

**Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie  
Universitätsklinikum Düsseldorf  
Direktor: Univ. Prof. Dr. Mayatepek**

**Interaktion von Streptococcus suis mit  
porcinen Plexus choroideus Epithel in vitro-  
Untersuchung zur Pathogenese der  
bakteriellen Meningitis**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine  
Universität Düsseldorf**

**vorgelegt von**

**Lars Lomberg**

**2009**

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan

Referent: Prof. Dr. Schrotten  
Korreferent: Prof. Dr. MacKenzie

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1.	Pathogenese der bakteriellen Meningitis	6
1.2.	Aufbau und Physiologie der Blut-ZNS-Schranken	9
1.3.	<i>Streptococcus suis</i> und seine Virulenzfaktoren	16
1.4.	Ziel der Dissertation	26
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>28</b>
2.1.	Präparation und Zellkultur der Plexusepithelien	28
2.2.	Anzucht und Kultur weiterer verwendeter Zelllinien	33
2.3.	Auswahl der <i>Streptococcus suis</i> Stämme	36
2.4.	Vorbereitende und begleitende Versuche	39
2.4.1.	Ultraschallsensibilität der Bakterienstämme	39
2.4.2.	Inokulumabhängigkeit der Adhäsion	40
2.4.3.	Zeitabhängigkeit der Adhäsion	40
2.4.4.	Kälteabhängigkeit der Adhäsion	40
2.4.5.	Vergleich verschiedener Zelllinien	41
2.4.6.	Adhäsion nach vorheriger Prästimulation mit TNF- $\alpha$	41
2.4.7.	Adhäsion nach vorheriger Zentrifugation	42

2.5.	Hauptversuche Adhäsion und Invasion	43
2.5.1	Versuchsvorbereitung	43
2.5.2.	Adhäsionsversuche	44
2.5.3.	Invasionsversuche	45
2.6.	Materialliste	46
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
3.1.	Ergebnisse Vorbereitende und begleitende Versuche	47
3.1.1.	Ultraschallsensibilität der Bakterienstämme	47
3.1.2.	Inokulumabhängigkeit der Adhäsion	49
3.1.3.	Zeitabhängigkeit der Adhäsion	50
3.1.4.	Kälteabhängigkeit der Adhäsion	52
3.1.5.	Vergleich verschiedener Zelllinien	54
3.1.6.	Adhäsion nach vorheriger Prästimulation mit TNF- $\alpha$	56
3.1.7.	Adhäsion nach vorheriger Zentrifugation	57
3.2.	Ergebnisse Hauptversuche Adhäsion und Invasion	59
3.2.1.	Adhäsionsversuche	59
3.2.2.	Invasionsversuche	69
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>76</b>
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>

<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>96</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>97</b>
7.1.	Abkürzungsverzeichnis	97
7.2.	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	98
7.3.	Curriculum Vitae	99

# 1. Einleitung

## 1.1. Pathogenese der bakteriellen Meningitis

Die erste Erwähnung einer Meningitis-Epidemie findet sich in der neuzeitlichen Literatur des Jahres 1805 in Genf. Aufgrund des vorherrschenden Symptoms rein deskriptiv als Genickstarre-Epidemie bezeichnet, folgten während des 19. und 20. Jahrhunderts mehrere Ausbrüche der Erkrankung und zwar bevorzugt bei Kindern und Militärpersonal in Kasernen. Obwohl die Inzidenz und die Letalität über die Jahrzehnte durchgehend abgenommen haben, bleibt eine bakterielle Infektion der Hirn- und Rückenmarkshäute bis zur Gegenwart eine vital bedrohliche Erkrankung mit hoher Morbidität und Mortalität. Aufgrund der komplexen, zu grossen Teilen noch unverstandenen Erreger-Wirt-Interaktionen und der Vielzahl der verschiedenen Erreger während unterschiedlicher Lebensphasen ist eine weitere genaue Untersuchung der einzelnen Schritte der Pathogenese mit dem Ziel einer besseren medizinischen Versorgung der Erkrankten und einer verbesserten Prävention dringend erforderlich.

Die Infektion kann einerseits Folge einer primär symptomlosen Kolonisation des Nasenrachenraums oder des Gastrointestinaltraktes sein, andererseits kommen Meningitiden auch nach einer Durchwanderung bei einem zunächst lokal begrenzten Krankheitsgeschehen im Nasennebenhöhlen- oder Mastoidbereich sowie nach einer traumatischen Duraverletzung vor. Bis zum 3. Lebensmonat finden sich als Erreger vornehmlich Gruppe B Streptokokken, *Escherichia coli* und seltener Listerien unter den häufigsten Erregern, bei älteren Kindern herrschen Infektionen mit Pneumokokken, Meningokokken und *Hämophilus influenzae b* vor. Die meisten Neuinfektionen treten mit ca. 50/100.000 in der Gruppe der Untereinjährigen auf.

Um die Epithelbarriere des Nasopharynx nach Kolonisation überwinden zu können, verwenden die unterschiedlichen Erreger nach möglicher viren- oder witterungsbedingter Vorschädigung des Epithels mehrere Mechanismen an. Sie besitzen dafür unterschiedliche Pathogenitätsfaktoren, um eine Adhäsion am Epithel zu unterhalten, so zum Beispiel spezifische IgA-Proteasen, Sialinidasen, Adhäsine (vor allem Meningokokken und *Escherichia coli*) und zilienhemmende Toxine, zum Beispiel das Pneumolysin der Pneumokokken (Adam 2004).

Zusätzlich exprimieren Meningokokken z.B. variabel verschiedene Kapsel- und Piligene zur zellulären Transzytose, andere Keime verwenden dafür wirtseigene Immunglobulinrezeptoren, um transzellulär die epithelialen Barrieren zu penetrieren oder parazellulär durch Zerstörung der zonulae occludentes den Wirt zu invadieren.

Beim häufig auf Kolonisation und anschließenden Penetration der Nasenschleimhaut folgenden Infektionsstadium erfolgt der Eintritt der invadierten Keime zunächst ins Blut, wo sie sich mittels Expression einer Kapsel, deren Proteine körpereigenen Proteinen ähneln, vor Komplementsystem, Opsonierung und spezifischer Immunität schützen. Schlussendlich gelangen die Keime durch die Blut-Hirn- und/ oder die Blut-Liquor-Schranke in den Liquorraum.

Für *Escherichia coli* und Pneumokokken konnte die Penetration ins Liquorsystem via zerebrales mikrovaskuläres Endothel nachgewiesen werden (Huang 2002). In Studien von Charland und Vanier konnte zudem bereits Adhäsion und Zytotoxizität Hämolysin-sezernierender *Streptococcus suis* Stämme an humanen und porcinen zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen (human/porcine brain microvascular cells HBMEC/PBMEC) nachgewiesen werden. Eine Invasion konnte nur an PBMEC beobachtet werden (Charland 2000, Vanier 2004).

Für eine Penetration der Blut-Liquor-Schranke durch virulente Keime sprechen verschiedene histopathologische Untersuchungen bei humanen und porcinen Fällen, in denen hohe Konzentrationen der Keime bereits in frühen Krankheitsstadien im Plexusgewebe nachgewiesen werden konnten (Williams 1990). Der mögliche Invasionsweg führt zunächst durch fenestriertes Endothel im Plexusbereich, anschließend durch Plexusstroma und dann durch die apikale Seite des Plexusepithels in den Liquor, wo die Keime ideale Wachstumsbedingungen vorfinden und sich exponentiell vermehren, da im Liquor nur eine ungenügende Konzentration an Komplementproteinen, Immunglobulinen und Leukozyten vorherrscht.

Die bereits nachgewiesenen Mechanismen zur Überwindung der beiden zuvor genannten Schrankensysteme umfassen neben der transzellulären Passage, welche für Meningokokken, Pneumokokken, Gruppe B Streptokokken und *Escherichia coli* nachgewiesen werden konnte (Huang 2002; Unkmeir 2002), die Möglichkeit einer parazellulären Passage vor allem bei hohen Bakterienkonzentrationen oder eine Passage durch Transmigration in Phagozyten als „Trojanisches Pferd“ (Tunkel 1992, Valentin-

Weigand 1996, Huang 2002, Sukumaran 2003). Ebenso konnte ein Überleben innerhalb zuvor nicht mit Antigen zur Antikörperherstellung stimulierter Makrophagen sogar schon bei *Streptococcus suis* nachgewiesen werden (Williams 1990, Norton 1997).

Mögliche Maßnahmen des Ependyms zur Bekämpfung der Erreger sind Tryptophanentzug aus dem Liquor zur Wachstumshemmung der Bakterien und eine geringfügige Phagozytose durch die Epiplexus- oder Kolmerzellen, sowie eine Aktivierung immunkompetenter Zellen durch Zytokine (Ransohoff 2003, Adam 2004)

Nach erfolgter Invasion der Bakterien in den Liquorraum entsteht eine weitere Schädigung der BHS/BLS-Schranke sowohl durch die Bakterien und deren Toxine, als auch durch die körpereigene zelluläre Immunantwort in Form von inflammatorischen Abwehrzellen und durch Vermittlung regulierender Zytokine, Chemokine und Lipidmediatoren.

In der Folge kommt es zu einer immer stärkeren Störung der Integrität der Schrankenfunktion und verstärkter Durchwanderung beider Barrieren durch Leukozyten an deren Ende die Schädigung des Hirngewebes selbst steht. Eine weitere Zellschädigung entsteht durch Ausschüttung reaktiver oxidativer Stoffwechselprodukte (Koedel 2002, Nau 2002), Matrixmetalloproteinasen und exzitatorischer Aminosäuren (Leib 2000, Shapiro 2003). Vasospasmen und verminderter zerebraler Perfusionsdruck können zusätzlich zu Ischämien führen. In Folge der Schrankendesintegration und des Verlustes der Autoregulation des Hirndrucks durch Zerstörung des Endothels kommt es zu einem Hirnödem, zudem kann die Hirndruckerhöhung durch Liquorresorptionsstörungen bei Verkleben der Paccionischen Granulationen verschlimmert werden. Die Kombination eines erhöhten Hirndruckes mit einer systemischen Hypotension im Rahmen eines septischen Schocks resultiert schlussendlich ebenso in Perfusionsminderungen mit konsekutiven Ischämien.

## 1.2. Aufbau und Physiologie der Blut-ZNS-Schranken

Zwischen dem Blutkreislauf und dem Hirngewebe bestehen in Form der Blut-Hirn-Schranke und der Blut-Liquor-Schranke mindestens zwei hochselektive Permeabilitätsbarrieren mit Schrankenfunktion (Gregoire 1989). Ziel dieser Barrieren ist es einerseits, das Eindringen toxischer Metabolite ins Hirngewebe zu verhindern, andererseits die für das Hirngewebe zum Teil unphysiologisch hohen Stoffkonzentrationen einzelner Substanzen des Blutes vom Zentralnervensystem fernzuhalten.

Die beiden hauptsächlich beschriebenen Schrankensysteme werden durch die Blut-Hirn-Schranke und Blut-Liquor-Schranke repräsentiert, das Vorhandensein weiterer möglicher Schrankensysteme wird zum Beispiel für den Bereich der Area postrema, das Subfornikalorgan und die Eminentia mediana postuliert. Der Austausch zwischen Liquor und Blut findet also entweder über die Blut-Hirn-Schranke über die Kapillaren des intrazerebralen Kreislaufs oder über den Plexus choroideus und Ependym statt.

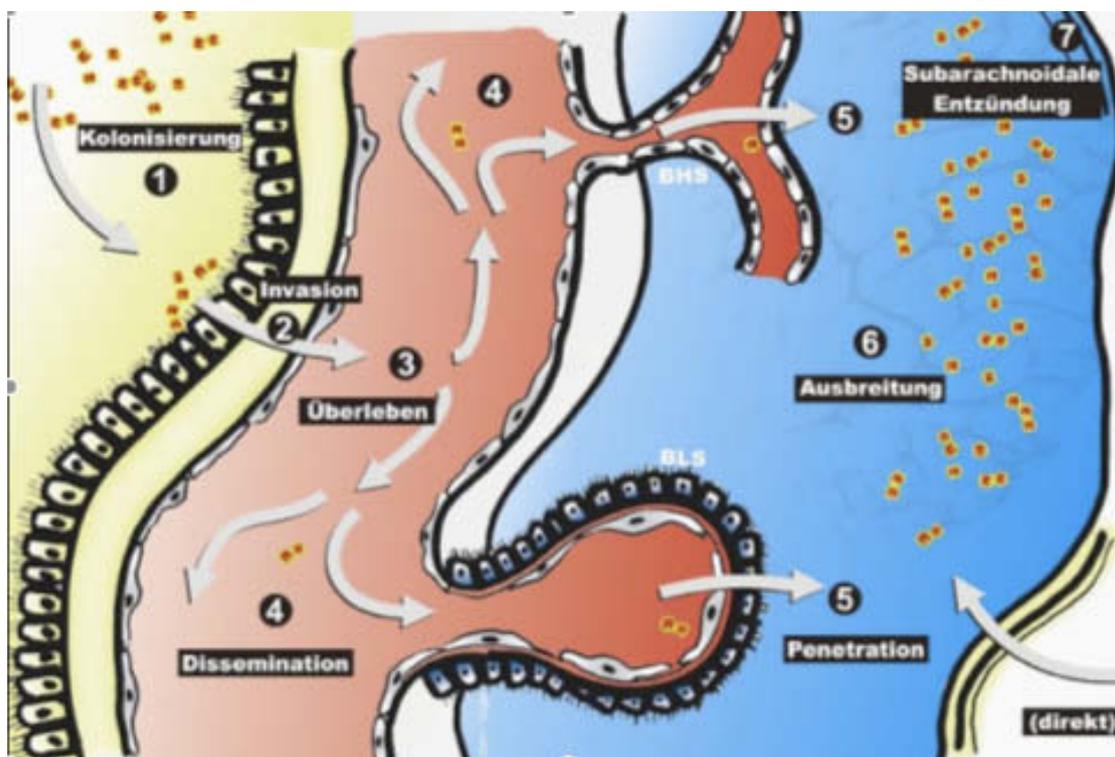


Abb. 1 :Invasion der Erreger über Schleimhautbarriere und BHS/ BLS (aus Adam (2004). "Pathogenese der bakteriellen Meningitis." Monatsschrift Kinderheilkunde 152: 362-70.

Die beiden voneinander unabhängigen Flüssigkeitssysteme Interstitialflüssigkeit und Liquor stehen dabei im Bereich des Plexus in engem Kontakt, nur durch das Plexusepithel getrennt, im restlichen Ventrikelbereich befinden sich lediglich Ependymzellen und im Bereich der äusseren Liquorräume lediglich Pia-Gewebe zwischen den Kompartimenten.

Das Vorhandensein einer Permeabilitätsbarriere zwischen ZNS und Blutkreislauf wurde im späten 19. Jahrhundert erstmalig vom Bakteriologen Paul Ehrlich bemerkt (Ehrlich 1885). In den Kreislauf von Ratten injizierte anilinhaltige Farbstoffe färbten daraufhin alle Organe mit Ausnahme des Gehirns an, so dass das Vorhandensein einer Barriere postuliert wurde.

Die Blut-Hirn-Schranke besteht aus drei wichtigen Barrierekomponenten, zunächst aus dem Endothel der Kapillaren, gefolgt von der Basalmembran und der aus den Endfortsätzen von Gliazellen bestehenden Membrana limitans glia perivascularis (Wolf 1996). Fettlösliche Substanzen, wie Nikotin, Alkohol und Blutgase, aber auch Narkotika wie Halothan, können die Blut-Hirn-Schranke per Diffusion passieren und gelangen somit ins Gehirn. Ionen und polare Substanzen sind auf spezifische Transportsysteme angewiesen. Ultrastrukturelles Korrelat der Barriere sind die apikalen Tight junctions der Endothelzellen, physiologisch nachweisbar durch einen hohen elektrischen Widerstand (Crone 1982). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte ein Fehlen von Fenestrierungen und nur eine kleine Anzahl pinozytotischer Vesikel nachgewiesen werden. Durch diesen anatomischen Aufbau ist neben einem optimalen Blutfluss die Kontrolle des Stofftransportes an den Kapillaren gewährleistet, es können schädliche Konzentrationsschwankungen oder gar der Übertritt ganzer Substanzgruppen verhindert werden, die Regulierung der Permeabilität erfolgt vornehmlich durch die Endfüßchen der Astrozytenfortsätze.

Als Blut-Liquor-Schranke bezeichnet man dagegen die Barriere im Bereich der Plexus choroidei. Das Gewebe des Plexus stellt dabei eine selektive Permeabilitätsbarriere dar, ultrastrukturell bestehend aus den zellverbindenden Zonulae occludentes und den Lipidkomponenten der Zellwände, welche den ungehinderten Stoffaustausch begrenzen (Milhorat 1975).

Die Endothelzellen des Plexus sind im Gegensatz zu denen der Blut-Hirn-Schranke fenestriert und bilden keine festen Zell-Zell-Kontakte aus, somit ist die Barrierefunktion

nicht wie bei der BHS im Endothel der Gefäße, sondern durch das Ependym des Plexus choroideus gebildet (Chodobski 2001).

Die Blut-Liquor-Schranke ist nur für Wasser, Sauerstoff und Kohlendioxid ganz durchlässig, für Elektrolyte wenig und für fast alle anderen Moleküle gar nicht, allerdings ist die Schrankenwirkung schwächer als die der Blut-Hirn-Schranke ausgeprägt. Substrate wie Kohlenhydrate oder Hormone werden von zum Teil spezialisierten Transportern, die zum Beispiel in den Tanyzyten, ependymalen Gliazellen oder Ependymzellen lokalisiert sind, aktiv durch die Blut-Liquor-Schranke befördert.

Das makroskopische Korrelat der BLS, die Plexus choroidei, befinden sich innerhalb aller vier Ventrikel des Zentralnervensystems, im Bereich der Seitenventrikel reichen sie vom Unterhorn bis in den Beginn des Vorderhornes und sind durch die Foramina Monroi mit dem Plexusgewebe des dritten Ventrikels verbunden. Der isolierte Plexus choroideus des vierten Ventrikels ist im Bereich des Velum medullare inferius fixiert und tritt teilweise durch die Foraminae Luschkae bis in den äusseren Liquorraum vor.

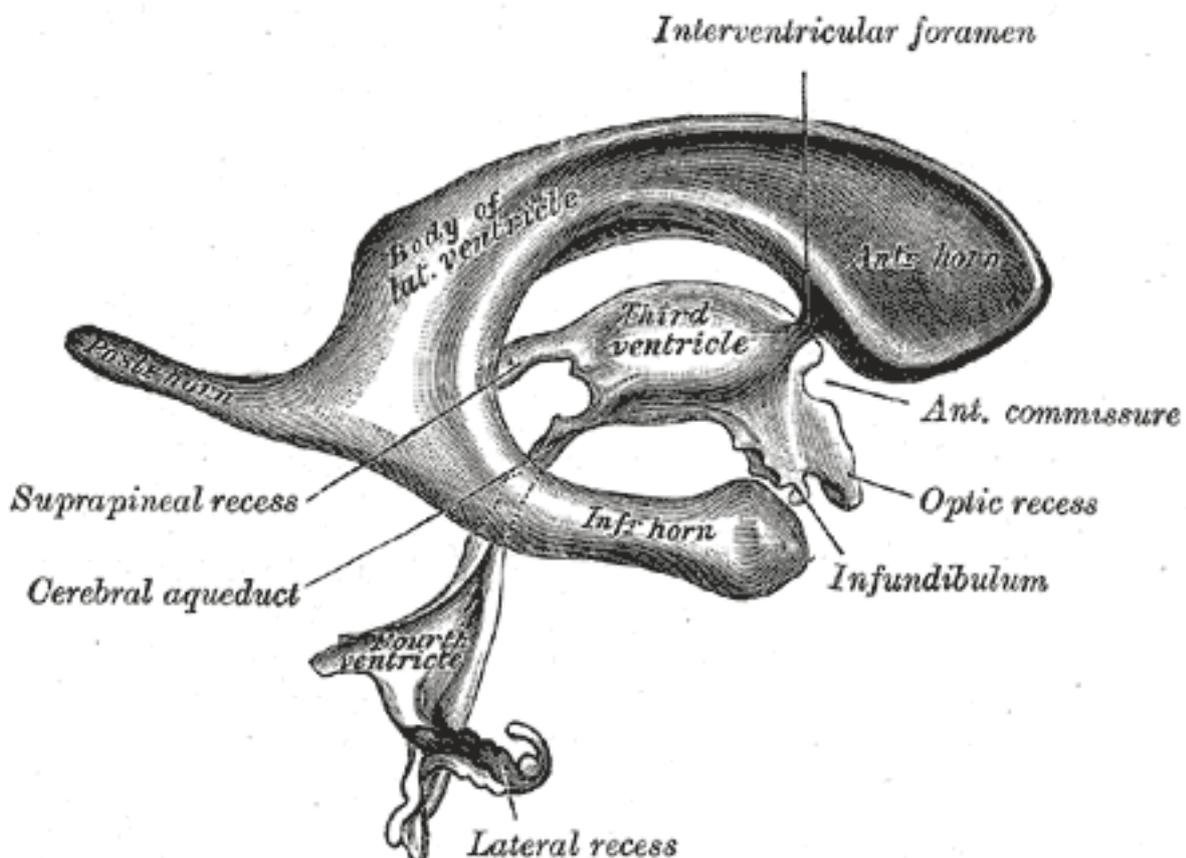
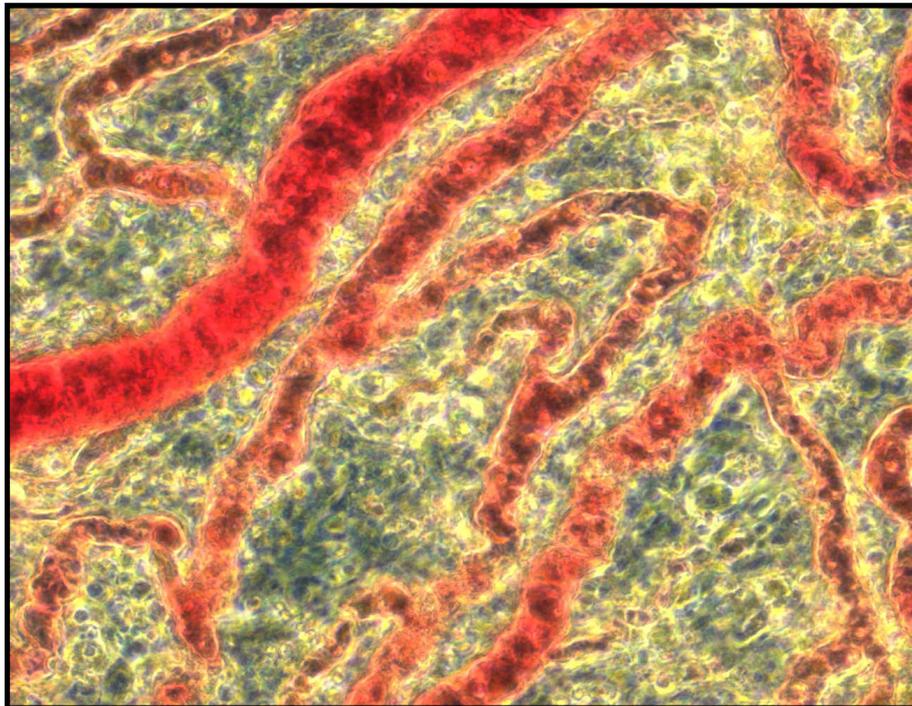


Abb. 2 : Aufbau des Liquorsystems (aus Gray's Anatomy: the Anatomical Basis of Medicine and Surgery, 20th Edition).

Das Ventrikelsystem des Gehirns besteht aus vier einzelnen in Reihe geschalteten Ventrikeln und drei Verbindungsöffnungen, welche das innere Ventrikelsystem mit dem äußeren das Hirn umgebenden Anteilen verbinden.

Der Grundaufbau des adulten Plexus choroideus besteht schließlich aus einer einschichtigen epithelialen Platte, der Lamina choroidea epithelialis und der darunter liegenden, an Gefäßen reichen Bindegewebsschicht, der Tela choroidea (Maxwell 1956). Das ausgeprägte Gefäßbett aus fenestrierten Kapillaren befindet sich in direkter Nähe zu einer einfachen Schicht hochkuboider epithelialer Zellen. Das Erscheinungsbild der Epithelzellen ist fast kubisch und mikroskopisch kopfsteinpflasterähnlich, im Grenzbereich zwischen Plexus und normaler Ventrikelwand geht es fließend ins Ependymgewebe der Ventrikelwand über.



*Abb. 3 : Plexus choroideus (63-fache lichtmikroskopische Vergrößerung):  
Der Plexus choroideus ist stark vaskularisiert, dies wird vor allem in geringer  
Vergrößerung deutlich.*

Die Oberfläche der Zellen wird durch einen ausgedehnten Mikrovillussaum vergrößert, zwischen den Bürstensaumzellen können vereinzelt zilientragende Zellen nachgewiesen werden, deren Beteiligung an der Liquorbewegung und -verteilung postuliert wird (Maxwell 1956). Zwischen den Ependymzellen wird das apikale Kompartiment mit Tight junctions, die unter anderem aus zwei spezifischen Proteinen, dem ZO-1 und Cingulin

(Citi 1988, Stevenson 1986) bestehen, gegen den Liquorraum abgetrennt, es existieren weiterhin Gap junctions und Punktdesmosomen. In der basolateralen Region finden sich weit verzweigte Interdigitationen, sowie als Hinweis auf einen hohen Energieumsatz reichlich Mitochondrien wie bei anderen transportaktiven Zellen.

Das Zytoplasma der Zellen erhält massenhaft verschiedene Organellen: neben den Mitochondrien existiert ein ausgeprägtes rauhes und glattes endoplasmatisches Retikulum und ein großer Golgi-Apparat als Nachweis einer starken Proteinproduktion und -modifikation (Zaki 1981).

Auf der Oberfläche des Plexusepithels finden sich makrophagenartige Zellen, die als Kolmer- oder Epiplexuszellen bezeichnet werden (De Spiegelaere 2008). Diese intraventrikulären Phagozyten, die mit Phagolysosomen und Vesikeln ausgestattet sind, stellen die erste zelluläre Abwehrlinie bei cerebralen Infektionen dar. Direkt an die basolaterale Seite der Epithelzellen grenzt die Tela choroidea das Plexusstroma (Strong 1964). Sie stellt sich als lockeres Bindegewebe dar und enthält fibroblastenähnliche Zellen, Plasmazellen und Perizyten, sowie die im Vergleich großlumigen Blutgefäße des Plexus und eine vornehmlich aus Kollagenfilamenten bestehende extrazellulären Matrix (Dohrmann 1970).

An der der Basallamina anliegenden Seite befindet sich eine einschichtige Lage leptomeningealer Zellen. Das Endothel der großlumigen, fenestrierten Kapillaren ist vergleichsweise dünn und die Endausläufer der Kapillaren verzweigen sich bis in die Plexusperipherie.

Die Ausbildung eines funktionsfähigen Plexus choroideus erfolgt aus zwei unterschiedlichen Keimblättern, einerseits dem mesodermalen Blatt, welches mit seiner hochentwickelten Gefäßversorgung die Basis der Ausbildung des Plexusstromas bildet, andererseits dem neuroektodermalen Blatt aus dem später das choroideale Epithel hervorgeht. Die wesentliche Entwicklung des Gewebes erfolgt hauptsächlich zwischen dem 10. und 14. Tag (Sturrock 1978; Keep 1986). Während sich in den ersten beiden Monaten zunächst lediglich erste keulenförmige Einfaltungen in die Ventrikel bilden, beginnt etwa im dritten und vierten Monat eine Transformation des Epithels zu einem einfachen niedrigen Säulenepithel mit ersten Villi. Im weiteren Verlauf entwickeln sich die Villi weiter, es kommt zu einer Zunahme des subepithelialen Bindegewebes und im prä- und peripartalen Stadium zum Ersatz des Säulenepithels durch kleinere kubische Zellen mit eher basal gelegenen Nuklei, ähnlich dem adulten Zellbild.

Der Liquor cerebrospinalis füllt alle vier Ventrikel, den Bereich des Zentralkanals und den das Gehirn umgebenden Subarachnoidalraum aus, wodurch der intrakranielle Druck

reguliert wird. Während Stoffe, die schnell oder in grossen Mengen im Gehirn benötigt werden zumeist via BHS dorthin gelangen, gelangen andere Stoffe, die in kleinen Mengen oder längerfristig benötigt werden via Liquor dorthin (Spector 1989). Der Plexus choroideus ist somit ein wichtiger Teil des Proteintransports (Gherzi-Egea 2002). Der Abtransport der anfallenden Abfallprodukte über die Pacchioni-Granulationen, welche diese ins venöse System drainieren (Nattie 1980, Johanson 2008).

Weiterhin ist das Liquorsystem über den CO<sub>2</sub>-Spiegel an der Regulation des Atemzentrums beteiligt und spielt eine wesentliche Rolle als Mediator für Moleküle des Immunsystems und weitere Signalmoleküle (Strazeille 2000, Gherzi-Egea 2002).

Die Produktion des Liquors findet zum größten Teil in den Plexus choroidei statt, diese stellen jedoch scheinbar nicht die einzige Produktionsstätte dar. Selbst bei Entfernung der Plexus choroidei besteht weiterhin eine deutlich nachweisbare Liquorproduktion von 40%-60% (Milhorat 1969).

Die Mehrheit der ca. 150 ml Liquor befindet sich im Bereich der Subarachnoidalräume und der basalen Zisternen, verhältnismäßig weniger im Bereich der inneren Liquorräume. Im Normalfall werden pro Tag etwa 500 ml Liquor produziert, altersabhängig erfolgt ein 1,7- sechsmaliger täglicher Austausch des kompletten Liquors. Im Liquorsystem herrscht dabei unter physiologischen Bedingungen ein durchschnittlicher hydrostatischer Druck von etwa 10-20 cm H<sub>2</sub>O (Gherzi-Egea 2002, Johanson 2008).

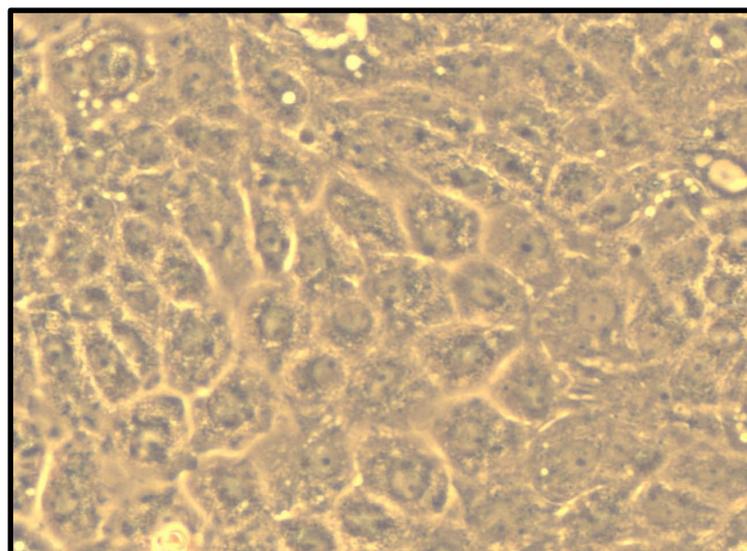
Zunächst entsteht durch die Filtration von Blutplasma durch die fenestrierten Kapillaren eine eiweißreiche Interstitialflüssigkeit im Plexusstroma. Es folgt ein selektiver Transport einzelner Stoffe über das Plexusepithel durch Einstellung eines Ionengradienten, vermittelt unter anderem durch die basolateral ansässige Carboanhydrase und die apikale Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, sowie den folgenden passiven Wassereinstrom (Speake 2001).

