

**Aus dem Institut für molekulare Infektionsbiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker**

**Bakterielle Adhärenz an Kryoschnitten humaner Darmbiopsien –
Screening von Kohlehydraten auf antibakterielle Wirkung**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Katja Hufnagel
aus Mainstockheim**

Würzburg, Mai 2007

Referent: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker

Koreferent: Prof. Dr. Klaus Brehm

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2007

Die Promovendin ist Zahnärztin

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Die physiologische humane Darmflora..... | 1 |
| 1.2. Funktionen der Darmflora..... | 2 |
| 1.3. Infektionen mit enteropathogenen Erregern..... | 3 |
| 1.3.1. Inzidenz..... | 3 |
| 1.3.2. <i>Escherichia coli</i> | 5 |
| 1.3.3. <i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium..... | 9 |
| 1.3.4. <i>Shigella flexneri</i> | 10 |
| 1.4. Stadien einer Infektion..... | 11 |
| 1.5. Unspezifische Abwehrmechanismen..... | 13 |
| 1.6. Therapeutische Maßnahmen zur Verhinderung einer Infektion..... | 14 |
| 1.6.1. Functional Food - Pro- und präbiotische Substanzen..... | 14 |
| 1.6.2. Prävention/Therapie mittels antiadhäsiver Strategien..... | 16 |
| 1.6.3. Vakzine allgemein..... | 16 |
| 1.6.4. Bakterielle Adhäsine als Grundlage für Vakzine..... | 17 |
| 1.7. Zielsetzung dieser Arbeit..... | 18 |
| | |
| 2. Material und Methoden | 19 |
| 2.1. Geräte und Chemikalien..... | 19 |
| 2.1.1. Geräte..... | 19 |
| 2.1.2. Puffer, Waschlösungen und Fixierungsmittel..... | 20 |
| 2.1.3. Nährmedien..... | 20 |
| 2.1.4. Färbelösungen und Eindeckelmaterialien..... | 21 |
| 2.2. Herstellung der Kryoschnitte..... | 21 |
| 2.2.1. Vorbereitung der Gewebeproben..... | 21 |
| 2.2.2. Schneiden der Gewebeproben..... | 22 |
| 2.2.3. Aufbewahrung der Kryoschnitte..... | 22 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3. Herstellung von Suspensionen der Testsubstanzen..... | 23 |
| 2.4. Bakterienstämme..... | 23 |
| 2.5. Anzucht der Bakterien..... | 24 |
| 2.5.1. Glycerin – Stammkulturen..... | 24 |
| 2.5.2. Kulturen für die Adhärenz – Assays..... | 24 |
| 2.5.3. Kultivierungsbedingungen der einzelnen Stämme..... | 25 |
| 2.5.4. Bestimmung der optischen Dichte..... | 26 |
| 2.6. Durchführung der Adhärenz-Assays..... | 27 |
| 2.7. Fixierung und Färbung der Schnitte..... | 28 |
| 2.8. Auswertung..... | 29 |
| 3. Ergebnisse..... | 30 |
| 3.1. Der <i>Escherichia coli</i> Stamm EAEC 5477/94..... | 30 |
| 3.2. Der <i>Escherichia coli</i> Stamm EHEC 5714..... | 33 |
| 3.3. Der <i>Escherichia coli</i> Stamm EPEC E2348/9..... | 36 |
| 3.4. Der <i>Escherichia coli</i> Stamm ETEC H10407..... | 39 |
| 3.5. Der <i>Salmonella enterica</i> Serotyp Typhimurium Stamm SL1344..... | 44 |
| 3.6. Der <i>Shigella flexneri</i> Stamm M90T..... | 47 |
| 3.7. Der <i>Citrobacter freundii</i> Stamm 3009..... | 50 |
| 3.8. Zusammenfassung der Ergebnisse..... | 52 |
| 4. Diskussion..... | 54 |
| 4.1. Auswirkungen der Biopsie – Eigenschaften..... | 54 |
| 4.2. Auswirkungen der Färbung – Technik..... | 56 |
| 4.3. Die Analyseparameter..... | 56 |
| 5. Zusammenfassung..... | 60 |
| 6. Literaturverzeichnis..... | 62 |
| 7. Anhang..... | 74 |

| | |
|--|-----|
| 7.1. Rohdaten und Säulendiagramme..... | 74 |
| 7.1.1. Der <i>Escherichia coli</i> Stamm EAEC 5477/94..... | 74 |
| 7.1.2. Der <i>Escherichia coli</i> Stamm EHEC 5714..... | 79 |
| 7.1.3. Der <i>Escherichia coli</i> Stamm EPEC E2348/9..... | 83 |
| 7.1.4. Der <i>Escherichia coli</i> Stamm ETEC H10407..... | 87 |
| 7.1.5. Der <i>Salmonella enterica</i> Serotyp Typhimurium Stamm SL1344..... | 92 |
| 7.1.6. Der <i>Shigella flexneri</i> Stamm M90T..... | 97 |
| 7.1.7. Der <i>Citrobacter freundii</i> Stamm 3009..... | 101 |

1. Einleitung

1.1. Die physiologische humane Darmflora

Die humane Darmflora stellt unter physiologischen Bedingungen, ebenso wie in der Mundhöhle, im Magen und auf der Haut, ein stabiles mikrobielles Gleichgewicht dar [56, 18].

30 – 50% des fäkalen Trockengewichts sind bakteriellen Ursprungs, wobei die Hauptmasse der Mikroflora im Kolon angesiedelt ist [56, 24]. Hier können mehr als 500 verschiedene Bakterienarten gefunden werden. Die vorherrschenden Stämme sind jedoch obligat anaerob [27].

Tab. 1.1: häufige Bakterienspezies im jeweiligen Darmabschnitt beim Gesunden (zusammengestellt nach [18], [54], [78])

| Abschnitt | Bakteriendichte pro g Darminhalt | Bakterienspezies |
|-----------|----------------------------------|---|
| Magen | $0-10^5$ | transiente Mundhöhlenflora exogene Mikroorganismen |
| Duodenum | 10^3 | wie Magen, retrograde Besiedlung aus unteren Darmabschnitten möglich |
| Jejunum | 10^5 | Laktobazillen, Streptokokken, und weitere Anaerobier |
| Ileum | 10^8-10^9 | Enterobacteriaceae, <i>Bacteroides</i> <i>spp.</i> , Prevotella, Porphyromonas, Enterokokken, Fusobakterien, Bifidobakterien |
| Dickdarm | 10^{12} | Bacteroides, Bifidobakterien, Eubakterien, Clostridien, anaerobe Kokken, Fusobakterien, Laktobazillen, Enterobakterien, Enterokokken <i>transient: Pseudomonas spp.</i> , Hefen, <i>Bacillus spp.</i> , Protozoen |

Die Zusammensetzung der Darmflora entwickelt sich in den ersten beiden Lebensjahren und beginnt mit dem Kontakt des zunächst sterilen Säuglingsdarms mit der mütterlichen Haut- und Darmflora [19]. Gerade in den ersten Lebensmonaten hat die Art der Säuglingsernährung, Stillen vs. Flaschennahrung, einen erheblichen Einfluss auf die bakterielle Kolonisation des Säuglingsdarms und somit auch auf die Gesundheit des Säuglings. Trotz intensiver Bemühungen der Industrie, Säuglingsnahrung mit bifidogenen Bestandteilen zu versetzen und eine muttermilch-vergleichbare Wirkung zu erzielen, sind gestillte Säuglinge durch den hohen Gehalt an Oligosacchariden und via Muttermilch übertragene Bifidusbakterien besser gegen Darminfektionen geschützt, als flaschenernährte Säuglinge [19, 34]. Im Laufe des Lebens nehmen Alter, Ernährung und die Einnahme von Medikamenten Einfluss auf das Gleichgewicht dieses Ökosystems [45].

1.2. Funktionen der Darmflora

Die Bakterienflora des Darms erfüllt für den Menschen wichtige Aufgaben. Tabelle 1.2 zeigt einige Beispiele.

Tab. 1.2: Schutzmechanismen der Darmflora (nach [8], [18], [22], [25], [56], [78])

-
- Produktion von Vitamin K, Vitamin B₂, B₆, B₁₂, Riboflavin, Thiamin, Folsäure
 - Verhinderung der Anheftung exogener und pathogener Mikroorganismen
 - Kompetitionen um Substrate, Vitamine und Wachstumsfaktoren
 - Bildung von Bakteriozinen
 - Anregung der Peristaltik
 - Stimulation des darmassoziierten lymphatischen Gewebes GALT
 - Stimulation der Entwicklung des intestinalen Immunsystems
 - Antigenpräsentation an Makrophagen
 - Stimulation der Phagozytose
 - Förderung des Epithelzellstoffwechsels
 - Abbau der Toxine, die von exogenen Bakterien gebildet wurden
-

Wie wichtig dieses bakterielle Gleichgewicht für den Wirt ist, zeigt sich z.B. durch die Gabe oraler Antibiotika. Hierbei kann als Nebenwirkung eine antibiotikainduzierte Diarrhöe auftreten oder es kommt zu einer Überwachsung des Darms mit dem zur physiologischen Darmflora gehörenden *Clostridium difficile*. Diese Überwachsung bedingt für den Patienten das Krankheitsbild einer pseudomembranösen Kolitis, welches mit einem schweren, unter Umständen tödlichen Krankheitsverlauf einhergeht [17, 22].

Ein weiteres Beispiel stellt das „bacterial overgrowth syndrome“ dar, das häufig Typ-II-Diabetes Patienten betrifft [10]. Hierbei kommt es zu einer bakteriellen Überbesiedlung des Dünndarms mit nachfolgender Malabsorption, Vitamin-Mangelscheinungen und Diarrhöe [13, 33, 43].

Liegen Störungen im bakteriellen Gleichgewicht vor, kann es leichter zu einer Besiedlung mit darmpathogenen Bakterien und dadurch zu einer Infektion kommen.

1.3. Infektionen mit enteropathogenen Erregern

1.3.1. Inzidenz

Infektionen mit darmpathogenen Bakterien sind nicht selten. Durch die Einführung der Meldepflicht lassen sich diese Daten gut überblicken. Das Robert – Koch – Institut meldete für das Jahr 2004 in der Bundesrepublik für Salmonellosen 52.431-, für EHEC (außer HUS) 836-, für sonstige darmpathogene *E. coli* 4.934- und für Shigellosen 954-Neuerkrankungen [21].

Im Jahr 2001 waren es für EHEC (außer HUS) 1018, für sonstige darmpathogene *E. coli* 5092, für Salmonellosen 77386 und für Shigellosen 1624 Neuerkrankungen [49].

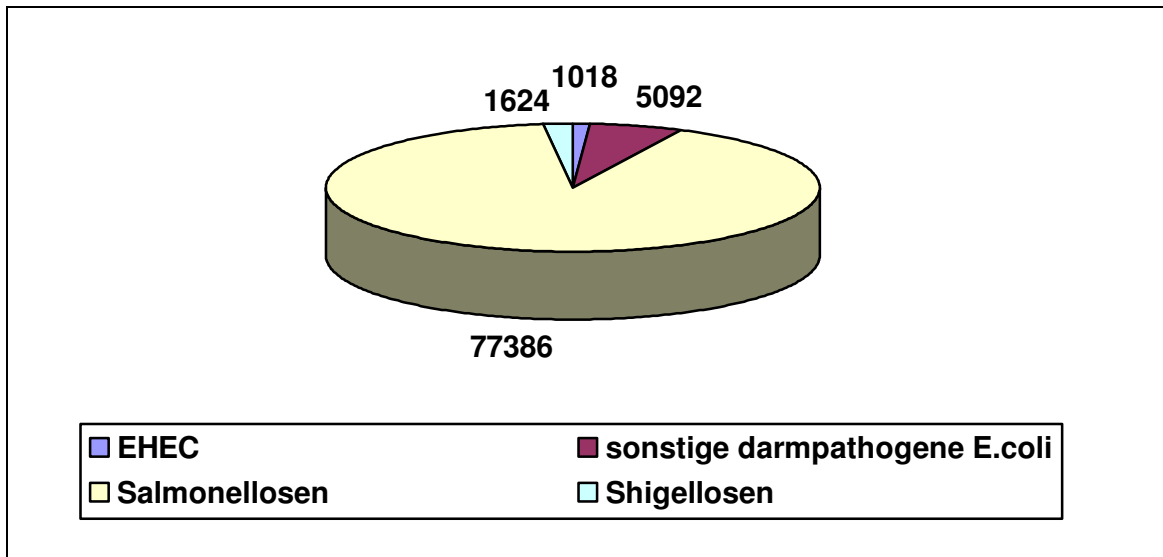


Abb. 1.1: gemeldete Neuerkrankungen durch darm-pathogene Erreger in der BRD 2001

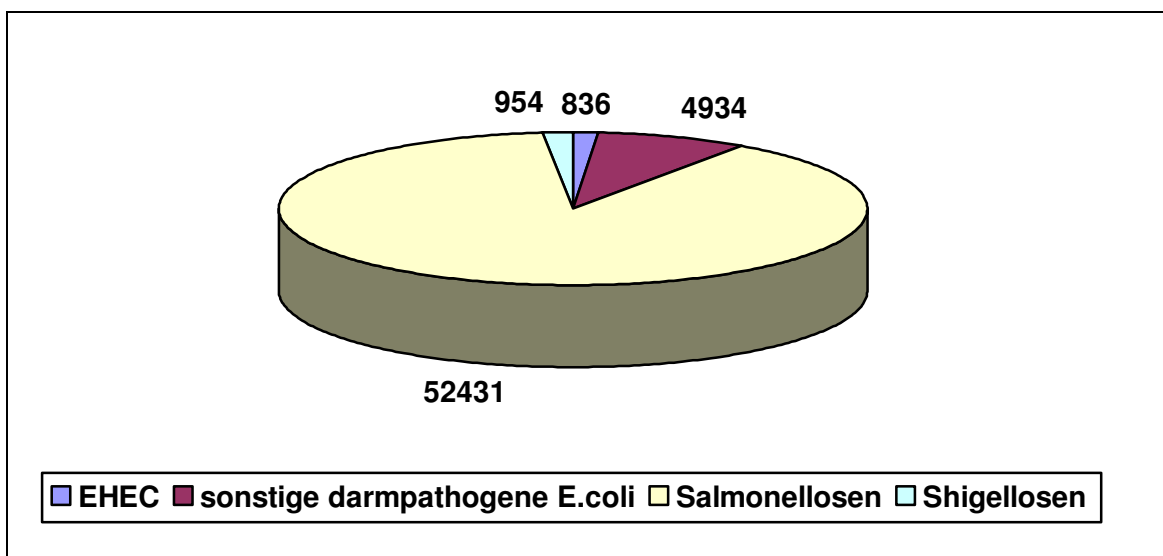


Abb. 1.2: gemeldete Neuerkrankungen durch darm-pathogene Erreger in der BRD 2004

Im Vergleich zum Jahr 2001 zeigt sich zwar ein deutlicher Rückgang der Neuerkrankungen, wobei die aber dennoch hohen Zahlen dafür sprechen, dass ein Bedarf an infektionsverhütenden bzw. infektionsverlaufs-limitierenden Maßnahmen besteht. Im Jahr 2004 gab es im Zusammenhang mit EHEC-Infektionen einen gemeldeten Todesfall, für HUS-Erkrankungen fünf, für Salmonellosen sogar 52 gemeldete Todesfälle [64].

Tab. 1.3: Infektionserreger des Gastrointestinaltraktes und ihre hauptsächlichen Wirkorte (modifiziert nach [17])

| Wirkorte | Infektionserreger |
|---------------------|---|
| Magen Ösophagus | <i>Helicobacter pylori</i> |
| Duodenum Jejunum | <i>E.coli</i> (ETEC, EPEC), <i>Giardia lamblia</i> , Rotaviren, <i>Vibrio cholerae</i> |
| Ileum | <i>Campylobacter</i> , <i>Salmonella</i> , Yersinien |
| Colon | <i>Clostridium difficile</i> , <i>E. coli</i> (EIEC, EHEC), <i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Shigella</i> |

Im Folgenden soll auf die pathogenen Eigenschaften der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stämme etwas näher eingegangen werden.

1.3.2. Escherichia coli

Escherichia coli gehören zu den physiologischen Besiedlern des Darms. Diese Spezies beinhaltet jedoch eine ganze Reihe von intestinalen und extraintestinalen Pathotypen [14]. Dank des schnellen Fortschritts molekularbiologischer und genetischer Forschung konnten in den letzten Jahren die Virulenzmerkmale der Bakterien entschlüsselt und so die Pathotypen charakterisiert werden [2].

Obligat pathogene Stämme der Spezies *E. coli*:

- **EAEC** (entero-aggregative *E. coli*): diese Gruppe hat die Tendenz, nicht gleichmäßig auf der Epithelschicht zu adhären, sondern sie kolonisiert das Wirtsgewebe in verklumpten „Aggregaten“ [14]. Die Fimbrientypen, die für die Adhärenz exprimiert werden (siehe Abb.1.3), sind unter anderem die AAFI und AAFII („aggregative Adhärenz vermittelnden Fimbrien I und II“) [88].

EAECs können das hitzestabile Enterotoxin EASTI und das Plasmid-kodierte Toxin Pet bilden [17]. Dieses induziert eine massive Schleimsekretion mit Elektrolytverlust und letztendlich Tod der Wirtszelle [88].

- **EHEC** (entero-hämorrhagische *E. coli*): Bisher wurden über 160 verschiedene Serovare dieser Gruppe beim Menschen nachgewiesen [88]. Für die enge Adhärenz dieses Erregers an die Zielzelle wird das Adhärenzprotein Intimin gebildet, das von der LEE-Pathogenitätsinsel, wie bei EPEC, codiert wird [17]. In einem frühen Schritt der Infektion kommt es zur Translokation von Effektorproteinen in Wirtszellen mittels des Typ-III-Proteinsekretionssystems wie für EPEC beschrieben (siehe Abb. 1.4). Zusätzlich produzieren sie das so genannte SLX („Shiga-like Toxin“), das nahezu identisch mit dem Shiga-Toxin ist [14]. Ein zweites gebildetes Toxin, das STX2, hat eine etwa 55-57%ige Aminosäurehomologie zum Shiga-Toxin [88]. Somit kommt es nach der Adhärenz des Erregers zur Ausschleusung von phagencodierten Shiga-Toxinen und einem plasmidcodierten Enterotoxin, die zur Hemmung der Proteinsynthese der Zielzelle und, nach Kontakt mit Erythrozyten, zu Porenbildung und Hämolyse führen [17], [88]. Somit ergibt sich das klinische Bild der entero-hämorrhagischen Colitis. Die STX-Toxine können auch über den Blutweg in andere Organe, wie z.B. die Niere, transportiert werden und dort zum „hämolytisch-urämischen Syndrom“ (HUS) führen [17]. EHEC sind außerdem durch eine ausgeprägte Säuretoleranz gekennzeichnet, d.h. sie überleben über etwa fünf Stunden einen pH von 2,5 [88].

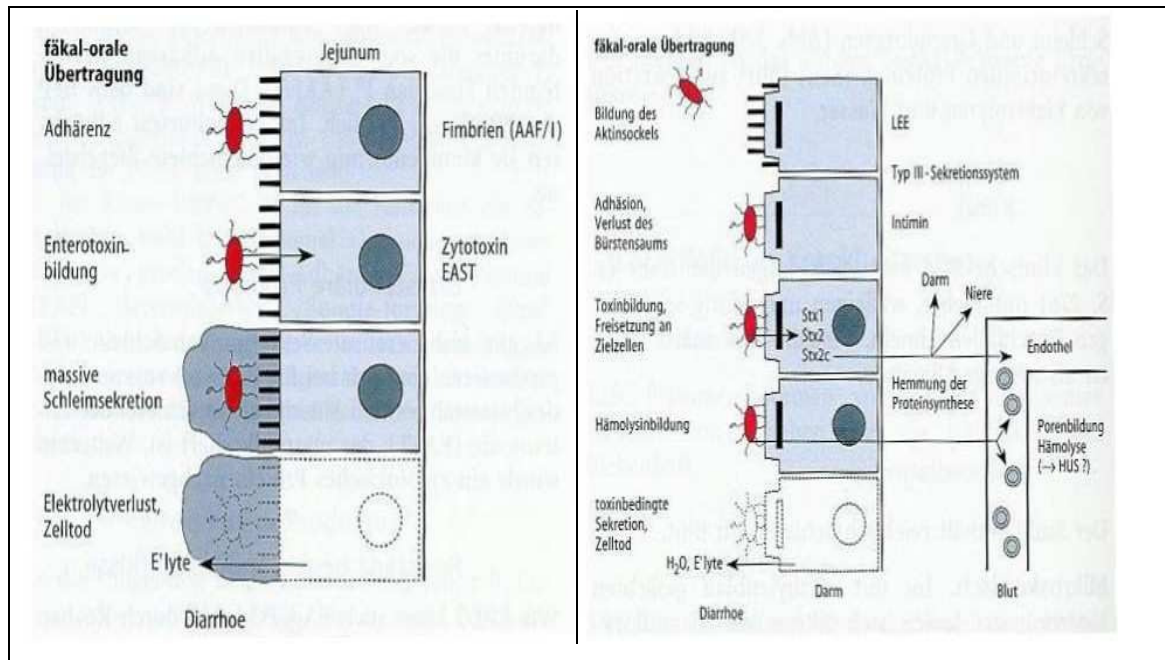


Abb. 1.3: Infektionsweg EAEC
(aus [88])

Abb. 1.4: Infektionsweg EHEC
(aus [88])

- **EPEC** (entero-pathogene *E. coli*): Der Infektionsweg dieser Bakterien läuft in drei Schritten ab:

Im ersten Schritt kommt es zu einer lockeren Bindung an die Epithelzellen durch bündelbildende Fimbrien (BFP). Diese werden mithilfe des Adhärenzplasmids EAF, exprimiert. Die Hauptuntereinheit dieser Fimbrien, das BFPA („Bundle-forming Pilus“ Protein A), ist weitgehend in der Primärstruktur homolog zu den Typ-IV-Fimbrien [14], [88]. Nach der Bindung an die Epithelzellen kommt es im nächsten Schritt zu einer Sekretion von (Effektor-)Proteinen in die Wirtszelle mittels des Typ-III-Protein-Sekretionssystem und einer Kaskade von Tyrosin-Phosphorylierungen von mindestens drei (Wirts-)Proteinen. Eines dieser Proteine, ursprünglich als Wirtsprotein Hp-90 identifiziert, stellt einen Rezeptor für das Nichtfimbrien-Adhäsion Intimin von EPEC dar [14]. Tatsächlich ist der Rezeptor für Intimin jedoch Tir (translocated intimin receptor), ein via dem Typ-III- Proteinsekretionssystem des LEE (locus of enterocyte effacement) transloziertes bakterielles Protein. Im dritten Schritt vollzieht sich eine sehr engen Bindung der Bakterien an

die Epithelzellen über das Nichtfimbrien-Adhäsin Intimin, was zu einer Umstrukturierung der Aktinfilamente des Zytoskeletts, zur Zerstörung der Mikrovilli der Wirtszelle und einer Sockelbildung führt, wobei das adhärierende Bakterium auf dem Sockel lokalisiert ist („attaching and effacing“) [17]. Allerdings kann das Adhäsin Intimin offenbar auch an Wirtsrezeptoren wie β 1-Integrine binden [90]. Diese Kaskade führt zur Änderung des Ionentransports, Chloridsekretion, Elektrolytverlust und schließlich Tod der Wirtszelle.

Bislang wurde nur ein Toxin, das Lymphostatin, in EPEC nachgewiesen [90].

- **ETEC** (entero-toxigene *E. coli*): diese Serogruppe adhärert am humanen Dünndarm und dem verschiedener Tiere [17]. Für die Adhärenz exprimierte Fimbrien, die sogenannten CFAs (Colonisation Factor Antigen), sind vom (Mannose-resistenten) MR-Typ [88] und werden aufgrund ihrer Morphologie in vier verschiedene Unterklassen eingeteilt (CFA I – IV). Es wurde jedoch in Studien belegt, dass etwa 75% der humanpathogenen ETECs CFA I, CFA II oder CFA IV exprimieren [91]. Nach oraler Aufnahme durchdringen ETEC die Schleimschicht, heften sich an epitheliale Rezeptoren des proximalen Dünndarms und bilden hier eines oder zwei unterschiedliche Exotoxine. Zum einen das hitzelabile LT, und zum anderen das hitzestabile ST. Das LT lässt sich wiederum in LT-I und LT-II einteilen, wobei LT-I, bedeutend für die humanen Erkrankungen, in Struktur und Funktion dem Cholera toxin ähnelt und mit denselben Zellrezeptoren, den GM1, interagiert. Das hitzestabile ST lässt sich ebenfalls in zwei Gruppen einteilen. Zum einen in die Methanol-lösliche ST-I und zum anderen in die Methanol-unlösliche ST-II, wobei auch hier wieder für die Pathogenese beim Menschen nur ST-I in Frage kommt [14].

Beide Toxine besitzen eine hormonähnliche Wirkung. LT bewirkt die Aktivierung der Adenylatcyclase mit der Folge von Flüssigkeits- und Elektrolytverlust der Wirtszelle, ST hingegen bewirkt die Aktivierung der

Guanylatcyclase, gleichfalls mit nachfolgendem Flüssigkeits- und Elektrolytverlust der Wirtszelle [88].

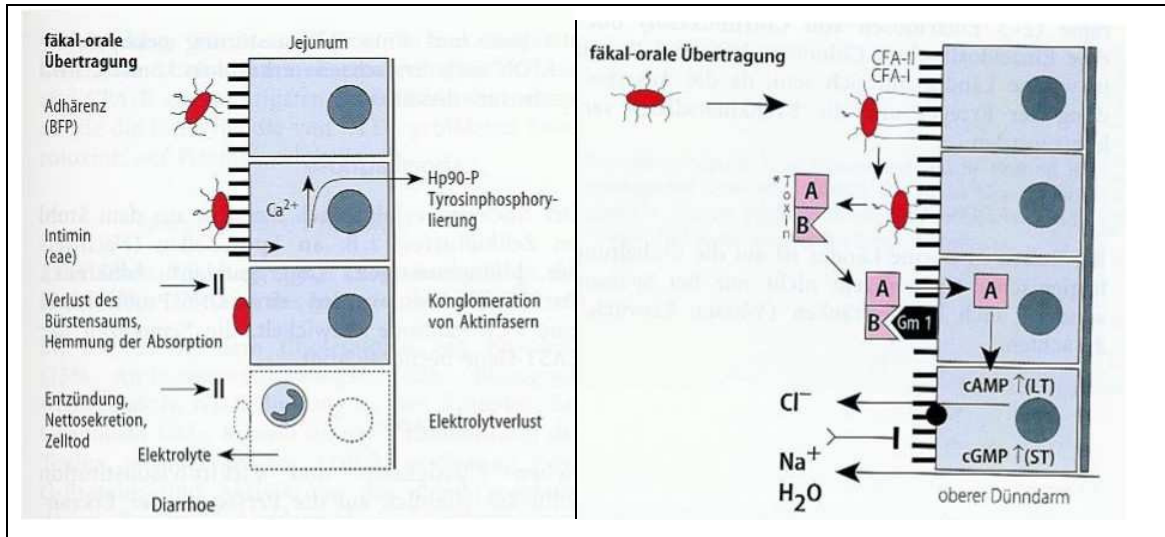


Abb. 1.5: Infektionsweg EPEC
(aus [88])

Abb. 1.6: Infektionsweg ETEC
(aus [88])

1.3.3. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium

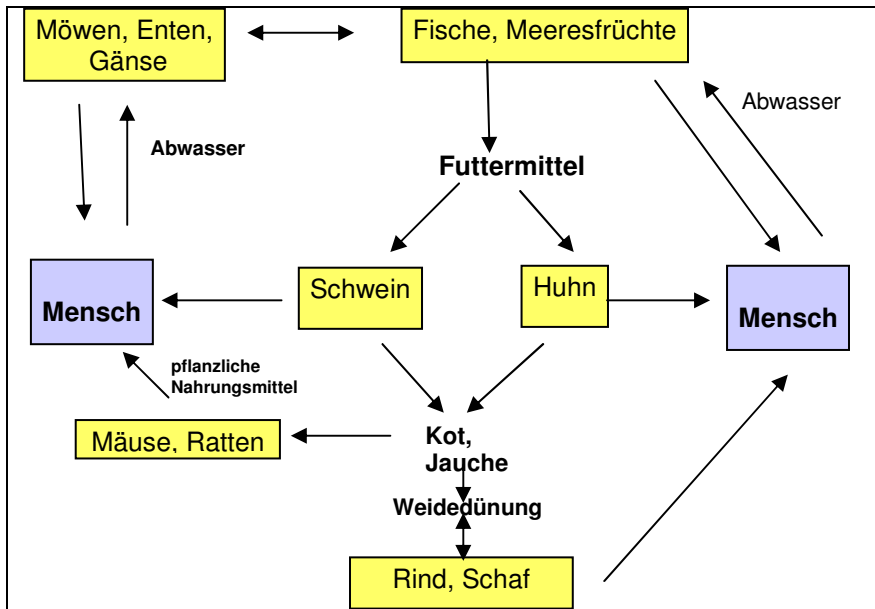


Abbildung 1.7: Infektionszyklus der nicht typhösen Salmonellen (modifiziert nach [39])

Enteritis-Salmonellen kommen ubiquitär vor, der Mensch stellt jedoch in der Infektionskette zumeist das Endglied dar [39] (vergleiche Abbildung 1.7).

Die Erreger adhäreren bevorzugt an die Peyer`schen Plaques des Dünndarms und besitzen die Fähigkeit, in nicht-phagozytotische Wirtszellen und Makrophagen zu invadieren [17]. Als Adhärenzfaktoren sind zur Zeit drei verschiedene Fimbrientypen bekannt: Fim, Pef und Lpf. Diese Fimbrien haben während des Infektionsvorgangs aber noch weitere Aufgaben, z.B. die Initialisierung der Invasion in die Epithelzellen und die Initialisierung des Entzündungsprozesses des Wirtsgewebes [92].

Die für die Ausbildung der Fimbrien benötigten Gene liegen unter anderem auf der so genannten SPI1-Pathogenitätsinsel die auch für ein Typ-III-Proteinsekretionssystem codiert, das die Invasion der Salmonellen in einer Vakuole ermöglicht [17]. Sie werden durch die Wirtszelle hindurchgeschleust und von Makrophagen mithilfe einer von PagC stimulierten Bildung eines Antigenrezeptors aufgenommen. Im Innern der Makrophagen vermehren sie sich in einer Vakuole, die durch eine Membran geschützt ist [88]. Hierfür ist ein zweites, auf der so genannten SPI2-Pathogenitätsinsel codiertes Typ-III-Proteinsekretionssystem notwendig [17]. So können Salmonellen Makrophagen als Vehikel für eine systemische Ausbreitung nutzen [88]. Es kommt zu einer meist selbstlimitierend verlaufenden Lokalinfection des Darms mit Flüssigkeits- und Elektrolytverlust, in etwa 5% der Fälle, vor allem bei immungeschwächten Patienten, zur systemischen Erkrankung bis hin zur Sepsis und zum Tod [53].

1.3.4. *Shigella flexneri*

Shigellen sind als Erreger der bakteriellen Ruhr weltweit verbreitet und treten vor allem in Gemeinschaftseinrichtungen, wie Kindergärten, Kasernen und Heimen unter schlechten hygienischen Bedingungen durch direkte Übertragung auf. In der 3. Welt sind sie besonders verbreitet durch die fäkale Kontamination von Lebensmitteln und Trinkwasser [88]. Sie besitzen eine hohe Säureresistenz

und überleben so unbeschadet die Magenpassage. Dadurch liegt die Infektionsdosis bei < 100 Shigellen [17].

Um am Zielgewebe zu adhären, bilden sie Mannose-sensitive Typ-I Fimbrien aus [93], [94]. Die mittels „ruffling“ erfolgende Internalisierung der Shigellen in die Enterozyten wird durch die Translokation von Effektoren (Ipa A, B, C, D) mittels eines TTSS (Type Three Secretion System) induziert. Im Cytoplasma der Zielzelle, nach Phagosomenlyse, vermehren sich die Erreger und bilden einen Aktinschweif, der es ihnen ermöglicht, in die Nachbarzellen überzutreten („spreading“) [17]. Der bekannteste Virulenzfaktor ist das Exotoxin Shiga-Toxin, welches, wie im Falle der entero-hämorrhagischen *E. coli*, das hämolytisch-urämische Syndrom hervorrufen kann [49].

