

Molekulare Methoden zum Nachweis des oral-probiotischen Stammes
Streptococcus salivarius ssp. *salivarius* K12 und Anwendung *in vitro* und *in vivo*

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Zahnmedizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Anica Meinelt

aus

Ratingen

Berichter: Herr Universitätsprofessor
 Dr. rer. nat. Georg Conrads

Herr Universitätsprofessor
Dr. med. dent. Friedrich Lampert

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juli 2006

***Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.***

meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	7
I EINLEITUNG	9
I.1 Streptokokken.....	9
I.1.1 <i>Streptococcus pyogenes</i>	10
I.1.1.1 Pathogenität.....	10
I.1.1.2 Impfung	12
I.1.2 <i>Streptococcus salivarius</i>	13
I.1.2.1 Taxonomie.....	13
I.1.2.2 Pathogenität.....	15
I.1.2.3 Identifikation	16
I.2 Bacteriocine und Bacteriocin-like-inhibitory-substances (BLIS)	17
I.2.1 Lantibiotika	18
I.2.1.1 Salivaricin A.....	20
I.2.1.1.1 BLIS-K12-Throat-Guard	23
I.3 Intention	24
II MATERIAL UND METHODEN	25
II.1 Material	25
II.1.1 Bakterienstämme und Patientenmaterial.....	25
II.1.1.1 Bakterienstämme	25
II.1.1.2 Patientenmaterial.....	25
II.1.2 Bakteriologische Kultur- und Transportmedien.....	26
II.1.3 Chemikalien und Enzyme	26
II.1.4 Puffer und Lösungen	27
II.1.5 Oligonukleotide (PCR-Primer)	28
II.1.5.1 Oligonukleotide für die 16S-rDNA-gerichtete PCR	28
II.1.5.2 Oligonukleotide für die ITS-gerichtete PCR.....	28
II.1.5.3 Oligonukleotide für die Ligasegen-gerichtete PCR	28
II.1.5.4 Oligonukleotide für die Dextranasegen-gerichtete PCR.....	29
II.1.5.5 Oligonukleotide der Salivaricin-B-Operon-gerichteten PCR	29
II.1.5.6 Oligonukleotide der Salivaricin-A-Operon-gerichteten PCR	29
II.1.5.7 Oligonukleotide für die stammspezifische K12-PCR	30

II.1.6	Geräte und Computerprogramme.....	30
II.2	Allgemeine Methoden.....	31
II.2.1	Kultivierung und Aufbewahrung der Bakterienstämme	31
II.2.2	Entnahme und Transportverfahren der Patientenmaterialien.....	31
II.3	Genetische Methoden.....	32
II.3.1	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	32
II.3.2	Konzentrationsbestimmung.....	33
II.3.3	Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden.....	33
II.3.4	Durchführung der Polymerasekettenreaktion.....	34
II.3.4.1	Qualitative PCR.....	34
II.3.4.1.1	16S-rDNA-gerichtete PCR.....	34
II.3.4.1.2	ITS-gerichtete PCR.....	34
II.3.4.1.3	Ligasegen-gerichtete PCR.....	35
II.3.4.1.4	Dextranasegen-gerichtete PCR.....	36
II.3.4.1.5	Salivaricin-B-Operon-gerichtete PCR.....	38
II.3.4.1.6	Salivaricin-A-Operon-gerichtete PCR.....	39
II.3.4.1.7	Konventionelle K12-PCR.....	41
II.3.4.1.8	Nested-PCR (K12).....	42
II.3.4.1.9	Amplifikationsbedingungen	43
II.3.4.1.10	Agarose-Gelelektrophorese	43
II.3.4.2	Quantitative PCR (real-time PCR).....	44
II.3.4.3	Sequenzierung	45
III	ERGEBNISSE	47
III.1	Entwicklung einer artspezifischen PCR für <i>S. salivarius</i>	47
III.1.1	ITS-gerichtete PCR	47
III.1.2	Ligasegen-gerichtete PCR.....	49
III.1.3	Dextranasegen-gerichtete PCR	51
III.2	Entwicklung einer stammspezifischen PCR für <i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12	55
III.2.1	Salivaricin-B-Operon-gerichtete PCR.....	56
III.2.2	Salivaricin-A-Operon-gerichtete PCR	57
III.2.2.1	Entwicklung einer PCR auf der Basis der Gensequenz von <i>S. salivarius</i> 20P3.....	57
III.2.2.2	Sequenzierung des Salivaricin-A-Operons von <i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12	64

III.2.2.3	Entwicklung einer PCR zum Nachweis von <i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12 auf der Basis der Salivaricin-A-Gensequenz von <i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12 sowie 20P3 als Referenz	64
III.2.2.3.1	Konventionelle PCR.....	64
III.2.2.3.2	Nested-PCR.....	74
III.2.2.3.3	Quantitative PCR (real-time PCR).....	85
IV	DISKUSSION	88
IV.1	Verwendung einer PCR zum artspezifischen Nachweis von <i>S. salivarius</i>	88
IV.1.1	ITS-gerichtete PCR	88
IV.1.2	Ligasegen-gerichtete PCR.....	89
IV.1.3	Dextranasegen-gerichtete PCR	90
IV.2	Anwendung der Salivaricin-A-Operon-gerichteten PCR zum stammspezifischen Nachweis von <i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12.....	91
IV.2.1	Konventionelle PCR.....	92
IV.2.2	Nested-PCR.....	93
IV.2.3	Quantitative PCR (real-time PCR).....	95
IV.3	Wirksamkeit des probiotischen Stammes <i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12 in Kolonisationsversuchen	96
IV.4	Sensitivität und Zuverlässigkeit von PCR-Methoden zum Nachweis von <i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12 in Studien und Kolonisationsversuchen.....	98
	ZUSAMMENFASSUNG.....	102
	LITERATURVERZEICHNIS	105
	DANKSAGUNG.....	118
	LEBENS LAUF	119

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	Brain-Heart-Infusion (Herz-Hirn-Bouillon)
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CFU/ KBE	Kolonienbildende Einheit
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotridtriphosphat (ATP/GTP/CTP/TTP)
G	Guanin
K	Konzentration
kb	Kilobasen
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
RNA	Ribonukleinsäure
T	Thymin
<i>Taq</i> -Polymerase	Polymerase von <i>Thermophilus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TPE	Tris-Phosphat-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der Streptokokken ausgehend vom <i>sodA_{int}</i> Gen, welches für eine Superoxiddismutase für Mangan bei grampositiven Bakterien kodiert (Poyart et al. 1998).....	14
Abbildung 2: Strukturgen des Salivaricin A (<i>salA</i>) von <i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12 sowie das partielle Gen <i>salB</i> , welches während der posttranskriptionellen Modifikation für die Aminosäuredehydrierung verantwortlich ist.....	21
Abbildung 3: Homologie der Präpeptide von Salivaricin A und Salivaricin A1 sowie der an der Salivaricin-Detektion und Signalleitung beteiligten Histidinkinase <i>SalK</i> und <i>SalK123</i>	
Abbildung 4: Streptokokken ITS-Vergleich: Auswahl verschiedener Streptokokkenarten (repräsentiert durch die Genbank-Nummer ihrer ITS-Sequenz) im Vergleich; Referenz: SSA439458 und AB051016 sind <i>S.-salivarius</i> -Sequenzen.....	47
Abbildung 5: Gelelektrophoretische Darstellung der Dextranasegen-gerichteten PCR bei einer Annealing-Temperatur von 48°C für die Stämme <i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12, <i>S. salivarius</i> DSM 20067 sowie die Stämme <i>S. salivarius</i> AC 1802, AC 2051, AC 3442, AC 3994, AC 4381 und <i>S. mutans</i> ATCC 25175.....	53
Abbildung 6: Lage der Salivaricin-A-Operon gerichteten Forward-Primer <i>psalOAF1</i> , <i>psalAF1</i> und <i>psalAF2</i> sowie die Reversed-Primer <i>psalAR1</i> , <i>psalAR2</i> und <i>psalAR3</i>	58
Abbildung 7: Darstellung der Ermittlung der optimalen Oligonukleotid-Kombination für die Salivaricin-A-Operon-gerichtete PCR	62
Abbildung 8: Vergleich des Salivaricin-A-Operons von <i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12 und <i>S. salivarius</i> 20P3	64
Abbildung 9: Gelelektrophoretische Darstellung der stammspezifischen PCR für <i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12 bei einer Annealing-Temperatur von 50°C (2. Abstrichentnahme) .	67
Abbildung 10: Gelelektrophoretische Darstellung der stammspezifischen PCR für <i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12 bei einer Annealing-Temperatur von 50°C (22. Tag der Abstrichentnahme = Probe 9).....	73
Abbildung 11: Lage der Oligonukleotide der Nested-PCR	75
Abbildung 12: Graphische Darstellung des Kolonisationsversuchs von <i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12 vom 1. - 22. Tag basierend auf den Daten der stammspezifischen Nested-PCR	83
Abbildung 13: Darstellung der Ergebnisse der Besiedlung von <i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12 an acht Stellen der Mundhöhle mit Hilfe der konventionellen und der Nested-PCR vom 7. - 43. Tag der Abstrichentnahme.....	84

Abbildung 14: Quantitative Darstellung der Besiedlung der Mundhöhle mit <i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12 mit Hilfe der quantitativen real-time (RTQ-) PCR.....	87
---	----

I EINLEITUNG

I.1 Streptokokken

Streptokokken sind grampositive, unbewegliche, fakultativ anaerobe Kokken, die sich paarweise oder in Ketten anordnen. Unter ihnen befinden sich pathogene und apathogene Arten. Die größte medizinische Relevanz haben aufgrund ihrer Pathogenität *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* und *Streptococcus agalacticae*. Bei den apathogenen Arten werden einige - wie zum Beispiel *Streptococcus thermophilus* - industriell genutzt und haben Bedeutung in der Erzeugung von Milch- und Fleischprodukten. Durch ihr fehlendes oxidatives Verhalten und die gegenüber den Staphylokokken negative Katalase-Reaktion lassen sie sich von anderen Gattungen grampositiver Kokken unterscheiden. Für die Kultivierung von Streptokokken bedarf es, bedingt durch ihre hochgradige Spezialisierung, Zusätzen von Blut, Serum, peptidisch verdaulichem Fleischextrakt oder Hefeextrakt (Podbielski et al. 2001).

Die groben Identifikationen einzelner Streptokokkenarten basieren weniger auf biochemischer oder physiologischer Ebene als auf ihrem Hämolyseverhalten auf bluthaltigen festen Medien:

- Die β -Hämolyse ist eine vollständige Hämolyse. Durch das von den Streptokokken produzierte Hämolsin werden die Erythrozyten aufgelöst und das Hämoglobin abgebaut. Es entsteht ein die Kolonie umgebender heller und durchsichtiger Hämolysehof.
- Die α -hämolisierenden Streptokokken sezernieren Wasserstoffperoxid, welches Hämoglobin zu Methämoglobin oxidiert. Dieser Mechanismus der Sauerstoffmetaboliteneliminierung in Form von Peroxid geschieht nur bei aeroben Bedingungen und manifestiert sich in einem grünlichen Hof.

Diese Einteilung hat primär eine praktische Bedeutung, da zumeist β -hämolisierende Streptokokken zu den Krankheitserregern gehören.

Eine weitere Differenzierung ist aufgrund der Antigenität möglich:

Das C-Polysaccharid ist an das Peptidoglykan der Streptokokkenzellwand gebunden. Es weist speziesspezifische Unterschiede auf und ist somit serologisch (A-H, K-V) unterscheidbar (Lancefield) (Hahn et al. 2001).

M-Proteine sind dimere Oberflächenproteine, die unterschiedliche Funktionen, wie eine antiphagozytäre Wirkung, die Adhäsion an Wirtszellen und die Bindung von Komplementproteinen unterstützen. Man unterscheidet vier Abschnitte auf dem M-Protein, die sowohl konstant als auch variabel sein können. Dabei stellt sich der N-terminale Abschnitt mit vielen genetisch determinierten Varianzen dar. Bei *S. pyogenes* sind dadurch bedingt mehr als 80 serologisch und mehr als 150 genetisch unterscheidbare M-Typen zu finden. Dies erklärt die besondere Resistenz des *S. pyogenes* gegenüber der menschlichen Immunabwehr (Fischetti 1989).

I.1.1 *Streptococcus pyogenes*

S. pyogenes wurde 1881 das erste Mal von T. Billroth beschrieben und bekam seinen Namen 1884 von F. Rosenbach (Hardie 1986). Er gehört zu den grampositiven Bakterien, ist β -hämolytisch und in der Serogruppe A.

S. pyogenes verfügt über diverse Virulenzfaktoren: Seine M-Proteine wirken antiphagozytär, die F-Proteine dienen der Adhäsion am Pharynxepithel und die an der Zelloberfläche lokalisierte C5a-Peptidase greift in die Kaskade des Komplementsystems ein und verhindert somit die Bindung von polymorphkernigen Granulozyten. Zusätzlich exprimiert *S. pyogenes* eine Reihe von extrazellulären Produkten und Faktoren, die Infektionen auslösen: So wirken Streptolysin O und S destruierend auf Körperzellen wie Erythrozyten und Phagozyten. Im Gegensatz zu Streptolysin S wirkt Streptolysin O als Antigen. Antikörper gegen Streptolysin O können daher als Nachweis für entsprechende Infektionen gewertet werden. Weitere Faktoren sind Hyaluronidasen, Streptodornasen und Streptokinasen, die der Ausbreitung der Streptokokken dienen.

Die erythrogenen Toxine werden besonders bei Scharlach gebildet und bewirken die klassische Exanthem- und Enanthem-Bildung bei diesem Krankheitsbild.

A-Streptokokken der Spezies *S. pyogenes* sind als rein humanpathologisch anzusehen, wobei sie auch außerhalb des Menschen für kurze Zeit vermehrungsfähig bleiben (Hahn et al. 2001).

I.1.1.1 Pathogenität

A-Streptokokken, zu denen *S. pyogenes* gehört, werden via Tröpfcheninfektion oder durch Schmierinfektion übertragen. Sie können sowohl bei Infektionen der Haut als auch des oberen Respirationstraktes nachgewiesen werden (Hahn et al. 2001).

Bei Kindern im Alter von vier bis zwölf Jahren, unter denen je nach epidemiologischer Situation zehn bis 20 Prozent Keimträger sind, treten vor allem Tonsillopharyngitiden auf. Nach einer Inkubationszeit von zwei bis vier Tagen kommt es zur Angina lacunaris mit Schluckbeschwerden und Fieber. Bei Krankheitsausbreitung kann es zu einem peritonsillären Abszess, einer Sinusitis, Otitis media und Pneumonie kommen. Differentialdiagnostisch sind virale Infektionen auszuschließen.

Eine weitere Infektion im Schleimhautbereich ist Scharlach. Von besonderer Bedeutung ist dabei das erythrogene Toxin Typ A und C („streptococcal pyrogenic exotoxins“: SPE). Als Symptom des Scharlachs tritt eine Angina in Kombination mit einem Exanthem auf.

Im Bereich der Haut können A-Streptokokken pustulös-eitrige Pyodermien, Erysipele, Phlegmone und nekrotisierende Faszitiden hervorrufen.

Als besonders schwerwiegend ist das Streptokokken-assoziierte toxische Schock-Syndrom anzusehen. Bedingt durch das SPE kommt es zu Multi-Organ-Versagen.

Weitere Folgeerkrankungen einer A-Streptokokken-Infektion sind das akute rheumatische Fieber und die akute diffuse Glomerulonephritis (Podbielski et al. 2001).

Das akute rheumatische Fieber manifestiert sich als Zweiterkrankung circa drei Wochen nach dem Streptokokkenerstinfekt vor allem bei Kindern und Jugendlichen. Klinisch treten als sogenannte Major-Kriterien nach Jones eine Karditis, Polyarthrit, Chorea minor sowie rosarote anuläre Flecken und subkutane Knoten auf. Weiterhin kommt es zu Minor-Symptomen wie Fieber und Arthralgien (Pschyrembel 1998). In den letzten Jahren ist ein weltweiter Anstieg von Fällen mit akutem rheumatischem Fieber zu verzeichnen (Kaplan 1991).

Die akute diffuse Glomerulonephritis beginnt nach einer Inkubationszeit von sieben bis 20 Tagen nach einem Streptokokkeninfekt. Symptomatisch geht das Krankheitsbild einher mit Proteinurie, Mikrohämaturie, Hypertonie und Ödemen. In seltenen Fällen kommt es zu einer terminalen Niereninsuffizienz (Pschyrembel 1998).

Bei der Labordiagnose werden die Abstriche bzw. Biopsien nach Kultivierung und Mikroskopie einer serologischen Gruppenbestimmung unterzogen. Zwei Wochen postinfektionär sind Antikörper nachweisbar. Typischerweise werden Antistreptolysin O und Antiribonuklease B bestimmt. Diese Tests dienen dem Nachweis von akutem rheumatischem Fieber (Hahn et al. 2001).

Als Therapie einer A-Streptokokkeninfektion schlägt die World-Health-Organisation (WHO) eine systemische Antibiotikatherapie mit Penicillin oder Cephalosporinen vor. Alternativ können Makrolide gegeben werden (www.who.int/medicines/library/bacterial_model_pres/014to019.pdf).

Generell ist festzustellen, dass die antibiotische Therapie nur sehr kalkulierte und indiziert angewendet werden sollte, da weltweit vermehrt Resistenzen gegen Antibiotika auftreten (Camporese et al. 1996).

Eine gute Prophylaxe bietet nach wie vor den besten Schutz vor Infektion.

I.1.1.2 Impfung

Eine Impfung gegen *S. pyogenes* stellt sich bis dato aufgrund einer seiner Virulenzfaktoren - dem M-Protein - als schwierig dar. Wie in Kapitel I.1 beschrieben, handelt es sich bei dem M-Protein um ein dimeres Oberflächenmolekül, das aus variablen und konstanten Komponenten aufgebaut ist. Bedingt durch die variablen Areale differenziert man serologisch mehr als 80 Typen.

Daher wurde in den 80er Jahren versucht, einen Impfstoff allein gegen die konservierten Anteile des M-Proteins zu finden. So erzielte man bei Labormäusen positive Resultate mit synthetischen Peptiden, die an eine Choleratoxin-B-Untereinheit binden und mit dem konstanten Bereich des M-Proteins korrespondieren (Bessen et al. 1988).

Für den Erfolg der Immunisierung ist von besonderer Relevanz, dass diese am Ort des ersten Kontaktes mit *S. pyogenes* abläuft. *S. pyogenes* findet sich vor allem auf der Schleimhaut des Oro-, Naso- und Pharyngealraumes (Peukert 1985). Folglich versuchte man eine Impfung auf intranasalem Wege durchzuführen. Direkt auf dem Epithel der Nasenschleimhaut wirkt sekretorisches Immunglobulin A antibakteriell. Experimentelle Studien an Labormäusen haben ergeben, dass anti-M-Protein-spezifisches sIgA Mäuse passiv auf mukosaler Ebene vor systemischen Erkrankungen mit A-Streptokokken schützt. Es zeigt aber verglichen mit Immunglobulinen im Serum eine verminderte Wirkung (Bessen et al. 1988).

In den letzten Jahren nahm man daher Abstand vom so variablen M-Protein als einem potentiellen Vakzine-Kandidaten und konzentrierte sich auf andere, stärker konservierte Virulenzfaktoren als Antigene. So gab es zum Beispiel eine Untersuchung zur C5a-Peptidase (Ji et al. 1996) und zum Fibronektin-Bindungsprotein SfbI (Talay et al. 2000).

Bis dato konnte aber noch kein Impfschutz gegen *S. pyogenes* erfolgreich bis zur Marktreife entwickelt werden. Als Gründe sind unter anderem Nebenwirkungen wie die Induktion einer Autoimmunantwort als auch der hohe finanzielle Aufwand zu nennen.

I.1.2 *Streptococcus salivarius*

S. salivarius gehört zur Gruppe der Viridansstreptokokken. Er wurde erstmals 1906 von Andrews und Horder beschrieben. Zu Beginn dieses Jahrhunderts war *S. salivarius* die einzige bekannte human-vorkommende, nicht-hämolisierende Streptokokken-Spezies.

Auf Saccharose-haltigem Agar bildet er Kolonien mit ein bis drei Millimetern Durchmesser und einer viskösen Textur. *S. salivarius* ist in der Lage Esculin, nicht aber Arginin zu hydrolysieren. Weiterhin ist eine Fermentation von Mannitol und Sorbitol nicht möglich (Coykendall et al. 1989).

S. salivarius ist ein Besiedler des Mund- bzw. Rachenraumes. Dort findet man ihn bei Erwachsenen als prozentualen Anteil aller isolierter Streptokokkenstämme zu zwei Prozent auf der Wangenmukosa, zu 17 Prozent auf der Zunge und zu 30 Prozent im Pharynx lokalisiert. Im Speichel lassen sich 10^6 bis 10^7 kolonienbildende Einheiten pro Milliliter nachweisen. Bereits zwei Tage postnatal ist er in diesem Lebensraum nachzuweisen. Prozentual beträgt der Anteil von *S. salivarius* an der Streptokokken-Zellzahl bei Neugeborenen zehn Prozent und steigt nach einem Monat auf 25 bis 30 Prozent an (Frandsen et al. 1991).

S. salivarius gehört zu den Produzenten von Bacteriocin-like-inhibitory-substances (BLIS). BLIS sind antibiotische Peptide, die ribosomal von grampositiven Bakterien synthetisiert werden und einen wachstumsregulierenden Effekt auf nahverwandte Bakterienarten haben. Dabei sind die Produzenten autoimmun (Ross et al. 1993). Über eine besonders ausgeprägte inhibitorische Wirkung gegenüber dem Pharyngitiserreger *S. pyogenes* verfügt der Stamm *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 (Tagg 2004).

I.1.2.1 Taxonomie

Unter den Streptokokken unterscheidet man phylogenetisch sechs Gruppen: Die Pyogenes-, die Anginosus-, die Mitis-, die Salivarius-, die Bovis- und die Mutansgruppe. *S. salivarius* gehört ebenso wie *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus infantarius*, *Streptococcus alactolyticus*, *Streptococcus hyointestinalis* und *S. thermophilus* der Salivariusgruppe an. Nur

S. salivarius, *S. infantarius* und *S. vestibularis* sind Besiedler des menschlichen Organismus. *S. thermophilus* hat eine besondere Bedeutung in der Milchindustrie (Facklam 2002).

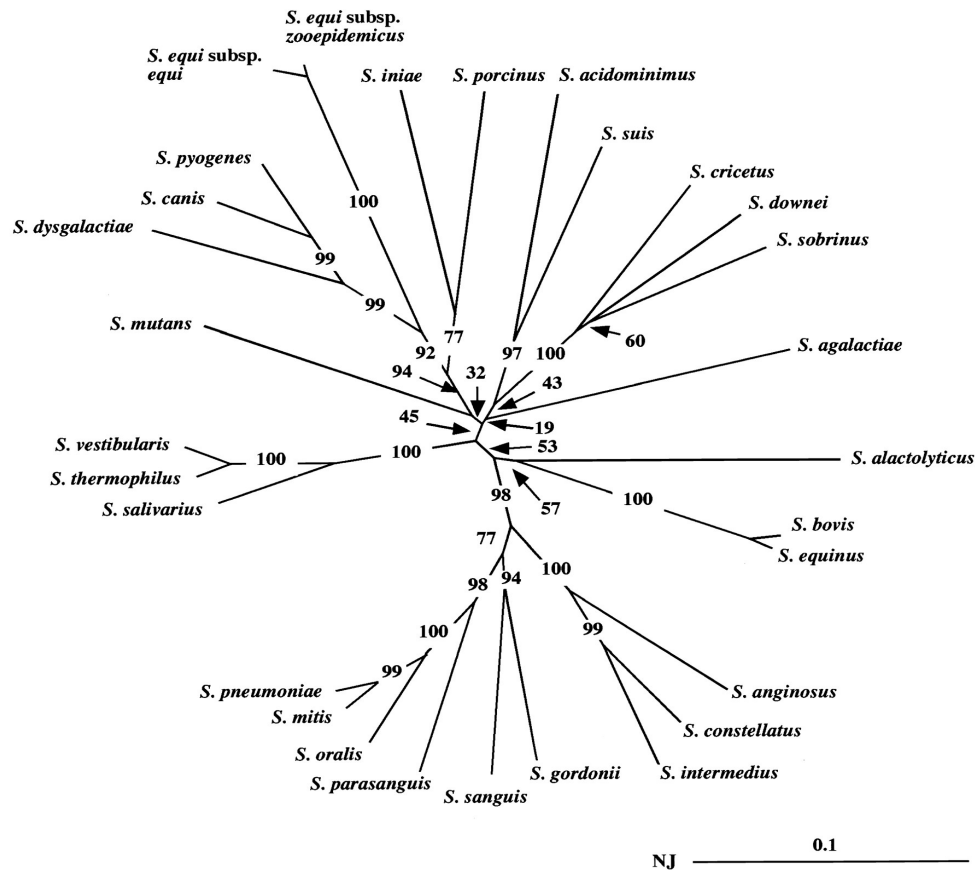


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der Streptokokken ausgehend vom *sodA_{int}* Gen, welches für eine Superoxiddismutase für Mangan bei grampositiven Bakterien kodiert (Poyart et al. 1998)

Der taxonomische Status von *S. thermophilus* ist in den letzten Jahren wiederholt in Frage gestellt worden. Man vermutet eine nähere Verwandtschaft zu *S. salivarius* und diskutiert eine Umbenennung in eine Subspezies von *S. salivarius*. Mora et al. verglichen *S. salivarius* und *S. thermophilus* im Bereich des 16S-23S rRNA „internal transcribed spacers“ (ITS). Der ITS-Bereich liegt „upstream“ vom 16S-rRNA-Gen sowie „downstream“ vom 23S-rRNA-Gen, kann auch tRNA-Gene beinhalten und gibt aufgrund des höheren Anteils variabler Bereiche Aufschluss über die taxonomische Zugehörigkeit verschiedener Isolate mit einer Auflösung, die der reinen 16S rDNA überlegen ist. Die ITS-Sequenzanalyse von *S. thermophilus* ließ die Identifikation von mindestens vier ITS-Allelen innerhalb der Spezies zu und zeigte mit Hilfe der HaeIII-Restriktionsanalyse zudem, dass keine eindeutige Differenzierung zwischen

S. thermophilus und *S. salivarius* möglich ist. Das Resultat konnte durch eine Multiplex-ITS-SSCP-Analyse bestätigt werden (Mora et al. 2003).

S. thermophilus (Sicherheitsstufe I nach dem Ausschuss für biologische Arbeitsstoffe (ABAS), apathogen) wird bereits seit mehreren Jahrzehnten in der Milchindustrie eingesetzt. Infektionen durch ihn sind beim Menschen - zum Beispiel nach Joghurtverzehr - bisher nicht bekannt. Nach Sequenzierung des Genoms von *S. thermophilus* konnte bestätigt werden, dass Gene, die mit Virulenz assoziiert werden, inaktiv sind oder fehlen (Bolotin et al. 2004). *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12, der bislang der Sicherheitsstufe II zugehörig war, wurde im April 2003 aufgrund seines großen Benefits als wirksame Komponente von BLIS-K12-Throat-Guard, einem in Neuseeland bereits seit längerer Zeit zugelassenem Antipharyngitisprobiotikum (s. I.2.1.1.1), auch in Deutschland in die Sicherheitsstufe I zurückgestuft. Prinzipiell ist somit eine industrielle Verarbeitung in Zukunft möglich. Die Übereinstimmung von *S. thermophilus* und *S. salivarius* auf ITS-Ebene sowie das Erfüllen der Anforderungen der Novel-Food-Verordnung (Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlaments und des Rates über neuartige Lebensmittel und Lebensmittelzutaten, die am 15. Mai 1997 in Kraft trat) könnten den Weg für eine Inverkehrbringung und Nutzung von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 als Nahrungsergänzungsmittel bzw. Probiotikum (s. I.2.1.1.1) in Deutschland ebnen.

I.1.2.2 Pathogenität

Als natürlicher Besiedler der Mundhöhle ist *S. salivarius* als ein primär apathogener Keim anzusehen. Einzelne Fälle von *S.-salivarius*-assoziierten Infektionen wurden allerdings dokumentiert. Dabei handelt es sich zumeist um Infektionen verursacht durch Missachtung hygienischer Maßnahmen während chirurgischer Eingriffe oder um opportunistische Infektionen bei immunsuppremierten Individuen.

Hygienische Mängel bei Spinalanästhesien (Berrouschot et al. 1997, Bouhemad et al. 1998, Idogoras et al. 2001, Kaiser et al. 1997, Laurila et al. 1998, Newton et al. 1994, Trautmann et al. 2002, Yaniv et al. 2000) oder Lumbalpunktionen (Veringa et al. 1995) führten zu iatrogener Meningitis. Zu diesem Krankheitsbild kam es ebenfalls bei neurochirurgischen Eingriffen (Watanakunakorn 1992, Megarbane et al. 2000). Infektionen durch Viridansstreptokokken bei gastrointestinalen Endoskopien (Carley 1992, Lee et al. 2000) und dentalen Eingriffen (Marda et al. 2002, Romero-Gomez et al. 1999, Watanakunakorn et al. 1993) wurden als Ursache für Bakteriämien oder Abszesse dokumentiert. Diese Bakteriämien

wurden sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern beschrieben (West et al. 1998). Opportunistische Infektionen konnten bei Patienten mit Bronchialkarzinomen (Svane 2000), Kolonkarzinomen (Legier 1991) und Leukämien (Beighton et al. 1994) nachgewiesen werden. Durch *S. salivarius* verursachte Infektionen des Respirationstraktes (Gentry et al. 1992) sind hingegen sehr selten. Weiterhin wurden einzelne Fälle von Noma (Paster et al. 2002), Impetigo bullosa (Brook 1980), Tonsillitis (Rajasuo et al. 1996) und Endophthalmitis (Heidemann et al. 1989) beschrieben. Endokarditiden, welche sehr häufig mit Viridansstreptokokken assoziiert sind, waren jedoch nur selten auf die Art *S. salivarius* zurückzuführen (Crawford et al. 1986, Horaud et al. 1984).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass *S. salivarius* nur sehr selten opportunistisch infektiös ist und somit bei immunkompetenten Individuen und bei Beachtung der geforderten klinischen Hygiene keine Gefahr darstellt. Da humane Schleimhäute eine physiologische Flora besitzen müssen, ist *S. salivarius* als Besiedler nahezu jeder anderen Bakterienspezies in Bezug auf Benefit (groß) und Risiko (gering) vorzuziehen. Ein absoluter Schutz gegenüber einer Infektion durch ein physiologisch den Menschen besiedelndes Bakterium wird und kann es aber nicht geben.

Im Fall einer Infektion reagiert *S. salivarius* sensibel auf zahlreiche Antibiotika, so dass auch beim Auftreten einer Erkrankung der Behandlungserfolg sehr sicher ist.

I.1.2.3 Identifikation

Die genetische Identifikation von *S. salivarius* läuft meist durch Abgrenzung von anderen Spezies der Streptokokken ab.

