

Aus der Abteilung Neuropathologie
(Prof. Dr. med. W. Brück)
im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Quantifizierung der Freisetzung bakterieller DNA in Modellen
experimenteller bakterieller Meningitis

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Anna-Katharina Höcht
aus
München

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. med. M. P. Schön

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. R. Nau

II. Berichterstatter/ in: Prof. Dr. med. F. Hufert

III. Berichterstatter/ in:

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Oktober 2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1. Einleitung	5
1.1 Epidemiologie und geschichtlicher Hintergrund der bakteriellen Meningitis	5
1.2 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	7
1.3 Pneumokokken – Meningitis	8
1.4 Pathogenese der bakteriellen Meningitis	10
1.4.1 Infektion und Ausbreitung	10
1.4.2 Bakteriämie und Überleben der Bakterien im Blut	11
1.4.3 Entzündungs- und Immunreaktion im Subarachnoidalraum	12
1.4.3.1 Toll-like-Rezeptoren (TLRs)	13
1.4.3.2 Bakterielle DNA - proinflammatorisch und neurotoxisch	15
1.5 Therapiemöglichkeiten der bakteriellen Meningitis	16
1.5.1 Antibiotika	18
1.6 Fragestellung	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Bakterienstämme	20
2.1.2 Klinisches Untersuchungsmaterial – Kaninchenliquores	20
2.1.3 Antibiotika	21
2.1.4 Verwendete Reagenzien	22
2.1.5 Geräte	23
2.2 Methoden	24
2.2.1 Anzucht von Bakterienstämmen	24
2.2.1.1 Anzucht von <i>Streptococcus pneumoniae</i> und <i>Escherichia coli</i>	24
2.2.1.2 Bestimmung der bakteriellen Keimzahl	25
2.2.1.3 Erstellung einer bakteriellen Wachstumskurve	26
2.2.2 Aufbereitung der DNA	26
2.2.2.1 Zellaufschluss	27
2.2.2.2 Präparation der DNA	28
2.2.3 Polymerasekettenreaktion	29
2.2.3.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion	29
2.2.3.2 Real-time-quantitative PCR	31

2.2.3.3 Erarbeitung des PCR-Protokolls	31
2.2.3.4 Erstellung einer Breitspektrum-PCR	32
2.2.4 Erarbeitung des internen Standards	33
2.2.4.1 Herstellung einer Standard-Reihe	33
2.2.5 Messung von DNA im Spektralphotometer	34
2.2.5.1 Quantitative Berechnung der DNA	35
2.2.6 Kontaminationsvermeidung	35
3. Ergebnisse	37
3.1 Vorversuche und Etablierung der PCR	37
3.1.1 Wachstumsverhalten von <i>S. pneumoniae</i> und <i>E. coli</i>	37
3.1.2 Quantifizierung der Standardreihe	40
3.1.3 Liquor-Stabilitätsversuch	40
3.1.4 Keimzahlbestimmung durch Ausplattung und PCR	43
3.1.5 Überprüfung der Standardreihe und der Pipettiergenauigkeit.....	45
3.1.6 Interpretation der LightCycler-Ergebnisse	46
3.1.6.1 Crossing-Point.....	46
3.1.6.2 Schmelzkurve – TM-Werte.....	47
3.2 Anwendung der PCR an in-vitro-Kulturen	47
3.2.1 Bakteriolyse-bedingte Freisetzung bakterieller DNA in vitro	47
3.2.2 Keimwachstum und Keimzahlbestimmung in humanem Liquor.....	49
3.3 Evaluation der PCR in vivo – Kaninchen.....	53
3.3.1 Quantifizierung bakterieller DNA in Kaninchenliquor vor Antibiotika- Therapie	53
3.3.2 Quantifizierung bakterieller DNA in Kaninchenliquor nach Antibiose.....	54
4. Diskussion	57
4.1 Probleme bei der Behandlung bakterieller Meningitiden	57
4.2 Etablierung einer Breitspektrum-PCR	59
4.2.1 Sensitivität der Polymerasekettenreaktion.....	60
4.2.2 Kontaminationsproblematik bei Anwendung einer PCR	61
4.2.3 Bedeutung der Polymerasekettenreaktion in der Routine-Diagnostik.....	63
4.3 Therapie der bakteriellen Meningitis	65
5. Zusammenfassung	69
6. Abkürzungen.....	71
7. Literaturverzeichnis.....	73

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie und geschichtlicher Hintergrund der bakteriellen Meningitis

Schon Hippokrates von Kos (um 460-370 v.Chr.), der als berühmtester Arzt der Antike gilt, beschreibt im ersten Kapitel des 3. Buches von „De morbis“ die Erkrankung der bakteriellen Meningitis mit folgenden Worten: *„Wenn das Hirn unter dem Druck der Entzündung an Volumen zunimmt, gibt es Kopfschmerzen. Sie sind in dem Teil stärker, wo die Entzündung wütet. Der Schmerz wird auch in den Schläfen empfunden. Der Kranke bekommt Ohrensausen, und das Gehör wird stumpf. Die Blutgefäße sind gespannt und sie klopfen. Fieber und Schauer tun sich kund, doch der Schmerz nimmt nicht ab, er lässt nur nach, wenn das Fieber sich ausbreitet. Diese Krankheit ist verhängnisvoll. Man kann nicht beurteilen, an welchem Tage der Tod eintritt.“* Im zweiten Kapitel des Buches heißt es dann weiter: *„Wenn sich Wasser im Hirn bildet, entstehen heftige Schmerzen in den Schläfen und andern Teilen des Kopfes. Von Zeit zu Zeit gibt es Schauer und Fieber. Die Gegend der Augen ist schmerzhaft, die Sicht verdunkelt, die Pupille deformiert. Es ergibt sich daraus Doppelsichtigkeit. Erhebt sich der Kranke, so bekommt er Schwindelgefühle. Er erträgt weder Wind noch Licht. Er bekommt Ohrensausen, erbricht Speichel, Schleim und manchmal das Essen.“* (Schreiber und Mathys 1987, S.113).

Auch heute noch stellt die bakterielle Meningitis eine der gefährlichsten Infektionskrankheiten des zentralen Nervensystems (ZNS) dar. Trotz möglicher Intensivmedizin und antibiotischer Therapie verläuft diese Erkrankung oft letal. Von den Patienten, die an einer Pneumokokkenmeningitis erkrankt sind, sterben etwa 25% und von den Patienten, die eine solche Meningitis überleben, können nur weniger als 50% ihre bisherige Lebensweise unbeeinträchtigt wiederaufnehmen (Kastenbauer und Pfister 2003); 20-40% leiden unter zahlreichen Spätfolgen und neurologischen Residuen wie Hör- und Sehstörungen, wie z. B. einer homonymen Hemianopsie, Hemiparesen, epileptischen Anfällen, seltener Ataxie und Hirnnervenparesen (Pomeroy et al. 1990, Schuchardt 1991, Durand et al. 1993).

Akut eitrige, ambulant erworbene Meningitiden können durch verschiedene bakterielle Erreger wie *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, gramnegative Enterobakterien, *Listeria monocytogenes* und *Escherichia coli* hervorgerufen werden.

Die häufigsten Erreger einer bakteriellen Meningitis im Erwachsenenalter sind *Streptococcus pneumoniae* und *Neisseria meningitidis*, gefolgt von *Listerien* (<5% der Fälle), anderen *Streptokokken* (je nach Literaturangabe 1-9% der Fälle), gramnegativen Enterobakterien inklusive *Pseudomonas aeruginosa* (<10% der Fälle) und *Haemophilus influenzae* (1-3% der Fälle) (DGN 2009).

Dabei gilt beispielsweise für *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes* und *Neisseria meningitidis* eine bundesweite namentliche Meldepflicht nach §7 des Infektionsschutzgesetzes, sofern die Bakterien direkt im Blut oder Liquor cerebrospinalis bzw. in hämorrhagischen Hautinfiltraten (*Neisseria meningitidis*), Abstrichen von Neugeborenen (*Listeria monocytogenes*) oder normalerweise sterilen Substraten nachgewiesen werden.

Durch Einführung der Impfprophylaxe gegen *Haemophilus influenzae* im Kindesalter konnte die Inzidenz der häufigsten Meningitiden des Kindesalters gesenkt werden und so überwiegen derzeit im Kindesalter Pneumokokken und Meningokokken, während in der Neugeborenenperiode Gruppe-B-Streptokokken (*Streptococcus agalactiae*) am häufigsten vertreten sind (Pfister 2002).

Mit 20-40% wird die höchste Letalität bei Pneumokokken- und Listerienmeningitiden gefunden; 3-10% der Patienten, die an einer Meningokokkenmeningitis erkrankt sind, versterben (Durand et al. 1993, Hussein u. Shafran 2000, Pfister 2002, RKI 2009).

Die geschätzte jährliche Inzidenz einer ambulant erworbenen Meningitis in Europa beträgt derzeit zwischen drei und sechs Patienten pro 100.000 Einwohner pro Jahr (van de Beek et al. 2010); in weniger entwickelten Ländern wird sogar von zehnmal soviel Fällen ausgegangen (van de Beek et al. 2004 b, van de Beek et al. 2006, Saez-Llorens und McCracken 2003, Scarborough und Thwaites 2008). Derzeit werden in Deutschland etwa 2,5 Fälle/ 100.000 Einwohner/ Jahr verzeichnet, wobei 80 % der Fälle bei Säuglingen und Kleinkindern zwischen dem 1. und 4. Lebensjahr auftreten (Gleixner et al. 2007/08).

Das Robert Koch Institut erfasste 2006 insgesamt 555 Fälle invasiver Erkrankungen durch Meningokokken in Deutschland. Im Vergleich zu den im Vorjahr übermittelten Fällen war ein Rückgang von 11,5% zu verzeichnen. Somit lag die Inzidenz der

invasiven Meningokokken-Erkrankungen in Deutschland bei 0,67 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner und damit unter der Inzidenz der vorangegangenen Jahre (RKI 2004, RKI 2006).

Die Inzidenz einer Pneumokokkenmeningitis kann dagegen nur geschätzt werden, da diese nicht meldepflichtig ist. Es werden allerdings höhere Fallzahlen angenommen; das Robert-Koch-Institut geht davon aus, dass in Deutschland allein bei Kindern etwa 220-330 der jährlichen Meningitis-Fälle und ferner ca. 1300 andere invasive Erkrankungen wie Septikämien oder Bakteriämien durch Pneumokokken hervorgerufen werden, wobei hierbei die höchste Letalitätsrate bei den unter 2- und den über 65-jährigen Personen liegt (RKI 2001).

1.2 *Streptococcus pneumoniae*

Bei Streptokokken handelt es sich um grampositive Kokken, die kettenförmig hintereinander gelagert sind, wobei *Pneumokokken (Streptococcus pneumoniae)* als lanzettförmige Diplokokken erscheinen. Es handelt sich um fakultativ anaerobe Bakterien. *Streptococcus pneumoniae* kann neben einer Pneumonie, einer Otitis, einer Sinusitis oder einer Mastoiditis unter anderem auch eine Meningitis hervorrufen.

Alle klinisch relevanten Stämme der Pneumokokken tragen als einen der wesentlichen Virulenzfaktoren eine Polysaccharidkapsel; anhand dieser Kapsel können mehr als 90 Serotypen unterschieden werden. Durch diese Kapsel erhalten die Bakterien zum einen ihre Virulenz und zum anderen werden sie, getarnt durch die Kapsel, selbst vor Phagozytose geschützt und können sich auf diese Weise vermehren.

Eine Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* erfolgt üblicherweise über eine Tröpfcheninfektion. Dabei siedelt sich der Erreger am häufigsten im oberen Respirationstrakt an. Von dort gelangt er transepithelial ins Blut, durch Aspiration in den Alveolarraum oder per continuitatem oder hämatogen zu den Meningen.

1.3 Pneumokokken – Meningitis

Infiziert sich ein Patient mit Pneumokokken, so kommt es zu einer Reihe von Entzündungsreaktionen, die durch das Immunsystem, angeregt durch die in den Liquor eingedrungenen Erreger, hervorgerufen werden. Dabei kommt es zu einer Entzündung der Hirnhäute Pia mater und Arachnoidea mater.

Klinisch kann eine Pneumokokken-Meningitis mit einem Prodromalstadium beginnen, das sich mit grippeähnlichen Symptomen wie Kopf- und Gliederschmerzen, Abgeschlagenheit, Müdigkeit und subfebrilen Temperaturen äußert. Im weiteren Verlauf kommt es zu Übelkeit und Erbrechen, Photophobie und dem typischsten Zeichen einer Meningitis, dem Meningismus. Getrübtes Bewusstsein bis hin zum Koma und zusätzliche neurologische Symptome wie fokale oder generalisierte Anfälle oder Paresen des III., IV. und VII. Hirnnerven können bei schweren Verläufen ebenfalls auftreten.

Die Diagnose wird primär über eine Anamnese und eine neurologische Untersuchung gestellt, in der die bereits erwähnte Nackensteifigkeit und zusätzlich auch ein positives Lasègue-Zeichen auftreten können.

Bei klinisch begründetem Verdacht wird die Diagnose zusätzlich über eine Liquorpunktion gesichert. Liegt eine bakterielle Meningitis vor, so zeigt sich typischerweise ein trüber Liquor, was sich durch eine Pleozytose (> 300 Zellen/ μl , vorwiegend Granulozyten) und eine erhöhte Proteinkonzentration oftmals auf Werte über 1000mg/l erklären lässt. Außerdem liegt meist ein erhöhter Laktat Spiegel von über $3,5\text{ mmol/l}$ und eine verminderte Glucosekonzentration von weniger als 30mg/dl im Liquor vor (Koch 2000).

Um eine schnelle und effiziente Therapie zu ermöglichen, sollte der Erkrankte bereits bei Verdacht auf Vorliegen einer bakteriellen Meningitis sofort in eine Klinik eingewiesen werden, um eine kalkulierte antibiotische Therapie beginnen zu können. In der Behandlung der Meningitis gilt es, möglichst frühzeitig eine antibiotische Therapie einzuleiten, wodurch die Wahrscheinlichkeit für einen günstigen klinischen Verlauf deutlich gesteigert werden kann (Lepur und Barsić 2007). Die Prognose der Erkrankung hängt dabei maßgeblich vom Zeitpunkt des Therapiebeginns ab (Leib und Täuber 1999);

Üblicherweise erfolgt die Therapie mit Cephalosporinen und Penicillinen (Nau et al. 1993, Zysk et al. 1994), um die Bakterien im Liquor rasch abzutöten und eine schnelle Sterilisierung des Liquors zu erreichen.

Zu Beginn der Therapie kommt es häufig zu einer Verschlechterung der klinischen Symptome. Erklärt wird dies durch einen Bakteriolyse-induzierten Entzündungsanstieg: Durch die Antibiotikagabe kommt es zur raschen Lyse der Bakterien mit konsekutiver Freigabe proinflammatorischer Zellwandkomponenten, bakterieller DNA und zytoplasmatischen Pneumolysins (Nau und Eiffert 2005). Hierdurch kommt es nach Beginn der Antibiotikatherapie zu einem massiven Aufflammen der Entzündung (Böttcher 2009, Mustafa et al. 1989, Böttcher et al. 2000), gefolgt von der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, einem Anstieg meningealer Entzündung und einem Hirnödem (Mustafa et al 1989, Burroughs et al. 1993). Die Symptome dieser verstärkten Entzündungsreaktion bilden sich, sofern sie überlebt werden, üblicherweise innerhalb weniger Tage zurück.

Häufig kommt es bei einer bakteriellen Meningitis zu verschiedenen Komplikationen, die die Prognose erheblich verschlechtern können. Zu diesen Komplikationen gehören unter anderem Hydrocephalus communicans oder occlusus bei gestörtem Liquorabfluss durch Arachnopathie mit Verklebung der Hirnhäute und Stenose des Aquaeductus cerebri, daraus resultierend ein Abfall des zerebralen Perfusionsdruckes oder eine Hirndrucksteigerung mit der Gefahr der Einklemmung des Hirnstammes, Hirnödem, Hirnabszess, eitrige Sinusvenenthrombose, Beteiligung des Hirnparenchyms im Sinne einer Meningoenzephalitis mit neurologischen Herdsymptomen, epileptischen Anfällen und Bewusstseinsstörungen.

Diese Komplikationen wie auch die Meningitis selbst können wiederum zu zahlreichen Spätfolgen führen wie zum Beispiel zu zerebralen Herdsymptomen (z.B. Hemi- und Tetraparesen, Aphasien oder Hemianopsien), Hirnnervenläsionen (z.B. Schädigung des III., VI., VII., VIII. Hirnnerven) (Bohr et al. 1984), Hörstörungen, Schwindel, Lern- und Gedächtnisstörungen.

1.4 Pathogenese der bakteriellen Meningitis

1.4.1 Infektion und Ausbreitung

Physiologischerweise wird das zentrale Nervensystem durch die Schädelknochen, die Hirnhäute Dura mater, Arachnoidea und Pia mater sowie die Blut-Hirn-Schranke bzw. Blut-Liquor-Schranke mit ihren Tight-Junctions vor dem Eindringen infektiöser Erreger geschützt.

Zu einer Infektion mit einer Pneumokokken-Meningitis kommt es am häufigsten durch eine bakterielle Kolonisation des Nasenrachenraumes (Tunkel und Scheld 1993, Mook-Kanamori et al. 2011).

Pneumokokken besitzen eine Reihe von Virulenzfaktoren wie eine Polysaccharidkapsel, spezielle Oberflächenproteine und Adhäsine (Feldman und Anderson 2011), die einer verbesserten Anheftung der Bakterien an die Mukosa dienen (Korneliise et al. 1995).

Der epithelialen Adhäsion an die Schleimhaut folgt ein Einstrom in die Blutbahn mit anschließender Aktivierung des körpereigenen Komplementsystems (Mook-Kanamori et al. 2011). Cundell et al. (1995) beschreiben ferner bei Pneumokokken einen Mechanismus zur Adhäsion von Pneumokokken an den Rezeptor des körpereigenen Platelet-activating factor. An den Rezeptor des Plättchen-aktivierenden Faktors im Blut gebunden können die Bakterien das zerebrale Endothel vermutlich durch Transzytose überqueren (Ring et al. 1998).

Überschreiten die Bakterien die Blut-Hirn- bzw. Blut-Liquor-Schranke, so kann eine bakterielle Meningitis ausgelöst werden. Dies ist auf folgenden Wegen möglich:

- hämatogen: durch Infektion der oberen oder unteren Luftwege wie beispielsweise bei einem Nasen-Rachen-Infekt sowie bei Infektionen aus dem HNO- Bereich gelangen die Bakterien in die Blutbahn und von dort über die Blut-Hirn-Schranke in den Subarachnoidalraum.

- per continuitatem: entzündliche Prozesse z.B. aus dem Bereich von Ohr, Orbita oder Nasennebenhöhlen werden direkt fortgeleitet und gelangen unter Umgehung der Blut-Hirn-Schranke an die Meningen und in den Subarachnoidalraum.
- direkte Infektion von außen: in seltenen Fällen dringen Bakterien z.B. nach einer Schädel-Hirn-Verletzung mit konsekutiver Duraverletzung direkt ein; begünstigt wird dies z.B. über eine Liquorfistel oder einen operativ angelegten Shunt.

1.4.2 Bakteriämie und Überleben der Bakterien im Blut

Haben die Bakterien mit Hilfe oben genannter Mechanismen den Weg in die Blutbahn gefunden, so sind sie körpereigenen Abwehrmechanismen ausgesetzt, denen es sich zu entziehen gilt (Mook-Kanamori et al. 2011).

Einen solchen Abwehrmechanismus stellt das Komplementsystem dar, das durch eingedrungene Bakterien oder Antigen-Antikörper-Komplexe aktiviert wird. Im Anschluss daran kommt es normalerweise zur Phagozytose der Pathogene durch Granulozyten.

Pneumokokken umgeben sich jedoch, wie bereits erwähnt, mit einer Polysaccharidkapsel. Diese Kapsel stellt einen der wichtigsten Faktoren dar, um der körpereigenen Abwehr zu entkommen. Die eingekapselten Bakterien entgehen z.B. dem Komplementsystem und umgehen dadurch eine Phagozytose durch neutrophile Granulozyten (Tunkel und Scheld 1993); im Anschluss können sich die Bakterien ungehindert vermehren und es kommt zu einer Bakteriämie.

1.4.3 Entzündungs- und Immunreaktion im Subarachnoidalraum

Physiologischerweise sind lokale Abwehrmechanismen im Liquor cerebrospinalis nur geringfügig vertreten.

Nach Besiedlung des Liquor cerebrospinalis mit Bakterien kommt es daher rasch zur Vermehrung und spontanen Lyse der Bakterien. Durch Autolyse und Sekretion kommt es zur Freisetzung proinflammatorischer und toxischer Substanzen (Roos 1997; Stuertz et al. 1998; Stuertz et al. 1999). Hierdurch stimulieren die Bakterien direkt Makrophagen und Mikrogliazellen und bewirken sowohl einen Einstrom an Leukozyten als auch eine Entzündung der Gefäße, eine sogenannte Vaskulitis (Nau und Brück 2002, Mook-Kanamori et al. 2011). Ferner wird durch die Freigabe inflammatorischer Komponenten die Permeabilität der Blut-Hirn- sowie der Blut-Liquor-Schranke weiter gesteigert; hierdurch können weitere Erreger leicht eindringen und sich ungehindert vermehren (Mook-Kanamori et al. 2011, s. auch Abb.1). Durch die freigesetzten Substanzen, wie zum Beispiel Endotoxine, zytoplasmatisches Hämolysin, Peptidoglykane, verschiedene Zellwandkomponenten und insbesondere freigesetzte bakterielle DNA werden das angeborene und erworbene Immunsystem stimuliert (Nau und Brück 2002, Nau und Eiffert 2005).

Während das angeborene Immunsystem verschiedene Abwehrmechanismen wie mukoziliäre Clearance, Komplementsystem, Neutrophile und Makrophagen umfasst, handelt es sich beim erworbenen Immunsystem hingegen um die klonale Expansion Pathogen-spezifischer T- und B-Zellen.

Anders als das erworbene Immunsystem, das eine ganz spezifische B- und T-Zell-Aktivierung gegen ein bestimmtes Pathogen beinhaltet und ein immunologisches Gedächtnis hat, ist das angeborene Immunsystem - als nicht-spezifische Abwehrfähig, die verschiedensten ihm unbekanntem Pathogene schnell zu erkennen und als solche zu bekämpfen (Paterson und Mitchell 2006).