Eine zeitweilige Immunität gegen Shigellen derselben Serogruppe entwickelt sich durch Produktion von Antikörpern der Klasse IgA auf der Darmschleimhaut. Orale Lebendvakzine sind in der Entwicklungsphase [88].

1.4. Stadien einer Infektion

Die hauptsächlichlichen Eintrittspforten für pathogene Mikroorganismen stellen die Schleimhäute des Respirationstrakts, des Magen-Darm- und Urogenitaltrakts, die Bindehaut des Auges und Mikroverletzungen der Haut dar [58]. Dabei besitzen die meisten Erreger einen so genannten Tropismus. Das bedeutet die Fähigkeit zur Adhärenz an bestimmte Gewebe [53].

Ob es nach Besiedelung mit Mikroorganismen zum tatsächlichen Ausbruch einer Krankheit kommt, hängt von der Dosis, der Virulenz des Mikroorganismus und den Abwehreigenschaften des Makroorganismus ab. Viele Infektionen laufen völlig ohne klinische Symptomatik ab, d.h. sie bleiben inapparent. Es kommt hierbei zu einer Stimulation des Immunsystems des Wirtes und nachfolgend zum Schutz vor einer erneuten Infektion mit demselben Erreger [58]. Dieses Prinzip macht man sich auch bei Schutzimpfungen zunutze [72].

Einer der ersten Schritte einer Infektion ist die Adhärenz des Erregers an die Zielzelle. Die Fähigkeit zur Adhäsion stellt einen entscheidenden Mechanismus dar, da Bakterien so befähigt werden, der mechanischen Abwehr des Wirts zu widerstehen [53]. Dies geschieht über bakteriell exprimierte Adhäsine. Es sind sowohl Fimbrienadhäsine (Pili, Fimbrien) als auch Nichtfimbrienadhäsine (z.B. Intimin) bei Bakterien bekannt. Meist binden Fimbrien (Pili) an Glykoproteine oder Glykolipide der Wirtszelloberfläche. Wird diese Adhäsion verhindert, kommt keine Infektion zustande [48].

Tabelle 1.4: Beispiele für bakterielle Adhäsine und ihre homologen Rezeptoren (zusammengestellt nach [35], [30], [58], [42])

| Spezies | Adhäsion | Rezeptor |
|---|--------------------|---|
| <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Salmonella</i> <i>spp.</i> | Typ1 Fimbrien | Mannosereste, Laminin, Fibronectin, Plasminogen |
| <i>E. coli</i> | P Fimbrien | Gal α (1-4) β Gal |
| EPEC | Intimin (EaeA) | Tir (Hp90) |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | Pilus | 48 kDa Protein |
| <i>S. gordonii</i> | Antigen Komplex | 73 kDa Protein des submandibulären Speichels |

Der zweite Schritt ist oft die Invasion des Erregers. A-Streptokokken produzieren z.B. eine Hyaluronidase, die zur Auflockerung des Bindegewebes und somit zu Spalten im Bindegewebe führt, die sich die Bakterien zur Invasion zunutze machen [48]. Andere Bakterien, wie z.B. *Porphyromonas gingivalis*, können direkt ihre Adhäsine als Invasine nutzen [35].

Im nächsten Schritt kommt es zur Etablierung. Diese Faktoren, z.B. die oben beschriebene „Überlebensstrategie“ der Salmonellen durch Überleben innerhalb von Endosomen in den Makrophagen, greifen hauptsächlich an der Wirtsabwehr an und bewirken eine Schwächung des Immunsystems des Wirts oder eine „Tarnung“ des Erregers, so dass er nicht mehr vom Immunsystem als fremd erkannt werden kann [48].

Als letztes kommt es zu einer Schädigung des Wirts z.B. über Toxine. Dies sind entweder Endotoxine (Bestandteile der Zellhüllen gramnegativer Bakterien, z.B.

LPS, die bei Zellteilung oder Tod freigesetzt werden und eine Entzündungsreaktion in Gang setzen, die ihrerseits den Wirt schädigt, z.B. Knochenabbau und Gingivarezeption bei Parodontitiden) [11], Exotoxine (bakterielle Sekretionsprodukte, Polypeptide) oder direkt durch intrazelluläre Vermehrung, die zur Lyse der Wirtszelle führt, z.B. bei der durch Shigellen verursachten Ruhr. Die Fähigkeit eines Erregers, ebensolche Toxine zu bilden, ist mitentscheidend für dessen Pathogenität [48].

1.5. Unspezifische Abwehrmechanismen

Den Virulenz- bzw. Pathogenitätsfaktoren der Mikroorganismen steht eine ganze Reihe an wirksamen Abwehrmechanismen des Wirts gegenüber. Die Kontrolle der Adhärenz beginnt zunächst an den Eintrittspforten des Erregers, also Haut und Schleimhäute.

Die Haut bietet durch ihren Säureschutzmantel (pH-Wert 4-6), relative Trockenheit, Abschilferung von Keratozyten und Sezernierung von Lysozym und toxischen Lipiden in Haarfollikeln und Schweißdrüsen ein äußerst ungünstiges Milieu für pathogene Erreger [25]. Als zweite Stufe befindet sich unter der Haut das so genannte SALT (skin-associated lymphoid tissue) [81].

Auf den Schleimhäuten (z.B. Bronchialtrakt, Geschlechtsorgane, Mundhöhle) bietet die Schleimschicht zusammen mit IgA, Lysozym, Laktoferrin und Laktoperoxidasen einen guten Schutz [53]. Unterstützend hierbei wirkt das so genannte mucosa-associated lymphoid tissue = MALT [25].

Am Auge verhindert die Lysozym-haltige Tränenflüssigkeit und die Bewegung des oberen Lides eine Besiedlung.

Im oberen Respirationstrakt findet eine mechanische Abwehr durch den eine Barriere bildenden Mucus und den Flimmerschlag der Zilien statt. Weiterhin kommen die Bronchialflüssigkeit mit ihren enthaltenen antimikrobiellen Stoffen und die Alveolarmakrophagen zur Abwehr dazu [4].

Im Magen stellt, vergleichbar mit der Haut, der pH-Wert von 1-3 einen wirksamen Schutz dar, der durch die Magenschleimhaut ergänzt wird [25].

Das Abwehrsystem des Darms umfasst, ähnlich wie im Respirationstrakt, eine mechanische Barriere durch die Peristaltik, die Schleimschicht, die dem Darmepithel vorgeschaltet ist, und das GALT (gut-associated lymphoid tissue) [23].

Kommt es zu einer Besiedelung mit Erregern beginnt die Kaskade der zellulären und humoralen Immunantwort des Wirts [4].

Auf diese soll aber in der vorliegenden Arbeit nicht näher eingegangen werden.

1.6. Therapeutische Maßnahmen zur Verhinderung einer Infektion

1.6.1. Functional Food - Pro- und präbiotische Substanzen

„Functional Food“ sind Lebensmittel, die über ihren Ernährungswert hinaus einen positiven Einfluss auf die Gesundheit und das körperliche und geistige Wohlbefinden des Konsumenten ausüben und Krankheiten vorbeugen [26].

Diese Produkte haben auf dem Nahrungsmittelsektor in den letzten Jahren einen wahren Boom erfahren. Der Gesamtmarkt wird auf 0,2% geschätzt [26].

Als Probiotika werden Mikroorganismen bezeichnet, die lebend appliziert eine positive Wirkung auf den Gesundheitszustand des Wirtes ausüben, indem sie präventive und therapeutische Effekte aufweisen. Probiotika werden sowohl als Medikamente als auch als Lebensmittelzusätze eingesetzt. Die größte Gruppe der Probiotika gehört zu den Lactobazillen und Bifidobakterien. Es sind aber auch probiotische *E. coli* Stämme und ein probiotischer Stamm der Spezies *Saccharomyces cerevisiae* (*Saccharomyces boulardii*) als Probiotika in der Humanmedizin im Einsatz [22].

In einer Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie an 5-24 Monate alten Kindern zeigte sich unter Gabe von *B. bifidum* und *S. thermophilus* eine deutliche

Reduktion der Inzidenz an akuter Diarrhöe oder am Rotavirus zu erkranken [65].

Weitere positive Effekte von probiotischen Nahrungszusätzen:

- Stimulation der Immunabwehr durch Steigerung der Granulozytenaktivität [71]
- Verminderung der Adhäsion und Invasion pathogener Bakterien wie *E. coli*, *S. typhimurium* und *Y. pseudotuberculosis* [79]
- Hemmung der Adhäsion von Gastroenteritis-Erregern der Gattungen *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* und *Listeria* durch Stoffwechselprodukte der Bifidobakterien, wie Acetat und Laktat, und die Sekretion anti-mikrobieller Substanzen [66].

Präbiotika sind unverdauliche natürliche oder synthetisch hergestellte Kohlehydrate (Disaccharide, wie Laktulose, und Oligosaccharide, wie Inulin, Fruktooligosaccharide, Isomaltoligosaccharide und andere) [69]. Sie werden von den kommensalen Darmbakterien verstoffwechselt und stimulieren deren Proliferation [26].

Folgende Kriterien für den Einsatz als Präbiotikum müssen erfüllt werden [68]:

- keine Absorption im oberen Gastrointestinaltrakt
- selektive Verdauung durch die kommensale Darmflora
- Änderung der mikrobiellen Zusammensetzung des Darms zugunsten der physiologischen Flora
- Induktion gesundheitsfördernder Effekte für den Wirt

In experimentellen Studien konnte die bifidogene Wirkung von Inulin und Oligofruktose durch eine Stimulierung des Immunsystems und eine Abnahme pathogener Bakterien im Darm nachgewiesen werden [62].

1.6.2. Prävention/Therapie mittels antiadhäsiver Strategien

Da die Adhäsion an Wirtszellen, vermittelt durch bakterielle Oberflächenproteine, die an eukaryotische Karbohydrate binden, einer der ersten Schritte in der Etablierung einer bakteriellen Infektion darstellt, gibt es zwei mögliche Strategien, diese Adhäsion zu blockieren.

Zum einen durch Analoga zu den bakteriellen Adhäsinen oder zum anderen durch die entsprechenden Karbohydrate.

Die erste Möglichkeit birgt den entscheidenden Nachteil, dass durch Bindung von Adhäsinaloga an den entsprechenden Rezeptoren Signalwege induziert werden könnten, die sich für den Wirt nachteilig auswirken. Deshalb wurden in den bisherigen Ansätzen zur antiadhäsiven Prävention oder Therapie einer bakteriellen Infektion Karbohydrate eingesetzt, die an die bakteriellen Adhäsine binden und diese dadurch blockieren können. Durch diese Blockade sollte dann die bakterielle Adhäsion verhindert werden.

Diese Strategien werden vom angeborenen Immunsystem durch Oligosaccharide in der Muttermilch als antiadhäsive Substanzen gegen die Adhäsion von *H. influenzae* und *S. pneumoniae* schon verwirklicht [95]. Ebenso wurde im Urin das Tamm-Horsefall-Protein nachgewiesen, das in der distalen Henle-Schleife der Niere gebildet wird und die Adhäsion uropathogener Bakterien inhibiert [96].

1.6.3. Vakzine allgemein

Durch den Einsatz von Impfstoffen, der bereits im 18.Jhdt. von Edward Jenner mit Kuhpockenlymphe durchgeführt wurde [17], haben einige schwere Infektionskrankheiten und große Seuchen ihren Schrecken verloren. Sie führten zu einer Verbesserung der Lebensqualität und Senkung der Morbidität und Mortalität.

Bereits ab dem Säuglingsalter werden durch die Ständige Impfkommission STIKO genaue Impfeempfehlungen gegeben, um einen Schutz vor diesen

Infektionskrankheiten, sowohl für den Einzelnen, als auch die Allgemeinheit, zu erhalten. Impfpflicht besteht in der Bundesrepublik jedoch nicht [63].

Grundsätzlich unterschieden wird zwischen passiver und aktiver Immunisierung.

Bei der passiven Immunisierung findet eine Applikation von Immunglobulinfraktionen, Immuseren oder Vollblutprodukten statt. Der entscheidende Vorteil der passiven Immunisierung liegt darin, dass bereits vorgebildete Antikörper sofort verfügbar sind, das bedeutet einen Impfschutz bereits ab der ersten Gabe [53], [72].

Bei der aktiven Immunisierung kommen Totimpfstoffe oder Lebendimpfstoffe zum Einsatz [72]. Zumeist werden den Totimpfstoffen ein oder mehrere Adjuvantien (z.B. Aluminiumhydroxid, Enterotoxin LT, IL-12 u.a.) hinzugefügt zur Verstärkung der immunogenen Wirkung oder Verlängerung der Depotwirkung [17]. Die Lebendimpfstoffe bestehen aus applikationsfähigen, abgeschwächten, noch vermehrungsfähigen Erregern. Diese können viraler oder bakterieller Herkunft sein [72]. Das Prinzip der aktiven Schutzimpfung besteht in einer Stimulation der humoralen Immunantwort und somit Bildung von Antikörpern [53].

1.6.4. Bakterielle Adhäsine als Grundlage für Vakzine

Für bakterielle Enteritiserreger gibt es bis heute wegen der hohen Anzahl an Serovaren noch keine geeigneten „alltagstauglichen“ Impfstoffe [14].

Einzig eine Eindämmung der Symptome und Verkürzung der Krankheitsdauer durch die Gabe geeigneter Antibiotika ist derzeit möglich. Hierbei sollte aber der immer weitreichenderen Ausbildung von Antibiotikaresistenzen, wie z.B. bei Oxacillin-resistenten *Staphylokokkus aureus*, Sorge getragen werden [85], [55].

Da Bakterien gegen die Abwehrmechanismen des Wirts widerstandsfähiger sind, wenn sie bereits an ihrem entsprechenden „Zielgewebe“ adhärirt haben, ist die so genannte „Anti – Adhäsions – Therapie“ als Verhinderung einer Infektion in das Augenmerk der Forschung gerückt [34].

Neuere Ansätze zeigen die Möglichkeit, bakterielle Adhäsine als Impfstoffe zu nutzen. Hierbei werden spezielle anti-Adhäsine-Antikörper gebildet, die entweder in einem anderen Wirt produziert wurden und im Sinne einer passiven Immunisierung eingesetzt werden, oder die Adhäsine werden im Sinne einer aktiven Impfung per se genutzt, um so die sIgA- und IgG- Produktion zu stimulieren [74, 76].

Es existieren bereits geeignete Tiermodelle für den Erfolg des sIgA- und IgG-vermittelten Schutzes vor einer Infektion [75].

Ebenso für den Einsatz als passiver Impfstoff konnten bereits positive Resultate sowohl im Tierversuch [74], als auch in einer Studie an menschlichen Probanden mit *S. mutans* erzielt werden [73].

Hinsichtlich dieser Ergebnisse bleibt abzuwarten, ob, gestützt auf aussagekräftige klinische Studien, in naher Zukunft zumindest für einige bakterielle Enteritiserreger brauchbare Vakzine einsetzbar sind.

1.7. Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, eine Reihe von 17 Kohlehydraten auf deren Fähigkeit zu bewerten, die Adhärenz humanpathogener Enteritis-/Diarrhoe-Erreger zu reduzieren oder gänzlich zu verhindern.

Gestestet wurde die Adhärenz an Kryoschnitten humaner Darmbiopsien.

Hierbei wurde die bakterielle Adhäsion ohne Zusatz der Kohlehydrate bestimmt und als Vergleichswert gegenüber dem Ansatz mit Zusatz der Kohlehydrate herangezogen.

Dabei kamen Stämme folgender Spezies zum Einsatz: entero-aggregative *E. coli*, entero-hämorrhagische *E. coli*, entero-pathogene *E. coli*, entero-toxigene *E. coli*, *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium und *Shigella flexneri*. Als Positiv-Kontrolle wurde *Citrobacter freundii* verwendet.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte und Chemikalien

2.1.1. Geräte

| | |
|------------------|--|
| Analysewaage | Chyo JL-180 |
| Brutschrank | Function Line Heraeus |
| Cleanbench | Nuaire Biological Safety Cabinets Hera Safe Heraeus |
| Deckgläser | Roth Karlsruhe |
| Eismaschine | Scotsman AF-20 |
| Grobwaage | Kern 470 |
| Mikroskop | Zeiss AxioLab |
| Mikrotom | Mikrom HM500 OM |
| Mikrotomklingen | Mikrom 80mm |
| Objekträger | Marienfeld HistoBond |
| Objekträgerboxen | GLW |
| Photometer | Amersham Biosciences Ultrospec 3100 pro |
| Schüttler | Certomat H Innova 4000 New Brunswick Scientific |
| Tischzentrifuge | Biofuge pico Heraeus |
| Vortex | Vortex Genie2 |

2.1.2. Puffer, Waschlösungen und Fixierungsmittel

| | |
|---|--|
| Pappenheimpuffer Stocklösung | 3,63g KH_2PO_4 4,43g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ad 400ml Aqua dest. |
| Pappenheimpuffer Gebrauchs- Lösung pH 7 | 300ml Stocklösung ad 700ml Aqua dest. |
| NaCl 0,9% | 7,2g NaCl ad 400ml Aqua dest. → autoklavieren |
| Methanol | |
| Tissue-Tek O.C.T.Compound Liquid Blocker | Einbettmittel, Sakura Super Pap Pen, Daido Sangyo |

2.1.3. Nährmedien

| | |
|--------------------|--|
| Mc Coy`s 5A Medium | ohne weitere Zusätze |
| Mc Coy`s 5A Medium | + 3,7ml L-Glutamin + 14ml FCS |
| LB-Agar | 2g NaCl 2g Hefe-Extrakt 4g Trypton/Pepton 6g Agar ad 400ml Aqua dest. → autoklavieren |

2.1.4. Färbelösungen und Eindeckelmaterialien

| | |
|----------------------|----------------|
| May- Grünwald Lösung | Fluka |
| Giemsa Lösung | Roth Karlsruhe |
| Roti-Histol | Roth Karlsruhe |
| Roti-Histokitt | Roth Karlsruhe |

2.2. Herstellung der Kryoschnitte

2.2.1. Vorbereitung der Gewebeproben

Die Biopsien des humanen Darmgewebes wurden von der medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg, Abteilung Gastroenterologie, zur Verfügung gestellt. Sie wurden sofort nach Entnahme in Eppendorf – Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Die Biopsien wurden alle aus dem sigmoidalen Colon, etwa 20 cm distal des Rektums entnommen und jeweils mit einer römischen Ziffer, die für den Patienten steht und einer arabischen Ziffer, die für die Nummer der Entnahme steht, gekennzeichnet.

Die Kryoschnitte wurden am Mikrotom angefertigt. Dafür wurde die Biopsie aus dem - 80°C Schrank entnommen und etwa zwei Minuten bei Raumtemperatur angetaut, um sie leichter entnehmen zu können. Danach wurde die Gewebeprobe, um mögliche Gewebstraumata zu vermeiden, ganz vorsichtig mit einer stumpfen Nadel aus dem Eppendorf - Reaktionsgefäß in einen Tropfen Tissue-Tek überführt. Abschließend wurde noch etwas Tissue-Tek um die Probe gegeben, um die gesamte Biopsie vollständig in das Material einzubetten und somit ein Einreißen während des Schneidevorgangs zu verhindern.

Bei der Entwicklung der Methodik war auffällig, dass das Gewebe mancher Schnitte sehr zerrissen war. Dies ließ sich unter anderem auf eine stumpfe

Mikrom – Klinge zurückführen. Deshalb wurde für jede Biopsie eine neue Mikrom – Einmalklinge verwendet, die nach etwa zehn Schneidedurchgängen auf dem Magnetklingenträger nach links an eine unbenutzte Stelle der Klinge verschoben wurde. Damit war gewährleistet, dass die Zellen beim Schneiden möglichst wenig traumatisiert wurden.

2.2.2. Schneiden der Gewebeproben

Nach Erreichen der gewünschten Objekttemperatur von -22°C wurde die eingebettete Biopsie in die entsprechende Haltevorrichtung des Mikrotoms eingespannt. Die Betriebstemperatur des Mikrotoms lag ebenfalls bei -22°C . Es hatte sich im Verlauf verschiedener Schnittreihen herausgestellt, dass sich bei diesen Temperaturen die Schnitte leicht anfertigen und auf die Objektträger überführen lassen. Höhere oder niedrigere Temperaturen führten entweder zum Verkleben oder zum Zerreißen des Schnitts.

Die geeignete Schnittstärke wurde ebenfalls in verschiedenen Testreihen geprüft. Es wurde dabei offensichtlich, dass eine Schnittstärke von $10\mu\text{m}$ sowohl für die Durchführung des Schnittes, als auch für Anfärbbarkeit und Auswertung am besten ist.

Die Schnitte wurden auf werksseitig silanisierte Objektträger aufgenommen, wobei je nach Biopsiegröße drei bis fünf Schnitte auf einem Objektträger angeordnet wurden.

Abschließend wurden die Objektträger mit der Biopsienummer beschriftet.

2.2.3. Aufbewahrung der Kryoschnitte

Die Objektträger wurden, nach Biopsien geordnet, in die dafür vorgesehenen Aufbewahrungsboxen eingebracht und bis zum Ende der jeweiligen Schnittreihe auf Eis zwischengelagert. Die Boxen wurden abschließend mit der jeweiligen

Biopsienummer und dem Schnittdatum versehen und bei – 20°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

2.3. Herstellung von Suspensionen der Testsubstanzen

Die Suspensionen der Testsubstanzen wurden in einer Konzentration von 2 % hergestellt.

Hierzu wurde von den einzelnen Substanzen jeweils 0,02g in ein Eppendorf – Reaktionsgefäß eingewogen und mit 1ml Mc Coy Medium versetzt. Um einen einheitlich pH-Wert zu erlangen, wurden die Suspensionen mithilfe von HCl und NaOH auf einen pH-Wert von 7 eingestellt.

Die Suspension wurde zuerst manuell gemischt, dann gründlich gevortext und nach Beschriften der Reaktionsgefäße bei – 20°C gelagert.

Bei den Test-Reihen ab dem 31.03.05 entfielen die Substanzen P4, P7, P8, P17 und P18, da sie vom Hersteller nicht mehr zur Verfügung gestellt werden konnten.

2.4. Bakterienstämme

Tab. 2.1: eingesetzte Bakterienstämme

| Stammbezeichnung | Spezies | Ausgelöste Krankheit | Betroffener Darmabschnitt |
|------------------|-----------------------------|--|---------------------------|
| C.f. 3009 | <i>Citrobacter freundii</i> | Diarrhoe, Harnwegsinfektion, Neugeborenen- Meningitis | Positivkontrolle |
| EAEC 5477/94 | <i>Escherichia coli</i> | (persistierende) Diarrhoe | Ileum |
| EHEC 5714 | <i>Escherichia coli</i> | Diarrhoe/hämorrhagische Colitis | Colon |
| EPEC E2348/96 | <i>Escherichia coli</i> | (persistierende) Diarrhoe | Jejunum |

| | | | |
|-------------|--|--------------------------------|---------|
| ETEC H10407 | <i>Escherichia coli</i> | (Cholera-ähnliche) Diarrhoe | Jejunum |
| SL 1344 | <i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium (<i>S.typhimurium</i>) | Bakterienruhr | Ileum |
| M90T | <i>Shigella flexneri</i> | | Colon |

2.5. Anzucht der Bakterien

2.5.1. Glycerin - Stammkulturen

Die einzelnen Bakterienstämme wurden jeweils in 2ml McCoy Nährmedium in Glasröhrchen als über Nacht – Standkultur bei 37°C angezchtet, unter der Clean – Bench in ein 2ml Eppendorf – Reaktionsgefäß überführt und in einer Tischzentrifuge für fünf Minuten bei 13000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet, wiederum unter der Clean – Bench, in 500µl einer 10mmol/l MgCl₂ Lösung resuspendiert und mit 1000µl 86%igem Glycerin versetzt.

Die Kultur wurde gründlich gevortext und bei – 20°C gelagert.

2.5.2. Kulturen für die Adhärenz – Assays

Der Stamm SL1344 wurde zur Entwicklung der Methodik herangezogen, so dass sich bei diesem in verschiedenen Verfahren eine optimale Kultivierungsbedingung von 48h Standkultur herausstellte.

Für die übrigen Stämme wurde, bevor die Assays mit den Substanzen durchgeführt wurden, für jeden Bakterienstamm die Kultivierungsmethode

getestet, um die beste Adhärenz der Bakterien an den Krypten der Kryoschnitte sicherzustellen.

Von jedem Stamm wurde somit jeweils eine 48 Stunden Standkultur sowohl in McCoy Medium ohne Zusätze, als auch in McCoy Medium mit Zusatz von FCS und L-Glutamin, und jeweils 12 Stunden Kulturen in McCoy Medium ohne und mit Zusätzen im Brutschrank und im Schüttler inkubiert.

Der Stamm SL1344 wurde auf LB-Platte ausgestrichen und von dort für das Ansetzen der Kulturen entnommen. Hierfür wurde eine Pipettenspitze mit etwas Kultur benetzt und zu 2ml Nährmedium in einem Glasröhrchen gegeben.

Die restlichen Stämme wurden direkt aus der Glycerinkultur zum Bebrüten entnommen. Hierbei wurden 20µl aus der Glycerinkultur zum Animpfen von 2ml Nährmedium im Glasröhrchen eingesetzt.

2.5.3. Kultivierungsbedingungen der einzelnen Stämme

Tab. 2.2: Kultivierungsbedingungen der eingesetzten Stämme

| Stamm | Kultivierung/Medium |
|--------------|---|
| C.f. 3009 | 12h ÜNK Stand / McCoy (+FCS, + L-Glutamin) |
| EAEC 5477/94 | 12h ÜNK Stand / McCoy (+FCS, + L-Glutamin) |
| EHEC 5714 | 12h ÜNK Stand / McCoy (+FCS, + L-Glutamin) |
| EPEC E2348/9 | 12h ÜNK Stand / McCoy (+FCS, + L-Glutamin) |
| ETEC H10407 | 12h ÜNK Stand / McCoy (+FCS, + L-Glutamin) |
| M90T | 12h ÜNK Stand / McCoy (+FCS, + L-Glutamin) |
| SL1344 | 48h Stand / McCoy (ohne Zusätze) |

2.5.4. Bestimmung der optischen Dichte

Von den Kulturen wurde eine 1:10 Verdünnung hergestellt, somit jeweils 100µl entnommen, in 900µl Nährmedium gelöst und die optische Dichte am Photometer bei 600nm gegen 1000µl Nährmedium als Nullwert bestimmt.

Tab. 2.3: Messwerte der optischen Dichte der eingesetzten Stämme pro Test-Reihe in 1:10 Verdünnung

| Stamm | OD ₆₀₀ Test-Reihe 1 | OD ₆₀₀ Test-Reihe 2 | OD ₆₀₀ Test-Reihe 3 |
|--------------|--|--|--|
| C.f. 3009 | Bei allen Substanzen: OD ₆₀₀ : 0,142 | Bei allen Substanzen: OD ₆₀₀ : 0,196 | Bei allen Substanzen: OD ₆₀₀ : 0,257 |
| EAEC 5477/94 | Bei allen Substanzen: OD ₆₀₀ : 0,271 | Bei allen Substanzen: OD ₆₀₀ : 0,232 | Bei allen Substanzen: OD ₆₀₀ : 0,282 |
| EHEC 5714 | Bei allen Substanzen: OD ₆₀₀ : 0,242 | Bei allen Substanzen: OD ₆₀₀ : 0,242 | Bei allen Substanzen: OD ₆₀₀ : 0,251 |
| EPEC E2348/9 | Bei allen Substanzen: OD ₆₀₀ : 0,258 | Bei allen Substanzen: OD ₆₀₀ : 0,284 | Bei allen Substanzen: OD ₆₀₀ : 0,248 |
| ETEC H10407 | Bei allen Substanzen: OD ₆₀₀ : 0,231 | Bei allen Substanzen: OD ₆₀₀ : 0,310 | Bei allen Substanzen: OD ₆₀₀ : 0,267 |
| M90T | Bei allen Substanzen: OD ₆₀₀ : 0,094 | Bei allen Substanzen: OD ₆₀₀ : 0,096 | Bei allen Substanzen: OD ₆₀₀ : 0,101 |
| SL 1344 | Bei Substanz SZ3, P3,5,6,12,14,20: OD ₆₀₀ : 0,361 Bei Substanz P1,2,7,8,11,15,16-19: OD ₆₀₀ : 0,229 Bei Substanz SZ2,P4,9,10,13: OD ₆₀₀ : 0,200 | Bei allen Substanzen: OD ₆₀₀ : 0,207 | Bei allen Substanzen: OD ₆₀₀ : 0,268 |

2.6. Durchführung der Adhärenz-Assays

Es wurde von den Bakterienkulturen für 1:10 Verdünnung mittels Photometer die OD bei 600nm bestimmt und anschließend auf eine OD₆₀₀ von 0,2 verdünnt. Zeitgleich wurden die eingefrorenen Aliquots der Suspensionen der Testsubstanzen bei Raumtemperatur aufgetaut. Von den 2%igen Suspensionen der Testsubstanzen und den auf OD₆₀₀ = 0,2 eingestellten Bakterien wurden jeweils 40µl in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und das Bakterien-Substanz-Gemisch invertiert. Durch diese 1:1-Mischung ergab sich für die Bakterien eine OD₆₀₀ von 0,1 und für die Substanz-Suspensionen eine Konzentration von 1%. Als Kontrolle wurden die auf OD₆₀₀ = 0,2 verdünnten Bakterienkulturen in einem weiteren Eppendorf-Reaktionsgefäß 1:1 mit Nährmedium verdünnt, um ebenfalls eine OD₆₀₀ von 0,1 zu erhalten.

Bakterien und Bakterien-Substanz-Gemische wurden anschließend für 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C vorinkubiert, um eine mögliche Reaktion zwischen Bakterien und Substanz zu ermöglichen.

Fünf Minuten vor Ende der Vorinkubationszeit wurden die Kryoschnitte bei Raumtemperatur aufgetaut und jeder Schnitt mit Liquid Blocker umrandet, um ein Wegfließen der aufzubringenden Suspensionen zu verhindern. Die Objektträger wurden mit dem Datum des Adhärenz-Assays beschriftet.

Nach Ablauf der Vorinkubation wurde jeder Schnitt mit 60µl beimpft. Es wurde derart vorgegangen, dass immer der erste Schnitt auf dem Objektträger als Kontrolle mit Bakterien beimpft wurde, die folgenden Schnitte mit den jeweiligen Bakterien-Substanz-Gemischen. So war die Vergleichbarkeit zwischen Schnitt mit Bakterien und Schnitt mit Bakterien-Substanz-Gemisch gewährleistet, da sich auf einem Objektträger in der Regel aufeinander folgende Schnittreihen befanden.

Die Schnitte wurden nach dem Beimpfen für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.7. Fixierung und Färbung der Schnitte

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die aufgebrauchten Flüssigkeiten von den Schnitten abgekippt und die Objektträger in fünf Bechergläsern mit 0,9 %iger NaCl Lösung gewaschen. Die gesamte Waschdauer betrug etwa zwei Minuten.

Die Fixation erfolgte nach den Waschdurchgängen in Methanol für 15 Minuten. Die Schnitte wurden anschließend nach Pappenheim gefärbt.

Tab. 2.4: Färbeschritte, Färbelösungen und Färbedauer der Kryoschnitte

| Färbeschritt | Lösung | Dauer |
|--------------|---|--|
| 1. | May-Grünwald-Lösung unverdünnt | <i>Stämme: SL1344 und EHEC 5714: 1 min. übrige Stämme: 45 sec.</i> |
| 2. | May-Grünwald-Lösung verdünnt 1:1 mit Pappenheim- Puffer Gebrauchslösung | <i>Stämme: SL1344 und EHEC5714: 1 min. übrige Stämme: 45 sec.</i> |
| 3. | Pappenheim-Puffer Gebrauchslösung | Schwenken für etwa 30 sec. |
| 4. | Giemsa-Lösung | 5 min. |
| 5. | Pappenheim-Puffer Gebrauchslösung | Schwenken für etwa 30 sec. |
| 6. | Aqua destillata | Abschließende Waschung für etwa 30 sec. |

Bei manchen Schnitten zeigte sich im Laufe der Adhärenz-Assays mit den Stämmen SL 1344 und EHEC 5714, dass die Färbung an der Basalmembran der Krypten teilweise zu dunkel ist und dadurch dort adhärierende Bakterien nicht zu erkennen und auszuwerten sind. Deshalb wurde bei den übrigen Stämmen die Färbedauer der unverdünnten und verdünnten May-Grünwald-Lösung auf 45 Sekunden herabgesetzt.

Nach der Färbung wurden die Objektträger getrocknet und eingedeckelt. Dies diente sowohl zum Schutz der Schnitte per se, als auch dazu, die Schnitte ohne Verlust der Färbequalität aufbewahren zu können.