Durch die medikamentöse Hemmung der jeweiligen Enzyme kann die Liquorproduktion stark gesenkt werden. Der kontinuierliche Abfluss erfolgt hauptsächlich über die oben erwähnten Pacchionischen Granulationen, Evaginationen der Arachnoidea, die sich in das Lumen der Sinus vorstülpen und durch ihren klappenartigen Aufbau und den vorherrschenden Druckgradienten einen richtungsabhängigen Abtransport ermöglichen (Potts 1972). Im Rückenmarksbereich besteht eine weitere Resorptionszone im Bereich der Austrittspunkte der Spinalnerven aus dem Wirbelkanal, wo Venen- und Lymphgefäßplexus den Liquor aufnehmen.

Die Zusammensetzung des Liquors weist im Vergleich zum Plasma sowohl einige Gemeinsamkeiten, als auch zum Teil deutliche Unterschiede auf. Im Vergleich zum

Plasma sind die Liquorkonzentrationen von Natrium und Chlorid höher, die von Kalium, Glucose und Aminosäuren niedriger, es handelt sich beim Liquor folglich nicht um ein reines Ultrafiltrat des Plasmas (Speake 2001). Die Flüssigkeit ist im Normalfall zellarm und im Vergleich zum Plasma ebenfalls proteinarm, die Proteinmenge und Proteinzusammensetzung steigt und ändert sich jedoch während des gesamten Drainageweges und ist somit im Bereich des äußeren Liquorraumes schon deutlich höher (Banks 1999). Es existiert sowohl ein aktiver, ATP-verbrauchender Transport in den Liquor, als auch aus dem Liquor heraus, wodurch hohe Konzentrationen von Abfallstoffen auch gegen ein bestehendes Konzentrationsgefälle ins Blut entsorgt werden können. Weiter existieren ebenfalls passive Transportmechanismen, die bisher für Chlorid- und Kaliumionen nachgewiesen werden konnten.

Die Proteinzusammensetzung des Liquors ähnelt der des Plasmas, stammt doch 80% des Proteingehaltes direkt aus dem Plasma (Wiederkehr 1991). Zusätzlich existiert jedoch eine intrathekale Proteinsynthese von vor allem Transthyretin, welches spezifisch im Plexus choroideus synthetisiert wird und ca. 25% der gesamten Proteinmenge umfasst. Es hat eine wichtige Funktion als Carrier für Thyroidhormone und wird unter anderem als Liquormarker zum Beispiel bei einer posttraumatischen Liquorrhoe verwendet werden (Herbert 1986, Schuller 1992). Ein weiteres wichtiges vornehmlich im Plexus choroideus synthetisiertes und im Liquor nachweisbares Protein ist  $\beta$ -trace-Protein, eine Substanz mit wichtiger Rolle innerhalb des Schlaf-Wach-Rhythmus und zum Nachweis eines Liquorlecks nach Schädel-Hirn-Trauma (Urade 2000).



*Abb. 4 :Plexus choroideus (200-fache lichtmikroskopische Vergrößerung):  
In stärkerer Vergrößerung zeigt sich das pflastersteinartige Erscheinungsbild des Plexusepithels.*

### 1.3. *Streptococcus suis* und seine Virulenzfaktoren

#### Epidemiologie

Die hauptsächliche volkswirtschaftliche Bedeutung des Erregers stellen die Infektion von Nutztierbeständen dar, *Streptococcus suis* gilt als eines der größten Probleme in der Schweinezucht, Infektionen mit diesem Erreger führen zu jährlichen Verlusten von ca. 300 Mio. US\$. Darüber hinaus stellt die Infektion mit *Streptococcus suis* auch eine relevante Zoonose dar (Wertheim 2009). Neben verschiedenen Therapieversuchen, die Krankheitsausbrüche mit Antibiotika zu kontrollieren, existieren verschiedene zumeist auf Serotyp 2 basierende Impfstoffe für Schweine, welche jedoch lediglich in experimenteller Verwendung sind. Weder die Antibiotikagabe noch Impfversuche haben bis jetzt jedoch zu einer Eindämmung der Durchseuchung der Nutztierbestände geführt. Hauptsächliches Problem ist die hohe geno- und phänotypische Diversität des Erregers, kapselproteinhaltige Vakzine konnten klinisch und experimentell nicht ausreichend vor Infektionen schützen, unter anderem, weil die Immunabwehr entsprechend auch vor unbekapselten Mutanten und verschiedenen Serotypen nicht ausreichend schützt (Baums 2009).

Ähnlich einer Pneumokokken-Kolonisation des Nasenrachenraumes beim Menschen stellt die häufige Besiedelung des oberen Respirationstraktes, besonders der Tonsillen und der Nasenhöhlen bei Schweinen ebenfalls nicht notwendigerweise einen krankhaften Zustand dar, ist jedoch Voraussetzung einer eventuell später folgenden Infektion. Entsprechend konnten in einer Studie bei Durchseuchungsraten von nahezu 100% nur <5% erkrankte Tiere nachgewiesen werden (Clifden-Hatley 1986).

Weitere Kolonisationsorte von *Streptococcus suis* sind der Urogenital- und der Gastrointestinaltrakt (Higgins 1999). Der Erreger kommt nicht nur bei Schweinen und Menschen vor, sondern konnte ebenso bei Vögeln, Katzen, Hunden und Pferden nachgewiesen werden. Neben der bekannten vertikalen Infektion von Sauen auf ihre Ferkel und horizontalen Infektion zwischen Schweinen, ist eine vektorgebundene Übertragung zum Beispiel durch Fliegen oder Mäuse Gegenstand der Diskussion (Staats 1997).

Neben Infektionen des Schweins ereignen sich regelmässig auch humane Infektionen. Besonders gefährdet sind dabei Personen, die in direktem Kontakt zu Schweinen stehen, wie Landwirte, Tierärzte, Schlachter, Arbeiter der fleischverarbeitenden Industrie und Jäger (Halaby 2000, Rosenkranz 2003, Smith 2008).

Bis jetzt sind mehr als 700 humane Infektionen mit *Streptococcus suis* belegt, zumeist Einzelfälle, jedoch zuletzt 2005 auch eine epidemische Infektion mit 204 Fällen in der Provinz Sichuan/China, davon 38 mit letalem Ausgang (Lun 2007, Wertheim 2009). In einer umfangreichen Übersichtsarbeit konnte nachgewiesen werden dass 83% der an einer Infektion mit *Streptococcus suis* Erkrankten auf die eine oder andere Art in der Schweineproduktion tätig waren.

Berichte über humane *Streptococcus suis*-Infektionen liegen aus aller Welt vor, so aus Asien (Kay 1995; Lun 2007, Segura 2009), Europa und Nordamerika (Arends 1988; Dupas 1992). Im Gegensatz zur Pathogenese bei porcinen Infektionen gelangt der Erreger bei humanen Infektionen wohl häufig durch eine Schnittverletzung in die Blutbahn ( Kay 1995). Bei zunehmender Häufung von epidemischen Infektionen gegenüber früher zumeist nur in Einzelfällen beschriebenen Krankheitsverläufen kann *Streptococcus suis* als zunehmendes zoonotisches Problem angesehen werden (Segura 2009).

## Klinik

Ein großer Teil der Infektionen verläuft ohne, oder mit nur milden Krankheitszeichen ab. Bei einer Untersuchungen in den Niederlanden (Elbers 1999) konnten bei 6% der untersuchten Tierärzte und 1% der Landwirte Antikörper gegen *Streptococcus suis* nachgewiesen werden, ohne dass diese klinisch erkrankt waren. Auch in Nordamerika konnte eine hohe Prävalenz von Antikörpern gegen *Streptococcus suis* bei Arbeitern in der schweineverarbeitenden Industrie nachgewiesen werden (Smith 2009). Häufigste Verlaufsform einer klinischen humanen *Streptococcus suis*-Infektion sind, wie im Rahmen eines epidemischen Ausbruchs 2005 in der Provinz Sichuan und im Rahmen einer retrospektiven Kohortenstudie in Thailand demonstriert, die purulente Meningitis mit 52-72% und der septische Schock mit Multiorganversagen mit 12-27% der Fälle. Zuletzt fanden sich zusätzlich vermehrt Fälle von Myositiden und grösseren Haut- und Weichteilinfektionen in der Literatur (Suankratay 2004, Wangsomboonsiri 2008, Wertheim 2009). Seltener Manifestationen einer humanen *Streptococcus suis*-Infektion sind Arthritiden, Endokarditiden, Pneumonie und Peritonitis (Bartelink 1995).

Todesfälle treten, wie der Ausbruch 2005 zeigt, insbesondere dann auf, wenn die Krankheit nicht sofort erkannt wird (Grebe 1997; Lun 2007). In einer niederländischen Untersuchung (Arends 1988) konnte eine Letalität von etwa 7% nachgewiesen werden, in Ländern mit eingeschränktem Zugang zu medizinischer Versorgung kann sie noch wesentlich höher ausfallen. So konnte im Rahmen eines Ausbruchs in Nordthailand konnte eine Gesamtletalität von 17% nachgewiesen werden (Wangsomboonsiri 2008). Insgesamt verstarben bei 409 dokumentierten nachgewiesenen humanen Infektionen im Rahmen der beschriebenen Epidemie 73 Menschen durch *Streptococcus suis*, entsprechend einer Letalität von 17,8% (Lun 2007). Überlebende behalten oft Residuen der Krankheit zum Beispiel in Form von Arthritiden, Taubheit und Ataxie (Walsh 1992, Mai 2008, Wangsomboonsiri 2008).

In laborchemischen Untersuchungen der erkrankten Personen fanden sich zumeist lediglich unspezifische Veränderungen, wie eine deutliche Leukozytose, CRP-Erhöhung und Zeichen der Leberparenchymschädigung im Status der Sepsis (Rosenkranz 2003, Halaby 2000, Wangsomboonsiri 2008).

#### Einteilung

Mikroskopisch stellt sich *Streptococcus suis* als ein Gram-positiver Kokkus dar, der entweder einzeln, in Diploform oder auch in kurzen Ketten (Kilpper-Bälz 1987; Staats 1997) auftritt.

Die Einteilung von *Streptococcus suis* in die heterogene Gruppe der verschiedenen Streptokokken erfolgte zunächst versuchsweise hinsichtlich der Hämolyse alleine, der Lancefield-Antigen-Strukturen oder der 1936 von Sherman entwickelten Einteilung anhand von 10 Merkmalen, unter denen sowohl die Lancefield-Antigen-Strukturen als auch das Wachstumsverhalten Beachtung fand.

Die Klassifikation anhand der Hämolyse unterscheidet zwischen  $\alpha$ -Hämolyse (vergrünender Hämolyse),  $\beta$ -Hämolyse (vollständiger Hämolyse) und der  $\gamma$ - bzw. nichtvorhandenen Hämolyse. Die Lancefield-Antigen-Strukturcharakterisierung der  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken anhand der gruppenspezifischen Präzipitation, basiert auf dem Vorhandensein des sog. C-Kohlenhydrats der Bakterienwand, das für die Serogruppen A–S je einen differenten Aminozucker als antigene Komponente besitzt. Betrachtet man die Hämolyse allein, so ist eine Einteilung von *Streptococcus suis* dadurch nicht möglich. In Abhängigkeit vom verwendeten Blutagar findet sich nämlich

teils eine  $\alpha$ - (auf Schafsblut), teils  $\beta$ -hämolyzierende Wirkung (auf Pferdeblut) des Keimes (Estoepongstie 1993). Weiterhin ist die Existenz von nicht-hämolyzierenden Stämmen beschrieben. Mittels der Lancefield-Charakterisierung alleine ist eine genaue Typisierung ebenso unmöglich, wie mittels der Hämolyse. *Streptococcus suis* steht somit der Gruppe der Enterokokken nahe, unter denen sich auch Keime wie *Streptococcus bovis* und *Streptococcus faecalis* befinden (Facklam 2002).

Neben der serologischen Einteilung des Keimes kann dieser ebenso anhand verschiedener mikroskopischer oder biochemischer Marker charakterisiert werden.

Die biochemische Differenzierung von *Streptococcus suis* gelingt mit Hilfe verschiedener Fermentationsmuster mit Hilfe der „bunten Reihe“ oder spezifischer *Streptococcus suis*-Tests wie API 20 Strep der Firma Merieux.



Abb. 5 : Biochemischer Nachweis von *Streptococcus suis* mittels „bunter Reihe“: Anhand einer Kombination verschiedener Fermentationsmuster kann *Streptococcus suis* zweifelsfrei identifiziert werden.

Eine Kombination einer positiven Amylase-Reaktion mit einem negativen Acetoin-Nachweis lässt die Einordnung *Streptococcus suis* wahrscheinlich erscheinen (Devriese 1991).

Weiterhin reagiert der Keim Katalase-negativ und zählt zu den Non-Fermentern. Lediglich mittels einer Kombination chromogener Tests und der oben genannten Serotypisierungen und Hämolyseverhalten kann klinisch eine genauere Typisierung erstellt werden (Tarradas 1994).

Bei *Streptococcus suis* sind mittlerweile 35 verschiedene Serotypen (Hill 2005, Gottschalk 2007, Fittipaldi 2009, Wei 2009, Wertheim 2009) nachgewiesen, dabei

stellen Serotyp 2 und mittlerweile auch Serotyp 3 die häufigsten mit Krankheit assoziierten Serotypen dar (Higgins 1994; Higgins 1999, Fittipaldi 2009, Wei 2009). Es bestehen jedoch deutliche Unterschiede in der Prävalenz einzelner Serotypen, zum Beispiel zwischen dem europäischen und dem kanadischen Keimspektrum mit einer Häufigkeit des Serotyps 2 von 15-70% (Berthelot-Herault 2000; Higgins 2000, Fittipaldi 2009). In vergleichenden Untersuchungen zeigten sich europäische Stämme im Vergleich zu nordamerikanischen virulenter (Gottschalk 2000). Serotyp 2 war während des Ausbruches mit *Streptococcus suis* Infektionen in der VR China ebenfalls der häufigste Serotyp (Wei 2009). Serotyp 1 wurde in verschiedenen Arbeiten zum Teil häufig, zum Teil seltener bei erkrankten Ferkeln isoliert (Brisebois 1990, Boetner 1987), weitere krankheitsassoziierte Serotypen sind z.B. Serotyp 3 und 9 welche bei porcinen Meningitiden in Australien nachweisbar waren und hochvirulente Stämme des Serotyps 14, die in Großbritannien nachgewiesen wurden (Heath 1996). Außerdem existieren auch Stämme, welche mit mehr als einem Antiserum reagieren und entsprechend mehreren Serotypen angehören. In den wenigen Arbeiten in denen eine größere Menge Isolate untersucht worden waren fanden sich bei humanen *Streptococcus suis* Infektionen fast ausschliesslich Keime der Serogruppe 2 (Arends 1998, Berthelot-Herault 2002, Suankratay 2004, Wei 2009). In einer neueren Studie aus Frankreich, in der Proben aus dem Tonsillenbereich von Schweinen einer erkrankten Herde entnommen wurden, fanden sich jedoch in der Mehrzahl der Isolate nicht-typisierbare Kapselserotypen (Marois 2007).

Innerhalb einer Serogruppe unterscheiden sich die verschiedenen Keime ebenfalls hinsichtlich ihrer Pathogenität und möglicher Infektionsorte, so konnte beispielsweise bei verschiedenen Stämmen des Serotyps 2 ein Tropismus einerseits für Lungengewebe andererseits für Hirngewebe nachgewiesen werden (Vecht 1989). Die in unseren Versuchen verwendeten Bakterien gehören zumeist Serotyp 2 an, es wurden jedoch auch die Serotypen 1,4 und 14 verwendet, welche bei humanen (Serotypen 4 und 14) und Infektionen bei Ferkeln (Serotyp 1) nachgewiesen wurden (Boetner 1987, Brisebois 1990, Poggenborg 2008).

Andere Nachweismöglichkeiten bestehen durch PCR oder FISH-Nachweis einer *Streptococcus suis* spezifischen 16 S oder 23S-RNA-Sequenz (Marois 2007) oder durch Multiplex-PCR, mit welcher man Isolate gleichzeitig auf unterschiedliche Pathogenitätsfaktoren untersuchen kann (Silva 2006).

Neben der Zugehörigkeit zu einer bestimmten Serogruppe spielen wahrscheinlich unterschiedliche Virulenzfaktoren der Streptokokken eine wesentliche Rolle im unterschiedlichen Gewebstropismus und der variablen Pathogenität der Erreger.

Der am besten untersuchte Virulenzfaktor ist die bakterielle Polysaccharidkapsel von *Streptococcus suis* (Gottschalk 1992, Wibawan 1994, Smith 1999). Sie besteht aus den fünf verschiedenen Zuckerarten Rhamnose, Glucose, Galaktose, N-Acetylglucosamin und Sialinsäure. Versuche mit Bakterien und deren kapsellosen, isogenen Mutanten demonstrierten eine geringe Pathogenität der nichtbekapselten Keime und eine schnelle Entfernung dieser Erreger aus dem Blutkreislauf mittels Phagozytose (Charland 1998, Segura 1998, Smith 1999). Auf der anderen Seite existieren ebenfalls kapseltragende, aber avirulente Keime, die ähnliche Mengen Sialinsäure in ihrer Kapsel erhalten wie die virulenten *Streptococcus suis* Stämme (Charland 1996), so dass das alleinige Vorhandensein der Kapsel nicht alleine für die unterschiedliche Pathogenität verantwortlich sein kann. Zusätzlich konnte in Tierversuchen durch gegen Kapselantigen gerichtete Antikörper nur ein partieller Schutz vor einer Infektion erreicht werden (Charland 1997).

In *in vitro* Versuchen an humanen mikrovaskulären Hirnendothelzellen (human brain microvascular cells, HBMEC) konnten zwischen dem Adhäsionsverhalten kapseltragender und kapseldefizienter *Streptococcus suis*-Stämme keine nennenswerten Unterschiede nachgewiesen werden (Charland 2000), in Adhäsions- und Invasionsversuchen an verschiedenen Zelllinien inklusive HBMEC und porcinen mikrovaskulären Hirnendothelzellen (porcine brain microvascular cells, PBMEC) konnte eine Reduktion der Invasion durch Vorhandensein einer Kapsel nachgewiesen werden (Gibson 1993, Nizet 1997, Vanier 2004, Vanier 2007). Es zeigte sich unter anderen Versuchsbedingungen ausserdem eine höhere Adhärenz der kapsellosen Mutanten an HeLa-Zellen (Salasia 1995). Neuere Arbeiten an HEp 2-Zellen, PBMEC und PEDSV deuten ebenfalls daraufhin, dass das Fehlen einer Kapsel die Adhäsion begünstigt (Benga 2004, Vanier 2004, Benga 2005, Vanier 2007). Diese Unterschiede zwischen Kapselexpression und allgemeiner Virulenz könnten durch eine infektionsstadienabhängige Modulation der Kapselexpression bedingt sein, wie sie zum Beispiel für *Hämophilus influenzae* nachgewiesen wurde (St Geme 1996). Eine schwache bis nicht vorhandene Expression während des Adhäsionsvorganges an Epithelien könnte eine Freilegung von möglichen Adhäsinen bewirken, eine starke

Expression während der bakteriellen Zellvermehrung im Blut eine Opsonierung verhindern (Tikkanen 1996).

Neben dem Vorhandensein einer Kapsel existieren verschiedene Proteine, die mit verstärkter Virulenz assoziiert werden (Vecht 1991; Vecht 1992; Smith 1992; Smith 1996, Staats 1999). Das muramidase-released protein (MRP) ist ein 136 kDa großes Protein, das in den meisten europäischen, jedoch nicht in den amerikanischen virulenten Stämmen nachzuweisen ist (Vecht 1991; Segers 1998; Chatellier 1999). Ursprünglich nachgewiesen wurde das Protein bei virulenten Stämmen des Serotyps 2 (Smith 1997). Aufgrund einer geringen 17%-igen Homologie mit der Aminosäuresequenz des fibronectin-bindenden Proteins von *Staphylococcus aureus* bestand die Vermutung einer ähnlichen Funktion von MRP, diese konnte jedoch nie bestätigt werden (Smith 1992).

Ein weiterer potentieller Virulenzfaktor ist das extracellular factor protein (EF), ein 110 kDa großes Protein, das ebenfalls in den meisten europäischen, jedoch nicht in den amerikanischen virulenten Stämmen nachzuweisen ist (Vecht 1991; Segers 1998; Chatellier 1999). Ursprünglich nachgewiesen wurde das Protein bei virulenten Stämmen des Serotyps 2 (Smith 1997, Staats 1999). Zusätzlich zur Normalvariante existieren mehrere weitere, größere Varianten des Proteins mit unklarer Virulenzrelevanz, welche unter dem Begriff EF\* subsummiert werden (Silva 2006).

Eine eindeutige Beziehung zwischen dem Vorhanden- oder Nichtvorhandensein dieser Faktoren und Virulenz zu ziehen ist bislang nicht möglich. Während zunächst postuliert wurde, dass MRP- EF- Keime apathogen seien (Vecht 1991), konnte in mehreren Versuchen bei isogenen MRP- EF- Mutanten ebenfalls eine hohe Virulenz nachgewiesen werden (Galina 1996; Smith 1997), so dass die Möglichkeit besteht, dass es sich entweder um eine zufällige Koinzidenz zwischen Virulenz und beiden Faktoren handeln könnte, oder gewisse Virulenzfaktoren in einem multifaktoriellen Prozess austauschbar sind. In einer Übersichtsarbeit über die Pathogenitätsfaktoren bei *Streptococcus suis* in Europa konnten MRP+EF+ Stämme aus 80% der an Meningitis durch *Streptococcus suis* erkrankten Tiere isoliert werden (Allgaier 2001), eine Übersichtsarbeit aus Kanada fand jedoch in 72% der Fälle MRP- EF- Stämme in den untersuchten Isolaten (Gottschalk 1998). In der Arbeit von Allgaier fanden sich innerhalb aller untersuchten klinischen Isolate 15% MRP+/EF+ Stämme, die große Mehrheit mit 52% war MRP+/EF-, 32% MRP- und EF-. MRP-/EF+ kommt dabei nicht, oder nur ausgesprochen selten vor (Allgaier 2001).

Ebenso ungeklärt ist die Rolle des P-Adhäsins, eines 18 kDa schweren, in den zwei Variationen Pn und Po vorkommenden Adhäsionsfaktors. Bekannt ist lediglich die Wiedererkennung eines oberflächlichen Zellglykolipids durch das Adhäsins (Haataja 1993). In Versuchen von Lalonde konnte jedoch durch eine kompetitive Präinkubation von *Streptococcus suis* Stämmen mit einem BSA-Neoglykokonjugat keine Reduktion der späteren Adhäsion gezeigt werden, außerdem existiert dieses Adhäsins ebenfalls sowohl bei virulenten als auch bei avirulenten Stämmen (Lalonde 2000).

In weiteren Studien konnte ergänzend die Wichtigkeit eines Fibrinogen- und Fibronectin-bindenden Proteins für die Kolonisation von Zielorganen nachgewiesen werden (de Greef 2002).

Für das Vorhandensein eines oder mehrerer weiterer, bisher nicht entdeckter, in der Zellwand enthaltener Adhäsine spricht eine von Lalonde durchgeführte Versuchsserie. Durch Präinkubation verwendeter Zelllinien mit purifizierter Zellwand von *Streptococcus suis* vor Durchführung der Adhäsionsversuche konnte eine Reduktion der späteren Adhäsion um bis zu 93% nachgewiesen werden, was als Hinweis auf einen negativen Zusammenhang zwischen Vorhandensein einer Kapsel und Adhäsion interpretiert wurde (Lalonde 2000).

Die Verantwortlichkeit verschiedener Zellwandkomponenten für die Adhäsion wurde unter anderem für GBS und Pneumokokken bereits vor Jahren postuliert (Beachey 1981; Nealon 1985), die Rolle von Lipoteichonsäure und von weiteren Peptidoglykanen bei der Adhäsion von *Streptococcus suis* ist unklar.

Weitere, bislang nicht weiter charakterisierte Adhäsine wie ein für die Bindung an Albumin verantwortliches 39 kDa schweres Adhäsins und ein zur HSP 60-Familie gehörendes 60 kDa schweres IgG-bindendes Protein existieren sowohl in virulenten als auch in avirulenten Stämmen (Benkirane 1998).

Ein zusätzlicher Virulenzfaktor, welcher in ähnlicher Form bei anderen Bakterien nachgewiesen wurde, ist die Gruppe der Hämolyse. Suilysin zählt zu dieser Gruppe und ist der Familie der Cholesterin-bindenden Toxine zugehörig, die Zugabe von Cholesterin kann somit die Suilysin-Wirkung reduzieren (Jacobs 1994; Gottschalk 1995). Ebenso kann durch Verwendung von Antikörpern gegen Suilysin, gewonnen durch Inokulation des Hämolyseins in ein Kaninchen, ein gewisser Schutz des Wirtes erreicht werden (Jacobs 1996). Die Wirkung von Suilysin wurde ähnlich der Wirkung anderer Hämolyseine als multi-hit-Schädigung mit letztendlicher Bildung transmembranöser Poren beschrieben (Gottschalk 1995). Dabei gleicht das Toxin in seiner genetischen Sequenz

sehr stark dem Pneumolysin der Pneumokokken (Segers 1998). Das Suilysin besitzt einen nachgewiesenen zytotoxischen Effekt auf zahlreiche Zellgattungen (Norton 1999; Segura 1999; Charland 2000; Lalonde 2000, Vanier 2004). In verschiedenen Studien konnte eine höhere Zytotoxizität bei stärker Suilysin-produzierenden Stämmen nachgewiesen werden, eine schwach Suilysin-produzierende Mutante zeigte eine erniedrigte, jedoch in Abhängigkeit von der Bakterienzahl steigende Toxizität (Charland 2000; Lalonde 2000, Vanier 2004). Ebenso konnte durch bakterienfreie Überstände Suilysin-produzierender Bakterienkulturen alleine ein zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden (Jacobs 1994; Gottschalk 1995; Charland 2000). Dabei konnte durch hitzeinaktivierte Bakterien im Gegensatz zu vitalen Bakterien keine Zellschädigung induziert werden, was für eine Nichtzellgebundenheit und einen Exotoxincharakter des Suilysins spricht. Dies steht im Einklang mit Erkenntnissen von Gottschalk (Gottschalk 1995). Suilysin konnte in verschiedenen europäischen *Streptococcus suis* Stämmen als ein wesentlicher Pathogenitätsfaktor nachgewiesen werden, in anderen Untersuchungen mit Deletionsmutanten zeigte sich jedoch auch die Fähigkeit Suilysin negativer Keime, Infektionen hervorzurufen (Segers 1998, Chatellier 1999, King 2001, Lun 2003). Es zeigten sich ebenfalls Unterschiede hinsichtlich des klinischen Erkrankungsbildes bei porcinen Infektionen mit primär Hämolysin-positiven Stämmen als Verursachen von Meningitiden und primär Hämolysin-negativen Stämmen als Auslöser bronchopulmonaler Infekte (Allgaier 2001). Die höchste hämolytische Potenz enthielten in einer Übersichtsarbeit Keime der Serogruppen 1/2, 1 und 2 (Feder 1994), etwa 50-72% der klinischen Isolate in der Übersichtsarbeit von Allgaier waren Hämolysin-positiv. Ergänzend muss erwähnt werden, dass in Untersuchungen von Jacobs phänotypisch Hämolysin-negative Stämme genotypisch Hämolysin-positiv waren, dies entspricht einer möglichen Regulierung des entsprechenden Genes in Abhängigkeit vom Stadium der Infektion (Jacobs 1996). In einer Studie von Staats konnte nachgewiesen werden, dass Mutationen des Suilysin-Gens eine gewisse Relevanz für die Virulenz einzelner *Streptococcus suis*-Isolate haben (Staats 1999). Möglicherweise unterscheidet sich die Pathogenese der Infektion durch unterschiedliche Stämme erheblich und die Konsequenzen von Adhäsion durch Suilysin negative Stämme zeigen sich anders, zum Beispiel durch eine vermehrte Zytokin-Ausschüttung der Zellen, wie es bereits für *Escherichia coli*, *Streptococcus viridans* und Pneumokokken nachgewiesen werden konnte (de Man 1989; Geelen 1993; Vernier 1996). Ausserdem spielt das Suilysin eine wichtige Rolle bei der Reaktion der Immunzellen und der Zytokininduktion (Billington

2000; Lun 2003). Für die Teilprozesse Adhäsion und Invasion konnte an PBMEC kein Unterschied zwischen Suilysin-positiven und Suilysin-negativen Stämmen nachgewiesen werden (Vanier 2004).

In Ansätzen, in denen mittels Multiplex-PCR der gleichzeitige Nachweis verschiedener Pathogenitätsfaktoren in einem Einzeltest versucht wurden, konnten verschiedene Muster von Pathogenitätsfaktoren als relevant herausgearbeitet werden (Silva 2006).

## 1.4. Ziel der Dissertation

In unserem Modell der Blut-Liquor-Schranke auf Basis einer porcinen Plexus choroideus-Zellkultur wurde ein choroidaler Zellmonolayer mit verschiedenen *Streptococcus suis* Stämmen inokuliert, um die Adhäsions- und Invasionsfähigkeit verschiedener Keime und deren Pathogenitätsfaktoren unter unterschiedlichen Bedingungen zu untersuchen und zu quantifizieren.

Anhand der Auswirkungen der unterschiedlicher Oberflächenmerkmale und Serogruppierungen der insgesamt 32 verschiedenen Isolate auf die Adhäsions- und Invasionsfähigkeit der unterschiedlichen Bakterienstämme wurde versucht, die Bedeutung der direkten Adhäsion und Invasion für die Zerstörung der Blut-Liquor-Schranke im Rahmen der Pathogenese der Erkrankung bestimmen zu können. Wie bereits für verschiedene andere Bakterien bekannt, können sowohl die direkte Schädigung des Plexusepithels durch Adhäsion, Invasion und Exotoxinsekretion und/oder andere Mechanismen, als auch die zellassoziierte Antwort des Organismus und Mediatorfreisetzung letztendlich die Ursache für den vollständigen Zusammenbruch der Blut-Liquor-Schranke darstellen.

Mittels direkter Adhäsions- und Invasionversuche untersuchten wir die Fähigkeit verschiedener *Streptococcus suis* Stämme an Plexusepithelien primär zu adhären, nachdem bereits zuvor nachgewiesen worden war, dass *Streptococcus suis* in der Lage sein kann, die BLS einerseits opsoniert in veränderten Makrophagen zu überwinden oder an porcinem cerebralen Endothel zu adhären und dieses zu invadieren, darüber hinaus ist der Keim sogar zur intraphagosomalen Vermehrung befähigt (Williams 1990, Norton 1997, Vanier 2004). Zum Vergleich der Adhäsions- und Invasionspotenz von *Streptococcus suis* wurden neben unserem Blut-Liquor-Schranken-Modell Versuche mit bereits durch andere Arbeitsgruppen beschriebenen Zelltypen, A549 und HBMEC, durchgeführt.