So dokumentierten Garnier et al. eine Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Erfassung des D-Alanin:D-Alanin-Ligasegens. Dieses ist speziesspezifisch für Prokaryonten, die Peptidoglykane synthetisieren. Mit Hilfe dieser PCR konnte *S. salivarius* identifiziert werden (Garnier et al. 1997).

Igarashi et al. entwickelten eine spezifische Dextranasegen-gerichtete PCR für *S. salivarius* aufgrund seiner Fähigkeit Dextranase zu synthetisieren (Igarashi et al. 2001).

Eine spezifische PCR zur Detektion eines bestimmten Stammes, wie zum Beispiel *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12, wurde bislang nicht dokumentiert, wäre aber essentiell, um einen solchen Stamm entweder in einem damit angereicherten (z.B. Milch-) Produkt oder

damit assoziierten Kolonisations- (physiologisch) bzw. Infektions- (pathologisch) Prozess nachweisen zu können.

I.2 Bacteriocine und Bacteriocin-like-inhibitory-substances (BLIS)

Bacteriocine sind antibiotisch wirksame Peptide, die eine abtötende Wirkung gegen andere Stämme derselben oder einer nahverwandten Bakterienart besitzen.

Sie werden sowohl von gramnegativen als auch von grampositiven Bakterien produziert.

Die erste Dokumentation einer von *Escherichia coli* produzierten antibiotischen Substanz, die später als Colicin V bezeichnet wurde, erfolgte 1925 durch Gratia. Colicine sind von *E. coli* ribosomal synthetisierte, hochmolekulare Proteine mit einer Masse von 29 bis 90 Dalton. Sie enthalten Domänen, die zunächst eine Adhäsion an Rezeptoren der äußeren Membran der Zielzelle erreichen und dann eine Translokation mit anschließendem Zelltod bewirken.

Das Zielerregerspektrum dieses Wirkmechanismus ist sehr gering und umfasst nur artverwandte Spezies. Mit diesem Modell des Colicins wurde lange der Begriff Bacteriocin gleichgesetzt (Jack et al. 1995).

Aufgrund des Unterschiedes im Mechanismus der Bacteriocinwirkung grampositiver Bakterien zu diesem Prototyp werden die antibiotischen Substanzen grampositiver Bakterien Bacteriocin-like-inhibitory-substances (BLIS) genannt (Tagg 1992):

BLIS haben eine geringere molekulare Masse, sind hitzestabil und kationisch.

Sie werden als Präpeptide, bestehend aus einer Leadersequenz und einem Propeptid, gebildet und posttranskriptionell modifiziert.

Die Zellmembranen grampositiver Bakterien gewähren die Passage relativ großer Moleküle, so dass sie keine Rezeptoren auf der äußeren Zellmembran benötigen, um in die Zielzelle einzudringen. Daher zeigen Bacteriocine grampositiver Bakterien ein breiteres Wirkungsspektrum.

Man unterscheidet zwei Formen von BLIS: Zum einen die Lantibiotika, deren charakteristisches Merkmal schwefelhaltige Ringstrukturen mit einer Klasse von Nicht-Standardaminoacidsäuren sind und zum anderen jene, denen diese Merkmale fehlen.

Die Wirkung von Bacteriocinen macht man sich besonders in der Nahrungsmittelindustrie zu Nutzen. Weitere Bedeutung haben die isolierten Bacteriocine von Bakterien, die in Interaktion mit pathogenen Keimen stehen (Jack et al. 1995) und häufig in der Lebensmittelherstellung verwendet werden. So wird zum Beispiel das Bacteriocin Piscicocin CS526 (*Carnobacterium piscicola*) mit einer Masse von 4,43 Dalton verwendet, um das Wachstum von *Enterococcus* und *Listeria* zu hemmen (Yamazaki et al. 2005).

I.2.1 Lantibiotika

Lantibiotika sind antibakterielle Peptide, die sich durch intramolekulare Ringstrukturen auszeichnen. An dem Aufbau der Ringstrukturen sind die Thioether-Aminosäuren Lanthionin und 3-Methylanthionin beteiligt. Zusätzlich findet man weitere seltene nichtproteinogene Aminosäuren wie Didehydroalanin (Dha), Didehydrobutyrin (Dhb), D-Alanin, S-Aminovinyl-D-Cystein, S-Aminovinyl-D-Methylcystein, Erythro-3-hydroxyaspartat und Lysinoalanin (Jung 1991).

Lantibiotika werden im Gegensatz zu anderen Peptidantibiotika nicht durch einen Multi-enzymkomplex sondern aus ribosomal gebildeten Vorläuferproteinen durch posttranslationelle Modifikation gebildet (Hurst 1966). Ein Strukturgen kodiert jedes Lantibiotikum (Banerjee et al. 1988). Erstes Produkt der Synthese ist ein Präpeptid. Dieses besteht aus einer N-terminalen Leadersequenz und einem C-terminalen Propeptid. Durch posttranskriptionelle Modifikation, bei der auch die für die Lantibiotika charakteristischen Thioetherbrücken entstehen, erhält das Propeptid seine nahezu endgültige Form. Anschließend wird das Leaderpeptid proteolytisch vor oder während des Transportes durch die Cytoplasmamembran abgespalten. Das kodierende Gen für diese Protease liegt ebenfalls auf dem gleichen Operon im selben Gencluster wie das Bacteriocin-Gen (Bierbaum et al. 1993).

Aufgrund ihrer Struktur und Wirkungsweise lassen sich die Lantibiotika in zwei große Gruppen unterteilen – die Typ-A- und Typ-B-Lantibiotika:

Typ-A-Lantibiotika besitzen eine langgestreckte, schraubenförmige Konformation und sind amphiphil. Sie haben eine molekulare Masse von 2,164 bis 3,488 Dalton (22 bis 34 Aminosäurereste), sind positiv geladen und werden von *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* und *Bacillus* gebildet.

Das bekannteste Typ-A-Lantibiotikum ist das Nisin, welches von *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* produziert wird. Nisin hat besondere Bedeutung in der Milchindustrie (Bierbaum et al. 1993).

Die prinzipielle Wirkungsweise von Typ-A-Lantibiotika ist von membranaktiver Art (Kordel et al. 1986). In wässrigem Milieu nehmen die überwiegend kationischen Peptide eine amphiphile, helikale Konformation an und interagieren mit der Zellmembran der Zielzelle (Driessen et al. 1995). Dieses Modell wurde für einige der Typ-A-Lantibiotika wie auch speziell für Nisin und Epidermin erweitert und spezifiziert. Diese binden an Lipid II, eine Peptidoglykanvorstufe in der Zellmembran (Brötz et al. 1998, Breukink et al. 1999). Aufgrund ihrer geringen Größe lagern sie sich in Gruppen senkrecht zur Oberfläche in die Membran ein und bilden wassergefüllte Poren. Die Poren haben einen Durchmesser von 0,1 bis 2 Nanometern und sind nur für eine kurze Zeit von wenigen Millisekunden bis 30 Sekunden geöffnet. Während dieser Zeit treten kleinste Metaboliten wie Aminosäuren und ATP aus der Zelle aus (Benz et al. 1991). Gleichzeitig bricht das Membranpotential zusammen und die Biosynthese der Zielzelle wird gestoppt.

Für Nisin konnte kürzlich ebenfalls eine Funktion als Botenstoff für die Messung der Zelldichte („quorum sensing“) nachgewiesen werden (Sturme et al. 2002).

Typ-B-Lantibiotika weisen eine kompaktere, globuläre Struktur auf. Sie haben eine negative Ladung und eine molekulare Masse von 1,959 bis 2,041 Dalton (Bierbaum et al. 1993).

Innerhalb der Gruppe der Typ-B-Lantibiotika unterscheidet man aufgrund ihrer Konfiguration und Wirkungsweise zwei Subtypen:

Die Typ-B-Lantibiotika, deren Aufbau dem des Cinnamycins gleichen, welches von *Streptomyces cinnamoneus* produziert wird, verfügen über eine Kopf-Schwanz-Symmetrie, die sich in einer kugelartigen Morphologie darstellt. Sie sind aus 19 Aminosäuren aufgebaut und haben eine neutrale bis negative Nettoladung. Lantibiotika vom Cinnamycintyp haben ebenfalls eine membranaktive Wirkung. Sie binden Phosphatidylethanolamin, welches unterschiedliche Auswirkungen wie die Hemmung der Phospholipase A2 hat (Fredenhagen et al. 1990).

Eine weitere Untergruppierung der Typ-B-Lantibiotika bilden Mersacidin (*Bacillus subtilis*) und Actagardin (*Actinoplanes* sp.). Durch die Bindung an Lipid II formieren sie keine Poren,

sondern greifen in die Peptidoglycan-Biosynthese ein und hemmen die Transglycosylierung (Hsu et al. 2003).

I.2.1.1 Salivaricin A

Salivaricin A (SalA) gehört zu den Typ-A-Lantibiotika (s. I.2.1.). Es hat eine molekulare Masse von 2,315 +/- 1,1 Dalton.

Salivaricin A wird von verschiedenen Stämmen von *S. salivarius* in unterschiedlicher Menge produziert. Die Strukturgene des Salivaricin-A-Operons kodieren für das entsprechende Präpeptid (salA), für Peptide bzw. Enzyme, die die posttranskriptionelle Modifikation und den Export des Proteins bewirken (salBCTX), sowie für ein Immunitäts- und Selbstregulierungsprotein (salYKR). Bei der Transkription entstehen zwei mRNA-Transkripte: Zum einen ausschließlich salA-mRNA und zum anderen das Komplementtranskript salABCTXYKR. Über einen Loop sind diese beiden Prozesse miteinander gekoppelt, ermöglichen aber eine verstärkte Produktion von SalA im Vergleich zu der Synthese der modifizierenden und regulierenden Peptide. Das Präpeptid besteht aus 51 Aminosäureresten (*S. salivarius* 20P3); das biologisch aktive Peptid aus 22 Aminosäureresten. Dieses enthält die für die Lantibiotika charakteristischen seltenen Aminosäuren Lanthionin (ein Rest) und β -Methyllanthionin (zwei Reste) (Ross et al. 1993, Upton et al. 2001).

1999 wurden aufgrund der BLIS-positiven Wirkung von *S. salivarius* gegenüber *S. pyogenes*, der als ein obligat humanpathogener Keim für Pharyngitiden verantwortlich ist (s. I.1.1), in einer brasilianischen Studie Schulkinder auf einen BLIS-positiven Stamm hin untersucht, die in ihren letzten drei Lebensjahren an keiner Entzündung des Mundrachenraumes erkrankt waren. Als Kontrollgruppe dienten 54 Kinder, die wiederholt an Infektionen durch *S. pyogenes* litten. Anhand von Antagonistentests wurde dargestellt, dass 98 Prozent der nicht erkrankten Schulkinder Träger eines BLIS-positiven *S.-salivarius*-Stammes waren. Innerhalb der Kontrollgruppe demonstrierten aber nur 53,7 Prozent der Kinder einen BLIS-positiven Stamm (Fantinato et al. 1999).

Eine noch umfangreichere Studie wurde im Jahr 2000 in Dunedin, Neuseeland, durchgeführt. In einem Zeitraum von zehn Monaten wurden 780 Grundschulkinder auf Kolonisation mit einem BLIS-positiven *S.-salivarius*-Stamm untersucht und die Rate der Infektionen durch *S. pyogenes* dokumentiert. Neun Prozent der Schulkinder trugen einen Stamm mit einer inhibitorischen Wirkung in Form des P-Typs 677 und elf Prozent in Form des P-Typs 226. Nur 17 Prozent der P-Typ 677 Träger erkrankten während der Studie an einer *S.-pyogenes*-Infektion. Im Vergleich dazu litten allerdings 32 Prozent der BLIS-negativen Schulkinder an einer entzündlichen Erkrankung des Pharynx, die auf eine Infektion mit *S. pyogenes* zurückzuführen war (Dierksen et al. 2000).

Untersuchungen auf molekularer Ebene zur inhibitorischen Wirkung von *S. salivarius* 20P3 wurden 2001 von Upton et al. veröffentlicht. Nicht nur *S. salivarius* sondern ebenfalls einige *S.-pyogenes*-Stämme verfügen über ein mehr oder weniger intaktes (rudimentäres) Salivaricin-Operon. So ist auch *S. pyogenes* T11 (M-Typ 4) Produzent des Salivaricins A1 (SalA1) und der modifizierenden Strukturgene. Dagegen weist *S. pyogenes* SF370 (M-Typ 1) zwar ebenfalls das salA1-Strukturgen auf, kann aber aufgrund einer 3,2-kb-Deletion im Bereich der modifizierenden Strukturgene salBCT das entsprechende Präpeptid nicht prozessieren und auch nicht aus der Zelle sezernieren.

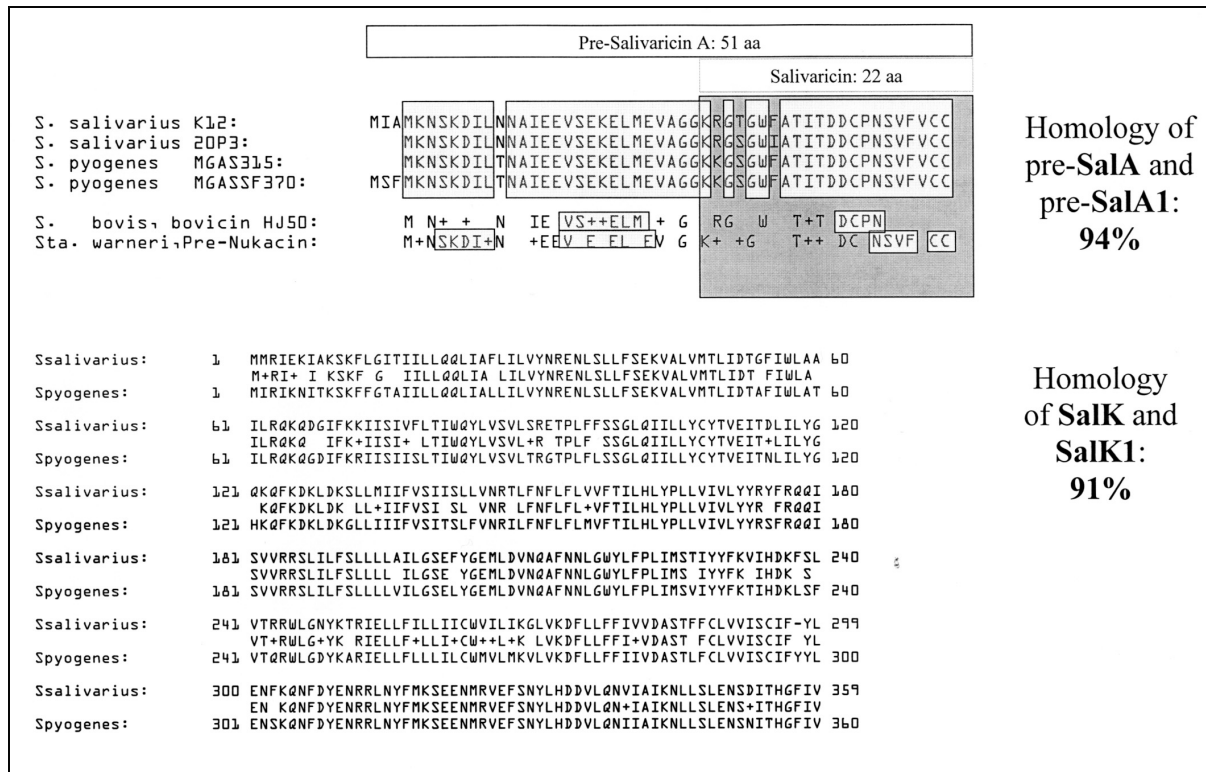


Abbildung 3: Homologie der Präpeptide von Salivarin A und Salivarin A1 sowie der an der Salivarin-Detektion und Signalleitung beteiligten Histidinkinase SalK und SalK1

Mit Hilfe einer spezifischen PCR konnte dargestellt werden, dass von den untersuchten M-Typen nur M-Typ 4 und M-Typ 57 über das komplette salBCT-Gen verfügen. *S. pyogenes*-Stämme, die die Deletion im Bereich salBCT aufweisen, reagieren besonders sensibel auf SalA und SalA1 während die übrigen M-Typen wahrscheinlich eigene Salivarin-ähnliche Substanzen produzieren und somit auch gegenüber dem SalA weniger empfindlich reagieren dürften. Es ist davon auszugehen, dass die Produkte SalA bzw. SalA1 selbstregulierend ihre Transkription modulieren, sowie die Produzenten autoimmun gegen ihr eigenes Bacteriocin sind. Produktion und Immunität sind koreguliert. (Dabei unterscheiden die Produzenten wahrscheinlich nicht zwischen den beiden Produkten SalA und SalA1, so dass eine Koexistenz von SalA1-produzierenden *S. pyogenes*-Stämmen und *S. salivarius* möglich ist.) Da nur die M-Typen 4 und 57 das salBCT Gen transkribieren, ist in den meisten Fällen von einer stark inhibitorischen Wirkung von *S. salivarius* gegen *S. pyogenes* auszugehen. Selbst bei den beiden M-Typen 4 und 57 wirkt die hohe Konzentration des *S. salivarius*-Bacteriocins letal (Upton et al. 2001).

1.2.1.1.1 BLIS-K12-Throat-Guard

Aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung gegenüber *S. pyogenes* ist seit Juni 2002 *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 unter dem Namen BLIS-K12-Throat-Guard auf dem neusee-

ländischen Markt erhältlich. Das Nahrungsergänzungsmittel in Form von Tabletten enthält mehr als 100 Millionen lyophilisierte K12-Zellen und ermöglicht die Kolonisation in der Mundhöhle für einen Monat (s. II.1.1.2). Für die wissenschaftlichen Untersuchungen in Verbindung mit dieser Doktorarbeit wurde uns der K12-Stamm von Prof. Dr. John R. Tagg zur Verfügung gestellt.

I.3 Intention

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Etablierung einer spezifischen Nachweismethode für den oral-probiotischen Stamm *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12, der mit Hilfe von BLIS-K12-Throat-Guard in die Mundhöhle eingeführt wird. Das Verfahren soll sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch die Untersuchung des Kolonisationsverhaltens bei einem einzelnen Probanden getestet werden.

BLIS-K12-Throat-Guard ist ein Nahrungsergänzungsmittel, welches auf dem neuseeländischen Markt bereits etabliert wird. Seine protektive Wirkung wird gegen den vor allem für Schulkinder gefährlichen Pharyngitiserreger *S. pyogenes*, gegen den es bislang keine Impfung gibt, eingesetzt. Der Wunsch nach einer Einführung des Nahrungsergänzungsmittels BLIS-K12-Throat-Guard auf dem deutschen Markt zieht die Forderung nach einem ausreichend sensitiven und spezifischen Nachweis für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 nach sich; besonders da *S. salivarius* bei immunsuppremierten Patienten zu opportunistischen Infektionen geführt hat (s. I.1.1.4). Weiterhin ist es von Bedeutung, Laborstämme jederzeit in den damit produzierten Nahrungsmitteln bzw. auch in der Umwelt nachweisen zu können.

II MATERIAL UND METHODEN

II.1 Material

II.1.1 Bakterienstämme und Patientenmaterial

II.1.1.1 Bakterienstämme

S. salivarius ssp. *salivarius* K12

S. salivarius DSM 20067

S. salivarius AC 1802

S. salivarius AC 2051

S. salivarius AC 3342

S. salivarius AC 3994

S. salivarius AC 4381

S. mutans ATCC 25175

II.1.1.2 Patientenmaterial

Für die vorliegende Arbeit wurden Proben von einem einzelnen, vierzigjährigen Probanden untersucht. Der Proband war klinisch gesund und hat drei Monate vor dem Untersuchungszeitraum keine Antibiotika genommen.

Aufgabe war es, die Kolonisation von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 in den verschiedenen Nischen der Mundhöhle qualitativ und quantitativ zu verfolgen. Die Kolonisation wurde durch die Gabe von BLIS-K12-Throat-Guard (BLIS Technologies Limited, Wellington, Neuseeland) erreicht.

Das als Nahrungsergänzungsmittel in Form von Tabletten in Neuseeland entwickelte und vertriebene Probiotikum enthält mehr als 100 Millionen lyophilisierte K12-Zellen pro Tablette und ermöglicht nach Herstellerangaben die Kolonisation in der Mundhöhle für einen Monat. Der Patient spült am ersten Tag mit zehn Millilitern einer Chlorhexidinlösung für 30 Sekunden und nimmt die erste Tablette BLIS-K12-Throat-Guard zu sich. In Intervallen von zwei bis vier Stunden werden weitere drei Tabletten verabreicht. In den folgenden zwei Tagen wird dieser Ablauf wiederholt, die Menge der Chlorhexidinlösung wird mit zehn Millilitern beibehalten.

Die Abstrichentnahme erfolgte am 1., 2., 3., 5., 7., 8., 10., 14., 22., 28. und 43. Tag an 16 Stellen der Mundhöhle (Lokalisation: s. II.2.2).

II.1.2 Bakteriologische Kultur- und Transportmedien

BHI-Bouillon:	37 g Fertigmedium (Oxoid CM 225) in 1 l H ₂ O suspendieren, autoklavieren
Columbia Agar:	39 g Columbia-Agar-Base (Oxoid CM 331) in 1 l H ₂ O suspendieren, autoklavieren und nach dem Abkühlen auf 50°C Zusatz von 5% sterilem Schafblut (FSR 1055); in Petrischalen ausgießen

II.1.3 Chemikalien und Enzyme

Agarose:	Merck KGaA, Darmstadt
AmpliSize™ Molecular Ruler (50-2000 bp Ladder):	Bio-Rad GmbH, München
Big Dye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit:	ABI (Perkin Elmer, Applied Biosystems GmbH), Weiterstadt
Bromphenolblau:	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
dA-/ dC-/dG-/dT-Phosphoramid:	Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA
Ethidiumbromid:	Merck KGaA, Darmstadt
LCL Karies-Testmaterial:	LCL biokey GmbH, MTZ, Aachen
Mutanolysin:	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NAP-5-Säulen:	Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
QIAamp® Blood & Tissue Kit:	QIAGEN GmbH, Hilden
Trisbase:	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TaqMan® PCR Master Mix:	Applied Biosystems, Weiterstadt

II.1.4 Puffer und Lösungen

Agarosegel (1,5%):	0,45 mg Agarose + 30 ml TPE (1x)
Agarosegel (2%):	0,6 mg Agarose + 30 ml TPE (1x)
Agarosegel (2,5%):	0,75 mg Agarose + 30 ml TPE (1x)
Aqua bidest/ DEPC:	Doppelt destilliertes Wasser (Aqua bidest) zur Eliminierung von RNasen auf 0,07% DEPC eingestellt, autoklavieren
Blue Marker:	40% Sucrose, 0,1% Bromphenolblau
dNTPs-Gebrauchslösung:	Jeweils 12,5 µl der dNTPs-Stammlösung entnehmen und auf 1 ml mit Aqua bidest auffüllen, Endkonzentration der dNTPs: 2 mM
Ethidiumbromidbad:	1 Tablette/ 10 ml Aqua bidest, 1 ml dieser Stammlösung verdünnt auf 1 l einsetzen
PCR-Puffer I (1x):	3,728 g/ 100 ml KCl, 10 ml 1 M Tris-HCL (pH 8,3), 10 mg/ 100 ml Gelantine, 0,305 g/ 100 ml MgCl ₂
TE-Puffer:	20 mM Tris HCl, 2 mM EDTA, 1,2% Triton
TPE-Puffer (1 x):	0,08 M Trisphosphat, 0,002 M EDTA
TPE-Puffer (10 x):	108 g/l Trisbase, 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0, 15,5 ml 85% Phosphorsäure

II.1.5 Oligonukleotide (PCR-Primer)

II.1.5.1 Oligonukleotide für die 16S-rDNA-gerichtete PCR

pF1: Forward-Primer als universeller Primer zur Amplifizierung des 16S-rDNA-Gens bei Eubakterien (Domäne *Bacteria*):

5' AGA' GTT' TGA' TCC' TGG' CTC' AG 3'

pF4: Alternativer Forward-Primer als universeller Primer zur Amplifizierung des 16S-rDNA-Gens bei Eubakterien (Domäne *Bacteria*):

5' CAT' GGC' TGT' CGT' CAG' CTG' GT 3'

pR1: Reversed-Primer als universeller Primer zur Amplifizierung des 16S-rDNA-Gens bei Eubakterien (Domäne *Bacteria*):

5' GGC' TAC' CTT' GTT' ACG' ACT' T 3'

II.1.5.2 Oligonukleotide für die ITS-gerichtete PCR

StrepITSSalF: Forward-Primer zum spezifischen Nachweis (ITS) von *S. salivarius*:

5' AAC' GGA' ATG' TAC' TTG' AGT' TTC' 3'

StrepITSSalR: Reversed-Primer zum spezifischen Nachweis (ITS) von *S. salivarius*:

5' ATC' TAT' ATG' TAT' TTA' ATT' AC 3'

II.1.5.3 Oligonukleotide für die Ligasegen-gerichtete PCR

StsalF: Forward-Primer zum spezifischen Nachweis von *S. salivarius* (Ala-Ala-Ligase):

5' GCA' GCA' GTA' GCA' GAG' ACG' CT 3' (Garnier et al. 1997)

StsalR: Reversed-Primer zum spezifischen Nachweis von *S. salivarius* (Ala-Ala-Ligase):

5' CAG' TAC' TGA' AGA' CGT' CCG' TG 3' (Garnier et al. 1997)

II.1.5.4 Oligonukleotide für die Dextranasegen-gerichtete PCR

Ssa442F: Forward-Primer zum spezifischen Nachweis von *S. salivarius* (Dextranase):

5' AAC' GTT' GAC' CTT' ACG' CTA' GC 3' (Igarashi et al. 2001)

Ssa2712R: Reversed-Primer zum spezifischen Nachweis von *S. salivarius*
(Dextranase):

5' GAT' TCT' GTC' AAA' GAA' GCC' AC 3' (Igarashi et al. 2001)

II.1.5.5 Oligonukleotide der Salivaricin-B-Operon-gerichteten PCR

psalBF: Forward-Primer zum Nachweis des SalB-Operons (Salivaricin B):

5' GGT' GGT' GGA' GTA' ATC' CAA' AC 3'

psalBR: Reversed-Primer zum Nachweis des SalB-Operons (Salivaricin B):

5' TTA' AGA' GCA' ACA' AGT' AAA' CA 3'

II.1.5.6 Oligonukleotide der Salivaricin-A-Operon-gerichteten PCR

psalOAF1: Forward-Primer zum Nachweis des SalA-Operons:

5' TCT' GGT' CCT' CTC' AGA' TGT' TAG' CTT' T 3'

psalAF1: Forward-Primer zur Sequenzierung des SalA-Operons von *S. salivarius* ssp.
salivarius K12 sowie zum Nachweis des SalA-Operons:

5' AGA' TGT' ATT' GGT' TAC' AAT' AAG' AGC' G 3'

psalAF2: Forward-Primer zum Nachweis des SalA-Operons:

5' GAT' ATT' TTG' AAC' AAT' GCT' ATC' GAA' GA 3'

psalAR1: Reversed-Primer zum Nachweis des SalA-Operons:

5' CCT' GCT' TAG' ACT' AAG' TCT' AAA' CAG' 3'

psalAR2: Reversed-Primer zum Nachweis des SalA-Operons:

5' ATT' AAC' AAC' AAA' CGA' ATA' CTG' AG 3'

psalAR3: Reversed-Primer zur Sequenzierung des SalA-Operons von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 sowie zum Nachweis des SalA-Operons :

5' GGC TTG' CAA' AAA' TTT' TCC' ATA' G 3'

II.1.5.7 Oligonukleotide für die stammspezifische K12-PCR

pK12F: Forward-Primer als stammspezifischer Primer für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12:

5' GAA' GGG' AGA' ATG' GAT' GCC' ATG' 3'

pK12R: Reversed-Primer als stammspezifischer Primer für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12:

5' GTT' GTT' GGT' ATT' CTG' ACT' TTA' ATT' CA 3'

II.1.6 Geräte und Computerprogramme

ABI (Perkin Elmer, Applied Biosystems GmbH), Weiterstadt:	ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser, GeneScan™ Analysis Software, Big Dye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit, 96-wells Mikrotiterplatten
Applied Biosystems, Foster City, CA, USA:	ABI-PRISM 7000 Sequence Detection System, ABI-PRISM 7000 SDS software
Biochrom Ltd., Cambridge, UK:	Ultrospec 2100 Pro
Biometra, Göttingen:	Biodoc Analyze 2.0 (Bilderfassung), UNO-Thermoblock
Beckman, München:	Oligo 1000 DNA Synthesizer
cti, Heidelberg:	Elektrophoresegerät E455, Elektrophorese-Kammer, Proben-Kämme
Eppendorf AG, Hamburg:	Eppendorfgefäße 1,5 ml, Pipetten, Zentrifuge 5804

Falcon™:	Polyester Fiber-Tipped Applicator Swab
Greiner bio-one, Frickenhausen:	Petrischalen, Impfösen
Heraeus, Osterode:	Varifuge K
IKA, Staufen:	Minishaker MS2
Pharmacia Biotech:	RNA/ DNA Calculator GeneQuant II
Sarstedt, Nümbrecht:	Pipettenspitzen

II.2 Allgemeine Methoden

II.2.1 Kultivierung und Aufbewahrung der Bakterienstämme

Alle Bakterienstämme wurden auf Columbia-Agarplatten mit fünf Prozent Schafsblut bei zehn Prozent CO₂ und 37°C für ein bis drei Tage bebrütet. Die Bakterien wurden regelmäßig passagiert. Für die längere Aufbewahrung der Stammkulturen wurden die Bakterien bei -70°C eingefroren.

II.2.2 Entnahme und Transportverfahren der Patientenmaterialien

Das klinische Material wurde an folgenden Stellen in der Mundhöhle entnommen.

	Habitat	Lage	Entnahmemedium
1.	Pharynx	rechts	Steriles Wattestäbchen
2.	Pharynx	links	Steriles Wattestäbchen
3.	bukkal	rechts	Steriles Wattestäbchen
4.	bukkal	links	Steriles Wattestäbchen
5.	Zunge	dorsal	Steriles Wattestäbchen
6.	Zunge	ventral	Steriles Wattestäbchen
7.	Zahn I. Quadrant	bukkal	Steriles Wattestäbchen

	Habitat	Lage	Entnahmemedium
8.	Zahn II. Quadrant	palatinal	Steriles Wattestäbchen
9.	Zahn III. Quadrant	bukkal	Steriles Wattestäbchen
10.	Zahn IV. Quadrant	lingual	Steriles Wattestäbchen
11.	Sulcus I. Quadrant	palatinal	Sterile Papierspitze ISO 45
12.	Sulcus II. Quadrant	bukkal	Sterile Papierspitze ISO 45
13.	Sulcus III. Quadrant	lingual	Sterile Papierspitze ISO 45
14.	Sulcus IV. Quadrant	bukkal	Sterile Papierspitze ISO 45
15.	Speichelprobe stimuliert		LCL Karies-Testmaterial
16.	Speichelprobe		LCL Karies-Testmaterial

Das Material wurde in 200 Millilitern BHI-Bouillon mit zwei bis drei sterilen Glaskügelchen suspendiert. Die Glaskügelchen erleichtern die Überführung des Materials vom Träger in die Flüssigkeit und die Homogenisierung der Probe. Die Suspension wurde bei -20°C nicht länger als drei Tage gelagert.

