. von Pneumolysin, einem wichtigen Virulenzfaktor von *S. pneumoniae*, bekannt (STRINGARIS et al. 2002 a, b).

1.1.3 Klinik

Bakterielle Meningitiden setzen meist subakut bis akut ein und äußern sich in starken Kopfschmerzen, Nackensteifigkeit (Meningismus), Nausea, Erbrechen, hochgradigen Bewusstseinsstörungen, Photophobie, Verwirrtheit und deliranten Zuständen (MASUHR 1998). Ein typisches Zeichen ist hohes Fieber.

Das klinische Bild der Meningitis zeigt zwar charakteristische Merkmale, variiert jedoch beträchtlich in Abhängigkeit vom Alter des Patienten und der Akutheit der Erkrankung; die klassische Trias von Fieber, Nackensteife und mentaler Veränderung findet sich nur in weniger als der Hälfte der Fälle (VAN DE BEEK et al. 2004), und insbesondere bei Säuglingen kann die Erkrankung oligosymptomatisch mit wenig wegweisenden Zeichen sein (HUWENDIEK et al. 2007). Den spezifischen klinischen Erscheinungen (s. Tabelle 3) können mehrere Tage mit unspezifischen gastrointestinalen oder respiratorischen Prodromalzeichen vorausgehen (REED 1986).

Tabelle 3: Klinische Symptome der Meningitis (NETTER 1986; REED 1986; VAN DE BEEK et al. 2004)

Altersgruppe	Symptomatik
Neugeborene und junge Säuglinge	u. U. minimale und unspezifische Symptome: Lethargie, Irritierbarkeit, Rastlosigkeit, Inappetenz Fontanellenvorwölbung und Suturendiastase als Zeichen des erhöhten intracranialen Druckes
Kinder und Erwachsene	Allgemeine Symptome: schwerer generalisierter Kopfschmerz, Übelkeit und Erbrechen, Anorexie, Verwirrung, Lethargie (als Zeichen der Hirndruckerhöhung) bis hin zu präkomatösen oder komatösen Zuständen, fokale neurologische Symptome Meningeale Symptome: Rückenschmerzen, Nackensteife, positives Kernig- (Schmerzen und Schwäche beim Strecken im Kniegelenk des im Hüftgelenk gebeugten Beines) und Brudzinski-Zeichen (Passive Nackenbeugung führt zur Flexion in Knie- und Hüftgelenken)
Alle	Anamnestische Hinweise: entsprechende Vorerkrankungen (Pneumonie, Otitis media etc.), protrahierter Geburtsverlauf, vorzeitiger Blasensprung, peripartale maternale Infektionen bei Neugeborenen

Wegen der schnellen Progression spricht das Fehlen eines Papillenödems nicht gegen das Vorliegen einer Hirndruckerhöhung. Insbesondere bei Meningokokkenmeningitis sind petechiale Blutungen nicht selten. Eine Beeinträchtigung der ADH-Sekretion führt zu einer Hyponatriämie, die bei kindlicher bakterieller Meningitis häufig (in über 50 %) gefunden wird und deren Ausmaß Hinweise auf die Prognose geben kann (KAPLAN und FEIGIN 1983).

Bezüglich des Erregers lassen sich aus dem klinischen Bild keine hinreichend sicheren Rückschlüsse ableiten (HANDRICK et al. 1988). Allerdings können bestimmte klinische Zeichen Hinweise geben: So weist ein makulopapulöses Exanthem – das leicht mit dem makulär-petechialen Exanthem der Echovirus-Meningitis verwechselt werden kann – auf eine septische Streuung durch Meningokokken hin (NETTER 1986).

Nach sorgfältiger Erhebung von Anamnese und klinischem Befund sind adäquate Bildgebung und die Liquoruntersuchung von zentraler Bedeutung für die Diagnosestellung (FITCH et al. 2008). Kontraindikationen für die Punktion der Liquorräume sind ein manifestes Papillen- bzw. Hirnödem, fokale neurologische Symptome, fokale Massenläsi-

onen mit Verlagerung des Hirns sowie ein vorausgegangenes Trauma (NETTER 1986, REED 1986).

In allen Fällen, in denen eine Bewusstseinsstörung den Verdacht auf Hirndrucksteigerung weckt, sollten o. a. Kontraindikationen - zweckmäßigerweise durch ein craniales Computertomogramm (CCT) - ausgeschlossen werden.

Liegt keine der genannten Kontraindikationen vor, so wird durch lumbale Punktion des Subarachnoidalraumes 3-4 ml Liquor gewonnen. Dieser bietet bei Vorliegen einer Meningitis folgende Charakteristika (NETTER 1986; REED 1986; HANDRICK et al. 1988; DELANK 1994):

- Trüb-eitriges Aussehen.
- Nach Untersuchung von Zellen, Eiweiß und Glukose zeigt sich das typische Bild eines entzündlichen Liquorsyndroms: Die Zellzahl ist stark vermehrt bei Überwiegen polymorphkerniger Granulozyten ($>500/\text{mm}^3$); Gesamteiweiß mäßig erhöht ($>100 \text{ mg/ml}$), Glukose $\leq 60\%$ des Blutglukosewertes, Nachweis großmolekularer Serumproteine als Ausdruck der Schrankenstörung.

Beweisend ist der bakterielle Liquorbefund. Bereits im Nativausstrich kann gelegentlich der Erregernachweis mit einiger Sicherheit erfolgen; die Morphologie in der Gramfärbung erlaubt meist die Erregerdiagnose durch den erfahrenen Untersucher, insbesondere beim Nachweis grampositiver Diplokokken (=Pneumokokken).

Zusätzlich werden Blut- und Liquorkulturen mit Antibiogramm angesetzt, um den bakteriologischen Keimnachweis zu ermöglichen.

In jüngerer Zeit haben weitere Untersuchungen das genannte Spektrum ergänzt: Erwähnenswert sind hier vor allem Nachweisverfahren für das bakterielle Antigen (Immunelektrophorese, Latexagglutination, ELISA), die erstens schneller als die Kultur sind und auch bei antibiotisch vorbehandelten Patienten noch eindeutige Aussagen ermöglichen (SALIH et al. 1995; BECKHAM und TYLER 2006; SCHUT et al. 2008). Mit der Beurteilung des gramgefärbten Nativausstrichs sowie dem Antigennachweis ist in etwa 75 % der Fälle der positive Erregernachweis möglich (MCCABE 1983).

1.1.4 Morphologie

1.1.4.1 *Neuronaler Schaden und Spätfolgen*

Die Morphologie des neuronalen Schadens kann sowohl nekrotisch als auch apoptotisch sein (LEIB et al. 1996; ZYSK et al. 1996; BRAUN et al. 1999; NAU et al. 1999 a; NAU und BRÜCK 2002). Neuronale Nekrosen werden vorwiegend in den Sektoren CA1 bis CA4 des Hippocampus und im Neocortex beobachtet (LEIB et al. 1996; NAU et al. 1999 a; GERBER et al. 2001 b). Herdförmige neocorticale Nekrosen werden wahrscheinlich durch eine Vaskulitis verursacht (LEIB et al. 1996; NAU et al. 1999 a; NAU und BRÜCK 2002). Das daraus resultierende Hirnödem ist für ca. 1/3 der Gesamtleblichkeit verantwortlich und verursacht bei Überlebenden schwere neurologische Defizite (NAU et al. 1999 a). Im Kaninchenmodell der bakteriellen Meningitis zeigen geschädigte Körnerzellen im *Gyrus dentatus* der *Formatio hippocampi* morphologische Kriterien der Apoptose (ZYSK et al. 1996). Bei neugeborenen infizierten Ratten sind ebenfalls apoptotische Untergänge im *Gyrus dentatus* zu erkennen (LEIB et al. 1996). Dies ist auch bei ca. 70 % der an einer bakteriellen Meningitis verstorbenen Menschen der Fall (NAU et al. 1999 a).

1.1.4.2 *Nekrose*

Die Nekrose ist eine Folge letaler Zellschädigung durch intensive und abrupte Beeinflussung des Zellstoffwechsels, z. B. bei Sauerstoffmangel, chemischen und physikalischen Noxen, toxischen Einwirkungen und nach Traumata (BUJA et al. 1993).

Es kommt zur Störung des Energiestoffwechsels und zu zunehmendem ATP-Mangel. Dadurch versagt die transmembranöse Ionenpumpe und die Plasmamembran kann den osmotischen Druck nicht mehr regulieren.

Es kommt zur Schwellung der Zelle, die zunächst reversibel ist; im weiteren Verlauf setzen irreversible Schädigungen ein. Zu diesen Schädigungen zählen fortschreitende

Pyknose, Karyorrhexie, Karyolyse und mitochondriale Veränderungen mit Bildung amorpher Matrixverdichtungen. Schließlich kommt es zur Ruptur der Plasmamembran und der Organellenmembran und zur Freisetzung des Zellinhaltes (BUJA et al. 1993). Dieser Kollaps der Zelle induziert schließlich die Entzündungsreaktion (COHEN 1993).

1.1.4.3 Apoptose

Bei der Apoptose finden sich an der Zellmembran Ausstülpungen. Im weiteren Fortschreiten schrumpft die Zelle und weist dabei ein extrem kondensiertes Zytoplasma mit eng gepackten Organellen auf (WYLLIE 1981). Es kommt zu Chromatinverdichtungen, die halbmondförmig an der Zellmembran auftreten. Die Zelle zerfällt schließlich in mehrere membranumschlossene Fragmente - apoptotische Körperchen -, die durch Phagozytose entfernt werden (SCHWARTZ und OSBORNE 1993). In der Regel kommt es im Gegensatz zur Nekrose nicht zu einer zellinduzierten Entzündungsreaktion.

1.1.5 Bakteriologie der *Streptococcus pneumoniae*-Infektion

S. pneumoniae sind α -hämolyisierende Streptokokken der Gruppe B, die sich mikroskopisch als grampositive ovale bis lanzettförmige Diplokokken darstellen. Bislang sind etwa 90 Serotypen bekannt, die sich durch ihre Kapselpolysaccharide unterscheiden (JEFFERSON et al. 2006). Die Struktur der Lipoteichon- und Teichonsäuren der einzelnen Spezies ist jedoch identisch (FISCHER et al. 1993), so dass alle denselben Serotyp aufweisen (SØRENSEN und HENRICHSEN 1987). Sie setzen sich aus sich wiederholenden Oligosaccharideinheiten, konjugiert mit Phosphorylcholinen, zusammen (BEHR et al. 1992). Teichon- und Lipoteichonsäuren sind somit wichtige proinflammatorische Bestandteile aus den Zellwänden von *S. pneumoniae*. Nach Injektion in den Subarachnoidalraum verursachen sie schwere meningeale Entzündungen (TUOMANEN et al. 1985).

1.1.6 Mechanismen der Schädigung

Proinflammatorische und toxische Bakterienbestandteile können den Wirtsorganismus auf unterschiedliche Weise schädigen. Schädigungen des Endothels cerebraler Gefäße und des Ependyms der Ventrikel können die Durchlässigkeit der Blut-Liquor-Schranke und der Blut-Hirn-Schranke erhöhen sowie die Liquorzirkulation beeinträchtigen und zu vasogenen und interstitiellen Hirnödemen beitragen (MICHEL et al. 2001). Durch hitzeinaktivierte Pneumokokken kommt es zur Schädigung von mit Gliazellen kultivierten Neuronen (KIM und TÄUBER 1996) und Neuronenschäden in hippocampalen Bereichen (SCHMIDT et al. 2001; VON MERING et al. 2001). Pneumolysin-Konzentrationen, wie sie im Liquor *cerebrospinalis* beobachtet wurden, sind *in vitro* neurotoxisch. Pneumolysin ist ein porenbildendes Protein, das zu einem Einstrom von extrazellulärem Kalzium führt (BRAUN et al. 2002; STRINGARIS et al. 2002 a, b).

1.1.7 Therapie der bakteriellen Meningitis

Die Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie sehen beim Verdacht auf bakterielle Meningitis folgende Vorgehensweise vor¹:

- Bei erwachsenen Patienten mit Verdacht auf bakterielle Meningitis, aber ohne Bewusstseinsstörung und fokales neurologisches Defizit wird unmittelbar nach der klinischen Untersuchung eine lumbale Liquorpunktion vorgenommen; nach Abnahme von Blutkulturen werden sofort Dexamethason (10 mg) und Antibiotika (s. u.) i.v. verabreicht.
- Bei schwer bewusstseinsgestörten Patienten und Patienten mit fokalneurologischem Defizit (z. B. Hemiparese) werden bereits unmittelbar nach der Blutentnahme (für

¹ S. <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/030-089.htm>

das Anlegen einer Blutkultur) Dexamethason und Antibiotika i.v. verabreicht; die Liquorpunktion wird bei diesen Patienten vom CCT-Befund abhängig gemacht.

- Die initiale empirische Antibiotikatherapie bei der ambulant erworbenen bakteriellen Meningitis im Erwachsenenalter beinhaltet eine Kombination aus Ampicillin und einem Cephalosporin der 3. Generation (z. B. Ceftriaxon); bei dringendem Verdacht auf eine Meningokokkenkrankung (Alter, Exposition, Hauterscheinungen) wird Penicillin G nach wie vor als ausreichend angesehen.
- Es muss eine rasche Fokussuche erfolgen, insbesondere eine HNO-ärztliche Konsiliaruntersuchung und Suche nach einem parameningealen Entzündungsherd (z. B. Sinusitis) im CCT oder MRT.
- Bei Vorliegen eines erhöhten intrakraniellen Drucks werden hirndrucksenkende Maßnahmen, z. B. Oberkörperhochlagerung um 30°, Osmotherapie und externe intraventrikuläre Liquordrainage bei Vorliegen eines Hydrozephalus, durchgeführt .

Die adjuvante Therapie mit Corticosteroiden wird heute bei Erwachsenen empfohlen und reduziert die Mortalität und die Rate persistierender neurologischer Symptome (VAN DE BEEK et al. 2007). Eine generelle Flüssigkeitsrestriktion innerhalb der ersten 48 Stunden nach Diagnosestellung scheint dagegen nach neueren Untersuchungen nicht erforderlich und möglicherweise sogar nachteilig zu sein (MACONCHIE et al. 2008).

Falls Cephalosporine der 3. Generation nicht zur Verfügung stehen, können mit Chloramphenicol, ggf. in Kombination mit Ampicillin, ebenfalls gute Ergebnisse erzielt werden (PRASAD et al. 2007).

Die wichtigste Voraussetzung für eine erfolgreiche Therapie der bakteriellen Meningitis ist die schnelle Diagnosestellung. In der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Göttingen wird, nach dem Beschluss vom 25.04.03, bei Verdacht auf bakterielle Meningitis nach folgendem Diagnose- und Therapieschema verfahren (Tabelle 4):

Tabelle 4: Vorgehen bei Verdacht auf bakterielle Meningitis

Alle Patienten		
1. Blutkulturen, Rachen-, ggf. Wundabstrich		
Patienten ohne Koma und/oder Herdsymptomatik	Patienten mit Koma und/oder Herdsymptomatik	
2. Liquorpunktion	2. Empirische Antibiotikatherapie	
3. Empirische Antibiotikatherapie	3. CCT	
4. CCT	Ø Hirnödem, Ø Mittellinienverlagerung	Hirnödem und/oder Mittellinienverlagerung
	4. Liquorpunktion	Ø Liquorpunktion

Das antibiotische Regime besteht bei Verdacht auf außerhalb des Krankenhauses erworbener bakterieller Meningitis aus:

Ampicillin 3x4 g und Ceftriaxon 2x2 g oder Cefotaxim 2x2 g.

Durch die Kombination der beiden Präparate ist ein breites Erregerspektrum abgedeckt. Ampicillin wirkt gut gegen *L. monocytogenes*, und Ceftriaxon und Cefotaxim erfassen auch *S. pneumoniae* mit verminderter Empfindlichkeit gegenüber Penicillin G.

1.2 Ziel der Arbeit

Die Behandlung der Meningitis führt heute noch, trotz effektiver Antibiotikatherapie, zu schweren Komplikationen und Langzeitschäden. Nicht-bakteriolytisch wirksame Antibiotika führen zu einer geringeren Freisetzung proinflammatorisch wirksamer Substanzen und wirken damit zytoprotektiv. Wir untersuchten daher im Tiermodell der bakteriellen Meningitis, ob eine antibiotische Behandlung mit dem Proteinsynthesehemmer Rifampicin, gefolgt von dem bakteriolytisch wirksamen Ceftriaxon, Vorteile gegenüber der Monotherapie mit Ceftriaxon hat. Die Effektivität dieser Kombinationsbehandlung wurde anhand von Protein- und Laktatkonzentration, Leukozytenzahl sowie LTA-Konzentration im Liquor bewertet. Die Beurteilung des Neuronenschadens erfolgte histologisch.