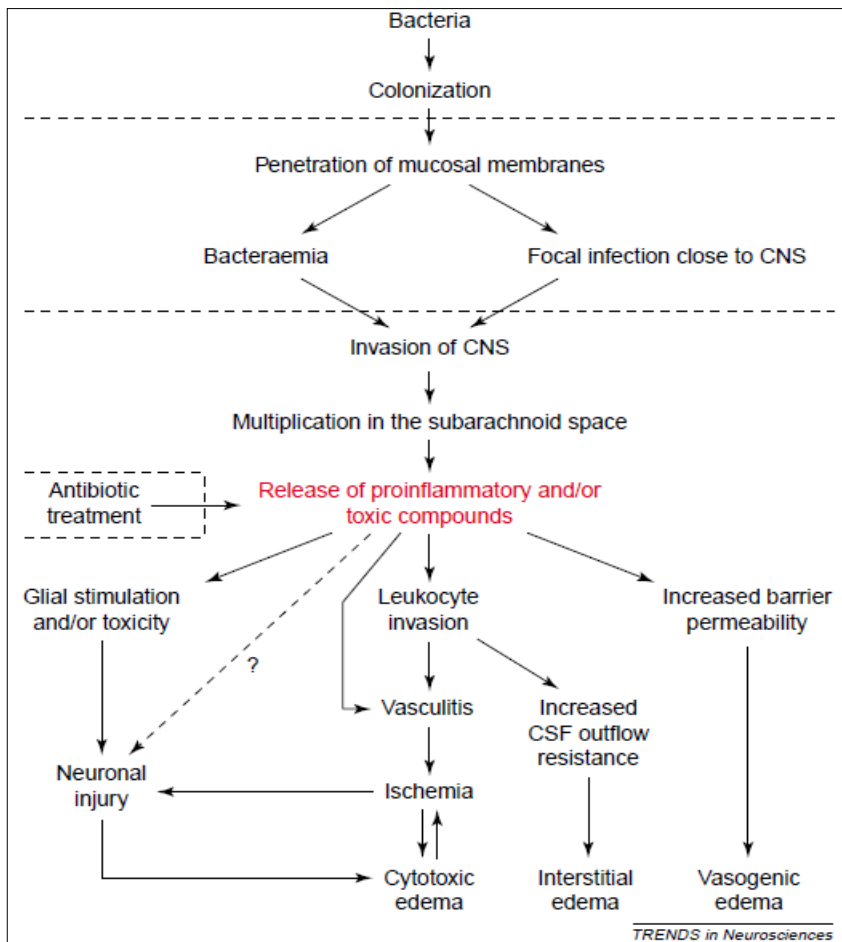


Abbildung 1: Cascade of pathophysiological events in bacterial meningitis. After colonization, bacteria enter the CNS by different strategies. During bacteraemia, invasion of the CNS probably occurs via the choroid plexus, the dural venous sinuses or after phagocytosis by monocytes migrating along normal pathways. From infectious foci in the nasal, sphenoidal or ethmoidal sinuses, middle ear or mastoid, bacteria might enter the cerebrospinal fluid (CSF) by continuous spread through the cribriform plate, fissures after skull fractures or along venous anastomoses crossing the basal skull. After multiplication in the subarachnoid space and release of proinflammatory and/or toxic compounds, bacteria stimulate directly resident macrophages and glial cells and cause leukocyte invasion, increased blood–CSF and blood–brain barrier permeability, and vasculitis. Although leukocyte density might be $\geq 10\,000\ \mu\text{l}^{-1}$, the CSF remains a compartment with an insufficient host defense.

Nau und Brück (2002), S. 39

1.4.3.1 Toll-like-Rezeptoren (TLRs)

Eine Schlüsselrolle im angeborenen Immunsystem spielen bestimmte Rezeptoren, die sogenannten *pathogen recognition receptors* (PRRs), zu denen z.B. die TLRs gehören; die Rezeptoren befinden sich auf der Oberfläche der Wirtszelle oder

intrazellulär und dienen dazu, fremde pathogene Erreger, die sich durch die PAMPs, die *pathogen-associated molecular patterns*, verraten (Paterson und Mitchell 2006), zu erkennen und auf sie zu reagieren (Janeway Jr. und Medzhitov 2002). Zu diesen PAMPs zählen z.B. oben erwähnte bakterielle Lipopolysaccharide und Peptidoglykane.

Die Hauptaufgabe der TLRs besteht darin, fremde Erreger zu entdecken, eine Entzündungsreaktion hervorzurufen und die Pathogene zu eliminieren. Mindestens zehn verschiedene TLRs sind bisher bekannt. Viele von ihnen scheinen bei Pneumokokkeninfektionen involviert zu sein (Paterson und Mitchell 2006), wobei sie durch unterschiedliche Fremdproteine angeregt werden.

TLR2 beispielsweise liegt entweder als Homo- oder Heterodimer mit TLR1 oder TLR6 vor und interagiert mit Lipoteichonsäure, Peptidoglykanen sowie anderen bakteriellen Komponenten (Underhill 2003).

TLR4 hingegen wird durch freigesetztes Endotoxin aktiviert, erkennt Pneumolysin und induziert Immunantworten, die nicht von TLR2 aktiviert werden (Underhill und Ozinsky 2001, Akira 2003, Barton und Medzhitov 2002).

Zu erwähnen gilt es auch noch TLR9, der durch bakterielle DNA stimuliert wird und dadurch wiederum das angeborene Immunsystem aktiviert (Iliev et al. 2004).

Eine Schlüsselrolle in der Signalkaskade spielt dabei unter anderem der Myeloid-differentiation-factor D88 (MyD88) (Paterson und Mitchell 2006); dieser führt zu einer Stimulierung der TLRs oder Freisetzung von IL-1 (Yamamoto et al. 2004), wodurch wiederum Makrophagen und zirkulierende Leukozyten aktiviert werden (Wagner 2004).

Dadurch bedingt kommt es wahrscheinlich zur vermehrten Freisetzung von Cytokinen und Matrix-Metalloproteinasen, wodurch eine erhöhte Permeabilität der Kapillaren erreicht wird (Nau und Eiffert 2005). Dies kann schließlich im Falle einer Meningitis zu einem Hirnödem oder einer Vaskulitis oder beispielsweise im Falle einer Sepsis zu einem septischen Schock mit Multiorganversagen führen (Kengatharan et al. 1998).

In Tiermodellen früherer Studien konnte gezeigt werden, dass genetisch bedingte Defekte der TLRs mit einer erhöhten Anfälligkeit für Pneumokokken-bedingte Erkrankungen einhergehen (Currie et al. 2004, Picard et al. 2003). In verschiedenen Studien an Mäusen, denen TLR4 fehlte oder ein Gendefekt an TLR4 vorlag, konnte gezeigt werden, dass diese Tiere anfälliger für Gram-negative Bakterien waren;

anders hingegen bei Mäusen, die einen Gendefekt in TLR2 aufwiesen und eine geringere Abwehr gegen Gram-positive Bakterien zeigten (Underhill und Ozinsky 2001, Akira 2003, Barton und Medzhitov 2002).

1.4.3.2 Bakterielle DNA - proinflammatorisch und neurotoxisch

Bedingt durch spontane Lyse und Autolyse der Bakterien kommt es, wie bereits oben beschrieben, u.a. zur Freisetzung bakterieller DNA.

Bakterielle DNA induziert sowohl über die Stimulierung von TLR9 eine anhaltende Entzündungsreaktion (Iliev et al. 2004) mit Freisetzung proinflammatorischer Cytokine und weiterer Entzündungsmediatoren (Mustafa et al. 1989, Burroughs et al. 1993) als auch die Proliferation von B-Zellen (Krieg et al. 1995). Durch die Entzündungsreaktion wiederum werden zum einen verstärkt TLRs im zentralen Nervensystem sezerniert, zum anderen kann neuronaler Schaden hervorgerufen werden (Iliev et al. 2004).

Freigesetzte bakterielle DNA enthält typischerweise etwa zwanzigmal mehr unmethyliertes Cytosin-phosphatidyl-Guanin (CpG) als menschliche DNA, in der eher methyliertes CpG vorkommt (Nau und Eiffert 2005).

Sobald bakterielle DNA methyliert wird, geht die Mitogenität verloren, womit gezeigt werden kann, dass gerade das Fehlen der Methylierung der Grund ist, weshalb bakterielle DNA das Immunsystem stimuliert (Krieg et al. 1995).

Diese Eigenheit bakterieller DNA macht sich das menschliche Immunsystem zunutze, indem es unmethyliertes CpG erkennt und das angeborene Immunsystem anregt (Nau und Eiffert 2005).

Die Neurotoxizität nicht methylierter DNA wird dabei zum einen über die Stimulation von TLR-9 vermittelt und zum anderen durch die Induktion von Mikroglia durch TNF- α und NO hervorgerufen (Iliev et al. 2004).

Bakterielle DNA, die durch Autolyse oder Antibiotika-induzierte Lyse freigesetzt wird, trägt damit zur proinflammatorischen Aktivität der lysierten Bakterien bei (Nau und Eiffert 2005) und kann einen septischen Schock hervorrufen (Sparwasser et al. 1997).

Ein besonders schneller Anstieg der Freisetzung proinflammatorischer und toxischer Substanzen ist nach Gabe von β -Lactam-Antibiotika oder Vancomycin zu beobachten (Nau und Eiffert 2002). Die Gabe von β -Laktamen führt dabei zu einer schnellen Lyse der Bakterien und die freigesetzten proinflammatorisch wirkenden Zellwandbestandteile bewirken ein massives Aufblähen der meningealen Entzündung (Böttcher 2009, Arditi et al. 1989), verbunden mit einer Verschlechterung der klinischen Symptome (Spreer et al. 2009).

1.5 Therapiemöglichkeiten der bakteriellen Meningitis

Eine bakterielle Meningitis stellt nach wie vor eine lebensbedrohliche Erkrankung dar, die einen fulminanten Verlauf nehmen kann. Daher sollte bei Erwachsenen mit Verdacht auf bakterielle Meningitis, sofern sie keine Bewusstseinsstörung und kein fokalneurologisches Defizit aufweisen, unmittelbar nach klinischer Untersuchung eine lumbale Liquorpunktion angeschlossen werden. Des Weiteren wird sofort eine Blutkultur abgenommen und danach mit der antibiotischen Behandlung begonnen. Bis zum Erhalt eines Antibiotogramms wird mit einer kalkuliert gewählten Antibiose behandelt.

Bei unbekanntem Erreger wird empirisch unter Berücksichtigung des Alters des Patienten, der prädisponierenden Faktoren und der damit wahrscheinlichsten Bakterien behandelt (DGN 2008). Sofern als Erreger von den in Deutschland gängigen Keimen wie *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* oder *Listeria monocytogenes* ausgegangen werden kann, wird empirisch üblicherweise mit einem β -Laktam-Antibiotikum wie einem Cephalosporin, beispielsweise Ceftriaxon oder Cefotaxim als Mittel der ersten Wahl therapiert, da die Erreger in Deutschland fast immer gegen diese Antibiotika empfindlich sind. Ferner erfolgt eine Ergänzung der Medikation mit Ampicillin.

Bei Resistenzen sieht die Therapie Cephalosporine und das Glykopeptid Vancomycin oder das Chemotherapeutikum Rifampicin vor (DGN 2008).

Nach Erhalt der Bakterienkultur und Antibiogramm erfolgt die Umstellung auf eine gezielte antibiotische Therapie.

Die Behandlungsdauer beträgt je nach Erreger zwischen zehn Tagen (*Haemophilus influenzae*) und drei Wochen (*Listerien* und gramnegative *Enterobakterien*). Bei einer Pneumokokken-induzierten Meningitis beträgt die Behandlungsdauer üblicherweise 14 Tage (DGN 2008).

β -Lactame gehören ebenso wie die Glykopeptide zu den die Zellwandsynthese hemmenden Antibiotika und führen durch Hemmung der Zellwandsynthese zur bakteriellen Lyse. Durch diese Bakteriolyse werden plötzlich Zellwandkomponenten, bakterielle DNA und Haemolysine (bei Pneumokokken das Pneumolysin) freigesetzt (Nau und Eiffert 2005). Diese bakteriellen Produkte stellen einen starken Stimulator für das Immunsystem dar. Dabei kommt es zu einer heftigen Entzündungsreaktion und letztlich zu einem Bakteriolyse-induzierten Entzündungsanstieg (Böttcher et al. 2000, Mustafa et al. 1989). Diese Entzündungsreaktion, die kurz nach der ersten Antibiotikagabe auftritt, kann zu einer plötzlichen Verschlimmerung der klinischen Symptome führen mit Kopfschmerzen, Tachykardien, Hyperventilation, Schüttelfrost und Hypotonie. Primär beschrieben bei der Therapie der Syphilis und dort bekannt als Jarisch-Herxheimer-Reaktion (JHR) (Herxheimer und Krause 1902) wird ebenfalls bei einer Sepsis oder Meningitis nach Beginn der Antibiotikatherapie häufig eine anfängliche Verschlechterung der klinischen Symptome beobachtet (Spreer et al. 2009). Des Weiteren vermutet man durch die Freisetzung der bakteriellen Komponenten Gewebe- und Neuronenschädigungen. In bisherigen Tierversuchen konnte zudem festgestellt werden, dass eine verminderte Freisetzung dieser Komponenten zu einer Mortalitätsabnahme, einer verminderten neuronalen Schädigung und einem insgesamt verbesserten klinischen Outcome führen (Nau und Eiffert 2005).

Bei einer gleichzeitigen Behandlung mit Dexamethason wurde bisher eine anti-inflammatorische Wirkung angenommen, wodurch das Outcome der Patienten mit einer Pneumokokken-Meningitis und systemischen Komplikationen verbessert werden kann (de Gans und van de Beek 2002).

Ebenso konnte bei Patienten, die unterstützend mit Corticosteroiden behandelt wurden, eine Verringerung der Mortalitätsrate und neurologischer Folgeerscheinungen gezeigt werden (van de Beek et al. 2004 a).

Neuere Studien zeigen jedoch für den Nutzen einer Behandlung mit Dexamethason widersprüchliche Ergebnisse (Peltola et al. 2007, Nguyen et al. 2007, Scarborough et al. 2007); von der Gabe von Cortikosteroiden scheinen nur manche Patienten zu profitieren. Unklar bleibt, bei welchen Patienten und unter welchen Bedingungen von einem Nutzen einer zusätzlichen Behandlung mit Dexamethason ausgegangen werden kann (van de Beek et al. 2010).

1.5.1 Antibiotika

Ceftriaxon zählt zur Klasse der Cephalosporine, die, wie bereits erwähnt, ihrerseits wiederum zur Gruppe der β -Lactam-Antibiotika gerechnet werden.

Rifampicin dagegen gehört zur Gruppe der Rifamycine (Ansamycine). Durch seine hohe Lipophilie ist es gut liquorgängig und ist ebenso wie die Cephalosporine sekundär bakterizid, wirkt also nur auf proliferierende, nicht auf ruhende Bakterien.

Die Wirkung der Rifamycine beruht darauf, dass sie an die DNA-abhängige RNA-Polymerase binden und so die RNA-Synthese blockiert wird. Dadurch bedingt kommt es nicht sofort zu einer Lyse der Bakterien mit konsekutiver Freisetzung von Zellwandbestandteilen.

Eine antibiotische Therapie kann jedoch einen schnellen Anstieg von Endotoxin im bakteriellen Überstand einer Bakterienkultur bewirken (Dofferhoff et al. 1991)

Generell gesehen kommt es bei hohen Konzentrationen der Antibiotika zu einer niedrigeren Freisetzung bakterieller proinflammatorischer oder toxischer Komponenten als bei Konzentrationen nahe der minimalen Hemmkonzentration (Dofferhoff et al. 1991, Jackson und Kropp 1992, Prins et al. 1995).

Während es bei Zellwand-aktiven Antibiotika wie den β -Lactamen sogar zu einer verstärkten Freisetzung toxischer und proinflammatorischer bakterieller Substanzen kommen kann, wird bei Antibiotika, die wie Rifampicin die RNA-Synthese hemmen, eine verspätete Bakteriolyse beobachtet oder diese unter Umständen sogar verhindert (Nau und Eiffert 2005).

1.6 Fragestellung

Nach wie vor ist die bakterielle Meningitis eine ernste Erkrankung, die oft letal endet und daher einer schnellen und effizienten antibiotischen Therapie bedarf.

Durch antibiotische Behandlung freigesetzte proinflammatorisch wirkende bakterielle Bestandteile führen jedoch zu einem starken Entzündungsanstieg, meist verbunden mit deutlicher klinischer Verschlechterung des Patienten.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen, ob eine sequentielle antibiotische Therapie mit dem Proteinsynthese-hemmenden Antibiotikum Rifampicin und nachfolgender Gabe von Ceftriaxon eine verminderte Bakteriolyse und Freisetzung bakterieller Komponenten und konsekutiv eine verminderte Entzündungsreaktion im Liquor cerebrospinalis bedeutet.

Um die bakterielle DNA im Liquor cerebrospinalis quantifizieren zu können, wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit eine real-time-PCR-Methode etabliert. Bei dieser Methode wurde die DNA amplifiziert, die für bakterielle 16S-RNA codiert. 16S-RNA ist spezifisch für Prokaryonten und ihre Amplifikation zeigt einen bakteriellen Ursprung in der jeweiligen Probe an.

Der zweite Teil der Arbeit wurde anhand von Liquorproben aus einem Kaninchenmodell, das von Frau PD Dr. A. Spreer und Herrn V. Stoltefaut zur Pneumokokkenmeningitis etabliert wurde, erarbeitet. Bei dem Kaninchenmodell wurden an Meningitis erkrankte Tiere mit unterschiedlichen Antibiotika sowie nach verschiedenen zeitlichen Therapieschemata behandelt. Anschließend wurden die entnommenen Liquorproben mit Hilfe der zuvor etablierten PCR auf das Vorkommen bakterieller DNA untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Für meine Untersuchungen kamen folgende Bakterienstämme zur Anwendung:

Der verwendete Penicillin-empfindliche *Streptococcus-pneumoniae*-Typ-3-Stamm wurde von einem Patienten, der an Pneumokokken-Meningitis erkrankt war, isoliert (freundliches Geschenk von Prof. M. Täuber, Universität Bern, Schweiz).

Der verwendete, das Kapselantigen K1 tragende Stamm von *Escherichia coli* (*E. coli* K1) wurde aus einem Fall einer Neugeborenenmeningitis isoliert (freundliches Geschenk von Dr. G. Zysk, Mikrobiologie Düsseldorf, Deutschland).

Jeweils ein klinisches Isolat eines Listerien- und Neisserien-Stammes wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Eiffert, Institut für Medizinische Mikrobiologie (Universität Göttingen, Deutschland, Direktor Prof. Dr. U. Groß) zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Klinisches Untersuchungsmaterial – Kaninchenliquores

Alle Tierversuche wurden von der Bezirksregierung Braunschweig, Niedersachsen, genehmigt, dem Tierschutzbeauftragten der Universität Göttingen vorgelegt und von diesem befürwortet. Die Genehmigung durch den Regierungspräsidenten von Braunschweig vom 07.04.2006 liegt vor (Aktenzeichen 33.42502-028/06). Die Kaninchenliquores wurden zur Verfügung gestellt von Frau PD Dr. A. Spreer und Herrn V. Stoltefaut.

Zur Behandlungsoptimierung in der Therapie der bakteriellen Meningitis wurde unter der Leitung von Herrn Prof. R. Nau (Abteilung Pathologie, Göttingen, Deutschland, Direktor Prof. W. Brück) von Frau PD Dr. A. Spreer und Herrn V. Stoltefaut in einem Tiermodell untersucht, ob der Nutzen einer Vorbehandlung mit dem Chemotherapeutikum Rifampicin und die daraus resultierenden Vorteile für das zentrale Nervensystem gezeigt werden konnten.

Die Labortiere (weiße Neuseeland-Kaninchen) wurden vor Beginn der Versuche zufällig der Versuchs- oder einer Kontrollgruppe zugeordnet. Für die Versuche wurden die Kaninchen nach intramuskulärer Ketamin- und Xylazin-Injektion mit 300µl Kochsalzlösung, die \log_{10} 5,0 (4,8 – 6,0) CFU *S. pneumoniae* enthielt, subokzipital punktiert und intrazisternal infiziert. Die Anästhesie wurde für die gesamte Dauer des Experiments (24 Stunden) aufrechterhalten und die Tiere anschließend getötet.

Zwölf Stunden nach Infektion wurde die Versuchsgruppe einmalig mit Rifampicin als Kurzinfusion und eine Stunde später mit Ceftriaxon behandelt.

Zu den Zeitpunkten 12-, 14-, 18-, und 24-Stunden wurde den Kaninchen Liquor entnommen, um daraus unter anderem die Leukozytenzahl, die Freisetzung von Prostaglandin, des Pneumokokken spezifischen Pneumolysins sowie die Bakterienanzahl zu bestimmen. Die gewonnenen Liquorproben wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit auf die freigesetzte Menge bakterieller DNA in Abhängigkeit der angewandten Therapie untersucht.

2.1.3 Antibiotika

Zur Behandlung der Kaninchen wurden Ceftriaxon (Rocephin®) und Rifampicin (Rifa®) verwendet; Ceftriaxon (Rocephin®) wurde freundlicherweise als Geschenk von Hoffmann-LaRoche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland) zur Verfügung gestellt und Rifampicin (Rifa®) käuflich von Grünenthal (Stolberg, Deutschland) erworben.

2.1.4 Verwendete Reagenzien

QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Proteinase K	Qiagen, Hilden
FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I Kit	ROCHE, Mannheim
Puffer AL	QIAamp DNA Mini Kit
Puffer AW1	QIAamp DNA Mini Kit
Puffer AW2	QIAamp DNA Mini Kit
Agarose – peq Gold Universal	peqLab, Erlangen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
EDTA	Serva, Heidelberg
Ethanol für die Molekularbiologie	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Tris	Paesel und Lorei
Wasser, DNase- und RNase- frei	Sigma, Taufkirchen
DNA Ladder	Quiagen, Hilden
Loading Dy (Ladepuffer)	Quiagen, Hilden

Als Oligonucleotid- Primer zur Amplifikation wurden, in Anlehnung an Greisen et al. 1994, verwendet:

*Positionen sind angegeben für E. coli J01859 (5`-3`)

Oligo	Sequenz	Position *	TM	Richtung
DG74	agg gag gtg atc caa ccg ca	1531-1539	58,87 °C	rev
RW01	aac tgg agg aag gtg ggg at	1170-1189	59,38 °C	forw

In jedem Lauf wurden Proben von 20ng – 2pg bakterieller Streptokokken-DNA als interner Standard amplifiziert. Die Standard-Reihe wurde freundlicherweise von

Herrn Dr. R. Lugert zur Verfügung gestellt (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Göttingen, Direktor Prof. U. Groß).

Zur Überprüfung und Kontrolle wurde eine neue eigene Standard-Reihe wie unter 2.2.4.1, S.33 beschrieben hergestellt.

2.1.5 Geräte

Verbrauchsmaterialien, wie Reaktionsgefäße und Spitzen wurden von der Firma Sarstedt bezogen.

Pipetten	Reference, Eppendorf, Hamburg
Thermomixer	Compact, Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	5417 C, Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	LightCycler 1.5 Roche, Mannheim
LightCycler	Software Version 3.5 von Roche, Mannheim
Gelapparatur	Horizon 58 BRL
Photometer	DU-70 Spectrophotometer von Beckmann, München
Spannungsgerät	Electrophoresis Constant Power Supply ECPS 3000/150

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht von Bakterienstämmen

2.2.1.1 Anzucht von *Streptococcus pneumoniae* und *Escherichia coli*

Für die Anzucht von *S. pneumoniae* und *E. coli* wurden Aliquots hergestellt. Hierfür wurden sechs Blutagarplatten mit *S. pneumoniae* bzw. *E. coli* beimpft und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Um einen Gesamtdurchschnitt der auf den verschiedenen Platten gewachsenen Bakterienkulturen bestimmen zu können wurde folgendermaßen verfahren: nach Beendigung der Inkubationszeit wurde auf eine der Platten NaCl gegeben, die gewachsenen Bakterienkolonien mit einem Schaber abgeschwemmt und anschließend auf eine zweite Platte pipettiert. Mit der zweiten Platte wurde der Vorgang wiederholt und die gesamten Bakterienkolonien auf eine dritte Platte überführt. Nach erneutem Abschwemmen wurden die gesammelten Bakterienkolonien der ersten drei Platten in ein Eppendorfgefäß abpipettiert.

Die Platten vier bis sechs wurden nach gleichem Schema behandelt und die Bakterien anschließend in dasselbe Eppendorfgefäß überführt. Nach kurzem Mischen des Inhaltes des Eppendorfgefäßes durch einen Vortexer wurde sämtlicher Inhalt in Proben zu jeweils 50µl aufgeteilt. Die Proben wurden anschließend bei – 80°C eingefroren aufbewahrt.

Um anschließend die Keimzahl in den Aliquots quantifizieren zu können, wurde ein Aliquot aufgetaut und wie unter 2.2.1.2, s. unten, beschrieben eine Verdünnungsreihe mit anschließender Ausplattung auf Blutagarplatten und Inkubation zur Keimzahlbestimmung hergestellt.

2.2.1.2 Bestimmung der bakteriellen Keimzahl

Zur Quantifizierung der bakteriellen Keimzahl wurde aus der jeweiligen Probe eine Verdünnungsreihe hergestellt; die einzelnen Verdünnungsstufen wurden anschließend auf einer Agarplatte aufgetragen. Hierfür wurde die Agarplatte zuvor in acht Felder, die mit 10^3 bis 10^{10} beschriftet wurden, sowie einem zentral liegenden Feld, das mit 10^2 beschriftet wurde, aufgeteilt.

