

---

**Analyse der Transmission und  
des zoonotischen Potentials von  
*Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus***

---

Dissertation zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

**Fakultät für Chemie  
Universität Bielefeld**

vorgelegt von  
**Jessika Dumke**  
aus Wismar

---

**Bad Oeynhausen/Bielefeld**

**Dezember 2015**

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von  
Herrn Prof. Dr. med. Knabbe  
am Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin,  
Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen,  
Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum  
in Bad Oeynhausen  
in der Zeit von Januar 2012 bis Dezember 2015.

1. Gutachten: Prof. Dr. med. Cornelius Knabbe
2. Gutachten: Prof. Dr. rer. nat. Hartmut Niemann



## Danksagung

Eine Dissertation ist nie das Werk einer einzelnen Person, deshalb möchte ich mich für die Unterstützung bei allen Personen bedanken und einige namentlich erwähnen.

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Cornelius Knabbe für das interessante und vielseitige Thema, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie das Interesse am Fortgang dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hartmut Niemann (Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie) möchte ich für die Bereitschaft danken, diese Dissertation als Zweitgutachter zu betreuen und zu beurteilen.

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jens Dreier für die Betreuung, die Geduld, fachliche Kompetenz und fortwährende konstruktive Diskussionsbereitschaft während der gesamten Doktorarbeit, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinem Kooperationspartner Herr Dr. rer. nat. Jochen Schulz (Institut für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) danke ich für die Bereitstellung der Rezeptur des Selektivmediums, die zahlreichen tierischen Isolate und für die fachliche Unterstützung der systematischen Beprobung von Tieren.

An dieser Stelle möchte ich meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen Christina Brandenburger, Dr. Mareike Dabisch-Ruthe, Birgit Drawe, Dr. Isabel Faust, Imke Grimm, Dr. Doris Hendig, Dr. Dennis Hinse, Bettina Ibold, Bärbel Kammel, Christoph Lichtenberg, Dr. Patricia Kuzaj, Dr. Frank Thies, PD Dr. Tanja Vollmer, Dr. Jan Weile und Dr. Melanie Weinstock für die stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und die schöne Arbeitsatmosphäre danken. Eure vielseitige Unterstützung, vor allem in der letzten Phase dieser Arbeit, ist nicht selbstverständlich, wofür ich euch herzlich danke. Meinen Studentinnen Sandra Bufe, Franziska Wandrer, Marina Brusdeilins und Jaqueline Rose danke ich für den Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich bei meinen Kolleginnen des PCR-Labors und allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin danken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die immer an mich geglaubt haben und ohne deren Rückhalt und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Sebastian, dir gilt ein besonderer Dank für deine fortwährende Unterstützung, Geduld, dein Verständnis und dein Interesse an meiner Arbeit.

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 <i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i></b> .....	<b>3</b>
<b>2.2 <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> als Pathogen</b> .....	<b>5</b>
2.2.1 Infektiöse Endokarditis .....	5
2.2.2 Kolonkarzinome .....	6
2.2.3 Die Rolle von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> in der Pathogenese .....	7
2.2.3.1 <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> im Zusammenhang mit kolorektalen Karzinomen .....	8
2.2.3.2 <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> in der Blutzirkulation .....	9
2.2.3.3 Etablierung einer infektiösen Endokarditis durch <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> .....	11
<b>2.3 Zoonose</b> .....	<b>13</b>
2.3.1 Zoonotische Streptokokken.....	14
2.3.1.1 <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> als potentielles zoonotisches Pathogen.....	15
2.3.2 Mögliche Transmissionswege von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> .....	16
2.3.2.1 Identifizierung epidemiologischer Strukturen in Bakterienpopulationen.....	17
2.3.2.1.1 Charakterisierung der Epidemiologie von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> .....	17
2.3.2.1.2 Epidemiologische Studien.....	18
<b>2.4 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>20</b>
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1 Optimierung des molekularbiologischen und kulturbasierten     Nachweises von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> im Fäzes</b> .....	<b>21</b>
3.1.1 Optimierung der <i>Real-Time</i> PCR zum Nachweis von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> in Stuhl .....	22
3.1.1.1 Bestimmung der unteren Nachweisgrenze der quantitativen <i>Real-</i> <i>Time</i> PCR.....	23
3.1.1.2 Beeinflussung der Spezifität der <i>Real-Time</i> PCR.....	25

3.1.2	Selektion von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> aus Fäzes .....	26
<b>3.2</b>	<b>Molekulargenetische Charakterisierung von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>-Isolaten .....</b>	<b>28</b>
3.2.1	MLST zur Typisierung <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> .....	29
<b>3.3</b>	<b>Fall-Kontrollstudie .....</b>	<b>32</b>
3.3.1	Probandencharakteristika .....	33
3.3.2	Prävalenz von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> im humanen Stuhl .....	34
3.3.2.1	<i>Follow-up</i> Studie .....	37
3.3.2.2	Vergleich der verschiedenen <i>Real-Time</i> PCR Methoden zur Detektion von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> in humanen Stuhlproben .....	38
3.3.2.3	-Auswertung der Fragebögen der Fall-Kontrollstudie .....	40
3.3.3	Analyse der Epidemiologie von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> mittels MLST-Analyse .....	48
3.3.3.1	Potentielle Transmissionswege von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> ..	54
<b>3.4</b>	<b>Phänotypische Charakterisierung von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> .....</b>	<b>62</b>
3.4.1	Überleben von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> bei Trockenstress .....	63
3.4.2	Überleben von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> im Stuhl .....	67
3.4.3	Vitalität von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> im Trinkwasser .....	68
3.4.3.1	Vergleich der Vitalitäten von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> auf der Oberfläche und in biologischen Milieus .....	71
3.4.4	Vitalität von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> in Milch .....	71
3.4.4.1	Stabilität von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> in Milch .....	72
3.4.4.2	Simulation der Pasteurisierung von Milch .....	74
3.4.5	Stabilität von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> bei verschiedenen pH-Werten .....	76
3.4.6	Adhäsion von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> an immobilisierte Kollagene .....	77
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>81</b>
<b>4.1</b>	<b>Detektion und Isolation von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> im Fäzes .....</b>	<b>81</b>

---

<b>4.2</b>	<b>Transmission von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i></b>	<b>87</b>
4.2.1	Potentielle Risikofaktoren der Kolonisation und Transmission	88
4.2.2	Epidemiologie von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	93
4.2.2.1	Molekulargenetische Charakterisierung der Populationsstruktur	94
4.2.2.2	Potentielle Transmissionswege von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	97
<b>4.3</b>	<b>Biofitness von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i></b>	<b>102</b>
4.3.1	Analyse der Korrelation zwischen dem Sequenz- und dem Phänotyp	103
4.3.2	Experimentell erfasste potentielle Transmission	106
4.3.2.1	Überleben von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> in der Umgebung	107
4.3.2.2	Putative Übertragung von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> durch Nahrungsmittel	109
4.3.2.3	Kolonisation und Infektion	110
4.3.2.4	Fazit für die Tenazität von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	111
<b>4.4</b>	<b>Ausblick</b>	<b>112</b>
<b>5</b>	<b>Methoden</b>	<b>114</b>
<b>5.1</b>	<b>Mikrobiologische Methoden</b>	<b>114</b>
5.1.1	Anzucht und Kultivierung von Bakterien	114
5.1.2	Selektion von <i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> aus Stuhl- und Umweltproben auf Tannin-Natriumazid-Agar	114
5.1.3	Kryokonservierung	114
5.1.4	Messung der Adhäsion über immobilisierte Kollagene	115
5.1.5	Titerbestimmung	115
5.1.6	Untersuchung der Tenazität von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	116
5.1.6.1	Überleben bei Trockenstress	116
5.1.6.2	Vitalität in Milch	116
5.1.6.3	Vitalität von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> beim Pasteurisieren von Milch	116
5.1.6.4	Vitalität in Trinkwasser	117
5.1.6.5	pH-Stabilität von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	117
5.1.6.6	Wiederfindung von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> im Fäzes	117

---

5.1.6.7 Überleben von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> im Stuhl .....	118
<b>5.2 Molekulargenetische Methoden.....</b>	<b>118</b>
5.2.1 Nukleinsäureextraktion aus Reinkulturen .....	118
5.2.2 Nukleinsäureextraktion mit dem <i>UltraClean Microbial DNA Isolation Kit</i> ..	119
5.2.3 DNA-Extraktion aus humanem Fäzes .....	120
5.2.4 DNA-Extraktion aus humanem und animaleem Fäzes und Umweltproben	120
5.2.5 Quantifizierung der DNA-Konzentration .....	121
5.2.6 Polymerase-Ketten-Reaktion im Block- <i>Thermocycler</i> .....	121
5.2.7 <i>Real-Time</i> PCR.....	122
5.2.8 Genomisches <i>Fingerprinting</i> (ERIC-PCR) .....	124
5.2.9 Agarosegelelektrophorese .....	125
5.2.10 Kapillargelelektrophorese zur Analyse der ERIC-PCR-Amplifikate.....	126
<b>5.3 DNA-Sequenzierung.....</b>	<b>126</b>
5.3.1 Aufreinigung der PCR-Amplifikate für die Sequenzierung .....	127
5.3.1.1 Enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte .....	127
5.3.1.2 <i>MSB-Spin PCRapace Kit</i> .....	127
5.3.2 Sequenzierreaktion mit dem <i>BigDye Terminator Kit</i> .....	128
5.3.3 Aufreinigung der Sequenzierprodukte mittels Sephadex-G50-Gelfiltration	128
5.3.4 Kapillargelelektrophorese zur Analyse der DNA-Sequenzierprodukte .....	129
<b>5.4 Identifizierung von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> mittels MALDI- TOF-MS.....</b>	<b>129</b>
5.4.1 Probenvorbereitung und -analyse .....	130
<b>5.5 Fall-Kontrollstudie.....</b>	<b>130</b>
5.5.1 Probanden .....	130
5.5.2 Einschlusskriterien .....	131
5.5.3 Maßnahmen.....	131
5.5.4 Statistische Auswertung.....	132
<b>5.6 Programme zum Auswerten der Klassifizierung mittels MLST .....</b>	<b>133</b>
<b>6 Material.....</b>	<b>134</b>

---

<b>6.1</b>	<b>Bakterienstämme.....</b>	<b>134</b>
<b>6.2</b>	<b>Enzyme.....</b>	<b>140</b>
<b>6.3</b>	<b>Chemikalien und Reagenzien .....</b>	<b>140</b>
<b>6.4</b>	<b>Puffer und Lösungen.....</b>	<b>141</b>
<b>6.5</b>	<b>Nährmedien.....</b>	<b>142</b>
<b>6.6</b>	<b>Testkits.....</b>	<b>142</b>
<b>6.7</b>	<b>Oligonukleotide .....</b>	<b>142</b>
<b>6.8</b>	<b>DNA-Größenmarker .....</b>	<b>144</b>
<b>6.9</b>	<b>Software .....</b>	<b>145</b>
<b>6.10</b>	<b>Geräte.....</b>	<b>145</b>
<b>6.11</b>	<b>Sonstige Materialien.....</b>	<b>147</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>148</b>
<b>8</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>150</b>
<b>9</b>	<b>Publikationen und Kongressbeiträge.....</b>	<b>163</b>
<b>10</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>165</b>
<b>11</b>	<b>Erklärung.....</b>	<b>180</b>

# 1 Zusammenfassung

*Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ist ein Kommensale des Gastrointestinaltraktes (GIT) von Mensch und Tier, der auch fakultativ pathogen sein kann. Das Bakterium kann als Erreger der Endokarditis, Meningitis und Sepsis im animalen und humanen Wirt identifiziert werden. Beispielsweise wurden in 20 % der humanen Streptokokken-bedingten Endokarditis *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* als auslösendes Pathogen identifiziert. Obwohl die Infektionszahl zunimmt, sind die Transmissionswege und das zoonotische Potential bislang weitgehend ungeklärt.

In dieser Arbeit wurde eine epidemiologische Fall-Kontrollstudie durchgeführt, mit der die Prävalenz von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im humanen GIT ermittelt wurde. Molekulargenetisch konnten 75 % der getesteten Stuhlproben gesunder Probanden (n = 96) als *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-positiv identifiziert werden. In der Studie konnte bei Probanden unter 50 Jahren das fakultative Pathogen signifikant häufiger detektiert werden, wenn der Wohnsitz nicht in der Stadt war (*Odds Ratio* 0,12;  $p = 0,025$ ). Des Weiteren gab es Hinweise, dass eine Amphixenose durch den Konsum von rohem Fleisch begünstigt werden könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch die Etablierung eines Selektivmediums zahlreiche *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate aus humanem und animaleem Fäzes und aus der Umwelt gewonnen und das Stammkollektiv damit erweitert. Dessen bakterielle Populationsstruktur konnte anhand des in dieser Arbeit komplettierten subspezies-spezifischen *Multilocus Sequence Typing* Schemas analysiert werden, wodurch erstmals Hinweise für eine potentielle Transmission zwischen Mensch und Tier aufgezeigt wurden. Ein übereinstimmendes Allelprofil wurde sowohl in einer humanen Blutkultur eines Landwirtes als auch im Kot von Legehennen seines Betriebes detektiert. Durch systematische Beprobungen konnten in diesem Legehennenbetrieb tierassoziierte Isolate aus der Umgebung (z. B. aus Staubpartikeln) und aus fäkalen Proben von Legehennen identifiziert werden, die diverse Sequenztypen (STs) aufwiesen. Durch die Analyse der einzelnen STs mit den jeweiligen Isolationsquellen konnten potentielle direkte und indirekte Transmissionswege identifiziert werden. Diese Interspeziesstransmission könnte sowohl durch einen engen Kontakt zu kolonisierten Legehennen als auch durch einen fäkal-oralen Transfer beeinflusst werden.

Weiterhin wurde eine Überlebensfähigkeit von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* außerhalb seines natürlichen Habitats auf trockenen Oberflächen, in Stuhl, im Leitungswasser sowie in Milch bis zu 14 Tage bei Raumtemperatur und 4 °C nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* die Pasteurisierung von Milch überleben kann, wodurch eine generelle Übertragung des fakultativen Pathogens durch Milchprodukte möglich wäre. Die nachgewiesene Toleranz von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* gegenüber alkalischen pH-Werten weist auf die Kolonisationsfähigkeit im GIT hin. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Umwelt als Reservoir des Bakteriums fungieren kann und ein Transfer des Bakteriums über Nahrungsmittel möglich ist. Nach der Kolonisation des GITs begünstigt unter anderem die Adhäsion an Kollagene die Initiation einer Infektion. Für die verschiedenen Isolate konnte außerdem eine unterschiedlich stark ausgeprägte Fähigkeit der Adhärenz an Kollagen I und IV aufgezeigt werden, was auf divergente Virulenzeigenschaften des analysierten Kollektivs hindeutet. Folglich resultiert ein unterschiedliches Potential der analysierten Stämme, an das Kollagen I der extrazellulären Matrix des Endokards zu adhären und eine Infektion zu initiieren. Diese ermittelten Phänotypen zeigen auf, dass die Übertragung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zwischen Mensch und Tier, eine Etablierung im GIT und eine Infektion am Endokard möglich ist.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit mit Hilfe der analytischen Epidemiologie sowie der phänotypischen Charakterisierung eine potentielle Interspeziesstransmission von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* dargestellt werden. Demnach konnten neue Erkenntnisse gewonnen werden, die das zoonotische Potential des fakultativen Pathogens aufzeigten.

## Abstract

*Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* is a normal inhabitant and also a facultative pathogenic bacterium of the human and animal gastrointestinal tract (GIT). The same infections, such as endocarditis, meningitis and septicemia, can be observed in animals and humans. Exemplarily, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* was the causative pathogen in 20% of human streptococcal-induced endocarditis cases. Although the number of infections detected is increasing, the transmission pathways and the zoonotic potential are still unexplained.

In this study, an epidemiological case-control study was performed to determine the prevalence of *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in the healthy human gut. Molecular genetic analyses revealed 75% *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-positive fecal specimens of healthy humans ( $n = 96$ ). Within these investigations, the facultative pathogen was significantly more detected in the younger population group ( $\leq 50$  years old) not living in an urban residence (odds ratio 0.12;  $p = 0.025$ ). It was also shown that the consumption of raw meat may promote amphixenosis.

Furthermore, a selective medium was established which enables the selection of several *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* isolates from human and animal feces as well as from the environment to enlarge the strain collection. Within this work, the subspecies-specific multilocus locus sequence typing scheme has been completed and was used to investigate the bacterial population structure. In addition, it demonstrates for the first time a potential transmission between animals and humans. The same allelic profile was identified in isolates from a human blood culture of a farmer and from fecal droppings of his laying hen flock. Systematic investigations of the multiage system of the laying hen flock revealed more isolates with divergent sequence types (STs) in isolates from the environment of birds (for example, in particles of dust) and from fecal droppings of laying hens. The analysis of the STs and the related origin of the isolates demonstrated potential direct and indirect transmission routes. The interspecies transmission might be increased through a close contact to colonized laying hens as well as a fecal oral transfer.

Additionally, the survival of *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* outside its natural habitat was demonstrated on dry surfaces, in human feces, in tap water and in milk up to 14 days at room temperature or at 4°C. Furthermore, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* survived the pasteurization of milk, which may imply a potential transmission by milk products. The tolerance of the bacterium to survive alkaline milieu detected suggests a possible colonization of the human digestive tract. Therefore, the environment may function as a reservoir of *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* and the transfer of the bacterium may be possible by nutrition. After colonization of the GIT, the adhesion to collagen may influence the initiation of an infection. Different abilities to adhere to collagen I and IV indicate divergent virulence capabilities within the strain collection analyzed. Consequently, the strains possess different potential to adhere to collagen I of the extracellular matrix of the endocardium to initiate an infection. These phenotypes observed lead to the assumption that *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* may be transmitted between animals and humans, colonize the GIT and cause an infection of endothelial structures.

In summary, this work demonstrates a potential interspecies transmission of *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* based on the analytical epidemiology and phenotypic characterization. These approaches, therefore, showed the zoonotic potential of *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*.

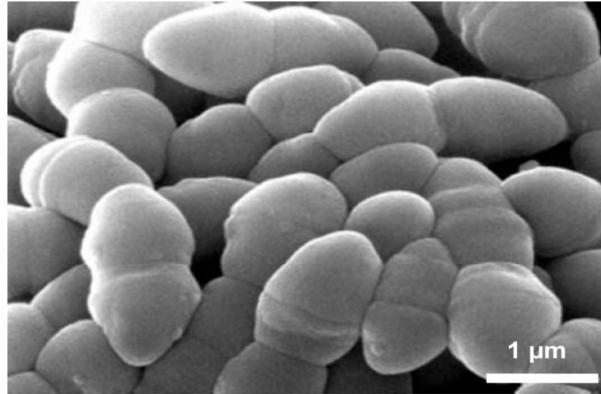
## 2 Einleitung

Der *Streptococcus* (*S.*) *bovis*/*S. equinus* Komplex ist eine Gruppierung animaler und humaner Streptokokken in der Gattung der *Streptococcaceae*, die in die Ordnung der *Lactobacillales* eingeordnet werden (Euzeby, 2006; Garrity *et al.*, 2004; Jans *et al.*, 2014; W. Ludwig, 2009). Die Gram-positiven Kokken haben eine Bedeutung als Kommensale (im Pansen oder Gastrointestinaltrakt), opportunistische Pathogene oder Fermenter in der Nahrungsmittelindustrie (Jans *et al.*, 2014). In Tieren führten Isolate dieses Komplexes zu Azidosen im Pansen, potentieller Laminitis und infektiöser Endokarditis (Jans *et al.*, 2014). Im Menschen wurden zahlreiche Bakteriämien, Endokarditiden und kolorektale Neoplasien beschrieben (Jans *et al.*, 2014). Der Komplex, der vorrangig aus Haustieren (Rinder, Pferde) stammende Isolate enthält, besteht aus nicht-hämolyisierenden Lancefieldgruppe D Streptokokken, die sich in sieben (Sub-) Spezies (*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus*, *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, *S. infantarius* subsp. *infantarius*, *S. lutetiensis*, *S. alactolyticus* und *S. equinus*) gliedern (Facklam, 1972; Jans *et al.*, 2014; Schlegel *et al.*, 2003). Aufgrund der phänotypischen Unterschiede der Stämme von *S. bovis* erfolgte eine Unterteilung in drei Biovarien, dem mannitolfermentierenden Biotyp I und dem nicht-mannitolfermentierenden Biotyp II, der wiederum in  $\beta$ -Glukuronidase-negative (II/1) und -positive (II/2) Stämme untergliedert wurde (Facklam, 2002; Parker und Ball, 1976; Schlegel *et al.*, 2000, 2003). Bei den durch *S. bovis* induzierten Bakteriämien und kolorektalen Karzinomen ist vorrangig zu 94 % der Biotyp I involviert und zu 18 % Biotyp II (Abdulmir *et al.*, 2010). Aufgrund phänotypischer Differenzen der Isolate des *S. bovis*/*S. equinus*-Komplexes erfolgten zahlreiche Änderungen in der Nomenklatur. Die ursprünglich in mannitol- bzw. nicht-mannitolfermentierenden Biotypen differenzierte *S. bovis*-Spezies wurde basierend auf identischen DNA-Sequenzen und biochemischen Eigenschaften 2003 reklassifiziert (Schlegel *et al.*, 2003). Der mannitolfermentierende Biotyp I wird seitdem als *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* aufgeführt. Des Weiteren wurden die Subspezies *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* (zuvor Biotyp II/2) und *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* mit in diese Spezies eingeordnet (Schlegel *et al.*, 2003).

### 2.1 *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ist ein Gram-positives, nicht-sporulierendes, nicht-bewegliches,  $\gamma$ -hämolytisches, fakultativ pathogenes Bakterium, welches als ovale bis lanzettförmige Diplokokke vorliegt, aber auch Ketten aus mehreren Kokken ausbilden

kann (Abb. 2.1) (O'donovan und Brooker, 2001; Osawa *et al.*, 1995; Schlegel *et al.*, 2000).



**Abbildung 2.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*.** Die Abbildung wurde modifiziert nach O'donovan und Brooker (2001).

Namensgebend für die Spezies ist die Fähigkeit, Gallotannine zu Gallussäure zu hydrolysieren und anschließend zu Pyrogallol zu decarboxylieren (Osawa *et al.*, 1995). Die Expression der Tannase (EC 3.1.1.20; Tanninacetylhydrolase) grenzt *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* sowohl von anderen Subspezies als auch von anderen Streptokokkenarten ab (Osawa *et al.*, 1995; Schlegel *et al.*, 2003). Tannine sind prokondensierte Proanthocyanidine, die von Dikotyledonen als Sekundärmetabolite synthetisiert werden, um Herbivore abzuwehren (Bhat *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2011). Die polyphenolische Verbindung bildet durch die Bindung an Proteine Tannin-Protein-Komplexe aus, die die Verdauung vor allem von pflanzenfressenden Säugetieren beeinflusst (Chamkha *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2014; Osawa *et al.*, 1995; Schlegel *et al.*, 2003). Durch die Hydrolyse der Tannin-Protein-Komplexe weist das gastrointestinale Bakterium *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* eine natürliche Resistenz gegenüber Tanninen auf (O'donovan und Brooker, 2001). Aus dem Fäzes eines Koalas konnte ein tannintolerantes *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolat gewonnen werden, welches befähigt war, diesen Komplex zu spalten (Osawa und Mitsuoka, 1990). Die Tanninacetylhydrolasen bieten einen selektiven Vorteil und befähigen das Bakterium, sich eine ökologische Nische im Gastrointestinaltrakt zu erschließen (Rusniok *et al.*, 2010). Zudem wurde 2001 gezeigt, dass Tanninsäure die Produktion extrazellulärer Matrixproteine (*extracellular matrix*, ECM) (Exopolysaccharide) beeinflussen kann (O'donovan und Brooker, 2001).

Mikroorganismen produzieren häufig feste, zellassoziierte (integrale) Kapseln oder periphere Strukturelemente (Schleim), die als Interaktionspunkt mit der Umwelt fungieren (O'donovan und Brooker, 2001; de Vuyst und Degeest, 1999). Zum einen dient die Polysaccharidkapsel als Schutz vor Austrocknung, dem Anhaften an Oberflächen oder dem Anhaften von anderen Bakterien und zum anderen stellt es einen wichtigen Virulenzfaktor dar (Hammerschmidt *et al.*, 2005; Kolenbrander und London, 1993; Marques *et al.*, 1992). Genomanalysen demonstrierten, dass im Genom von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ein Operon für die Expression einer Polysaccharidkapsel vorhanden ist (Hinse *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011; Rusniok *et al.*, 2010). Diese Expression kann einen Schutz vor dem menschlichen Immunsystem darstellen und fördert die Adhäsion an die Wirtszelle (Boleij *et al.*, 2011 b).

## **2.2 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* als Pathogen**

*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ist nicht nur ein natürliches Darmbakterium bei Tieren (z. B. Vögeln, Wiederkäuern, Säugetieren) und beim Menschen (2,5 bis 15 %), sondern auch fakultativ pathogen und ein Initiator diverser humaner und animaler Erkrankungen (Boleij und Tjalsma, 2013; Sillanpää *et al.*, 2009). Dabei können Meningitis, Sepsis und Endokarditis beim Menschen und im Tier gleichermaßen hervorgerufen werden (Headings *et al.*, 1978; Sekizaki *et al.*, 2008). Des Weiteren wurde häufig eine Koinzidenz der humanen infektiösen Endokarditis (IE) durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (bzw. *S. bovis* Biotyp I) und Kolonkarzinomen beschrieben (Abeni *et al.*, 2013; Boleij *et al.*, 2009; Klein *et al.*, 1977). 2011 zeigte eine Metaanalyse, dass 43 % der Patienten, die an einer Infektion durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (am häufigsten IE) litten, Darmadenome aufwiesen. Von diesen Patienten entwickelten 18 % kolorektale Karzinome (Boleij *et al.*, 2011 a; Tjalsma *et al.*, 2012).

### **2.2.1 Infektiöse Endokarditis**

Die Endokarditis wird differenziert in die infektiöse und nicht-infektiöse Endokarditis. Bei der infektiösen Endokarditis handelt es sich um eine nichtansteckende Infektion des Endokards, wobei die Herzklappen, vor allem die linksventrikulären, am häufigsten betroffen sind (Prattes und Zollner-Schwetz, 2015). Vorrangig pathogene Mikroorganismen besiedeln dabei das Endokard und stimulieren damit eine Inflammation. Die Diagnose der IE erfolgt häufig erst nach einer initialen vierwöchigen

Lag-Phase, gefolgt von unspezifischen Symptomen (Werdan *et al.*, 2013). Die Inzidenzen der IE nehmen besonders in den Industrienationen zu, wobei sich das Altersspektrum der an IE-leidenden Patienten verschiebt. Während es 1920 unter 30-Jährige waren, wurde 2009 ein mittleres Alter von etwa 58 Jahren ermittelt (Habib *et al.*, 2009; Prattes und Zollner-Schwetz, 2015). Obwohl verbesserte Methoden zur Erregeridentifikation und Therapie der IE vorliegen, liegt die Mortalitätsrate bei 30 % (Malhotra *et al.*, 2014). Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken sind in 80 % der Fälle für die Infektionen verantwortlich (McDonald, 2009; Werdan *et al.*, 2013). Pilze können ebenfalls eine Infektion am Endokard triggern (Naber *et al.*, 2004). In etwa 20 % der Streptokokken-Endokarditiden ist *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* das kausative Agens (Sillanpää *et al.*, 2008; Vollmer *et al.*, 2009, 2010 b). Das Krankheitsbild der IE wird beeinflusst sowohl durch den Erreger selbst als auch durch den Immunstatus des Patienten.

### 2.2.2 Kolonkarzinome

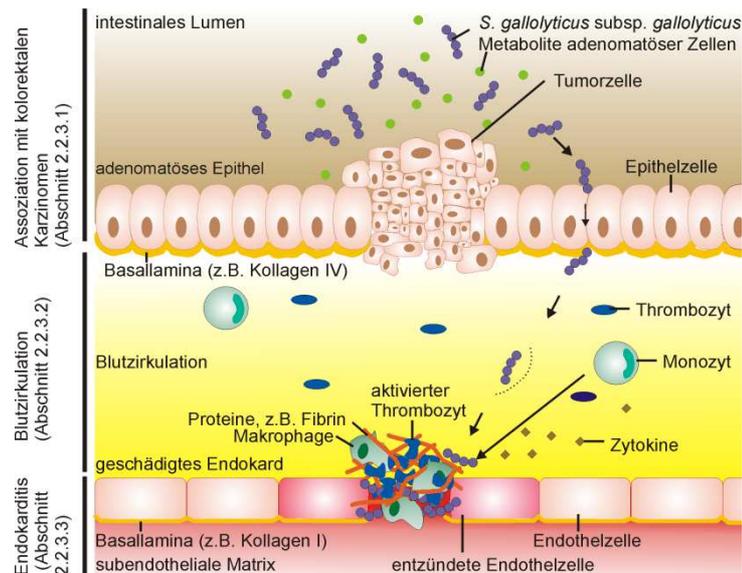
Das kolorektale Karzinom ist eine Erkrankung, die vorrangig in Industrieländern auftritt. Mit etwa einer Million Neuerkrankungen im Jahr und über 600.000 Todesfällen sind kolorektale Karzinome die vierthäufigste diagnostizierte Krebsart weltweit (Abdulmir *et al.*, 2009; Boleij und Tjalsma, 2013; Tjalsma *et al.*, 2012). Wie bei anderen Krebsarten auch haben die genetische Exposition, Umweltfaktoren und auch das intestinale Mikrobiom einen Einfluss auf die Ausbildung von gastrointestinalen Neoplasien (Boleij und Tjalsma, 2013; Geng *et al.*, 2014). Von physiologischen Veränderungen wie eine gesteigerte Mukusproduktion und Epithelpermeabilität können pathogene Darmbakterien profitieren und dies als Eintrittspforte in die Blutzirkulation nutzen (Boleij und Tjalsma, 2013).

Die Assoziation bakterieller Infektionen mit Tumoren wird durch zwei Mechanismen beeinflusst: zum einen durch die chronische Inflammation und zum andern durch die Produktion karzinogener Metabolite (Abdulmir *et al.*, 2011; Parsonnet, 1995). Letzteres soll die Kolonisation der Darmmukosa mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* fördern (Boleij *et al.*, 2012). Die fäkale Belastung mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ist bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen um 10 bis 50 % erhöht als bei Gesunden (Boleij *et al.*, 2012; Klein *et al.*, 1977). Molekulargenetische Analysen identifizierten DNA von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in mukosalen Darmgeweben (tumorartig, nicht-tumorartig) von Tumorpatienten zu etwa 20 bis 50 %. In den Kontrollen wurde das Bakterium deutlich seltener (< 5 %) molekulargenetisch detektiert (Abdulmir *et al.*,

2010). Das Fehlen einheitlicher mikrobiologischer Klassifizierungen des *S. bovis*-Biotyps (I/II) in der Literatur verzerrte die Assoziation zwischen kolorektalen Karzinomen und *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (Boleij *et al.*, 2011 a). Für *S. bovis* sind Inzidenzen von 18 bis 62 % beschrieben worden (Abdulmir *et al.*, 2009; Leport *et al.*, 1987; Zarkin *et al.*, 1990). Dabei stellt sich die Frage, ob das Bakterium bei kolorektalen Karzinomen als Initiator oder Promotor fungiert oder ob die Assoziation eine Konsequenz der Tumorerkrankungen ist (Abdulmir *et al.*, 2009; Hensler, 2011). In Tierexperimenten konnte eine gesteigerte Zytokinexpression in der Kolonmukosa im Zusammenhang mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* beobachtet werden (Ellmerich *et al.*, 2000). Diese führt vermutlich zur Stimulation der Progression von präneoplastischen Läsionen zu Adenomen im Rattenmodell (Ellmerich *et al.*, 2000).

### **2.2.3 Die Rolle von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in der Pathogenese**

Die erste Assoziation einer durch Enterokokken ausgelösten infektiösen Endokarditis und sigmoiden Kolonkarzinomen wurde 1951 dargestellt (McCoy und Mason 3rd, 1951). 1977 wurde das gemeinsame Auftreten von *S. bovis* mit kolorektalen Karzinomen erstmalig dokumentiert (Jans *et al.*, 2014; Klein *et al.*, 1977). Die Koexistenz der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-assoziierten kolorektalen Karzinome mit infektiöser Endokarditis beträgt weniger als 1 % (Boleij und Tjalsma, 2013). Obwohl seither zahlreiche Publikationen veröffentlicht wurden, die sich dem Zusammenhang zwischen einer von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-ausgelösten infektiösen Endokarditis und kolorektalen Tumoren widmen (Gold *et al.*, 2004, 2004; Gupta *et al.*, 2010; Leport *et al.*, 1987), ist der Pathomechanismus der Infektion nicht abschließend aufgeklärt. In Abbildung 2.2 ist der hypothetische Pathomechanismus dargestellt, auf den in den nächsten Abschnitten näher eingegangen wird.



**Abbildung 2.2:** Schematische Darstellung der hypothesierten Pathogenese von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bei kolorektalen Karzinomen und in der infektiösen Endokarditis. Die Abbildung wurde in Anlehnung an Boleij und Tjalsma (2013), Boleij *et al.* (2011 b), Tjalsma *et al.* (2012) und Weinstock (2014) erstellt und modifiziert.

### 2.2.3.1 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Zusammenhang mit kolorektalen Karzinomen

Eine prädominante Spezies im Ileum des Gastrointestinaltraktes ist *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, der dort aufgrund der Metabolisierung von Kohlenhydraten eine wichtige Rolle einnimmt (Boleij und Tjalsma, 2013; Boleij *et al.*, 2012). Die zahlreichen für den Glukosestoffwechsel kodierenden Gene im Genom von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* stützen diese Ergebnisse (Lin *et al.*, 2011; Rusniok *et al.*, 2010). Es wird vermutet, dass durch nährstoffarme Situationen im Ileum von Gesunden *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* durch das bakterielle Mikrobiom verdrängt wird (Boleij *et al.*, 2012). Neue *in vitro* Studien zeigten, dass durch neoplastische Veränderungen im Kolon durch hyperaktive metabolische Tumorzellen hohe Konzentrationen von Laktat, Glukosederivaten, Aminosäuren, Lipiden und Fettsäuren synthetisiert werden (Bi *et al.*, 2006; Boleij und Tjalsma, 2013; Hirayama *et al.*, 2009; Righi *et al.*, 2009), sodass dort ähnliche Nährstoffbedingungen wie im Ileum vorherrschen (Boleij *et al.*, 2012). Diese Ergebnisse konnten in einer *in vitro* Metabolomanalyse ebenfalls dargestellt werden und lassen vermuten, dass der gesteigerte Glukosemetabolismus für glukosefermentierende Bakterien wie *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* eine ökologische Nische darstellt (Boleij und Tjalsma, 2013). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass das *pil3*-Gen, welches für eine der drei Pilusuntereinheiten kodiert, die Besiedlung der Darmmukosa in Mäusen unterstützt (Martins *et al.*, 2015). Die

Darmmukosa stellt die erste physikalische Barriere vor dem Eintritt in den Blutkreislauf dar. Die Oberflächenantigene von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* induzieren die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine (Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1-Familie (IL-1), IL-6), des Chemokins IL-8 und der Aktivierung von NF $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer*) in der Mukosa des Kolorektums (Abdulmir *et al.*, 2011). Die durch den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B exprimierte Faktoren IL-1 und COX-2 (Cyclo-Oxygenase-2) stellen zentrale Immunmodulatoren der Immunreaktion dar (Abdulmir *et al.*, 2010). Dabei wirkt COX-2 karzinogen und IL-8 angiogenetisch, sodass die Angiogenese und die Zellproliferation stimuliert und die Zellapoptose inhibiert wird (Abdulmir *et al.*, 2010; Biarc *et al.*, 2004; Boleij und Tjalsma, 2013). Darüber hinaus ist in 85 % der kolorektalen Karzinome die COX-2 überexprimiert (Kargman *et al.*, 1995). Die lokale Expression der Zytokine und der Chemokine wirkt stimulierend auf kolorektale Karzinome, führt zur Vasodilatation und einer erhöhten kapillaren Permeabilität (Abdulmir *et al.*, 2009). Weiterhin wird die Barrierefunktion der Epithelschicht reduziert und die Permeabilität der *Tight Junctions* erhöht (Abdulmir *et al.*, 2010; Boleij und Tjalsma, 2013; Soler *et al.*, 1999). Diese physiologischen Veränderungen sowie eine veränderte Sekretproduktion, Sekretzusammensetzung und die Exposition extrazellulärer Matrixmoleküle ermöglichen es *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, mit Hilfe der parazellulären Translokation das Darmepithel zu passieren (Aksoy und Akinci, 2004; Boleij *et al.*, 2011 b). Die Translokation aufgrund einer reduzierten Barriere kann eine potentielle Ursache dafür sein, dass Patienten mit kolorektalen Karzinomen eine erhöhte bakterielle Infektionsrate aufweisen (Boleij und Tjalsma, 2013).

### **2.2.3.2 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in der Blutzirkulation**

Durch das Eindringen von Mikroorganismen in die Blutzirkulation wird das angeborene Immunsystem aktiviert. *Pattern recognition receptors* der Leukozyten detektieren die konservierten *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) der bakteriellen Oberfläche, sodass die Zytokinexpression in humanen Zellen initiiert wird (Takeuchi und Akira, 2010). Die Induktion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  führt zu einer zur Expression eukaryotischer ECM-Moleküle und zum anderen zur Rekrutierung von Immunzellen (z. B. Leukozyten, Neutrophile, Monozyten) zum Infektionsherd (Andreasen *et al.*, 2008). Die Expression von Chemokinen, wie z. B. IL-8, bewirken die Rekrutierung von Monozyten zum inflammatorischen Gewebe entlang eines chemotaktischen Gradienten. Das IL-6 wird exprimiert und sekretiert und triggert somit die Monozytendifferenzierung in Makrophagen (Chomarat *et al.*, 2000). Dadurch

werden Bakterien phagozytiert und im Phagosomen abgetötet. Zudem wird der bakterielle Abbau durch sauerstoffabhängige Mechanismen, die zur Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS; Superoxid, Wasserstoffperoxid, Hydroxyradikal) führen, in den Makrophagen gewährleistet (Haas, 2002).

Die resultierende Biofilmbildung an Kollagenen könnte die hohe Assoziation des Erregers mit kolorektalen Karzinomen und dem Eintritt in den Blutkreislauf über die kollagenreiche ECM erklären (Boleij und Tjalsma, 2013; Boleij *et al.*, 2011 b; Yantiss *et al.*, 2001). Darüber hinaus hat die Pil1-Untereinheit einen Einfluss auf die Phagozytose, sodass ein Überleben in einem Vollblut-Modellsystem von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* möglich ist (Danne *et al.*, 2014; Weinstock, 2014). Die Isolation von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* aus humanen Blutkulturen asymptomatischer Patienten zeigt ebenfalls auf, dass das Bakterium das angeborene Immunsystem umgehen kann (Vanrobaeys *et al.*, 1999). Diese Hypothese wird durch das Vorhandensein eines Kapseloperons im Genom gestützt (Hinse *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011; Rusniok *et al.*, 2010). Anderen Streptokokken-Spezies wurde eine protektive Funktion der Polysaccharidkapsel zugeschrieben. Bei *S. pneumoniae* stellt diese einen der wichtigsten Virulenzfaktoren dar, durch den sich die Pneumokokken vor dem menschlichen Immunsystem schützen (Fine, 1975; Talay, 2005). Ein Zusammenhang zwischen der Synthese des Exopolysaccharides und einer verminderten Phagozytoserate von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* konnte jedoch nicht hergestellt werden (Weinstock, 2014). Kollagenbindende MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) Gram-positiver Bakterien sind etablierte Virulenzfaktoren bei verschiedenen Infektionsmodellen. Für *Staphylococcus* (*S.*) *aureus* wurde gezeigt, dass diese auch als Inhibitor des klassischen Komplementsystems fungieren können, sodass das humane Immunsystem umgangen werden könnte (Kang *et al.*, 2013). Eine gesteigerte Überlebensrate von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Makrophagen im Vergleich zu *Bacillus subtilis* und *Lactobacillus plantarum* wurde bereits 2011 demonstriert (Boleij *et al.*, 2011 b). Ein variierendes Überleben in Makrophagen wurde für die Isolate DSM 16831, UCN 34 und ATCC BAA-2069 in Abhängigkeit von der Zeit beobachtet (Weinstock, 2014). Während der Stamm aus Koalafäzes (DSM 16831) sukzessive abgebaut wurde, zeigten die humanen Stämme einen konstanten Bakterientiter (nach 8 bis 12 h und 8 bis 16 h) (Weinstock, 2014). Die Vitalität der Bakterien im Vollblut-Modellsystem zeigte eine Korrelation zwischen der IL-6-Induktion und der Wachstumskinetik von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Dabei wird das pro-inflammatorische Zytokin IL-6 durch DSM 16831 früher als durch andere Stämme induziert, was mit einem verminderten Bakterientiter im

Vollblutssystem einhergeht (Weinstock, 2014). Die Überlebensfähigkeit von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Blutkreislauf wird unterstützt durch eine verringerte Lyse durch Makrophagen (im Vergleich zu *S. aureus*) und einer Resistenz gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (Garben, 2015; Weinstock, 2014). Dabei zeigte *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* eine Resistenz bis zu einer Konzentration von 20 mM Wasserstoffperoxid, was Vorteile hinsichtlich der Umgehung des Immunsystems und dem Ausbilden einer IE gewährleistet (Garben, 2015). Die Persistenz des Gram-positiven fakultativen Pathogens in den Phagosomen kann zur Freisetzung aus diesen führen, sodass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zur Replikation im Zytosol befähigt sein könnte. Demzufolge lassen sich nahezu konstante Bakterientiter detektieren (Weinstock, 2014). Ein zweiter Mechanismus ist die Mimikry von Sialyl-Antigenen humaner Monozyten und Granulozyten durch Sialyl-Lewis-X-Antigene auf der Zellwandoberfläche von Bakterien (Boleij und Tjalsma, 2013; Hirota *et al.*, 1995; Rusniok *et al.*, 2010). Darüber hinaus könnte durch diese Oberflächenstruktur die Effizienz der Bindung an Endothelzellen und das Eindringen in das Blutkreislaufsystem begünstigt werden (Boleij und Tjalsma, 2013; Hirota *et al.*, 1995). Diese Pathomechanismen ermöglichen dem fakultativen Pathogen in der Blutzirkulation zu bestehen, um an vorgeschädigte Endokardzellen zu adhären und eine Sekundärinfektion auszulösen.

### **2.2.3.3 Etablierung einer infektiösen Endokarditis durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus***

Die Entwicklung einer IE basiert auf verschiedenen Mechanismen. Zum einen können virulente, invasive oder parasitäre Pathogene, die an ein nicht geschädigtes Endokard adhären, eine Vegetation ausbilden und somit eine mechanische Schädigung und folglich eine IE hervorrufen (Werdan *et al.*, 2013), zum anderen kann ein vorgeschädigtes Epithel (abnormale, verletzte oder entzündete Herzklappen) als Basis für invasive und nicht-invasive Mikroorganismen dienen (Durack und Beeson, 1972; Werdan *et al.*, 2013). Bei der Schädigung endothelialer Strukturen liegt eine nicht-bakterielle Endokarditis (NBTE) vor. Bei der NBTE wird die Gewebeschädigung durch eine sterile Vegetation aus Fibrin und Thrombozyten eingedämmt (Durack und Beeson, 1972; Forte *et al.*, 2001; Werdan *et al.*, 2013). Infolge endothelialer Läsionen können pathogene Mikroorganismen über exponierte ECM-Proteine interagieren, sodass der initiale Schritt einer (Sekundär-) Infektion gegeben ist (Allen *et al.*, 2002; Forte *et al.*, 2001; Werdan *et al.*, 2013). Dies verdeutlicht, dass die Pathogenese der Endokarditis ein multifaktorieller Prozess ist, in dem immunologische und mikrobielle pathogene

Mechanismen erforderlich sind (Durack und Beeson, 1972; Forte *et al.*, 2001). Dabei spielen in Gram-positiven Bakterien die oberflächenlokalisierten, zellwand-verankerten Adhäsine, die als MSCRAMMs bezeichnet werden, eine wichtige Rolle bei der Virulenz und der damit verbundenen Pathogenität (Patti *et al.*, 1994). *In vitro* sowie Genomanalysen konnten für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* MSCRAMMs identifizieren, die es dem im Blut zirkulierenden Bakterium ermöglichen, über die ECM-Proteine mit der Wirtszelle zu interagieren (Hinse *et al.*, 2011; Rusniok *et al.*, 2010; Sillanpää *et al.*, 2009). Die eukaryotische, adhäsive Oberfläche wird u. a. aus den extrazellulären Matrixproteinen Fibronectin, Fibrinogen, Kollagen und aus heparinverbundenen Polysacchariden gebildet (Patti *et al.*, 1994). Es wurde gezeigt, dass die erhöhte Fähigkeit zur Bindung an Kollagene zugleich ein Indikator für die Virulenz im experimentellen Endokarditismodell ist (Vollmer *et al.*, 2010 a). Die Fähigkeit, an Kollagene zu adhären, wird zum Teil durch das *pil1*-Gens im Genom von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* vermittelt, welches für ein Pilusprotein mit einer kollagenbindenden Domäne kodiert (Danne *et al.*, 2011, 2013). Die sterile Vegetation sowie freiliegende Moleküle der ECM begünstigen die Besiedlung durch Pathogene am Endokard (Durack und Beeson, 1972; Werdan *et al.*, 2013). *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ist befähigt, an endokardiale Endothelzellen zu adhären und in diese Zellen zu invadieren (Vollmer *et al.*, 2010 a), wobei stammspezifische Unterschiede auftraten. Eine Besonderheit bei der Invasion stellt dabei das Koalaisolat DSM 16831 dar, welches nicht in die Zellen der humanen Endothelzelllinie EA.hy926 invadieren konnte (Vollmer *et al.*, 2010 a). Neben der stark ausgeprägten Adhäsion an Kollagen I/II/IV kann *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* auch an Fibrinogen und Laminin binden und am vorgeschädigte Endokard einen Biofilm ausbilden, was eine starke Assoziation des Erregers mit der IE erklären könnte (Boleij und Tjalsma, 2013; Boleij *et al.*, 2011 b; Hinse, 2012; Sillanpää *et al.*, 2009; Vollmer *et al.*, 2010 a).