Dazu wurde der Objektträger für etwa zehn Minuten bei Raumtemperatur liegen gelassen bis die Flüssigkeit der abschließenden Aqua dest. Waschung komplett getrocknet war.

Danach wurde der Objektträger kurz in Roti-Histol getaucht und das Deckglas mit Roti-Histokitt eingestrichen. Das Deckglas wurde umgehend auf den Objektträger aufgelegt und unter bidigitalem Druck etwaige Lufteschlüsse ausgepresst.

2.8. Auswertung

Die Auswertung der Versuchsreihen erfolgte am Durchlichtmikroskop in 200facher Vergrößerung nach folgenden Kriterien:

- die Auszählung der adhärenen Bakterien erfolgte, soweit nicht anders angegeben, an 10 quergeschnittenen Krypten, die in ihrer Größe und Beschaffenheit annähernd gleich waren.
- Bei manchen Schnitten war es aufgrund der Schnittgröße nicht möglich, zehn gleiche quergeschnittene Krypten zu finden. In diesem Fall wurden nur fünf Krypten zur Auswertung herangezogen.
- Die an den Krypten und, soweit möglich, an der Basalmembran adhärenen Bakterien wurden ausgezählt und der Mittelwert gebildet.
- von diesen Absolutwerten der adhärenen Bakterien mit und ohne Test-Substanz-Suspensionen wurde daraufhin die relative Adhärenz in Prozent berechnet.
- für jeden Stamm wurden die Test-Substanz-Suspensionen in 3 Test-Reihen geprüft und der Mittelwert aus den 3 Reihen bestimmt.
- Zur Dokumentation wurden pro Schnitt während der Auszählung zwei Fotos gemacht.

3. Ergebnisse

3.1. Der *Escherichia coli* Stamm EAEC 5477/94

Für die Adhärenzexperimente mit dem Stamm EAEC wurden fünf verschiedene Biopsien verwendet.

In der ersten Test-Reihe die Biopsien I/4 und V/2, in Test-Reihe 2 die Biopsie II/2 und in Test-Reihe 3 die Biopsien V/3 und X/4. Dadurch ergab sich bei den Kontrollwerten eine starke Differenz im Mittelwert der adhätierenden Bakterien pro Krypte in Abwesenheit von Prüfsubstanzen. Auf der Biopsie X/4 zeigte sich die höchste Adhärenz, auf der Biopsie V/3 dagegen die niedrigste Adhärenz pro Krypte (Abb. 3.1). Abbildung 3.2 zeigt eine mikroskopische Aufnahme eines Kryoschnittes der Biopsie II/2 ohne Zugabe einer Prüfsubstanzen.

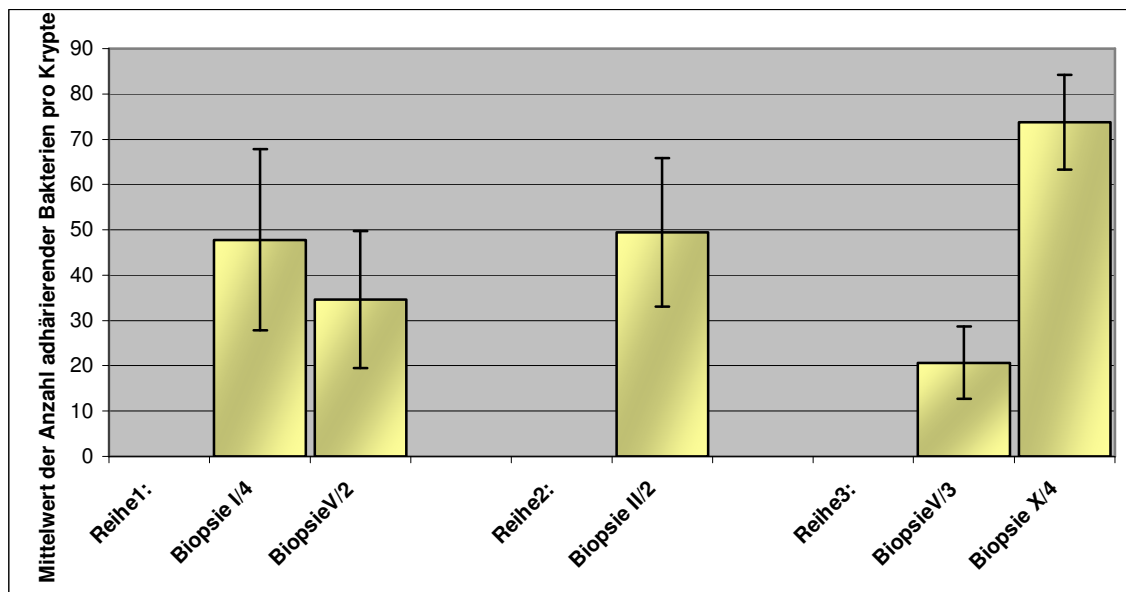


Abb. 3.1: Anzahl der adhätierenden Bakterien des Stammes EAEC 5477/94 in Abwesenheit von Prüfsubstanzen pro Krypte auf den verwendeten Biopsien

Die Ergebnisse der Adhärenz-Tests an Kryoschnitten mit dem Stamm EAEC 5477/94 ergaben nur in Gegenwart der Testsubstanz SZ2 eine Reduktion der Adhärenz unter 50% (47,4 %) (Abb. 3.3). Die Substanzen P1 und P12 inhibierten nicht die Adhärenz, sondern erhöhten diese auf über 200% (Abb. 3.4).

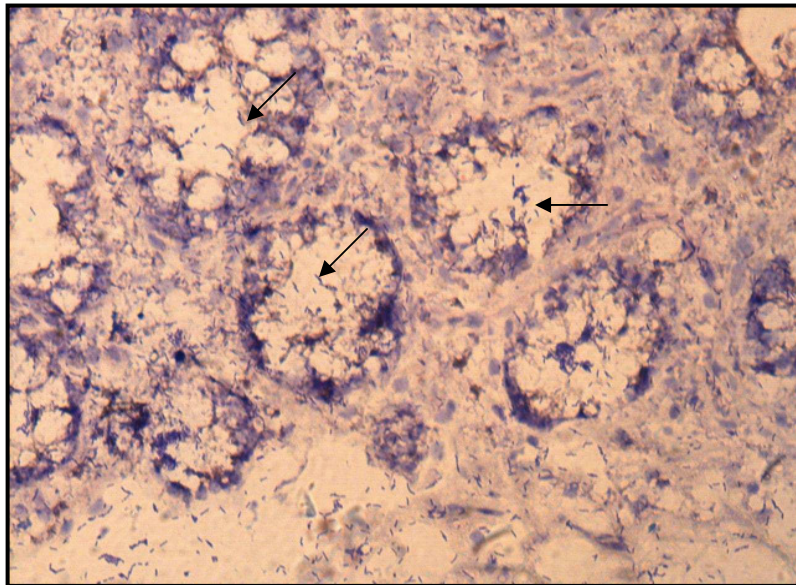


Abb. 3.2: mikroskopische Aufnahme eines Kryoschnittes der Biopsie II/2 mit adhärenzenden Bakterien (siehe Pfeile) des Stammes EAEC 5477/94 ohne Zugabe einer Test-Substanz.

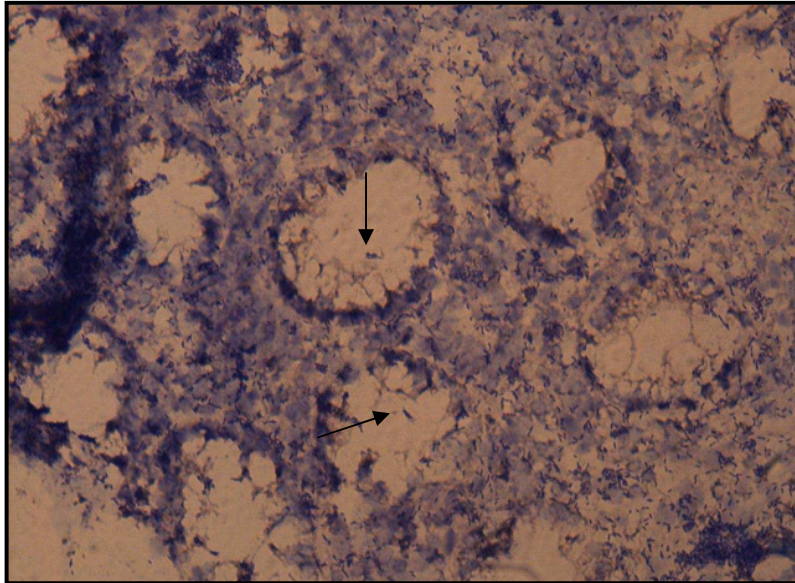


Abb. 3.3: mikroskopische Aufnahme eines Kryoschnittes der Biopsie II/2 mit adhärierende Bakterien (siehe Pfeile) des Stammes EAEC 5477/94 in Gegenwart der Test-Substanz SZ2.

Es sind deutlich weniger Bakterien zu erkennen, als auf dem Schnitt ohne Prüfsubstanz (vgl. Abb. 3.2)

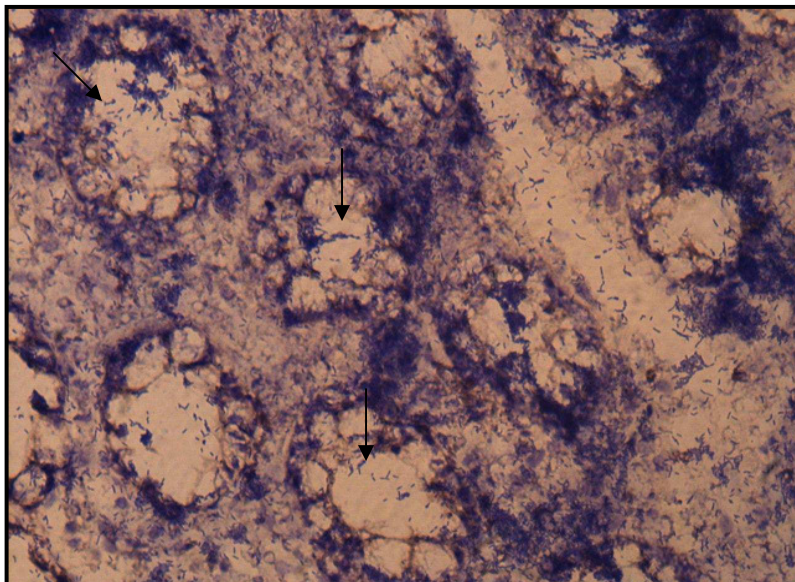


Abb. 3.4: mikroskopische Aufnahme eines Kryoschnittes der Biopsie II/2 mit adhärierende Bakterien (siehe Pfeile) des Stammes EAEC 5477/94 in Gegenwart der Test-Substanz P1. Es sind wesentlich mehr Bakterien zu erkennen, als auf dem Schnitt ohne Prüfsubstanz (vgl. Abb. 3.2)

Die Präsenz aller anderen Substanzen resultierte in Adhärenzwerten von über 50% (vgl. Abb. 3.5).

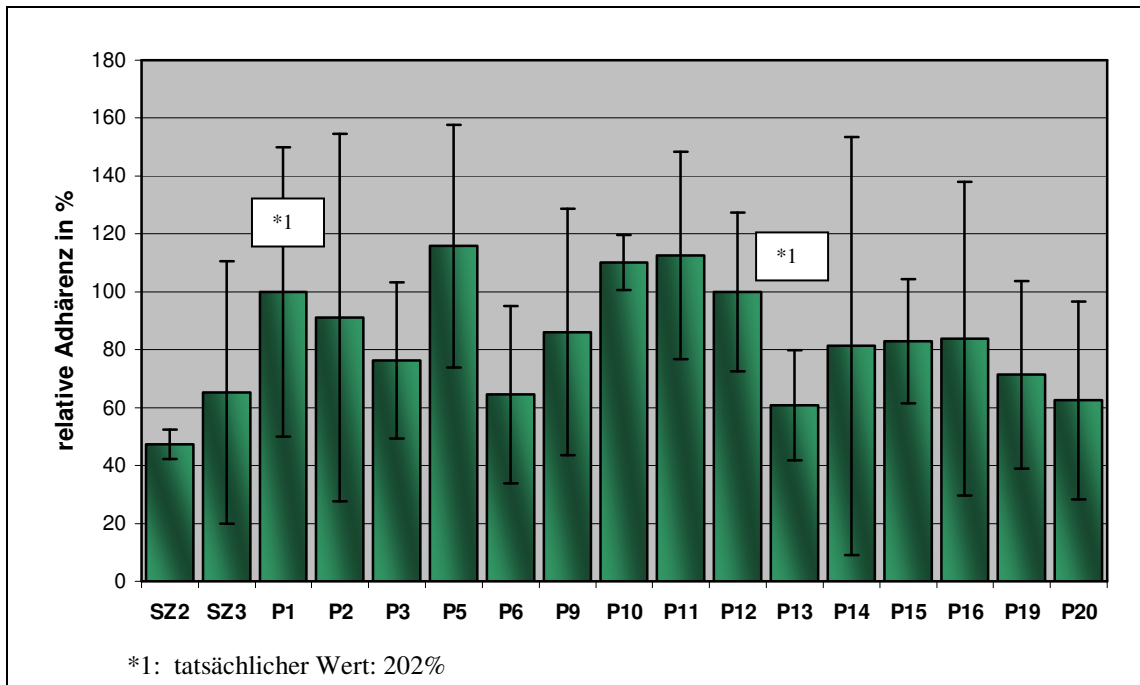


Abb. 3.5: relative Adhärenz des Stammes EAEC in Anwesenheit der Substanzen. Angegeben sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus den Ergebnissen der drei Test - Reihen

3.2. Der *Escherichia coli* Stamm EHEC 5714

Bei den Adhärenz-Tests mit dem Stamm EHEC 5714 wurden zwei verschiedene Biopsien verwendet. Für die Test-Reihen 1 und 2 kam die Biopsie III/4 und für die dritte Test-Reihe kam die Biopsie X/4 zur Anwendung (Abb. 3.6).

Erstaunlicherweise war der Mittelwert für die Anzahl adhärenter Bakterien an die Biopsie III/4 in Testreihe 2 und an Biopsie X/4 in Testreihe 3 mit 11 Bakterien gleich. Dagegen ergab sich ein etwas höherer Wert (14 Bakterien/Krypte) für die Adhärenz mit derselben Biopsie III/4 in Testreihe 1. Es wäre eigentlich eine gleich hohe Anzahl adhärrierender Bakterien pro Krypte auf

Kryoschnitten derselben Biopsie und ein unterschiedlicher Wert mit der anderen Biopsie zu erwarten gewesen.

Die mikroskopischen Bilder verdeutlichen die Adhärenz ohne (Abb. 3.7) und mit (Abb. 3.8) Zugabe einer Test-Substanz an die Biopsie III/4.

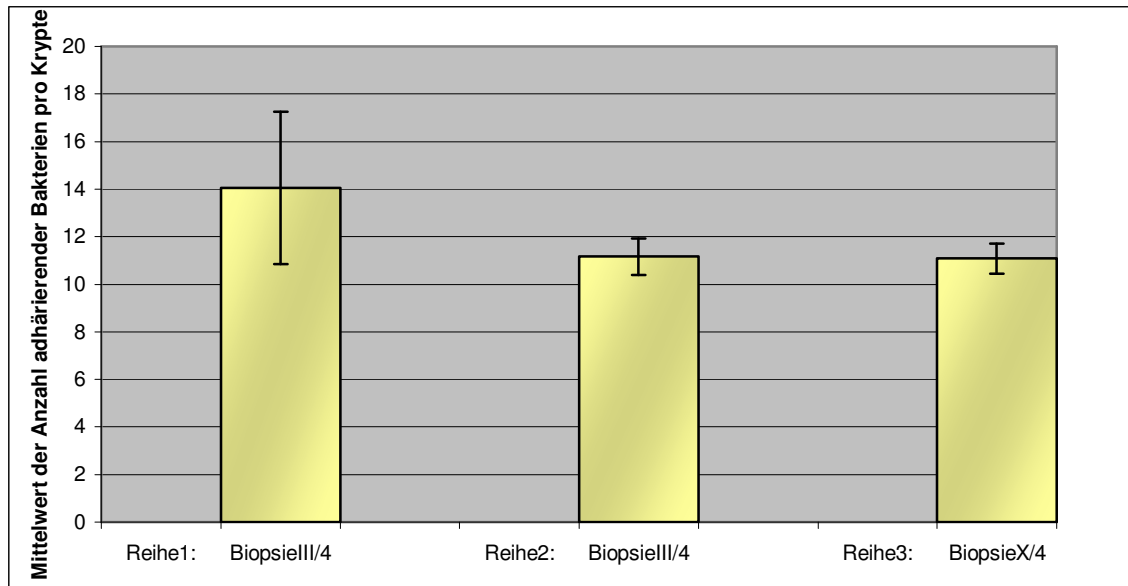


Abb. 3.6: Anzahl der adhärrenderen Bakterien des Stammes EHEC 5714 in Abwesenheit von Prüfsubstanzen pro Krypte auf den verwendeten Biopsien

Die Ergebnisse der Adhärenz Tests mit dem Stamm EHEC 5714 an den Kryoschnitten ergab, wie beim Stamm EAEC 5477/94, nur in Anwesenheit der Test-Substanz SZ2 eine Reduktion der Adhärenz von über 50% (46,1%) (Abb. 3.8).

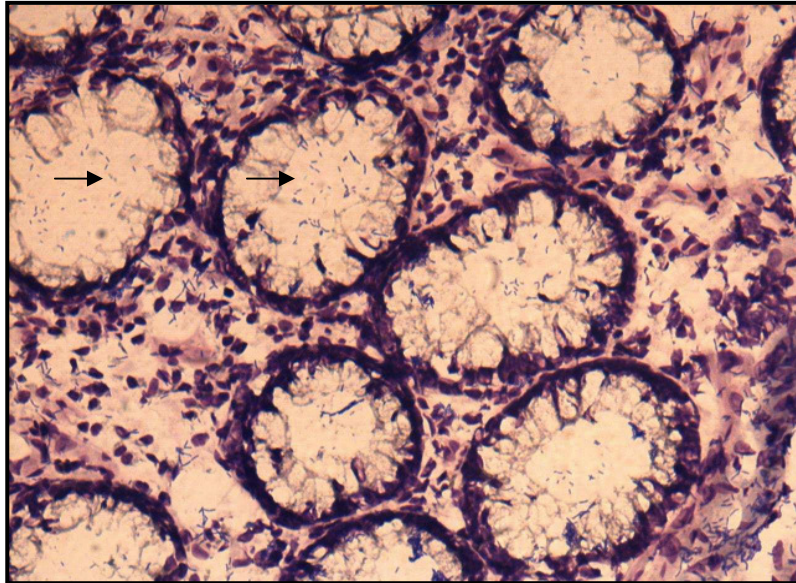


Abb. 3.7: mikroskopische Aufnahme eines Kryoschnittes der Biopsie III/4 mit adhärierenden Bakterien (siehe Pfeile) des Stammes EHEC 5714 ohne Zugabe einer Test-Substanz.

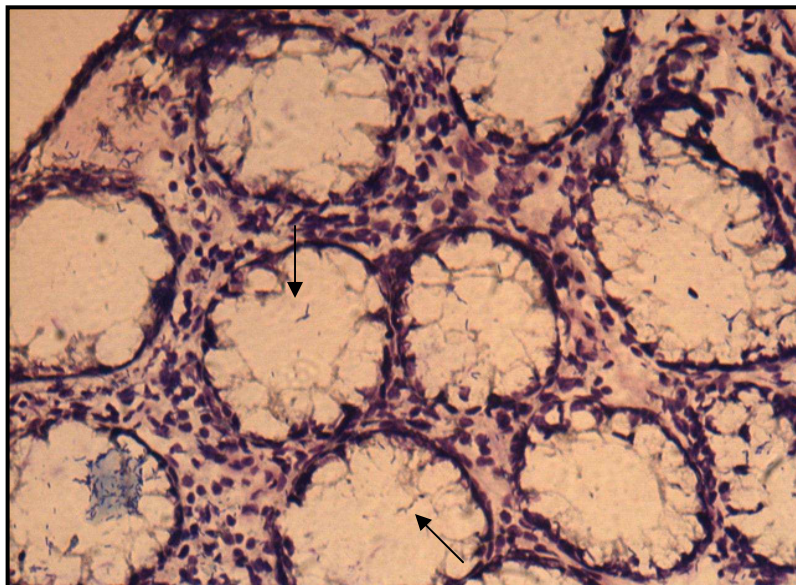


Abb. 3.8: mikroskopische Aufnahme eines Kryoschnittes der Biopsie III/4 mit adhärierende Bakterien (siehe Pfeile) des Stammes EHEC 5714 in Gegenwart der Test-Substanz SZ2.

Es sind deutlich weniger Bakterien zu erkennen, als auf dem Schnitt ohne Prüfsubstanz (vgl. Abb. 3.7)

Die Präsenz aller anderen Substanzen resultierten jeweils in relativen Adhärenzen von über 50%. Die Test-Substanz P2 führte sogar zu einer Adhärenz von 132,6% im Vergleich zu den Kontrollwerten (Abb. 3.9).

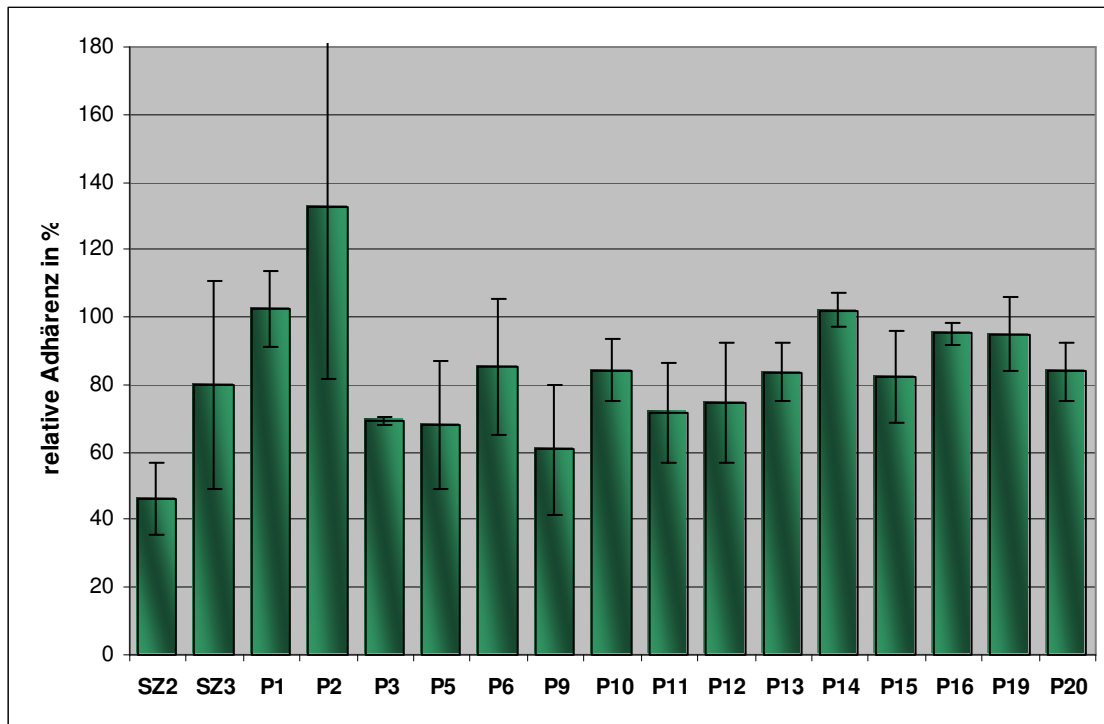


Abb. 3.9: relative Adhärenz des Stammes EHEC in Anwesenheit der Substanzen. Angegeben sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus den Ergebnissen der drei Test - Reihen

3.3. Der *Escherichia coli* Stamm EPEC E2348/9

Für die Adhärenzstudien mit dem Stamm EPEC E2348/9 wurden drei verschiedene Biopsien verwendet. Für die Test-Reihe 1 die Biopsie X/4, für die Test-Reihe 2 die Biopsie V/2 und für die Test-Reihe 3 die Biopsie I/4.

Die Verwendung jeweils unterschiedlicher Biopsien zeigte sich auch deutlich im Vergleich der Anzahl der adhärrierenden Bakterien pro Krypte ohne Zugabe einer Prüfsubstanz, wobei sich auf Biopsie X/4 mit durchschnittlich 30,2 Bakterien pro Krypte deutlich weniger Bakterien ansiedelten, als auf Biopsie I/4

mit durchschnittlich 61,7 Bakterien pro Krypte (Abb. 3.10). Abb. 3.11 zeigt die mikroskopische Aufnahme der Biopsie I/4 mit adhärenenten Bakterien ohne Zugabe einer Prüfsubstanz.

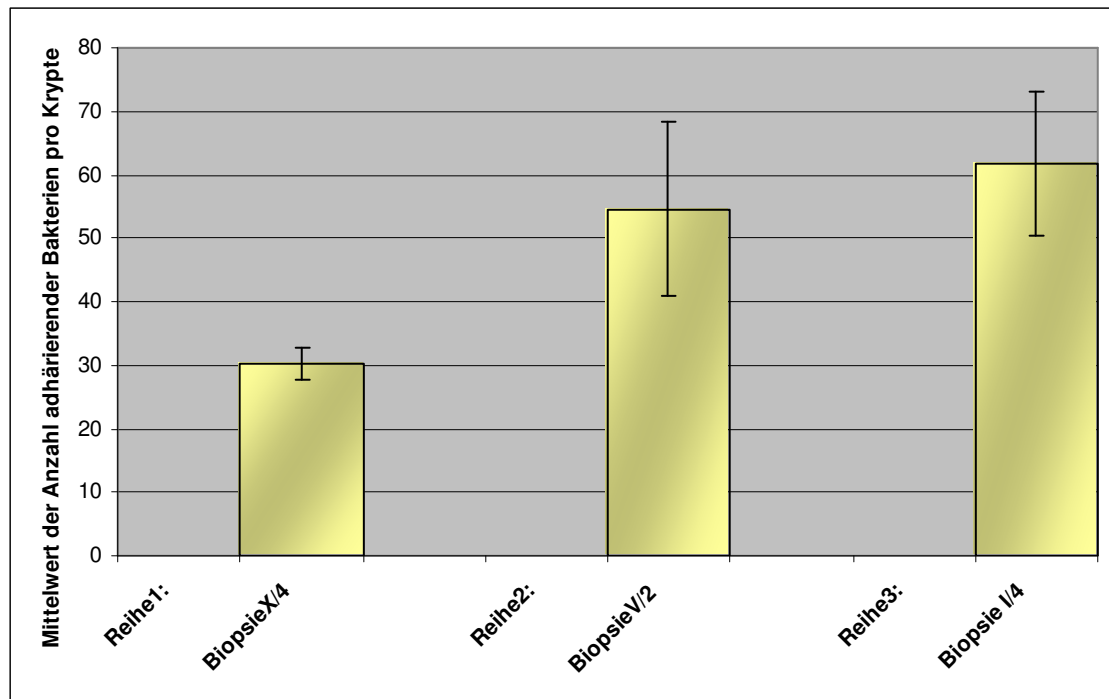


Abb. 3.10: Anzahl der adhärerenden Bakterien des Stammes EPEC E2348/9 in Abwesenheit von Prüfsubstanzen pro Krypte auf den verwendeten Biopsien

Im Ergebnis zeigte sich für diesen Stamm nur bei Zugabe der Prüfsubstanz P12 eine Reduktion der Adhärenz von unter 50% (45,4%) (Abb. 3.12 und Abb. 3.13).

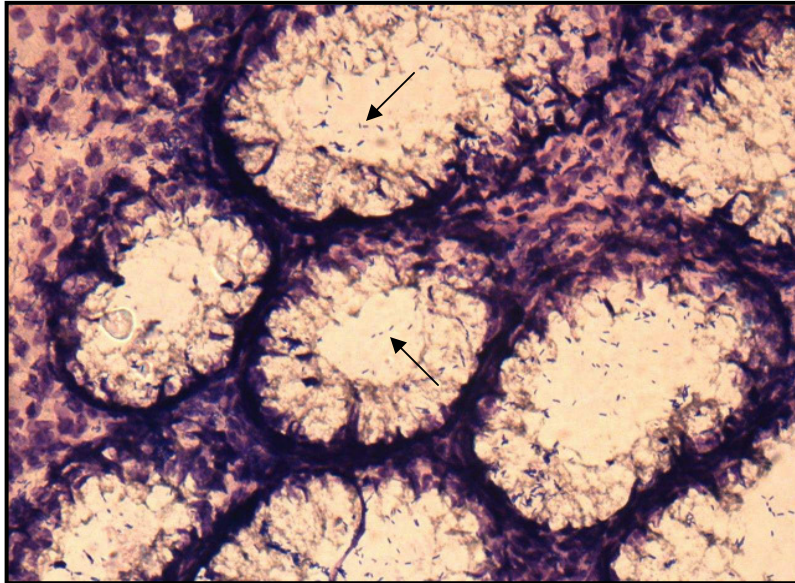


Abb. 3.11: mikroskopische Aufnahme eines Kryoschnittes der Biopsie I/4 mit adhätierenden Bakterien (siehe Pfeile) des Stammes EPEC E2348/9 ohne Zugabe einer Test-Substanz.

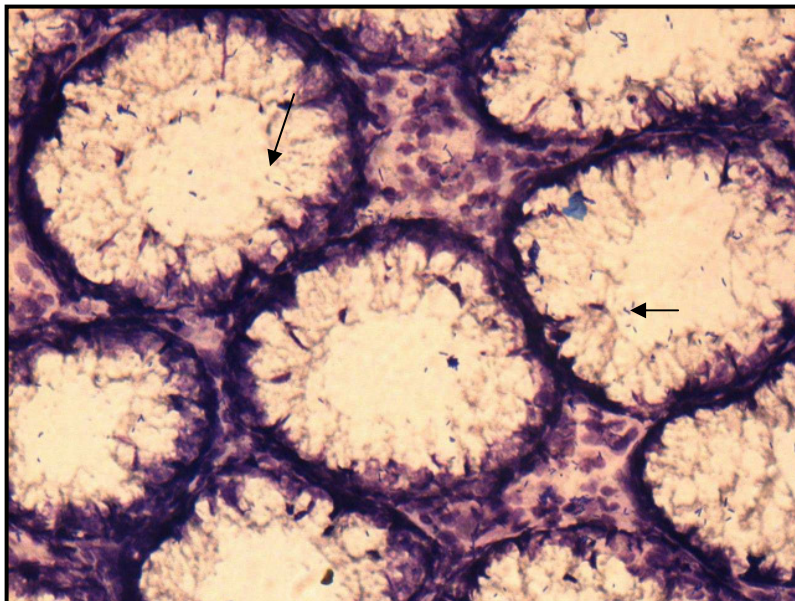


Abb. 3.12: mikroskopische Aufnahme eines Kryoschnittes der Biopsie I/4 mit adhätierenden Bakterien (siehe Pfeile) des Stammes EPEC E2348/9 in Gegenwart der Test-Substanz P12.

Es sind deutlich weniger Bakterien zu erkennen, als auf dem Schnitt ohne Prüfsubstanz (vgl. Abb. 3.11)

Trotz unterschiedlicher Qualität der Bilder zeigt sich deutlich eine Verringerung der Adhärenz unter Zugabe der Prüfsubstanz P12.

Die Präsenz aller anderen Substanzen reduzierte die Adhärenz nicht unter den Schwellenwert (Abb. 3.13).