Für die Herstellung der Verdünnungsreihe wurde folgendermaßen verfahren: Aus einer Probe wurden $10\mu\text{l}$ entnommen und in einem neuen Eppendorfgefäß mit $90\mu\text{l}$ NaCl 1:10 verdünnt; aus diesem Eppendorfgefäß wurden $50\mu\text{l}$ entnommen und in einem neuen Eppendorfgefäß mit $450\mu\text{l}$ NaCl gemischt, so dass eine weitere 1:10 Verdünnung entstand. Anschließend wurde dieser Verdünnungsschritt weitere sechsmal vorgenommen. Jedes Mal wurden $50\mu\text{l}$ der vorherigen Verdünnung mit $450\mu\text{l}$ NaCl in einem neuen Eppendorfgefäß verdünnt, so dass insgesamt 8 Verdünnungsstufen entstanden.

Mittig auf der Blutagarplatte wurden $10\mu\text{l}$ unverdünnte Probe aufgetragen, entsprechend einer Sensitivität von 10^2 CFU/ml ;

$10\mu\text{l}$ der ersten Verdünnung wurden in das mit 10^3 beschriftete Feld pipettiert, entsprechend einer Sensitivität von 10^3 CFU/ml ; ebenso wurde mit den weiteren Verdünnungsstufen verfahren, so dass alle Felder bis 10^{10} mit der entsprechenden verdünnten Probe beimpft wurden; beispielsweise im Feld 10^{10} entsprechend einer Sensitivität von 10^{10} CFU/ml .

Anschließend wurden die beimpften Platten bei 37°C inkubiert und einen Tag später abgelesen.

Anhand der letzten Verdünnungsstufe, auf der sich ausreichend bakterielles Wachstum zeigte, konnte auf die Keimzahl in der Ausgangsprobe geschlossen werden.

Dabei zeigte sich, dass in den Ausgangsproben, den sogenannten Aliquots, eine Bakterienanzahl von 10^8 CFU/ml *S. pneumoniae* bzw. 10^{11} CFU/ml *E. coli* enthalten war.

2.2.1.3 Erstellung einer bakteriellen Wachstumskurve

Um das Wachstumsverhalten der Keime *S. pneumoniae* und *E. coli* zu untersuchen, wurde eine Flasche mit 100ml TSB-Lösung mit 20µl eines Aliquots von *S. pneumoniae* beimpft, entsprechend einer Ausgangskonzentration von 2×10^4 CFU/ml *Streptococcus pneumoniae*; eine zweite Flasche mit 100ml TSB-Lösung wurde mit 20µl eines Aliquots von *E. coli* infiziert, entsprechend einer Ausgangskonzentration von 2×10^7 CFU/ml *E. coli*.

Anschließend wurden die Flaschen im Brutschrank inkubiert. Zu folgenden Zeitpunkten nach Beimpfung mit *S. pneumoniae* bzw. *E. coli* wurden jeweils zwei Proben zu je 200µl und eine Probe mit 1000µl entnommen: 0-, 3-, 6-, 9-, 12- und 15-Stunden bei *E. coli* und zusätzlich zu den Zeitpunkten 18-, 21- und 24 Stunden bei *S. pneumoniae*, da dieser Keim typischerweise ein langsames Wachstum zeigt.

Die Versuche zur Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der untersuchten Bakterien wurden an unabhängigen Versuchstagen insgesamt viermal repliziert.

An jedem der vier Versuchstage wurde wie oben beschrieben verfahren. Aus der abgenommenen 1000µl Probe wurde vor Einfrieren der Probe zur Keimzahlbestimmung eine Subkultur auf einer Blutagarplatte angelegt, um neben der PCR auch eine Keimzahlbestimmung über die gewachsene Kultur auf der Platte vornehmen zu können. Dabei wurde eine Verdünnungsreihe angelegt wie unter 2.2.1.2, S. 25 beschrieben. Die anderen Proben wurden sofort bei -80°C eingefroren, später wie unter 2.2.2, S. 26 beschrieben für eine PCR aufbereitet und wie unter 2.2.3.4, S. 32 beschrieben in die PCR eingesetzt.

2.2.2 Aufbereitung der DNA

Dieser Schritt wurde angewendet, um die bakterielle DNA, die in den Proben enthalten war, für den Einsatz in die PCR vorzubereiten.

In dieser Arbeit wurde für die Aufbereitung der DNA das QIAamp DNA Mini Kit-Säulensystem (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die DNA wurde nach

Spaltung durch eine Proteinase in mehreren Waschgängen gereinigt und anschließend in Elutionspuffer wieder gelöst.

Anschließend wurden die Proben bei mindestens -20C° eingefroren oder direkt für die PCR verwendet.

Zur Kontrolle dieser Arbeitsschritte wurde eine Negativkontrolle mit angesetzt, bei der das Extraktionsmaterial durch steriles Wasser ersetzt wurde.

2.2.2.1 Zellaufschluss

Zur Aufbereitung der Proben (jeweils $200\mu\text{l}$) wurde folgendermaßen vorgegangen: Zuerst wurden $20\mu\text{l}$ Proteinase K zur Probe hinzugegeben. Diese Serinprotease kann Keratin durchdringen, was ihr den Buchstaben „K“ eingebracht hat und worin sie sich von anderen Proteasen unterscheidet (Betzel et al. 1988). Durch Hinzufügen der Proteinase K wird die Permeabilität der Zellwand erhöht und ein Zellaufschluss erfolgt. In der Folge können Reagenzien, die der Probe hinzugefügt werden, während der folgenden Verarbeitungsschritte sowie während der PCR-Läufe leichter in die Zelle eindringen (Bagasra und Hansen 1997).

Im nächsten Verarbeitungsschritt wurden $200\mu\text{l}$ Puffer AL hinzugegeben, die Probe mit Hilfe eines Vortexers gut durchmischt und bei 56°C für mindestens zwei Stunden im Heizschüttler inkubiert.

Bei der Negativkontrolle wurden anstelle der Probe $200\mu\text{l}$ steriles Wasser eingesetzt, $20\mu\text{l}$ Proteinase K und $200\mu\text{l}$ Puffer AL hinzugegeben und die Probe anschließend ebenfalls für mindestens zwei Stunden inkubiert.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Proben kurz zentrifugiert, um Kondenswasser vom Deckel zu entfernen.

2.2.2.2 Präparation der DNA

Zur Präparation der DNA wurden die Proben nach oben beschriebenen Arbeitsschritten durch Zugabe von 200µl Ethanol ausgefällt, gut durchmischt und anschließend erneut kurz zentrifugiert.

Um die DNA an die Säulenmembran zu binden wurden die Proben vorsichtig, ohne dabei die Membran in der Säule zu berühren, mit einer Pipette in die vorbereiteten Säulen überführt und für eine Minute bei 6000x g zentrifugiert.

Danach wurden die Säulen aus dem Eppendorfgefäß genommen und in neue Eppendorfgefäße gestellt, während die alten, mit Flüssigkeit gefüllten Eppendorfgefäße, verworfen wurden.

Anschließend erfolgten drei Waschschrte: Für den ersten Waschschrte wurden 500µl AW1-Puffer hinzugegeben, die Proben mit einem Vortexer gut durchmischt und eine Minute lang bei 6000x g zentrifugiert; anschließend wurden die Säulen wieder in neue Eppendorfgefäße gestellt und die alten Eppendorfgefäße mit Flüssigkeit verworfen.

Für den zweiten Waschschrte wurden die Proben mit 500µl AW2-Puffer versetzt, wieder gut durchmischt und diesmal für drei Minuten bei 20.000x g zentrifugiert; danach wurden die Säulen in neue Eppendorfgefäße gestellt und die alten, mit Flüssigkeit gefüllten Gefäße verworfen.

Zur Elution der DNA wurden 100µl Tris-HCl-Elutionspuffer hinzugefügt und die Proben gut durchmischt. Anschließend wurden die Proben für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und für eine weitere Minute bei 6000x g zentrifugiert.

Die Säulen wurden nun verworfen und die aufgearbeiteten Proben entweder bei – 20°C eingefroren oder direkt der PCR zugeführt.

2.2.3 Polymerasekettenreaktion

2.2.3.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion

Bereits Anfang der 1970er Jahre entwickelte der norwegische Wissenschaftler Kjell Kleppe die Idee, DNA mit Hilfe von flankierenden Primern zu vervielfältigen (Kleppe et al. 1971). Allerdings geriet seine Idee in Vergessenheit, bis 1984 Kary Mullis erneut die Polymerasekettenreaktion erfand. 1993 wurde ihm hierfür der Nobelpreis für Chemie verliehen.

Die Polymerasekettenreaktion (Mullis et al. 1984) dient dazu, kleinste Mengen von Nucleinsäuren zu amplifizieren. Dabei macht man sich die Eigenschaft der DNA-Polymerase zunutze, spezifische DNA-Abschnitte verdoppeln zu können. Daher ist es möglich, durch die Polymerasekettenreaktion kleinste Mengen bakterieller DNA, die für die Bakterien spezifische 16S-RNA codiert, zu amplifizieren.

Die PCR benötigt einige grundlegende Komponenten:

- das sogenannte Template, die Original-DNA, die den Abschnitt enthält, der vervielfältigt werden soll
- zwei Primer, die auf den beiden Einzelsträngen der DNA den Bereich begrenzen, der amplifiziert werden soll, und damit den Startpunkt der DNA-Synthese festlegen
- eine hitzestabile DNA-Polymerase, um den festgelegten Abschnitt zu replizieren; hierfür eignet sich insbesondere die sogenannte Taq-Polymerase, da sie von dem hitzestabilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammt und daher den hohen Temperaturen, die bei einer PCR verwendet werden, standhält
- Desoxyribonukleosidtriphosphate als Bausteine für den neu synthetisierten Strang
- Magnesiumionen als essentieller Bestandteil für die Funktion der Polymerase
- Pufferlösungen, um eine geeignete chemische Umgebung sicherzustellen

Der PCR-Prozess besteht aus einzelnen Zyklen, die in einem Thermocycler durchgeführt werden. Jeder einzelne Zyklus wiederum besteht aus drei Schritten:

1. Denaturierung: Durch Temperaturerhöhung auf 90 C° wird der DNA-Doppelstrang denaturiert. Die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, werden dabei aufgebrochen.

2. Annealing (Primerhybridisierung): Anschließend werden Oligonukleotide, sogenannte Primer, hinzugefügt, die die komplementäre Sequenz wie die 3`-OH-Enden des DNA-Abschnittes aufweisen. Die Primer binden an die DNA-Einzelstränge und markieren das Fragment, das amplifiziert werden soll. Die hierfür benötigte Temperatur liegt in der Regel bei etwa 55 - 65C°; nur so kann davon ausgegangen werden dass sich die Primer zum einen an die komplementären Sequenzen anlagern und es zum anderen zu einer effizienten Produktbildung kommen kann.

3. Elongation: Die den Proben hinzugefügte DNA-Polymerase komplementiert die beiden Einzelstränge, so dass anschließend zwei vollständige Doppelstränge vorhanden sind. Dabei beginnt die DNA-Polymerase am 3`-Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA-Strang zum 5`-Ende, bis dieser verdoppelt ist. Durch erneute Denaturierung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge können neue Primermoleküle binden und der Prozess wiederholt sich. Somit lässt sich durch eine Polymerasekettenreaktion eine exponentielle Vervielfältigung des gewünschten DNA-Fragments erzielen, da jeweils auch die neu gebildeten Stränge als Matrize dienen.

2.2.3.2 Real-time-quantitative PCR

Bei der real-time-PCR handelt es sich um eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die nach dem Prinzip der ursprünglichen Polymerasekettenreaktion aufgebaut ist und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA erlaubt. Dies wird dadurch ermöglicht, dass man dem PCR-Ansatz einen Fluoreszenzfarbstoff – in dieser Arbeit SYBR-Green – hinzufügt. Am Ende des PCR-Laufes wird anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignale die Quantifizierung vorgenommen.

2.2.3.3 Erarbeitung des PCR-Protokolls

Für die Anwendung einer PCR wurden bestimmte theoretische Vorüberlegungen wichtig, was z.B. die Wahl der Primer oder die Zyklenanzahl im PCR-Lauf betrifft.

Auswahl der Primer:

Als zentralen Baustein in der PCR stellen Oligonucleotide, die sogenannten Primer, den Startpunkt dar, an dem die DNA-Polymerase beginnt die DNA zu replizieren. Durch Primer wird zum einen bestimmt, ob pro- oder eukaryotische oder z.B. speziesspezifische DNA und zum anderen, welcher Teil einer Sequenz amplifiziert wird.

Allgemein wichtige Eigenschaften von Primern sind z.B. das Vermeiden der Ausbildung interner Sekundärstrukturen, eine gleichmäßige Verteilung der vier Nukleotide sowie Schmelztemperaturen (TM), die Annealingtemperaturen zwischen 55°C und 65°C ermöglichen.

Die für diese Arbeit grundlegend angestrebte Eigenschaft der Primer lag insbesondere darin, dass die Primer an Regionen der 16S-rRNA binden, um den Nachweis bakterieller DNA zu ermöglichen.

Wahl der Zyklusanzahl:

Im ersten Zyklus entstehen zwei komplementäre DNA-Stränge, die in den folgenden Zyklen als Matrize für die weitere Vervielfältigung zur Verfügung stehen.

Die bei dieser Arbeit sich als ideal erweisende Zyklusanzahl lag für die Amplifikation bei 30 Zyklen, da zu diesem Zeitpunkt genügend Produkt zur weiteren Analyse vorliegt.

Wird eine höhere Zyklusanzahl gewählt, so erhöht sich neben der gewünschten Ziel-DNA auch die Anzahl kürzerer, unspezifischer Fragmente. Daher sollte auch bei einer geringen Menge der Ausgangs-DNA eine maximale Zyklusanzahl nicht überschritten werden.

2.2.3.4 Erstellung einer Breitspektrum-PCR

Folgendes Pipettierschema wurde angewendet: Pro einzusetzender Probe wurden 5,5µl H₂O aqua destillatum mit 0,25µl Primer RW01, 0,25µl Primer DG74 und 4µl Cyber Green 5xMaster Mix gemischt.

Der Ansatz wurde gut durchmischt und jeweils 10µl des Ansatzes mit 10µl von der jeweiligen DNA-Probe in eine Glaskapillare pipettiert.

Zur Kontrolle dieser Arbeitsschritte wurde eine Negativprobe angelegt; hierfür wurde eine Glaskapillare mit 10µl Ansatz und, statt der Probe, 10µl sterilem Wasser befüllt.

Die Glaskapillaren wurden verschlossen und 30 Sekunden lang bei 2500U zentrifugiert. Danach wurden die Glaskapillaren in den Light Cycler transferiert.

Folgendes Cyclerprogramm wurde gewählt:

Denaturierung: 1 Zyklus

95 C° 10 min

Amplifikation: 30 Zyklen

95 C° 10 sec

65 C° 10 sec

72 C° 20 sec

Schmelzkurve: 1 Zyklus

95 C° 20 sec

66 C° 20 sec

Kühlung: 1 Zyklus

40 C° 30 sec

2.2.4 Erarbeitung des internen Standards

In jedem Lauf wurde zur quantitativen Kontrolle Pneumokokken-DNA (20ng bis 2pg) als interner Standard mitgeführt und amplifiziert. Eine quantitative Analyse der Proben wurde mit Hilfe der LightCycler Software Version 3.5 durchgeführt.

2.2.4.1 Herstellung einer Standard-Reihe

Um eine Standard-Reihe herstellen zu können, wurde folgendermaßen verfahren:

Keime des *S. pneumoniae* Stammes wurden auf drei Agarplatten ausgeplattet und im Brutschrank für einen Tag inkubiert.

Die gewachsenen Kolonien wurden mit einer Plastiköse von den Agarplatten abgetragen und das gewonnene Material auf zwei Proben aufgeteilt und in jeweils 180µl ATL-Puffer eluiert.

Der Zellaufschluss wurde wiederum bei jeder Probe durch Zugabe von 20µl Proteinase K bewirkt und die Proben für mindestens zwei Stunden im Heizschüttler bei 56°C inkubiert.

Anschließend wurden 200µl AL-Puffer hinzupipettiert, die Proben 15 Sekunden lang mit Hilfe eines Vortexers gemischt und für zehn Minuten bei 70°C inkubiert.

Nach kurzer Zentrifugation, um am Deckel befindliches Kondenswasser zu entfernen, wurden 200µl Ethanol hinzugefügt, die Proben wieder gut durchmischt und erneut kurz zentrifugiert. Danach wurden die Proben mithilfe einer Pipette in Qiagen-Säulen überführt und für 1min. bei 6000x g zentrifugiert; anschließend wurden die Säulen in neue Eppendorfgefäße gestellt, während die alten, mit Flüssigkeit gefüllten Eppendorfgefäße verworfen wurden.

Um die DNA zu waschen, erfolgten drei Waschvorgänge. Für den ersten Waschvorgang wurden jeweils 500µl AW1-Puffer hinzugegeben, die Proben eine Minute lang bei 6000x g zentrifugiert und die Säule in ein neues Eppendorfgefäß gestellt, während das alte Eppendorfgefäß mit Flüssigkeit darin verworfen wurde.

Für den zweiten Waschvorgang wurden jeweils 500µl AW2-Puffer hinzugefügt, die Proben drei Minuten bei 20.000x g zentrifugiert und die Säule in ein 1,5 ml fassendes Eppendorfgefäß gestellt. Das alte Eppendorfgefäß wurde verworfen.

Zur Elution der DNA wurden 100µl Tris-HCl hinzupipettiert und die Proben gut durchmischt; danach wurden die Proben für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und eine Minute bei 6000x g zentrifugiert.

Anschließend wurden beide Proben in ein gemeinsames Eppendorfgefäß pipettiert, so dass insgesamt 200µl Probenmaterial erhalten wurden.

2.2.5 Messung von DNA im Spektralphotometer

Um die DNA-Konzentration berechnen zu können, wurden die Proben der Standardreihe im Spektralphotometer gemessen. Dafür wurde die DNA in H₂O 1:5 vorverdünnt und die Absorption der Probe bei einer Wellenlänge des Lichtes von A₂₆₀nm gegen Wasser als Leerwert gemessen. Das Prinzip dieser Messung beruht

darauf, dass die Purin- und Pyrimidinbasen der Nukleinsäuren ultraviolettes Licht absorbieren und ihr Absorptionsmaximum bei 260nm zeigen.

Die bei 260nm gemessene optische Dichte OD von 1,0 entspricht bei einer Schichtdicke der Flüssigkeit in der Küvette einer Konzentration von 50µg/ml für Doppelstrang DNA (Sambrook et al. 1989).

2.2.5.1 Quantitative Berechnung der DNA

Zur Berechnung der DNA-Konzentration c wurde folgende Formel verwendet:

$$c = A_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50\mu\text{g/ml}$$

Zusätzlich wurde eine Messung bei $A_{280\text{nm}}$ vorgenommen, da bei diesem Wert das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt. Hiermit wurde der Grad der Verunreinigung durch Proteine gemessen. Der Quotient aus $A_{260\text{nm}}$ und $A_{280\text{nm}}$ sollte bei reiner DNA bei etwa 1,8 liegen.

2.2.6 Kontaminationsvermeidung

Bei der Verarbeitung von DNA gibt es verschiedene Kontaminationsquellen. Diese können zum einen darin bestehen, dass Fremd-DNA in Reaktionskomponenten eingebracht wird, zum anderen kann es bei der Verarbeitung und Aufarbeitung der DNA zu einem Verschleppen fremder DNA-Spuren in das nächste Reaktionsgefäß kommen.

Durch folgendes Vorgehen wurde versucht, das Risiko einer Kontamination möglichst gering zu halten:

- Das Probenmaterial wurde in einem eigenen Labor gewonnen und bis zur Verwendung in einem separaten Gefrierschrank aufbewahrt.

- Die DNA-Aufarbeitung wurde in einem eigenen Raum mit eigenen Geräten und Pipettiermaterial durchgeführt.
- Die Reaktionskomponenten für die PCR und die Verwendung des Probenmaterials für die PCR wurden ebenfalls in einem separaten Raum mit eigenem Material pipettiert.
- Für den PCR-Ansatz sowie die Negativkontrolle der Aufarbeitung wurde steriles Wasser verwendet.
- Als Pipettiermaterial wurden sterilisierte Spitzen eingesetzt.
- Die Arbeitsschritte wurden jeweils mit separaten Einmalhandschuhen durchgeführt.
- Alle Arbeitsflächen und Geräte wurden regelmäßig und gründlich nach jedem Arbeitsschritt mit Äthanol gereinigt.
- Alle Arbeitsflächen wurden nach Verarbeitung der Proben über Nacht mit UV-Licht bestrahlt.

3. Ergebnisse

3.1 Vorversuche und Etablierung der PCR

Um die unter 2.2.2, S.26 beschriebene Aufbereitung der DNA und das unter 2.2.3, S.29 beschriebene PCR-Protokoll zu etablieren, wurde auf Erfahrungen aus der Abteilung aufgebaut. Mittels verschiedener Vorversuche wurde die Sensitivität ermittelt.

3.1.1 Wachstumsverhalten von *S. pneumoniae* und *E. coli*

Um eine PCR-Methode für klinische Materialien etablieren zu können, wurden Vorversuche unternommen, bei denen das Wachstumsverhalten von *Streptococcus pneumoniae* und *E. coli* untersucht wurde.

Hierbei wurde, wie unter 2.2.1.3, S. 26, beschrieben, TSB mit *S. pneumoniae* bzw. *E. coli* versetzt und im Brutschrank inkubiert. Nach Proben-Abnahme zu den angegebenen Zeitpunkten erfolgte die Ausplattung der Proben auf Blutagarplatten; diese wurden am folgenden Tag abgelesen. Die jeweiligen Keimzahlen lassen sich aus unten stehender Graphik entnehmen.

Als Ergebnis der Wachstumskurven ließ sich folgendes Keimwachstum feststellen (Tabellen 1 und 2, Abbildungen 2 und 3):

Die Keime zeigten zwischen 0 und 3 Stunden die sogenannte Lag-Phase, eine Latenzphase; während der Zeit 6 bis 9 Stunden eine logarithmische Wachstumsphase und im Intervall 9 bis 12 Stunden eine endlogarithmische Wachstumsphase. Anschließend, zwischen den Zeitpunkten 12 bis 15 Stunden folgte die postlogarithmische Phase, bei der das Keimwachstum aufgrund der verbrauchten Nährstofflösung stark zurückging und sich die Keimanzahl nahezu den Ausgangswerten annäherte (siehe Tabelle 1 und Abbildung 2).