2 Material und Methoden

2.1 Testorganismen

In diesem Experiment wurde ein *Streptococcus pneumoniae* Typ 3-Stamm verwendet, der von einem infizierten Erwachsenen isoliert wurde (freundlicherweise überlassen von M. G. Täuber, Universität Bern, Schweiz). Nach mehreren Kaninchenpassagen wurde infizierter Liquor für 24 Stunden auf Blutagarplatten kultiviert und die resultierenden Bakterien in Kochsalzlösung suspendiert; die Aliquots wurden bei -70 °C eingefroren.

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) und die minimale bakterizide Konzentration (MBK) wurden mit Hilfe der Bouillon-Makrodilutionsmethode bestimmt; bei dieser Methode wird ein Wirkstoff einer Reihenverdünnung unterzogen und danach eine bestimmte Menge einer Bakteriensuspension mit standardisierter Dichte in eine Nährbouillon pipettiert. Dieses sog. „Inokulum“ wird anschließend der Antibiotikaverdünnung zugegeben. Nach Bebrütung des Ansatzes ist bakterielles Wachstum durch die Trübung des Mediums zu erkennen; die Konzentration im letzten Röhrchen, das kein Wachstum (Trübung) zeigt, entspricht der MHK. MHK und MBK betragen $0,03$ bzw. $0,06\text{ }\mu\text{g/ml}$ für Ceftriaxon und $0,008$ bzw. $0,06\text{ }\mu\text{g/ml}$ für Rifampicin.

2.2 Kaninchenmodell

Die Versuche wurden in Anlehnung an das Kaninchenmodell von DACEY und SANDE (1974) durchgeführt.

Als Versuchstiere dienten weiße Neuseeländer Kaninchen mit einem Körpergewicht zwischen 2000 und 3000 g. Nach intramuskulärer Anästhesie mit Ketamin (25 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg) wurden die Tiere intrazisternal mit 10^6 CFU *S. pneumoniae* infiziert. Die Anästhesie wurde intravenös für die Versuchsdauer von 24 Stunden mit Urethan fortgesetzt. In der ersten Stunde erhielten die Tiere 3 g Urethan als 30 %ige Lösung in H₂O, in den folgenden 4 Stunden erneut 3 g und zum Ende des Versuchs nochmals 3 g.

Alle Medikamente wurden über eine Ohrvene zugeführt, Blut wurde kontralateral aus einer Ohrarterie entnommen.

Insgesamt wurden 21 Tiere auf 2 Gruppen verteilt:

- Eine Gruppe (n=11²) erhielt 12 Stunden nach der Infektion Ceftriaxon (Rocephin[®], Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen); zunächst wurde ein Bolus von 20 mg/kg verabreicht, gefolgt von einer Erhaltungsdosis von 10 mg/kg/h. Diese Gruppe wird im Folgenden mit dem Kürzel CRO bezeichnet.
- Die zweite Gruppe (n=11, im Folgenden RIF/CRO) erhielt nach 12 Stunden zunächst Rifampicin (Rifa[®], Grünenthal, Stolberg) in einer Dosis von 10 mg/kg als Bolus und anschließend 5 mg/kg/h; 6 Stunden später wurde zusätzlich CRO in der gleichen Dosis wie in der ersten Gruppe verabreicht.

Die Prüfsubstanzen wurden kontinuierlich verabreicht, um möglichst schnell die Einstellung eines Fließgleichgewichts im Serum zu erreichen und Schwankungen der Liquorkonzentration möglichst zu minimieren. Frühere Versuche hatten gezeigt, dass CRO-Konzentrationen im Liquor nach einer Einzeldosis von 125 mg/kg und einer kontinuierlichen Verabreichung von 10 mg/kg/h äquivalent sind (NAU et al. 1995; COTTAGNOUD et al. 2000).

Zielgrößen des Versuchs waren Bakterientiter, Laktat, Protein, Leukozyten und Lipoteichonsäurekonzentrationen im Liquor; zu deren Bestimmung wurde 12, 14, 18, 20 und 24 Stunden nach Infektion Blut und Cerebrospinalflüssigkeit entnommen.

² Ein Tier dieser Gruppe starb vor Versuchsende und wurde deshalb in die Auswertung nicht mit eingeschlossen.

24 Stunden nach Infektion wurden die Tiere durch intravenöse Injektion von 75 mg Thiopental (Trapanal[®], Byk Gulden, Konstanz) getötet. Danach wurde das Gehirn entnommen und in 4 % Paraformaldehyd für 24 h fixiert.

Abbildung 1 zeigt den Versuchsablauf im Überblick:

	CRO	RIF/CRO
0 h	Infektion mit 10^6 CFU intrazisternal	
12 h	CRO Bolus 20 mg/kg, dann 10 mg/kg/h Entnahme von Blut und CSF	RIF Bolus 10 mg/kg, dann 5 mg/kg/h Entnahme von Blut und CSF
14 h	Entnahme von Blut und CSF	Entnahme von Blut und CSF
18 h	Entnahme von Blut und CSF	CRO Bolus 20 mg/kg, dann 10 mg/kg/h Entnahme von Blut und CSF
20 h	Entnahme von Blut und CSF	Entnahme von Blut und CSF
24 h	Entnahme von Blut und CSF Versuchsende und Entnahme des Gehirns	Entnahme von Blut und CSF Versuchsende und Entnahme des Gehirns

Abbildung 1: Ablauf des Versuchs

2.3 Gewebeentnahme und Fixation

Nach Versuchsende (24 Stunden nach Infektion) wurde den Tieren nach vorheriger Abtrennung der *Medulla oblongata* vom Rückenmark das Gehirn entnommen.

Der dorsale Anteil der rechten Hemisphäre wurde für 24 Stunden in Paraformaldehyd fixiert.

Paraformaldehyd 4 %: 100 ml 0,1 M Phosphatpuffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, \text{KH}_2\text{PO}_4$ im Verhältnis 81,8:18,2)
darin gelöst 4 g Formaldehyd

Die Lösung wurde auf 70 °C erhitzt, anschließend wurden 10 Tropfen 1 M NaOH zugegeben und nach dem Abkühlen filtriert.

2.3.1 Herstellung der Schnitte

Die entnommenen und in Paraformaldehyd fixierten Gewebeproben wurden gewässert und anschließend in Paraffin eingebettet.

Von den Proben wurden 1 µm dicke Schnitte angefertigt, die auf mit Poly L-Lysin (Sigma, Deisenhofen) beschichtete Objektträger aufgebracht wurden.

2.3.2 Färbung: *In situ*-Tailing

In situ-Tailing (IST) ist eine Methode zum Nachweis fragmentierter DNA in Zellkernen.

Das Prinzip beruht auf der Verknüpfung von mit Digoxigenin markierten Desoxiribonukleosidtriphosphaten mit den 3'-Hydroxylenden von einzel- oder doppelsträngiger DNA (MARTIN et al. 1990).

Katalysator dieser Reaktion ist die terminale Transferase. Die Farbreaktion der markierten Zellkerne wird durch einen gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper ermöglicht.

Für das *in situ*-Tailing wurden die 1 µm dicken Schnitte zunächst entparaffiniert, indem sie 2-mal für 15 min in Xylol getaucht wurden und danach die absteigende Alkoholreihe durchliefen (100 %, 90 %, 70 %, 50 %, 30 % Ethanol für jeweils 5 min).

Anschließend wurden sie mit Tris Buffered Saline (TBS) gespült und dann für 15 min mit 5 %iger Proteinase K (Sigma, Deisenhofen) bei 37 °C für 15 min in einem Reaktionsgemisch von 10 µl 5x Tailing-Puffer, 1 µl Digoxigenin DNA Labeling Mix, 2 µl Kobaltchlorid, 12,5 Einheiten terminaler Transferase und dem ad 50 µl erforderlichen Volumen von *Aqua bidest.* inkubiert.

Danach wurde wieder mit TBS gespült und 10 %iges fetales Kälberserum (FCS) für 15 min aufgetragen. Nach erneuter Waschung mit TBS wurde, um die durch Digoxigenin markierten Nukleotide im weiteren Versuchsverlauf sichtbar machen zu können, ein Anti-Digoxigenin-Antikörper in 10 % FCS (1:250) aufgetragen, der für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Auch hier wurde im Anschluss mit TBS gespült.

Die schwarze Farbreaktion wurde durch 4-Nitroblau-Tetrazolin-Chlorid-5-Bromid-4-Chlorid-3-Indolyl-Phosphat (Roche Diagnostics, Mannheim) ausgelöst (ZYSK et al. 1996). Die Gegenfärbung der Kerne wurde mit Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung (Roche Diagnostics, Mannheim) vorgenommen.

Lösungen: Xylol (J. T. Baker, Holland, Nr. 7386)
Isopropylalkohol (Chemievertrieb Hannover)
Chloroform (J. T. Baker, Holland, Nr. 8118)
Proteinase K (Sigma, Deisenhofen)

Tailing Mix:

Reaktionspuffer für Terminale Transferase (Boehringer, Nr. 220582)
Kobaltchlorid Lsg., 25 mM (Boehringer, Nr. 220582)
Terminale Transferase (Boehringer, Nr. 220582)
Digoxigenin-Labeling-Mix (Boehringer, Nr. 1277065)

100 µl Tailing Mix : 20µl Reaktionspuffer
4µl Kobaltchloridlösung
1µl Terminale Transferase
2µl Digoxigenin-Labeling-Mix
Aqua bidest.

FCS (Biochrom KG, Berlin, Nr. 50115)

Anti-Digoxigenin-Antikörper vom Schaf, Fab-Fragmente konjugiert mit
alkalischer Phosphatase (Boehringer, Nr. 1093274)

AK:FCS(10 %) 1:250

TBS: Stammlösung (50 ml)
NaCl (8,7 g)
Aqua bidest. 950 ml

Puffer für Farbreaktion: Tris-HCl (12,1 g, Sigma, Nr. T 1378)
NaCl (5,8 g, J.T. Baker, Holland, Nr. 0278)
Aqua bidest. (1000 ml)
Der pH-Wert wurde auf 9,5 eingestellt, dies erfolgte mit
Hilfe von 1N HCl.

Färbung: 4-Nitroblau-Tetrazolin-Chlorid (NBT) (Boehringer, Nr. 1087479)
100 mg/ml in 70 %igem Dimethylformamid

5-Bromid-4-Chlorid-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) (Boehringer,
Nr. 760994)
50 mg/ml in 100 %igem Dimethylformamid.

Das Verhältnis der einzelnen Komponenten wurde so gewählt, dass auf
60 ml Puffer 270 µl NBT und 210 µl BCIP zugegeben wurden.

Gegenfärbung: Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung
0,1 g Kernechtrot, 5 g Aluminiumsulfat auf 100 ml aqua bidest.

Die Schnitte wurden schließlich mit Aquamount (BDH Laboratory Supplies, Nr.
3622662 H) eingedeckelt.

2.3.3 Färbung: Hämatoxylin-Eosin

Die HE-Färbung wurde nach Standardprotokoll vorgenommen.

Die Schnitte wurden 3 min in Xylol entparaffiniert und durchliefen anschließend die absteigende Alkoholreihe (100 %, 90 %, 70 %, 50 %, 30 % Ethanol je 5 min).

Danach wurden die Schnitte für 5-10 min in Hämalaun (Merck, Darmstadt) getaucht, anschließend erfolgte die Differenzierung in HCl-Alkohol. Im Anschluss wurden sie für 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut, um darauf für 5 min das Eosinbad (Eosin G, Merck, Darmstadt) und schließlich die aufsteigende Alkoholreihe zu durchlaufen.

Danach wurden die Schnitte mit *DePex* eingedeckelt. Im Färbepreparat zeigen sich die Kerne blau, Plasma rosa.

2.3.4 Quantifizierung apoptotischer Neurone

An den HE-gefärbten Schnitten wurde mit Hilfe eines Contron Videoplan-Computers (Grundig, Nürnberg) die Fläche der Körnerzellschicht im *Gyrus dentatus* gemessen sowie die Anzahl der apoptotischen Zellen in diesem Areal mittels der *in situ*-Tailing-Technik und nach morphologischen Kriterien bestimmt. Die Dichte der apoptotischen Neurone wurde als Zahl der markierten Neurone pro mm^2 in der hippocampalen Körnerzellschicht angegeben.

2.4 Liquoranalyse

2.4.1 Entzündungsparameter

Nach Entnahme des Liquors wurden die Leukozytenzahlen bestimmt, die Proben eisgekühlt und anschließend für 5 min bei 3000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Die Überstände wurden mit einer Pipette entnommen und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Sie dienten der späteren Bestimmung von Protein, Laktat und Lipoteichonsäure (LTA).

1. **Leukozyten:** Die Bestimmung der Leukozytenzahlen im Liquor wurde mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer vorgenommen.
2. **Laktat:** Laktatkonzentrationen wurden enzymatisch bestimmt.

3. **Protein:** Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nephelometrisch.

2.4.2 Lipoteichonsäure

Die Bestimmung der Lipoteichonsäure im Verlauf der antibiotischen Behandlung erfolgte mit einem enzymatischen Immunoassay (STUERTZ et al. 1998). Bei diesem Assay wurden gereinigte, aus einem unbekapselten Stamm von *S. pneumoniae* (R6) gewonnene Lipoteichonsäuren zur Immunisierung und Erstellung einer Eichkurve verwendet. Dabei wurden polyklonale Antikörper von weißen Neuseeländer Kaninchen gewonnen, die vorher subkutan mit einer Mischung von 500 µg LTAs und 500 µg eines inkompletten Freund'schen Adjuvans immunisiert worden waren. Als Capture-Antikörper wurde der kommerziell erhältliche TEPC-15 (Sigma, Deisenhofen) verwendet, und als Detektions-Antikörper diente das polyklonale Kaninchen-Antiserum.

Die verabreichten Pharmaka zeigten keine Interaktion mit diesem Assay.

Der Lipoteichonsäure-Assay wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Tag: Zugabe des ersten Antikörpers, Mouse IgA Kappa: 15 µL Antikörper wurden in 8 ml PBS gelöst. Je 80 µl wurden in jedes Well der Titerplatte gegeben. Über Nacht wurden die Platten bei +4 °C inkubiert.

2. Tag: Die Platten wurden dreimal mit PBS-0,2 % Tween 20 Waschpuffer gewaschen (2 ml Tween 20 auf 1l PBS) und anschließend auf Papier ausgeschlagen.

Blockschritt: Je 175 µl FCS (PBS mit 9 g/l NaCl und 5 % FCS) wurden in jedes Well gegeben und ca. 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Entfernung des PBS durch Ausschütteln wurde die Platte auf Luftblasen kontrolliert.

Zugabe der zu messenden Proben: Auftragen der Standardreihe: Die Eichlösung wurde mit 0,5 µl LTA-7 auf 1 ml FCS angesetzt (=50 ng/ml). Es wurde mit den folgenden Verdünnungen gearbeitet: 50-25-12,5-6,25-3.1-1,6-0,8 und 0 (jeweils in ng/ml). Die Standardreihe wurde in den beiden linken Spalten der Platte jeweils als Doppelbestim-

nung aufgetragen (Spalten A und B). Es wurden in alle Wells, außer in A1 und A2 80 µl FCS zugegeben.

In A1 und A2 wurden 160 µl Eichlösung aufgetragen und durch 5-10-maliges Hochziehen mit der Mehrkanalpipette durchmischt. 80 µl wurden aus A1 und A2 entnommen und in B1 und B2 überführt. Danach wurden B1 und B2 ebenfalls 5-10-mal durchmischt und 80 µl der Lösung in C1 und C2 überführt. Dieser Vorgang wurde nun bis einschließlich zur Spalte G fortgeführt.

80 µl aus G1 und G2 wurden entnommen und verworfen.

Auftragen der Proben: Die Liquorproben wurden mit FCS auf 80 µl verdünnt. 80 µl jeder Probe wurden in die entsprechenden Wells eingeführt und 1,5 Std. bei Raumtemperatur geschüttelt.

Zugabe des zweiten Antikörpers, Kaninchen-Anti-Lipoteichonsäure; E2: Die Platten wurden ausgeschüttet und dreimal mit PBS-Tween 20 gewaschen. Der zweite Antikörper wurde 1:4000 mit FCS verdünnt. Je 80 µl der Antikörperverdünnung wurden in jedes zu messende Well gegeben und für 1,5 Std. geschüttelt.

Zugabe des dritten Antikörpers, Ziege-Anti-Kaninchen-IgG, Peroxidase-konj.: Die Platten wurden ausgeschüttet und dreimal mit PBS-Tween 20 gewaschen. Der dritte Antikörper wurde 1:8000 mit FCS verdünnt und je 80 µl davon in jedes Well gegeben und erneut für 1,5 Std. geschüttelt.