II.3 Genetische Methoden

II.3.1 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

Die Isolierung der Nukleinsäure erfolgte mit dem QIAamp-Blood-and-Tissue-Kit der Firma Qiagen.

Die Proben wurden in 300 Mikrolitern Aqua bidest/ DEPC in einem 1,5-Milliliter-Eppendorfgefäß mit Glaskugeln aufgenommen und drei Minuten mit 8000 rpm („revolutions per minute“) zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 Mikrolitern Aqua bidest/ DEPC versetzt und erneut für drei Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nach Zugabe von 180 Mikrolitern ATL-Puffer (Qiagen-Kit) und 20 Mikrolitern Protein K (Kit) erfolgte nach Vortexen eine Inkubation bei 56°C für 30 Minuten. Der Probe wurden 200 Mikroliter AL-Puffer (Kit) zugesetzt. Nach erneutem Mischen und einer Inkubation bei 70°C

für zehn Minuten wurden 200 Mikroliter Ethanol z.A. (100%) zugefügt. Der Inhalt des Eppendorfgefäßes wurde in eine QIAamp-Spin-Säule, die sich in einem zwei Milliliter Röhrchen befand, pipettiert und für eine Minute mit 8000 rpm zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen. Die Spin-Säule wurde mit 500 Mikrolitern AW1-Puffer (Kit) gewaschen, für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert, anschließend mit 500 Mikrolitern AW2-Puffer (Kit) behandelt und für drei Minuten mit 13000 rpm zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde verworfen. Zum Eluieren der Nukleinsäure wurden der auf ein neues Eppendorfgefäß überführten Spin-Säule auf 70°C vorgewärmtes Aqua bidest/ DEPC zugesetzt. Die Probe wurde für drei Minuten bei Raumtemperatur stengelassen und für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Der letzte Schritt der Aufbereitung wurde wiederholt.

Zur Optimierung der Nukleinsäuregewinnung wurden die Proben alternativ in 200 Mikrolitern Aqua bidest/DEPC aufgenommen, für drei Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert und anschließend für zehn Minuten bei 96°C gekocht. Nach Abkühlen auf Eis wurde die Probe erneut zentrifugiert.

Weiterhin wurde die Zugabe von zehn Mikrolitern Mutanolysin (50 units) und 20 Mikrolitern TE-Puffer für 30 Minuten bei 37°C erprobt.

II.3.2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäure erfolgte mit Hilfe des RNA/DNA-Calculators (Gene-Quant II) sowie des Ultrospec-2100-Pro durch spektrometrische Messung einer 1:20-Verdünnung bei $\lambda=260$ nm.

II.3.3 Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden

Die Synthese der Oligonucleotide erfolgte mit dem OLIGO-1000-DNA-Synthesizer von Beckmann nach dem Cyanoethyl-Phosphoramidit-Ergebnisprotokoll und der Festphasenmethodik auf Säulen. Die Oligonukleotide wurden mit 32%iger Ammoniaklösung von der Säule eluiert. Die Schutzgruppen wurden durch Inkubation bei 70°C für 90 Minuten abgespalten. Die Suspension wurde auf zwei 1,5-Milliliter-Eppendorfgefäße verteilt und bei 60°C für zwei Stunden eingedampft. Jedes Sediment wurde in 500 Mikrolitern Aqua bidest aufgenommen und über eine NAP-5-Säule entsalzt. Es folgt eine Konzentrationsbestimmung und eine Einstellung der Oligonukleotidkonzentration auf 13 Mikrogramm pro 100 Mikrolitern Aqua bidest.

II.3.4 Durchführung der Polymerasekettenreaktion

Das Verfahren der PCR wurde zum Nachweis des Salivarcin-A-Operons sowie des Salivarcin-B-Operons, zum universellen Nachweis des 16S-rDNA-Gens bei Eubakterien (alle echten Bakterien der Domäne *Bacteria*), zum spezifischen Nachweis von *S. salivarius* sowie zum stammspezifischen Nachweis von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 durchgeführt.

II.3.4.1 Qualitative PCR

II.3.4.1.1 16S-rDNA-gerichtete PCR

Die Bedeutung dieser PCR-Reaktion lag im Direktnachweis von Bakterienmaterial und wurde parallel zu den spezifischen Untersuchungen durchgeführt. Diese PCR diente daher mehr als Positivkontrolle, um auszuschließen, dass ein Material (zum Beispiel Speichel und Mukosa-Abstriche) inhibierende Faktoren wie Albumin oder Magnesiumantagonisten enthielt.

II.3.4.1.2 ITS-gerichtete PCR

Ziel der ITS-gerichteten PCR war ein artspezifischer Nachweis von *S. salivarius*.

Template:	<i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12 (294 ng/ 3 µl)	<i>S. salivarius</i> DSM 20067 (253 ng/ µl)
Forward-Primer:	2,5 µl StrepITSSalF (2 pmol)	2,5 µl StrepITSSalF (2 pmol)
Reversed-Primer:	2,5 µl StrepITSSalR (2,2 pmol)	2,5 µl StrepITSSalR (2,2 pmol)
PCR-Puffer I:	5 µl	
dNTPs:	2,5 µl	
Aqua bidest:	34,5 µl	36,5 µl
<i>Taq</i> unit:	0,5 µl	
Gesamtvolumen:	50 µl	
Amplifikationsbedingungen:	94°C 1 min; 30 x 94°C, 1 min 48°C, 1 min 72°C, 2,5 min; 72 °C 5 min, 4°C	
Annealing T:	48°C	
Lauf :	5 min/ 25V; 40 min/ 80 V	
Amplifikatgröße:	199 bp	
Agarosegel K:	1%	

II.3.4.1.3 Ligasegen-gerichtete PCR

Die Ligasegen-gerichtete PCR diene dem artspezifischen Nachweis von *S. salivarius*.

Template:	<i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12 (490 ng/ 5 µl); <i>S. salivarius</i> DSM 20067 (1265 ng/ 5 µl); <i>S. salivarius</i> AC 1802 (48,5 ng/ 5 µl), AC 2051 (332,5 ng/ 5 µl), AC 3442 (600,5 ng/5 µl), AC 3994 (381 ng/ 5 µl), AC 4381 (2190 ng/5 µl)	<i>S. mutans</i> ATCC 25175(100 ng/ µl)
Forward-Primer:	2,5 µl StsalF (4,5 pmol)	
Reversed-Primer:	2,5 µl StsalR (3,7 pmol)	
PCR-Puffer I:	5 µl	
dNTPs:	2,5 µl	
Aqua bidest:	32,5 µl	36,5 µl
<i>Taq</i> unit:	0,5 µl	
Gesamtvolumen:	50 µl	
Amplifikationsbedingungen:	94°C 1 min; 30 x 94°C 1 min, 55°C/48°C 1 min, 72°C 2,5 min; 72°C 5 min, 4°C	
Annealing T:	55°C/ 48°C	
Lauf :	5 min/ 25 V; 30 min/ 80 V	
Amplifikatgröße:	334 bp	
Agarosegel K:	2,5%	

II.3.4.1.4 Dextranasegen-gerichtete PCR

Mit Hilfe der Dextranasegen-gerichteten PCR sollte *S. salivarius* in seiner Art dargestellt werden.

Template:	<i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12 (490 ng/ 5 µl); <i>S. salivarius</i> DSM 20067 (1265 ng/ 5 µl); <i>S. salivarius</i> AC 1802 (48,5 ng/ 5 µl), AC 2051 (332,5 ng/ 5 µl), AC 3442 (600,5 ng/5 µl), AC 3994 (381 ng/ 5 µl), AC 4381 (2190 ng/5 µl)	<i>S. mutans</i> ATCC 25175(100 ng/ µl)
Forward-Primer:	2,5 µl Ssa442F (4,3 pmol)	
Reversed-Primer:	2,5 µl Ssa2712R (4,3 pmol)	
PCR-Puffer I:	5 µl	
dNTPs:	2,5 µl	
Aqua bidest:	32,5 µl	36,5 µl
<i>Taq</i> unit:	0,5 µl	
Gesamtvolumen:	50 µl	
Amplifikationsbedingungen:	94°C 1 min; 30 x 94°C 1 min, 55°C/ 48°C 1 min, 72°C 2,5 min; 72°C 5 min, 4°C	
Annealing T:	55°C/ 48°C	
Lauf :	5 min/ 25V; 30 min/ 80 V	
Amplifikatgröße:	2271 bp	
Agarosegel K:	2,5%	

Für die Untersuchung der klinischen Proben wurde die Annealing-Temperatur auf 50°C gesenkt (Die PCR war erschwert aufgrund der Anwesenheit von Kompetitor-DNA). Weiterhin wurde die Primerkonzentration gesenkt.

Template*:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Forward-Primer:	2,5 µl Ssa442F (2,6 pmol)															
Reversed-Primer:	2,5 µl Ssa2712R (2,6 pmol)															
PCR-Puffer I:	5 µl															
dNTPs:	2,5 µl															
Aqua bidest:	32,5 µl															
<i>Taq</i> unit:	0,5 µl															
Gesamtvolumen:	50 µl															
Amplifikationsbedingungen:	94°C 1min; 30 x 94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 2,5 min; 72°C 5 min, 4°C															
Annealing T:	50°C															
Lauf :	5 min/ 25 V; 40 min/ 80 V															
Amplifikatgröße:	2271 bp															
Agarosegel K:	1%															

* Es wurden jeweils fünf Mikroliter Template eingesetzt (1-16: s. II.2.2).

II.3.4.1.5 Salivaricin-B-Operon-gerichtete PCR

Basierend auf der Gensequenz des Salivaricin-B-Operons von *S. salivarius* 20P3, die uns dankenswerterweise von Prof. Dr. John R. Tagg zur Verfügung gestellt wurde, wurde eine stammspezifische PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 entwickelt.

Template:	<i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12 (294 ng/ 3 µl)	<i>S. salivarius</i> DSM 20067 (253 ng/ µl)
Forward-Primer:	2,5 µl psalBF (2,1 pmol/ 4,3 pmol)	
Reversed-Primer:	2,5 µl psalBR (2,2 pmol/ 4,3 pmol)	
PCR-Puffer I:	5 µl	
dNTPs:	2,5 µl	
Aqua bidest:	34,5 µl	36,5 µl
<i>Taq</i> unit:	0,5 µl	
Gesamtvolumen:	50 µl	
Amplifikationsbedingungen:	94°C 1min; 30 x 94°C 1 min, 48°C 1 min, 72°C 2,5 min; 72°C 5 min, 4°C	
Annealing T:	48°C	
Lauf :	5 min/ 25 V; 40 min/ 80 V	
Amplifikatgröße:	78 bp	
Agarosegel K:	1%	

II.3.4.1.6 Salivaricin-A-Operon-gerichtete PCR

Eine stammspezifische PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12, die gegen eine oder mehrere Strukturgene des Salivaricin-A-Operons gerichtet ist, wurde mit Hilfe der publizierten Gensequenz von *S. salivarius* 20P3 (Genbank AY 005472) entwickelt.

Template:	<i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12 (294 ng/ 3 µl; 490 ng/ 5 µl)	<i>S. salivarius</i> DSM 20067 (253 ng/ µl)
Forward-Primer:	2,5 µl psalOAF1 (2,0 pmol/ 4pmol)/ psalAF1 (1,7 pmol/ 3,5 pmol)/ psalAF2 (1,7 pmol/ 3,3 pmol)	
Reversed-Primer:	2,5 µl psalAR1 (1,9 pmol)/ psalAR2 (3,7 pmol)	
PCR-Puffer I:	5 µl	
dNTPs:	2,5 µl	
Aqua bidest:	32,5 µl/ 34,5 µl	36,5 µl
<i>Taq</i> unit:	0,5 µl	
Gesamtvolumen:	50 µl	
Amplifikationsbedingungen:	94°C 1min; 30 x 94°C 1 min, 48°C 1 min, 72°C 2,5 min; 72°C 5 min, 4°C	
Annealing T:	48°C	
Lauf :	5 min/ 25 V; 40 min/ 80 V	
Amplifikatgröße:	214 bp	
Agarosegel K:	1%	

Template:	<i>S. salivarius</i>				
	AC 1802 (48 ng/ 5µl)	AC 2051 (200 ng/ 3µl)	AC 3442 (240 ng/ 2 µl)	AC 3994 (229 ng/ 3 µl)	AC 4381 (438 ng/ µl)
Forward-Primer:	2,5 µl psalAF1 (3,5 pmol)/ psalAF2 (3,3 pmol)				
Reversed-Primer:	2,5 µl psalAR2 (3,7 pmol)				
PCR-Puffer I:	5 µl				
dNTPs:	2,5 µl				
Aqua bidest:	32,5 µl	34,5 µl	35,5 µl	34,5 µl	36,5 µl
<i>Taq</i> unit:	0,5 µl				
Gesamtvolumen:	50 µl				
Amplifikationsbedingungen:	94°C 1min; 30 x 94°C 1 min, 48°C 1 min, 72°C 2,5 min; 72°C 5 min, 4°C				
Annealing T:	48°C				
Lauf :	5 min/ 25 V; 40 min/ 80 V				
Amplifikatgröße:	217 bp				
Agarosegel K:	2,5%				

II.3.4.1.7 Konventionelle K12-PCR

Nach partieller Sequenzierung des Salivaricin-A-Operons (Strukturgene *salA* und *salB*) von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 wurde eine K12-PCR zur Stammidentifizierung in klinischen Materialien entwickelt.

Template*:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Forward-Primer:	2,5 µl pK12F (2,0 pmol)															
Reversed-Primer:	2,5 µl pK12R (1,7 pmol)															
PCR-Puffer I:	5 µl															
dNTPs:	2,5 µl															
Aqua bidest:	32,5 µl															
Taq unit:	0,5 µl															
Gesamtvolumen:	50 µl															
Amplifikationsbedingungen:	94°C 1min; 30 x 94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 2,5 min; 72°C 5 min; 4°C															
Annealing T:	50°C															
Lauf :	5 min/ 25 V; 25 min/ 80 V															
Amplifikatgröße:	290 bp															
Agarosegel K:	1%															

* Es wurden jeweils fünf Mikroliter Template eingesetzt (1-16: s. II.2.2).

II.3.4.1.8 Nested-PCR (K12)

Zur Darstellung geringster Mengen Template des Stammes *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 nutzte man die Methode der Nested-PCR.

Template*:	1	2	3	4	5	6	15	16
Forward-Primer:	2,5 µl psalAF1 (1,7 pmol)							
Reversed-Primer:	2,5 µl psalAR3 (1,96 pmol)							
PCR-Puffer I:	5 µl							
dNTPs:	2,5 µl							
Aqua bidest:	35,5 µl							
Taq unit:	0,5 µl							
Gesamtvolumen:	50 µl							
Amplifikationsbedingungen:	94°C 1min; 30 x 94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 2,5 min; 72°C 5 min, 4°C							
Annealing T:	50°C							
Lauf :	5 min/ 25 V; 40 min/ 80 V							
Amplifikatgröße:	1560 bp							
Agarosegel K:	1,5%							
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Forward-Primer:	2,5 µl pK12F (2,0 pmol)							
Reversed-Primer:	2,5 µl pK12R (1,7 pmol)							
PCR-Puffer I:	5 µl							
dNTPs:	2,5 µl							
Aqua bidest:	36,5 µl							
Taq unit:	0,5 µl							
Gesamtvolumen:	50 µl							
Amplifikationsbedingungen:	94°C 1min; 30 x 94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 2,5 min; 72°C 5 min, 4°C							
Annealing T:	50°C							
Lauf :	5 min/ 25 V; 40 min/ 80 V							
Amplifikatgröße:	290 bp							
Agarosegel K:	1,5%							

* In der ersten PCR der Nested-PCR wurden jeweils zwei Mikroliter Template eingesetzt; in der zweiten PCR jeweils ein Mikroliter des PCR-Produktes der ersten PCR (1-16: s. II.2.2). Hierbei wurde nur eine Auswahl der Materialien untersucht.

II.3.4.1.9 Amplifikationsbedingungen

Die PCR Ansätze wurden im Biometra-UNO-Thermoblock nach folgendem Programm prozessiert:

Schritt 1 (Vordenaturierung):	1 min bei 94°C, Zugabe von 0,5 µl <i>Taq</i> -Polymerase (Hot Start)
Schritt 2 (Denaturierung) *:	1 min bei 94°C
Schritt 3 (Annealing)*:	1 min bei entsprechender Annealing-Temperatur: 48°C: ITS-gerichtete PCR, Ligasegen-gerichtete PCR, Dextranasegen-gerichtete PCR, SalB-Operon-gerichtete PCR, SalA-Operon-gerichtete PCR 50°C: Dextranasegen-gerichtete PCR für klinische Proben, K12-PCR, Nested-PCR (K12) 55°C: Ligasegen-gerichtete PCR, Dextranasegen-gerichtete PCR
Schritt 4 (Elongation)*:	2,5 min bei 72°C
Schritt 5 (Finale Auffüllreaktion):	5 min bei 72°C
Schritt 6:	4°C

* Die Schritte 2 bis 4 wurden in 30 Zyklen wiederholt.

II.3.4.1.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse der PCR-Amplifikate fand über Elektrophorese in 1,5 bis 2,5%igem Agarosegel statt. Jeweils zehn Mikroliter der PCR-Produkte wurden mit zwei Mikrolitern Agarose-Gel-Probenpuffer (Blue-Marker) versetzt. Zum Längenvergleich diente eine 50- bis 2000-bp-Ladder. Der Vorlauf erfolgte bei 25 Volt für fünf Minuten; der Hauptlauf bei 80 Volt für 25 Minuten (K12-PCR), 30 Minuten (Ligasegen-gerichtete PCR, Dextranasegen-gerichtete PCR) oder 40 Minuten (ITS-gerichtete PCR, Dextranasegen-gerichtete PCR für klinische Proben,

SalB-Operon-gerichtete PCR, SalA-Operon-gerichtete PCR, Nested-PCR (K12)). Die Färbung des Gels erfolgte in einem Ethidiumbromidbad durch Inkubation für zehn Minuten. Anschließend wurde das Gel mit Aqua bidest gespült. Unter ultraviolettem Licht wurden die Banden dargestellt und digital erfasst.

II.3.4.2 Quantitative PCR (real-time PCR)

Eine real-time PCR zur Amplifizierung und Quantifizierung des Salivaricin-A-Operons von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 wurde unter Verwendung des ABI-PRISM-7000-Sequence-Detection-System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt, um die Proben des 3., 8., 14., 22., 28. und 43. Tag der Abstrichentnahme (Proben 4, 6, 8, 9, 10 und 11) erneut zu untersuchen und das Ausmaß des Kontaminationsproblems besser beurteilen zu können. Eingesetzt wurden die stammspezifischen K12-Primer pK12F und pK12R (s. II.1.5.7). Die PCR wurde mittels Mikrotiter-Platten (96-wells) mit jeweils 25 Mikrolitern pro Reaktionsansatz durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte im TaqMan-Format unter Verwendung des TaqMan®-PCR-Master-Mix (Applied Biosystems), 2,5 Picomol pro Primer und zwei Mikrolitern Template (ca. 50 Nanogramm Template). Angewendet wurde das folgende PCR-Temperatur-Profil:

Schritt 1 (Vordenaturierung): 10 min bei 94°C

Schritt 2 (Denaturierung)*: 15 sec bei 94°C

Schritt 3 (Annealing und Elongation)*: 1 min bei 60°C

* Die Schritte 3 bis 4 wurden in 40 Zyklen wiederholt.

Die Datenerfassung und weitere Analyse der Ergebnisse wurde mit der ABI-PRISM-7000-SDS-software (Applied Biosystems) durchgeführt. Der Betrag der initialen Kopienzahl des Salivaricin-A-Amplifikates wurde mit Hilfe des Schwellenzyklus, dem sogenannten „threshold cycle“ (Ct) bestimmt. Der Schwellenzyklus beschreibt die Anzahl der PCR-Zyklen, die benötigt werden, um eine signifikante Erhöhung der Reporteraktivität gegenüber dem Fluoreszenzhintergrund, der zwischen dem sechsten und 15. PCR-Zyklus ermittelt wurde, nachzuweisen. Wir gingen von einem Schwellenwert von Ct = 0,2 aus, welcher einem zehnfachen Fluoreszenz/Background-Verhältnis („signal to noise-ratio“ = SNR) entspricht. Eine zehnfache Verdünnungsreihe genomischer DNA von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 wurde zur Erstellung einer Eichgeraden (Standard) und somit zur quantitativen Bestimmung des Zielgens in den Proben hergestellt. Standards wurden bei jedem Lauf eingesetzt, um

Variationen zwischen unterschiedlichen Läufen zu detektieren und gegebenenfalls auszugleichen.

II.3.4.3 Sequenzierung

Grundlage für die Sequenzierung des partiellen Salivaricin-A-Operons (Strukturgene *salA* und *salB*) von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 war das PCR-Produkt folgender spezifischer PCR-Reaktion:

1 µl	<i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12 (125 ng/ µl)
3 µl	psalAF1 (3,5 pmol) Forward-Primer
3 µl	psalAR3 (2,4 pmol) Reversed-Primer
3 µl	dNTPs
5 µl	PCR-Puffer I
35 µl	Aqua bidest
0,5 µl	<i>Taq</i> -Polymerase

Der PCR Ansatz wurde im Biometra-UNO-Thermoblock bei einer Annealing-Temperatur von 50°C nach dem in Kapitel II.3.4.1.8 beschriebenen Programm prozessiert.

Zur Gewinnung der Sequenz wurde das entstandene PCR-Produkt mit Hilfe des Big-Dye®-Terminator-Cycle-Sequencing-Kit wie folgt sequenziert:

8 µl	Big Dye TM Terminator RR Mix
6 µl	PCR-Produkt
4 µl	Sequenzierungsprimer (psalAF1 und psalAR3)
2 µl	Aqua Bidest

Die Cycle Sequenzierung wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

Schritt 1 (Vordenaturierung):	2 sec bei 96°C
Schritt 2 (Denaturierung) *:	15 sec bei 96°C
Schritt 3 (Annealing)*:	15 sec bei 50°C
Schritt 4 (Elongation)*:	4 min bei 60°C
Schritt 5 :	4°C

* Die Schritte 2 bis 4 wurden in 25 Zyklen wiederholt.

Nach Abschluss der Sequenzierungsreaktion wurde das Produktgemisch wie folgt gereinigt: In 20 Mikrolitern Sequenzierungsansatz wurden zwei Mikroliter 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und 50 Mikroliter 100%iges Ethanol gegeben. Die Probe wurde gevortext und für zehn Minuten auf Eis gestellt. Nach 20 Minuten Zentrifugieren mit 13000 rpm wurde das Ethanol abpipettiert und erneut mit 250 Mikrolitern 70%igem Ethanol durchgespült. Anschließend wurde in der Speedvac getrocknet. Das Pellet wurde in 20 Mikrolitern TRS-Puffer („template suppression reagent“) aufgenommen und direkt auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte für fünf Minuten bei 96°C die Denaturierung vor dem Auftragen in eine Polyacrylamid-Gelkapillare.

Die anschließende Sequenzierung des partiellen Salivaricin-A-Operons (salA und salB) von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 erfolgte mit dem ABI-PRISM™-310-Genetic-Analyser und der GeneScan™-Analysis-Software.

und der Reversed-Primer StrepITSsalR entwickelt. Überprüft wurden die Stämme *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 sowie *S. salivarius* DSM 20067. Als Positivkontrolle fanden die universellen Forward-Primer pF1 und pF4 sowie der Reversed-Primer pR1 Verwendung.

Template:	<i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12 (294 ng/ 3 µl)					<i>S. salivarius</i> DSM 20067 (253 ng/ µl)				
Forward-Primer:	Strep ITS salF 2 pmol	pF1 2,2 pmol	pF1 2,2 pmol	pF4 2,15 pmol	pF4 2,15 pmol	Strep ITS salF 2 pmol	pF1 2,2 pmol	pF1 2,2 pmol	pF4 2,15 pmol	pF4 2,15 pmol
Reversed-Primer:	Strep ITS salR 2,2 pmol	pR1 2,3 pmol	Strep ITS salR 2,2 pmol	Strep ITS salR 2,2 pmol	pR1 2,3 pmol	Strep ITS salR 2,2 pmol	pR1 2,3 pmol	Strep ITS salR 2,2 pmol	Strep ITS salR 2,2 pmol	pR1 2,3 pmol
Banden Anzahl:	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
Ergebnis:	-	++	-	-	+	-	++	-	-	+

Tabelle 1: Ergebnisprotokoll für die ITS-gerichtete PCR

Die Ergebnisse der ITS-gerichteten PCR stellten sich als negativ dar.

Um Fehlerquellen auszuschließen wurde eine alternative Aufbereitung der Nukleinsäure von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 getestet. Eine Probe wurde in 200 µl Aqua bidest/DEPC aufgenommen, für drei Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert und anschließend für zehn Minuten bei 96°C gekocht. Nach Abkühlen auf Eis wurde die Probe erneut zentrifugiert und die Konzentration bestimmt. Das Ergebnis der ITS-gerichteten PCR zeigte keinen Unterschied zwischen der Elutionstechnik der Nukleinsäure mit Hilfe von QIAamp-Blood-and-Tissue-Kit der Firma Qiagen und der Methode des einfachen Erhitzens auf 96°C.

Die ITS-gerichtete PCR erwies sich bei Verwendung des Forward-Primers StrepITSsalF und des Reversed-Primers StrepITSsalR als negativ. Zu vermuten ist, dass ITS-Sequenzen bei Streptokokken zwischen den Stämmen einer Art abweichen. Solche hypervariablen Regionen können auch die gewählten Primerbereiche betreffen. Dies erschwert die Entwicklung einer speziesspezifischen PCR auf ITS-Sequenzbasis bzw. macht sie unmöglich. Inhibitorische Substanzen als Ursache für die negative Amplifikation wurden durch die universellen 16S-rDNA-PCRs ausgeschlossen.

III.1.2 Ligasegen-gerichtete PCR

Basierend auf Untersuchungen von Garnier et al. 1997 wurden der Forward-Primer StsalF und der Reversed-Primer StsalR verwendet. Die PCR basiert auf dem Gen, welches die D-Alanin:D-Alanin-Ligase kodiert. Das Enzym ist spezifisch für Prokaryonten, die Peptidoglykane produzieren, und soll auf Artebene in der Sequenz konserviert sein. Die Ligasegen-gerichtete PCR könnte somit eine Identifizierung der Spezies *S. salivarius* ermöglichen. Für die PCR wurden die Stämme *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12, *S. salivarius* DSM 20067 sowie die Stämme *S. salivarius* AC 1802, AC 2051, AC 3442, AC 3994, AC 4381 und *S. mutans* ATCC 25175 (Negativkontrolle) überprüft.

Template:	<i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12 (490 ng/ 5 µl); <i>S. salivarius</i> DSM 20067 (1265 ng/ 5 µl); <i>S. salivarius</i> AC 1802 (48,5 ng/ 5 µl), AC 2051 (332,5 ng/ 5 µl), AC 3442 (600,5 ng/5 µl), AC 3994 (381 ng/ 5 µl), AC 4381 (2190 ng/5 µl)	<i>S. mutans</i> ATCC 25175(100 ng/ µl)
Forward-Primer:	StsalF 4,5 pmol	
Reversed-Primer:	StsalR 3,7 pmol	
Banden Anzahl:	0	0
Ergebnis:	-	-

Tabelle 2: Ergebnisprotokoll der Ligasegen-gerichteten PCR bei einer Annealing-Temperatur von 55°C für die Stämme *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12, *S. salivarius* DSM 20067 sowie die Isolate *S. salivarius* AC 1802, AC 2051, AC 3442, AC 3994, AC 4381 und als Negativkontrolle *S. mutans* ATCC 25175

Aufgrund der negativen Ergebnisse wurde die Annealing-Temperatur auf 48°C herabgesetzt. Die anderen Parameter wurden beibehalten.

Template:	<i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12 (490 ng/ 5 µl)	<i>S. salivarius</i> DSM 20067 (1265 ng/ 5 µl)
Forward-Primer:	StsalF 4,5 pmol	
Reversed-Primer:	StsalR 3,7 pmol	
Banden Anzahl:	0	0
Ergebnis:	-	-

Tabelle 3: Ergebnisprotokoll der Ligasegen-gerichteten PCR bei einer Annealing-Temperatur von 48°C für die Stämme *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 und *S. salivarius* DSM 20067

Template:	<i>S. salivarius</i> AC 1802 (49 ng/ 5 µl) AC 2051 (333 ng/ 5 µl) AC 3442 (600 ng/ 5 µl) AC 3994 (381 ng/ 5 µl) AC 4381 (2190 ng/ 5 µl)					<i>S. mutans</i> ATCC 25175 (100 ng/ µl)
Forward-Primer:	StsalF 4,5 pmol					StsalF 4,5 pmol
Reversed-Primer:	StsalR 3,7 pmol					StsalR 3,7 pmol
Banden Anzahl:	0	0	0	0	1	1
Ergebnis:	-	-	-	-	+ -	+ -

Tabelle 4: Ergebnisprotokoll der Ligasegen-gerichteten PCR bei einer Annealing-Temperatur von 48°C für die Isolate *S. salivarius* AC 1802, AC 2051, AC 3442, AC 3994, AC 4381 und als Negativkontrolle *S. mutans* ATCC 25175

Das Ergebnis zeigte sich für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12, *S. salivarius* DSM 20067 sowie für die Stämme *S. salivarius* AC 1802, AC 2051, AC 3442, AC 3994 unerwarteterweise als negativ. *S. salivarius* AC 4381 aber auch die Negativkontrolle *S. mutans* ATCC 25175 demonstrierten schwach positive Banden.

Zusätzlich wurde eine 16S-rDNA-PCR durchgeführt, um einen Fehler bei der Aufbereitung der Templates auszuschließen. Die Ergebnisse waren für alle Stämme positiv.

Unter den veröffentlichten PCR-Bedingungen bietet die Ligasegen-gerichtete PCR keine Möglichkeit für eine adäquate Detektion der Streptokokkenart. Speziell scheint auch bei weiter sinkender Annealing-Temperatur die Diskriminierung zwischen *S. salivarius* und zum Beispiel *S. mutans* unmöglich.

III.1.3 Dextranasegen-gerichtete PCR

Nach Ergebnissen von Igarashi et al. 2001 wurde zur Identifizierung von *S. salivarius* die speziesspezifische PCR - basierend auf dem Nachweis des Dextranasegens - angewendet. Für das Dextranasegen wird ebenfalls eine Konservierung auf Ebene der Art angenommen. Der Forward-Primer Ssa442F und der Reversed-Primer Ssa2712R wurden nach der Sequenz des Dextranasegens von *S. salivarius* PC-1 designt. Von uns untersucht wurden die Stämme *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12, *S. salivarius* DSM 20067 sowie die Stämme *S. salivarius* AC 1802, AC 2051, AC 3442, AC 3994, AC 4381 und als Negativkontrolle *S. mutans* ATCC 25175.