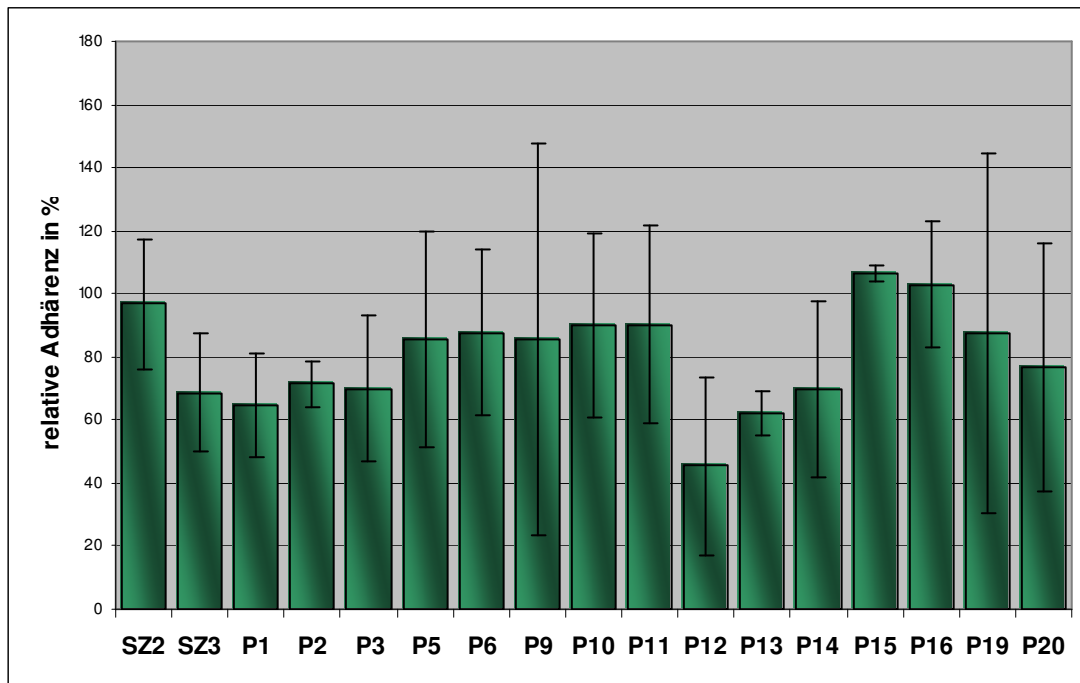


Abb. 3.13: relative Adhärenz des Stammes EPEC in Anwesenheit der Substanzen. Angegeben sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus den Ergebnissen der drei Test - Reihen

3.4. Der *Escherichia coli* Stamm ETEC H10407

Bei den Adhärenz-Tests mit dem Stamm ETEC H10407 wurden vier verschiedene Biopsien verwendet. In der ersten Test-Reihe die Biopsie X/4, in der zweiten Test-Reihe die Biopsie I/4 und in der dritten Test-Reihe die Biopsien V/3 und II/2 (Abb. 3.14).

Auf den Krypten der Biopsie II/2 adhärten mit durchschnittlich 92,5 Bakterien pro Krypte die meisten, auf den Krypten der Biopsie V/3 mit durchschnittlich 22,1 Bakterien pro Krypte die wenigsten Bakterien (Abb. 3.14). Abbildung 3.15

zeigt eine mikroskopische Aufnahme eines Kryoschnittes der Biopsie I/4 ohne Zugabe einer Prüfsubstanz.

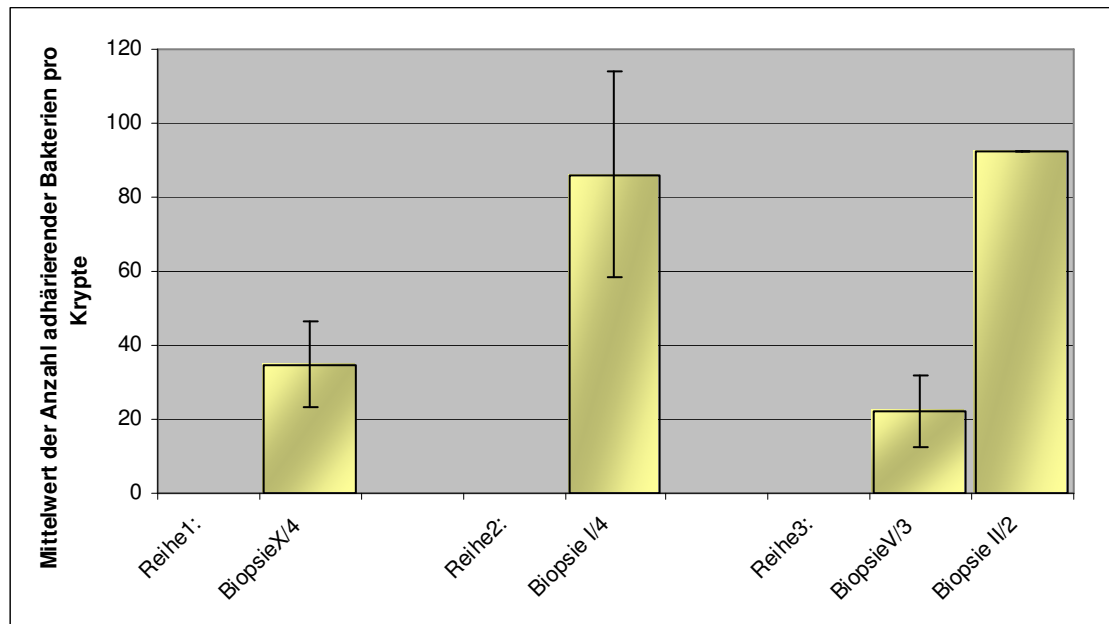


Abb. 3.14: Anzahl der adhärerenden Bakterien des Stammes ETEC H10407 in Abwesenheit von Prüfsubstanzen pro Krypte auf den verwendeten Biopsien

Die Ergebnisse der Adhärenz-Tests mit dem Stamm ETEC H10407 an Kryoschnitten zeigten in Anwesenheit der Substanzen P3 (43%) (Abb. 3.16) und P20 (45%) (Abb. 3.17) eine Hemmung der Adhärenz auf unter 50% (vgl. Abb. 3.19).

Die Zugabe der Substanz P16 bewirkte keine Hemmung, sondern verstärkte die Adhärenz der Bakterien auf 181,4% (Abb.3.18).

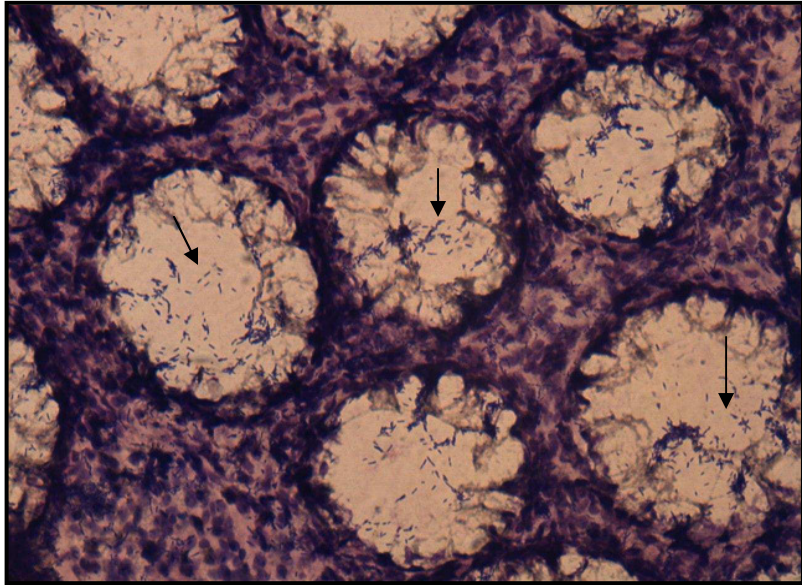


Abb. 3.15: mikroskopische Aufnahme eines Kryoschnittes der Biopsie I/4 mit adhärenierenden Bakterien des Stammes ETEC H10407 ohne Zugabe einer Test-Substanz.

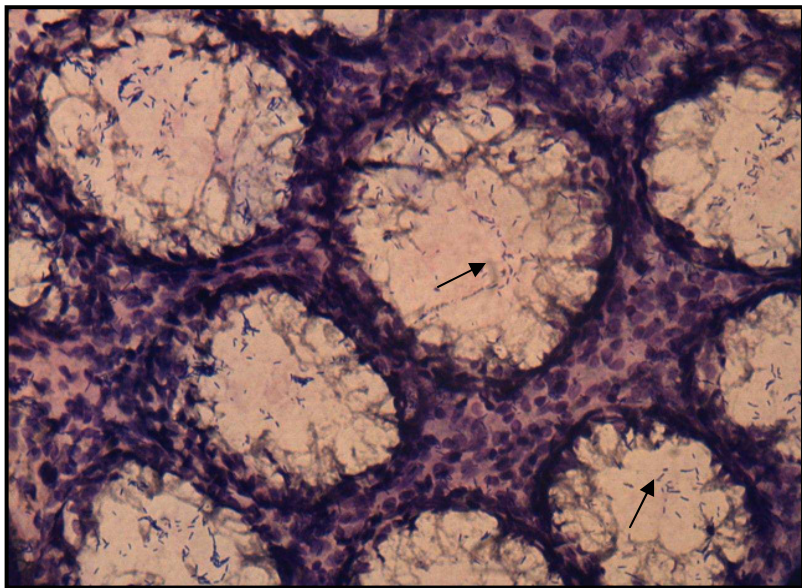


Abb. 3.16: mikroskopische Aufnahme eines Kryoschnittes der Biopsie I/4 mit adhärenierenden Bakterien des Stammes ETEC H10407 in Gegenwart der Test-Substanz P3. Es sind deutlich weniger Bakterien zu erkennen, als auf dem Schnitt ohne Prüfsubstanz (vgl. Abb. 3.15)

Abb. 3.17 und 3.18 zeigen mikroskopische Aufnahmen der Biopsie X/4, die trotz der unterschiedlichen Biopsie und unterschiedlicher Qualität der Bilder im Vergleich zu Abb. 3.15 und 3.16 (Kryoschnitt der Biopsie I/4) deutlich die Änderung im Adhärenzverhalten der Bakterien unter Zugabe der Test-Substanzen erkennen lassen.

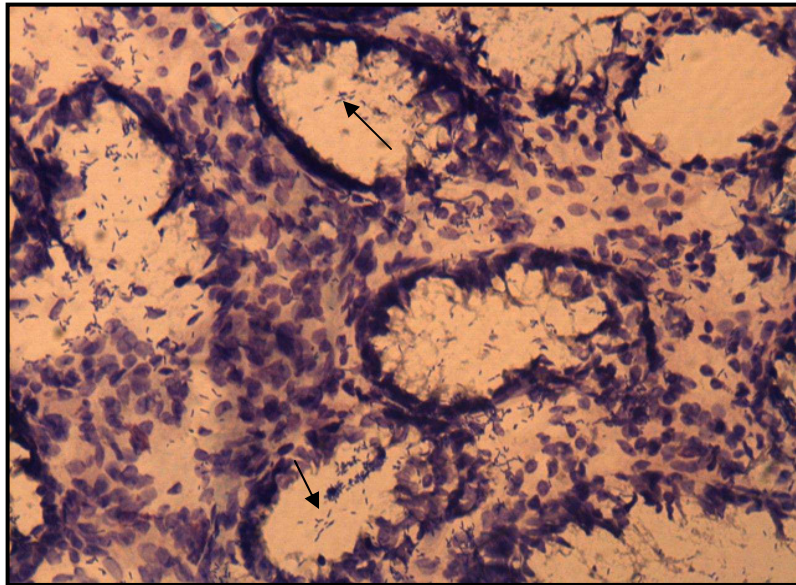


Abb. 3.17: mikroskopische Aufnahme eines Kryoschnittes der Biopsie X/4 mit adhärenierenden Bakterien des Stammes ETEC H10407 in Gegenwart der Test-Substanz P20. Es sind wesentlich weniger Bakterien zu erkennen, als auf dem Schnitt ohne Prüfsubstanz (vgl. Abb. 3.15)

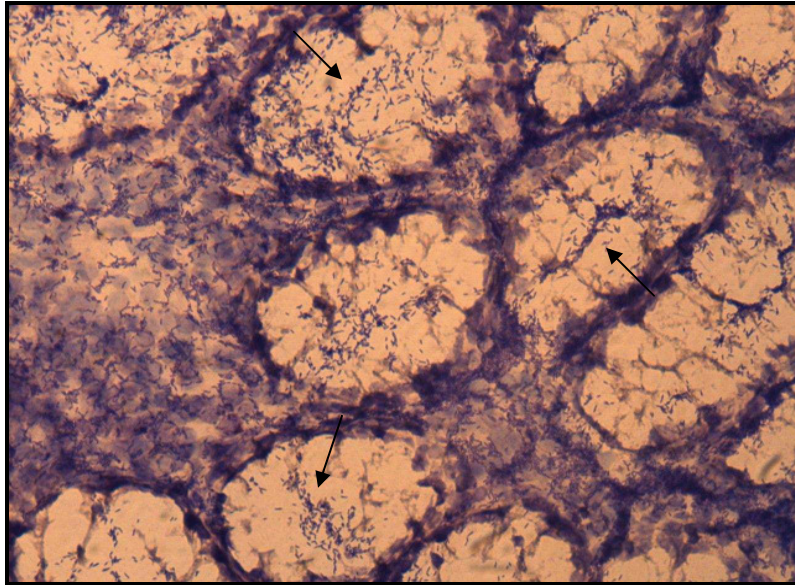


Abb. 3.18: mikroskopische Aufnahme eines Kryoschnittes der Biopsie X/4 mit adhären den Bakterien des Stammes ETEC H10407 in Gegenwart der Test-Substanz P16. Es sind deutlich mehr Bakterien zu erkennen, als auf dem Schnitt ohne Prüfsubstanz. (vgl. Abb. 3.15)

Alle übrigen eingesetzten Prüfsubstanzen führten zu keiner Inhibition der Adhärenz (Abb. 3.19).

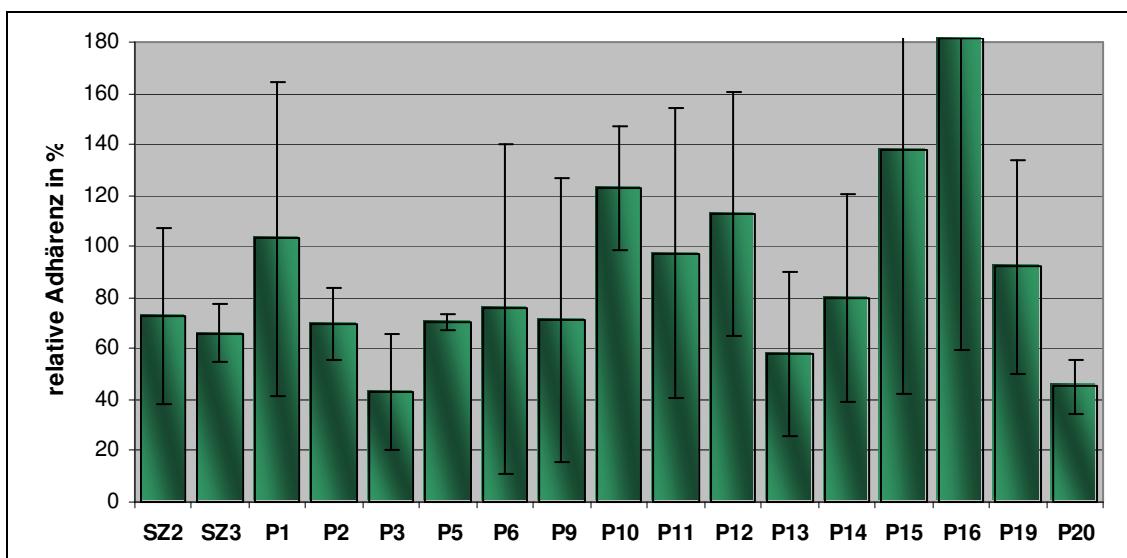


Abb. 3.19: relative Adhärenz des Stammes ETEC in Anwesenheit der Substanzen. Angegeben sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus den Ergebnissen der drei Test - Reihen

3.5. Der *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium Stamm SL1344

Zur Beurteilung der Adhärenz des Stammes SL 1344 wurden zwei unterschiedliche Biopsien herangezogen. In der ersten Test-Reihe die Biopsien III/4 und IV/2, und in der zweiten und dritten Test-Reihe jeweils die Biopsien III/4 (Abb. 3.20).

Da, bis auf die Substanzen SZ3, P6, P12, P3, P5, P14, und P20 in der ersten Test-Reihe auf Biopsie IV/2, alle weiteren Substanzen in allen drei Test-Reihen auf der Biopsie III/4 zugegeben wurden, war eine genaue Beurteilung der Unterschiede in den jeweiligen Test-Reihen gut durchführbar.

Daraus resultierten relativ geringe Unterschiede in der Anzahl der adhärierenden Bakterien in Abwesenheit von Prüfsubstanzen pro Krypte mit den Kryoschnitten der Biopsie III/4 im Vergleich der drei Test-Reihen (Abb. 3.21).

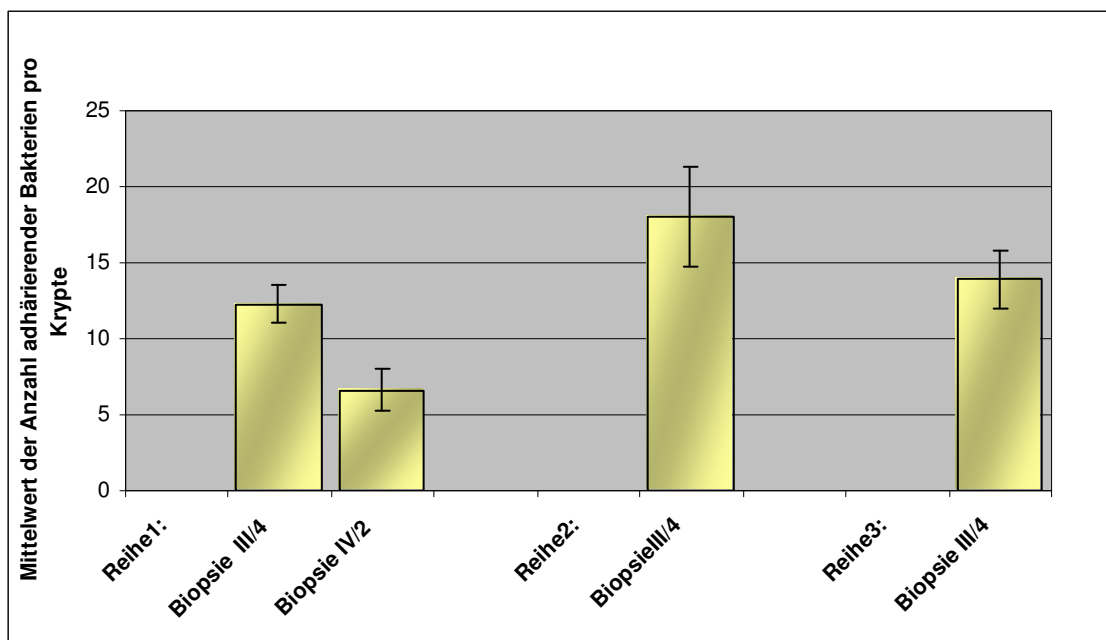


Abb. 3.20: Vergleich der Anzahl der adhärierenden Bakterien des Stammes SL1344 pro Krypte auf den einzelnen Biopsien ohne Zugabe einer Prüfsubstanz. Angegeben sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus den drei Test-Reihen

Weiterhin muss angemerkt werden, dass ab der dritten Test-Reihe die Substanzen P4, P7, P8, P17 und P18 entfielen (siehe Material und Methoden Teil).

In den Abbildungen 3.21 und 3.22 sind die mikroskopischen Aufnahmen der Kryoschnitte der Biopsie III/4 dargestellt, die die deutliche Reduktion der Adhärenz mit (Abb. 3.22) im Vergleich zu ohne (Abb. 3.21) Zugabe einer Prüfsubstanz erkennen lassen.

Nach der Auswertung des Adhärenz-Verhaltens des Stammes SL 1344 an den Kryoschnitten zeigte sich für drei der Prüfsubstanzen, P7 (33,2%), P 17 (48,2%) und P20 (45,5%) (Abb. 3.22), eine Inhibition um mehr als 50% (vgl. Abb. 3.23).

Da aber, wie oben angemerkt, die Substanzen P7 und P17 nur für die ersten beiden Test-Reihen zur Verfügung standen, ist die dargestellte Adhärenz in Anwesenheit dieser Substanzen nicht sicher als Inhibition zu werten.

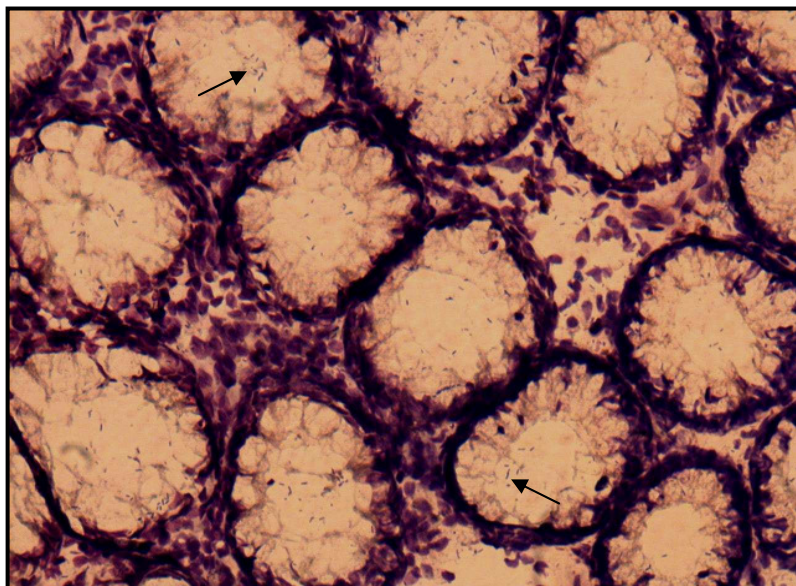


Abb. 3.21: mikroskopische Aufnahme eines Kryoschnittes der Biopsie III/4 mit adhätierenden Bakterien des Stammes SL 1344 ohne Zugabe einer Test-Substanz-Suspension.

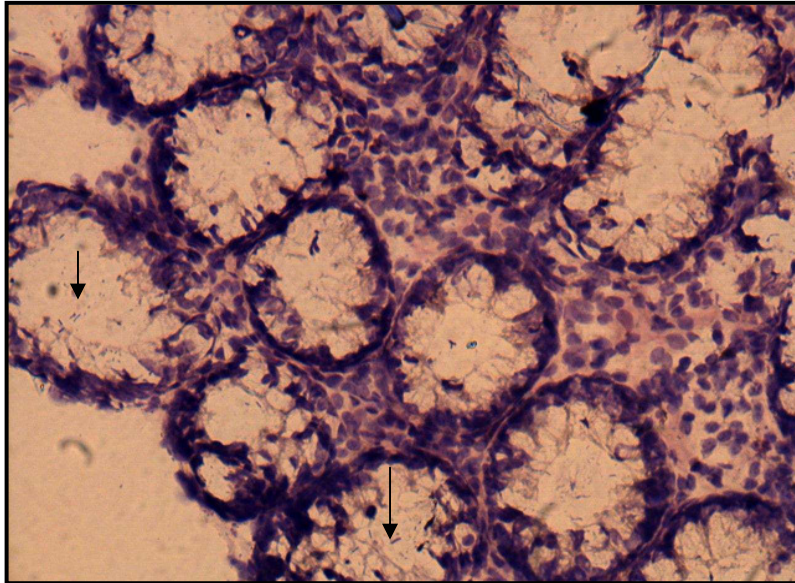


Abb. 3.22: mikroskopische Aufnahme eines Kryoschnittes der Biopsie III/4 mit adhärenenden Bakterien des Stammes SL 1344 in Gegenwart der Test-Substanz P20. Es sind deutlich weniger Bakterien zu erkennen, als auf dem Schnitt ohne Prüfsubstanz. (vgl. Abb. 3.21)

In Gegenwart der Substanzen SZ2 und SZ3 wurden Mittelwerte von 51,3% (SZ2) und 51,7% (SZ3) erhalten, welche nicht unter dem Schwellenwert von 50% liegen. Die Standardabweichungen schließen allerdings Werte unter 50 % relative Adhärenz mit ein. Alle anderen Test-Substanzen reduzierten die Adhäsionseffizienz nicht um $\geq 50\%$ (Abb. 3.23).

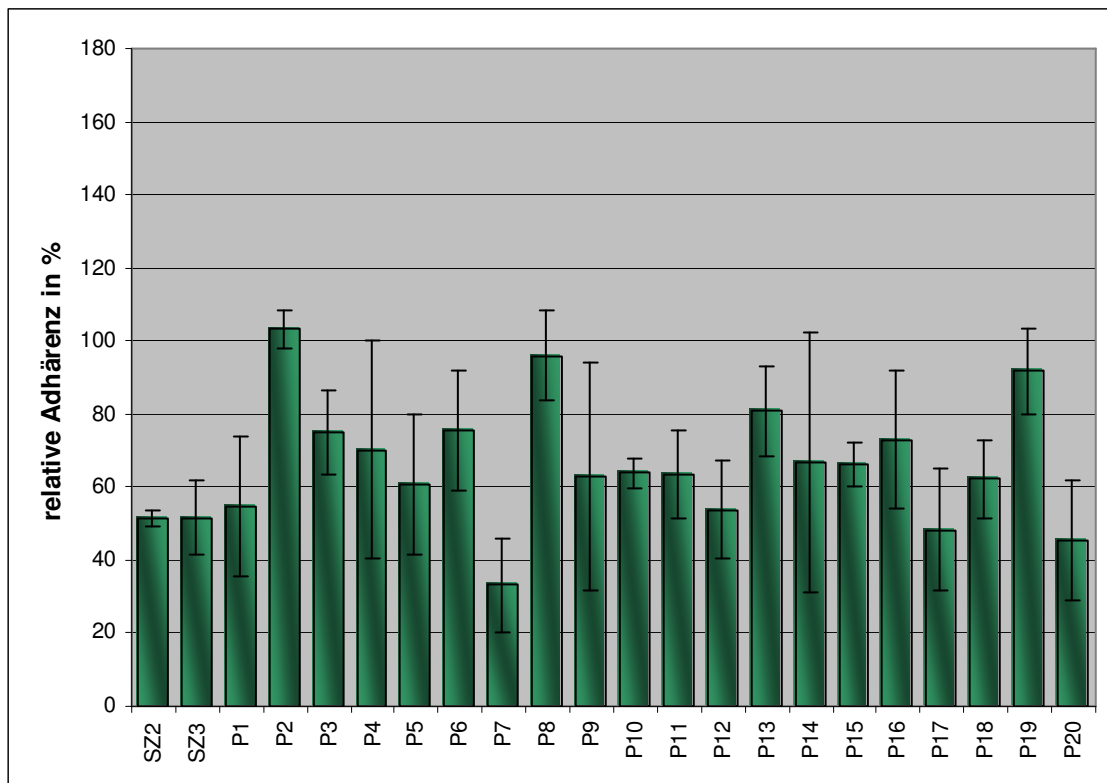


Abb. 3.23: relative Adhärenz des Stammes SL 1344 in Anwesenheit der Substanzen. Angegeben sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus den Ergebnissen der drei Test - Reihen

3.6. Der *Shigella flexneri* Stamm M90T

Für die Untersuchungen mit dem *Shigella* Stamm M90T wurden in allen drei Test-Reihen dieselbe Biopsie (X/1) benutzt (Abb. 3.24).

Es zeigten sich kaum Unterschiede im Adhärenz-Verhalten bei den Kontrollwerten in Abwesenheit von Prüfsubstanzen.

In der ersten Test-Reihe war eine Adhäsionseffizienz mit im Schnitt 11,1 Bakterien pro Krypte, in der zweiten Test-Reihe mit 11,9 Bakterien pro Krypte, und in der dritten Test-Reihe die höchste Adhärenz mit 12,8 Bakterien pro Krypte erhalten worden (Abb. 3.24).

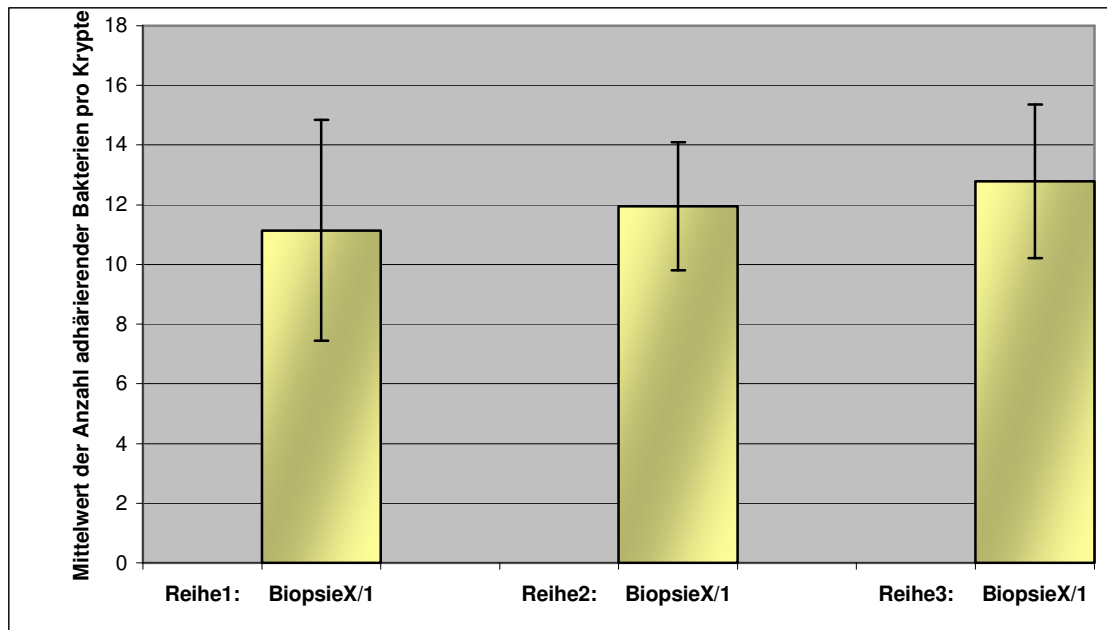


Abb. 3.24: Vergleich der Anzahl der adhärierenden Bakterien des Stammes *Shigella flexneri* M90T pro Krypte auf den einzelnen Biopsien ohne Zugabe einer Prüfsubstanz. Angegeben sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus den drei Test-Reihen

Abb. 3.25 zeigt die mikroskopische Aufnahme der Biopsie X/1 ohne Zugabe einer Prüfsubstanz.

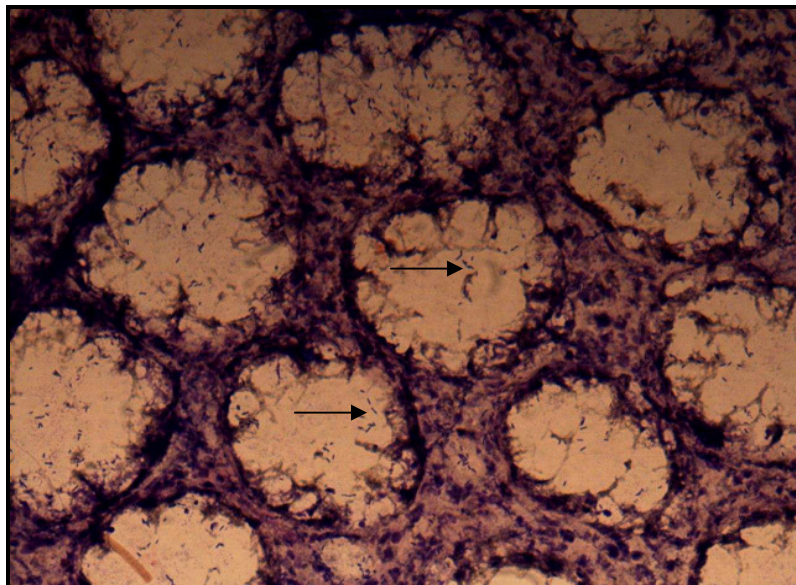


Abb. 3.25: mikroskopische Aufnahme eines Kryoschnittes der Biopsie X/1 mit adhärierenden Bakterien des Stammes M90T ohne Zugabe einer Test-Substanz.

Die Ergebnisse der Auswertung der drei Test-Reihen wies nur für die Substanz SZ3 eine Inhibition von unter 50% (45,6%) aus. In Abb. 3.26 sieht man trotz des Qualitätsunterschieds der mikroskopischen Bilder die deutliche Abnahme der Anzahl adhärenter Bakterien am eingesetzten Kryoschnitt der Biopsie X/1.