Zugabe des Peroxidase-Substrates (Azino-bis[3-Ethylbenzothiazolin-6-Sulfonat] [ABTS]): 10 mg ABTS wurden in 9 ml H₂O gelöst und 1ml 10x ABTS-Puffer hinzugefügt (=1 mg/ml ABTS). Davon wurden je 80 µl in jedes Well gegeben und für 10-15 min unter Lichtabschluss geschüttelt. Nach 15 min wurden die Proben im Elisa-Reader bei 405 nm gemessen.

2.5 Datenauswertung und Statistik

Alle Auswertungen wurden mit dem Programmpaket CSS:STATISTICA (StatSoft, Inc., Tulsa, USA) durchgeführt. Für intervallskalierte und rangskalierte Variablen (im Folgenden als „stetige“ Variablen bezeichnet) wurden als Kennwerte Median, 25er und 75er Perzentil berechnet. Für diskrete Variablen wurde die Anzahl der Werte in jeder Kategorie und deren Anteil an der Gesamtzahl (in Prozent) ermittelt.

Prüfstatistisch waren Unterschiede zwischen stetigen bzw. diskreten Variablen in unabhängigen Stichproben (Gruppen CRO bzw. RIF/CRO) auf Nichtzufälligkeit hin zu überprüfen. Dazu wurden die im Folgenden beschriebenen Tests durchgeführt, die jeweils eine sinnvoll gewählte „Nullhypothese“ zu der aufgeworfenen Fragestellung auf ihre Bestätigung oder Ablehnung für die Grundgesamtheit untersuchen. Ergebnis eines jeden Tests ist die Irrtumswahrscheinlichkeit p . Je kleiner p , desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein postulierter Zusammenhang oder Unterschied zwischen Stichproben tatsächlich existiert.

Die für einen Test aufgestellte Nullhypothese wird üblicherweise abgelehnt, wenn p kleiner als 0,05 (=5 %) ist. Ein Testergebnis wird dann als signifikant bezeichnet. Der Zusammenhang oder Unterschied kann in diesem Fall nicht nur für die untersuchten Stichproben, sondern auch für die Grundgesamtheit angenommen werden. Für den Fall $p > 0,05$ spricht man von einem nicht signifikanten Ergebnis. Die Nullhypothese wird in diesem Fall beibehalten, ein Zusammenhang oder Unterschied ist dann nicht mit ausreichender Sicherheit nachzuweisen.

Unterschiede stetiger Variablen in unabhängigen Stichproben (z. B. Unterschiede in der Leukozytenzahl im Liquor 12 Stunden nach Infektion bei den mit CRO bzw. RIF/CRO behandelten Gruppen) wurden mit dem U-Test von Mann und Whitney geprüft; dieser ist unabhängig von Unterschieden der Standardabweichungen der Gruppen und prüft die Nullhypothese: „Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Beobachtung in einer Stichprobe größer ist als eine beliebige gezogene Beobachtung einer anderen Stichprobe, ist gleich 1/2.“ Für die Durchführung des U-Tests werden alle Werte der stetigen Variablen der Größe nach geordnet. Dem kleinsten Wert wird die Rangzahl 1, dem zweitkleinsten die Rangzahl 2 usw. zugeordnet. Die Rangzahlen werden getrennt nach Kategorien der diskreten Variablen addiert und daraus eine Prüfgröße U berechnet.

Durch Vergleich mit der so genannten Standardnormalverteilung erhält man den Wert für die Irrtumswahrscheinlichkeit p .

Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung diskreter Variablen in unverbundenen Stichproben wurden mit dem χ^2 -Test untersucht. Die Einteilung von zwei Stichproben (A und B) (hier z. B. Gruppe CRO und RIF/CRO), die nach n Ausprägungen eines Merkmals aufgeteilt sind (hier z. B. Keimzahl in Gruppen), führt zur Aufstellung einer $2 \times n$ -Feldertafel mit den folgenden Besetzungszahlen:

	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^3$	$>10^3 \leq 10^4$	$>10^4 \leq 10^5$	$>10^5 \leq 10^6$	$>10^6 \leq 10^7$	$>10^7$
CRO	a	b	c	d	e	f	g
RIF/CRO	h	i	j	k	l	m	n

Mit dem χ^2 -Test kann diese daraufhin überprüft werden, ob die Stichproben sich hinsichtlich des untersuchten Merkmals unterscheiden oder nicht, d. h. ob sie als Zufallsstichprobe aus einer durch die Zeilen- und Spaltensummen repräsentierten Grundgesamtheit aufgefasst werden können. Der Test prüft die Nullhypothese: „Die Besetzungszahlen der $2 \times n$ -Feldertafel sind proportional zu den Randsummen.“ Aus den Besetzungszahlen a-n wird dazu eine Prüfgröße χ^2 berechnet und daraus mit Hilfe der χ^2 -Verteilungsfunktion die Irrtumswahrscheinlichkeit p ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Körpertemperatur

Die Körpertemperatur stieg innerhalb der ersten 12 Stunden nach Infektion der Tiere um etwa 1,1 °C und bis 18 Stunden um weitere 1,0 °C an (jeweils im Median). Nach 20 Stunden ergab sich ein statistisch signifikanter Wiederabfall um 0,6 °C. In der Gruppe der mit Rifampicin und Ceftriaxon behandelten Tiere lag die Temperatur – bei identischen Ausgangswerten – durchgängig etwas höher, der Gruppenunterschied betrug zwischen 0,2 und 1,0 °C und war nach 12 (d. h. bei der *Verabreichung* des Antibiotikums) und 18 Stunden statistisch signifikant (Tabelle 5, Abbildung 2).

Tabelle 5: Körpertemperatur im Versuchsverlauf

Körpertemperatur	25er Perzentil	Median	75er Perzentil
0h: CRO	38,0	38,3	38,2
RIF/CRO	37,5	38,5	38,1
12h: CRO	39,0	39,1	39,5
RIF/CRO	39,4	39,7	40,3
14h: CRO	39,5	40,0	40,1
RIF/CRO	39,7	40,5	40,6
18h: CRO	39,3	39,7	40,6
RIF/CRO	40,4	40,7	41,3
20h: CRO	39,1	39,5	40,0
RIF/CRO	39,8	40,5	40,8
24h: CRO	38,4	39,6	40,0
RIF/CRO	39,4	40,2	40,5

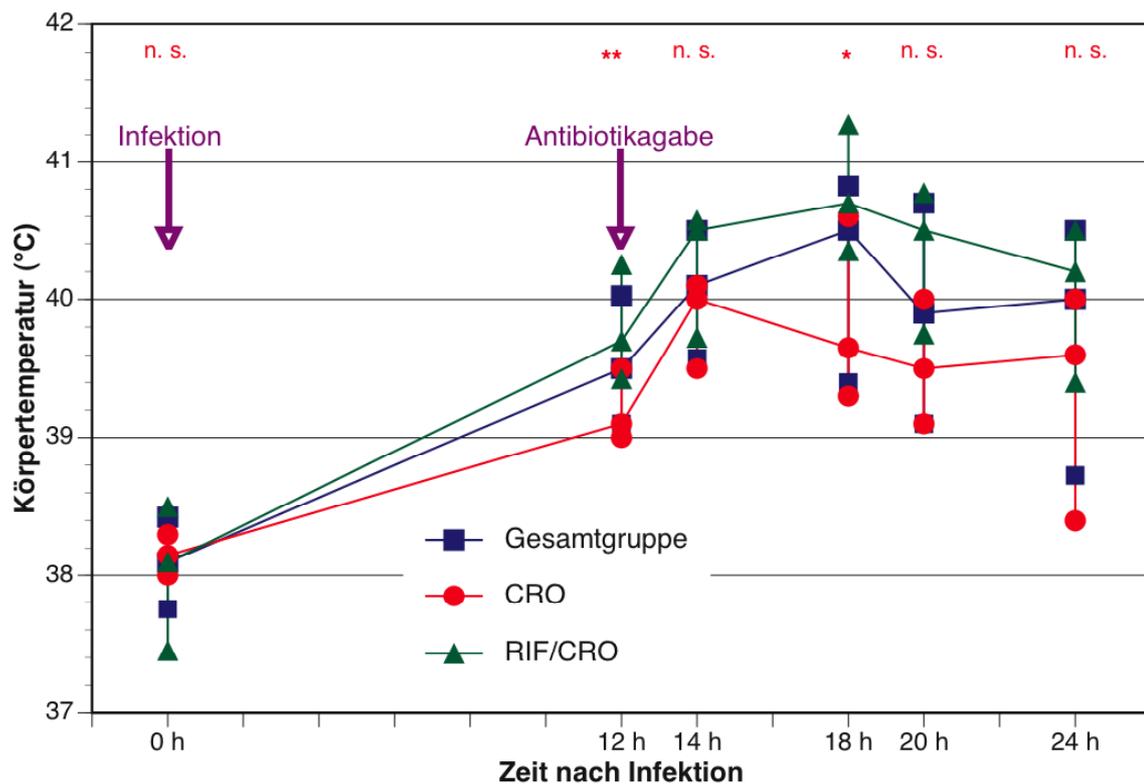


Abbildung 2: Verlauf der Körpertemperatur. Zur Legende: Dargestellt sind Median, 25er und 75er Perzentil. *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; n.s. nicht signifikant; rot Gruppenunterschied CRO – RIF/CRO

3.2 Bakterientiter

Bei der Betrachtung der Bakterientiter zeigte sich zu Beginn der Antibiotikatherapie kein signifikanter Unterschied. Bereits 2 Stunden später lag der Titer in der CRO-Gruppe aber bereits um deutlich mehr als eine Zehnerpotenz niedriger, und die Keimfreiheit im Liquor wurde in dieser Gruppe etwa 6 Stunden früher erzielt als in der RIF/CRO-Gruppe (Abbildung 3, Tabelle 6).

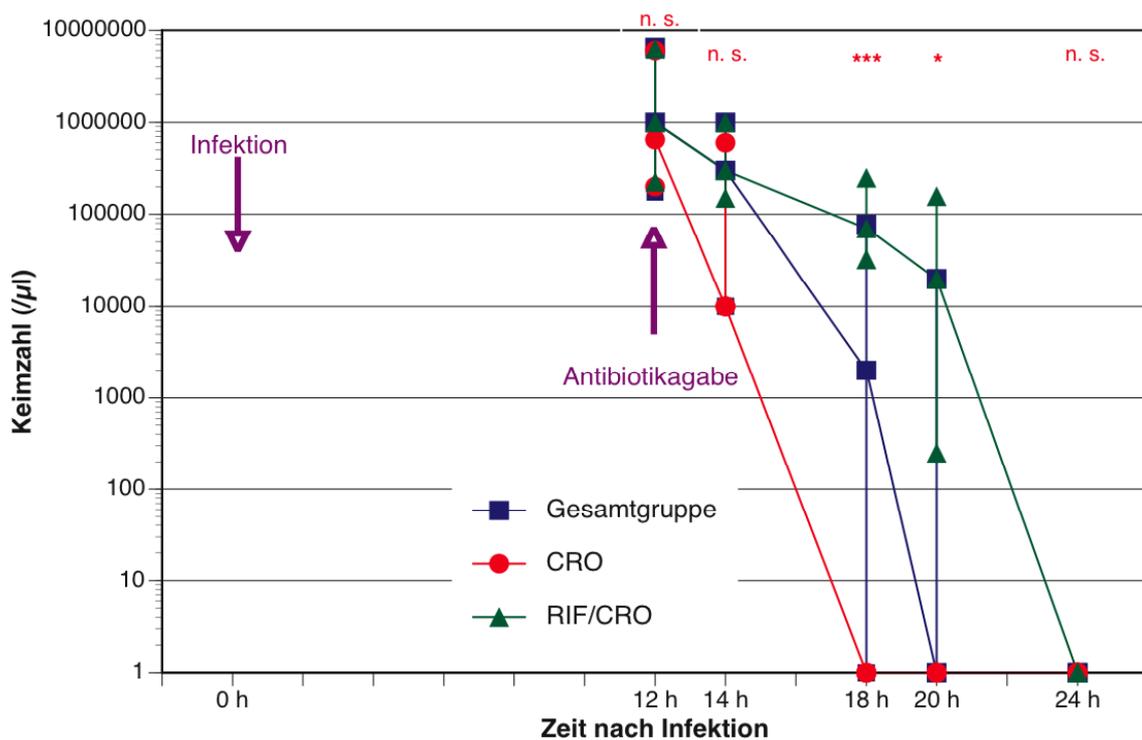


Abbildung 3: Verlauf der Bakterientiter. Zur Legende: Dargestellt sind Median, 25er und 75er Perzentil. *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; n.s. nicht signifikant; rot Gruppenunterschied CRO – RIF/CRO, Teilung der y-Achse hier logarithmisch

Tabelle 6: Bakterientiter im Versuchsverlauf

Bakterientiter (μl^{-1})	25er Perzentil	Median	75er Perzentil
12h: CRO	200000	650000	6000000
12h: RIF/CRO	225000	1000000	6250000
14h: CRO	10000	10000	600000
14h: RIF/CRO	150000	300000	1000000
18h: CRO	0	0	0
18h: RIF/CRO	32500	70000	250000
20h: CRO	0	0	0
20h: RIF/CRO	250	20000	157500
24h: CRO	0	0	0
24h: RIF/CRO	0	0	0

Deutlich wird die unterschiedlich schnelle Keimeliminierung auch bei Betrachtung der Keimzahl als diskrete Variable: Während sich in der CRO-Gruppe bereits nach 18 Stunden bei keinem Versuchstier mehr Bakterien im Liquor nachweisen ließen, fanden sich nach Rifampicin-Vorbehandlung am Ende der Experimente nach 24 Stunden noch bei 2 Tieren Erreger mit einem Titer von $n \cdot 10^4$ (Abbildung 4).

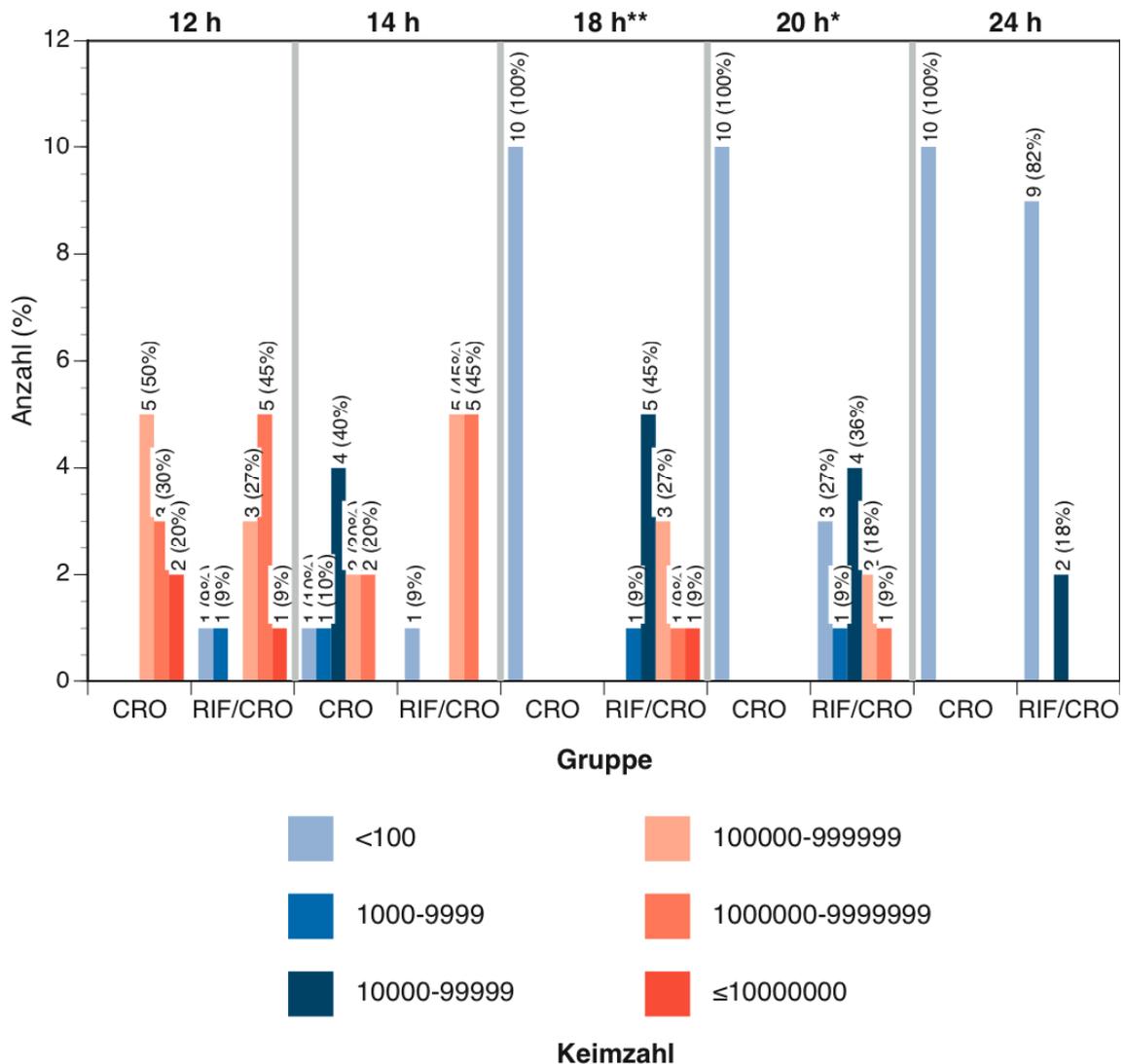


Abbildung 4: Bakterientiter im Versuchsverlauf, Behandlung als diskrete Variable. Zur Legende: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ im Gruppenvergleich

3.3 Entzündungsparameter im Liquor

3.3.1 Protein

Die Proteinkonzentrationen im Liquor stiegen innerhalb der ersten 2 Stunden nach Antibiotikagabe statistisch signifikant auf mehr als das Doppelte an und waren in der RIF-Gruppe geringfügig niedriger als in der CRO-Gruppe; der Unterschied war aber zu keinem der beiden Messzeitpunkte statistisch signifikant (Abbildung 5, Tabelle 7).