Template:	<i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12 (490 ng/ 5 µl)	<i>S. salivarius</i> DSM 20067 (1265 ng/ 5 µl)
Forward-Primer:	Ssa442F 4,3 pmol	Ssa442F 4,3 pmol
Reversed-Primer:	Ssa2712R 4,3 pmol	Ssa2712R 4,3 pmol
Banden Anzahl:	0	1
Ergebnis:	-	+

Tabelle 5: Ergebnisprotokoll der Dextranasegen-gerichteten PCR bei einer Annealing-Temperatur von 55°C für die Stämme *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 und *S. salivarius* DSM 20067

Template:	<i>S. salivarius</i> AC 1802 (48 ng/ 5 µl) AC 2051 (332 ng/ 5 µl) AC 3442 (600 ng/ 5 µl) AC 3994 (381 ng/ 5 µl) AC 4381 (2190 ng/ 5 µl)					<i>S. mutans</i> ATCC 25175 (100 ng/ µl)
Forward-Primer:	Ssa442F 4,3 pmol					Ssa442F 4,3 pmol
Reversed-Primer:	Ssa2712R 4,3 pmol					Ssa2712R 4,3 pmol
Banden Anzahl:	1	0	1	1	1	0
Ergebnis:	++	-	++	++	+ -	-

Tabelle 6: Ergebnisprotokoll der Dextranasegen-gerichteten PCR bei einer Annealing-Temperatur von 55°C für die Stämme *S. salivarius* AC 1802, AC 2051, AC 3442, AC 3994, AC 4381 und als Negativkontrolle *S. mutans* ATCC 25175

Für die Dextranasegen-gerichtete PCR ergaben sich zunächst positive Ergebnisse für die Stämme *S. salivarius* DSM 20067, *S. salivarius* AC 1802, AC 3442, AC 3994 sowie AC 4381 (schwach).

Weiterhin wurde zur Überprüfung der allgemeinen Bedingungen der Dextranasegen-gerichteten PCR eine 16S-rDNA-PCR durchgeführt. Alle Stämme erwiesen ein positives Ergebnis, wobei sich die Bande bei dem Stamm *S. salivarius* AC 4381 als besonders schwach zeigte.

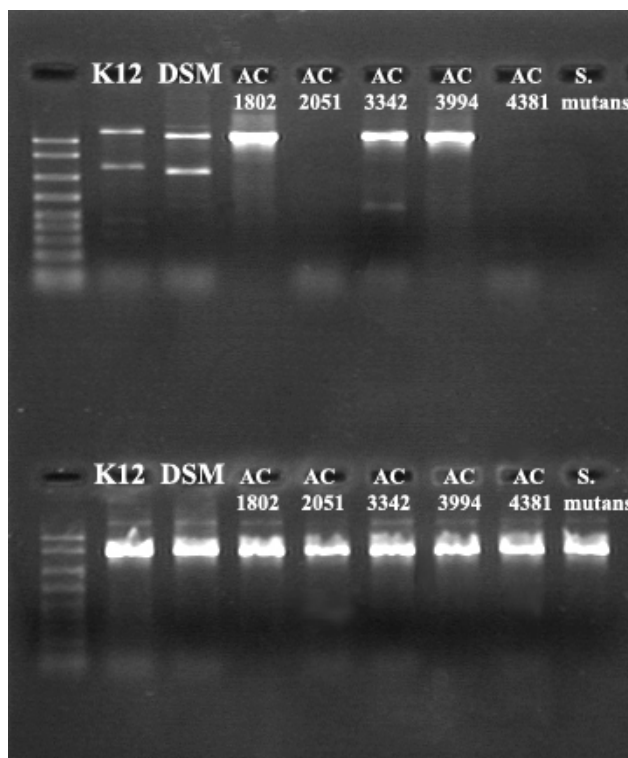
Zur Optimierung der PCR wurde die Annealing-Temperatur auf 48°C sowie die Templatekonzentration von *S. salivarius* AC 4381 auf 438 Nanogramm pro Mikroliter gesenkt, da wir vermuteten, dass es bei der vormals verwendeten sehr hohen Templatekonzentration zu einem Primermangel gekommen sein könnte.

Template:	<i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12 (490 ng/ 5 µl)	<i>S. salivarius</i> DSM 20067 (1265 ng/ 5 µl)
Forward-Primer:	Ssa442F 4,3 pmol	Ssa442F 4,3 pmol
Reversed-Primer:	Ssa2712R 4,3 pmol	Ssa2712R 4,3 pmol
Banden Anzahl:	2	2
Ergebnis:	+	+

Tabelle 7: Ergebnisprotokoll der Dextranasegen-gerichteten PCR bei einer Annealing-Temperatur von 48°C für die Referenzstämme *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 und *S. salivarius* DSM 20067

Template:	<i>S. salivarius</i> AC 1802 (48 ng/ 5 µl) AC 2051 (332 ng/ 5 µl) AC 3442 (600 ng/ 5 µl) AC 3994 (381 ng/ 5 µl) AC 4381 (438 ng/ µl)					<i>S. mutans</i> ATCC 25175 (100 ng/ µl)
Forward-Primer:	Ssa442F 4,3 pmol					Ssa442F 4,3 pmol
Reversed-Primer:	Ssa2712R 4,3 pmol					Ssa2712R 4,3 pmol
Banden Anzahl:	1	1	2	1	0	1
Ergebnis:	++	-	++	++	-	-

Tabelle 8: Ergebnisprotokoll der Dextranasegen-gerichteten PCR bei einer Annealing-Temperatur von 48°C für die Stämme *S. salivarius* AC 1802, AC 2051, AC 3442, AC 3994, AC 4381 und als Negativkontrolle *S. mutans* ATCC 25175



Dextranasegen-gerichtete PCR

16S-rDNA-PCR

Abbildung 5: Gelelektrophoretische Darstellung der Dextranasegen-gerichteten PCR bei einer Annealing-Temperatur von 48°C für die Stämme *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12, *S. salivarius* DSM 20067 sowie die Stämme *S. salivarius* AC 1802, AC 2051, AC 3442, AC 3994, AC 4381 und *S. mutans* ATCC 25175

Nach Evaluation der optimalen Annealing-Temperatur ergaben sich spezifische Ergebnisse für die einzelnen Stämme. *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12, *S. salivarius* DSM 20067 und *S. salivarius* AC 3342 wiesen jeweils ein spezifisches Bandenmuster mit einer Anzahl von zwei Banden auf. Aufgrund des Bandenmusters waren diese Stämme von *S. salivarius*

AC 1802 und AC 3994 unterscheidbar, welche jeweils eine intensive Bande demonstrierten. *S. salivarius* AC 2051, AC 4381 und *S. mutans* ATCC 25175, welcher als Negativkontrolle untersucht wurde, reagierten negativ.

Unter diesen für die Mehrheit der *S.-salivarius*-Stämme optimierten Bedingungen mit der Möglichkeit einzelne Stämme durch ihr Bandenmuster zu unterscheiden konnte nun auch der Proband auf die Anwesenheit der Spezies *S. salivarius* in seiner Mundhöhle untersucht werden. Die Abstrichentnahme erfolgte an 16 Stellen der Mundhöhle wie in Kapitel II.2.2 beschrieben.

Template:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Forward-Primer:	Ssa442F 4,3 pmol															
Reversed-Primer:	Ssa2712R 4,3 pmol															
Banden Anzahl:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ergebnis:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 9: Ergebnisprotokoll der Dextranasegen-gerichteten PCR bei einer Annealing-Temperatur von 50°C und einer Primerkonzentration von 4,3 pmol/ Ansatz für die klinischen Proben 1-16 (1 – Pharynx, rechts, 100 ng/ 5 µl; 2 – Pharynx, links, 57 ng/ 5 µl; 3 – bukkal, rechts, 41 ng/ 5 µl; 4 – bukkal, links, 24 ng/ 5 µl; 5 – Zunge, dorsal, 427 ng/ 5 µl; 6 – Zunge, ventral, 178 ng/ 5 µl; 7 – Zahn, I. Quadrant, bukkal, 58 ng/ 5 µl; 8 – Zahn, II. Quadrant, palatinal, 58 ng/ 5 µl; 9 – Zahn, III. Quadrant, bukkal, 73 ng/ 5 µl; 10 – Zahn, IV. Quadrant, lingual, 90 ng/ 5 µl; 11 – Sulcus, I. Quadrant, palatinal, 78 ng/ 5 µl; 12 – Sulcus, II. Quadrant, bukkal, 64 ng/ 5 µl; 13 – Sulcus, III. Quadrant, lingual, 90 ng/ 5 µl; 14 – Sulcus, IV. Quadrant, bukkal, 17,9 ng/ 5 µl; 15 – Speichelprobe, stimuliert, 1457 ng/ 5 µl; 16 – Speichelprobe, 164 ng/ 5 µl)

Die Ergebnisse für diese Untersuchung erwiesen sich als negativ. Zur Überprüfung der Bedingungen der PCR wurde zusätzlich eine 16S-rDNA-PCR angewendet. Die für alle 16 Proben positiven Banden zeigten sich nur schwach. Um Fehlerquellen auszuschließen, wurde eine neue dNTPs-Gebrauchslösung, wie in Kapitel II.1.4 beschrieben, hergestellt. Weiterhin wurde die Konzentration der Primer auf 2,6 Picomol verdünnt.

Template:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Forward-Primer:	Ssa442F 2,6 pmol															
Reversed-Primer:	Ssa2712R 2,6 pmol															
Banden Anzahl:	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Ergebnis:	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Tabelle 10: Ergebnisprotokoll der Dextranasegen-gerichteten PCR bei einer Annealing-Temperatur von 50°C und einer erniedrigten Primerkonzentration von 2,6 pmol/ Ansatz für die klinischen Proben 1-16 (1 – Pharynx, rechts, 100 ng/ 5 µl; 2 – Pharynx, links, 57 ng/ 5 µl; 3 - bukkal, rechts, 41 ng/ 5 µl; 4 – bukkal, links, 24 ng/ 5µl; 5 - Zunge, dorsal, 427 ng/ 5µl; 6 – Zunge, ventral, 178 ng/ 5 µl; 7 – Zahn, I. Quadrant, bukkal, 58 ng/ 5 µl; 8 – Zahn, II. Quadrant, palatinal, 58 ng/ 5 µl; 9 – Zahn, III. Quadrant, bukkal, 73 ng/ 5 µl; 10 – Zahn, IV. Quadrant, lingual, 90 ng/ 5 µl; 11 – Sulcus, I. Quadrant, palatinal, 78 ng/ 5 µl; 12 – Sulcus, II. Quadrant, bukkal, 64 ng/ 5µl; 13 – Sulcus, III. Quadrant, lingual, 90 ng/ 5µl; 14 - Sulcus, IV. Quadrant, bukkal 17,9 ng/ 5 µl; 15 – Speichelprobe, stimuliert, 1457 ng/ 5 µl; 16 – Speichelprobe, 164 ng/ 5 µl)

Nachweisbar war demnach bei dem Probanden eine Kolonisation mit der Spezies *S. salivarius* im Pharynx beidseitig, auf der Zunge ventral und dorsal sowie im Speichel. Unsere Untersuchungen zeigen sich kongruent mit den veröffentlichten Daten. Im Mund- bzw. Rachenraum eines Erwachsenen findet man *S. salivarius* nach Frandsen et al. 1991 als prozentualen Anteil aller isolierten Streptokokkenstämmen nur zu zwei Prozent auf der Wangenschleimhaut, aber zu 17 Prozent auf der Zunge (Proben 5 und 6) und zu 30 Prozent im Pharynx (Proben 1 und 2). Im Speichel (Proben 15 und 16) lassen sich 10^6 bis 10^7 kolonienbildende Einheiten (KBE) pro Milliliter nachweisen (Frandsen et al. 1991).

Unsere Untersuchungen demonstrieren, dass die Dextranasegen-gerichtete PCR *in vitro* und *in vivo* weitestgehend als Nachweis für die Spezies *S. salivarius* eingesetzt werden kann. Einzelne Stämme werden jedoch nicht oder nur schwach erfasst.

III.2 Entwicklung einer stammspezifischen PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12

Eine Etablierung des Nahrungsergänzungsmittels BLIS-K12-Throat-Guard auf dem deutschen Markt zieht die Forderung nach einem Nachweis für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 nach sich. Aufgrund dessen entwickelten wir als Verfahren der Wahl eine stamm-

spezifische PCR, die mit einfachen Mitteln schnell und effektiv für eine Detektion der in die Mundhöhle eingeführten lyophilisierten K12-Zellen sorgt. Untersucht wurden eine stamm-spezifische PCR auf der Basis des Salivaricin-B- und des Salivaricin-A-Operons. Grundlage war zunächst die Sequenz des Stammes *S. salivarius* 20P3, die uns nach Genbank (AY005472) zur Verfügung stand.

III.2.1 Salivaricin-B-Operon-gerichtete PCR

Auf Basis der Gensequenz von Salivaricin B des Stammes *S. salivarius* 20P3 wurden die Oligonukleotide psalBF und psalBR entwickelt. Salivaricin B ist ein weiteres Salivaricin von *S. salivarius*, welches gemeinsam mit Salivaricin A produziert wird, allerdings nicht mit diesem und dem Strukturgen salB des Salivaricin-A-Operons verwandt ist (Tagg 2004). Untersucht wurden die Stämme *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 sowie *S. salivarius* DSM 20067.

Template:	<i>S. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12 (294 ng/ 3 µl)	<i>S. salivarius</i> DSM 20067 (253 ng/ µl)
Forward-Primer:	psalBF 2,1 pmol	
Reversed-Primer:	psalBR 2,2 pmol	
Banden Anzahl:	1	1
Ergebnis:	+ -	+ -

Tabelle 11: Ergebnisprotokoll der SalB-Operon-gerichteten PCR bei einer Annealing-Temperatur von 48°C für die Stämme *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 und *S. salivarius* DSM 20067

Das Ergebnis erwies sich als schwach positiv. 78-bp-Amplifikate sind stets schwächer und zudem mit Primerdimeren verwechselbar. Die Banden zeigten sich für beide Stämme daher nicht eindeutig. Um die PCR-Bedingungen zu verbessern, erhöhten wir die Konzentration der Oligonukleotide.

Template:	S. salivarius ssp. salivarius K12 (294 ng/ 3 µl)	S. salivarius DSM 20067 (253 ng/ µl)
Forward-Primer:	psalBF 4,3 pmol	
Reversed-Primer:	psalBR 4,3 pmol	
Banden Anzahl:	1	1
Ergebnis:	+ -	+ -

Tabelle 12: Ergebnisprotokoll der SalB-Operon-gerichteten PCR bei einer Annealing-Temperatur von 48°C und einer erhöhten Oligonukleotidkonzentration (4,3 pmol) für die Stämme *S. salivarius ssp. salivarius K12* und *S. salivarius DSM 20067*

Das Ergebnis der PCR unterschied sich nicht vom vorangehenden Versuch.

Aufgrund der schwachen Banden und dem nicht erwünschten Nachweis des ebenfalls BLIS-positiven Stammes *S. salivarius DSM 20067* erwies sich die SalB-Operon-gerichtete PCR als keine adäquate Möglichkeit zur Detektion von *S. salivarius ssp. salivarius K12*.

III.2.2 Salivaricin-A-Operon-gerichtete PCR

Salivaricin A (SalA) gehört zu den Typ-A-Lantibiotika, welches von verschiedenen Stämmen von *S. salivarius* – so auch von *S. salivarius ssp. salivarius K12* - produziert wird und inhibitorisch gegen den Pharyngitiserreger *S. pyogenes* wirkt. Aufgrund dessen ergibt sich die Schlussfolgerung, eine stammspezifische PCR für *S. salivarius ssp. salivarius K12*, die gegen ein oder mehrere Strukturgene des Salivaricin-A-Operons mit einer stammspezifischen Allelität gerichtet ist, zu entwickeln.

III.2.2.1 Entwicklung einer PCR auf der Basis der Gensequenz von *S. salivarius 20P3*

Grundlage für die Entwicklung der Oligonukleotide war zunächst die Sequenz des SalA-Operons des Stammes *S. salivarius 20P3* (Genbank Accessionnummer AY005472). Die entsprechende Sequenz von *S. salivarius ssp. salivarius K12* lag uns zu diesem Zeitpunkt noch nicht vor.

Getestet wurden die SalA-Operon-gerichteten Forward-Primer psalOAF1, psalAF1 und psalAF2 sowie die Reversed-Primer psalAR1 und psalAR2.

psalAOF1
 AGAGAAGACCTATCTGGTCCTCTCAGATGTTAGCTTTTCGTCACCCACTACAGTTGACAAAGAGCCATTATTGA
 TTGTCATAAATTGAAATGTTTTAGATATTTGGAATAGCCGCTGTTCAATATTTGGTTAGAAATTTTCTTTATG
 TTCAAAAGGAGTCAGAATGACTCCTTTTGAATAAAGTTTATAAAAAAGGTAGTGATGAAAATATTATAATAATT
 ACCTCAAAAAGAAGTATGTATAAGTTAAATTGTTTTTTCATACTCAAACCTCTCGGCAAGAAACAAGAATAAGA
 GCTAGAAAATTTAGACAGTAGACAAACACTATTTTGAGTGTTTGTCTTTTTTAAGTCACCTAGTCTGAATTTAA
 GGGATTAATTTTATAATAAGAAGGTATTGGATTGTAAATAGCTACAAAAATGAAATTTGAGAGACTGCTTTT
 TTATAAGCGATATTTTACATTTAAAAATATTAATAAAAAACAATATTTGCACTTTTTACTCACTAAAAATA
 psalAF1
 AAGATGTTATTGGTTACAATAAGAGCGTAGAAAATATTTACTACATACTAACAGAAGGGAGAATGGATGCCATGA
 psalAF2
 AAAACTCAAAAGATATTTTGAACAATGCTATCGAAGAAAGTTTCTGAAAAAGAACTTATGGAAGTAGCTGGTGGT
 psalAR2
 AAAAGAGGTTTCAGGTTGGATTGCAACTATTACTGATGACTGTCCAACTCAGTATTCGTTTGTGTTAATTAAA
 psalAR1
 ACAATCTTGATAAGTAGACTAAAAAAATCTGTTTAGACTTAGTCTAAGCAGGATTTTTGAGTAATGGTAAGA
 TAAATATGATAAAAAGAGACGAATTAAAGCTAGATTATCAACGGCATCAGTTTTACGAATACTTTAACTCAATT
 TTTAATTACGACATACTAGATGCTTCTATTAGTGAAAATATTTATTTATTGAGGAAAACGACAGATAAGTTATT
 TTATATTGAGTTTGAAAATCAATTATTTGAAACCGTAATGTTCTTTCAATGAAAACACTAGTTTGTAGATATAA
 ATAGTTTTTCCAAGGAAATTGGAATAAGTCAGAGGCATATGAGCAATATATACAGCAAATAAAGGAAGAAAAT
 GGAATAAATAATTTTTTTGATAGGTATCCGTATTTGTTAAAACAAATCAATAGAGAAGTCAGATTAATAGAAGA
 ATCATATTCTTTACTATTTGATAGATTTTTAAAAGACTTGCTGAGTTAAGGTCATGTTTTAATATTACTGAAC
 CCCTAAGTAATGTTGAGTTTTCACTTGAGATAGTCATTCTCAAAAACAAACAGTTGTTAAGATTGAATTTAAA
 GGGAAATCCATTTACTACAAGCCTAAAAGTTATGATTCAACAACATTTTGTAGAACTTATTAGTTTATTGAA
 ATCTAATAATATACCCTCGTTCAGTCTTCCTGAAAGCTTAATTAAAGCGGATTATTGTTGGCAACTCGGTGTGG
 ATTATATAAATTCTAATAATGATGAAGTAAAGAGAATATACTTTAAGTATGGTGTTTTAGCAGCATTTTCTGAA
 ATTTTTTCCATTACGGACTTACATATGGAATGTGATTGTTTCAGGTGGAGATTATATTTAATTGATGTTGA
 AACATTTTTTCAAAGAAAGTTGAATGTACAACTAATAATTTTGAAGGGATTACTGTTGATACTTATCAGAGAA
 TTTATGAGACATCACTTTCAAATGGTTTATTTCTGTACAATTTGAGAAAAACAGCGCTCCTAACATTTCTGGA
 ATAAGTGAAAAAGGTGAAAAAGAAAAAGGGGAAGTATGAACTGATAAATAAAAAATCGTGGGGATATGAAGTT
 AGTGAAAACTGACTATTTTCAGGAAGATAGCTATAATATTTCAACATTAAATGAGAAAAATGGTGGAACTCTCG
 ACTATGCTAATGAGGTAATTGCAGGATTTAGAGAATGCTATACATTTCTCATGACGCAACGTGCAAAGGTCAAA
 psalAR3
 AAAATTTTATATGTTTTCCGAAATTGAGAACTAGAGCCATATTCAGAAATACTTCCGACTATGGAAAAATTTTT
 GCAAGCCCTCTACGAATCCAAAATATCTTTTCTCAGAAAAAAGAGGGAGAATCTATTTTCGATACTATATGAGT
 CAAAACATATTGAACAATTTATTGTTGATAGTGAAATTAAGACTTGATGAATGGTGATATTCCTTACTTTTCA
 ATGGATCCCAATGGAATGTATATAATTCTTTAGGAACAGTAATTGGAATCTAGGAAAGACAACCTCGTTATT
 TGATAATATAGCCACCCTGAATGATGAAAGAATGAAGTTCACCTGTGAATTGATTGGAATAGTCTTGAAAAAC
 CGATTAACATTGGGAGAGGAAAGATGGGAAATCTTATTATTTTCCATCGATATCCTCAAAAACAAAGTTTTAAT
 GAGGAAATCTTAAGACAGCGTAG

Abbildung 6: Lage der Salivaricin-A-Operon gerichteten Forward-Primer psalOAF1, psalAF1 und psalAF2 sowie die Reversed-Primer psalAR1, psalAR2 und psalAR3

In der ersten Untersuchung wurden die Oligonukleotide psalAF1 und psalAR1 kombiniert.

Template:	S. salivarius ssp. salivarius K12 (490 ng/ 5 µl)	S. salivarius DSM 20067 (253 ng/ µl)
Forward-Primer:	psalAF1 1,7 pmol	
Reversed-Primer:	psalAR1 1,9 pmol	
Banden Anzahl:	0	0
Ergebnis:	-	-

Tabelle 13: Ergebnisprotokoll der Sala-Operon-gerichteten PCR mit den Oligonukleotiden psalAF1 und psalAR1 bei einer Annealing-Temperatur von 48°C für die Stämme *S. salivarius ssp. salivarius* K12 und *S. salivarius* DSM 20067

Die Stämme *S. salivarius ssp. salivarius* K12 und *S. salivarius* DSM 20067 demonstrierten ein negatives Ergebnis. Zu vermuten war, dass einer der Oligonukleotide – psalAF1 bzw. psalAR1 - nicht komplementär zur Sequenz des Sala-Operons der beiden Stämme ist. Zunächst wurde der Reversed-Primer psalAR1 mit dem Forward-Primer psalOAF1, welcher weiter „upstream“ auf dem Salivaricin-A-Operon liegt, kombiniert. Die PCR-Bedingungen wurden beibehalten. Lediglich die Templatemenge von *S. salivarius ssp. salivarius* K12 wurde auf 294 Nanogramm gesenkt.

Template:	S. salivarius ssp. salivarius K12 (294 ng/ 3 µl)	S. salivarius DSM 20067 (253 ng/ µl)
Forward-Primer:	psalOAF1 2,0 pmol	
Reversed-Primer:	psalAR1 1,9 pmol	
Banden Anzahl:	0	0
Ergebnis:	-	-

Tabelle 14: Ergebnisprotokoll der Sala-Operon-gerichteten PCR mit den Oligonukleotiden psalOAF1 und psalAR1 bei einer Annealing-Temperatur von 48°C für die Stämme *S. salivarius ssp. salivarius* K12 und *S. salivarius* DSM 20067

Weiterhin wurde die Zusammenstellung der Oligonukleotide psalAF2 und psalAR1 untersucht.

Template:	S. salivarius ssp. salivarius K12 (294 ng/ 3 µl)	S. salivarius DSM 20067 (253 ng/ µl)
Forward-Primer:	psalAF2 1,7 pmol	
Reversed-Primer:	psalAR1 1,9 pmol	
Banden Anzahl:	0	0
Ergebnis:	-	-

Tabelle 15: Ergebnisprotokoll der SalA-Operon-gerichteten PCR mit den Oligonukleotiden psalAF2 und psalAR1 bei einer Annealing-Temperatur von 48°C für die Stämme *S. salivarius ssp. salivarius* K12 und *S. salivarius* DSM 20067

Da sich keine Banden bei beiden Primer-Kombinationen darstellten, schlossen wir aus diesem negativen Ergebnis, dass sich der Reversed-Primer psalAR1 nicht komplementär zur Sequenz des SalA-Operons für die Stämme *S. salivarius ssp. salivarius* K12 und *S. salivarius* DSM 20067 verhält. Um die Fehleranalyse fortzuführen, entwickelten wir einen neuen Reversed-Primer – psalAR2 – und überprüften ihn mit den bereits getesteten Forward-Primern psalOAF1, psalAF1 sowie psalAF2. Die Konzentration der Forward-Primer wurde zudem erhöht.

Template:	S. salivarius ssp. salivarius K12 (294 ng/ 3 µl)	S. salivarius DSM 20067 (253 ng/ µl)
Forward-Primer:	psalAF1 3,5 pmol	
Reversed-Primer:	psalAR2 3,7 pmol	
Banden Anzahl:	1	1
Ergebnis:	+	+

Tabelle 16: Ergebnisprotokoll der SalA-Operon-gerichteten PCR mit den Oligonukleotiden psalAF1 und psalAR2 bei einer Annealing-Temperatur von 48°C für die Stämme *S. salivarius ssp. salivarius* K12 und *S. salivarius* DSM 20067

Template:	S. salivarius ssp. salivarius K12 (294 ng/ 3 µl)	S. salivarius DSM 20067 (253 ng/ µl)
Forward-Primer:	psalOAF1 4,0 pmol	
Reversed-Primer:	psalAR2 3,7 pmol	
Banden Anzahl:	0	0
Ergebnis:	-	-

Tabelle 17: 1. Ergebnisprotokoll der SalA-Operon-gerichteten PCR mit den Oligonukleotiden psalOAF1 und psalAR2 bei einer Annealing-Temperatur von 48°C für die Stämme *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 und *S. salivarius* DSM 20067

Template:	S. salivarius ssp. salivarius K12 (294 ng/ 3 µl)	S. salivarius DSM 20067 (253 ng/ µl)
Forward-Primer:	psalAF2 3,3 pmol	
Reversed-Primer:	psalAR2 3,7 pmol	
Banden Anzahl:	1	1
Ergebnis:	+ -	+ -

Tabelle 18: 1. Ergebnisprotokoll der SalA-Operon-gerichteten PCR mit den Oligonukleotiden psalAF2 und psalAR2 bei einer Annealing-Temperatur von 48°C für die Stämme *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 und *S. salivarius* DSM 20067

Für die Stämme *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 und *S. salivarius* DSM 20067 ergab sich eine positive Detektion für die Oligonukleotid-Kombination von psalAF1 und psalAR2, ein schwach positives Ergebnis für die Kombination von psalAF2 und psalAR2 und in der gelelektrophoretischen Auftrennung kein Bandenmuster für die Primer-Zusammenstellung von psalOAF1/ psalAR2.

Nach diesem Ausschlussverfahren ergibt sich eine Anwendungsmöglichkeit für die Forward-Primer psalAF1 und psalAF2 sowie für den Reversed-Primer psalAR2.

Zu vermuten ist, dass das negative Ergebnis bei Anwendung des Oligonukleotids psalOAF1 auf die Sequenzfolge von drei Thymidinbasen am 3'-Ende zurückzuführen ist, welche ein Rutschen der Primer ermöglichen könnte.

Forward- Reversed- Primer	psalOAF1	psalAF1	psalAF2
psalAR1	-	-	-
psalAR2	-	+	+

Abbildung 7: Darstellung der Ermittlung der optimalen Oligonukleotid-Kombination für die Salivarin-A-Operon-gerichtete PCR

Die gewonnen Ergebnisse der SalA-Operon-gerichteten PCR entsprechen nicht der ursprünglichen Zielsetzung, einen stammspezifischen Nachweis für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 zu entwickeln.

So wurden ferner die oben genannten Primer-Kombinationen für die Stämme *S. salivarius* AC 1802, AC 2051, AC 3442, AC 3994 und AC 4381 getestet.

Template:	S. salivarius				
	AC 1802 (48 ng/ 5µl)	AC 2051 (200 ng/ 3µl)	AC 3442 (240 ng/ 2 µl)	AC 3994 (229 ng/ 3 µl)	AC 4381 (438 ng/ µl)
Forward- Primer:	psalAF1 3,5 pmol				
Reversed- Primer:	psalAR2 3,7 pmol				
Banden Anzahl:	0	0	0	0	0
Ergebnis:	-	-	-	-	-

Tabelle 19: Ergebnisprotokoll der SalA-Operon-gerichteten PCR mit den Oligonukleotiden psalAF1 und psalAR2 bei einer Annealing-Temperatur von 48°C für die Stämme *S. salivarius* AC 1802, AC 2051, AC 3442, AC 3994 und AC 4381

Template:	S. salivarius				
	AC 1802 (48 ng/ 5µl)	AC 2051 (200 ng/ 3µl)	AC 3442 (240 ng/ 2 µl)	AC 3994 (229 ng/ 3 µl)	AC 4381 (438 ng/ µl)
Forward-Primer:	psalAF2 3,3 pmol				
Reversed-Primer:	psalAR2 3,7 pmol				
Banden Anzahl:	0	0	0	0	0
Ergebnis:	-	-	-	-	-

Tabelle 20: 1. Ergebnisprotokoll der SalA-Operon-gerichteten PCR mit den Oligonukleotiden psalAF2 und psalAR2 bei einer Annealing-Temperatur von 48°C für die Stämme *S. salivarius* AC 1802, AC 2051, AC 3442, AC 3994 und AC 4381

Alle Stämme erwiesen sich als negativ.

Ferner wurde in der parallel durchgeführten, phänotypisch orientierten Doktorarbeit von Beate Houben das Hemmvermögen von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12, *S. salivarius* DSM 20067 sowie *S. salivarius* AC 1802, AC 2051, AC 3442, AC 3994 und AC 4381 gegen *S. pyogenes* ATCC 12202 (M-Typ 1), ATCC 12344 (M-Typ 1), AC 5180 (M-Typ 1), AC 1428 (M-Typ 77/27L), AC 4088 (M-Typ 77/27L), AC 3880 (M-Typ 4) und AC 4697 (M-Typ 2) auf Platte untersucht. Dabei demonstrierten *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12, *S. salivarius* DSM 20067 und *S. salivarius* AC 3994 einen wachstumshemmenden Einfluss auf *S. pyogenes* (Houben 2006).