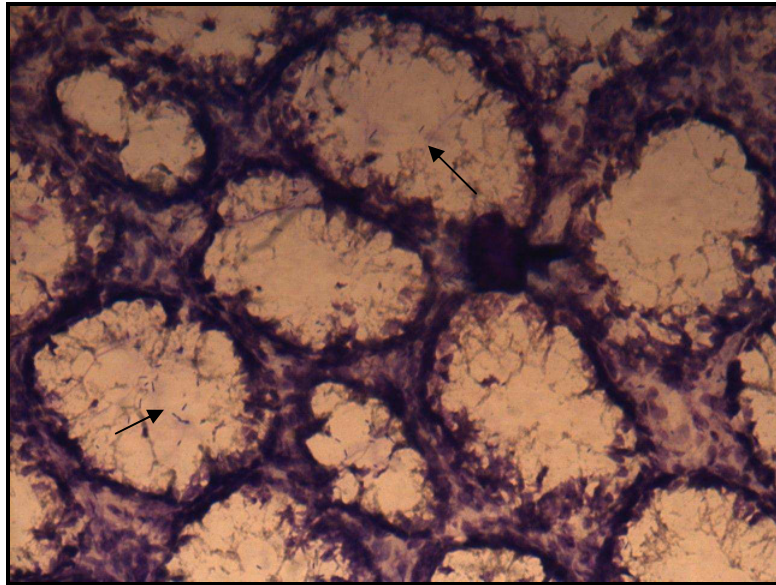


Abb. 3.26: mikroskopische Aufnahme eines Kryoschnittes der Biopsie X/1 mit adhärenierenden Bakterien des Stammes M90T in Gegenwart der Test-Substanz SZ3. Es sind weniger Bakterien zu erkennen, als auf dem Schnitt ohne Prüfsubstanz. (vgl. Abb. 3.25)

Alle anderen getesteten Prüfsubstanzen hemmten die Adhärenz nicht (vgl. Abb. 3.27).

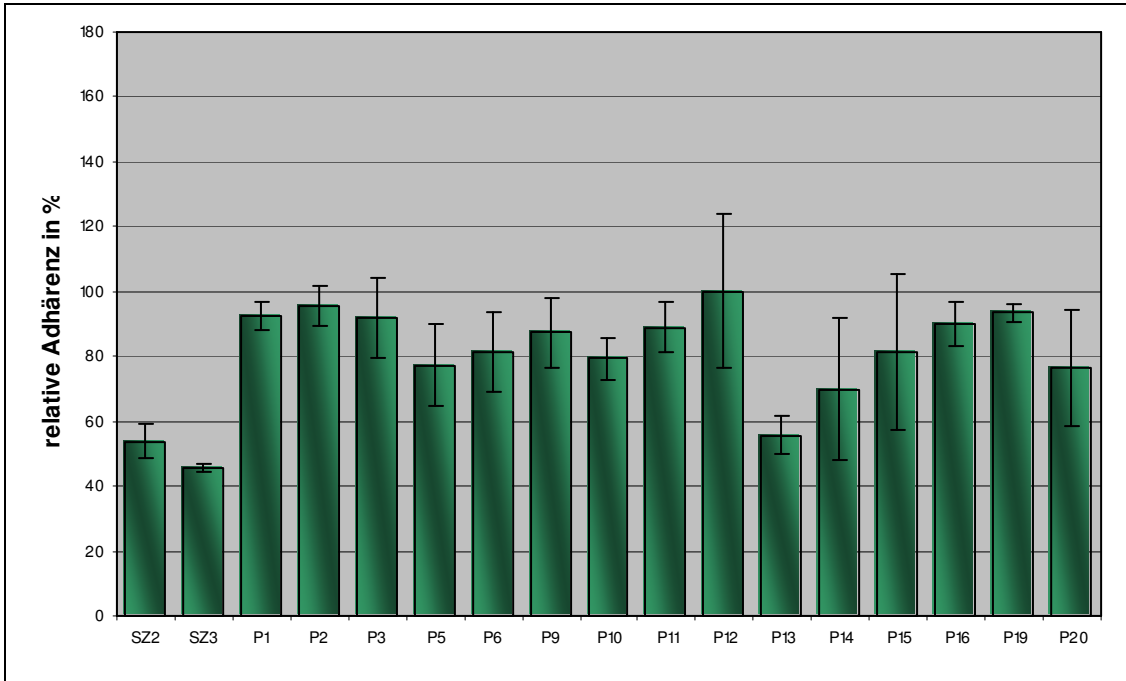


Abb. 3.27: relative Adhärenz des Stammes M90T in Anwesenheit der Substanzen. Angegeben sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus den Ergebnissen der drei Test - Reihen

3.7. Der *Citrobacter freundii* Stamm 3009

Der Stamm 3009 wurde als Positivkontrolle benutzt (siehe Material und Methoden Teil). Auch hier wurden drei getrennte Test-Reihen mit zwei verschiedenen Biopsien, X/4 in Reihe1 und V/2 in den Reihen 2 und 3, durchgeführt.

Das Adhärenzverhalten der Bakterien dieses Stammes lässt sich mit dem der anderen Stämme vergleichen. In den Kontroll-Assays in der ersten Test-Reihe adhärten mit 23,3 Bakterien pro Krypte jedoch deutlich weniger, als in der dritten Test-Reihe mit durchschnittlich 34,6 Bakterien pro Krypte (Abb. 3.28).

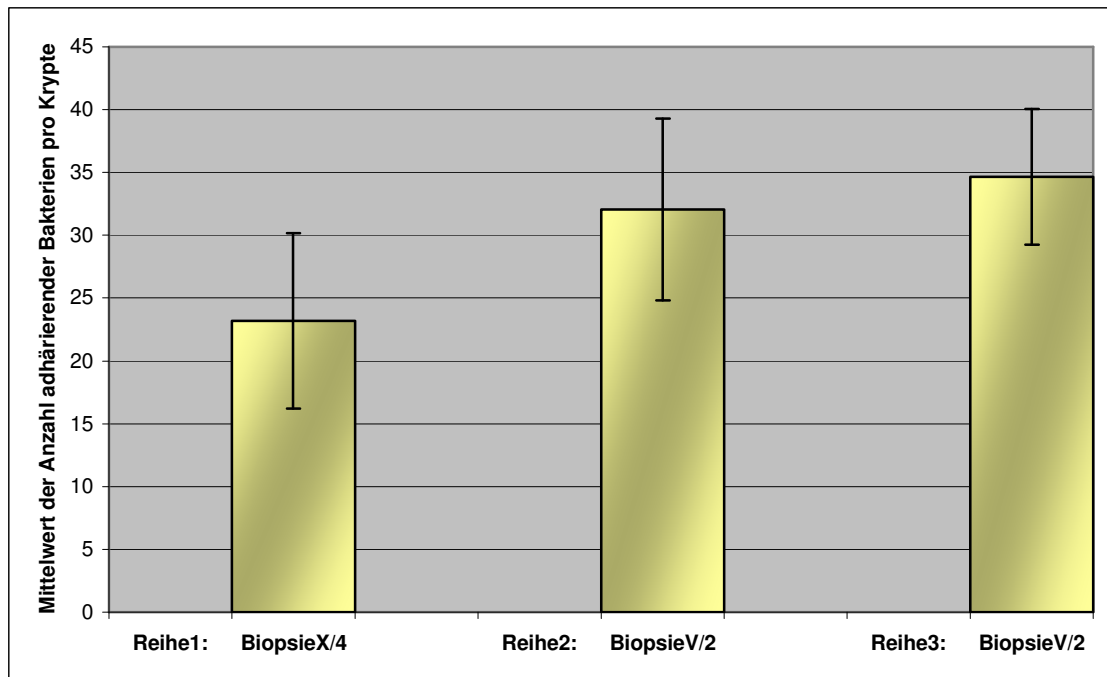


Abb. 3.28: Vergleich der Anzahl der adhärrenden Bakterien des Stammes 3009 pro Krypte auf den einzelnen Biopsien ohne Zugabe einer Prüfsubstanz. Angegeben sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus den drei Test-Reihen

Der Vergleich der drei Test-Reihen in Gegenwart der Test-Substanzen ließ jedoch erkennen, dass keine der angewandten Prüfsubstanzen die Adhärenz um wenigstens 50% inhibierte (Abb. 3.29).

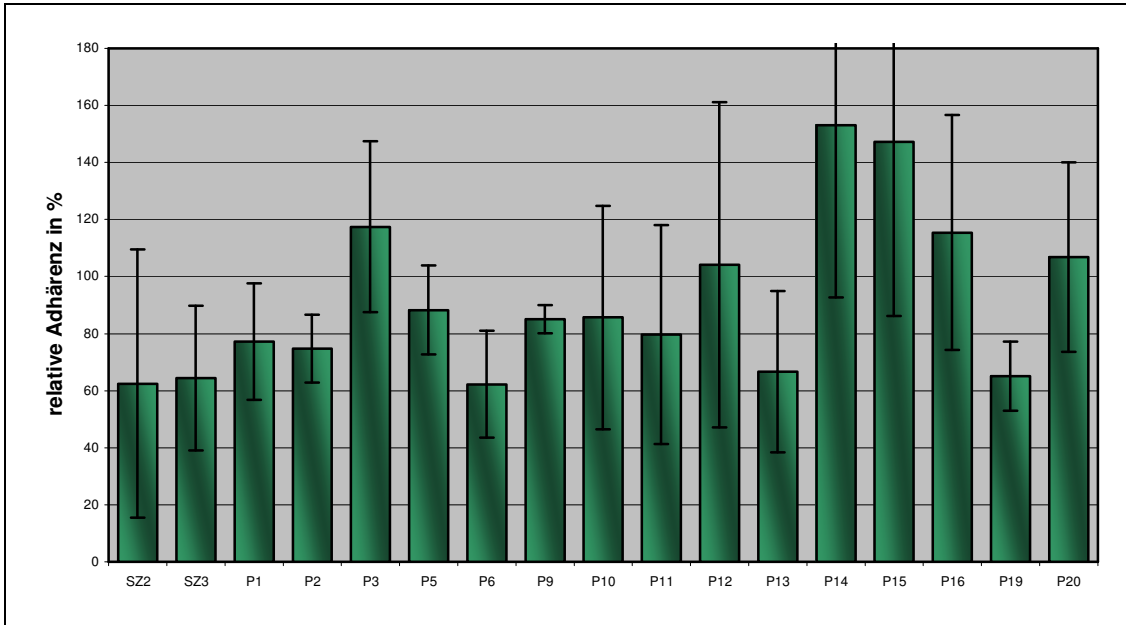


Abb. 3.29: relative Adhärenz des Stammes 3009 in Anwesenheit der Substanzen. Angegeben sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus den Ergebnissen der drei Test - Reihen

3.8. Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass keine der untersuchten Prüfsubstanzen die Adhärenz aller eingesetzten Stämme um $\geq 50\%$ zu inhibieren vermochte.

Die Substanz SZ2 inhibierte EAEC 5477/94, EHEC 5714 und SL1344 um mehr als 50%.

Die Substanz SZ3 verringerte die Adhäsionseffizienz von SL1344 und M90T um $\geq 50\%$.

Die Test-Substanz P3 reduzierte nur die Adhärenz von ETEC Stamm H10407 um mehr als 50%.

Substanz P12 inhibierte EPEC Stamm E2348/9 um mehr als 50%.

P20 inhibierte die Adhäsion von ETEC H10407 und SL1344 um $> 50\%$.

Die Prüfsubstanzen P7 und P17 inhibierten die Adhäsion von SL1344 um mehr als 50%. Jedoch standen diese Substanzen nur für die Test-Reihen mit SL1344

zur Verfügung, so dass ein Vergleich mit den anderen Stämmen leider nicht möglich war.

Bei dem EAEC Stamm 5477/94 war in Anwesenheit der Prüfsubstanzen P1 und P12 eine Verdopplung der Adhärenz zu beobachten.

Beim ETEC Stamm H10407 führte die Substanz P16 annähernd zu einer Verdopplung der Adhäsion.

4. Diskussion

In dieser Studie sollte eine Methodik etabliert werden, um Testsubstanzen auf eine mögliche Inhibierung der Adhäsion darmpathogener Bakterien an Kryoschnitten humaner Darmbiopsien prüfen zu können. Der Einsatz von Gefrierschnitten, die aus humanen Darmbiopsien gewonnen wurden, wurde deshalb gewählt, da dieses Material im Vergleich zu humanen Darmepithelzelllinien die in vivo Situation besser simuliert.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden zunächst die Herstellung der Kryoschnitte und die Färbetechnik optimiert. Danach war es möglich, die antiadhäsiven Effekte von Prüfsubstanzen auf die Adhärenz von ausgewählten darmpathogenen Bakterien zu bestimmen. Allerdings ergaben sich teilweise technische Probleme bei der Herstellung der Kryoschnitte und der Färbung, die sich nachteilig auf die Auswertbarkeit auswirkten.

4.1. Auswirkungen der Biopsie - Eigenschaften

Die für diese Studie verwendeten Biopsien wurden alle aus dem sigmoidalen Kolon, etwa 20cm distal des Rektums, entnommen. Für jeden der eingesetzten Stämme konnte, nach Testung unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen und Nährmedienzusätze, auch eine, für die Auswertung der Ergebnisse, ausreichende Adhärenz an den Gewebsschnitten erzielt werden.

Dem Gewebstropismus der Bakterien wurde jedoch in dieser Untersuchung nicht nachgekommen (siehe Tabelle 4.1.). Dies gilt in diesem Fall für die Stämme *Salmonella*, ETEC und EPEC.

Daher stellt sich die Frage, ob eine zahlenmäßig höhere Adhärenz erreicht werden könnte, wenn Biopsien aus den für die einzelnen Stämme präferierten Darmabschnitten eingesetzt würden.

Tabelle 4.1.: Tropismus der verwendeten Stämme (nach [17])

| Wirkorte | Infektionserreger |
|----------------------|--|
| Duodenum und Jejunum | <i>E.coli</i> (ETEC, EPEC) |
| Ileum | <i>Salmonella</i> |
| Colon | <i>E. coli</i> (EIEC, EHEC), <i>Shigella</i> |

Des Weiteren konnte nicht für alle drei Test-Reihen der einzelnen Stämme dieselbe Biopsie verwendet werden, da diese entweder nicht groß genug waren, oder ein zu hoher Verschleiß beim Schneiden der Gewebeproben auftrat.

Es wäre hilfreich, für die Tests mit den Prüfsubstanzen bei jedem Stamm zumindest dieselbe Biopsie zu verwenden, um zu verhindern, dass bei Verwendung unterschiedlicher Biopsien Varianzen in der Adhäsionseffizienz auftreten.

Für *S. flexneri* Stamm M90T konnte unter Verwendung derselben Biopsie in allen drei Test-Reihen gezeigt werden, dass die Bakterien ohne Zugabe einer Prüfsubstanz kaum Unterschiede in der relativen Adhärenz aufwiesen. Auch unter Zugabe der Test-Substanzen war daher eine sehr geringe Standardabweichung erwartet worden. Dies konnte auch bei den erzielten Ergebnissen bis auf wenige Ausnahmen (bei den Prüfsubstanzen P12, P14 und P15 ergaben sich Standardabweichungen von über 20%) bestätigt werden.

Bei den Analysen mit dem EHEC Stamm 5714 zeigte sich trotz des Einsatzes derselben Biopsie in den ersten beiden Test-Reihen eine Differenz von 40% und mehr in der relativen Adhärenz der Bakterien unter Zugabe der Prüfsubstanzen SZ3, P6 und P9. Auch hier wurde eigentlich erwartet, dass unter Zugabe derselben Test-Substanz die Bakterien mit annähernd gleicher Effizienz adhären würden.

Die Ursache dieser Schwankungen könnte in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

4.2. Auswirkungen der Färbung – Technik

Zum Einfärben der Kryoschnitte wurde die Pappenheim-Färbung gewählt (siehe Material und Methoden Teil), da sich aufgrund vorheriger Probefärbungen mit unterschiedlichen Färbetechniken und -lösungen gezeigt hatte, dass hiermit die beste Färbung erreicht werden konnte.

Es konnte jedoch, trotz identischem Färbeprotokoll, teilweise keine einheitliche Färbung der Schnitte erzielt werden. Mehrere Gründe kommen hierfür in Frage.

Zum Einen könnte eine unterschiedliche Schnittstelle, also Mitte oder Rand einer Biopsie, dazu beitragen, dass manche Schnitte viel heller gefärbt waren, als andere. Dies ließe sich eventuell dadurch verhindern, dass nur Schnitte aus der Mitte der Biopsie verwendet würden, da sich dadurch eher die Wahrscheinlichkeit ergibt, dass das geschnittene Gewebe die Farbstoffe gleichmäßig aufnimmt und keine Reste von Schleim etc. am Biopsie-Rand mitgeschnitten und mit eingebettet wurden.

Zum Anderen könnte eine sehr dunkle Färbung der Schnitte an den zugegebenen Test-Substanzen liegen. Dies kann aber ausgeschlossen werden, da nicht immer in Gegenwart derselben Testsubstanz eine dunklere Färbung erhalten wurde.

4.3. Die Analyseparameter

Um eine annähernd optimale Vergleichbarkeit unter den eingesetzten Stämmen zu erzielen, wurden für die Auszählung der adhärierenden Bakterien jeweils zehn querschnittene Krypten ausgewählt, die in ihrer Größe annähernd gleich waren. Die quantitative Auswertung erfolgte manuell am Lichtmikroskop.

Zum Einen war es leider nicht bei allen Schnitten möglich, zehn solcher Krypten aufzufinden. Deshalb wurden in einem solchen Fall nur fünf Krypten gezählt (die betroffenen Stämme bzw. Test-Reihen sind im Anhang gekennzeichnet).

Bei manchen Schnitten sah man ganz deutlich, dass kaum noch Krypten im Präparat zu finden waren, im Gegensatz zu anderen Schnitten, bei denen pro Schnitt 20 oder mehr quergeschnittene Krypten anzutreffen waren. Dies lässt vermuten, dass bei den Schnitten mit wenigen Krypten der Rand einer Biopsie verwendet wurde. Daher musste in diesem Fall die Anzahl der ausgewerteten Krypten auf fünf, statt zehn, pro Schnitt reduziert werden.

Dieses Vorgehen führte deshalb dazu, dass nicht alle Biopsien nach denselben Kriterien ausgewertet werden konnten.

Zum Anderen waren bei einigen Schnitten aufgrund der dunklen Färbung die an der Basalmembran adhärierenden Bakterien nicht zu erkennen und konnten dadurch ebenfalls nicht mitgezählt werden.

Ein weiteres Problem ergab sich bei der Auszählung durch teilweise starke Aggregation der Bakterien. Auch hier war es schwierig bis unmöglich zu erkennen, wie viele einzelne Bakterien hier zu zählen waren.

Eine andere Möglichkeit der Auswertung könnte eine Auszählung der adhärierenden Bakterien pro Gesichtsfeld sein. So werden auch Bakterien, die im interstitiellen Gewebe adhärirt haben, miteinbezogen. Dies wurde bei der vorliegenden Untersuchung jedoch nicht getan, da das Ziel war, in der in vivo Situation die Inhibierung der Adhäsion an die Enterozyten durch entsprechende Substanzen zu erreichen.

Desweiteren könnte man die Bakterien mit einem Fluoreszenz-Marker versehen und sie per Computer auszählen. Dadurch kann möglicherweise eine noch genauere Identifizierung einzelner Bakterien erreicht werden.

In der vorliegenden Untersuchung wurde eine Inhibierung der Adhärenz in Gegenwart einer Prüfsubstanz um mindestens fünfzig Prozent im Vergleich zur Adhäsionseffizienz in Abwesenheit einer Prüfsubstanz als relevant definiert. Es

kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Prüfsubstanzen, die in diesem Versuchsansatz keine relevante Inhibierung zeigten, unter in vivo Bedingungen doch inhibitorisch wirksam sind. Ebenso wenig auszuschließen ist, dass Prüfsubstanzen, die hier die bakterielle Adhärenz hemmten, auch in vivo antiadhäsiv wirksam sind.

Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit recht hoch, dass Substanzen, die in diesen in vitro Studien antiadhäsiv wirksam waren, auch unter anderen in vitro oder in vivo Bedingungen entsprechende Effekte zeigen. Dies wird durch Befunde aus Tierexperimenten untermauert, die parallel zu diesen Studien durchgeführt wurden. Im Mausmodell konnte für die Prüfsubstanzen SZ2 und SZ3 ein Schutz der Tiere gegen eine Salmonellainfektion gezeigt werden, wenn diese Substanzen als 1%ige Lösung im Trinkwasser angeboten wurde.

In der vorliegenden Studie inhibierten diese Substanzen die Adhäsion von *Salmonella* um ca. 50 %.

Das Hauptziel dieser Studie, Karbohydrate, die die Adhäsion humanmedizinisch bedeutender enteropathogener Bakterien an Kryoschnitten humaner Darmbiopsien zu inhibieren vermögen, zu identifizieren, wurde erreicht.

Karbohydrate wurden deshalb gewählt, weil Mannose schon vor etwa 30 Jahren als kompetitiver Rezeptorantagonist für Enterobakterien identifiziert wurde. Auch in jüngsten Studien über den Einsatz von Karbohydraten in der Anti-Adhäsions-Therapie konnten z.B. Glykopeptide als Inhibitoren für *E. coli* K99 oder Mannose als Inhibitor für *Shigella flexneri* eindeutig nachgewiesen werden [34].

Dies konnte in der vorliegenden Untersuchung für die Prüfsubstanzen SZ2, SZ3, P3, P12 und P20 gezeigt werden. Allerdings inhibiert keine der Prüfsubstanzen die Adhäsion aller eingesetzten Bakterien. Vielmehr war der antiadhäsive Effekt einer Substanz in dieser Studie jeweils auf ein oder zwei Bakterienstämme begrenzt. Nur für die Substanz SZ2 wurden mehr als zwei Bakterienstämme (EAEC 5477/99 und EHEC 5714) inhibiert, wenn die nur knapp über 50 % liegende relative Adhäsion von *S. flexneri* M90T (50,8 %) und

S. typhimurium SL1344 (51,3 %) auch als signifikant inhibierte Adhäsion interpretiert wird.

Zusammen mit den im genannten Mausmodell erhaltenen Resultaten für SZ2 ist diese Substanz jene, die am ehesten in weiteren Studien auf eine mögliche Anwendung in der Infektionsprävention gegen Darminfektionen verursacht von enteroaggregativen und enterohämorrhagischen *E. coli*, *S. flexneri* oder (vor allem) *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium einbezogen werden sollten.

In weiteren Studien könnte dann auch versucht werden, den Wirkmechanismus der antiinvasiven Prüfsubstanzen aufzuklären. Dies war jedoch nicht das Ziel dieser Studien.

5. Zusammenfassung

In der Bundesrepublik Deutschland kommt es jedes Jahr zu einer beträchtlichen Zahl von, teilweise sogar tödlich verlaufenden, bakteriell verursachten Darminfektionen. Gleichzeitig ist eine besorgniserregende Zunahme an Antibiotikaresistenzen und -unverträglichkeiten zu beobachten. Eine mögliche alternative Strategie zur Prävention und Therapie solcher Infektionen könnte die Blockierung der bakteriellen Adhäsion sein.

Dies wurde in einem in vitro Modell mit Kryoschnitten humaner Darmbiopsien und sechs ausgewählten humanpathogenen Enteritiserregern untersucht. Dazu wurden 17 Kohlenhydrate als 1%ige Lösung auf ihre antiadhäsive Wirksamkeit geprüft. Die Adhärenz des enteroaggregativen *E. coli* Stammes EAEC 5477/94, des enterohämorrhagischen *E. coli* Stammes EHEC 5714, des enteropathogenen *E. coli* Stammes EPEC E2348/96, des enterotoxigenen *E. coli* Stammes ETEC H10407, des *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Stammes SL1344 und des *Shigella flexneri* Stammes M90T sowie des als Positivkontrolle dienenden *Citrobacter freundii* Stammes 3009 wurden in An- und Abwesenheit der Prüfsubstanzen quantifiziert. Dazu wurden die Kryoschnitte mit Aliquots der entsprechenden Bakterienkulturen inkubiert, die Präparate anschließend gefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

Die Untersuchungen ergaben, dass nur die Substanz SZ2 die Adhäsion von drei Stämmen (EAEC 5477/94, EHEC 5714, SL1344) um mehr als 50 % inhibierte. Substanz SZ3 reduzierte die Adhäsionseffizienz von SL1344 und M90T um > 50 %. Auch die Gegenwart von Substanz P20 resultierte in einer um mehr als die Hälfte verringerten Adhäsion von zwei der untersuchten Darmpathogenen (ETEC H10407, SL1344). Die Adhärenz jeweils nur eines Bakterienstammes wurde durch P3 (ETEC H10407) und P12 (EPEC E2348/96) um mehr als 50 % verringert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass alleine die Prüfsubstanz SZ2 die Adhärenz von mehr als zwei Stämmen um mehr als 50% zu inhibieren vermochte.

Somit ist diese Substanz am ehesten erfolgversprechend in einem weiteren Einsatz in Studien über die Infektionsprophylaxe gegen enteroaggregative und enterohämorrhagische *E.coli*, *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium oder *S. flexneri*.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Bischoff, S.C.; Manns, M.P.: „Probiotika, Präbiotika und Synbiotika - Stellenwert in Klinik und Praxis“. Dt Ärztebl 102:A 752–759 (2005)
- [2] Levine, M.M.: “*Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent”. J Infect Dis 155: 377-389 (1987)
- [3] Holden, N.J.; Gally, D.L.: “Switches, cross-talk and memory in *Escherichia coli* adherence”. J Med Microbiol 53: 585-593 (2004)
- [4] Sprenger, H.; Gemsa, D.: „Angeborene Mechanismen der Infektabwehr“. In: Ganten, D.; Ruckpaul, K.(Hrsg.): „Immunsystem und Infektiologie“. Handbuch der molekularen Medizin, Band 4. Springer Verlag Berlin: 317-340 (1999)
- [5] Botzenhart, K.: „Mikroorganismen im Trinkwasser“. Dt Ärztebl 93: A2142–2144 (1996)
- [6] Steinbach, G.; Hartung, M.: „Versuch einer Schätzung des Anteils menschlicher Salmonellaerkrankungen, die auf vom Schwein stammende Lebensmittel zurückzuführen sind“. Berl Münch Tierärztl Wschr 106: 269-308 (1999)
- [7] Boyle, E.C.; Finlay, B.B.: “Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence”. Curr Opin Cell Biol 15: 633-639 (2003)
- [8] Eckmann, L.; Kagnoff, M.; Fierer, J.: “Intestinal epithelial cells as watchdogs for the natural immune system”. Trends Microbiol 3: 118–29 (1995)

- [9] Robert-Koch-Institut: „Falldefinitionen des Robert Koch-Instituts zur Übermittlung von Erkrankungs- oder Todesfällen und Nachweisen von Krankheitserregern“. Ausgabe 2004
- [10] Erckenbrecht, J.F.; Flesch, S.; Frieling, T.; Ziegler, D.; Wienbeck, M.; Caspary, W.: „Die autonome diabetische Neuropathie des Gastrointestinaltraktes“. Dt Ärztebl 93: A 1831–1835 (1996)
- [11] Flemmig, T.F.: „Immunologische Aspekte marginaler Parodontopathien“. Parodontologie 3: 203-222 (1990)
- [12] Saavedra, J.M.: „Clinical applications of probiotic agents“. Am J Clin Nutr 73(6): 1147S-1151S (2001)
- [13] Gregg, C.R.: „Enteric bacterial flora and bacterial overgrowth syndrome“. Semin Gastrointest Dis 13(4): 200-9 (2002)
- [14] Gross, R.; Goebel, W.: „Molekulare Mechanismen der Pathogenität von Bakterien.“ In: Ganten, D.; Ruckpaul, K.(Hrsg.): „Immunsystem und Infektiologie“. Handbuch der molekularen Medizin, Band 4. Springer Verlag Berlin: 233-298 (1999)
- [15] Guiney, D.G.: „The role of host cell death in *Salmonella* infections“. Curr Top Microbiol Immunol 289: 131-50 (2005)
- [16] Karch, H.; Bockemühl, J.; Huppertz, H.I.: Erkrankungen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC)“. Dt Ärztebl 97: A 2314–2318 (2000)
- [17] Hacker, J.; Heesemann, J.: „Molekulare Infektionsbiologie“. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (2000)

- [18] Autenrieth, I.B.: „Die Ökologie der humanen Darmflora: physiologische und pathophysiologische Aspekte“. J Ernährungsmed 2 (4): 6-9 (2000)
- [19] Veitl, V.: „Der Säuglingsdarm -Organ zur Abwehr und Allergieprävention“. J Ernährungsmed 4(3): 35-36 (2002)
- [20] Hammer, H. F.: „Diagnostik und Therapie der chronischen Durchfallerkrankung“. J Ernährungsmed 4 (3): 25-31 (2002)
- [21] Robert-Koch-Institut: „Epidemiologisches Bulletin“ Nr.50. (2004)
- [22] Hammer, H.F.; Aichbichler, B. :“Probiotika und Präbiotika: Grundlagen, Einsatz und Wirkungen beim gesunden und kranken Menschen“. J Ernährungsmed 5 (2): 16-24 (2003)
- [23] Köhne, G.; Schneider, T.; Zeitz, M.: „Mukosales, gastrointestinales Immunsystem (GIS)“. In: Ganten, D.; Ruckpaul, K.(Hrsg.): „Immunsystem und Infektiologie“. Handbuch der molekularen Medizin, Band 4. Springer Verlag Berlin: 106-125 (1999)
- [24] Hick, C.; Hick, A.(Hrsg.): „Kurzlehrbuch Physiologie“. 3. Auflage, Urban und Fischer Verlag München: 161 – 187 (2000)
- [25] Junqueira, L.C.; Carneiro, J.: „Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen“. übersetzt von Schiebler, T.H. 4. Auflage. Springer Verlag Berlin Heidelberg (1996)
- [26] Kiefer, I.; Berghofer, E.; Blass, M.; Burger, P.; Hoppichler, F.: „Functional Food - Lebensmittel mit Zusatznutzen?“. J Ernährungsmed 4 (2): 10-15 (2002)

- [27] Unger, S.: „Die Bedeutung von Pro- und Präbiotika in der Ernährung“. J Ernährungsmed. 1 (1): 22-29 (1999)
- [28] Hüttinger, C.: „Untersuchungen zur Aufklärung der in vivo-Funktion des Zytolysins ClyA von *Escherichia coli*“. Dissertation, Universität Würzburg (2003)
- [29] Grundmann, E.(Hrsg.): „Einführung in die allgemeine Pathologie“. 9. Auflage, Fisher Verlag Stuttgart (1996)
- [30] Klemm, P.; Schembri, M.A.: „Bacterial adhesins: function and structure“. Int J Med Microbiol 290: 27-35 (2000)
- [31] Schödel, F.: „Impfstoffe“. In: Ganten, D.; Ruckpaul, K.(Hrsg.): „Immunsystem und Infektiologie“. Handbuch der molekularen Medizin, Band 4. Springer Verlag Berlin: 367-385 (1999)
- [32] Ledochowski, M.; Fuchs, D.; Widner, B.: „Fruktosemalabsorption“. J Ernährungsmed 3 (1): 15-19 (2001)
- [33] Mathias, J.R.; Clench, M.H.: “Review: pathophysiology of diarrhea caused by bacterial overgrowth of the small intestine”. Am J Med Sci 289(6): 243-8 (1985)
- [34] Ofek, I.; Hasty, D.L.; Sharon, N.: “Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems”. FEMS Immunol Med Microbiol 38: 181-191 (2003)
- [35] Ölschläger, T.A.: „Adhesins as invasins“. Int J Med Microbiol 291: 7-14 (2001)

- [36] Papenbrock, S.: „Untersuchungen zum Einfluss einer groben Vermahlung des Futters und/oder eines Kalium-Diformiat-Zusatzes auf die Chymusqualität sowie die Aktivität und Zusammensetzung der Magen-Darm-Flora unter den Bedingungen einer experimentellen Infektion von Absetzferkeln mit Salmonella Derby“. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover (2004)
- [37] Robert-Koch-Institut: „Epidemiologisches Bulletin“ Nr.15. (2000)
- [39] Ullmann, U.: „Die Familie der Enterobacteriaceae“. In: Brandis, H.; Köhler, W.; Eggers, H.J.; Pulverer, G. (Hrsg.): „Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie“. 7. Auflage, Fischer Verlag Stuttgart: 390-424 (1994)
- [40] Lemberger, S.; Widhalm, K.: „Probiotika in Säuglingsmilchnahrungen“. J Ernährungsmed 5 (4): 4-7 (2003)
- [41] Robert-Koch-Institut: „Epidemiologisches Bulletin“ Nr.19. (2005)
- [42] Rosan, B.; Lamont, R.J.: “Dental plaque formation”. Microbes and Infection 2: 1599-1607 (2000)
- [43] Saltzman, J.R.; Russell, R.M.: „Nutritional consequences of intestinal bacterial overgrowth“. Compr Ther 20 (9): 523-30 (1994)
- [44] Vetter, C.: „*Helicobacter pylori*“. zm Zahnärztl Mitt 87 (7): 825-828 (1997)
- [45] Sonnenborn U.; Greinwald R.: „Beziehungen zwischen Wirtsorganismus und Darmflora“. Schattauer Verlag Stuttgart (1991)
- [46] Zimmerhackl, L.B.; Verweyen, H; Gerber, A.; Karch, H.; Brandis, M.: „Das hämolytisch-urämische Syndrom“. Dt Ärztebl 99: A 196–203 (2002)