Die durch PAMPs aktivierten Monozyten exprimieren und sekretieren pro-inflammatorische Zytokine (Takeuchi und Akira, 2010). Inflammatorisch bedingt werden zuerst TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  synthetisiert (Andreasen *et al.*, 2008). Diese Mediatoren rekrutieren Leukozyten zur Infektion und stimulieren die IL-6-Expression. Das IL-6 führt zur Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen (Chomarat *et al.*, 2000). Vermutlich besitzt dieses Zytokin auch einen Einfluss auf die Etablierung der IE (Shun *et al.*, 2005). In verschiedenen Zellkulturmodellen (mit Endothel und Monozyten) wurde eine variierende *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-IL-6-Expression beschrieben sowie die Genexpression der chemotaktischen Substanzen IL-8 und MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) untersucht. Dabei ist die mRNA-Expression der pro-

inflammatorischen Zytokine im Endothelsystem deutlich geringer als im Monozytenmodell (Weinstock, 2014). Eine verminderte Synthese von IL-6 am Endothel könnte das Überleben von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* beim Initiieren einer Vegetation am Endokard fördern. Diese Vegetation wird durch weitere Rekrutierungen von Thrombozyten und Fibrin zum Infektionsherd vor der Immunantwort des Wirts maskiert (Werdan *et al.*, 2013). Dies ermöglicht eine ungehinderte Replikation des Opportunisten, sodass eine sich zunehmend ausbreitende Vegetation zu beobachten ist und das Endokard zunehmend geschädigt wird (Werdan *et al.*, 2013). Streptokokken und Staphylokokken können zudem die Thrombozyten-Aggregation triggern (Bayer *et al.*, 1995; Herzberg *et al.*, 1992), was auch für die Spezies *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* gezeigt wurde (Weinstock, 2014). Dieser Mechanismus kann somit ebenfalls in die Pathogenese der infektiösen Endokarditis eingreifen (Weinstock, 2014). Dabei sollte bei den Bakterien eine natürliche Resistenz gegenüber des *Platelet Microbicidal Proteins* (PMPs), das von den aktivierten Thrombozyten sekretiert wird, vorliegen (Fowler *et al.*, 2000; Koo *et al.*, 1999; Yeaman *et al.*, 1997). Die Modulation der Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten wurde für diverse oberflächenexponierte Virulenzfaktoren von *S. aureus* beschrieben (z. B. *clumping factor A* (ClfA) und ClfB, fibronektinbindende Proteine) (Fitzgerald *et al.*, 2006; Werdan *et al.*, 2013). Die *in vitro* Resistenz von *S. aureus* korrelierte mit einer ausgedehnten experimentellen infektiösen Endokarditis (Fowler *et al.*, 2000). Die sekretierten antimikrobiellen Peptide aus den Thrombozyten werden von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* durch noch bisher unbekannte Mechanismen toleriert (Weinstock, 2014).

### 2.3 Zoonose

Zoonosen sind Erkrankungen oder Infektionen, die zwischen Mensch und domestizierten und wildlebenden Tieren übertragen werden. Etwa 60 % von aller humanen Erkrankungen und ca. 75 % der neu auftretenden Infektionskrankheiten (*emerging infectious diseases*) sind zoonotisch (Grace *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2001; Woolhouse und Gowtage-Sequeria, 2006). Die Richtung der Übertragung des bakteriellen, viralen, parasitären oder fungiziden Erregers wird durch die Begriffe Zooanthroponose (Tier auf Mensch), Anthroozoonose (Mensch auf Tier) und Amphixenose (zwischen Mensch und Tier) beschrieben. Der Einfluss von Zoonosen auf die humane Gesundheit kann in die drei Kategorien endemische, epidemische und aufkommende Zoonosen eingeteilt werden (Tab. 2.1) (Grace *et al.*, 2012).

**Tabelle 2.1: Zoonosekategorien in Bezug auf den humanen Gesundheitszustand (Grace et al., 2012).**

Kategorie	Definition	Beispiel
endemische Zoonose	<ul style="list-style-type: none"> <li>• geografisch verbreitet</li> <li>• viele Menschen und Tiere betroffen</li> <li>• in armen Regionen</li> <li>• 99,9 % humaner Infektionen</li> <li>• 96 % humaner Mortalität</li> <li>• größte Reduktion in der Tierhaltung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Salmonellose</li> <li>• Bruzellose</li> <li>• Leptospirose</li> </ul>
epidemische Zoonosen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• typisch bei Ausbrüchen</li> <li>• temporale und geografische Variabilität</li> <li>• durch Klimaveränderungen, Überflutung, geringen Immunstatus oder begleitend bei Hunger oder Erkrankungen</li> <li>• unvorhersehbar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anthrax</li> <li>• Leishmaniose</li> <li>• Tollwut</li> </ul>
aufkommende Zoonosen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• existierten bereits oder neu; steigende Inzidenzen oder geografische Ausbreitung</li> <li>• seltenes Auftreten als Ausbruch (300 Ereignisse in 70 Jahren (Jones et al., 2008))</li> <li>• beeinflusst durch sozioökonomische und ökologische Faktoren sowie Umweltfaktoren (Jones et al., 2008)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HIV/AIDS</li> </ul>

### 2.3.1 Zoonotische Streptokokken

Im Bereich der Streptokokken sind zahlreiche Zoonosen bekannt. Zu den zoonotischen Erregern gehören die in Tieren vorherrschenden Bakterienspezies *Streptococcus (S.) equi* subsp. *zoepidemicus* und *Streptococcus (S.) suis* (Spickler, 2005). Das pathogene oder kommensale Bakterium *S. suis* ist gewöhnlich mit dem Schwein assoziiert und weist 35 Serotypen auf, die sich in ihrer Virulenz unterscheiden (King et al., 2001). Der Serotyp zwei wird dabei häufig von infizierten Schweinen isoliert und ist prädominant im Menschen (Francois et al., 1998; Spickler, 2005; Ye et al., 2008). Einige Streptokokkus-Spezies, wie der humanpathogene *Streptococcus (S.) pyrogenes* (Pharyngitis, Hauterkrankungen), haben sich an den Menschen angepasst und besitzen kein natürliches Habitat im Tier. Allerdings konnten diese Bakterien dennoch auf Tiere übertragen werden (reverse Zoonose). So kann *S. pyrogenes* das Euter von Rindern infizieren, sodass über kontaminierte Milch der kolonisierten Tiere Reinfektionen des Menschen stattfinden und Ausbrüche im Menschen hervorrufen (Spickler, 2005). Wiederum sind zoonotische Signifikanzen anderer Streptokokken trotz der Identifizierung in Mensch und Tier unklar.

### 2.3.1.1 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* als potentielles zoonotisches Pathogen

Ein Vertreter unklarer Zoonosen ist das gastrointestinale Bakterium *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, das bis zu 15 % in der gesunden Bevölkerung vertreten ist (Abeni *et al.*, 2013; Sillanpää *et al.*, 2009). Obwohl das opportunistische Bakterium in zahlreichen Tieren, wie Tauben, Hühnern und Rindern identifiziert wurde, ist die Kolonisationsrate in Tieren bisher nicht beschrieben worden (Chadfield *et al.*, 2007, 2007; Devriese *et al.*, 1990; Sasaki *et al.*, 2004; Sekizaki *et al.*, 2008). Das Gram-positive Bakterium ist nicht nur Kommensale, sondern gleichzeitig auch ein fakultatives Pathogen und Erreger zahlreicher Infektionen in Mensch und Tier. In der Veterinärmedizin wird der Pathogenität des Erregers wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Obwohl *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* als Hauptpathogen in Tauben (Sepsis, Nekrose verschiedener Organe, Arthritis, Endokarditis) identifiziert wurde und eine erhöhte Mortalität bei Infektionen in Puten in den ersten drei Lebenswochen auftraten, wurden keine genotypischen Analysen durchgeführt (Chadfield *et al.*, 2007; Devriese *et al.*, 1990; Droual *et al.*, 1997; de Herdt *et al.*, 1994). Eine Mortalitätsrate von 4,3 % durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wurde in einer Broilerherde ermittelt (Chadfield *et al.*, 2007). In Milchkühen wurde dieses Bakterium als Pathogen der Mastitis identifiziert (Garvie und Bramley, 1979; Sasaki *et al.*, 2004; Schlegel *et al.*, 2000). Weiterführende Studien identifizierten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Milch und Rohmilchprodukten (Fortin *et al.*, 2003; Randazzo *et al.*, 2006; Tsakalidou *et al.*, 1998). Seit fast 60 Jahren ist bekannt, dass *S. bovis* ein Auslöser für die infektiöse Endokarditis sein kann (Niven Jr *et al.*, 1948). Weiterhin demonstrierten verschiedene Studien die Assoziation der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-ausgelösten infektiösen Endokarditis mit Kolonkarzinomen im Menschen (Abeni *et al.*, 2013; Klein und Wang, 2014; Klein *et al.*, 1977). Wie im humanen Wirt ist *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Tier das kausative Agens von Sepsis, Meningitis und Endokarditis (Headings *et al.*, 1978; Sekizaki *et al.*, 2008). Obwohl das Vorkommen des fakultativen Pathogens in Mensch und Tier mit ähnlichen Krankheitsbildern ein zoonotisches Potential nahe legen, ist der Aspekt der zoonotischen Übertragung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bisher nicht eindeutig belegt (Hogg und Pearson, 2009). Besonders Infektionen in Nutztieren (z. B. Rindern, Schweinen) und Haustieren (Hunden, Tauben) erfordern die Aufklärung der Transmission des Bakteriums (Baele *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2004; Sekizaki *et al.*, 2008). In den letzten Jahren ist der Anteil der infektiösen Endokarditiden in den südlichen Ländern Europas immer häufiger durch Gruppe D Streptokokken hervorgerufen worden (Hoen *et al.*, 2005). Dabei belegten Analysen aus Frankreich und Spanien, dass diese häufiger in ruralen als in urbanen Regionen zu

finden sind (Corredoira *et al.*, 2015; Giannitsioti *et al.*, 2007). Den größten Anteil der Endokarditiden in ländlichen Gebieten nimmt *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ein, sodass dies ein Indiz einer möglichen Zoonose darstellen könnte, da in ländlichen Regionen der Kontakt zu infizierten oder kolonisierten Tieren höher ist.

### **2.3.2 Mögliche Transmissionswege von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus***

Neben bisher noch ungeklärten Aspekten des Pathomechanismus sind die Transmissionswege und das zoonotische Potential nicht hinreichend analysiert. Für andere zoonotische Pathogene sind direkte und indirekte Transmissionswege beschrieben worden. Über kontaminierte Oberflächen, Staub (z. B. Tierexkrete, Tierfutter) oder durch Inhalation oder Verschlucken von Bioaerosolen kann eine indirekte Transmission erfolgen (Millner, 2009; Taylor *et al.*, 2001). Ein enger Kontakt zwischen Mensch und Tier erhöht die Transmission für Bakterien wie beispielsweise bei *S. suis* (Francois *et al.*, 1998; Lun *et al.*, 2007). Somit könnte ein enger Kontakt mit kolonisierten oder infizierten Tieren wie Tauben, Rindern oder Schweinen oder der Kontakt mit der belasteten Tierumgebung (z. B. Tierkot, Federn, Stäube) eine Möglichkeit der Übertragung zwischen Mensch und Tier darstellen (Corredoira *et al.*, 2015). Der Konsum von unpasteurisierten Milchprodukten führt zu *S. equi* subsp. *zooepidemicus* Infektionen (Bordes-Benitez *et al.*, 2006; Shah *et al.*, 2001; Spickler, 2005). Der Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Milch und Rohmilchprodukten (Fortin *et al.*, 2003; Randazzo *et al.*, 2006; Tsakalidou *et al.*, 1998) sowie das Auslösen der Mastitis in Milchkühen (Sasaki *et al.*, 2004) führt zu der Annahme, dass über *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-kontaminierte Nahrungsmittel eine Übertragung auf den Menschen stattfinden könnte. Durch Genomanalysen konnte eine spezifische Genausstattung für die Anpassung an das menschliche und animale gastrointestinale Milieu gezeigt werden. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* als Zoonoseerreger agieren zu können. Dazu zählen zahlreiche Enzyme für den Transport, für die Spaltung und die Nutzung zahlreicher pflanzlicher Polysaccharide (z. B. Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferasen, Zellulasen, Pektatlyasen) sowie die Erschließung alternativer Kohlenstoffquellen (z. B. Tanninacetylhydrolasen) und die Synthese essentieller Metabolite (Tryptophan- und Panthenolbiosynthese) (Hinse, 2012; Hinse *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011; Rusniok *et al.*, 2010). Im Genom des Kälberisolates LMG 17956 wurde das *Tn1546*-Transposon identifiziert. Dieses ist genetisch ähnlich der Transposons von Enterokokken, die im Menschen Bakteriämien und Endokarditis verursachen, und wurde vermutlich über Konjugation von *Enterococcus faecalis* in das Genom des

*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolates integriert (Romero-Hernández *et al.*, 2015; Willems *et al.*, 1999; Woodford *et al.*, 1998). Die Präsenz im *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Genom liegt mutmaßlich in einer zoonotischen Transmission begründet (Romero-Hernández *et al.*, 2015). Ferner stützen identische molekulargenetische Muster in menschlichen und tierischen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolaten die Möglichkeit, als Zoonoseerreger fungieren zu können (Hinse, 2012; Sasaki *et al.*, 2004). Dennoch ist bisher ungeklärt, ob das Bakterium zoonotisches Potential besitzt (Hogg und Pearson, 2009).

### **2.3.2.1 Identifizierung epidemiologischer Strukturen in Bakterienpopulationen**

Epidemiologie beschreibt die Verteilung und die Häufigkeit einer Erkrankung oder einer Infektion in einer Population und deren Determinanten, die die Verteilung und Häufigkeit bestimmen (Pearce, 1996). Die Aufklärung epidemiologischer Strukturen von Infektionserregern ist im Hinblick auf die steigenden Infektionszahlen mit dem fakultativen Pathogen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* von besonderer Bedeutung. Die Transmissionsquellen, die Verbreitungsmechanismen und inwieweit eine Gefahr des Erregers durch die Übertragung zwischen Mensch und Tier ausgeht sind bisher noch nicht bekannt. Zur Analyse epidemiologische Fragestellungen stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Zum einen können epidemiologische Studien potentielle Risikofaktoren identifizieren und zum anderen können epidemiologische Strukturen mittels *Multilocus Sequence Typing* (MLST) erfasst werden.

#### **2.3.2.1.1 Charakterisierung der Epidemiologie von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus***

MLST ermöglicht das Identifizieren von Transmissionswegen, Populationsstrukturen und dem zoonotischen Potential von Bakterien. Diese Methode ist gut reproduzierbar, um akkurate und vergleichbare Ergebnisse zu erzeugen (Urwin und Maiden, 2003). Das Sequenzieren von meist sieben Haushaltsgenen ermöglicht das Erfassen phylogenetischer Zusammenhänge durch das Erstellen spezifischer Allelprofile (Sequenztypen) (Maiden *et al.*, 1998). In der Vergangenheit konnten mittels MLST zoonotische Organismen, Infektionsketten und evolutionäre Strukturen identifiziert werden (Urwin und Maiden, 2003). Diese Typisierungsmethode wurde beispielsweise angewandt, um einen bestimmten Ausbruchsstamm von *S. suis* in einer Provinz von China zu identifizieren (Lun *et al.*, 2007). Für die Spezies *S. gallolyticus* wurde 2013

ein MLST-Schema entwickelt, welches jedoch alle Subspezies miteinbezieht (Shibata *et al.*, 2014). Neben dem Identifizieren epidemiologischer Zusammenhänge wurde dieses System auch etabliert, um die Subspezies zu identifizieren und Vorhersagen hinsichtlich der Virulenz zu treffen (Shibata *et al.*, 2014). In dieser Publikation konnte keine pathogene Gruppierung innerhalb des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Clusters identifiziert werden. Allerdings wurden dieselben Allelprofile in Mensch und Tier identifiziert (Shibata *et al.*, 2014). Aufgrund der Diversität der einzelnen Subspezies hinsichtlich der Wirtsspezifität, der Pathomechanismen und der biochemischen Charakteristika, die sich auch in den potentiellen Transmissionswegen widerspiegeln können, ist dieses entwickelte spezies-spezifische MLST Schema nicht ausreichend. Initiale Analysen mit Hilfe eines subspezies-spezifischen MLST Schemas deuten ebenfalls auf eine Transmission zwischen Mensch und Tier hin. Basierend auf vier bisher etablierten Haushaltsgenen (*glgB*, *nifS*, *p20*, *uvrA*) wurden Allelprofile für 59 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme erstellt (Hinse, 2012). Diese verschiedenen Sequenztypen sind nicht nur in einer Spezies vertreten, sondern sind auch bei Human- und Tierisolaten identifiziert worden. Durch das Fehlen von Wirtsspezifitäten im Zusammenhang mit verschiedenen humanen und animalen Infektionen zeigen diese initialen Typisierungen der bakteriellen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Population ebenfalls eine potentielle Zoonose des Erregers an (Hinse, 2012).

#### **2.3.2.1.2 Epidemiologische Studien**

Zur Analyse epidemiologischer Fragestellungen stehen unterschiedliche Studiendesigns zur Verfügung. Die Verteilung einer Krankheit (deskriptive Epidemiologie) und die Assoziation zwischen einzelnen Krankheiten und den Risikofaktoren (analytische Epidemiologie) können mit Hilfe epidemiologischer Studien untersucht werden (Klug *et al.*, 2004). Korrelationsstudien (Längsschnittstudien), Querschnittsstudien (*Surveys*) und Fall-Kontrollstudien haben dabei eine wichtige Bedeutung (Klug *et al.*, 2004). In Abhängigkeit von der Fragestellung wird ein entsprechender Studientyp ausgewählt. Alle genannten Studientypen ermöglichen neben der Datenerhebung mit Hilfe eines Fragebogens (klassische Epidemiologie) das Sammeln biologischer Materialien wie z. B. Blut- oder Stuhlproben der Studienteilnehmer. Nach der Analyse der biologischen Materialien werden die Ergebnisse mit den erhobenen Daten in Verbindung gebracht (molekulare Epidemiologie) (Klug *et al.*, 2004). In einer analytischen Fall-Kontrollstudie erfolgt ein Vergleich der Probanden bezüglich verschiedener Risikofaktoren (Exposition). Die Definition der Fälle bzw. der Kontrollen erfolgt anhand einer vorliegenden bzw. nicht

vorliegenden Erkrankung oder eines anderen Ereignisses. Rückblickend (retrospektiv) erfolgt die Analyse der ursächlichen Exposition, indem Chancenverhältnisse (*Odds Ratios*; OR) ermittelt werden. Verschiedene Studien zum Ermitteln der Assoziation mit *S. bovis* und *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* sind beschrieben worden. Diese variieren jedoch in ihren Ergebnissen. Eine Metaanalyse determinierte ein erhöhtes Risiko für kolorektale Karzinome für Patienten mit *S. bovis* Biotyp I-induzierten infektiöse Endokarditiden (OR 3,72; 95 %-CI: 2,03-6,81) (Boleij *et al.*, 2011 a). Aufgrund der Heterogenität der eingeschlossenen Studien, die diskrepante Ergebnisse zeigten, ist diese Studie wenig aussagekräftig (Boltin *et al.*, 2015). Neue Indizien für geografische Unterschiede hinsichtlich der Kolonisation mit *S. bovis* Biotyp I resultierten aus einer Studie von 2015. Diese retrospektive, epidemiologische, klinische Studie zeigte durch den Vergleich von Versuchsteilnehmern unterschiedlicher spanischer Regionen (Atlantik, Mediterran, Stadt) eine regional bedingte Kolonisation der Bevölkerung mit *S. bovis* und einen potentiellen Zusammenhang mit engem Tierkontakt und der Ernährung auf. Ferner wurde eine erhöhte Mortalität durch kolorektale Karzinomen ländlichen Regionen beobachtet (Corredoira *et al.*, 2015). In der Rinderzucht- und Milchproduktionsregion leben die meisten Menschen in ländlichen Gebieten und im Vergleich zu den anderen beobachteten Regionen wird vorrangig Fleisch und wenig Gemüse verzehrt, was möglicherweise eine Transmission des Bakteriums vom Tier auf den Menschen fördern könnte. Jedoch konnte kein direkter Beweis für eine Zoonose durch *S. bovis* erbracht werden (Corredoira *et al.*, 2015). Dahingegen zeigte eine 17-jährige prospektive *Follow-up* Studie kein erhöhtes Risiko für fortgeschrittene oder nicht fortgeschrittene Kolonläsionen mit einer *S. bovis*-Grundkolonisation. In der Literatur fehlt häufig die Differenzierung von *S. bovis* in die Biotypen I und II und wird lediglich als separate Spezies geführt, sodass die Nachverfolgung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* erschwert wird. Demzufolge können keine eindeutigen Rückschlüsse auf ein zoonotisches Potential gezogen werden. Darüber hinaus fehlen eindeutige Angaben hinsichtlich der Kolonisation. Ein breites Spektrum (2,5 bis 15 %) für die Kolonisation der gesunden Normalbevölkerung ist angegeben worden. Des Weiteren ist die Kolonisation von Tieren zwar beschrieben worden, jedoch gibt es keine Prävalenzzahlen für die Besiedlung animaler Spezies. Ein vermehrter Kontakt zwischen Mensch und Tier sowie die Übertragung durch Lebensmittel wurde als potentielle Transmissionsquelle postuliert, bisher aber nicht bestätigt (Corredoira *et al.*, 2008, 2015; Giannitsioti *et al.*, 2007).

## 2.4 Zielsetzung der Arbeit

Das kommensale und fakultativ pathogene Bakterium *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* des menschlichen und tierischen Gastrointestinaltraktes kann in verschiedenen Spezies identische Krankheitsbilder hervorrufen. Bisher sind jedoch nur spekulative Transmissionswege und -quellen erläutert. Daher soll die Analyse des zoonotischen Potentials im Fokus dieser Arbeit stehen, sodass die von dem fakultativen Pathogen ausgehende Gefahr auf Mensch und Tier neu definiert wird. Zur Erhebung der Prävalenz in der Normalbevölkerung und zur Erfassung der Phylogenie in der bakteriellen Population soll zum einen eine *Real-Time* PCR zum Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Stuhl optimiert und zum anderen das subspezies-spezifische MLST-Schema komplettiert werden. Basierend auf diesen Methoden soll eine Fall-Kontrollstudie durchgeführt werden. In dieser Studie soll aus Stuhlproben das fakultative Pathogen molekulargenetisch erkannt, mit selektiver Kultivierung auf Tannin-Natriumazid-Trypton Soja-Agar isoliert und anschließend durch MALDI-TOF-MS (*matrix assisted laser desorption-time of flight mass spectrometry*) und *sodA*-Sequenzierung identifiziert werden. Ob eine Korrelation zwischen dem Auftreten eines bestimmten Stammes regional bedingt ist, soll analysiert werden, indem die gewonnenen Isolate mittels MLST charakterisiert werden. Die mit Hilfe der *Real-Time* PCR und MLST gewonnenen Daten sollen den Ergebnissen des Fragebogens der Fall-Kontrollstudie gegenübergestellt werden. Dabei sollen u. a. Alter und Geschlecht sowie Ernährungsgewohnheiten, Erkrankungen und der Tierkontakt erfragt werden. Exemplarisch soll der Kontakt zwischen Mensch und Tier über einen definierten Zeitraum mit den zuvor genannten Methoden charakterisiert werden. Diese Studien sollen einen Zusammenhang zwischen der Kolonisation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, den Lebensgewohnheiten und dem Ausbruch einer Erkrankung (z. B. infektiöse Endokarditis) aufzeigen. Phänotypische Charakterisierungen von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolaten sollen die potentiellen Transmissionswege des Gram-positiven Bakteriums stützen. Dabei sollen die Vitalität und Tenazität des Opportunisten experimentell bestimmt werden. Das Überleben in der Umwelt soll anhand des bakteriellen Titers in Stuhl, auf Polyesteroberflächen sowie im Trinkwasser nachgestellt werden. Die potentielle Transmission des Erregers über Milchprodukte vom Tier zum Menschen soll über einen nachgestellten Pasteurisierungsprozess sowie der Bestimmung der Vitalität in Milch definiert werden. Die sich anschließende Magenpassage und die Kolonisation des Darms soll durch das Testen der Vitalität bei verschiedenen pH-Werten überprüft werden. Zum Auslösen einer Infektion sind pathogene Eigenschaften eines Bakteriums von Bedeutung. Diese sollen anhand von *in vitro* Adhäsionsstudien an Kollagen I/IV untersucht werden.

### 3 Ergebnisse

Im Gastrointestinaltrakt von Mensch und Tier wurde *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* als Kommensale beschrieben. Während die Prävalenz des Bakteriums in der gesunden Mikroflora des Menschen bis zu 15 % betragen kann (Sillanpää *et al.*, 2009), ist diese im animalen Wirt nicht beschrieben. Ebenso sind dieselben Infektionen wie Sepsis, Meningitis und Endokarditis in Tieren wie im Menschen bekannt (Boleij und Tjalsma, 2013; Headings *et al.*, 1978; Sekizaki *et al.*, 2008). Dennoch konnten die Fragen zum Pathomechanismus, den Transmissionswegen und der potentiellen Zoonose nicht abschließend beantwortet werden. Diese Arbeit bezieht sich nicht nur auf die Endpunkte der Assoziation von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* mit IE oder kolorektale Karzinomen, sondern greift zentrale Faktoren auf, die dazu beitragen, ein Konzept der Übertragung zwischen Mensch und Tier zu erfassen.

Den Ausgangspunkt dieser Analysen stellt die Detektion des Bakteriums im Stuhl dar. Zur schnellen Erregeridentifizierung wurde eine *Real-Time* PCR etabliert, die es ermöglicht, aus komplexen Probenmaterialien *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zu identifizieren (Hinse, 2012). Die Untersuchung fäkaler Proben zum Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* stellt die Möglichkeit dar, die Prävalenz des Opportunisten im Darm zu bestimmen. Durch die sich anschließende Isolation des Bakteriums mit Hilfe eines Selektivmediums können die Transmissionswege näher charakterisieren werden. Die Geno- und Phänotypisierung der gewonnenen Isolate mittels *Multilocus Sequence Typing* bzw. der experimentellen Analyse tenazitärer Eigenschaften ermöglichen, Übertragungswege aufzuzeigen. Im Zusammenhang mit der analytischen Beobachtungsstudie kann somit ein zoonotisches Potential des fakultativen Pathogens bestimmt werden.

#### 3.1 Optimierung des molekularbiologischen und kulturbasierten Nachweises von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Fäzes

Um Aufschluss über die gastrointestinale Kolonisation und die Verbreitung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zu gewinnen, ist eine Identifizierung im Stuhl notwendig. Fäzes stellt eine komplexe Matrix unter anderem aus nicht resorbierten Nahrungsbestandteilen und gastrointestinalen Bakterien dar. Folglich kann die Probenzusammensetzung die direkte PCR-Testung durch das Vorhandensein von Inhibitoren (z. B. Gallensalze, komplexe Kohlenhydrate) (Holland *et al.*, 2000) aber auch die Isolation des potentiellen Zoonoseerregers aus Stuhl beeinträchtigen. Sowohl die Detektion als auch die Isolation des Bakteriums sollen dazu führen, die Prävalenz

im Gastrointestinaltrakt zu bestimmen und epidemiologische Zusammenhänge zu analysieren.

Daher war es ein Ziel dieser Arbeit, das entwickelte *Real-Time* PCR-System (Hinse, 2012) zu optimieren und ein Selektivmedium zur Isolation von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* aus Fäzes zu etablieren. Beide Methoden basieren auf der Tanninresistenz von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* durch die Gene *tanA* und *tanB*, welche die extrazellulären und zytosolischen Tannasen (Tanninacetylhydrolase, EC 3.1.1.20) kodieren. Durch diese Enzyme werden Gallotannine zu Gallussäure hydrolysiert (Hinse, 2012; Lin *et al.*, 2011; Osawa *et al.*, 1995; Rusniok *et al.*, 2010).

### **3.1.1 Optimierung der *Real-Time* PCR zum Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Stuhl**

Der molekulargenetische Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in fäkalen Proben erfolgt durch die Amplifikation eines *tanA*-Genfragments. Auch andere *Enterococcus*- und *Streptococcus*-Spezies exprimieren das Tanninacetylhydrolasegen. Diese weisen jedoch keine Sequenzhomologien mit dem *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Gen auf oder kommen nicht im Stuhl vor (Hinse, 2012). Des Weiteren sind die DNA-Sequenzen des *tanA*-Gens der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Subspezies stark konserviert und zu fast 100 % identisch (Hinse, 2012).

Zum Optimieren der Nachweismethode wurden zum einen die DNA-Extraktion und zum anderen der PCR-Reaktionsansatz optimiert. Ein Vergleich der DNA-Isolationsmethoden *PSP Spin Stool DNA Kit* (Invitex, Berlin, Deutschland) (s. 5.2.3) und der *NucliSENS easyMag*-Nukleinsäureextraktion (BioMérieux, Nürtingen) (s. 5.2.4) zeigte eine höhere Sensitivität der in der *Real-Time* PCR für die automatisiert (*NucliSENS easyMag*) gewonnenen DNA-Extrakte. Das PCR-System wurde optimiert, indem zur Detektion des Tannasegens eine *Minor-Groove-Binder* (MGB) Sonde in der *TaqMan*-PCR eingesetzt wurde. Diese *Real-Time* PCR basiert auf dem FRET-Mechanismus (*fluorescence resonance energy transfer*) (s. 5.2.7), wobei die 3'-MGB-Sonde stabiler und spezifischer an die Zielregion der DNA als nicht MGB-markierte Sonden bindet (Kutyavin *et al.*, 2000). Zum Überprüfen der Sequenzhomologien im Bereich der für die *Real-Time* PCR eingesetzten Oligonukleotide wurden die Primer *tanA1\_F* bzw. *tanA1\_R* zum Sequenzieren des *tanA*-Gens verschiedener *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme eingesetzt. In einem multiplen *Alingment* konnten eindeutige Sequenzhomologien der eingesetzten Stämme detektiert werden.

Die als interne Kontrolle verwendete Lambda-DNA stellte sich als weniger geeignet heraus, was sich durch stark divergierende *Cycle Threshold*-Werte ( $C_T$ -Werte) zeigte. Damit eine bessere Kontrolle der *Real-Time* PCR erfolgen kann, wurde daher eine heterogene interne Kontrolle (Cytomegalievirus (CMV)) erfolgreich eingesetzt. Dabei wurden geringere Variabilitäten der  $C_T$ -Werte und bessere Fluoreszenzsignale beobachtet.

### 3.1.1.1 Bestimmung der unteren Nachweisgrenze der quantitativen *Real-Time* PCR

Die analytische Sensitivität der *Real-Time* PCR-Methode wurde anhand der Nachweisgrenze determiniert. Diese wird angegeben als *Limit of Detection* (LOD) und wird als geringste Konzentration definiert, bei der die Detektionswahrscheinlichkeit 95 % beträgt (Bustin *et al.*, 2009).

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze der *Real-Time* PCR wurde zuerst eine *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-negative Stuhlsuspension hergestellt, indem ca. 3 g Stuhl in 20 ml PBS (*Phosphate Buffered Saline*) resuspendiert wurden. Eine analoge Suspension mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wurde erstellt, wobei diese mit 1117 koloniebildenden Einheiten (KBE)/ml inokuliert und anschließend geometrisch mit der negativen Stuhlsuspension bis zu 9 KBE/ml verdünnt wurde (Tab. 3.1). Die DNA-Extraktion der Stuhlsuspensionen erfolgte viermal automatisiert mittels *NucliSENS easyMag* (BioMérieux, Nürtingen) (s. 5.2.4).

In der nachgeschalteten *Real-Time* PCR konnte das *tanA*-Gen bei jeder eingesetzten Bakterienkonzentration detektiert werden. Bis zu einem Bakterientiter von 70 KBE/ml konnte von vier DNA-Extrakten, die in Doppelbestimmung in die PCR eingesetzt wurden, 100 % detektiert werden (Tab. 3.1). Basierend auf der Probit-Analyse wurde eine Nachweisgrenze von 51,4 KBE/ml errechnet (Tab. 3.1).

Diese Stuhl-*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-DNA-Extrakte wurden auch eingesetzt, um die Nachweisgrenze in zwei anderen *Real-Time* PCR Verfahren zu ermitteln. Zum einen wurde die *tanA-TaqMan*-PCR (Hinse, 2012) und zum anderen die *recN*-MGB-PCR (Lopes *et al.*, 2014) angewandt (s. 5.2.7). Dafür wurden die in der Publikation angegebenen Primer- und Sondenkonzentrationen eingesetzt und das PCR-Protokoll auf den *Rotor-Gene* angepasst (s. 5.2.7). Die Markierung der MGB-Sonde mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (FAM, VIC) ermöglicht die Identifikation und Differenzierung der Subspezies *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und *S. gallolyticus*

subsp. *pasteurianus* mittels *recN* (Lopes *et al.*, 2014). Die Vorbereitung der mit *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* versetzten Proben erfolgte wie zuvor mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* beschrieben. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.1 übersichtlich erfasst.

**Tabelle 3.1: Quantitative Analyse der Nachweisgrenze der *tanA*-MGB-, *tanA*- und *recN*-Real-Time PCR in Fäzes.**

[KBE/ml]	Anzahl positiv detektierter Proben (%)			
	<i>tanA</i> -MGB	<i>tanA</i> <sup>1</sup>	<i>recN</i> -FAM <sup>2</sup>	<i>recN</i> -VIC <sup>3</sup>
1117	8/8 (100)	8/8 (100)	8/8 (100)	6/8 (75)
559	8/8 (100)	8/8 (100)	8/8 (100)	6/8 (75)
279	8/8 (100)	8/8 (100)	8/8 (100)	6/8 (75)
140	8/8 (100)	3/8 (37,5)	8/8 (100)	6/8 (75)
70	8/8 (100)	7/8 (87,5)	8/8 (100)	6/8 (75)
35	6/8 (75)	0/8 (0)	7/8 (87,5)	6/8 (75)
17	7/8 (87,5)	0/8 (0)	8/8 (100)	6/8 (75)
9	3/8 (37,5)	0/8 (0)	7/8 (87,5)	5/8 (62,5)
LOD 95 % [KBE/ml]	51,4 (32,9- 22542,3)	-	-	-

<sup>1</sup> Hinse, 2012; <sup>2</sup> *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Detektion, Lopes *et al.*, 2014; <sup>3</sup> *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*-Detektion, Lopes *et al.*, 2014

In Stuhl war ein 100 %-iger Nachweis der jeweiligen Gene bis zu einem bakteriellen Titer von 279 KBE/ml möglich. Bis zur geringsten eingesetzten Konzentration von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (und *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*) konnten bei allen eingesetzten Matrizen Fluoreszenzsignale mit den jeweiligen Oligonukleotidsystemen detektiert werden, wobei eine Reduktion der Anzahl positiver Proben nicht kontinuierlich zu beobachten war. Eine Ausnahme stellte die *tanA*-PCR dar. Während bei 140 und 70 KBE/ml ein Fluoreszenzsignal zu detektieren war, erfolgte bei geringeren eingesetzten Bakterienkonzentrationen (< 70 KBE/ml) kein positiver Nachweis. Eine Nachweisgrenze mit der Probit-Analyse konnte somit nicht festgelegt werden (Tab. 3.1).

Sowohl für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* als auch für *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* konnte eine stetige Detektion der DNA aus inokulierten Proben erfolgen. Aufgrund der fast gleichbleibenden Anzahl positiv detektierbarer fäkaler DNA-Proben war ein Ermitteln einer Nachweisgrenze nicht möglich (Tab. 3.1).

### 3.1.1.2 Beeinflussung der Spezifität der *Real-Time* PCR

Die Sensitivität der PCR-Diagnostik wird beeinflusst durch Inhibitoren und von unspezifischer ko-extrahierter DNA anderer Darmbakterien (Holland *et al.*, 2000; Vollmer *et al.*, 2010 b). Deshalb wurde die Spezifität der *tanA-Real-Time* PCR überprüft, indem zum einen der Einfluss der Amplifikation der internen Kontrolle (CMV) auf das *tanA*-Gen und zum anderen die Kreuzreaktion des Tanninacetylhydrolase-kodierenden Gens mit anderen Bakterien überprüft wurde.

Ein Vergleich der *Real-Time* PCR-Ansätze zum einen mit und zum anderen ohne CMV, diente dem Nachweis der Unabhängigkeit der *tanA*-Detektion von der internen Kontrolle. Dabei wurden die zum Ermitteln der LOD-Werte hergestellten DNA-Eluate in Doppelbestimmung als Matrize in die PCR eingesetzt. Sowohl bei dem Ansatz mit als auch ohne CMV, konnten für die einzelnen Konzentrationen gleiche  $C_T$ -Werte ermittelt werden (Tab. 3.2).

**Tabelle 3.2:  $C_T$ -Werte der *tanA*-Detektion in Abhängigkeit von der amplifizierten internen Kontrolle.**

[KBE/ml]	CT-Wert	
	Ansatz mit CMV-DNA	Ansatz ohne CMV-DNA
1117	29,35; 29,97	29,84; 29,60
559	30,67; 29,94	30,24; 29,76
279	27,88; 28,37	28,04; 27,97
140	32,86; 33,55	34,57; 33,06
70	31,92; 31,04	32,49; 30,49
35	31,57; 31,95	33,13; 33,25
17	negativ; 32,34	33,13; 33,25
9	36,99; 36,62	36,54; 36,22
Positivkontrolle	27,16	26,05
Negativkontrolle	negativ	negativ

Zum Testen der analytischen Spezifität dieser molekulargenetischen Analyseverfahren wurden genomische DNA-Extrakte der aus Stuhlproben isolierten Stämme *Enterococcus* (*E.*) *faecalis*, *E. flavus*, *E. avium*, *Aerococcus* (*A.*) *viridans* und *E. aquimarinus* sowie die Stämme *Streptococcus* (*S.*) *mutans* DSM 20523, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* DSM 15351 und *E. coli* ATCC 25922 als *Template* (1:100 und 1:1000 verdünnt) für die *Real-Time* PCR eingesetzt und mit der Detektion des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolates ATCC BAA-2069 verglichen. Dabei konnte das *tanA*-Gen des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolates

in jeder Reaktion detektiert werden. Eine Detektion möglicher kreuzreagierender Bakterien konnte nicht beobachtet werden (Tab. 3.3).

**Tabelle 3.3: Testung der analytischen Spezifität der *tanA*-Real-Time PCR mit potentiellen kreuzreaktiven Erregern.**

Kontrollgruppe	<i>tanA</i> (FAM-Kanal)	CMV (Cy5-Kanal)
<i>E. faecalis</i>	-	+
<i>E. flavus</i>	-	+
<i>E. avium</i>	-	+
<i>A. viridans</i>	-	+
<i>E. aquimarinus</i>	-	+
<i>S. mutans</i> DSM 20523	-	+
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-	+
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	+
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i> DSM 15351	-	+

### 3.1.2 Selektion von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* aus Fäzes

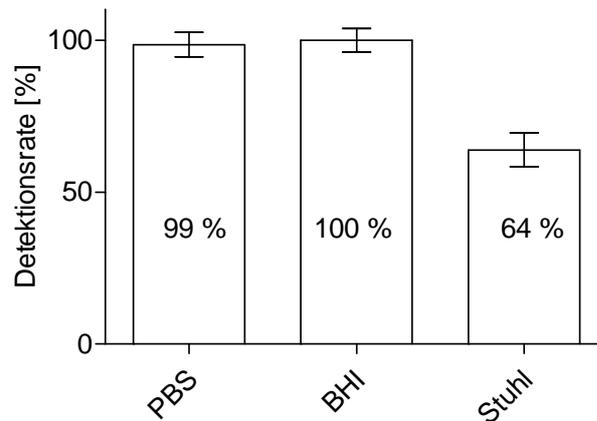
*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ist ein Kommensale des Gastrointestinaltraktes (Sillanpää *et al.*, 2009). Aufgrund der Zusammensetzung des Darmmikrobioms ist für die Selektion dieses Gram-positiven Bakteriums aus Stuhlproben ein Selektivmedium erforderlich. In Kooperation mit dem Institut für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover wurde ein Medium entwickelt (s. 6.5), welches es ermöglicht, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* von anderen gastrointestinalen Bakterien zu separieren. Die Eignung des Selektivmediums wurde durch quantitative und qualitative Analysen von Putenkot aus 18 verschiedenen ökologisch gehaltenen Tierbeständen aus Nord-, Ost- und Süddeutschland geprüft. Die Puten waren zum Beprobungszeitraum (Spätsommer, Herbst, Winter) vier bis 18 Wochen alt. Von fünf homogenisierten Einzelkotproben eines Tierbestandes (insgesamt 90 Proben) wurden 2 g Fäzes in 4 ml PBS suspendiert und auf dem modifizierten Trypton Soja-Agar (TSA) mit einem Dreiösenausstrich ausgestrichen bzw. zur bakteriellen Titerbestimmung ausplattiert (s. 5.1.5) (Schulz *et al.*, 2015). 82 Proben wurden für die qualitative (n = 26) und quantitative (n = 56) Bestimmung ausgewertet. Das Wachstum anderer Gram-positiver Bakterien wurden durch die Tanninzugabe unterdrückt, während Gram-negative Bakterien des Darmmikrobioms durch das Hinzufügen von Natriumazid (0,25 g/l) zum TSA gehemmt wurden (Lichstein und Snyder, 1941; Schulz *et al.*, 2013, 2015). Die Expression der zytosolischen und extrazellulären Tannasen unterscheidet *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* von anderen Streptokokken-Spezies (Osawa *et al.*, 1995; Schlegel *et al.*, 2003). Diese können die

dem TSA zugesetzte Tanninsäure (5 g/l) nicht hydrolysieren (Osawa *et al.*, 1995; Schlegel *et al.*, 2003). Diese zusätzliche Modifikation des Mediums ermöglichte es, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* aus fäkalen Proben zu isolieren (Schulz *et al.*, 2013, 2015).

Nach zweitägiger Inkubation bei 37 °C unter 5 % CO<sub>2</sub> wurden jeweils fünf Einzelkolonien auf Columbia Agar bei 37 °C aerob subkultiviert. Die mikroskopisch und biochemisch als *S. bovis* Biotyp I determinierten Bakterien wurden im Rahmen dieser Arbeit durch Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS, *matrix assisted laser desorption-time of flight mass spectrometry*) und Sequenzierung des Superoxidsismutasegens bis zum Subspezieslevel bestimmt (s. 5.3 und 5.4). Dabei konnte *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in allen beprobten Tierbeständen detektiert werden, wobei 82 von insgesamt 90 Proben positiv getestet wurden. Daraus resultierte eine Detektionsrate von 91 % in Puten. Neben *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* konnten auch andere Spezies auf dem Medium kultiviert werden (Mischkulturen). Nachdem Ausschluss dieser Mischkulturen bzw. von Proben mit einer nicht adäquaten Bakterienanzahl (< 10 KBE/ml; > 400 KBE/ml) konnten zur Quantifizierung des Gram-positiven Streptokokken in Putenfäzes 39 von 56 ausplattierten Proben verwendet werden. Es konnte eine fäkale Last von  $1,1 \times 10^4$  bis  $1,6 \times 10^6$  KBE/g (Mittelwert:  $3,6 \times 10^5$  KBE/g) nachgewiesen werden (Schulz *et al.*, 2015). Zur Genotypisierung mittels *Multilocus Sequence Typing* wurden 82 Isolate eingesetzt (s. 3.3.3).

Darüber hinaus wurde die Nachweisgrenze des Selektivmediums in humanem Stuhl bestimmt. Dafür wurde eine Stuhlsuspension hergestellt, indem 1 g *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-negativer Stuhl mit 100 µl einer  $1 \times 10^{-4}$  verdünnten Übernachtskultur des Stammes ATCC BAA-2069 inokuliert wurde. Die Stuhlprobe wurde anschließend in 900 µl PBS resuspendiert. Damit die prozentuale Wiederfindungsrate des Bakteriums determiniert werden konnte, wurden 900 µl PBS bzw. BHI-Medium ebenfalls mit 100 µl der verdünnten Übernachtskultur versetzt. Die Suspensionen wurden zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten auf Tannin-Natriumazid-TSA bzw. auf nicht modifiziertem TSA ausplattiert (s. 5.1.5) und in Dreifachbestimmung ausplattiert. Neben *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* konnten auch andere Bakterienspezies, die sich morphologisch von dem zu untersuchenden Pathogen unterschieden, auf dem modifizierten Medium wachsen. Daher wurden die gewachsenen Kolonien auf Tannin-Natriumazid-TSA massenspektrometrisch identifiziert (s. 5.4), um den Einfluss anderer Bakterien, wie z. B. *Lactobacillus plantarum*, auf die KBE/ml zu vermeiden. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.1 erfasst. In dem Balkendiagramm wurde die Detektionsrate in Prozent [%] gegen die eingesetzten

Matrizes (BHI, PBS, Stuhl) aufgetragen. Von den eingesetzten  $1,42 \times 10^6$  KBE/ml resultierten  $1,41 \times 10^6$  KBE/ml nach zweitägiger Kultivierung der mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* inokulierten BHI- bzw. PBS-Lösung, was einer 100 %-igen Wiederfindungsrate entspricht. Aus der mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-inokulierten Stuhlprobe konnten  $9,14 \times 10^5$  KBE/ml detektiert werden. Somit konnten 64 % des eingesetzten Isolates nach der Kultivierung auf Tannin-Natriumazid-TSA aus humanem Fäzes detektiert werden (Abb. 3.1).



**Abbildung 3.1: Bestimmung der Nachweisgrenze des Selektionsmediums zur Kultivierung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*.** 1 g Stuhl bzw. 900 µl PBS/BHI-Medium wurden mit 100 µl Bakterien (ca.  $1 \times 10^6$ ) versetzt. Der inokulierte Stuhl wurde in 900 µl PBS suspendiert, auf modifiziertem und nicht-modifiziertem Medium ausplattiert und bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert (s. 5.1.2). Der Bakterientiter der Übernachtskultur wurde als 100 % definiert. Der Versuch wurde in drei biologischen und drei technischen Replikaten durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

### 3.2 Molekulargenetische Charakterisierung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolaten

Selektierte *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate verschiedenen Ursprungs, aus verschiedenen Isolationsquellen aus unterschiedlichen Regionen sollen in dieser Arbeit mittels MLST (*Multilocus Sequence Typing*) typisiert werden. Basierend auf der Bestimmung von Nukleotidsequenzen von Haushaltsgenen können evolutionäre Strukturen und Infektionsketten erkannt werden (Maiden, 2006; Urwin und Maiden, 2003). Interne DNA-Fragmente von in der Regel sieben Haushaltsgenen, die eine Länge von etwa 500 bp aufweisen, werden amplifiziert, sequenziert und analysiert (Maiden, 2006). Jeder einzigartigen Sequenzvariation eines Gens wird eine spezifische Allelnummer zugeordnet. Die Kombination der Allelnummern (Allelprofil) der einzelnen

Gene eines Stammes wird dann zu dem sogenannten Sequenztyp (ST) zusammengefasst (Maiden *et al.*, 1998). Mit diesen Allelprofilen und den zugehörigen bakteriellen Stamminformationen (z. B. Ursprung, Isolationsquelle) können *online*-Datenbanken (www.pubmlst.org, www.mlst.net) zum globalen Austausch generiert werden. Epidemien können dadurch besser überwacht und schneller erfasst werden. In diesen Datenbanken gibt es aktuell 102 MLST-Schemata (Stand 08/2015).