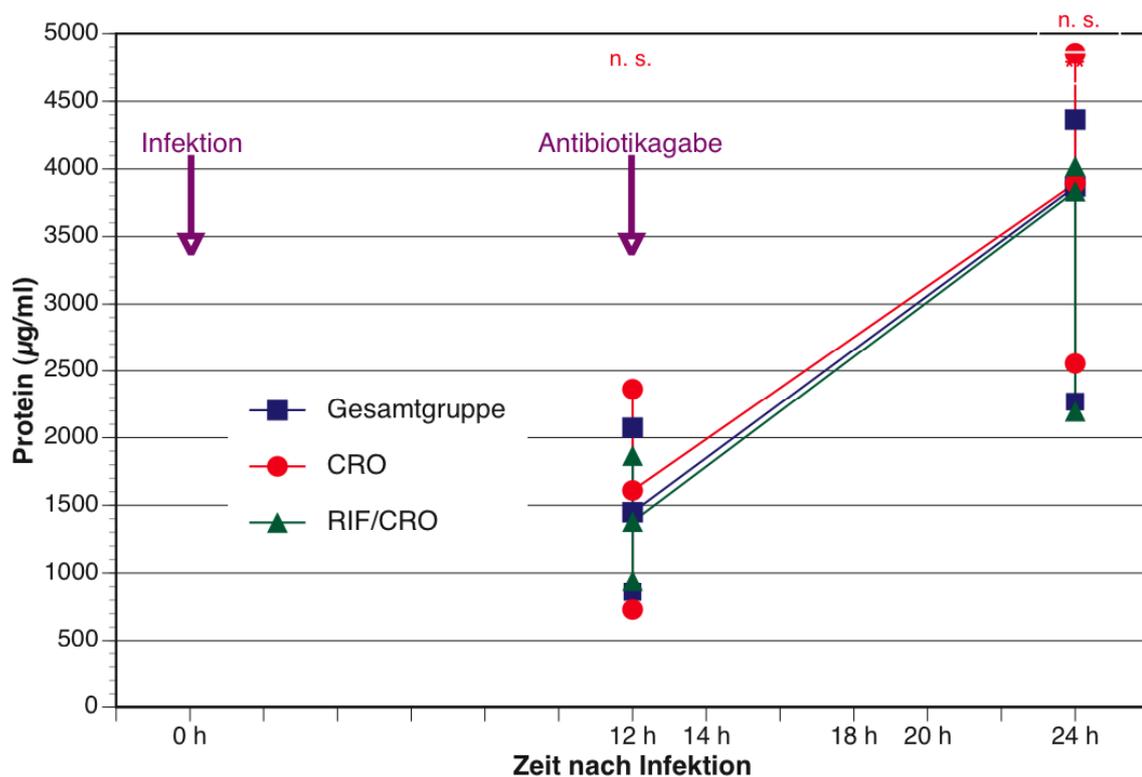


Abbildung 5: Verlauf der Proteinkonzentration. Zur Legende: Dargestellt sind Median, 25er und 75er Perzentil. *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; n.s. nicht signifikant; rot Gruppenunterschied CRO – RIF/CRO

Tabelle 7: Proteinkonzentration im Versuchsverlauf

Proteinkonzentration (µg/ml)	25er Perzentil	Median	75er Perzentil
12h: CRO	731,0	1609,0	2362,5
RIF/CRO	942,3	1379,0	1867,3
24h: CRO	2555,3	3894,0	4853,8
RIF/CRO	2195,5	3835,0	4020,0

3.3.2 Laktat

Laktat als Indikator der anaeroben Glycolyse stieg ebenfalls insgesamt hochsignifikant an und konnte bei den mit Rifampicin vorbehandelten Tieren in geringfügig, aber nicht signifikant höheren Konzentrationen festgestellt werden als bei der reinen Ceftriaxongruppe (Tabelle 8, Abbildung 6).

Tabelle 8: Laktatkonzentration im Versuchsverlauf

Laktatkonzentration (mmol/l)	25er Perzentil	Median	75er Perzentil
12h: CRO	2,20	2,85	3,80
RIF/CRO	1,73	3,10	5,25
24h: CRO	4,20	5,15	10,40
RIF/CRO	4,40	7,80	10,53

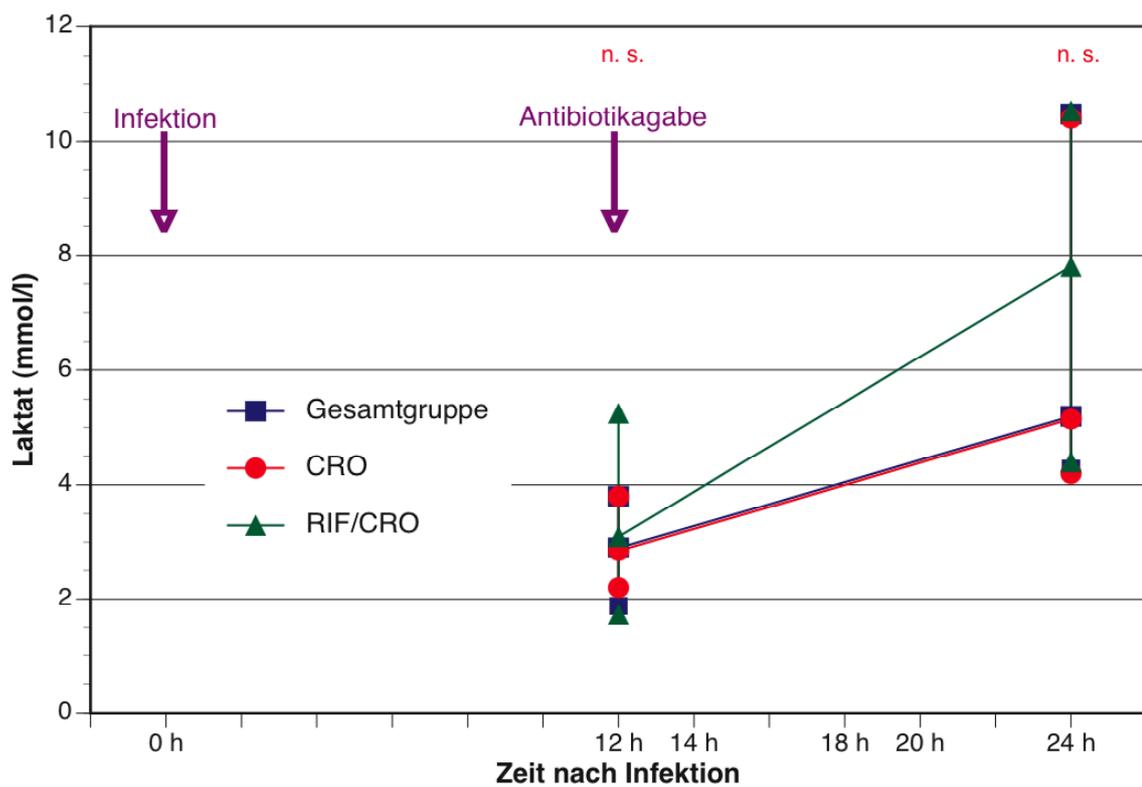


Abbildung 6: Verlauf der Laktatkonzentration. Zur Legende: Dargestellt sind Median, 25er und 75er Perzentil. *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; n.s. nicht signifikant; rot Gruppenunterschied CRO – RIF/CRO

3.3.3 Zellzahl

Die Zellzahl im Liquor stieg in der Gesamtgruppe im Median bis zum Ende der Beobachtung an und war nach Rifampicin-Vorbehandlung ab 14 h niedriger als in der CRO-Gruppe; statistisch signifikant war der Unterschied nach 14 und 18 Stunden (Tabelle 9, Abbildung 7).

Tabelle 9: Zellzahl im Versuchsverlauf

Zellzahl (μl^{-1})	25er Perzentil	Median	75er Perzentil
12h: CRO	149,0	219,0	533,0
RIF/CRO	120,0	299,0	903,5
14h: CRO	484,0	624,0	992,0
RIF/CRO	272,0	576,0	1010,3
18h: CRO	2571,0	3539,0	5717,0
RIF/CRO	773,0	1610,0	1976,3
20h: CRO	3673,0	6064,0	8107,0
RIF/CRO	1360,0	2283,0	4656,3
24h: CRO	3074,8	5611,0	8623,8
RIF/CRO	3037,3	3701,0	7231,8

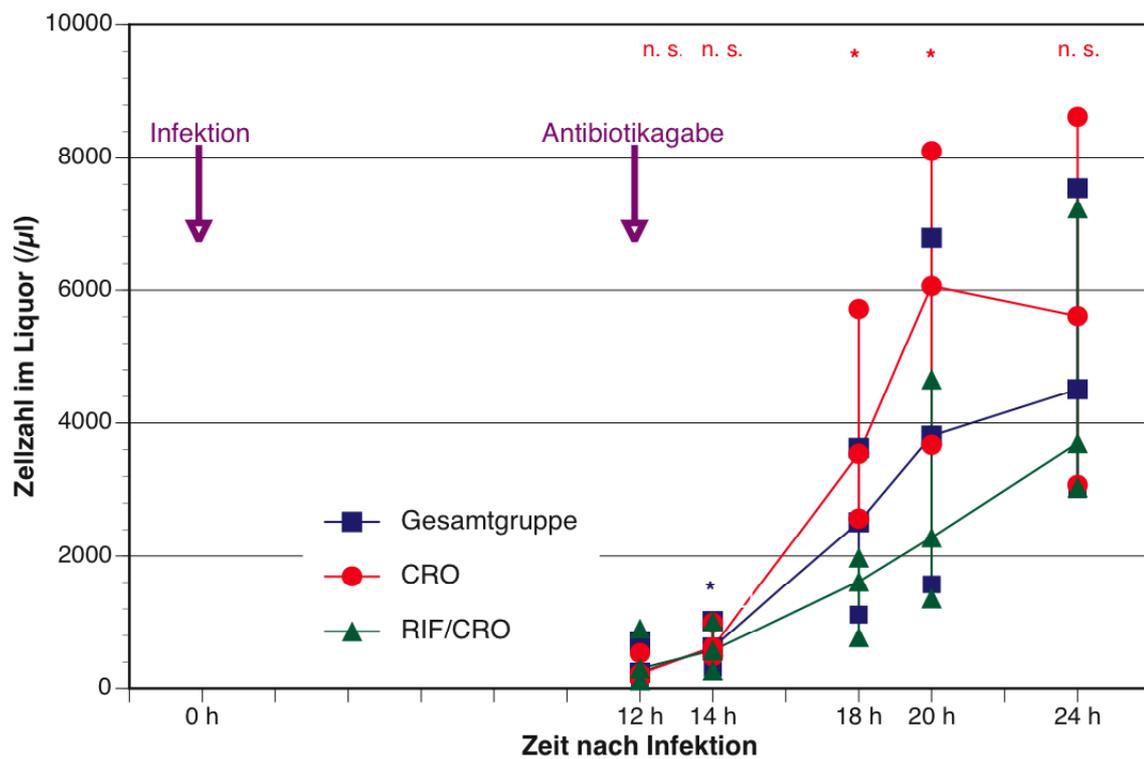


Abbildung 7: Verlauf der Zellzahl. Zur Legende: Dargestellt sind Median, 25er und 75er Perzentil. *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; n.s. nicht signifikant; rot Gruppenunterschied CRO – RIF/CRO

3.3.4 Lipoteichonsäure

Die LTA-Konzentrationen waren 12 und 14 Stunden nach Infektion in der RIF-Gruppe im Median geringer als in der CRO-Gruppe; aufgrund der starken Streuung war dieser Unterschied allerdings statistisch nicht signifikant. Im weiteren Verlauf ließ sich keine eindeutige Tendenz eines Gruppenunterschiedes nachweisen (Tabelle 10).

Tabelle 10: Lipoteichonsäure im Versuchsverlauf

LTA (µg/ml)	25er Perzentil	Median	75er Perzentil
12h: CRO	6,00	37,00	247,00
RIF/CRO	9,75	23,00	154,50
14h: CRO	33,00	113,5	1491,00
RIF/CRO	13,50	76,00	230,25
18h: CRO	5,00	10,00	183,75
RIF/CRO	6,00	41,50	225,00
20h: CRO	4,25	20,00	166,25
RIF/CRO	4,00	15,00	56,00
24h: CRO	3,00	6,50	118,00
RIF/CRO	7,00	19,50	45,50

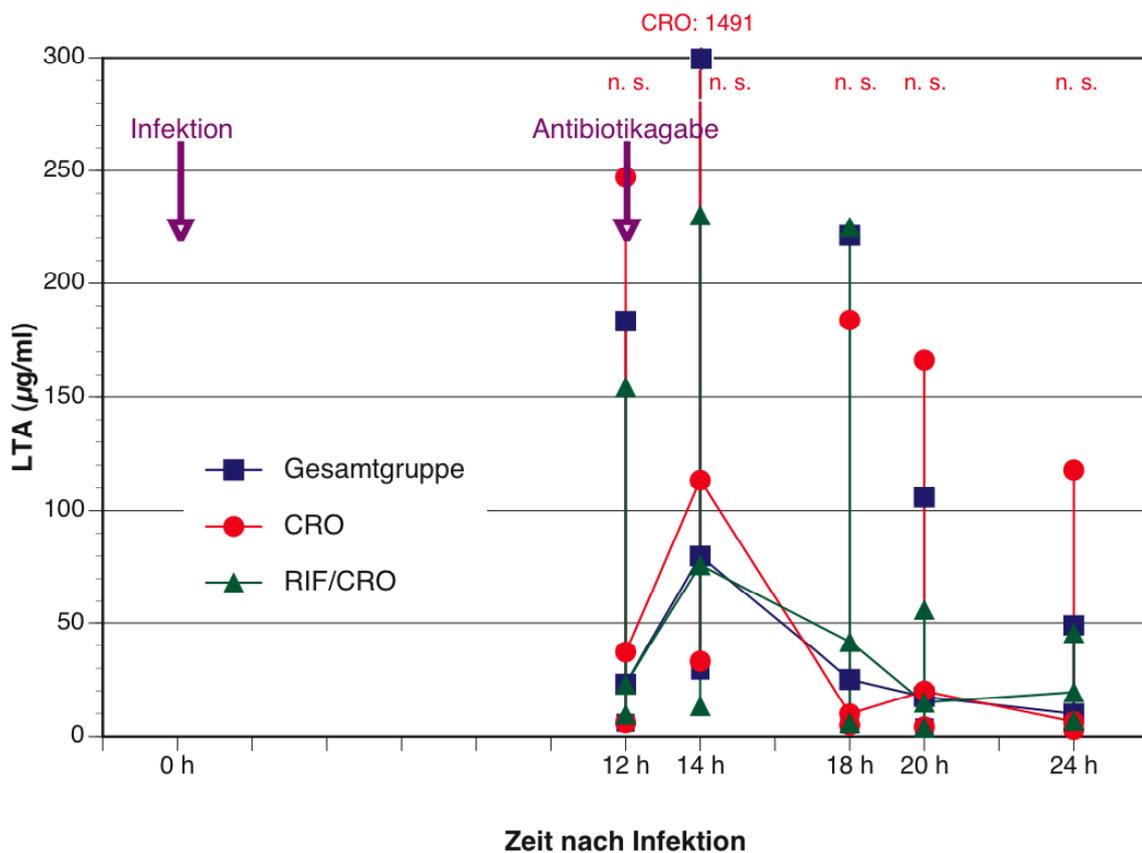


Abbildung 8: Verlauf der LTA-Konzentration. Zur Legende: Dargestellt sind Median, 25er und 75er Perzentil. *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; n.s. nicht signifikant; **rot** Gruppenunterschied CRO – RIF/CRO (in der CRO-Gruppe lag das 75er Perzentil nach 14 Stunden bei 1491 $\mu\text{g/ml}$; zur Verbesserung der Anschaulichkeit der Abbildung wurde dieser Wert in der Graphik nicht dargestellt).