In unserem *in vitro*-Modell verwendeten wir mit *Streptococcus suis* einen Keim, der sowohl bei Infektionen beim Schwein nachgewiesen werden konnte als auch humanpathogene Relevanz hat. Dieser wird an Zellen ebenfalls porcinen Ursprungs untersucht, so daß dieses Modell dem Infektionsgeschehen einer *Streptococcus suis*-Infektion beim Schwein nahe kommt. Es besteht beim verwendeten Keim zudem eine humanmedizinische Relevanz auf Grund regelmäßiger Infektionen bei Arbeitern der

fleischverarbeitenden Industrie und sonstigen im Kontakt zu Schweinen oder Vieh stehenden Personen. Insgesamt postulieren wir, dass der Teilschritt der Adhäsion am Plexusepithel nach Durchdringen der Blut-ZNS-Schranken einen wichtigen Teil der Pathogenese der Meningitis darstellt und zur letztendlichen Desintegration der Blut-Liquor-Schranke beiträgt. Es ist bereits bekannt, dass der Verlauf der bakteriellen Meningitis von der Liquorseite aus perpetuiert wird, dabei ist bislang nicht geklärt in wieweit die Adhäsion am Plexusepithel dafür einen relevanten Teilschritt darstellt, was in dieser Arbeit untersucht werden soll. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass es zusätzlich zu einem so genannten „Reseeding-Phänomen“, einem Wiedereintritt der Erreger in den Blutkreislauf über die apikale Oberfläche des Plexus choroideus kommt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Präparation und Zellkultur der Plexusepithelzellen

Die Präparation der Plexuszellen folgte mit Modifikationen dem Protokoll von Gath und Haselbach (Gath 1997, Haselbach 2001).

#### Präparation im Schlachthof

Vor der Zellkultivierung im Labor mussten zunächst im Schlachthof frische Plexus choroidei aus den Seitenventrikeln frisch geschlachteter adulter Schweine gewonnen werden.



*Abb. 5 : Freipräparation des Plexus choroideus:  
Mittels steriler Pinzette wird der Plexus choroideus aus den Seitenventrikeln der frisch geschlachteten Schweine entfernt.*

Die Entnahme der Plexus aus den Hirnhälften erfolgte maximal einige Minuten nach der Schlachtung der Tiere. Die Freipräparation des Gewebes erfolgte unter möglichst sterilen Bedingungen. Die Hirnhälften wurden nach Halbierung der Tiere mit der linken unsterilen Hand aus der Kalotte gelöst und die Plexus mittels steriler Pinzette aus den Seitenventrikeln freipräpariert. Anschließend wurden sie sofort in die bereitgestellte

Lösung aus Hank's Buffered Salt Solution <sup>++</sup> mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>(HBSS) + 2 % Penicillin/ Streptomycin + 15 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) überführt. Blasse oder livide aussehende Plexus wurden verworfen. Es erfolgte in der Regel eine Präparation von etwa 30-50 Plexussträngen, etwa einem Feuchtgewicht von 3-5 g entsprechend. Vor dem Transport ins Labor wurden die Plexusstränge in serumfreies Medium überführt.

#### Präparation im Labor

Unter sterilen Bedingungen erfolgte die Präparation der Plexusstränge zunächst durch Abtrennung beider Endabschnitte der Plexus.



*Abb. 6 : Plexus choroideus in Petrischale:  
Vor dem Abstreifen am Rand der Petrischale ist der Plexus choroideus noch stark mit Blut gefüllt.*

Durch vorsichtiges Abstreifen des Gewebes an den inneren Rändern steriler Petrischalen und durch Kapillarwirkung wurde der Plexus choroideus zum Ausbluten gebracht. Weiter wurden eventuell anhaftende Hirngewebeteile mit einer sterilen Pinzette entfernt. Durch diese Vorbehandlung erfolgte bereits eine erste mechanische Entfernung weiterer Fremdzellpopulationen. Eine weitere Reduktion der Erythrozyten wurde durch dreimaliges Waschen der Gewebestränge in HBSS-Hepes, diesmal ohne Zusatz von Ca<sup>2+</sup>

und  $Mg^{2+}$  erreicht, im Rahmen dieser Waschungen wurden die Gewebeteile wiederum am Rand der sterilen Petrischalen abgestreift.

### Enzymatische Verdauung

Nach Beenden des Waschvorgangs erfolgte das Wiegen der Gesamtmenge der Stränge nach Abschütten der Waschlösung und eine enzymatische Verdauung der Plexusstränge durch 20 ml einer 0.2 %igen Trypsinlösung pro 1 g Plexusnassgewicht. Diese Trypsinsuspension wurde zunächst für 45 Minuten bei 4°C inkubiert, um ein gleichmäßiges Durchdringen des Gewebes mit der Enzymlösung zu gewährleisten. Anschließend wurde sie etwa 20 Minuten im 37°C warmen Wasserbad unter leichtem automatischen Schwenken belassen.

Durch diese Behandlung erfolgt eine Ablösung der Epithelzellen vom darunter liegenden Stroma.

Die Beendigung des enzymatischen Prozesses erfolgte durch die Zugabe von ebenfalls körperwarmem Fetalem Kälberserum (FCS) in gleichem Volumen der Trypsinlösung nach Ablauf der 20 Minuten. Nach Beenden des Andauens erfolgte ein nochmaliges Waschen der jetzt deutlich ausgedünnten Gewebestränge zum Ablösen noch möglicher, anheftender Epithelzellen und die schlussendliche Entfernung der Stromareste mit einer sterilen Pinzette.

### Resuspension und Aussaat

Auf die Beendigung der Verdauung folgte die Zentrifugation der Zellsuspension für 10 Minuten bei 300 Rotationen/min in der Rotationszentrifuge und anschließend eine erneute Resuspension mit serumhaltigen Medium (SHM) bestehend aus einer 1:1 Mischung von Dulbecco's modified Eagle medium and Ham's F-12 Medium angereichert durch 4 mM L-Glutamin, 5%-iges hitzeinaktiviertes FCS, 5 µg Insulin/ml und 100 µg Penicillin/Streptomycin/ml (26,3 ml Medium/g Plexusgewebe). Bei dieser Resuspension musste auf vorsichtiges Pipettieren geachtet werden, da bei zu intensivem Vorgehen ein zu starker Isolationsgrad der Zellen entstehen kann, welcher ein schlechteres Anwachsen der Zellcharge bewirken oder im schlimmsten Falle ein Verwerfen der kompletten Charge notwendig machen kann. Um das Überwuchern des Zellrasens mit fibroblastenartigen Zellen zu vermeiden, wurden 20 µM Cytosin-Arabinosid zum Medium zugefügt. Aufgrund eines spezifischen Nukleosidtransporters

des Plexusepithels bleiben diese Zellen unbehelligt, während alle anderen proliferierenden kontaminierenden Zelltypen absterben. Zuletzt wurde die Zellsuspension auf 12-Napf-Platten aufgebracht, dabei entspricht 1 g Plexusgewebe (Feuchtgewicht) auf etwa 90 cm<sup>2</sup> optimalen Bedingungen zum Anwachsen.

Am folgenden Tag wurden die Zellen erstmalig mit serumhaltigem Medium gewaschen, um Erythrozyten und nicht adhärenente Epithelzellen zu entfernen, anschliessend erfolgte ein Wechsel des Mediums durch vorsichtiges Abpipettieren, einmaliges Waschen mit serumhaltigem Medium und neuerlichem Aufbringen von frischem Medium bis zum Zeitpunkt vollständiger Konfluenz.

War die Kultur nahezu frei von allen potentiell kontaminierenden Zellen und zeigte sich eine vollständige Konfluenz, erfolgte die Umstellung des Mediums meistens am 9. oder 10. Tag nach Aussaat.

#### Umstellung und Verwendung der Zelllinie

Zum Zeitpunkt der vollständigen Konfluenz des Zellrasens erfolgte die Umstellung der Zellcharge auf serumfreies Medium. Nach einmaligem Waschen mit serumfreiem Medium folgte ein wiederum zweitägiger Wechselrhythmus mit frischem Medium bis zum 4. oder 5. Tag nach Medienumstellung, an dem die Verwendung der Charge für die Versuche stattfand.

#### Vorbereitung des Plexusepithels für elektronenmikroskopische Schnitte

Ausbringen und Anzucht der Plexus-choroideus-Zellen zur anschließenden elektronenmikroskopischen Aufarbeitung erfolgte analog der zuvor beschriebenen Prozedur, im Gegensatz zu den Adhäsions- und Invasionsversuchen jedoch anstatt in 12-Napf-Platten auf Filtermembranen. Zunächst wurde der konfluente Plexusepithellayer auf Filtermembranen für 24 h in 5% Glutaraldehyd fixiert. Am Folgetag wurden die Filter ausgeschnitten und in Schnappdeckelgläschen mit 0,1 M Cacodylat-Puffer bei 4°C bis zur Einbettung gelagert.

Am Tag der Durchführung der Elektronenmikroskopie wurden die Zellen abwechselnd mit 0,1 M Cacodylat-Puffer und 2% OsO<sub>4</sub> mit 0,8% Hexacyanoferrat gewaschen, danach erfolgte die Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe, die Einbettung

in Epon und ein anschliessendes Erhitzen. Nach Anfertigung von 10-100 nm dicken Schichten erfolgte die elektronenmikroskopische Untersuchung der Präparate (siehe Abb. 17).

## 2.2. Anzucht und Kultur weiterer verwendeter Zelllinien

### HBMEC

Für die Vergleichsversuche der Adhäsion an humanen Hirnendothelzellen verwendeten wir die durch eine Hirnbiopsie an einer epilepsiekranken Patientin gewonnene Zelllinie HBMEC. Diese Zelllinie wurde durch Transfektion mit dem Simian Virus 40 large T Antigen immortalisiert und behielt dabei ihre wesentlichen funktionellen und morphologischen Charakteristika (Stins 1997).

Eine Verwendung der Zelllinie erfolgte in unseren Versuchen bis zur Passage 30.

### Zellkultur

Die Zellkultivierung erfolgte in einem 37° C warmen Medium auf Basis von RPMI 1640-Medium, ergänzt um 10%-iges hitzeinaktiviertes FCS, 10%-iges hitzeinaktiviertes NU-Serum, 2mM L-Glutamin, 100 U Penicillin/Streptomycin/ml, 1mM Na-Pyruvat, weitere nicht-essentielle Aminosäuren und Vitamine. Bei Verwendung von primär aufgetauten Zellen erfolgte eine Zugabe von ECGF (epidermal cell growth factor).

Nach erstmaligem Auftauen der Zelllinie erfolgte eine Suspension der Zellen mit jeweils 12 ml Medium in Zellkulturflaschen und eine regelmäßige zweitägige Fütterung der Zelllinie mit frischem Medium, lediglich am ersten Tag nach einer frischen Aussaat erfolgte der erstmalige Wechsel des Mediums bereits am Folgetag.

Bei Konfluenz des Zelllayers wurden der Kulturflasche zunächst 5 ml Trypsin zugeführt und diese etwa 15 Minuten im Wärmeschrank bei 37° C belassen, um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Durch leichtes Klopfen gegen die Zellkulturflasche wurden die Zellen vom Plastikboden gelöst und anschließend die Andauung mit einem der Trypsinmenge identischen Menge an PBS Puffer wieder gestoppt.

Es folgte eine Zentrifugation der Zellen für 15 Minuten bei 1180 Umdrehungen/min und eine anschließende Resuspension des Bodensatzes mit frischem Medium und Neuverteilung in die doppelte Menge neuer Zellkulturflaschen im Verhältnis 1:2.

Bei Verwendung der Zellen für die Versuchsreihen wurden nach der Zentrifugation und der Resuspension in Medium jeweils 0,5 ml der Suspension auf jeweils 0,5 ml bereits vorher pro Napf zugegebenes Medium gegeben. Es folgte schließlich die Anzucht bis zu Konfluenz und die anschließende Verwendung in den Versuchsreihen. Dafür wurde der Monolayer unmittelbar vor Versuchsbeginn dreimal mit HBSS gespült und schließlich im Rahmen der verschiedenen Versuchsaufbauten verwendet.

#### A 549-Zellen

Für die Vergleichsversuche der Adhäsion verwendeten wir die einem humanen Bronchialkarzinom entstammende epitheliale Zelllinie A 549.

#### Zellkultur

Die Zellkultivierung erfolgte in 37°C warmen Dulbecco´s Modified Eagle Medium unter Zusatz von 10%-igem hitzeinaktiviertem FCS, 2mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin/Streptomycin und 1mM Na-Pyruvat.

Nach erstmaligem Auftauen der Zelllinie erfolgte eine Suspension der Zellen mit jeweils 12 ml Medium in Zellkulturflaschen und eine regelmäßige zweitägige Fütterung der Zelllinie mit frischem Medium, lediglich am ersten Tag nach einer frischen Aussaat erfolgte der erstmalige Wechsel des Mediums bereits am Folgetag.

Bei Konfluenz des Zelllayers wurde die Kulturflasche zunächst mit sterilem Phosphate Buffered Saline (PBS) gereinigt und anschließend eine von der Kulturflaschengröße abhängige Menge Trypsin/Calciumdinatriummethyldiamintetraacetat (EDTA) zugeführt und diese etwa 15 Minuten im Wärmeschrank bei 37° C auf dem Zellrasen belassen, um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen.

Durch leichtes Klopfen gegen die Zellkulturflasche wurden die Zellen vom Plastikboden gelöst und anschließend die Andauung der Zelllösung durch eine der Trypsinmenge identischen Menge an PBS Puffer wieder gestoppt.

Nach Beendigung der Andauung erfolgte eine Zentrifugation der Suspension mit 1180 U/m für etwa 5-10 Minuten bei 25°C, ein anschließendes Dekantieren des Überstandes und eine Resuspension mit wenig frischem Medium und die Rückführung in frische bereits mit vorgewärmten Medium gefüllte Zellkulturflaschen.

Bei Verwendung der Zellen für die Versuchsreihen wurden nach der Zentrifugation der Zellen und der Resuspension in Medium die gewünschte Zellzahl von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml durch Auszählung in der Neubauer-Zählkammer eingestellt, jeweils 0,5 ml der Suspension auf jeweils 0,5 ml bereits vorher pro Napf zugegebenes Medium gegeben und dort im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> unter regelmäßigen Mediumswechseln bis zur Konfluenz gezüchtet.

Anschließend wurde der Monolayer unmittelbar vor Versuchsbeginn dreimal mit HBSS gespült und schließlich im Rahmen der Adhäsionsversuche mit entsprechenden Bakterienlösungen inokuliert.

### 2.3. Auswahl der *Streptococcus suis* Stämme

Zunächst führten wir orientierende Adhäsionsversuche für die Gesamtzahl der vorhandenen Bakterienstämme durch. Dazu wurden mindestens 2-3 Adhäsionsversuche mit allen 27 Stämmen und einer niedrigen Inokulationsdosis von  $10^5$  Bakterien/ml durchgeführt.

Tab. 1 : Verwendete Bakterienstämme und Virulenzfaktoren:  
Die Tabelle zeigt alle in den Versuchen verwendeten Bakterienstämme, ihre in den Versuchen verwendeten Codes und ihre Pathogenitätsfaktoren.

Keim	Stamm	Herkunft	Cps	mrp	efp	sui	HU/PO	
A1	AC2212	EU	2		+	-	+	HU
A2	AC2947	EU	1		+	-	+	HU
A3	MAC724	EU	2		+	-	+	HU
A4	AC1448	EU	2		+	-	+	HU
A5	AC3940	EU	NT		s	+	+	HU
A6	S735/DSM9682	EU	2		+	*	+	PO
B1	P1/7	EU	2		+	+	+	PO
H1	A305/3/97	EU	NT		-	-	+	PO
H2	P204	EU	2		+	+	+	PO
H3	A5439/96	EU	NT		-	-	+	PO
H4	Wildtyp Strain 10	EU	2		+	+	+	PO
H5	Strain 10/10 caps EF	EU	keine		+	+	+	PO
H6	A5505/93	EU	NT		+	-	+	PO
H7	A386/94	EU	NT		+	-	+	PO
L1	Strain 3	EU	2		+	+	?	PO
L2	Strain 10	EU	2		+	+	?	PO
L3	Strain 22	EU	2		+	+	?	PO
L4	T15	EU	2		-	-	+	PO
L5	12	EU	2		-	-	-	PO
L6	16	EU	2		-	-	-	PO
L7	Strain 22	EU	2		+	+	?	PO
L8	Strain 24	EU	2		+	*	?	PO
L9	D282	EU	2		+	+	+	PO
L10	4005	EU	2		+	+	+	PO
Q1	90-2741	AM	2		VAR	-	+	HU
Q2	91-1804	AM	2		VAR	-	+	HU
Q3	94-3047	AM	2		VAR	-	+	HU
Q4	98-3634	AM	2		VAR	-	+	HU
Q5	99-734723	AM	2		VAR	-	-	HU
S1	S428/DSM9683	EU	1		-	-	+	PO
S4	Ss4	EU	4		VAR	-	+	PO
S14	Ss14	EU	1		+	-	+	PO

In Spalte eins der Tabelle findet sich der von uns verwendete Code des Bakterienstammes, in Spalte zwei die Bezeichnung des zur Verfügung stehenden

Institutes. Spalte drei beschreibt, ob es sich um einen europäischen oder amerikanischen Stamm handelt, Spalte vier den Kapselserotyp, so eine Kapsel vorhanden, Spalte fünf, sechs und sieben das Vorhandensein von MRP, EF und Suilysin und Spalte acht ob es sich um ein humanes oder ein porcines Isolat handelt.

Die Keime A1-A5 entsprechen dabei verschiedenen humanen klinischen Isolaten europäischer Herkunft aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie der RWTH Aachen. A1, A2 und A5 entsprechen klinischen Liquorisolaten an Meningitis erkrankter Patienten, A4 entstammt einem Abszess im Mundbereich, A3 wurde aus Mittelohr und Kleinhirngewebe eines Sektionsfalles gewonnen.

Der Keim A6 entspricht dem in den meisten Versuchen anderer Kollegen verwendeten Referenzkeim S735 aus der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen DSMZ.

Der Keim B1 entspricht einem aus einem erkrankten Schwein isolierten Keim der Organisation Intervet International aus den Niederlanden.

Die Keime H1-H7 entsprechen verschiedenen aus Schweinen isolierten Keimen der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

Die Keime Q1-Q5 entsprechen verschiedenen nordamerikanischen Isolaten, von durch eine nicht weiter spezifizierte Infektion mit *Streptococcus suis* klinisch erkrankten Patienten.

Die Keime L1-L10 entsprechen verschiedenen porcinen Isolaten der Serogruppe 2, die Keime S1, S4 und S14 den Referenzstämmen der Serogruppen 1,4 und 14 der Universität Lelystad/NL.

Nachdem in dem ersten Durchgang mit einer Inokulationsdosis von  $1 \times 10^5$ /ml alle Keime verwendet wurden, reduzierten wir die Zahl der Versuchsstämme in den folgenden Versuchsreihen auf letztlich 14 verschiedene Stämme mit möglichst unterschiedlichen Charakteristika hinsichtlich der möglichen Virulenzfaktoren. Die von uns zu diesem Zeitpunkt neu erhaltenen Stämme H3-H7 wurden ebenfalls integriert, so dass die

folgenden Adhäsionsversuchsreihen mit insgesamt 18 verschiedenen Keimen durchgeführt wurden.

Mit den ausgewählten Keimen wurden in mindestens drei weiteren Wiederholungen Adhäsionsversuche nach dem oben genannten Schema mit zwei verschiedenen Inokulationsdosen ( $1 \times 10^6$  und  $1 \times 10^7$  cfu/ml) durchgeführt.

## 2.4. Vorbereitende und begleitende Versuche

Zur Optimierung des Versuchsaufbaus wurden im Vorfeld der Hauptuntersuchungen einzelne Variablen späterer Hauptversuche genauer untersucht.

### 2.4.1. Ultraschallsensibilität der Bakterienstämme

Um die fehlende Schädigung der eingesetzten Bakterien durch die Ultraschallanalyse der Plexusepithelzellen nachzuweisen, wurden in drei Versuchen insgesamt 12 eingestellte Bakteriensuspensionen verschiedener schwächer adhärenter Keime, darunter A6, Q5 und S4 unter Verwendung des üblichen, in den Hauptversuchen verwendeten Ultraschallverfahrens lysiert.

Dabei erfolgte unter sterilen Bedingungen der Verschluss der Platten mithilfe von Tegaderm-Klebefolie und nach kreuzförmigem Schlitzen der Folie des jeweilig zu beschallenden Napfs mit einem sterilen Skalpell die Ultraschallanalyse jedes einzelnen Napfinhaltes für 30 Sekunden im Pulsationsmodus der Sonotrode bei maximaler Stärke von 100 W in chronologischer Reihenfolge. Bei der Lyse wurde auf eine ausreichende Eintauchtiefe der Sonotrode und ein enges Anliegen der Folie geachtet, um einerseits Kontaminationen anderer Bereiche der Folie zu vermeiden, andererseits um einem Entweichen des bakterienhaltigen Aerosols vorzubeugen.

Zwischen jeder Ultraschallanalyse eines einzelnen Napfs erfolgte eine Desinfektion der Sonotrode in 70%-igem Ethanol für 20 Sekunden bei maximaler Sonotrodenstärke und die manuelle Reinigung der Sonotrode mit einem sterilen Tuch, danach jeweils das Eröffnen des nächsten Napfs und dessen Ultraschallanalyse. Vor und nach der Lyse wurde eine Verdünnungsreihe der verwendeten Bakteriensuspensionen angefertigt, um die genaue Bakterienkonzentration bestimmen zu können und zu der ursprünglich eingesetzten Konzentration in Beziehung gesetzt. Während der Reinigungsphase der Sonotrode wurde die Bakteriensuspension abpipettiert und im Eisbad gelagert. Der Inhalt der Näpfe, welche bereits mit der Sonotrode behandelt wurden, wurde direkt ausplattiert, oder kurzzeitig auf Eis gelegt und nach Beendigung der Ultraschallbehandlung ausplattiert. Hintergrund dieses Versuchs war es herauszufinden ob die Bakterien bei der Ultraschallbehandlung Schaden nehmen und ob eine Zersprengung der in der Regel in kurzen Ketten vorkommenden Streptokokken durch die Ultraschallanalyse stattfindet. Überprüft wurde dies mittels der Auszählung der cfu/ml.

#### 2.4.2. Inokulumabhängigkeit der Adhäsion

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Abhängigkeit der Anzahl der adhärenierten Bakterien/ml von steigenden Inokulationsdosen untersucht. Es wurden Inokulationsdosen von  $1 \times 10^4$  bis  $1 \times 10^8$  cfu/ml verwendet. Wie beim Hauptversuch der Adhäsion wurden zwei Bakterienstämme, in diesem Fall der Referenzstamm A6 und Q5 in variablen Bakterienkonzentrationen auf den Zelllayer aufgebracht. Die tatsächliche Inokulationsdosis wurde in Form einer Verdünnungsreihe jeweils auf Columbia-Agar ausplattiert.

#### 2.4.3. Zeitabhängigkeit der Adhäsion

Um einerseits einen Zeitpunkt zu finden, an dem bereits eine nennenswerte Adhäsion besteht, andererseits eine möglichst hohe Praktikabilität für die Versuchsaufbauten der Hauptversuche zu gewährleisten und zudem eine theoretisch mögliche toxische Langzeitwirkung der Bakterien auszuschließen, wurde in mehreren Versuchen die nachgewiesene Adhäsion für verschiedene Bakterienstämme über einen längeren Zeitraum bestimmt.

Der Referenzkeim A6, sowie der leicht besser adhärenierende Keim Q5 wurden jeweils in den in den Hauptversuchen verwendeten Standardinokulationsdosen von  $1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  cfu/ml entsprechend einer MOI von 10-100 bis zu vier Stunden lang auf dem Epithelzellrasen belassen. In der Folge wurden die effektiv adhärenierten Bakterien, sowie die prozentuale Adhäsion der Keime A6 und Q5 gegen die verstrichene Zeit aufgetragen.

#### 2.4.4. Kälteabhängigkeit der Adhäsion

Zur Klärung der Frage ob die Proteinneusynthese einen relevanten Einfluss auf die Adhäsion hat, wurden Versuche mit dem stark adhärenierenden Keim H1 in vier verschiedenen niedrigen Konzentrationen am Epithel bei unterschiedlichen Temperaturen vorgenommen. Dabei setzten wir die Adhäsionsergebnisse bei Umgebungstemperatur als 100% und betrachteten die Adhäsionsfähigkeit bei 4°C im Verhältnis zu diesen. Hintergrund dieses Versuchsaufbaus war ebenso der Versuch des

Nachweises einer verminderten Adhäsion unter Kühlung der Proben auf 4°C. Aufgrund organisatorischer Gründe existiert eine kurze Pause zwischen Lyse der Zellen nach Adhäsion/Invasion und dem anschließenden Ausplattieren auf die Agarplatten, in welcher die Keime in der Zellsuspension bei 4°C auf Eis gelegt wurden.

#### 2.4.5. Vergleich verschiedener Zelllinien

Als Variante des Hauptadhäsionsversuches wurden zwei endotheliale Zelllinien (HBMEC und A549) mit verschiedenen *Streptococcus suis* Stämmen inkubiert, zu denen bereits publizierte Daten hinsichtlich des Adhäsionsverhaltens vorlagen. HBMEC wurde im Rahmen einer Arbeit von Charland (Charland 2000) bereits hinsichtlich der Adhäsion durch *Streptococcus suis* untersucht, jedoch mit einer deutlich niedrigeren MOI, A 549 im Rahmen einer Arbeit von Lalonde (Lalonde 2000). In unseren dreifach wiederholten Versuchen verwendeten wir eine Inokulationsdosis von  $1 \times 10^7$  cfu/ml, entsprechend einer MOI von ca. 100.

#### 2.4.6. Adhäsion nach vorheriger Stimulation mit TNF- $\alpha$

Wir untersuchten die Adhäsion zweier verschiedener Keime (A6 und Q5) bei einer Inokulationsdosis von MOI 10 nach vorheriger Stimulation des Pexusepithels mit TNF- $\alpha$ , einem wesentlichen proinflammatorischen Zytokin mit hoher Relevanz bei der Entstehung einer bakteriellen Meningitis (Frosch 2003).

Dazu wurden die Zellen vor der Inokulation mit den Bakterien für 1 h mit TNF- $\alpha$  in einer Konzentration von 5 ng/ml respektive 10 ng/ml inkubiert.

Nach Entfernung des TNF- $\alpha$  betrug die normale Inkubationszeit danach wie in den meisten anderen Adhäsionsversuchen 2 h.

Es wurden für beide Keime jeweils zwei Versuche mit jeweils zwei verschiedenen TNF- $\alpha$  Dosierungen vorgenommen.

Die Darstellung erfolgte als relativer prozentualer Mittelwert im Vergleich zu den Mittelwerten der ohne Prästimulation durchgeführten Versuche.

#### 2.4.7. Adhäsion nach Vorbereitung mittels Rotationszentrifuge

Um die Möglichkeit einer besseren Adhärenz der Keime an die Plexusepithelzellen mittels einer 10-minütigen Vorbehandlung in der Rotationszentrifuge bei 300 g/min ermitteln zu können, wurde eine Versuchsreihe mit jeweils vier Wiederholungen mit den Keimen A6, Q5 und S4 durchgeführt. Die verwendete Inokulationsdosis betrug  $1 \times 10^6$ /ml entsprechend einer MOI 10, die Zentrifuge wurde während den Versuchen auf 4°C gekühlt um ein Bakterienwachstum unter der Behandlung zu vermeiden. Ziel war hier ein Vergleich zwischen herkömmlicher oberflächlicher Exposition der Zellen und einer intensivierten Exposition unter Verwendung der Rotationszentrifuge.

## 2.5. Hauptversuche Adhäsion und Invasion

### 2.5.1. Versuchsvorbereitung

Zur Vorbereitung des Adhäsionsversuches erfolgte am Vorabend des Versuchs eine Inkubation der bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Primäraliquots von  $100\ \mu\text{l}$  der entsprechenden Bakterienstämme in jeweils  $10\ \text{ml}$  THB in ein mit einer Zeitschaltuhr versehenes und mit Eissäcken gekühltes Wasserbad, welches so programmiert wurde, dass eine Übernachtskultur der Bakterien von etwa 5-7 Stunden bis zum Erreichen der mid-log Phase gewährleistet werden konnte. Die ideale Anwachszeit wurde durch Wachstumskurven im Vorfeld ermittelt. Ähnlich wie bei *Streptococcus agalactiae* konnten auch bei *Streptococcus suis* in vorherigen Versuchen durch andere Arbeitsgruppen keine Adhärenzunterschiede zwischen log-Phase Bakterien und Bakterien der stationären Phase nachgewiesen werden (Tamura 1994; Lalonde 2000). Gleichzeitig erfolgten aus dem inokulierten THB-Medium Kontroll-Ausstriche zur Quantifizierung eines Bakterienwachstums und zum Ausschluss einer Kontamination.

Zu Versuchsbeginn wurde die THB-Lösung bei  $4^{\circ}\text{C}$  in der Rotationszentrifuge bei  $3000$  Rotationen/min für  $10\ \text{min.}$  zentrifugiert, danach erfolgte ein vorsichtiges Abschütten und die Resuspension des Bakterienpellets mit  $10\ \text{ml}$  PBS mit  $0.1\ \%$  BSA, sowie zwei weitere Zentrifugations- und Resuspensionsschritte nach gleichem Vorgehen. Anschließend erfolgte eine photometrische Einstellung der Bakteriensuspension auf eine Extinktion von ca.  $0.651$  bei einer Wellenlänge von  $600\text{nm}$ , entsprechend einer bakterienstammabhängigen Konzentration von  $1 \times 10^8$  bis  $5 \times 10^8$  cfu/ml, welche zuvor in Wachstumskurven für jeden einzelnen Keim ermittelt worden war. Zuletzt wurden die photometrisch eingestellten Bakterienlösungen auf die versuchsabhängig gewünschte Bakterienzahl pro Milliliter Inokulationsvolumen mit HBSS/Hepes ohne Antibiotikazusatz verdünnt und kurzfristig in einem bereitgestellten Eisbad untergebracht, um weiteres Keimwachstum zu verhindern. Gleichzeitig erfolgten aus dem inokulierten THB-Medium Kontroll-Ausstriche auf Columbia-Agar.

## 2.5.2. Adhäsionsversuche

Vor Inokulation der Bakterien auf die konfluente Zellkultur erfolgte eine mikroskopische Betrachtung der Zellen ( $\sim 1-2 \times 10^5$  Zellen/Napf) hinsichtlich ihrer Konfluenz oder etwaiger Kontaminationen. Anschließend wurde der Zellrasen dreimalig mit HBSS/Hepes (37°C) gewaschen und zuletzt 1 ml der Lösung im Napf belassen. Vor Inkubation der Zellen mit der jeweiligen Batersuspension erfolgte eine Ausplattierung der Lösung mittels einer Verdünnungsreihe auf Columbia-Agar, um nach dem Versuch die richtige Verdünnung der Inokulationsdosis hinreichend sicher bestimmen zu können. Daraufhin wurde jeweils 1 ml der ausplattierten Batersuspension pro Napf zugegeben, wobei auf jeder 12-Napf-Platte drei Nöpfe für eine Positivkontrolle (Bakterienlösung, jedoch kein darauf folgendes Waschen), eine Negativkontrolle (keine Bakterienlösung, trotzdem Waschen) und eine Vitalitätskontrolle (Trypanblau-Färbung des Zellrasens auf Zytotoxizität nach Bakterieninokulation) reserviert wurden.