### 3.2.1 MLST zur Typisierung *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

In dieser Arbeit wurde das begonnene Projekt (Hinse, 2012) der Etablierung eines MLST-Schemas zur Typisierung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* fortgeführt. Zuvor waren die Gene *glgB* (Glykogen-verzweigendes Enzym), *nifS* (Cystein-Desulfurase), *p20* (Acyl-Coenzym A N-Acyltransferase) und *uvrA* (Excinuklease ABC-Untereinheit A) vollständig etabliert worden (Hinse, 2012). Basierend auf den entwickelten Primersystemen wurde die Etablierung des MLST-Schemas zur Klassifizierung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* aufgebaut. Die Oligonukleotide sind das Resultat aus einem Vergleich aus den zu dem Zeitpunkt (2012) publizierten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Genomen. Der Genomvergleich wurde mit der EDGAR Software (Blom *et al.*, 2009) durchgeführt, um gemeinsame Gene zu identifizieren. Aus dem sich ergebenden Genpool wurden 22 Haushaltsgene auf Grund der Variabilität, der Länge (etwa 500 bp) oder der Verwendung in anderen MLST-Schemata selektiert. In Anlehnung an eine andere Publikation (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006) wurden für die Variabilität der Gene Primersysteme ausgewählt, die eine Differenz von 2 bis 4,5 % in den Allelen aufwiesen. Für diese Kandidatengene wurden 22 Oligonukleotidsysteme konstruiert und an neun sich in der *sodA*-Gensequenz und im genetischen Fingerabdruck unterscheidenden *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolaten getestet (Hinse, 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Gene *aroE* (Shikimat-5-Dehydrogenase), *tkt* (Transketolase) und *trpD* (Anthranilat-Phosphoribosyltransferase) mittels Temperaturgradienten-PCR etabliert und im Folgenden mit der gleichen *Annealing*-Temperatur amplifiziert wie *glgB*, *nifS*, *p20* und *uvrA*. Dabei konnten die zu erwartenden Amplifikatgrößen von *aroE* mit 596 bp, *tkt* mit 550 bp und *trpD* mit 643 bp detektiert werden. Weiterhin wurden durch einen multiplen Sequenzvergleich die *Trimming*sequenzen bestimmt. Anhand dieser 20 bp langen Sequenzen, die in maximal einem Basenpaar variierten, wurden die Bereiche des Sequenzvergleiches der Gene definiert, die in die MLST-Analyse einfließen.

In Anlehnung an die Richtlinien (Maiden, 2006) für die Entwicklung eines MLST-Schemas wurden für die finale Typisierungsmethode 101 Stämme in die Analysen integriert. Es wurden die zuvor etablierten sieben Loci aus der chromosomalen DNA von 101 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Stämmen mit den Oligonukleotidsystemen für die Haushaltsgene *aroE*, *glgB*, *nifS*, *p20*, *tkl*, *trpD* und *uvrA* amplifiziert. Diese Amplifikate wurden sequenziert, verglichen und mit Hilfe der Software *BioNumerics* 6.6 im Bereich der vordefinierten *Trimming*sequenzen analysiert. Die *Trimming*sequenzen sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

**Tabelle 3.4: *Trimming*sequenzen für die Analyse der Sequenzen in *Bionumerics* 6.6 (Dumke et al., 2014).**

Gen	<i>Trimming</i> sequenzen Start 5'-3'	<i>Trimming</i> sequenzen Stopp 5'-3'	Produktgröße [bp]
<i>aroE</i>	CTGGATAAACAGCGATAGAT	CACCATTAACACCCGTTTTA	458
<i>glgB</i>	ATCCGCTTGGGATGAGTTGG	CTGATATCATGATGATTGCT	491
<i>nifS</i>	AGGTTTTCCAGCTTTTGATGAA	AACGATGATGTGTTTGCCATA	738
<i>p20</i>	GCTGGTTTTCCACCTGCAGA	CGCACAAGGAAAACGTTGTG	394
<i>tkl</i>	TTCTATGGCTGTCGGACTAGC	CGGAGCTCCACTCGGTGCTGA	441
<i>trpD</i>	C TTGATAAGTAAACTGATGT	CCTGATTTTGATGAAACCGA	418
<i>uvrA</i>	ACCTTTGACGTTAAATGAGA	GCCACCAAATCACCTGCA	517

Die für die Etablierung der Typisierungsmethode erhaltenen Ergebnisse der 101 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme sind in Tabelle 3.5 dargestellt. Des Weiteren wurden die dazugehörigen Allelprofile und diese Daten bereits publiziert (Dumke et al., 2014) und in der *Online*-Datenbank PubMLST hinterlegt. Diese MLST-Daten sind ebenfalls in Abschnitt 3.3.3 miteingegangen, um das zoonotische Potential des Bakteriums zu untersuchen.

Zusammengefasst wurden 14 bis 22 verschiedene Allele in jedem Locus identifiziert und ergaben im Durchschnitt 16,9 Allele in jedem internen Fragment. Dabei umfassten die polymorphen Positionen einen Bereich von 3,12 % bis 10,53 % und lieferten insgesamt  $1,3 \times 10^{10}$  Genotypen. Die durch die Haushaltsgene erhaltene Trennschärfe des MLST-Schemas wurde durch den *Simpson's Index of Diversity* (SID) bestimmt. Eine hohe Differenzierung der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Population wurde durch einen SID von 0,84 (95 %-Konfidenzintervall [CI]; 0,735-0,931) demonstriert. Ein Verhältnis von nicht-synonymen zu synonymen Nukleotidveränderungen ( $d_N/d_S$ ) lieferte

einen Wert  $< 1$ , sodass für die sieben gewählten Gene keine positive Selektion vorlag. Um die Populationsstruktur zu beurteilen, wurde der Assoziationsindex ( $I_A$ ) berechnet. Dafür wurde das Ausmaß der Rekombination zwischen den involvierten Sequenzen und der detektierten Assoziation zwischen den Allelen verschiedener Loci quantifiziert (Curran *et al.*, 2004). Es wurde ein  $I_A$ -Wert von 2,4 ermittelt, sodass eine signifikante Kopplung eines Ungleichgewichtes vorlag. Das heißt, dass die sieben Allele bei 101 analysierten Isolaten nicht unabhängig in der Population vorlagen. Ein Überblick zu diesen ermittelten Parametern ist in Tabelle 3.5 gegeben.

**Tabelle 3.5: Eigenschaften der verwendeten Haushaltsgene in der analysierten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Population mit 101 Isolaten (Dumke *et al.*, 2014).**

Gen	Locus tag	Genfunktion	Allele	SID <sup>1</sup>	CI (95 %) <sup>2</sup>	$d_N/d_S$ <sup>3</sup>	variable Positionen	
							Anzahl	[%]
<i>aroE</i>	SGGBAA2069_c13440	Shikimat-5-Dehydrogenase	15	0,830	0,735-0,860	0,2971	24	5,24
<i>glgB</i>	SGGBAA2069_c07540	Glykogen verzweigendes Enzym	14	0,815	0,822-0,889	0,0519	27	5,50
<i>nifS</i>	SGGBAA2069_c13360	Cystein-Desulfurase	19	0,854	0,788-0,867	0,0618	23	3,12
<i>p20</i>	SGGBAA2069_c04560	Acyl-CoA N-Acyltransferase	22	0,911	0,892-0,931	0,1566	34	8,63
<i>tkt</i>	SGGBAA2069_c21090	Transketolase	15	0,827	0,813-0,895	0,0534	15	3,40
<i>trpD</i>	SGGBAA2069_c05200	Anthranilat-Phosphoribosyltransferase	16	0,855	0,760-0,869	0,0758	44	10,53
<i>uvrA</i>	SGGBAA2069_c18560	Excinuklease ABC Untereinheit A	17	0,798	0,778-0,882	0,0353	38	7,35

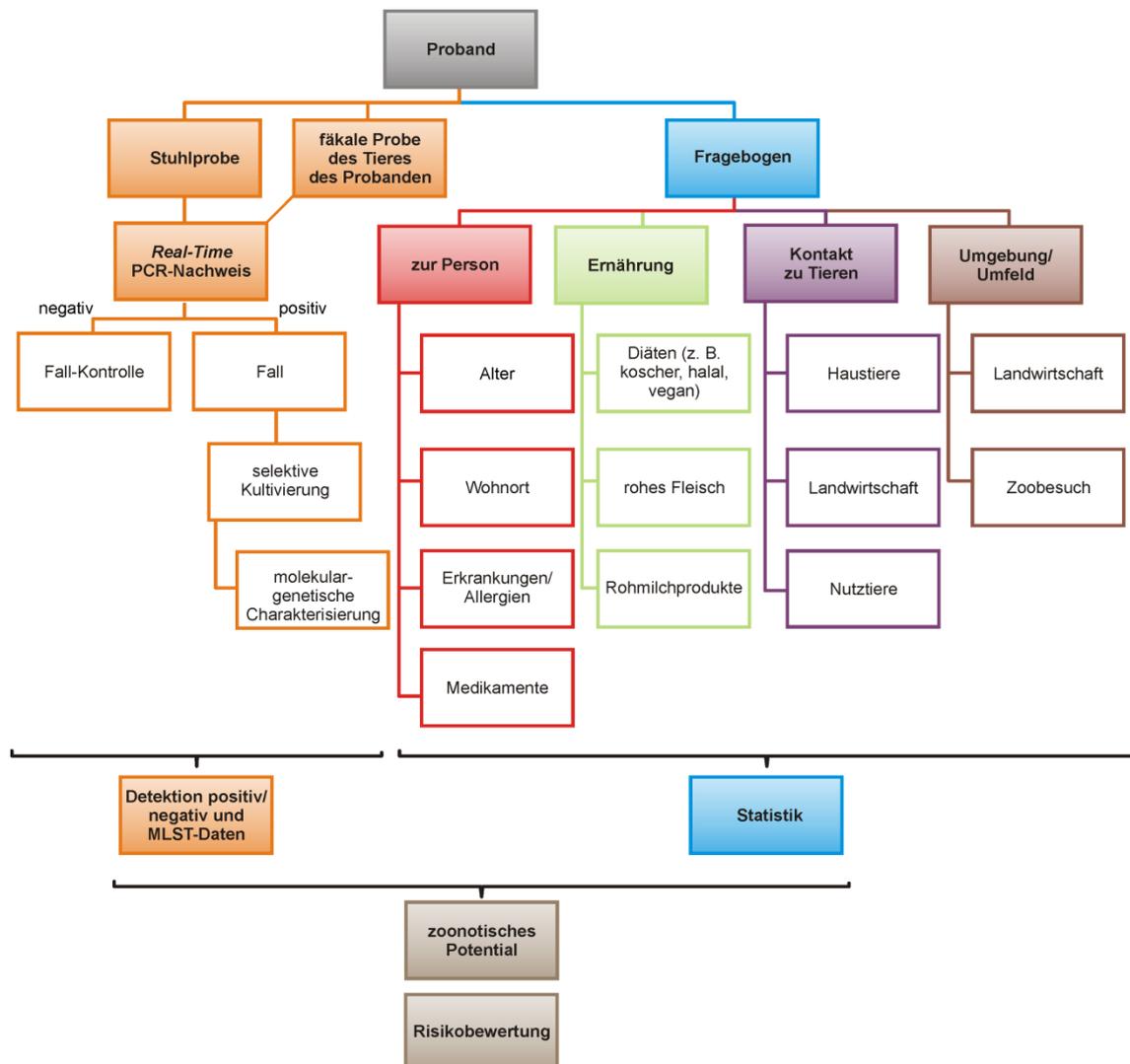
<sup>1</sup> Simpson's Index of Diversity; <sup>2</sup> Verhältnis der nicht-synonymen ( $d_N$ ) zu den synonymen Nukleotidveränderungen ( $d_S$ ); <sup>3</sup> Konfidenzintervall

Dieses etablierte subspezies-spezifische MLST-Schema stellt die Basis für folgende phylogenetische Analysen dar (s. 3.3.3).

### 3.3 Fall-Kontrollstudie

Obwohl bereits potentielle Zoonosen mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* beschrieben wurden, konnte noch kein eindeutiges Resultat erzielt werden. Dabei können sowohl direkte als auch indirekte Transmissionswege fokussiert werden.

Die Übertragungswege und -quellen sollen anhand einer Fall-Kontrollstudie im Rahmen dieser Arbeit näher betrachtet werden. Die kulturelle und molekulargenetische Analyse der fäkalen Proben der Versuchsteilnehmer zur Identifikation von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* soll zusammen mit einem Fragebogen eine Korrelation zu Tierhaltung, Tierkontakt, Ernährung und weiteren Lebensumständen herstellen. Zusätzlich sollen Prävalenzdaten in der Bevölkerung erhoben werden, um Rückschlüsse auf die tatsächliche Kolonisationsrate zu ziehen. Weiterhin sollen Proben von Personen mit engem Tierkontakt sowie von deren Tieren und von deren Umgebung analysiert werden. Die Daten der molekularen epidemiologischen Studie sollen durch die Analyse der phylogenetischen Zusammenhänge mittels MLST und genomischem *Fingerprinting* (ERIC-PCR, *enterobacterial repetitive intergenic consensus*) gestützt werden. Dadurch sollen fundamentale Zusammenhänge zwischen der Kolonisation von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und geografischen Bezügen, Ernährungsbedingungen und gegebenenfalls auch Infektionen hergestellt werden können. Somit soll das zoonotische Potential, sowie Transmissionsquellen und -wege und die Risikobewertung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ermittelt werden können (s. 5.5). Die Arbeitsschritte der Studie sind in Abbildung 3.2 erfasst. Um einen genaueren Einblick zum Umfang des Fragebogens zu erhalten, ist dieser im Anhang aufgeführt (s. Anhang, 10.1.1).



**Abbildung 3.2: Arbeitsablauf der Fall-Kontrollstudie.** Die von den Versuchsteilnehmern abgegebenen Stuhlproben (sowie tierische fäkale Proben sofern vorhanden) wurden kulturell und molekulargenetisch untersucht. Die in der *Real-Time* PCR positiv detektierten Proben wurden als Fall definiert und anschließend kultiviert, um *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zu isolieren und mittels MLST zu charakterisieren. Die erhaltenen Daten des integrierten Fragebogens wurden statistisch ausgewertet und den *Real-Time* PCR- und Kulturergebnissen gegenübergestellt, um Zusammenhänge zwischen den individuellen Faktoren, dem Tierkontakt, und der Darmbesiedlung mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zu identifizieren und die potentielle Gefahr auf den Menschen zu determinieren (s. 5.5).

### 3.3.1 Probandencharakteristika

Bei der im Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen durchgeführten Fall-Kontrollstudie haben innerhalb von 34 Monaten 135 Probanden teilgenommen. Neben der Einverständniserklärung und einem ausgefüllten Fragebogen wurden zusätzlich Stuhlproben abgegeben/per Post eingesandt (s. 5.5). Diese wurden eingesetzt, um *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* molekulargenetisch und kulturell zu identifizieren (s. 5.2.7 und 5.1.2). Aufgrund des Fehlens eines ausgefüllten Fragebogens oder einer

Stuhlprobe, erfüllten zwei Probanden die Einschlusskriterien nicht (s. 5.5.2), sodass diese von der Studie ausgeschlossen wurden. Die erhobenen Daten der Studienteilnehmer wurden pseudonymisiert, indem Fall-Kontrollstudiennummern zugeordnet wurden. In allen folgenden Analyseschritten wurden jeweiligen Resultate der Analyse der Stuhlproben sowie die Daten des Fragebogens zu den jeweiligen Versuchsteilnehmer mit dieser Nummer angegeben. Die Kodierung der Nummern erfolgte zusätzlich mit einer Bezifferung durch Buchstaben. Dabei steht das „H“ für die Patienten des HDZ NRW und das „M“ für Patienten des Darmkrebszentrums in Minden.

An der Fall-Kontrollstudie haben demnach 133 Probanden aus Nord- und Westdeutschland teilgenommen. Insgesamt wurden sechs Patienten des HDZ NRW, die an einer infektiösen Endokarditis erkrankt waren, 13 Patienten aus dem Darmkrebszentrum in Minden und 115 freiwillige Probanden in die Fall-Kontrollstudie eingeschlossen. Von den insgesamt 65 Männern und 69 Frauen lag das Durchschnittsalter bei  $48,64 \pm 16,51$  Jahren.

Von allen Probanden wurden die Stuhlproben molekulargenetisch mittels *Real-Time* PCR auf Vorhandensein von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* untersucht und aus positivem Probenmaterial wurden mittels selektiver Kultivierung auf Tannin-Natriumazid-TSA die Isolate gewonnen. Die kultivierten Bakterien wurden auf Blutagar subkultiviert und anschließend wurde die Spezies und Subspezies mittels MALDI-TOF-MS (s. 5.4) und *sodA*-Sequenzierung (s. 5.3) bestimmt. Die positiven Blutkulturen der Endokarditispatienten konnten als *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (5) bzw. *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* identifiziert (2) werden.

### 3.3.2 Prävalenz von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im humanen Stuhl

Inwieweit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zum normalen Darmmikrobiom des Menschen gehört ist bisher unbekannt. Daher wurde die Kolonisationsrate mit den zuvor etablierten und den optimierten Methoden ermittelt, sodass die mikrobielle Kultivierung zusammen mit der molekulargenetischen Analyse zu einem genaueren Resultat führte.

Mit Hilfe der *tanA-Real-Time* PCR (s. 5.2.7) wurden insgesamt 64 von 133 Stuhlproben (48,12 %) positiv auf *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Stuhl getestet (Tab. 3.6). Eine signifikante Reduktion der Detektionsrate von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bei einer Antibiotikaeinnahme im letzten halben Jahr vor der Teilnahme an der

Beobachtungsstudie wurde ermittelt (OR 0,24; 95 %-CI: 0,10-0,60;  $p = 0,003$ ) (s. 3.3.2.3). Daher wurden für die Erhebung der Prävalenz von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in der Normalbevölkerung die Probanden ausgeschlossen, die eine Antibiotikatherapie im Fragebogen angegeben hatten. Des Weiteren wurde ein Proband als gesund angesehen, wenn weder eine infektiöse Endokarditis noch eine gastrointestinale oder sonstige Erkrankung vorlag. Von insgesamt 96 gesunden Versuchsteilnehmern konnten 56,25 % positiv auf das *tanA*-Gen getestet werden (Tab. 3.6).

**Tabelle 3.6: Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in humanen Stuhlproben aus der Fall-Kontrollstudie durch selektive Kultivierung und *tanA*-Real-Time PCR.**

		Anzahl der Probanden (Prozent)		
		gesamt	ohne Antibiotikatherapie	
			gesamt	gesund
		133	107	96
<i>tanA</i> -Real-Time PCR	positiv	64 (48,12 %)	57 (53,27 %)	54 (56,25 %)
	negativ	69 (51,88 %)	50 (46,73 %)	42 (43,75 %)
selektive Kultivierung	positiv	5 (3,76 %)	3 (2,80 %)	3 (3,13 %)
	negativ	128 <sup>A</sup> (96,24 %)	104 <sup>B</sup> (97,20 %)	93 <sup>B</sup> (96,87 %)

<sup>A</sup> 4 positiv für *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*; <sup>B</sup> 3 positiv für *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*

Im Vergleich dazu konnten insgesamt fünf *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate mittels selektiver Kultivierung gewonnen werden. Diese Isolate stammten von den Versuchsteilnehmern FKS\_002\_H, FKS\_030, FKS\_032, FKS\_098 und FKS\_117 (Tab. 3.7). Von den Probanden FKS\_022\_M, FKS\_045, FKS\_110 und FKS\_133 konnten *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*-Isolate gewonnen werden (Tab. 3.7). Bei der Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten der selektierten Subspezies konnten für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* 60 bis  $1,55 \times 10^4$  KBE/ml (FKS\_098 bzw. FKS\_117) detektiert werden (Tab. 3.7). Mischkulturen wurden beim Determinieren der Bakterienanzahl ausgeschlossen. In der folgenden Tabelle 3.7 sind die selektierten Isolate mit den dazugehörigen laufenden Nummern des Studienteilnehmers, den jeweiligen Stammbezeichnungen und den Mittelwerten der KBE/ml aufgelistet.

**Tabelle 3.7: Anzahl der koloniebildenden Einheiten der jeweiligen *S. gallolyticus*-Subspezies auf Tannin-Natriumazid-TSA.**

Nummer	Stuhlkultur	Stamm	Mittelwerte [KBE/ml]
FKS_002_H <sup>A</sup>	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 1092	3,35 x 10 <sup>3</sup>
FKS_030	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	-	Mischkultur <sup>B</sup>
FKS_032	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 1323	Mischkultur <sup>B</sup>
FKS_098	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 1329	6 x 10 <sup>1</sup>
FKS_117	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 1332	1,55 x 10 <sup>4</sup>
FKS_133	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	HDZ 1340	1,24 x 10 <sup>4</sup>
FKS_110	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	HDZ 1331	4,3 x 10 <sup>1</sup>
FKS_045	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	HDZ 1328	Mischkultur <sup>B</sup>
FKS_022_M <sup>A</sup>	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	HDZ 1159	Mischkultur <sup>B</sup>

<sup>A</sup> Antibiose; <sup>B</sup> neben *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* *Enterococcus faecalis* oder *Lactobacillus plantarum* kultiviert

Ein Vergleich der molekulargenetischen Ergebnisse mit der Kultur zeigte vorrangig Übereinstimmungen an. Vier der infektiösen Endokarditis-Patienten mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in der Blutkultur konnten trotz einer Antibiose als *tanA*-positiv detektiert werden. Dabei konnte aus einer Stuhlprobe (FKS\_002\_H) auch das kausative Agens (HDZ 1092) isoliert werden (Tab. 3.7).

Durch den signifikanten Effekt der Antibiose auf das Darmmikrobiom die Detektion des Bakteriums im Stuhl, wurden im Folgenden nur Studienteilnehmer ohne Antibiose aufgeführt.

Obwohl das Tanninacetylhydrolase-kodierende Gen in der *Real-Time* PCR nachgewiesen werden konnte, wurde bei der Kultivierung der Stuhlproben der Studienteilnehmer FKS\_045 (HDZ 1328) und FKS\_133 (HDZ 1340) *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* identifiziert. Bei den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-kulturpositiv identifizierten Stuhlproben FKS\_032 (HDZ 1323), FKS\_098 (HDZ 1329) und FKS\_117 (HDZ 1132) stimmten die Ergebnisse der kulturellen und *Real-Time* PCR-basierten Methode überein. Das in der Kultur selektierte und als *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* identifizierte Isolat (FKS\_110/HDZ 1331) zeigte kein Signal in der *Real-Time* PCR.

Bei den Probanden FKS\_004\_H (*tanA*-positiv, Blutkultur, HDZ 1140; Antibiose), FKS\_005 (*tanA*-positiv, kulturnegativ), FKS\_007 (*tanA*-positiv, kulturnegativ), FKS\_008 (*tanA*-positiv, kulturnegativ) und FKS\_010 (*tanA*-positiv, kulturnegativ) wurden zusätzlich zu den humanen Proben auch Fäzesproben von Hühnern und Pferden analysiert. Die Exkremente der Hühner des Studienteilnehmers FKS\_008 wurde mittels

PCR positiv auf *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* getestet. Die Selektion dieser auf Tannin-Natriumazid-TSA war negativ. Die Hühnerproben der anderen Versuchsteilnehmer (sowie die Probanden selbst) stammten von einem Legehennenbetrieb. Aus diesen fäkalen Proben konnten ebenfalls *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate gewonnen werden. Der Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Exkrementen von Pferden konnte nicht erbracht werden. In Abschnitt 3.3.3.1 wird auf den Zusammenhang zwischen den Legehennen und den Besitzern dieses Betriebes genauer eingegangen.

Insgesamt betrachtet konnten bei den Probanden ohne Antibiotikatherapie im Vergleich zur selektiven Kultivierung auf Tannin-Natriumazid-TSA, bei der 2,80 % von 107 Stuhlproben als *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* positiv identifiziert wurden, wurden mit Hilfe der *Real-Time* PCR 57,27 % positive fäkale Proben positiv getestet. Ein molekulargenetischer Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*tanA*) in der Normalbevölkerung konnte in 56,25 % von 96 Stuhlproben erfolgen.

### 3.3.2.1 Follow-up Studie

Im Beobachtungszeitraum wurden acht Probanden (ein infektiöser Endokarditispatient, sieben gesunde Versuchsteilnehmer) mehrfach (zwei- bis dreimal) auf die Kolonisation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* untersucht (Tab. 3.8). Die Kennzeichnung der wiederholten Probenanalyse erfolgte durch die Indizes „\_2“ bzw. „\_3“. Die Stuhlproben der Versuchsteilnehmer wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgegeben (Tab. 3.8).

Während bei den initialen Analysen im November 2014, Dezember 2014 bzw. Januar 2015 bei den Probanden FKS\_032, FKS\_098 bzw. FKS\_117 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* kultiviert werden konnte, waren die folgenden Stuhlproben im März und Juli negativ (Tab. 3.8). Die Ergebnisse der molekulargenetischen Analyse zeigten hingegen, dass alle Proben bis auf die dritte Stuhlprobe des Probanden FKS\_117, positiv auf *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* getestet werden konnten. Wie auch bei dem Studienteilnehmer FKS\_117 konnte bei der dritten Probe des Probanden FKS\_004\_H keine Detektion des *tanA*-Gens erfolgen. Weiterhin konnte bei den Probanden FKS\_010 und FKS\_043 zu beiden Zeitpunkten (April 2013 und Juli 2015 bzw. November 2014 und März 2015) *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nachgewiesen werden. Erst in der Folgeanalyse wurde bei den Probanden FKS\_075 und FKS\_110 der fakultativ pathogene Erreger detektiert. Dabei konnte beide Male aus der Kultur der Probe FKS\_110 *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* identifiziert werden (Tab. 3.8).

**Tabelle 3.8: Ergebnisse der *Real-Time* PCR und Kultivierung der Stuhlproben aus der *Follow-up* Studie.**

Nummer	Blutkultur	Stuhlkultur	<i>tanA</i>	Datum Probennahme
FKS_004_H	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	-	+	März 2013
FKS_004_2H	n. g.	-	+	Dezember 2013
FKS_004_3H	n. g.	-	-	Juni 2015
FKS_010	n. g.	-	+	April 2013
FKS_010_2	n. g.	-	+	Juni 2015
FKS_032	n. g.	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	+	November 2014
FKS_032_2	n. g.	-	+	März 2015
FKS_032_3	n. g.	-	+	Juli 2015
FKS_043	n. g.	-	+	November 2014
FKS_043_2	n. g.	-	+	März 2015
FKS_075	n. g.	-	-	Dezember 2014
FKS_075_2	n. g.	-	+	März 2015
FKS_098	n. g.	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	+	Dezember 2014
FKS_098_2	n. g.	-	+	März 2015
FKS_098_3	n. g.	-	+	Juli 2015
FKS_110	n. g.	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	Dezember 2014
FKS_110_2	n. g.	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	+	März 2015
FKS_117	n. g.	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	+	Januar 2015
FKS_117_2	n. g.	-	+	März 2015
FKS_117_3	n. g.	-	-	Juli 2015

n. g.: nicht getestet, +: positiv; -: negativ, H: HDZ NRW

### 3.3.2.2 Vergleich der verschiedenen *Real-Time* PCR Methoden zur Detektion von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in humanen Stuhlproben

Im Zusammenhang mit dem *S. bovis*/*S. equinus*-Komplex wurde eine *recN*- und *gyrB*-basierte *Real-Time* PCR beschrieben (Lopes *et al.*, 2014). Zur Identifikation und Differenzierung der *S. gallolyticus*-Subspezies *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* wurde die Sonde zur Detektion des *recN*-Gens mit FAM bzw. VIC markiert (Lopes *et al.*, 2014). Dieses System wurde zusätzlich zur

optimierten *tanA-Real-Time* PCR angewandt, um die Stuhlproben aus der Fall-Kontrollstudie zu analysieren (s. 5.2.7). Für den Vergleich der PCR-Methoden wurden nur die Probanden ohne Antibiotikatherapie (107) herangezogen. In Tabelle 3.9 ist eine Übersicht des Vergleiches der *Real-Time* PCR-Analyseergebnisse dargestellt.

Von 107 Stuhlproben konnten mit dieser Methode 62 positiv auf das Vorhandensein von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* getestet werden. Dabei stimmen 48 getestete Proben mit den *tanA*-Ergebnissen überein. Außerdem wurden zehn Proben nur mit der *tanA*- und 15 mit *recN-Real-Time* PCR nachgewiesen. Von den zehn zusätzlich *tanA*-positiv getesteten Stuhlproben wurden mittels *recN-Real-Time* PCR drei als *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* detektiert, wobei in einem Fall das *recN-VIC*-Ergebnis durch ein Kulturoislat bestätigt wurde. Insgesamt konnten durch diesen zweiten Fluoreszenzfarbstoff zehn Signale detektiert werden (Tab. 3.9).

**Tabelle 3.9: Vergleich der analytischen Sensitivität der *recN*- bzw. *tanA-Real-Time* PCR im Zusammenhang mit der selektiven Kultivierung der Stuhlproben.**

	gesamt		gesund	
	positiv	negativ	positiv	negativ
<i>tanA</i>	57 (53,27 %)	50 (46,73 %)	54 (56,25 %)	42 (43,75 %)
<i>recN-FAM</i> <sup>A</sup>	62 (57,94 %)	45 (42,06 %)	60 (62,50 %)	36 (37,50 %)
<i>recN-VIC</i> <sup>B</sup>	10 (9,35 %)	97 (90,65 %)	9 (9,38 %)	87 (90,62 %)
selektive Kultivierung	3 <sup>A/B</sup> (2,80 %)	104 (97,20 %)	3 <sup>A/B</sup> (3,13 %)	93 (96,87 %)

<sup>A</sup> *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* <sup>B</sup> *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*; <sup>A/B</sup> Lopes et al., 2014

Eine Gegenüberstellung der Kultur- und der beiden *Real-Time* PCR-Resultate ist in Tabelle 3.10 dargestellt. Bei dem Vergleich wurden nur die Ergebnisse aufgeführt, bei denen ein Blut- oder Stuhlkulturoislat oder bei denen divergente Ergebnisse vorlagen. Fluoreszenzsignale, die entweder mittels *tanA*- oder *recN*-PCR erzielt wurden, wurden hier nicht dargestellt.

In der Tabelle 3.10 zeigt sich, dass die Blut- und Stuhlisolate mit den PCR-Ergebnissen bei fünf von zwölf Probanden übereinstimmten und somit sowohl *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* als auch *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* zu 41,67 % eindeutig detektiert wurden. Dahingegen waren sieben Ergebnisse diskrepant zwischen dem kulturellen und molekulargenetischen Nachweis (fett hervorgehoben). Einmal wurde *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* selektiert und in beiden molekulargenetischen *Screening*-Methoden das Vorhandensein von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* angezeigt

(FKS\_045). Weiterhin stimmte das Resultat von FKS\_030 aus der Stuhlkultur mit der Detektion von *tanA* überein, jedoch wurde ebenfalls ein Fluoreszenzsignal für *recN*-VIC (*S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*) nachgewiesen. Dasselbe molekulargenetische Ergebnis konnte auch für die FKS\_115-(kulturnegative) Stuhlprobe gezeigt werden. Bei drei Probanden (FKS\_051, FKS\_066, FKS\_110\_2) wurde ein positives Signal sowohl für *tanA* als auch für *recN*-FAM und *recN*-VIC angezeigt. Nur für den Probanden FKS\_110\_2 lag ein Kulturergebnis (*S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*) vor (Tab. 3.10).

**Tabelle 3.10: Vergleich der Kultur- und Real-Time PCR Ergebnisse.**

Nummer	Blutkultur	Stuhlkultur	<i>tanA</i>	<i>recN</i> -FAM <sup>A</sup>	<i>recN</i> -VIC <sup>B</sup>
FKS_003_H	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	-	+	+	-
FKS_030	n. g.	<b><i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i></b>	+	-	+
FKS_032	n. g.	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	+	+	-
FKS_045	n. g.	<b><i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i></b>	+	+	-
FKS_051	n. g.	-	+	+	+
FKS_066	n. g.	-	+	+	+
FKS_098	n. g.	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	+	+	-
FKS_110	n. g.	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	+
FKS_110_2	n. g.	<b><i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i></b>	+	+	+
FKS_115	n. g.	-	+	-	+
FKS_117	n. g.	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	+	+	-
FKS_133	n. g.	<b><i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i></b>	+	-	+

<sup>A</sup> *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* <sup>B</sup> *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*; <sup>A/B</sup> Lopes *et al.*, 2014; n. g.: nicht getestet, +: positiv, -: negativ, H: HDZ NRW; **fett**: diskrepante Ergebnisse

### 3.3.2.3 -Auswertung der Fragebögen der Fall-Kontrollstudie

*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wurde im Gastrointestinaltrakt von Mensch und Tier als Kommensale aber auch als Pathogen identifiziert (Boleij und Tjalsma, 2013). Die Frage der Übertragung zwischen Mensch und Tier und der Übertragungsquellen von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ist bislang noch nicht geklärt (Hogg und Pearson, 2009). Deshalb soll ein integrierter Fragebogen in der Fall-Kontrollstudie neben

allgemeinen Informationen zur Person (z. B. Alter, Geschlecht, Wohnort) potentielle Risikofaktoren (Ernährungsgewohnheiten, Kontakt zu Tieren) aufgreifen. Die Auswertung der erhobenen Daten soll es ermöglichen, eine Korrelation zwischen dem positiven Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und den potentiellen Expositionen herzustellen.

Die anhand der *tanA*- und *recN*-Real-Time PCR erzielten Ergebnisse dienten als Basis für die Definition von Fällen und Fall-Kontrollen. Von insgesamt 133 hatten 28 Probanden ein Antibiotikum innerhalb des letzten halben Jahres eingenommen. Ein *Odds Ratio* von 0,24 (CI: 0,10-0,60;  $p = 0,003$ ) zeigte an, dass eine Nichteinnahme von Antibiotika innerhalb der letzten sechs Monate vor der Studienteilnahme die Detektionsrate von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Stuhl signifikant verminderte. Daher wurden diese Versuchsteilnehmer nicht in die Auswertung der Fragebögen einbezogen. Ein positiver Befund von 67,29 % von 107 Probanden in beiden Analysemethoden definierte 72 Fälle. Ein negativer Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* führte folglich zu 35 Fall-Kontrollen. Das mittlere Alter betrug  $45,9 \pm 15,3$  Jahre für die Fälle und  $49,6 \pm 14,5$  Jahre für die Kontrollen (Tab. 3.11). An der Fall-Kontroll-Studie hatten etwa gleichviele Männer (51) und Frauen (56) teilgenommen. Diese waren in den Fällen (männlich: 35, weiblich 37) und Kontrollen (männlich: 16, weiblich 19) gleichmäßig verteilt (Tab. 3.11).

**Tabelle 3.11: Fall- und Fall-Kontroll- sowie *Follow-up*-Charakteristika.**

	Fälle	Kontrollen	<i>Follow-up</i>
<b>Gesamt</b>	72	35	8
<b>Alter [Jahre]</b>	$45,9 \pm 15,3^A$	$49,6 \pm 14,5^A$	$36,75 \pm 12,67^A$
> 50 Jahre	32	19	$54,33 \pm 4,04$
≤ 50 Jahre	40	16	$32,75 \pm 7,5$
<b>Geschlecht</b>			
männlich	35	16	6
weiblich	37	19	2

<sup>A</sup> Standardabweichung

Fall-Kontrollstudien werden anhand der deskriptiven Statistik ausgewertet. Die Assoziation zwischen einer *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Detektion und einem potentiellen Risikofaktor, die Stärke und Richtung des Effektmaßes (*Odds Ratio*/Chancenverhältnis) wurde anhand von Kreuztabellen mit der *Software* SPSS-Version 23 berechnet. Die ermittelten absoluten (beobachten) Häufigkeiten sind im

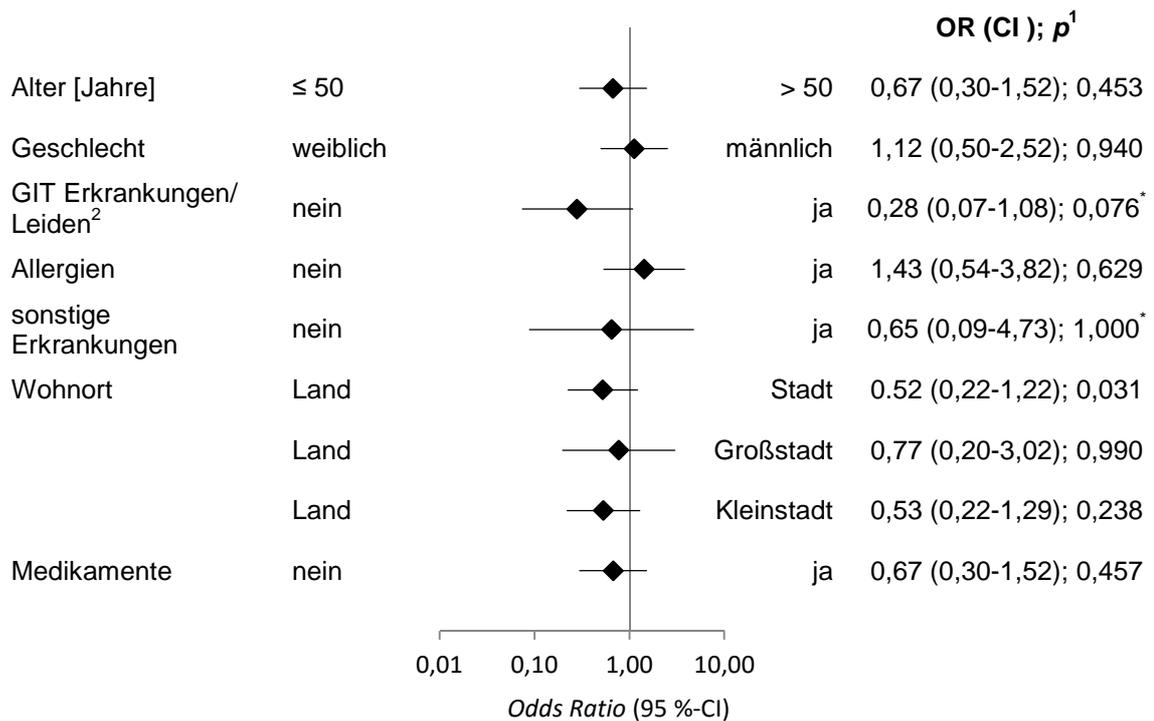
Anhang aufgeführt (s. 10.1.2). Die *Odds Ratios* der Charakteristika und die potentiellen Risikofaktoren (Kontakt zu Tieren, Ernährung) und deren Einfluss auf den Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Stuhl sind in den Abbildungen 3.3 bis 3.5 zusammengefasst.

Das Testen des Einflusses des Alters und des Geschlechts zeigte eine geringe Risikotendenz mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* kolonisiert zu sein bei männlichen Probanden und Versuchsteilnehmern unter 50 Jahren. Jedoch lag kein signifikantes Ergebnis vor (Abb. 3.3).

Von 107 Studienteilnehmern konnten folgende Krankheitsbilder beobachtet werden: einmal eine infektiöse Endokarditis, zehnmal gastrointestinale Erkrankungen/Leiden (9,3 %; u. a. Tumore, Polypen, Colitis ulcerosa, Reizdarmsyndrom, Morbus Crohn und Hämorrhoidalleiden), 28-mal Allergien (u. a. Hausstaub, Pollen, Formaldehyd, Insektenstiche) und viermal wurden sonstige Erkrankungen (3,7 %; Neurodermitis, Asthma) angegeben. Gastrointestinale Erkrankungen/Leiden und Neurodermitis bzw. Asthma führten zu einem *Odds Ratio* kleiner als eins. Diese Aspekte wiesen darauf hin, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* tendenziell eher in gesunden Probanden identifiziert werden konnte als in Erkrankten. Diese Beobachtungen waren nicht signifikant (Abb. 3.3).

Die fortwährende oder regelmäßige Einnahme von Medikamenten wie beispielsweise blutdrucksenkende Mittel (z. B.  $\beta$ -Blocker), Schmerzmittel (z. B. Ibuprofen, Paracetamol) und Hormone (Kontrazeptiva, L-Thyroxin) zeigten einen OR von 0,67 (CI: 0,30-1,52), wodurch eine Kolonisation mit dem Gram-positiven Pathogen wahrscheinlicher war, wenn keine Medikation des Probanden vorlag. Dies war durch die fehlende Signifikanz nur eine Risikotendenz (Abb. 3.3).

Das Verhältnis der Probanden, die in der Stadt oder auf dem Land leben, zeigte an, dass mehr Menschen in Groß- oder Kleinstädten (64) (mehr als 100.000 bzw. 10.000 bis 100.000 Einwohner) als in ländlichen Regionen (43) (bis 10.000 Einwohner) lebten. Ein Chancenverhältnis von 0,52 (CI: 0,22-1,22) wies auf ein potentiell vermindertes Risiko hin, wenn sich der Wohnort nicht auf dem Land befand. Beim Differenzieren dieser Variable in Großstadt/Land und Kleinstadt/Land, wiesen die *Odds Ratios* ebenfalls darauf hin, dass ein Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* eher zu beobachten war, wenn der Wohnsitz in einem ländlichen Gebiet war (Abb. 3.3).

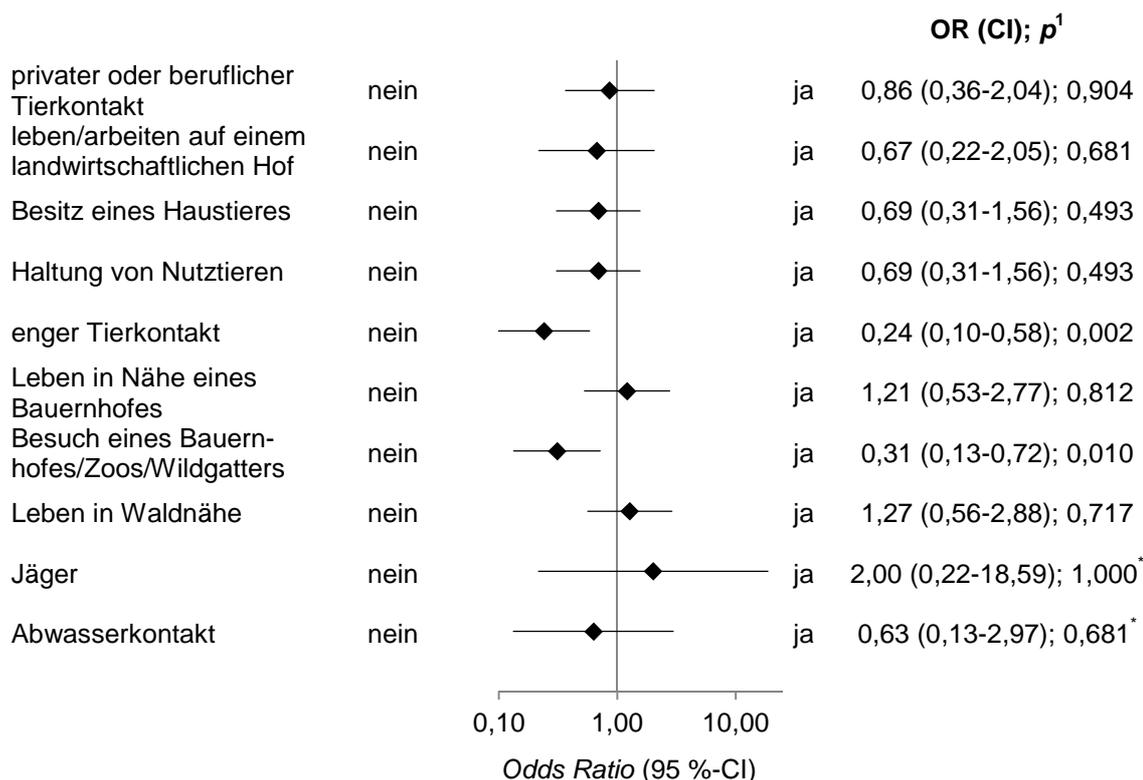


**Abbildung 3.3: Potentielle Risikofaktoren für die Kolonisation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*.** Es sind die Probandencharakteristika (Alter, Geschlecht, Angaben zum Wohnort, Gesundheitsstatus, Einnahme von Medikamenten) dargestellt. Die Unabhängigkeit der einzelnen Variablen (Chi-Quadrat-Test;  $p$ ) von der Kolonisation von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und die Ausprägung des Effekts (*Odds Ratio*, OR) sowie ein 95 %-Konfidenzintervall sind dargestellt. Die x-Achse wurde logarithmiert. GIT: gastrointestinale Erkrankungen/Leiden, <sup>1</sup> Chi-Quadrat-Test,  $\alpha = 0,05$ ; Kontinuitätskorrektur nach Yates; <sup>2</sup> Fisher's-Exakt-Test; OR: *Odds Ratio*, CI: Konfidenzintervall (95 %); <sup>2</sup> aktuelle gastrointestinale Erkrankungen/Leiden: 7 (Morbus Crohn, Polypen, Colitis ulcerosa, Darmtumor, Hämorrhoiden, Reizdarmsyndrom); in der Vergangenheit: 2 (Darmtumor)

Ein beruflicher oder privater Kontakt zu Tieren, das Leben oder Arbeiten auf einem landwirtschaftlichen Hof sowie weitere Faktoren (s. Abb. 3.4) wiesen durch einen *Odds Ratio* kleiner eins auf eine Unabhängigkeit der Besiedlung des menschlichen Darmtraktes vom Tierkontakte hin ( $p > 0,05$ ) (Abb. 3.4). Ein Kontakt mit Kot oder Urin beispielsweise durch das Reinigen der Ställe oder durch die Nutzung der Exkremente als Dünger auf Feldern oder im Garten zeigten einen *Odds Ratio* kleiner eins an, dass diese Expositionsfaktoren potentiell keinen Einfluss auf die Kolonisation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* hatten (Abb. 3.5). Diese Ergebnisse waren nicht signifikant (Abb. 3.4 und 3.5). Die berechneten *Odds Ratios* für einen engen Tierkontakt (streicheln der Tiere, Kontakt zu Tierspeichel, Tierkot oder -urin) (OR 0,24; CI 0,10-0,58;  $p = 0,002$ ) und der Besuch eines Zoos, Bauernhofes oder Wildgatters (OR 0,31; CI: 0,13-0,72;  $p = 0,010$ ) zeigten bei diesen Expositionsfaktoren eine signifikant seltenere Detektion des Bakteriums in Stuhl an. Dementsprechend konnte

ein enger Kontakt zwischen Mensch und Tier sowie der Besuch eines Tierparks als Risikofaktor ausgeschlossen werden (Abb. 3.4).