Die Differenz der LTA-Werte zwischen den Messzeitpunkten zeigte statistisch signifikante Gruppenunterschiede: Zwischen der 12. und der 14. Stunde nahm die Konzentration in der CRO-Gruppe im Median um 70 (24; 1239) $\mu\text{g/ml}$ zu, während sich nach Rifampicin-Vorbehandlung kein weiterer Anstieg ergab (Δ LTA 12-14h Median 0 [-108,75; 46,25] $\mu\text{g/ml}$) [Abbildung 9].

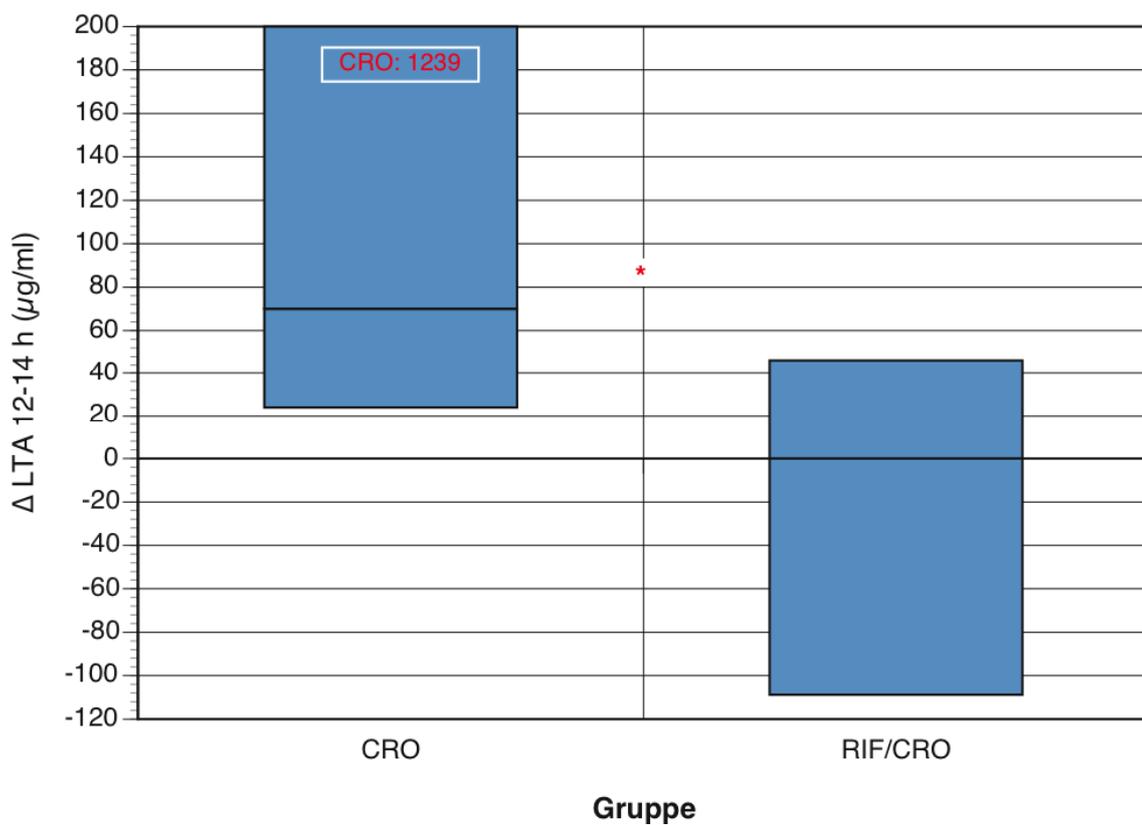


Abbildung 9: Δ LTA 12-14 h im Gruppenvergleich. Zur Legende: Dargestellt sind 25er und 75er Perzentil (Box) sowie Median (horizontale Linie); * $p < 0,05$ im Gruppenvergleich (in der CRO-Gruppe lag das 75er Perzentil bei 1239 $\mu\text{g/ml}$; zur Verbesserung der Anschaulichkeit der Abbildung wurde dieser Wert in der Graphik auf 200 $\mu\text{g/ml}$ reduziert).

Im Verlauf zwischen 18 und 20 Stunden nach Infektion ergab sich kein signifikanter Gruppenunterschied mehr; die in beiden Gruppen in der Tendenz zu beobachtende Abnahme fiel allerdings nach Rifampicin-Vorbehandlung wiederum etwas deutlicher aus (Abbildung 10).

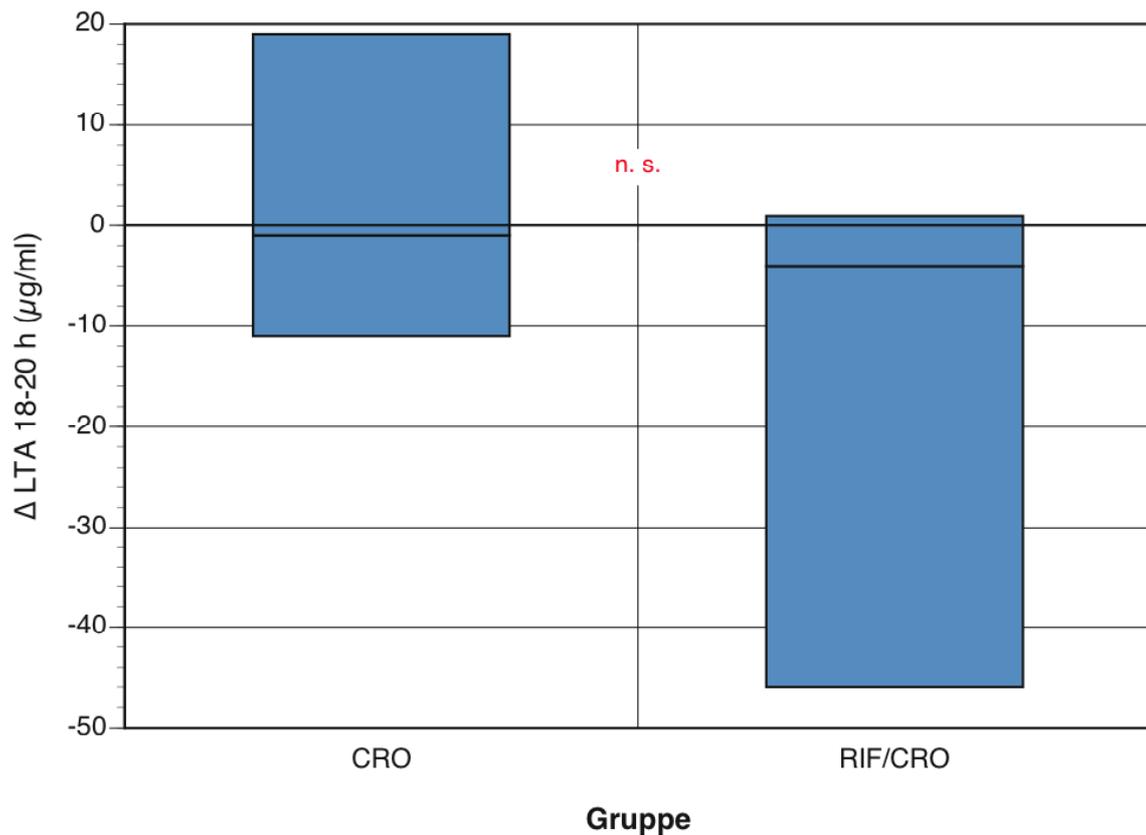


Abbildung 10: Δ LTA 18-20 h im Gruppenvergleich. Zur Legende: Dargestellt sind 25er und 75er Perzentil (Box) sowie Median (horizontale Linie); n. s. nicht signifikant im Gruppenvergleich

3.4 Dichte apoptotischer Neurone

Die Dichte apoptotischer Neurone in der histologischen Untersuchung lag bei den mit Rifampicin vorbehandelten Tieren im Median mit 58,4 (37,2; 99,1)/mm² weniger als halb so hoch wie in der allein mit Ceftriaxon behandelten Gruppe (Median 148,1 [81,7; 152,3]/mm²) [Abbildung 11].

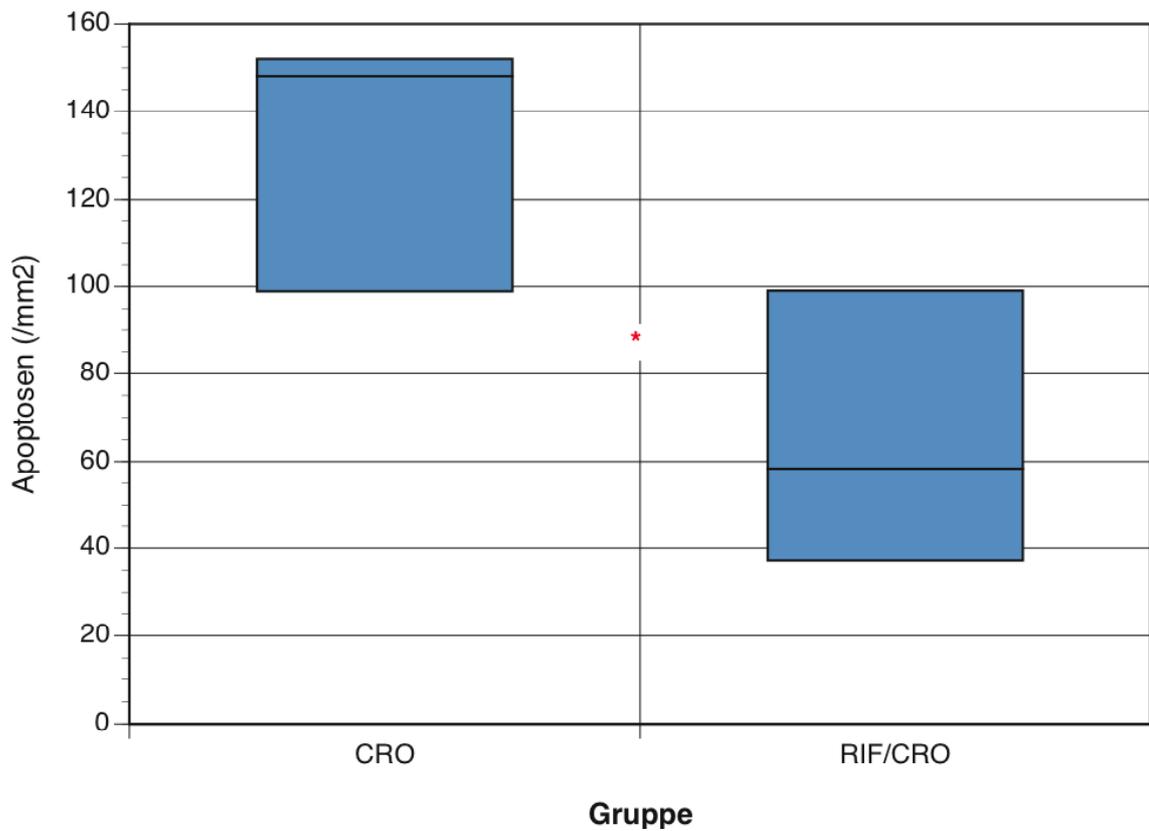


Abbildung 11: Dichte apoptotischer Neurone im histologischen Bild. Zur Legende: Dargestellt sind 25er und 75er Perzentil (Box) sowie Median (horizontale Linie); * $p < 0,05$ im Gruppenvergleich

4 Diskussion

Neuronale Schäden bei Infektionen mit *S. pneumoniae* sind nicht monokausaler Natur; ihnen liegen vielmehr eine ganze Reihe von Ursachen zugrunde, die nicht nur im Zusammenhang mit der Grunderkrankung, sondern auch als Konsequenz der antibiotischen Therapie zu sehen sind: Durch Stoffwechselprodukte der Pneumokokken, die verstärkt bei ihrer bakteriziden Zerstörung freigesetzt werden, wird eine Einwanderung von Leukozyten in das ZNS induziert, ebenso findet eine Stimulation von Mikroglia und ortsständigen Makrophagen statt (TUOMANEN et al. 1985; HEUMANN et al. 1994; HÄUSLER et al. 2002; DJUKIC et al. 2006; BRAUN et al. 2007). Somit beeinflussen diese Stoffwechselprodukte nachteilig das cerebrale Gefäßendothel und Ependym und begünstigen damit die Auslösung einer Vaskulitis und eines Hirnödems, das wiederum Ursache einer Ischämie sein kann. Eine wichtige Rolle als Mediatoren der neuronalen Schädigung spielen reaktive Sauerstoffspezies (PFISTER et al. 1992; LEIB et al. 1996; N'GUESSAN et al. 2005) und exzitatorische Aminosäuren (z. B. Aspartat, Glutamat [LEIB et al. 1996; SPRANGER et al. 1996; BÖTTCHER et al. 2004]); direkte Auslöser des neuronalen Zelltodes sind intrazellulärer Kalziumanstieg, Energieentladung und Caspaseaktivität (NAU und BRÜCK 2002; SCHELD et al. 2002).

Pneumokokken können über verschiedene Mechanismen zytotoxisch wirken:

- Pneumolysin, ein wichtiger Virulenzfaktor von *S. pneumoniae* (WELLMER et al. 2002), wirkt in Konzentrationen, die bei Pneumokokkenmeningitis im ZNS gefunden werden, direkt neurotoxisch (BRAUN et al. 2002; STRINGARIS et al. 2002 a, b). Es schädigt zudem die Blut-Hirn-Schranke und begünstigt die Penetration der Bakterien ins ZNS sowie die Entwicklung eines Hirnödems (ZYSK et al. 2001; NAU und EIFFERT 2002). Zudem schädigt Pneumolysin spezifisch die cochleären Haarzellen und dürfte damit maßgeblich für die Hörstörungen als häufiges Residuum der Pneumokokkenmeningitis verantwortlich sein (BEURG et al. 2005). Das Besondere am Pneumolysin ist, dass es zytosolisch vorkommt und erst durch Autolyse des Bakteriums – typischerweise also als Konsequenz einer erfolgreichen antibiotischen Behandlung – freigesetzt wird.

- Hitzeinaktivierte Pneumokokken bzw. Bestandteile der Pneumokokken-Zellwand wirken in Ko-Kulturen von humanen Neuronen- und Gliazellen zytotoxisch (KIM et al. 1995), was als Hinweis auf einen Wirkmechanismus neben der direkten und der leukozytenvermittelten Neurotoxizität zu werten ist, nämlich den über eine Stimulation der Gliazellen.
- Darüber hinaus sind Pneumokokken in der Lage, die Apoptose von neuronalen Zellen auch Caspase-unabhängig zu induzieren (GRANDGIRARD et al. 2007).

Für die Behandlung der Pneumokokkenmeningitis stehen zwar seit geraumer Zeit wirksame Antibiotika zur Verfügung; dennoch führt sie in einem substantiellen Teil der Fälle zum Tod bzw. hinterlässt bleibende neurologische Ausfallsymptome als Folge des neuronalen Schadens:

Die Letalität liegt – seit mehreren Jahrzehnten und bis in die jüngste Zeit – mit bemerkenswerter Konstanz bei 20-30 % (CHOO et al. 1990; QUAGLIARELLO und SCHELD 1992; DURAND et al. 1993; PFISTER et al. 1993; DAVIS und MCINTYRE 1995; KASTENBAUER und PFISTER 2003; VAN DE BEEK et al. 2004; AL KHORASANI und BANAJEH 2006; PRASAD und KARLUPIA 2007; THEODORIDOU et al. 2007; ARDA et al. 2008).

Bei über 30 % (bis über 50 % in Abhängigkeit von den angelegten Kriterien) der Überlebenden finden sich Hörschäden, neuropsychologische Defizite, Epilepsien und/oder motorische Lähmungen als Spätfolgen des neuronalen Schadens (BOHR et al. 1984; SCHWARTZ 1984; CHOO et al. 1990; QUAGLIARELLO und SCHELD 1992; DAVIS und MCINTYRE 1995; KASTENBAUER und PFISTER 2003; VAN DE BEEK et al. 2004; AL KHORASANI und BANAJEH 2006; ARDA et al. 2008).