Es folgte eine Inkubation der Platten für 2 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen durch erneutes dreimaliges vorsichtiges Waschen mit HBSS/Hepes von nicht adhären Bakterien befreit, so dass lediglich zellassoziierte Bakterien übrig blieben. Nach dreimaligem Waschen wurden 2 ml HBSS/Hepes auf dem Zellrasen belassen, da eine Flüssigkeitsmenge von etwa 2 ml für die praktische Durchführung der Ultraschallanalyse notwendig ist. Ergänzend erfolgte die Sichtkontrolle aller Nöpfe, der Ausschluss durch die Sonotrode beschädigter Zelllayer aus der Auswertung, sowie die Anfärbung eines Napfs mit 500 µl Trypanblau 0.4% für 5 min und dessen mikroskopische Kontrolle um mögliche toxische Effekte der Bakterien auf Zellrasen auszuschließen und die Integrität der Zellen zu bestätigen.

Bezüglich der Ultraschalllyse der einzelnen Nöpfe wurde gleich den Vorversuchen das unter 2.4.1. beschriebene Protokoll verwendet. Im Anschluss an die Lyse wurden jeweils 10-100 µl des Lysats auf Columbia-Agar ausplattiert, sowie absteigende Verdünnungsreihen in PBS+BSA angefertigt, um große Unterschiede bei den Bakterienkonzentrationen verschiedener Stämme nicht zu übersehen.

Es folgte die Kultivierung der Bakterien bei 3% CO<sub>2</sub> im Brutschrank über 1-2 Tage und eine anschließende Auszählung der Kolonien einschließlich der Positiv- und Negativkontrollen mittels einer Verdünnungsreihe.

### 2.5.3. Invasionsversuche

Die Bakterienkultur und die photometrische Einstellung der Bakterien für die Durchführung der Invasionsversuche wurden identisch zur Versuchsvorbereitung für die Adhäsionsversuche durchgeführt. Gleiches gilt für das Waschen der konfluenten Plexuszellen und die initiale Inokulation der Platten mit den verschiedenen photometrisch quantifizierten Erregersuspensionen. Genau wie beim Versuchsaufbau des Adhäsionsversuch wurden auf jeder Platte drei Näpfe für eine Positivkontrolle (bakterienhaltige Lösung, kein Antibiotikazusatz), eine Negativkontrolle (steriles HBSS/Hepes, antibiotikahaltige Lösung) und eine Vitalitätskontrolle reserviert.

Nach Aufbringen der bakterienhaltigen Suspension erfolgte ebenso wie im vorbeschriebenen Adhäsionsversuch eine Inkubation der Platten für 2 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank.

Nach zweistündiger Inkubation erfolgte eine dreimalige Reinigung der Platten mit 37°C warmem HBSS/ Hepes und eine anschließende mikroskopische Kontrolle der Näpfe hinsichtlich der Integrität der Zelloberfläche.

Nach dem dritten Waschen des Zelloberflächen erfolgte die Zugabe von 1 ml HBSS/Hepes mit antibiotischem Zusatz von 100 µg Gentamicin und 5 µg Penicillin G/ml für weitere 2 Stunden, um ein Abtöten der lediglich adhären den Bakterien bei weitgehender Schonung bereits invadierter Organismen zu erreichen. Dies erfolgte in Anlehnung an Vorversuche durch Elsinghorst, welcher die Idee des „gentamicin protection assay“ entwickelte (Elsinghorst 1994).

Nach wiederum zwei Stunden Einwirkzeit erfolgte ein weiterer Waschzyklus des Zelloberflächen mit HBSS/Hepes.

Anschließend folgte die Vitalitätstestung der Zellen innerhalb eines Napfsmittels Zellfärbung mit Trypanblau analog des Vorgehens im Adhäsionsversuch. Nach dem letzten Waschvorgang wurden 2 ml HBSS/Hepes pro Napf für die folgende Ultraschallanalyse belassen.

Die Zellyse wurde analog des Vorgehens bei den Adhäsionsversuchen nach steriler Abdeckung mit Tegaderm-Folie einzeln für jeden Napf durchgeführt. Ebenso wurde analog hinsichtlich der Desinfektionsmodalitäten und der abschließenden Ausplattierung der Bakterien auf Columbia-Agar verfahren. 1-2 Tage später erfolgte die Auszählung der cfu/ml, einschließlich der Positiv- und Negativkontrollen.

## 2.6. Materialliste

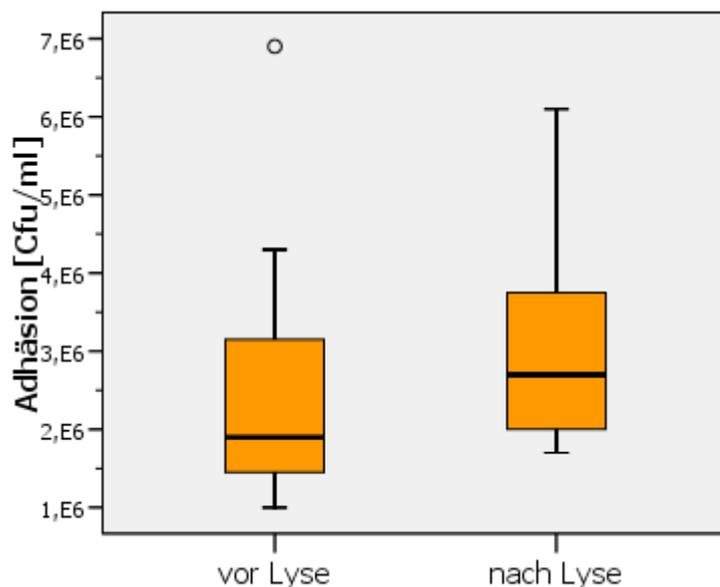
Zentrifuge (Rotanta TRC)	Hettich, Deutschland
Vortexer	Bandelin, Berlin
Ultraschallsonotrode	
Sterile Handschuhe	
Sterile Skalpelle	
Sterile Pinzetten	
Sterile Bechergläser	
Steriles Bechergefäß mit Schraubverschluss	
Weiße Kleidung,	
Mundschutz,	
Hauben für die Plexuspräparation auf dem Schlachthof	
Kunststoffartikel, Reaktionsbehälter, Pipette,	
Multistepper und Mikrotiterplatten	Eppendorf, Deutschland
	Greiner, Deutschland
	Nunc, Kanada
Agar (CCH-B-Agar)	
Blut (Hammelvollblut in EDTA)	Dade-Behring, ORAW 31, 50 ml
Waschpuffer	
PBS Dulbecco instamed 9,55g/l	Biochrom, Berlin
BSA (Bovines Serum Albumin)	Applichem GmbH, Darmstadt
Ethanol 70%	
DMEM/F-12	Sigma, Deisenhofen, Nr. D- 6421
HBSS ohne Calcium/ Magnesium	Gibco, Nr. 14175-053 (HBSS -)
HBSS	Gibco, Nr. 14025-050
HEPES 1 M	BioWhittaker, BE 17-737 E
Penicillin/ Streptomycin	ICN, Nr. 1670049
L-Glutamin, 200mM	Gibco, Nr. 25030-024
Insulin	Sigma, Deisenhofen, Nr. I-1882
Foetales Kälberserum (FCS)	Seromed,/ Biochrom, Nr. S- 0115
Cytosinarabinosid (ARAc)	Cell-Pharm GmbH
Trypsin	Biochemisches Institut der Universität Münster
THB	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Ergebnisse der vorbereitenden und begleitenden Versuche

##### 3.1.1. Ultraschallsensibilität der Bakterien

Zur Klärung der Frage, ob die Bakterien durch Behandlung mit dem von uns gewählten Ultraschallprotokoll selbst Schaden nehmen können, wurde eine zuvor bestimmte Anzahl Bakterien verschiedener schwächer adhärenter Stämme, darunter A6, Q5 und S4 nach dem beschriebenen Protokoll behandelt und die nachweisbaren Keime vor und nach Behandlung ausgezählt. Abb. 8 zeigt die gemittelte Anzahl der Keime vor und nach der Ultraschallbehandlung.



*Abb. 8 : Ergebnisse Ultraschallsensibilität: Darstellung der Anzahl der nachgewiesenen Bakterien 12 verschiedener schwächer adhärenter Stämme vor und nach Ultraschallbehandlung in cfu/ml. Die Ultraschallbehandlung führt zu keiner relevanten Abtötung der Bakterien.*

Die Anzahl der Bakterien wird durch die Ultraschall-Lyse in der Mehrzahl der Fälle nicht reduziert, eher wird sie leicht erhöht (Wilcoxon-Test für Paardifferenzen,  $p=0,023$ ). Grund für die steigende Anzahl der nachweisbaren cfu/ml könnte sowohl in geringem Maße natürliches Wachstum der Keime während der bis zu einer Stunde andauernden Lysephase sein, wahrscheinlicher ist jedoch, daß es durch die Ultraschallbehandlung zu

einem Sprengen der kurzen Kokkenketten in einzelne Keime kommt, welche in der Folge als einzelne cfu wachsen.

In ähnlichen Arbeiten, in denen Adhäsions- und Invasionsversuche mit *Streptococcus suis* durchgeführt wurden (Charland 2000; Lalonde 2000), wählten die Autoren die Verwendung von deionisiertem Wasser zur diffusionsbedingten Zerstörung des Zelllayers und Freisetzung der adhärenierten bzw. invadierten Bakterien.

Durch Vergleiche der cfu/ml vor und nach der beschriebenen Ultraschallbehandlung konnte eine Schädigung der Vitalität der Bakterien durch die beschriebene Behandlung als unwahrscheinlich angesehen werden. Die Zerstörung eines Zelllayers im Rahmen von Adhäsions- oder Invasionsstudien mittels Ultraschallbehandlung konnte somit als sinnvolle Alternative zur Behandlung zum Beispiel mit deionisiertem Wasser vorgenommen werden.

### 3.1.2. Inokulationsdosisabhängigkeit der Adhäsion

Zum Nachweis einer linearen Abhängigkeit der vorhandenen Adhäsion und zur Optimierung der Inokulationsdauer der Bakterien für die Folgeversuche erfolgte in diesem Versuch die Inokulation der Plexuszellen mit zwei unterschiedlichen Bakterienstämmen.

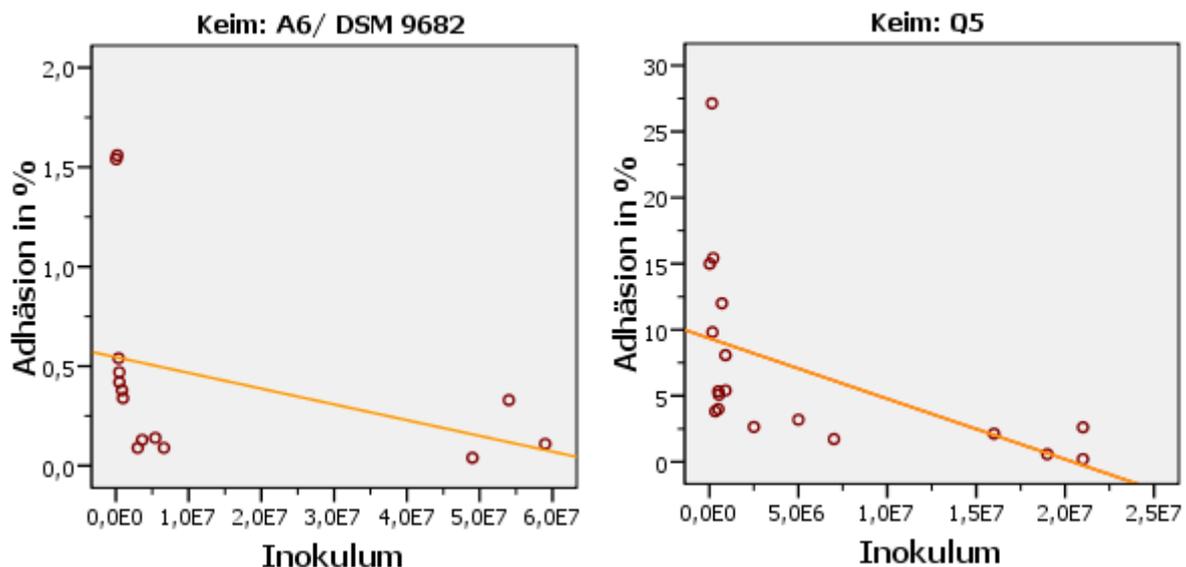


Abb. 9 : Ergebnisse Inokulationsdosis:

Darstellung der prozentualen Menge adhärierter Bakterien der Stämme A6 und Q5 an der Inokulationsdosis in Abhängigkeit von der Höhe der Inokulationsdosis. Es besteht bei hohen Inokulationsdosen eine Sättigungskinetik.

Sowohl in den Versuchen mit dem Referenzkeim A6, als auch in denen mit Q5 konnte eine deutliche negative Korrelation der prozentualen Adhäsion von der Inokulationsdosis im von uns untersuchten Bereich, wie in Abb. 9 dargestellt, nachgewiesen werden. In gleicher Weise besteht auch bei den Absolutzahlen eine inokulationsdosisunabhängige maximale Anzahl adhärierter Keime.

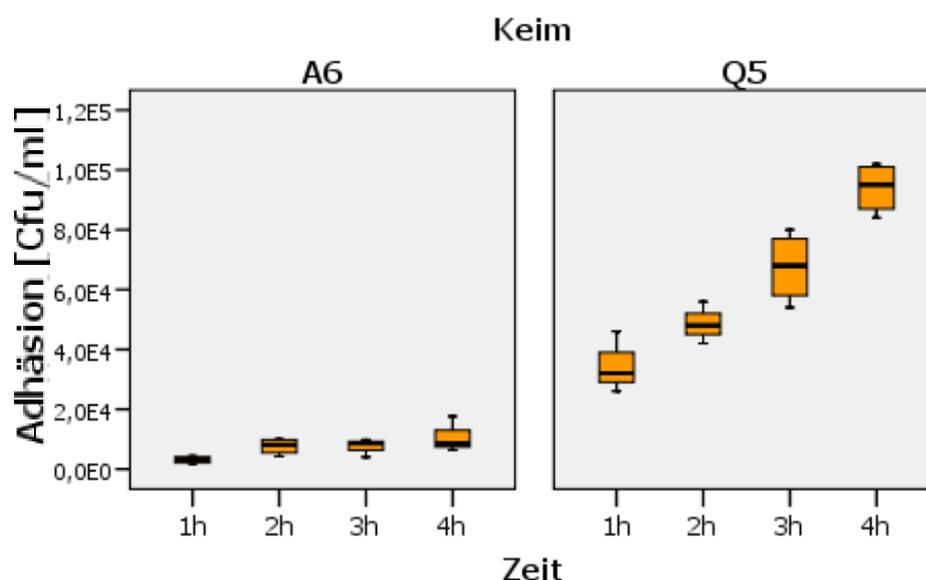
Auf eine Untersuchung noch höherer Inokulationsdosen wurde aufgrund des zytotoxischen Effekts der Mehrzahl der *Streptococcus suis*-Stämme bei Konzentrationen  $>1 \times 10^8$  cfu/ml verzichtet.

In der statistischen Auswertung der beiden verwendeten Keime konnte bezüglich der prozentualen Adhäsion im Verhältnis zur Inokulationsdosis jeweils eine negative signifikante Korrelation nachgewiesen werden (Spearman  $R = -0,858 / -0,854$ ,  $p < 0,001$ ), gleiches gilt in etwas geringerem Maße genauso für beide verwendeten Keime

zusammen (nicht dargestellt). Der oben beschriebene Abfall der maximalen prozentualen Adhäsion kann am ehesten mit dem Begriff einer Sättigungskinetik erklärt werden, indem neben einer möglichen räumlichen Limitation ebenso nutritive Ursachen der abnehmenden Adhäsion denkbar sind. In Versuchen von Lalonde untersuchten die Autoren ebenfalls die Inokulumabhängigkeit der Adhäsion von *Streptococcus suis* anhand des Referenzkeims S 735 an porcinen Nierenzelllinien. Sie verwendeten Inokulationsdosen zwischen  $1 \times 10^2$  cfu/ml und  $1 \times 10^8$  cfu/ml und wiesen eine lineare Steigerung der maximal adhärenierten cfu/ml bei bilogarithmischer Auftragung nach (Lalonde 2000).

### 3.1.3. Zeitabhängigkeit der Adhäsion

Um zu klären, zu welchem Zeitpunkt eine maximale Adhäsion der Bakterien erreicht wird, ohne die Integrität des Zelllayers durch zytotoxische Effekte zu schädigen, erfolgte eine Inokulation der Plexusepithelzellen mit zwei unterschiedlichen, in vielen Versuchen zuvor verwendeten Bakterienstämmen und unterschiedlichen Inokulationszeiten. Darüber hinaus galt es, einen Kompromiss hinsichtlich der optimalen Inokulationszeit zwischen Praktikabilität und optimalen Adhäsionsbedingungen für die Bakterien zu schaffen.



**Abb. 10 : Ergebnisse Inokulationszeit:**  
Darstellung der adhärenierten cfu/ml der Stämme A6 und Q5 in Abhängigkeit von der gewählten Inokulationszeit. Eine zweistündige Inokulation bietet einen akzeptablen Kompromiss zwischen nachweisbarer Adhäsion und geringer Zytotoxizität.

In den durchgeführten Versuchsreihen zeigte sich beim Keim A6 keine signifikante, bei Q5 eine zeitabhängige Steigerung der Adhäsion. Ersteres ist wahrscheinlich am ehesten im Rahmen der insgesamt nur sehr geringen Adhäsion zu Erklären. Darüber hinaus spielt hier wahrscheinlich die bei ebenfalls explorativem Untersuchungsdesign geringe Fallzahl eine wichtige Rolle.

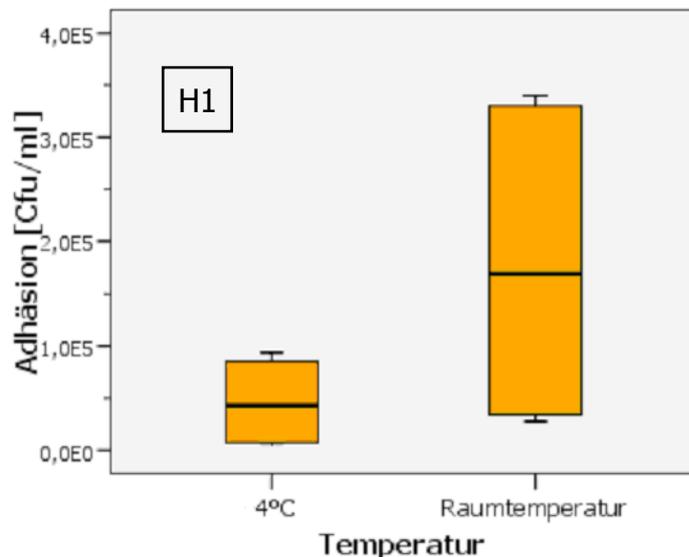
Beim tendenziell etwas stärker adhärierenden Keim Q5 findet sich eine zeitlich signifikante Steigerung der Adhäsion (ANOVA,  $p = <0,001$ , Post-hoc-Vergleiche nach Scheffé).

In verschiedenen Versuchsreihen anderer Autoren konnte vor allem bei 2h überschreitenden Inokulationszeiten eine zunehmende Zytotoxizität nachgewiesen werden, weshalb die regulären Adhäsionsversuche mit Inkubationszeiten von 2h durchgeführt wurden.

In Versuchen von Lalonde und Vanier untersuchten die Autoren ebenfalls die Zeitabhängigkeit der maximalen Adhäsion von *Streptococcus suis*, allerdings an porcinen Nierenzelllinien und PBMEC. Lalonde wies dabei bei einer Inokulationsdosis von  $1 \times 10^5$  cfu/ml eine zeitabhängige lineare Steigerung der Adhäsion bis zu einer Inokulationsdauer von 2 h nach, eine längere Dauer steigerte ihren Ergebnissen zufolge die Adhäsion nicht, ein weiterer Grund die Inokulationszeit in den anschliessend durchgeführten Hauptversuchen auf 2h zu beschränken, Vanier wies ebenfalls eine Zeitabhängigkeit der Adhäsion an PBMEC nach (Lalonde 2000, Vanier 2004).

### 3.1.4. Temperaturabhängigkeit der Adhäsion

Mit dem Ziel, die Frage nach Beeinflussung der Adhäsion durch Proteinneusynthese zu beantworten, erfolgte ein modifizierter Adhäsionsversuch des stark adhärenen Keim an Plexusepithelzellen bei auf 4°C reduzierter Temperatur verglichen mit Adhäsionsversuchen bei Raumtemperatur.



*Abb. 11 : Ergebnisse Temperaturabhängigkeit: Darstellung der Adhäsion des Stammes H1 bei 4°C im Vergleich zu Raumtemperatur. Es zeigt sich eine deutlich verminderte Adhäsion bei Kühlung als ein möglicher Hinweis auf Beeinflussung der Adhäsion durch Proteinneusynthese.*

In den durchgeführten Versuchsreihen zeigte sich wie in Abb. 11 ersichtlich eine deutliche Reduktion der maximalen insgesamt hohen Adhäsion des Stammes H1 bei 4°C im Vergleich zu Raumtemperatur (Wilcoxon-Test für Paardifferenzen,  $p=0,012$ ).

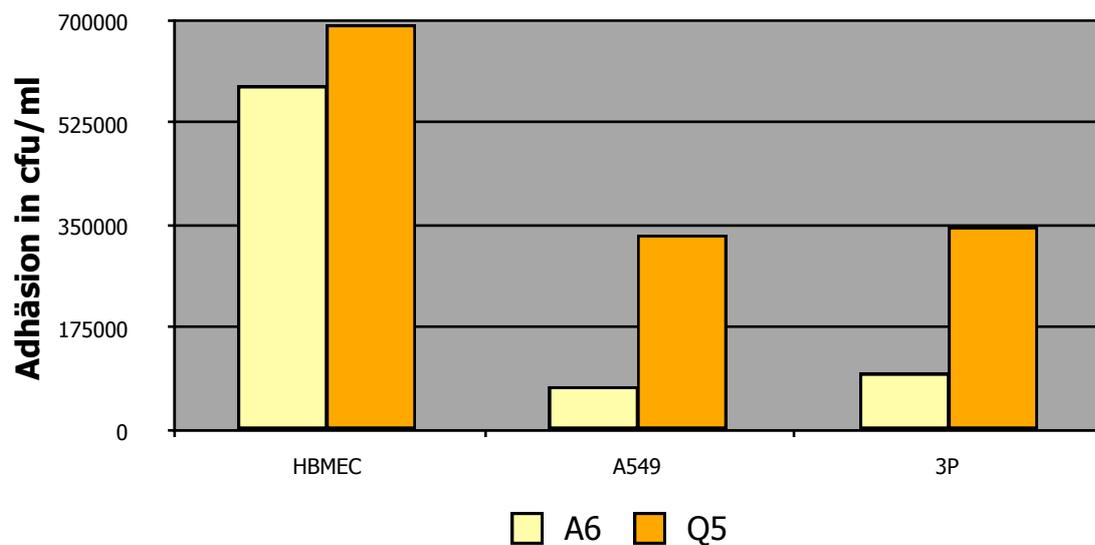
Es ist denkbar, dass hier die nachweislich temperaturabhängige Expression spezieller DNA oder Proteine möglicherweise für die Adhäsion relevant sein könnte. Inwieweit dies in gleichem Maße auch auf die weniger stark adhärenen Stämme zutrifft, kann dieser Versuchsaufbau nicht beantworten, war hier jedoch auch nicht Gegenstand der Fragestellung.

Die Ergebnisse legen zusätzlich nahe, dass ein kurzzeitiges Lagern der lysierten Proben auf Eis im Rahmen der Adhäsionsversuche ein weiteres unkontrolliertes Keimwachstum zumindest deutlich einschränken kann.

In Adhäsionsversuchen von Charland mit verschiedenen *Streptococcus suis* Stämmen an HBMEC bei auf 4°C reduzierter Temperatur konnte keine größere Reduktion der Adhäsionsfähigkeit der Keime beobachtet werden. Im Gegensatz zu unserem Versuchsaufbau verwendeten die Autoren jedoch im Vergleich insgesamt deutlich schwächer adhärierende Keime als den hier verwendeten Stamm H1 (Charland 2000).

### 3.1.5. Vergleich verschiedener Zelllinien

Um eine Vergleichbarkeit der eigenen erhobenen Zahlen mit zuvor durchgeführten Versuchen an HBMEC und A549 durch Charland und Lalonde zu gewährleisten, wurden Adhäsionsversuche mit den genannten Zellreihen parallel zu Versuchen an porcinen Plexusepithelzellen durchgeführt. Es erfolgte eine Inokulation der unterschiedlichen Zelltypen mit einer MOI von 100.



*Abb. 12 : Ergebnisse Zelllinienvergleich*

*Darstellung der Adhäsion der Stämme A6 und Q5 an unterschiedlichen Zelllinien. Die erfassten Ergebnisse weisen hinsichtlich der prozentualen Adhäsion Ähnlichkeiten zu den Zahlen ähnlicher Versuche an A549 und HBMEC auf.*

Es zeigte sich bei den porcinen Plexuszellen eine im Vergleich zur HBMEC-Zelllinie tendenziell reduzierte Adhäsion durch die beiden untersuchten Keime A6 und Q5.

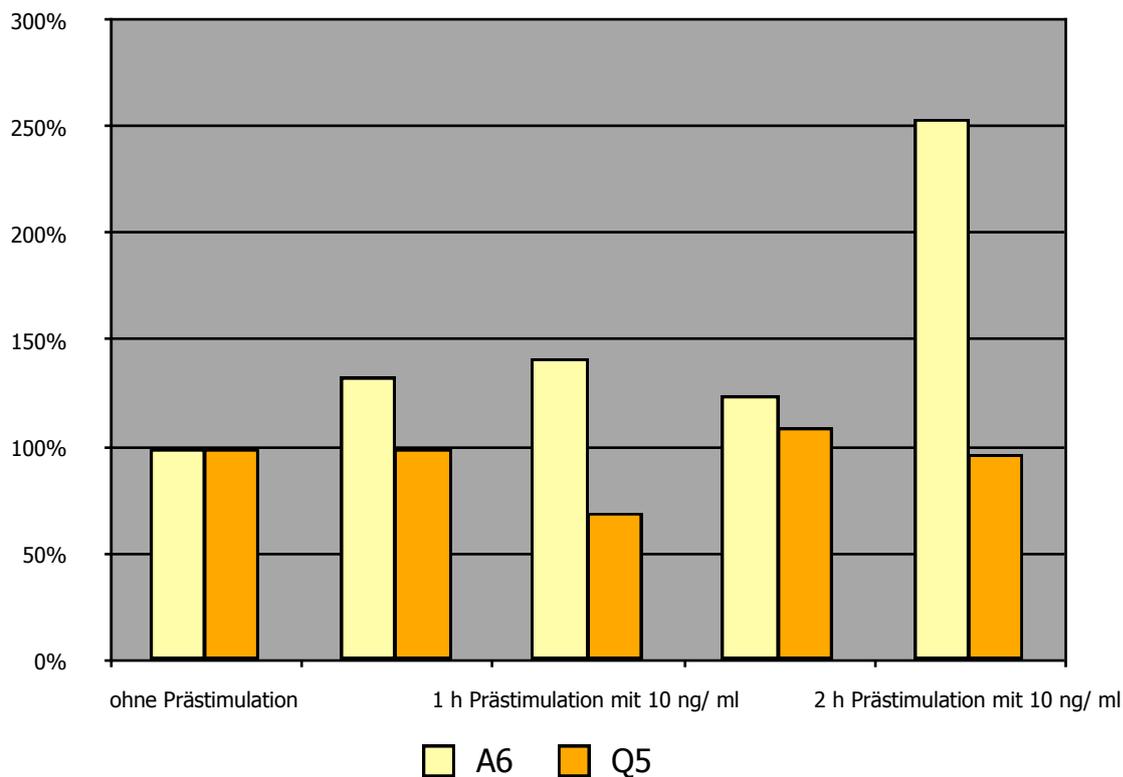
Wie in der Hauptversuchsreihe bereits für die Plexuszellen nachgewiesen werden konnte, scheint der aus einem Humanisolat gewonnene Stamm Q5 eine geringfügig stärkere Adhäsionspotenz auch für die beiden anderen untersuchten Zelllinien zu haben. Aufgrund der niedrigen Wiederholungsanzahl der Versuche an den anderen Zelllinien wurde auf eine statistische Auswertung der Vergleiche an verschiedenen Zelllinien verzichtet.

Die gemessene relative Adhäsion der beiden verwendeten Stämme an HBMEC bewegt sich in ähnlichen Dimensionen wie in den Versuchen von Charland, wo diese relative Adhäsionswerte von etwa 3-12% nachweisen konnte. Neben dem Referenzkeim A6 verwendete sie ebenfalls weitere teils akapsuläre und schwächer hämolysierende Varianten, sowie verschiedene europäische und amerikanische Wildtypen (Charland 2000).

Die Adhäsionspotenz der untersuchten Keime an der Zelllinie A549 erscheint im Vergleich zu den Ergebnissen von Lalonde weniger stark ausgeprägt. Die bei Lalonde erreichten Adhäsionsraten entsprachen im Wesentlichen Werten zwischen  $1 \times 10^3$  und  $3 \times 10^4$  adhärerte cfu/ml, bei einer Inkubationsdosis von  $1 \times 10^5$  cfu/ml entsprechend einer 1-30% Adhäsion abhängig vom jeweiligen Bakterienstamm. Die von ihr verwendete akapsuläre Mutante erreichte an A 549 Adhäsionswerte bis zu 100% (Lalonde 2000).

### 3.1.6. Adhäsion nach vorheriger Prästimulation mit TNF- $\alpha$

Mit dem Ziel, eine denkbare Hemmung des Adhäsionsverhaltens von *Streptococcus suis* an Plexusepithelzellen nachzuweisen, nachdem diese mit TNF- $\alpha$  prästimuliert wurden, erfolgte ein modifizierter Adhäsionsversuch an Plexus choroideus-Zellen nach deren Prästimulation mit unterschiedlichen Inokulationsdosen und -zeiten von TNF- $\alpha$ . Verwendet wurde eine Inokulationsdosis von  $1 \times 10^6$  cfu/ml, entsprechend einer MOI von 10.