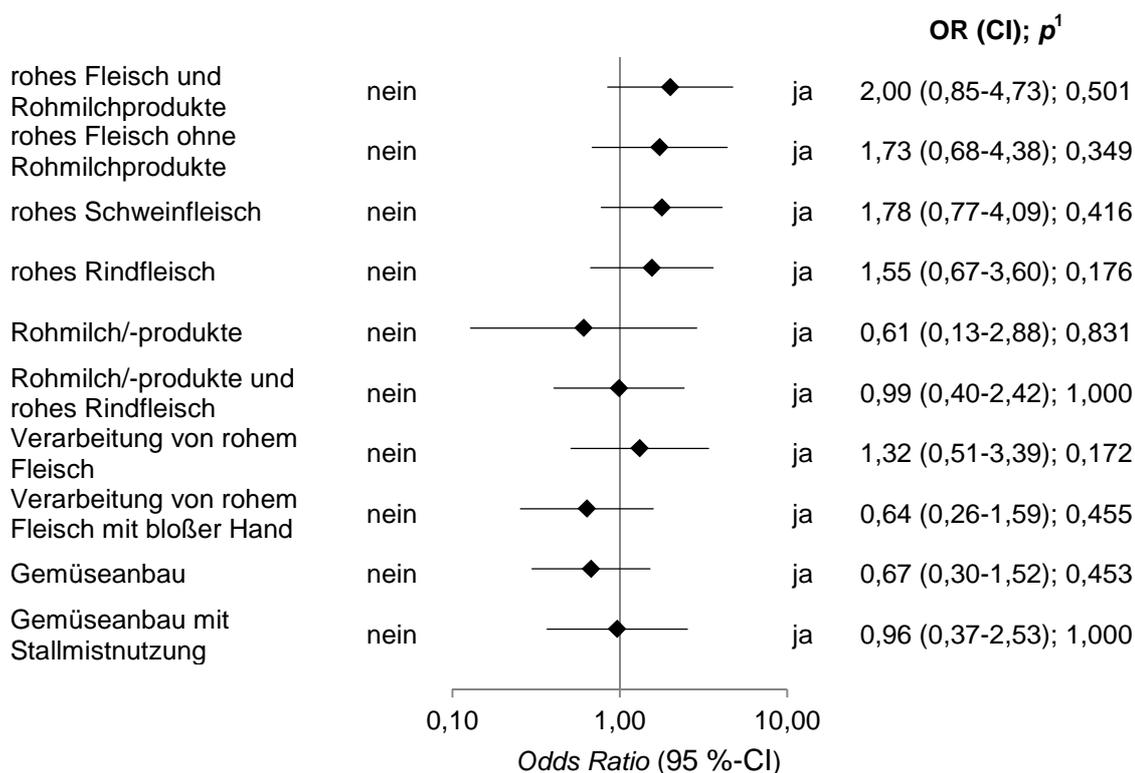
Ein erhöhtes Risiko konnte bei Jägern und für das Leben in der Nähe eines Waldes oder eines Bauernhofes detektiert werden. Da diese Expositionsfaktoren keine Signifikanz aufwiesen, sind diese als Risikotendenz zu werten (Abb. 3.4).



**Abbildung 3.4: Assoziation des Tierkontaktes mit der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Kolonisation des humanen Gastrointestinaltraktes.** Es wurden die Odds Ratios der einzelnen Variablen des Tierkontaktes aufgetragen sowie die Abhängigkeit der einzelnen Variablen mittels Chi-Quadrat-Test berechnet. Die x-Achse wurde logarithmiert. <sup>1</sup> CI: Konfidenzintervall (95 %), OR: Odds Ratio, Chi-Quadrat-Test,  $\alpha = 0,05$ ; <sup>\*</sup> Fisher's Exakt-Test

Von 72 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* positiven Probanden gaben 54 an sowohl rohes Fleisch (Rind, Schwein) als auch Rohmilch und Rohmilchprodukte zu sich genommen zu haben, während 25 nur rohes Fleisch ohne Rohmilchprodukte konsumierten (s. Anhang, Tab. 10.2). Das bedeutet, dass eine Tendenz zum Risiko sowohl hinsichtlich des Konsums von beiden Nahrungsmitteln als auch beim alleinigen Konsum von rohen Fleischprodukten vorlag (Abb. 3.5). Die Ernährung mit rohem

Rindfleisch und Rohmilchprodukten wurde 21-mal im Fragebogen von exponierten Probanden angegeben, während vier den alleinigen Konsum von Rohmilchprodukten bestätigten (s. Anhang, Tab. 10.2). Ein alleiniger Rohmilchkonsum (OR 0,61; CI: 0,13-2,88) wies auf einen potentiellen Ausschluss als möglichen Risikofaktor hin (Abb. 3.5). In diesem Zusammenhang konnte auch beobachtet werden, dass die Verarbeitung von rohem Fleisch im Haushalt mit einem OR über eins auf einen potentiellen Risikofaktor hinwies (Abb. 3.5).



**Abbildung 3.5: Zusammenhang der Ernährung mit der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Kolonisation des humanen Gastrointestinaltraktes.** Die Abhängigkeit der einzelnen Variablen des Ernährungsaspektes mit der Präsenz von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* mittels Chi-Quadrat-Test berechnet. Die Odds Ratios der einzelnen Merkmalsausprägungen der Ernährungsgewohnheiten, die als potentielle Risikofaktoren der Transmission zwischen Mensch und Tier in Betracht gezogen werden, sind dargestellt. Ein Konfidenzintervall von 95 % wurde festgelegt. Die x-Achse wurde logarithmiert. <sup>1</sup> CI: Konfidenzintervall (95 %), OR: Odds Ratio, Chi-Quadrat-Test,  $\alpha = 0,05$ ; \* Fisher's Exakt-Test

Zusammenfassend, zeigte die Betrachtung einzelner Variablen, dass ein enger Tierkontakt sowie der Besuch eines Zoos oder landwirtschaftlichen Hofes signifikant als Risikofaktoren für die Kolonisation des humanen Gastrointestinaltraktes mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ausgeschlossen werden könnten.

Da häufig multiple Expositionen zur Ausprägung einer Erkrankung oder eines Ereignisses führen, wurde deren Relevanz mit Hilfe der logistischen Regression überprüft. Diese statistische Analyse ermöglicht, den Effekt einer Variablen bezüglich einer anderen Variablen zu adjustieren, um eine Verzerrung eines *Odds Ratios* zu reduzieren (Kleinbaum und Klein, 2010).

Die zuvor betrachteten Einzelfaktoren wurden im Folgenden kombiniert, um den gemeinsamen Einfluss dieser Variablen auf die Kolonisation mit dem fakultativen Pathogen zu ermitteln. Dafür wurden unterschiedliche Modellsysteme aufgestellt. Dabei erfolgte einerseits die Betrachtung aller definierten Fälle und Kontrollen (A) und andererseits erfolgte die Betrachtung von Altersgruppen ( $\leq 50$  (B) und  $> 50$  Jahre (C)) (Tab. 3.12 und 3.13). In die Analyse wurden die Expositionsfaktoren eingeschlossen, die zum einen mit einer Tendenz (Modell 1 A-C) zur Kolonisation des Gastrointestinaltraktes mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* durch eine mögliche Transmission einhergingen und zum anderen die Möglichkeit der Kolonisation reduzierten (Modell 2 A-C).

In den aufgestellten Modellen (Tab. 3.12 und 3.13) konnte kein signifikanter Einfluss des Geschlechts auf die Präsenz von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* gezeigt werden. Bei der simultanen Betrachtung dieser Expositionsfaktoren mit der Kolonisation des Darms durch den fakultativen Pathogen konnte eine Risikotendenz beobachtet werden.

Der Konsum von rohem Fleisch (Rind, Schwein) und Rohmilchprodukten zeigte eine Risikotendenz in den Modellen 1 A bis 1 C an, wobei ein alleiniger Konsum von rohem Schweinefleisch tendenziell als Risiko ausgeschlossen werden konnte (Tab. 3.12). Ein potentiell erhöhtes Risiko mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* kolonisiert zu sein, konnte bei dem Verzehr von rohem Rindfleisch in der Gesamtpopulation (1 A; OR 1,64; CI: 0,35-7,70) sowie bei den über 50-Jährigen (1 C; OR 15,88; CI: 0,589-422,41) beobachtet werden. Die Verarbeitung des rohen Fleisches führte bei über 50-Jährigen zu einer Risikotendenz, mit dem fakultativen Pathogen kolonisiert zu sein (OR 2,67; CI: 0,48-14,81; Modell 1 C Tab. 3.12).

Die *Odds Ratios* für das Wohnen in der Nähe eines landwirtschaftlichen Betriebes (1 A bis 1 C) sowie das Leben in der Nähe eines Waldes (1 A bis 1 B) zeigten ein tendenziell erhöhtes, jedoch nicht signifikantes Risiko auf. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass ein Wohnort auf dem Land als potentieller Risikofaktor hervorging, der für unter 50-Jährige einen signifikanten *Odds Ratio* von 0,12 (CI: 0,02-0,77,  $p = 0,025$ ) ergab.

**Tabelle 3.12: Modell 1 A-C der multiplen logistischen Regressionsanalyse für potentielle Risikofaktoren für die Transmission von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zwischen Mensch und Tier.**

potentieller Risikofaktor	Gesamt (1 A)	≤ 50 Jahre (1 B)	> 50 Jahre (1 C)
	OR (CI); $p^1$	OR (CI); $p^1$	OR (CI); $p^1$
Alter	1,02 (0,99-1,05); 0,319	-	-
Geschlecht	1,20 (0,48-3,00); 0,692	1,39 (0,33-5,81); 0,651	1,43 (0,35-5,76); 0,618
rohes Fleisch und/oder Rohmilchprodukte	2,81 (0,21-37,15); 0,433	2,79 (0,04-182,85); 0,631	37,79 (0,26-5426,89); 0,152
rohes Fleisch ohne Rohmilchprodukte	0,87 (0,14-5,31); 0,883	1,58 (0,08-30,13); 0,763	0,25 (0,01-5,23); 0,370
rohes Schweinefleisch	0,67 (0,08-5,71); 0,714	0,86 (0,04-16,49); 0,920	0,04 (<0,001-3,49); 0,159
rohes Rinderfleisch	1,64 (0,35-7,70); 0,530	0,79 (0,10-6,53); 0,826	15,88 (0,597-422,41); 0,099
rohes Rinderfleisch und Rohmilchprodukte	0,45 (0,05-3,94); 0,469	0,69 (0,02-24,17); 0,840	0,04 (<0,001-2,39); 0,125
Verarbeitung von rohem Fleisch	1,02 (0,34-3,07); 0,970	0,42 (0,07-2,62); 0,351	2,67 (0,48-14,81); 0,262
Leben in Nähe eines Bauernhofes	1,32 (0,49-3,52); 0,584	2,39 (0,47-12,18); 0,296	1,31 (0,28-6,23); 0,731
Waldnähe	1,31 (0,48-3,58); 0,602	5,68 (0,97-33,37); 0,055	0,57 (0,11-2,99); 0,504

<sup>1</sup> Odds Ratio, 95 %-Konfidenzintervall; Chi-Quadrat-Test,  $\alpha = 0,05$

Durch das Zusammenwirken potentieller Nicht-Risikofaktoren konnte im zweiten logistischen Regressionsmodell gezeigt werden, dass sowohl die beobachteten 107 Versuchsteilnehmer als auch die Gruppierung der unter 50-Jährigen eine Risikotendenz aufwiesen mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* kolonisiert zu sein, wenn ein beruflicher oder privater Tierkontakt bestand (Tab. 3.13, 2 A, 1 B). Der Anbau von Gemüse im Garten, ein enger Tierkontakt (streicheln und füttern von Tieren, Kontakt mit Tierexkrementen) sowie der Besuch eines Zoos oder landwirtschaftlichen Hofes zeigten Odds Ratios kleiner eins an (2 A bis 2 C), sodass diese Expositionsfaktoren keinen Einfluss auf die Transmission oder Kolonisation hatten oder zu einer Reduktion dieser Ausprägung führten. Diese Variablen konnten daher als potentielle Nicht-Risikofaktoren betrachtet werden. Diese Ergebnisse wiesen keine Signifikanz auf (Tab. 3.13, Modell 2 A bis 2 C).

**Tabelle 3.13: Modell 2 A-C der multiplen logistischen Regressionsanalyse potentieller Nicht-Risikofaktoren für die Transmission von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zwischen Mensch und Tier.**

potentieller Risikofaktor	Gesamt (2 A)	≤ 50 Jahre (2 B)	> 50 Jahre (2 C)
	OR (CI); $p^1$	OR (CI); $p^1$	OR (CI); $p^1$
Alter	1,03 (1,00-1,07); 0,052	-	-
Geschlecht	0,95 (0,37-2,43); 0,912	1,04 (0,22-4,84); 0,961	0,94 (0,26-3,38); 0,928
Wohnort (Stadt/Land)	0,42 (0,16-1,14); 0,090	0,12 (0,02-0,77); 0,025	1,08 (0,29-3,96); 0,910
privater oder beruflicher Tierkontakt	1,35 (0,47-3,86); 0,579	2,26 (0,44-11,70); 0,333	0,82 (0,19-3,55); 0,788
enger Tierkontakt	0,20 (0,04-1,08); 0,061	0,11 (0,01-2,06); 0,141	0,34 (0,03-3,40); 0,360
Besuch eines Bauernhofes/Zoos/Wildgatters	0,87 (0,18-4,10); 0,856	0,86 (0,06-12,43); 0,912	1,05 (0,146-7,49); 0,964
Gemüseanbau	0,59 (0,23-1,50); 0,266	1,08 (0,25-4,69); 0,916	0,33 (0,09-1,20); 0,093

<sup>1</sup> Odds Ratio, 95 %-Konfidenzintervall; Chi-Quadrat-Test,  $\alpha = 0,05$

Die simultane Beobachtung mehrerer potentieller Expositionsfaktoren zeigte, dass der Konsum von rohem Fleisch (Schwein, Rind) und Rohmilchprodukten, der Kontakt zu Tieren sowie das Leben in ländlichen Gebieten als potentielle Risikofaktoren für die Kolonisation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* fungierten. In der jüngeren Gruppierung konnte das Leben auf dem Land als signifikanter Risikofaktor identifiziert werden.

### 3.3.3 Analyse der Epidemiologie von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* mittels MLST-Analyse

Zur Typisierung der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Population wurden das zuvor etablierte subspezies-spezifische MLST-Schema angewandt (s. 3.2.1). Dies soll die Möglichkeit bieten, die Transmissionwege des Darmbakteriums zu identifizieren und das zoonotische Potential aufzuklären.

In die Analyse wurden insgesamt 250 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate eingeschlossen, wobei bereits ein großer Teil der MLST-Daten (205 Isolate) in verschiedene Publikationen eingegangen ist (Dumke *et al.*, 2014, 2015; Schulz *et al.*, 2015). In diesem Kollektiv waren unter anderem sieben Isolate aus der Fall-Kontrollstudie, fünf klinische Isolate aus einer Kooperation mit der Ruhr-Universität Bochum (Abteilung: medizinische Mikrobiologie) und weitere 116 Tierisolate aus der Zusammenarbeit mit der tiermedizinischen Hochschule Hannover in die

epidemiologische Analyse integriert. Es wurden insgesamt 65 humane, 177 animale, sechs Isolate aus der Umwelt und zwei Isolate unbekanntem Ursprungs analysiert.

Durch die Anwendung des MLST-Schemas auf die 250 Isolate konnten 16 (*glgB*) bis 23 (*p20*) Allele definiert werden, die durch die Anzahl der variablen Positionen  $2,25 \times 10^{10}$  Genotypen bereitstellen. Ein Verhältnis von nicht-synonymen zu synonymen Nukleotidsubstitutionen von  $< 1$  und ein Assoziationsindex von 2,38 wurden berechnet. Der  $I_A$  zeigte ein signifikantes *Linkage disequilibrium* bzw. eine nicht zufällige Verteilung der Allele der sieben Haushaltsgene bei den 250 analysierten Isolaten an. Die Berechnung dieses Wertes für einzelne Untergruppen in der Population resultierte in demselben Ergebnis.

Die Sequenzierung von sieben Haushaltsgenen ermöglichte die Differenzierung der Gesamtpopulation in 79 STs. Am häufigsten traten die Sequenztypen 48 und 13 auf. Innerhalb des STs 48 fanden sich vorrangig aus Kotproben gewonnene Isolate aus Puten wieder, die von vier Tierbeständen aus zwei in Mecklenburg-Vorpommern lokalisierten Putenfarmen (Farm 2 und 7) stammten (s. Anhang, Tab. 10.4). Des Weiteren wurden zwei humane Stuhlisolate mit diesem ST identifiziert. Die 23 Isolate des ST 13 wurden von Tier-, Mensch- und Umweltmaterial selektiert. Neben einem humanen Endokarditisolat (FKS\_004\_H/HDZ 1140) konnten elf *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate aus Exkrementen von Hühnern unterschiedlichen Alters diesem ST zugeordnet werden. Darüber hinaus wurde dieser ST bei den Umweltisolaten des Güllevorrates (HDZ 1153 und HDZ 1184), in getrockneten Hühnerexkrementen (HDZ 1298), auf der Oberfläche von Eierschalen (HDZ 1303) und in Mäusekot (HDZ 1293) sowie in dem Kot von Puten aus Niedersachsen (HDZ 1057, HDZ 1062, HDZ 1065, HDZ 1066) und Mecklenburg-Vorpommern (HDZ 1126) identifiziert werden (s. Anhang, Tab. 10.4).

Damit die epidemiologischen Zusammenhänge betrachtet werden können, wurde ein UPGMA-Dendrogramm mit der Software von *BioNumerics* erstellt. Dieses Dendrogramm wurde anhand der Distanz der einzelnen Allelprofile untereinander angefertigt und zeigte eine hohe Diversität der getesteten Population auf. Der Mittelwert von 0,883 (95 %-CI, 0,771 bis 0,957) aller berechneten SIDs zeigte eine gute Trennschärfe des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-MLST-Schemas und die zugrundeliegende Vielfalt innerhalb der analysierten Population auf (Tab. 3.14).

**Tabelle 3.14: Genetische Diversität in den sieben Loci.**

Gen	Allele	SID <sup>1</sup>	CI (95 %)²	d <sub>N</sub> /d <sub>S</sub> ³	variable Positionen	
					Anzahl	[%]
<i>aroE</i>	18	0,89	0,808-0,903	0,2923	18	3,93
<i>glgB</i>	16	0,83	0,883-0,931	0,0575	29	5,91
<i>nifS</i>	22	0,88	0,851-0,920	0,0668	37	5,01
<i>p20</i>	23	0,93	0,908-0,957	0,1678	36	9,14
<i>tkt</i>	20	0,89	0,842-0,922	0,0626	18	4,08
<i>trpD</i>	18	0,91	0,771-0,898	0,0766	45	10,77
<i>uvrA</i>	20	0,86	0,853-0,920	0,0336	40	7,74

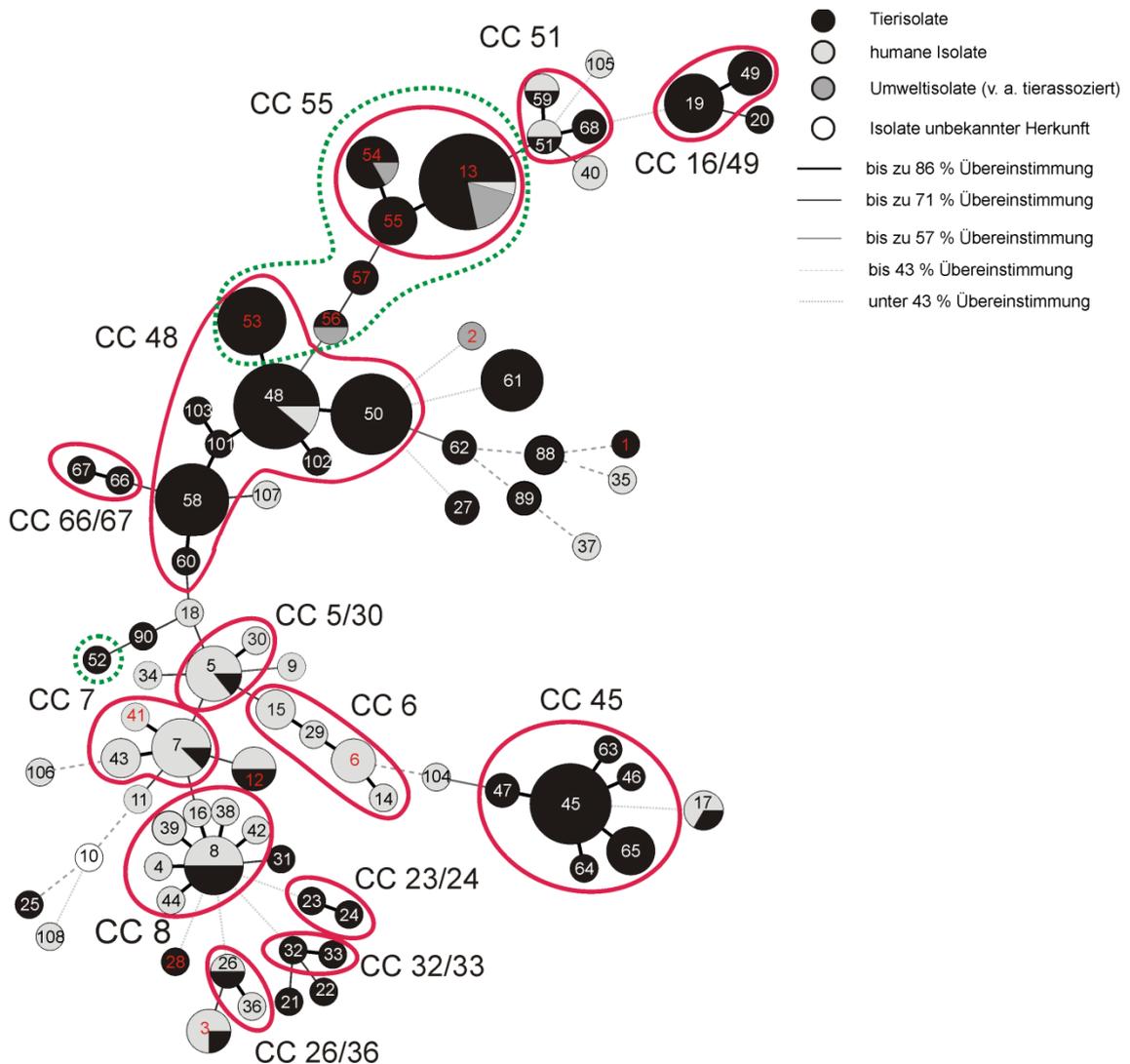
<sup>1</sup> Simpson's Index of Diversity, <sup>2</sup> Konfidenzintervall, <sup>3</sup> Verhältnis der nicht-synonymen (d<sub>N</sub>) zu den synonymen Nukleotidveränderungen (d<sub>S</sub>)

Zur besseren Charakterisierung der 250 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate wurde basierend auf dem zuvor errechneten UPGMA-Dendrogramm ein *Minimum Spanning Tree* (MST) generiert. Es wurden nahverwandte Individuen einer Population miteinander verbunden, sodass in einem phylogenetischen Baum alle Einträge erfasst wurden (Teixeira *et al.*, 2015). Diese Darstellung bietet die Möglichkeit, Infektionsketten, Wirtsspezifitäten (Abb. 3.6) und regionale Bezüge (s. Anhang, Abb. 10.1) zu identifizieren und phylogenetische Zusammenhänge besser zu erfassen. Dabei zeigte der Baum die im UPGMA-Dendrogramm beobachtete Diversität der Stämme und wies ein diffuses Verteilungsmuster auf (Abb. 3.6).

Die MST-Darstellung wurde mit der eBURST-Analyse (*based upon related sequence types*) ergänzt, sodass 13 klonale Komplexe (CC) ermittelt wurden. Ein klonaler Komplex wurde als Gruppe ähnlicher Isolate definiert, wenn bei jedem Isolat mindestens sechs von sieben Allelen eines anderen STs identisch waren (Feil *et al.*, 2004). Wenn sich die analysierten Allele in einem Locus unterschieden (*Single locus variants*, SLV) und innerhalb einer Gruppierung bei einem Allel die meisten SLVs auftraten, wurden diese als Ursprung-ST (*Founder*) definiert. Bei älteren CC konnte sich ein SLV weiterdifferenzieren, sodass ein Unterursprung (*Subfounder*) bestimmt wurde (Feil *et al.*, 2004). Wenn kein *Founder* mittels eBURST festgelegt werden konnte, wurde in dieser Arbeit entweder der ST mit den meisten Isolaten als Ursprung angegeben oder derjenige, der sich im MST weiter aufspaltete.

Für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* waren 44 Sequenztypen in klonalen Komplexen mit inbegriffen und 39 STs kamen nur einmal vor (*Singletons*). Für die Gesamtpopulation aus 250 Stämmen wurde ST 8 als möglicher Ursprungs-ST angegeben. Dieser Sequenztyp gehörte zu dem CC 8, welcher vor allem aus humanen

Isolaten zusammengesetzt war. Innerhalb dieser klonalen Linie befanden sich die Sequenztypen 4, 8, 11, 16, 38, 42 und 44 von Isolaten verschiedener Länder (Deutschland, Spanien, Korea, USA) und von unterschiedlichen Zeitpunkten (1992, 1998, 2002, 2003, 2012, 2014) (Abb. 3.6; s. Anhang, Tab. 10.4).



**Abbildung 3.6:** Beziehung von 79 STs von 250 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Stämmen dargestellt im *Minimum Spanning Tree*. Der UPGMA-Algorithmus wurde angewandt, um den MST-Baum zu generieren. Jeder ST wird durch einen Kreis symbolisiert, dessen Größe proportional zur eingeschlossenen Isolatanzahl ist. Die Farbkodierung gibt den Ursprung der jeweiligen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate wieder. In rot umrandet sind die mittels eBURST ermittelten klonalen Komplexe (CC). Zur Erläuterung potentieller Transmissionswege werden die grün umrandeten Gruppierungen im Abschnitt 3.3.3.1 aufgegriffen. Einzelne Isolate der rot hervorgehobenen Sequenztypen werden im Abschnitt 3.4 phänotypisch charakterisiert.

Der CC 48 bildete mit 57 Isolaten, die in die STs 48, 101, 58, 102, 50, 53, 103 und 60 differenziert wurden, den größten klonalen Komplex und wies einen *Subfounder*

(ST 101) auf. Dieser Komplex umfasste bis auf zwei Ausnahmen (human; 1158-1, HDZ 1251) nur Isolate aus Hühner- und Putenexkrementen. Einer Region in Nordrhein-Westfalen konnte der in Hühnern identifizierte ST 53 zugeordnet werden. Die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate aus Putenkot stammten von verschiedenen Putenfarmen in Deutschland und konnten zum Teil in verschiedenen Herden eines Betriebes detektiert werden. Im Vergleich zu den anderen Isolaten aus Putenkot konnte der ST 50 ausschließlich einer Farm in Bayern (Farm 1) zugeordnet werden. Dieses Allelprofil war dort in allen Tierbeständen (1, 11, 12) identifiziert worden. Ein Isolat des 12. Tierbestandes wurde mit dem ST 90 detektiert und lag nicht in diesem Komplex (Abb. 3.6; s. Anhang, Tab. 10.4, Abb. 10.1).

Eine Assoziation einzelner STs mit dem Menschen oder dem Tier konnte beobachtet werden. Dabei sind vor allem der CC 45 der ausschließlich aus Tierisolaten gebildet wird, sowie der klonale Komplex 6, der nur aus humanen klinischen Isolaten zusammengesetzt ist, herauszustellen (Abb. 3.6).

Die Typisierung mittels MLST wies zum Beispiel die Allelkombinationen 24, 32, 33 und 45 nur in Tieren nach. Dabei war der ST 24 bei einem Isolat eines Pferdes beobachtet worden. Von Tonsillen eines Rindes bzw. Kalbes wurden die STs 32 und 33 identifiziert. Bis auf die Taubenisolate unbekannter regionaler Herkunft (Deutschland, Bundesland nicht bekannt), beinhaltet dieser Komplex nur Isolate zweier Putenfarmen aus Sachsen (Abb. 3.6; 10 Tab. 10.4).

In der klonalen Linie CC 6 war auch das infektiöse Endokarditisisolat des Fall-Kontrollstudien-Teilnehmers FKS\_002\_H (HDZ 1092; ST 15) wiederzufinden. Des Weiteren wurden Probanden der Fall-Kontrollstudie mit neuen Sequenztypen identifiziert. Die Kombination der sequenzierten Gene resultierte in den Profilen 104 (FKS\_011\_H/HDZ 1158) und 105 (FKS\_117/HDZ 1332). Diese konnten zu keinem klonalen Komplex zugeordnet werden (Abb. 3.6; s. Anhang, Tab. 10.4).

Die Allelprofile 41 und 43 sind ebenfalls nur bei Humanisolaten beobachtet worden. Diese beiden STs bilden mit dem ST 7 den CC 7. Der ST 7 war vorwiegend in *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Stämmen detektiert worden, die im Zusammenhang mit klinischen, humanen Infektionen (u. a. IE-Proband FKS\_003\_H/HDZ 1118) standen, und konnte Stämmen unterschiedlicher Länder zugeordnet werden (Deutschland, Spanien). Dieses Allelprofil konnte auch in einem fäkalen Isolat eines gesunden Fall-Kontrollstudie-Probanden (FKS\_032/HDZ 1323) detektiert werden.

Darüber hinaus konnte die Typisierung diesen Sequenztyp auch bei einem Rinderisolat (LMG 14634; Belgien) ermitteln (Abb. 3.6; s. Anhang, Abb. 10.1, Tab. 10.4).

Die Identifizierung desselben STs sowohl in Human- und als auch in Tierisolaten war beispielsweise bei den Allelprofilen 3, 12, 51 und 59 möglich. Dabei umfassten die beiden zuletzt genannten Allelprofile (ST 51 und 59 des CC 51) jeweils ein Isolat aus einer humanen Blutkultur (HDZ 1023/FKS\_001\_H, HDZ 1319; Deutschland) sowie jeweils ein Isolat aus Puten (HDZ 1088, HDZ 1056; Deutschland), bei denen keine Symptome einer akuten oder chronischen Infektion beobachtet wurden. Der ST 3 konnte bei den Isolaten von Gesunden (FKS\_098/HDZ 1329, Deutschland), von humanen Herzklappenkulturen (Isolat 1293/01, Isolat 010288/01; Deutschland) und aus dem Interstitium eines Rindes (LMG 16005, Belgien) gefunden werden. Neben zwei Blutkulturisolaten (K6236/35\_MS, ATCC 43143) und einem Rinderpensenisolat (LMG 15063) wurde der ST 12 auch in einem Milchisolat eines Rindes mit Mastitis (LMG 15049) identifiziert. Eine weite geografische Verteilung der Isolate konnte hier beobachtet werden. Dieser Sequenztyp wurde in belgischen und englischen Isolaten ermittelt (Abb. 3.6; s. Anhang, Tab. 10.4).

Informationen zum geografischen Ursprung der Isolate waren limitiert. Es waren vorrangig *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Stämme aus Deutschland in diese MLST-Datenanalyse eingegangen, sodass keine eindeutigen Beziehungen zwischen dem regionalen Auftreten eines bestimmten STs und der Wiederfindung in Tieren oder dem Menschen hergestellt werden konnten (s. Anhang, Abb. 10.1, Tab. 10.4). Die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate von Patienten oder gesunden Probanden aus der Fall-Kontrollstudie wiesen teilweise neue Sequenztypen (ST 104, ST 105) auf oder konnten STs von Isolaten humaner Infektionen oder tierischem Ursprungs zugeordnet werden. Dementsprechend konnten keine Infektionsketten oder Übertragungswege definiert werden. Transmissionswege konnten auch aufgrund der limitierten Anzahl von Isolaten aus der Umwelt oder aus Nahrungsmitteln (LMG 15049, ST 12) nicht erkannt werden. Eine Ausnahme stellte der IE-Patient der Fall-Kontrollstudie (FKS\_004\_H) dar. Der ST 13 des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Stammes, der aus der Blutkultur isoliert wurde, wurde auch in den Isolaten der Exkremente der Legehennen seines Betriebes identifiziert. Systematische Beprobungen wiesen weitere Sequenztypen im Fäzes der Hühner nach. Darüber hinaus konnte in diesem Betrieb *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* auch in Umweltproben (z. B. Staub, Güllevorrat) und im Kot von Mäusen (HDZ 1303) nachgewiesen werden. Die genotypische Charakterisierung der Staubisolate zeigte dabei die STs 54 und 56 auf. Diese Allelprofile waren gleichzeitig in

Isolaten von Hühnerexkrementen (z. B. HDZ 1267, HDZ 1228) detektiert worden. Der 54. Sequenztyp gehörte zu dem CC 55, welcher den zweitgrößten klonalen Komplex mit 34 Isolaten bildete. Zu diesem Komplex gehörte auch der zuvor beschriebene ST 13 (Abb. 3.6, grün hervorgehoben; s. Anhang, Tab. 10.4). Im Zusammenhang mit potentiellen Transmissionsquellen und Übertragungswegen wird dieser Aspekt des Auftretens desselben STs in Mensch und Tier am selben Standort im Folgenden anhand einer systematischen Analyse dokumentiert (Abb. 3.6, grün hervorgehoben). Die in der Abbildung 3.6 rot hervorgehobenen STs werden aufgrund der identifizierten Sequenztypen und den Isolationsquellen in 3.4 phänotypisch charakterisiert.

### **3.3.3.1 Potentielle Transmissionswege von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus***

Obwohl *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* sowohl im Menschen als auch im Tier als Kommensale und Erreger diverser Infektionen identifiziert wurde, ist das zoonotische Potential des fakultativen Pathogens nicht hinreichend belegt (Hogg und Pearson, 2009). Um mögliche indirekte und direkte Transmissionswege zu analysieren, wurden *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate eines IE-Patienten (FKS\_004\_H) und die Hühner seines Legehennenbetriebes genauer untersucht. Um die potentielle Transmission des Bakteriums weiter belegen zu können, haben in diesem Zusammenhang auch die Mitarbeiter und Familienangehörigen (FKS\_005, FKS\_007, FKS\_010) an der epidemiologischen Studie teilgenommen. Darüber hinaus wurde auch eine fäkale Probe eines Pferdes dieses Hofes untersucht. Die systematische Analyse der Hühner des Legehennenbetriebes erfolgte von Februar 2013 bis Juli 2014.

Im Februar 2013 wurde der 54-jährige Proband mit einer künstlichen Herzklappe mit Fieber und einer infektiösen Endokarditis in das Herz- und Diabeteszentrum NRW eingeliefert. Mit Hilfe der initialen Blutkultur konnten Gram-positive Kokken isoliert und mittels MALDI-TOF-MS und *sodA*-Sequenzierung als *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* identifiziert werden (s. 5.3 und 5.4). Aufgrund der Assoziation des fakultativ pathogenen Agens mit Kolonkarzinomen wurde eine Koloskopie durchgeführt, die negativ für maligne Veränderungen im Gastrointestinaltrakt war. Der Stuhl des Probanden wurde kulturell negativ auf das fakultative Pathogen getestet. Die Stuhlproben der Ehefrau, des Mitarbeiters und des Sohnes (gleichzeitig Mitarbeiter) wurden mittels selektiver Kultivierung ebenfalls negativ auf *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* getestet. Die extrahierte Stuhl-DNA dieser Probanden einschließlich des Patienten wurde mit Hilfe der *tanA*-Real-Time PCR positiv auf das Vorhandensein von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Fäzes getestet.

Der IE-Patient besitzt eine Kleingruppenanlage mit Legehennen, welche aus vier verschiedenen Altersgruppen besteht (*Multiage* System). Jede Altersgruppe besteht aus 1500 Hühnern, (Ausnahme: Legehennengruppe I mit 1100 Hühnern; eingestallt Februar 2012) wobei jeweils eine Altersgruppe als Reihe oder Gruppe (I-IV) bezeichnet wird. Die Reihen, die aus fünf Abschnitten mit jeweils 40 Legehennen bestehen, sind in Volieren zusammengefasst. Die Volieren bestehen aus jeweils drei übereinanderliegenden Etagen, die unter anderem mit Fütterungsbändern, Nippeltränken und darunterliegenden Kotbändern ausgestattet sind. Die Legehennen des Betriebes werden von zwei verschiedenen Zuchtbetrieben (1, 2) bezogen. Da diese Altersgruppen zwar räumlich aber die Belüftungssysteme nicht voneinander getrennt sind, wird die gesamte Hühnerpopulation als Tierbestand/Herde bezeichnet.

Damit potentielle Transmissionswege identifiziert werden konnten, erfolgte die Probennahme in einem Zeitraum von 1,5 Jahren (April 2013, Dezember 2013, Februar 2014, Juli 2014). Dabei wurden von den Kotbändern jeder Reihe aus jeder Etage Kotproben entnommen und je Reihe wurden fünf fäkale Proben gepoolt. Weiterhin wurden aus der Stallumgebung Staubpartikel, Exkremate von Nagern, Exkremate der Scharrmatten, Eierschalen, das Leitungswasser der Tränken und aus dem Güllevorrat Proben entnommen. Zum Testen des Vorkommens von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Tier- und Umweltproben wurden diese auf dem Selektionsmedium kultiviert (s. 5.1.2) und die DNA für den Nachweis des *tanA*-Gens isoliert (s. 5.2.4. und 5.2.7).

Die Identifizierung der gewonnenen 44 Isolate bis zur Subspezies erfolgte mittels MALDI-TOF-MS und Sequenzierung des *sodA*-Genes (s. 5.3 und 5.4). In der folgenden Übersicht (Tab. 3.15) sind die Ergebnisse der *Real-Time* PCR, der selektiven Kultivierung und des MLSTs zu den jeweiligen Beprobungsdaten zusammengefasst. Dabei ist zu beachten, dass im Juli 2014 die Volieren der Reihe IV bereits einen Monat leer standen.

**Tabelle 3.15: Beprobung des *Multiage* Systems und Ergebnisse der molekulargenetischen und kulturbasierten Analyse (Dumke *et al.*, 2015).**

Proben- nahme	Quelle	Alter der Hennen	Proben- typ	Real- Time PCR	Kultur <sup>A</sup>	Isolat	ST <sup>B</sup>	
Februar 2013	human (FKS_004_H)	-	Blutkultur	n. g.	+ <sup>C</sup>	HDZ 1140	13	
		-	Fäzes	+	-	-	-	
09. April 2013	human (FKS_005)	-	Fäzes	+	-	-	-	
	human (FKS_007)	-	Fäzes	+	-	-	-	
	human (FKS_010)	-	Fäzes	+	-	-	-	
	Legehennengruppe I	77	g. f.	+	+	HDZ 1141	52	
	Legehennengruppe II	94	g. f.	+	+	HDZ 1146	13	
	Legehennengruppe III	48	g. f.	+	+	HDZ 1151	13	
	Legehennengruppe IV	30	g. f.	-	-	-	-	
	Pferd	-	g. f.	-	-	-	-	
Umweltprobe	-	Güllevarrat	+	+	HDZ 1153	13		
De- zember 2013	human (FKS_004_2H)	-	Fäzes	+	-	-	-	
18. De- zember 2013	Legehennengruppe I	27	g. f.	-	-	-	-	
	Legehennengruppe II	51	g. f.	+	+	HDZ 1180	13	
	Legehennengruppe III	84	g. f.	+	+	HDZ 1169	13	
						HDZ 1178	13	
						HDZ 1168	53	
						HDZ 1179	53	
	Legehennengruppe IV	65	g. f.	+	+	HDZ 1172	53	
	Umweltprobe der Legehennengruppe I und II	-	g. S.	+	+	HDZ 1194	54	
						Umweltprobe der Legehennengruppe III und IV	-	-
						Umweltprobe	-	Güllevarrat
10. Februar 2014	Legehennengruppe I	35	g. f.	+	+	HDZ 1210	53	
	Legehennengruppe II	58	g. f.	+	-	-	-	
	Legehennengruppe III	20	g. f.	-	-	-	-	
	Legehennengruppe IV	73	g. f.	+	+	HDZ 1212	53	
HDZ 1223						53		
01. April 2014	Legehennengruppe I	42	g. f.	+	+	HDZ 1224	13	
						HDZ 1226	13	
						HDZ 1225	53	
	Legehennengruppe II	66	g. f.	+	+	HDZ 1235	13	
						HDZ 1233	53	
						HDZ 1250	54	
						HDZ 1228	56	
						HDZ 1229	57	
	HDZ 1230	57						
	Legehennengruppe III	28	g. f.	-	-	-	-	
Legehennengruppe IV	80	g. f.	+	+	HDZ 1246	13		
					HDZ 1242	53		

Proben- nahme	Quelle	Alter der Hennen	Proben- typ	Real- Time PCR	Kultur <sup>A</sup>	Isolat	ST <sup>B</sup>
						HDZ 1240	54
						HDZ 1237	55
						HDZ 1238	55
						HDZ 1244	55
	Legehennengruppe I	59	g. f.	+	+	HDZ 1252	13
						HDZ 1257	53
	Legehennengruppe II	84	g. f.	+	+	HDZ 1262	13
						HDZ 1267	54
	Legehennengruppe III	45	g. f.	+	+	HDZ 1277	54
						HDZ 1282	54
						HDZ 1287	55
29. Juli 2014	Legehennen IV	-	-	-	-	-	-
	Umweltprobe der Legehennengruppen I-IV	-	g. S.	+	+	HDZ 1305	56
	Maus	-	g. f.	+	+	HDZ 1293	13
	Umweltprobe Scharrmatte der Legehennengruppe II	-	g. f.	+	+	HDZ 1298	13
	Umweltprobe Eierschale der Legehennengruppe II	-	Eierschale	+	+	HDZ 1303	13
	Leitungswasser der Legehennengruppe II	-	Wasser	-	-	-	-
Juni 2015	human (FKS_004_3H)	-	Fäzes	-	-	-	-
	human (FKS_010_2)	-	Fäzes	-	-	-	-

<sup>A</sup> +/-: positive/negative Kultivierung auf Selektivmedium (s. 5.1.2); <sup>B</sup> Sequenztyp; n. g.: nicht getestet, <sup>C</sup> Kultivierung der Blutkultur; g. f.: gepoolte fäkale Probe; g. S.: gepoolte Staubprobe

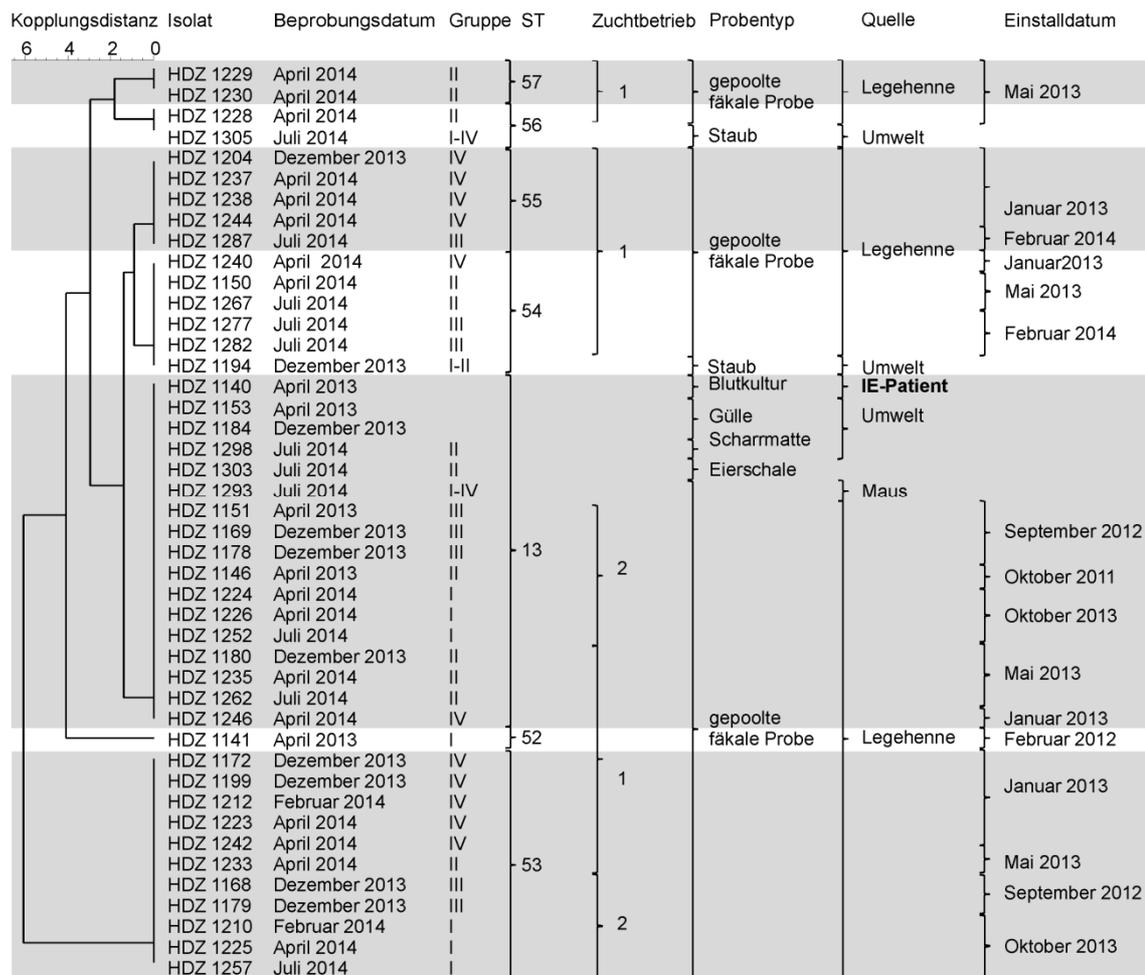
Ein Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Fäzes des Pferdes konnte nicht erbracht werden.

Die Junghennen wurden in einem Alter von 18 bis 22 Wochen eingestallt. Dabei standen die Reihen im Wechsel (eine von vier) zuvor leer. Nach dem Einstellen neuer Hühner, wurden die Hennen molekulargenetisch (*tanA*) und kulturell stets negativ auf *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* getestet. Nach einigen Monaten war im Fäzes der Hühner sowohl mit Hilfe der *Real-Time* PCR als auch mit der selektiven Kultivierung *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* auf Tannin-Natriumazid-TSA detektierbar. Im Alter von 27 Wochen (Dezember 2013) konnte das Bakterium beispielsweise in der Legehennengruppe I des zweiten Zuchtbetriebes nicht nachgewiesen werden. Zwei Monate später mit einem Alter von 35 Wochen wurden die fäkalen Proben derselben Legehennen positiv auf *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* getestet. Im Februar 2014 wurde Fäzes der neuen Legehennen der Reihe III analysiert, bevor diese dem *Multiage* System zugeführt wurden. Diese blieben bis zu einem Alter von 28 Wochen negativ (April 2014) (Tab. 3.15).

Zur Charakterisierung der Population wurden die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate aus der Blutkultur des IE-Patienten, aus den Hühnerkotproben und aus der Umwelt mittels MLST und DNA-*Fingerprinting* typisiert (s. 5.2.8).