Ein großer Teil dieser Komplikationen ist erregerspezifisch, da die Prognose sowohl im Hinblick auf das Überleben als auch auf Spätschäden nach Meningokokken- und *H. influenzae*-Infektion bedeutend günstiger ist als bei der Pneumokokkenmeningitis (z. B. VAN DE BEEK et al. 2004; ARDA et al. 2008).

Eine *restitutio ad integrum* nach Pneumokokkenmeningitis wird damit trotz moderner antibiotischer Therapie nur in etwa der Hälfte der Fälle erreicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde in diesem Zusammenhang untersucht, ob eine vorhe-rige Behandlung mit Rifampicin die Freisetzung proinflammatorischer Bakterienbe-standteile im Liquor reduzieren kann. Dabei zeigten sich im Wesentlichen folgende Ergebnisse:

- Der *antimikrobielle* Effekt der Antibiose trat nach alleiniger Ceftriaxon-Behandlung rascher auf. Die Keimzahl lag 18 und 20 Stunden nach Inokulation in der RIF/CRO-Gruppe signifikant höher.
- Die *Körpertemperatur* war im Median in der RIF/CRO-Gruppe niedriger. Die Tatsache, dass bereits vor Beginn der Behandlung bei 12 h ein statistisch signi-fikanter Unterschied vorlag, sowie ein fehlender statistischer Unterschied zum Zeitpunkt 14 h, 20 h und 24 h sprechen aber gegen einen spezifischen Effekt der Kombinationsbehandlung RIF/CRO auf die Körpertemperatur.
- Die *inflammatorische Reaktion* auf die Infektion fiel nach der Rifampicin-Vorbehandlung deutlich weniger stark aus:
 - Die *Zellzahl im Liquor* war 18 und 20 Stunden nach der Inokulation in der RIF/CRO-Gruppe – trotz der zu diesen Zeitpunkten höheren Keim-zahlen – deutlich und signifikant niedriger als nach alleiniger Ceftria-xongabe; die Betrachtung des Verlaufs zeigt einen geringeren Anstieg der Zellzahl in dieser Gruppe.
 - Die *LTA-Konzentrationen* unterschieden sich zwar zu den einzelnen Messzeitpunkten nicht signifikant (was nicht zuletzt der hohen Streuung der Werte geschuldet ist), wohl aber deren Differenz zwischen den Ein-zelmessungen: Zwischen der 12. und der 14. Stunde nahm die Konzentration in der CRO-Gruppe im Median noch zu, während sich nach Ri-fampicin-Vorbehandlung hier – trotz des nach 12 Stunden bereits niedri-geren Ausgangsniveaus – kein weiterer Anstieg mehr ergab.
- Wahrscheinlich ebenfalls als Ausdruck einer reduzierten inflammatorischen Re-aktion zeigte sich nach Rifampicin-Vorbehandlung die Dichte apoptotischer Neurone nach Sektion der Tiere signifikant reduziert, die in dieser Gruppe im Median weniger als halb so hoch lag wie nach alleiniger Ceftriaxon-Behandlung.

Die Tatsache, dass diesen Ergebnissen eine relativ kleine Stichprobe zugrunde liegt, schränkt diese im Fall der vorliegenden Untersuchung nicht ein, eher im Gegenteil. Die kleine Stichprobe bringt ein höheres Risiko mit sich, einen Zusammenhang zu *übersehen*, das heißt die Nullhypothese anzunehmen (einen Unterschied oder Zusammenhang also zu verwerfen), obwohl sie in der Grundgesamtheit nicht zutrifft. Das „*Erkennen*“ eines Zusammenhanges, der in Wirklichkeit nicht vorhanden ist (d. h. das Verwerfen einer in Wirklichkeit zutreffenden Nullhypothese), ist dagegen in einer kleinen Stichprobe sehr unwahrscheinlich und tritt typischerweise in Stichproben von mehreren hundert Fällen und besonders bei Durchführung von zahlreichen statistischen Tests auf (POSPESCHILL 2006). Werden in einer kleinen Stichprobe – wie in der vorliegenden Untersuchung – deutliche, hochsignifikante und zudem biologisch plausible Zusammenhänge gefunden, so sind diese in größeren Stichproben mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit reproduzierbar.

Durch die Gabe von Rifampicin 6 Stunden vor dem – nach der vorliegenden Untersuchung maßgeblich bakteriziden – Ceftriaxon wird damit in unserem Kaninchenmodell die Erzielung der Keimfreiheit zwar verzögert, die inflammatorische Reaktion und das Ausmaß des neuronalen Schadens jedoch reduziert.

Die Pharmakodynamik von Rifampicin und Ceftriaxon macht diesen Zusammenhang auch durchaus plausibel (ESTLER 1995):

- *Ceftriaxon* blockiert als Vertreter der β -Laktam-Antibiotika die Mureinsynthese in der Zellwand der wachsenden Bakterien durch Hemmung der Transpeptidasen und führt so zur Bildung von Lücken in der Zellwand, die schließlich dem Innendruck des wachsenden Bakteriums nicht mehr standhalten kann; unter dem Einfluss von Autolysin kommt es zur Lysis mit Entleerung des Zellinhalts – einschließlich etwa des zytosolischen Virulenzfaktors Pneumolysin – in die Umgebung.
- *Rifampicin* dagegen bindet sich an die RNA-Polymerase der Bakterienzelle und blockiert damit die Initiation der RNA-Synthese und somit die Proteinsynthese. Ein bakterizider Effekt tritt dadurch nur dann ein, wenn sich das Bakterium im Teilungszyklus befindet; außerhalb desselben werden aber intrazelluläre Synthesevorgänge gehemmt. Da eine rasche Resistenzentwicklung gegen Rifampicin nach dem Einschlittmuster vorkommt, ist es als Monotherapeutikum ungeeignet.

Die Vorbehandlung mit Rifampicin hat also nur einen begrenzten bakteriziden Effekt – dies bestätigt die vorliegende Untersuchung –, reduziert aber die Syntheseaktivität in der Bakterienzelle und damit die Menge an toxisch-inflammatorisch wirkenden Bestandteilen, die bei der Ceftriaxon-induzierten Zytolyse frei werden. Beide Substanzen sind grundsätzlich in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden; für das lipophile Rifampicin gilt dies generell, während Ceftriaxon die intakte Blut-Hirn-Schranke nur schlecht passiert, bei Vorliegen inflammatorischer Veränderungen dagegen gut in Liquor und Hirngewebe eindringen kann (NAU et al. 1995, 1998). Damit ist der hier vorgestellte Ansatz klinisch praktikabel.

Im Gegensatz zu intrathekaler und intravenöser Gabe von Antikörpern, die bakterielle Stoffwechselprodukte neutralisieren (KARTALIJA et al. 1995), verhindern Proteinsyntheseinhibitoren die Freisetzung schädlicher bakterieller Wirkstoffe, wie LTA/TA (STUERTZ et al. 1998, 1999), Peptidoglykane (VAN LANGENFELDE et al. 1998), bakterielle DNA (GERBER et al. 2001 a) und Endotoxine (EVANS und POLLACK 1993; TRAUTMANN et al. 1998).

Es ist wahrscheinlich, dass Proteinsyntheseinhibitoren auch in der Lage sind, die Konzentration toxischer Verbindungen, wie z. B. Pneumolysin, zu reduzieren (KERSTAN et al. 2002). *In vitro* zeigten dies SPREER et al. (2007) für subinhibitorische Konzentrationen von Rifampicin, Clindamycin und Erythromycin an Pneumokokkenkulturen, und in *in vitro*- (GERBER et al. 2003) sowie *in vivo*-Untersuchungen (BÖTTCHER et al. 2004) zeigte Clindamycin einen dem Rifampicin bezüglich der LTA-Freisetzung sowie der Schwere der Entzündung äquivalenten Effekt. Vor dem Hintergrund einer Untersuchung von WELLMER et al. (2002), die dem Pneumolysin den maßgeblichen pathogenetischen Einfluss im Rahmen der neuronalen Schädigung bei der Pneumokokkenmeningitis attestierten, liegt dem in der vorliegenden Studie gefundenen neuroprotektiven Effekt der Rifampicin-Vorbehandlung demnach am wahrscheinlichsten die von SPREER et al. (2007) demonstrierte Hemmung der Pneumolysin-Synthese zugrunde, die sich in ähnlicher Weise auch mit anderen Proteinsynthesehemmern erzielen lassen sollte. Diese Vermutung bestätigten ANDERSON et al. (2007) für die Gruppe der Makrolidantibiotika, die ebenfalls die Proteinsynthese hemmen.

In einer autoptischen Studie an menschlichen Gehirnen konnten NAU et al. (1999 a) darüber hinaus zeigen, dass die Dichte der Apoptosen im Bereich des *Gyrus dentatus*

eine valide Grundlage für die Beurteilung der Häufigkeit neurologischer Spätschäden der bakteriellen Meningitis darstellt.

Das Konzept, die Freisetzung bakterieller Bestandteile zu verhindern und dadurch Granulozyteneinwanderung, Stimulation von Mikroglia und ortsständigen Makrophagen sowie die direkte toxische Einwirkung auf neuronales Gewebe zu reduzieren, erweist sich somit als grundsätzlich vielversprechende therapeutische Strategie.

Die Verzögerung der Sterilisierung des Liquors, die wir in der vorliegenden Untersuchung beobachtet haben, beeinträchtigt die Praktikabilität dieses Ansatzes dabei nicht wesentlich: Da nicht nur die Gegenwart des Keims selbst im Cerebrospinalraum, sondern auch die von ihm ausgelöste inflammatorische Reaktion maßgeblich zur Pathogenese beiträgt, stellt die Kombinationsbehandlung RIF/CRO einen interessanten Ansatzpunkt für die Reduktion der Letalität und Folgemorbidität der Pneumokokkenmeningitis dar: Verglichen mit anderen Therapien und deren Ergebnissen bei experimenteller Meningitis (NAU und BRÜCK 2002) erreichten wir mit der Kombinationstherapie aus einer Vorbehandlung mit Rifampicin und einer konsekutiven Verabreichung von Ceftriaxon die höchste Reduktion proinflammatorischer und toxischer Bakterienbestandteile im Liquor. Dieser Ansatz wird durch bereits publizierte Arbeiten in der Literatur untermauert; er kann zudem mit anderen Therapiemöglichkeiten kombiniert werden, die Leukozyteneinwanderung ins ZNS verhindern, Zwischenprodukte reaktiven Sauerstoffes spalten und Aminosäureantagonisten stimulieren (z. B. KIM 2003; KLEIN et al. 2006, 2007).

Studien haben gezeigt, dass die Behandlung mit Rifampicin im Vergleich zu Ceftriaxon Neuronenschäden und Mortalität herabsetzt (STUERTZ et al. 1998; NAU et al. 1999 b; STUERTZ et al. 1999; BÖTTCHER et al. 2000; LEE et al. 2004; RIBES et al. 2005).

Von NAU et al. (1999 b) wurde demonstriert, dass Mäuse bei Behandlung einer experimentellen Meningitis mit Rifampicin eine deutlich längere Überlebenszeit und – in Übereinstimmung mit STUERTZ et al. (1999) – signifikant niedrigere LTA-Konzentrationen in der CSF aufwiesen als nach Gabe von Ceftriaxon (jeweils als Monotherapie); die Autoren bestätigten damit *in vivo* die Ergebnisse einer *in vitro*-Studie von STUERTZ et al. (1998).

BÖTTCHER et al. (2000) verabreichten in einem Kaninchenmodell der Pneumokokkenmeningitis, das dem der vorliegenden Untersuchung entsprach, je 9 Tieren entweder 5 mg/kg/h Rifampicin oder 10 mg/kg/h Ceftriaxon; die Leukozyten aus der CSF mit Rifampicin behandelte Tiere produzierten dabei signifikant weniger freie Sauerstoffradikale als nach Ceftriaxonbehandlung, und sowohl die MDA-Konzentrationen als auch die Dichte apoptotischer Neurone waren deutlich niedriger.

NAU et al. (1997) zeigten einen ähnlichen Befund für den Gyrasehemmer Trovofloxacin, der allerdings wegen seiner hohen Hepatotoxizität nicht mehr auf dem Markt ist.

Die schnelle Resistenzentstehung der Erreger gegenüber Rifampicin als Monotherapie nach dem Einschlittmuster schließt es allerdings als alleiniges Therapeutikum aus (KLUGMAN und MADHI 1999).

Unsere aktuell durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass die Kombination von Rifampicin und einem β -Laktam-Antibiotikum, das 6 Stunden nach Initialtherapie verabreicht wurde, gute Ergebnisse erzielt (vgl. GERBER et al. 2003). Wir erreichten geringere Konzentrationen von proinflammatorischen toxischen Bakterienbestandteilen im Liquor und einen geringeren Neuronenschaden. Die *in vitro*-Studien ergaben, dass diese Ergebnisse nicht nur mit Rifampicin, sondern auch mit anderen PBS-Inhibitoren, wie Clindamycin, erreicht werden können.

In zahlreichen experimentellen Infektionen führten Substanzen, die die bakterielle Proteinsynthese hemmen, gegenüber β -Laktam-Antibiotika zu einer geringeren Letalität. In einem Maus-Modell der pulmonalen *Yersinia pestis*-Infektion wurde durch schnelle Gabe von Ceftriaxon 24 Stunden nach Infektion eine 100 %ige Überlebensrate erreicht. Bei Initialtherapie mit β -Laktam-Antibiotika 42 Stunden nach Infektion war die spätere Mortalität dagegen höher als 90 %. Umgekehrt überlebten ca. 60 % der Mäuse, die 42 Stunden nach Infektion mit Streptomycin, Netilmycin, Gentamycin, Ciprofloxacin und Ofloxacin behandelt wurden (BYRNE et al. 1998). Im Maus-Modell der *Staphylococcus aureus*-Sepsis und Peritonitis konnte nachgewiesen werden, dass Clindamycin im Vergleich zu Ceftriaxon die Mortalität herabsetzte (AZEH et al. 2002).

Die Reduktion der Freisetzung proinflammatorischer Bakterienbestandteile durch antibakteriell wirkende Medikamente hat aufgrund der nach wie vor hohen Mortalität und der Häufigkeit bleibender Schäden nach Pneumokokkenmeningitis eine erhebliche Be-

deutung; ganz besonders ist dies in Entwicklungsländern der Fall, wo die Dexamethasonbehandlung nicht überall zur Verfügung steht und zudem weniger wirksam ist (MOLYNEUX et al. 2002).

Insgesamt ist die Evidenz für die Gültigkeit des der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Konzepts der Reduktion der inflammatorischen Reaktion auf Pneumokokkenbestandteile – v. a. Pneumolysin – durch Vorbehandlung mit Rifampicin (oder anderen Proteinsynthesehemmern) ausreichend, um klinische Studien zu rechtfertigen. Dieses Konzept ist pharmakodynamisch und pathogenetisch plausibel und durch tierexperimentelle sowie *in vitro*-Untersuchungen hinreichend untermauert.

5 Zusammenfassung

Pneumokokken sind heute wichtigste Erreger der ambulant erworbenen bakteriellen Meningitis; gleichzeitig ist der Verlauf der Pneumokokkenmeningitis trotz moderner, wirksamer Antibiotika und der adjuvanten Dexamethasontherapie häufig schwer, und nur in maximal etwa der Hälfte der Fälle wird eine *restitutio ad integrum* erreicht. Auslöser der neuronalen Schädigung sind dabei (über unterschiedliche Wirkmechanismen) Zellbestandteile der Erreger, die bei der bakteriziden Therapie mit β -Laktamantibiotika freigesetzt werden. Eine Therapiealternative, die zu einer geringeren Freisetzung solcher Bestandteile führt, ist der Proteinsynthesehemmer Rifampicin, der *in vitro* und im Tiermodell zu einer Reduktion der inflammatorischen Reaktion geführt hat, aber wegen rascher Resistenzentwicklung als Monotherapeutikum nicht in Frage kommt. In der vorliegenden Untersuchung wurde vor diesem Hintergrund geprüft, ob auch eine Vorbehandlung mit Rifampicin vor einer Ceftriaxonbehandlung die inflammatorische Reaktion bei der Pneumokokkenmeningitis reduziert.

Die Untersuchung erfolgte an insgesamt 21 weißen Neuseeländer Kaninchen, die intrazisternal mit 10^6 CFU *S. pneumoniae* infiziert wurden. 12 Stunden nach Infektion wurden die Tiere mit Rifampicin und 6 Stunden später zusätzlich mit Ceftriaxon behandelt oder erhielten in der Kontrollgruppe eine Ceftriaxon-Monotherapie.

Die Sterilisierung der CSF erfolgte bei der Ceftriaxon-Monotherapie schneller, die inflammatorische Reaktion war aber dafür deutlich stärker ausgeprägt, was sich in einer deutlich und signifikant niedrigeren Zellzahl (18 und 20 Stunden nach Infektion), einem erheblich reduzierten Anstieg der LTA-Konzentration von der 12. zur 14. Stunde und einer signifikant niedrigeren Dichte apoptotischer Neurone nach Rifampicin-Vorbehandlung zeigte.