**Abb. 13 : Ergebnisse Prästimulation**

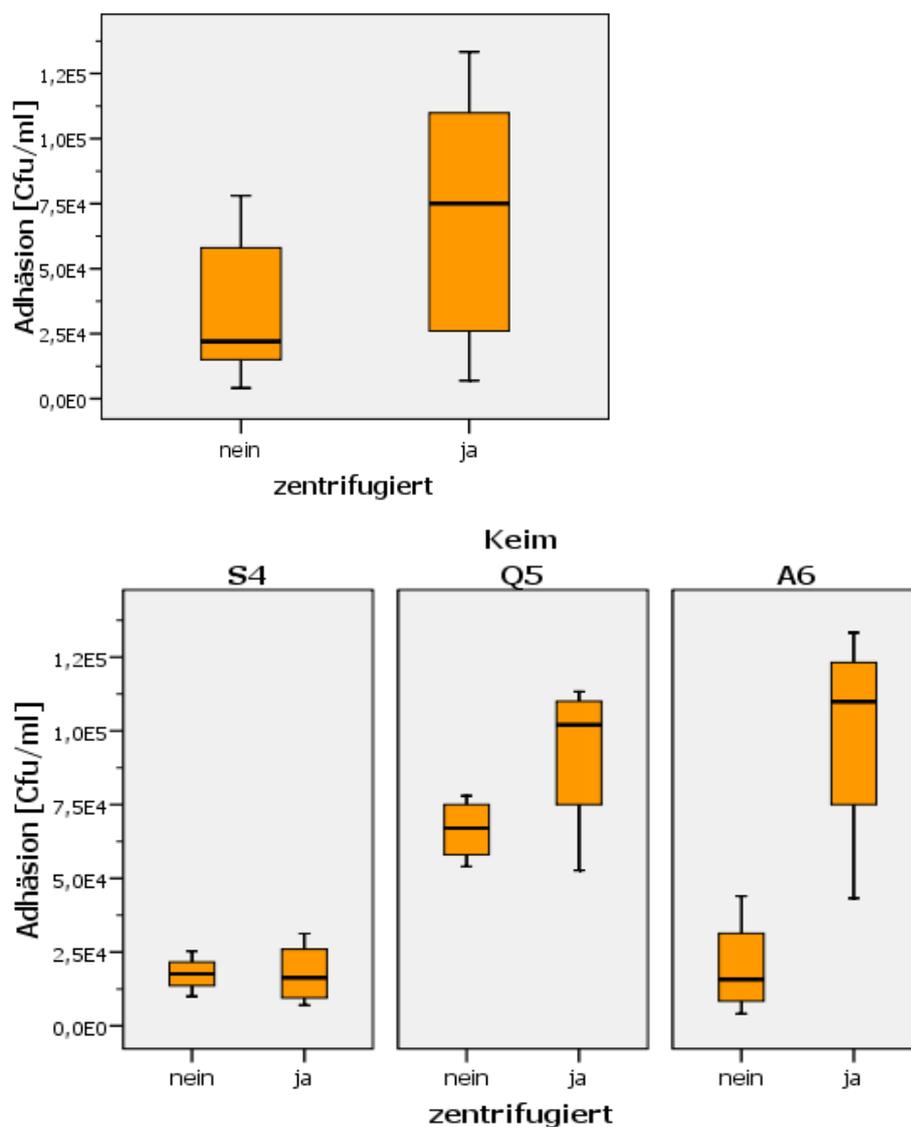
Die Darstellung der prozentualen Adhäsion von *Streptococcus suis* Stämmen A6 und Q5 an porcinem Plexus choroideus nach Prästimulation der Zellen mit TNF- $\alpha$  ergibt statistisch keinen signifikanten Unterschied zwischen fehlender und durchgeführter Prästimulation.

Die Ergebnisse der Versuchsreihe mit Prästimulation durch TNF- $\alpha$  fallen am ehesten bedingt durch eine niedrige Wiederholungsanzahl uneinheitlich aus. Während dem Anschein nach eine höhere und länger durchgeführte Prästimulation des Plexusepithels die Adhäsion des Keimes A6 begünstigt, ist ansonsten und beim Keim Q5 von keiner nennenswerten Beeinflussung des Adhäsionsverhaltens nachweisbar.

In Versuchen von Adam konnte unter Kostimulation der Plexusepithelzellen mit IFN- $\gamma$  in vitro eine Hemmung des Bakterienwachstums im Zellüberstand nachgewiesen und somit eine wichtige Rolle des Plexus choroideus für die antibakterielle Abwehr einer bakteriellen Meningitis postuliert werden (Adam 2004).

Insgesamt konnte eine Hemmung des bakteriellen Wachstums unter Prästimulation mit TNF- $\alpha$  in diesen Vorversuchen nicht nachgewiesen werden, ergänzend muss hier jedoch erneut der rein explorative Charakter dieses Versuchsaufbaus erwähnt werden.

### 3.1.7. Adhäsion nach vorheriger Zentrifugation



**Abb. 14 : Ergebnisse Rotationszentrifuge**  
 Darstellung der Adhäsion der Stämme A6, Q5 und S4 mit und ohne vorherige Zentrifugation. Die unphysiologische Vorbehandlung verstärkt die Adhäsionsfähigkeit vor allem stärker adhärenter Bakterienstämme weiter.

Zur Klärung der Frage, ob durch Zentrifugation mittels einer Rotationszentrifuge die Adhäsionspotenz von *Streptococcus suis* positiv beeinflusst wird erfolgte ein paralleler Versuchsaufbau mit Aufbringen der Bakterien mittels Pipette versus 10-minütiger Behandlung in der Rotationszentrifuge.

Tendenziell zeigte sich wie in Abb. 14 dargestellt eine höhere Adhäsion im mittels Rotationszentrifuge vorbehandelten Versuchsarm im Vergleich zu dem Versuchsarm in dem die Bakterien lediglich auf den Zelllayer aufpipettiert wurden (t-Test für unabhängige Stichproben,  $p = 0,034$ ).

In Anbetracht der Tatsache, dass diese jedoch in den zitierten Vergleichsversuchen nicht verwendet wurde, haben wir auf eine reguläre Verwendung innerhalb unserer Hauptversuchsreihe ebenfalls darauf verzichtet, zudem entspricht die konventionelle Art des Aufpipettierens eher den natürlichen Umständen.

## 3.2. Ergebnisse Hauptversuche Adhäsion und Invasion

### 3.2.1. Adhäsionsversuche

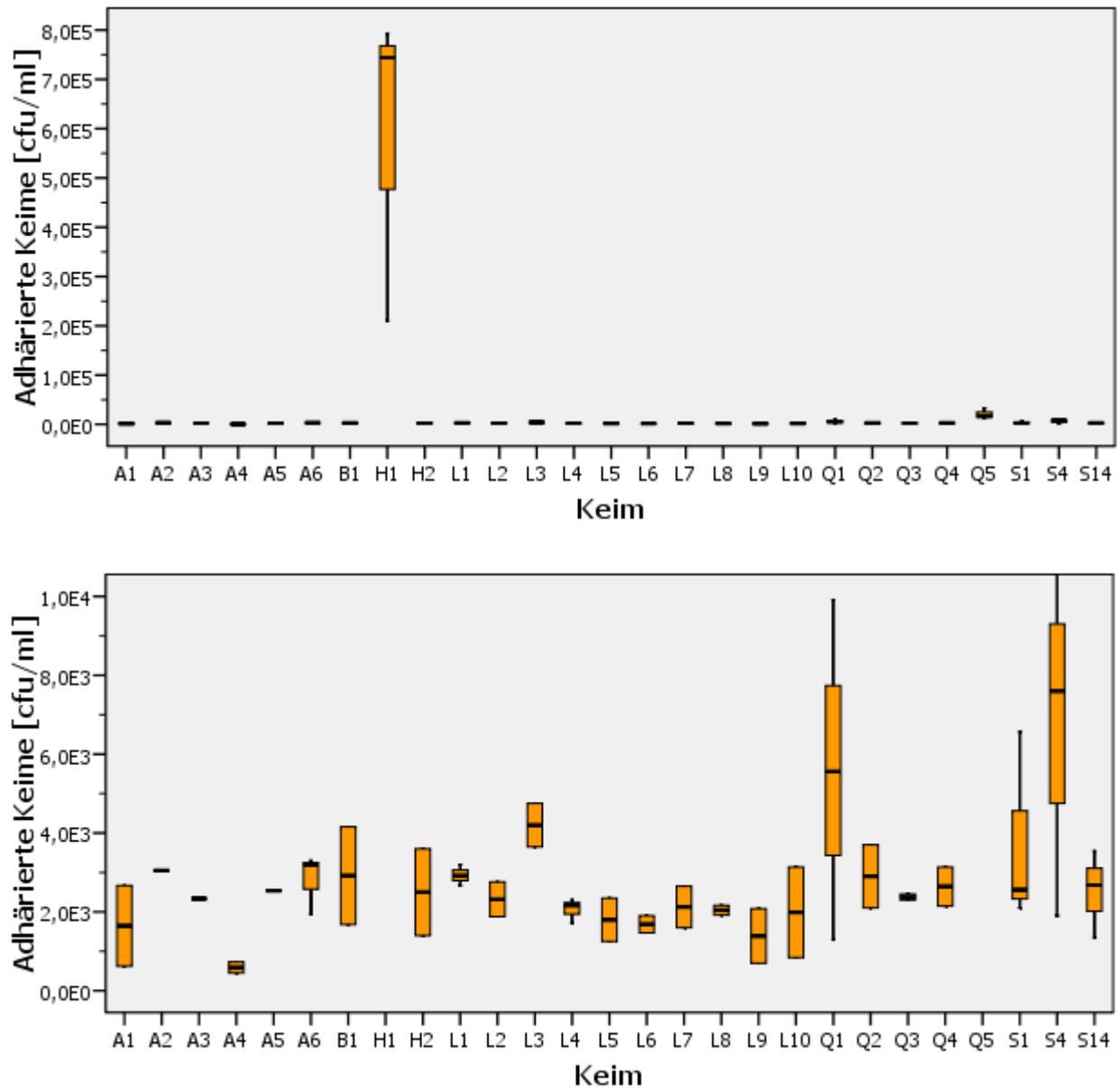


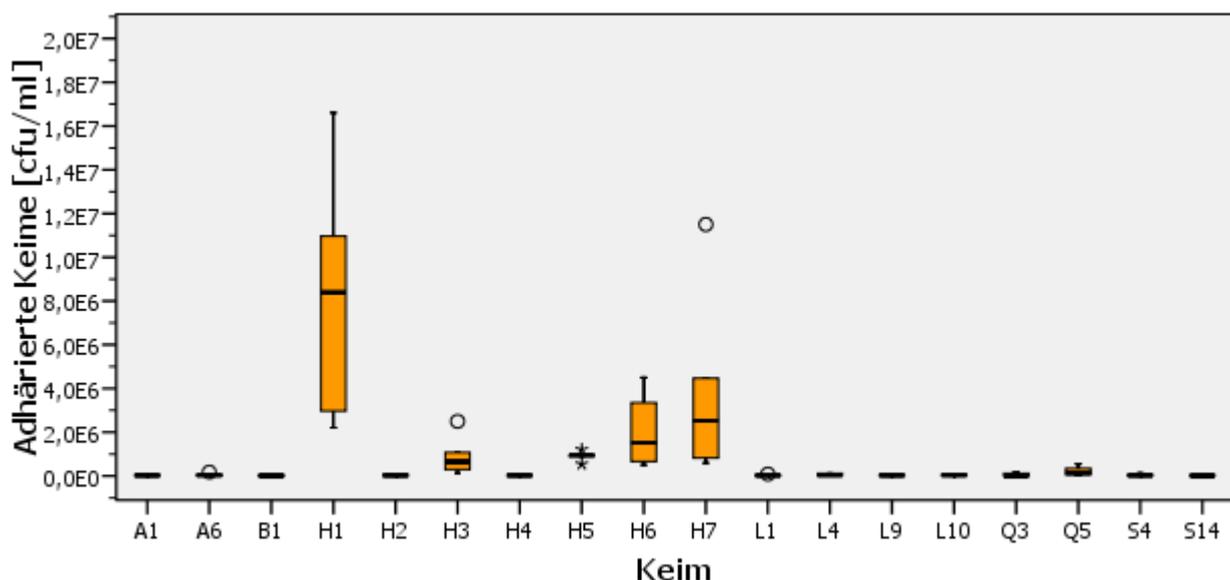
Abb. 15 : Ergebnisse Adhäsion, Inokulationsdosis  $10^5$  cfu/ml:

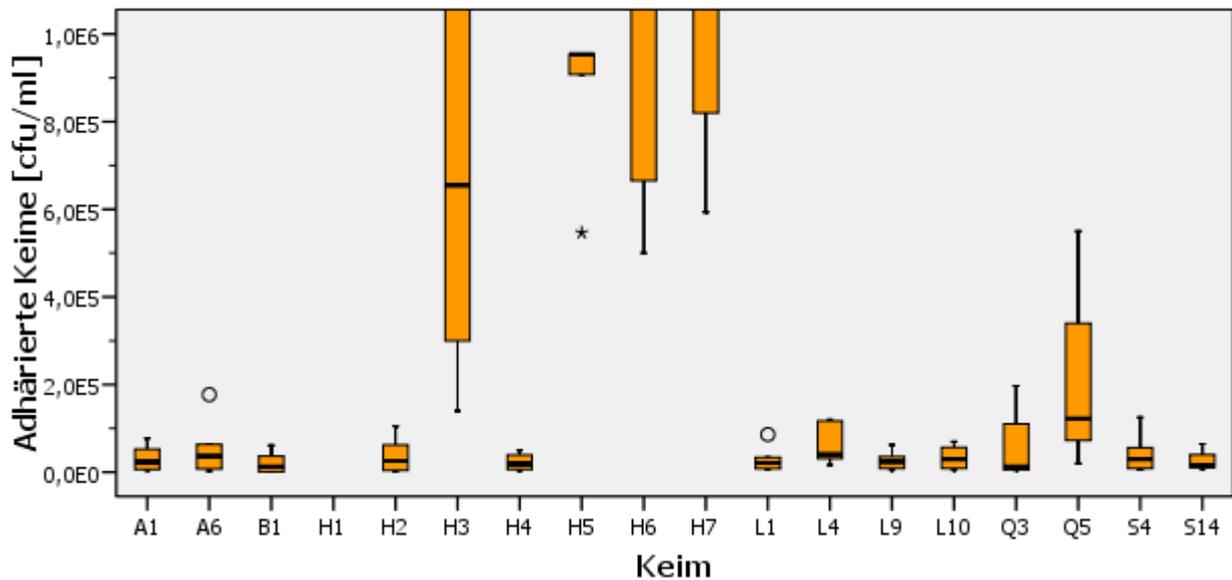
In der Gesamtdarstellung bei niedriger Inokulationsdosis zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Bakterienstämme unterschiedlicher Gruppen. Dies hilft die Anzahl der mit höherer Inokulationsdosis weiter untersuchten Stämme zu verringern.

Mit dem Ziel, einen ersten Überblick über die uns zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Bakterienstämme zu gewinnen und die Gesamtzahl der unterschiedlichen Keime für die folgenden Versuche sinnvoll zu reduzieren, erfolgten die ersten Adhäsionsversuche an Plexus choroideus-Zellen an 27 unterschiedlichen Bakterienstämmen bei einer Inokulationsdosis von  $10^5$  cfu/ml bei einer Versuchszahl von  $n=3$ .

Die Mehrzahl der untersuchten Keime erreichte in den Adhäsionsversuchen mit niedrigen Inokulationsdosen von  $1 \times 10^5$  cfu/ml (entsprechend einer MOI von 1), Adhäsionswerte um  $1 \times 10^3$  bis  $5 \times 10^3$  cfu/ml entsprechend einer prozentualen Adhäsion zwischen 1% und 5% (siehe unterer Teil Abb. 15). Es zeigten sich tendenziell deutliche Unterschiede bei den Einzelvergleichen vor allem hinsichtlich des Keimes H1, welcher eine um mehr als zwei Potenzen höhere Adhäsion aufwies (oberer Teil Abb. 15). Aufgrund der niedrigen Versuchsanzahl mit dieser Inokulationsmenge fiel dieser Unterschied zwar leider nicht statistisch signifikant aus (Kruskal-Wallis Test  $p=0,145$ ), erlaubte jedoch eine erste Einschätzung der Adhäsionspotenz von H1. Die Bakterienstämme H3 bis H7 wurden erst im Rahmen der Hauptversuche auf ihre Adhäsionspotenz untersucht, da sie unserem Labor erst später zur Verfügung standen Sie und die nach den Vorversuchen mit der niedrigsten Inokulationsdosis selektierten Keime wurden in den Folgeversuchen mit höheren Inokulationsdosen inkubiert.

Die folgende Darstellung Abb. 16 demonstriert die unterschiedliche Adhäsionspotenz der im Weiteren untersuchten reduzierten Anzahl Bakterienstämme bei Inokulationsdosen von  $10^6$  bis  $10^7$  cfu/ml.





*Abb. 16 : Ergebnisse Adhäsion, Inokulationsdosis  $10^6/10^7$  cfu/ml:  
Bei höheren Inokulationsdosen findet sich eine Gruppe verschiedener Bakterienstämme mit signifikant besserer Adhäsionsfähigkeit.*

In den Adhäsionsversuchen mit höheren Inokulationsdosen von  $10^6$  bis  $10^7$  cfu/ml entsprechend einer MOI von 10-100, zeigten die meisten verwendeten Bakterienstämme ebenfalls Adhäsionswerte zwischen  $5 \times 10^3$  cfu/ml bis  $5 \times 10^4$  cfu/ml entsprechend einer prozentualen Adhäsion zwischen 0,5% und 5%.

Wie bereits in den Vorversuchen mit einer MOI von 1 zeigte sich in den Versuchen mit höherer Inokulationsdosis ebenfalls die deutlich höhere Adhäsionspotenz des Keimes H1 und einiger, der neu hinzugekommenen Keime, namentlich H3, H5, H6 und H7.

Nach statistischem Nachweis signifikanter Unterschiede innerhalb der einzelnen Keime untereinander (Kruskal-Wallis Test,  $p < 0,001$ ) fanden sich in den Einzelvergleichen insgesamt 53 Paarunterschiede nach Berechnung mit BiAS, wovon 52 einem Unterschied zwischen einem der oben genannten Keime und einem der weniger stark adhärenenten entsprachen (Dunn-Test, Einzelergebnisse nicht abgebildet). Es konnten innerhalb der Gruppe der stärker adhärenenten genannten Keime keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Neben dem bereits im Rahmen der ersten Versuchsreihe verwendeten H1, einem nachweislich sowohl für Suilysin, als auch für MRP und EF positiven Keim mit nichttypisierbaren Kapselpolysaccharid, zeigte sich die starke Adhäsion erneut bei vier weiteren Stämmen der H-Reihe, von denen drei ebenfalls über nichttypisierbare Kapselpolysaccharide verfügen, der dritte die kapsellose isogene Mutante eines schwach adhärenenten Wildtyps darstellt. Innerhalb der restlichen

Stämme war beim verwendeten Stamm Q5 wiederum eine tendenzielle jedoch nicht signifikante oberhalb der restlichen Keimen liegende Adhäsionsfähigkeit nachweisbar. Dieser Keim verfügt allerdings genau wie die anderen untersuchten nordamerikanischen Stämme über die hochmolekulare Variante des MR-Proteins. Im Gegensatz zu ihnen ist der Keim allerdings Suilysin-negativ.

Das Vorhandensein einer Adhäsion des Referenzkeimes A6 am porcinen Plexusepithel konnte in elektronenmikroskopischen Schnitten von uns nachgewiesen werden (siehe Abb. 17).



*Abb. 17 : Elektronenmikroskopische Adhäsion von Streptococcus suis an Plexusepithel: Der teils als Diplococcus vorliegende Keim Streptococcus suis adhärirt am Oberflächenepithel des Plexus choroideus.*

Bezüglich der unterschiedlichen Keime ergab sich allerdings trotz jeweils genauer Einstellung auf eine zuvor in Vorversuchen einer bestimmten optischen Dichte entsprechenden Inokulationsdosen eine über die Normalverteilung hinausgehende Streuung der Inokulationsmengen, wie in Abb. 18 und 19 dargestellt. Eine Beeinflussung der effektiv gemessenen Adhäsionswerte durch diese unterschiedlichen

Inokulationsdosen ist denkbar. Zur Abschätzung dieser Beeinflussung enthält die Arbeit anbei eine Darstellung der Variabilität der Inokulationsdosen der verschiedenen Keime.

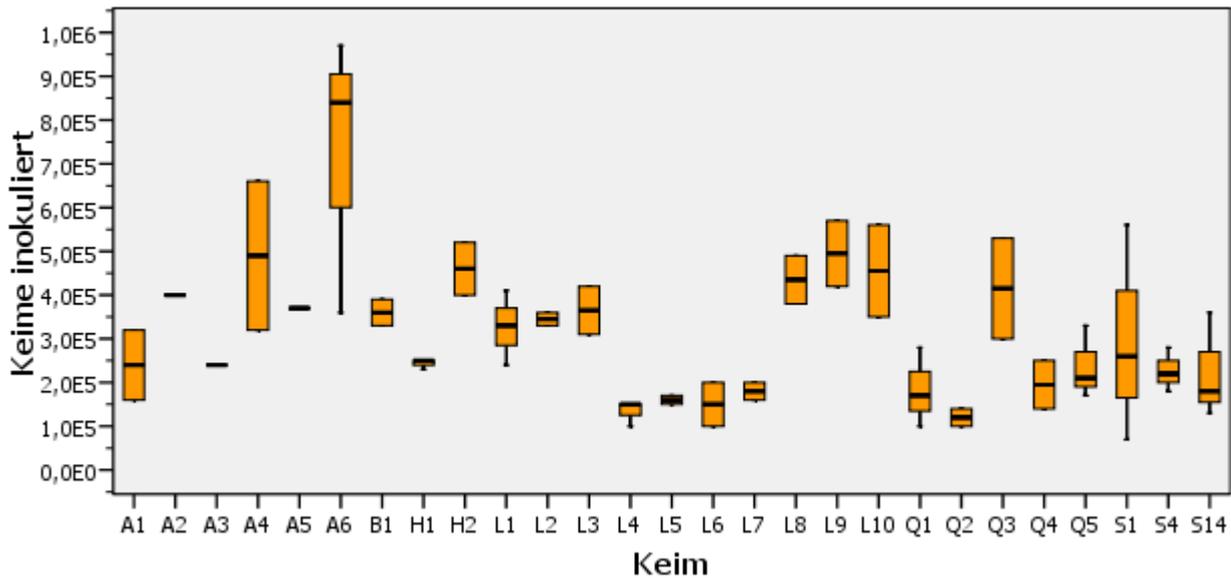


Abb. 18 : Unterschiedliche Inokulationsdosen Adhäsionsversuche  $10^5$  cfu/ml: Trotz optimierter photometrischer Einstellung der Inokulationsdosis der verschiedenen Bakterienstämme variiert die tatsächlich aufgebrachte Dosis zwischen den unterschiedlichen Stämmen deutlich.

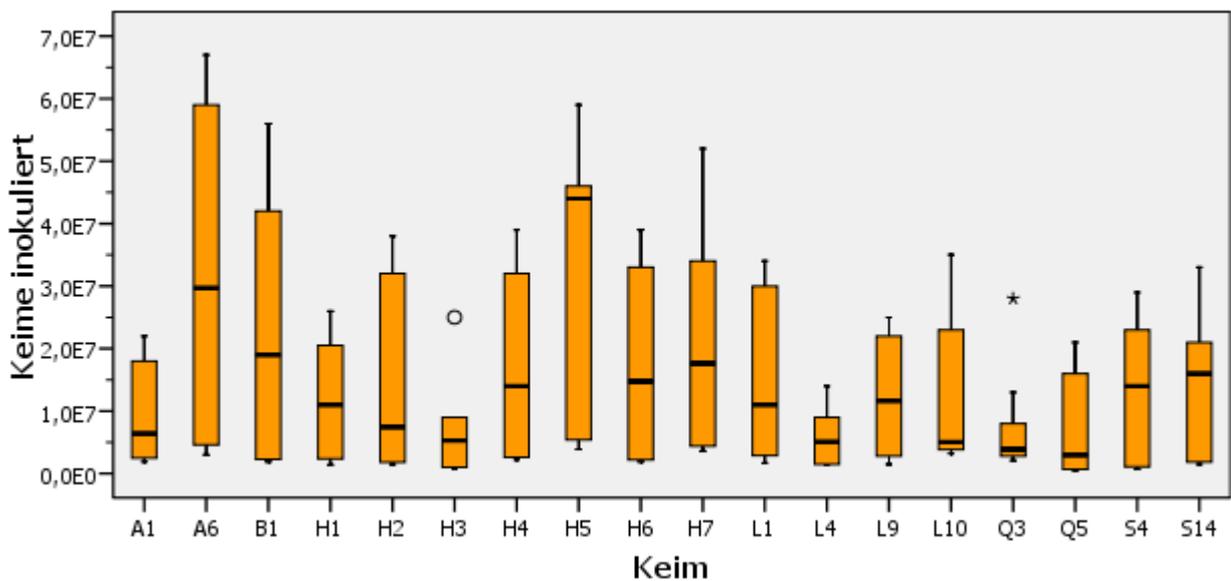
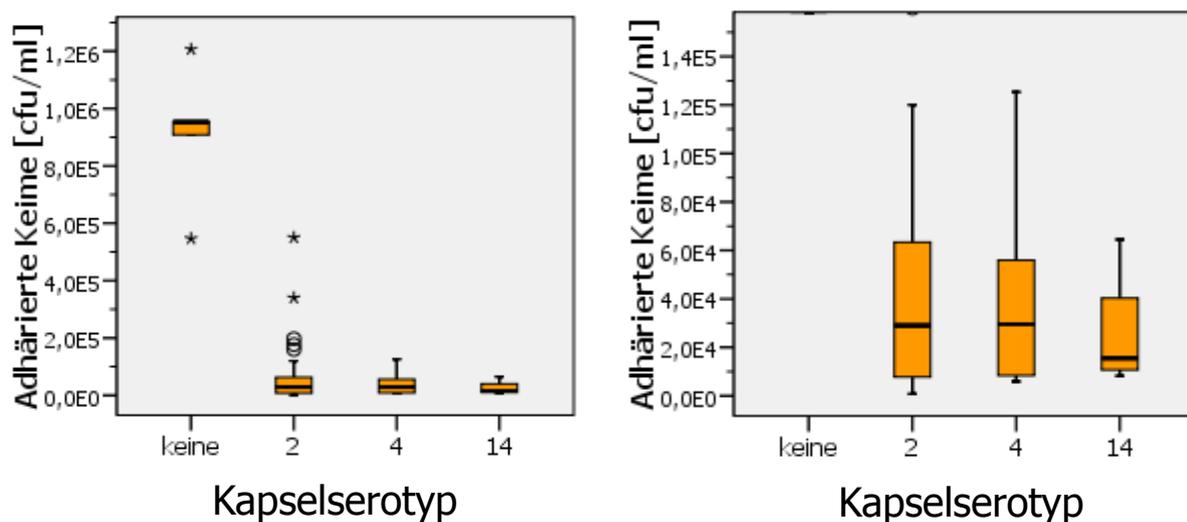


Abb. 19 : Unterschiedliche Inokulationsdosen Adhäsionsversuche  $10^6/10^7$  cfu/ml: Auch bei höheren Inokulationsdosen ergibt sich dasselbe Bild. Die effektiv aufgebrachte Inokulationsdosis variiert zwischen den unterschiedlichen Stämmen deutlich.

Inwieweit die einzelnen untersuchten Faktoren Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der einzelnen unterschiedlichen Keime ausüben versuchten wir in Gruppenvergleichen darzustellen. Dabei verglichen wir jeweils alle einzelnen in der Pathogenitätsfaktoren-Tabelle aufgelisteten Merkmale tragenden Keime gegen die nicht das Merkmal tragenden Isolate.

Folgend finden sich die Pathogenitätsfaktorenvergleiche der Adhäsionsversuche mit  $10^6$  bis  $10^7$  cfu/ml dargestellt, da lediglich hier eine relevante Zahl an Wiederholungen für eine statistische Auswertung zusammenkommt.

#### Bedeutung der Kapsel und Kapselserotypen für die Adhäsion



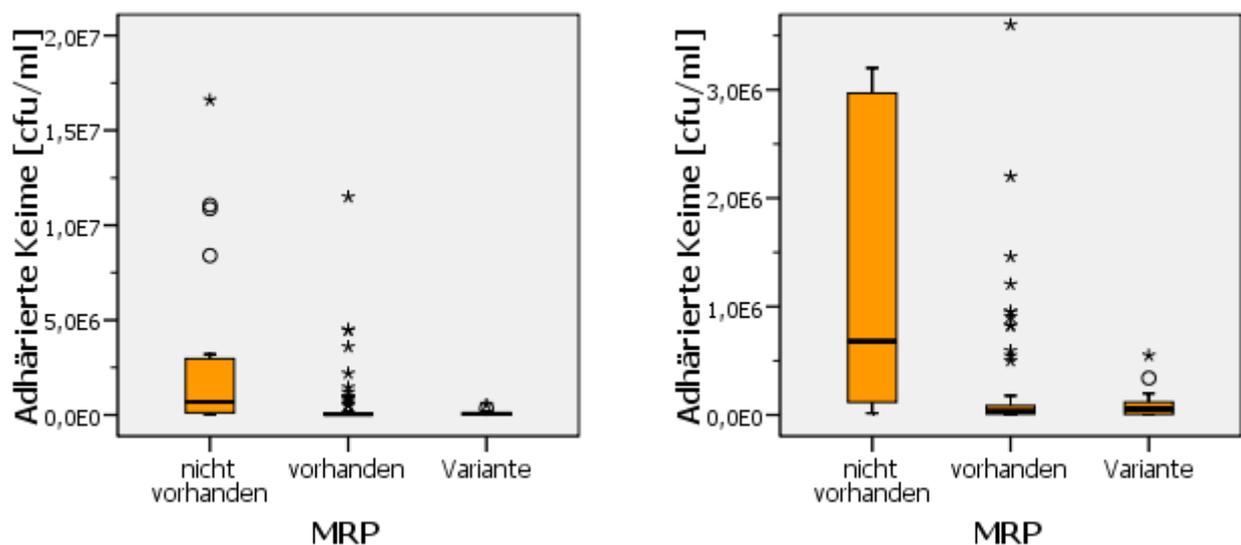
*Abb. 20 : Kapselserotyp als Pathogenitätsfaktor bei der Adhäsion:*

*Der keine Kapsel tragende Bakterienstamm adhärert signifikant besser als alle kapseltragenden Stämme, zwischen denen kein signifikanter Unterschied besteht.*

Hinsichtlich der ausgeprägteren Adhärenz des kapsellosen Keimes muss daraufhin gewiesen werden, dass leider nur eine kapsellose Mutante (H5) verwendet werden konnte, wohingegen die Mehrzahl aller Isolate dem Serotyp 2 entspricht. Ebenfalls ergänzend muss erwähnt werden dass alle anderen in den Adhäsionsversuchen stark adhärierenden Keime (namentlich H1, H3, H6 und H7) bislang nicht kapseltypisiert und entsprechend in der Abb. 20 nicht aufgeführt sind. In der Auswertung zeigt sich im Vergleich zwischen der kapsellosen Mutante und den restlichen Keimen ein statistisch signifikanter Unterschied (Kruskal-Wallis Test,  $p=0,003$ , Dunn-Test,  $p= 0,001$  für keine Kapsel vs. Serotyp 2,  $p= 0,015$  für keine Kapsel vs. Serotyp 4,  $p=0,010$  für keine Kapsel vs. Serotyp 14). Es ist zu vermuten dass sich ein ähnlicher Unterschied zwischen den nicht-typisierbare Kapseln tragenden Keimen und den Serogruppen 2, 4 und 14

ergeben würde. Entsprechend ergibt sich, nimmt man kapsellose und nicht typisierte Keime zusammen, ein deutlicher Hinweis auf eine Assoziation zwischen diesen Merkmalen und einer vermehrten Adhäsion. Besonders auffällig wird die Bedeutung der Kapsel für die Adhäsion bei Betrachtung des Paares H4 und H5. Hier zeigt sich ein deutlich signifikanter Unterschied zwischen H5, der isogenen kapsellose Variante des Stammes H4 und H4 selbst, deren sonstige Merkmale identisch sind ( $p=0,001$ ).