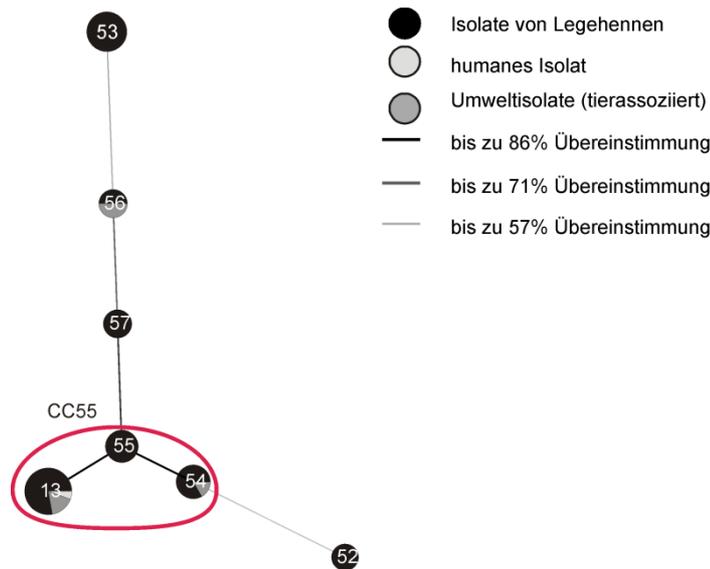
Das UPGMA-Dendrogramm der molekulargenetischen Typisierung mittels MLST ist in der Abbildung 3.7 dargestellt. Basierend auf den amplifizierten und sequenzierten Haushaltsgenen wurden die 44 Isolate in sieben STs (ST 13, 52, 53, 54, 55, 56 und 57) unterteilt. ST 13 wurde gleichzeitig in der humanen Blutkultur des IE-Patienten, bei verschiedenen Altersgruppen der Legehennen und zu verschiedenen Zeitpunkten in den Exkrementen des Güllevorrats identifiziert. Die Exkremente von Mäusen, die in der Kleingruppenanlage auf den Kotbändern lagen, konnten mit Hilfe der selektiven Kultivierung und durch die *tanA*-Detektion positiv auf *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* getestet werden. Das Mäuseisolat HDZ 1293 wies ebenfalls den ST 13 auf. Des Weiteren konnte *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Staubpartikeln zu jedem getesteten Zeitpunkt durch den Nachweis des *tanA*-Gens detektiert und zum Teil isoliert werden. Der ST 54 des Staubisolates HDZ 1194, welches im Dezember 2013 isoliert wurde, konnte ebenfalls in den Legehennengruppen II und III identifiziert werden. Ähnliche Ergebnisse wie bei dem ST 13 konnten auch für den ST 53 erzielt werden. Im darauffolgenden Jahr (Juli 2014) wurde *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* aus dem angesammelten Staub des Belüftungssystems isoliert. Dieses Umweltisolat HDZ 1305 wies den ST 56 auf und wurde bereits im April 2014 in den fäkalen Proben der Hühnergruppe II identifiziert. Im Vergleich zu anderen Sequenztypen war der ST 13 über den gesamten getesteten Zeitraum nachweisbar. Dahingegen war ST 52 nur im April 2013 zu detektieren (Abb. 3.5).

Das UPGMA-Dendrogramm demonstriert die ungleichmäßige Verteilung der Isolate im Zusammenhang mit dem Zuchtbetrieb. Dabei wiesen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate desselben Zuchtbetriebes unterschiedliche STs auf. Der erste Zuchtbetrieb konnte jedem ST zugeordnet werden (Abb. 3.7).



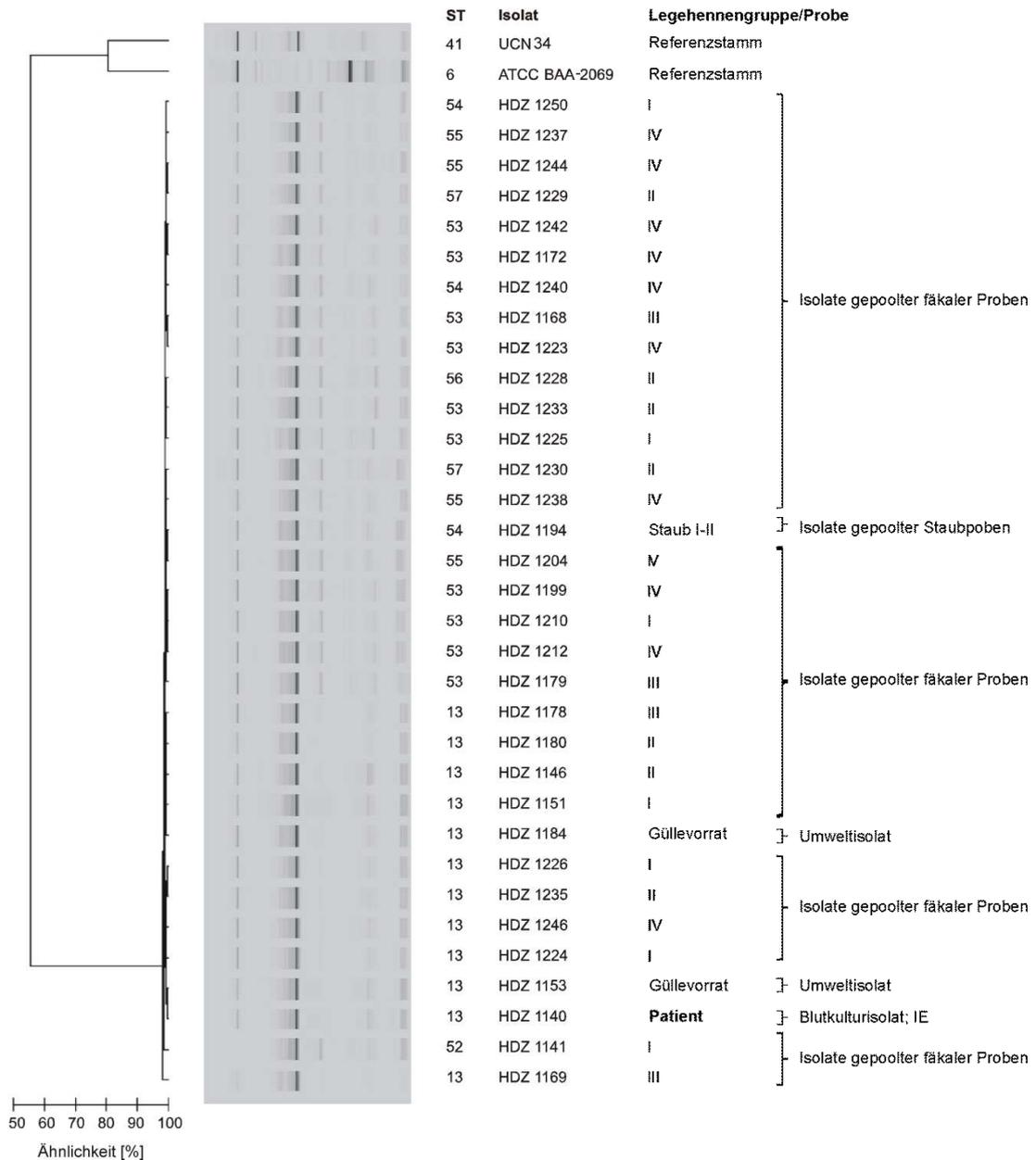
**Abbildung 3.7: UPGMA-Dendrogramm von 44 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolaten.** Die Grafik zeigt die bakteriellen Isolate mit den zugehörigen Parametern (Beprobungs- und Einstalldatum, ST, CC, Zuchtbetrieb, Ursprung und Quelle der Isolate). Die Isolate desselben STs sind in grau und weiß hinterlegt. I-IV: Isolate der fäkalen Proben der Legehennengruppen I-IV.

Um phylogenetische Verhältnisse der Isolate aus dem Tierbestand charakterisieren zu können, wurde basierend auf den Sequenztypen der Isolate ein MST konstruiert. Durch die Anwendung des eBURSTs konnte ST 55 als potentieller Ursprungsstamm der Sequenztypen 13 und 54 identifiziert werden. Diese drei STs wurden unter dem klonalen Komplex CC 55 zusammengefasst, wobei die Isolate mit den Sequenztypen 52, 53, 56 und 57 keinem klonalen Komplex zugeordnet werden konnten (Abb. 3.8).



**Abbildung 3.8: Minimum Spanning Tree von 44 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolaten.** Das MST wurde mit Hilfe des UPGMA-Algorithmus generiert. Die Kreise, dessen Größe mit der Anzahl der Isolate korreliert, stellen den jeweiligen ST dar. Die Farbkodierungen indizieren den Ursprung der Isolate. Der klonale Komplex (CC) wurde mit der Software eBURST determiniert und ist mit einer roten Linie umrandet.

Die Berechnung des SIDs ergab einen Wert von 0,49 (95 %-CI: 0,39 bis 0,59). Ein Wert nahe Null zeigte eine geringe Vielfalt der analysierten Population an. Diese Ergebnisse konnten auch durch das DNA-Fingerprinting mit Hilfe der ERIC-PCR bestätigt werden (Abb. 3.9). *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC) Sequenzen (intergenisch repetitive Einheiten) sind imperfekte palindromische Sequenzen des bakteriellen Genoms (z. B. von *Enterobacteriaceae*). Bei der ERIC-PCR werden spezifische Primer eingesetzt, die es ermöglichen, die 127 bp langen intergenischen Regionen zu amplifizieren. Durch die multiplen Kopien der Konsensussequenzen, die Deletionen oder Insertionen aufweisen können, kann ein genetischer Fingerabdruck erzeugt werden (s. 5.2.8). In die Analyse mittels ERIC-PCR wurden 33 Isolate integriert, sodass alle Sequenztypen jeder Ursprungsquelle präsent waren. In der Abbildung 3.9 zeigt sich eine hohe Diversität zwischen den Referenzstämmen ATCC BAA-2069 und UCN 34 und den Isolaten der Legehennenherde. Alle Isolate des Betriebes zeigten unabhängig von der jeweiligen Altersgruppe denselben genetischen Fingerabdruck (Abb. 3.9). Weiterhin wurde ein Assoziationsindex von 3,8 berechnet, der auf eine signifikante Kopplung eines Ungleichgewichtes hindeutet.



**Abbildung 3.9: Dendrogrammanalyse und virtuelles Gelbild des DNA-Fingerprintings von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*.** 33 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate wurden mittels DNA-Fingerprinting analysiert. Die Chip-Gelelektrophorese wurde angewandt, um die PCR-Produkte zu detektieren (s. 5.2.8).

Zusammenfassend wurden innerhalb eines Zeitraums von eineinhalb Jahren sieben Sequenztypen in der beprobten Legehennenherde identifiziert. Insbesondere in den Tierbestand neu eingebrachte Junghennen wurden zu Beginn immer negativ und mit zunehmendem Alter positiv getestet. Die Sequenztypen 13, 53 und 54 konnten fortwährend in der Legehennenherde erfasst werden. Der ST 13 war ebenfalls in den Exkrementen von Mäusen, der Scharmatten und dem Güllevorrat sowie in

Staubpartikeln und auf Eierschalen nachgewiesen worden. Zwei weitere *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate mit dem ST 54 bzw. ST 56 waren aus Staubpartikeln kultivierbar. Darüber hinaus konnte das Bakterium mit dem ST 13 nicht nur in den fäkalen Proben der Hennen, Mäuse und des Güllevorrates identifiziert werden, sondern auch in der Blutkultur des Tierpflegers, der an infektiöser Endokarditis erkrankt war. Zudem wiesen die hier analysierten Isolate dasselbe DNA-*Fingerprinting*-Muster auf.

### **3.4 Phänotypische Charakterisierung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus***

Im Folgenden wurden phänotypische Charakteristika analysiert, um potentielle Transmissionswege zwischen Mensch und Tier experimentell bestätigen zu können. Die Anpassung an die Veränderung der Umwelt (Biofitness; Tenazität) und das Überleben in der Umwelt von Mensch und Tier soll im Fokus der Analysen stehen.

Bei der Transmission von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zwischen Mensch und Tier ist die Widerstandsfähigkeit gegenüber Umwelteinflüssen ein wichtiger Faktor. In dieser Arbeit sollte auf das Überleben bei Trockenstress (3.4.1), im Trinkwasser (3.4.3), in der Milch (3.4.4), nach einem nachgestellten Pasteurisierungsvorgang (3.4.4), bei verschiedenen pH-Werten (3.4.5) und im Stuhl (3.4.2) getestet werden. Nach der Kolonisation des Darms stellt die Adhäsion an extrazelluläre Matrixmoleküle einen wichtigen Schritt in der Infektionskaskade dar und soll anhand der *in vitro* Bindungsfähigkeit von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* an Kollagen I und IV ermittelt werden (3.4.6). Für diese Untersuchungen berücksichtigt wurden Isolate, die in der epidemiologischen Analyse der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Gesamtpopulation durch den definierten Sequenztyp und der Isolationsquelle auffällig waren (s. 3.3.3 Abb. 3.6, rot hervorgehobene STs). Basierend auf der Hypothese, dass der Ursprung eines klonalen Komplexes mit einer Biofitness einhergehen kann (Feil *et al.*, 2004), wurden die Isolate HDZ 1140 (ST 13), HDZ 1194 (ST 54) und HDZ 1204 (ST 55) des CC 55 analysiert. Aus derselben Region aber nicht aus dieser klonalen Linie wurden die Hühnerisolate HDZ 1141 (ST 52) und HDZ 1168 (ST 53) analysiert (Tab. 3.16, fett; s. 3.3.3, Abb. 3.6, grün umrandet; STs rot hervorgehoben). Die Referenzstämme ATCC BAA-2069, UCN 34, DSM 16831 und ATCC 43143 sowie weitere Stämme, die auf eine potentielle Transmission hinwiesen, wurden in die Experimente eingeschlossen (Tab. 3.16; s. 3.3.3, Abb. 3.6, STs rot hervorgehoben). Dadurch soll die Transmission zwischen Mensch und Tier experimentell bestätigt werden und

zusätzlich ein möglicher Zusammenhang zwischen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Phänotypen bzw. -Wirten und dem ermittelten Sequenztyp geprüft werden.

**Tabelle 3.16: Stammauswahl zur phänotypischen Charakterisierung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*.**

Stamm	ST	Ursprung	Isolationsquelle
<b>HDZ 1140</b>	<b>13</b>	<b>Mensch</b>	<b>Endokarditis</b>
<b>HDZ 1141</b>	<b>52</b>	<b>Huhn</b>	<b>Fäzes</b>
<b>HDZ 1168</b>	<b>53</b>	<b>Huhn</b>	<b>Fäzes</b>
<b>HDZ 1194</b>	<b>54</b>	<b>Staub</b>	<b>Umgebung</b>
<b>HDZ 1204</b>	<b>55</b>	<b>Huhn</b>	<b>Fäzes</b>
HDZ 1146	13	Huhn	Fäzes
HDZ 1151	13	Huhn	Fäzes
HDZ 1153	13	Güllevarrat Hühner	Fäzes
HDZ 1293	13	Maus	Fäzes
HDZ 1298	13	Scharmatte Hühner	Fäzes
HDZ 1303	13	Eierschale Hühner	Fäzes
05WDK 43740 002	13	Kalb	-
DSM 16831	1	Koala	Fäzes
DSM 13808	2	Umwelt	Faulschlamm
Isolat 12932/01	3	Mensch	Endokarditis
LMG 16005	3	Rind	Intestinum
Isolat 010672/01	6	Mensch	Endokarditis
ATCC BAA-2069	6	Mensch	Endokarditis
K6236/35_MS	12	Mensch	Endokarditis
LMG 15049	12	Rind	Milch (Mastitis)
ATCC 43143	12	Mensch	Endokarditis, Kolonkarzinom
LMG 17956	28	Kalb	-
UCN 34	41	Mensch	Endokarditis

**fett:** Isolate derselben Region, die im Fokus der Analyse standen

### 3.4.1 Überleben von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bei Trockenstress

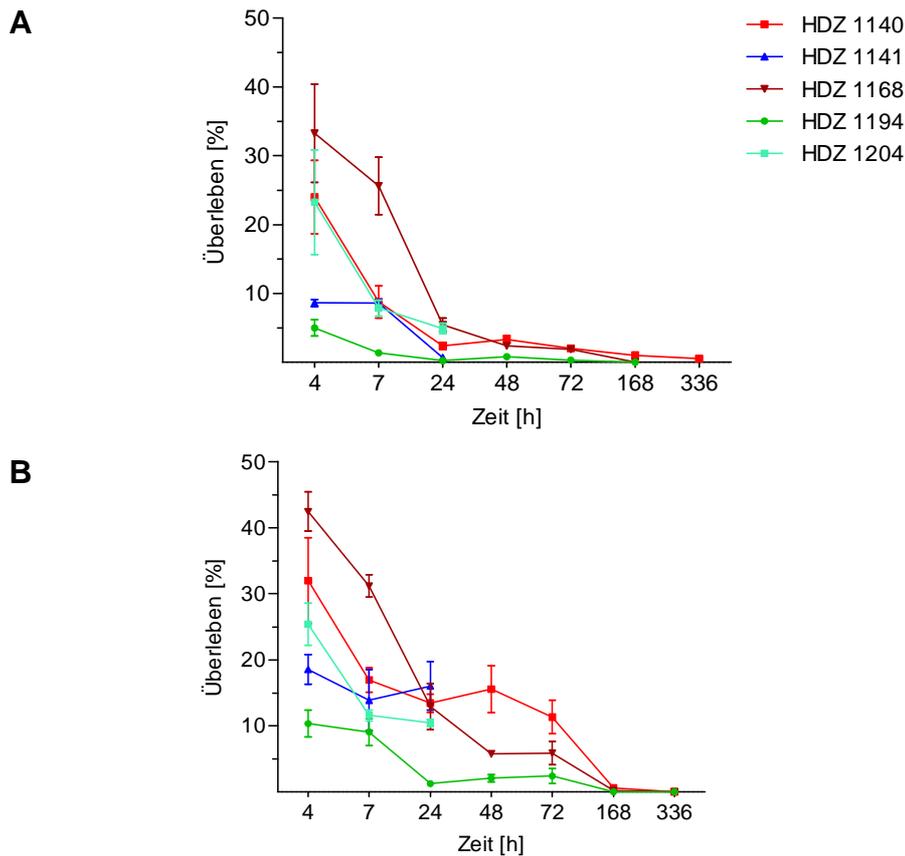
Bei der Transmission von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zwischen Mensch und Tier ist die Widerstandsfähigkeit gegenüber Trockenstress ein wichtiger Faktor. Dazu wurden die zu analysierenden *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Stämme auf einer Polyesteroberfläche 1 h getrocknet, bei RT und 4 °C inkubiert und der Titer nach 0, 4, 7, 24, 48, 72, 168 und 336 h bestimmt (s. 5.1.6.1 und 5.1.5), wobei nur die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate HDZ 1140, HDZ 1168 und HDZ 1194 zwei Wochen lang analysiert wurden. Die Ergebnisse des Experimentes sind in Abbildung 3.10 und 3.11 dargestellt.

Ausgehend von  $1,3 \times 10^7$  KBE/ml überlebten nach dem Trockenschritt von einer Stunde bei RT insgesamt 0,003 % (ATCC 43143;  $4,77 \times 10^4$  KBE/ml) bis 1,44 % (HDZ 1204;  $2,18 \times 10^5$ ) (Daten nicht dargestellt). Diese Werte wurden als Nullstundenwert (100 %) für das jeweilige Isolate definiert und die folgenden Werte wurden dazu ins Verhältnis gesetzt.

Es zeigte sich für die getesteten Isolate ein divergentes Bild der Fähigkeit, den Trockenstress bei unterschiedlichen Temperaturen zu überleben. Eine Vitalität nach 24 h konnte bei allen Stämmen beobachtet werden. Dabei überlebten die Bakterien bei 4 °C besser als bei RT und es konnte eine sukzessive Reduktion der Überlebensraten detektiert werden (Abb. 3.10 und 3.11).

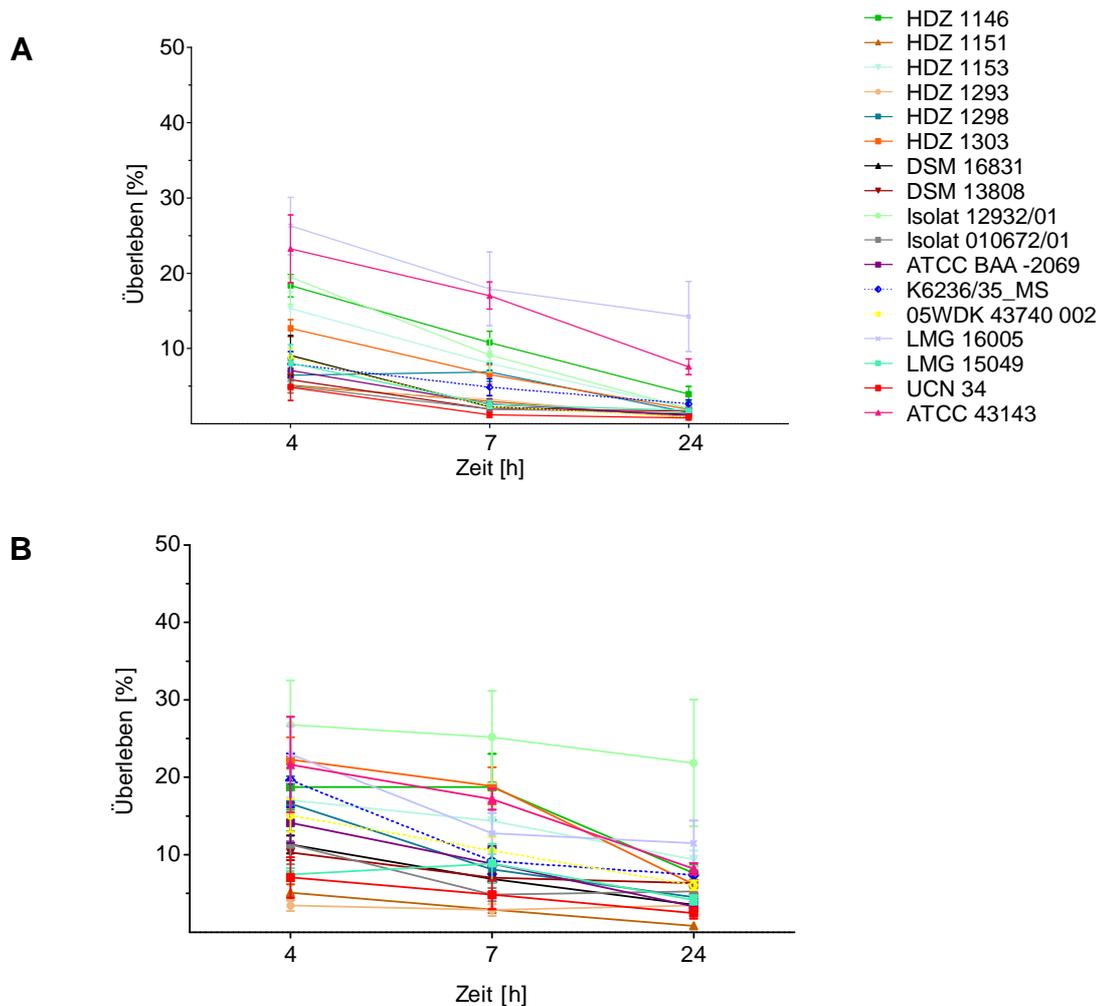
Die Isolate HDZ 1140 (ST 13), HDZ 1168 (ST 53) und HDZ 1204 (ST 55) zeigten nach der vierstündigen Inkubation bei RT ähnliche hohe Überlebensraten während bei dem Staubisolat HDZ 1194 (ST 54) und dem Hühnerisolat HDZ 1141 (ST 52) ein deutlich geringerer Anteil an überlebenden Bakterien dokumentiert wurde. Im Gegensatz zu dem Hühner- und Staubisolat, die nur drei bzw. sieben Tage bei RT nachweisbar waren, war das humane Isolat HDZ 1140 (ST 13) bis zu 14 d vital. Auffällig war, dass das Staubisolat (HDZ 1168) trotz einer geringeren Überlebensrate nach vier Stunden als das Hühnerisolat HDZ 1204, länger (sieben Tage) vital war (Abb. 3.10 A).

Innerhalb von 24 h wurden bei 4 °C deutlich reduzierte Bakterientiter detektiert (4 h: 10,4 bis 42,4 %; 24 h: 1,3 bis 16,4 %). Nach weiteren 24 h bzw. 48 h Inkubation bei 4 °C konnten für die Isolate HDZ 1140 (ST 13), HDZ 1168 (ST 53) und HDZ 1194 (ST 54) konstante Vitalitätsraten nachgewiesen werden (Abb. 3.10 B). Im inokulierten Leitungswasser konnten nach einer Woche bei 4 °C noch 0,2 bis 0,59 % überlebende Bakterien detektiert werden. Das humane Isolat war im Gegensatz zu dem Hühner- und Staubisolat nach 14 d nachweisbar (0,57 %) (Abb. 3.10 B)



**Abbildung 3.10: Überleben von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bei Trockenstress.**  $1,3 \times 10^7$  Bakterien wurden pro Kavität einer 24-Kavitätenplatte eingesetzt, 1 h bei RT getrocknet und für 4, 7 und 24 h bei RT (A) bzw. 4 °C (B) inkubiert. Die Isolate HDZ 1140, HDZ 1168 und HDZ 1194 wurden zusätzlich 48, 72, 168 und 336 h analysiert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Bakterien in PBS resuspendiert und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten bestimmt (s. 5.1.5 und 5.1.6.1). Die KBE/ml zum Zeitpunkt null wurden als 100 % definiert. Die Vitalität bei Trockenstress erfolgte in drei biologischen und drei technischen Replikaten. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

Die anderen getesteten 18 Umwelt-, Tier und Menschenisolate wiesen ähnliche Phänotypen auf. Es zeigte sich eine ebenso divergente Überlebensfähigkeit wie bei den zuvor beschriebenen Isolaten. Nach einer vierstündigen Inkubation auf einer trockenen Oberfläche bei RT konnten noch 4,85 bis 26,26 % vitale Bakterien von ursprünglichen 100 % bestimmt werden. Nach weiteren 20 h Inkubation fiel der Anteil vitaler Bakterien auf 0,78 % (UCN 34) bis 14,25 % (LMG 16005) ab. Der Trockenstress bei 4 °C zeigte bei den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolaten ein vielfältiges Vitalitätsspektrum auf, bei dem nach vier Stunden 3,46 bis 26,78 %, nach sieben Stunden 2,86 bis 25,19 % und nach 24 h 0,85 bis 21,84 % der Bakterien vital waren (Abb. 3.11 A).



**Abbildung 3.11: Überleben von 18 *S. gallolyticus subsp. gallolyticus* bei 24-stündigem Trockenstress.**  $1,3 \times 10^7$  Bakterien wurden pro Kavität einer 24-Kavitätenplatte eingesetzt, 1 h bei RT getrocknet und für 4, 7 und 24 h bei RT (A) bzw. 4 °C (B) inkubiert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Bakterien in PBS resuspendiert und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten bestimmt (s. 5.1.5 und 5.1.6.1). Die KBE/ml zum Zeitpunkt 0 wurden als 100 % definiert. Die Vitalität bei Trockenstress erfolgte in drei biologischen und drei technischen Replikaten. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

Sowohl bei RT als auch bei 4 °C waren die Endokarditisolate 12932/01 (ST 3), HDZ 1140 (ST 13) und ATCC 43143 (ST 12) sowie die Isolate aus Hühnern HDZ 1168 (ST 53), HDZ 1204 (ST 55), HDZ 1146 (ST 13) und dem Rinderisolat LMG 16005 (ST 3) zu den getesteten Zeitpunkten am widerstandsfähigsten. Dahingegen waren die humanen Blutkulturisolate UCN 34 (ST 41) und Isolat 010672/01 (ST 6), das HDZ 1194-Staubisolat (ST 54), das Isolat aus gepooltem Mäusekot HDZ 1293 (ST 13) und das Hühnerkotisolat HDZ 1151 bei dem ausgeübten Trockenstress auf Polyesteroberflächen am wenigsten resistent. Im Vergleich zu anderen Stämmen

zeigte das Hühnerisolat HDZ 1151 (ST 13) bei 4 °C identische Überlebensraten bei RT (Abb. 3.10 und 3.11).

Bei dem ausgeübten Trockenstress bei verschiedenen Temperaturen konnte kein spezifischer Phänotyp zu tierischen oder humanen Isolaten oder Isolaten aus der Umwelt bzw. zu den jeweiligen Sequenztypen zugeordnet werden.

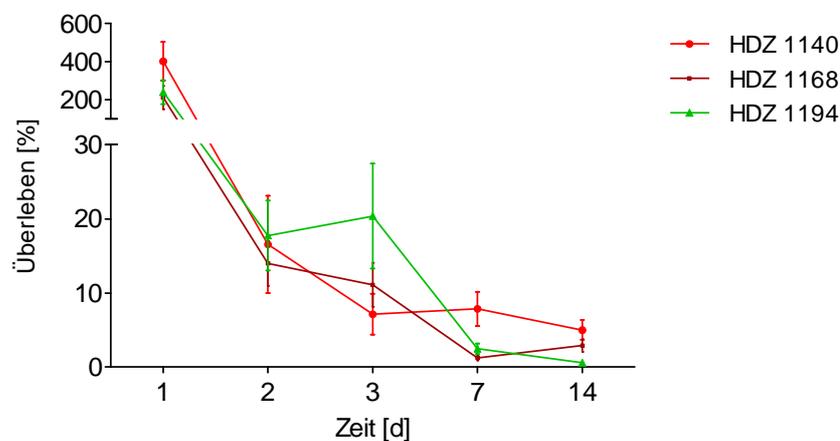
### 3.4.2 Überleben von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Stuhl

Während sich zahlreiche Studien der gastrointestinalen Kolonisation mit dem fakultativen Pathogenen im Zusammenhang mit kolorektalen Karzinomen oder mit der infektiösen Endokarditis widmen (Chirouze *et al.*, 2013; Lopes *et al.*, 2014), fehlen bislang Vitalitätsanalysen von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in fäkalen Proben. Die Vitalität in Stuhl spielt im Hinblick auf die Interspezies- und Intraspezies-Transmission des Bakteriums eine wichtige Rolle.

Das Überleben innerhalb von 14 Tagen wurde von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im gepoolten humanen Stuhl untersucht. Zu jeweils 500 mg homogenisiertem Stuhl wurden etwa  $1,68 \times 10^8$  KBE/ml der gewaschenen Übernachtskultur hinzugegeben und bei RT inkubiert. Der initial eingesetzte Titer wurde als 100 %-Wert definiert. Nach 1, 2, 3, 7 und 14 d wurde der mit dem Bakterium inokulierte Stuhl in 1 ml PBS suspendiert und der bakterielle Titer bestimmt (s. 5.1.5 und 5.1.6.7). Dabei wurde der prozentuale Anteil der vitalen Bakterien dargestellt (Abb. 3.12). Die auf Tannin-Natriumazid-TSA gewachsenen Kolonien wurden zusätzlich mittels MALDI-TOF-MS identifiziert, sodass eine Kontrolle der gewachsenen Bakterienspezies gewährleistet wurde (s. 5.4).

Mittels drei biologischer und jeweils drei technischer Replikate konnte das Überleben der Isolate HDZ 1140, HDZ 1168 und HDZ 1194 gezeigt werden (Abb. 3.12). Nach einwöchiger Kultivierung der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-inokulierten Stuhlproben wurden mittels massenspektrometrischer Analyse Mischkulturen von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und *Lactobacillus plantarum* identifiziert. Durch phänotypische Unterschiede der heterogenen Kultur konnte eine nähernde Anzahl koloniebildender Einheiten von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* detektiert werden. Es zeigte sich innerhalb von 14 Tagen eine Reduktion des bakteriellen Titers. Nach eintägiger Lagerung bei RT zeigte sich bei den verwendeten Isolaten aus der humanen Blutkultur, dem animalen Fäzes und aus der Umwelt ein Wachstum im Vergleich zum initialen Bakterientiter. Das prozentuale Überleben lag etwa zwei- bis viermal höher als der initiale Bakterientiter. In den sich anschließenden Analysetagen fiel der Anteil der

detektierbaren Bakterien deutlich ab. Es konnten etwa 14 % (HDZ 1168) bis 18 % (HDZ 1194) überlebende Bakterien nachgewiesen werden. Die Isolate HDZ 1168 (11,11 %) und HDZ 1194 (20,38 %) zeigten nach drei Tagen Inkubation bei RT den höchsten Anteil vitaler Bakterien. Nach ein- und zweiwöchiger Inkubation der inokulierten Proben reduzierte sich der Anteil der nachzuweisenden vitalen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate weiter (HDZ 1168: 7 d: 1,27 %; 14 d: 2,93 %; HDZ 1194: 7 d: 2,48 %; 14 d: 0,60 %). Nur 7,14 % konnten bei dem humanen Blutkulturisolat HDZ 1140 nach dreitägiger Inkubation bei RT detektiert werden. Die prozentuale Anteil vitaler Bakterien blieb an den darauf folgenden Analysetagen annähernd konstant (HDZ 1140: 7 d: 7,84 %; 14 d: 5,01 %) (Abb. 3.12).



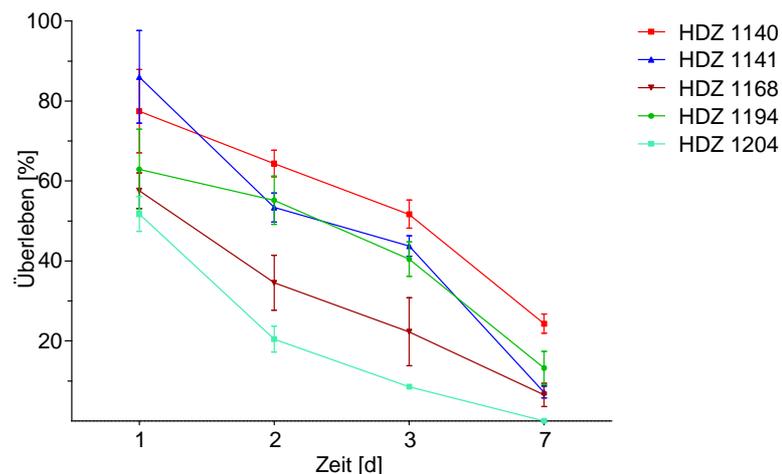
**Abbildung 3.12: Prozentualer Anteil vitaler *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate nach 14-tägiger Inkubation inokulierter humaner Stuhlproben bei RT.** Zum Überprüfen der Vitalität von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Stuhl wurden etwa  $1,68 \times 10^8$  Bakterien zu 500 mg Fäzes gegeben. Nach ein, zwei, drei, sieben und 14 Tagen erfolgte eine Suspension der inokulierten Stühle in PBS und der bakterielle Titer wurde durch Ausplattieren auf Tannin-Natriumazid-TSA bestimmt (s. 5.1.5 und 5.1.6.7). Dabei wurde der initiale Titer als 100 % definiert. Die Analyse wurde in drei biologischen und drei technischen Replikaten durchgeführt. Dargestellt ist der Standardfehler.

### 3.4.3 Vitalität von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Trinkwasser

Da das fakultativ pathogene Bakterium sowohl beim Menschen als auch beim Tier im Gastrointestinaltrakt identifiziert wurde, sollte die Stabilität in Trinkwasser, welches eine potentielle Transmissionsquelle darstellt, getestet werden. Dafür wurden 7 ml autoklaviertes Leitungswasser mit  $1 \times 10^3$  Bakterien inokuliert und anschließend bei RT und 4 °C inkubiert. Die für die Inokulation verwendeten Stämme sind in Tabelle 3.16 aufgeführt. Nach einem, zwei, drei und sieben Tagen wurde der Bakterientiter durch

ausplattieren auf TSA bestimmt (s. 5.1.5 und 5.1.6.4). In Abbildung 3.13 wurden die Ergebnisse grafisch erfasst.

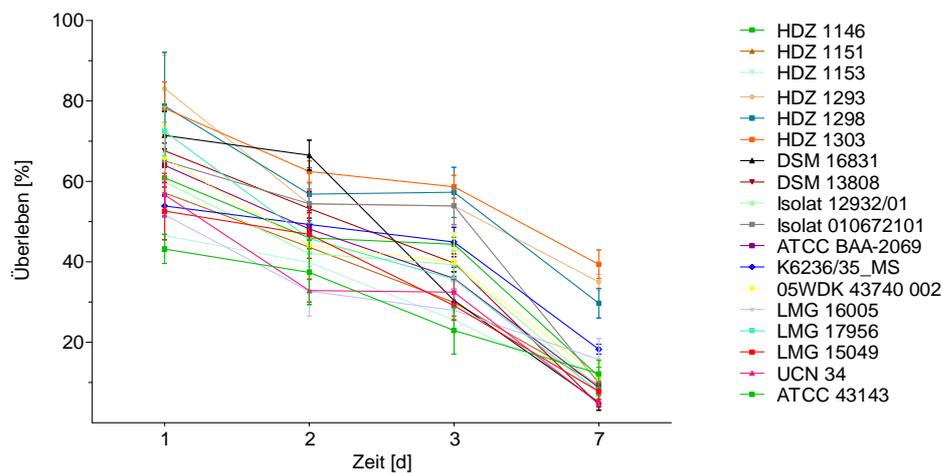
Es lag ein initialer Titer von 535,5 (HDZ 1141) bis 2340 KBE/ml (HDZ 1194) vor. Dabei wurde die Anzahl der koloniebildenden Einheiten zum Zeitpunkt Null als 100 % determiniert. Bereits nach einem Tag konnten keine vitalen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate bei RT detektiert werden. Die Kultivierung der Trinkwasserinokulate zeigte bei 4 °C ein divergentes Bild. Nach einem Tag Inkubation bei 4 °C im Trinkwasser konnten noch 57,6 (HDZ 1168) bis 86 % (HDZ 1141) vitale Bakterien nachgewiesen werden. Innerhalb des Beobachtungszeitraumes war eine weitere Reduktion der vitalen Bakterien im Leitungswasser zu verzeichnen. Nach siebentägiger Kultivierung der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate konnte eine Überlebensrate von 6,5 bis 24,3 % detektiert werden. Nur bei dem Isolat HDZ 1204 konnten keine vitalen Bakterien nach diesem Zeitraum nachgewiesen werden (Abb. 3.13).



**Abbildung 3.13: Vitalität von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Trinkwasser bei 4 °C.** Autoklaviertes Trinkwasser wurde mit etwa  $1 \times 10^3$  KBE/ml verschiedener *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate inokuliert, bis zu sieben Tage bei 4 °C inkubiert und der Bakterientiter bestimmt (s. 5.1.5 und 5.1.6.4). Das Überleben der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate ist in Prozent [%] dargestellt, wobei der initial eingesetzte Bakterientiter 100 % gesetzt wurde. Es wurden drei biologisch und drei technische Replikate erstellt. Die Fehlerbalken symbolisieren den Standardfehler.

Darüber hinaus wurde das Überleben 18 weiterer Stämme untersucht (Abb. 3.14). Diese wiesen einen ähnlichen initialen Bakterientiter wie die zuvor beschriebenen fünf Isolate auf. Im Vergleich zum Ausgangstiter konnte nach einem Tag eine Vitalität von 43,19 % (ATCC 43143) bis 83,1 % (HDZ 1293) bestimmt werden. Eine stetige

Reduktion der koloniebildenden Einheiten war an den folgenden Beobachtungstagen zu detektieren. Die Kultivierung aller Isolate in Leitungswasser bei 4 °C führte nach sieben Tagen zu einer Reduktion der vitalen Bakterien auf 4,5 (DSM 13808) bis 18,3 % (K6236/35\_MS) (Abb. 3.14).



**Abbildung 3.14: Überleben von 18 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolaten bei 4 °C im Trinkwasser.** Mit etwa  $1 \times 10^3$  KBE/ml verschiedener *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate wurde autoklaviertes Trinkwasser angeimpft. Nach einem, zwei, drei und sieben Tagen wurde bei 4 °C der Bakterientiter bestimmt (s. 5.1.5 und 5.1.6.4). Das Überleben der Bakterien ist in Prozent [%] dargestellt. Die koloniebildenden Einheiten zu Beginn des Versuches wurden als 100 % definiert. Es wurden drei biologisch und drei technische Replikate erstellt. Der Standardfehler ist in Form von Fehlerbalken aufgeführt.

Insgesamt betrachtet zeigten alle Isolate in einem Zeitraum von sieben Tagen eine Verminderung des Bakterientiters im Trinkwasser. Dabei wies das Isolat HDZ 1204 im Allgemeinen die geringsten Vitalitätswerte auf und war nach sieben Tagen nicht mehr vital. Das beste Überleben im Trinkwasser konnte bei den tierassoziierten Umweltisolaten HDZ 1293, HDZ 1298 und HDZ 1303 und bei dem humanen HDZ 1140-Isolat detektiert werden. Es zeigte sich zum einen keine Korrelation phänotypischer Charakteristika beim Überleben in Trinkwasser mit tierischen oder menschlichen Stämmen oder Isolaten aus der Umwelt und zum anderen keine Korrelation mit den jeweiligen Sequenztypen der Isolate.

### **3.4.3.1 Vergleich der Vitalitäten von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* auf der Oberfläche und in biologischen Milieus**

Ein Vergleich der Überlebensfähigkeit von drei *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolaten (HDZ 1140, HDZ 1168, HDZ 194) zeigte bei Trockenstress, in Leitungswasser oder in humanem Stuhl eine Reduktion des initialen Bakterientiters im beobachteten Zeitraum.

Während im Leitungswasser bereits nach einem Tag bei RT keine vitalen Bakterien beobachtet wurden, konnten bei der Inkubation auf einer trockenen Oberfläche bzw. im humanen Stuhl über einen längeren Zeitraum vitale Bakterien detektiert werden. Beispielsweise konnten nach dreitägiger Inkubation bei RT im Stuhl 7,14 % (HDZ 1140) bis 20,38 % (HDZ 1194) überlebende Bakterien nachgewiesen werden. Ein ausgeübter Trockenstress von drei Tagen bei RT reduzierte den Anteil vitaler Bakterien auf 0,322 % (HDZ 1194) bis 1,9 % (HDZ 1140).

Bei einem Vergleich des Überlebens bei 4 °C auf trockenen Oberflächen und im Leitungswasser konnten z. B. am dritten Inkubationstag 4,5 (HDZ 1140) bis 16,9-fach (HDZ 1168) erhöhte Vitalitätsraten im Wasser nachgewiesen werden.

Folglich zeigten sich für die analysierten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate höhere prozentuale Überlebensraten im biologischen Milieu bei 4 °C (Leitungswasser) bzw. bei RT (Stuhl) im Vergleich zum Überleben auf einer trockenen Polyesteroberfläche.

### **3.4.4 Vitalität von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Milch**

Das fakultative Pathogen wurde bereits in Milch und Rohmilchprodukten identifiziert (Fortin *et al.*, 2003; Randazzo *et al.*, 2006; Tsakalidou *et al.*, 1998). Ob Milch- und Rohmilchprodukte als potentielle Transmissionsquelle zwischen Mensch und Tier in Betracht gezogen werden können wurde überprüft, indem die Vitalität in Milch und die Überlebensfähigkeit während eines nachgestellten Pasteurisierungsvorgangs analysiert wurde. Da haltbare Milch durch die Ultrahocherhitzung (bei 135 bis 150 °C) keine bakteriellen Verunreinigungen aufweist, wurde diese für die Analysen eingesetzt. Die eingesetzten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate sind als Übersicht in Tabelle 3.16 aufgeführt.

#### 3.4.4.1 Stabilität von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Milch

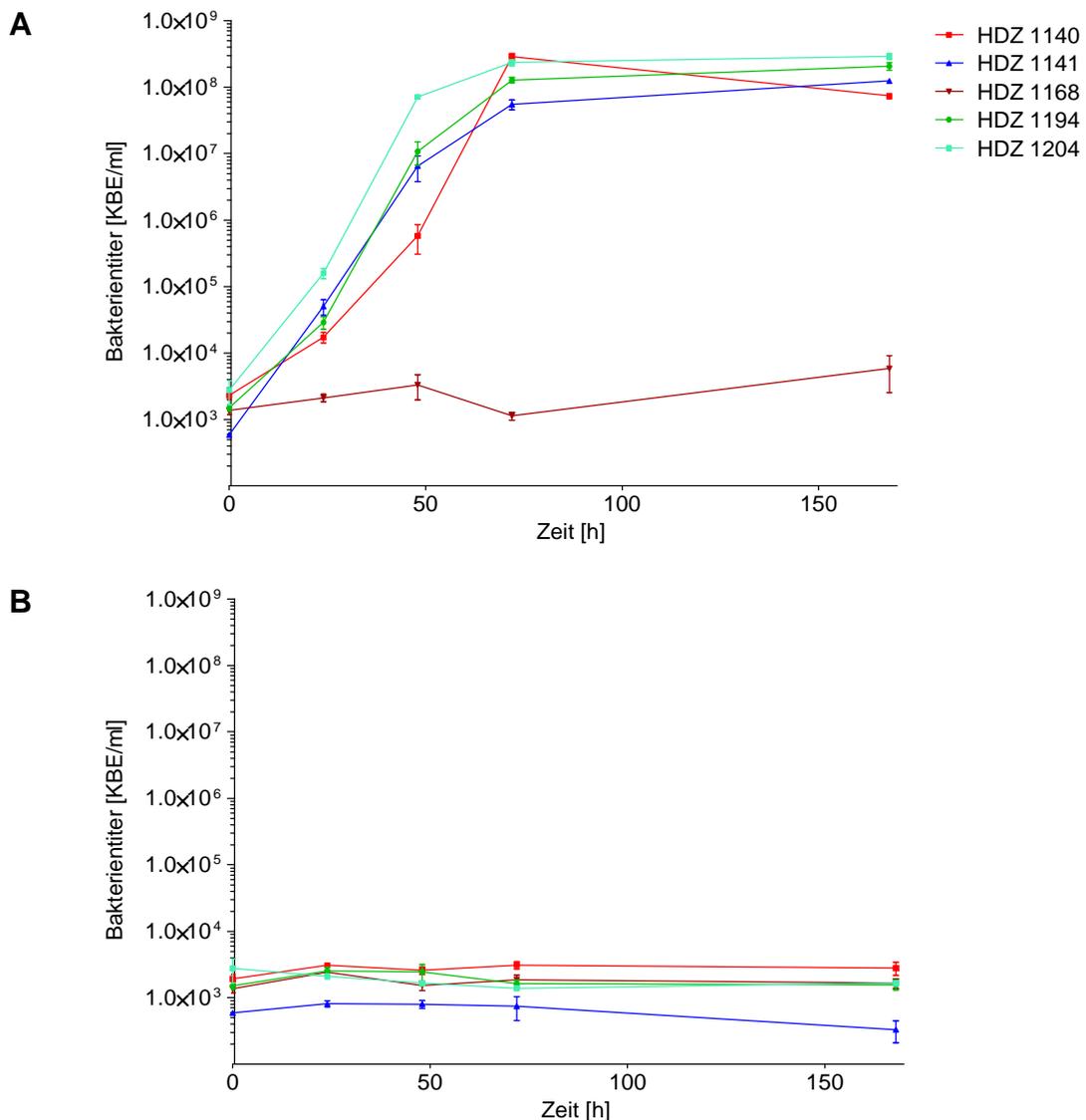
Die Überlebensfähigkeit von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wurde experimentell ermittelt, indem jeweils 7 ml H-Milch mit  $1 \times 10^3$  KBE/ml der verschiedenen Stämme inokuliert wurde. Nach einem, zwei, drei und sieben Tagen Inkubation bei RT und 4 °C wurde die Anzahl der überlebenden bakteriellen Isolate ermittelt. Dabei wurden 100 µl entnommen, entsprechend verdünnt und ausplattiert (s. 5.1.5 und 5.1.6.2). Die Abbildung 3.15 zeigt die Ergebnisse der Überlebensfähigkeit in Milch, wobei die KBE/ml gegen die Zeit aufgetragen wurden.

Wie in Abbildung 3.15 A dargestellt konnte bei der Lagerung der mit verschiedenen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolaten versetzten Milch bei RT ein starker Anstieg des Bakterientiters beobachtet werden. Dabei stellte das Isolat HDZ 1168 (ST 53) eine Ausnahme dar. Während der Kultivierung bei RT über sieben Tage zeigte sich ein langsames Bakterienwachstum. Am Ende des Versuches konnte bei diesem Isolat eine achtfache Steigerung (5849 KBE/ml) des inokulierten Bakterientiters ermittelt werden. Bereits nach 24 h war der Ausgangstiter der anderen Isolate (HDZ 1140, HDZ 1141, HDZ 1194, HDZ 1204) auf  $1,7 \times 10^4$  (HDZ 1140; ST 13) bis  $1,6 \times 10^5$  KBE/ml (HDZ 1204; ST 55) angestiegen. Nach weiteren 24 bzw. 48 h Inkubation bei RT war ein weiteres Wachstum bis zu  $2,8 \times 10^8$  KBE/ml (HDZ 1140) zu verzeichnen und ging anschließend in die stationäre Phase über, sodass bei dem Isolat HDZ 1204 (ST 55) der höchste Bakterientiter von  $2,9 \times 10^8$  KBE/ml zu verzeichnen war. Im Vergleich dazu war bei dem humanen Blutkulturisolat HDZ 1140 nach sieben Tagen eine Reduktion des bakteriellen Titers von 25,6 % ( $7,34 \times 10^7$  KBE/ml) zu beobachten (im Vergleich zum 72 h-Wert) (Abb. 3.15 A).