Der Vergleich zwischen dem Versuch auf Festmedium und der SalA-Operon-gerichteten PCR ermöglicht uns eine Aussage über das geno- und phänotypische Verhalten der untersuchten Stämme und somit eine Aussage über die Aktivität der Expression des SalA-Operons bei den verschiedenen Stämmen. So zeigen sich *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 und *S. salivarius* DSM 20067 geno- und phänotypisch positiv, der Stamm *S. salivarius* AC 3994 genotypisch negativ und phänotypisch positiv sowie *S. salivarius* AC 1802, AC 2051, AC 3442 und AC 4381 geno- und phänotypisch negativ. Die Abweichung des geno- und phänotypischen Verhaltens des Stammes *S. salivarius* AC 3994 lässt sich wahrscheinlich durch eine Mutation im Primerbereich erklären.

III.2.2.2 Sequenzierung des Salivaricin-A-Operons von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12

Aufgrund der fehlenden Spezifität der SalA-Operon-gerichteten PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 - basierend auf der Gensequenz von *S. salivarius* 20P3 -, amplifizierten wir partiell mit Hilfe der Oligonukleotide psalAF1 und psalAR3 das Salivaricin-A-Operon (circa 1500 bp) und sequenzierten den Bereich des Strukturgens, welcher für das entsprechende Prä-peptid (salA) kodiert sowie einen für eines der Peptide bzw. Enzyme, die die posttranskriptionelle Modifikation und den Export des Proteins bewirken, kodierenden Sequenzbereich (salB-Gen).

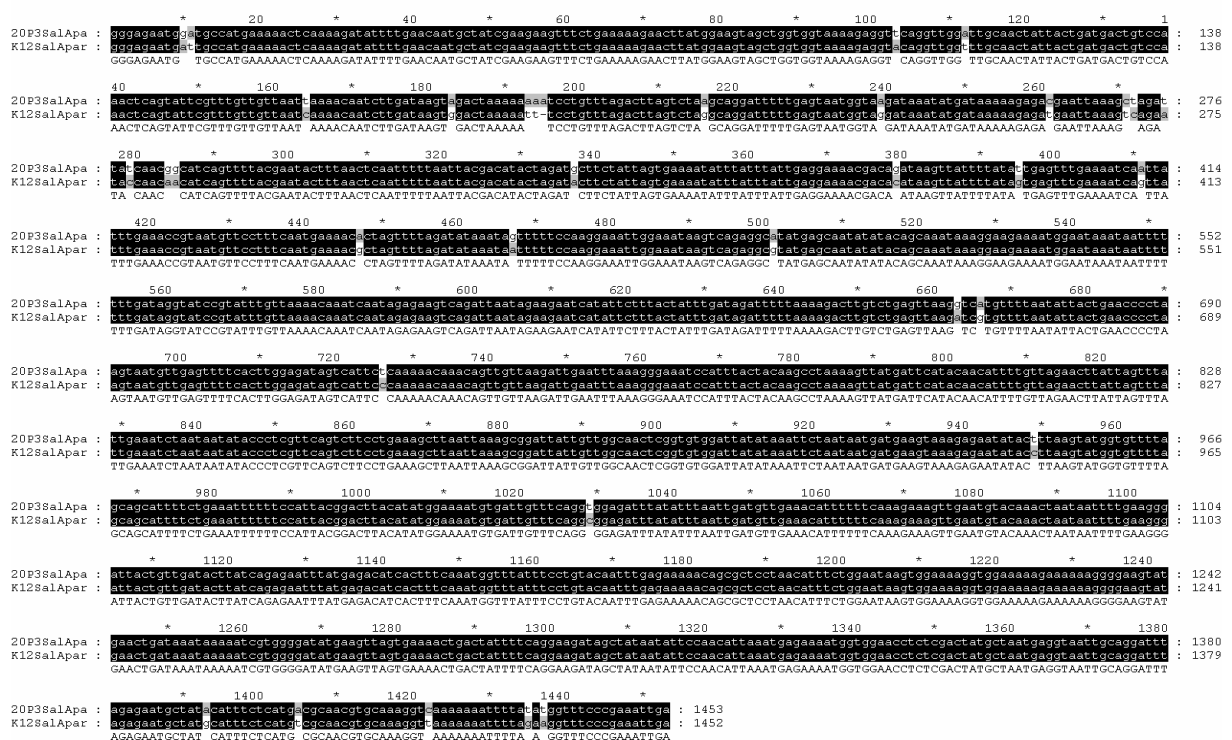


Abbildung 8: Vergleich des Salivaricin-A-Operons von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 und *S. salivarius* 20P3

III.2.2.3 Entwicklung einer PCR zum Nachweis von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 auf der Basis der Salivaricin-A-Gensequenz von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 sowie 20P3 als Referenz

III.2.2.3.1 Konventionelle PCR

Mit Hilfe der gewonnenen Daten aus der Sequenzierung des salA- und Teilen des salB-Strukturgens des Stammes *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 (im Vergleich zum Referenzstamm *S. salivarius* 20P3) entwickelten wir die Oligonukleotide pK12F und pK12R.

Untersucht wurden zunächst die *S.-salivarius*-Stämme *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12, *S. salivarius* DSM 20067 sowie *S. salivarius* AC 1802, AC 2051, AC 3442, AC 3994 und AC 4381. Ausschließlich *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 reagierte positiv mit einer Bande. Das optimalste Ergebnis ergab sich bei einer Konzentration der Oligonukleotide pK12F und pK12R von 2 bzw. 1,7 Picomol sowie einer Annealing-Temperatur von 52°C.

Weiterhin wurde der Proband mit der neuentwickelten PCR auf eine Besiedlung mit *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 untersucht, welche - wie erwartet - nicht nachgewiesen werden konnte.

Nachdem wir nun über eine sichere Detektionsform für den Stamm *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 verfügten und sichergestellt hatten, dass der zu untersuchende Patient nicht mit einem K12-Stamm besiedelt war, begann der Proband mit der Aufnahme von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12, der in die Mundhöhle mit Hilfe von BLIS-K12-Throat-Guard gemäß den Herstellerangaben eingeführt wurde.

Den Herstellerangaben des Produktes entsprechend spülte der Patient am ersten Tag mit zehn Millilitern einer Chlorhexidinlösung für 30 Sekunden und nahm die erste Tablette BLIS-K12-Throat-Guard zu sich. In Intervallen von zwei bis vier Stunden wurden weitere drei Tabletten verabreicht (0. Tag der Kolonisation). In den folgenden zwei Tagen (1.-2. Tag) wurde dieser Ablauf wiederholt, die Menge der Chlorhexidinlösung wurde mit zehn Millilitern beibehalten. Das Putzen der Zähne wurde bis zwei Stunden nach Einnahme der Tabletten vermieden. Antibiotika, der Verzehr von antibakteriellen Nahrungsmitteln wie Zwiebeln und Knoblauch sowie der Genuss von Alkoholika wurde unterlassen. Die Abstrichentnahme erfolgte am 1., 2., 3., 5., 7., 8., 10., 14., 22., 28. und 43. Tag an acht bis 16 Stellen der Mundhöhle.

Während der aktiven Kolonisationsphase wurde die Anzahl der Orte der Abstrichentnahme in der Mundhöhle auf acht reduziert, da zu diesem Zeitpunkt mit einer massiven Verbreitung und somit einer ausgeprägten Detektion des Stammes zu rechnen war.

Template:	1/1*	2/1	3/1	4/1	5/1	6/1	15/1	16/1
Forward-Primer:	pK12F 2,0 pmol							
Reversed-Primer:	pK12R 1,7 pmol							
Banden Anzahl:	1	1	1	1	1	1	1	1
Ergebnis:	++	++	++	++	++	++	++	++

Tabelle 21: Ergebnisprotokoll der stammspezifischen PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 bei einer Annealing-Temperatur von 50°C und für die klinischen Proben 1-6/1 und 15-16/1 (1/1 – Pharynx, rechts, 81 ng/ 5 µl; 2/1 – Pharynx, links, 90 ng/ 5 µl; 3/1 - bukkal, rechts, 125 ng/ 5 µl; 4/1 – bukkal, links, 100 ng/ 5µl; 5/1 - Zunge, dorsal, 265 ng/ 5µl; 6/1 – Zunge, ventral, 220 ng/ 5 µl; 15/1 – Speichelprobe, stimuliert, 270 ng/ 5 µl; 16/1 – Speichelprobe, 161 ng/ 5 µl) am 1.Tag der Abstrichentnahme = Probe 1 (*)

Template:	1/2*	2/2	3/2	4/2	5/2	6/2	15/2	16/2
Forward-Primer:	pK12F 2,0 pmol							
Reversed-Primer:	pK12R 1,7 pmol							
Banden Anzahl:	1	1	1	1	1	1	1	1
Ergebnis:	++	++	++	++	++	++	++	++

Tabelle 22: Ergebnisprotokoll der stammspezifischen PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 bei einer Annealing-Temperatur von 50°C für die klinischen Proben 1-6/2 und 15-16/2 (1/2 – Pharynx, rechts, 108 ng/ 5 µl; 2/2 – Pharynx, links, 90 ng/ 5 µl; 3/2 - bukkal, rechts, 179 ng/ 5 µl; 4/2 – bukkal, links, 90 ng/ 5µl; 5/2 - Zunge, dorsal, 534 ng/ 5µl; 6/2 – Zunge, ventral, 84 ng/ 5 µl; 15/2 – Speichelprobe, stimuliert, 630 ng/ 5 µl; 16/2 – Speichelprobe, 116 ng/ 5 µl) am 2.Tag der Abstrichentnahme = Probe 2 (*)

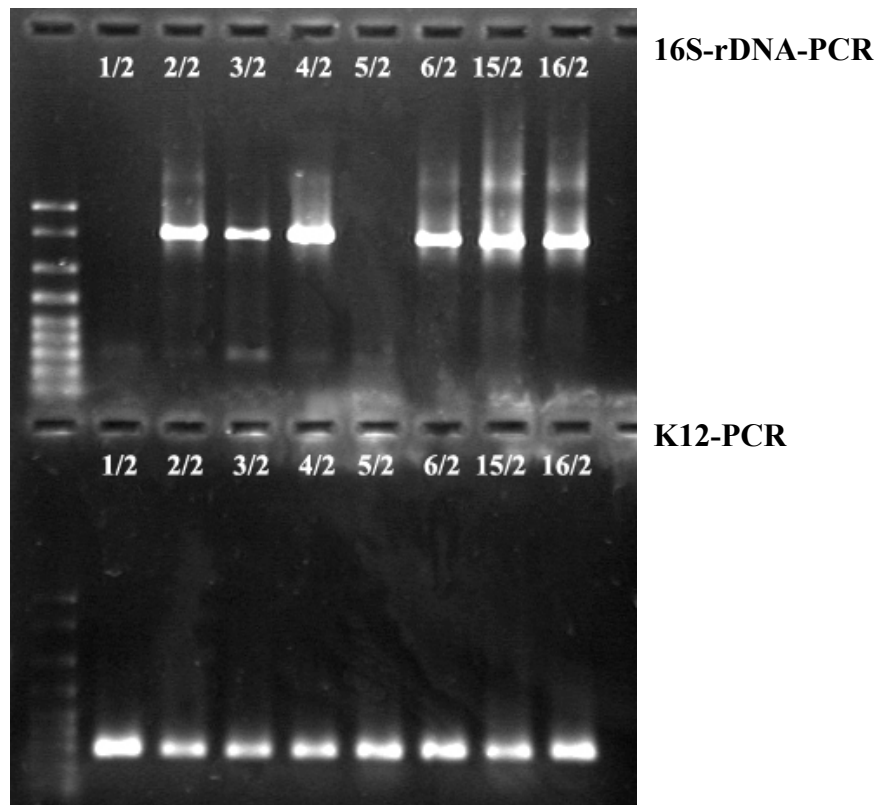


Abbildung 9: Gelelektrophoretische Darstellung der stammspezifischen PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 bei einer Annealing-Temperatur von 50°C (2. Abstrichentnahme)

Am zweiten Tag der Abstrichentnahme (Probe 2) wurde die aktive Kolonisierung mit *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 beendet. Bis dato erwiesen sich die Ergebnisse als stark positiv. Ein deutliches Bandenmuster und somit eine hohe Quantität an Zellen war in den Probandenproben nachweisbar.

Am dritten Tag der Abstrichentnahme (Probe 3) und somit am ersten Tag ohne Einnahme von BLIS-K12-Throat-Guard wurden morgens – circa zehn Stunden nach Einnahme der letzten Tablette - an acht Stellen der Mundhöhle wiederum Proben entnommen. Zu diesem Zeitpunkt sollten die lyophilisierten K12-Zellen der BLIS-K12-Throat-Guard-Tabletten aus der Mundhöhle eliminiert worden sein.

Template:	1/3*	2/3	3/3	4/3	5/3	6/3	15/3	16/3
Forward-Primer:	pK12F 2,0 pmol							
Reversed-Primer:	pK12R 1,7 pmol							
Banden Anzahl:	1	1	1	1	1	1	1	1
Ergebnis:	++	++	++	++	++	++	++	++

Tabelle 23: Ergebnisprotokoll der stammspezifischen PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 bei einer Annealing-Temperatur von 50°C für die klinischen Proben 1-6/3 und 15-16/3 (1/3 – Pharynx, rechts, 59 ng/ 5 µl; 2/3 – Pharynx, links, 56 ng/ 5 µl; 3/3 - bukkal, rechts, 101ng/ 5 µl; 4/3 – bukkal, links, 115 ng/ 5µl; 5/3 - Zunge, dorsal, 281 ng/ 5µl; 6/3 – Zunge, ventral, 72 ng/ 5 µl; 15/3 – Speichelprobe, stimuliert, 332 ng/ 5 µl; 16/3 – Speichelprobe, 77 ng/ 5 µl) am 3. Tag der Abstrichentnahme (morgens, circa 10 h nach Einnahme der letzten Tablette) = Probe 3 (*)

Das positive Bandenmuster zeigte sich nahezu unverändert. Jedoch demonstrierten sich der Pharynx links und rechts, die Zunge ventral und dorsal sowie die Speichelproben als stärker besiedelt.

Am Nachmittag desselben Tages – circa 20 Stunden nach der letzten aktiven Einführung von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 in die Mundhöhle – wurden erneut Proben (Probe 4) entnommen. Dieses Mal entschlossen wir uns für die ursprüngliche Anzahl der Detektionsorte (16 Stellen der Mundhöhle), um einen vollständigen Überblick über das Kolonisationsverhalten von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 zu erhalten.

Template:	1/4*	2/4	3/4	4/4	5/4	6/4	7/4	8/4	9/4	10/4	11/4	12/4	13/4	14/4	15/4	16/4
Forward-Primer:	pK12F 2,0 pmol															
Reversed-Primer:	pK12R 1,7 pmol															
Banden Anzahl:	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Ergebnis:	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Tabelle 24: Ergebnisprotokoll der stammspezifischen PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 bei einer Annealing-Temperatur von 50°C 1-16/4 (1/4 – Pharynx, rechts, 26 ng/ 5 µl; 2/4 – Pharynx, links, 46 ng/ 5 µl; 3/4 – bukkal, rechts, 38 ng/ 5 µl; 4/4 – bukkal, links, 5 ng/ 5µl; 5/4 – Zunge, dorsal, 95 ng/ 5µl; 6/4 – Zunge, ventral, 254 ng/ 5 µl; 7/4 – Zahn, I. Quadrant, bukkal, 63 ng/ 5 µl; 8/4 – Zahn, II. Quadrant, palatinal, 55 ng/ 5 µl; 9/4 – Zahn, III. Quadrant, bukkal, 108 ng/ 5 µl; 10/4 – Zahn, IV. Quadrant, lingual, 48 ng/ 5 µl; 11/4 – Sulcus, I. Quadrant, palatinal, 48 ng/ 5 µl; 12/4 – Sulcus, II. Quadrant, bukkal, 51 ng/ 5µl; 13/4 – Sulcus, III. Quadrant, lingual, 38 ng/ 5µl; 14/4 – Sulcus, IV. Quadrant, bukkal, 40 ng/ 5 µl; 15/4 – Speichelprobe, stimuliert, 552 ng/ 5 µl; 16/4 – Speichelprobe, 53 ng/ 5 µl) am 3. Tag der Abstrichentnahme (nachmittags, circa 20 h nach Einnahme der letzten Tablette) = Probe 4 (*)

Im Zeitraum zwischen zehn und 20 Stunden nach der letzten Aufnahme von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 zeigte sich mit Hilfe der stammspezifischen PCR ein Kolonisationsverlust an verschiedenen Messstellen der Mundhöhle. Dem klassischen Kolonisationsverhalten von *S. salivarius* entsprechend konnte der Stamm K12 im Pharynx rechts, auf der Zunge ventral und dorsal sowie im Speichel noch deutlich nachgewiesen werden. Parallel wurde, um Fehlerquellen auszuschließen, eine 16S-rDNA-PCR durchgeführt. Hier zeigten sich alle Proben positiv.

Die nächste Probenentnahme (Probe 5) fand am siebten Tag – fünf Tage nach Einnahme des letzten BLIS-K12-Throat-Guards – statt. Die Anzahl der Entnahmestellen in der Mundhöhle wurde wieder auf acht reduziert, da eine Besiedlung der Zähne und des Sulcus nicht gezeigt werden konnte und somit eine weitere Untersuchung nicht notwendig war.

Template:	1/5*	2/5	3/5	4/5	5/5	6/5	15/5	16/5
Forward-Primer:	pK12F 2,0 pmol							
Reversed-Primer:	pK12R 1,7 pmol							
Banden Anzahl:	0	0	0	0	0	1	1	1
Ergebnis:	-	-	-	-	-	+ -	+ -	+ -

Tabelle 25: Ergebnisprotokoll der stammspezifischen PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 bei einer Annealing-Temperatur von 50°C für die klinischen Proben 1-6/5 und 15-16/5 (1/5 – Pharynx, rechts, 52 ng/ 5 µl; 2/5 – Pharynx, links, 44 ng/ 5 µl; 3/5 - bukkal, rechts, 119 ng/ 5 µl; 4/5 – bukkal, links, 64 ng/ 5µl; 5/5 - Zunge, dorsal, 5 ng/ 5µl; 6/5 – Zunge, ventral, 419 ng/ 5 µl; 15/5 – Speichelprobe, stimuliert, 651 ng/ 5 µl; 16/5 – Speichelprobe, 406 ng/ 5 µl) am 7. Tag der Abstrichentnahme = Probe 5 (*)

S. salivarius ssp. *salivarius* K12 war nur noch auf der Zunge ventral sowie im Speichel zu detektieren. Das Bandenmuster demonstrierte sich als sehr schwach. Die 16S-rDNA-PCR zeigte sich für alle Proben positiv.

Die nächste Abstrichentnahme erfolgt am achten Tag (Probe 6). Um Fehlerquellen auszuschließen, wurde zusätzlich eine 16S-rDNA-PCR durchgeführt.

Template:	1/6*	2/6	3/6	4/6	5/6	6/6	15/6	16/6
Forward-Primer:	pK12F 2,0 pmol							
Reversed-Primer:	pK12R 1,7 pmol							
Banden Anzahl:	1	1	1	1	0	1	1	1
Ergebnis:	+	++	+	+	-	+	+ -	+

Tabelle 26: Ergebnisprotokoll der stammspezifischen PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 bei einer Annealing-Temperatur von 50°C für die klinischen Proben 1-6/6 und 15-16/6 (1/6 – Pharynx, rechts, 40 ng/ 5 µl; 2/6 – Pharynx, links, 32 ng/ 5 µl; 3/6 - bukkal, rechts, 46 ng/ 5 µl; 4/6 – bukkal, links, 52 ng/ 5µl; 5/6 - Zunge, dorsal, 313 ng/ 5µl; 6/6 – Zunge, ventral, 92 ng/ 5 µl; 15/6 – Speichelprobe, stimuliert, 471 ng/ 5 µl; 16/6 – Speichelprobe, 102 ng/ 5 µl) am 8. Tag der Abstrichentnahme = Probe 6 (*)

Im Pharynx links konnte *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 erneut stark detektiert werden. Im Pharynx rechts, auf beiden Bukkalflächen, auf der Zunge ventral und im Speichel war der Stamm ebenfalls gut nachweisbar. Schwache Banden zeigten sich bei den Proben, die aus

dem stimulierten Speichel entnommen wurden. Auf der Zunge dorsal war *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 nicht mehr nachweisbar. Zurückzuführen ist dies eventuell auf die hohe Templatekonzentration. Nach der Phase des Ausspülens der zugeführten K12-Zellen könnte nun eine echte Kolonisation mit Zellvermehrung stattgefunden haben. Die 16S-rDNA-PCR zeigte sich für alle Templates positiv.

Eine Woche nach der ersten Abstrichentnahme wurde der Zeitraum zwischen den Untersuchungen verlängert.

Zwei Tage nach der letzten klinischen Untersuchung wurden am zehnten Tag acht Proben (Probe 7) aus der Mundhöhle genommen. Wir führten die stammspezifische und eine 16S-rDNA-PCR durch.

Template:	1/7*	2/7	3/7	4/7	5/7	6/7	15/7	16/7
Forward-Primer:	pK12F 2,0 pmol							
Reversed-Primer:	pK12R 1,7 pmol							
Banden Anzahl:	0	0	0	0	0	0	0	0
Ergebnis:	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 27: Ergebnisprotokoll der stammspezifischen PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 bei einer Annealing-Temperatur von 50°C für die klinischen Proben 1-6/7 und 15-16/7 (1/7 – Pharynx, rechts, 147 ng/ 5 µl; 2/7 – Pharynx, links, 49 ng/ 5 µl; 3/7 - bukkal, rechts, 113 ng/ 5 µl; 4/7 – bukkal, links, 106 ng/ 5µl; 5/7 - Zunge, dorsal, 385 ng/ 5µl; 6/7 – Zunge, ventral, 701 ng/ 5 µl; 15/7 – Speichelprobe, stimuliert, 393 ng/ 5 µl; 16/7 – Speichelprobe, 306 ng/ 5 µl) am 10. Tag der Abstrichentnahme = Probe 7 (*)

An keinem Ort der Mundhöhle konnte *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 direkt nachgewiesen werden. Die stammspezifische PCR war negativ; die 16S-rDNA-PCR im Gegensatz dazu positiv.

Am 14. Tag (Probe 8), am 22. Tag (Probe 9), am 28. Tag (Probe 10) und am 43. Tag (Probe 11) wurde die Mundhöhle erneut auf eine noch bestehende Kolonisation mit *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 getestet. Wie zuvor wurde zusätzlich eine 16S-rDNA-PCR durchgeführt.

Template:	1/8*	2/8	3/8	4/8	5/8	6/8	15/8	16/8
Forward-Primer:	pK12F 2,0 pmol							
Reversed-Primer:	pK12R 1,7 pmol							
Banden Anzahl:	0	0	0	0	0	0	0	0
Ergebnis:	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 28: Ergebnisprotokoll der stammspezifischen PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 bei einer Annealing-Temperatur von 50°C für die klinischen Proben 1-6/8 und 15-16/8 (1/8 – Pharynx, rechts, 67 ng/ 5 µl; 2/8 – Pharynx, links, 108 ng/ 5 µl; 3/8 - bukkal, rechts, 113 ng/ 5 µl; 4/8 – bukkal, links, 67 ng/ 5µl; 5/8 - Zunge, dorsal, 407 ng/ 5µl; 6/8 – Zunge, ventral, 266 ng/ 5 µl; 15/8 – Speichelprobe, stimuliert, 282 ng/ 5 µl; 16/8 – Speichelprobe, 274 ng/ 5 µl) am 14. Tag der Abstrichentnahme = Probe 8 (*)

Template:	1/9*	2/9	3/9	4/9	5/9	6/9	15/9	16/9
Forward-Primer:	pK12F 2,0 pmol							
Reversed-Primer:	pK12R 1,7 pmol							
Banden Anzahl:	0	0	0	0	1	0	0	0
Ergebnis:	-	-	-	-	+	-	-	-

Tabelle 29: Ergebnisprotokoll der stammspezifischen PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 bei einer Annealing-Temperatur von 50°C für die klinischen Proben 1-6/9 und 15-16/9 (1/9 – Pharynx, rechts, 18 ng/ 5 µl; 2/9 – Pharynx, links, 26 ng/ 5 µl; 3/9 - bukkal, rechts, 42 ng/ 5 µl; 4/9 – bukkal, links, 41 ng/ 5µl; 5/9 - Zunge, dorsal, 224 ng/ 5µl; 6/9 – Zunge, ventral, 147 ng/ 5 µl; 15/9 – Speichelprobe, stimuliert, 682 ng/ 5 µl; 16/9 – Speichelprobe, 85 ng/ 5 µl) am 22. Tag der Abstrichentnahme = Probe 9 (*)

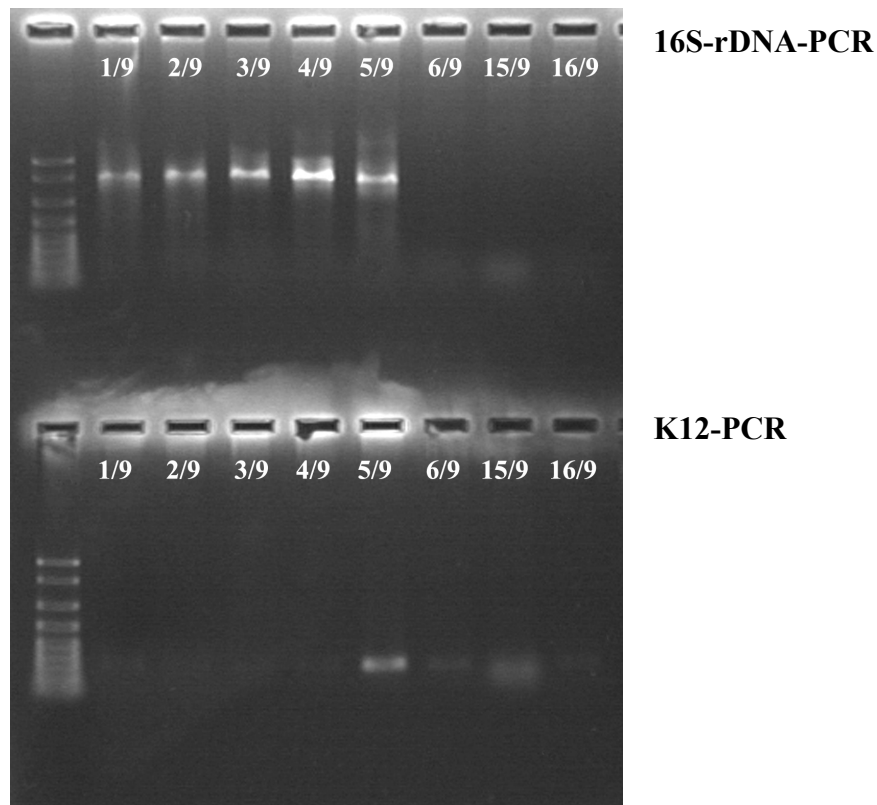


Abbildung 10: Gelelektrophoretische Darstellung der stammspezifischen PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 bei einer Annealing-Temperatur von 50°C (22. Tag der Abstrichentnahme = Probe 9)

Template:	1/10*	2/10	3/10	4/10	5/10	6/10	15/10	16/10
Forward-Primer:	pK12F 2,0 pmol							
Reversed-Primer:	pK12R 1,7 pmol							
Banden Anzahl:	0	0	0	0	0	0	0	0
Ergebnis:	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 30: Ergebnisprotokoll der stammspezifischen PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 bei einer Annealing-Temperatur von 50°C für die klinischen Proben 1-6/10 und 15-16/10 (1/10 – Pharynx, rechts, 44,5 ng/ 5 µl; 2/10 – Pharynx, links, 51 ng/ 5 µl; 3/10 - bukkal, rechts, 52 ng/ 5 µl; 4/10 – bukkal, links, 94 ng/ 5µl; 5/10 - Zunge, dorsal, 886 ng/ 5µl; 6/10 – Zunge, ventral, 442 ng/ 5 µl; 15/10 – Speichelprobe, stimuliert, 391 ng/ 5 µl; 16/10 – Speichelprobe, 120 ng/ 5 µl) am 28. Tag der Abstrichentnahme = Probe 10 (*)

Template:	1/11*	2/11	3/11	4/11	5/11	6/11	15/11	16/11
Forward-Primer:	pK12F 2,0 pmol							
Reversed-Primer:	pK12R 1,7 pmol							
Banden Anzahl:	0	0	0	0	0	0	0	0
Ergebnis:	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 31: Ergebnisprotokoll der stammspezifischen PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 bei einer Annealing-Temperatur von 50°C für die klinischen Proben 1-6/11 und 15-16/11 (1/11 – Pharynx, rechts, 56 ng/ 5 µl; 2/11 – Pharynx, links, 39 ng/ 5 µl; 3/11 - bukkal, rechts, 87 ng/ 11 µl; 4/11 – bukkal, links, 30 ng/ 5µl; 5/11 - Zunge, dorsal, 60 ng/ 5µl; 6/11 – Zunge, ventral, 34 ng/ 5 µl; 15/11 – Speichelprobe, stimuliert, 258 ng/ 5 µl; 16/11 – Speichelprobe, 74 ng/ 5 µl) am 43. Tag der Abstrichentnahme = Probe 11 (*)

Ab dem zehnten Tag war mit Hilfe der stammspezifischen K12-PCR keine Detektion von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 mehr möglich. Lediglich am 22. Tag ließ sich *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 noch auf der Zunge ventral (Probe 5/9) in Form einer schwachen Bande nachweisen. An diesem Tag zeigte sich die 16S-rDNA-PCR negativ für den vorderen Anteil der Zunge (Probe 6/9) und den Speichel (Proben 15/9 und 16/9). Im Übrigen erwies sich die 16S-rDNA-PCR als stets positiv.

III.2.2.3.2 Nested-PCR

Bedingt durch den fehlenden Nachweis von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 mit der konventionellen stammspezifischen K12-PCR ab dem zehnten Tag, beschlossen wir eine Nested-PCR anzuwenden, die es uns ermöglicht, geringe Mengen an Template darzustellen und falsche Amplifikate der PCR auszusondern. Folglich kann mit der Nested-PCR die Sensitivität erhöht werden. Für die erste PCR griffen wir auf die Kombination der Oligonukleotide psalAF1 und psalAR3 (1500-bp-Amplifikat) zurück. Bei dem PCR-Produkt dieser Reaktion wurden die bekannten Primer der stammspezifischen PCR – pK12F und pK12R –angewendet (290-bp-Amplifikat).



Abbildung 11: Lage der Oligonukleotide der Nested-PCR

Um den Vergleich der konventionellen und der Nested-PCR zu ermöglichen, testeten wir erneut die Proben der fünften bis elften Abstrichentnahme (Proben 5-11).