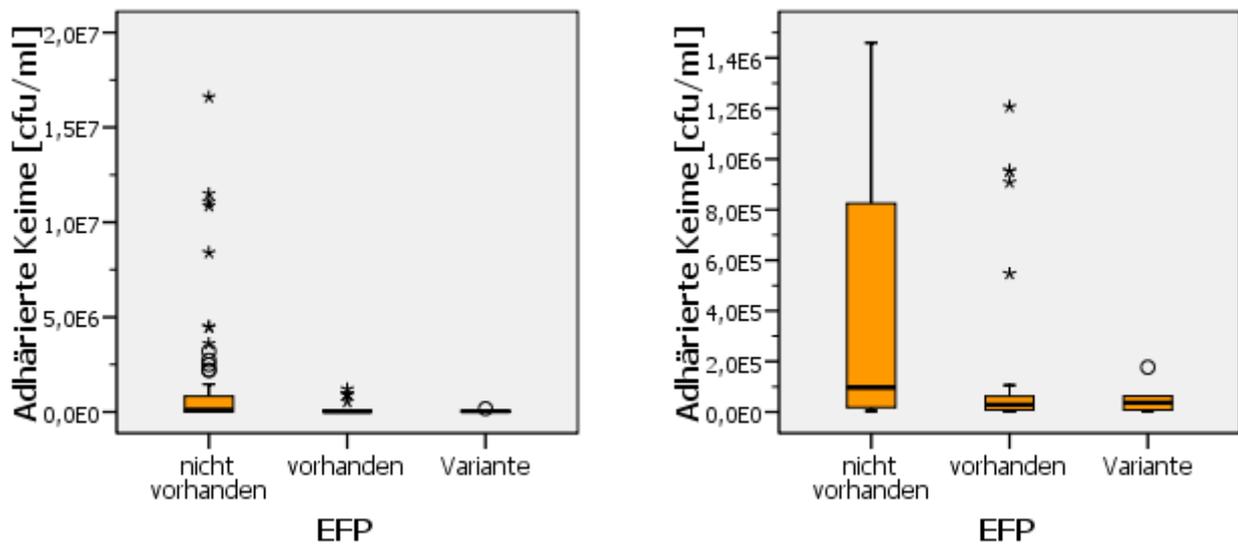
#### Bedeutung des MRP für die Adhäsion



*Abb. 21 : Muramidase-Released protein als Pathogenitätsfaktor bei der Adhäsion: Die Adhäsionsfähigkeit MRP-negativer Stämme scheint die der MRP-positiven zu übertreffen.*

Abb. 21 stellt die Bedeutung des MRP als Faktor für die Adhäsion dar. Im linken Abbildungsteil findet sich die gesamte Breite der adhärenierten cfu/ml, im rechten Abbildungsteil ein Ausschnitt aus dem unteren Tabellenbereich, in dem die Ausreisserwerte nicht mehr mit dargestellt sind. Bezüglich der Mengenverteilung der Keime ergibt sich bei der Variable MRP ein ausgeglichenes Bild mit mindestens jeweils drei unterschiedlichen Keimen, welche eins der drei dargestellten Merkmale (vorhanden, nicht vorhanden, Variante) tragen. Im direkten statistischen Vergleich zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den MRP-positiven Stämmen (inklusive MRP-Variante) und den MRP-negativen, allerdings mit verstärkter Adhäsion der MRP-negativen Stämme (Kruskal-Wallis Test,  $p<0,001$ , Dunn-Test für MRP-positiv vs. MRP-negativ,  $p<0,001$ , für MRP-Variante vs. MRP-negativ,  $p=0,001$ ). Trotzdem gibt es unter den fünf stark adhärenenten Stämmen ein nahezu ausgeglichenes Verhältnis bei zwei MRP-negativen und drei MRP-positiven Stämmen.

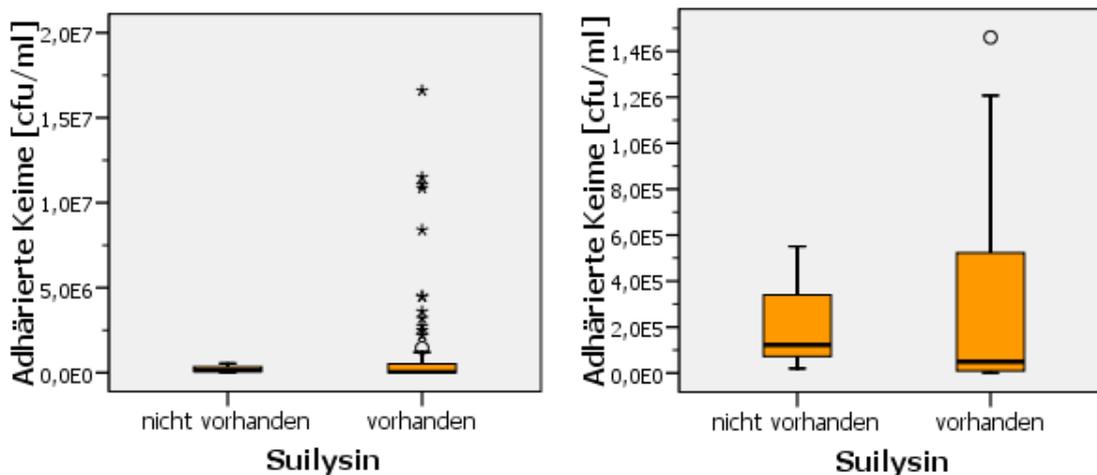
## Bedeutung des EF für die Adhäsion



*Abb. 22 : Extracellular factor protein als Pathogenitätsfaktor bei der Adhäsion: Die Adhäsionsfähigkeit EF-negativer Stämme scheint die der EF-positiven zu übertreffen.*

In Abb. 22 ist die Bedeutung des EF als Faktor für die Adhäsion dargestellt. Im linken Abbildungsteil findet sich die gesamte Breite der adhärenierten cfu/ml, im rechten Abbildungsteil ein Ausschnitt aus dem unteren Tabellenbereich, in dem Ausreisserwerte nicht mehr dargestellt sind. Dargestellt sind die beiden Varianten eines vorhandenen gegenüber eines nichtvorhandenen EF-Proteins. Es zeigt sich innerhalb der Keime ohne EF eine stärkere Variabilität zwischen den Einzelwerten und im Median gegenüber der Vergleichsgruppe mit EF im direkten statistischen Vergleich ein signifikanter Unterschied zwischen den EF-positiven Stämmen und den EF-negativen, allerdings mit verstärkter Adhäsion der EF-negativen Stämme (Kruskal-Wallis Test,  $p=0,001$ , Dunn-Test für EF-positiv vs. EF-negativ,  $p=0,001$ ). Unter den stark adhärenenten Stämmen finden sich demnach vier EF-negative bei nur einem EF-positiven Stamm.

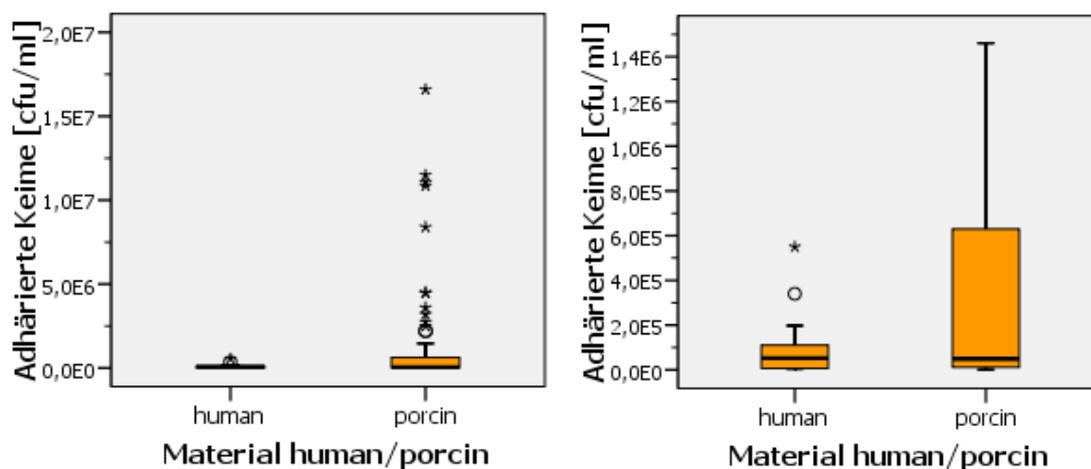
## Bedeutung des Suilysin für die Adhäsion



*Abb. 23 : Suilysin als Pathogenitätsfaktor bei der Adhäsion: Suilysin scheint als beeinflussender Faktor für die Adhäsion keine relevante Rolle zu spielen.*

In Abb. 23 wird Suilysin als Faktor für die Adhäsion untersucht. Im linken Abbildungsteil findet sich die gesamte Breite der adhärenierten cfu/ml, rechts ein Ausschnitt des unteren Tabellenbereichs. Es muss erwähnt werden, dass in diesen Versuchsreihen Q5 der einzige verwendete Suilysin-negative Keim war. Es überrascht somit nicht, dass der innerhalb der Einzelvergleiche tendenziell recht gut adhärenierende Q5 gegenüber den anderen Keimen keinen signifikanten Unterschied bietet (U-Test,  $p=0,285$ ).

## Bedeutung der Isolatherkunft für die Adhäsion



*Abb. 24 : Humane oder porcine Isolatherkunft als Pathogenitätsfaktor bei der Adhäsion: Die Herkunft der verwendeten Isolate ist für sich genommen kein relevanter Faktor für eine stärkere Adhäsionsfähigkeit.*

In Abb. 24 wird die Herkunft der Keimisolate in ein direktes Verhältnis zueinander gestellt. Die meisten der verwendeten Keimisolate entstammen porcinen Isolaten, lediglich die Keime der A- und der Q-Reihe sind Aliquots aus humanen Isolaten. Keiner der humanen Isolate bietet in den direkten Vergleichen annähernd ähnliche Adhäsionsraten, wie die bestadhärenten porcinen Isolate. Trotzdem gibt es unter den porcinen Isolate viele ebenfalls nur schlecht adhärente Keime, weshalb letztendlich keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden kann (U-Test,  $p=0,290$ ). Dies legt die Vermutung nahe, dass andere Faktoren als die Herkunft aus einem humanen gegenüber einem porcinen Wirt ursächlich für verstärkte Adhärenz sind.

### 3.2.2 Invasionsversuche

Bei insgesamt nur geringer Adhäsion in Vor- und Hauptversuchen wurden die Invasionsversuche an den Plexus choroideus-Zellen nur mit höheren Inokulationsdosen durchgeführt. Die folgende Darstellung demonstriert die unterschiedliche Invasionspotenz der in den Hauptversuchen untersuchten Bakterienstämme.

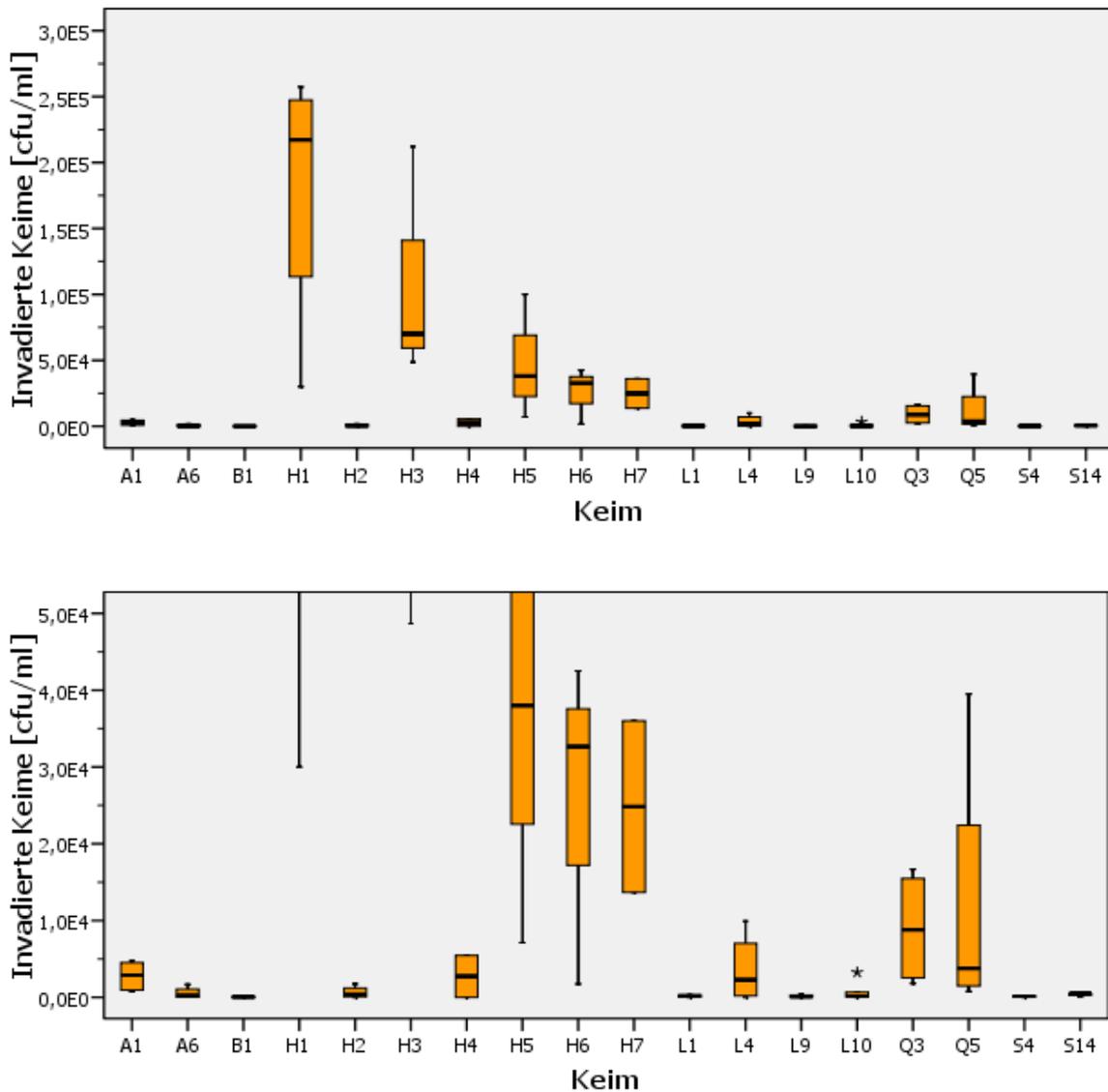


Abb. 25 : Ergebnisse Invasion, Inokulationsdosis  $10^7$  cfu/ml:

Ähnlich den Ergebnissen bei den Adhäsionsversuchen fallen die Ergebnisse der Invasionsversuche aus. Die stark adhätierenden Bakterienstämme zeigen im Vergleich ebenfalls die stärkste Invasionsfähigkeit, dies jedoch auf deutlich niedrigerem Niveau.

Im Gegensatz zu den deutlich ausgeprägten Adhäsionsunterschieden fielen die Unterschiede im Rahmen der Invasionsversuche weniger deutlich, jedoch mit ähnlicher Tendenz aus, wie in Abb. 25 gezeigt wird. Die geringere Deutlichkeit liegt wohl am

ehesten in der insgesamt doch verhältnismässig geringen Invasionspotenz der untersuchten Keime begründet.

Die Mehrzahl der untersuchten Keime erreichte in den Invasionsversuchen mit hohen Inokulationsdosen von ca.  $10^7$  cfu/ml entsprechend einer MOI von ca. 100, Invasionswerte unter  $10^4$  entsprechend einer prozentualen Invasion von weniger als 0,1%.

Die bereits in den Adhäsionsversuchen auffällig höhere Werte erzielenden Keime H1, H3, H5, H6 und H7 zeigten in den Invasionsversuchen ebenfalls um bis zu eine Potenz höhere Invasionswerte als der Rest der Keime, wiesen jedoch mit effektiven Invasionswerten um 1% ebenfalls keine außerordentlich starke Invasion nach.

Die amerikanischen Humanisolaten entsprechenden Stämme Q3 und Q5 zeigten innerhalb der geringer adhärenen Bakterienstämme ebenfalls eine tendenziell leicht höhere, jedoch weiterhin nicht signifikante unterschiedliche Invasionsfähigkeit gegenüber dem Rest der weniger stark adhärenen Keime.

Gleichermaßen wie in den oben beschriebenen Adhäsionsversuchen ergibt sich möglicherweise ein die Ergebnisse beeinflussender Faktor aus der nicht zu verhindernden Unterschiedlichkeit der Inokulationsdosen (siehe Abb. 26). Folgend die Grafik bezüglich der unterschiedlichen Inokulationsdosen bei der Invasionsversuchsreihe.

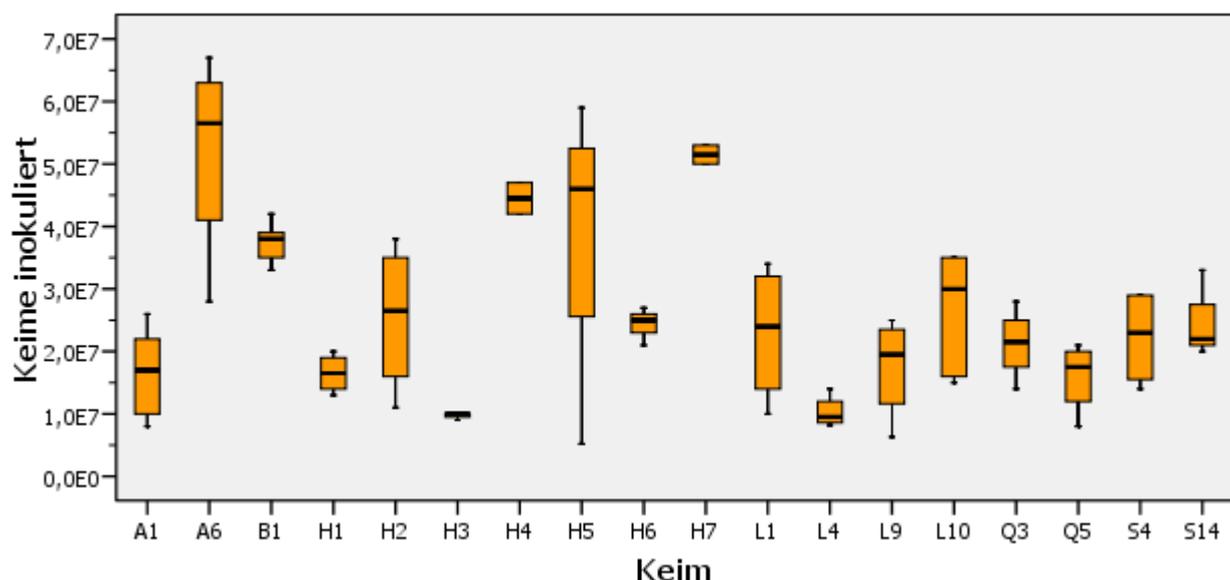
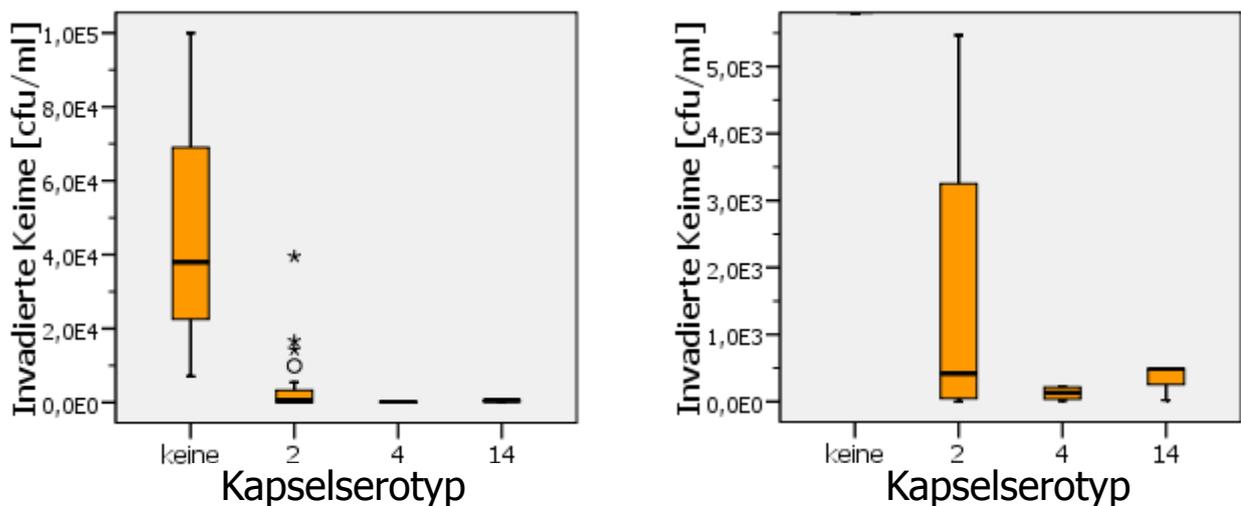


Abb. 26 : Unterschiedliche Inokulationsdosen Invasionsversuche  $10^7$  cfu/ml: Trotz optimierter photometrischer Einstellung der Inokulationsdosis der verschiedenen Bakterienstämme variiert die tatsächlich aufgebrachte Dosis zwischen den unterschiedlichen Stämmen auch bei den Invasionsversuchen deutlich.

Inwieweit die einzelnen untersuchten Faktoren Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der einzelnen unterschiedlichen Keime ausüben versuchten wir in Gruppenvergleichen darzustellen. Dabei verglichen wir jeweils alle die Merkmale tragenden Keime gegen die nicht das Merkmal tragenden Isolate.

Die Grafiken entsprechen der Darstellung der Pathogenitätsfaktorenvergleiche der Adhäsion im vorherigen Textbereich.

#### Bedeutung der Kapsel und Kapselserotypen für die Invasion



*Abb. 27 : Kapselserotyp als Pathogenitätsfaktor bei der Invasion: Der keine Kapsel tragende Bakterienstamm invadiert ebenfalls signifikant besser als alle kapseltragenden Stämme, zwischen denen kein signifikanter Unterschied besteht. Das Invasionsniveau ist jedoch insgesamt deutlich niedriger als das der Adhäsion.*

Besonders auffällig wird die Bedeutung der Kapsel für die Invasion erneut bei Betrachtung des Paares H4 und H5. Hier zeigt sich ein deutlich signifikanter Unterschied zwischen H5, der isogenen kapsellose Variante des Stammes H4, dessen sonstige Merkmale er teilt und H4 selbst ( $p= 0,001$ ). Alle anderen in den Invasionsversuchen stärker invadierenden Keime (namentlich H1, H3, H6 und H7) sind nicht kapseltypisiert und entsprechend in der Abb. 28 nicht aufgeführt. In der Auswertung zeigt sich im Vergleich zwischen der kapsellosen Mutante und den Keimen der Serogruppen 2 und 4 ein statistisch signifikanter Unterschied (Kruskal-Wallis Test,  $p=0,031$ , Dunn-Test,  $p= 0,047$  für keine Kapsel vs. Serotyp 2,  $p= 0,028$  für keine Kapsel vs. Serotyp 4). Es ist zu vermuten dass sich ein ähnlicher Unterschied zwischen den nicht-typisierbare Kapseln tragenden Keimen und den Serogruppen 2 und 4

ergeben würde. Entsprechend ergibt sich, nimmt man kapsellose und nicht typisierte Keime zusammen, ein deutlicher Hinweis auf eine Assoziation zwischen diesen Merkmalen und einer vermehrten Invasion, wenngleich diese auch nur auf absolut gesehen deutlich geringerem Niveau stattfindet.

#### Bedeutung des MRP für die Invasion

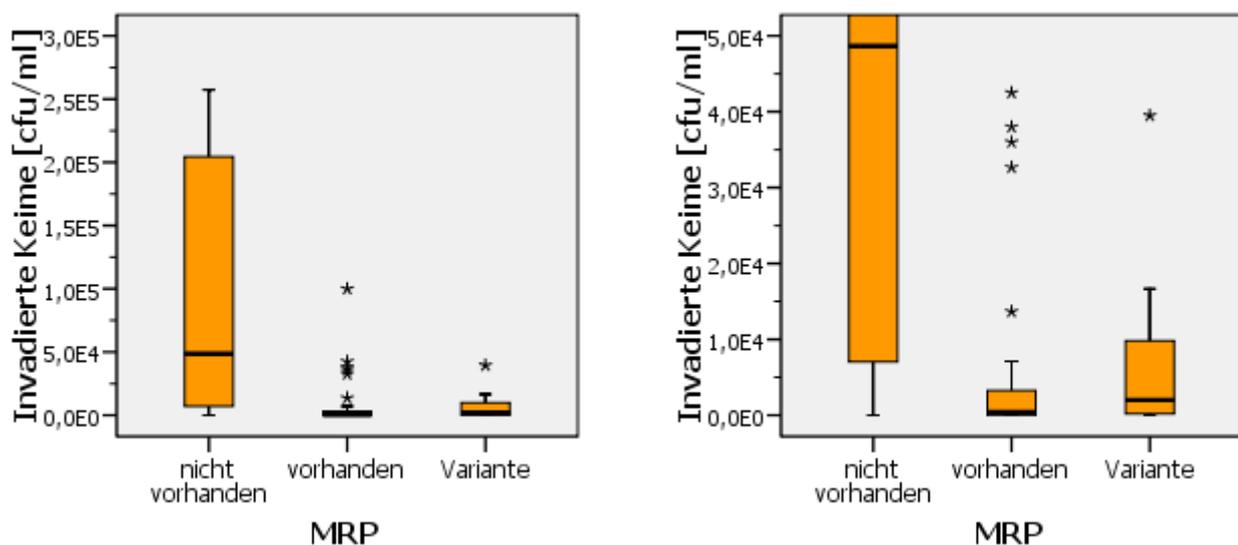
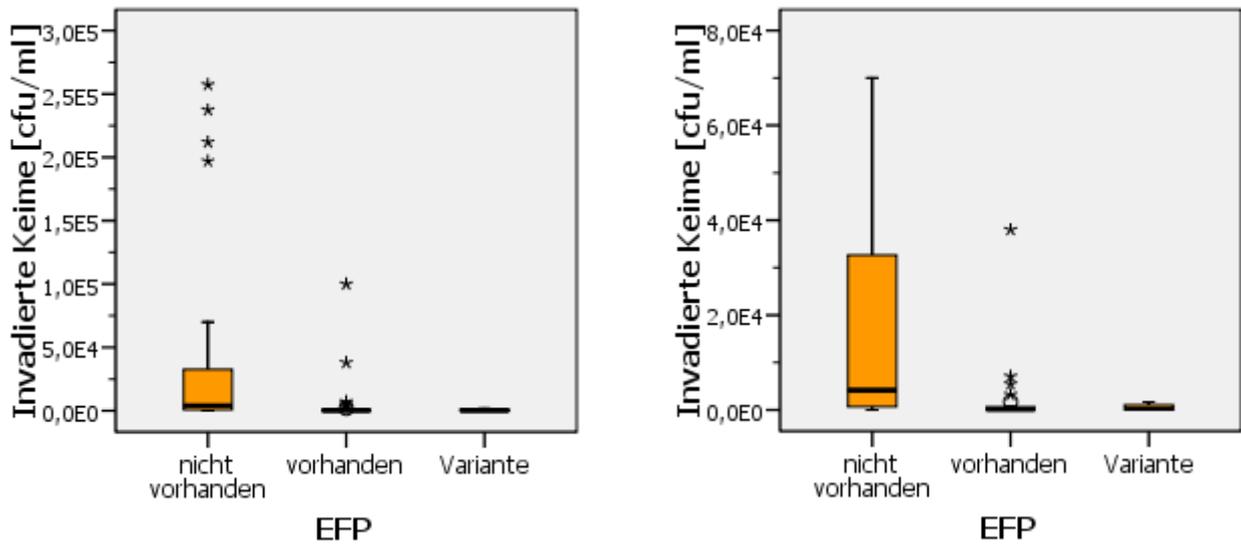


Abb. 28 : Muramidase released protein als Pathogenitätsfaktor bei der Invasion: Ähnlich den Ergebnissen bei den Adhäsionsversuchen scheint die Invasionsfähigkeit MRP-negativer Stämme die der MRP-positiven zu übertreffen.

MRP als möglichen Faktor der Invasion darzustellen ist Inhalt von Abb. 28. Im linken Abbildungsteil befindet sich die gesamte Breite der invadierten cfu/ml, im rechten Abbildungsteil ein Ausschnitt aus dem unteren Tabellenbereich, in dem die Ausreisserwerte nicht mehr mit dargestellt sind. Im direkten statistischen Vergleich zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den das normale MRP exponierenden Stämmen und den MRP-negativen Stämmen, allerdings mit verstärkter Invasion der MRP-negativen Stämme (Kruskal-Wallis Test  $p=0,002$ , Dunn-Test MRP-positiv vs. MRP-negativ,  $p=0,001$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen MRP-Variante und MRP-negativ konnte ungleich der Darstellung für die Adhäsion nicht nachgewiesen werden (Dunn-Test,  $p=0,132$ ). Unter den fünf stärker invadierenden Stämmen finden sich jedoch sowohl MRP-positive wie auch MRP-negative Stämme.

## Bedeutung des EF für die Invasion



*Abb. 29 : Extracellular factor protein als Pathogenitätsfaktor bei der Invasion: Ähnlich den Ergebnissen bei den Adhäsionsversuchen scheint die Invasionsfähigkeit EF-negativer Stämme die der EF-positiven zu übertreffen.*

In Abb. 29 ist die Bedeutung des EF als Faktor für die Invasion dargestellt. Im linken Abbildungsteil findet sich erneut die gesamte Breite der invadierten cfu/ml, im rechten Abbildungsteil ein Ausschnitt aus dem unteren Tabellenbereich, in dem Ausreisserwerte nicht mehr dargestellt sind. Dargestellt sind die beiden Varianten des vorhandenen gegenüber eines nichtvorhandenen EF-Proteins. Im direkten statistischen Vergleich findet sich ein signifikanter Unterschied nur zwischen den das normale EF exprimierenden Stämmen und den EF-negativen, ebenfalls erneut mit verstärkter Invasion der EF-negativen Stämme (Kruskal-Wallis Test,  $p < 0,001$ , Dunn-Test für EF-positiv vs. EF-negativ,  $p < 0,001$ ). Trotzdem findet sich unter den fünf stärker invadierenden Stämmen auch ein EF-positiver bei vier EF-negativen Stämmen.

## Bedeutung des Suilysin für die Invasion

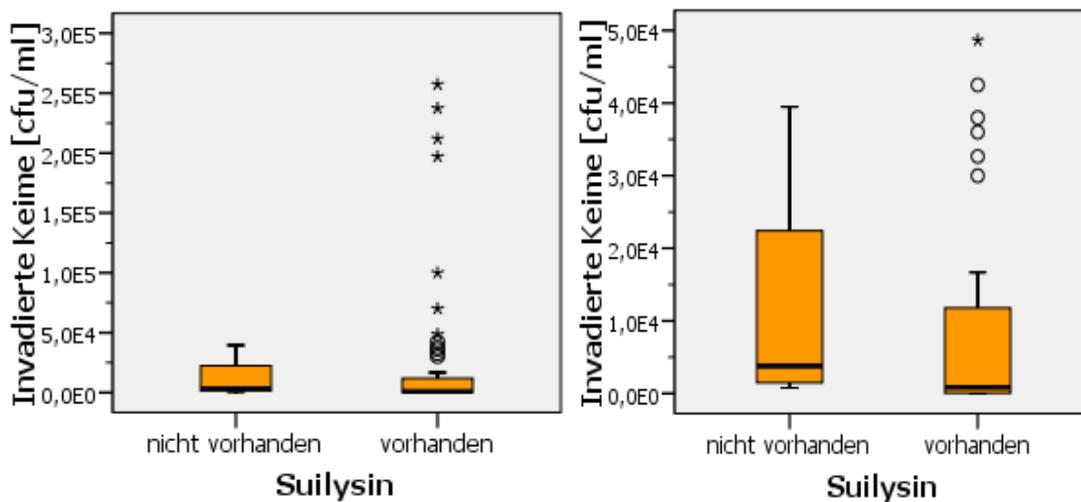


Abb. 30 : Suilysin als Pathogenitätsfaktor bei der Invasion:

Ähnlich den Ergebnissen bei den Adhäsionsversuchen scheint Suilysin als beeinflussender Faktor auch für die Invasion keine relevante Rolle zu spielen.