Bei der Kultivierung bei 4 °C zeigten sich innerhalb der ersten drei Tage relativ konstante Bakterientiter (Abb. 3.15 B). Während der Kultivierung bei 4 °C schwankten die KBE/ml in einem Bereich von 1380 KBE/ml bis 3067 KBE/ml. Nach einer einwöchigen Inkubation bei 4 °C ähnelten die koloniebildenden Einheiten den Ausgangswerten und lagen bei 1652 bis 2797 KBE/ml (Abb. 3.15 B).

Während das Isolat HDZ 1141 (ST 52) einen Inokulationstiter von ca. 589 KBE/ml aufwies, konnte bei den anderen vier *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolaten ein doppelt so hoher Ausgangswert (ca. 1368 bis 2761 KBE/ml) nachgewiesen werden. Während der Inkubationszeit war bei dem HDZ 1168-Hühner- und dem HDZ 1194-Staubisolat ein geringer Anstieg von ca. 1000 KBE/ml zu verzeichnen. Bei diesen Isolaten waren nach sieben Tagen Inkubation in Milch bei 4 °C noch ca. 1500 KBE/ml vital. Die Lagerung des HDZ 1140-Milchinokulats bei 4 °C über einen Zeitraum von drei

Tagen führte zu einem Wachstum, sodass etwa 3500 KBE/ml nachweisbar waren. Nach einer Woche zeigte sich eine geringe Reduktion des Bakterientiters. Bei dem Isolat HDZ 1204 war kein Wachstum innerhalb der 336 h zu beobachten. (Abb. 3.15 B). Innerhalb von 72 h konnte bei dem HDZ 1141-Isolat ein Wachstum (800 KBE/ml) verzeichnet werden. Der Bakterientiter fiel nach einer Woche auf 330 KBE/ml ab (Abb. 3.15 B).



**Abbildung 3.15.: Vitalität von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Milch.** Haltbare Milch wurde mit  $1 \times 10^3$  KBE/ml Bakterien inokuliert und anschließend sieben Tage bei RT (A) bzw. 4 °C (B) kultiviert. Die Wachstumskinetik wurde nach 24, 48, 72 und 168 h durch Ausplattieren auf TSA bestimmt (s. 5.1.5 und 5.1.6.2). Die Titerbestimmung (KBE/ml) erfolgte in drei biologischen und drei technischen Replikaten. Dargestellt ist der Standardfehler.

Die Ergebnisse der anderen getesteten 18 Isolate (Tab. 3.16) sind im Anhang aufgeführt (s. Anhang, Abb. 10.2). Sowohl bei 4 °C als auch bei RT zeigten diese verschiedenen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Stämme ein phänotypisch ähnliches Wachstum wie die zuvor beschriebenen Isolate.

Der initial eingesetzte Bakterientiter der anderen Umwelt-, Menschen- und Tierisolate stieg auf  $2,9 \times 10^5$  (HDZ 1151) bis  $6,6 \times 10^6$  (UCN 34) nach einem Tag, auf  $3,2 \times 10^7$  (HDZ 1146) bis  $2,97 \times 10^8$  (LMG 16005) nach zwei Tagen, auf  $9,7 \times 10^4$  (DSM 16831) nach drei Tagen und auf  $5,9 \times 10^7$  (Isolat 010672/01) bis  $2,7 \times 10^8$  KBE/ml (Isolat 05WDK 43740 002) nach sieben Tagen bei RT an (s. Anhang, Abb. 10.2 A).

Bei den Isolaten HDZ 1153 (ST 13), DSM 16831 (ST 1) und 12932/01 (ST 2) war bei RT ein anderes Wachstumsverhalten zu beobachten. Innerhalb der ersten Inkubationstage war bei dem HDZ 1153-Isolat aus dem Güllevorrat ein ähnliches Wachstumsverhalten wie bei dem Isolat HDZ 1168 ersichtlich. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten in Milch war nach einem weiteren bzw. nach sieben Tagen vergleichbar mit den KBE/ml der anderen Isolate. Eine weitere Besonderheit im Wachstumsverhalten zeigte sich bei dem Koalastamm DSM 16831 (ST 1). Dieser zeigte wie auch das humane Isolat HDZ 1140 (ST 13) nach sieben Tagen Kultivierung in Milch bei RT einen verminderten Bakterientiter im Vergleich zu den anderen Isolaten (s. Anhang, Abb. 10.2 A).

Bei Milch, die bei 4 °C gelagert wurde, blieb der eingesetzte Bakterientiter in den ersten drei Tagen stabil zwischen 833 (DSM 16831) und 3924 KBE/ml (K6236/35\_MS; ST 12). Während der Bakterientiter bei den meisten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Stämme über die sieben Tage konstant zwischen 1000 und 5000 KBE/ml lag, konnte bei den Stämmen DSM 16831 und ATCC BAA-2069 (ST 6) ein Anstieg des Titers von ca. 700 auf 1900 bzw. 6200 KBE/ml verzeichnet werden (s. Anhang, Abb. 10.2 B).

Eine Korrelation zwischen dem Sequenztyp und dem Isolationsursprung bzw. der ermittelten Fähigkeit von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Milch zu überleben konnte nicht gezeigt werden.

#### **3.4.4.2 Simulation der Pasteurisierung von Milch**

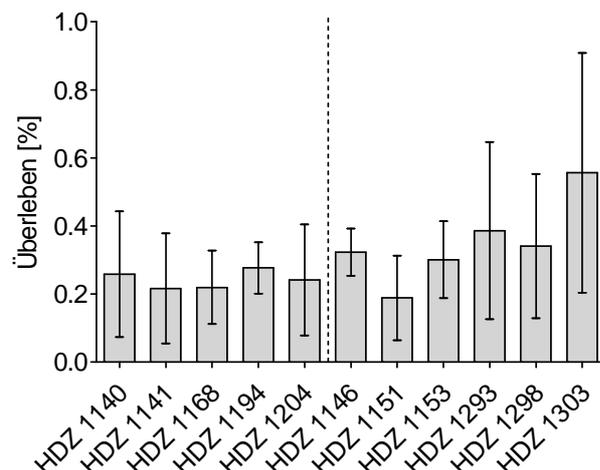
Im nachgestellten Pasteurisierungsvorgang sollte überprüft werden, ob *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* beim Pasteurisierungsprozess vollständig eliminiert wird oder ob pasteurisierte Milch als potentielle Übertragungsquelle fungieren kann. Dazu wurde haltbare Milch mit  $1 \times 10^5$  KBE/ml der verschiedenen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-

Stämme inokuliert und 1/10 des Volumens einem Pasteurisierungsvorgang in Glaskapillaren im *Lightcycler* bei 72°C für 30 sec mit anschließendem Herunterkühlen auf 37 °C unterzogen. Der kontinuierliche Durchfluss wurde experimentell vernachlässigt. Im Anschluss wurden die Proben auf Eis gekühlt. Vor und nach der Pasteurisation wurde der bakterielle Titer bestimmt und daraus das prozentuale Überleben ermittelt (s. 5.1.5 und 5.1.6.3, Abb. 3.16).

Dabei konnte sowohl bei dem humanen Blutkulturisolat (HDZ 1140) als auch bei den Isolaten aus der Umwelt (HDZ 1168) und aus den gepoolten Hühnerkotproben (HDZ 1141, HDZ 1204) eine einheitliche Überlebensrate beobachtet werden. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wies im Vergleich zum initialen Titer ein Überleben von 0,2 bis 0,28 % auf.

Die anderen getesteten Isolate HDZ 1146, HDZ 1151, HDZ 1153, HDZ 1293, HDZ 1298, und HDZ 1303 zeigten ähnliche Vitalitätsraten (0,19 % bis 0,39 %). Die prozentuale Überlebensrate des Isolates HDZ 1303 lag bei 0,56 % (Abb. 3.16).

Die ähnlichen Vitalitätsraten der beobachteten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate zeigten keinen Zusammenhang zwischen dem Allelprofil und dem determinierten Phänotyp bzw. dem Isolationsursprung an.

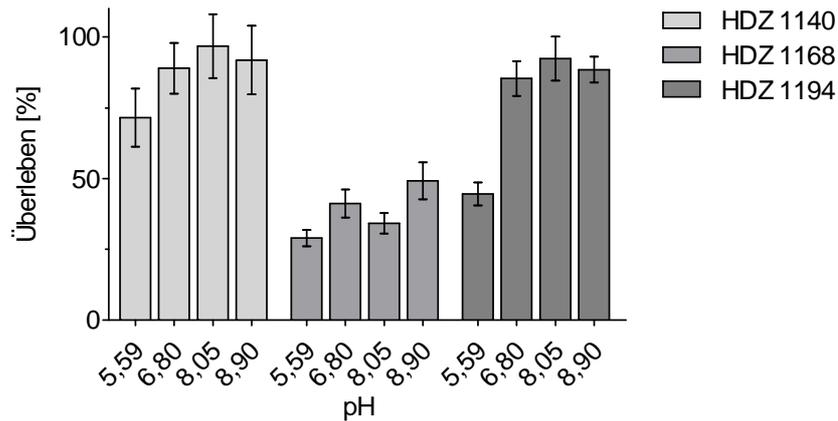


**Abbildung 3.16: Darstellung des prozentualen Überlebens nach der Pasteurisierung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*- inokulierter Milch.** Mit je  $1 \times 10^5$  KBE/ml der verdünnten Übernachtskultur von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wurde die haltbare Milch inokuliert. Die mit Bakterien versetzte Milch wurde einem nachgestellten Pasteurisierungsprozess unterzogen und dabei auf 72 °C für 30 sec im *Lightcycler* erhitzt (s. 5.1.5 und 5.1.6.3). Der Anteil der vitalen Bakterien ist in Prozent [%] dargestellt. Die vertikale gestrichelte Linie trennt die fokussiert betrachteten Isolate von den anderen analysierten Isolaten, die im Vergleich betrachtet wurden, ab. Der Versuch erfolgte in drei biologischen und drei technischen Replikaten. Die Fehlerbalken sind als Standardfehler aufgeführt.

### 3.4.5 Stabilität von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bei verschiedenen pH-Werten

Durch das Inokulieren des AK I -Puffers mit variierenden pH-Werten (pH 1 bis 9) mit etwa  $1 \times 10^4$  KBE/ml, erfolgte die Simulation der Magenpassage und der Kolonisation des tierischen und menschlichen Darms durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Der initiale bakterielle Titer wurde in PBS determiniert und 100 % gesetzt. Nach 2,5 h Inkubation bei 37 °C wurde die prozentuale Überlebensrate der bakteriellen Isolate ermittelt (s. 5.1.5 und 5.1.6.5). Zu Beginn und am Ende des Experimentes wurde der pH-Wert der auf 37 °C-äquilibrierten Lösungen ermittelt. Dabei wurden folgende pH-Werte gemessen: 0,97; 1,92; 2,87; 3,5; 4,05; 5,56; 6,80; 8,05 und 8,90.

Im Mittel wurden ca.  $7 \times 10^4$  (HDZ 1140, HDZ 1194) bzw.  $5 \times 10^4$  KBE/ml (HDZ 1168) eingesetzt. Die Ergebnisse der Vitalität in Prozent bei verschiedenen pH-Werten sind in Abbildung 3.17 grafisch dargestellt. Bei den pH-Werten eins bis fünf konnten bei allen Isolaten keine vitalen Bakterien detektiert werden. Das humane Blutkulturisolat HDZ 1140 (ST 13) und das Staubisolat HDZ 1194 (ST 54) zeigten bei den pH-Werten 5,59 bis 8,90 einen ähnlichen Phänotyp. Hier konnte bei einem pH-Wert von etwa sechs eine Überlebensrate von 44,54 (HDZ 1194) bzw. 71,44 % (HDZ 1140) nachgewiesen werden. Wohingegen die Anzahl der koloniebildenden Einheiten des HDZ 1168-Hühnerisolates (ST 53) um 71 % reduziert waren. Ein neutrales (pH 6,8) bzw. alkalisches (pH 8,05 bis pH 8,90) Milieu führte nach 2,5 h zu ähnlichen Vitalitätsraten bei dem Blutkultur- und Umweltisolat, während bei dem Hühnerisolat der Bakterientiter auf ein Drittel bis ein Viertel vermindert vorlag. Etwa  $6 \times 10^3$  vitale Bakterien (HDZ 1140, HDZ 1194) konnten bei einem pH-Wert von 6,8 nachgewiesen werden. Derselbe pH-Wert führte bei dem Isolat HDZ 1168 zu einer Reduktion von etwa 50 %, sodass etwa  $3 \times 10^3$  KBE/ml nachgewiesen werden konnten. Von den zu Beginn des Versuches eingesetzten  $2,12 \times 10^3$  KBE/ml konnte nach 2,5 h bei 37 °C ca. 34 bis 49 % bei einem pH von 8,05 bzw. 8,90 detektiert werden. Überlebensraten von 97 % und 92 % bzw. 92 % und 88 % konnten bei dem HDZ 1140- bzw. HDZ 1194-Isolat bei alkalischen pH-Werten beobachtet werden (pH 8,05 bzw. pH 8,90) (Abb. 3.17).



**Abbildung 3.17: Vitalität der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate HDZ 1140, HDZ 1168 und HDZ 1194 bei verschiedenen pH-Werten.**  $1 \times 10^4$  KBE/ml Bakterien wurden zum Inokulieren von 7 ml AK I -Puffer mit den pH-Werten zwischen eins und neun eingesetzt. Nach 2,5 h bei 37 °C wurde der Titer der vitalen Bakterien determiniert (s. 5.1.5 und 5.1.6.5). Der Anteil der überlebenden Bakterien ist in Prozent [%] dargestellt. Die pH-Werte eins bis fünf sind grafisch nicht erfasst, da keine vitalen Bakterien nachgewiesen wurden. Der Versuch wurde in drei biologischen und drei technischen Replikaten durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

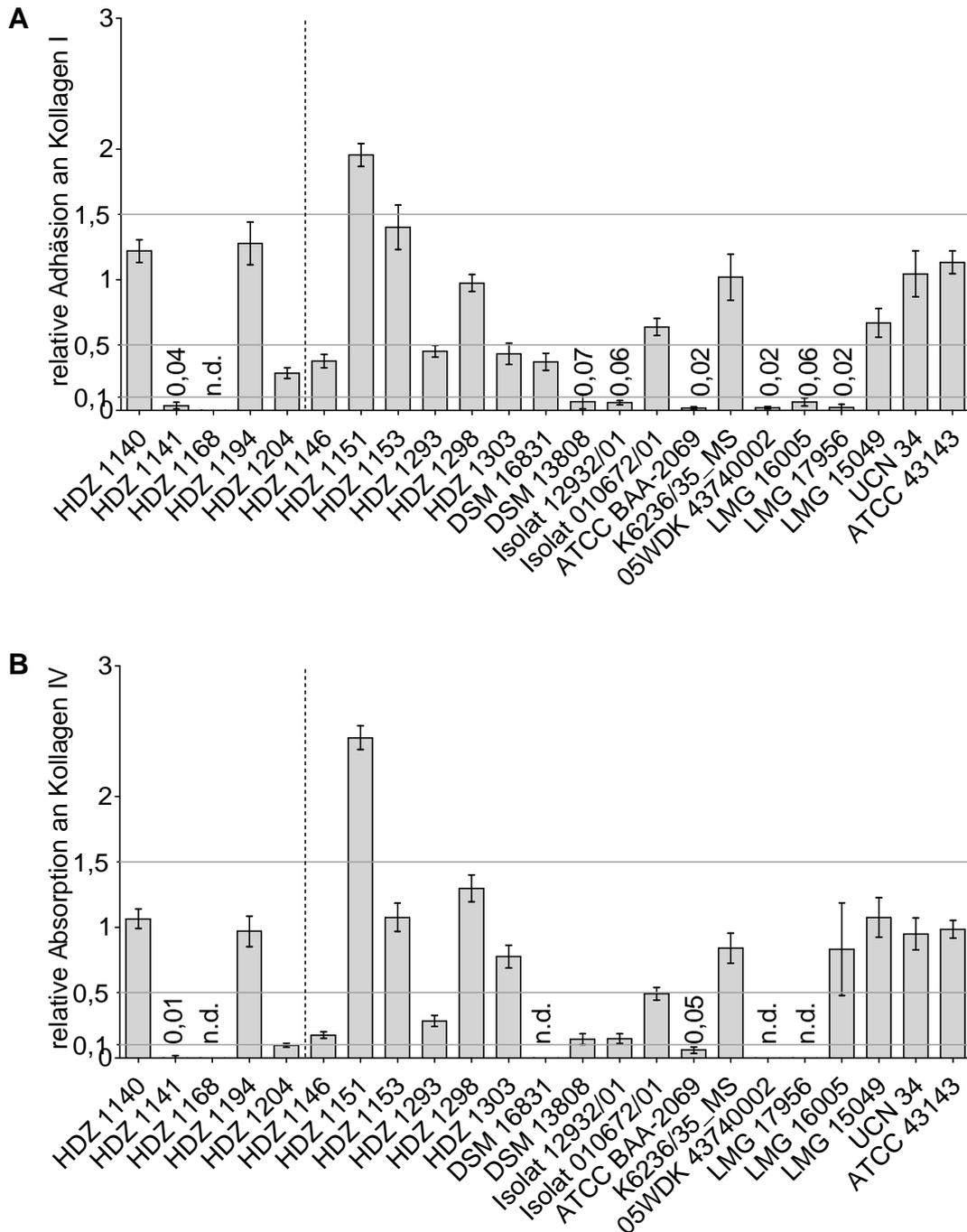
#### 3.4.6 Adhäsion von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* an immobilisierte Kollagene

Der initiale Schritt bei einer Infektion ist die Adhäsion an die extrazelluläre Matrix der Wirtszelle. Es wurde bereits beschrieben, dass im Vergleich zu anderen gastrointestinalen Bakterien eine verstärkte Biofilmbildung des fakultativen Pathogens auftritt (Boleij *et al.*, 2011 b). Die Kollagene I und IV treten verstärkt am Endokard des Herzens bzw. am Epithel des Kolons auf, sodass ein Zusammenhang zwischen der Adhäsion und der Pathogenese bei den durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-ausgelösten infektiösen Endokarditiden und der Assoziation mit Kolonkarzinomen in Betracht gezogen werden kann (Boleij *et al.*, 2011 b). Daher wurden in dieser Arbeit Zusammenhänge zwischen der Kollagenadhäsion und dem Ursprung verschiedener Stämme ermittelt. Die Adhäsionsfähigkeit an Kollagen I und IV wurde mit 23 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Stämmen durchgeführt (Tab. 3.16). Diese Isolate wurden in einer 96-Kavitätenplatte auf die zuvor immobilisierten Proteine Kollagen I/IV und BSA gegeben und bei 37 °C inkubiert. Das überschüssige Material wurde abgenommen, die Platte getrocknet und die adhärenierten Bakterien mit Kristallviolett angefärbt. Der Farbstoff wurde anschließend mit Ethanol gelöst. Die relativen Werte der Adhäsionsfähigkeit der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate wurden erzielt, indem die unspezifische Adhärenz an BSA von der spezifischen an Kollagen subtrahiert wurde (s. 5.1.4).

Die Kollagenadhäsionen sind in einem Balkendiagramm dargestellt (Abb. 3.18). Dabei wurden die einzelnen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Stämme gegen die relative Adhäsion an Kollagen I bzw. IV aufgetragen. Es wurde definiert, dass bei Werten bis 0,1 eine sehr schwache, bis zu 0,5 eine schwache, bis 1,5 eine mittlere und über 1,5 eine sehr starke Adhäsionsbindungsfähigkeit an Kollagen vorlag (Abb. 3.18).

Bei den im Fokus der Analyse stehenden Isolaten HDZ 1140, HDZ 1141, HDZ 1168, HDZ 1194 und HDZ 1204 ließen sich starke Unterschiede in der Kollagenadhäsion feststellen, wobei die Tendenzen der Adhäsionen an Kollagen I und IV gleich stark ausgeprägt waren. Bei dem Hühnerisolat HDZ 1168 (ST 53) konnte sowohl bei Kollagen I als auch beim Kollagen IV keine Adhäsion detektiert werden. Das Isolat HDZ 1141 (ST 52) zeigte einen ähnlichen Phänotyp und wies eine sehr schwache Bindung an beide Kollagene (Kollagen I: 0,04; Kollagen IV: 0,01) auf (Abb. 3.18). Eine Bindung von 0,1 (Kollagen I) bzw. 0,29 (Kollagen IV) wies das HDZ 1204-Isolat (ST 55) auf. Die stärkste Adhäsionsfähigkeit konnte bei dem humanen Blutkulturisolat HDZ 1140 (ST 13) und dem Staubisolat HDZ 1194 (ST 54) nachgewiesen werden (Abb. 3.18).

Vergleichbare relative Adhäsionswerte an die immobilisierten Kollagene I und IV konnten bei den anderen 18 getesteten Isolaten erzielt werden. Die Stämme DSM 16831 (ST 1), 05WDK 4374 0002 (ST 13) und LMG 17956 (ST 28) adhärten nicht an Kollagen IV wie auch das Hühnerisolat HDZ 1168. Auch zeigten die Isolate DSM 13808 (ST 2), Isolat 12932/01 (ST 3), ATCC BAA-2069 (ST 6), 05WDK 4374 0002 (ST 13), LMG 16005 (ST 3) und LMG 19756 (ST 28) sehr geringe Adhäsion ( $< 0,1$ ) an das immobilisierte Kollagen I. Dieser Phänotyp konnte auch bei ATCC BAA-2069 bei der Bindung an Kollagen IV (0,05) beobachtet werden. Bei den Isolaten HDZ 1146 (ST 13), HDZ 1293 (ST 13), HDZ 1303 (ST 13) und DSM 16831 (ST 1) war ebenfalls eine schwache Adhäsion ( $< 0,1$ ) zu detektieren, welche somit einen ähnlichen Phänotyp wie das Isolat HDZ 1204 bei der Bindung an Kollagen I zeigten. Sieben Stämme (Isolat 010672/1 (ST 6), LMG 15049 (ST 12), HDZ 1298 (ST 13), K6236/35\_MS (ST 12), UCN 34 (ST 41), ATCC 43143 (ST 12) und HDZ 1153 (ST 13)) wiesen neben dem humanen Blutkulturisolat HDZ 1140 und dem Staubisolat HDZ 1194 eine mittelstarke Adhäsion an Kollagen I auf. Eine mittelstarke Adhäsion dieser sieben Isolate konnte auch an Kollagen IV zu detektiert werden. Sowohl an Kollagen I als auch an Kollagen IV adhärte das Hühnerisolat HDZ 1151 (ST 13) am stärksten (Abb. 3.18).



**Abbildung 3.18: Adhäsion von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* an immobilisiertes Kollagen.** Mit Kollagen I bzw. IV vorbeschichtete 96-Kavitätenplatten wurden bei 37 °C mit verschiedenen Isolaten inkubiert. Nachdem die nicht gebundenen Bakterien abgenommen, die an Kollagen I/IV bzw. an BSA gebundenen Bakterien mit Kristallviolettlösung angefärbt wurden, erfolgte die Absorptionsmessung bei 550 nm (s. 5.1.4). Die angegebene relative Adhäsion ergibt sich aus der Subtraktion der unspezifischen (BSA) von der spezifischen Bindung (Kollagen I/IV). Die durch dunkelgraue horizontale Linien gekennzeichneten Bereiche unterteilen die Isolate in die Kategorien sehr schwache (< 0,1), schwache (0,1-0,5), mittlere (0,5-1,5) und starke Adhäsion (>1,5). Grafik A zeigt die Adhäsion an Kollagen I und Grafik B an Kollagen IV. Die vertikale gestrichelte Linie separiert die fokussiert betrachteten Isolate von den anderen Isolaten, die im Vergleich betrachtet wurden. Das Experiment wurde mit je drei biologischen und technischen Replikaten absolviert. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. n. d.: nicht detektiert.

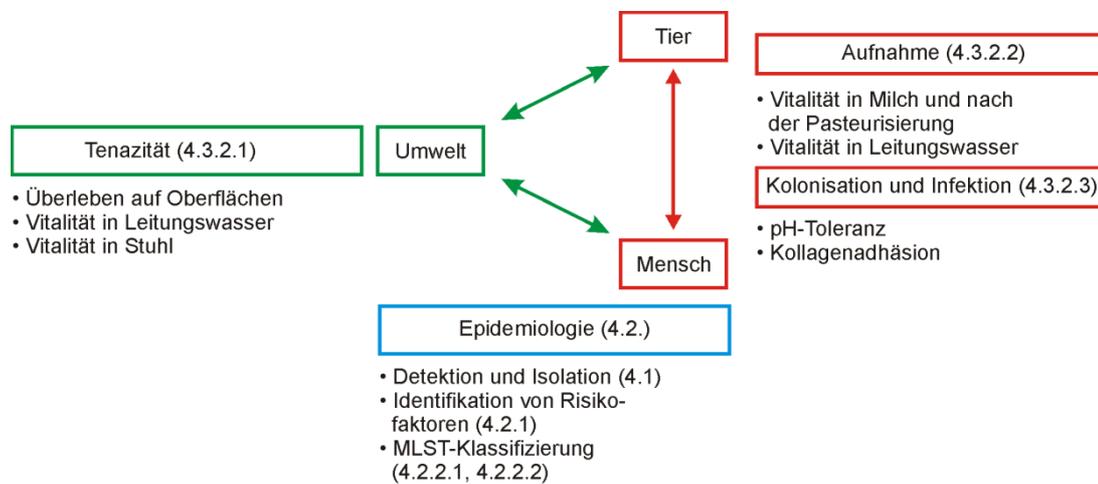
Im Allgemeinen waren die Tendenzen der Adhäsionsfähigkeit der Isolate an Kollagen IV ähnlich der Adhäsion an Kollagen I (Abb. 3.18 B). Eine stärkere Adhäsionsfähigkeit an dieses extrazelluläre Matrixprotein als an Kollagen I konnte bei dem Umweltisolat DSM 13808, dem Blutkulturisolat 12932/01, dem Rinderisolat LMG 16005 und dem tierassoziierten Isolat HDZ 1303 aufgezeigt werden.

Für die Adhäsion an die immobilisierten extrazellulären Matrixproteine zeigten sich für alle *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate stark variierende Adhärenzen, wobei auch unterschiedliche adhätierende Eigenschaften desselben Stammes beobachtet werden konnten. Die höchste relative Adhäsion sowohl an Kollagen I als auch an Kollagen IV wies das Hühnerisolat HDZ 1151 auf. Dahingegen zeigten andere Isolate (LMG 17956, 05WDK 43740 002), unabhängig von ihrem Ursprung, wesentlich geringere bis gar keine Fähigkeiten auf, an die Kollagen zu binden. Wie auch das humane Blutkulturisolat HDZ 1140 wurden die Isolate UCN 34, ATCC 43143 und LMG 15049 im Zusammenhang mit Infektionen isoliert und wiesen ähnliche phänotypische Eigenschaften auf.

Folglich zeigten sich keine phänotypischen einheitlichen Charakteristika bei der Adhäsion an Kollagen, die mit der Isolationsquelle korreliert. Ebenfalls war keine Korrelation zwischen dem Sequenztyp und den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Phänotypen vorhanden.

## 4 Diskussion

Das Bakterium *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ist ein fakultatives Pathogen, dessen Transmission und potentielle Zoonose bisher nicht eindeutig geklärt ist (Hogg und Pearson, 2009). Verschiedene Phasen können bei dem Ablauf einer Infektion erfasst werden. Diese beginnt bei dem natürlichen Reservoir, dem Gastrointestinaltrakt von Mensch und Tier und dem sich anschließenden Überleben außerhalb des natürlichen Habitats. Eine indirekte und direkte Transmission über die Kolonisation bis hin zur Infektion schließt sich an. Dieser Verlauf ist in Abbildung 4.1 erfasst. Es wurden die Analysen dieser Arbeit den einzelnen Zwischenstufen zugeordnet.



**Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Analyse der möglichen Transmission und des zoonotischen Potentials von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*.** In dem Modell sind die verschiedenen Etappen der analysierten potentiellen Transmissionswege und -quellen zwischen Mensch und Tier und der Umwelt aufgegriffen. Die Transmissionswege sind in Form von Pfeilen dargestellt. Interaktionen der Wirte von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* mit der Umwelt sind in grün erfasst. Dabei wird das Überleben außerhalb des Gastrointestinaltraktes von der Widerstandsfähigkeit des Bakteriums gegenüber Umwelteinflüssen (Tenazität; grün, 4.3.2.1) bestimmt. Eine Voraussetzung für eine Kolonisation und Infektion (4.3.2.3; rot) ist die orale Aufnahme des Bakteriums durch direkte (Schmierinfektionen) oder indirekte Transmission (z. B. Staub, kontaminierte Nahrungsmittel) (4.3.2.2, rot) sowie die Überlebensfähigkeit von sauren pH-Werten (4.3.2.3, rot), um den Magen passieren zu können. Die Entstehung einer Infektion wird dabei unter anderem durch die Adhäsion an Kollagene bestimmt (4.3.2.3, rot). In blau erfasst ist die analytische Epidemiologie, die es ermöglicht die Prävalenz des Bakteriums im Darm zu bestimmen, Risikofaktoren zu ermitteln und Infektionsketten zu determinieren.

### 4.1 Detektion und Isolation von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Fäzes

Während die Prävalenz von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in der gesunden Mikroflora des Menschen bis zu 15 % betragen kann (Sillanpää *et al.*, 2009), sind diese

im animalen Wirt nicht beschrieben. Neben der noch nicht vollständig aufgeklärten Pathogenese des Bakteriums sind auch die potentiellen Wege und Quellen der Transmission zwischen Mensch und Tier derzeit nicht abschließend aufgeklärt. Eine Analyse der potentiellen Zoonose und Infektionsketten erfordert die Identifikation und Isolation des fakultativen Pathogens im Fäzes sowie in der Umgebung von Mensch und Tier. Eine schnelle und nicht invasive molekulargenetische Methode (*Real-Time* PCR) wurde zur Detektion von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in der komplexen Stuhlmatrix bereits etabliert (Hinse, 2012). Diese *Real-Time* PCR wurde in dieser Arbeit optimiert und im Rahmen einer Fall-Kontrollstudie angewandt, um die Prävalenz des Bakteriums zu ermitteln. Dies stellt die Basis der epidemiologischen Analysen dar.

Diese Analyse basiert auf der Detektion des spezifischen *tanA*-Gens, welches für die Tanninacetylhydrolase (EC 3.1.1.20) kodiert. Dieses Enzym ermöglicht es *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, Gallotannine zu verwerten, um neue Kohlenstoffquellen zu erschließen (Osawa *et al.*, 1995; Schlegel *et al.*, 2003). In anderen Bakterienspezies wurde dieses Gen auch beschrieben. Allerdings sind diese keine Kommensalen des Gastrointestinaltraktes oder weisen keine Sequenzhomologien zu dem *tanA*-Gen von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* auf (Hinse, 2012). Durch dieses Gen unterscheidet sich das Gram-positive Pathogen von den anderen Subspezies *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* und *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* und von anderen Streptokokken (Osawa *et al.*, 1995; Schlegel *et al.*, 2003).

Eine subjektiv sehr gute Sensitivität wurde zuvor in dem *TaqMan*-sondenbasierten PCR-System erzielt (neun bis 18 KBE/ml), welches jedoch einer systematischen Verifizierung bedarf (Hinse, 2012). Zum Optimieren der molekulargenetischen Methode wurde das Extraktionssystem und die interne Kontrolle auf CMV umgestellt und eine *Minor-Groove-Binder*-Sonde eingesetzt. Diese Sonde weist neben dem 5'-fluoreszierenden Reporter und dem 3'-terminalen Quencher zusätzlich eine Modifikation des 3'-Endes mit einem *Minor-Groove-Binder* (MGB) auf, die es ermöglicht, eine stabilere Bindung mit der komplementären DNA einzugehen. Damit wird zum einen eine höhere Spezifität und zum anderen ein stärkeres Fluoreszenzsignal und somit eine erhöhte Sensitivität innerhalb der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate erzielt (Kutyavin *et al.*, 2000). Um den Einfluss der Stuhlmatrix auf das PCR-System zu testen, wurden Stuhlsuspensionen mit unterschiedlichen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Konzentrationen inokuliert und in jeweils vier Replikaten extrahiert. Ein *Limit of Detection* (LOD) von 51,4 KBE/ml (95 %-CI: 32,9-22542,3) konnte ermittelt werden. Im direkten Vergleich beider PCR-Methoden

zeigte diese optimierte MGB-basierte *Real-Time* PCR eine deutliche Verbesserung. Mit denselben DNA-Extrakten konnte mit der zuvor etablierten *tanA-TaqMan*-PCR (Hinse, 2012) keine Nachweisgrenze determiniert werden. Die Detektion eines Fluoreszenzsignales war in der *tanA-TaqMan*-PCR (Hinse, 2012) bis zu einer Konzentration von 70 KBE/ml möglich. Bei geringeren Konzentrationen war keine Präsenz von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Stuhl angezeigt worden.

Im Zusammenhang mit dem *S. bovis/S. equinus*-Komplex wurde eine *Real-Time* PCR entwickelt (Lopes *et al.*, 2014). Diese Methode beruht ebenfalls auf dem Prinzip der *TaqMan*-MGB-Sonde und bietet den zusätzlichen Vorteil, durch unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe auch *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* detektieren zu können (Lopes *et al.*, 2014). Diese *Real-Time* PCR wurde mit dem Enzymsystem *StepOnePlus Real-Time* PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt (Lopes *et al.*, 2014) und in dieser Arbeit für die PCR im *Rotor-Gene* umgestellt. Mit dem *recN-Real-Time* PCR-System konnte in Stuhl für beide Subspezies ein Nachweis des Bakteriums bis zu 9 KBE/ml erfolgen.

Sowohl die *tanA*-MGB- als auch die *recN-Real-Time* PCR konnten im Konzentrationsbereich von 9 KBE/ml Fluoreszenzsignale detektieren und sind daher als gleichwertig einzustufen.

Daher wurde das Probenkollektiv der Fall-Kontrollstudie neben dem *Screening* auf das *tanA*-Gen auch auf die Präsenz des *recN*-Gens überprüft, sodass die Besiedlung des Darms mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ermittelt werden kann. Bei spanischen Koloskopiepatienten ermöglichte das zuletzt genannte molekulargenetische *Screeningsystem*, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in 11,1 % in 59 rektalen Abstrichen nachzuweisen (Lopes *et al.*, 2014). Die Analyse von 107 fäkalen Proben im Rahmen der Beobachtungsstudie am HDZ NRW detektierte 53,27 % *tanA*- und 57,94 % *recN*-positive fäkale Proben (57 bzw. 62 Proben). Außerdem wurden 9,35 % (10 von 107) molekulargenetisch positiv auf die Präsenz von *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* getestet, was dem Nachweis von etwa 13 % in rektalen Abstrichen ähnelt (Lopes *et al.*, 2014). Möglicherweise basieren diese Divergenzen der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* auf dem unterschiedlich untersuchten Probenkollektiv oder der Art der Probennahme. Während in der Studie zur Identifizierung verschiedener *S. bovis/S. equinus*-Subspezies rektale Abstriche entnommen wurden (Lopes *et al.*, 2014), wurden in dieser Arbeit Stuhlproben eingesetzt. Auch könnten regionale Unterschiede der untersuchten Probanden eine variierende Kolonisationsrate verursachen.

Eine Übereinstimmung der Nachweisverfahren konnte in 82 von 107 Proben (76,64 %) erzielt werden. Dabei konnte bei drei gesunden Probanden die positive Stuhlkultur erfolgreich in der PCR bestätigt werden. Widersprüchlich hingegen sind Ergebnisse, die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in der PCR anzeigen und in der Kultur *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* identifiziert wurde, oder aber auch der kulturelle Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* und die parallele Detektion beider Subspezies durch *tanA* und *recN*. Hervorzuheben ist, dass in der PCR *tanA*- und beide *recN*-Zielsequenzen gleichermaßen auf die Präsenz beider Subspezies hinwiesen, sodass eine gleichzeitige Kolonisation des Darms mit beiden *S. gallolyticus*-Subspezies angezeigt wurde. Dabei kann sowohl eine Kreuzreaktion in der *tanA*-*Real-Time* PCR als auch in der *recN*-*Real-Time* PCR (Lopes *et al.*, 2014) ausgeschlossen werden. Wie bereits in der Literatur diskutiert (Lopes *et al.*, 2014), konnte das Vorhandensein mehrerer *S. gallolyticus*-Subspezies im Stuhl bestätigt werden. Die Hälfte der *S. bovis*/*S. equinus* identifizierten Probanden besaßen zwei oder drei Subspezies, wovon einmal die Konstellation von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zusammen mit *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* beschrieben wurde (Lopes *et al.*, 2014).

Häufig sind in der Literatur kulturbasierte Methoden angewandt worden (Boltin *et al.*, 2015; Chirouze *et al.*, 2013), um die Kolonisation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nachzuweisen, sodass dadurch möglicherweise falsch negative Testergebnisse erzielt wurden und die Prävalenz des Gram-positiven Bakteriums unterrepräsentiert dargestellt wurde. Jeweils 2,80 % der kultivierten 107 Stuhlproben konnten mittels MALDI-TOF-MS und *sodA*-Sequenzanalyse als *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bzw. *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* identifiziert werden. Möglicherweise ist eine geringe Detektionsrate der Art der Kultivierung geschuldet. Diese hier angewandte Selektionsmethode nutzte Suspensionen mit 1 g Stuhl/1 ml PBS, die auf dem modifizierten Medium ausplattiert wurden. Eine andere Forschergruppe führte Nachweisraten von etwa 7 % (*S. bovis*) auf, wenn diese Flüssigkultivierungen des Stuhls oder von Darmfluiden anwandten (Boltin *et al.*, 2015). Ebenso wurden 7,3 % *S. bovis*-positive gesunde Individuen identifiziert und eine Rate von 48,6 % bei neoplastischen Veränderungen im Gastrointestinaltrakt (Al-Jashamy *et al.*, 2010). 4,6 % Gruppe D Streptokokken (einmal *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*) wurden in 259 Probanden, die einer Koloskopie unterzogen wurden, identifiziert (Chirouze *et al.*, 2013). Aufgrund der materiellen Eigenschaften und eines nicht homogen bzw. nicht homogenisierbaren Stuhls sowie das Darmmikrobiom insgesamt können die DNA-Reinheit und damit auch die PCR (z. B. durch inhibitorische Substanzen) aber auch die

Kultivierung beeinflussen (Holland *et al.*, 2000), sodass damit nicht nur falsch negative Ergebnisse erklärt werden könnten sondern auch die Diskrepanz der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Kultur und der *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*-positiven *Real-Time* PCR und *vice versa*. Die widersprüchlichen Ergebnisse der negativen Kultur und der positiven *Real-Time* PCR könnte ebenso darauf zurückzuführen sein, dass in der PCR DNA sowohl vitale als auch abgestorbene Bakterien detektiert werden. Falsch negative molekulargenetische und kulturelle Ergebnisse könnten auch aufgrund potentieller Inhibitoren oder durch einen zu geringen Bakterientiter (möglicherweise aufgrund des Stuhlprobenalters) verursacht werden (Holland *et al.*, 2000).

Obwohl ein Selektivmedium zur Gewinnung von Reinkulturen eingesetzt wurde, konnten dennoch andere Spezies kultiviert werden, die möglicherweise das Wachstum von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* inhibierten. *L. plantarum* und *E. faecalis* konnten bei der selektiven Kultivierung von Stuhlproben von Versuchsteilnehmern der Fall-Kontrollstudie auf Tannin-Natriumazid-TSA anstatt *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* isoliert werden. Diese bakteriellen Spezies können ebenfalls Tanninsäure abbauen (Goel *et al.*, 2011; Reverón *et al.*, 2013). Ein inhibitorischer Effekt auf das Wachstum von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* durch das Tannin-Natriumazid-Medium selbst kann ausgeschlossen werden, da dort in einem Vorversuch die gleiche Anzahl koloniebildender Einheiten wie mit nicht modifiziertem Medium ermittelt werden konnte. Indes zeigte das Inokulieren von Stuhl, BHI-Medium und PBS, dass nur 64 % des eingesetzten Bakterientiters im Stuhl nach sofortigem Ausplattieren wiedergefunden werden konnten. Somit wurde ein Effekt der Stuhlmatrix auf die Selektion von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* gezeigt, die die Isolation des Bakteriums beeinflusst.

Die *Follow-up*-Studie von acht Probanden zeigte, dass im Beobachtungszeitraum ein diskontinuierlicher Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Stuhl aufgetreten ist. Beispielsweise wurde ein Patient des HDZ NRW 2013 zum Zeitpunkt der IE sowie nach der Genesung am Ende desselben Jahres molekulargenetisch positiv auf *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* getestet. Zwei Jahre später war kein Nachweis des Gram-positiven Bakteriums mehr möglich. Dies lässt vermuten, dass das Darmmikrobiom nicht über den gesamten Zeitraum stabil ist. Ähnliche Erkenntnisse konnten auch für die Assoziation von *S. bovis* mit kolorektalen Karzinomen erzielt werden (Boltin *et al.*, 2015). Die Verschiebung des Mikrobioms kann z. B. durch die Ernährung oder durch Medikamente (z. B. Antibiotika) hervorgerufen werden (Turnbaugh *et al.*, 2008; Sekirov *et al.*, 2010; Rashid *et al.*, 2015). Die Bestimmung variierender Bakterienkonzentrationen lässt ebenfalls auf eine potentielle unterschiedliche Besiedlung des Gastrointestinaltraktes rückschließen.

Deutlich höhere Detektionsraten konnten bei der selektiven Kultivierung von Putenkot erzielt werden. Der Kot von Puten verschiedener Altersklassen, Zuchtlinien und Farmen in Deutschland wurde zu 91 % positiv getestet (Schulz *et al.*, 2015). Dadurch könnte eine Persistenz von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Darmmikrobiom angenommen werden. Weiterhin ähneln die ermittelten Bakterienkonzentrationen ( $3,6 \times 10^5$  KBE/ml) den Werten anderer *Enterococcus*-Spezies (Fisher und Phillips, 2009), die der Normalflora des gastrointestinalen Systems angehören.

Die Beprobung eines Legehennenbetriebes in Nordrhein-Westfalen in eineinhalb Jahren zeigte wiederum auf, dass die Besiedlung des Gastrointestinaltraktes erst im Zuge des Stalllebens auftritt. Dies kann vermutet werden, da junge Legehennen vor dem Einstellen sowohl molekulargenetisch als auch kulturell zunächst negativ getestet wurden und während der Beobachtungsphase der Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* möglich war. Es wurden Legehennen unterschiedlichen Alters, von unterschiedlichen Zuchtbetrieben und zu unterschiedlichen Jahreszeiten beprobt, und das fakultative Pathogen konnte fortwährend detektiert werden. Bei anderen Bakterienspezies wie beispielsweise *Campylobacter* sind *Lag*-Phasen von bis zu drei Wochen bekannt (Newell und Fearnley, 2003), nachdem die Masthühner neu in die Mastanlage gesetzt wurden. Basierend auf den ermittelten Daten kann angenommen werden, dass die Kolonisation des Gastrointestinaltraktes von Hühnern mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* vermutlich länger andauert. Im Gegensatz zu den analysierten Puten aus ökologischer Haltung scheint demnach das Bakterium nicht in der Normalflora von Hühnern zu persistieren. Dabei kann in Betracht gezogen werden, dass der Transfer von älteren Legehennen zu den jungen Hennen durch bisher unbekannte Mechanismen erfolgen könnte. Detaillierter ist der Aspekt der potentiellen Transmissionswege in diesem Tierbestand unter dem Abschnitt 4.2.2.2 aufgeführt.

Da davon ausgegangen werden kann, dass auch eine Koexistenz von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* nicht auszuschließen ist, wurde angenommen, dass die Anwendung beider PCR-Methoden zu einer Detektionsrate von 67,29 % (72 Proben) von 107 getesteten Probanden führt. Von 107 Versuchsteilnehmern wiesen zehn Probanden gastrointestinale Erkrankungen oder Leiden auf, einmal wurde eine *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-induzierte IE diagnostiziert und viermal wurden sonstige Erkrankungen angegeben (s. Anhang, Tab. 10.1). Folglich konnten 13,54 % der erkrankten Probanden positiv auf das fakultative Pathogen getestet werden. Eine Prävalenz von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im humanen Stuhl von 75 % konnte in 96 gesunden Probanden bestimmt werden. Die detektierte hohe Prävalenz lässt auf eine hohe Persistenz des Bakteriums im

Gastrointestinaltrakt schließen. Im Gegensatz dazu konnten mit Hilfe der fäkalen Kultivierung des humanen Stuhls nur drei positive *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate selektiert werden. Wie zuvor berichtet (Lopes *et al.*, 2014) weist die in dieser Arbeit etablierte *Real-Time* PCR im Vergleich zur selektiven Kultivierung ebenfalls eine höhere Nachweisrate auf. Dennoch ist das Tannin-Natriumazid-Medium geeignet, nicht nur tierische Isolate zu gewinnen, sondern auch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Stämme aus humanen Fäzesproben zu selektieren. Dabei ist möglicherweise auch das Stuhlprobenalter entscheidend. Tierische Proben wurden sofort aufgearbeitet während humane Proben aufgrund des postalischen Eingangs verzögert bearbeitet wurden.

Schluss folglich demonstrieren diese Ergebnisse, wie bereits zuvor beschrieben (Boleij *et al.*, 2011 a; Chirouze *et al.*, 2013; Lopes *et al.*, 2014), dass die Anwendung molekularbiologischer Methoden und die Subspeziesklassifikation erforderlich sind, um den Status der Kolonisation und der Infektion mit dem fakultativen Pathogen besser bewerten zu können.

#### **4.2 Transmission von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus***

Ungeklärt ist die Frage der Übertragung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zwischen Mensch und Tier und inwieweit die Umwelt auf die inner- und zwischenartliche Übertragung einen Einfluss nimmt. Das gastrointestinale Bakterium wurde im Menschen und in verschiedenen Tieren wie Rindern, Schweinen, Tauben und Hühnern als Kommensale identifiziert. In verschiedenen Wirten kann das fakultative Pathogen auch Infektionen wie Mastitis in Rindern oder Sepsis in Tauben auslösen (Devriese *et al.*, 1990; Garvie und Bramley, 1979; de Herdt *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, 2004). Darüber hinaus konnten dieselben Infektionen, wie Endokarditis und Meningitis, in Mensch und Tier beobachtet werden (Grant *et al.*, 2000; Headings *et al.*, 1978; Sekizaki *et al.*, 2008; Sillanpää *et al.*, 2008). Diese Beobachtungen legen eine Rolle von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* als potentiellen zoonotischen Erreger nahe. Epidemiologische Analysen können mittels MLST-Klassifizierung phylogenetische Zusammenhänge in bakteriellen Populationen und damit Infektionsketten aufdecken. Auch können Fall-Kontrollstudien potentielle Risikofaktoren für die Kolonisation des humanen Gastrointestinaltraktes sowie potentielle Transmissionswege und -quellen identifizieren. Zudem soll ein Fragebogen das Herstellen von Korrelationen zwischen dem potentiellen zoonotischen Erreger und der Tierhaltung, dem Tierkontakt, der Ernährung und weiteren Lebensumständen ermöglichen. Aus den erhobenen Daten kann somit ein neuer Einblick auf das

zoonotische Potential von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* gewährleistet werden und das Risiko des fakultativen Pathogens auf die humane Gesundheit neu determiniert werden.