Tabelle 1: Keimanzahl *S. pneumoniae*

Zeit (h)	Keimanzahl
0	3,00E+04
3	2,00E+04
6	1,00E+05
9	3,00E+07
12	6,00E+08
15	2,00E+08
18	1,00E+05
21	1,00E+04
24	1,00E+05

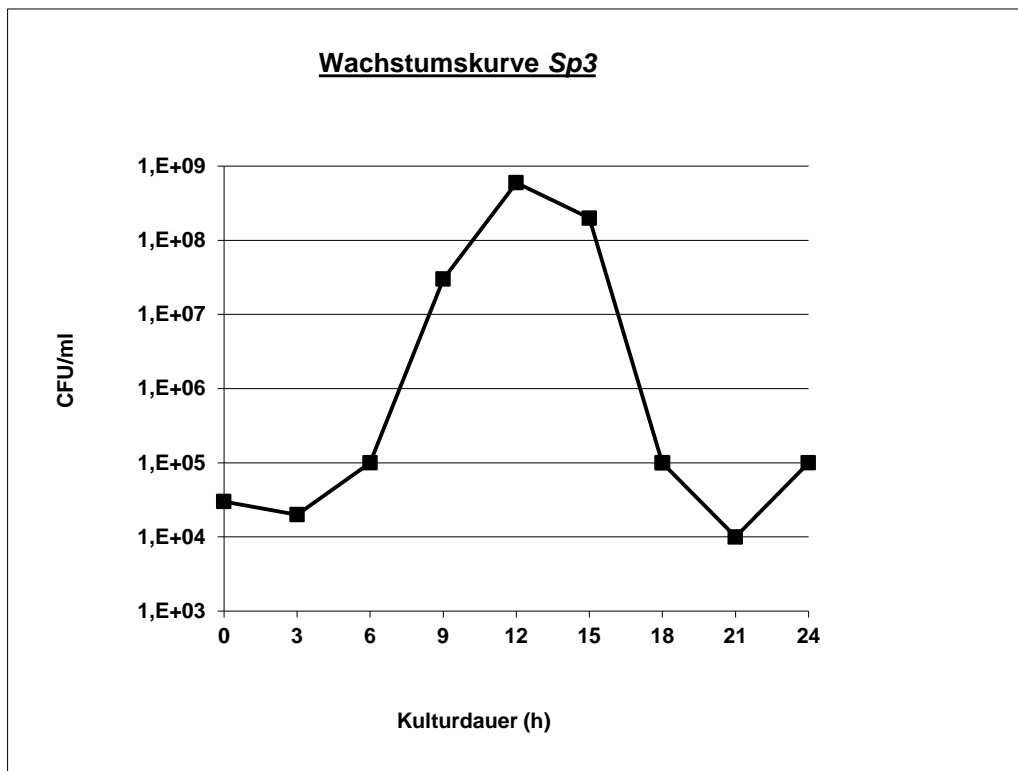


Abbildung 2: Wachstumskurve *S. pneumoniae* (SP³)

Tabelle 2: Keimanzahl *E. coli*

Zeit (h)	Keimanzahl
0	1,00E+04
3	1,50E+05
6	4,00E+07
9	7,00E+08
12	3,00E+09
15	9,00E+08

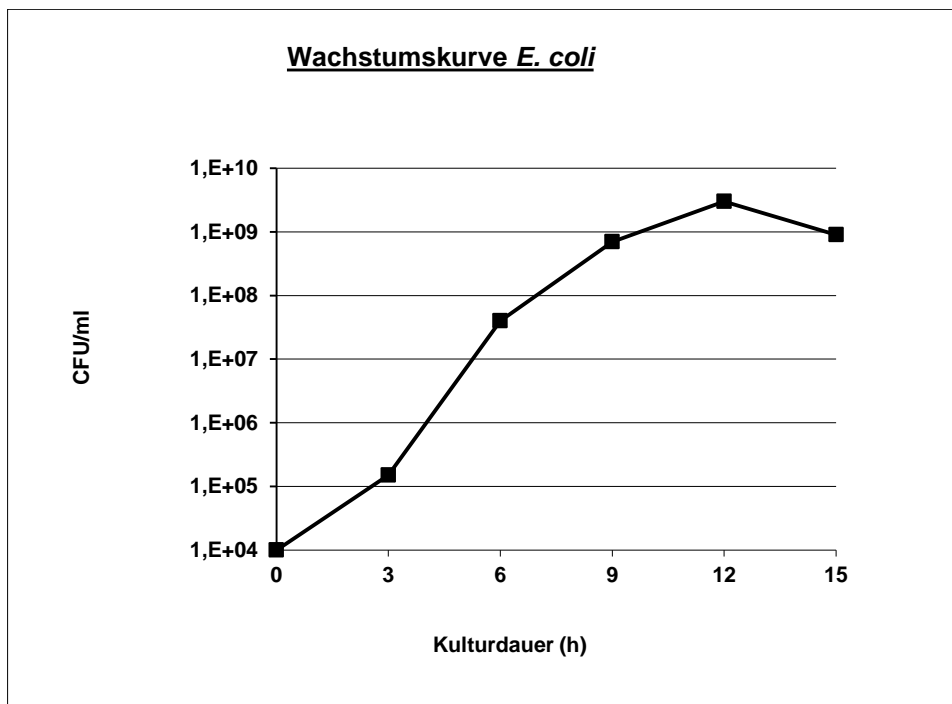


Abbildung 3: Wachstumskurve *E. coli*

3.1.2 Quantifizierung der Standardreihe

Für die folgenden Versuche, bei denen eine PCR angewendet wurde, wurde eine Standardreihe hergestellt. Anhand des mitgeführten internen Standards konnte anschließend eine quantitative Berechnung der DNA durchgeführt werden. Die Herstellung des internen Standards erfolgte nach dem unter 2.2.4.1, S.33 beschriebenen Protokoll.

Bei Messung der Proben im Spektralphotometer wurde, wie unter 2.2.5, S.34 beschrieben vorgegangen und folgende Werte gemessen:

Bei einer Vorverdünnung der Proben von 1:5 wurde bei $A_{260\text{nm}}$ ein Wert von 0,11 und bei $A_{280\text{nm}}$ ein Wert von 0,06 gemessen; daraus ergibt sich ein Quotient von 1,8. Die DNA-Konzentration wurde, wie im Methoden-Teil unter 2.2.5.1, S.35 beschrieben, errechnet und ergab $0,11 \times 50 \times 5 = 27,5\mu\text{g/ml} = 27,5\text{ng}/\mu\text{l}$ in der Stammlösung. Aus dieser Stammlösung wurde im Verhältnis 1:10, 1:100 usw. eine Verdünnungsreihe hergestellt.

Um aus den errechneten Werten in der PCR eine quantitative Berechnung der DNA vornehmen zu können, wurde verallgemeinernd davon ausgegangen, dass 1 Million Basenpaare DNA 1fg wiegen (Rose et al. 2003, Fogel et al. 1999).

Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden bei allen PCR-Läufen als interner Standard mitgeführt und machen so eine Quantifizierung der einzelnen DNA-Proben möglich.

3.1.3 Liquor-Stabilitätsversuch

Mit diesem Versuch wurde das Wachstumsverhalten der Keime *E. coli* und *S. pneumoniae* in humanem Liquor unter Anwendung einer PCR untersucht. Insbesondere sollte dabei überprüft werden, ob und in welchen Maßen sich das Keimwachstum bei Raumtemperatur im Vergleich zum Wachstum bei 4°C unterscheidet.

Hierfür wurden zwei Liquorproben zu je 4ml, die keine relevanten pathologischen Keime enthielten, mit 10^6 Keimen von *E. coli* bzw. *S. pneumoniae* versetzt. Zum

Zeitpunkt 0 Stunden wurden den Proben je 200µl entnommen, die bei -80°C tiefgefroren wurden. Das restliche Probenmaterial wurde je zur Hälfte bei Raumtemperatur (RT= 23°C) und gekühlt bei 4°C aufbewahrt. Zu den Zeitpunkten 3-, 6-, 9-, 12-, 24-Stunden und nach 5 Tagen wurden wiederum jeweils 200µl entnommen und bei -80°C tiefgefroren.

Um die DNA von *S. pneumoniae* und *E. coli* in den humanen Liquorproben bestimmen zu können, wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut, nach dem unter 2.2.2, S. 26 genannten Schema aufgearbeitet und in die PCR eingesetzt. Dabei zeigte sich folgendes Ergebnis in der PCR:

S. pneumoniae:

Tabelle 3: Bakterienanzahl *S. pneumoniae*

Zeit (h)	Keimanzahl bei RT	Keimanzahl bei 4°C
0	1,00E+08	1,00E+08
6	6,00E+07	8,40E+06
12	5,50E+07	2,85E+08

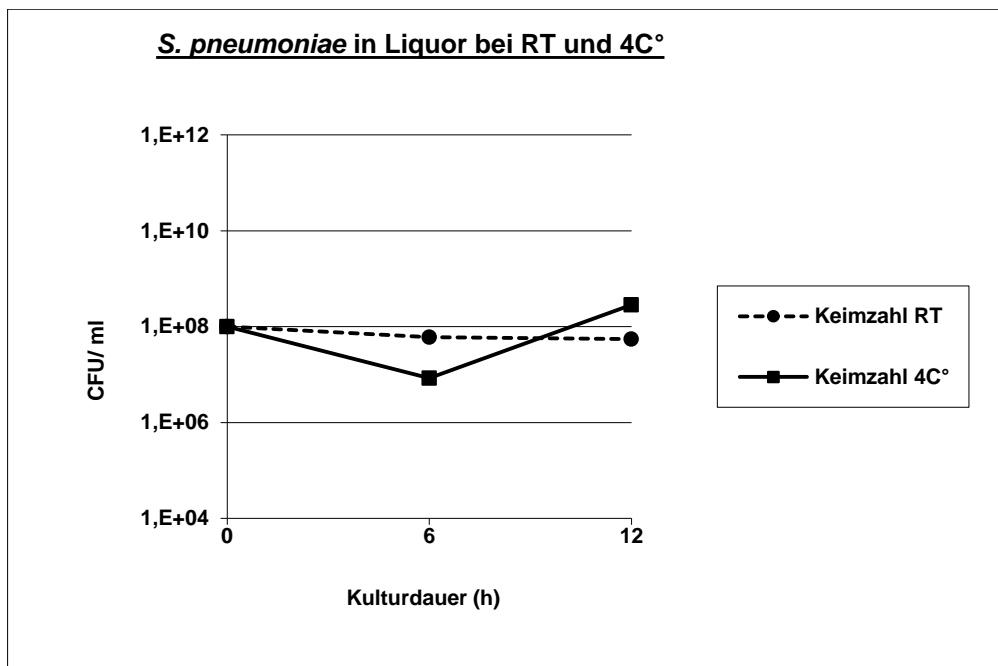


Abbildung 4: Wachstum von *S. pneumoniae* in Liquor: Raumtemperatur (RT) und 4°C

E. coli:

Tabelle 4: Bakterienanzahl *E. coli*

Zeit (h)	Keimzahl bei RT	Keimzahl bei 4C°
0	2,20E+09	2,20E+08
6	3,85E+09	2,35E+09
12	2,75E+09	1,89E+09

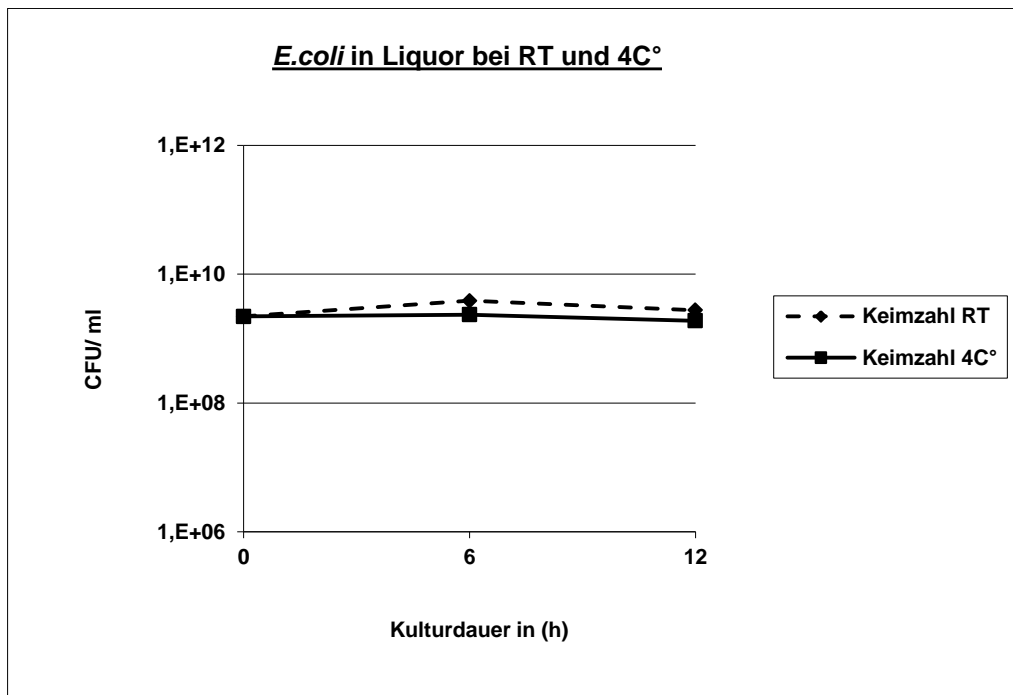


Abbildung 5: Wachstum von *E. coli* in Liquor: Raumtemperatur und 4°C

Die Diagramme zeigen im Zeitverlauf sowohl bei *S. pneumoniae* als auch bei *E. coli* bei Raumtemperatur und bei 4°C eine annähernd gleiche Keimzahl. Begründen lässt sich dies damit, dass die Keime sowohl bei Raumtemperatur (23°C) als auch bei 4°C keine ausreichenden Wachstumsbedingungen vorfinden und daher das Wachstum stagniert.

3.1.4 Keimzahlbestimmung durch Ausplattung und PCR

Zur Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der untersuchten Bakterien wurde, wie unter 2.2.1.3, S.26 beschrieben, der gleiche Versuch an verschiedenen Tagen insgesamt viermal wiederholt.

Alle vier Flaschen zeigten auf den Agarplatten ein nahezu völlig identisches Wachstumsverhalten. Im Mittelwert ergaben sich bei der Ausplattung folgende Werte:

Tabelle 5: Bakterienanzahl *S. pneumoniae* und *E. coli*

Zeit (h)	<i>S. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
0	1,27E+05	3,50E+05
6	2,00E+06	3,00E+07
9	1,33E+08	1,10E+09
12	7,00E+08	6,33E+08

Die zu jedem Zeitpunkt gewonnenen vier Proben wurden nach den unter 2.2.2, S.26 und 2.2.3, S.29 beschriebenen Protokollen für die PCR aufbereitet und eingesetzt.

Die aufgearbeiteten Proben wurden jeweils 1:10 verdünnt in die PCR eingesetzt. Zur quantitativen Bestimmung wurde in jedem Lauf Pneumokokken-DNA (20ng bis 2pg) als interner Standard mitgeführt.

Aus den in der PCR gewonnenen jeweiligen vier Proben wurde ebenfalls ein Mittelwert gebildet. Einen Vergleich der Keimanzahl bei Ausplattung und bei der PCR zeigt untenstehende Tabelle 6 und Abbildung 6:

Tabelle 6: Vergleich der Keimzahlen bei PCR und Ausplattung

S. pneumoniae

E. coli

Zeit (h)	Ausplattung	PCR	Zeit (h)	Ausplattung	PCR
6	2,00E+06	1,32E+08	6	3,00E+07	4,03E+08
9	1,33E+08	3,97E+09	9	1,10E+09	6,50E+09

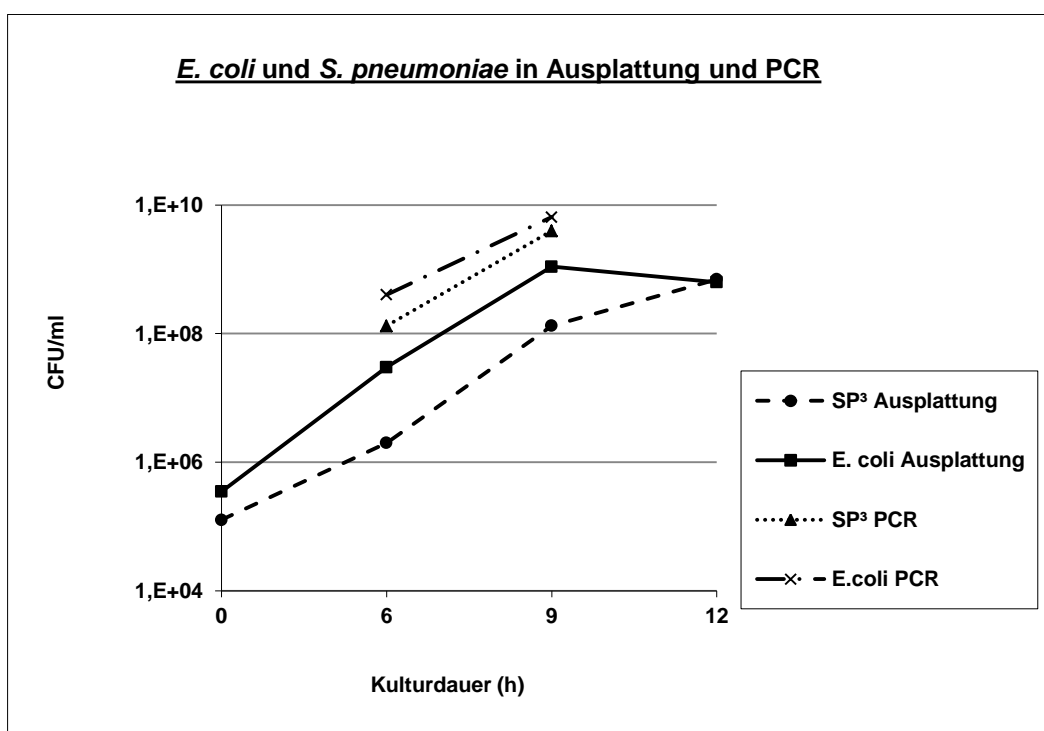


Abbildung 6: Vergleich Ausplattung und PCR bei S. pneumoniae und E. coli; Werte in PCR fraglich zu hoch, errechnet anhand des mitgeführten internen Standards in Abhängigkeit der jeweiligen Menge des eingesetzten Probenmaterials; potentielle Fehlerquellen wurden soweit möglich ausgeschlossen.

In der obigen Abbildung wird deutlich, dass sich die Keimzahlen unterscheiden, je nachdem, ob die Proben ausgeplattet wurden oder anhand der PCR quantifiziert wurden. Die 6- und 9-Stunden-Werte der Ausplattung differieren und zeigen niedrigere Konzentrationen als die Ergebnisse der PCR an; dabei liegen die durch Ausplattung erzielten Werte jeweils ein bis zwei log-Stufen unterhalb der Werte, die durch PCR quantifiziert wurden.

Die Werte der PCR wurden anhand des mitgeführten internen Standards errechnet; dabei wurde die jeweilige Probenmenge, die als Ausgangsmaterial eingesetzt wurde, berücksichtigt und in die Berechnungen mit einbezogen. Angenommene potentielle Fehlerquellen in der Berechnung als Ursache für die unterschiedlich hohen Werte bei den Ergebnissen konnten durch mehrmaliges Überprüfen der Berechnungen sowie einer Neuanfertigung der verwendeten Standardreihe sowohl in diesem wie auch in den weiteren Versuchen ausgeschlossen werden.

Ferner wurde in dieser Arbeit, wie bereits in der Fragestellung unter 1.6, S. 19 erläutert, die Bakteriolyse mit konsekutiver Freisetzung bakterieller DNA ohne Antibiotikatherapie im Verhältnis zur Freisetzung bakterieller DNA unter Antibiose untersucht; die Ergebnisse zeigen deutlich die bestehenden Unterschiede in der Freisetzung nach der jeweiligen Therapieform; daher können die Ergebnisse der PCR und der konventionellen Methode mit Ausplattung als reine Verhältniswerte angesehen werden, die keine Übereinstimmung mit den absoluten Werten verlangen.

3.1.5 Überprüfung der Standardreihe und der Pipettiergenauigkeit

Da sich bei oben beschriebenem Versuch unterschiedliche Ergebnisse bei der Ausplattung und bei der durchgeführten PCR zeigten, wurde erneut eine Standardreihe erarbeitet, anhand derer die Ergebnisse erneut berechnet wurden. Dabei konnten oben genannte Ergebnisse bestätigt werden.

Ferner wurden zur Bestimmung der eigenen Pipettiergenauigkeit Proben aus dem Versuch 3.1.4, S. 43 erneut in einen PCR-Lauf eingesetzt. Hierfür wurden von *S. pneumoniae* sowie von *E. coli* die aufgearbeiteten 6-Stunden-Proben der dritten Versuchsdurchführung (Flasche III) bzw. von der ersten Durchführung des Versuches (Flasche I) verwendet. Von den Proben wurden jeweils dreimal 10µl entnommen und mit 90µl H₂O verdünnt, um eine Verdünnung 1:10 herzustellen. Alle drei Proben wurden schließlich in die PCR eingesetzt, d.h. insgesamt wurden die 6-Stunden-Proben von *S. pneumoniae* bzw. *E.coli* von Flasche III bzw. I viermal in der PCR ausgewertet und konnten miteinander verglichen werden.

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden der TM-Wert sowie der Crossing Point (siehe unten) der jeweiligen Probe im PCR-Lauf bestimmt. Diese stimmten jeweils sowohl zwischen den beiden einzelnen Läufen sowie innerhalb der beiden PCR-Läufe überein. Damit konnte eine ausreichende Pipettiergenauigkeit bestätigt werden.

3.1.6 Interpretation der LightCycler-Ergebnisse

Für das Verständnis der in dieser Arbeit erstellten LightCycler-Läufe stellte sich insbesondere die Interpretationskenntnis folgender zwei Aspekte als besonders wichtig heraus:

3.1.6.1 Crossing-Point

Die in den PCR-Läufen gebildeten Crossing Points dienen der Quantifizierung der Ergebnisse. Der Crossing Point bezeichnet dabei jeweils den Moment, in dem sich in der PCR ein Signal bestimmter Größe in der Probe zeigt. Anhand einer auf der Festplatte des eingesetzten LightCyclers hinterlegten Standardgeraden werden definierte Crossing Points bestimmten Erregermengen zugeordnet.

Unter Einbeziehung der Menge der Ausgangsprobe, der DNA-Aufbereitung und der Verdünnungsstufen der eingesetzten Proben lassen sich schließlich die quantitativen Erregermengen der eingesetzten Proben bestimmen. Um einen repräsentativen Wert angeben zu können, wurden die Proben generell unverdünnt sowie 1:10, teilweise sogar 1:100 oder 1:1000 verdünnt eingesetzt und daraus dann der Mittelwert angegeben.

3.1.6.2 Schmelzkurve – TM-Werte

Mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green gelingt es, spezifische von unspezifischen DNA-Produkten zu unterscheiden. Dies beruht auf folgendem Mechanismus: Dem PCR-Ansatz wird der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green zugesetzt, der sich völlig unspezifisch in jede doppelsträngige DNA einlagert.

Erreicht das jeweilige DNA-Fragment seine spezifische Schmelztemperatur, denaturiert der Doppelstrang und trennt sich auf in zwei einzelne Stränge. Dabei wird SYBR-Green freigesetzt und die daraus resultierende Fluoreszenzabnahme wird registriert.

Anhand des TM-Wertes, des sogenannten Schmelzpunktes, lassen sich spezifische PCR-Produkte von unspezifischen Produkten wie z.B. Primerdimeren unterscheiden, da letztere einen deutlich geringeren Schmelzpunkt aufweisen, wie etwa den der Wasserkontrolle.

Um zu ermitteln, ob das gebildete Signal dem erwarteten Produkt entspricht, wurde in der Auswertung der PCR-Läufe für die vorliegende Arbeit jeweils der TM-Wert der Probe mit dem der mitgeführten Standards verglichen. Es wurde darauf geachtet, dass sich diese Werte in etwa entsprachen.

3.2 Anwendung der PCR an in-vitro-Kulturen

3.2.1 Bakteriolyse-bedingte Freisetzung bakterieller DNA in vitro

Wie in der Einleitung schon erwähnt, kommt der Therapie der Meningitis eine ganz besondere Bedeutung zu. Nicht nur die Wahl der Antibiotika, sondern insbesondere der frühe Zeitpunkt der Behandlung spielen dabei eine ganz entscheidende Rolle.

Um die Freisetzung bakterieller DNA in vitro testen zu können, wurde in Zusammenarbeit mit Herrn V. Stoltefaut folgender Versuch durchgeführt: Eine TSB-Lösung wurde mit Pneumokokken beimpft und inkubiert, bis sich die Pneumokokken in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Um identische Startbedingungen

zu schaffen, wurde primär nur die eine Stammlösung angesetzt, die erst anschließend zu gleichen Anteilen aufgeteilt und unter verschiedenen Bedingungen weitere 12 Stunden inkubiert wurde: Probe a) wurde kein Antibiotikum hinzugefügt, Probe b) wurde mit 8µg/ml Ceftriaxon behandelt, Probe c) erhielt 3µg/ml Rifampicin, Probe d) 3µg/ml Rifampicin und nach zwei Stunden zusätzlich Ceftriaxon, Probe e) Rifampicin und nach 30 Minuten zusätzlich Ceftriaxon und Probe f) wurde Tigecyclin zugesetzt. Die jeweiligen Antibiotika- Konzentrationen wurden gewählt in Anlehnung an Klugman et al. (1995) und Nahata et al. (1990).