Suilysin hat keinen Einfluss auf die Invasion der Streptokokken. Links erneut die gesamte Breite der invadierten cfu/ml, im rechten Abbildungsteil ein Ausschnitt aus dem unteren Tabellenbereich. Es muss ergänzt werden, dass in diesen Versuchsreihen Q5 der einzige verwendete Suilysin-negative Keim war. Es überrascht somit nicht, dass der innerhalb der Einzelvergleiche tendenziell recht gut invadierende Q5 gegenüber den anderen Keimen keinen signifikanten Unterschied bietet (U-Test,  $p=0,279$ ).

## Bedeutung der Isolatherkunft für die Invasion

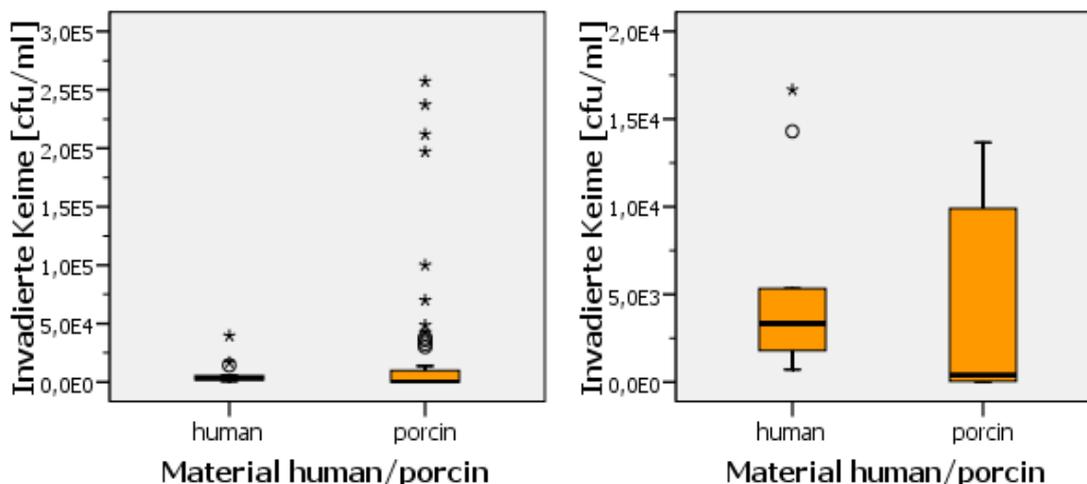


Abb. 31 : Humane oder porcine Isolatherkunft als Pathogenitätsfaktor bei der Invasion:

Gleich den Ergebnissen bei den Adhäsionsversuchen ist die Herkunft der verwendeten Isolate für sich genommen kein relevanter Faktor für eine stärkere Invasionsfähigkeit.

In Abb. 31 wird die Herkunft der Keimisolate in ein direktes Verhältnis zueinander gestellt. Bis auf die Humanisolate der A- und der Q-Reihe handelt es sich ausschliesslich um porcine Isolate. Keines der humanen Isolate bietet in den direkten Vergleichen annähernd ähnliche Invasionsraten, wie die bestinvadierenden porcinen Isolate. Entsprechend zeigte sich erwartungsgemäss eine statistische Signifikanz zugunsten der porcinen Isolate (U-Test,  $p=0,026$ ).

Wie schon bei der Adhäsion zeigte sich auch bei der Invasion tendenziell eine stärkere Invasionspotenz bei der kapsellosen und den nicht-typisierbare Kapseln tragenden Varianten. In den Einzelvergleichen waren die bestinvadierenden Keime ebenso die Isolate H1, H3, H5, H6 und H7. Analog den Ergebnissen bei den Adhäsionsversuchen zeigte sich eine verbesserte Invasionsfähigkeit der MRP-negativen und EF-negativen Bakterienstämme im Vergleich zu den MRP-positiven und EF-positiven Isolat. Ebenso wenig wie die Suilysin-Positivität nicht mit einer verstärkten Adhäsionsfähigkeit assoziiert werden konnten, fehlte ein entsprechender Zusammenhang zur Invasionsfähigkeit.

## 4. Diskussion

### Adhäsion und Bedeutung der Kapsel

Es besteht eine durchweg ähnliche durchschnittliche prozentuale Adhäsion der Mehrzahl der Stämme zwischen 0,5 und 5% mit einer gewissen Sättigung bei Verwendung der höchsten Inokulationsdosis. Weiter zeigten die Stämme H1, H3, H5, H6 und H7 durchweg eine um mindestens eine Zehnerpotenz höhere Adhäsion als alle anderen Keime, innerhalb der restlichen Stämme zeigt sich eine tendenziell leicht stärkere Adhäsion des Stamm Q5 ohne dabei jedoch statistische Signifikanz zu erreichen.

Betrachtet man die oben genannten Stämme hinsichtlich ihrer Charakteristika, so fällt auf, dass sich unter den gut adhätierenden Stämmen sowohl bekapselte (H1, H3, H6, H7), als auch kapsellose Stämme (H5) befinden. Hierbei handelt es sich jedoch ausschließlich um nicht typisierbare Kapselvarianten, die nicht den Standardkapselserotypen entsprechen. Die als Kapseltyp 2 typisierten Stämme H2 und H4 weisen dazu eine im Vergleich deutlich reduzierte Adhäsionspotenz auf.

Im Fall H4/H5 zeigt sich, dass sich bei isogenen Stämmen große Unterschiede allein aufgrund der unterschiedlichen Kapselexpression ergeben können, in diesem Fall zugunsten einer stärkeren Adhäsion bei der kapsellosen Mutante.

Einzig in vergleichbaren Versuchen von Charland zeigte sich zunächst eine weitgehende Unabhängigkeit der Adhäsion an HBMEC vom Vorhandensein einer Kapsel (Charland 2000). Die in diesen Versuchen verwendeten Stämme entsprachen allerdings ausschließlich dem Kapseltyp 2 und den entsprechenden isogenen akapsulären Varianten, beide zeigten lediglich an HBMEC nicht jedoch an einer HUVEC-Zelllinie eine reproduzierbare Adhäsion. Es konnte jedoch vermutet werden, dass das Nichtvorhandensein und/ oder die Nicht-Typisierbarkeit der Kapsel bei der Adhäsion an porcine Plexusepithelzellen gegenüber der an HBMEC oder HUVEC eine höhere Bedeutung hat.

In entsprechenden Versuchen an HEp-2 Zelllinien, sowie an porcinen Zelllinienkorrelaten fand sich in Adhäsionsversuchen mit Stämmen der Serogruppe 2, sowie deren isogenen kapsellosen Mutanten von *Streptococcus suis* sowie Stämmen mit nichttypisierbaren Kapselpolysacchariden eine statistisch signifikant höhere Adhäsion der letzteren beiden Gruppen. Besonders ausgeprägt war die Adhäsion der isogenen kapsellosen Mutante

des verwendeten Keimes am porcinen Äquivalent von HUVEC, so dass aufgrund dieser Versuche eine wichtigere Bedeutung der Kapsel für den Adhäsionsprozess an den beschriebenen Zelllinien angenommen werden darf (Benga 2004, Vanier 2004, Benga 2005, Vanier 2007).

Sowohl in unseren Hauptversuchen, als auch in dem im Rahmen der Vorversuche durchgeführten Vergleichsversuch, in dem die Adhäsion zweier ausgewählter Stämme sowohl an porcinen Plexusepithelzellen als auch an HBMEC verglichen wurde, zeigten sich vergleichbare Adhäsionsraten bei der Mehrheit der geringer adhärierenden Keime wie in den Versuchen von Charland (Charland 2000).

Die Autoren dieser Studie verwendeten mit einer Dosis von etwa  $10^5$  cfu/ml dabei eher etwas niedrigere Inokula als in unseren Versuchen, der Nachweis der Keime erfolgte gleich unseren Versuchen durch Ausplattieren auf THB-Agar. Sowohl bei dem Referenzstamm DSM 9682, der unserem Referenzkeim A6 entspricht, als auch bei akapsulären oder schwach hämolysierenden Mutanten konnten Adhäsionswerte von ca. 3-12% der ursprünglichen Inokulationsdosis nachgewiesen werden, gleiches galt für weitere verwendete europäische und amerikanische Wildtypen. Die Adhäsionswerte der verwendeten Keime an HUVEC waren durchweg deutlich niedriger, so dass Charland einen Tropismus von *Streptococcus suis* an HBMEC postulierten.

In Anbetracht der Ergebnisse unserer Adhäsionsversuche kann ein ähnlicher Tropismus für porcine Plexusepithelzellen postuliert werden, zusätzlich besteht eine Abhängigkeit vom Vorhandensein oder der Typisierung einer Kapsel.

Ebenso wie in unserem Vergleichsversuch mit anderen Zelllinien zeigte sich in den Adhäsionsversuchen von Lalonde (Lalonde 2000) eine nachweisbare Adhäsion sowohl des Referenzstammes als auch verschiedener, teils akapsulärer Mutanten auch an anderen epithelialen Zelllinien, so zum Beispiel an der bei uns ebenfalls verwendeten Zelllinie A 549 oder an HeLa, MDCK und zwei weiteren Nierenzelllinien des Schweines.

Verwendet wurde innerhalb ihres Versuchsaufbaus ebenfalls eine Inokulationsdosis von  $10^5$  cfu/ml für eine Dauer von 2 h. Die dabei erreichten Adhäsionsraten entsprachen im Wesentlichen Werten zwischen  $10^3$  und  $20^4$  adhärerte cfu/ml, entsprechend einer 1-20%-igen Adhäsion. Es konnte eine verstärkte Adhäsion der akapsulären Mutante an allen Zelllinien nachgewiesen werden, beispielsweise erreichte sie sowohl an einer porcinen Nierenzelllinie als auch an A 549 Adhäsionswerte bis zu 100%. Die Adhäsion

der verschiedenen Stämme konnte zudem elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden. In diesen Versuchen zeigt sich erneut, dass die Abwesenheit einer Kapsel wie bei der durch uns verwendeten isogenen kapsellosen Variante zu einer erhöhten Adhäsion führt.

In Versuchen von Vanier mit *Streptococcus suis* Serotyp 2 an porcinem Hirnendothel konnte ebenfalls eine deutliche Adhäsion bei verschiedenen Stämmen gezeigt werden, erneut zeigte besonders die verwendete akapsuläre Mutante des Referenzkeimes eine starke Adhäsion von bis zu  $10^5$  cfu/ml nach 2h und mehr als  $10^6$  cfu/ml nach 6h, bei einer verwendeten Inokulationsdosis von  $10^6$  cfu/ml entsprechend einer MOI von 10 (Vanier 2004).

Die weiteren verwendeten Stämme erreichten nach zweistündiger Inkubation Adhäsionswerte zwischen  $10^4$  bis  $10^5$  cfu/ml und damit eine vergleichbare prozentuale Adhäsion von 1-10%.

Zusammenfassend zeigt sich hinsichtlich der bakteriellen Kapsel ein deutlicher Vorteil für die Adhäsion bei kapsellosen Stämmen, lediglich in der ersten der zitierten Vergleichsarbeiten fand sich in der Arbeit von Charland kein klarer Vorteil der kapsellosen oder nichttypisierbare Kapseln tragenden Stämme. Folglich könnte die klinische Beobachtung einer verstärkten Pathogenität, wie sie zum Beispiel durch Vecht für bekapselte Keime der Serogruppe 2 beobachtet wurde, nicht durch eine verstärkte Adhärenz erklärt werden, sondern müsste im Einklang mit den Untersuchungen von Smith als weiterer unterschiedlicher Virulenzfaktor bezeichnet werden (Vecht 1991, Smith 1997). Es ist weiter denkbar, dass als Begründung für die Nicht-Typisierbarkeit der von uns verwendeten, überproportional adhärierenden Keime das Fehlen einer Zellwandkomponente in Frage kommt, welche einerseits für die Typisierbarkeit der Kapsel in Frage kommt, andererseits durch ihr Fehlen eine vermehrte Adhäsionsfähigkeit bedingt. Dies würde die ausgeprägte Adhäsion sowohl kapselloser Mutanten, als auch der eine nicht-typisierbare Kapsel tragenden Keime erklären. Dies steht in Einklang mit der im Vergleich zu Keimen der Serogruppe 2 überdurchschnittlichen Adhäsionsfähigkeit der nichttypisierbare Kapselantigene tragenden Stämme. Einige der von uns verwendeten Stämme entsprechen dabei den in den Versuchen von Benga an HEp-2 sowie PBMEC und PEDSV verwendeten (Benga 2004; Benga 2005). Ebenfalls denkbar ist eine stadienabhängige Regulierung der Adhäsionsfähigkeit. Insofern widerspricht dieses Adhäsionsergebnis nur scheinbar den Ergebnissen von Charland und Smith (Charland 1998, Smith 1999), in denen das

Vorhandensein einer Kapsel als ein unabhängiger Virulenzfaktor nachgewiesen wurde. Während des Aufenthaltes in Kompartimenten des Körpers mit einem ausgeprägten humoralen Immunsystem bietet die Kapsel Schutz vor Phagozytose, im Kompartiment des Liquorsystems, wo eine derartige humorale Abwehr jedoch weit weniger Bedeutung hat scheinen die unbekapselten Bakterienstämme bezüglich einer verbesserten Adhäsionsfähigkeit im Vorteil zu sein. In Versuchen von Hoffmann an *Escherichia coli* K1 zeigte sich ebenfalls ein verbesserter Phagozytoseschutz durch das Vorhandensein einer Kapsel ohne Vorteile für die Transmigration der Blut-Hirn-Schranke zu bieten (Hoffmann 1999). Möglich ist ebenfalls, dass ein in der Zellwand vorhandenes weiteres Adhäsion partiell durch eine exprimierte Kapsel überlagert wird.

#### Bedeutung der Kapselproteine MRP und EF

Die Untersuchung der beiden Proteine EF und MRP als Variablen einer möglichen Adhäsion ergab keinen Hinweis auf die Notwendigkeit des Vorhandenseins einer oder beider Proteine für die Adhäsion an Plexus choroideus Epithel, eher schien ein Fehlen der Proteine mit höherer Adhäsions- bzw. Invasionspotenz assoziiert.

Das Protein MRP, über dessen Verwandtschaft mit dem Fibronectin-bindenden Protein von *Staphylococcus aureus* bereits spekuliert wurde (Smith 1992), scheint in unseren Versuchen kein notwendiger Bestandteil des Adhäsionsprozesses an Plexusepithel zu sein, da sich in in der Gruppe der maximal adhätierenden Stämme sowohl mehrere MRP-positive wie –negative Stämme befinden. Der EF, welcher bereits in Versuchen von Vecht als bei weniger humanpathogenen, als schweinepathogenen Stämmen vorhanden nachgewiesen wurde, wurde sowohl in stark-, wie schwach adhärenen Stämmen exprimiert (Vecht 1991).

In der Arbeit von Vanier, in der die beiden Proteine als Variable bei der Adhäsion von *Streptococcus suis* Serotyp 2 an PBMEC untersucht wurden, fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen MRP und EF-negativen zu MRP und EF-positiven Stämmen (Vanier 2004). Im Gegensatz hierzu konnte in Versuchen von Vanier durch Vorbehandlung der Zellen mit purifizierter Zellwand von *Streptococcus suis* an PBMEC eine Reduktion der Adhärenz nachgewiesen werden, möglicherweise konkurrieren proteinhaltige Anteile der purifizierten Zellwand mit einzelnen Keimen um Verbindungen zur Adhäsion.

## Bedeutung des Suilysins und Zytotoxizität

In unseren Versuchen zeigte sich das höchste Ausmaß an Adhäsionsfähigkeit bei den Suilysin-positiven Stämmen H1, H3, H5, H6 und H7. Trotzdem zeigte sich auch eine sehr niedrige Adhäsion bei anderen Suilysin-positiven Stämmen. Ein klarer Zusammenhang zwischen beiden Faktoren ließ sich nicht finden.

Bestätigend zeigte sich in den Versuchen von Vanier kein Hinweis für einen signifikanten Unterschied der Adhäsionsfähigkeit zwischen Suilysin-produzierenden Stämmen und deren Suilysin-negativen Mutanten (Vanier 2004, Vanier 2007). Gleiches gilt für die verwendeten, zum Teil lediglich genotypisch Suilysin-positiven, jedoch phänotypisch negativen Stämme, sowie für die sowohl geno-, als auch phänotypisch-negativen Stämme. Beide Gruppen stellten sowohl stark als auch schwach adhärierende Vertreter, so dass eine direkte Begünstigung der Adhäsion durch den Faktor Suilysin wenig wahrscheinlich erscheint. In *in vivo*-Versuchen von Lun konnte kein direkter Zusammenhang zwischen Suilysin-positiven *Streptococcus suis* Stämmen und klinischer Infektion von jungen Ferkeln gegenüber isogenen Suilysin-negativen Mutanten nachgewiesen werden. Nach Infektion mittels bakterienhaltiger Aerosole via Respirationstrakt unterschieden sich die Zahlen der erkrankten Tiere nicht signifikant voneinander. Relativierend muss dabei allerdings die geringe Fallzahl der Versuchsreihe erwähnt werden (Lun 2003).

In älteren Untersuchungen von Feder in der alle bekannten Serogruppen von *Streptococcus suis* auf ihre hämolytische Potenz untersucht wurden zeigten die *in vivo* in den meisten klinischen Fällen nachgewiesenen Serogruppen 1, 2, 4 und 14 bei weitem die stärksten hämolytische Aktivität (Feder 1994). Dies kann als ein weiterer Hinweis gewertet werden, dass einer verstärkten Virulenz nicht notwendigerweise eine starke Adhäsion vorhergehen muss.

Eine mögliche Fehlerquelle einer erhöhten gemessenen Adhäsion durch ausserhalb des Zellrasens anheftende Bakterien oder durch hohe Inokulationsdosen und verlängerte Inkubationszeiten mit verstärkter Suilysinproduktion, wie sie von Vanier nachgewiesen werden konnte (Vanier 2004), wurde in unseren Versuchen mit zum Teil höheren Inokulationsdosen mittels der Trypanblau-Anfärbung des Zellrasens als Vitalitätsnachweis und ausgiebiges Spülen der Näpfe vor Ultraschallyse minimiert.

In Versuchen von Charland konnte mittels LDH-Messung und elektronenmikroskopisch eine deutliche Zytotoxizität verschiedener Keime, vornehmlich des Referenzstammes

DSM 9682 und eines weiteren europäischen Isolates nachgewiesen werden (Charland 2000). Die Autoren wiesen jedoch darauf hin, dass diese Zytotoxizität bei niedrigeren Konzentrationen und einer Inkubationsdauer von 2 h gering sei und elektronenmikroskopisch normale Zellcharakteristika nachgewiesen werden konnten. Selbst bei den am stärksten zytotoxischen Stämmen zeigte sich nach zwei Stunden nicht mehr als 5-10% der maximalen Zytotoxizität, während einige Stämme nach 4h Inkubationsdauer schon Werte von >80% erreichten.

In Zytotoxizitätsversuchen von Lalonde konnte an einer porcinen Nierenepithelzelllinie eine nennenswerte Zytotoxizität ebenfalls erst ab einer Inokulationsdosis von  $5 \times 10^7$  cfu/ml und/oder einer Inokulationsdauer von 4 h nachgewiesen werden (Lalonde 2000). Hier zeigte sich allerdings ein wesentlicher Unterschied zwischen zwei Suilysin-produzierenden Stämmen und jenen, die über diese Fähigkeit nicht verfügen und entsprechend keine erhöhte Zytotoxizität induzierten.

Vanier fand bei LDH-Messungen nach Inokulation mit verschiedenen Suilysin-positiven und -negativen Stämmen eine nennenswerte Zytotoxizität ebenso vornehmlich bei längeren Inkubationszeiten und Konzentrationen von mehr als  $10^7$  cfu/ml unter Verwendung Suilysin-positiver Keime (Vanier 2004).

## Invasion

Ebenso wie in vergleichbaren Versuchen von Charland, in denen keine relevante Invasion verschiedener *Streptococcus suis* Stämme an HBMEC- und HUVEC-Zelllinien nachgewiesen werden konnte, zeigte sich in unseren Versuchen zur Invasion nur eine geringe Invasivität aller Stämme (Charland 2000). Während die konfluenten Zellschichten der genannten Zelllinien bei Charland mit einer Dosis von etwa  $10^5$  cfu/ml für 2h inokuliert und später für weitere 2h der ebenfalls von uns verwendeten Antibiotikadosis aus Penicillin/Streptomycin ausgesetzt wurden, verwendeten wir eine höhere Inokulationsdosis von  $10^7$  cfu/ml. Der Nachweis der Keime erfolgte ebenso durch Ausplattieren auf THB-Agar. Während bei Charland weder bei dem Referenzstamm DSM 9682 noch bei akapsulären oder schwächer hämolysierenden Mutanten oder den weiteren verwendeten europäischen und amerikanischen Wildtypen eine nennenswerte Invasion nachgewiesen werden konnte, fanden wir im Invasionsversuch mit um zwei Potenzen höheren Inokula eine geringgradige Invasion der unterschiedlichen Stämme, erneut zugunsten der zuvor beschriebenen Stämme mit den beschriebenen Merkmalen.

In Invasionsversuchen von Lalonde zeigte sich wie bei Charland keine Invasion sowohl des Referenzstammes als auch verschiedener, teils akapsulärer Mutanten an den untersuchten epithelialen Zelllinien A 549, HeLa, MDCK und zweier Nierenzelllinien des Schweins (Lalonde 2000). Verwendet wurde innerhalb der Hauptversuche eine Inokulationsdosis von  $10^5$  cfu/ml für eine Dauer von 2 h, die Autoren gaben jedoch an, auch bei erhöhten Inokulationsdosen und -zeiten keine Invasion nachgewiesen haben zu können.

In Versuchsansätzen von Norton konnten im Gegensatz zu den erwähnten Publikationen stammsspezifisch verschieden stark ausgeprägte Invasionsergebnisse an HEp-2 Zellen nachgewiesen werden (Norton 1999). Im Gegensatz zu der bei uns und in anderen Publikationen verwendeten Darstellungsart erfassten die Autoren dieser Studie allerdings den Prozentsatz der Zellen mit invadierten Bakterien an der Gesamtzahl der Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie. Es fanden sich bei den meisten Stämmen jedoch in weniger als jeder vierten Zelle invadierte Bakterien.

In Versuchen von Vanier mit *Streptococcus suis* Serotyp 2 an porcinem Hirnendothel konnte eine stärkere Invasion als bei den meisten in unserem Versuchsaufbau verwendeten Stämmen nachgewiesen werden, dabei zeigte die verwendete akapsuläre Mutante des Referenzkeimes erneut die deutlichste Invasion (Vanier 2004). Bei einer Inokulationsdosis von  $10^6$  cfu/ml konnten sich bei der Mutante bis zu  $10^4$  invadierte cfu/ml nachweisen lassen, entsprechend einer prozentualen Invasion von ca. 1%. Die Invasion der Bakterien konnte ebenfalls elektronenmikroskopisch bestätigt werden. Unter Zugabe von Antibiotika auf den Zelllayer konnten überlebende invadierte Bakterien noch bis zu 7 h nach Inokulation in den Zellen gefunden werden, dabei zeigte sich jedoch ein zeitlicher Abfall der intrazellulär nachgewiesenen Bakterienzahl.

Benga fand in seinen Versuchen an HEp-2 Zellen eine zum Teil deutliche Invasion bei einzelnen *Streptococcus suis* Stämmen, diese stimmen im Wesentlichen mit den durch uns verwendeten Stämmen überein, es handelt sich um nicht-typisierbare Kapseln tragende oder kapsellose Bakterienstämme (Benga 2004). In Einklang mit Versuchen von Vanier fand sich bei uns ebenfalls keine Assoziation einer verstärkten Invasion mit einer vorhandenen oder nicht vorhandenen Suilysin-Expression (Vanier 2004).

Mittels bakteriostatischer Vorbehandlung mit Rifampicin und Tetracyclin in verschiedenen Dosierungen zur Hemmung der bakteriellen Protein- und RNA-Synthese

konnte keine Hemmung der Invasion erreicht werden, was für eine geringe Beeinflussung der Invasion durch neu gebildete Proteine spricht (Vanier 2004).

In weiteren Versuchen untersuchten die Autoren die Rolle von Aktinfilamenten und Mikrotubuli beim Transport der invadierten Bakterien durch Vorbehandlung der Zellen mit Cytochalasin D und Colchicin. Dabei ließ sich lediglich eine dosisabhängige Reduktion der maximalen Invasion durch Cytochalasin D, nicht aber durch Colchicin nachweisen, was eine Beteiligung der Aktinfilamente nicht jedoch der Mikrotubuli an der Internalisierung nahe legt (Vanier 2004).

Prinzipiell sind für eine Penetration der epithelialen Barriere des Plexus choroideus eine Vielzahl von Mechanismen denkbar, so zum Beispiel das Vorhandensein weiterer bakterieneigener Proteine, die z.B. einen parazellulären oder transzellulären Transport erleichtern oder gar erst ermöglichen könnten. Als mögliche Vorbilder seien hier die im Rahmen der Penetration der Schleimhautbarriere bei der Meningitispathogenese verwendeten Mechanismen von Meningokokken und *Hämophilus influenzae* genannt. Alternative Wege zur Desintegration der Blut-Liquor-Schranke für *Streptococcus suis* konnten beispielsweise in einer Arbeit von Tenenbaum bereits aufgezeigt werden (Tenenbaum 2005). Ebenso besteht die Möglichkeit, dass eine genotypisch vorhandene Kapsel zum Adhäsions- oder gar Invasionszeitpunkt möglicherweise hoch- oder herunterreguliert ist und dass hierfür möglicherweise im Versuchsaufbau nicht vorhandene Faktoren verantwortlich sein könnten.

Dies macht deutlich, dass die Adhäsion und die in geringerem Maße vorhandene Invasion lediglich einen kleinen Teilschritt innerhalb der komplexen Perpetuation einer bakteriellen Meningitis darstellen. In jedem Fall darf die Adhäsions- oder Invasionsfähigkeit eines Stammes nicht mit der Virulenz desselben verwechselt oder gleichgesetzt werden, da weitere bakterien- und wirtsassoziierte Faktoren für die Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion angeschuldigt werden müssen.

Dieser Gedanke wird unterstützt von der Tatsache, dass in diversen älteren Untersuchungen (Vecht 1991; Smith 1997) die von uns untersuchten Pathogenitätsfaktoren teilweise als virulenzassoziiert nachgewiesen wurden, in unseren Arbeiten jedoch keine direkte Voraussetzung zur Adhäsion darstellten. Sollten diese zum Teil ebenfalls uneinheitlichen Ergebnisse als Maßstab genommen werden um die Virulenz und damit auch die klinische Relevanz verschiedener Stämme zu beurteilen, so ist zu vermuten, dass die direkte Adhäsion gefolgt von anschließender Internalisierung

nicht das von *Streptococcus suis* bevorzugte Mittel zum Austritt aus dem Liquorraum darstellt, sondern hierfür andere, der im Vorfeld genannten oder unbekannte Mechanismen verantwortlich sind. In wieweit die vorherige unterschiedlich ausgeprägte Adhäsion hierfür eine Rolle spielt, kann innerhalb dieses Versuchsaufbaus nicht beantwortet werden.

Dass die Interaktion von *Streptococcus suis* mit dem Plexus choroideus in Form von Adhäsion und Invasion trotzdem ein wesentlicher Baustein in der Meningitispathogenese sein kann, wurde in Untersuchungen zur Reaktion des Plexus auf Inkubation mit *Streptococcus suis* bereits gezeigt. So war der frühe Nachweis der transkriptionalen Aktivierung von TLR2 und CD 14, sowie weiterer Zytokine in verschiedenen Hirnregionen und hier insbesondere im Plexus choroideus, mit früher hoher Letalität bei Ferkeln assoziiert (Dominguez-Punaro 2007). Die Fähigkeit des Plexus choroideus durch Degradation von Tryptophan mittels Induktion der Indolamin-2,3-Dioxygenase das Wachstum von *Streptococcus suis* zu inhibieren wurde durch Arbeiten von Adam ebenfalls bereits nachgewiesen. Nach Stimulation von porcinem Plexus choroideus mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  konnte Bakterienwachstum *in vitro* deutlich reduziert werden (Adam 2004).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Verlauf einer durch *Streptococcus suis* hervorgerufenen Meningitis eine Vielzahl von Faktoren, welche sowohl die Bakterien als auch die Antwort der Wirtszellen betreffen, berücksichtigt werden müssen. Auf Seite der Bakterien spielt, wie auch in dieser Arbeit bestätigt, der Virulenzfaktor Kapsel eine entscheidende Rolle. Dabei ist zu beachten, dass es potentiell während verschiedener Phasen der Meningitis auch zu einer gezielten Regulierung der Kapselexpression durch das Bakterium kommen kann. Dies, das mögliche Zusammenspiel weiterer Virulenzfaktoren und die Wechselbeziehungen zwischen ihnen und den durch den Plexus choroideus sezernierten Substanzen stellen essentielle Faktoren zum Verständnis der bakteriell hervorgerufenen Meningitis dar und bieten interessante Ansatzpunkte für weitergehende Studien.

## 5. Literaturverzeichnis

Adam R, Schrotten H (2004). "Pathogenese der bakteriellen Meningitis" *Monatsschrift Kinderheilkunde* 152: 362-370.

Adam R, Tenenbaum T, Valentin-Weigand P, Laryea M, Schwahn B, Angelow S, Galla HJ, Däubener W, Schrotten H (2004). "Porcine choroid plexus epithelial cells induce *Streptococcus suis* bacteriostasis in vitro" *Infect Immun* 72 (5): 3084-3087.

Allgaier A, Goethe R, Wisselink HJ, Smith HE, Valentin-Weigand P (2001). "Relatedness of *Streptococcus suis* isolates of various serotypes and clinical backgrounds as evaluated by macrorestriction analysis and expression of potential virulence traits" *J Clin Microbiol* 39 (2): 445-53.

Arends J (1988). "Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans" *Rev Inf Dis* 10: 131-137.

Banks WA (1999). "Physiology and pathology of the blood-brain barrier: implications for microbial pathogenesis, drug delivery and neurodegenerative disorders" *J Neurovirol* 5 (6): 538-55.

Baums CG, Kock C, Beineke A, Bennecke K, Goethe R, Schröder C, Waldmann KH, Valentin-Weigand P (2009). "Streptococcus suis bacterin and subunit vaccine immunogenicities and protective efficacies against serotypes 2 and 9" *Clin Vaccine Immunol* 16 (2): 200-8.

Beachey E (1981). "Bacterial adherence: adhesin receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces." *J Infect Dis* 143: 325-345.

Benga L, Goethe R, Rohde M, Valentin-Weigand P (2004). "Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells" *Cell Microbiol* 6 (9): 867-881

Benga L, Friedl P, Valentin-Weigand P (2005). "Adherence of *Streptococcus suis* to Porcine Endothelial Cells" *J Vet Med B* 52: 392-95.

Benkirane R, Gottschalk M, Jaques M, Dubreuil JD (1998). "Immunochemical characterization of an IgG-binding protein of *Streptococcus suis*" *FEMS Immunol Med Microbiol* 20: 121-27.

Berthelot-Herault F, Morvan H (2000). "Production of Muramidase-released protein (MRP), extracellular factor (EF) and suilysin by field isolates of *Streptococcus suis* capsular types 2, 1/2, 9, 7 and 3 isolated from swine in France" *Vet Res* 31 (5): 473-9.