- [47] Stuke, O.: „Untersuchungen zu möglichen infektionsprophylaktischen Effekten verschiedener Futterzusätze (Ameisen- und Zitronensäure / Lactulose / Pankreasenzyme) unter den Bedingungen einer experimentellen oralen Belastung mit *E. coli* (Absetzferkel) bzw. mit *S. derby* (Mastschweine)“. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover (2003)
- [48] Hahn, H.; Miksits, K.; Bhakdi, S.: „Grundbegriffe der Infektionslehre: Pathogenität, Virulenz und Infektion“. In: Hahn, H.; Falke, D.; Kaufmann, S.H.E.; Ullmann, U.(Hrsg.): „Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie“. 4. Auflage, Springer Verlag Berlin: 17-36 (2001)
- [49] Robert-Koch-Institut: „Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2002“ (2003)
- [50] Chaunchom, S.: „Assessment of *Salmonella* contamination using an antibody-ELISA test and a PCR technique in pigs at slaughter and on farm level“. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover (2003)
- [51] Weissman, S.J.; Moseley, S.L.; Dykhuizen, D.E.; Sokurenko, E.V.: „Enterobacterial adhesins and the case for studying SNPs in bacteria“. Trends Mikrobiol 11: 115-117 (2003)
- [52] Unger, F.M.; Viernstein, H.: „Probiotika: Regenerierende, prophylaktische und adjuvant-therapeutische Anwendungen“. J Ernährungsmed 6 (2): 24-29 (2004)
- [53] Heizmann, W.R.; Döller, P.C.; Kropp, S.; Bleich, S.: „Kurzlehrbuch medizinische Mikrobiologie und Immunologie“. 2. Auflage, Schattauer Verlag Stuttgart (1999)

- [54] Bär, W.: „Physiologische Bakterienflora: Kolonisationsresistenz, endogene Opportunisteninfektionen“. In: Hahn, H.; Falke, D.; Kaufmann, S.H.E.; Ullmann, U.(Hrsg.): „Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie“. 4. Auflage, Springer Verlag Berlin: 37-43 (2001)
- [55] Miksits, K.; Dierich, M.P.: „Resistenz“. In: Hahn, H.; Falke, D.; Kaufmann, S.H.E.; Ullmann, U.(Hrsg.): „Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie“. 4. Auflage, Springer Verlag Berlin: 821-823 (2001)
- [56] Young, J.A.; Cook, D.I.; Lingard, J.M.; Van Lennep, E.W.; Wegman, E.: „Funktion des Magen-Darm-Trakts“. In: Klinke, R.; Silbernagel, S. (Hrsg.): „Lehrbuch der Physiologie“. 2. Auflage: 387-434. Thieme Verlag Stuttgart (2000)
- [57] Tauchnitz, C.; Miksitz, K.: „Bakterielle Gastroenteritiden“. In: Hahn, H.; Falke, D.; Kaufmann, S.H.E.; Ullmann, U.(Hrsg.): „Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie“. 4. Auflage, Springer Verlag Berlin: 968-973 (2001)
- [58] Röllinghoff, M.: „Infektion und Infektionsabwehr“. In: Brandis, H.; Köhler, W.; Eggers, H.J.; Pulverer, G. (Hrsg.): „Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie“. 7. Auflage, Fischer Verlag Stuttgart: 18-48 (1994)
- [59] Isolauri, E.; Sütas, Y.; Kankaanpää, P.; Arvilommi, H.; Salminen, S.: „Probiotics: effects on immunity“. Am J Clin Nutr 73(suppl): 444S–50S (2001)
- [60] Isolauri, E.: „Probiotics in human disease“. Am J Clin Nutr 73(suppl):1142S–6S (2001)

- [61] Roberfroid, M.B.: "Prebiotics and probiotics: are they functional foods?". Am J Clin Nutr 71(suppl):1682S–7S (2000)
- [62] Kaur, N.; Guptak, A.K.: "Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition". J Biosci 27(7):703-14 (2002)
- [63] Empfehlungen der Ständigen Impfkommision (STIKO) am Robert-Koch-Institut /Stand: Juli 2004. Epidemiologisches Bulletin Nr.30 (2004)
- [64] Robert-Koch-Institut: „Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2004“ (2005)
- [65] Saavedra J.M., Bauman N.A., Oung I., Perman J.A., Yolken R.H.: „Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus". Lancet 15; 344(8929): 1046-9 (1994)
- [66] Gibson G.R., Wang X.: „Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria". J Appl Bacteriol 77(4): 412-20 (1994)
- [67] Collins, M.D.; Gibson, G.R.: "Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut". Am J Clin Nutr 69(suppl): 1052S–7S (1999)
- [68] Gibson, G.R.: "Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin". J Nutr 129: 1438S–1441S (1999)
- [69] Ziemer, C.J.; Gibson G.R.: "An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies". Int Dairy J 8: 473–9 (1998)

- [70] Young, G.: "Prevention of colon cancer: role of short chain fatty acids produced by intestinal flora". *Asia Pacific J Clin Nutr* 5: 44–7 (1996)
- [71] Schiffrin, E.J.; Brassart, D.; Servin, A.L.; Rochat, F.; Donnet-Hughes, A.: "Immune modulation of blood leukocytes in man by lactic acid bacteria. Criteria for strain selection". *Am J Clin Nutr* 66: 515S–520S (1997)
- [72] Mertens, Th.: „Grundlagen der aktiven Schutzimpfung und der passiven Immunisierung“. In: Brandis, H.; Köhler, W.; Eggers, H.J.; Pulverer, G. (Hrsg.): „Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie“. 7. Auflage, Fischer Verlag Stuttgart: 276-290 (1994)
- [73] Ma, J.K.; Hikmat, B.Y.; Wycoff, K.; Vine, N.D.; Chargelegue, D.; Yu, L.; Hein, M.B., Lehner, T.: "Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans". *Nat Med* 4: 601-606 (1998)
- [74] Moon, H.W.; Bunn, T.O.: "Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animals". *Vaccine* 11: 200-213 (1993)
- [75] Ofek, I.; Doyle, R.J.: "Recent developments in bacterial adhesion to animal cells." In: Ofek, I.; Doyle, R.J. (Hrsg.): "Bacterial Adhesion to Cells and Tissues". Chapman & Hall, New York: 321-512 (1994)
- [76] Robbins, J.B.; Schneerson, R.; Szu, S.C.: "Perspective: hypothesis: serum IgG antibody is sufficient to confer protection against infectious disease by inactivating the inoculum". *J Infect Dis* 171: 1387-1398 (1995)
- [77] Asano, N.: "Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use". *Glycobiology* vol.13 no.10: 93R-104R (2003)

- [78] Mittermayer, H.: „Mikrobielle Besiedlung des gesunden Menschen“. In: Brandis, H.; Köhler, W.; Eggers, H.J.; Pulverer, G. (Hrsg.): „Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie“. 7. Auflage, Fischer Verlag Stuttgart: 181-188 (1994)
- [79] Bernet-Camard, M.F.; Liédvin, V.; Brassart, D.; Neeser, J.R.; Servin, A.L.; Hudault, S.: “The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA 1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo”. *Appl Environ Microbiol* 63: 2747–53 (1997)
- [80] Geitz, C.: “ Molekulare Untersuchungen zu Virulenzfaktoren und Klonalität enterohämorrhagischer *Escherichia coli* der Serogruppe O103”. Inaugural-Dissertation, Universität Würzburg (2004)
- [81] Schmitt-Egenolf, M.; Sterry, W.: „Immunsystem Haut“. In: Ganten, D.; Ruckpaul, K.(Hrsg.): „Immunsystem und Infektiologie“. Handbuch der molekularen Medizin, Band 4. Springer Verlag Berlin: 87-105 (1999)
- [82] Gudzuhn, A.: „Virulenzfaktoren von *E. coli* aus gewaschenen Kolonbiopsien von Patienten mit kolorektalen Neoplasien“. Inaugural-Dissertation, Charité Berlin (2003)
- [83] Vetter, C.: „Der Morbus Crohn“. *zm Zahnärztl Mitt* 94 (7): 832-837 (2004)
- [84] Hess, P.: „Genetische und molekularbiologische Analyse von *fim* Determinanten bei *Citrobacter freundii* und *Escherichia coli*“. Dissertation, Universität Würzburg (2003)
- [85] Böttger, E.C.; Kern, P.: „Molekulare Mechanismen und klinische Aspekte der Resistenz“. In: Ganten, D.; Ruckpaul, K.(Hrsg.): „Immunsystem und

- Infektiologie“. Handbuch der molekularen Medizin, Band 4. Springer Verlag Berlin: 386-411 (1999)
- [86] Kühnel,W.: „Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie“. 10. Auflage. Thieme Verlag Stuttgart (1999)
- [87] Thomas, C.: „Histopathologie“. 11. Auflage, Springer Verlag Stuttgart (1992)
- [88] Hahn, H.; Bockemühl, J.: „Enterobakterien“. In: Hahn, H.; Falke, D.; Kaufmann, S.H.E.; Ullmann, U.(Hrsg.): „Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie“. 4. Auflage, Springer Verlag Berlin: 250-287 (2001)
- [89] Vetter, C.: „ Der Darmkrebs“. zm Zahnärztl Mitt 90 (7): 798-801 (2000)
- [90] Nougayrède, J.-P., J. Fernandes, P., Donnenberg, M.: „Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells“. Cellular Microbiology 5 (6): 359–372 (2003)
- [91] Nataro, J.P., Kaper, J.B.: „Diarrheagenic *Escherichia coli*“. Clin Microbiol Rev 11 (1): 142-201 (1998)
- [92] Baumler, A.J.; Tsolis, R.M.; Heffron, F.: “Fimbrial adhesins of *Salmonella typhimurium*. Role in bacterial interactions with epithelial cells”. Adv Exp Med Biol 412: 149-58 (1997)
- [93] Snellings, N.J.; Tall, B.D.; Venkatesan, M.M.: “Characterization of *Shigella* type 1 fimbriae: expression, FimA sequence, and phase variation.” Infect Immun 65(6): 2462-7 (1997)

- [94] Utsunomiya, A.; Nakamura, M.; Hamamoto, A.: "Expression of fimbriae and hemagglutination activity in *Shigella boydii*." *Microbiol Immunol* 44 (6): 529-31 (2000)
- [95] Andersson, B.; Porras, O.; Hanson, LA; Lagergard, T.; Svanborg-Eden C.: "Inhibition of attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by human milk and receptor oligosaccharides." *J Infect Dis* 153 (2): 232-7 (1986)
- [96] Saemann, M.D.; Weichhart, T.; Horl, W.H.; Zlabinger, G.J.: "Tamm-Horsfall protein: a multilayered defence molecule against urinary tract infection." *Eur J Clin Invest.* 35 (4): 227-35 (2005)
- [97] Sharon, N.; Ofek, I.: "Safe as mother's milk: Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for bacterial diseases." *Glycocon J* 17: 659-664 (2000)
- [98] Bavington, C.; Page, C.: "Stopping Bacterial Adhesion: A Novel Approach to Treating Infections." *Respiration* 72: 335-344 (2005)

7. Anhang

7.1. Rohdaten und Säulendiagramme

7.1.1. Der *Escherichia coli* Stamm EAEC 5477/94

Tab. 7.1: Absolutwerte und relative Adhärenz in % der 1. Test-Reihe des Stammes EAEC mit allen Testsubstanzen

| Test-Reihe 1 | | | | Test-Reihe 1 | |
|--------------|--------------|------------|------------|------------------------|--|
| | Absolutwerte | | | relative Adhärenz in % | |
| | Kontrolle | + Substanz | | | |
| SZ2 | 69 | 28,8 | SZ2 | 41,74 | |
| SZ3 | 69 | 35,2 | SZ3 | 51,01 | |
| P1 | 69 | 39 | P1 | 56,52 | |
| P2 | 69 | 28,2 | P2 | 40,86 | |
| P3 | 51,8 | 50,8 | P3 | 98,06 | |
| P5 | 51,8 | 35,4 | P5 | 68,33 | |
| P6 | 51,8 | 44 | P6 | 84,94 | |
| P9 | 51,8 | 67,6 | P9 | 130,51 | |
| P10 | 22,6 | 23,8 | P10 | 105,31 | |
| P11 | 22,6 | 23,4 | P11 | 103,54 | |
| P12 | 22,6 | 43,5 | P12 | 192,48 | |
| P13 | 22,6 | 16,2 | P13 | 71,68 | |
| P14 | 23,6 | 38,4 | P14 | 162,71 | |
| P15 | 23,6 | 25,4 | P15 | 107,63 | |
| P16 | 23,6 | 33,8 | P16 | 143,22 | |
| P19 | 51,2 | 25,2 | P19 | 49,22 | |
| P20 | 51,2 | 12,6 | P20 | 24,61 | |

Tab. 7.2: Absolutwerte und relative Adhärenz in % der 2. Test-Reihe des Stammes EAEC mit allen Testsubstanzen

| Test-Reihe 2 | | | | Test-Reihe 2 | |
|--------------|--------------|------------|------------|------------------------|--|
| | Absolutwerte | | | relative Adhärenz in % | |
| | Kontrolle | + Substanz | | | |
| SZ2 | 41,6 | 20,2 | SZ2 | 48,56 | |
| SZ3 | 41,6 | 12 | SZ3 | 28,85 | |
| P1 | 41,6 | 81,5 | P1 | 195,91 | |
| P2 | 41,6 | 29,2 | P2 | 70,19 | |
| P3 | 48,6 | 22,4 | P3 | 46,09 | |
| P5 | 48,6 | 64 | P5 | 131,69 | |
| P6 | 48,6 | 14,2 | P6 | 29,22 | |
| P9 | 48,6 | 22,2 | P9 | 45,68 | |
| P10 | 30,4 | 36,8 | P10 | 121,05 | |
| P11 | 30,4 | 46,2 | P11 | 151,97 | |
| P12 | 30,4 | 70,8 | P12 | 232,89 | |
| P13 | 30,4 | 11,8 | P13 | 38,81 | |
| P14 | 75,4 | 18,8 | P14 | 24,93 | |
| P15 | 75,4 | 51,8 | P15 | 68,70 | |
| P16 | 75,4 | 28,2 | P16 | 37,40 | |
| P19 | 66 | 37,2 | P19 | 56,36 | |
| P20 | 66 | 47,5 | P20 | 71,97 | |

Tab. 7.3: Absolutwerte und relative Adhärenz in % der 3. Test-Reihe des Stammes EAEC mit allen Testsubstanzen

| Test-Reihe 3 | | | | Test-Reihe 3 | |
|--------------|--------------|------------|------------|------------------------|--|
| | Absolutwerte | | | relative Adhärenz in % | |
| | Kontrolle | + Substanz | | | |
| SZ2 | 11,2 | 5,8 | SZ2 | 51,79 | |
| SZ3 | 11,2 | 13 | SZ3 | 116,07 | |
| P1 | 11,2 | 39,6 | P1 | 353,57 | |
| P2 | 11,2 | 18,2 | P2 | 162,50 | |
| P3 | 23,2 | 19,6 | P3 | 84,48 | |
| P5 | 23,2 | 34,2 | P5 | 147,41 | |
| P6 | 23,2 | 18,4 | P6 | 79,31 | |
| P9 | 23,2 | 19 | P9 | 81,89 | |

| | | | | |
|------------|------|------|------------|--------|
| P10 | 30 | 31,2 | P10 | 104 |
| P11 | 30 | 24,6 | P11 | 82 |
| P12 | 30 | 54,2 | P12 | 180,66 |
| P13 | 24,8 | 17,8 | P13 | 71,77 |
| P14 | 24,8 | 14 | P14 | 56,45 |
| P15 | 35 | 25,4 | P15 | 72,57 |
| P16 | 35 | 24,8 | P16 | 70,85 |
| P19 | 26,2 | 28,4 | P19 | 108,39 |
| P20 | 26,2 | 23,8 | P20 | 90,83 |

Tab. 7.4: Mittelwerte und Standardabweichung der relativen Adhärenz des Stammes EAEC für alle Testsubstanzen

| | Mittelwert der rel. Adhärenz | Standardabweichung |
|------------|-------------------------------------|---------------------------|
| SZ2 | 47,36 | 5,12 |
| SZ3 | 65,31 | 45,33 |
| P1 | 202,01 | 148,61 |
| P2 | 91,18 | 63,47 |
| P3 | 76,21 | 26,95 |
| P5 | 115,81 | 41,85 |
| P6 | 64,49 | 30,67 |
| P9 | 86,02 | 42,56 |
| P10 | 110,12 | 9,48 |
| P11 | 112,50 | 35,83 |
| P12 | 202,01 | 27,38 |
| P13 | 60,75 | 19,00 |
| P14 | 81,36 | 72,18 |
| P15 | 82,96 | 21,44 |
| P16 | 83,82 | 54,08 |
| P19 | 71,32 | 32,30 |
| P20 | 62,47 | 34,12 |

Tab. 7.5: Mittelwerte und Standardabweichung der Kontrollwerte pro Biopsie des Stammes EAEC

| | Mittelwert der Kontrollwerte pro Biopsie | Standardabweichung |
|--------------|--|--------------------|
| Reihe1: | | |
| Biopsie I/4 | 47,8 | 20,01 |
| Biopsie V/2 | 34,64 | 15,11 |
| | | |
| Reihe2: | | |
| Biopsie II/2 | 49,44 | 16,33 |
| | | |
| Reihe3: | | |
| Biopsie V/3 | 20,69 | 8,03 |
| Biopsie X/4 | 73,78 | 10,45 |

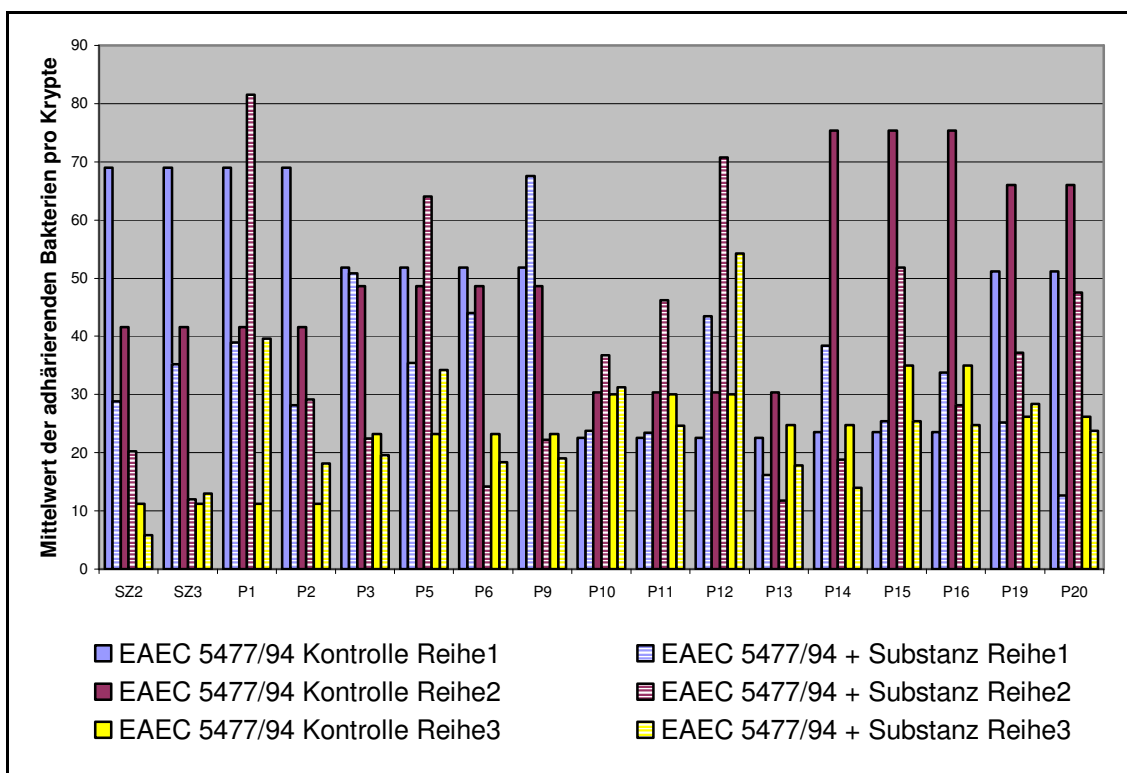


Abb. 7.1: Mittelwert der adhärenenden Bakterien pro Krypte des Stammes EAEC in An- und Abwesenheit der Substanzen. Abgebildet ist der Vergleich der Test-Reihen 1, 2 und 3

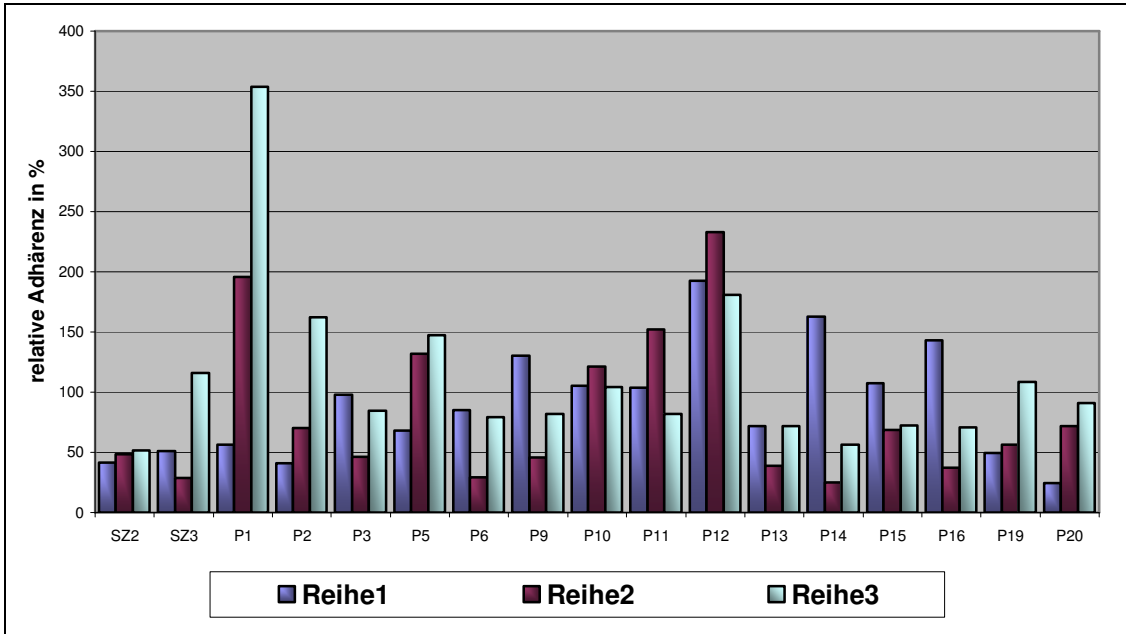


Abb. 7.2: relative Adhärenz des Stammes EAEC in Anwesenheit der Substanzen.
Abgebildet ist der Vergleich der Test-Reihen 1, 2 und 3

Anmerkungen zur Auswertung:

Es ergab sich beim Auszählen der adhärenierten Bakterien die Schwierigkeit, dass diese teilweise sehr stark verklumpten. Dadurch konnten einzelne Bakterien nicht differenziert und somit nicht einzeln ausgezählt werden. Dies wurde vor allem in der zweiten Test-Reihe mit den Substanzen P1 und P5 deutlich.

In der gesamten zweiten Test-Reihe wurden aufgrund der geringen Schnittgröße nur fünf Krypten zur Auswertung herangezogen. In der dritten Test-Reihe traf dies auf die Schnitte mit den Substanzen SZ2, SZ3, P1, P2, P13 und P14 zu.

Zuletzt muss angemerkt werden, dass sich sowohl in der zweiten, als auch in der dritten Test-Reihe, trotz identischem Färbeprotokoll, bei den Substanzen P6, P9 und P13 die Schnitte sehr dunkel färbten und damit die Auswertung ebenfalls erschwert wurde.

7.1.2. Der *Escherichia coli* Stamm EHEC 5714

Tab. 7.6: Absolutwerte und relative Adhärenz in % der 1. Test-Reihe des Stammes EHEC mit allen Testsubstanzen

| Test-Reihe 1 | | | Test-Reihe 1 | |
|--------------|--------------|------------|--------------|------------------------|
| | Absolutwerte | | | relative Adhärenz in % |
| | Kontrolle | + Substanz | | |
| SZ2 | 10,2 | 4,5 | SZ2 | 44,11 |
| SZ3 | 10,2 | 11,8 | SZ3 | 115,68 |
| P1 | 10,5 | 12,1 | P1 | 115,23 |
| P2 | 10,5 | 17,5 | P2 | 166,66 |
| P3 | 18,2 | 12,4 | P3 | 68,131 |
| P5 | 18,2 | 8,6 | P5 | 47,25 |
| P6 | 19,1 | 11,8 | P6 | 61,78 |
| P9 | 19,1 | 7,6 | P9 | 39,79 |
| P10 | 15,8 | 13,1 | P10 | 82,91 |
| P11 | 15,8 | 10,4 | P11 | 65,82 |
| P12 | 14,4 | 8,5 | P12 | 59,02 |
| P13 | 14,4 | 13,5 | P13 | 93,75 |
| P14 | 13,6 | 13,8 | P14 | 101,47 |
| P15 | 13,6 | 11,3 | P15 | 83,08 |
| P16 | 12,4 | 11,9 | P16 | 95,96 |
| P19 | 12,4 | 12 | P19 | 96,77 |
| P20 | 10,5 | 9,1 | P20 | 86,66 |

Tab. 7.7: Absolutwerte und relative Adhärenz in % der 2. Test-Reihe des Stammes EHEC mit allen Testsubstanzen

| Test-Reihe 2 | | | Test-Reihe 2 | |
|--------------|--------------|------------|--------------|------------------------|
| | Absolutwerte | | | relative Adhärenz in % |
| | Kontrolle | + Substanz | | |
| SZ2 | 12,5 | 7,2 | SZ2 | 57,6 |
| SZ3 | 12,5 | 7,7 | SZ3 | 61,6 |
| P1 | 10,5 | 10,3 | P1 | 98,09 |
| P2 | 10,5 | 16,5 | P2 | 157,14 |
| P3 | 11,4 | 8 | P3 | 70,17 |
| P5 | 11,4 | 8,4 | P5 | 73,68 |

| | | | | |
|------------|------|------|------------|--------|
| P6 | 11,9 | 11,7 | P6 | 98,31 |
| P9 | 11,9 | 9,2 | P9 | 77,31 |
| P10 | 10,3 | 7,8 | P10 | 75,72 |
| P11 | 10,3 | 9,1 | P11 | 88,34 |
| P12 | 11,5 | 8,1 | P12 | 70,43 |
| P13 | 11,5 | 9 | P13 | 78,26 |
| P14 | 11,2 | 12 | P14 | 107,14 |
| P15 | 11,2 | 10,7 | P15 | 95,53 |
| P16 | 10,2 | 10 | P16 | 98,03 |
| P19 | 10,2 | 10,7 | P19 | 104,92 |
| P20 | 10,8 | 8 | P20 | 74,074 |

Tab. 7.8: Absolutwerte und relative Adhärenz in % der 3. Test-Reihe des Stammes EHEC mit allen Testsubstanzen

| Test-Reihe 3 | | Test-Reihe 3 | | |
|---------------------|---------------------|---------------------|------------|-------------------------------|
| | Absolutwerte | | | relative Adhärenz in % |
| | Kontrolle | + Substanz | | |
| SZ2 | 10,7 | 3,9 | SZ2 | 36,44 |
| SZ3 | 10,7 | 6,7 | SZ3 | 62,6168 |
| P1 | 10,7 | 10,1 | P1 | 94,39 |
| P2 | 11,2 | 8,3 | P2 | 74,11 |
| P3 | 11,2 | 7,8 | P3 | 69,64 |
| P5 | 11,2 | 9,4 | P5 | 83,92 |
| P6 | 10,2 | 9,7 | P6 | 95,09 |
| P9 | 10,2 | 6,7 | P9 | 65,68 |
| P10 | 10,2 | 9,6 | P10 | 94,11 |
| P11 | 11,4 | 6,9 | P11 | 60,52 |
| P12 | 12,1 | 11,4 | P12 | 94,21 |
| P13 | 11,4 | 9 | P13 | 78,94 |
| P14 | 11,4 | 11,1 | P14 | 97,36 |
| P15 | 12,1 | 8,3 | P15 | 68,59 |
| P16 | 12,1 | 11,1 | P16 | 91,73 |
| P19 | 10,8 | 9 | P19 | 83,33 |
| P20 | 10,8 | 9,8 | P20 | 90,74 |

Tab. 7.9: Mittelwerte und Standardabweichung der relativen Adhärenz des Stammes EHEC für alle Testsubstanzen

| | Mittelwert rel. Adhärenz | Standardabweichung |
|------------|---------------------------------|---------------------------|
| SZ2 | 46,05 | 10,71 |
| SZ3 | 79,96 | 30,93 |
| P1 | 102,57 | 11,12 |
| P2 | 132,63 | 50,91 |
| P3 | 69,31 | 1,06 |
| P5 | 68,28 | 18,92 |
| P6 | 85,06 | 20,23 |
| P9 | 60,92 | 19,20 |
| P10 | 84,25 | 9,26 |
| P11 | 71,56 | 14,77 |
| P12 | 74,55 | 17,95 |
| P13 | 83,65 | 8,75 |
| P14 | 101,99 | 4,91 |
| P15 | 82,41 | 13,48 |
| P16 | 95,24 | 3,21 |
| P19 | 95,01 | 10,89 |
| P20 | 83,82 | 8,68 |

Tab. 7.10: Mittelwerte und Standardabweichung der Kontrollwerte pro Biopsie des Stammes EHEC

| | Mittelwert der Kontrollwerte pro Biopsie | Standardabweichung |
|--------------|---|---------------------------|
| Reihe1: | | |
| BiopsieIII/4 | 14,05 | 3,21 |
| | | |
| Reihe2: | | |
| BiopsieIII/4 | 11,16 | 0,76 |
| | | |
| Reihe3: | | |
| BiopsieX/4 | 11,08 | 0,63 |

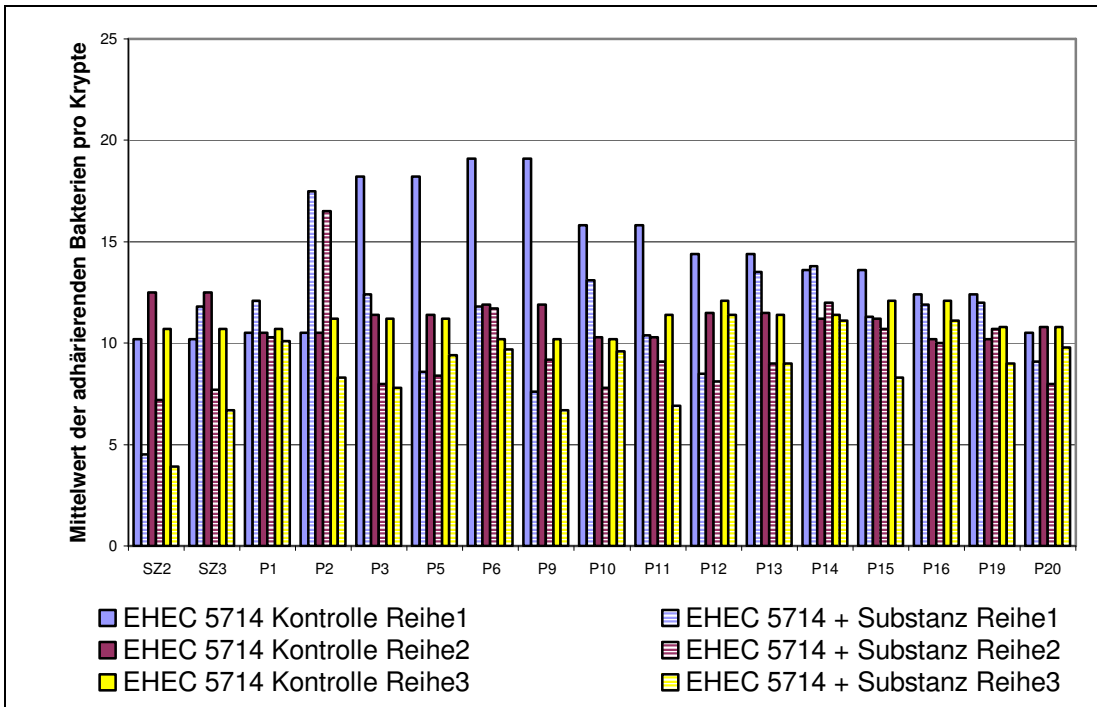


Abb. 7.3: Mittelwert der adhärenenden Bakterien pro Krypte des Stammes EHEC in An- und Abwesenheit der Substanzen. Abgebildet ist der Vergleich der Test-Reihen 1, 2 und 3