Zu Beginn des Versuches, also vor Hinzufügen der Antibiotika und zu den Zeitpunkten 3-, 6-, 9-, und 12-Stunden wurden Proben entnommen. Um die freigesetzte bakterielle DNA im Überstand der Proben bestimmen zu können, wurden die Proben zentrifugiert und für den späteren Gebrauch bei – 80C° tiefgefroren.

Später wurden sie aufgetaut, mit Hilfe eines Vortexers gut durchmischt, anschließend nach dem unter 2.2.2, S. 26 genannten Schema aufgearbeitet und in die PCR eingesetzt. Der Versuch wurde insgesamt fünfmal an unterschiedlichen Tagen durchgeführt.

In der PCR zeigte sich dabei folgendes Ergebnis:

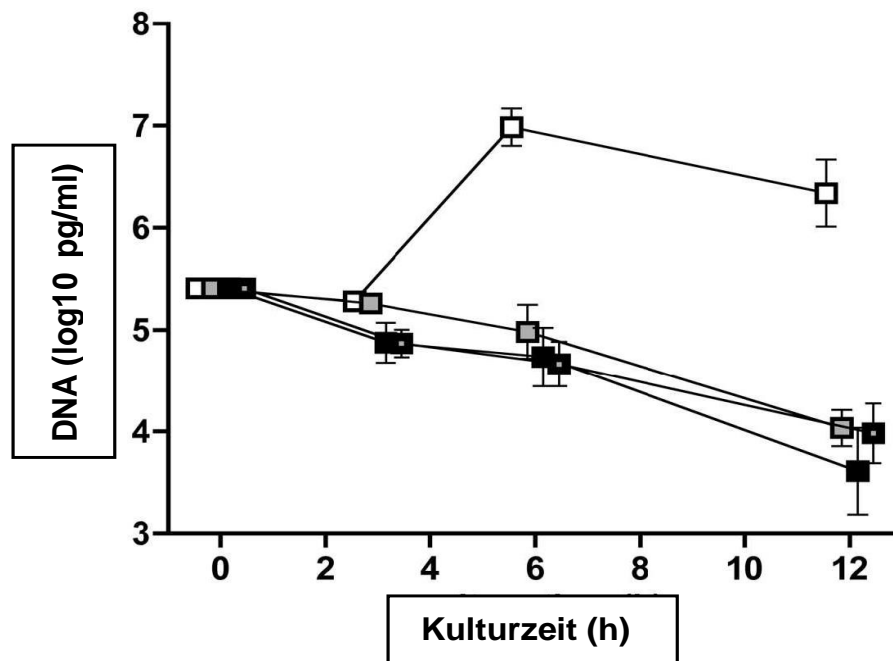
Bei den Proben, denen kein Antibiotikum hinzugefügt wurde, zeigte sich in jedem Versuch in der PCR innerhalb der ersten drei Stunden weiterhin ein ungehindertes Wachstum der Keime mit einer Konzentration bis 10^8 CFU/ml. Nach der logarithmischen Phase mit Erreichen der postlogarithmischen Phase konnte ein deutlicher Anstieg bakterieller DNA nachgewiesen werden; dieser beruht auf der spontanen bakteriellen Lyse und der damit verbundenen Freisetzung intrazellulärer Produkte und DNA.

Von den Proben hingegen, die mit Antibiotika behandelt worden waren, konnte eine höhere bakterizide Wirkung bei den Proben gezeigt werden, die mit Ceftriaxon allein behandelt worden waren als bei den Proben, die entweder nur mit Rifampicin oder mit Rifampicin in Kombination mit Ceftriaxon behandelt worden waren.

Durch die hohe bakteriolytische Wirkung, die Ceftriaxon aufweist, wurde in den mit Ceftriaxon behandelten Proben eine besonders schnelle und hohe Freisetzung intrazellulärer Produkte wie zum Beispiel bakterieller DNA nachgewiesen (s.Abb.7).

Im Gegensatz dazu konnte festgestellt werden, dass bei Behandlung der Kulturen mit Rifampicin deutlich weniger bakterielle DNA freigesetzt wurde; ferner zeigte sich sogar in den Versuchen, dass eine Vorbehandlung mit Rifampicin mit anschließender

Gabe von Ceftriaxon 30 Minuten später nicht nur eine übermäßige Bakteriolyse durch Ceftriaxon verhindert, sondern auch, dass dadurch die Konzentration freigesetzter bakterieller DNA deutlich vermindert werden konnte (s. Abb.7).



□ keine Antibiose, ■ alleinige Gabe von Ceftriaxon, ■ alleinige Gabe von Rifampicin, ■erst Gabe Rifampicin, 30 Minuten später Zugabe von Ceftriaxon

Abbildung 7: Freisetzung bakterieller DNA aus *S. pneumoniae* in vitro in Abhängigkeit der antibiotischen Therapie; Spreer et al. (2009), S. 2255

3.2.2 Keimwachstum und Keimzahlbestimmung in humanem Liquor

Zur Kontrolle und Bestätigung des unter 3.1.3, S.40 genannten Versuches zur Bestimmung des Keimwachstums in humanem Liquor wurde zusätzlich an einem anderen Tag ein weiterer Versuch unternommen. Erneut wurde humaner Liquor, der

zunächst keine relevanten Keime enthielt, mit vier verschiedenen Bakterien versetzt und bei Raumtemperatur und 4C° inkubiert. Bei den vier Keimen handelte es sich um *Streptococcus pneumoniae*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes* und *Neisseria meningitidis*. Alle drei Stunden wurden zwei Proben mit einem Volumen von jeweils 200µl entnommen und bei -20C° gelagert; diese Proben wurden anschließend für die Erstellung einer PCR nach dem unter 2.2.2, S. 26 genannten Schema aufgearbeitet.

Der genaue Versuchsaufbau wurde folgendermaßen durchgeführt:

Am Tag zuvor wurden Inokula aller vier Keime aufgetaut und die Keime auf einer Blutagar bzw. bei *Neisseria meningitidis* auf einer Kochblutagarplatte ausgestrichen und bei 37C° inkubiert.

Am Versuchstag selbst wurden die beimpften Platten aus dem Brutschrank genommen und Proben der gewachsenen Kolonien gewonnen. Mit diesen Keimen wurden später die Liquorproben beimpft. Die Zielkonzentration von 10⁶ CFU/ml wurde mit Hilfe des McFarland-Standard bestimmt.

Generell werden McFarland-Standards als Trübungsstandards zur Bestimmung der Keimdichte einer Bakteriensuspension verwendet. Dabei werden McFarland-Standards durch Hinzufügen von Schwefelsäure zu einer wässrigen Lösung aus Bariumchlorid hergestellt; dies führt zur Bildung einer suspendierten Bariumsulfat-Lösung. Dabei entspricht ein McFarland-Standard von 0,5, gemessen im Spektralphotometer, in etwa einer *Escherichia-coli*-Suspension von 1,5 x 10⁸ Zellen pro ml.

Um in den Liquorproben eine Keimzahl von 10⁶ CFU/ml zu erhalten, wurde primär jeweils mit oben genannten Bakterien ein McFarland-Standard hergestellt; im weiteren wurden 50µl des McFarland-Standards mit 450µl NaCl vermischt und anschließend zu einer Liquorprobe, die 4050µl und primär keine relevanten Keime enthielt, hinzugefügt; somit wurde die Ausgangsprobe 1:100 verdünnt, entsprechend einer Keimzahl von 10⁶ CFU/ml.

Die Liquorproben wurden über 24 Stunden bei Raumtemperatur und bei 4C° inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0-, 3-, 6-, 9-, 12- und 24-Stunden wurden zum einen jeweils zwei Proben von je 200µl entnommen, um mit diesen Proben eine PCR erstellen zu können. Um die gesamte bakterielle DNA, sowohl von lebenden wie von abgestorbenen Bakterien als auch freigesetzte bakterielle DNA in den Proben bestimmen zu können, wurden die Proben vor der Verarbeitung nicht zentrifugiert.

Zum anderen wurde zusätzlich zu jedem Zeitpunkt sofort eine Subkultur zur Keimzahlbestimmung auf Blutagar oder Kochblutagar angelegt, um neben der PCR auch eine Keimzahlbestimmung über die gewachsene Kultur auf der Platte vornehmen zu können. Dabei wurde wie unter 2.2.1.2, S. 25 beschrieben verfahren. In diesem Versuch wurde zum einen das Wachstumsverhalten der Bakterien bei Raumtemperatur im Vergleich zum Wachstum bei 4°C bestimmt. Zum anderen wurde die Keimzahl bei Ausplattung mit der ermittelten Keimzahl der PCR verglichen. Um die gesamte Keimzahl in der Ausplattung bzw. PCR bestimmen zu können und um keinen Verlust lebender Bakterien zu erhalten, wurden die Proben nicht zentrifugiert und nicht nach Entnahme eingefroren, sondern sofort nach Entnahme verarbeitet und ausgeplattet bzw. in die PCR eingesetzt.

In der Ausplattung der Keime zeigte sich, dass es bei Raumtemperatur und bei Inkubation der Keime bei 4°C zu keinem bedeutenden Unterschied in der Keimzahl kam. Wohl aber zeigte sich erneut, wie bereits in oben beschriebenem Versuch, ein Unterschied um etwa zwei log-Stufen in der Keimzahl bei Ausplattung und PCR (siehe untenstehende Abbildungen 8 bis 11).

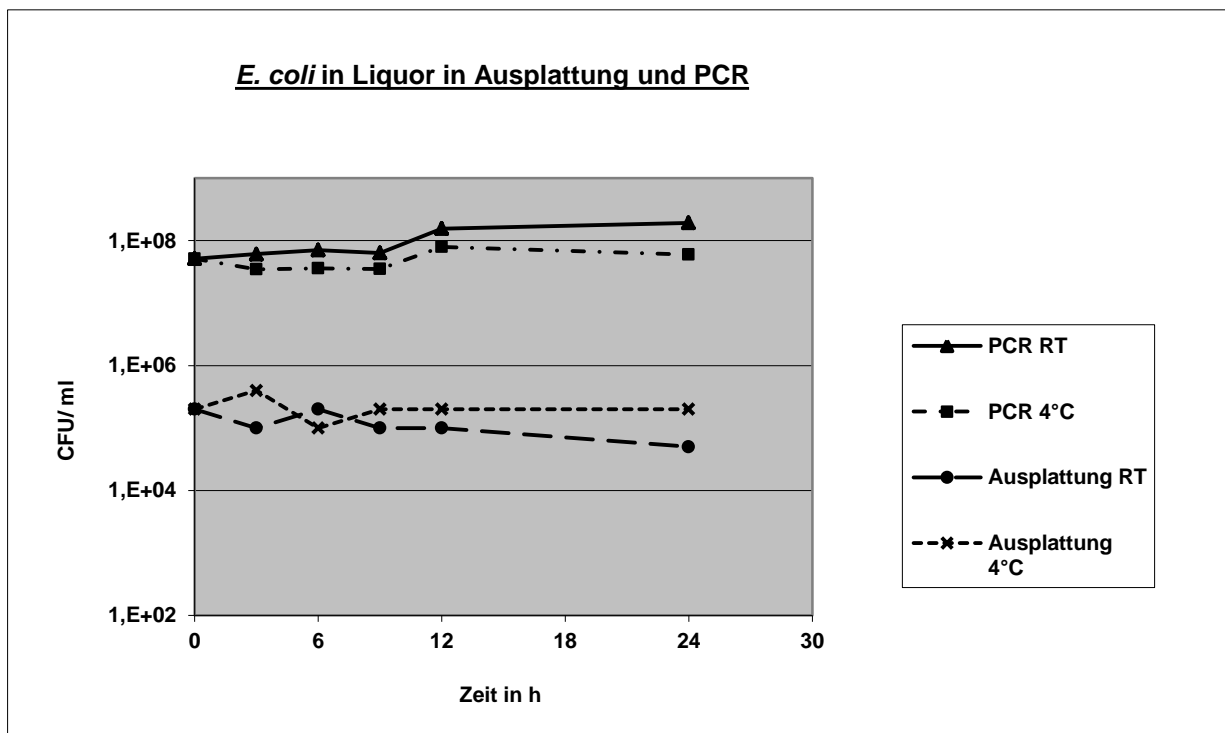


Abbildung 8: Vergleich von Ausplattung und PCR: *E. coli*

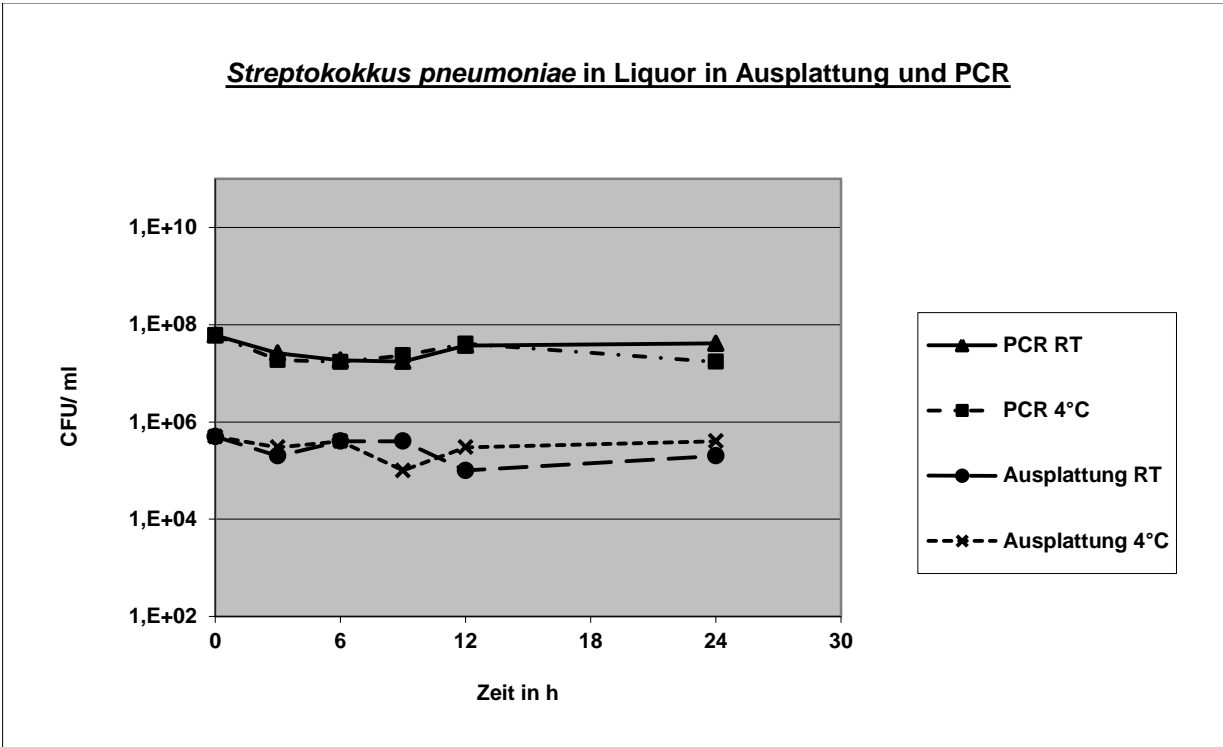


Abbildung 9: Vergleich von Ausplattung und PCR: *S. pneumoniae*

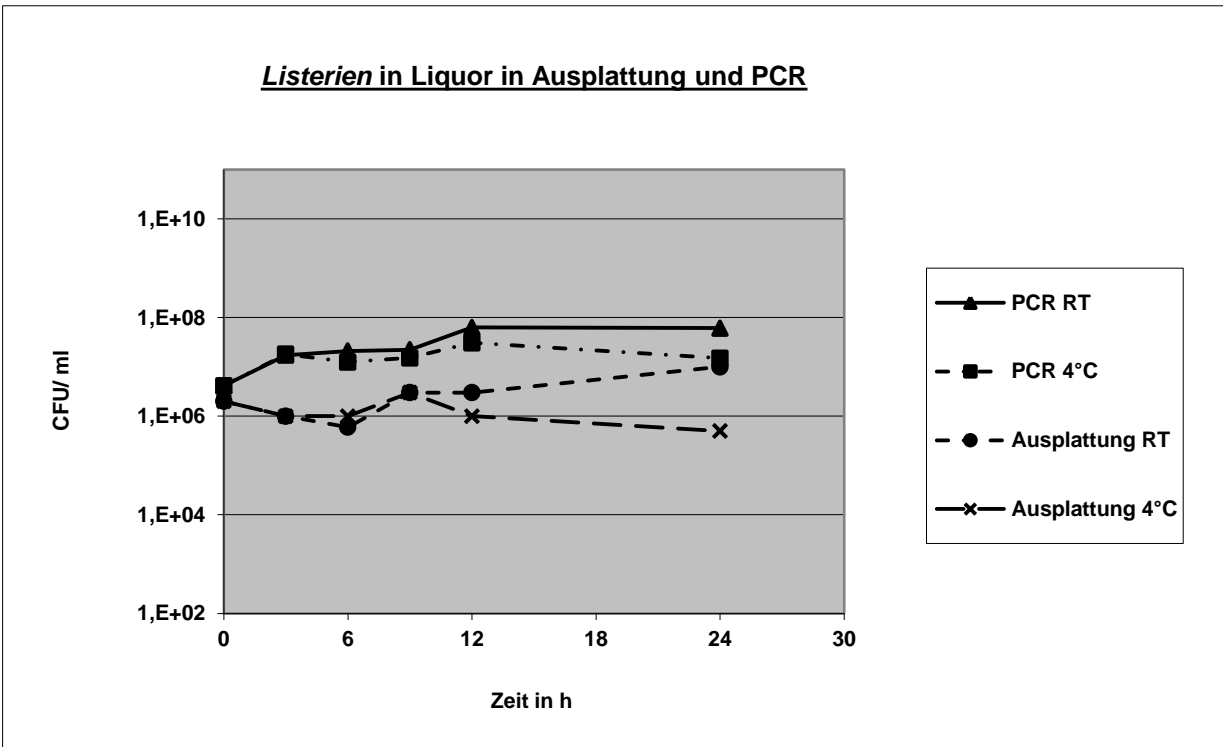


Abbildung 10: Vergleich von Ausplattung und PCR: *Listerien*

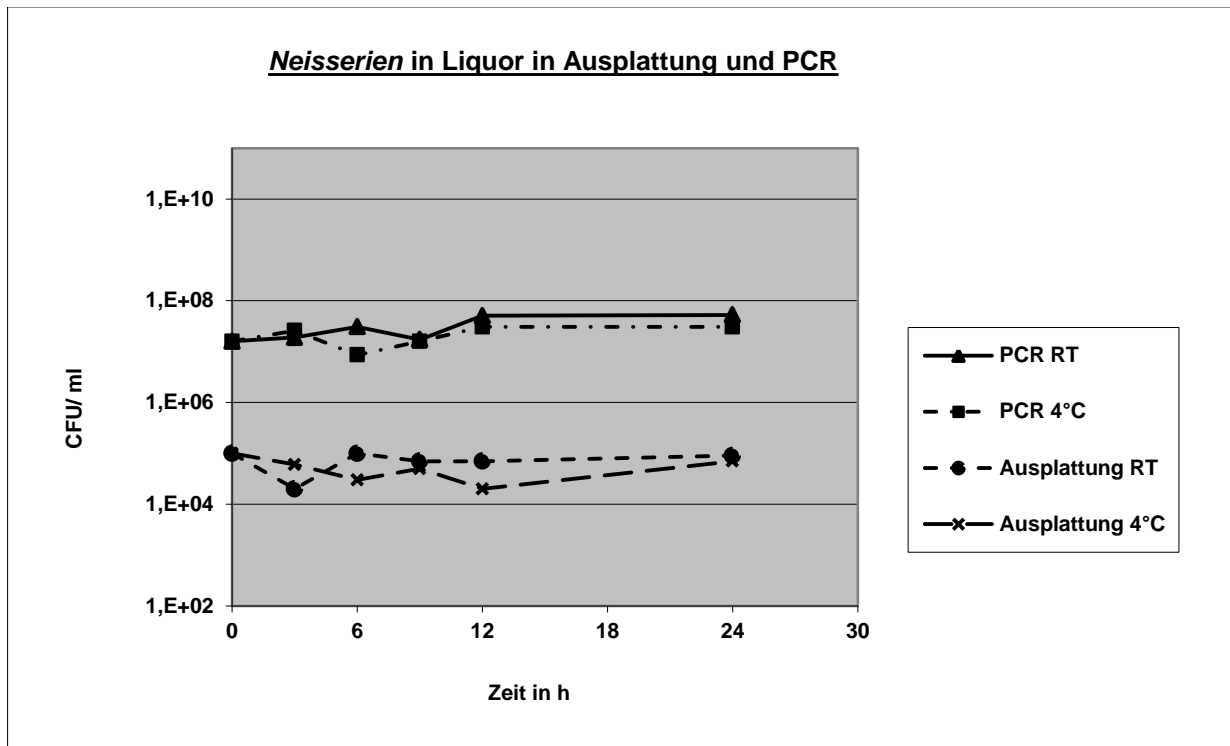


Abbildung 11: Vergleich von Ausplattung und PCR: *Neisserien*

3.3 Evaluation der PCR in vivo – Kaninchen

3.3.1 Quantifizierung bakterieller DNA in Kaninchenliquor vor Antibiotika-Therapie

Hierfür wurde vier an Pneumokokken-Meningitis erkrankten Kaninchen Liquor entnommen; erst anschließend, nach Probenentnahme, wurde die antibiotische Therapie der erkrankten Tiere eingeleitet.

Das Ziel dieses Versuches lag darin, die gesamte bakterielle DNA, die sich zum Zeitpunkt der Abnahme in den Proben befand, zu bestimmen. Dabei sollte sowohl die bakterielle DNA von lebenden wie von toten Bakterien als auch durch spontanes

Absterben freigewordene DNA bestimmt werden. Daher wurden die Proben nach Abnahme *nicht* zentrifugiert.

Da die Proben noch vor Beginn der antibiotischen Therapie entnommen wurden, befanden sich die meisten Keime noch lebend in den Proben.

Die Keimanzahl im Liquor wurde primär mittels Ausplatten auf Blutagarplatten bestimmt. Anschließend wurden die Proben aufbereitet und zur Keimzahlbestimmung in die PCR eingesetzt. Das Ergebnis ist unten stehender Abbildung zu entnehmen (siehe Abb. 12).

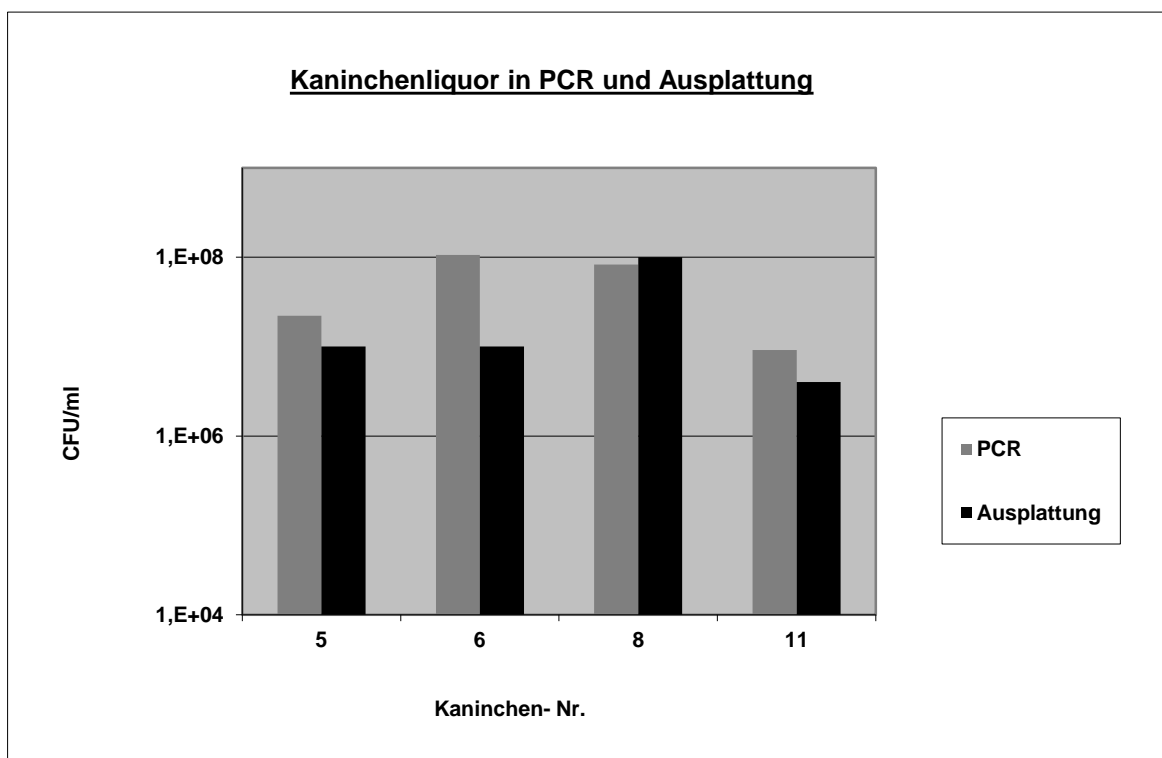


Abbildung 12: Vergleich Kaninchenliquor (unzentrifugiert) in PCR und Ausplattung

3.3.2 Quantifizierung bakterieller DNA in Kaninchenliquor nach Antibiose

Alle die Tiere betreffenden Versuche wurden dem Tierschutzbeauftragten der Universität Göttingen vorgelegt und von diesem befürwortet. Die Genehmigung durch

den Regierungspräsidenten von Braunschweig vom 07.04.2006 liegt vor (Aktenzeichen 33.42502-028/06). Die verwendeten Liquorproben wurden freundlicherweise von Frau PD Dr. Annette Spreer und Herrn Valentin Stoltefaut zur Verfügung gestellt.