Die Initialbehandlung mit Rifampicin, gefolgt von Ceftriaxon, stellt somit eine vielversprechende Option in der Pharmakotherapie der Pneumokokkenmeningitis dar.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

ABTS	Azino-bis(3-Ethylbenzothiazolin-6-Sulfonat)
BCIP	5-Bromid-4-Chlorid-3-Indolyl-Phosphat
CCT	craniale(s) Computertomographie/-gramm
CFU	colony forming units (kolonieformende Einheiten)
CRO	Ceftriaxon
CSF	cerebrospinale Flüssigkeit
DNA.....	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
<i>H. influenzae</i>	<i>Hämophilus influenzae</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
IST	<i>in situ</i> -Tailing
LTA.....	lipoteichonic acid (Lipoteichonsäure)
MBK.....	minimale bakterizide Konzentration
MDA	Malondialdehyd
MHK	minimale Hemmkonzentration
MRT.....	Magnetresonanztomographie/-gramm

NBC.....	4-Nitroblau-Tetrazolin-Chlorid
RIF.....	Rifampicin
RNA.....	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
TA.....	teichonic acid (Teichonsäure)
TBS.....	tris buffered saline (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
TEPC.....	thymic epithelial progenitor cell

6.2 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ERREGERSPEKTRUM BEI DER BAKTERIELLEN MENINGITIS (NETTER 1986 UND REED 1986).....	3
TABELLE 2: ÜBERSICHT ZUR ERREGERHÄUFIGKEIT BEI BAKTERIELLER MENINGITIS (AUSWAHL).....	4
TABELLE 3: KLINISCHE SYMPTOME DER MENINGITIS (NETTER 1986; REED 1986; VAN DE BEEK ET AL. 2004).....	8
TABELLE 4: VORGEHEN BEI VERDACHT AUF BAKTERIELLE MENINGITIS.....	14
TABELLE 5: KÖRPERTEMPERATUR IM VERSUCHSVERLAUF.....	28
TABELLE 6: BAKTERIENTITER IM VERSUCHSVERLAUF.....	30
TABELLE 7: PROTEINKONZENTRATION IM VERSUCHSVERLAUF.....	33
TABELLE 8: LAKTATKONZENTRATION IM VERSUCHSVERLAUF.....	33
TABELLE 9: ZELLZAHL IM VERSUCHSVERLAUF.....	35
TABELLE 10: LIPOTEICHONSÄURE IM VERSUCHSVERLAUF.....	36

6.3 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: ABLAUF DES VERSUCHS.....	17
ABBILDUNG 2: VERLAUF DER KÖRPERTEMPERATUR. ZUR LEGENDE: DARGESTELLT SIND MEDIAN, 25ER UND 75ER PERZENTIL. *** P<0,0001; ** P<0,01; * P<0,05; N.S. NICHT SIGNIFIKANT; ROT GRUPPENUNTERSCHIED CRO – RIF/CRO	29
ABBILDUNG 3: VERLAUF DER BAKTERIENTITER. ZUR LEGENDE: DARGESTELLT SIND MEDIAN, 25ER UND 75ER PERZENTIL. *** P<0,0001; ** P<0,01; * P<0,05; N.S. NICHT SIGNIFIKANT; ROT GRUPPENUNTERSCHIED CRO – RIF/CRO, TEILUNG DER Y-ACHSE HIER LOGARITHMISCH	30
ABBILDUNG 4: BAKTERIENTITER IM VERSUCHSVERLAUF, BEHANDLUNG ALS DISKRETE VARIABLE. ZUR LEGENDE: ** P<0,01; * P<0,05 IM GRUPPENVERGLEICH	31
ABBILDUNG 5: VERLAUF DER PROTEINKONZENTRATION. ZUR LEGENDE: DARGESTELLT SIND MEDIAN, 25ER UND 75ER PERZENTIL. *** P<0,0001; ** P<0,01; * P<0,05; N.S. NICHT SIGNIFIKANT; ROT GRUPPENUNTERSCHIED CRO – RIF/CRO	32
ABBILDUNG 6: VERLAUF DER LAKTATKONZENTRATION. ZUR LEGENDE: DARGESTELLT SIND MEDIAN, 25ER UND 75ER PERZENTIL. *** P<0,0001; ** P<0,01; * P<0,05; N.S. NICHT SIGNIFIKANT; ROT GRUPPENUNTERSCHIED CRO – RIF/CRO	34
ABBILDUNG 7: VERLAUF DER ZELLZAHL. ZUR LEGENDE: DARGESTELLT SIND MEDIAN, 25ER UND 75ER PERZENTIL. *** P<0,0001; ** P<0,01; * P<0,05; N.S. NICHT SIGNIFIKANT; ROT GRUPPENUNTERSCHIED CRO – RIF/CRO.....	35
ABBILDUNG 8: VERLAUF DER LTA-KONZENTRATION. ZUR LEGENDE: DARGESTELLT SIND MEDIAN, 25ER UND 75ER PERZENTIL. *** P<0,0001; ** P<0,01; * P<0,05; N.S. NICHT SIGNIFIKANT; ROT GRUPPENUNTERSCHIED CRO – RIF/CRO (IN DER CRO-GRUPPE LAG DAS 75ER PERZENTIL NACH 14 STUNDEN BEI 1491 µG/ML; ZUR VERBESSERUNG DER ANSCHAULICHKEIT DER ABBILDUNG WURDE DIESER WERT IN DER GRAPHIK NICHT DARGESTELLT).....	37
ABBILDUNG 9: Δ LTA 12-14 H IM GRUPPENVERGLEICH. ZUR LEGENDE: DARGESTELLT SIND 25ER UND 75ER PERZENTIL (BOX) SOWIE MEDIAN (HORIZONTALE LINIE); * P<0,05 IM GRUPPENVERGLEICH (IN DER CRO-GRUPPE LAG DAS 75ER PERZENTIL BEI 1239 µG/ML; ZUR VERBESSERUNG DER ANSCHAULICHKEIT DER ABBILDUNG WURDE DIESER WERT IN DER GRAPHIK AUF 200 µG/ML REDUZIERT).....	38

- ABBILDUNG 10: Δ LTA 18-20 H IM GRUPPENVERGLEICH. ZUR LEGENDE: DARGESTELLT SIND 25ER UND 75ER PERZENTIL (BOX) SOWIE MEDIAN (HORIZONTALER LINIE); N. S. NICHT SIGNIFIKANT IM GRUPPENVERGLEICH 39
- ABBILDUNG 11: DICHTEN APOPTOTISCHER NEURONE IM HISTOLOGISCHEN BILD. ZUR LEGENDE: DARGESTELLT SIND 25ER UND 75ER PERZENTIL (BOX) SOWIE MEDIAN (HORIZONTALER LINIE); * $P < 0,05$ IM GRUPPENVERGLEICH 40

7 Literaturverzeichnis

- Al Khorasani A, Banajeh S (2006): Bacterial profile and clinical outcome of childhood meningitis in rural Yemen: A 2-year hospital-based study. *J Infect* 53, 228-234
- Anderson R, Steel HC, Cockeran R, von Gottberg A, de Gouveia L, Klugman KP, Mitchell TJ, Feldman C (2007): Comparison of the effects of macrolides, amoxicillin, ceftriaxone, doxycycline, tobramycin and fluoroquinolones, on the production of pneumolysin by *Streptococcus pneumoniae* in vitro. *J Antimicrob Chemother* 60, 1155-1158
- Arda B, Sipahi OR, Atalay S, Ulusoy S (2008): Pooled analysis of 2,408 cases of acute adult purulent meningitis from Turkey. *Med Princ Pract* 17, 76-79
- Azeh I, Gerber J, Wellmer A, Wellhausen M, Koenig B, Eiffert H, Nau R (2002): Protein synthesis inhibiting clindamycin improves outcome in a mouse model of *Staphylococcus aureus* sepsis compared with the cell wall active ceftriaxone. *Crit Care Med* 30, 1560-1564
- Beam TR jr (1984): Cephalosporins in adult meningitis. *Bull N Y Acad Med* 60, 380-393
- Beckham JD, Tyler KL (2006): Initial management of acute bacterial meningitis in adults: Summary of IDSA guidelines. *Rev Neurol Dis* 3, 57-60
- Behr T, Fischer W, Peter-Katalinic J, Egge H (1992): The structure of pneumococcal lipoteichoic acid. Improved preparation, chemical and mass spectrometric studies. *Eur J Biochem* 207, 1063-1075
- Beurg M, Hafidi A, Skinner L, Cowan G, Hondarrague Y, Mitchell TJ, Dulon D (2005): The mechanism of pneumolysin-induced cochlear hair cell death in the rat. *J Physiol* 568, 211-227

- Böttcher T, Gerber J, Wellmer A, Smirnov AV, Fakhrjanali F, Mix E, Pilz J, Zettl UK, Nau R (2000): Rifampin reduces production of reactive oxygen species of cerebrospinal fluid phagocytes and hippocampal neuronal apoptosis in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *J Infect Dis* 181, 2095-2098
- Böttcher T, Ren H, Goigny M, Gerber J, Lykkesfeldt J, Kuhnt U, Lotz M, Bunkowski S, Werner C, Schau I (2004): Clindamycin is neuroprotective in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis compared with ceftriaxone. *J Neurochem* 91, 1450-1460
- Bohr V, Paulson OB, Rasmussen N (1984): Pneumococcal meningitis. Late neurologic sequelae and features of prognostic impact. *Arch Neurol* 41, 1045-1049
- Braun JS, Novak R, Herzog KH, Bodner SM, Cleveland JL, Tuomanen EI (1999): Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nat Med* 5, 298-302
- Braun JS, Sublett JE, Freyer D, Mitchell TJ, Cleveland JL, Tuomanen EI, Weber JR (2002): Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest* 109, 19-27
- Braun JS, Hoffmann O, Schickhaus M, Freyer D, Dagand E, Bempohl D, Mitchell TJ, Bechmann I, Weber JR (2007): Pneumolysin causes neuronal cell death through mitochondrial damage. *Infect Immun* 75, 4245-4254
- Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH (1993): Apoptosis and necrosis: Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med* 117, 1208-1214
- Byrne WR, Welkos SL, Pitt ML, Davis KJ, Brueckner RP, Ezzell JW, Nelson GO, Vaccaro JR, Battersby LC, Friedlander AM (1998): Antibiotic treatment of experimental pneumonic plague in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 675-681

- Campagne G, Schuchat A, Djibo S, Ousséni A, Cissé L, Chippaux JP (1999):
Epidemiology of bacterial meningitis in Niamey, Niger, 1981-96. *Bull World Health Organ* 77, 499-508
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2002): Progress toward elimination of *Haemophilus influenzae* type b invasive disease among infants and children – United States, 1998-2000. *MMWR* 51, 234-237
- Choo KE, Ariffin WA, Ahmad T, Lim WL, Gururaj AK (1990): Pyogenic meningitis in hospitalized children in Kelantan, Malaysia. *Ann Trop Paediatr* 10, 89-98
- Cohen JJ (1993): Apoptosis. *Immunol Today* 14, 126-130
- Collignon PJ, Turnidge JD (2000): Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Med J Aust* 173, 58-64
- Cottagnoud P, Acosta F, Cottagnoud M, Neffel K, Täuber MG (2000): Synergy between trovafloxacin and ceftriaxone against penicillin-resistant pneumococci in the rabbit meningitis model and in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 2179-2181
- Craig AS, Erwin PC, Schaffner W, Elliott JA, Moore WL, Ussery XT, Patterson L, Dake AD, Hannah SG, Butler JC (1999): Carriage of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* and impact of chemoprophylaxis during an outbreak of meningitis at a day care center. *Clin Infect Dis* 29, 1257-1264
- Dacey RG, Sande MA (1974): Effect of probenecid on cerebrospinal fluid concentrations of penicillin and cephalosporin derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 6, 437-441
- Davis CWC, McIntyre PB (1995): Invasive pneumococcal infection in children, 1981-1992: A hospital-based study. *J Pediatr Child Health* 31, 317-322

- Delank HW: Neurologie, Enke-Reihe zur AO(Ä), 7. Auflage; Enke Verlag, Stuttgart 1994
- Deng GM, Liu ZQ, Tarkowski A (2001): Intracisternally localized bacterial DNA containing CpG motifs induces meningitis. *J Immunol* 167, 4616-4626
- Djukic M, Mildner A, Schmidt H, Czesnik D, Brück W, Priller J, Nau R, Prinz M (2006): Circulating monocytes engraft in the brain, differentiate into microglia and contribute to the pathology following meningitis in mice. *Brain* 129, 2394-2403
- Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, Miller SI, Southwick FS, Caviness VS, Swartz MN (1993): Acute bacterial meningitis in adults: A review of 493 episodes. *N Engl J Med* 328, 21-28
- Estler CJ: Pharmakologie and Toxikologie, 4. Auflage; Schattauer, Stuttgart 1995
- Evans ME, Pollack M (1993): Effect of antibiotic class and concentration on the release of lipopolysaccharide from *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 167, 1336-1343
- Farag HF, Abdel-Fattah MM, Yousri AM (2005): Epidemiological, clinical and prognostic profile of acute bacterial meningitis among children in Alexandria, Egypt. *Indian J Med Microbiol* 23, 95-101
- Fischer W, Behr T, Hartmann R, Peter-Katalinic J, Egge H (1993): Teichoic acid and lipoteichoic acid of *Streptococcus pneumoniae* possess identical chain structures. A reinvestigation of teichoid acid (C polysaccharide). *Eur J Biochem* 215, 851-857
- Fitch MT, Abrahamian FM, Moran GJ, Talan DA (2008): Emergency department management of meningitis and encephalitis. *Infect Dis Clin North Am* 22, 33-52

- Geiseler P, Nelson KE, Levin S, Reddi KT, Moses VK (1980): Community-acquired purulent meningitis: A review of 1,316 cases during the antibiotic era, 1954-1976. *Rev Infect Dis* 2, 725-745
- Gerber J, Eiffert H, Fleischer H, Wellmer A, Munzel U, Nau R (2001 a): Reduced release of DNA from *Streptococcus pneumoniae* after treatment with rifampin in comparison to spontaneous growth and ceftriaxone treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20, 490-493
- Gerber J, Raivich G, Wellmer A, Noeske C, Kunst T, Werner A, Brück W, Nau R (2001 b): A mouse model of *Streptococcus pneumoniae* meningitis mimicking several features of human disease. *Acta Neuropathol* 101, 499-508
- Gerber J, Pohl K, Sander V, Bunkowski S, Nau R (2003): Rifampin followed by ceftriaxone for experimental meningitis decreases lipoteichoic acid concentrations in cerebrospinal fluid and reduces neuronal damage in comparison to ceftriaxone alone. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 1313-1317
- Grandgirard D, Steiner O, Täuber MG, Leib SL (2007): An infant mouse model of brain damage in pneumococcal meningitis. *Acta Neuropathol* 114, 609-617
- Guggenbichler JP, Allerberger F, Dietze O, Klima G (1989): Die Behandlung der eitrigen Meningitis im Kindesalter. *Padiatr Padol* 24, 3-19
- Haack HP, Weigel B (1972): Eitrige Leptomeningitis und Hirnabszeß im Sektionsgut vor und nach Einführung der antibiotischen Therapie. *Z Inn Med* 27, 42-428
- Häusler KG, Prinz M, Nolte C, Weber JR, Schumann RR, Kettenmann H, Hanisch UK (2002): Interferon-gamma differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages. *Eur J Neurosci* 16, 2113-2122

- Handrick W, Spencker FB, Braun W, Rieske K, Lietz R, Springer W, Waesser S (1988): Pneumokokken-Infektionen im Kindesalter - Meningitis. 2. Mitteilung: Diskussion des Berichts über 58 Erkrankungen und Literaturübersicht. *Pediatr. Grenzgeb* 27, 287-294
- Harvey D, Holt DE, Bedford H (1999): Bacterial meningitis in the newborn: A prospective study of mortality and morbidity. *Semin Perinatol* 23, 218-225
- Heumann D, Barras C, Severin A, Glauser MP, Tomasz A (1994): Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect Immun* 62, 2715-2721
- Huwendiek S, Steiner T, Tönshoff B (2007): "Typische" Symptome fehlen häufig. Erkennen Sie die Warnzeichen der bakteriellen Meningitis? *MMW Fortschr Med* 149, 15-18
- Hviid A, Rubin S, Mühlemann K (2008): Mumps. *Lancet* 371, 932-944
- Jefferson T, Ferroni E, Curtale F, Giorgi Rossi P, Borgia P (2006): Streptococcus pneumoniae in western Europe: Serotype distribution and incidence in children less than 2 years old. *Lancet Infect Dis* 6, 405-410
- Kains JP, Thys JP (1985): Principles of treatment of bacterial meningitis. *Acta Clin Belg* 40, 304-313
- Kaplan SL, Feigin RD (1983): Treatment of meningitis in children. *Ped Clin North Am* 30, 259-269
- Kartalija M, Kim Y, White ML, Nau R, Tureen JH, Täuber MG (1995): Effect of a recombinant N-terminal fragment of bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI₂₃) on cerebrospinal fluid inflammation induced by endotoxin. *J Infect Dis* 171, 948-953