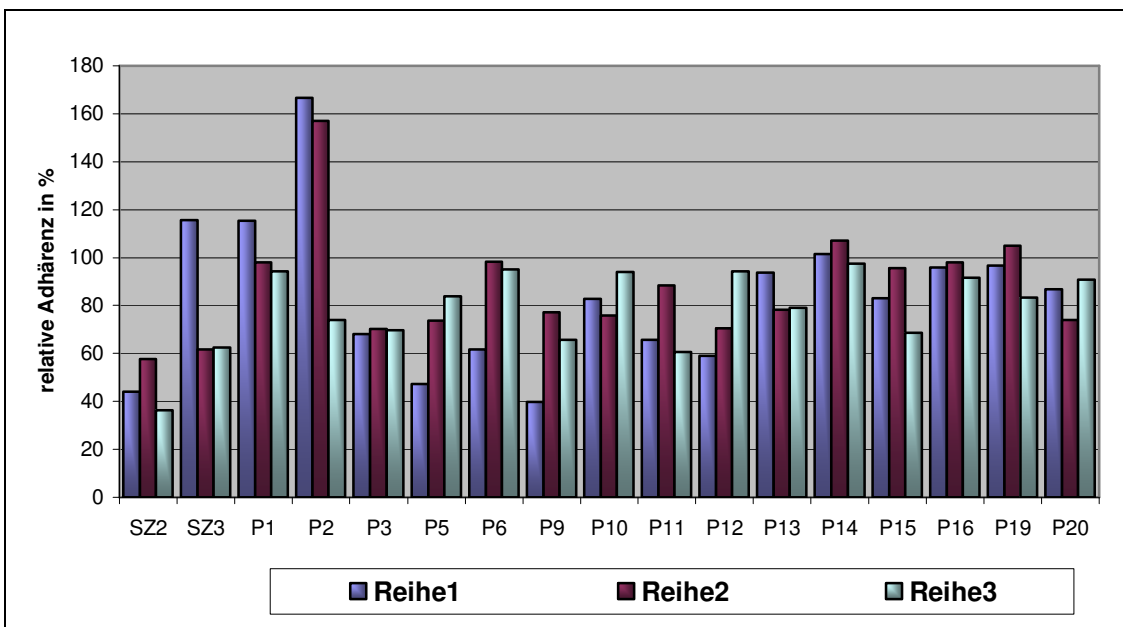


Abb. 7.4: relative Adhärenz des Stammes EHEC in Anwesenheit der Substanzen. Abgebildet ist der Vergleich der Test-Reihen 1, 2 und 3

7.1.3. Der *Escherichia coli* Stamm EPEC E2348/9

Tab. 7.11: Absolutwerte und relative Adhärenz in % der 1. Test-Reihe des Stammes EPEC mit allen Testsubstanzen

| Test-Reihe 1 | | | Test-Reihe 1 | |
|--------------|--------------|------------|--------------|------------------------|
| | Absolutwerte | | | relative Adhärenz in % |
| | Kontrolle | + Substanz | | |
| SZ2 | 28,6 | 33,1 | SZ2 | 115,73 |
| SZ3 | 28,6 | 18 | SZ3 | 62,94 |
| P1 | 28,6 | 18,1 | P1 | 63,87 |
| P2 | 26,5 | 17 | P2 | 64,15 |
| P3 | 26,5 | 24,7 | P3 | 93,21 |
| P5 | 26,5 | 22,7 | P5 | 85,67 |
| P6 | 30,8 | 34 | P6 | 110,39 |
| P9 | 30,8 | 14,5 | P9 | 47,08 |
| P10 | 30,8 | 36 | P10 | 116,88 |
| P11 | 33,9 | 42,8 | P11 | 126,25 |
| P12 | 33,9 | 24 | P12 | 70,8 |
| P13 | 33,9 | 19 | P13 | 56,05 |
| P14 | 29,7 | 24,4 | P14 | 82,15 |
| P15 | 29,7 | 32 | P15 | 107,74 |
| P16 | 29,7 | 30,5 | P16 | 102,7 |
| P19 | 32,4 | 13,9 | P19 | 42,9 |
| P20 | 32,4 | 17,6 | P20 | 54,32 |

Tab. 7.12: Absolutwerte und relative Adhärenz in % der 2. Test-Reihe des Stammes EPEC mit allen Testsubstanzen

| Test-Reihe 2 | | | Test-Reihe 2 | |
|--------------|--------------|------------|--------------|------------------------|
| | Absolutwerte | | | relative Adhärenz in % |
| | Kontrolle | + Substanz | | |
| SZ2 | 42,7 | 32,1 | SZ2 | 75,17 |
| SZ3 | 42,7 | 22,8 | SZ3 | 53,39 |
| P1 | 42,7 | 34,9 | P1 | 81,73 |
| P2 | 42,7 | 30,5 | P2 | 71,42 |
| P3 | 51,1 | 35,7 | P3 | 69,86 |

| | | | | |
|------------|------|------|------------|--------|
| P5 | 51,1 | 61,2 | P5 | 119,76 |
| P6 | 51,1 | 47,8 | P6 | 93,54 |
| P9 | 51,1 | 80,3 | P9 | 157,14 |
| P10 | 44,8 | 42,4 | P10 | 94,64 |
| P11 | 44,8 | 33,6 | P11 | 75 |
| P12 | 44,8 | 6,8 | P12 | 15,17 |
| P13 | 44,8 | 27 | P13 | 60,26 |
| P14 | 76,2 | 68,2 | P14 | 89,50 |
| P15 | 76,2 | 78,8 | P15 | 103,41 |
| P16 | 76,2 | 63,2 | P16 | 82,93 |
| P19 | 72,2 | 48,6 | P19 | 67,31 |
| P20 | 72,2 | 38,6 | P20 | 53,46 |

Tab. 7.13: Absolutwerte und relative Adhärenz in % der 3. Test-Reihe des Stammes EPEC mit allen Testsubstanzen

| Test-Reihe 3 | | | | Test-Reihe 3 |
|---------------------|---------------------|------------|------------|-------------------------------|
| | Absolutwerte | | | relative Adhärenz in % |
| | Kontrolle | + Substanz | | |
| SZ2 | 34,6 | 34,4 | SZ2 | 99,42 |
| SZ3 | 34,6 | 31 | SZ3 | 89,59 |
| P1 | 62,8 | 30,4 | P1 | 48,40 |
| P2 | 62,8 | 49,4 | P2 | 78,66 |
| P3 | 63,4 | 29,8 | P3 | 47 |
| P5 | 63,4 | 32,4 | P5 | 51,10 |
| P6 | 57,4 | 33,8 | P6 | 58,88 |
| P9 | 57,4 | 30 | P9 | 52,26 |
| P10 | 72,8 | 42,8 | P10 | 58,79 |
| P11 | 72,8 | 50,6 | P11 | 69,50 |
| P12 | 70,2 | 35,2 | P12 | 50,14 |
| P13 | 70,2 | 48,8 | P13 | 69,51 |
| P14 | 70,2 | 26,4 | P14 | 37,60 |
| P15 | 64,2 | 69,2 | P15 | 107,78 |
| P16 | 64,2 | 79 | P16 | 123,05 |
| P19 | 64,2 | 97,4 | P19 | 151,71 |
| P20 | 64,2 | 78,4 | P20 | 122,11 |

Tab. 7.14: Mittelwerte und Standardabweichung der relativen Adhärenz des Stammes EPEC für alle Testsubstanzen

| | Mittelwert der rel.Adhärenz | Standardabweichung |
|------------|------------------------------------|---------------------------|
| SZ2 | 96,77 | 20,41 |
| SZ3 | 68,64 | 18,76 |
| P1 | 64,67 | 16,677 |
| P2 | 71,41 | 7,256 |
| P3 | 70,02 | 23,1 |
| P5 | 85,51 | 34,33 |
| P6 | 87,61 | 26,26 |
| P9 | 85,49 | 62,1 |
| P10 | 90,1 | 29,3 |
| P11 | 90,25 | 31,29 |
| P12 | 45,37 | 28,11 |
| P13 | 61,94 | 6,88 |
| P14 | 69,75 | 28,08 |
| P15 | 106,31 | 2,51 |
| P16 | 102,89 | 20,05 |
| P19 | 87,31 | 57,09 |
| P20 | 76,63 | 39,39 |

Tab. 7.15: Mittelwerte und Standardabweichung der Kontrollwerte pro Biopsie des Stammes EPEC

| | Mittelwert der Kontrollwerte pro Biopsie | Standardabweichung |
|-------------|---|---------------------------|
| Reihe1: | | |
| BiopsieX/4 | 30,19 | 2,51 |
| | | |
| Reihe2: | | |
| BiopsieV/2 | 54,55 | 13,73 |
| | | |
| Reihe3: | | |
| Biopsie I/4 | 61,72 | 11,1 |

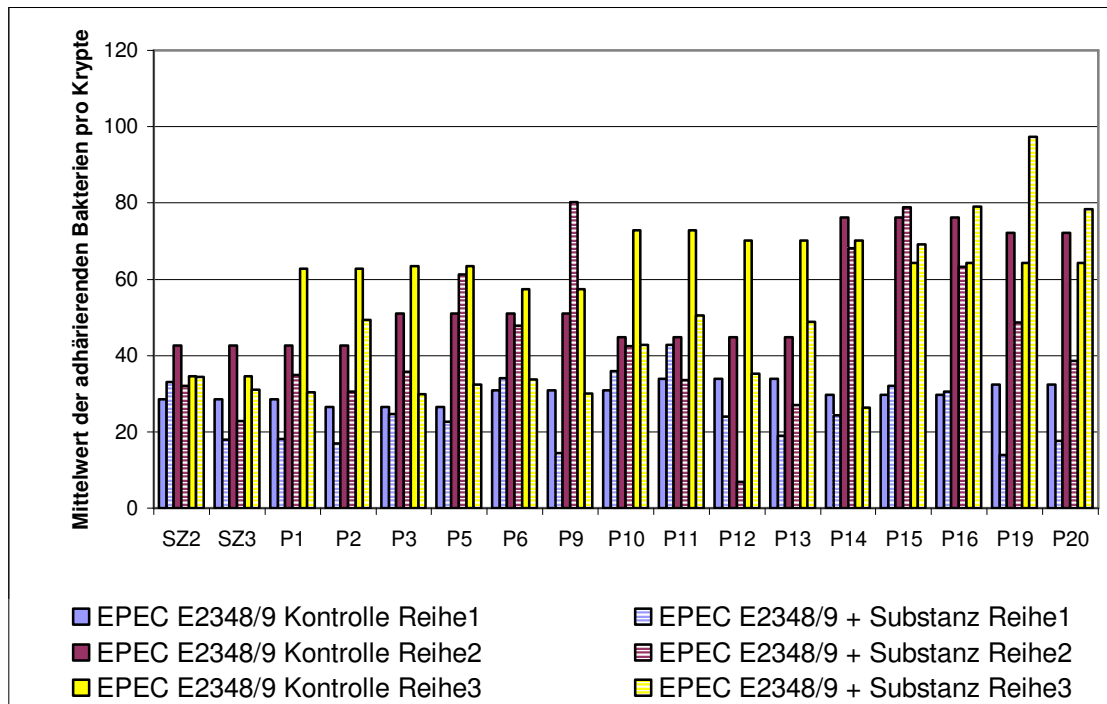


Abb. 7.5: Mittelwert der adhärenenden Bakterien pro Krypte des Stammes EPEC in An- und Abwesenheit der Substanzen. Abgebildet ist der Vergleich der Test-Reihen 1, 2 und 3

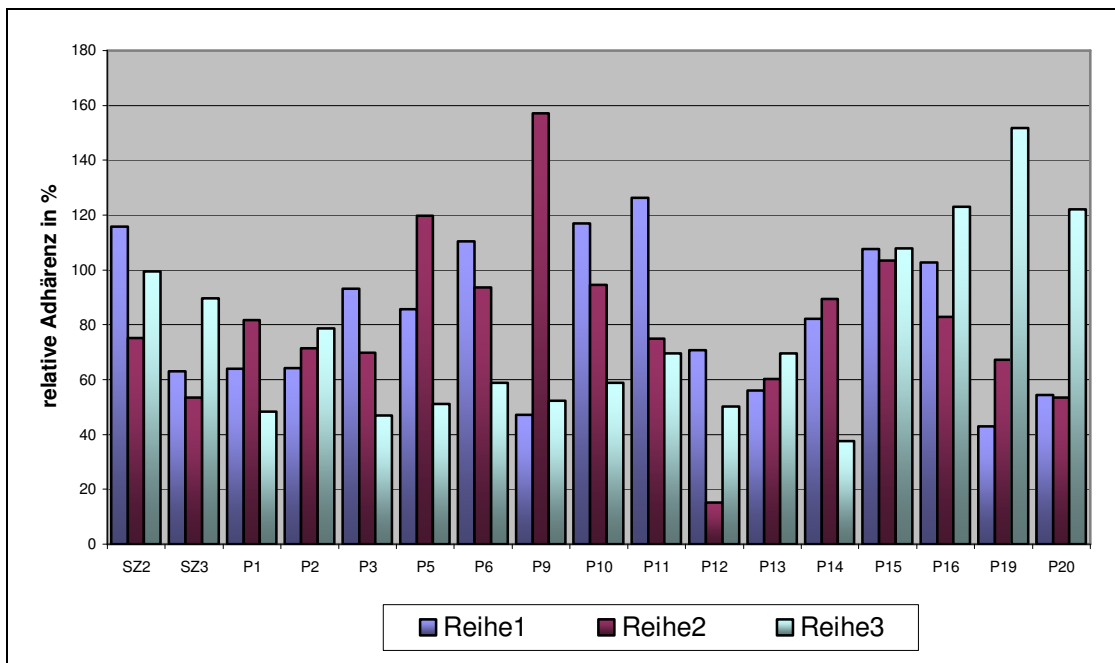


Abb. 7.6: relative Adhärenz des Stammes EPEC in Anwesenheit der Substanzen. Abgebildet ist der Vergleich der Test-Reihen 1, 2 und 3

Anmerkungen zur Auswertung:

Bei der Auswertung dieser Adhäsionsexperimente ergaben sich ähnliche Probleme wie beim Stamm EAEC 5477/94.

Zum Ersten waren trotz identischen Färbeprotokolls bei den Prüfsubstanzen P3, P5, P16 in der ersten Test-Reihe und bei den Prüfsubstanzen P6 und P9 in der zweiten Test-Reihe die Schnitte sehr dunkel gefärbt, so dass die Auszählung dadurch erschwert wurde.

Zum Zweiten bildeten sich in Test-Reihe 1 bei der Prüfsubstanz P11, in der Test-Reihe 2 bei allen Prüfsubstanzen und in der Test-Reihe 3 bei den Substanzen P19 und P20 dicke Bakterienkolonien. Dadurch konnten die einzelnen Bakterien nicht sicher differenziert und ausgezählt werden.

Zum Dritten wurden in der dritten Test-Reihe bei den Substanzen SZ2, SZ3, P15, P16, P17, P18 und P19 nur fünf Krypten ausgewertet, da es bei diesen Schnitten nicht möglich war, zehn annähernd identische Krypten zur Auswertung heranzuziehen.

7.1.4. Der *Escherichia coli* Stamm ETEC H10407

Tab. 7.16: Absolutwerte und relative Adhärenz in % der 1. Test-Reihe des Stammes ETEC mit allen Testsubstanzen

| Test-Reihe 1 | | | | Test-Reihe 1 | |
|--------------|--------------|--|------------|------------------------|--------|
| | Absolutwerte | | | relative Adhärenz in % | |
| | Kontrolle | | + Substanz | | |
| SZ2 | 26 | | 12,2 | SZ2 | 46,92 |
| SZ3 | 26 | | 13,8 | SZ3 | 53,08 |
| P1 | 26 | | 10,6 | P1 | 40,78 |
| P2 | 34 | | 25,6 | P2 | 75,3 |
| P3 | 34 | | 11,7 | P3 | 34,41 |
| P5 | 34 | | 24,7 | P5 | 72,65 |
| P6 | 32,8 | | 46,2 | P6 | 140,85 |
| P9 | 32,8 | | 41,6 | P9 | 126,83 |
| P10 | 32,8 | | 34 | P10 | 103,66 |
| P11 | 41,2 | | 54,8 | P11 | 133 |

| | | | | |
|------------|------|------|------------|--------|
| P12 | 41,2 | 41,6 | P12 | 100,1 |
| P13 | 41,2 | 31 | P13 | 75,24 |
| P14 | 22,4 | 23 | P14 | 102,68 |
| P15 | 22,4 | 42 | P15 | 187,5 |
| P16 | 22,4 | 67,3 | P16 | 300,45 |
| P19 | 61,2 | 37,6 | P19 | 61,44 |
| P20 | 61,2 | 34,2 | P20 | 55,88 |

Tab. 7.17: Absolutwerte und relative Adhärenz in % der 2. Test-Reihe des Stammes ETEC mit allen Testsubstanzen

| Test-Reihe 2 | | | | Test-Reihe 2 | |
|--------------|--------------|------------|------------|------------------------|--|
| | Absolutwerte | | | relative Adhärenz in % | |
| | Kontrolle | + Substanz | | | |
| SZ2 | 72 | 43 | SZ2 | 59,72 | |
| SZ3 | 72 | 53,6 | SZ3 | 74,44 | |
| P1 | 72 | 75,8 | P1 | 105,27 | |
| P2 | 72 | 38,3 | P2 | 53,19 | |
| P3 | 96,8 | 66,6 | P3 | 68,8 | |
| P5 | 96,8 | 65 | P5 | 67,14 | |
| P6 | 96,8 | 72 | P6 | 74,38 | |
| P9 | 96,8 | 69 | P9 | 71,28 | |
| P10 | 84,4 | 97,4 | P10 | 115,4 | |
| P11 | 84,4 | 107,4 | P11 | 127,25 | |
| P12 | 84,4 | 61,6 | P12 | 72,98 | |
| P13 | 84,4 | 65,6 | P13 | 77,72 | |
| P14 | 51,8 | 53,6 | P14 | 103,47 | |
| P15 | 51,8 | 103 | P15 | 198,84 | |
| P16 | 51,8 | 97 | P16 | 187,25 | |
| P19 | 148,5 | 112 | P19 | 75,42 | |
| P20 | 148,5 | 52 | P20 | 35,01 | |

Tab. 7.18: Absolutwerte und relative Adhärenz in % der 3. Test-Reihe des Stammes ETEC mit allen Testsubstanzen

| Test-Reihe 3 | | | Test-Reihe 3 | |
|--------------|--------------|------------|--------------|------------------------|
| | Absolutwerte | | | relative Adhärenz in % |
| | Kontrolle | + Substanz | | |
| SZ2 | 9,9 | 11,1 | SZ2 | 112,12 |
| SZ3 | 9,9 | 7 | SZ3 | 70,70 |
| P1 | 9,9 | 16,2 | P1 | 163,63 |
| P2 | 9,9 | 7,9 | P2 | 79,79 |
| P3 | 34,5 | 8,9 | P3 | 25,79 |
| P5 | 34,5 | 24,7 | P5 | 71,59 |
| P6 | 34,5 | 4 | P6 | 11,59 |
| P9 | 34,5 | 5,3 | P9 | 15,36 |
| P10 | 16,6 | 24,9 | P10 | 150 |
| P11 | 16,6 | 5,3 | P11 | 31,92 |
| P12 | 16,6 | 27,5 | P12 | 165,66 |
| P13 | 16,6 | 3,4 | P13 | 20,48 |
| P14 | 27,5 | 9 | P14 | 32,72 |
| P15 | 27,5 | 7,5 | P15 | 27,27 |
| P16 | 27,5 | 15,5 | P16 | 56,36 |
| P19 | 27,5 | 38,5 | P19 | 140 |
| P20 | 92,5 | 41 | P20 | 44,32 |

Tab. 7.19: Mittelwerte und Standardabweichung der relativen Adhärenz des Stammes ETEC für alle Testsubstanzen

| | Mittelwert der rel.Adhärenz | Standardabweichung |
|------------|-----------------------------|--------------------|
| SZ2 | 72,92 | 34,54 |
| SZ3 | 66,07 | 11,41 |
| P1 | 103,23 | 61,45 |
| P2 | 69,43 | 14,23 |
| P3 | 43 | 22,75 |
| P5 | 70,46 | 2,91 |
| P6 | 75,6 | 64,63 |
| P9 | 71,15 | 55,73 |
| P10 | 123,02 | 24,09 |
| P11 | 97,39 | 56,76 |

| | | |
|------------|--------|--------|
| P12 | 112,9 | 47,64 |
| P13 | 57,81 | 32,35 |
| P14 | 79,62 | 40,61 |
| P15 | 137,87 | 95,94 |
| P16 | 181,35 | 122,15 |
| P19 | 92,28 | 41,90 |
| P20 | 45,07 | 10,45 |

Tab. 7.20: Mittelwerte und Standardabweichung der Kontrollwerte pro Biopsie des Stammes ETEC

| | Mittelwert der Kontrollwerte pro Biopsie | Standard- abweichung |
|--------------|---|---------------------------------|
| Reihe1: | | |
| BiopsieX/4 | 34,8 | 11,79 |
| | | |
| Reihe2: | | |
| Biopsie I/4 | 86,18 | 28,04 |
| | | |
| Reihe3: | | |
| BiopsieV/3 | 22,12 | 9,82 |
| Biopsie II/2 | 92,5 | 0 |

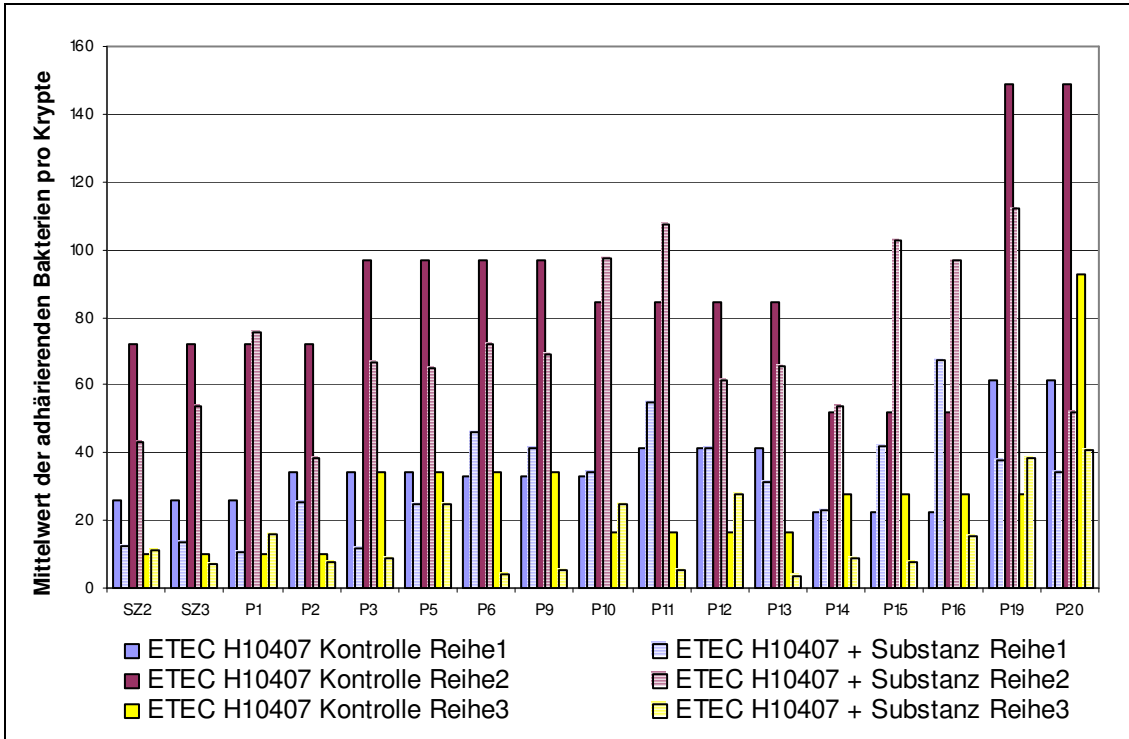


Abb. 7.7: Mittelwert der adhärenenden Bakterien pro Krypte des Stammes EAEC in An- und Abwesenheit der Substanzen. Abgebildet ist der Vergleich der Test-Reihen 1, 2 und 3

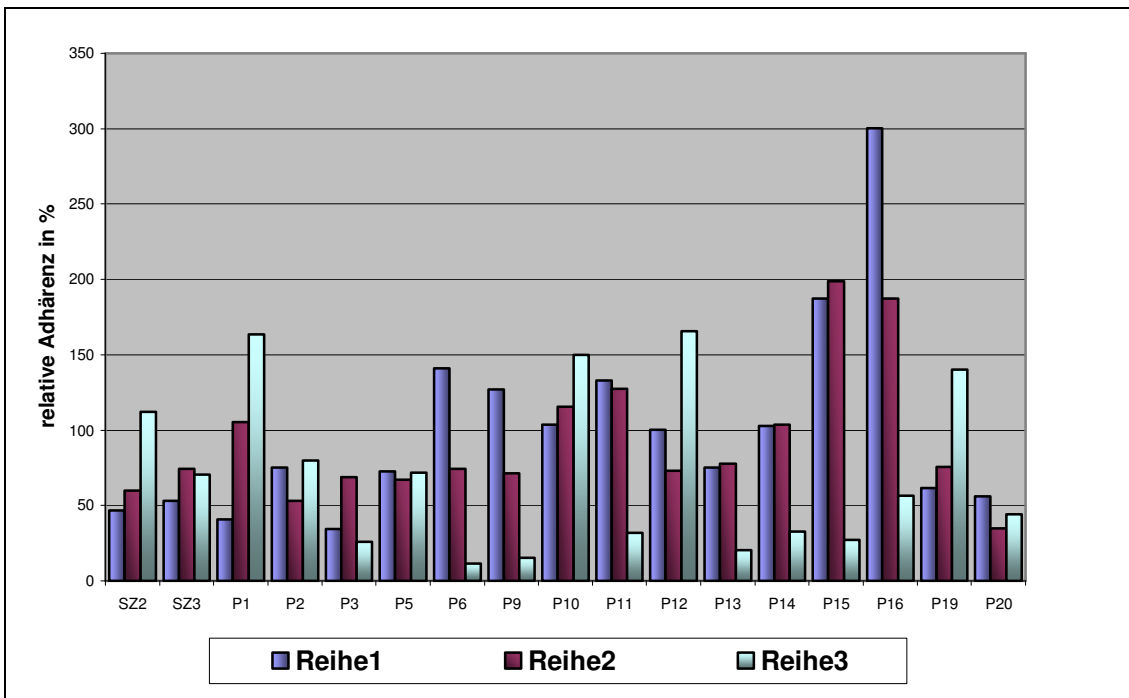


Abb. 7.8: relative Adhärenz des Stammes EAEC in Anwesenheit der Substanzen. Abgebildet ist der Vergleich der Test-Reihen 1, 2 und 3

Anmerkungen zur Auswertung:

In der ersten Test-Reihe konnten bei den Substanzen P6, P9, P10, P11, P12, P13, P19, und P20 nur fünf Krypten zur Auswertung herangezogen werden.

7.1.5. Der *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium Stamm SL1344

Tab. 7.21: Absolutwerte und relative Adhärenz in % der 1. Test-Reihe des Stammes SL 1344 mit allen Testsubstanzen

| Test-Reihe 1 | | | |
|--------------|--------------|------------|------------------------|
| | Absolutwerte | | relative Adhärenz in % |
| | Kontrolle | + Substanz | |
| SZ2 | 14,9 | 8 | SZ2 53,69 |
| SZ3 | 5,1 | 2,9 | SZ3 56,86 |
| P1 | 8,8 | 6,3 | P1 71,59 |
| P2 | 8,8 | 9,6 | P2 109,09 |
| P3 | 6,2 | 4,8 | P3 77,41 |
| P4 | 14,9 | 7,3 | P4 48,99 |
| P5 | 6,2 | 5,1 | P5 82,25 |
| P6 | 6,7 | 4,9 | P6 73,13 |
| P7 | 7,9 | 1,9 | P7 24,05 |
| P8 | 7,9 | 6,9 | P8 87,34 |
| P9 | 13 | 11 | P9 84,61 |
| P10 | 13 | 8,6 | P10 66,15 |
| P11 | 5,4 | 2,7 | P11 50 |
| P12 | 6,7 | 4,4 | P12 65,67 |
| P13 | 12 | 10,3 | P13 85,83 |
| P14 | 7 | 2,4 | P14 34,28 |
| P15 | 5,4 | 3,2 | P15 59,259 |
| P16 | 4,5 | 3,3 | P16 73,33 |
| P17 | 4,5 | 2,7 | P17 60 |
| P18 | 7,3 | 5,1 | P18 69,86 |
| P19 | 7,3 | 7 | P19 95,89 |
| P20 | 7 | 1,9 | P20 27,14 |

Tab. 7.22: Absolutwerte und relative Adhärenz in % der 2. Test-Reihe des Stammes SL 1344 mit allen Testsubstanzen

| Test-Reihe 2 | | | |
|---------------------|---------------------|------------|-------------------------------|
| | Absolutwerte | | relative Adhärenz in % |
| | Kontrolle | + Substanz | |
| SZ2 | 14,6 | 7,4 | SZ2 50,68 |
| SZ3 | 14,6 | 8,5 | SZ3 58,21 |
| P1 | 16,7 | 9,7 | P1 58,08 |
| P2 | 16,7 | 16,6 | P2 99,4 |
| P3 | 17 | 14,4 | P3 84,7 |
| P4 | 17 | 15,5 | P4 91,17 |
| P5 | 22,4 | 12,3 | P5 54,91 |
| P6 | 22,4 | 13,6 | P6 60,71 |
| P7 | 17,7 | 7,5 | P7 42,37 |
| P8 | 17,7 | 18,5 | P8 104,51 |
| P9 | 20,4 | 5,5 | P9 26,96 |
| P10 | 20,4 | 12,1 | P10 59,31 |
| P11 | 17,7 | 12,9 | P11 72,88 |
| P12 | 17,7 | 10 | P12 56,49 |
| P13 | 16,8 | 15,1 | P13 89,88 |
| P14 | 26,8 | 16,4 | P14 61,19 |
| P15 | 20,6 | 14,2 | P15 68,93 |
| P16 | 20,6 | 11,1 | P16 53,88 |
| P17 | 16,5 | 6 | P17 36,36 |
| P18 | 16,5 | 9 | P18 54,54 |
| P19 | 13 | 10,2 | P19 78,46 |
| P20 | 13 | 7,7 | P20 59,23 |

Tab. 7.23: Absolutwerte und relative Adhärenz in % der 3. Test-Reihe des Stammes SL 1344 mit allen Testsubstanzen

| Test-Reihe 3 | | | |
|---------------------|---------------------|------------|-------------------------------|
| | Absolutwerte | | relative Adhärenz in % |
| | Kontrolle | + Substanz | |
| SZ2 | 13,5 | 6,7 | SZ2 49,62 |
| SZ3 | 13,5 | 5,4 | SZ3 40 |
| P1 | 14,8 | 5 | P1 33,78 |

| | | | | |
|------------|------|------|------------|--------|
| P2 | 14,8 | 15 | P2 | 101,35 |
| P3 | 17,6 | 11 | P3 | 62,5 |
| P4 | / | / | P4 | / |
| P5 | 17,6 | 8 | P5 | 45,45 |
| P6 | 12,8 | 11,9 | P6 | 92,96 |
| P7 | / | / | P7 | / |
| P8 | / | / | P8 | / |
| P9 | 12,8 | 9,9 | P9 | 77,34 |
| P10 | 14,9 | 9,8 | P10 | 65,77 |
| P11 | 14,9 | 10 | P11 | 67,11 |
| P12 | 14,5 | 5,7 | P12 | 39,31 |
| P13 | 14,5 | 9,7 | P13 | 66,89 |
| P14 | 12,4 | 13 | P14 | 104,83 |
| P15 | 12,4 | 8,7 | P15 | 70,16 |
| P16 | 10,9 | 10 | P16 | 91,74 |
| P17 | / | / | P17 | / |
| P18 | / | / | P18 | / |
| P19 | 10,9 | 11 | P19 | 100,91 |
| P20 | 13,8 | 6,9 | P20 | 50 |