In einem Tiermodell wurden Kaninchen, die zuvor in Narkose gelegt worden waren, mit *Streptococcus pneumoniae* infiziert.

12 Stunden nach Infektion und nachdem alle Kaninchen hohe Bakterientiter entwickelt hatten, wurde eine Hälfte der Kaninchen (n=12) mit Rifampicin als Kurzinfusion vorbehandelt und erhielt im Anschluss eine Stunde später Ceftriaxon. Die Zeitdauer zur Vorbehandlung mit Rifampicin wurde gewählt in Kenntnis pharmakokinetischer Studien am Menschen, wo ein Anstieg bakterieller DNA im Liquor eine Stunde nach Rifampicingabe beobachtet wurde (Nau et al. 1992).

Die Kontrollgruppe hingegen (n=12) wurde direkt und ausschließlich mit Ceftriaxon behandelt, ebenfalls verabreicht als Kurzinfusion.

Um im Liquor eine weitestgehend vergleichbare Antibiotika-Konzentration wie beim Menschen zu erreichen, wurde die für Kinder empfohlene Maximaldosis Rifampicin gewählt; dies geschah in Anlehnung an Tunkel et al. (2004).

Die Ceftriaxondosis wurde gewählt im Hinblick auf bereits bekannte pharmakokinetische Studien an Kaninchen (Friedland et al. 1993b).

Nach Infektion der Kaninchen wurde zu den Zeitpunkten 0-, 12-, 14-, 18- und 24-Stunden Liquor entnommen. Um allein die freigesetzte DNA nach Antibiotikatherapie bestimmen zu können, wurden alle entnommenen Proben sofort zentrifugiert und für eine PCR aufgearbeitet; mit Hilfe der durchgeführten PCR sollte die Menge der freigesetzten bakteriellen DNA bestimmt werden.

Zwölf Stunden nach Infektion konnte bei allen Kaninchen, unabhängig zu welcher Gruppe die Kaninchen gehörten, eine gleich hohe Bakterienzahl im Liquor cerebrospinalis festgestellt werden (siehe Tabelle 7). Zu diesem Zeitpunkt zeigten alle Kaninchen ernsthafte klinische Symptome einer bakteriellen Infektion wie etwa Fieber und Opisthotonus. 21% der insgesamt 24 Kaninchen starben vor Beendigung des Versuches; 13% davon gehörten zur Ceftriaxon-Gruppe, 8% zur Rifampicin-Gruppe.

In beiden Versuchsgruppen konnte 12 Stunden nach Antibiotikagabe eine Verminderung der Bakterienzahl im Liquor bis unter die Nachweisgrenze von 100 CFU/ml festgestellt werden (siehe Tabelle 7).

Im Verlauf nach Antibiotikagabe zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede in beiden Gruppen in Bezug auf die Menge freigesetzter DNA. Bei der Gruppe, die nur mit Ceftriaxon behandelt wurde, zeigte sich eine deutliche Bakteriolyse. Daraus resultierend konnte zwei Stunden nach Antibiotikagabe ein deutlicher Anstieg bakterieller DNA nachgewiesen werden (siehe Abb. 13). Im Vergleich hierzu zeigte sich in der Gruppe, die mit Rifampicin vorbehandelt worden war, 14 Stunden nach Infektion eine deutlich geringere Konzentration freigesetzter bakterieller DNA (siehe Abb. 13).

Tabelle 7: bakterielle Konzentration im Liquor (log₁₀ CFU/ml)^o; °Median (min-max); paired t-test von log₁₀ CFU/ml/h (p=0,002)

Zeit nach Infektion (h)	Ceftriaxon Gruppe	Rifampicin Gruppe
12	7,00 (6,00-8,48)	7,00 (7,00-8,48)
14	5,60 (3,00-7,30)	6,48 (5,90-8,30)
18	<2,00	4,30 (<2,00-5,90)
24	<2,00	<2,00 (<2,00-2,00)

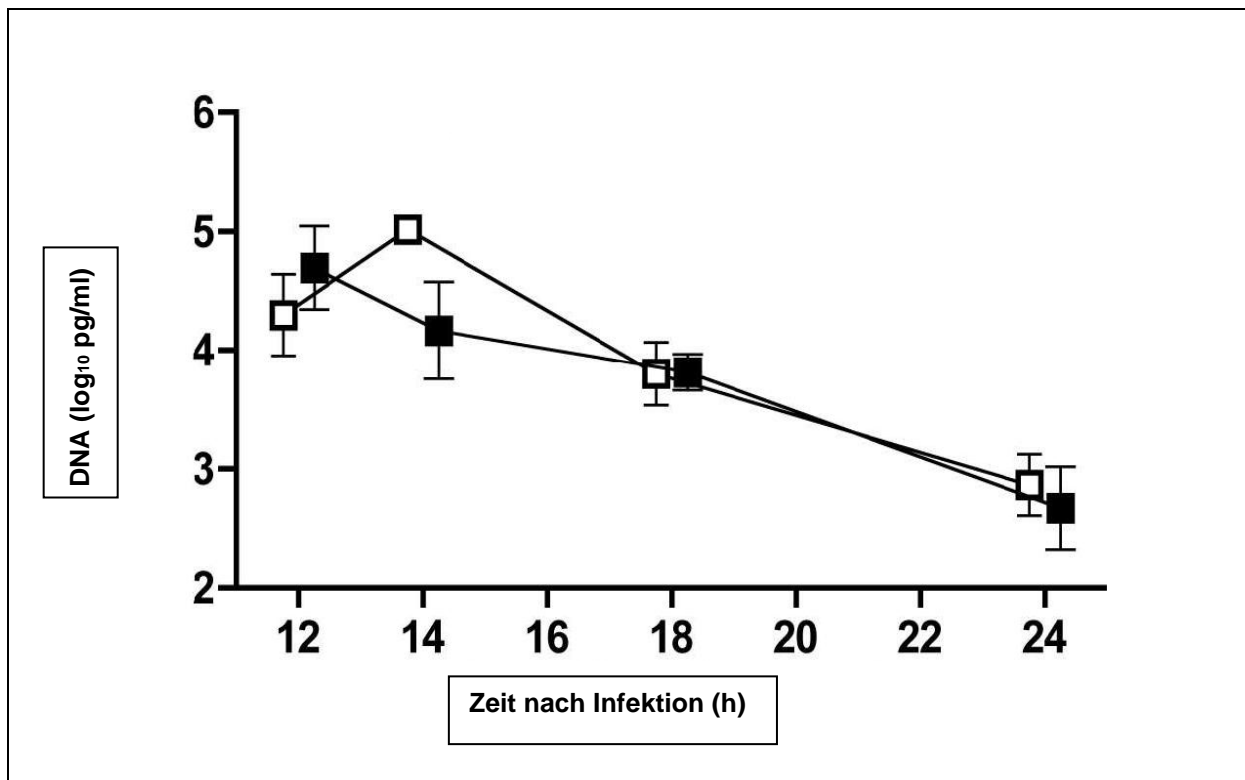


Abbildung 13: Konzentration bakterieller DNA in Kaninchenliquor nach Standard- Antibiotikatherapie mit Ceftriaxon und nach Vorbehandlung mit Rifampicin für eine Stunde; (□ Ceftriaxon, ■ Rifampicin/ Ceftriaxon); Spreer et al. (2009), S. 2255

4. Diskussion

4.1 Probleme bei der Behandlung bakterieller Meningitiden

Eine bakterielle Meningitis stellt nach wie vor eine der gefährlichsten Infektionskrankheiten dar. Systemische und neurologische Komplikationen treten gehäuft auf und resultieren in einer hohen Letalität sowie bei den überlebenden Patienten in einer hohen Rate an neurologischen Folgeerscheinungen (Weisfelt et al. 2006b). In vielen Fällen verläuft die Erkrankung letal oder geht mit gravierenden Spätfolgen einher (Wenger et al. 1990, Durand et al. 1993);

Hierzu zählen beispielsweise neuropsychologische Defizite und Hörstörungen, die bei 54% der Überlebenden zu Einschränkungen im täglichen Leben führen (Bohr et al. 1984, Dodge et al. 1984, Kragbjerg et al. 1994, Letson et al. 1992). Auch eine Hemiparese kann als Folgeerscheinung auftreten (Weisfelt et al. 2006b).

Aufgrund dieser hohen Rate an Langzeitschäden nach Infektion ist die Optimierung der Therapie von herausragender Bedeutung.

Die Therapie einer Pneumokokken-Meningitis sieht die Gabe von β -Lactam-Antibiotika wie Penicillin G oder Cephalosporinen vor.

In früheren großen klinischen Studien zur Anwendung von Dexamethason und Glycerol bei der Behandlung der bakteriellen Meningitis wurde die unterstützende Gabe von Dexamethason (de Gans und van de Beek 2002) sowie ein verbessertes Outcome bei oraler Gabe von Glycerol (Peltola et al. 2007) gezeigt. Insbesondere durch Dexamethason konnten Entzündungsreaktionen und systemische Komplikationen reduziert werden, was die Notwendigkeit einer anti-inflammatorischen Behandlung verdeutlicht (de Gans und van de Beek 2002).

Allerdings kann eine Behandlung mit Dexamethason auch nicht ohne Einschränkung empfohlen werden; in tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass genau eine solche Behandlung zu Neuronenschäden im Hippokampus und in der Folge langfristig zu Lernschwierigkeiten führen kann (Zysk et al. 1996, Leib et al. 2003, Spreer et al. 2006). Dabei kann Dexamethason eine neuronale Schädigung

hervorrufen, indem es die Apoptoserate neuronaler Zellen im hippokampalen Gyrus dentatus beeinflusst (Zysk et al 1996).

Ferner wurden bei Erwachsenen durch die Gabe von Kortikosteroiden bei chronischen Erkrankungen die Hippokampus-abhängigen Gedächtnisfunktionen negativ beeinflusst (Keenan et al. 1996). Bei Kindern, die als Frühgeborene mit Glukokortikoiden behandelt wurden, wird sogar vermutet, dass die Gabe von Dexamethason zu Entwicklungsverzögerungen, Hypertension, Hyperglykämien, gastrointestinalen Blutungen (Shinwell et al. 2000) sowie einer Beeinträchtigung neuropsychologischer Fähigkeiten führen kann (Yeh et al. 2004); ferner konnten in einer weiteren Studie mit Kindern, die ebenfalls als Frühgeborene mit Glukokortikoiden behandelt wurden, im Kleinkindalter eine verminderte neuronale motorische Funktion sowie ein vermindertes Körperwachstum und -gewicht bei den männlichen Patienten nachgewiesen werden (Yeh et al. 1998); sogar ein Anstieg des Risikos für zerebrale Lähmungen nach Kortikosteroidtherapie wird in der Literatur beschrieben (O`Shea et al. 1999, Shinwell et al. 2000).

Neuere Meta-Analysen stellen die Therapie mit Dexamethason ebenfalls in Frage. Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit bakterieller Meningitis eine Behandlung mit Dexamethason keine signifikante Reduktion neurologischer Folgeerscheinungen oder eines letalen Ausgangs der Erkrankung bewirkt (van de Beek et al. 2010). Ferner bleibt dabei ungeklärt, welche Patienten von einer Therapie mit Kortikosteroiden profitieren und unter welchen Umständen ein Nutzen aus einer Kortikosteroidtherapie gezogen werden kann (van de Beek et al. 2010, Nguyen et al. 2007, Scarborough et al. 2007).

Fest steht jedoch, dass gerade die Freisetzung bakterieller toxischer und proinflammatorischer Komponenten eine der kritischsten Phasen in der Entzündungsreaktion einer bakteriellen Meningitis darstellt (Nau und Brück 2002, Weber und Tuomanen 2007). Hierdurch wird das angeborene und erworbene Immunsystem angeregt; durch die angestoßene Entzündungsreaktion werden Entzündungskaskaden aktiviert, die zu einer Schädigung des neuronalen Gewebes führen. Daher gilt es, soweit möglich, diese Entzündungsreaktion zu vermeiden. Durch Anregung des Immunsystems werden Leukozyten und Immunzellen aktiviert und Entzündungsmediatoren und freie Radikale freigesetzt (Spreer et al. 2009). Je nach Entzündungsaktivität können diese freigesetzten Substanzen Schäden im

zentralen Nervensystem verursachen wie etwa freigesetztes Pneumolysin, das toxisch auf Neuronen wirkt (Braun et al. 2002, Stringaris et al. 2002).

Auch konnte bereits gezeigt werden, dass bei Patienten, die an einer bakteriellen Meningitis leiden, bakterielle proinflammatorische und toxische Substanzen wie Pneumolysin, Teichon- und Lipoteichonsäure in den Liquor cerebrospinalis freigesetzt werden (Spreer et al. 2003, Schneider et al. 1999).

Ziel dieser Arbeit war es daher, den Effekt einer Kombinationstherapie mit Rifampicin und Ceftriaxon auf die Freisetzung bakterieller DNA als proinflammatorischen Erregerbestandteil zu prüfen. Hierfür wurde eine rtPCR etabliert, um zunächst sowohl in vitro als auch im Verlauf anhand eines Kaninchenmodells in vivo die unterschiedlichen antibiotischen Therapien zu evaluieren.

Neben der bislang üblichen Ceftriaxontherapie wurde eine sequentielle Kombinationstherapie angewendet, bei der den Kaninchen eine Stunde vor Behandlung mit Ceftriaxon Rifampicin verabreicht wurde. Mit dieser Therapie wurde die Hypothese überprüft, dass Rifampicin zu einer verminderten Freisetzung bakterieller DNA und konsekutiv zu einer verminderten Entzündungsreaktion führt.

Zusätzlich wurde die PCR-Methode auf ihre Empfindlichkeit gegenüber der Anwendung einer bakteriellen Kultur überprüft. Dabei wurde der Frage nachgegangen, ob der Einsatz einer PCR einen schnelleren und genaueren Nachweis bakterieller DNA im Vergleich zum klassischen diagnostischen Vorgehen ermöglicht.

Bei der Etablierung der PCR zeigten sich Stärken und Schwächen der Methode, die im Folgenden diskutiert werden.

4.2 Etablierung einer Breitspektrum-PCR

Zur Quantifizierung bakterieller DNA wurde ein Protokoll für eine real-time-PCR etabliert; diese real-time-PCR basiert auf der Amplifikation des Gens, das für 16S-RNA codiert. Durch den Nachweis des Vorhandenseins von 16S-RNA kann von

einem bakteriellen Ursprung in der Probe ausgegangen werden. Da die Anzahl der Kopien des 16S-RNA-Gens zwischen den verschiedenen Meningitis-Erregern nur geringfügig variiert, kann anhand einer quantitativen PCR auf die Anzahl der Erreger geschlossen werden, die sich in der jeweiligen Probe befinden.

Nach Etablierung dieses Verfahrens anhand verschiedener Vorversuche wurde anschließend im Kaninchenliquor die Menge der im Überstand freigesetzten bakteriellen DNA bestimmt. Mit Hilfe eines intern mitgeführten Standards lässt sich dabei die Keimzahl, d.h. die Menge der die Meningitis verursachenden Erreger, quantitativ bestimmen.

4.2.1 Sensitivität der Polymerasekettenreaktion

Bei Anwendung einer PCR zeigen sich verschiedene Vorteile gegenüber den bisherigen konventionellen Methoden wie z.B. einer Bakterienkultur;

In der vorliegenden Arbeit wurde der Vorteil der hohen Sensitivität einer PCR genutzt, die es ermöglicht, unter optimalen Versuchsbedingungen schon kleinste DNA-Mengen der Zielsequenz zu vervielfältigen (Fredricks und Relman 1999);

dabei wurden in der vorliegenden Arbeit zur quantitativen Bestimmung der Keimanzahl die in der PCR gemessenen Werte anhand einer internen Standardreihe quantifiziert. Diese Werte wurden mit Hilfe der unter 3.1.2, S. 40 genannten Formel auf die quantitative Keimzahl hin umgerechnet. Dies wurde unter Berücksichtigung der Ausgangsmenge der einzelnen Proben sowie der vorgenommenen Verdünnungen, die sich bei Aufbereitung der DNA und für den Einsatz in die PCR als nötig erwiesen, durchgeführt.

Eine andere Methode, die jedoch nur zum Abschätzen der Keimzahl im Kulturmedium dient, ist die Messung mit Hilfe des McFarland-Standards. Dabei wird, wie bereits unter 3.2.2, S. 49 beschrieben, durch eine photometrische Messung der Bakteriendichte die Anzahl der Bakterien näherungsweise bestimmt.

In vitro wurden die unter 3.2.2, S.49 genannten Keime *Neisseria meningitidis*, *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae* und *Listeria monocytogenes* untersucht; zum einen wurde das Wachstum dieser Keime in humanem Liquor bestimmt, zum anderen

wurden mit der Auswahl dieser Keime die verschiedenen Zellwandbeschaffenheiten grampositiver und gramnegativer Keime in die Sensitivitätsbestimmung miteinbezogen.

Bei der konventionellen Methode hingegen wird eine Bakterienkultur auf einem Nährmedium angelegt. Hierfür wird eine mit Nährmedium gefüllte Flasche mit Keimen beimpft und nach ausreichender Inkubationszeit werden einzelne Proben sowie einzelne Verdünnungsstufen auf Blutagarplatten ausgeplattet; nach Bebrütung der Agarplatten kann näherungsweise die Keimzahl bestimmt werden.

Um in der Diagnostik die absolute Keimzahl bestimmen zu können, ist nicht nur die Kenntnis der jeweiligen Bakterien, sondern auch die Kenntnis der entsprechenden Genomgrößen von Bedeutung. Jedes Bakterium weist eine unterschiedliche Genomgröße auf, weshalb für jeden Erreger eine äquivalente Bakterienmenge berechnet werden kann.

Da z.B. *E.coli*-Bakterien ein höheres Genomgewicht aufweisen als z.B. *Streptokokken*, sind in 1pg bakterieller DNA unterschiedlich viele Bakterien der jeweiligen Spezies enthalten.

In der vorliegenden Arbeit wurden die einzelnen Proben anhand des internen Standards quantifiziert. Dieser wurde wie unter 3.1.2 beschrieben errechnet, wobei verallgemeinernd davon ausgegangen wurde, dass eine Million Basenpaare DNA 1fg wiegen.

4.2.2 Kontaminationsproblematik bei Anwendung einer PCR

Ein generell bestehendes Problem bei der Anwendung einer Polymerasekettenreaktion ist das mögliche Auftreten einer Kontamination der Proben. Sie äußert sich entweder in unspezifischen Signalen der jeweiligen DNA-Proben oder in auftretenden Signalen bei Negativkontrollen.

Prinzipiell wurden, um die Kontaminationsquellen der Negativkontrollen zu eliminieren, verschiedene Vorkehrungen getroffen. Den Empfehlungen von Kwok und Higuchi (1989) zufolge wurde zum einen eine strikte räumliche Trennung von DNA-Extraktion, PCR-Aufbereitung und LightCycler-Läufen eingehalten; zum

Anderen wurden Puffer, Primer, Wasser etc. separat aufbewahrt und bei Verdacht auf Kontamination sofort erneuert (Kwok und Higuchi 1989).

Als weitere Maßnahmen wurden für alle Arbeitsschritte separate Handschuhe, Pipettenspitzen und Eppendorf-Gefäße verwendet, die Arbeitsflächen nach jedem Gebrauch mit Alkohol desinfiziert und über Nacht mit UV-Licht bestrahlt (Kwok und Higuchi 1989).

Da es trotz dieser Maßnahmen in einer der Versuchsreihen zur Bakteriolyse bedingten Freisetzung bakterieller DNA in vitro (siehe auch 3.2.1, S.47) zu unerwünschten Signalen in der PCR kam, wurden die entsprechenden PCR-Läufe wiederholt oder, wenn dadurch keine Verbesserung der Ergebnisse erzielt werden konnte, die Proben neu aufgearbeitet und mit diesen Proben eine neue PCR erstellt. Auch wenn auf eine besonders saubere Verarbeitung der Proben sowie der LightCycler-Läufe geachtet wurde, stellt sich die Frage, ob allgemein z.B. die verwendeten Versuchsmaterialien mit Fremd-DNA kontaminiert sein könnten oder bei Verwendung kontaminiert werden könnten. Allerdings wurden auch hierfür verschiedene Vorkehrungen wie getrennte Aufbewahrung der Reagenzien, Trennung der Reagenzien in einzelne Aliquots etc. getroffen (Kwok und Higuchi 1989), um eine Kontamination zu verhindern.

In verschiedenen Studien wurden ähnliche Kontaminationsprobleme beschrieben (Corless et al. 2000), die ebenfalls durch oben genannte Maßnahmen versucht wurden zu eliminieren.

Es bleibt jedoch zu diskutieren, inwieweit und ob überhaupt eine vollständige Dekontaminierung von Fremd-DNA erreicht werden kann. Eine Forschergruppe aus Bonn (Klaschik et al. 2002) berichtet, verschiedene Methoden der Dekontaminierung angewendet zu haben, unter Anderem eine Bestrahlung mit UV-Licht; allerdings konnte keine vollständige Dekontaminierung erreicht werden, vielmehr wurde durch die versuchten Maßnahmen die PCR in ihrer Reaktion gehemmt (Klaschik et al. 2002).

Des Weiteren wird berichtet, dass bereits die Reagenzien häufig mit Fremd-DNA kontaminiert sind (Klaschik et al. 2002, Meier et al. 1993). In einer Studie aus den USA konnte sogar gezeigt werden, dass in 85% der kommerziell erworbenen PCR-Master-Mix Reagenzien bereits Kontaminationen enthalten waren (Silkie et al. 2008). Bei der vorliegenden Arbeit wurde, sofern in den PCR-Läufen unspezifische Signale in der Aufarbeitungskontrolle oder der Negativkontrolle der PCR auftraten, davon

ausgegangen, dass die jeweilige Kontamination bei positiver Aufarbeitungskontrolle in der Verarbeitung der Proben bzw. bei positiver PCR-Kontrolle im Ansetzen der PCR-Läufe zustande gekommen sein muss; bei Kontamination der PCR-Kontrolle wurden die betroffenen Läufe erneut erstellt, während bei Verdacht auf Kontamination einzelner Proben diese verworfen wurden, die entsprechenden Proben neu aufgearbeitet und ein neuer PCR-Lauf erstellt wurde;

Gerade jedoch bei den PCR-Läufen, die auf Kontaminationen in den Proben schließen lassen, bleibt letztlich ungeklärt, ob die Kontaminationen während der Aufarbeitung entstanden oder schon vorher als Fremd-DNA in den Proben enthalten waren.