#### 4.2.1 Potentielle Risikofaktoren der Kolonisation und Transmission

Das Auftreten von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im menschlichen Gastrointestinaltrakt kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Für die Kolonisation des Magen-Darm-Traktes mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* sowie dessen Interspezies-Transmission werden verschiedene direkte und indirekte Übertragungswege diskutiert. Zum einen kann die Ernährung zum anderen aber auch der Kontakt zu Tieren oder der Lebensraum einen maßgeblichen Expositionsfaktor darstellen. Im Zusammenhang mit der analytischen Beobachtungsstudie sollen diese potentiellen Risikofaktoren genauer untersucht werden, vor allem um eine mögliche Transmissionsquelle von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zu identifizieren. Bisher sind keine Studien bekannt, die potentielle Risikofaktoren für die Kolonisation oder dem Auftreten der infektiösen Endokarditis mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* beschreiben (Giannitsioti *et al.*, 2007).

Es wurde beobachtet, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* signifikant häufiger im Stuhl nachgewiesen werden konnte, wenn keine Antibiotika innerhalb des letzten halben Jahres vor der Teilnahme an der Beobachtungsstudie eingenommen wurden. Dabei kann eine Antibiotikatherapie die Zusammensetzung des Darmmikrobioms verändern (Card, *et al.* 2015; Rashid *et al.*, 2015). In einer Langzeitstudie wurde der Einfluss der Antibiose auf das gastrointestinale Mikrobiom gesunder Probanden analysiert. Die Kultivierung und Mikrobiomanalysen der Stuhlproben zeigte, dass das Mikrobiom bis zu zwölf Monate nach der Antibiotikatherapie verändert sein kann (Rashid *et al.*, 2015). Folglich könnte *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nicht nachgewiesen worden sein, wenn in den sechs Monaten vor der Studienteilnahme eine Antibiotikatherapie erfolgte. Ob eine Antibiose die Detektion des fakultativen Pathogens im Fäzes langfristig verändert, sollte in weiterführenden Analysen untersucht werden. Im Folgenden wurden bei der Betrachtung potentieller Risikofaktoren für die Übertragung des Bakteriums sowie die Besiedlung mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nur Studienteilnehmer der Fall-Kontrollstudie einbezogen, die keine antibiotische Therapie angaben.

Kontrovers wird in der Wissenschaft diskutiert, ob *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* mit Infektionen oder kolorektalen Karzinomen assoziiert ist. Bereits einige Dekaden zuvor

wurde gezeigt, dass Patienten mit kolorektalen Karzinomen eine erhöhte fäkale Last aufweisen (Klein *et al.*, 1979), was in einigen Studien zum Teil bestätigt werden konnte (Abdulmir *et al.*, 2010; Boleij *et al.*, 2011 a; Krishnan *et al.*, 2014). Im Gegensatz dazu konnte eine erhöhte Präsenz des Erregers im Darm und eine daraus resultierende erhöhte Inzidenz von Bakteriämien, Infektionen oder kolorektalen Karzinomen in anderen retrospektiven und prospektiven Studien nicht bestätigt werden (Boltin *et al.*, 2015; Chirouze *et al.*, 2013). In dieser Arbeit wies nur ein geringer Anteil der Probanden (ohne Antibiose) gastrointestinale Erkrankungen/Leiden (10) oder infektiöse Endokarditis (1) auf, sodass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* tendenziell eher in der gesunden Population detektiert werden konnte. Aufgrund des geringen Anteils erkrankter Probanden lässt sich daher keine Assoziation zwischen infektiöser Endokarditis oder Kolontumoren mit dem Bakterium ableiten.

Im univariaten und multivariaten Modell konnte gezeigt werden, dass potentiell mehr Männer mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* besiedelt sind, was jedoch nicht signifikant ist. Verschiedene andere Studien zeigten ebenso eine positive Assoziation zwischen der Isolation des Bakteriums mit Männern sowie einen Bezug zu älteren Patienten und dem Vorliegen einer infektiösen Endokarditis (Coffey *et al.*, 2012; Giannitsioti *et al.*, 2007; Hoen *et al.*, 2002; Kupferwasser *et al.*, 1998; Romero *et al.*, 2011; Tripodi *et al.*, 2004). Die Ursachen dafür sind bisher jedoch unbekannt. Dass das Alter für die Kolonisation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* vermutlich nicht maßgeblich ist, kann vor allem im multivariaten Modell gezeigt werden. Die Unabhängigkeit vom Alter scheint sowohl für potentielle Risikofaktoren als auch für Nicht-Risikofaktoren zuzutreffen (Modell 1 und 2). Das ist dadurch ersichtlich, dass eine gleichmäßige Verteilung bei den exponierten und nicht-exponierten Probanden beobachtet werden konnte. Dies konnte auch für das Verhältnis von Männern und Frauen in den Fällen und Kontrollen gezeigt werden. Die Betrachtung des multivariaten Modells potentieller Einflussfaktoren deutet auf eine Risikotendenz für Männer hin, mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* kolonisiert zu sein.

Es konnte demonstriert werden, dass die Einnahme von Arzneimitteln im Allgemeinen (z. B. zur Behandlung von Hypertonie; Kontrazeptiva) einen protektiven Effekt auf das Darmmikrobiom ausüben könnte. Es ist zu empfehlen, bei zukünftigen Analysen den Fragebogen um spezifischere Arzneimittelklassen zu erweitern, um zu identifizieren, ob und welche Arzneimittel tatsächlich Einfluss auf die Kolonisation des Darms mit dem fakultativen Pathogen einnehmen. Daher sollte das Spektrum der bekannten Erkrankungen auf chronische Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder *S. gallolyticus*

subsp. *gallolyticus*-assoziierte Erkrankungen ausgeweitet werden und nicht nur auf bekannte gastrointestinale Erkrankungen oder Allergien fokussiert sein.

Somit konnte eine Assoziation des fakultativen Pathogens mit dem Gesundheitsstatus, einer Geschlechtsspezifität oder dem erhöhten Alter nicht erfasst werden, sondern nur als Risikotendenzen verstanden werden.

Infektiöse Endokarditiden, die durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* hervorgerufen werden, sollen vorrangig in ruralen Gebieten lokalisiert sein (Boleij und Tjalsma, 2013; Corredoira *et al.*, 2015; Giannitsioti *et al.*, 2007). In einer spanischen Studie wurden diesbezüglich Stadt-, Rinderzucht- und Fischerregionen untersucht. Diese demonstrierten, dass in dem Gebiet, in dem vor allem Rinderzucht und Milchproduktion betrieben wird, *S. bovis* Biotyp I die prädominante isolierte Spezies ist. Ebenso konnte in dieser Region eine erhöhte Mortalität im Zusammenhang mit kolorektalen Karzinomen beobachtet werden (Corredoira *et al.*, 2015). Das Leben auf dem Land und ein häufiger Tierkontakt sollen ebenso die Kolonisation und Transmission des Bakteriums fördern. In der Fall-Kontrollstudie konnte bei der Betrachtung des Wohnortes bestätigt werden, dass tendenziell ein Risiko besteht, wenn der Wohnsitz in ländlichen Gebieten lag. Das häufigere Auftreten von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bei Personen, die auf dem Land leben konnte bei der simultanen Betrachtung verschiedener potentieller Risikofaktoren für unter 50-Jährige als signifikant nachgewiesen werden. Somit konnten Publikationen bestätigt werden, die postulieren, dass Menschen in ruralen Regionen eher mit dem Bakterium kolonisiert sind als Stadtbewohner (Corredoira *et al.*, 2015; Giannitsioti *et al.*, 2007).

Zusätzlich könnte auch ein potentielles Risiko bestehen, wenn sich in der Nähe des Wohnhauses ein Wald oder ein Bauernhof befindet. Diese Tendenz wird deutlicher bei den unter 50-Jährigen im logistischen Regressionsmodell (Modell 1). Dort lag der *Odds Ratio* für das Leben in Waldnähe für unter 50-Jährige bei 5,68 (CI: 0,97-33,37). Im Gegensatz dazu scheint in der gesamten betrachteten Population und bei über 50-Jährigen, keine Exposition durch eine Nähe eines landwirtschaftlichen Betriebes zum Wohnort zu bestehen (nicht signifikant). Es könnte somit plausibel sein, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* sich im humanen Gastrointestinaltrakt über kontaminierte Nahrungsmittel oder durch das Leben in der Nähe von Tieren etablieren kann (Boleij und Tjalsma, 2013).

Der Verzehr von Rohmilch und Rohmilchprodukten soll zur Kolonisation und Transmission des Gram-positiven Pathogens beitragen (Giannitsioti *et al.*, 2007), vor allem durch die Detektion des Erregers in Rohmilchprodukten von infizierten

Milchkühen (Fortin *et al.*, 2003; Garvie und Bramley, 1979; Watts, 1988). Wider der Erwartung kann in der Beobachtungsstudie der alleinige Konsum von Rohmilch und Rohmilchprodukten tendenziell als Transmissionsquelle ausgeschlossen werden. Es kann eher angenommen werden, dass die Aufnahme von rohem Fleisch ein potentieller Risikofaktor ist, da sowohl der alleinige Verzehr von rohem Rind- oder Schweinefleisch sowie die Kombination beider Nahrungsmittel eine Risikotendenz anzeigt. Daher kann angenommen werden, dass der Konsum von rohem Rindfleisch zur Kolonisation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* beiträgt, was bereits zuvor postuliert wurde (Boleij und Tjalsma, 2013; Corredoira *et al.*, 2015; Giannitsioti *et al.*, 2007). Die *Odds Ratios* im logistischen Regressionsmodell (Modell 1) zeigten Risikotendenzen auch im Zusammenhang mit dem Konsum von rohem Fleisch (Schwein, Rind) und Rohmilchprodukten an. Dabei ist hervorzuheben, dass vor allem Probanden über 50 Jahre eher *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Darm vorwies bei dem Konsum von rohen Fleisch- (Rind und Schwein) und Rohmilchprodukten. Darüber hinaus konnte auch eine Tendenz zur Kolonisation des Gastrointestinaltraktes bei der Verarbeitung von rohem Fleisch im univariaten Modell beobachtet werden. Dabei scheint es bei einem Alter über 50 Jahren eine erhöhte Risikotendenz zu geben im Vergleich zu der jüngeren Gruppierung ( $\leq 50$  Jahre). Daraus kann die Hypothese generiert werden, dass in einem Alter von über 50 Jahren, die Akkumulation verschiedener Expositionsfaktoren (Konsum von rohem (Rind-)Fleisch, Verarbeitung von rohem Fleisch) zur Kolonisation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Magen-Darm-Trakt führt.

Die Identifikation des Opportunisten im Fäzes von Tieren lässt vermuten, dass eine Transmission des Bakteriums über Schmierinfektionen durch den Kontakt mit den Exkrementen beim Reinigen von Ställen, dem Einsatz dieser als Düngemittel oder durch den Kontakt mit Speichel oder das Streicheln von Tieren erfolgen könnte. Dies kann in dieser Beobachtungsstudie jedoch nur teilweise bestätigt werden. Entgegen der aufgestellten Hypothesen, dass ein häufiger Tierkontakt oder das Leben in unmittelbarer Nähe zu Tieren zu erhöhten Prävalenzen von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Verdauungstrakt führt (Boleij und Tjalsma, 2013; Corredoira *et al.*, 2008), deutet der *Odds Ratios* der univariaten Analyse auf eine Transmission unabhängig vom Tierkontakt hin. Weder der berufliche oder private Tierkontakt, der Besitz bzw. die Haltung von Haus- oder Nutztieren, noch das Leben oder Arbeiten auf einem landwirtschaftlichen Hof als Expositionsfaktor traten als Risikofaktor in Erscheinung (univariat,  $OR < 1$ , nicht signifikant). Andererseits konnte in dem Modell für mehrere potentielle Nicht-Risikofaktoren gezeigt werden, dass ein beruflicher oder

privater Kontakt zu Tieren in der beobachteten Gesamtpopulation und bei Probanden unter 50 Jahren einen Einfluss hat, während für die Gruppierung über 50 Jahren keine Risikotendenz bestand. Die erhobenen Daten schließen einen engen Tierkontakt und den Besuch eines Zoos, landwirtschaftlichen Hofes oder Wildgatters im univariaten Modell signifikant als Risikofaktor für die Kolonisation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* aus. Allerdings ist diese Signifikanz im Nicht-Risikofaktormodell nicht mehr nachweisbar. Bei der Auswertung dieser Daten zum Kontakt zu Tieren sowie auch zu deren Exkrementen ist allerdings zu beachten, dass häufig nicht die Tierart im Fragebogen angegeben wurde, mit der der Proband in Kontakt gekommen ist. Zwar ist das Vorkommen von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in zahlreichen Tierarten (z. B. Tauben und Rindern) allgemein dokumentiert worden (Sasaki *et al.*, 2004; Baele *et al.*, 2000), die Kolonisationsrate und das daraus resultierende Transmissionspotential in den unterschiedlichen Spezies ist jedoch nicht bekannt. In dieser Arbeit wurden erstmalig die Besiedlung des animalen Gastrointestinaltraktes beschrieben, sodass eine Transmission zwischen Puten bzw. Legehennen und dem Landwirt angenommen werden kann (s. 4.2.2.2). Allerdings ist unbekannt, welche Detektionsrate bei anderen Tierspezies (beispielsweise bei Tierarten in Streichelzoos, bei denen eher ein privater Kontakt von Mensch zu Tier zu erwarten ist als privater Kontakt zu Geflügel) vorzufinden ist. Der Anbau von Gemüse im Garten mit der zusätzlichen Exposition des Kontaktes zu Tierexkrementen zeigte einen potentiellen Ausschluss einer Übertragung durch Schmierinfektion an (uni- und multivariat, nicht signifikant).

Der integrierte Fragebogen in der analytischen Beobachtungsstudie zeigte potentielle Expositionsfaktoren wie den Verzehr von rohem Fleisch und das Leben in ländlichen Regionen im Zusammenhang mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im humanen Gastrointestinaltrakt auf. Ob auch protektive Faktoren wie der Verzehr von Rohkost oder Obst vor einer Kolonisation schützen, wurde nicht erfasst. Die bisher postulierte Korrelation des Tierkontaktes konnte hier zum Teil abgeschwächt werden. Die Datenerhebung erfolgt in Fall-Kontrollstudien jedoch rückblickend, sodass eine Ergebnisverzerrung in Erscheinung treten kann, wie es zum Beispiel bei der Angabe von Erkrankungen und der Einnahme von Medikamenten der Fall sein könnte. Bei der Auswertung der Analyse ist generell zu beachten, dass der retrospektive Charakter der Beobachtungsstudie Einfluss auf die Daten haben könnte. Eine rückblickende Wiedergabe von Gewohnheiten ist abhängig sowohl von den Erinnerungsfähigkeiten als auch von der Bereitwilligkeit zur Auskunft der Studienteilnehmer (z. B. Ernährung, Kontakt zu Tieren). Dementsprechend könnte eine Verzerrung der Ergebnisse entstehen. Dies zeigte sich dadurch, dass Probanden bei der wiederholten Befragung

zum Teil abweichende Antworten wie z. B. bei den Ernährungsgewohnheiten angeben. Dieses Phänomen zeigte auf, dass bestimmte Umstände in der Vergangenheit unterschiedlich bewertet wurden. Zu beachten ist, dass aus diesen Gründen durch Fall-Kontrollstudien nur Hypothesen aufgestellt werden, da keine relativen Risiken aufgrund der nicht ermittelbaren Inzidenzen angegeben werden können (Klug *et al.*, 2004). Darüber hinaus wurde nur eine kleine Gruppe von Fällen und Kontrollen analysiert, sodass häufig lediglich Risikotendenzen zu beobachten waren. Folglich konnte der Einfluss der Ernährung, des Tierkontaktes und des Lebensraumes auf die Transmission des fakultativen Pathogens und die Kolonisation des humanen Gastrointestinaltraktes derzeit nicht abschließend geklärt werden. Es sollten daher weitere Analysen erfolgen, die verschiedene Zielgruppen erfassen. Die Untersuchung von größeren Gruppen mit Versuchsteilnehmern, die gastrointestinale Veränderungen oder infektiöse Endokarditis aufweisen oder gesund sind, könnte verifizieren, ob die ermittelten potentiellen Risikofaktoren einen tatsächlichen Einfluss auf die Transmission und Kolonisation haben. Darüber hinaus könnten mit größeren Probandengruppen signifikante Assoziationen zwischen Risikofaktoren und der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Präsenz im Darm erzielt werden.

#### **4.2.2 Epidemiologie von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus***

Neben dem Pathomechanismus und der kontrovers diskutierten Assoziation von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* mit diversen Krankheitsbildern in Mensch und Tier sind die Transmissionswege und das zoonotische Potential nicht hinreichend erforscht. Neben den zuvor erläuterten potentiellen Risikofaktoren könnten auch bestimmte Genotypen mit der Verbreitung und dem Auftreten von Infektionen korrelieren.

Eindeutige Differenzierungen von tierischen und humanen infektiösen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolaten konnten mittels SDS-PAGE (*Sodium-Dodecyl-Sulfat*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) oder Pulsfeld-Gelelektrophorese erzielt werden (Devriese *et al.*, 1998; Romero-Hernández *et al.*, 2015). Dass keine eindeutige Auftrennung von klinischen humanen und animalen Isolaten von subklinischen Tierkotisolaten ermittelt werden konnte (Sasaki *et al.*, 2004), wurde auch durch die Generierung genetischer Fingerabdrücke (*rep*-, ERIC- und RAPD-PCR) demonstriert (Hinse, 2012). Auch weisen initiale MLST-Klassifizierungen darauf hin, dass die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Infektionen eine potentielle bakterielle Zoonose darstellen könnten (Hinse, 2012). Demnach kann eine zoonotische Übertragung zwischen Mensch und Tier nicht ausgeschlossen werden. Über *Multilocus Sequence*

*Typing* können phylogenetische Ähnlichkeiten von Stämmen erfasst werden und Transmissionswege, Populationsstrukturen und eine potentielle Zoonose identifiziert werden (Urwin und Maiden, 2003). Für die Spezies *S. gallolyticus* wurde 2014 ein MLST-Schema publiziert, welches neben den epidemiologischen Aspekten auch die Virulenz und die Subspeziesidentifizierung anstrebt (Shibata *et al.*, 2014). Jedoch unterscheiden sich die drei *S. gallolyticus*-Subspezies hinsichtlich der Wirtsspektren, Pathomechanismen sowie biochemischen Eigenschaften deutlich voneinander. Nur *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* sind Kommensalen des gastrointestinalen Systems und können Auslöser von Endokarditis oder Meningitis sein (Ballet *et al.*, 1995; Grant *et al.*, 2000; Headings *et al.*, 1978; MacNeal und Blevins, 1945; Onoyama *et al.*, 2009; Sillanpää *et al.*, 2008; Sturt *et al.*, 2010). Neben der durch *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* hervorgerufenen Sepsis, ist dieses Bakterium vorrangig in immunkompetenten Patienten mit chronischen Lebererkrankungen oder Leberzirrhose assoziiert (Barnett *et al.*, 2008; Gonzalez-Quintela *et al.*, 2001). Im Vergleich zu den humanen Infektionen durch diese Subspezies sind im Gegensatz zu *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nur wenige Fälle in Tieren (z. B. Entenküken, Gänse) beschrieben worden (Barnett *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012). Aus Milchprodukten wie beispielsweise Käse und Sauerrahm wurde der nicht pathogene *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* isoliert (Tsakalidou *et al.*, 1998). Schluss folglich weist die fakultative pathogene Subspezies *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ein breiteres Wirts- und Krankheitsspektrum auf, sodass basierend auf diesen Charakteristika das subspezies-spezifische MLST-Schema konstruiert wurde. Der subspezies-spezifische Fokus der Erforschung der epidemiologischen Struktur und die Abschätzung des Risikos durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* werden durch spezifische Positionen der Primerbindungen an die Haushaltsgene gewährleistet. Das etablierte System ist nicht übertragbar auf die anderen Subspezies *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* und *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus*.

#### 4.2.2.1 Molekulargenetische Charakterisierung der Populationsstruktur

Die Ergänzung des initialen MLST-Schemas (*glgB*, *nifS*, *uvrA* und *p20*; Hinse, 2012), mit den Haushaltsgenen *tkt*, *trpD* und *aroE* zeigt ein erwartet höheres Diskriminierungspotential. Die stark ausgeprägte Vielfalt in der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Populationsstruktur ist im MST wiederzufinden und wird ebenfalls durch den *Simpson's Index of Diversity* (SID) angezeigt. Zum Etablieren des Systems wurde initial eine Population von 101 Stämmen analysiert, die neben einem hohen SID-Wert von 0,84 einer geringen positiven Selektion ( $d_N/d_S < 1$ ) unterliegt. In der analysierten

Gesamtpopulation wurden 250 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate charakterisiert, die 16 (*glgB*) bis 23 (*p20*) Allele aufweisen und somit in  $1 \times 10^9$  STs differenziert werden können. Insgesamt konnten für die analysierte Gesamtpopulation 79 STs identifiziert werden, die in 13 klonale Komplexe gegliedert wurden. Daraus lässt sich ableiten, dass das entwickelte subspezies-spezifische MLST-Schema vergleichbar mit anderen entwickelten *Streptococcus*-Schemata ist (z. B. Enright *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2003). Vor allem ist es dem *S. gallolyticus*-MLST-Schema, welches ein anderes Genset (*dpr*, *gmk*, *rpoD*, *parC*, *pta*, *pyrC* und *recN*) anwendet, nicht unterlegen. Dieses weist ähnliche Allelvariationen von 6,4 % (*gmk*, *parC*) bis 11,1 % (*dpr*) auf (Shibata *et al.*, 2014). Des Weiteren kann die Struktur der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Population durch den berechneten Assoziationsindex als klonal und nicht epidemiologisch interpretiert werden. Dies kann durch unterschiedliche geographische Ursprünge oder unterschiedliche Wirte der Isolate begründet sein (Smith *et al.*, 1993).

Eine Spezifität zu einem bestimmten Wirt, einer bestimmten Region oder gar dem Isolationszeitpunkt kann aus der MLST-Analyse der Bakterienpopulation nicht abgeleitet werden, da diesbezüglich nicht bei allen Isolaten Informationen vorhanden waren. Die Klassifizierung mittels MLST zeigt Ansammlungen von bestimmten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolaten in verschiedenen Tierarten (hauptsächlich Tauben, Puten, Hühner). Nur bei den Putenisolaten sind genauere Informationen zur Herkunft bekannt. Diese stammten aus verschiedenen Tierbeständen von zehn Farmen aus Deutschland und wiesen unabhängig vom Alter, der Zuchtlinie und von der Jahreszeit diverse STs auf (Schulz *et al.*, 2015). Einerseits wurden in verschiedenen Putenbeständen STs mit sehr geringen Übereinstimmungen gefunden und andererseits wurden bestimmte STs in Farmen verschiedener Bundesländer detektiert. Darüber hinaus wurden bestimmte STs auch in anderen Spezies wie z. B. Tauben, Hühnern und dem Menschen identifiziert (Schulz *et al.*, 2015). Diese Erkenntnisse weisen auf mögliche Intra- und Interspezies-Transmissionen von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* hin (Schulz *et al.*, 2015), was für andere Gram-positive pathogene Bakterien bereits beschrieben wurde (Van den Bogaard *et al.*, 2002).

Insgesamt fällt im *Minimum Spanning Tree* (MST) eine starke Präsenz tierischer Isolate auf, die nur sehr geringe Verwandtschaften zu menschlichen Isolaten aufweisen. Herauszustellen ist der klonale Komplex sechs, der nur klinische *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate nah verwandter humaner Stämme aufweist. Daher kann angenommen werden, dass die Isolate dieses Komplexes eine höhere Überlebensfähigkeit aufweisen und humane Infektionen hervorrufen, sodass dieser Komplex als potentiell human pathogen einzustufen ist. Die Korrelation bestimmter

klonaler Komplexe mit Infektionen konnte beispielsweise für *S. aureus* oder *S. suis* gezeigt werden (King *et al.*, 2002; Nethercott *et al.*, 2013).

Mit Hilfe des MLSTs konnten Allelkombinationen identifiziert werden, die sowohl Menschen als auch Tieren zugeordnet werden konnten. Dabei wurde der ST 3 und ST 12 sowohl in humanen Blutkulturen und gesunden Probanden der Fall-Kontrollstudie als auch in Rindern (mit einem Milchisolat einer Euterinfektion, ST 12) isoliert. Das Vorhandensein derselben STs in unterschiedlichen Wirten sowie in Nahrungsmitteln, deuten auf eine zoonotische Übertragung des Bakteriums zwischen Mensch und Tier hin, bei der Lebensmittel als potentielle Transmissionsquelle von Bedeutung sein könnten. Besonders hervorzuheben ist der ST 13, der erstmalig Hinweise auf eine potentielle Transmission zwischen einem Landwirt, der an infektiöser Endokarditis erkrankt war, und seinen Legehennen zeigte (s. 4.2.2.2). Neben diesem Endokarditisisolat des Landwirtes waren nur wenige Isolate aus der Fall-Kontrollstudie in diese phylogenetische Charakterisierung eingegangen und es konnten keine detaillierteren Erkenntnisse in Bezug auf das zoonotische Potential gewonnen werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass zum einen nur ein geringer Anteil der Isolate aus *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-induzierten Endokarditiden und zum anderen nur wenige humane Isolate aus Stuhlproben selektiert werden konnten. Der determinierte Genotyp dieser humanen Isolate zeigte neue STs (ST 104, ST 105), oder STs, die dem Komplex humaner Endokarditiden (CC 6) oder Isolaten humanen und animalen Ursprungs (ST 3, CC 51) zugeordnet werden konnten. Im CC 51 waren neben dem ST 51 eines IE-Patienten dieser Studie Putenisolate mit unbekanntem Infektionsstatus und ein weiteres Blutkulturisolat enthalten. Vor allem aufgrund fehlender Informationen (wie z. B. Gesundheitszustand der Tiere oder genauere Patientencharakteristika) zu diesen Isolaten aus der Stammsammlung konnten keine Rückschlüsse auf Transmissionswege erfolgen. Dennoch kann von einem zoonotischen Potential von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ausgegangen werden, da dieselben STs in Mensch und Tier identifiziert wurden und diese Isolate Infektionen ausgelöst haben. Ein zoonotisches Potential kann auch aus dem *S. gallolyticus*-MLST-Schema abgeleitet werden (Shibata *et al.*, 2014).

Da Isolate desselben STs sowohl als Kommensale als auch als Pathogen auftreten, kann nicht abschließend geklärt werden, ob eine Übertragung zwischen Mensch und Tier stattgefunden hat. Über die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Genome kann die Anpassung des Bakteriums an den animalen Wirt abgeleitet werden (Lin *et al.*, 2011; Rusniok *et al.*, 2010). Die spezifischen tierassoziierten Gene sind im humanen Wirt nicht essentiell, sodass eine potentielle Transmission nicht ausgeschlossen werden

kann. Denkbar ist auch, dass nicht nur der Genotyp sondern auch der Immunstatus des Wirts einen Einfluss auf die bakterielle Infektion hat. Ob humane Infektionen ausschließlich von Stämmen hervorgerufen werden, die den Menschen kolonisieren, oder ob eine Übertragung zwischen Mensch und Tier erfolgen kann, ist noch nicht bekannt. Dies liegt möglicherweise an fehlenden Studien, die den Kontakt zwischen Mensch und Tier im Zusammenhang mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* untersuchen. Es konnten erste Hinweise generiert werden, die eine potentielle Transmission zwischen Mensch und Tier aufzeigen. Der ST 13 wurde sowohl in einem Blutkulturisolat eines Landwirtes mit infektiöser Endokarditis als auch in den Hennen seines Tierbestandes gefunden. Dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Tieren diverse Infektionen auslösen kann, ist bereits bekannt (Chadfield *et al.*, 2007; Devriese *et al.*, 1990; Sekizaki *et al.*, 2008). Dieser Tatsache wird in der Veterinärmedizin allerdings nicht weiter nachgegangen. Dabei wird vermutet, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Gastrointestinaltrakt von klinisch gesunden Hühnern persistiert und im Laufe der Zeit zu subklinischen Infektionen führt, sodass die Bedeutung in der Veterinärmedizin in Bezug auf die humane Gesundheit nicht unterschätzt werden sollte (Sekizaki *et al.*, 2008). *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* wurden als Hauptursache für nahrungsmittelübertragene Erkrankungen im Menschen weltweit identifiziert (Kalupahana *et al.*, 2013). Das Hauptreservoir dieser Spezies ist im Geflügel. Auf dem Markt der europäischen Union sind 80 % der geschlachteten Hühner mit dieser Spezies kontaminiert (El-Adawy *et al.*, 2012). Epidemiologische Studien zeigten, dass diese *Campylobacter* spp. über die Verarbeitung oder dem Konsum von ungegartem Geflügelfleisch oder dem Verzehr von Rohmilch auf den Mensch übertragen werden kann und so zu Gastroenteritis führt (van de Giessen *et al.*, 2006).

#### **4.2.2.2 Potentielle Transmissionswege von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus***

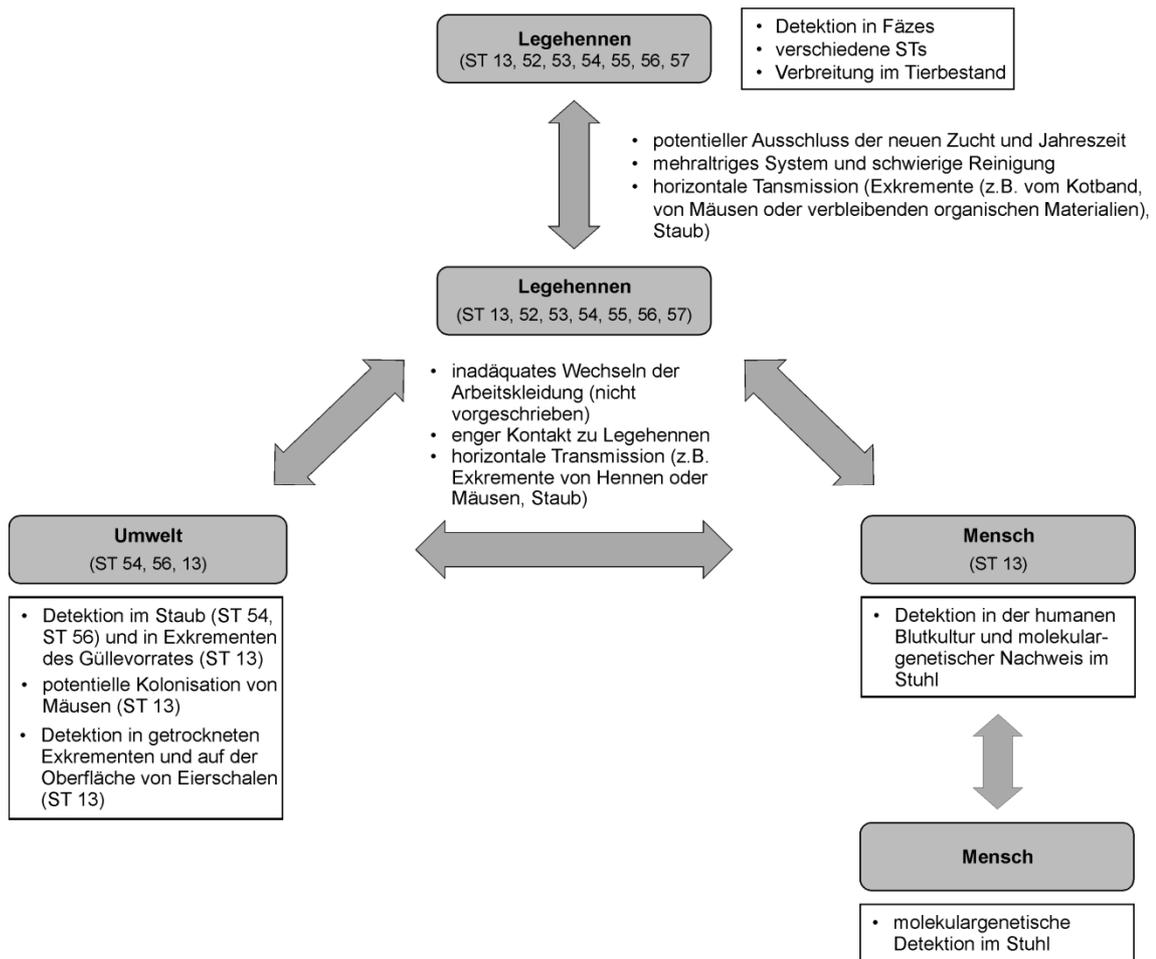
Mit Hilfe der in dieser Arbeit angewandten Typisierungsmethode konnte erstmalig die potentielle Übertragung des Bakteriums zwischen Mensch und Tier systematisch untersucht werden. Ein identisches Allelprofil konnte in einem humanen Blutkulturisolat sowie in Isolaten aus Exkrementen von Legehennen identifiziert werden.

In Abschnitt 4.1 wurde bereits das Auftreten des Bakteriums im Gastrointestinaltrakt von Geflügel näher betrachtet. Für Puten aus ökologisch gehaltenen Tierbeständen liegt nahe, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zur Normalflora des Darmmikrobioms gehört. Im Gegensatz dazu konnte für Legehennen festgestellt werden, dass eine Kolonisation erst im Zuge der Legeperiode im Tierstall auftreten könnte. Das

gastrointestinale Bakterium konnte in neu eingestellten Gruppen weder durch selektive Kultivierung noch molekulargenetisch detektiert werden. Dabei könnte in Betracht gezogen werden, dass der Transfer von älteren Legehennen zu den neuen Hennen durch bisher unbekannte Mechanismen erfolgt.

Die molekulargenetische Charakterisierung der Isolate aus dieser Region (Nordrhein-Westfalen) mittels MLST wies eine geringe Vielfalt auf (geringer SID), die sich auch im identischen genetischen Fingerabdruck (ERIC-PCR) der Isolate widerspiegelte. Der Assoziationsindex ( $I_A > 1$ ) zeigte geringe Raten an Mutationen und horizontalem Gentransfer der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate in dem Legehennenbetrieb an. Basierend auf diesen Daten wurde eine hohe Phylogenie der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate reflektiert.

Verschiedene Hypothesen wurden generiert, die die Übertragung zwischen den Legehennen sowie zwischen den Legehennen und den Tierpflegern erklären könnten. Ein Modell, welches alle betrachteten potentiellen Transmissionen aufgreift, ist in Abbildung 4.2 dargestellt. In dieser Arbeit wurden die Zuchtbetriebe, Beprobungsdaten (Jahreszeiten) und die Legehennenherde selbst in die Analysen eingeschlossen.



**Abbildung 4.2: Potentielle Transmissionswege von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Legehennenbestand.** Die Ergebnisse der Identifizierung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* des landwirtschaftlichen Hofes sind in den schwarzumrandeten weißen Kästen zusammengefasst. Die grauen Pfeile symbolisieren die Intraspezies- (zwischen Legehennen bzw. dem Menschen selbst) und die Interspezies- (zwischen den Legehennen und den Landwirten) sowie die Übertragung zwischen den Hennen/Menschen und der Umwelt. Der Transfer des Bakteriums könnte dabei durch verschiedene Faktoren, die neben den Pfeilen dargestellt wurden, beeinflusst werden. (Dumke *et al.*, 2015)

Ob eine Korrelation zwischen den gewonnenen Isolatens aus dem Kot von Legehennen verschiedener Gruppen des Tierbestandes mit der Herkunft (Zuchtbetrieb) oder dem Zeitpunkt des Einstellens (Jahreszeit) und dem detektierten Sequenztypen besteht, wurde ermittelt, indem diese Daten den jeweiligen STs gegenübergestellt wurden. Falls eine Assoziation zwischen der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Detektion in Fäzesproben des Legehennenbetriebs und den neuen Hühnern eines Zuchtbetriebes oder der Jahreszeit bestünde, wäre derselbe ST bei den alten und den neu eingestellten Legehennen zu erwarten. Allerdings konnten diverse STs verschiedener *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate im Zusammenhang mit dem Zuchtbetrieb oder dem Beprobungsdatum identifiziert werden. Dass das fakultative Pathogen im

Legehennenbetrieb womöglich durch ein Umweltreservoir oder durch den Landwirt von einer Gruppe zur nächsten transferiert wird, kann durch das Auftreten des ST 13 und ST 53 im gesamten Stall vermutet werden. Wenngleich die Transmission vom Zuchtbetrieb auf Masthühner für andere Humanpathogene wie *Campylobacter jejuni* in der Literatur beschrieben ist, konnte dies für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nicht bestätigt werden (Cox *et al.*, 2002). Detailliertere Forschungen (z. B. Abstriche der Kloaken der Hennen) wären erforderlich, um diese Hypothese eindeutig zu belegen. Dass die Präsenz in Hühnern unabhängig vom Alter ist, da diese bei Hennen unterschiedlichen Alters zu verschiedenen Beprobungsdaten erfasst wurden, konnte anhand der zuvor aufgeführten Sequenztypen aufgezeigt werden.

Wenn die Detektion von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Fäzes von Legehennen unabhängig von dem Zuchtbetrieb, dem Alter und der Jahreszeit ist, könnte eine Präsenz des Bakteriums in der Stallumgebung erwartet werden. Die Tierhalter und die Umwelt könnten eine Möglichkeit der Transmission zwischen den Legehennen, den Mitarbeitern und der Stallumgebung darstellen. Für *Salmonella* mit denselben Phagentypen konnte gezeigt werden, dass ein enger Kontakt infizierter oder kolonisierter Tiere mit der Umwelt zur Kolonisation der Tiere beiträgt (Schulz *et al.*, 2011). Demnach könnte die Umwelt als Reservoir für Bakterien fungieren. Zwei bis acht Prozent der Staubpartikel in Legehennenbeständen sind mit Exkrementen belastet (Müller und Wieser, 1987). In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Staubpartikeln detektiert und isoliert werden. Damit besteht die Möglichkeit, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* auch außerhalb des Gastrointestinaltraktes überlebensfähig ist. Der Nachweis des Gram-positiven Bakteriums in getrockneten Exkrementen von Scharrmatten sowie auf der Oberfläche von Eierschalen stützt diese Annahme. Dies bestärkt die Hypothese der indirekten Transmission von der Umgebung auf die jungen Legehennengruppen. Somit könnte ein enger Tierkontakt zwischen dem Menschen, den Tieren und der Umwelt die Detektion verschiedener Sequenztypen in den fäkalen Proben von Legehennen verschiedener Gruppen und unterschiedlichen Alters erklären.

Ein erhöhtes Risiko der Kolonisation neu integrierter Hühner im Vergleich zu Haltungssystemen, bei denen alle Hühner auf einmal ein- und ausgestallt werden, besteht durch die schwer handhabbare Reinigung mehraltriger Haltungssysteme (Davies und Breslin, 2003; Wales *et al.*, 2007). Demzufolge ist eine potentielle Gefahr der Transmission durch die Inhalation oder durch das Verschlucken von Staubpartikeln oder verbliebenen Exkrementen, die mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* belastet sind, aus der Umgebung denkbar. Auch wenn nicht zu jedem Zeitpunkt der Probennahme

eine Selektion von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* möglich war, konnte das Bakterium fortwährend molekularbiologisch nachgewiesen werden. Dass das Überleben in leer stehenden sowie gereinigten Geflügelhäusern möglich ist, wurde für *Salmonella enteritidis* und *S. typhimurium* beschrieben (Carrique-Mas und Davies, 2008; Newell und Fearnley, 2003; Schulz *et al.*, 2011). Darüber hinaus könnte auch eine Transmission des Opportunisten durch lebende Vektoren wie Nager erfolgen. Durch die Aufnahme von mit Fäzes von Nagetieren kontaminiertem Futter wurde die Infektion mit bzw. die Übertragung von *Salmonella* und *Campylobacter* in Legehennenbeständen verursacht (Carrique-Mas und Davies, 2008). Mäusekot, der sich auf den Kotbändern der Volieren befand, könnte mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* kolonisiert sein. Dieses Isolat wies den ST 13 auf, der auch in der humanen Blutkultur des IE-Patienten und in den Legehennen identifiziert wurde. Somit könnten Mäuse eine Interspezies-Transmission im Stall fördern. Allerdings kann eine Sekundärinfektion des Staubes nicht ausgeschlossen werden.

Neben den hier beschriebenen Mechanismen kann auch eine fäkal-orale Transmission in Betracht gezogen werden, da die Exkremente des Systems über Kotbänder mechanisch abtransportiert werden. Infolgedessen könnten die Hühner direkt mit dem belasteten Kot der anderen Hühner in Kontakt kommen.

Das Arbeiten auf einem landwirtschaftlichen Hof kann zur Kontamination der Kleidung des Tierpflegers durch Fäzespartikel oder Staubpartikel beitragen. Eine Verbreitung des Bakteriums kann durch eine unzureichende Kleiderordnung (keine Desinfektion von Stiefeln, kein Wechsel der Arbeitskleidung, kein Tragen von Masken oder Handschuhen; nicht vorgeschrieben), ein unzureichendes Hygienemanagement (z. B. Nutzung derselben Utensilien zum Reinigen) (Newell und Fearnley, 2003) oder durch das Tragen der Arbeitskleidung außerhalb des Hühnerstalles erfolgen. Dadurch erscheint eine Transmission zwischen den Legehennengruppen durch die Kleidung oder durch dieselben Utensilien möglich. Solch eine Beziehung wurde für *Campylobacter* spp. in Masthühnern und Legehennen in tropischen Klimazonen bei Haltungen mit geringer biologischer Sicherheit beschrieben (Kalupahana *et al.*, 2013). Basierend auf den *Real-Time* PCR-Ergebnissen, die darlegen, dass auch die Ehefrau des Landwirtes mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* kolonisiert ist, weist auf die Bedeutung des Tragens der Arbeitskleidung im privaten Lebensbereich hin. Eine direkte Transmission könnte somit begünstigt werden.

Darüber hinaus könnten Transmissionsraten des Bakteriums zwischen Tieren und dem Menschen durch einen engen Kontakt zu kolonisierten Tieren verstärkt werden. Dieser

Zusammenhang konnte für Nutztier-assoziierte *Staphylococcus aureus*-Isolate demonstriert werden. *S. aureus* kann die Speziesbarriere überwinden und von Tieren zu Menschen mit direktem Tierkontakt übertragen werden (Cuny *et al.*, 2009; Köck *et al.*, 2013). In diesem Fall ist es möglich, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zwischen verschiedenen Spezies transferiert wurde.

Die systematische Analyse lieferte einen detaillierteren Einblick in die potentiellen direkten und indirekten Transmissionswege und dem zoonotischen Potential von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Zum ersten Mal wurde mittels MLST-Typisierung eine potentielle Amphixenose erforscht. Das Allelprofil des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolates der Blutkultur eines Patienten mit infektiöser Endokarditis wurde ebenso in den fäkalen Proben von Legehennen seines Betriebes identifiziert. Eine potentielle Intra- und Interspeziesübertragung sowie die Interaktion der Legehennen oder des Menschen mit der Umwelt als mögliches Reservoir des fakultativen Pathogens könnte bei der Kolonisation des Gastrointestinaltraktes in Betracht gezogen werden. Diese Infektionskette könnte durch diverse Faktoren unterstützt werden. Die Haltung von verschiedenen Altersgruppen in der Kleingruppenanlage zieht eine problematische Reinigung nach sich und könnte die Kolonisation junger Legehennen fördern. Zusätzlich könnte das Bakterium über Exkremente von Legehennen, Mäusen oder durch Staub fäkal-oral transferiert werden. Außerdem könnte der Tierpfleger durch das mangelnde Wechseln der Arbeitskleidung und durch einen direkten Tierkontakt *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* verbreiten und übertragen. Auch wenn diese Analyse keinen Beweis der zwischenartlichen Transmission darlegt, konnten Hinweise einer Übertragung gewonnen werden und die Hypothese des potentiellen Zoonoseerregers unterstrichen werden.

### **4.3 Biofitness von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus***

Als Voraussetzung für die Transmission gilt die Widerstandsfähigkeit des Bakteriums außerhalb seines natürlichen Habitats, dem Gastrointestinaltrakt. Für die Analyse der Überlebensfähigkeit in der Umgebung von Mensch und Tier und ob Nahrungsmittel als potentielle Transmissionsquelle dienen können, wurden eine Auswahl an Stämmen untersucht. Zum einen wurden *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate phänotypisch charakterisiert, die sowohl im Mensch als auch im Tier Infektionen wie beispielsweise Mastitis oder Endokarditis ausgelöst haben, zum anderen Isolate derselben Region, die in beiden Wirten identifiziert wurden und zusätzlich evolutionär nah verwandte Isolate mit einschließen.

#### 4.3.1 Analyse der Korrelation zwischen dem Sequenz- und dem Phänotyp

Der Ursprung nah verwandter Isolate resultiert entweder aus der Fähigkeit, resistent oder tolerant gegenüber Umweltveränderungen zu sein, oder aus der zufälligen Veränderung der Allelfrequenzen im Genpool der analysierten Population (Gendrift), sodass der Ursprungs-ST sich weiter differenziert (Feil *et al.*, 2004; Francisco *et al.*, 2009). Am besten untersucht werden konnte dies bei Isolaten aus einem Legehennenbetrieb, da dort sowohl Isolate aus einem IE-Patienten, dessen Hühnern und der Stallumgebung isoliert werden konnten. Weiterhin wurden bestimmte Tier-, Umwelt- und Humanisolate aus diversen Infektionsquellen phänotypisch charakterisiert. Die Hypothese, dass Stämme eines klonalen Komplexes (hier: CC 55) oder eines definierten STs der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Population mit bestimmten Fitnesseigenschaften korrelieren, sollte überprüft werden. Ebenfalls sollte analysiert werden, ob diese Charakteristika zu einer erhöhten Inzidenz von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Infektionen führen.

Es wurde erwartet, dass dieselben Sequenztypen auch einen identischen Phänotyp aufweisen oder die nah verwandten STs eines klonalen Komplexes ähnlich tolerant gegenüber Veränderungen sind. Ein Überblick der gesamten erfassten phänotypischen Eigenschaften ist in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Im Allgemeinen überlebten alle *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolate die beobachtete Zeitspanne der Tenazitätsexperimente. Daher wurden in der folgenden Tabelle 4.1 nur der Endpunkt des jeweiligen Vitalitäts- und Stabilitätsexperiments (Austrocknung, Trinkwasser, Milch, pH, Stuhl) aufgeführt, um die phänotypischen Eigenschaften zur Charakterisierung der Biofitness der Isolate aufzuzeigen. Die vorrangig betrachteten Isolate des CC 55 (HDZ 1140, HDZ 1194 und HDZ 1204) sowie weitere Isolate aus fäkalen Proben von Legehennen (HDZ 1141, HDZ 1168) dieses Tierbestandes wurden in der Tabelle fett hervorgehoben.