- Kastenbauer S, Pfister HW (2003): Pneumococcal meningitis in adults. Spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases. *Brain* 126, 1015-1025
- Kerstan H, Spreer A, Gerber J, Böttcher T, Eiffert H, Nau R: Verminderte Freisetzung von Pneumolysin aus Pneumokokken *in vitro* und *in vivo* unter Therapie mit Rifampicin und Clindamycin im Vergleich zur Ceftriaxon-Therapie. Abstract presented at the 75. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Mannheim, Germany 2002
- Killian M, Thomsen B (1983): Antigenic heterogeneity of immunoglobulin A1 proteases from encapsulated and non-encapsulated *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 42, 126-132
- Kim KS (2003): Emerging molecular targets in the treatment of bacterial meningitis. *Expert Opin Ther Targets* 7, 141-152
- Kim YS, Täuber MG (1996): Neurotoxicity of glia activated by gram-positive bacterial products depends on nitric oxide production. *Infect Immun* 64, 3148-3153
- Kim YS, Kennedy S, Täuber MG (1995): Toxicity of *Streptococcus pneumoniae* in neurons, astrocytes, and microglia *in vitro*. *J Infect Dis* 171, 1363-1368
- Klein M, Koedel U, Pfister HW (2006): Oxidative stress in pneumococcal meningitis: A future target for adjunctive therapy? *Prog Neurobiol* 80, 269-280
- Klein M, Koedel U, Pfister HW (2007): N-acetyl-L-Cystein bei bakterieller Meningitis. Eine zukünftige adjuvante Therapieoption? *Nervenarzt* 78, 202-205
- Klugman KP, Madhi SA (1999): Emergence of drug resistance. Impact on bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am* 13, 637-646

- Kyaw MH, Christie P, Jones IG, Campbell H (2002): The changing epidemiology of bacterial meningitis and invasive non-meningitic bacterial disease in Scotland during the period 1983-1999. *Scand J Infect Dis* 34, 289-298
- Lee H, Song JH, Kim SW, Oh WS, Jung SI, Kiem S, Peck KR, Lee NY (2004): Evaluation of a triple-drug combination for treatment of experimental multidrug-resistant pneumococcal meningitis. *Int J Antimicrob Agents* 23, 307-310
- Leib SL, Kim YS, Chow LL, Sheldon RA, Täuber MG (1996): Reactive oxygen intermediates contribute to necrotic and apoptotic neuronal injury in an infant rat model of bacterial meningitis due to group B streptococci. *J Clin Invest* 8, 2632-2639
- Lesnakova A, Holeckova K, Kolenova A, Streharova A, Kisac P, Beno P, Kalavsky E, Sramka M, Ondrusova A, Benca J (2007): Bacterial meningitis after sinusitis and otitis media: Ear, nose, throat infections are still the commonest risk factors for the community acquired meningitis. *Neuro Endocrinol Lett* 28, 14-15
- Logan SA, MacMahon E (2008): Viral meningitis. *BMJ* 336, 36-40
- Maconochie I, Baumer H, Stewart ME (2008): Fluid therapy for acute bacterial meningitis. *Cochrane Database Syst Rev* 23, CD004786
- Martin R, Hoover C, Grimme S, Grogan C, Höltke J, Kessler C (1990): A highly sensitive, nonradioactive DNA labeling and detection system. *Biotechniques* 9, 762-768
- Masuhr K: Neurologie, Duale Reihe, 4. Auflage; Hippokrates Verlag, Stuttgart 1998
- Mathers CD, Lopez AD, Murray CJL: The burden of disease and mortality by condition: Data, methods and results for 2001; in: Global burden of disease and risk factors; hrsg. v. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJL; Oxford University Press and the World Bank 2006, 45-270

- McCabe WR (1983): Empiric therapy for bacterial meningitis. *Rev Infect Dis* 5, 74-83
- McCracken GH jr (1983): New concepts in the management of infants and children with meningitis. *Pediatr Infect Dis* 2, 51-55
- Michel U, Zobotke R, Mäder M, Nau R (2001): Regulation of matrix metalloproteinase expression in endothelial cells by heat-inactivated *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 69, 1914-1916
- Molyneux EM, Walsh AL, Forsyth H, Tembo M, Mwenechanya J, Kayira K, Bwanaisa L, Njobvu A, Rogerson S, Malenga G (2002): Dexamethasone treatment in childhood bacterial meningitis in Malawi: A randomised controlled trial. *Lancet* 360, 211-218
- Montagnani F, Fanetti A, Stolzuoli L, Croci L, Arena F, Zanchi A, Cellesi C (2008): Pneumococcal disease in a paediatric population in a hospital of central Italy: A clinical and microbiological case series from 1992 to 2006. *J Infect* 56, 179-184
- Nau R, Brück W (2002): Neuronal injury in bacterial meningitis: Mechanisms and implications for therapy. *Trends Neurosci* 25, 38-45
- Nau R, Eiffert H (2002): Modulation of release of proinflammatory bacterial compounds by antibacterials: Potential impact on course of inflammation and outcome in sepsis and meningitis. *Clin Microbiol Rev* 15, 95-110
- Nau R, Schmidt T, Kaye K, Froula JL, Täuber MG (1995): Quinolone antibodies in therapy of experimental pneumococcal meningitis in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 593-597
- Nau R, Zysk G, Schmidt H, Fischer FR, Stringaris AK, Stuertz K, Brück W (1997): Trovafloxacin delays the antibiotic-induced inflammatory response in experimental pneumococcal meningitis. *J Antimicrob Chemother* 39, 781-788

- Nau R, Sörgel F, Prange HW (1998): Pharmacokinetic optimisation of the treatment of bacterial central nervous system infections. *Clin Pharmacokinet* 35, 223-246
- Nau R, Soto A, Brück W (1999 a): Apoptosis of neurons in the dentate gyrus in humans suffering from bacterial meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 265-274
- Nau R, Wellmer A, Soto A, Koch K, Schneider O, Schmidt H, Gerber J, Michel U, Brück W (1999 b): Rifampin reduces early mortality in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *J Infect Dis* 179, 1557-1560
- Netter FH: The Ciba Collection of Medical Illustrations, Volume 1: Nervous System. Part II: Neurologic and neuromuscular disorders; Ciba Pharmaceutical Company, West Caldwell NJ 1986
- N'Guessan PD, Schmeck B, Ayim A, Hocke AC, Brell B, Hammerschmidt S, Rosseau S, Suttorp N, Hippenstiel S (2005): Streptococcus pneumoniae R6x induced p38 MAPK and JNK-mediated caspase-dependent apoptosis in human endothelial cells. *Thromb Haemos* 94, 295-303
- Peltola H (1999): Prophylaxis of bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am* 13, 685-710
- Peltola H (2000): Worldwide haemophilus influenzae type b disease at the beginning of the 21st century: Global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microbiol Rev* 13, 302-317
- Pfister HW, Koedel U, Lorenzl S, Tomasz A (1992): Antioxidants attenuate microvascular changes in the early phase of experimental pneumococcal meningitis in rats. *Stroke* 23, 1798-1804
- Pfister HW, Feiden W, Einhäupl KM (1993): Spectrum of complications during bacterial meningitis in adults. *Arch Neurol* 505, 575-581

- Pospeshill M: Statistische Methoden; Elsevier, München 2006
- Prasad K, Karlupia N (2007): Prevention of bacterial meningitis: An overview of Cochrane systematic reviews. *Respir Med* 101, 2037-2043
- Prasad K, Kumar A, Gupta PK, Singhal T (2007): Third generation cephalosporins versus conventional antibiotics for treating acute bacterial meningitis. *Cochrane Database Syst Rev* 17, CD001832
- Quagliarello V, Scheld MW (1992): Bacterial meningitis: Pathogenesis, pathophysiology and progress. *N Engl J Med* 327, 864-872
- Reed MD (1986): Current concepts in clinical therapeutics: Bacterial meningitis in infants and children. *Clin Pharm* 5, 798-809
- Ribes S, Taberner F, Domenech A, Cabellos C, Tubau F, Liñares J, Fernández Viladrich P, Gudiol F (2005): Evaluation of ceftriaxone, vancomycin and rifampicin alone and combined in an experimental model of meningitis caused by highly cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* ATCC 51916. *J Antimicrob Chemother* 56, 979-982
- Robert Koch Institut (2000): Infektionen des Zentralnervensystems - 2. Folge. *Epidemiol Bull* 36, 287-291
- Rogner G (1971): Purulente Meningitis im Krankengut der Kinderklinik Dresden-Neustadt der Jahre 1956 bis 1969. *Z Ärztl Fortbild* 65, 194-198
- Sáez-Llorens X, McCracken GH jr (2003): Bacterial meningitis in children. *Lancet* 361, 2139-2148
- Salih MA, Ahmed AA, Sid Ahmed H, Olcen P (1995): An ELISA assay for the rapid diagnosis of acute bacterial meningitis. *Ann Trop Paediatr* 15, 273-278
- Scheld WM (1984): Bacterial meningitis in the patient at risk: Intrinsic risk factors and host defense mechanisms. *Am J Med* 76, 193-207

- Scheld WM, Koedel U, Nathan B, Pfister HW (2002): Pathophysiology of bacterial meningitis: Mechanism(s) of neuronal injury. *J Infect Dis* 186, 225-233
- Schmidt H, Tlustochowska A, Stuertz K, Djukic M, Gerber J, Schutz E, Kuhnt U, Nau R (2001): Organotypic hippocampal cultures. A model of brain tissue damage in *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *J Neuroimmunol* 113, 30-39
- Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, Harrison LH, Farley M, Reingold AL, Lefkowitz L, Perkins BA (1997): Bacterial meningitis in the United States in 1995. *N Engl J Med* 337, 970-976
- Schut ES, de Gans J, van de Beek D (2008): Community-acquired bacterial meningitis in adults. *Pract Neurol* 8, 8-23
- Schwartz MN (1984): Bacterial meningitis: More involved than just the meninges. *N Engl J Med* 311, 912-914
- Schwartz IM, Osborne BA (1993): Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunol Today* 14, 582-590
- Skoczynska A, Kriz P, Konradsen HB, Hryniewicz W (2000): Characteristics of the major etiologic agents of bacterial meningitis isolated in Poland in 1997-1998. *Microb Drug Resist* 6, 147-153
- Sørensen UB, Henriksen J (1987): Cross-reactions between pneumococci and other streptococci due to C polysaccharide and F antigen. *J Clin Microbiol* 25, 1854-1859
- Spranger M, Krempien S, Schwab S, Maiwald M, Bruno K, Hacke W (1996): Excess glutamate in the cerebrospinal fluid in bacterial meningitis. *J Neurol Sci* 143, 126-131

- Spreer A, von Ruden C, Mitchell TJ, Eiffert H, Nau R (2007): Influence of subinhibitory concentrations of protein-synthesis-inhibiting antibiotics on production and release of the pneumococcal virulence factor pneumolysin in vitro. *Chemotherapy* 53, 327-331
- Stephens DS (1985): *Neisseria meningitidis*. *Infect Control* 6, 37-40
- Stephens DS, McGee ZA (1981): Attachment of *Neisseria meningitidis* to human mucosal surfaces: Influence of pili and type of receptor cell. *J Infect Dis* 143, 525-532
- Stringaris AK, Bergmann F, Geisenhainer J, Bähr M, Nau R (2002 a): Neurotoxicity of pneumolysin, a major pneumococcal virulence factor, involves calcium influx and depends on activation of p38 mitogen activated protein kinase. Abstract American Academy of Neurology, 54th Annual Meeting, Denver Colorado. *Neurology* 58, 262-263
- Stringaris AK, Geisenhainer J, Bergmann F, Balshüsemann C, Lee U, Zysk G, Mitchell TJ, Keller BU, Kuhnt U, Gerber J (2002 b): Neurotoxicity of pneumolysin, a major pneumococcal virulence factor, involves calcium influx and depends on activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neurobiol Dis* 11, 355-368
- Stuertz K, Schmidt H, Eiffert H, Schwartz P, Mäder M, Nau R (1998): Differential release of lipoteichoic and teichoic acids from *Streptococcus pneumoniae* as a result of exposure to β -lactam antibiotics, rifamycins, trovafloxacin, and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 277-281
- Stuertz K, Schmidt H, Trostdorf F, Eiffert H, Mäder M, Nau R (1999): Lower lipoteichoic and teichoic acid CSF concentrations during treatment of pneumococcal meningitis with non-bacteriolytic antibiotics than with ceftriaxone. *Scand J Infect Dis* 31, 367-370

- Theodoridou MN, Vasilopoulou VA, Atsali EE, Pangalis AM, Mostrou GJ, Syriopoulou VP, Hadjichristodoulou CS (2007): Meningitis registry of hospitalized cases in children: Epidemiological patterns of acute bacterial meningitis throughout a 32-year period. *BMC Infect Dis* 7, 101-113
- Trautmann M, Zick R, Rukavina T, Cross AS, Marre R (1998): Antibiotic-induced release of endotoxin: In-vitro comparison of meropenem and other antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 41, 163-169
- Tuomanen E, Liu H, Hengstler B, Zak O, Tomasz A (1985): The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J Infect Dis* 151, 859-868
- Tyski S, Grzybowska W (1998): Analysis of bacterial meningitis during 1992-1996 in Poland. *Cent Eur J Public Health* 6, 225-230
- van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, Weisfelt M, Reitsma JB, Vermeulen M (2004): Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Eng J Med* 351, 1849-1859
- van de Beek D, de Gans J, McIntyre P, Prasad K (2007): Corticosteroids for acute bacterial meningitis. *Cochrane Database Syst Rev* 24, CD004405
- van Langenfelde P, van Dissel JT, Ravensbergen E, Appelmelk BJ, Schrijver IA, Groeneveld PH (1998): Antibiotic-induced release of lipoteichoic acid and peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*: Quantitative measurements and biological reactivities. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 3073-3078
- von Mering M, Wellmer A, Michel U, Bunkowski S, Tlustochowska A, Brück W, Kuhnt U, Nau R (2001): Transcriptional regulation of caspases in experimental pneumococcus meningitis. *Brain Pathol* 11, 282-295
- Weise HJ (1982): Die Meningitiden im Infektionsspektrum der Bundesrepublik Deutschland. *Münch Med Wochenschr* 124, 667-668

- Wellmer A, Noeske C, Gerber J, Munzel U, Nau R (2000): Spatial memory and learning deficits after experimental pneumococcal meningitis in mice. *Neurosci Lett* 296, 137-140
- Wellmer A, Zysk G, Gerber J, Kunst T, Von Mering M, Bunkowski S, Eiffert H, Nau R (2002): Decreased virulence of a pneumolysin-deficient strain of *Streptococcus pneumoniae* in murine meningitis. *Infect Immun* 70, 6504-6508
- Wyllie AH: Cell death: A new classification separating apoptosis from necrosis; in: *Cell death in biology and pathology*; hrsg. v. Bowen ID, Lockship RA u. a.; Chapman & Hall, New York 1981, 9-34
- Zwahlen A, Winkelstein JA, Moxon ER (1983): Surface determinants of *Hemophilus influenzae* pathogenicity: Comparative virulence of capsular transformants in normal and complement-depleted rats. *J Infect Dis* 148, 385-394
- Zysk G, Brück W, Gerber J, Brück Y, Prange HW, Nau R (1996): Anti-inflammatory treatment influences neuronal apoptotic cell death in the dentate gyrus in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 722-728
- Zysk G, Schneider-Wald BK, Hwang JH, Bejo L, Kim KS, Mitchell TJ, Hakenbeck R, Heinz HP (2001): Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 69, 845-852

Danksagung

Ich danke Herrn Juniorprofessor Dr. med. Joachim Gerber, Abteilung Neurologie der Georg-August-Universität Göttingen, für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Erstellung meiner Arbeit sowie für die umfassende persönliche Betreuung, Hilfestellung und konstruktive Kritik während der experimentellen Aufgabenstellungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Roland Nau, Chefarzt der Abteilung für Neurologie und Psychiatrie im evangelischen Krankenhaus Göttingen Weende.

Des Weiteren gilt mein Dank den Mitarbeitern des Neurochemischen Labors und allen, die zu dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere Herrn Tammo Kunst für die Hilfestellung während der Korrekturperiode.