Eine vollständige und sichere Vermeidung einer Kontamination der Ausgangsmaterialien oder der Proben wird nicht erreicht werden können; Ziel kann es daher letztendlich nur sein, durch möglichst steriles Arbeiten und Einhaltung oben erläuteter Maßnahmen eine Kontamination der Proben oder der Reagenzien weitestgehend zu vermeiden und bei begründetem Verdacht die PCR-Läufe bzw. die Aufarbeitung der Proben zu wiederholen.

4.2.3 Bedeutung der Polymerasekettenreaktion in der Routine-Diagnostik

Um die Bedeutung einer Breitspektrum-PCR in der Diagnostik abwägen zu können, müssen primär die Vor- und Nachteile dieser Methode abgewogen werden. Als besondere Vorteile einer PCR können vor allem die hohe Sensitivität und die relativ einfache und schnelle Handhabung genannt werden.

Schon wenige Stunden nach Probeneingang können Ergebnisse erzielt und die daraus nötigen Konsequenzen für eine Therapie gezogen werden. Somit stellt die schnelle Anwendung einen Vorteil gegenüber der konventionellen Diagnostik dar (Uzuka et al. 2004; Ren et al. 2010; Jbara et al. 2007, Rafi et al. 2010), bei der gerade bei langsam wachsenden Keimen von einer Zeitdauer bis zu 48 Stunden ausgegangen werden muss (Welinder-Olsson et al. 2007);

Anhand einer PCR kann theoretisch ein einzelner Erreger nachgewiesen und selbst kleinste DNA-Spuren können vervielfältigt werden. Die extrem hohe Sensitivität kann

also durchaus als Vorteil dienen. Selbst nach Beginn einer kalkulierten Antibiose ist eine Keimidentifizierung mit Hilfe einer PCR möglich. Dies wird in einer Studie aus dem Jahre 2009 beschrieben (Chakrabarti et al. 2009), in der 267 CSF-Proben untersucht wurden und die Patienten bereits vor Liquorentnahme mit Antibiotikum behandelt worden waren. Dafür verantwortlich gemacht wird die Tatsache, dass bei einer PCR keine bestimmte Keimzahl nötig ist, sondern schon kleinste Mengen bakterieller DNA ausreichen, um die Zielsequenz zu amplifizieren.

Des Weiteren wird die geringere Anfälligkeit der PCR im Vergleich zur Kultur gegenüber der bereits sinkenden Keimzahl nach Antibiotikagabe damit begründet, dass bei einer PCR keine lebenden Bakterien benötigt werden und dadurch die PCR weniger durch eine antimikrobielle Therapie beeinflusst wird (Resti et al. 2009). Unklar jedoch bleibt, wie lange nach Antibiotikagabe der DNA-Nachweis positiv bleibt (Resti et al. 2009).

Die hohe Sensitivität bedeutet in der Praxis jedoch auch eine potenziell mögliche Vervielfältigung von Kontaminations- oder Fremd-DNA aus den eingesetzten Proben oder den Versuchsmaterialien. Somit ist in der hohen Sensitivität der PCR auch ein Nachteil zu sehen, der den großen Nutzen der hohen Sensitivität wieder deutlich schmälert.

Insgesamt wird die PCR in der Literatur den bisherigen konventionellen Methoden wie der Kultur in vielen Fällen vorgezogen. Duan (Duan et al. 2009) und Poppert (Poppert et al. 2005) beschreiben die PCR als sensitivere Methode verglichen mit der Kultur. Weiterhin werden bei Resti et al. (2009) molekulare Methoden bei Pneumokokken-induzierten Erkrankungen als sensitivere Verfahren beschrieben. Ferner kann nach Anwendung einer real-time-PCR und Identifizierung des Keimes anhand eines intern mitgeführten Standards das Ausmaß der Bakteriämie ermittelt werden; anhand der Bakteriämie wiederum kann schließlich auf die klinische Relevanz geschlossen und das klinische Verständnis verbessert werden (Peters et al. 2009).

Ein weiterer Vorteil der PCR liegt in einer zunehmend leichteren Umsetzbarkeit und zunehmend geringerem Kostenaufwand, da immer mehr standardisierte Kits auf den Markt kommen, die die Handhabung und Anwendbarkeit erleichtern.

Natürlich dürfen darüber hinaus jedoch nicht die Kosten vergessen werden, die in der Anschaffung und Wartung der Geräte sowie den Personalkosten zur Einweisung in die Geräte, deren Betrieb und Interpretation der Ergebnisse liegen.

Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass aufgrund oben genannter Vorteile die PCR in der Literatur zunehmend als nützliche Ergänzung zur konventionellen Diagnostik in der klinischen Routine-Diagnostik (Chakrabarti et al. 2009) gesehen werden kann; auch als unterstützende Methode in der Diagnostik nach bereits erfolgter Antibiotika-Therapie (Deutch et al. 2006) sowie insbesondere als Multiplex-PCR zur Diagnosestellung unklarer Meningitisfälle (Ren et al. 2010) kann eine PCR gewinnbringend eingesetzt werden und stellt dadurch einen zunehmend wichtigeren Anteil in der Routinediagnostik dar.

4.3 Therapie der bakteriellen Meningitis

Für die vorliegende Arbeit wurde die Freisetzung proinflammatorischer bakterieller DNA nach Antibiotikagabe in vivo mithilfe einer Breitspektrum PCR untersucht. Hierfür wurden verschiedene Antibiotika verwendet;

zum einen Ceftriaxon, ein β -Laktam-Antibiotikum, das die Zellwandsynthese hemmt und zum anderen Rifampicin, ein Ansamycin, das die Proteinsynthese inhibiert.

Ein Vorteil bei der Therapie mit β -Lactamen wie Ceftriaxon liegt darin, dass eine schnelle Sterilisation des Liquors erreicht wird (Stuertz et al. 1999).

Ein Nachteil der Therapie mit β -Laktam-Antibiotika zeigt sich jedoch in der verstärkten Freisetzung von Teichon- und Lipoteichonsäure aus der Zellwand. Diese Komponenten stellen potente proinflammatorische Substanzen der bakteriellen Zellwand von *Streptococcus pneumoniae* dar (Stuertz et al. 1998); werden diese Substanzen freigesetzt, kommt es zu einem plötzlichen Entzündungsanstieg (Stuertz et al. 1999), verbunden mit klinischer Verschlechterung des Patienten.

Ferner konnte gezeigt werden, dass es bei einer geringeren Dosis der Antibiotika zu einer größeren Freisetzung bakterieller Komponenten kommt als ohne antibiotische Therapie; daher gilt es die Therapie nicht mit einer geringen Dosis zu beginnen (Stuertz et al. 1998).

Die Freisetzung der Entzündungsmediatoren sowie der proinflammatorischen und toxischen Substanzen kann also durch die Wahl der Antibiotika beeinflusst werden. Dabei gilt es eine Therapieform zu finden, bei der es nicht zu einer vermehrten

Freisetzung toxischer Komponenten in den Liquor cerebrospinalis und dadurch bedingter notwendiger Gabe von Immunsuppressiva kommt.

Eine Ergänzung der Medikation mit Dexamethason zur Vermeidung einer generalisierten Entzündung wird nach Ergebnissen neuer Metaanalysen nicht mehr empfohlen; nach van de Beek et al. (2010) konnte bei Patienten mit bakterieller Meningitis durch die Behandlung mit Dexamethason keine signifikante Reduktion neurologischer Folgeerscheinungen gezeigt werden. Vielmehr wird eine neuronale Schädigung sowie eine erhöhte Apoptoserate neuronaler Zellen im hippocampalen Gyrus dentatus beschrieben (Zysk et al. 1996).

Einen vielversprechenden Therapieansatz stellt die Gabe von Proteinsynthese hemmenden Antibiotika wie Rifampicin dar (Stuertz et al. 1998). Als Ansamycin hemmt es die Synthese der RNA (Stuertz et al. 1998) und der Proteinsynthese, Wachstum und Replikation der Bakterien werden minimiert (Mason et al. 1995).

Da diese Antibiotika bakterizid wirken, ohne bei einer Lyse die Zellwände zu zerstören, kommt es insgesamt zu einer geringeren Freisetzung proinflammatorischer und toxischer Komponenten als bei bakteriolytisch wirkenden Antibiotika (Orman und English 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand der, wie unter 3.3.2, S. 54 beschrieben, gewonnenen Proben mit Hilfe der etablierten PCR die erhöhte Freisetzung bakterieller DNA zwei Stunden nach Beginn der Ceftriaxongabe deutlich gezeigt (siehe auch Abb. 13, S. 56). Dieser plötzliche und verstärkte Anstieg bakterieller Komponenten nach Gabe von β -Laktam-Antibiotika führt vermutlich zu einer Verschlechterung der klinischen Symptome, wahrscheinlich sogar gefolgt von einem schlechteren klinischen Outcome.

In einer Studie an Kindern, die an einer Meningitis durch *Haemophilus influenzae* erkrankt waren, konnte nach Gabe von β -Lactam-Antibiotika ein deutlicher Anstieg freigesetzten Endotoxins und einer dadurch verstärkt hervorgerufenen Entzündungsreaktion nachgewiesen werden (Arditi et al. 1989).

Die klinische Bedeutsamkeit einer Freisetzung von Endotoxin wurde insbesondere bei Erkrankungen wie Urosepsis und Meningitis untersucht (Holzheimer 2001); in diversen Tierversuchen, bei denen *E. coli*-, *Pseudomonas-aeruginosa*- und *Staphylococcus-aureus*-induzierte Peritonitiden bzw. Septikämien vorlagen sowie in einem Mausmodell zur *E. coli*-assoziierten Peritonitis sowie *Streptococcus-pneumoniae*-assoziierten Meningitis konnte sogar gezeigt werden, dass eine

verminderte Freisetzung proinflammatorischer bakterieller Komponenten, wie etwa des Endotoxins, mit einer geringeren Mortalität als auch Morbidität assoziiert ist (Nau und Eiffert 2002, Harnden et al. 2006, Friedland et al. 1993a, Azeh et al. 2002).

Ferner wurde bei Verwendung Proteinsynthese hemmender Antibiotika wie Rifampicin, Clindamycin, Doxycyclin oder Daptomycin im Vergleich zur Verwendung von β -Laktam Antibiotika eine Abnahme neuronaler Gewebeschädigung festgestellt (Böttcher et al. 2004, Nau et al. 1999, Böttcher et al. 2000, Grandgirard et al. 2007, Meli et al. 2006).

Im Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass nach Gabe von Antibiotika die Höhe des Endotoxinanstiegs maßgeblich von der Wahl der Antibiotika (Holzheimer 2001, Dofferhoff et al. 1991) abhängt, während unabhängig von der Antibiotikawahl ein ähnlicher Rückgang der Bakteriämie verzeichnet wurde (Holzheimer 2001).

Die Antibiotika assoziierte Freisetzung von Endotoxin sowie die Phagozytoserate hängt dabei von verschiedenen Faktoren wie zum Beispiel Art der Infektion sowie Entzündungsort, Virulenz der Erreger, Morphologie der Bakterien, Gram-Positivität oder -Negativität der Bakterien sowie von der Dosierung und Applikationsart der Antibiose ab (Holzheimer 2001, Periti und Mazzei 1999).

Wie bereits erwähnt ist es bei der Behandlung von Patienten, die an ernstesten bakteriellen Infektionen erkrankt sind, besonders wichtig eine adäquate Auswahl an Antibiotika zu treffen sowie frühzeitig mit der Behandlung zu beginnen. Um eine Resistenzentwicklung der Keime zu vermeiden, empfiehlt sich insbesondere bei Anwendung von Rifampicin eine Kombinationstherapie anzuwenden. Bei der Behandlung Penicillin-resistenter Pneumokokken wird eine Kombination aus Ceftriaxon und Rifampicin empfohlen (Tunkel et al. 2004, Weisfelt et al. 2006a).

Rifampicin wird empfohlen, da es aufgrund seiner hohen Lipophilie die Blut-Hirnschranke überwinden und so in den Liquor vordringen kann (Nahata et al. 1990, Nau et al. 1992). Des Weiteren ist Rifampicin als Antibiotikum gegen alle in Deutschland üblichen Erreger einer ambulant erworbenen Meningitis, wie etwa *S. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *H. influenzae* und *N. meningitidis* (Weisfelt et al. 2006a, Hof 2003, Stille et al. 2005, Yogev et al. 2005) aktiv; auch wird es neben Ceftriaxon zur Prophylaxe nach Kontakt mit an einer Meningitis erkrankten Person (Stille et al. 2005) empfohlen.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde eine sequentielle Kombinationstherapie aus Rifampicin und Ceftriaxon angewendet. Generell gilt dabei, dass die Wirkung einer

Antibiose maßgeblich vom Zeitpunkt des Beginns der Therapie abhängt. Als prinzipiell besonders wichtig gilt dabei die frühzeitige Gabe der Antibiotika, da es sonst zu einem Anstieg der Mortalität kommen kann.

Allerdings gibt es unterschiedliche Daten, was die Zeitdauer zwischen Krankenhausaufnahme, Beginn der antibiotischen Therapie sowie dem Outcome der Patienten betrifft; nach Proulx et al. (2005) zeigt sich kein prognostischer Unterschied, ob der Beginn einer antibiotischen Therapie innerhalb der ersten zwei Stunden oder zwischen zwei und vier bzw. vier und sechs Stunden nach Krankenhausaufnahme erfolgt; zu einem deutlichen Anstieg der Mortalitätsrate kommt es erst sobald die Zeit der Krankenhausaufnahme bis zur Antibiotikagabe mehr als sechs Stunden beträgt.

In einer weiteren Studie konnte allerdings gezeigt werden, dass bereits eine Zeitverzögerung von drei Stunden zwischen Krankenhausaufnahme und Beginn der antibiotischen Therapie den prognostisch ungünstigsten Faktor für eine steigende Mortalität innerhalb der ersten drei Monate darstellt (Anburtin et al. 2006).

Im Hinblick darauf wurde für die in vivo Versuche des Kaninchenmodells ein Behandlungsschema evaluiert, bei dem den Kaninchen zuerst Rifampicin verabreicht wurde, gefolgt von Ceftriaxon nur eine Stunde später.

In bisherigen Studien konnte nach einer Vorbehandlung mit Rifampicin für sechs Stunden eine Reduktion der Apoptoserate um nahezu 60% gezeigt werden (Gerber et al. 2003); anhand der zu dieser Arbeit parallel durchgeführten Versuche konnte von Herrn V. Stoltefaut bereits eine Stunde nach Beginn der Vorbehandlung mit Rifampicin eine Verminderung der Apoptoserate um 30% nachgewiesen werden (Spreer et al. 2009).

Mithilfe der PCR wurde schließlich gezeigt, dass bereits eine Vorbehandlung mit Rifampicin für nur eine Stunde eine durch Ceftriaxon hervorgerufene Bakteriolyse und einen Anstieg bakterieller Produkte vermindert; damit verbunden konnte eine reduzierte Entzündungsreaktion sowie verminderter Neuronenschaden (Spreer et al. 2009) nachgewiesen und infolgedessen von einem verbesserten klinischen Outcome der Patienten ausgegangen werden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden anhand verschiedener Versuche die Auswirkungen unterschiedlicher antibiotischer Therapien auf die Bakteriolysebedingte Freisetzung bakterieller DNA im Liquor cerebrospinalis hin untersucht.

Nach Durchführung verschiedener Vorversuche wurden zuerst verschiedene Versuchsreihen in vitro durchgeführt. Um gleiche Startbedingungen zu schaffen, wurde hierfür eine TSB-Stammlösung mit Pneumokokken beimpft und, nachdem sie sich in der logarithmischen Wachstumsphase befand, in einzelne Subkulturen aufgeteilt und mit unterschiedlichen Antibiotika behandelt. Es wurden Proben vor Beginn der antibiotischen Therapie entnommen und zu verschiedenen Zeitpunkten im weiteren Verlauf. Um die abgetöteten von den noch lebenden Bakterien im Überstand zu trennen, wurden die entnommenen Proben vor der weiteren Verarbeitung zentrifugiert.

Um hingegen die Freisetzung bakterieller DNA in vivo während der antibiotischen Therapie untersuchen zu können, wurde eine Versuchsreihe mit Kaninchen durchgeführt; nach subokzipitaler Punktion und intrazisternaler Injektion mit Pneumokokken wurden die Kaninchen nach Entwicklung einer Meningitis mit einer sequentiellen Kombinationstherapie aus dem Chemotherapeutikum Rifampicin und dem Cephalosporin Ceftriaxon behandelt. Anschließend wurde den Kaninchen zu unterschiedlichen Zeitpunkten Liquor entnommen und dieser zentrifugiert, um die freigesetzte bakterielle DNA im Überstand nachweisen zu können. Diese Versuche wurden von Frau PD Dr. A. Spreer und Herrn V. Stoltefaut durchgeführt.

Das aus diesen Versuchsreihen gewonnene Probenmaterial wurde für die vorliegende Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Von den Proben wurden zum einen zum Keimnachweis Kulturen angelegt und nach entsprechender Inkubationszeit ausgewertet.

Zum anderen wurde ein PCR-Protokoll etabliert, das auf der Amplifikation von DNA, die für bakterielle 16S-RNA codiert, basiert und mit an hoch konservierte Regionen bindenden Primern arbeitet. Eine Quantifizierung der bei der PCR gewonnenen bakteriellen DNA erfolgte mit Hilfe eines bei der PCR mitgeführten internen Standards.

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der Ergebnisse Folgendes gezeigt werden: In den mit Pneumokokken versehenen Kulturen konnte bei einer Vorbehandlung mit Rifampicin für nur 30 Minuten im Gegensatz zur alleinigen Ceftriaxontherapie eine verminderte Freisetzung bakterieller DNA nachgewiesen werden.

Ferner konnte in unserem Kaninchenmodell in vivo gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung mit Rifampicin für nur eine Stunde eine Ceftriaxon-bedingte Bakteriolyse und Freisetzung bakterieller DNA verringert und somit die Entzündungsreaktion und dadurch bedingten neuronalen Zellschaden vermindert (Spreer et al. 2009).

Neben diesen Ergebnissen wurde in der vorliegenden Arbeit die absolute Notwendigkeit einer Optimierung in der Therapie der bakteriellen Meningitis grundlegend erläutert.

Im Hinblick auf die vorliegenden Ergebnisse wird deutlich, dass eine Optimierung in der Behandlung einer bakteriellen Meningitis eine Modifikation der Antibiotikatherapie bedeutet: auf der einen Seite die vorausgehende Therapie mit einem Proteinsynthesehemmer wie Rifampicin, um eine möglichst gute neuroprotektive Wirkung zu erreichen; und auf der anderen Seite ein möglichst frühzeitiger Beginn der leitliniengerechten Therapie mit einem β -Laktam-Antibiotikum wie Ceftriaxon.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bei der antibiotischen Behandlung einer bakteriellen Meningitis eine sequentielle Kombinationstherapie mit Rifampicin und Ceftriaxon in einer verminderten Freisetzung proinflammatorischer Erregerbestandteile und konsekutiv einer geringeren Entzündungsaktivität resultiert.

6. Abkürzungen

A	Absorption
Abb.	Abbildung
Ad	aqua destillata
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
CFU	colony forming units
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CSF	Liquor; (engl.) cerebro-spinal-fluid
DNA	Desoxyribonukleinsäure; (engl.) desoxyribonucleic acid
d	dezi
D	Drainage
E. coli	Escherichia coli
E-Cup	Eppendorf-Gefäß
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
f	femto (10^{-15})
g	Gravitationskonstante
G	Gramm
h	Stunde
HCl	Wasserstoffchlorid
H ₂ O	Diwasserstoffmonoxid
H. influenzae	Haemophilus influenzae
IL	Interleukin
L	Liter
L. monocytogenes	Listeria monocytogenes
Log, log	Logarithmus
LP	Liquorpunktion
μ	mikro (10^{-6})
m	milli (10^{-3})
M	Meter
mol	Mol

MyD	Myeloid-differentiation-factor
n	nano (10^{-9})
NaCl	Natriumchlorid
N. meningitidis	Neisseria meningitidis
NO	Stickstoffmonoxid; (engl.) nitric oxide
OD	Optische Dichte
p	piko (10^{-12})
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PCR	Polymerasekettenreaktion; (engl.) polymerase chain reaction
PRR	Pathogen-recognition receptor
RNA	Ribonukleinsäure; (engl.) ribonucleic acid
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure; (engl.) ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
rtPCR	real-time-PCR
s.	siehe
S. pneumoniae	Streptococcus pneumoniae
Tab.	Tabelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
TM	Schmelzpunkt; (engl.) melting temperature
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSB	Sojabrühe; (engl.) tryptic soya broth
u.a.	unter anderem
unv.	unverdünnt
UV	ultraviolett

7. Literaturverzeichnis

Akira S (2003): Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15, 5-11

Anburtin M, Wolff M, Charpentier J, Varon E, Le Tulzo Y, Girault Ch, Mohammedi I, Renard B, Mourvillier B, Bruneel F (2006): Detrimental role of delayed antibiotic administration and penicillin-nonsusceptible strains in adult intensive care unit patients with pneumococcal meningitis: The PNEUMOREA prospective multicenter study. *Crit Care Med* 34 (11), 2758-2765

Arditi M, Ables L, Yoegev R (1989): Cerebrospinal fluid endotoxin levels in children with *H. influenzae* meningitis before and after administration of intravenous ceftriaxone. *J Infect Dis* 160 (6), 1005-1011

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 *Streptococcus aureus* sepsis compared with the cell wall active ceftriaxone. *Crit Care Med* 30 (7), 1560-1564

Bagasra O, Hansen J: *In Situ PCR Techniques*. Wiley-Liss, New York 1997

Barton GM, Medzhitov R (2002): Toll-like receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* 270, 81-92

Beek van de D, Gans de J, McIntyre P, Prased K (2004 a): Steroids in adults with acute bacterial meningitis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 4, 139-143

Beek van de D, Gans de J, Spanjaard L, Weisfelt M, Reitsma JB, Vermeulen M (2004 b): Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 351, 1849-1859

Beek van de D, Gans de J, Tunkel AR, Wijdicks EF (2006): Community-acquired bacterial meningitis in adults. *N Engl J Med* 354, 44-53

Beek van de D, Farrar JJ, Gans de J, Nguyen THM, Molyneux EM, Peltola H, Peto TE, Roine I, Scarborough M, Schultz C (2010): Adjunctive dexamethasone in bacterial meningitis : a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Neurol* 9, 254-263

Betzl Ch, Gour P, Pal, Saenger W (1988): Three-dimensional structure of proteinase K at 0.15-nm resolution. *Eur J Biochem* 178, 155-171

Bohr V, Paulsen OB, Rasmussen N (1984): Pneumococcal meningitis. Late neurologic sequelae and features of prognostic impact. *Arch Neurol* 41 (10), 1045-1049

Böttcher T (2009) : Pathophysiology of Neuronal Injury in Bacterial Meningitis and Experimental Adjunctive Therapeutic Approaches. *Fortschr Neurol Psychiatr* 77,07-09

Böttcher T, Gerber J, Wellmer A, Smirnov AV, Fakhrjanali F, Mix E, Pilz J, Zettl UK, Nau R (2000): Rifampicin 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 a neuroprotective in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis compared with ceftriaxone. *J Neurochem* 91, 1450-1460

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

Burroughs M, Rozdzinski E, Geelen S, Tuomanen E (1993): A structure-activity relationship for induction of meningeal inflammation by muramyl peptides, *J Clin Invest* 92, 297-302

Chakrabarti P, Das BK, Kapil A (2009): Application of 16S rRNA based seminested PCR for diagnosis of acute bacterial meningitis. *Indian Med Res* 129 (2), 182-188

Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards- Jones V, Kaczmarski EB, Fox AJ (2000): Contamination and Sensitivity Issues with a Real- Time Universal 16S rRNA PCR. *J Clin Microbiol* 38 (5), 1747-1752

Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, Idanpaan-Heikkila I, Tuomanen EI (1995): Streptococcus pneumonia anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* 377 (6548), 435-438