Tab. 7.24: Mittelwerte und Standardabweichung der relativen Adhärenz des Stammes SL 1344 für alle Testsubstanzen

| | Mittelwert der rel.Adhärenz | Standard- abweichung |
|------------|--|---------------------------------|
| SZ2 | 51,33 | 2,1 |
| SZ3 | 51,69 | 10,14 |
| P1 | 54,48 | 19,15 |
| P2 | 103,28 | 5,12 |
| P3 | 74,87 | 11,31 |
| P4 | 70,08 | 29,82 |
| P5 | 60,87 | 19,11 |
| P6 | 75,6 | 16,26 |
| P7 | 33,21 | 12,95 |
| P8 | 95,93 | 12,14 |
| P9 | 62,97 | 31,39 |
| P10 | 63,74 | 3,84 |
| P11 | 63,33 | 11,9 |

| | | |
|------------|-------|--------|
| P12 | 53,82 | 13,38 |
| P13 | 80,87 | 12,26 |
| P14 | 66,77 | 35,6 |
| P15 | 66,11 | 5,97 |
| P16 | 72,98 | 18,93 |
| P17 | 48,18 | 16,71 |
| P18 | 62,2 | 10,83 |
| P19 | 91,75 | 11,784 |
| P20 | 45,45 | 16,51 |

Tab. 7.25: Mittelwerte und Standardabweichung der Kontrollwerte pro Biopsie des Stammes SL 1344

| | Mittelwert der Kontrollwerte pro Biopsie | Standard- abweichung |
|---------------|---|---------------------------------|
| Reihe1: | | |
| Biopsie III/4 | 12,3 | 1,28 |
| Biopsie IV/2 | 6,62 | 1,33 |
| | | |
| Reihe2: | | |
| BiopsieIII/4 | 18,03 | 3,28 |
| | | |
| Reihe3: | | |
| Biopsie III/4 | 13,91 | 1,88 |

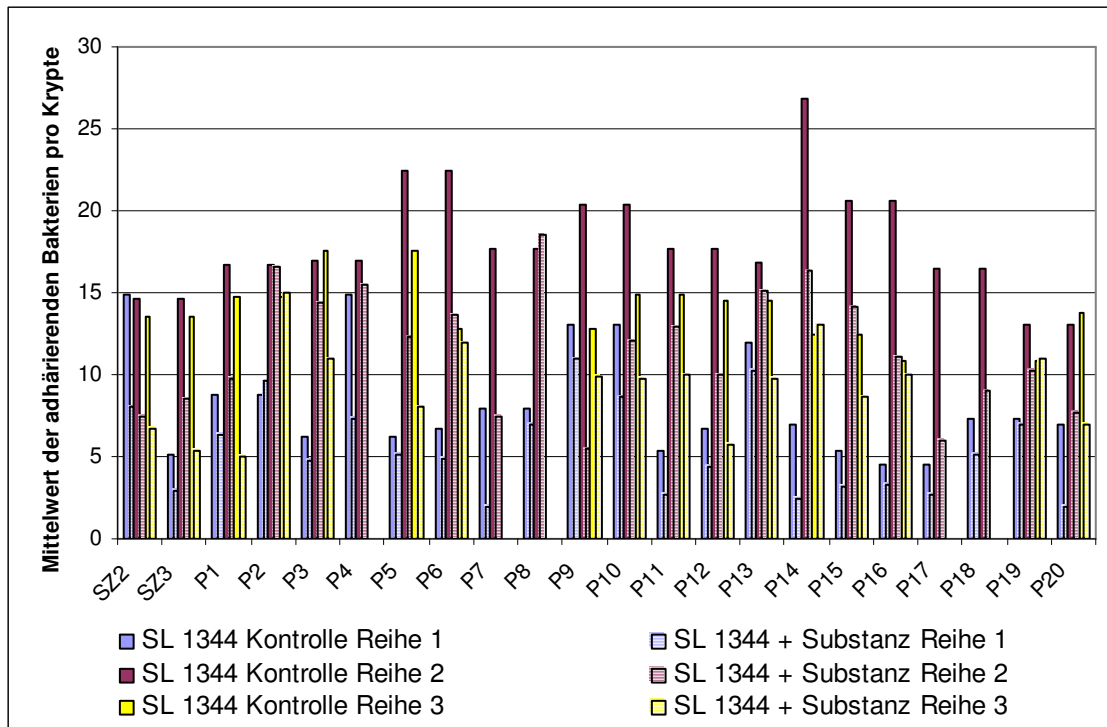


Abb. 7.9: Mittelwert der adhärerenden Bakterien pro Krypte des Stammes SL 1344 in An- und Abwesenheit der Substanzen. Abgebildet ist der Vergleich der Test-Reihen 1, 2 und 3

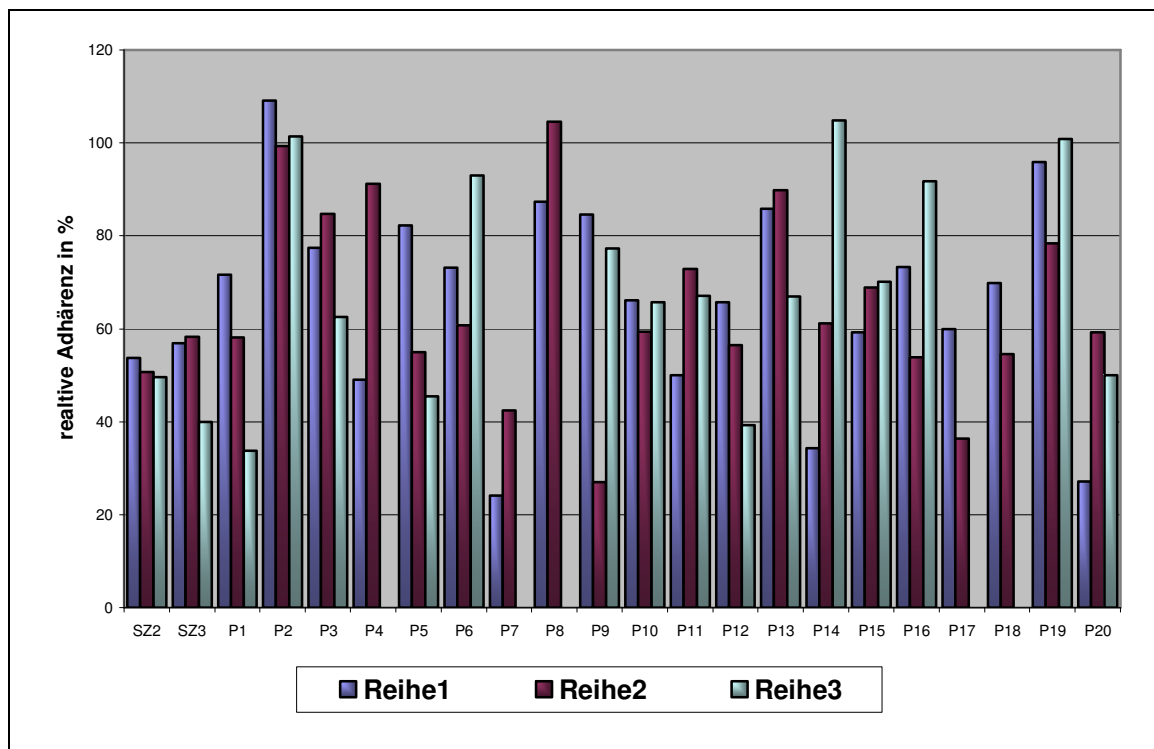


Abb. 7.10: relative Adhärenz des Stammes SL 1344 in Anwesenheit der Substanzen. Abgebildet ist der Vergleich der Test-Reihen 1, 2 und 3

Anmerkungen zur Auswertung:

In der dritten Test-Reihe ergab sich bei der Auswertung die Schwierigkeit, dass bei identischem Färbeprotokoll der Schnitt unter Zugabe der Prüfsubstanz P10 sehr hell, und bei den Substanzen P16 und P20 sehr dunkel gefärbt war.

Weiterhin muss angemerkt werden, dass ab der dritten Test-Reihe die Substanzen P4, P7, P8, P17 und P18 entfielen (siehe Material und Methoden Teil).

7.1.6. Der *Shigella flexneri* Stamm M90T

Tab. 7.26: Absolutwerte und relative Adhärenz in % der 1. Test-Reihe des Stammes M90T mit allen Testsubstanzen

| Test-Reihe 1 | | | Test-Reihe 1 | |
|--------------|--------------|------------|--------------|------------------------|
| | Absolutwerte | | | relative Adhärenz in % |
| | Kontrolle | + Substanz | | |
| SZ2 | 6,3 | 3,2 | SZ2 | 50,79 |
| SZ3 | 6,3 | 2,9 | SZ3 | 46,031 |
| P1 | 6,3 | 5,7 | P1 | 90,47 |
| P2 | 6,6 | 6,6 | P2 | 100 |
| P3 | 6,6 | 5,7 | P3 | 86,36 |
| P5 | 6,6 | 4,7 | P5 | 71,21 |
| P6 | 14,5 | 10,2 | P6 | 70,34 |
| P9 | 14,5 | 12,4 | P9 | 85,51 |
| P10 | 14,5 | 11 | P10 | 75,86 |
| P11 | 13 | 12,7 | P11 | 97,69 |
| P12 | 13 | 9,6 | P12 | 73,84 |
| P13 | 13 | 8,1 | P13 | 62,3 |
| P14 | 15,5 | 7,8 | P14 | 50,32 |
| P15 | 15,5 | 12,7 | P15 | 81,93 |
| P16 | 12,4 | 12 | P16 | 96,77 |
| P19 | 12,4 | 11,2 | P19 | 90,32 |
| P20 | 12,4 | 12 | P20 | 96,77 |

Tab. 7.27: Absolutwerte und relative Adhärenz in % der 2. Test-Reihe des Stammes M90T mit allen Testsubstanzen

| Test-Reihe 2 | | | | Test-Reihe 2 | |
|--------------|--------------|------------|------------|------------------------|--|
| | Absolutwerte | | | relative Adhärenz in % | |
| | Kontrolle | + Substanz | | | |
| SZ2 | 12 | 7,2 | SZ2 | 60 | |
| SZ3 | 12 | 5,6 | SZ3 | 46,66 | |
| P1 | 12 | 11,7 | P1 | 97,5 | |
| P2 | 13,2 | 13 | P2 | 98,48 | |
| P3 | 13,2 | 14 | P3 | 106,06 | |
| P5 | 13,2 | 12,1 | P5 | 91,66 | |
| P6 | 9,3 | 8,8 | P6 | 94,62 | |
| P9 | 9,3 | 7,2 | P9 | 77,41 | |
| P10 | 9,3 | 7 | P10 | 75,26 | |
| P11 | 10 | 8,7 | P11 | 87 | |
| P12 | 10 | 12 | P12 | 120 | |
| P13 | 10 | 5,1 | P13 | 51 | |
| P14 | 12,4 | 8,2 | P14 | 66,12 | |
| P15 | 12,4 | 13 | P15 | 104,83 | |
| P16 | 12,4 | 11,1 | P16 | 89,51 | |
| P19 | 16,2 | 15,5 | P19 | 95,67 | |
| P20 | 16,2 | 10,3 | P20 | 63,58 | |

Tab. 7.28: Absolutwerte und relative Adhärenz in % der 3. Test-Reihe des Stammes M90T mit allen Testsubstanzen

| Test-Reihe 3 | | | | Test-Reihe 3 | |
|--------------|--------------|------------|------------|------------------------|--|
| | Absolutwerte | | | relative Adhärenz in % | |
| | Kontrolle | + Substanz | | | |
| SZ2 | 15,6 | 7,9 | SZ2 | 50,64 | |
| SZ3 | 15,6 | 6,9 | SZ3 | 44,23 | |
| P1 | 15,6 | 14 | P1 | 89,74 | |
| P2 | 13,1 | 11,6 | P2 | 88,54 | |
| P3 | 13,1 | 10,9 | P3 | 83,2 | |
| P5 | 13,1 | 9 | P5 | 68,7 | |
| P6 | 16 | 12,7 | P6 | 79,3 | |
| P9 | 16 | 15,8 | P9 | 98,75 | |
| P10 | 16 | 13,9 | P10 | 86,87 | |

| | | | | |
|------------|------|-----|------------|--------|
| P11 | 11,3 | 9,3 | P11 | 82,3 |
| P12 | 11,3 | 12 | P12 | 106,19 |
| P13 | 11,3 | 6,1 | P13 | 53,98 |
| P14 | 9,1 | 8,5 | P14 | 93,4 |
| P15 | 9,1 | 5,2 | P15 | 57,14 |
| P16 | 10,4 | 8,7 | P16 | 83,65 |
| P19 | 10,4 | 9,8 | P19 | 94,23 |
| P20 | 10,4 | 7,2 | P20 | 69,23 |

Tab. 7.29: Mittelwerte und Standardabweichung der relativen Adhärenz des Stammes M90T für alle Testsubstanzen

| | Mittelwert rel. Adhärenz | Standardabweichung |
|------------|---------------------------------|---------------------------|
| SZ2 | 53,81 | 5,35 |
| SZ3 | 45,64 | 1,26 |
| P1 | 92,57 | 4,28 |
| P2 | 95,67 | 6,21 |
| P3 | 91,87 | 12,38 |
| P5 | 77,19 | 12,59 |
| P6 | 81,44 | 12,27 |
| P9 | 87,22 | 10,76 |
| P10 | 79,33 | 6,53 |
| P11 | 88,99 | 7,88 |
| P12 | 100,01 | 23,68 |
| P13 | 55,76 | 5,86 |
| P14 | 69,95 | 21,79 |
| P15 | 81,3 | 23,85 |
| P16 | 89,98 | 6,57 |
| P19 | 93,41 | 2,77 |
| P20 | 76,52 | 17,75 |

Tab. 7.30: Mittelwerte und Standardabweichung der Kontrollwerte pro Biopsie des Stammes M90T

| | Mittelwert der Kontrollwerte pro Biopsie | Standardabweichung |
|------------|--|--------------------|
| Reihe1: | | |
| BiopsieX/1 | 11,14 | 3,7 |
| | | |
| Reihe2: | | |
| BiopsieX/1 | 11,94 | 2,14 |
| | | |
| Reihe3: | | |
| BiopsieX/1 | 12,78 | 2,57 |

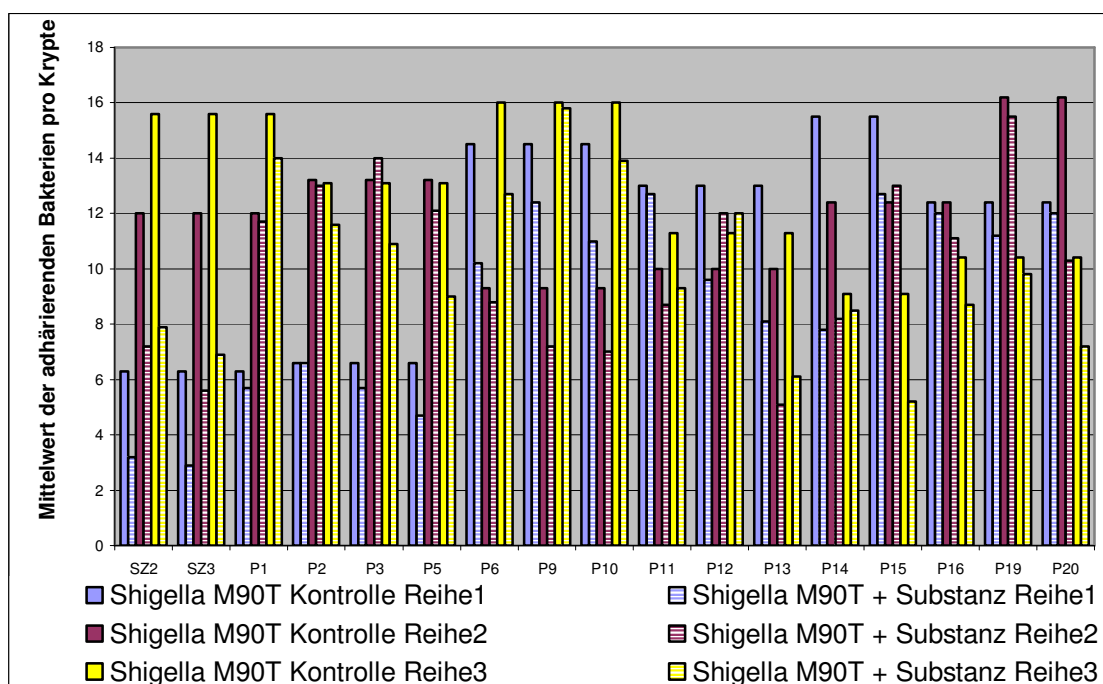


Abb. 7.11: Mittelwert der adhärenenden Bakterien pro Krypte des Stammes M90T in An- und Abwesenheit der Substanzen. Abgebildet ist der Vergleich der Test-Reihen 1, 2 und 3

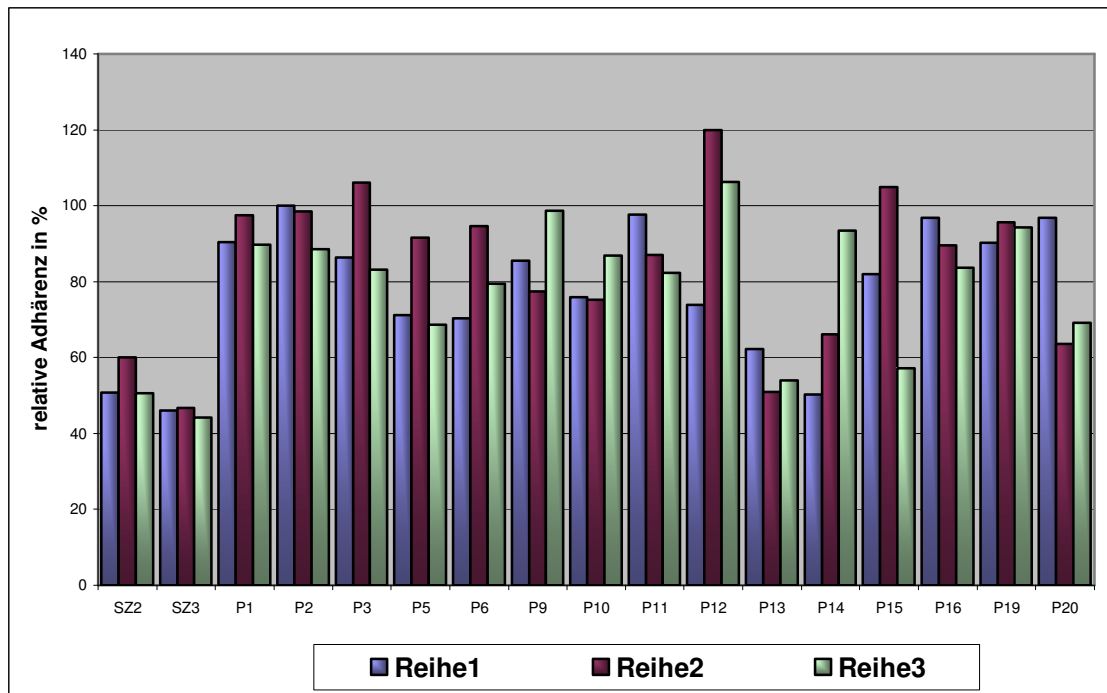


Abb. 7.12: relative Adhärenz des Stammes M90T in Anwesenheit der Substanzen. Abgebildet ist der Vergleich der Test-Reihen 1, 2 und 3

7.1.7. Der *Citrobacter freundii* Stamm 3009

Tab. 7.31: Absolutwerte und relative Adhärenz in % der 1. Test-Reihe des Stammes Cf3009 mit allen Testsubstanzen

| Test-Reihe 1 | | | Test-Reihe 1 | |
|--------------|--------------|------------|--------------|------------------------|
| | Absolutwerte | | | relative Adhärenz in % |
| | Kontrolle | + Substanz | | |
| SZ2 | 14,5 | 16,9 | SZ2 | 116,55 |
| SZ3 | 14,5 | 8,3 | SZ3 | 57,24 |
| P1 | 14,5 | 12,5 | P1 | 86,2 |
| P2 | 15,1 | 9,3 | P2 | 61,58 |
| P3 | 15,1 | 17,3 | P3 | 114,56 |
| P5 | 15,1 | 15,8 | P5 | 104,63 |
| P6 | 27,5 | 21,9 | P6 | 79,636 |
| P9 | 27,5 | 24,1 | P9 | 87,63 |
| P10 | 27,5 | 22 | P10 | 80 |

| | | | | |
|------------|------|------|------------|--------|
| P11 | 23,4 | 22,5 | P11 | 96,15 |
| P12 | 23,4 | 14,4 | P12 | 61,53 |
| P13 | 23,4 | 11,4 | P13 | 48,71 |
| P14 | 28,7 | 33 | P14 | 114,98 |
| P15 | 28,7 | 36,9 | P15 | 128,57 |
| P16 | 28,7 | 28,4 | P16 | 98,95 |
| P19 | 33,4 | 17,1 | P19 | 51,19 |
| P20 | 33,4 | 27,5 | P20 | 82,33 |

Tab. 7.32: Absolutwerte und relative Adhärenz in % der 2. Test-Reihe des Stammes Cf3009 mit allen Testsubstanzen

| Test-Reihe 2 | | Test-Reihe 2 | |
|--------------|--------------|--------------|------------------------|
| | Absolutwerte | | relative Adhärenz in % |
| | Kontrolle | + Substanz | |
| SZ2 | 31,5 | 12,5 | SZ2 39,68 |
| SZ3 | 31,5 | 29,2 | SZ3 92,69 |
| P1 | 31,5 | 28,9 | P1 91,74 |
| P2 | 33 | 28 | P2 84,84 |
| P3 | 33 | 49,1 | P3 148,78 |
| P5 | 33 | 28,6 | P5 86,66 |
| P6 | 36,5 | 15,5 | P6 42,46 |
| P9 | 36,5 | 29 | P9 79,45 |
| P10 | 36,5 | 18,1 | P10 49,58 |
| P11 | 38,8 | 41,6 | P11 107,21 |
| P12 | 38,8 | 65,5 | P12 168,81 |
| P13 | 38,8 | 38,5 | P13 99,22 |
| P14 | 17,8 | 39,6 | P14 222,47 |
| P15 | 17,8 | 38,3 | P15 215,16 |
| P16 | 17,8 | 28,9 | P16 162,35 |
| P19 | 36 | 26,3 | P19 73,055 |
| P20 | 36 | 52,1 | P20 144,72 |

Tab. 7.33: Absolutwerte und relative Adhärenz in % der 3. Test-Reihe des Stammes Cf3009 mit allen Testsubstanzen

| Test-Reihe 3 | | | Test-Reihe 3 | |
|--------------|--------------|------------|--------------|------------------------|
| | Absolutwerte | | | relative Adhärenz in % |
| | Kontrolle | + Substanz | | |
| SZ2 | 37,3 | 11,6 | SZ2 | 31,09 |
| SZ3 | 37,3 | 16,2 | SZ3 | 43,43 |
| P1 | 37,3 | 20,1 | P1 | 53,88 |
| P2 | 44,5 | 34,6 | P2 | 77,75 |
| P3 | 44,5 | 39,6 | P3 | 88,98 |
| P5 | 44,5 | 32,7 | P5 | 73,48 |
| P6 | 32,2 | 20,8 | P6 | 64,59 |
| P9 | 32,2 | 28,4 | P9 | 88,19 |
| P10 | 32,2 | 41 | P10 | 127,32 |
| P11 | 29,3 | 10,5 | P11 | 35,83 |
| P12 | 29,3 | 24 | P12 | 81,91 |
| P13 | 29,3 | 15,2 | P13 | 51,87 |
| P14 | 30,7 | 37,3 | P14 | 121,49 |
| P15 | 30,7 | 30 | P15 | 97,71 |
| P16 | 30,7 | 26,1 | P16 | 85,01 |
| P19 | 33,4 | 23,8 | P19 | 71,25 |
| P20 | 33,4 | 31,2 | P20 | 93,41 |

Tab. 7.34: Mittelwerte und Standardabweichung der relativen Adhärenz des Stammes Cf3009 für alle Testsubstanzen

| | Mittelwert der rel. Adhärenz | Standardabweichung |
|------------|------------------------------|--------------------|
| SZ2 | 62,44 | 47,05 |
| SZ3 | 64,45 | 25,41 |
| P1 | 77,28 | 20,44 |
| P2 | 74,73 | 11,92 |
| P3 | 117,44 | 30 |
| P5 | 88,26 | 15,63 |
| P6 | 62,23 | 18,69 |
| P9 | 85,09 | 4,89 |
| P10 | 85,63 | 39,17 |

| | | |
|------------|--------|-------|
| P11 | 79,73 | 38,41 |
| P12 | 104,08 | 56,97 |
| P13 | 66,60 | 28,29 |
| P14 | 152,98 | 60,26 |
| P15 | 147,15 | 60,88 |
| P16 | 115,4 | 41,22 |
| P19 | 65,17 | 12,13 |
| P20 | 106,82 | 33,28 |

Tab. 7.35: Mittelwerte und Standardabweichung der Kontrollwerte pro Biopsie des Stammes Cf3009

| | Mittelwert der Kontrollwerte pro Biopsie | Standard- abweichung |
|------------|---|---------------------------------|
| Reihe1: | | |
| BiopsieX/4 | 23,2 | 6,97 |
| | | |
| Reihe2: | | |
| BiopsieV/2 | 32,04 | 7,24 |
| | | |
| Reihe3: | | |
| BiopsieV/2 | 34,63 | 5,39 |

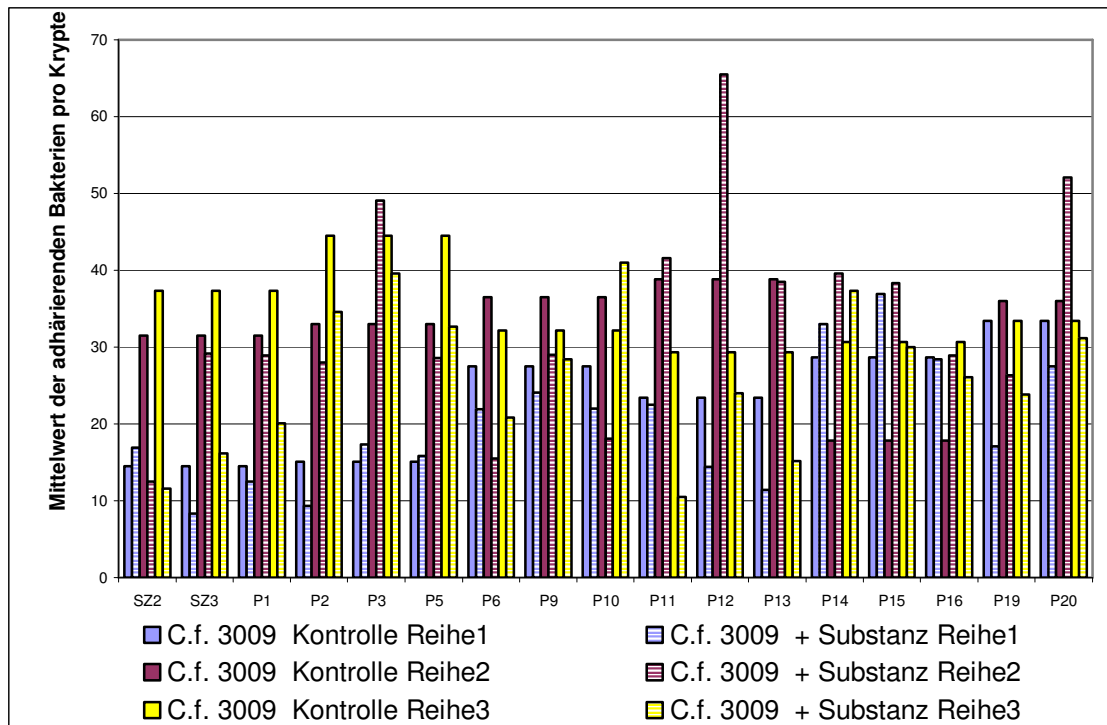


Abb. 7.13: Mittelwert der adhärenenden Bakterien pro Krypte des Stammes Cf3009 in An- und Abwesenheit der Substanzen. Abgebildet ist der Vergleich der Test-Reihen 1, 2 und 3

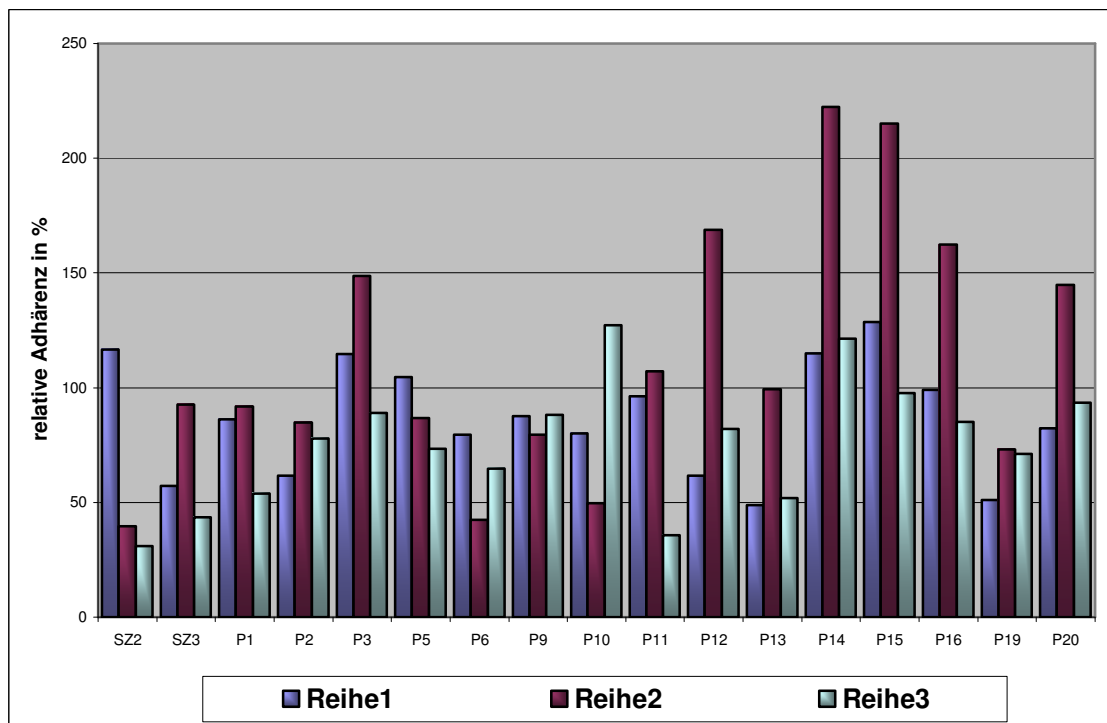


Abb. 7.14: relative Adhärenz des Stammes Cf3009 in Anwesenheit der Substanzen. Abgebildet ist der Vergleich der Test-Reihen 1, 2 und 3

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker für die freundliche Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Klaus Brehm für die Übernahme des Koreferats.

Ein ganz besonders großes Dankeschön geht an Herrn Dr. Tobias Ölschläger für die sehr engagierte Betreuung und Unterstützung meiner gesamten Arbeit, das Korrekturlesen und vor allem für die oft lustigen und sehr netten Gespräche und Diskussionen.

Meinen Laborkollegen Jessica, Carina und Artur danke ich für die unermüdliche Hilfe und die vielen praktischen Tipps bei meinen Arbeiten im Labor. Besonders in den Pausen und bei privaten Treffs hatten wir immer sehr viel Spaß. Vielen lieben Dank an Euch alle für die freundschaftliche und fast familiäre Arbeitsatmosphäre.

Ein herzliches Dankeschön geht an Uwe für die Übernahme der nicht ganz wenigen Ausdrücke meiner Arbeit.

Meinen Eltern und vor allem meinem Mann Holger möchte ich für die Geduld, das Verständnis und die grenzenlose Unterstützung bei meinem Weg durch Studium und Promotion danken. Ohne Euch hätte ich das nicht geschafft.

Curriculum vitae

Name: Katja Hufnagel
Geburtstag und –ort: 12.09.1976 in Würzburg
Familienstand: verheiratet
Nationalität: deutsch

Werdegang

09.1983 – 07.1987 Grundschule Kitzingen
09.1987 – 05.1994 Armin-Knab-Gymnasium Kitzingen
06.1994 – 05.1996 Berufsausbildung zur Zahnarzhelferin
09.1996 – 07.1998 Abitur an der Berufsoberschule Hauswirtschaft
 und Sozialpflege Würzburg
09.1998 – 10.2001 Vorklinisches Studium Universität Würzburg
10.2001 – 07.2004 Klinisches Studium Universität Würzburg
07.2004 – 11.2004 Staatsexamen Universität Würzburg
15.12.2004 Approbation
seit 10/2005 tätig als angestellte Zahnärztin

Mainstockheim, Mai 2007



Katja Hufnagel