Billington SJ, Jost BH, Songer JG (2000) "Thiol-activated cytolysins: structure, function and role in pathogenesis" *FEMS Microbiol Letters* 182 (2): 197-205

Boetner AG, Binder M, Bille-Hansen V (1987). "Streptococcus suis infections in Danish pigs and experimental infection with Streptococcus suis serotype 7" *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 95 (4): 233-9.

Brisebois LM, Charlebois R, Higgins R, Nadeau M (1990). "Prevalence of Streptococcus suis in four to eight week old clinically healthy piglets" *Can J Vet Res* 54 (1): 174-7.

Charland N, Kobisch M, Martineau-Doize B, Jaques M, Gottschalk M (1996). "Role of capsular sialinic acid in virulence and resistance to phagocytosis of Streptococcus suis capsular type 2" *FEMS Immunol Med Microbiol* 14: 195-203.

Charland N, Jaques M, Lacouture S, Gottschalk M (1997). "Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular epitope shared by Streptococcus suis serotypes 1, 2 and 1/2" *Microbiology* 143: 3607-14.

Charland N, Harel J (1998). "Streptococcus suis serotype 2 mutants deficient in capsular expression" *Microbiology* 144 (2): 325-32.

Charland N, Nizet V (2000). "Streptococcus suis serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells" *Infect Immun* 68 (2): 637-43.

Chatellier S, Gottschalk M (1999). "Relatedness of Streptococcus suis serotype 2 isolates from different geographic origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping" *J Clin Microbiol* 37 (2): 362-6.

Chodobski A, Szmydynger-Chodobska J (2001). "Choroid plexus: target for polypeptides and site of their synthesis" *Microsc Res Tech* 52 (1): 65-82.

Citi S, Sabanay H, Jakes R, Geiger B, Kendrick-Jones J (1988). "Cingulin, a new peripheral component of tight junctions" *Nature* 333: 272-6.

Clifden-Hatley F (1986). "The epidemiology, diagnosis, treatment and control of Streptococcus suis type 2 infection" *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners*: 471-491.

Crone C, Olesen SP (1982) "Electrical resistance of brain microvascular endothelium" *Brain Res* 241 (1): 49-55

de Greef A, Buys H, Verhaar R, Dijkstra J, van Alphen L, Smith HE (2002). "Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2" *Infect Immun* 70: 1319-25.

de Man P, van Kooten C, Aarden L, Engberg I, Linder H, Svanborg-Eden C (1989). "Interleukin 6 induced at mucosal surfaces by gram negative bacterial infection" *Infect Immun* 57: 3383-88.

De Spiegelaere W, Casteleyn C, Van den Broeck W, Simoens P (2008). "Electron microscopic study of the porcine choroid plexus epithelium" *Anat Histol Embryol* 37 (6): 458-63.

Devriese LA, Ceyskens K (1991). "Characteristics of different *Streptococcus suis* ecovars and description of a simplified identification method" *Vet Microbiol* 26 (1-2): 141-50.

Dohrmann GJ (1970). "The choroid plexus: a historical review" *Brain Res* 3 (18): 197-218.

Dominguez-Punaro MC, Segura M, Plante MM, Lacouture S, Rives S, Gottschalk M (2007). "Streptococcus suis Serotype 2, an Important Swine and Human Pathogen, Induces Strong Systemic and Cerebral Inflammatory Responses in a Mouse Model of Infection" *J Immun* 179: 1842-54.

Dupas DV, Geraut C (1992). "Streptococcus suis meningitis. A severe noncompensated occupational disease" *J Occup Med* 34 (11): 1102-5.

Ehrlich P (1885). "Zur biologischen Verwertung des Methylenblau" *Centralblatt für die medicinischen Wissenschaften* 23: 113-117

Elbers AR, Osterhaus AD, Groen J, Wisselink HJ, Diepersloot RJ, Tielen MJ (1999). "Low prevalence of antibodies against the zoonotic agents *Brucella abortus*, *Leptospira* spp., *Streptococcus suis* serotype II, hantavirus, and lymphocytic choriomeningitis virus among veterinarians and pig farmers in the southern part of The Netherlands" *Vet Q* 21 (2): 50-4.

Elsinghorst EA (1994). "Measurement of invasion by gentamicin resistance" *Methods Enzymol* 236: 405-20.

Estoepangestie S, Laemmler C (1993). "Distribution of capsular types 1 to 28 and further characteristics of *Streptococcus suis* isolates from various European countries" *Zentralbl Bakteriol* 279 (3): 394-403.

Facklam R (2002). "What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes" *Clin Microbiol Rev* 15 (4): 613-30.

Feder I, Chengappa MM, Fenwick B, Rider M, Staats J (1994). "Partial characterization of *Streptococcus suis* type 2 hemolysin" *J Clin Microbiol* 32 (5): 1256-60.

Fittipaldi N, Fuller TE, Teel JF, Wilson TL, Wolfram TJ, Lowery DE, Gottschalk M (2009). "Serotype distribution and production of muramidase-released protein, extracellular factor and suilysin by field strains of *Streptococcus suis* isolated in the United States" *Vet Microbiol Epub* (ahead of print).

Frosch M (2003). "Akute bakterielle Meningitis" UNI- MED Verlag ISBN Nr.978-3-89599-701-3

Galina L, Vecht U, Wisselink HJ, Pijoan C (1996). "Prevalence of various phenotypes of *Streptococcus suis* isolated from swine in the U.S.A. based on the presence of muraminidase-released protein and extracellular factor" *Can J Vet Res* 60 (1): 72-4.

Gath U, Hakvoort A, Wegener J, Decker S, Galla HJ (1997). "Porcine choroid plexus cells in culture: expression of polarized phenotype, maintenance of barrier properties and apical secretion of CSF-components" *Eur J Cell Biol* 74: 68-78.

Geelen S, Bhattacharyya C, Tuomanen E (1993). "The cell wall mediates pneumococcal attachment to and cytopathology in human endothelial cells" *Infect Immun* 61: 1538-43.

Gherzi-Egea JF, Strazielle N (2002). "Choroid plexus transporters for drugs and other xenobiotics" *J Drug Target* 10 (4): 353-7.

Gibson R, Lee MK, Soderland C, Chi EY, Rubens CE (1993). "Group B streptococci invade endothelial cells: type III capsular polysaccharide attenuates invasion" *Infect Immun* 61: 478-85.

Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Dubreuil D (1992). "Production and characterization of two *Streptococcus suis* capsular type 2 mutants" *Vet Microbiol* 30 (1): 59-71.

Gottschalk M, Lacouture S (1995). "Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin" *Microbiol* 141 (1): 189-95.

Gottschalk M, Lebrun A, Wisselink H, Dubreuil JD, Smith H, Vecht U (1998). "Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2" *Can J Vet Res* 62 (1): 75-9.

Gottschalk M, Segura M, Xu J (2007). "Streptococcus suis infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America" *Anim Health Res Rev* 8 (1): 29-45.

Gregoire N (1989). "The blood-brain barrier" *J Neuroradiol* 16 (3): 238-50.

Haataja S, Tikkanen K (1993). "Characterization of a novel bacterial adhesion specificity of *Streptococcus suis* recognizing blood group P receptor oligosaccharides" *J Biol Chem* 268 (6): 4311-7.

Halaby T, Hoitsma E, Hupperts R, Spanjaard L, Luirink M, Jacobs J (2000). "Streptococcus suis meningitis, a poacher's risk" *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19: 943-45.

Haselbach M, Wegener J, Decker S, Engelbertz C, Galla HJ (2001). "Porcine choroid plexus epithelial cells in culture: regulation of barrier properties and transport processes" *Microsc Res Tech* 52: 137-52.

Heath P, Hunt BW, Duff JD, Wilkinson JD (1996). "Streptococcus suis serotype 14 as a cause of pig disease in the UK" *Vet Rec* 139: 450-1.

Herbert J, Wilcox JN, Pham KT, Fremerey RT Jr, Zeviani M, Dwork A, Soprano DR, Makover A, Goodman DS, Zimmerman EA (1986). "Transthyretin: a choroid plexus-specific transport protein in human brain" *Neurology* 36 (7): 900-11.

Higgins R, Gottschalk M (1994). "Distribution of streptococcus suis capsular types in 1994" *Can Veterinary Journal* 35: 245.

Higgins R, Gottschalk M (1999). "Streptococcal diseases" *Diseases of Swine* 8th edition: 563-70.

Higgins R, Gottschalk M (2000). "Distribution of Streptococcus suis capsular types in 1999" *Can J Vet Res* 41: 414.

Hill JE, Gottschalk M, Brusseau R, Harel J, Hemmingsen SM, Goh SH (2005). "Biochemical analysis, cpn60 and 16s rDNA sequence data indicate that streptococcus suis serotypes 32 and 34, isolated from pigs are Streptococcus orisratti" *Vet Microbiol* 107: 63-9.

Hoffmann JA, Wass C, Stins MF, Kim KS (1999). "The capsule supports survival but not transversal of Escherichia coli K1 across the blood-brain-barrier" *Infect Immun* 67: 3566-70.

Huang YS, Wang SM, Liu CC, Yang YJ (2002). "Invasive Escherichia coli infection in infancy: clinical manifestation, outcome, and antimicrobial susceptibility" *J Microbiol Immunol Inf* 35 (2): 103-8.

Jacobs A, Loeffen PL (1994). "Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of Streptococcus suis" *Infect Immun* 62 (5): 1742-8.

Jacobs A, Van den Berg AJ, Loeffen PL (1996). "Protection of experimentally infected pigs by suilysin, the thiol-activated haemolysin of Streptococcus suis" *Vet Rec* 139: 225-8.

Johanson CE, Duncan JA 3rd, Klinge PM, Brinker T, Stopa EG, Silverberg GD (2008). "Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease" *Cerebrospinal Fluid Res* 14 (5): 10.

- Kay R, Cheng AF, Tse CY (1995). "Streptococcus suis infection in Hong Kong" *QJM* 88 (1): 39-47.
- Keep RF, Jones HC, Cankwell RD (1986). "A morphometric analysis of the development of the fourth ventricle choroid plexus in the rat" *Brain Res* 392 (1-2): 77-85.
- Kilpper-Bälz R, Schleifer KH (1987). "Streptococcus suis sp. nov., nom. rev." *International Journal of Systematic Bacteriology* 37 (2): 160-2.
- King SJ, Heath PJ, Luque I, Tarradas C, Dowson CG, Whatmore AM (2001). "Distribution and genetic diversity of suilysin in Streptococcus suis isolated from different diseases of pigs and characterization of the genetic basis of suilysin absence" *Infect Immun* 69 (12): 7572-82.
- Koedel U, Scheld WM, Pfister HW (2002). "Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis" *Lancet Inf Dis* 2 (12): 721-36.
- Lalonde M, Segura M (2000). "Interactions between Streptococcus suis serotype 2 and different epithelial cell lines" *Microbiology* 146 (8): 1913-21.
- Leib SL, Leppert D, Clements J, Täuber MG (2000). "Matrix metalloproteinases contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis" *Infect Immun* 68 (2): 615-20.
- Lun S, Perez-Casal J, Connor W, Willson PJ (2003). "Role of suilysin in pathogenesis of Streptococcus suis capsular serotype 2" *Microbiol Pathogen* 34 (1): 27-37.
- Lun ZR, Wang QP, Chen XG, Li AX, Zhu XQ (2007). "Streptococcus suis: an emerging zoonotic pathogen" *Lancet Inf Dis* 7 (3): 201-9.
- Mai NT, Hoa NT, Nga TV, Linh le D, Chau TT, Sinh DX, Phu NH, Chuong LV, Diep TS, Campbell J, Nghia HD, Minh TN, Chau NV, de Jong MD, Chinh NT, Hien TT, Farrar J, Schultz C (2008). "Streptococcus suis meningitis in adults in Vietnam" *Clin Infect Dis* 46 (5): 659-67.
- Marois C, Le Devendec L, Gottschalk M, Kobisch M (2007) "Detection and molecular typing of Streptococcus suis in tonsils from live pigs in France" *Can J Vet Res* 71 (1): 14–22.
- Maxwell D, Pease DC (1956). "The electron microscopy of the choroid plexus" *J Biophys Biochem Cytol* 2: 467-474.
- Milhorat T (1969). "Choroid Plexus and Cerebrospinal Fluid Production" *Science* 166 (3912): 1514-16.

Milhorat TH, Davis DA, Hammock MK (1975). "Experimental intracerebral movement of electron microscopic tracers of various molecular sizes" *J Neurosurg* 42 (3): 315-29.

Nattie EE (1980). "Brain and cerebrospinal fluid ionic composition and ventilation in acute hypercapnia" *Respir Physiol* 40 (3): 309-22.

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 (1): 95-110.

Nealon T, Mattingly SJ (1985). "Kinetic and chemical analyses of the biologic significance of lipoteichoic acid in mediating adherence of serotype III group B streptococci" *Infect Immun* 50: 107-15.

Nizet V, Kim KS, Stins M, Jonas M, Chi EY, Nguyen D, Rubens CE (1997). "Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci" *Infect Immun* 65: 5074-81.

Norton PM, Leigh JA (1997). "Virulence mechanisms of *Streptococcus suis*" *Adv Exp Med Biol* 418: 823-5.

Norton PM, Rolph C (1999). "Epithelial invasion and cell lysis by virulent strains of *Streptococcus suis* is enhanced by the presence of suilysin" *FEMS Immunol Med Microbiol* 26 (1): 25-35.

Poggenborg R, Gaani S, Kjaeldgaard P, Christensen JJ (2008). "*Streptococcus suis*: meningitis, spondylodiscitis and bacteraemia with a serotype 14 strain" *Scand J Infect Dis* 40 (4): 346-9.

Potts DG, Reilly KF, Deonaraine V (1972). "Morphology of the arachnoid villi and granulations" *Radiology* 105 (2): 333-41.

Ransohoff RM, Kivisäkk P, Kidd G (2003). "Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system" *Nat Rev Immun* 3 (7): 569-81.

Rosenkranz M, Elsner HA, Stürenburg HJ, Weiller C, Röther J, Sobottka I (2003). "*Streptococcus suis* meningitis and septicemia contracted from a wild boar in Germany" *J Neurol* 250 (7): 869-70.

Salasia S, Lämmler C, Herrmann G (1995). "Properties of a *Streptococcus suis* isolate of serotype 2 and two capsular mutants" *Vet Microbiol* 45: 151-6.

Segers R, Kenter T, de Haan LA, Jacobs AA (1998). "Characterization of the gene encoding suilysin from *Streptococcus suis* and expression in field strains" *FEMS Microbiol Lett* 167: 255-61.

Segura M, Cleroux P (1998). "Streptococcus suis and group B Streptococcus differ in their interactions with murine macrophages" *FEMS Immunol Med Microbiol* 21 (3): 189-95.

Segura M, Gottschalk M (1999). "Adhesion of Streptococcus suis capsular type 2 to phagocytic cells" Abstracts of the XIV.Lancefield Int. Symposium on Streptococci and streptococcal diseases Abstract P8,17 (Auckland,NZ).

Segura M, Stankova J (1999). "Heat-killed Streptococcus suis capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by murine macrophages" *Infect Immun* 67 (9): 4646-54.

Segura M (2009) "Streptococcus suis: an emerging human threat" *J Infect Dis* 199 (1): 4-6.

Schuller E, Gervais A, Reboul J, Lebon P, Devillechabrolle A, Huraux JM (1992). "Intrathecal synthesis of proteins: from immunoglobulins to prealbumin" *Ital J Neurol Sci* 13 (9/14): 69-77.

Shapiro S, Miller A, Lahat N, Sobel E, Lerner A (2003). "Expression of matrix metalloproteinases, sICAM-1 and IL-8 in CSF from children with meningitis" *J Neurol Science* 206 (1): 43-8.

Silva LM, Baums CG, Rehm T, Wisselink HJ, Goethe R, Valentin-Weigand P (2006) "Virulence-associated gene profiling of Streptococcus suis isolates by PCR" *Vet Microbiol* 115 (1-3): 117-27.

Smith HE, Vecht U, Gielkens AL, Smits MA (1992). "Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the 136-kilodalton surface protein (muraminidase-released protein) of Streptococcus suis type 2" *Infect Immun* 60 (6): 2361-7.

Smith HE, Vecht U, Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Biermann Y, Smits MA (1996). "Mutants of Streptococcus suis types 1 and 2 impaired in expression of muraminidase-released protein and extracellular protein induce disease in newborn germfree pigs" *Infect Immun* 64 (10): 4409-12.

Smith HE, Wisselink HJ, Vecht U, Gielkens A, Smits MA (1997). "Virulence markers of Streptococcus suis type 1 and 2" *Adv Exp Med Biol* 418: 651-6.

Smith H, Damman M (1999). "Identification and characterization of the cps locus of Streptococcus suis serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor" *Infect Immun* 67 (4): 1750-6.

Smith TC, Capuano AW, Boese B, Myers KP, Gray GC (2008). "Exposure to Streptococcus suis among US swine workers" *Emerg Infect Dis* 14 (12): 1925-7.

Speake T, Whitwell C, Kajita H, Majid A, Brown PD (2001). "Mechanisms of CSF secretion by the choroid plexus" *Microsc Res Tech* 52 (1): 49-59.

Spector R, Johanson CE (1989). "The mammalian choroid plexus" *Sci Am* 261 (5): 68-74.

Staats JJ, Feder I (1997). "Streptococcus suis: past and present" *Vet Res Commun* 21 (6): 381-407.

Staats JJ, Plattner BL, Stewart GC, Changappa MM (1999) "Presence of the Streptococcus suis suilysin gene and expression of MRP and EF correlates with high virulence in Streptococcus suis type 2 isolates" *Vet Microbiol* 70 (3-4): 201-11.

Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA (1986). "Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia" *J Cell Biol* 103: 755-66.

St Geme J, Cutter D (1996). "Influence of pili, fibrils and capsule on in vitro adherence by Haemophilus influenzae type b" *Mol Microbiol* 21: 21-31.

Stins MF, Gilles F, Kim KS (1997). "Selective expression of adhesion molecules on human brain microendovascular endothelial cells" *J Neuroimmunol* 76: 81-90.

Stins MF, Prasadarao NV, Zhou J, Arditi M, Kim KS (1997). "Bovine brain microendovascular cells transfected with SV 40-large T antigen: development of an immortalized cell line to study pathophysiology of CNS disease" *In Vitro Cell Dev Biol* 33: 243-7.

Strazielle N, Ghersi-Egea JF (2000). "Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology" *J Neuropathol Exp Neurol* 59 (7): 561-74.

Strong H (1964). "The vascular and ependymal development of the tela choroidea of the lateral ventricle of the mammal" *J Morphol* 114: 59-82.

Sturrock RR (1978). "A developmental study of ependymal cells and supraependymal cells and their possible relationship to microglia" *Neuropath Appl Neurobiol* 4 (5): 307-22.

Suankratay C, Intalapaporn P, Nunthapisud P, Arunyingmongkol K, Wilde H (2004). "Streptococcus suis meningitis in Thailand" *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 35: 868-76.

Sukumaran SK, McNamara G, Prasadarao NV (2003). "Escherichia coli K-1 interaction with human brain micro-vascular endothelial cells triggers phospholipase C-gamma1 activation downstream of phosphatidylinositol 3-kinase" *J Biol Chem* 278 (46): 45753-62.

- Tamura G, Kuypers JM, Smith S, Raff H, Rubens CE (1994). "Adherence of group B streptococci to cultured epithelial cells: roles of environmental factors and bacterial surface components" *Infect Immun* 62: 2450-8.
- Tarradas C, Arenas A, Maldonado A, Luque I, Miranda A, Perea A (1994). "Identification of *Streptococcus suis* isolated from swine: proposal for biochemical parameters" *J Clin Microbiol* 32 (2): 578-80.
- Tikkanen K, Haataja S, Finne J (1996). "The galactosyl-(alpha 1-4)-galactose binding adhesin of *Streptococcus suis*: occurrence in strains of different haemagglutination activities and induction of opsonic antibodies" *Infect Immun* 64: 3659-65.
- Tenenbaum T, Adam R, Eggenpoehler I (2005). "Strain-dependent disruption of blood-cerebrospinal fluid barrier by *Streptococcus suis* in vitro " *FEMS Immunol Med Microbiol* 44:25-34.
- Tunkel AR, Tunkel S (1993). "Pathogenesis and Pathophysiology of Bacterial Meningitis" *Clin Microbiol Rev* 6: 118-36.
- Unkmeir A, Kämmerer U, Stade A, Hübner C, Haller S, Kolb-Mäurer A, Frosch M, Dietrich G (2002). "Lipooligosaccharide and polysaccharide capsule: virulence factors of *Neisseria meningitidis* that determine meningococcal interaction with human dendritic cells" *Inf Immun* 70 (5): 2454-62.
- Urade Y, Hayaishi O (2000). "Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase" *Biochim Biophys Acta* 1482 (1-2): 259-71.
- Valentin-Weigand P, Benkel P, Rohde M, Chatwal GS (1996). "Entry and intracellular survival of Group B streptococci in J774 macrophages" *Infect Immun* 64: 2467-73.
- Vanier G, Segura M, Friedl P, Lacouture S, Gottschalk M (2004). "Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2" *Infect Immun* 72 (3): 1441-9.
- Vanier G, Segura M, Gottschalk M (2007). "Characterization of the invasion of porcine endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2" *Can J Vet Res* 71: 81-9.
- Vecht U, Arends JP, van der Molen EJ, van Lenngoed LA (1989). "Difference in virulence between two strains of *Streptococcus suis* type 2 after experimentally induced infection of new-born germ-free pigs" *Am J Vet Res* 50: 1037-43.
- Vecht U, Wisselink HJ, Jellema ML, Smith HE (1991). "Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* Type 2" *Infect Immun* 59: 3156-62.

Vecht U, Wisselink HJ, van Dijk JE, Smith HE (1992). "Virulence of Streptococcus suis type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype" *Infect Immun* 60 (2): 550-6.

Vernier A, Diab M, Soell M, Haan-Archipoff G, Beretz A, Wachsmann D, Klein JP (1996). "Cytokine production by human epithelial and endothelial cells following exposure to oral viridans streptococci involves lectin interactions between bacteria and cell surface receptors" *Infect Immun* 64: 3016-22.

Walsh B, Williams AE, Satsangi J (1992). "Streptococcus suis type 2: pathogenesis and clinical disease" *Rev Med Microbiol* 3: 65-71.

Wangsomboonsiri W, Luksananun T, Saksornchai S, Ketwong K, Sungkanuparph S (2008) "Streptococcus suis infection and risk factors for mortality" *J Infect* 57(5):392-6.

Wei Z, Li R, Zhang A, He H, Hua Y, Xia J, Cai X, Chen H, Jin M (2009). "Characterization of Streptococcus suis isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007" *Vet Microbiol* 137 (1-2): 196-201.

Wertheim HF, Nghia HD, Taylor W, Schultsz C (2009). "Streptococcus suis: an emerging human pathogen" *Clin Infect Dis* 48 (5): 617-25.

Wibawan IW, Laemmler C (1994). "Relation between encapsulation and various properties of Streptococcus suis" *Zentralbl Veterinarmed B* 41 (7-8): 453-9.

Wiederkehr F (1991). "Analysis of cerebrospinal fluid proteins by electrophoresis" *J Chromatogr* 13, 569 (1-2): 281-96.

Williams AE, Blakemore WF (1990). "Pathogenesis of meningitis caused by Streptococcus suis type 2" *J Infect Dis* 162 (2): 474-81.

Wolf S (1996). "Die Blut-Hirn-Schranke: Eine Besonderheit des cerebralen Mikrozirkulationssystems" *Naturwissenschaften* 83: 302-11.

Zaki W (1981). "Ultrastructure of the choroid plexus and its development in the mouse" *Z Mikrosk Anat Forsch* 95 (6): 919-35.



# 7. Anhang

## 7.1. Abkürzungsverzeichnis

A549	humane Bronchialkarzinomzelllinie
ARA-C	Cytosinarabinosid
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLS	Blut-Liquor-Schranke
BSA	bovine serum albumine
Ca <sup>++</sup>	Calcium
cfu	colony forming units
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
CSF	cerebrospinal fluid
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellreihen
EDTA	Calciumdinatriummethyldiamintetraacetat
EF	extracellular factor
FCS	fetal calve serum
FISH	fluorescent in situ hybridisation
HBMEC	human brain microvascular cells
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HeLa	Zervixcarcinomzelllinie nach Name der Spenderin benannt
Hep-2	humane Larynxepithelzellkarzinomlinie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HSP 60	Hitzeschockprotein 60
IFN	Interferon
IL	Interleukin
K <sup>+</sup>	Kalium
kDa	kiloDalton
L.monocytogenes	Listeria monocytogenes
LP	Lumbalpunktion
Mg <sup>++</sup>	Magnesium
MOI	multiplicity of infection
MRP	mureinidase- related peptide
N.meningitidis	Neisseria meningitidis
Na <sup>+</sup>	Natrium
OD600	optical density 600
PEDSV	immortalisierte porcine aortoendotheliale Zelllinie
PBMEC	porcine brain microvascular cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction
RNA	ribonuclein acid
SFM	serumfreies Medium
SHM	serumhaltiges Medium
S.pneumoniae	Streptococcus pneumoniae

A549	humane Bronchialkarzinomzelllinie
Streptococcus suis	Streptococcus suis
THB	Todd-Hewitt broth
TNF	tumor necrosis factor
ZNS	Zentralnervensystem
ZO	zonula occludentes

## 7.2. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle	1	Verwendete Bakterienstämme und Virulenzfaktoren	36
Abbildung	1	Invasion der Erreger über Schleimhautbarriere und BHS/ BLS	9
Abbildung	2	Aufbau des Liquorsystems	11
Abbildung	3	Plexus choroideus (63x-fach vergrößert)	12
Abbildung	4	Plexus choroideus (200x-fach vergrößert)	15
Abbildung	5	Biochemischer Nachweis von Streptococcus suis mittels „bunter Reihe“	19
Abbildung	6	Freipräparation des Plexus choroideus aus dem Seitenventrikel	28
Abbildung	7	Plexus choroideus in Petrischale vor dem Ausblutenlassen	29
Abbildung	8	Ergebnisse Ultraschallsensibilität	47
Abbildung	9	Ergebnisse Inokulationsdosis	49
Abbildung	10	Ergebnisse Inokulationszeit	50
Abbildung	11	Ergebnisse Temperaturabhängigkeit	52
Abbildung	12	Ergebnisse Zelllinienvergleich	54
Abbildung	13	Ergebnisse Prästimulation	56
Abbildung	14	Ergebnisse Rotationszentrifuge	57
Abbildung	15	Ergebnisse Adhäsion, Inokulationsdosis $10^5$	59
Abbildung	16	Ergebnisse Adhäsion, Inokulationsdosis $10^6/10^7$	60
Abbildung	17	Adhäsion von S. suis an Plexusepithel (elektronenmikroskopische Darstellung)	62
Abbildung	18	Unterschiedliche Inokulationsdosen Adhäsionsversuche $10^5$	63
Abbildung	19	Unterschiedliche Inokulationsdosen Adhäsionsversuche $10^6/10^7$	63
Abbildung	20	Kapselserotyp als Pathogenitätsfaktor bei der Adhäsion	64
Abbildung	21	Mureinidase related protein als Pathogenitätsfaktor bei der Adhäsion	65
Abbildung	22	Extracellular factor protein als Pathogenitätsfaktor bei der Adhäsion	66
Abbildung	23	Suilysin als Pathogenitätsfaktor bei der Adhäsion	67
Abbildung	24	Humane oder porcine Isolatherkunft als Pathogenitätsfaktor bei der Adhäsion	67
Abbildung	25	Ergebnisse Invasion, Inokulationsdosis $10^7$	69
Abbildung	26	Unterschiedliche Inokulationsdosen Invasionsversuche $10^7$	70
Abbildung	27	Kapselserotyp als Pathogenitätsfaktor bei der Invasion	71
Abbildung	28	Mureinidase related protein als Pathogenitätsfaktor bei der Adhäsion	72
Abbildung	29	Extracellular factor protein als Pathogenitätsfaktor bei der Adhäsion	73
Abbildung	30	Suilysin als Pathogenitätsfaktor bei der Adhäsion	74
Abbildung	31	Humane oder porcine Isolatherkunft als Pathogenitätsfaktor bei der Adhäsion	74

### 7.3. Curriculum Vitae

Name: Lars Olaf Lomberg  
Geburtsdatum: 19. April 1979  
Geburtsort: Düsseldorf  
Adresse: Lichtstr. 31, 40235 Düsseldorf  
Familienstand: ledig, keine Kinder

#### Berufliche Ausbildung

03/2006 – 08/2007 Assistenzarzt Neurologie Marienhospital, Düsseldorf  
02/2008 - 07/2009 Assistenzarzt Innere Medizin, St. Marien Krankenhaus, Ratingen  
08/2009 - 11/2009 Assistenzarzt Innere Medizin/Kardiologie, Lukas Krankenhaus, Neuss  
12/2009 - aktuell Assistenzarzt Zentrale Notaufnahme, Klinikum Duisburg

#### PJ- Tertiale

10/2004 – 02/2005 1. Tertial: Neurologie an der Universitätsklinik Düsseldorf  
02/2005 – 05/2005 2. Tertial: Innere Medizin am Regionalspital Lachen (CH)  
05/2005 – 09/2005 3. Tertial: Chirurgie am Middlemore Hospital Auckland (NZ)

#### Studium

10/1999 - 09/2001 Beginn des Medizinstudiums an der Universität Mainz  
10/2001 - 12/2005 Medizinstudium an der Universität Düsseldorf  
09/2001 Ärztliche Vorprüfung (Note: 2,0)  
09/2002 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 3,0)  
05/2004 USMLE Step 1  
09/2004 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1,6)  
05/2005 USMLE Step 2  
12/2005 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1,0)

#### Schulbildung

08/1985 – 06/1989 Wilhelm-Busch-Grundschule, Ratingen  
08/1989 – 06/1998 Theodor-Fliedner-Gymnasium, Düsseldorf, Abitur (Note 2,1)

Düsseldorf, Oktober 2009

## **Danksagung**

Für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Klinik für Allgemeine Pädiatrie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf durchführen zu können, bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. Horst Schrotten.

Für die intensive Betreuung in allen Höhen und Tiefen der Arbeit und seine tatkräftige Unterstützung danke ich ganz besonders Herrn Dr. Rüdiger Adam, sowie den gesammelten Mitarbeitern des S2-Labors Infektiologie der Klinik für Allgemeine Pädiatrie.

Meiner Laborliebe Simone, deren Anwesenheit dort der beste Grund für Kontinuität bei der Fortführung der Arbeit war, und die mir immer wieder Ansporn zur Komplettierung der Arbeit gegeben hat, indem sie mit gutem Beispiel voran gegangen ist, danke ich ganz besonders. Gleiches gilt für meine Familie, ich wünsche dass wir die Chance bekommen, die Fertigstellung dieser Arbeit gemeinsam zu feiern.

Des weiteren bedanke ich mich für die Kooperation bei der Zusammenstellung der Isolate bei:

Professor Dr. Rudolf Lütticken, Institut für Medizinische Mikrobiologie, RWTH Aachen (A1- A5)

Professor Dr. Luc Wijnhoven, Intervet International, Boxmeer, Niederlande (B1)

Professor Dr. Marcello Gottschalk, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Canada (Q1-Q5)

Professor Dr. Peter Valentin-Weigand, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Tierärztlichen Hochschule Hannover (H1-H7)

Professor Dr. Hilde Smith, Instituut voor Dierhouderij en Diergezondheit ID Lelystad, Niederlande (L1- L10, S1, S4, S14)