Template:	1/5*	2/5	3/5	4/5	5/5	6/5	15/5	16/5
Forward-Primer:	psalAF1 1,7 pmol							
Reversed-Primer:	psalAR3 1,96 pmol							
Banden Anzahl:	0	0	0	0	0	1	1	1
Ergebnis:	-	-	-	-	-	+ -	+ -	+ -
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Forward-Primer:	pK12F 2,0 pmol							
Reversed-Primer:	pK12R 1,7 pmol							
Banden Anzahl:	0	1	1	1	1	1	1	1
Ergebnis:	-	++	++	++	++	++	++	++

Tabelle 32: Ergebnisprotokoll der stammspezifischen Nested-PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 bei einer Annealing-Temperatur von 50°C für die klinischen Proben 1-6/5 und 15-16/5 (1/5 – Pharynx, rechts, 21 ng/ 2 µl; 2/5 – Pharynx, links, 17 ng/ 2 µl; 3/5 - bukkal, rechts, 48 ng/ 2 µl; 4/5 – bukkal, links, 25 ng/ 2 µl; 5/5 - Zunge, dorsal, 2 ng/ 2 µl; 6/5 – Zunge, ventral, 168 ng/ 2 µl; 15/5 – Speichelprobe, stimuliert, 260 ng/ 2 µl; 16/5 – Speichelprobe, 162 ng/ 2 µl) am 7. Tag der Abstrichentnahme = Probe 5 (*)

Das Ergebnis der Nested-PCR der Probe 5 stellte sich als stark positiv für den Pharynx links, die Bukkalflächen, die Zunge und den Speichel dar. Ein negatives Ergebnis demonstrierte sich für den Pharynx rechts.

Template:	1/6*	2/6	3/6	4/6	5/6	6/6	15/6	16/6
Forward-Primer:	psalAF1 1,7 pmol							
Reversed-Primer:	salAR3 1,96 pmol							
Banden Anzahl:	0	0	0	0	0	1	1	1
Ergebnis:	-	-	-	-	-	+ -	+ -	+ -
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Forward-Primer:	pK12F 2,0 pmol							
Reversed-Primer:	pK12R 1,7 pmol							
Banden Anzahl:	1	1	1	1	0	1	1	0
Ergebnis:	++	++	++	+ -	-	++	++	-

Tabelle 33: Ergebnisprotokoll der stammspezifischen Nested-PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 bei einer Annealing-Temperatur von 50°C für die klinischen Proben 1-6/6 und 15-16/6 (1/6 – Pharynx, rechts, 16 ng/ 2 µl; 2/6 – Pharynx, links, 13 ng/ 2 µl; 3/6 - bukkal, rechts, 18 ng/ 2 µl; 4/6 – bukkal, links, 21 ng/ 2 µl; 5/6 - Zunge, dorsal, 125 ng/ 2 µl; 6/6 – Zunge, ventral, 37 ng/ 2 µl; 15/6 – Speichelprobe, stimuliert, 188 ng/ 2 µl; 16/6 – Speichelprobe, 41 ng/ 2 µl) am 8. Tag der Abstrichentnahme = Probe 6 (*)

Am achten Tag der Abstrichentnahme (Probe 6) konnte mit Hilfe der Nested-PCR der Pharynx, die Bukkalfläche rechts, die Zunge ventral und die Speichelprobe als K12-kolonisiert dargestellt werden. Schwache Banden zeigten sich für die linke Bukkalfläche. Eine Besiedlung durch *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 war für den dorsalen Anteil der Zunge nicht nachweisbar.

Template:	1/7*	2/7	3/7	4/7	5/7	6/7	15/7	16/7
Forward-Primer:	psalAF1 1,7 pmol							
Reversed-Primer:	psalAR3 1,96 pmol							
Banden Anzahl:	0	0	0	0	0	0	0	0
Ergebnis:	-	-	-	-	-	-	-	-
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Forward-Primer:	pK12F 2,0 pmol							
Reversed-Primer:	pK12R 1,7 pmol							
Banden Anzahl:	1	1	0	1	0	1	1	1
Ergebnis:	++	++	-	++	-	+ -	+ -	++

Tabelle 34: Ergebnisprotokoll der stammspezifischen Nested-PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 bei einer Annealing-Temperatur von 50°C für die klinischen Proben 1-6/7 und 15-16/7 (1/7 – Pharynx, rechts, 59 ng/ 2 µl; 2/7 – Pharynx, links, 19 ng/ 2 µl; 3/7 - bukkal, rechts, 45 ng/ 2 µl; 4/7 – bukkal, links, 42 ng/ 2 µl; 5/7 - Zunge, dorsal, 154 ng/ 2 µl; 6/7 – Zunge, ventral, 280 ng/ 2 µl; 15/7 – Speichelprobe, stimuliert, 157 ng/ 2 µl; 16/7 – Speichelprobe, 122 ng/ 2 µl) am 10. Tag der Abstrichentnahme = Probe 7 (*)

Die Probe 7 vom zehnten Tag der klinischen Untersuchung demonstrierte mit Hilfe der Nested-PCR den K12-Stamm im Pharynx beidseitig, auf der linken Wangenmukosa und im Speichel. Eine nur schwache Detektion zeigte sich auf dem vorderen Anteil der Zunge. Nicht nachweisbar war der Stamm auf der rechten Bukkalfläche und auf dem Zungengrund.

Template:	1/8*	2/8	3/8	4/8	5/8	6/8	15/8	16/8
Forward-Primer:	psalAF1 1,7 pmol							
Reversed-Primer:	psalAR3 1,96 pmol							
Banden Anzahl:	0	0	0	0	0	0	0	0
Ergebnis:	-	-	-	-	-	-	-	-
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Forward-Primer:	pK12F 2,0 pmol							
Reversed-Primer:	pK12R 1,7 pmol							
Banden Anzahl:	1	1	1	1	1	1	0	1
Ergebnis:	++	++	++	++	++	++	-	++

Tabelle 35: Ergebnisprotokoll der stammspezifischen Nested-PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 bei einer Annealing-Temperatur von 50°C für die klinischen Proben 1-6/8 und 15-16/8 (1/8 – Pharynx, rechts, 27 ng/ 2 µl; 2/8 – Pharynx, links, 43 ng/ 2 µl; 3/8 - bukkal, rechts, 45 ng/ 2 µl; 4/8 – bukkal, links, 27 ng/ 2 µl; 5/8 - Zunge, dorsal, 163 ng/ 2 µl; 6/8 – Zunge, ventral, 106 ng/ 2 µl; 15/8 – Speichelprobe, stimuliert, 113 ng/ 2 µl; 16/8 – Speichelprobe, 110 ng/ 2 µl) am 14. Tag der Abstrichentnahme = Probe 8 (*)

Am 14. Tag der Abstrichentnahme (Probe 8) konnte *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 mit der Nested-PCR an allen untersuchten Stellen der Mundhöhle des Probanden nachgewiesen werden. Lediglich in der stimulierten Speichelprobe wurde der Stamm nicht detektiert.

Template:	1/9*	2/9	3/9	4/9	5/9	6/9	15/9	16/9
Forward-Primer:	psalAF1 1,7 pmol							
Reversed-Primer:	psalAR3 1,96 pmol							
Banden Anzahl:	0	0	0	0	0	0	0	0
Ergebnis:	-	-	-	-	-	-	-	-
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Forward-Primer:	pK12F 2,0 pmol							
Reversed-Primer:	pK12R 1,7 pmol							
Banden Anzahl:	1	1	1	1	1	1	1	1
Ergebnis:	++	++	++	++	++	++	++	++

Tabelle 36: Ergebnisprotokoll der stammspezifischen Nested-PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 bei einer Annealing-Temperatur von 50°C für die klinischen Proben 1-6/9 und 15-16/9 (1/9 – Pharynx, rechts, 7 ng/ 2 µl; 2/9 – Pharynx, links, 10 ng/ 2 µl; 3/9 - bukkal, rechts, 17 ng/ 2 µl; 4/9 – bukkal, links, 16 ng/ 2 µl; 5/9 - Zunge, dorsal, 90 ng/ 2 µl; 6/9 – Zunge, ventral, 59 ng/ 2 µl; 15/9 – Speichelprobe, stimuliert, 273 ng/ 2 µl; 16/9 – Speichelprobe, 34 ng/ 2 µl) am 22. Tag der Abstrichentnahme = Probe 9 (*)

Am 22. Tag der Abstrichentnahme (Probe 9) konnte die Kolonisation mit *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 an allen Stellen der Mundhöhle des Probanden demonstriert werden.

Template:	1/10*	2/10	3/10	4/10	5/10	6/10	15/10	16/10
Forward-Primer:	psalAF1 1,7 pmol							
Reversed-Primer:	psalAR3 1,96 pmol							
Banden Anzahl:	0	0	0	0	0	0	0	0
Ergebnis:	-	-	-	-	-	-	-	-
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Forward-Primer:	pK12F 2,0 pmol							
Reversed-Primer:	pK12R 1,7 pmol							
Banden Anzahl:	1	0	1	1	1	0	1	0
Ergebnis:	+	-	+	+	+	-	+	-

Tabelle 37: Ergebnisprotokoll der stammspezifischen Nested-PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 bei einer Annealing-Temperatur von 50°C für die klinischen Proben 1-6/10 und 15-16/10 (1/10 – Pharynx, rechts, 18 ng/ 2 µl; 2/10 – Pharynx, links, 20 ng/ 2 µl; 3/10 - bukkal, rechts, 21 ng/ 2 µl; 4/10 – bukkal, links, 38 ng/ 2 µl; 5/10 - Zunge, dorsal, 354 ng/ 2 µl; 6/10 – Zunge, ventral, 177 ng/ 2 µl; 15/10 – Speichelprobe, stimuliert, 156 ng/ 2 µl; 16/10 – Speichelprobe, 48 ng/ 2 µl) am 28. Tag der Abstrichentnahme = Probe 10 (*)

Ab dem 28. Tag (Probe 10) reduzierte sich die Qualität der Besiedlung mit dem Stamm. Die Nested-PCR zeigte positive Banden für den Pharynx rechts, die beiden Bukkalflächen, den posterioren Anteil der Zunge sowie für die stimulierte Speichelprobe. Im linken Rachenraum sowie im vorderen Bereich der Zunge konnte *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 nicht mehr detektiert werden.

Template:	1/11*	2/11	3/11	4/11	5/11	6/11	15/11	16/11
Forward-Primer:	psalAF1 1,7 pmol							
Reversed-Primer:	psalAR3 1,96 pmol							
Banden Anzahl:	0	0	0	0	0	0	0	0
Ergebnis:	-	-	-	-	-	-	-	-
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Forward-Primer:	pK12F 2,0 pmol							
Reversed-Primer:	pK12R 1,7 pmol							
Banden Anzahl:	1	1	1	1	1	0	1	0
Ergebnis:	++	++	++	++	++	-	++	-

Tabelle 38: Ergebnisprotokoll der stammspezifischen Nested-PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 bei einer Annealing-Temperatur von 50°C für die klinischen Proben 1-6/11 und 15-16/11 (1/11 – Pharynx, rechts, 22 ng/ 2 µl; 2/11 – Pharynx, links, 16 ng/ 2 µl; 3/11 - bukkal, rechts, 35 ng/ 2 µl; 4/11 – bukkal, links, 12 ng/ 2 µl; 5/11 - Zunge, dorsal, 24 ng/ 2 µl; 6/11 – Zunge, ventral, 13 ng/ 2 µl; 15/11 – Speichelprobe, stimuliert, 103 ng/ 2 µl; 16/11 – Speichelprobe, 30 ng/ 2 µl) am 43. Tag der Abstrichentnahme = Probe 11 (*)

43 Tage (Probe 11) nach Beginn der Besiedlung von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 zeigte sich die Mundhöhle des Probanden im Bereich des Rachenraumes, der Wangenschleimhaut, des Zungengrundes und des Speichels nach Detektion mit der Nested-PCR als kolonisiert.

Da zum gleichen Zeitpunkt jedoch auch Negativkontrollen positiv wurden, wurde dieses Ergebnis als nicht mehr valide gewertet. Durch die große Anzahl der Experimente war das Salivaricin-A-Amplifikat offensichtlich im Labor verbreitet worden.

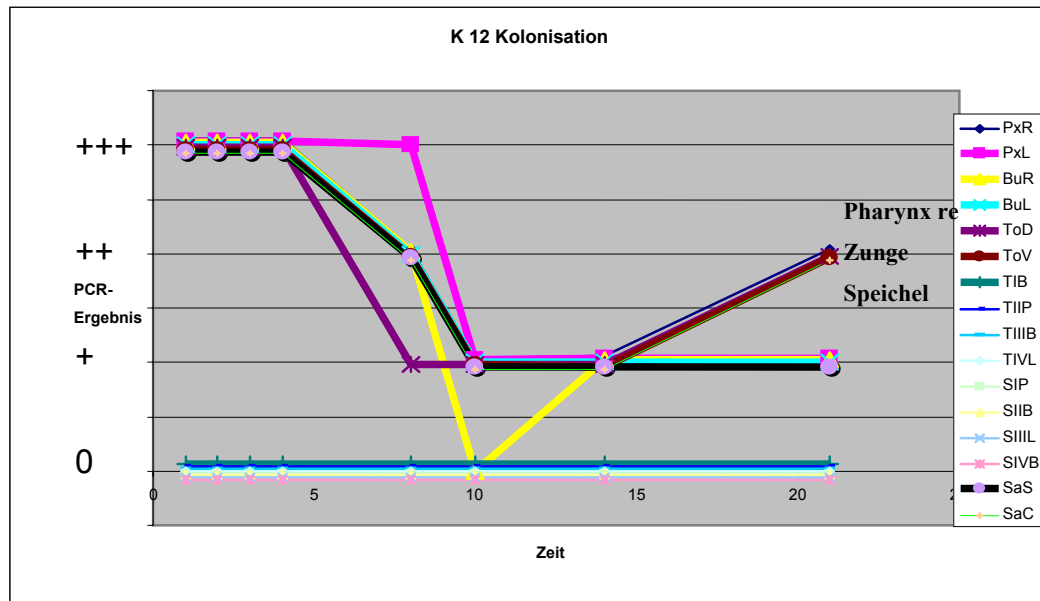


Abbildung 12: Graphische Darstellung des Kolonisationsversuchs von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 vom 1. - 22. Tag basierend auf den Daten der stammspezifischen Nested-PCR

	Pharynx rechts	Pharynx links	Bukkal rechts	Bukkal links	Zunge dorsal	Zunge ventral	Speichel stimuliert	Speichel
7.Tag (Probe 5)	-	-	-	-	-	+ -	+ -	+ -
7.Tag (Probe 5)	-	++	++	++	++	++	++	++
8.Tag (Probe 6)	+	++	+	+	-	+	+ -	+
8.Tag (Probe 6)	++	++	++	+ -	-	++	++	-
10. Tag (Probe 7)	-	-	-	-	-	-	-	-
10.Tag (Probe 7)	++	++	-	++	-	+ -	+ -	++
14. Tag (Probe 8)	-	-	-	-	-	-	-	-
14.Tag (Probe 8)	++	++	++	++	++	++	-	++
22. Tag (Probe 9)	-	-	-	-	+	-	-	-
22. Tag (Probe 9)	++	++	++	++	++	++	++	++
28. Tag (Probe 10)	-	-	-	-	-	-	-	-
28. Tag (Probe 10)	+	-	+	+	+	-	+	-
43. Tag (Probe 11)	-	-	-	-	-	-	-	-
43. Tag (Probe 11)	++	++	++	++	++	-	++	-

Abbildung 13: Darstellung der Ergebnisse der Besiedlung von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 an acht Stellen der Mundhöhle mit Hilfe der konventionellen (□) und der Nested-PCR (■) vom 7. - 43. Tag der Abstrichentnahme; Die Daten der Nested-PCR der 43. Abstrichentnahme (Probe 11) wurden nicht gewertet, da zu diesem Zeitpunkt die Negativkontrollen schwach positiv wurden (■).

III.2.2.3.3 Quantitative PCR (real-time PCR)

Um die Sensitivität der stammspezifischen Nested-PCR quantitativ darzustellen, nutzten wir nach Elimination des Kontaminationsproblems die Methode der real-time PCR. Die Abstriche vom 3., 8., 14., 22., 28. und 43. Tag des Kolonisationsexperiments (Proben 4, 6, 8, 9, 10 und 11) wurden erneut untersucht.

Am dritten Tag (Probe 4) der Untersuchung ließen sich mit Hilfe der real-time PCR in allen Abstrichen K12-Zellen nachweisen. So detektierte das Nachweisverfahren 1.600 Salivaricin-A-Amplifikate/ Abstrich im Pharynx rechts, im Pharynx links 400 Salivaricin-A-Amplifikate/ Abstrich, auf der rechten Wangenschleimhaut 100 Salivaricin-A-Amplifikate/ Abstrich, auf der linken Bukkalfläche 1.000 Salivaricin-A-Amplifikate/ Abstrich, auf dem dorsalen Anteil der Zunge 2.500 Salivaricin-A-Amplifikate/ Abstrich, im vorderen Zungenbereich 45.800 Salivaricin-A-Amplifikate/ Abstrich, in der stimulierten Speichelprobe 23.900 Salivaricin-A-Amplifikate/ Abstrich sowie in der Probe des konzentrierten Speichels 700 Salivaricin-A-Amplifikate/ Abstrich.

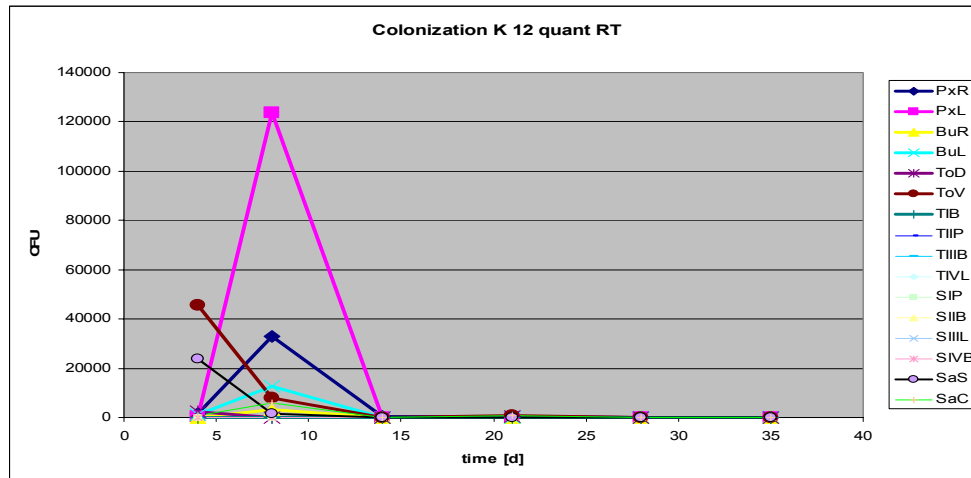
Am achten Tag (Probe 6) der Abstrichentnahme war eine vermehrte Kolonisation mit *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 im Pharynx rechts (32.900 SalA-Amplifikate/ Abstrich) und links (123.700 SalA-Amplifikate/ Abstrich), auf der rechten (3.100 SalA-Amplifikate/ Abstrich) und linken Bukkalfläche (12.800 SalA-Amplifikate/ Abstrich) sowie in der konzentrierten Salivaprobe (6.000 SalA-Amplifikate/ Abstrich) zu verzeichnen. Die Besiedlung mit dem Stamm hatte sich auf der Zunge ventral auf 7.800 SalA-Amplifikate/ Abstrich und in der stimulierten Speichelprobe auf 1.700 SalA-Amplifikate/ Probe verringert. Im hinteren Bereich der Zunge war der Stamm nicht mehr nachweisbar.

Am 14. Tag (Probe 8) der Untersuchung konnte der Stamm mit 300 SalA-Amplifikaten/ Abstrich im Pharynx rechts und mit 100 SalA-Amplifikaten/ Abstrich links sowie mit ebenfalls 100 SalA-Amplifikaten/ Abstrich auf der linken Wangenschleimhaut nachgewiesen werden.

Am 22. Tag (Probe 9) des Experiments detektierte die quantitative real-time (RTQ-) PCR K12 im rechtsseitigen Pharynx mit 500 SalA-Amplifikaten/ Abstrich. Ein erneute Kolonisation konnte auf dem dorsalen (200 SalA-Amplifikate/ Abstrich) und ventralen (800 SalA-Amplifikate/ Abstrich) Anteil der Zunge sowie in einer Speichelprobe (900 SalA-

Amplifikate/ Abstrich) gezeigt werden, nachdem diese Lokalisation in der Mundhöhle in der vorangegangenen Abstrichentnahme als K12-zellfrei dargestellt wurde.

Am 28. (Probe 10) sowie 43. (Probe 11) Tag der Untersuchung demonstrierte der quantitative Nachweis eine Besiedlung mit *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 von 100 SalA-Amplifikaten/ Abstrich im Pharynx rechts. Die Nachweisgrenze des Stammes wurde hiermit erreicht. Pro PCR-Ansatz war damit nur noch eine K12-Zelle nachweisbar.



	Pharynx rechts	Pharynx links	Bukkal rechts	Bukkal links	Zunge dorsal	Zunge ventral	Speichel stim.	Speichel konz.
3. Tag (Probe 4)	1600	400	100	1000	2500	45800	23900	700
8. Tag (Probe 6)	32900	123700	3100	12800	0	7800	1700	6000
14. Tag (Probe 8)	300	100	0	100	0	0	0	0
22. Tag (Probe 9)	500	0	0	0	200	800	0	900
28. Tag (Probe 10)	100	0	0	0	0	0	0	0
43. Tag (Probe 11)	100	0	0	0	0	0	0	0

Abbildung 14: Quantitative Darstellung der Besiedlung der Mundhöhle mit *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 mit Hilfe der quantitativen real-time (RTQ-) PCR

IV DISKUSSION

IV.1 Verwendung einer PCR zum artspezifischen Nachweis von *S. salivarius*

Um einen artspezifischen Nachweis von *S. salivarius* zu ermöglichen, wurde auf verschiedene Primersysteme zurückgegriffen, die bereits von Autoren beschrieben worden waren. Für den möglichst selektiven *S.-salivarius*-Nachweis mussten die publizierten Parameter angepasst und optimiert werden.

IV.1.1 ITS-gerichtete PCR

Die ITS („internal transcribed spacer“)-Bereiche des bzw. der ribosomalen *rm*-Operons werden häufig genutzt, um Bakterien taxonomisch exakt zu erfassen. Die ITS-Regionen befinden sich zum Beispiel zwischen dem 16S- und 23S-rRNA-Gen, enthalten manchmal tRNA-Gene und zeigen insgesamt wenig konservierte Abschnitte, die von langen variablen Abschnitten unterbrochen werden. Übereinstimmungen in den konservierten Regionen ermöglichen die Zuordnung eines Isolates zu einer Art (Barry et al. 1991, Mendoza et al. 1998, Uemori et al. 1992). Andererseits kann die Variabilität in den ITS-Regionen für eine spezifische Stammidentifizierung genutzt werden (Conrads et al. 2002 und 2005, Mora et al. 2003). Wir entwickelten eine ITS-gerichtete PCR basierend auf den in Genbank hinterlegten Streptokokken-ITS-Sequenzen mit den von uns entwickelten Primern StrepITSsalF und StrepITSsalR und untersuchten zunächst zwei *S.-salivarius*-Stämme. Beide Ergebnisse zeigten sich als negativ. Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass Variabilitäten in der ITS-Region in Form von Deletionen oder Punktmutationen, speziell im Bereich der Primer, zu hoch sind, um einen speziesspezifischen Nachweis von *S. salivarius* noch zuzulassen. Inhibitorische Substanzen als Ursache der negativen Amplifikation wurden durch die positiven universellen 16S-rDNA-PCRs ausgeschlossen.

Untersuchungen mit Hilfe einer ITS-gerichteten PCR zum Nachweis von Viridansstreptokokken auf Ebene der Art wurden bereits von Chen et al. 2004 veröffentlicht. Getestet wurden unter anderem sechs *S.-salivarius*-Stämme. Die Erfassung der einzelnen Spezies und die Unterscheidung zwischen verschiedenen Arten waren gegeben. So zeigte sich zwischen *S. salivarius* ATCC 13419 und *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556 eine Übereinstimmung der ITS-Sequenz von 54 Prozent, zwischen *S. salivarius* ATCC 13419 und *Streptococcus uberis* ATCC 13386 von 52 Prozent und zwischen *S. salivarius* ATCC 13419 und

Enterococcus faecalis ATCC 19433 von nur 37 Prozent. Innerhalb der Gruppe der sechs untersuchten *S.-salivarius*-Stämme lag die Kongruenz des ITS-Bereichs nach Autorenangaben bei 98 bis 100 Prozent. Probleme bei dieser Untersuchung ergaben sich mit den sechs untersuchten *Streptococcus-mitis*-Stämmen sowie bei vier untersuchten Stämmen von *Streptococcus oralis*. Die Autoren vermuteten, dass die Deckung der Sequenz zwischen zum Beispiel *S. mitis* ATCC 49456 und *Streptococcus pneumoniae* ATCC 33400 höher ist als im Intraspezies-Bereich (Chen et al. 2004). Zu überprüfen wäre, ob eine solche geringe Konkordanz bei den von uns untersuchten *S.-salivarius*-Stämmen vorlag und zu dem negativen Nachweis führte. Als Alternative wurde von Chen et al. 2005 eine Kombination der ITS-gerichteten PCR mit einem Oligonukleotid-Array zum speziesspezifischen Nachweis von Viridansstreptokokken veröffentlicht. In dieser Untersuchung zeigten sich eine Sensitivität von 100 Prozent (120 von 120 Stämmen) und eine Spezifität von 95,6 (87 von 91 Stämmen) (Chen et al. 2005).

Probleme mit einer ITS-gerichteten PCR wurden ebenfalls in einer Studie von Kuwahara et al. 2001 dargestellt, in der die Variabilität der ITS-Region genutzt wurde, um die Spezies *Bacteroides* zu untersuchen. 90 *Bacteroides*-Arten wurden getestet. In den Fällen, in denen keine ITS-Produkte detektiert wurden, verwiesen die Autoren als Erklärung auf eine These von Lamfrom et al. 1978 und Krawiec et al. 1990, in der von einer anderen Anordnung der 16S- und 23S-rRNA-Gene ausgegangen wurde. Es wurde vermutet, dass in manchen Fällen eine Verknüpfung der Gene in entgegengesetzter Richtung – also eine 23S/16S-Verbindung – vorliegt. Geht man von einer solchen Anordnung bei den von uns untersuchten *S.-salivarius*-Stämmen aus, ist ein Ergebnis mit den von uns verwendeten Primer nicht möglich. Hier müssten weiterführende genomische Untersuchungen folgen.

IV.1.2 Ligasegen-gerichtete PCR

Die von Garnier et al. 1997 beschriebenen Primer StsalF und StsalR amplifizieren eine Gensequenz, welche die D-Alanin:D-Alanin-Ligase kodiert und spezifisch ist für Prokaryonten, die Peptidoglykane produzieren. Gensequenzen, die für ein essentielles Protein kodieren, erweisen sich meistens als konstant (auf Artebene) und selten variabel. Trotz Optimierung der Annealing-Temperatur zeichnete sich kein spezifisches Ergebnis für die sieben untersuchten *S.-salivarius*-Stämme ab. Lediglich *S. salivarius* ATCC 4381 zeigte ein schwach positives Ergebnis. Weiterhin stellte sich der als Negativkontrolle untersuchte Stamm *S. mutans* ATCC 25175 als falsch-positiv dar. Um spezifische Aussagen präzisieren und Fehler ausschließen zu können, könnten neben dieser genspezifischen PCR weitere

molekulargenetische Untersuchungen z.B. in Form einer Multiplex-PCR stattfinden (Angeletti et al. 2001). Ähnliche Probleme mit den von Garnier et al. beschriebenen Primern stellten Kawamura et al. 1999 dar, jedoch mit den für die Arten *Streptococcus mitis* und *Streptococcus oralis* publizierten Primersequenzen. So ergaben sich bei fünf von acht untersuchten *S.-mitis*-Stämmen mit der Ligasegen-gerichteten PCR falsch-negative Ergebnisse. Weiterhin konnten zwei von acht untersuchten *S.-oralis*-Stämmen mit den entsprechenden Primern bei dieser Untersuchung nicht nachgewiesen werden (Kawamura et al. 1999).

IV.1.3 Dextranasegen-gerichtete PCR

Das Primerpaar Ssa442F und Ssa2712R amplifiziert speziesspezifisch einen Teilbereich des *S.-salivarius*-Dextranasegens. Erstmals beschrieben wurde dieser Nachweis von Igarashi et al. 2001 auf der Basis der Gensequenz von *S. salivarius* PC-1. Nach Optimieren der Annealing-Temperatur und Erhöhen der Primerkonzentration (bedingt durch die hohe Templatekonzentration vermuteten wir zuerst einen Primermangel) war für 72 Prozent der *S.-salivarius*-Stämme (fünf von sieben Stämmen) ein reproduzierbarer Nachweis möglich. *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12, *S. salivarius* DSM 20067 und *S. salivarius* AC 3342 wiesen zudem ein spezifisches Zwei-Bandenmuster auf. Aufgrund des Bandenmusters waren diese Stämme von *S. salivarius* AC 1802 und AC 3994 unterscheidbar, welche jeweils nur eine intensive Bande demonstrierten. *S. salivarius* AC 2051 und AC 4381 reagierten trotz gesicherter biochemischer Speziesidentifizierung leider negativ. Wie erwartet blieb auch *S. mutans* ATCC 25175, welcher als Negativkontrolle eingesetzt wurde, ohne Amplifikat.

Die klinische Untersuchung des Probanden mit Hilfe der Dextranasegen-gerichteten PCR demonstrierte eine Kolonisation mit der Spezies *S. salivarius* im Pharynx beidseitig, auf der Zunge ventral und dorsal sowie im Speichel. Unsere Ergebnisse zeigen sich kongruent mit den veröffentlichten Daten nach Frandsen et al. 1991, der die Mundhöhle von sechs erwachsenen Individuen auf Viridansstreptokokken untersuchte. *S. salivarius* zeigte sich hier als Anteil aller isolierten Streptokokken zu 17 Prozent auf der Zunge und zu 30 Prozent im Pharynx. Eine stammspezifische Analyse fand ebenso wie eine Überprüfung einer möglichen BLIS-Produktion in dem von Frandsen et al. dargestellten Versuch nicht statt.

Kritisch anzumerken sei, dass die von uns durchgeführte Studie keine Aussage über die mit Hilfe der Dextranasegen-gerichteten PCR nicht-detektierbaren Stämme ermöglicht. In der Voruntersuchung der sieben *S.-salivarius*-Stämme wurden zwei BLIS-negative Stämme nicht

erfasst. Im Gegensatz dazu konnten die beiden bekannten Salivaricin-produzierenden Stämme *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 und *S. salivarius* DSM 20067 nachgewiesen werden. Zu vermuten wäre nun, dass der Proband über Bacteriocin-produzierende Stämme verfügen könnte, da sich *S. salivarius* in seiner Mundhöhle mit Hilfe der Dextranasegen-gerichteten PCR als nachweisbar zeigte. Das spezifische Zwei-Bandenmuster der BLIS-positiven Stämme konnte allerdings nicht dargestellt werden, was uns annehmen lässt, dass der Proband mit keinem Bacteriocin-Produzenten kolonisiert ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass unser Proband BLIS-Träger ist, ist als unwahrscheinlich zu bewerten. In der von Dierksen et al. 2000 durchgeführten Untersuchung von 780 Schulkindern, demonstrierten nur 20 Prozent aller Kinder einen BLIS-positiven *S.-salivarius*-Stamm. Der am stärksten inhibitorisch wirkende P-Typ 777 (s. I.2.1.1), zu dem auch *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 gehört, wurde in dieser Studie nicht getestet (Dierksen et al. 2000). Bis dato liegen keine Aussagen über die Anzahl der Träger dieses P-Typs vor.