Currie AJ, Davidson DJ, Reid GS, Bharya S, MacDonald KL, Devon RS, Speert DP (2004): Primary immunodeficiency to pneumococcal infection due to a defect in Toll-like receptor signaling. *J Pediatr* 144, 512-518

Deutch S, Pedersen LN, Pødenphant L, Olesen R, Schmidt MB, Møller JK, Ostergaard L (2006): Broad-range real time PCR and DNA sequencing for the diagnosis of bacterial meningitis. *Scand J Infect Dis.* 38 (1), 27-35

DGN – Deutsche Gesellschaft für Neurologie: bakterielle (eitrige) Meningoenzephalitis; Expertengruppe Pfister H-W, Eiffert H, Müller M, Nau R. Leitlinien der DGN, DGN, o.O. 2008

DGN – Deutsche Gesellschaft für Neurologie: bakterielle (eitrige) Meningoenzephalitis; Expertengruppe Pfister H-W, Eiffert H, Müller M, Nau R. Leitlinien der DGN, DGN, o.O. 2009

Dodge PR, Davis H, Feigin RD, Holmes SJ, Kaplan SL, Jubelirer DP, Stechenberg BW, Hirsh SK (1984): Prospective evaluation of hearing impairment as a sequela of acute bacterial meningitis. *N Engl J Med* 311 (14), 869-874

Dofferhoff AS, Nijland JH, de Vries- Hospers HG, Mulder PO, Bom VJ (1991): Effects of different types and combination of antimicrobial agents on endotoxin release from

gram. Negative bacteria: an in-vitro and in-vivo study. *Scand J Infect Dis* 23 (6), 745-754

Duan QJ, Shang SQ, Wu YD (2009): Rapid diagnosis of bacterial meningitis in children with fluorescence quantitative polymerase chain reaction amplification in the bacterial 16S rRNA gene. *Eur J Pediatr* 168 (2), 211-216

Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, Miller SI, Southwick FS, Caviness VS Jr., Swartz MN (1993): Acute bacterial meningitis. A review of 493 episodes. *N Engl J Med* 328, 21-28

Feldman C, Anderson R (2011): Bacteraemic pneumococcal pneumonia: current therapeutic options. *Drugs* 71 (2), 131-153

Fogel GB, Collins CR, Brunk CF (1999): Prokaryotic Genome Size and SSU rDNA Copy Number: Estimation of Microbial Relative Abundance from a Mixed Population. *Microb Ecol* 38, 93-113

Fredricks DN, Relman DA (1999): Application of PCR to the Diagnosis of infectious diseases. *Clin Infect Dis* 29, 475-488

Friedland IR, Jafari H, Ehrett S, Rinderknecht S, Paris M, Coulthard M, Saxen H, Olsen K, McCracken GH Jr. (1993a): Comparison of endotoxin release by different antimicrobial agents and the effect on inflammation in experimental *Escherichia coli* meningitis. *J Infect Dis* 168 (3), 657-662

Friedland IR, Paris M, Ehrett S, Hickey S, Olsen K, McCracken GH Jr. (1993b): Evaluation of antimicrobial regimens for treatment of experimental penicillin- and cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 8, 1630-1636

Gans de J, Beek van de D (2002): Dexamethasone in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 347, 1549-1556

Gerber J, Pohl K, Sander V, Bunkowski S, Nau R (2003): Rifampicin 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 (4), 1313-1317

Gleixner C, Müller M, Wirth S-B: *Neurologie und Psychiatrie*. medizinische Verlags- und Informationsdienste, Herausgeber Müller M; 6. Auflage, Breisach 2007/ 08

Grandgirard D, Schürch C, Cottagnoud P, Leib SL (2007): Prevention of brain injury by the nonbacteriolytic antibiotic daptomycin in experimental pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 51 (6), 2173- 2178

Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D (1994): Primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 32, 335-351

Harnden A, Ninis N, Thompson M, Perera R, Levin M, Mant D, Mayon- White R (2006): Parenteral penicillin for children with meningococcal disease before hospital admission: Case-controlled study. *BMJ* 332, 1295-1298

Herxheimer K, Krause K (1902): Über eine bei Syphilitischen vorkommende Quecksilberreaktion. *Dtsch Med Wochenschr* 28, 895-897

Hof H (2003): Listeriosis: Therapeutic options. *FEMS Immunol Med Microbiol* 35, 203-205

Holzheimer RG (2001): Antibiotic induced endotoxin release and clinical sepsis: a review. *J Chemother*, 13 Spec No 1 (1), 159-172

Hussein AS, Shafran SD (2000): Acute bacterial meningitis in adults. A 12-year review. *Medicine* 79, 360-368

Iliev AI, Stringaris AK, Nau R, Neumann H (2004): Neuronal injury mediated via stimulation of microglial toll-like receptor-9 (TLR-9). *FASEB J* 18, 412-414

Janeway CA Jr., Medzhitov R (2002): Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216

Jackson JJ, Kropp H (1992): β -Lactam antibiotic-induced release of free endotoxin: in vitro comparison of penicillin-binding protein (PBP) 2-specific imipenem and PBP 3-specific ceftazidime. *J Infect Dis* 165, 1033-1041

Jbara I, Baysallar M, Kilic A, Yetiser S, Unay B, Acikel C, Yapar M, Doganci L (2007): Comparison of culture and polymerase chain reaction methods for the detection of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* in cerebrospinal fluids and middle ear effusions. *Mikrobiyol Bul* 41 (4), 495-502

Kastenbauer S, Pfister H-W (2003): Pneumococcal meningitis in adults: Spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases. *Brain* 126, 1015-1025

Keenan PA, Jacobson MW, Soleymani RM, Mayes MD, Stress ME, Yaladoo DT (1996): The effect on memory of chronic prednisone treatment in patients with systemic disease. *Neurology* 47, 1396-1402

Kengatharan KM, De Kimpe S, Robson C, Foster SJ, Thiemermann C (1998): Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. *J Exp Med* 188, 305-315

Klaschik S, Lehmann LE, Raadts A, Hoeft A, Stuber F (2002): Comparison of different decontamination methods for reagents to detect low concentrations of bacterial 16S DNA by real-time-PCR. *Mol Biotechnol* 22 (3), 231-242

Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG (1971): Studies on polynucleotides: XCVI. Repair replications of short synthetic DNAs as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol* 56, 341-361

Klugman KP, Friedland IR, Bradley JS (1995): Bactericidal activity against cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in cerebrospinal fluid of children with acute bacterial meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 1988-1992

Koch K: Vergleich von Rifampicin und Ceftriaxon bei der experimentellen Pneumokokken- Meningitis. Med Diss Göttingen 2000

KorneliiseRF, de Groot R, Neijens HJ (1995): Bacterial meningitis; mechanisms of disease and therapy. *Eur J Pediatr* 154, 85-96

Kragstjerg P, Kallman J, Olcen P (1994): Pneumococcal meningitis in adults. *Scand J Infect Dis* 26 (6), 659-666

Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM (1995): CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, 546-549

Kwok S, Higuchi R (1989): Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339, 237-238

Leib SL, Täuber MG (1999): Meningitis (II)- akute bakterielle Meningitis. *Ther Umsch* 56, 640-646

Leib SL, Heimgartner C, Bifrare YD (2003): Dexamethasone aggravates hippocampal apoptosis and learning deficiency in pneumococcal meningitis in infant rats. *Pediatr Res* 54, 353-357

Lepur D, Barsic B (2007): Community-acquired bacterial meningitis in adults: antibiotic timing in disease course and outcome. *Infection* 35 (4), 225-231

Letson GW, Gellin BG, Bulkow LR, Parks DJ, Ward JI (1992): Severity and frequency of sequelae of bacterial meningitis in Alaska Native Infants. Correlation with a scoring system for severity of sequelae. *Am J Dis Child* 146 (5), 560-566

Mason DJ, Power EGM, Talsania H, Phillips I, Gant VA (1995): Antibacterial action of ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother* 39: 2752- 2758

Meier A, Persing DH, Finken M, Böttger EC (1993): Elimination of contaminating DNA within polymerase chain reaction reagents: implications for a general approach to detection of uncultured pathogens. *J Clin Microbiol* 31 (3), 646-652

Meli DN, Coimbra RS, Erhart DG, Loquet G, Bellac CL, Täuber MG, Neumann U, Leib SL (2006): Doxycycline reduces mortality and injury to the brain and cochlea in experimental pneumococcal meningitis. *Infect Immun* 74, 3890- 3896

Miksits K, Hahn H: *Basiswissen medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York 2004

Mook-Kanamori BB, Geldhoff M, van der Poll T, van de Beek D (2011): Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clin Microbiol Rev* 24 (3), 557-591

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51, 263-273

Mustafa MM, Mertsola J, Ramilo O, Saez-Llorens X, Risser RC, McCracken Jr. GH (1989): Increased endotoxin and interleukin-1 β concentrations in cerebrospinal fluid of infants with coliform meningitis and ventriculitis associated with intraventricular gentamicin therapy. *J Infect Dis* 160, 891-895

Nahata MC, Fan-Havard P, Barson WJ, Bartkowski HM, Kosnik EJ (1990): Pharmacokinetics, cerebrospinal fluid concentration, and safety of intravenous rifampicin in pediatric patients undergoing shunt placements. *Eur J Clin Pharmacol* 38, 515-517

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, Eiffert H (2005): Minimizing the release of proinflammatory and toxic bacterial products within the host: a promising approach to improve outcome in life-threatening infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 44, 1-16

Nau R, Prange HW, Menck S, Kolenda H, Visser K, Seydel JK (1992): Penetration of rifampicin into the cerebrospinal fluid of adults with uninflamed meninges. *J Antimicrob Chemother* 29, 719-724

Nau R, Zysk G, Prange H (1993) : Erregerspektrum, Klinik und Therapie bakterieller Infektionen des Zentralnervensystems. *Nervenheilkunde* 12, 187-192

Nau R, Wellmer A, Soto A, Koch K, Schneider O, Schmidt H, Gerber J, Michel U, Brück W (1999): Rifampin reduces early mortality in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *J Infect Dis* 179, 1557-1560

Nguyen Thi HM, Tran Thi HC, Thwaites G, Van Chuong L, Xuan Sinh D, Dang Trung HN, Phung Quoc T, Nguyen Duy P, Nguyen Hoan P, To Song D (2007): Dexamethasone in Vietnamese adolescents and adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 357, 2431-2440

Nikkari S, McLaughlin IJ, Bi W, Dodge DE, Relman DA (2001): Does blood of healthy subjects contain bacterial ribosomal DNA? *J Clin Microb* 39, 1956-1959

Orman KL, English BK (2000): Effects of antibiotic class on the macrophage inflammatory response to *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 182, 1561-1565

O`Shea TM, Kothadia JM, Klinepeter KL, Goldstein DJ, Jackson BG, Weaver RG, Dillard RG (1999): Randomized placebo- controlled trial of a 42-day tapering course of dexamethasone to reduce the duration of ventilator dependency in very low birth

weight infants: outcome of study participants at 1-year adjusted age. *Pediatrics* 104, 15-21

Paterson GK, Mitchell TJ (2006): Innate immunity and the pneumococcus. *Microbiology* 152, 285-293

Peltola H, Roine I, Fernández J, Zavala I, González Ayala S, González Mata A, Arbo A, Bologna R, Miño G, Goyo J (2007): Adjuvant glycerol and/ or dexamethasone to improve the outcomes of childhood bacterial placebo- controlled trial. *Clin Infect Dis* 45, 1277-1286

Periti P, Mazzei T (1999): New criteria for selecting the proper antimicrobial chemotherapy for severe sepsis and septic shock. *Int J Antimicrob Agents* 12 (2), 97-105

Peters RP, de Boer RF, Schumann T, Gierveld S, Kooistra-Smid M, van Agtmael MA, Vandembroucke-Grauls CM, Persons MC, Savelkoul PH (2009): *Streptococcus pneumoniae* DNA load in blood as a marker of infection in patients with community-acquired pneumonia. *J Clin Microbiol.* 47 (10), 3308-3312

Pfister H-W : Meningitis. Kohlhammer Verlag, Stuttgart 2002

Picard C, Puel A, Bonnet M, Ku C-L, Bustamante J, Yang K, Soudais C, Dupuis S, Feinberg J, Fieschi C (2003): Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* 299, 2076-2079

Pomeroy SL, Holmes SJ, Dodge P R, Feigin R D (1990): Seizures and other neurologic sequelae of bacterial meningitis in children. *N Engl J Med* 323, 1651-1657

Poppert S, Essig A, Stoehr B, Steingruber A, Wirths B, Juretschko S, Reischl U, Wellinghausen N (2005): Rapid diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 43 (7), 3390-3397

Prins JM, Agtmael van MA, Kuijper EJ, Deventer van SJ, Speelman P (1995): Antibiotic-induced endotoxin release in patients with Gram-negative urosepsis: a double-blind study comparing imipenem and ceftazidime. *J Infect Dis* 172, 886-891

Proulx N, Fréchette D, Tuye B, Chan J, Kravcik S (2005): Delays in the administration of antibiotics are associated with mortality from adult acute bacterial meningitis. *QJM* 98, 291- 298

Rafi W, Chandramuki A, Mani R, Satishchandra P, Shankar SK (2010): Rapid diagnosis of acute bacterial meningitis: role of a broad range 16S rRNA polymerase chain reaction. *J Emerg Med* 38 (2), 225-230

Ren HY, An SY, Li MC (2010): Detection of bacterial meningitis by multiplex polymerase chain reaction. *Zhongguo Ji Hua Mian Yi* 16 (1), 47-51

Resti M, Micheli A, Moriondo M, Becciolini L, Cortimiglia M, Canessa C, Indolfi G, Bartolini E, de Martino M, Azzari C (2009): Comparison of the effect of antibiotic treatment on the possibility of diagnosing invasive pneumococcal disease by culture or molecular methods: a prospective, observational study of children and adolescents with proven pneumococcal infection. *Clin Ther* 31 (6), 1266-1273

Ring A, Weiser JN, Tuomanen EI (1998): Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 102 (2), 347-360

RKI (2001): Begründung der STIKO-Empfehlung zur Pneumokokken-Impfung. *Epidemiol Bull* 28, 220-224

RKI (2004): Invasive Meningokokken- Erkrankungen im Jahr 2003. *Epidemiol Bull* 27, 211-218

RKI (2006): Invasive Meningokokken- Erkrankungen im Jahr 2006. *Epidemiol Bull* 32, 297-306

RKI (2009): Invasive Meningokokken- Erkrankungen im Jahr 2008. Epidemiol Bull 45, 463-474

Roos KL: Infections of Central Nervous System, 2. Auflage, Scheld WM et al., Lippincott-Raven 1997, 335-402

Rose P, Harkin JM, Hickey WJ (2003): Competitive touchdown PCR for estimation of *Escherichia coli* DNA recovery in soil DNA extraction. J Microbiol Methods 52, 29-38

Saez-Llorens X, Mc Cracken GH Jr. (2003): Bacterial meningitis in children. Lancet 361, 2139-2148

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1989

Scarborough M, Thwaites GE (2008): The diagnoses and management of acute bacterial meningitis in resource-poor settings. Lancet Neurol 7, 637-648

Scarborough M, Gordon SB, Whitty CJM, French N, Njalale Y, Chitani A, Peto TEA, Lalloo DG, Zijlstra EE (2007): Corticosteroids for bacterial meningitis in adults in sub-Saharan Africa. N Engl J Med 357, 2441-2450

Schneider O, Michel U, Zysk G, Dubuis O, Nau R (1999): Clinical outcome in pneumococcal meningitis correlates with CSF lipoteichoic acid concentrations. Neurology 53, 1584-1587

Schreiber W, Mathys FK: Infectio. Editiones `Roche`, 2. Auflage, F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel 1987, 113-115

Schuchardt V: Akutverlauf und Langzeitprognose intensivmedizinisch behandelte Entzündungen des Nervensystems. Thieme, Stuttgart 1991

Shinwell ES, Karplus M, Reich D, Weintaub Z, Blazer S, Bader D, Yurman S, Dolfin T, Kogan A, Dollberg S (2000): Early postnatal dexamethasone treatment and

increased incidence of cerebral palsy. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 83, F177-F181

Silkie SS, Tolcher MP, Nelson KL (2008): Reagent decontamination to eliminate false- positives in Escherichia coli qPCR. J Microbiol Methods 72 (3), 275-282

Sparwasser T, Miethke T, Lipford GB, Borschert K, Häcker H, Heeg K, Wagner H (1997): Bacterial DNA causes septic shock. Nature 386, 336-337

Spreer A, Kerstan H, Böttcher T, Gerber J, Siemer A, Zysk G, Mitchell TJ, Eiffert H, Nau R (2003): Reduced release of pneumolysin by *Streptococcus pneumoniae* in vitro and in vivo after treatment with nonbacteriolytic antibiotics in comparison to ceftriaxone. Antimicrob Agents Chemother 47 (8), 2649-2654

Spreer A, Gerber J, Hanssen M (2006): Dexamethasone increases hippocampal neuronal apoptosis in a rabbit model of *Escherichia coli* meningitis. Pediatr Res 60, 210-215

Spreer A, Lugert R, Stoltefaut V, Hoecht A, Eiffert H, Nau R (2009): Short rifampicin pretreatment reduces inflammation and neuronal cell death in a rabbit model of bacterial meningitis. Crit Care Med 37 (7), 2253-2258

Stille W, Brodt HR, Groll A: Antibiotika-Therapie. Eleventh Edition, Schattauer GmbH, Stuttgart 2005

Stringaris AK, Geisenheiner J, Bergmann F, Balshüsemann Ch, Lee U, Zysk G, Mitchell TJ, Keller BU, Kuhnt U, Gerber J (2002): 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 nonbacteriolytic antibiotics than with ceftriaxone. *Scand J Infect Dis* 31, 367-370

Tunkel AR, Scheld WM (1993): Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* 6 (2), 118-136

Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM, Whitley RJ (2004): Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis* 39, 1267-1284

Underhill DM (2003) : Toll-like receptors: networking for success. *Eur J Immunol* 33, 1767-1775

Underhill DM, Ozinsky A (2001) : Toll-like receptors :key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 14, 103-110

Uzuka R, Kawashima H, Hasegawa D, Ioi H, Amaha M, Kashiwagi Y, Takekuma K, Hoshika A, Chiba K (2004): Rapid diagnosis of bacterial meningitis by using multiplex PCR and real time PCR. *Pediatr Int* 46(5), 551-554

Wagner H (2004): The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends Immunol* 25, 381-386

Weber JR, Tuomanen EI (2007): Cellular damage in bacterial meningitis: An interplay of bacterial and host driven toxicity. *J Neuroimmunol* 184, 45-52

Weisfelt M, de Gans J, van der Poll T, van de Beek D (2006a): Pneumococcal meningitis in adults: New approaches to management and prevention. *Lancet Neurol* 5, 332- 342

Weisfelt M, van de Beek D, Spanjaard L, Reitsma JB, de Gans J (2006b): Clinical features, complications, and outcome in adults with pneumococcal meningitis: a prospective case series. *Lancet Neurol* 5, 123-129

Welinder-Olsson C, Dotevall L, Hogevik H, Jungnelius R, Trollfors B, Wahl M, Larsson P (2007): Comparison of broad-range bacterial PCR and culture of cerebrospinal fluid for diagnosis of community-acquired bacterial meningitis. *Clin Microbiol Infect* 13, 879-886

Wenger JD, Hightower AW, Facklam RR, Gajenta S, Broome CV, Bacterial Meningitis Study Group (1990): Bacterial meningitis in the United States 1986: Report of a multistate surveillance study. *J Infect Dis* 162, 1316-1323

Yamamoto M, Takeda K, Akira S (2004) : TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol Immunol* 40, 861-868

Yeh TF, Lin YJ, Lin HC, Huang CC, Chen YJ, Lin CH, Lin HC, Hsieh WS, Lien YJ (1998): Early dexamethasone therapy in preterm infants: a follow up study. *Pediatrics* 101 (5)

Yeh TF, Lin YJ, Lin HC, Huang CC, Hsieh WS, Lin CH, Tsai CH (2004): Outcome at school age after postnatal dexamethasone therapy for lung disease of prematurity. *N Engl J Med* 350, 1304- 1313

Yogev R, Guzman- Cottrill J (2005): Bacterial meningitis in children: Critical review of current concepts. *Drugs* 65, 1097- 1112

Zysk G, Nau R, Prange H (1994) : bakterielle ZNS- Infektionen bei Erwachsenen in Südniedersachsen. *Nervenarzt* 65, 527-535

Zysk G, Brück W, Gerber J, Brück Y, Prange H.W., Nau R (1996): Antiinflammatory treatment influences neuronal apoptotic cell death in the dentate gyrus in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 722-728

Danksagung

An dieser Stelle danke ich insbesondere Herrn Professor Dr. med. Roland Nau für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, die vorliegende Dissertation unter seiner Leitung zu verfassen. Weiterhin danke ich ihm für die immerwährend gute Betreuung und die Möglichkeit, ihn bei Fragen oder auftretenden Problemen ansprechen zu können.

Mein besonderer Dank gilt ferner Herrn Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Helmut Eiffert, der eine Kooperation mit dem Institut für Medizinische Mikrobiologie ermöglichte. Dabei stand er jederzeit für theoretische und praktische Fragen in der Durchführung der vorliegenden Doktorarbeit zur Verfügung.

Gleich anschließend möchte ich mich bei Frau PD Dr. med. Annette Spreer und Herrn Dr. phil. nat. Raimond Lugert für die fachliche, praktische und persönliche Unterstützung und Zusammenarbeit bedanken. Durch ihre Hilfe konnte ich auftretende Fragen bei der Durchführung dieser Arbeit klären und so wichtige Hürden bewältigen.

Außerdem danke ich hierbei insbesondere Frau Constanze Kunze und Frau Madlen Targatz für ihre unermüdliche Unterstützung im PCR-Labor und ihr immerzu offenes Ohr für auftretende Fragen. Somit waren sie mir beide in der praktischen Durchführung eine unersetzliche Hilfe.

Den Mitarbeitern der Abteilung Bakteriologie, insbesondere Frau Kellner, danke ich für die freundliche und unkomplizierte Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung der in dieser Abteilung durchgeführten Versuche.

Herrn Valentin Stoltefaut danke ich für die Überlassung des Probenmaterials der in-vivo-Versuche der Kaninchenversuchsreihe. Weiterhin möchte ich ihm danken für den gedanklichen Austausch bei auftretenden Fragen bezüglich unserer Doktorarbeiten.

Und last but not least gilt mein Dank all den Menschen, die mich in der Durchführung der vorliegenden Arbeit unterstützt und stets mit aufmunternden Worten motiviert haben.

Lebenslauf

Am 12. Oktober 1980 wurde ich als zweite Tochter von Dr. Inge-Friederike Höcht, geb. Hoh, und Dr. Wolfgang Höcht in München geboren.

Von 1987 bis 1991 besuchte ich die Grundschule an der Fröttmaningerstrasse, von 1991 bis 1996 das humanistische Maximiliansgymnasium in München und von 1996 bis 2000 das neusprachliche und musische Gymnasium Max-Josef-Stift in München. Dieses schloss ich im Juni 2000 mit der allgemeinen Hochschulreife ab.

Von Oktober 2001 bis April 2002 arbeitete ich am Hospital Clinico de Valencia, Spanien, und absolvierte dort unter anderem das Krankenpflegepraktikum für das Medizinstudium.

Im April 2002 kehrte ich nach Deutschland zurück und begann mit dem Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen.

Im Wintersemester 2004/05 bestand ich erfolgreich das Physikum und am 26. November 2009 legte ich erfolgreich die zweite ärztliche Prüfung ab.

Im Mai 2007 begann ich mit der Arbeit an der vorliegenden Dissertation. Sie wurde unter der Leitung von Herrn Professor Nau, Abteilung Neuropathologie, in Kooperation mit Herrn Professor Eiffert, Abteilung Mikrobiologie der Universität Göttingen erstellt.

Seit November 2010 arbeite ich als Assistenzärztin in der Klinik für Kardiologie, Angiologie und konservative Intensivmedizin des Klinikums Neukölln in Berlin. Im Rahmen einer Rotation bin ich derzeit in der Klinik für Hämatologie/ Onkologie tätig.