IV.2 Anwendung der Salivaricin-A-Operon-gerichteten PCR zum stammspezifischen Nachweis von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12

Der Wunsch nach einer Etablierung des Nahrungsergänzungsmittels BLIS-K12-Throat-Guard auf dem deutschen Markt zieht die Forderung nach einer adäquaten Detektionsform für den in diesem Produkt enthaltenen *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 nach sich. Der Stamm gehört zu den Produzenten des Bacteriocins Salivaricin A, welches inhibitorisch gegen den Pharyngitis-erreger *S. pyogenes* wirkt. Aufgrund dessen ergab sich der Bedarf, eine stammspezifische PCR für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12, die gegen ein oder mehrere Strukturgene des Salivaricin-A-Operons mit einer stammspezifischen Allelität gerichtet ist, zu entwickeln.

Die auf der Basis der Gensequenz von *S. salivarius* 20P3 („Genbank-Accessionnummer AY005472“) entwickelte Salivaricin-A-Operon-gerichtete PCR erzielte nicht die gewünschte Spezifität. Zu vermuten war das Vorliegen einzelner Punktmutationen. Der uns durch die Sequenzierung des *salA*-Strukturgens und Teilen des *salB*-Strukturgens von K12 ermöglichte Vergleich der Sequenzen des Salivaricin-A-Operons der beiden Stämme *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 und *S. salivarius* 20P3 zeigte eine fehlende Übereinstimmung der Basen in 2,4 Prozent (35 bp/ 1453 bp). Die von Tagg 2004 nach unserer Studie veröffentlichten Daten zeigen eine Sekretion unterschiedlicher Lantibiotika bei *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 und *S. salivarius* 20P3. So produziert *S. salivarius* 20P3 wie bereits angenommen Salivaricin A;

S. salivarius ssp. *salivarius* K12 im Gegensatz dazu die beiden Lantibiotika Salivaricin A2 und Salivaricin B, wobei Letzteres nicht in Bezug zu Salivaricin A und A2 zu setzen ist. Betrachtet man die molekulare Masse, so unterscheiden sich bereits die beiden Lantibiotika mit 2.315 Dalton (Salivaricin A) und 2.368 Dalton (Salivaricin A2). Zusätzlich differieren die beiden Antipharyngitis-Peptide in der Aminosäuresequenz. Salivaricin A2 trägt an vierter Position anstelle von Serin Threonin und an siebter Position statt Isoleucin Phenylalanin (Tagg 2004).

Mit Hilfe der gewonnenen Daten aus der Sequenzierung des *salA*-Strukturgens und Teilen des *salB*-Strukturgens des Stammes *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 (im Vergleich zur Referenz 20P3) entwickelten wir eine spezifische PCR für den Stamm K12. Die vorhandenen Punktmutationen sichern die Stammspezifität dieser PCR.

IV.2.1 Konventionelle PCR

Nachdem wir nun über eine eindeutige Detektionsform für den Stamm *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 verfügten und sichergestellt hatten, dass der zu untersuchende Patient nicht mit K12 oder einem K12-ähnlichen Stamm natürlicherweise besiedelt war, begann der Proband mit der Aufnahme von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12, der in die Mundhöhle mit Hilfe von BLIS-K12-Throat-Guard gemäß Herstellerangaben eingeführt wurde.

Die konventionelle K12-PCR ermöglichte uns den stammspezifischen Nachweis von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 in der Mundhöhle des Probanden.

Während der Kolonisationsphase und aktiven Zuführung von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 war der Stamm mit Hilfe der K12-PCR an allen untersuchten Lokalisationen in der Mundhöhle des Probanden nachweisbar.

Zehn bis 20 Stunden (Probe 4) nach der letzten Einnahme von BLIS-K12-Throat-Guard wies die K12-PCR den Stamm - dem klassischen Kolonisationsverhalten entsprechend - im Pharynx rechts, auf der Zunge ventral und dorsal sowie im Speichel nach.

Am siebten Tag der Abstrichentnahme (Probe 5) – fünf Tage nach Einnahme der letzten BLIS-K12-Throat-Guard-Tablette – zeigte sich mit Hilfe der K12-PCR noch eine Kolonisation mit *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 auf der Zunge ventral sowie im Speichel.

Am achten Tag der Abstrichentnahme (Probe 6) konnte der Stamm im Pharynx linksseitig stark detektiert werden. Weiterhin war er im Pharynx rechts, auf beiden Bukkalflächen, auf

der Zunge ventral und im Speichel ebenfalls gut nachweisbar. In der stimulierten Speichelprobe zeigte er sich diesmal nur schwach.

Am 10., 14., 22., 28. und 43. Tag (Proben 7 - 11) erfolgten weitere Abstrichentnahmen und Untersuchungen. Mit Hilfe der K12-PCR war der Stamm jedoch nicht mehr direkt nachweisbar.

Die stammspezifische K12-PCR bietet ein adäquates Nachweisverfahren für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 und erwies sich in ihrem Rahmen als robust und reproduzierbar. Während der aktiven Kolonisationsphase war der Stamm mit Hilfe der PCR in der Mundhöhle nachweisbar. Um den weiteren Verlauf der Besiedlung bzw. das Ausschleichen von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 nachvollziehen zu können, bedarf es aber sensiblerer Methoden. Hier waren die Grenzen der konventionellen einstufigen PCR erreicht.

Aus den Ergebnissen der Besiedlung mit *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 können nun auch Überlegungen in Bezug auf das für die probiotische Aktivität erforderliche Kolonisationsverhalten des Stammes K12 angestellt werden. So ist zu überlegen, ob die kurzzeitige geringere Nachweisbarkeit am siebten Tag (Probe 5) – fünf Tage nach der letzten aktiven Zuführung von BLIS-K12-Throat-Guard in die Mundhöhle – für eine kurzweilige Latenzphase spricht und der aktive Vermehrungs- und Besiedlungsprozess erst ab dem achten Tag stattfindet. Hier zeigen sich Übereinstimmungen mit dem Erstauftreten von *S. salivarius* in der Mundhöhle Neugeborener. Trotz Erstbesiedlung am zweiten Tag postnatal erreicht er seine hohe Prävalenz erst nach einem halben Jahr (Könönen et al. 2002). Es ist aber zu bedenken, dass die Mundhöhle eines Erwachsenen und die primär unbesiedelte Mundhöhle eines Säuglings unterschiedliche Kolonisationsvoraussetzungen bieten.

IV.2.2 Nested-PCR

Die stammspezifische Nested-PCR stellt eine sensitivere Methode zum Nachweis von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 dar. Ein weiterer Vorteil ist eine Erhöhung der Spezifität, während falsche Amplifikate ausgesondert werden.

Um die Kolonisation von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 beurteilen zu können, untersuchten wir die Abstriche vom 7., 8., 10., 14., 22., 28. und 43. Tag (Probe 5 – 11) erneut mit Hilfe der stammspezifischen zweistufigen PCR. Mit der Nested-PCR konnte in den meisten Fällen einer negativen konventionellen K12-PCR noch eine geringfügige Besiedlung mit *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 gezeigt werden. So konnte der Stamm K12 am siebten Tag

der Abstrichentnahme (Probe 5) auf der Zunge ventral sowie in den Speichelproben mit der stammspezifischen Nested-PCR nachgewiesen werden. Zusätzlich ergaben sich ebenfalls positive Befunde für den Pharynx rechtsseitig, die Bukkalflächen und den dorsalen Anteil der Zunge.

Am achten Tag der Abstrichentnahme (Probe 6) zeigten sich alle Ergebnisse – eine Speichelprobe ausgeschlossen – kongruent mit den durch die einstufige K12-PCR erhobenen Daten. Lediglich die Intensität der Banden war mit der Nested-PCR als stärker zu verzeichnen.

Ab dem zehnten Tag der Abstrichentnahme (Probe 7) stellte die konventionelle K12-PCR die Mundhöhle als nicht mehr mit dem Stamm besiedelt dar. Ausnahme war die dorsale Zungenprobe am 22. Tag. Die stammspezifische Nested-PCR konnte dagegen den Stamm jedoch noch zusätzlich im Pharynx beidseitig, auf der Wangenmukosa rechts, auf der Zunge ventral sowie in den Speichelproben darstellen.

Am 14. Tag der Abstrichentnahme (Probe 8) zeigte die zweistufige Nachweismethode alle Abstrichlokalisationen der Mundhöhle als mit K12 besiedelt.

Einen ebenfalls durchgehend für alle Messstellen positiven Befund demonstrierte die Nested-PCR am 22. Tag der Abstrichentnahme (Probe 9).

Am 28. Tag der Abstrichentnahme (Probe 10) detektierte die Nested-PCR *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 im Pharynx rechts, auf den Bukkalflächen, auf dem dorsalen Anteil der Zunge sowie in der stimulierten Speichelprobe. Die Bandenstärke erwies sich als schwächer im Vergleich zu den vorangegangenen Befunden.

Am 43. Tag (Probe 11) zeigte sich mit Hilfe der Nested-PCR der Pharynx beidseitig, die Wangenschleimhaut, die Zunge sowie die Speichelprobe als erneut stärker besiedelt.

Die Zunahme der positiven Messergebnisse gegen Ende der Untersuchungsreihe lässt die Frage aufkommen, ob die Validität der Nested-PCR am Schluss der Studie noch gegeben war. Parallel zu den Untersuchungen wurden templatefreie Negativproben untersucht. Am 43. Tag der Abstrichentnahme (Probe 11) zeigte sich diese ebenfalls positiv. Daher kann eine Kontamination mit dem Salivarin-A-Amplifikat vermutet werden. Nur die bis zum 43. Tag erhobenen Daten wurden somit in die Endauswertung einbezogen.

Die Problematik der Kontamination ist seit Einführung der PCR als diagnostischer Test in mikrobiologische Laboratorien bekannt. Häufig Ursache ist das so genannte „carry over“, das heißt die Kontamination von Untersuchungsproben durch die in vorherigen PCR-Ansätzen amplifizierte DNA. Schon ein in der Pipette hochgesaugtes Aerosol mit einigen wenigen Molekülen reicht aus, um bei Verwendung der Pipette für weitere Schritte mit diesem Amplifikat falsch-positive Ergebnisse zu erzeugen. Gerade die sensitiveren PCRs – so auch die Nested-PCR – fallen mit falsch-positiven Ergebnissen auf (Burkadt 2000, Vaneechoutte et al. 1997). Studien zur Qualität von Amplifikationsmethoden konnten falsch-positive Daten in neun bis 57 Prozent der Fälle zeigen (Borst et al. 2004). Zusätzlich kommt mit Erhöhung der Sensitivität die Frage nach den Grenzen der klinischen Bedeutung einer geringen Anzahl eines Keimes auf. Zu diskutieren ist, ob bei kleinsten Mengen von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 der schützende Effekt in der Mundhöhle und somit die Forderung nach Nachweisbarkeit entfällt (Wolk et al. 2001).

IV.2.3 Quantitative PCR (real-time PCR)

Nach Beseitigung des Kontaminationsproblems ermöglichte uns die Methode der real-time PCR eine quantitative sowie sensitive und spezifische Aussage über den Kolonisationsversuch mit *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12.

Der Vorteil der quantitativen real-time PCR liegt zum einen im automatisierten Ablauf, der ein kontaminationsfreies, zeitsparendes sowie reproduzierbares Arbeiten ermöglicht und zum anderen in der direkten und absoluten Erfassung der K12-Zellen bzw. Salivaricin-A-Amplifikate (Mackay 2004).

Mit Hilfe der real-time PCR konnte am dritten Tag der Abstrichentnahme (Probe 4) eine Besiedlung mit *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 an allen untersuchten Lokalisationen der Mundhöhle des Probanden dargestellt werden. Besonders stark zeigte sich diese auf dem vorderen Anteil der Zunge (45.800 SalA-Amplifikate/ Abstrich) sowie in der stimulierten Speichelprobe (23.900 SalA-Amplifikate/ Probe).

Am achten Tag der Abstrichentnahme (Probe 6) detektierte die quantitative Nachweismethode den Stamm im Pharynx, auf den Bukkalflächen, im ventralen Bereich der Zunge sowie in den Speichelproben. Lediglich die Zunge dorsal zeigte einen negativen Befund. Die Anzahl der erfassten Salivaricin-A-Amplifikate hatte sich für den Pharynx rechts (32.900 SalA-Amplifikate/ Abstrich) und links (123.700 SalA-Amplifikate/ Abstrich), die rechte (3.100 SalA-Amplifikate/ Abstrich) und linke Wangenschleimhaut (12.800 SalA-Amplifikate/

Abstrich) sowie die Probe des konzentrierten Speichels (6.000 SalA-Amplifikate/ Probe) erhöht. Im vorderen Anteil der Zunge (7.800 SalA-Amplifikate/ Abstrich) und in der konzentrierten Speichelprobe (1.700 SalA-Amplifikate/ Probe) war eine geringere Kolonisation zu erfassen.

Am 14. Tag der Kolonisationsuntersuchung (Probe 8) konnten nur noch 300 SalA-Amplifikate/ Abstrich im Pharynx rechts, 100 SalA-Amplifikate/ Abstrich im linksseitigen Pharynx sowie ebenfalls 100 SalA-Amplifikate/ Abstrich auf der linken Wangenmukosa nachgewiesen werden.

Am 22. Tag (Probe 9) zeigte sich der Pharynx rechts (500 SalA-Amplifikate/ Abstrich) besiedelt. Eine erneute Besiedlung mit dem Stamm konnte für den hinteren (200 SalA-Amplifikate/ Abstrich) und vorderen (800 SalA-Amplifikate/ Abstrich) Bereich der Zunge sowie in der konzentrierten Speichelprobe (900 SalA-Amplifikate/ Probe) gezeigt werden.

Am 28. (Probe 10) sowie 43. (Probe 11) der Abstrichentnahme demonstrierte das quantitative Nachweisverfahren eine Besiedlung mit *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 von 100 SalA-Amplifikate/ Abstrich im Pharynx rechts. Die Nachweisgrenze des Stammes wurde hiermit erreicht. Im PCR-Ansatz war folglich nur noch eine K12-Zelle nachweisbar.

Somit ermöglicht uns die Methode der quantitativen real-time PCR einen sensitiven und spezifischen Nachweis des Stammes *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12. Allerdings ist hier erneut die Überlegung anzustellen, ob eine so geringe Anzahl von einzelnen K12-SalA-Amplifikaten pro Besiedlungsort von Relevanz für eine probiotische Wirkung bzw. noch valide ist (s. IV.2.2). Das Maß der Sensitivität ist aber bei einem Nachweis des Laborstammes in der Umwelt oder in einem als unwahrscheinlich zu vermutenden Infektionsprozess („Biologische Sicherheit“) von großer Bedeutung.

IV.3 Wirksamkeit des probiotischen Stammes *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 in Kolonisationsversuchen

Aufgrund der geringen Nachweisbarkeit mit Hilfe der quantitativen real-time PCR von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 ab dem 22. Tag der Abstrichentnahme – 20 Tage nach Einnahme der letzten BLIS-K12-Throat-Guard-Tablette – stellt sich wiederholt die Frage nach der Wirksamkeit der Kolonisation in Bezug auf die Forderungen an ein probiotisches Antipharyngitismittel (s. IV.2.2 und IV.2.3). So kann bei einer so niedrigen Zellzahl nicht mehr von einem inhibitorischen Effekt ausgegangen werden. Hier ist es sinnvoll, die

Wirksamkeit des wohl bekanntesten und am häufigsten untersuchten probiotischen Bakteriums - *Lactobacillus casei* - vergleichend zu betrachten.

L. casei wird in Form von Milch - und Joghurtprodukten dargereicht und entwickelt seine gesundheitsfördernde und protektive Wirkung im Magen-Darm-Trakt – vor allem in Magen und Zäkum. Das Bakterium schützt vor Salmonellenenteritis und stimuliert die Sekretion von Immunglobulin A bei mangelernährten Individuen (Perdignon et al. 1995).

Studien konnten zeigen, dass nach einmaliger Inokulation des Milchsäurebakteriums - bedingt durch das saure Milieu des Magens und die etablierte Flora in diesem Lebensraum - es zu keiner Ansiedlung oder Vermehrung kommt. Lediglich ein Überleben für den Zeitraum von fünf Tagen ist festzustellen. In dieser Zeit kommt es zur Synthese protektiver Proteine, die für den probiotischen Effekt sorgen (Oozeer et al. 2002).

Weitere Studien untersuchten den schützenden Effekt gegen *Salmonella thyphimurium*. Perdignon et al. testeten die probiotische Wirkung in Bezug auf die zeitliche Länge der Gabe von *L. casei*. Jeden Tag wurden $1,2 \times 10^9$ *L.-casei*-Zellen sowie nach zwei, fünf und sieben Tagen jeweils 10^6 Zellen von *S. thyphimurium* verabreicht. Der stärkste Erfolg konnte nach Einführen von *L. casei* über zwei Tage erzielt werden. Nach Gabe des Bakteriums über fünf Tage verschwand der schützende Effekt. Eine Erklärung dafür fanden die Autoren nicht. Sie gehen von einer Art Autoregulationsmechanismus aus. Nach sieben Tagen war ein erneuter schwächerer Schutz zu verzeichnen (Perdignon et al. 1995).

Überträgt man diese Ergebnisse auf unseren Kolonisationsversuch mit *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 dürfen die Differenzen zwischen dem K12-Stamm und *L. casei* vor allem in Bezug auf den unterschiedlichen Lebensraum nicht außer Acht gelassen werden. Das saure Milieu des Magens erschwert während der Passage die Lebensbedingungen für *L. casei* wesentlich. Allerdings ermöglicht uns der Vergleich der beiden probiotisch wirkenden Bakterien, Vermutungen über das Verhalten von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 zu äußern. Man kann wohl davon ausgehen, dass - ähnlich wie bei *L. casei* - eine wirkliche Etablierung des Keimes in der Mundhöhle über einen längeren Zeitraum bedingt durch die bestehende residente Mikroflora oder andere individuelle, inhibierende Faktoren nicht gegeben ist (Oozeer et al. 2002). Dies hätte folgende Konsequenzen für die Anwendung von BLIS-K12-Throat-Guard: Zum einen müsste die Zufuhr des Nahrungsergänzungsmittels in kürzeren Abständen wiederholt werden, um eine protektive Wirkung gegen *S. pyogenes* zu erzielen, zum anderen könnte über eine entsprechende Beeinflussung der persistierenden Mikroflora

der Mundhöhle nachgedacht werden, die eine dauerhafte Besiedlung mit *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 ermöglicht. In diesem Zusammenhang wäre eine vorausgehende Behandlung in Form einer selektiven Dekontamination zu diskutieren. Studien zu dieser Therapie sind bis dato nur im Rahmen der selektiven Darmdekontamination, die häufig zum Schutz immunsupprimierter Patienten vor endogenen Infektionen angewendet werden (Giuliano et al. 1989), veröffentlicht worden. Verabreicht wurden die 4-Chinolon-Derivate Norfloxacin oder Pefloxacin. Sowohl bei immunsupprimierten als auch gesunden Probanden wurde eine Beeinflussung der gramnegativen Mikroflora beobachtet. Das Wachstum grampositiver Bakterien wurde dagegen kaum inhibiert (Edlund et al. 1988, Giuliano et al. 1989, van Saene et al. 1988). Somit wäre diese Form der Medikation für die Elimination artverwandter Spezies von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 und folglich eine Beeinflussung seiner ökologischen Nische nicht gegeben. Gataullin et al. testeten 2004 die Kolonisation mit dem therapeutisch wirksamen Bakterium *Bacillus subtilis* 1719 und seine Auswirkungen auf die Intestinalflora. Für die selektive Darmdekontamination wurde Cifran verabreicht. Es konnte eine Besiedlung mit *B. subtilis* demonstriert werden (Gataullin et al. 2004). Obwohl eine selektive Dekontamination der Mundhöhle mit Sicherheit die Kolonisation für den Stamm K12 erleichtern würde, muss der Benefit einer Besiedlung durch K12 gegenüber den Risiken des Eingriffs in das intakte Ökosystem und die symbiotischen Beziehungen der Mikroflora der Mundhöhle abgewogen werden (Clasener et al. 1987, Marshall 1999).

IV.4 Sensitivität und Zuverlässigkeit von PCR-Methoden zum Nachweis von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 in Studien und Kolonisationsversuchen

Versucht man einen Laborstamm, von dessen positiven Eigenschaften man sich einen gesundheitsfördernden Effekt verspricht, der allerdings auch in immunsupprimierten Individuen negative Folgen haben könnte, in der humanen Mundhöhle zu etablieren, so muss im Vorhinein gewährleistet sein, dass dieser Stamm jederzeit detektierbar ist. Eine solche adäquate, leicht durchführbare und reproduzierbare Nachweismethode, die sowohl über eine hohe Sensitivität als auch Spezifität verfügt, haben wir vor unserem Kolonisationsversuch mit *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 versucht zu entwickeln. Mit Hilfe unserer gewonnen Daten aus der Sequenzierung des *salA*- und Teilen des *salB*-Strukturgens des Stammes *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 (im Vergleich zum Referenzstamm *S. salivarius* 20P3) entwickelten wir als Verfahren der Wahl drei stammspezifische PCR-Methoden: eine konventionelle einstufige PCR, eine zweistufige Nested-PCR sowie eine quantitative real-time PCR.

Unsere Daten zeigten, dass die stammspezifische einstufige PCR eine adäquate Detektionsform für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 während der aktiven Zuführung des Stammes in die Mundhöhle darstellt. Zu diesem Zeitpunkt konnte das Problem der Kontamination noch nicht festgestellt werden. Eine weitere Anwendung stellt die Untersuchung von Patienten auf eine bestehende Kolonisation mit dem Stamm dar. Wenn diese in ausreichender Quantität vorliegt, kann hier die stammspezifische einstufige PCR eingesetzt werden.

Um die Sensitivität zu steigern und eine mögliche Besiedlung der Mundhöhle nach dem zehnten Tag der Abstrichentnahme mit *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 zu erfassen, setzten wir eine stammspezifische Nested-PCR ein. Sie ermöglicht uns den Nachweis einer geringeren Zellzahl.

Studien zur Detektion von Translokationen bei Non-Hodgkin-Lymphomen vom B-Zell-Typ konnten zeigen, dass bei geringen Zellzahlen die zweistufige PCR eine wesentlich höhere Sensitivität bietet. Allerdings trat in dieser Studie ebenfalls das Problem der falsch-positiven Ergebnisse auf (Johnson et al. 1999). Weitere Studien zu anderen diagnostischen Fragestellungen konnten dies bestätigen (Jones et al. 2000, Carroll et al. 2000). So zeigte eine Untersuchung zur Infektion mit *Ehrlichia platys* bei Kaninchen, dass die Nested-PCR zehnmal sensitiver ist als die konventionelle PCR (Chang et al. 1996). Sulaiman et al. verglichen 1999 elf PCR-Protokolle zum Nachweis von *Cryptosporidium*-Parasiten. Die Untersuchung der Sensitivität von einstufigen und zweistufigen PCRs zeigte, dass sich mit Hilfe der Nested-PCRs tatsächlich noch eine einzelne Zelle erfassen lässt. Die sensitivste einphasige Nachweismethode konnte weniger als zehn Zellen nicht mehr detektieren.

Die Forderung nach der Detektion kleinster Mengen eines entsprechenden Keimes ist mit Sicherheit in der klinischen Diagnostik von schwerwiegenden Krankheitsbildern von Bedeutung. So ist es ebenso wichtig, über eine ähnlich sensitive Nachweismethode für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 zu verfügen, um ihn als Laborstamm entsprechend jederzeit darstellen und seinen Besiedlungshabitus beurteilen zu können. Die Nested-PCR bietet somit ein adäquates Nachweisverfahren mit ausreichender Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit zur Untersuchung von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12. Allerdings muss bei dieser zweistufigen PCR die Validität während der Laborabläufe durch Kontaminationsvermeidung gesichert werden, in dem der Arbeitsplatz, der mit einem Abzug ausgestattet sein muss, und die Instrumente regelmäßig gereinigt, alle Pipettenspitzen und Eppendorfgefäße autoklaviert werden, die Probenaufbereitung in einem separaten Raum stattfindet und Negativkontrollen eingesetzt werden. Eine weitere Möglichkeit zur Vermeidung falsch-positiver

Ergebnisse ist das Einsetzen des Uracil-DNA-Glykosylase(UNG)-Systems im Vorfeld der Amplifikation (Rys et al. 1993, Schwab et al. 2003, Tevere et al. 1996). Es findet eine Substitution von dTTP mit dUTP statt, welches von der UNG verdaut werden kann. Somit verweilt nur noch das uracil-negative Ursprungstemplate. Die Uracil-DNA-Glykosylase verhält sich hitzelabil ab 40°C und wird bei den von uns eingesetzten Annealing-Temperaturen von 48 bis 55°C im weiteren Verlauf der PCR inaktiviert. Kritisch anzumerken sei, dass diese in vielen Laboratorien etablierte Methode bis dato bezüglich der Auswirkung der Uracil-DNA-Glykosylase auf die Sensitivität der Amplifikation noch nicht untersucht wurde. Weiterhin müsste die eingesetzte Menge des Enzyms an das Maß der Verunreinigung angepasst werden. So zeigte Kleiboeker 2005, dass im Falle einer real-time PCR für die Degradation von 500 Kopien amplifizierter DNA die nach Herstellerangaben vorgeschlagene Menge von einer Unit UNG pro 50 Mikroliter Reaktionsvolumen verdoppelt werden muss. Der Autor gibt an, dass dieses Ergebnis auf andere PCR-Methoden übertragbar ist (Kleiboeker 2005). Zusätzlich sollte bedacht werden, dass die Inaktivierung der mit dUTP substituierten Amplifikate durch UNG von der Menge der Basenpaare Guanin und Cytosin, die von der Substitution mit dUTP ausgeschlossen sind, abhängt (Espy et al. 1993).

Als weitere Methode etablierten wir eine stammspezifische quantitative real-time PCR. Dieses sensitive und spezifische Nachweisverfahren ermöglicht im Vergleich zur Nested-PCR ein kontaminationssichereres Arbeiten und die direkte quantitative Bestimmung der Salivaricin-A-Amplifikate anhand von Standardkurven. Trotz stärkerer Vermeidung von „carry-over“, welche durch verschlossene PCR-Gefäße während der gesamten Analyse gesichert wird, bietet dieses Nachweisverfahren ebenfalls keinen absoluten Schutz vor falsch-positiven Ergebnissen, da Gefäße zur Probenentnahme für die Kontroll-Gelelektrophorese vereinzelt zu öffnen sind. Die hohe Sensitivität der quantitativen PCR erhöht ebenso wie für die Nested-PCR beschrieben ihre Kontaminationsanfälligkeit. Das Problem in der Aussonderung von falsch-positiven Resultaten besteht in der damit einhergehenden Verringerung der Sensitivität. Corless et al. stellten 2000 bei der Entwicklung eines Verfahrens zum universellen Nachweis des 16S-rRNA-Gens von Eubakterien dar, dass eine Bestrahlung mit ultraviolettem Licht zu einer 4-log-, eine Anwendung mit 8-Methoxypsoralen zu einer 5- bis 7-log- und eine Behandlung mit DNase zu einer 1,66-log-Reduktion der Sensitivität führt. Weiterhin wurde beanstandet, dass das Einsetzen von *Taq*-Polymerasen unterschiedlicher Anbieter zu differierenden Ergebnissen führt, was die Entwicklung eines standardisierten Verfahrens verhindert. Die Autoren fordern eine kritische Auseinandersetzung mit den Ergebnissen, die mit der quantitativen real-time PCR erzeugt werden (Corless et al. 2000).

Ähnlich kritisch setzten sich Skern et al. kürzlich mit der Methodik der quantitativen real-time PCR auseinander. Die Autoren untersuchten das Expressionslevel des LSTryp1-Gens von *Lepeophtheirus salmonis* unter und ohne Nahrungszufuhr. Angewendet wurden zwei Analysemethoden: Zum einen die ursprünglich für die Quantifizierung eingesetzte Formel „ $2^{-\Delta\Delta C_t}$ “, die auf der Annahme einer idealen Effizienz der Amplifikation mit einer Verdoppelung der Produktmenge pro Zyklus basiert, und zum anderen der „Data Analysis for real-time PCR“ von Excel (Microsoft) (DART-PCR), bei der eine automatisierte Kalkulation der Amplifikationsrate für jede Probe durchgeführt wird (Peirson et al. 2003). Die Transkription des Gens zeigte sich mit Hilfe der „ $2^{-\Delta\Delta C_t}$ “-Methode in Phasen des Hungers als verringert und nach Nahrungszufuhr als wieder ansteigend. Im Gegensatz dazu demonstrierte die Analyse anhand der DART-Methode eine verminderte Produktion des Gens während des Nahrungsausschlusses und unverändert gering unter erneuter Nahrungszufuhr. Weiterhin kritisierten die Autoren, dass der Schwellenzyklus vom Anwender bestimmt wird und somit nicht verlässlich und reproduzierbar ist (Skern et al. 2005). Seit kurzem sind Weiterentwicklungen der quantitativen real-time PCR auf dem Markt. So wurde speziell für epidemiologische Fragestellungen eine „quantitative nucleic acid sequence-based amplification“ (QT-NASBA) entwickelt (Schoone et al. 2000). Vorteil gegenüber der quantitativen real-time PCR ist der schnellere Ergebniserfolg zum Beispiel beim Nachweis von *Plasmodium falciparum* innerhalb von vier Stunden. Weiterhin wird eine geringere Menge des klinischen Isolates benötigt. Für unseren Kolonisationsversuch bietet die Methode der QT-NASBA keinen wesentlichen Vorteil, wäre aber in einer größer angelegten Studie zur Detektion von *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 einsetzbar (Schneider et al. 2005).

ZUSAMMENFASSUNG

S. pyogenes, der zu den β -hämolyisierenden Streptokokken der serologischen Lancefield-Gruppe A gehört, wirkt via Tröpfcheninfektion obligat humanpathogen und verursacht das Krankheitsbild der Tonsillopharyngitis. Mögliche schwerwiegende Folgeerkrankungen sind die Glomerulonephritis und das rheumatische Fieber. Besonders gefährdet sind Schulkinder im Alter von vier bis zwölf Jahren, unter denen je nach epidemiologischer Situation zehn bis 20 Prozent Keimträger sind. Aufgrund der hohen Variabilität seines Hauptimmunogens und Virulenzfaktors - dem M-Protein - konnte bis dato kein Impfschutz gegen *S.-pyogenes*-Infektionen bis zur Marktreife entwickelt werden.

S. salivarius gehört zur Gruppe der Viridansstreptokokken und ist ein natürlicher Besiedler der Mundhöhle. Er zählt zu den Produzenten von Bacteriocin-like-inhibitory-substances (BLIS). BLIS sind antibiotische Peptide, die ribosomal von grampositiven Bakterien synthetisiert werden und einen wachstumsregulierenden Effekt auf nahverwandte Bakterienarten haben. Dabei sind die Produzenten autoimmun. Über eine besonders ausgeprägte inhibitorische Wirkung gegenüber dem Pharyngitiserreger *S. pyogenes* verfügt der Stamm *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12, der Produzent des Lantibiotikums Salivaricin A2 ist.

Den inhibitorischen Effekt gegenüber *S. pyogenes* macht man sich seit Juni 2002 zu Nutzen. Unter dem Namen BLIS-K12-Throat-Guard ist *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 in Neuseeland erhältlich. Das Nahrungsergänzungsmittel enthält mehr als 100 Millionen lyophilisierter K12-Zellen pro Tablette und ermöglicht laut Herstellerangaben die Kolonisation in der Mundhöhle für einen Monat.

Um vom Benefit des Stammes K12 in Deutschland zu profitieren, bedarf es eines ausreichend sensitiven und spezifischen Nachweises für *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12; besonders da *S. salivarius* in wenigen Fällen bei immunsuppremierten Patienten zu opportunistischen Infektionen geführt hat. Weiterhin ist es von Bedeutung, Laborstämme jederzeit in den damit produzierten Nahrungsmitteln bzw. auch in der Umwelt hochspezifisch nachweisen zu können.

In der vorliegenden Studie wurde zunächst eine artspezifische PCR auf Basis des Dextranasegens zum Nachweis von *S. salivarius* entwickelt. Nach Optimieren der Parameter war für 72 Prozent der untersuchten *S.-salivarius*-Stämme ein reproduzierbarer Nachweis möglich. Weiterhin demonstrierten die untersuchten Stämme ein Bandenmuster, welches eine

weitere Differenzierung zulässt. Die ebenfalls untersuchten ITS- und Ligasegen-gerichteten PCRs zeigten kein spezifisches Ergebnis für die untersuchten *S.-salivarius*-Stämme. Inhibitorische Substanzen als Ursache der ausbleibenden Amplifikation wurden durch 16S-rDNA-Positivkontrollen ausgeschlossen.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Studie eine stammspezifische Nachweismethode für den Industriestamm *S. salivarius ssp. salivarius* K12 etabliert. Das Verfahren wurde nicht nur *in vitro* getestet, sondern auch *in vivo* mittels Untersuchung des Kolonisationsverhaltens durch BLIS-K12-Throat-Guard bei einem einzelnen Probanden. Basierend auf der Genbank-Salivaricin-A-Operonsequenz von *S. salivarius* 20P3 wurden zunächst konservierte Primer für die Amplifikation und Sequenzierung des *salA*-Strukturgens und Teile des *salB*-Strukturgens des Stammes *S. salivarius ssp. salivarius* K12 entwickelt. Mit Hilfe der gewonnenen Daten aus dieser Sequenzierung wurden dann drei K12-stammspezifische PCR-Methoden entwickelt: Eine konventionelle einstufige PCR, eine zweistufige Nested-PCR sowie eine quantitative real-time (RTQ-) PCR. Die Daten zeigen, dass die stammspezifische einstufige PCR eine adäquate Detektionsform für *S. salivarius ssp. salivarius* K12 während der aktiven Zuführung des Stammes in die Mundhöhle offeriert. Eine weitere Anwendung dieser PCR stellt die Untersuchung von Patienten auf eine bestehende Kolonisation mit dem Stamm dar. Wenn diese in ausreichender Quantität vorliegt, kann hier die stammspezifische einstufige PCR eingesetzt werden. Um die Sensitivität zu steigern und eine mögliche Besiedlung der Mundhöhle nach der aktiven Kolonisationsphase mit *S. salivarius ssp. salivarius* K12 zu erfassen, wurde die stammspezifische Nested-PCR eingesetzt. Sie ermöglicht den Nachweis einer geringeren Zellzahl und bietet somit ein adäquates Nachweisverfahren mit ausreichender Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit zur Untersuchung von *S. salivarius ssp. salivarius* K12. Allerdings muss bei dieser zweistufigen und sensitiven PCR die Validität durch maximale Kontaminationsprophylaxe während der Laborabläufe gesichert werden. Als weitere Methode wurde eine stammspezifische quantitative real-time (RTQ-) PCR etabliert. Dieses sensitive und spezifische Nachweisverfahren bewirkt im Vergleich zur Nested-PCR ein kontaminationssichereres Arbeiten und die direkte quantitative Bestimmung der Salivaricin-A-Amplifikate anhand von Standardkurven. Mit Hilfe der Nested-PCR sowie der quantitativen real-time PCR konnte eine Besiedlung der Mundhöhle des Probanden mit *S. salivarius ssp. salivarius* K12 im Pharynx, auf der Zunge sowie im Speichel bis zum 22. Untersuchungstag nachgewiesen werden, wobei die Zellzahlen am 22. Tag bereits sehr gering waren. Eine Substitution mit *S. salivarius ssp. salivarius* K12 sollte nach Analyse der

vorliegenden Ergebnisse spätestens nach drei Wochen wiederholt werden, um einen längerfristigen protektiven Schutz vor *S.-pyogenes*-Kolonisation und -Infektion zu erzielen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Angeletti S., Lorino G., Gherardi G., Battistoni F., De Cesaris M., Dicuonzo G. (2001): Routine molecular identification of *enterococci* by gene-specific PCR and 16S ribosomal DNA sequencing. J Clin Microbiol. 39(2), 794-7
2. Banerjee S., Hansen J.N.(1988): Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic. J. Biol. Chem. 263, 9508-14
3. Barry T., Colleran G., Glennon M., Dunican L.K., Gannon F. (1991); The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify *eubacteria*. PCR Methods Appl. 35, 367-72
4. Beighton D., Carr A.D., Oppenheim B.A. (1994): Identification of viridans *streptococci* associated with bacteraemia in neutropenic cancer patients. J Med Microbiol 40, 202-4
5. Benz R., Jung G., Sahl H.G. (1991): Mechanism of channel-formation by lantibiotics in black lipid membranes. In Nisin an Novel Lantibiotics. (Hrsg. Jung G., Sahl H.G.) Escom, Leiden, 359-72
6. Berrouschot J., Sterker M., Schneider D. (1997): *Streptococcus salivarius* meningitis: A case report and literature review. European Journal of Neurology 4, 90-3
7. Bessen D., Fischetti V.A. (1988): Influence of intranasal immunization with synthetic peptides corresponding to conserved epitopes of M Protein on mucosal colonization by group A *streptococci*. Infect Immun 56 (10), 2666-72
8. Bessen D., Fischetti V.A. (1988): Passive acquired mucosal immunity to group A *streptococci* by secretory immunoglobulin A. J Exp Med 167, 1945-50
9. Bierbaum G., Sahl H.G. (1993): Lantibiotics – unusually modified bacteriocin-like peptides from gram-positive bacteria. Zbl Bakt 278, 1-22

10. Bolotin A., Quinquis B., Renault P., Sorokin A., Ehrlich S.D., Kulakauskas S., Lapidus A., Goltsman E., Mazur M., Pusch G.D., Fonstein M., Overbeek R., Kyprides N., Purnelle B., Prozzi D., Ngui K., Masuy D., Hancy F., Burteau S., Boutry M., Delcour J., Goffeau A., Hols P. (2004): Complete sequence and comparative analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. Nat Biotech 22: 1554-8
11. Borst A., Box A.T., Fluit A.C. (2004): False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 23: 289-99
12. Bouhemad B., Dounas M., Mercier F.J., Benhamou D. (1998): Bacterial meningitis following combined spinal-epidural analgesia for labour. Anaesthesia 53, 290-5
13. Breukink E., Wiedemann I., van Kraaij C., Kuipers O.P., Sahl H.G., de Kruijff B. (1999): Use of the cell wall precursors lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. Science 286, 2361-4
14. Brook I. (1980): Bullous impetigo caused by *Streptococcus salivarius*: a case report. J Clin Pathol 33, 1099-101
15. Brötz G., Josten M., Wiedemann I., Schneider U., Götz F., Bierbaum G. et al. (1998): Role of lipid-bound peptidoglykan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. Molecular Microbiology 30, 317-27
16. Burkardt H.J. (2000): Standardization and quality control of PCR analyses. Clin Chem Lab Med 38, 87-91
17. Camporese A., Tizianel G., Santalena G. (1996): Epidemiology surveillance of *Streptococcus pyogenes* resistance to macrolides and lincosamides. Infez. Med. 4 (2), 74-8
18. Carley N.H. (1992): *Streptococcus salivarius* bacteremia and meningitis following upper gastrointestinal endoscopy and cauterisation for gastric bleeding. Clinical Infectious Diseases 14, 947-8

19. Carroll N.M., Jaeger E.E.M., Choudhury S., Dunlop A.A.S., Matheson M.M., Adamson P., Okhrave N., Lightman S. (2000): Detection of and discrimination between gram-positive and gram-negative bacteria in intraocular samples by using Nested-PCR. *J Clin Microbiol* 38, 1753-7
20. Chang W.-L., Pan M.-J. (1996): Specific amplification of *Ehrlichia platys* DNA from blood specimens by two-step PCR. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1342-6
21. Chen C.C., Teng L.J., Chang T.C. (2004): Identification of clinically relevant viridans group *streptococci* by sequence analysis of the 16S-23S ribosomal DNA spacer region. *J Clin Microbiol* 42, 2651-7
22. Chen C.C., Teng L.J., Kaiung S., Chang T.C. (2005): Identification of clinically relevant viridans *streptococci* by an oligonucleotide array. *J Clin Microbiol.* 43(4), 1515-21
23. Clasener H.A., Vollaard E.J., van Saene H.K. (1987): Long-term prophylaxis of infection by selective decontamination in leukopenia and in mechanical ventilation. *Rev Infect Dis* 9, 295-328
24. Corless C.E., Guiver M., Borrow R., Edwards-Jones V., Kaczmarek E.B., Fox A.J. (2000): Contamination and sensitivity issues with real-time universal 16S rRNA PCR. *J Clin Microbiol* 38(5), 1747-52
25. Conrads G., Claros M.C., Citron D.M., Tyrrell K.L., Merriam V., Goldstein E.J. (2002): 16S-23S rDNA internal transcribed spacer sequences for analysis of the phylogenetic relationships among species of the genus *Fusobacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 52(2), 493-99
26. Conrads G., Citron D.M., Tyrrell K.L., Horz H.-P., Goldstein E.J. (2005): 16S-13S rRNA gene transcribed spacer sequences for analysis of the phylogenetic relationships among species of the genus *Porphyromonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 607-13
27. Coykendall A.L. (1989): Classification and identification of the viridans *streptococci*. *Clin Microbiol Rev* 2(3), 315-28

28. Crawford I., Russel C. (1986): Comparativ adhesion of seven species of *streptococci* isolated from the blood of patients with sub-acute bacterial endocarditis to fibrin-platelet clots in vitro. *Journal of Applied Bacteriology* 60, 127-33
29. Dempster R.P., Tagg J.R. (1982): The production of bacteriocin-like substances by the oral bacterium *Streptococcus salivarius*. *Arch Oral Biol* 27, 151-57
30. Dierksen K.P., Tagg J.R. (2000): The influence of indigenous bacteriocin-producing *Streptococcus salivarius* on the acquisition of *Streptococcus pyogenes* by primary school children in Dunedin, New Zealand. *Proceedings of the XIV Lancefield International symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases*, 81-5
31. Donoghue H.D., Tyler J.E. (1975): Antagonisms amongst *streptococci* isolated from the human oral cavity. *Archs oral Biol* 20, 381-7
32. Driessen A.J.M., van den Hooven H.W., Kuiper W., Van de Kamp M., Sahl H.G., Konings R.N. et al. (1995): Mechanistic studies of the lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry* 34, 1606-14
33. Edlund C., Nord C.E. (1988): A review on the impact of 4-quinolones on the normal oropharyngeal and intestinal human microflora. *Infection* 16(1), 8-12
34. Espy M.J., Smith T.F., Persing D.H. (1993): Dependence of polymerase chain reaction product inactivation protocols on amplicon length and sequence composition. *J Clin Microbiol* 31, 2361-5
35. Facklam R. (2002): What happened to the *streptococci*: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* 15(4), 613-30
36. Fantinato V., Jorge A.O.C., Shimizu M.T. (1999): Production of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) by *Streptococcus salivarius* strains isolated from tongue and throat of children with and without sore throat. *Rev Microbiol* 30(4), 332-4
37. Frandsen E.V.G., Pedrazzoli V., Kilian M. (1991) Ecology of viridans *streptococci* in the oral cavity and pharynx. *Oral Microbiol Immunol* 6, 129-33

38. Fredenhagen A., Fendrich G., Marki F., Marki W., Gruner J., Raschdorf F., Peter H.H. (1990): Duramycin B and C, two new lanthionine containing antibiotics as inhibitors of phospholipase A₂. Structural revision of duramycin and cinnamycin. J Antibiot (Tokyo) 43(11), 1403-12
39. Garnier F., Gerbaud G., Courvalin P., Galimand M. (1997): Identification of clinically relevant viridans group *streptococci* to the species level by PCR. J Clin Microbiol 35, 2337-41
40. Gataullin A.G., Mikhailova N.A., Blinkova L.P., Romanenko E.E., Elkina S.I., Gaiderov A.A., Kalina N.G. (2004): Properties of the isolated *Bacillus subtilis* strains and their influence on the intestinal microflora of experimental mice. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 2, 91-4
41. Gentry L.O., Lipsky B., Farber M.O., Tucker B., Rodriguez-Gomez G. (1992): Oral ofloxacin therapy for lower respiratory tract infection. Southern Medical Journal 85, 14-8
42. Giuliano M., Pantosti A., Gentile G., Venditti M., Arcese W., Martino P. (1989): Effects on oral and intestinal microfloras of Norfloxacin and Pefloxacin for selective decontamination in bone marrow transplant patients. Antimicrob Agents Chemother 33, 1709-13
43. Hahn H., Miksits K., Gattermann S. (2001): Streptokokken. In: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. (Hrsg.: Hahn H., Falke D., Kaufmann S.H.E., Ullmann U.) Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 212-220
44. Hardie J.M. (1986): Oral *streptococci*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Hrsg.: Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.) Williams & Wilkins, Baltimore, Volume 2, Section 12, 1054-63
45. Heidemann D.G., Dunn S.P., Haimann M. (1989): *Streptococcus salivarius* endophthalmitis from contaminated donor cornea after keratoplasty. American Journal of Ophthalmology 107, 429-30

46. Horaud T., Delbos F. (1984): Viridans *streptococci* in infective endocarditis: species distribution and susceptibility to antibiotics. *European Heart Journal* 5 Suppl C, 39-44
47. Houben B. (2006): *In-vitro*-Studie über die Wirksamkeit der Bacteriocine von *Streptococcus salivarius* zur Inhibition von *Streptococcus pyogenes*..
48. Hsu S.T., Breukink E., Bierbaum G., Sahl H.G., de Knuijff R., van Nuland N.A., Bonvin A.M. (2003): NMR study of mersacidin and lipid II interaction indodecylphosphocholine micelles. Conformational changes are a key to antimicrobial activity. *J. Bio. Chem.* 278(15), 13110-7
49. Hurst A. (1966): Biosynthesis of the antibiotic nisin by whole *Streptococcus lacys* organisms. *J. Gen. Microbiol.* 44, 209-220
50. Idogoras P., Valiente A., Iglesias L. (2001): Meningitis due to *Streptococcus salivarius*. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 3017
51. Igarashi T., Yano Y., Yamamoto A., Sasa R., Goto N. (2001): Identification of *Streptococcus salivarius* by PCR and DNA probe. *Letters in Applied Microbiology* 32, 394-7
52. Jack R.W., Tagg J.R., Bibek R. (1995): Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59 (2), 171-200
53. Ji Y., McLandsborough L., Kondagunta A., Cleary P. (1996): C5a Peptidase alters clearance and trafficking of group A *streptococci* by infected mice. *Infect Immun* 64(2), 503-10
54. Jones C.D., Okhravi N., Adamson P., Tasker S., Lightman S. (2000): Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA Genes of *T. gondii* in aqueous humor. *IOVS* 41(3), 634-44
55. Johnson P.W.M., Swinbank K., MacLennan S., Colomer D., Debuire B., Diss T., Gabert J., Gupta R.K., Haynes A., Kneba M., Lee M.S., Macintyre E., Mensink E., Moos M., Morgan G.J., Neri A., Johnson A., Reato G., Salles G, van 't Veer M.B.,

- Zehnder J.L., Zucca E., Selby P.J., Cotter F.E. (1999): Variability of polymerase chain reaction detection of the bcl-2-IgH translocation in an international multicentre study. *Annals of Oncology* 10, 1349-54
56. Jung G. (1991): Lantibiotics – ribosomally synthesized biologically active polypeptides containing sulfide bridges and α , β -didehydroaminoacids. *Angew Chem Int Ed Engl* 30, 1051-68
57. Kaiser E., Suppini A., de Jaureguiberry J.P., Paris J.F., Quinot J.F. (1997): Acute *Streptococcus salivarius* meningitis following spinal anesthesia. *Ann Fr Anesth Réanim* 16, 47-9
58. Kaplan E.L. (1991): The resurgence of group A streptococcal infections and their sequelae. *Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis.* 10, 55-7
59. Kawamura Y., Whiley R.A., Shu S.E., Ezaki T., Hardie J.M. (1999): Genetic approaches to the identification of the mitis group within the genus *Streptococcus*. *Microbiology*. 145 (Pt 9), 2605-13
60. Kleiboeker S.B. (2005): Quantative assessment of the effect of uracil-DNA glycosylase on amplicon DNA degradation and RNA amplification in reverse transcription-PCR. *Virology Journal* 2, 29
61. Könönen H., Jousimies-Somer H., Bryk A., Kilpi T., Kilian M. (2002): Establishment of *streptococci* in the upper respiratory tract: longitudinal changes in the mouth and nasopharynx up to 2 years of age. *Jornal of Medical Microbiology*. 51, 723-30
62. Kordel M., Sahl H.G. (1986): Susceptibiliity of bacterial, eukaryotic, and artificial membranes to the disruptive action of the cationic peptides Pep5 an nisin. *FEMS Microbiology Letters* 34, 139-44
63. Krawiec S., Riley M. (1990): Organization of the bacterial chromosome. *Mircrobiol Rev* 54, 502-39

64. Kuwahara T., Norimatsu I., Nakayuma H., Akimoto S., Kataoka K., Arimochi H., Ohnishi Y. (2001): Genetic variation in 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions and the possible use of this genetic variation for molecular diagnosis of *Bacteroides* species. *Microbiol Immunol* 45(3), 191-9
65. Lamfrom H., Sarabhai A., Aberson J. (1978): Cloning *Beneckes* genes in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol* 28, 561-7
66. Laurila J.J., Kostamovaara P.A., Alahuhta S. (1998): *Streptococcus salivarius* meningitis after spinal anesthesia. *Anesthesiology* 89, 1579-80
67. Lee T.H., Hsueh P.R., Yeh W.C., Wang H.P., Wang T.H., Lin J.T. (2000): Low frequency of bacteremia after endoscopic mucosal resection. *Gastrointestinal Endoscopy* 52, 223-5
68. Legier J.F. (1991): *Streptococcus salivarius* meningitis and colonic carcinoma. *Southern Medical Journal* 84, 1058-9
69. Mackay I.M. (2004): Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 10, 190-212
70. Marda H., Shinoda G., Kuroki S., Tsutsui T., Kubota M., Haruta T. (2002): *Streptococcus salivarius* meningitis after oral trauma by a skewer: a case report. *Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases* 76, 72-5
71. Marshall J.C. (1999): Gastrointestinal flora and its alterations in critical illness. *Curr Opin Clin Metab Care* 2, 405-11
72. Megarbane B., Casetta A., Esvant H., Marchal P., Axler O., Brivet F.G. (2000): *Streptococcus salivarius* acute meningitis with latent petromastoiditis. *Scand J Infect Dis* 32, 322-3
73. Mendoza M., Meugnier H., Bes M., Etienne J., Freney J. (1998): Identification of *Staphylococcus* species by 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. *Int J Syst Bacteriol* 48, 1049-55

74. Mora D., Ricci G., Guglielmetti S., Daffonchio D., Fortina M.G. (2003): 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequence variation in *Streptococcus thermophilus* and related dairy streptococci and development of a multiplex ITS-SSCP analysis for their identification. *Microbiology* 149, 807-13
75. Newton J.A.Jr., Lesnik I.K., Kennedy C.A. (1994): *Streptococcus salivarius* meningitis following spinal anesthesia. *Clinical Infectious Disease* 18, 840-1
76. Oozeer R., Goupil-Feuillerat N., Alpert C.A., van de Guchte M., Anba J., Mengaud J., Corthier G. (2002): *Lactobacillus casei* is able to survive and initiate protein synthesis during transit in the digestive tract of human flora-associated mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3570-4
77. Paster B.J., Falkler Jr. W.A., Enwonwu C.O., Idgbe E.O., Savage K.O., Levanos V.A., Tamer M.A., Ericson R.L., Lau C.N., Dewhirst F.E. (2002): Prevalent bacterial species and novel phylotypes in advanced noma lesions. *J Clin Microbiol* 40, 2187-91
78. Peirson S.N., Butler J.N., Foster R.G. (2003): Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res* 31(14), 73
79. Perdignon G., Alvarez S., Rachid M., Agüero G., Gobbato N. (1995): Probiotic bacteria for humans: Clinical for evaluation of effectiveness. *J Dair Sci* 78, 1597-1606
80. Peukert W. (1985): Microbiology of streptococcal infections. *Klin. Padiatr.* 197(1), 5-8
81. Podbielski A., Lütticken R. (2001): Die Familie der *Streptococcae*. In: *Medizinische Mikrobiologie*. (Hrsg.: Köhler W., Eggers H.J., Fleischer B., Marre R., Pfister H., Pulverer G.) Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 261-3
82. Poyart C., Quesne G., Coulon S., Berche P., Trieu-Cuot P. (1998): Identification of *streptococci* to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxid dismutase. *J Clin Microbiol* 36(1), 41-7

83. Pschyrembel (1998): Klinisches Wörterbuch. De Gruyter Verlag, Berlin, 258., 503, 583
84. Rajasuo A., Jousimies-Somer H., Savolainen S., Leppänen J. (1996): Bacteriologic findings in tonsillitis and pericoronitis. *Clinical Infectious Diseases* 23, 51-60
85. Romero-Gomez M., Larraona J.L. (1999): Pancreatic abscess due to *Streptococcus salivarius* after dental manipulation. *American Journal of Gastroenterology* 94, 1987-8
86. Ross K.F., Ronson C.W., Tagg J.R. (1993): Isolation and characterization of the lantibiotic salivaricin A and structural gene *salA* from *Streptococcus salivarius* 20P3. *Appl Environ Microbiol* 59(7), 2014-21
87. Rys P.N., Persing D.H. (1993): Preventing false-positives: Quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. *J Clin Microbiol* 31(9), 2356-60
88. Sanders C.C., Nelson G.E., Sanders W.E.Jr. (1977): Bacterial interference IV. Epidemiological determinants of the antagonistic activity of the normal throat flora against group A *streptococci*. *Infect Immun* 16, 599-603
89. Schneider P., Wolters L., Schoone G., Schallig H., Sillekens P., Hermsen R., Sauerwein R. (2005): Real-time nucleic acid sequence based amplification is more convenient than real-time PCR for quantification of *Plasmodium falciparum*. *J Clin Microbiol* 43(1), 402-5
90. Schoone G.J., Oskam L., Kroon C.M., Schallig H.D.F.H., Omar S.A. (2000): Detection and quantification of *Plasmodium falciparum* in blood samples using quantitative nucleic acid sequence-based amplification. *J Clin Microbiol* 38, 4072-5
91. Schwab K.J., McDevitt J.J. (2003): Development of a PCR-enzyme immunoassay oligoprobe detection method for *Taxoplasma gondii* oocysts, incorporating PCR controls. *Appl Environ Microbiol* 69, 5819-25

92. Skern R., Frost P., Nilsen F. (2005): Relative transcript quantification by quantative PCR: roughly right or precisely wrong? BMC Molecular Biology 6, 10
93. Sturme M.H., Kleerebezem M., Nakayama J., Akkermans A.D., Vaughn E.E., de Vos W.M. (2002): Cell to cell communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria. Anatomie Van Leuwenhoek 81(1-4), 233-43
94. Sulaiman I.M., Xiao L., Lal A.A. (1999): Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. Appl Environm Microbiol 65, 4431-5
95. Svane S. (2000): Acute phlegmonous jejunitis and viridans streptococcal peritonitis associated with bronchial carcinoma. Scand J Infect 32, 421-2
96. Tagg J.R. (1992): Bacteriocins of gram-positive bacteria: an opinion regarding their nature, nomenclature and numbers. In: Bacteriocins, microcins and lantibiotics. (Hrsg.: Lazdunski R.J.C., Pattus F.) Springer-Verlag, Heidelberg, 33-6
97. Tagg J.R., Pybus V., Phillips L.V., Fiddes T.M. (1983): Application of inhibitor typing in a study of the transmission and retention in the human mouth of the bacterium *Streptococcus salivarius*. Arch Oral Biol 28, 911-15
98. Tagg J.R. (2004): Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-*Streptococcus pyogenes* bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. Indian J Med Res 119, 13-6
99. Talay S.R., Zock A., Rohde M., Molinari G., Oggioni M., Pozzi G., Guzmán C.A., Chatwal G.S. (2000): Co-operative binding of human fibronectin to SfbI protein triggers streptococcal invasion into respiratory epithelial cells. Cel Microbiol 2(6), 521-535
100. Tevere V.J., Hewitt P.L., Dare A., Hocknell P., Keen A., Spadaro J.P., Young K.K.Y. (1996): Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR amplification with pan-*mycobacterium* primers and hybridization to an *M. tuberculosis*-specific probe. J Clin Microbiol 34(4), 918-23

101. Trautmann M., Lepper P.M., Schmitz F.J. (2002): Three cases of bacterial meningitis after spinal and epidural anesthesia. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 21, 43-5
102. Uemori T., Asada K., Kato I., Harasawa R. (1992): Amplification of the 16S-23S spacer region in rRNA operons of mycoplasmas by the polymerase chain reaction. *Syst Appl Microbiol* 15, 181-6
103. Upton M., Tagg J.R., Wescombe P., Jenkinson H.F. (2001): Intra- and interspecies signalling between *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus pyogenes* mediated by SalA and SalA1 lantibiotic peptides. *J Bacteriol* 183(13), 3931-8
104. van Saene H.K., Lemmens S.E., van Saene J.J. (1988): Gut decontamination by oral ofloxacin and ciprofloxacin in healthy volunteers. *J Antimicrob Chemother* 22, 127-34.
105. Vaneechoutte M., Van Eldere J. (1997): The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. *J Med Microbiol* 46, 188-94
106. Veringa E., van Belkum A., Schellekens H. (1995): Iatrogenic meningitis by *Streptococcus salivarius* following lumbar puncture. *Journal of Hospital Infection* 29, 316-8
107. Watanakunakorn C. (1992): *Streptococcus salivarius* meningitis following myelography. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 13, 454
108. Watanakunakorn C., Pantelakis J. (1993): Alpha-hemolytic streptococcal bacteremia: a review of 203 episodes during 1980-1991. *Scand J Infect Dis* 25, 403-8
109. West P.W.J., Al-Sawan R., Foster H.A., Electricwala Q., Alex A., Panigrahi D. (1998): Speciation of presumptive viridans streptococci from early onset neonatal sepsis. *J Med Microbiol* 47, 923-8
110. Wolk D., Mitchel S., Patel R. (2001): Principles of molecular microbiology testing methods. *Infect Dis Clin North Am* 15, 1157-204

111. Yamazaki K., Suzuki M., Kawai Y., Inoue N., Montville T.J. (2005): Purification and characterization of a novel class II bacteriocin, piscicocin CS526, from surimi-associated *Carnobacterium piscicola*. *Appl Environm Microbiol* 71: 554-7
112. Yaniv L.G., Potasman I. (2000): Iatrogenic meningitis: An increasing role for resistant viridans *streptococci*? Case report and review of the last 20 years. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 32, 693-6

DANKSAGUNG

Insbesondere möchte ich meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. Georg Conrads, Leiter des Lehr- und Forschungsgebietes Orale Mikrobiologie und Immunologie der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, für die Vergabe der Doktorarbeit, seine umfassende Betreuung, Unterstützung und Hilfsbereitschaft sowie für die Klärung aller Fragen und seine konstruktive Kritik danken.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Friedrich Lampert, Prodekan und Direktor der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, danke ich für das Interesse an meiner Arbeit, die Übernahme des Korreferates und die Möglichkeit der Gewinnung von klinischem Material.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Rudolf Lütticken, Dekan und Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, danke ich für die Herstellung des Kontaktes zu Herrn Prof. Dr. John R. Tagg und seine wissenschaftliche Unterstützung.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. John R. Tagg, Department of Microbiology, University of Otago, Dunedin, New Zealand, für das Bereitstellen des Stammes *S. salivarius* ssp. *salivarius* K12 sowie die wissenschaftliche Unterstützung in Verbindung mit dieser Doktorarbeit danken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank den weiteren Mitarbeitern des Lehr- und Forschungsgebietes Orale Mikrobiologie und Immunologie der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, besonders Herrn Dr. Hans-Peter Horz, sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen.

Ganz besonders danken möchte ich Frau Ilse Seyfarth für die große Hilfsbereitschaft, die zahlreichen Auskünfte und die Geduld beim Erlernen der erforderlichen Labortechniken sowie für Ihr stets offenes Ohr und Ihre Anteilnahme.

Dank gilt auch meinen Mitdoktoranden, besonders Frau Beate Houben, die für eine kollegiale Zusammenarbeit mit viel Unterstützung und ein sehr angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben.

LEBENS LAUF

Name	Anica Meinelt
Anschrift	Zweigertstr. 19 45130 Essen
Telefon	0201 4748833 0176 20173830
Email	anicameinelt@web.de
Geburtsdatum	18.03.1980
Geburtsort	Ratingen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
	Schulbildung
08/1986-07/1990	Suitbertusgrundschule in Ratingen
08/1990-05/1999	Theodor-Heuss-Gymnasium in Ratingen; Abschluss: Abitur
08/1996-01/1997	Schüleraustausch an die Burris-Laboratory-School in Muncie, USA
	Studium und Promotion
10/1999-12/2004	Studium der Zahnheilkunde an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen; Abschluss: Staatsexamen
02/2003-07/2006	Promotion im Lehr- und Forschungsgebiet Orale Mikrobiologie und Immunologie • Doktorvater: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Georg Conrads • Thema der Arbeit: Molekulare Methoden zum Nachweis des oral-probiotischen Stammes <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> K12 und Anwendung <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>
	Beruflicher Werdegang
Seit 09/2005	Tätigkeit als Weiterbildungsassistentin der Kieferorthopädie in der Praxis Dres. Schumann/ Mohr in Essen

Essen, 26. Juli 2006