Tabelle 4.1: Sequenz- und Phänotypen von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolaten.

Stamm	Isolations- quelle	Ur- sprung	ST	Überleben							Kollagen I/IV <sup>7</sup>
				Stuhl <sup>1</sup>	Austrocknung		Wasser <sup>4</sup>	Milch <sup>5</sup>	Pasteur- isierung <sup>6</sup>	pH	
					24 h <sup>2</sup>	> 24 h <sup>3</sup>					
HDZ 1140	Mensch	IE	13	++	+/+++	7/7	+++	++/+	+	> 5,6	+++/+++
HDZ 1141	Huhn	Fäzes	52	n. g.	+/+++	n. g.	+	+/+	+	n. g.	+/+
HDZ 1168	Huhn	Fäzes	53	+	++/+++	3/7	+	++/+	+	> 5,6	-/
HDZ 1194	Staub	Fäzes	54	+	+/++	7/7	++	++/+	+	> 5,6	+++/+++
HDZ 1204	Huhn	Fäzes	55	n. g.	+/+++	n. g.	-	++/+	+	n. g.	++/+
HDZ 1146	Huhn	Fäzes	13	n. g.	+/++	n. g.	++	++/+	+	n. g.	++/++
HDZ 1151	Huhn	Fäzes	13	n. g.	+/+	n. g.	+	++/+	+	n. g.	++++/++++
HDZ 1153	Gülleovorrat Hühner	Fäzes	13	n. g.	++/++	n. g.	+	++/+	+	n. g.	+++/+++
HDZ 1293	Maus	Fäzes	13	n. g.	+/+	n. g.	+++	+	+	n. g.	++/++
HDZ 1298	Scharrmatte Hühner	Fäzes	13	n. g.	+/+	n. g.	+++	+	+	n. g.	+++/+++
HDZ 1303	Eierschale Hühner	-	13	n. g.	+/++	n. g.	+++	+	+	n. g.	++/+++
DSM 16831	Koala	Fäzes	1	n. g.	+/+	n. g.	+	++/+	n. g.	n. g.	++/-
DSM 13808	Faulschlamm	-	2	n. g.	+/++	n. g.	+	++/+	n. g.	n. g.	+/++
Isolat 12932/01	Mensch	IE	3	n. g.	+/+++	n. g.	+	++/+	n. g.	n. g.	+/+++
Isolat 010672/01	Mensch	IE	6	n. g.	+/++	n. g.	+	++/+	n. g.	n. g.	+++/++
ATCC BAA- 2069	Mensch	IE	6	n. g.	+/+	n. g.	+	++/+	n. g.	n. g.	+/+
K6236/35_M S	Mensch	IE	12	n. g.	+/++	n. g.	++	++/+	n. g.	n. g.	+++/+++
05WDK 43740 002	Kalb	-	13	n. g.	+/++	n. g.	++	++/+	n. g.	n. g.	+/-
LMG 16005	Rind	Intest- inum	3	n. g.	+++/+++	n. g.	++	++/+	n. g.	n. g.	+/+++
LMG 17956	Kalb	-	28	n. g.	n. g.	n. g.	+	++/+	n. g.	n. g.	+/-
LMG 15049	Rind	Mastitis	12	n. g.	+/+	n. g.	+	++/+	n. g.	n. g.	+++/+++
UCN 34	Mensch	IE	41	n. g.	+/+	n. g.	+	++/+	n. g.	n. g.	+++/+++
ATCC 43143	Mensch	IE, CRC	12	n. g.	++/++	n. g.	++	++/+	n. g.	n. g.	+++/+++

<sup>1</sup> Überleben 336 h bei RT im Stuhl: +: < 5 %, ++: > 5 %

<sup>2</sup> 24 h Überleben bei RT/4 °C bei Trockenstress; +: < 5 %, ++: 6-10 %, +++: > 10 %

<sup>3</sup> > 24 h: Überleben bei RT/4 °C bei Trockenstress; Zeit [d]

<sup>4</sup> 168 h Überleben in Leitungswasser bei 4 °C; -: 0 %, +: < 10 %, ++: 11-20 %, +++: > 20 %

<sup>5</sup> 168 h Überleben bei RT/4 °C in Milch; +: < 1 x 10<sup>4</sup> KBE/ml, ++: > 1 x 10<sup>4</sup> KBE/ml

<sup>6</sup> Pasteurisierung: +: überleben

<sup>7</sup> Kollagenadhäsion: keine: -; sehr schwach: +; schwach: ++; mittelstark: +++; sehr stark: ++++

n. g.: nicht getestet; IE: infektiöse Endokarditis, CRC: kolorektales Karzinom; **fett**: vorrangig betrachtete Isolate

Der ST 52 in Hühnern wurde nur einmal im Legehennenbetrieb beobachtet und wies nur geringe phylogenetische Übereinstimmungen mit den anderen Isolaten dieser Region auf. Aufgrund dessen, dass dieses Isolat nur zu einem Zeitpunkt detektiert werden konnte, wurde vermutet, dass dieses Hühnerisolat nur eine geringe Widerstandsfähigkeit aufweist. Die geringeren Vitalitätsraten des HDZ 1141-Isolates beim in Leitungswasser und in Milch im Vergleich zu den anderen drei Isolaten des CC 55 bestätigten diese Theorie. Allerdings konnte bei dem ST 52-Isolate ein ähnlicher

Phänotyp wie bei den Isolaten des klonalen Komplexes beim Überleben auf einer trockenen Oberfläche beobachtet werden. Ebenfalls nicht in den CC 55 mit inbegriffen ist das ST 53-Hühnerisolat, welches gegenüber dem ausgeübten Trockenstress ähnlich stabil ist wie die CC 55-Isolate, aber beim Überleben in Leitungswasser unterlegen ist. Innerhalb des klonalen Komplexes der drei Isolate sind nur bedingt Übereinstimmungen oder Verbesserungen der Fitness gegenüber den betrachteten Stressoren zu beobachten. Darüber hinaus besitzen andere tierische und tierassoziierte Isolate des ST 13 bessere Überlebensfähigkeiten in Leitungswasser und schlechtere Widerstandsfähigkeiten bei Trockenstress im Vergleich zum humanen ST 13-Isolat (Tab. 4.1).

Falls ein Zusammenhang zwischen einer Virulenz und einem bestimmten ST besteht, sollten die Charakteristika eines STs auch bei denselben STs anderer Isolationsquellen nachgewiesen werden können. Am Beispiel des Überlebens in Milch und der nachgestellten Pasteurisierung konnten ähnliche Phänotypen (bis auf eine Ausnahme) beobachtet werden. Des Weiteren würde eine erhöhte Resistenz gegenüber einem Nährstoffentzug bei Umweltisolaten und Human- oder Tierisolaten erwartet werden. Allerdings wurden hier zum Teil divergente Überlebensfähigkeiten bei Isolaten desselben Ursprungs detektiert (Tab. 4.1).

Die Adhäsion an das Zielgewebe eukaryotischer Zellen bildet die Basis, um eine bakterielle Vegetation auszubilden. Über eine Interaktion mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix (z. B. Kollagen, Fibrinogen) kann *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* an eukaryotische Zellen adhären (Abdulmir *et al.*, 2011; Danne *et al.*, 2011; Vollmer *et al.*, 2010 a). Im Zusammenhang mit den Sequenztypen zeigten sich für Isolate mit dem ST 13 schwache bis starke Adhärenzen an die immobilisierten extrazellulären Matrixproteine, die auch für den ST 54 ermittelt werden konnten. Die Hühnerisolate mit dem ST 52 bzw. 53 zeigten hingegen keine bzw. eine sehr schwache Fähigkeit an die Kollagene zu binden. Dieser Phänotyp konnte auch bei den Isolaten mit den Allelprofilen eins bis drei beobachtet werden. Die Endokarditisolate ATCC BAA-2069 und 010672/01, zeigten trotz desselben Sequenztypen stark divergente Ergebnisse. Wie auch das humane Blutkulturisolat (ST 13) wurden die Isolate UCN 34 (ST 41), ATCC 43143 (ST 12) und LMG 15049 (ST 12) im Zusammenhang mit Infektionen isoliert und wiesen ähnliche Kollagenadhäsionen auf. Dennoch zeigten sich keine phänotypischen einheitlichen Charakteristika bei der Adhäsion an Kollagen, die mit der Isolationsquelle der Stämme oder einem ST korrelieren.

Zusammengefasst konnte Übereinstimmungen bestimmter Phänotypen oder Isolationsquellen mit einem Sequenztyp nur bedingt festgestellt werden. Tenazitäre Eigenschaften wurden zuvor nicht im Zusammenhang mit Sequenztypen diskutiert, sodass ein Vergleich mit anderen Spezies nicht möglich ist. Die Methodik des MLSTs wurde für andere Bakterienpopulationen angewandt, um Assoziationen von Pathogenen mit Virulenzen herzustellen. IE-assoziierte *S. aureus*-Isolate konnten bestimmten klonalen Komplexen zugewiesen werden. Bei diesen klinischen Isolaten wurden kontroverse Ergebnisse dargestellt, die einerseits eine Assoziation eines virulenzassoziierten Gensets zulassen und andererseits keine Assoziation zwischen infektiöser Endokarditis- und nicht IE-Isolaten einzelner Gene determinieren konnten (Nethercott *et al.*, 2013; Tristan *et al.*, 2012). Die phylogenetische Aufarbeitung von DNA-Microarray-Analysen von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolaten zeigten gegenüber initialen MLST-Daten, dass die erhaltenen DNA-Profile virulenzassoziiierter Gene kongruente Gruppierungen sich wie im MLST widerspiegeln (Hinse, 2012). Allerdings konnte das Microarray-Virulenzprofil nicht auf die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Phänotypen übertragen werden (Hinse, 2012), sodass möglicherweise ein Zusammenspiel verschiedener Gene erforderlich ist, um die Pathogenese zu beeinflussen. Die ermittelten MLST-Genotypen stimmen ebenfalls nicht immer mit den determinierten Eigenschaften überein. Möglicherweise ist diese Analysemethode nicht geeignet, Korrelationen zwischen Geno- und Phänotypen herzustellen, sondern dient ausschließlich zum Definieren von Infektionsketten oder Ausbrüchen in der Bevölkerung.

Als Fazit kann aus diesen Beobachtungen gezogen werden, dass der Phänotyp des jeweiligen Isolates sowie dessen Ursprung nicht immer mit dem Allelprofil übereinstimmt. Vielmehr könnten diese beobachteten Fähigkeiten allgemein betrachtet werden, um das zoonotische Potential von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zu unterstreichen, was im Folgenden diskutiert wird.

#### **4.3.2 Experimentell erfasste potentielle Transmission**

Anhand der epidemiologischen Analysen konnten potentielle Risikotendenzen und ein zoonotisches Potential definiert werden. Zum Bekräftigen dieser Ergebnisse wurden *in vitro* Experimente durchgeführt, die die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Transmissionwege genauer charakterisieren.

#### 4.3.2.1 Überleben von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in der Umgebung

Außerhalb des natürlichen Habitats wurde *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Staub, in getrockneten Fäzesproben und auf der Oberfläche von Eierschalen und in dem Güllevorrat der Hühner gefunden. Um zu analysieren, ob eine mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* belastete Umgebung von Mensch und Tier als Transmissionsquelle dienen kann, wurde die Trockenresistenz auf einer Polyesteroberfläche untersucht. Die gewaschenen und getrockneten Bakterien wurden bei 4 °C und Raumtemperatur inkubiert. Unabhängig von der Temperatur und unabhängig von der Isolationsquelle der eingesetzten Stämme konnten nach einem Tag vitale Bakterien detektiert werden. Im betrachteten Zeitraum von zwei Wochen konnte nur das IE-Isolat HDZ 1140 detektiert werden. Bei geringeren Temperaturen (4 °C) waren die Bakterien bis zu sieben Tage nachweisbar. Auf Textilien wie z. B. Baumwolle überlebten *E. faecalis* und *E. faecium* bedeutend länger als auf Kunststoffoberflächen (Neely und Maley, 2000). Da *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* auf einer Polyesteroberfläche bis zu zwei Wochen detektiert werden kann, ist der Transfer des Bakteriums von kontaminierten Oberflächen auf den Wirtsorganismus denkbar. Möglicherweise könnten auch Kleidungsstoffe als Vektoren fungieren, was allerdings in dieser Arbeit nicht untersucht wurde.

Für einige Probanden konnten Bakterienanzahlen im Stuhl determiniert werden. Allerdings war die Stuhlmenge nicht ausreichend, um die Überlebensfähigkeit des Darmbakteriums über eine bestimmte Zeitspanne zu testen. Daher wurden *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-negative Stuhlproben mit dem Bakterium versetzt und zwei Wochen beobachtet. Bei Raumtemperatur konnte ein Überleben des Bakteriums bis zu 14 Tage aufgezeichnet werden. Daraus resultiert ein besseres Überleben als des zoonotischen Erregers *Campylobacter*, der in Stuhl bei 25 °C bis zu einer Woche vital war (Blaser *et al.*, 1980). Eine Interaktion des Wirtsorganismus mit der kontaminierten Umwelt kann eine Schmierinfektion nach sich ziehen, wobei z. B. eine fäkal-orale Transmission bei beruflich oder privat bedingtem Reinigen von Tierställen auftreten könnte. Ein Vergleich der Überlebensraten in Stuhl oder auf Polyesteroberflächen zeigte, dass sich die Stuhlmatrix positiv auf die Überlebensfähigkeit von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* auswirkte. Der prozentuale Anteil der vitalen Bakterien war in Stuhl auf das etwa 4- bis 62-fache erhöht im Vergleich zum Trockenstress. Zoonotische Pathogene konnten bereits in den Exkrementen von infizierten Nutztieren identifiziert werden. Diese kontaminierten Exkremente konnten als Ursache von nahrungsmittelinduzierten humanen Infektionen beschrieben werden (Hutchison *et al.*, 2004). Seitdem diese aus Nutztierhaltung

stammenden Exkremete in der Landwirtschaft zur Produktion von Nahrungsmitteln eingesetzt wurden, konnten in Großbritannien gehäuft Gastroenteritisfälle beobachtet werden (Hutchison *et al.*, 2004). Durch den Nachweis des potentiellen Zoonoseerregers im Güllevorrat eines Legehennenbetriebes und die hier detektierten Überlebensraten in Stuhl kann abgeleitet werden, dass auch die Exkremete ein mögliches Reservoir und folglich auch eine Übertragungsquelle darstellen könnten.

Außerhalb des Gastrointestinaltraktes können Enterokokken weit verbreitet sein und im Boden und in verschiedenen Wasserquellen vorkommen (Byappanahalli *et al.*, 2012). Die Präsenz in der Umwelt kann zur Kolonisation und Infektion von Tieren und Menschen führen. 2004 wurde von einem Ausbruch gastrointestinaler Erkrankungen berichtet, die durch Enterokokken-kontaminiertes Grundwasser ausgelöst wurden (Fong *et al.*, 2007). Ob *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* aus einem Umweltreservoir auf Mensch und Tier übertragbar ist, ist derzeit nicht bekannt. Daher wurde Leitungswasser mit dem Bakterium inokuliert und der bakterielle Titer eine Woche nachverfolgt. Während kein Überleben bei Raumtemperatur beobachtet werden konnte, wurde bei 4 °C gelagertem Wasser ein abnehmender Bakterientiter detektiert. Ein Überleben in Leitungswasser war nur bei dem Hühnerisolat mit dem ST 55 nicht detektierbar. Die Analyse des Überlebens von *Campylobacter* in sterilisiertem Oberflächenwasser von Bächen zeigte ähnliche Ergebnisse (Blaser *et al.*, 1980). Unabhängig von der Mineralzusammensetzung überlebte dieses Bakterium in 4 °C-temperiertem Wasser besser als bei 25 °C gelagerten Proben (Blaser *et al.*, 1980). Demzufolge kann es möglich sein, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bei sinkenden Temperaturen besser überleben kann. Möglicherweise stellt somit kälteres Wasser eine bessere Transmissionsquelle dar. Die Detektion von *Campylobacter* konnte in einem Putenhaltungssystem nach sechs Tagen im Leitungswasser und nach zwei Wochen in den Tieren nachgewiesen werden (El-Adawy *et al.*, 2012). Auch wenn *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bei der systematischen Beprobung in dem Leitungswasser der Tränken nicht identifiziert wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Bakterium darin wiederzufinden ist. Auch könnte die Belastung des Leitungswassers durch andere Bakterien den Nachweis des fakultativen Pathogens verhindern. Dementsprechend könnten Wassertränken in der Nutztierhaltung zur Verbreitung des Bakteriums in der Population beitragen.

#### 4.3.2.2 Putative Übertragung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* durch Nahrungsmittel

Durch den Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Rohmilchprodukten und in Milchkühen mit Mastitis (Fortin *et al.*, 2003; Garvie und Bramley, 1979; Sasaki *et al.*, 2004; Schlegel *et al.*, 2000) werden Milchprodukte, insbesondere nicht-pasteurisierte, als mögliche Transmissionsquelle angesehen. Daher wurde zum einen die Vitalität innerhalb einer Woche in Milch und zum anderen die Überlebensfähigkeit nach einem nachgestellten Pasteurisierungsprozess analysiert. Bei allen Stämmen aus unterschiedlichen Isolationsquellen können ähnliche Phänotypen bei Raumtemperatur und 4 °C beobachtet werden. Im Vergleich zur Raumtemperatur, bei der ein starkes Wachstum zu verzeichnen ist, bleibt der bakterielle Titer bei 4 °C nahezu konstant. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* durch Milchprodukte übertragen werden könnte. Auffällig ist dabei das Isolat HDZ 1168, welches einen gleichbleibenden bakteriellen Titer auch bei Raumtemperatur aufwies. Bei der Betrachtung der geringeren Überlebensfähigkeit (im Vergleich zu HDZ 1140 und HDZ 1194) bei einem pH-Wert von 6,8 kann vermutet werden, dass der pH-Wert der Milch (pH 6,7) einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten in Milch zur Folge hat. Ein Hauptrisikofaktor der Zoonose der *Mycobacterium bovis*- oder *Mycobacterium tuberculosis*-assoziierten Tuberkulose in Rindern und Menschen ist der Konsum von Rohmilchprodukten (Grace *et al.*, 2012). Aufgrund der Vitalität und des Wachstums von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Milch sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob das fakultative Pathogen einen nachgestellten Pasteurisierungsvorgang überleben kann. Der Desinfektionsprozess in Glaskapillaren im *Lightcycler* mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-inokulierter Milch zeigte die Widerstandsfähigkeit des Bakteriums an. Dabei könnten sich die Fette, Proteine oder andere Substanzen in der Milch protektiv auf die Vitalität auswirken (Garcia-Graells *et al.*, 2000).

Bei der Auswertung sollte beachtet werden, dass bei der Pasteurisierung im Industriemaßstab effizientere Verfahren zur Anwendung kommen. Ein kontinuierlicher Durchfluss konnte in dieser Arbeit experimentell nicht durchgeführt werden. Dennoch lässt sich aufgrund der Ergebnisse eine Übertragung durch pasteurisierte Lebensmittel nicht ausschließen. Zusammen mit der Überlebensfähigkeit in Milch kann diese als mögliche Transmissionsquelle zwischen Mensch und Tier angesehen werden. Dies wird durch den Nachweis von Enterokokken in pasteurisierter Milch unterstrichen, die auch ein Wachstum in steriler Milch bei 4 bzw. 7 °C aufwiesen (McAuley *et al.*, 2015). In England demonstrierte eine Studie, dass *S. equi* subsp. *zooepidemicus* durch nicht ordnungsgemäße Pasteurisierungen zu Infektionen im Menschen geführt hat (Bordes-

Benitez *et al.*, 2006). Dass diese experimentell ermittelte potentielle Übertragungsquelle durch die Fall-Kontrollstudie nicht bestätigt werden konnte, ist möglicherweise auf eine verbesserte Kontrolle von Lebensmitteln zurückzuführen (Schlundt *et al.*, 2004). Dahingegen war eine erhöhte Risikotendenz beobachtet worden, mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* kolonisiert zu sein, wenn Rohmilchprodukte und ungegartes Fleisch konsumiert wurden. Demnach sollte über dieses Experiment hinaus auch das Überleben in anderen Lebensmitteln wie Fleisch überprüft werden.

#### 4.3.2.3 Kolonisation und Infektion

Um sich im Gastrointestinaltrakt von Mensch und Tier etablieren und persistieren zu können, muss *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* den Magen passieren. Für die Überlebensfähigkeit ist folglich eine pH-Toleranz entscheidend. Da die Magenpassage bis zu fünf Stunden betragen kann, wurde der Anteil der ermittelten vitalen Bakterien im sauren, neutralen oder alkalischen Milieu im AK I -Puffer nach 2,5 h bestimmt. Aus dem Experiment geht eine pH-Sensitivität für alle analysierten Stämme hervor, da bei einem pH-Wert unter fünf keine lebenden Bakterien nachgewiesen werden konnten. Im nüchternen Zustand liegt der pH-Wert im Magen bei einem pH-Wert  $\leq 3$  (Giannella *et al.*, 1972). Demnach erscheint das Passieren des Magens unwahrscheinlich. Jedoch verändert der Konsum von Nahrungsmitteln, insbesondere Milchprodukten, den pH-Wert, sodass ein Wert von 4,5 bis 6,5 erzielt werden kann (Conway *et al.*, 1987; Giannella *et al.*, 1972). Folglich könnte im Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in den Darm gelangen. Zudem können Nahrungsbestandteile das Bakterium schützen, sodass die Wahrscheinlichkeit der anschließenden Kolonisation erhöht wird. Die Aufnahme von inokuliertem Joghurt mit *S. thermophilus* oder *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* mit einer anschließenden kulturellen Stuhlanalyse zeigte, dass diese Bakterien im Darm wiederzufinden waren (Mater *et al.*, 2005), sodass eine erfolgreiche Magenpassage vorausgegangen sein muss. Eine Kolonisation könnte auch erfolgen, wenn eine erhöhte Exposition durch beispielsweise kontaminierte Nahrungsmittel besteht. Die im Darm vorherrschenden pH-Werte (5,7-7,4 (Evans *et al.*, 1988; Fallingborg, 1999)) kann *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* gut tolerieren. Eine erfolgreiche Kolonisation setzt voraus, dass sich das fakultative Pathogen gegenüber dem Darmmikrobiom durchsetzen kann. Die Expression von Genen, die beispielsweise für Bakteriozine und Tannasen kodieren (Hinse *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011; Rusniok *et al.*, 2010), zeigen das Potential auf,

dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in der Lage ist, sich eine ökologische Nische im tierischen und menschlichen Gastrointestinaltrakt zu erschließen.

Im Genom von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* sind drei Loci Pilusprotein-kodierender Gene verankert (*pil1*, *pil2*, *pil3*) (Rusniok *et al.*, 2010). Pili führen zu einer gesteigerten Adhäsion und Kolonisation von Wirtsgeweben. Für das *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolat UCN 34 wurde bereits gezeigt, dass der *pil1*-Locus für einen Pilus mit einer kollagenbindenden Domäne (PilA) kodiert (Boleij und Tjalsma, 2013; Danne *et al.*, 2014), sodass eine gesteigerte Adhäsion des Bakteriums an Kollagen IV resultiert (Danne *et al.*, 2011). Dieses extrazelluläre Matrixprotein wird in der Basallamina des Darms bei präkanzerösen Polypen vermehrt synthetisiert, was die Kolonisation des Gastrointestinaltraktes mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* begünstigt (Danne *et al.*, 2014). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass dieses Pilusprotein ebenfalls bei der Adhäsion an Kollagen I, dem Hauptbestandteil von Herzklappen, beteiligt ist (Danne *et al.*, 2011, 2014). Die Ausbildung von Biofilmen an der kollagenreichen extrazellulären Matrix führt vermutlich zu der Assoziation von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* mit infektiöser Endokarditis und kolorektalen Karzinomen (Boleij und Tjalsma, 2013, 2013). Da die Adhäsion an Kollagenen einen entscheidenden Faktor in der Infektionskaskade darstellt, wurden *in vitro*-Experimente dazu durchgeführt. Die Isolate des untersuchten Kollektivs wiesen ein unterschiedliches Spektrum der Kollagenadhäsionsfähigkeit auf. Dabei stimmten die Adhäsionsfähigkeiten der Isolate an die unterschiedlichen Kollagene überein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Stämme ein unterschiedliches Potential aufweisen, an Endokardzellen zu adhären und in diese zu invadieren (Vollmer *et al.*, 2010 a). Eine unterschiedliche Ausstattung an Virulenzgenen sowie dessen Expression führt vermutlich zu einer unterschiedlichen Ausprägung pathogener Eigenschaften.

#### **4.3.2.4 Fazit für die Tenazität von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus***

Basierend auf der nachgewiesenen Fähigkeit von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, ohne Nährstoffe oder Flüssigkeiten auszukommen, führt zu der Annahme, dass ein Überleben außerhalb des Gastrointestinaltraktes möglich ist. Dabei kann sich Fäzes positiv auf die Überlebensrate in der Umwelt auswirken, sodass eine verbesserte Resistenz gegenüber Temperaturschwankungen oder Sonneneinstrahlung gegeben sein könnten. Dies konnte unabhängig von dem Ursprung oder der Quelle der Isolation beobachtet werden, sodass die Umgebung einen Einfluss auf die Transmission von

*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* hat. Die Aufnahme von bakteriell kontaminierten Milchprodukten kann als Transmissionsquelle fungieren und dadurch möglicherweise auch das Passagieren des Magens gewährleisten. Diese ermittelten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Phänotypen deuten auf ein zoonotisches Potential hin. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass diese Beobachtungen auf nachgestellte Experimente zurückzuführen sind und möglicherweise nicht den natürlichen Gegebenheiten in der Natur entsprechen. Daher kann über diese Experimente nur eine Tendenz dargestellt werden, die die Hypothese der Transmission zwischen Mensch und Tier stützt. Darüber hinaus suggerieren Kollagenadhäsionsfähigkeiten das Potential, Infektionen auszulösen.

#### 4.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, mit Hilfe von epidemiologischen Studien und Tenazitätsexperimenten umfangreiche Erkenntnisse über die potentielle Transmission von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zwischen Mensch und Tier und der Umwelt zu erlangen.

Mit Hilfe der *Real-Time* PCR und der selektiven Kultivierung konnten präzisere Prävalenzzahlen von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im humanen Gastrointestinaltrakt erzielt sowie erstmalig Nutztierbestände beprobt werden. MLST-Charakterisierungen der daraus generierten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Stammsammlung sowie die systematische Beprobung eines Tierbestandes im Zusammenhang mit einer induzierten IE des Besitzers zeigten erste fundamentale Hinweise, dass das fakultative Pathogen zwischen Mensch und Tier transferiert werden kann. Zukünftige Forschungen, bei denen auch Nutztierhaltungen integriert werden sollten, sind notwendig, um das zoonotische Potential zu klären. Die Identifizierung von Infektionsketten sollte weiterhin durch die Bestimmung potentieller Risikofaktoren mit Hilfe der Fall-Kontrollstudie ergänzt werden.

Als tendenzielle Risikofaktoren für die Transmission des Bakteriums und die Kolonisation des Verdauungstraktes konnten der Konsum von rohem Fleisch sowie dessen Verarbeitung und das Leben in ländlichen Gebieten, in der Nähe eines Waldes oder Bauernhofes identifiziert werden, während der enge Tierkontakt potentiell ausgeschlossen werden konnte. Um die Rolle des fakultativen Pathogens in der Pathophysiologie bewerten zu können, sollten umfangreichere Studien erfolgen, die symptomatische und asymptomatische IE-Patienten und Probanden mit

gastrointestinalen Veränderungen sowie gesunde Versuchsteilnehmer in die Studie mit einschließt. Es sollten weiterhin Probanden aus unterschiedlichen Regionen rekrutiert werden, sodass geografische Korrelationen bestimmt werden können. Darüber hinaus sollten weitere Aspekte in den Fragebogen aufgenommen werden. Vor allem die Ernährungsgewohnheiten in Bezug auf den Verzehr von Geflügel als möglichen Expositionsfaktor sowie der Konsum von Obst und Gemüse als potentieller protektiver Faktor sollte eingebracht werden. Somit sollte das von dem fakultativen Pathogen ausgehende Risiko auf den Menschen besser bewertet und die in dieser Arbeit ermittelten (Nicht-)Risikotendenzen eindeutig definiert werden können.

Das zuvor ermittelte zoonotische Potential des Opportunisten wurde im letzten Teil der Arbeit durch die Überlebensfähigkeit auf Oberflächen und in Stuhl/Milch/Leitungswasser experimentell bestätigt. Damit die Bedeutung des potentiellen Zoonoseerregers weiter bekräftigt wird, sind weitere *in vitro* Studien erforderlich, die neben der Analyse von Milch auch weitere Nahrungsmittel untersuchen. In Tierexperimenten sollten mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-inokulierte Nahrungsmittel angewandt werden, damit Transmissionsquellen und die Kolonisation des Gastrointestinaltraktes eindeutig verifiziert werden können.

Zukünftig sollte eine Mikrobiomanalyse des Darms durchgeführt werden. Über diese Studien könnten die ermittelten Prävalenzen des Bakteriums im Darm den ermittelten Risikofaktoren der Zusammensetzung des Darmmikrobioms gegenübergestellt werden. Demzufolge könnte der Einfluss endo- und exogener Faktoren eindeutig identifiziert und die Frage des Risikos auf den Menschen aufgeklärt werden.

## 5 Methoden

### 5.1 Mikrobiologische Methoden

#### 5.1.1 Anzucht und Kultivierung von Bakterien

Die zu kultivierenden Bakterienstämme wurden mit einer Impfperle aus dem Kryobankkulturröhrchen mittels Dreiösenausstrich auf *Brain Heart Infusion Agar* (BHI-Agar) ausgestrichen und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Von der Bakterienstammlatte wurden vereinzelte Kolonien zum Animpfen von 7 ml BHI-Medium verwendet. Die Inkubation erfolgte schüttelnd über Nacht bei 37 °C bei 200 upm (Inkubator Unimax 1000 mit Schüttler 1010, Heidolph, Schwabach).

#### 5.1.2 Selektion von *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* aus Stuhl- und Umweltproben auf Tannin-Natriumazid-Agar

Von homogenisierten Stuhlproben wurde zum einen 1 g Fäzes eingewogen, in 1 ml PBS suspendiert und gemischt und zum anderen ein Dreiösenausstrich auf Tannin-Natriumazid-Trypton Soja-Agar (TSA) durchgeführt. Zusätzlich wurden von der Stuhlsuspension in Dreifachbestimmung 100 µl auf Tannin-Natriumazid-TSA ausplattiert und ein Ausstrich durchgeführt. Des Weiteren wurden 0,1 g der Staubprobe oder der Eierschalen eingewogen und genauso vorgegangen wie mit den Stuhlproben. 100 µl wurden von Leitungswasserproben in Dreifachbestimmung auf dem Selektivmedium ausplattiert. Die ausplattierten und ausgestrichenen Proben wurden 2 d bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur Speziesbestimmung wurden Kolonien auf Blutagar (BioMérieux, Nürtingen) subkultiviert und erneut einer Inkubation bei 37 °C unterzogen und anschließend mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse (MALDI-TOF-MS, s. 5.4) identifiziert.

#### 5.1.3 Kryokonservierung

Zur Aseverierung der Bakterienstämme wurden Kryobankröhrchen eingesetzt. Eine einzelne Kolonie des entsprechenden Bakterienstammes wurde mit einer sterilen Impföse in ein Kryoröhrchen überführt und suspendiert und das überschüssige Kryomedium mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen.

Zur Archivierung der Stuhlproben wurden 2 ml autoklaviertes Glycerin in einem sterilen 2 ml Röhrchen vorgelegt. Eine Impföse der homogenisierten Probe wurde in das

Glycerin überführt und gemischt. Die Lagerung der Kryokulturen erfolgte jeweils bei -80 °C.

#### **5.1.4 Messung der Adhäsion über immobilisierte Kollagene**

Zur Analyse der Adhäsion über extrazelluläre Matrixproteine wurden 100 µl 0,1 mg/ml Kollagen I bzw. IV (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) bzw. BSA als Negativkontrolle (Stammlösungen: 1 mg/ml) pro Kavität einer 96 Kavitäten-Zellkulturplatte über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Nachdem die Proteinlösungen abgenommen wurden, erfolgte eine zweistündige Inkubation mit 250 µl Blockierungslösung bei 4 °C. Nach zweimaligem Waschen mit je 200 µl PBS wurden 180 µl Übernachtskultur unverdünnt pro Kavität zugegeben und bei 37 °C 2 h inkubiert. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten der stationär gewachsenen Kultur wurde durch Ausplattieren und die optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit 200 µl PBS wurden die Kavitäten für 20 min bei 60 °C getrocknet. Zum Anfärben der gebundenen Bakterien wurden 100 µl Kristallviolettlösung (10 %-ig) hinzupipettiert und nach 30 min RT wurde überschüssige Kristallviolettlösung durch fünfmaliges Waschen mit 200 µl PBS-Puffer entfernt. Der an Bakterien gebundene Farbstoff wurde durch 250 µl 70 %-igem Ethanol durch leichtes Schütteln bei 140 upm für 10 min gelöst. Die Absorptionsmessung erfolgte im Mikrotiterplatten *Reader* Infinite® m200 PRO (Tecan, Schweiz) bei 550 nm (5 Blitze, quadratisch 2x2). Dabei steht die gemessene Absorption in direktem Verhältnis zu dem Anteil der an Kollagen bzw. BSA adhärenen Bakterien. Die Testung der Adhäsion an diese immobilisierten Proteine erfolgte in drei biologischen und vier technischen Replikaten.

#### **5.1.5 Titerbestimmung**

Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro Milliliter (KBE/ml) wurde über Verdünnungsreihen in PBS bestimmt. Die Übernachtskulturen wurden in einer entsprechenden Verdünnungstufe eingestellt und je 100 µl in Dreifachbestimmung auf TSA mit Glaskugeln oder mit dem Drigalskispatel (in Abhängigkeit von der Probenbeschaffenheit) ausplattiert, bei 37 °C über Nacht inkubiert und die gewachsenen Kolonien mit dem Koloniezähler (Fisher Scientific, Schwerte) oder dem *ColonyCounter* (Synbiosis, Cambridge, England) gezählt. Die Anzahl der KBE/ml wurde anschließend unter Berücksichtigung des ausplattierten Volumens und der Verdünnung berechnet.

## 5.1.6 Untersuchung der Tenazität von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

### 5.1.6.1 Überleben bei Trockenstress

Zum Testen des Überlebens von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bei Trockenstress wurde eine 16-stündige Übernachtskultur bei 5000 × g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakteriensediment in 7 ml PBS resuspendiert. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt. Von der gewaschenen Übernachtskultur bzw. von der Negativkontrolle (PBS) wurden zum einen 10 µl zu 990 µl PBS gegeben und die KBE/ml der gewaschenen Kultur bestimmt (eingesetzte KBE/ml), und zum anderen 10 µl auf die Polyesteroberfläche einer 24-Kavitätenplatten gegeben. Es folgte ein einstündiger Trockenschritt bei RT. Die 24-Kavitätenplatten wurden mit Parafilm verschlossen und bei RT bzw. 4 °C gelagert. Nach 0, 4, 7, 24, 48, 72, 168 und 336 h wurden die Bakterien in 1 ml PBS suspendiert und die KBE/ml bestimmt (s. 5.1.5). Als Nullstundenwert wurden die KBE/ml definiert, die nach dem Trocknen bei RT resultierten. Diese Bakterienanzahl wurde auf 100 % gesetzt. Der Anteil der vitalen Bakterien nach den Inkubationsschritten wurde in Prozent [%] angegeben.

### 5.1.6.2 Vitalität in Milch

Zur Bestimmung der Überlebensfähigkeit in Milch wurden 100 µl einer 1:1000 verdünnten stationär gewachsenen Übernachtskultur zum Inokulieren von 7 ml 3,5 % fetthaltiger H-Milch (steril) eingesetzt. Die mit verschiedenen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolaten inokulierte Milch wurde bei RT und 4 °C inkubiert. Das Wachstumsverhalten der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme wurde nach 1, 2, 3 und 7 Tagen anhand der Bestimmung der KBE/ml ermittelt (s. 5.1.5).

### 5.1.6.3 Vitalität von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* beim Pasteurisieren von Milch

Der Pasteurisierungsvorgang wird in der Industrie zum Abtöten von Mikroorganismen in der Milch genutzt, um die Haltbarkeit der Milch zu verlängern. Die Pasteurisierung erfolgt in einem kontinuierlichen Durchflussverfahren bei 72 bis 75 °C für mindestens 15 bis 30 sec (Milchverordnung, 1993). Um das Überleben von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* beim Pasteurisieren von Milch zu analysieren wurden 100 µl einer 1:100 verdünnten Übernachtskultur in 0,9 ml Milch (ca. 10<sup>5</sup> KBE/ml) pipettiert. Diese inokulierte Milch diente als Ausgangswert (100 %). Von der mit verschiedenen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolaten inokulierten Milch wurden jeweils 100 µl in

eine Glaskapillare zentrifugiert (3000 upm, 10 sec; Eppendorf Zentrifuge 5417C, Hamburg). Das Temperaturprofil der Pasteurisierung wurde im *Lightcycler 2.0* nachgestellt (Hochheizen: 65 °C 1 sec; 70 °C 1 sec; Pasteurisieren: 72 °C 30 sec; Abkühlen: 37°C). Sowohl vor (100 %) als auch nach dem Pasteurisieren wurde der bakterielle Titer bestimmt (s. 5.1.5). Das prozentuale Überleben der Bakterienisolate wurde jeweils dargestellt. Alle Arbeitsschritte, mit Ausnahme des Pasteurisierungsprozesses, wurden auf Eis durchgeführt.

#### **5.1.6.4 Vitalität in Trinkwasser**

Ob *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Trinkwasser überlebensfähig ist, wurde getestet, indem eine 1:1000 verdünnte stationär gewachsene Kultur zu 7 ml autoklaviertem Trinkwasser gegeben wurde. Es wurde eine Inkubation bei 4 °C und RT durchgeführt und die KBE/ml wurden nach 1, 2, 3 und 7 Tagen bestimmt (s. 5.1.5). Der Titer der eingesetzten stationären Übernachtkultur wurde dabei auf 100 % gesetzt und das Überleben der Bakterien im Trinkwasser nach den Inkubationszeiten in Prozent [%] angegeben.

#### **5.1.6.5 pH-Stabilität von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus***

Zur Analyse der pH-Resistenz von verschiedenen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Stämmen wurde der AK I -Puffer mit HCl bzw. NaOH auf einen pH-Wert zwischen eins und neun eingestellt und autoklaviert. 7 ml der pH-Lösungen wurden mit ca.  $10^4$  KBE/ml inokuliert und bei 37 °C stehend 2,5 h inkubiert. Der prozentuale Anteil der überlebenden Bakterien wurde ermittelt, indem die KBE/ml der Ausgangskultur (100 %) und die KBE/ml der verschiedenen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Stämme bei den unterschiedlichen pH-Werten nach 2,5 h ermittelt wurde (s. 5.1.5). Zusätzlich wurden die pH-Werte nach dem Experiment gemessen.

#### **5.1.6.6 Wiederfindung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Fäzes**

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in humanem Fäzes wurden jeweils 100 µl der 1:1000 verdünnten stationären Bakterienkultur ( $10^4$  KBE/ml) zu 900 µl BHI-Medium, 900 µl PBS oder 1 g Stuhl gegeben. Zur inokulierten Stuhlprobe wurden anschließend 900 µl PBS zum Suspendieren hinzugegeben. Die Proben wurden anschließend auf TSA

(*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in BHI bzw. PBS) oder auf Tannin-Natriumazid-TSA (*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Stuhl) ausplattiert und nach 2 d Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde der Bakterientiter bestimmt (s. 5.1.5).

#### **5.1.6.7 Überleben von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Stuhl**

Um zu überprüfen, wie lange *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in humanem Stuhl bei RT lebensfähig ist, wurden Stuhlproben gepoolt, homogenisiert und aliquotiert á 0,5 g. Die Übernachtskulturen wurden wie im Abschnitt 5.1.6.1 vorbereitet und anschließend in 100 µl PBS resuspendiert. Davon wurden 10 µl zum Inokulieren der Stuhlproben eingesetzt. Der prozentuale Anteil der vitalen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Stämmen wurde durch das Resuspendieren der Probe in 1 ml PBS und dem anschließenden Ausplattieren der Stuhlsuspension auf Tannin-Natriumazid-TSA ermittelt. Die Agarplatten wurden anschließend 2 d bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach 0, 24, 48, 72, 168 und 336 h wurde der bakterielle Titer bestimmt. Der Nullstundenwert wurde auf 100 % gesetzt und die ermittelten KBE/ml entsprechend ins Verhältnis gesetzt, um das prozentuale Überleben der Bakterien in Stuhl zu ermitteln.

## **5.2 Molekulargenetische Methoden**

### **5.2.1 Nukleinsäureextraktion aus Reinkulturen**

Zur Extraktion bakterieller DNA wurde das *QIAamp Blood Mini Kit* (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Dabei erfolgte die Isolierung der Gesamt-DNA nach beiliegendem Protokoll des Herstellers. Die Extraktion der DNA basiert bei dieser Methode auf der enzymatischen Permeabilisierung der bakteriellen Zellwand und der anschließenden Lyse durch Detergenzien und chaotrope Salze. Durch Ethanol wird die DNA gefällt, dann an die Silikamembran der Säule gebunden und vor dem Eluieren der Gesamt-DNA mit Puffern gewaschen. Die Extraktion der Gesamt-DNA erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei RT.

In 180 µl Lysispuffer mit 10 mg/ml Lysozym wurden etwa zehn Einzelkolonien von einer BHI-Stammpatte mit einer sterilen Impföse suspendiert, gemischt und bei 37 °C 30 min ohne Schütteln inkubiert. Nach einer weiteren 30-minütigen Inkubation bei 56 °C mit 20 µl Proteinase K und 200 µl AL-Puffer erfolgte eine Inaktivierung der Enzyme bei 95 °C für 15 min. Zum Fällen der DNA wurden 200 µl Ethanol (96 %)

hinzugegeben, homogenisiert und Zellsedimente bei  $12000 \times g$  1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf die Silikasäule gegeben, 1 min bei  $4000 \times g$  zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die an die Silikamembran gebundene DNA wurde mit 500  $\mu$ l AW1-Puffer (Waschpuffer 1) (1 min,  $4000 \times g$  zentrifugiert) und 500  $\mu$ l AW2-Puffer (Waschpuffer 2) (1 min,  $12000 \times g$  zentrifugiert) gewaschen und der Durchlauf jeweils verworfen. Zum Entfernen der Waschpufferreste erfolgte eine erneute Zentrifugation bei  $12000 \times g$  (3 min). Zum Eluieren der gebundenen DNA wurden 50  $\mu$ l des vortemperierten Elutionspuffers (AE-Puffer;  $55^\circ\text{C}$ ) mittig auf die Säule pipettiert, 1 min inkubiert und abschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß 1 min bei  $4000 \times g$  zentrifugiert und die Säule verworfen. Die bakterielle Gesamt-DNA wurde mittels NanoDrop (PeqLab Biotechnologie, Erlangen) quantifiziert (s. 5.2.5). Die Nukleinsäuren wurden dann bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### 5.2.2 Nukleinsäureextraktion mit dem *UltraClean Microbial DNA Isolation Kit*

In dem Kit „*UltraClean Microbial DNA Isolation*“ von Mo Bio (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, USA), waren die verwendeten Säulen, Reaktionsgefäße und Puffer (*MicroBeadSolution*, MD1- bis MD5-Puffer) enthalten. Zur Extraktion der DNA wurden 2 ml Flüssigkultur 1 min bei  $10000 \times g$  sedimentiert und der Überstand verworfen. Durch das Mischen mit 300  $\mu$ l *MicroBeadSolution* erfolgte die Resuspension des Bakteriensediments. Die Bakteriensuspension wurde in ein *MicroBead*-Reaktionsgefäß überführt, mit 50  $\mu$ l MD1-Puffer versetzt und 15 min bei maximaler Geschwindigkeit aufgemischt. Nach der Zentrifugation für 30 sec bei  $10000 \times g$  wurde der Überstand in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 100  $\mu$ l MD2-Puffer versetzt, gemischt und bei  $-20^\circ\text{C}$  5 min inkubiert. Es wurde erneut bei  $10000 \times g$  (1 min) zentrifugiert und der Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Überstand wurden 900  $\mu$ l homogenisierte MD3-Lösung pipettiert und gemischt. Von der Probe wurden 700  $\mu$ l auf die Säule gegeben, 30 sec bei  $10000 \times g$  zentrifugiert und der Durchlauf verworfen und der Arbeitsschritt wurde erneut mit dem restlichen Probenmaterial durchgeführt, um die DNA an die Membran zu binden. Die mit DNA beladene Säule wurde mit 300  $\mu$ l MD4-Puffer gewaschen (Zentrifugation: 30 sec,  $10000 \times g$ , Durchlauf verworfen). Nach einem weiteren einminütigen Zentrifugationsschritt bei  $10000 \times g$  wurde die Säule in ein neues Reaktionsgefäß gesetzt. 30  $\mu$ l des MD5-Puffers wurden zum Eluieren der Gesamt-DNA mittig auf die Membran der Säule pipettiert. Nach 3 min Inkubation bei RT wurde 30 sec bei  $10000 \times g$  zentrifugiert. Die DNA-Konzentration und DNA-Reinheit wurde wie unter Abschnitt 5.2.5 beschrieben photometrisch bestimmt und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### 5.2.3 DNA-Extraktion aus humanem Fäzes

Zum Optimieren der DNA-Extraktion aus humanen Stuhlproben wurde das *PSP Spin Stool DNA Kit* (Invitex, Berlin) angewandt. Das Protokoll des Herstellers wurde leicht modifiziert.

Im *SK38 Ribolyser Tube* wurden 1,2 ml Lysispuffer P vorgelegt, 150 mg Stuhl suspendiert, homogenisiert und 1 min prälysiert. Nach 10 min Inkubation auf dem Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg) bei 95 °C und 900 upm und 3 min auf Eis erfolgte die mechanische Fragmentierung der Stuhlprobe im *MagNA Lyzer Instrument* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) bei 7000 Einheiten für 1 min. Anschließend wurde die Probe bei 95 °C für 3 min (900 upm) im Thermomixer inkubiert. Um PCR-Inhibitoren zu entfernen wurde nach der Sedimentation (13400 × g, 1 min, RT) der Überstand der Probe in ein *InviAdsorb*-Reaktionsgefäß überführt, 15 sec gemischt, und 1 min bei RT inkubiert. Nach einer erneuten Sedimentation (3 min, 13400 × g, RT) wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml *Receiver*-Reaktionsgefäß überführt, das Sediment verworfen und erneut sedimentiert (3 min, 13400 × g, RT). 25 µl Proteinase K wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und 400 µl des Überstandes hinzugegeben, kurz gemischt und 10 min bei 70 °C im Thermomixer bei 900 upm inkubiert. 200 µl Bindungspuffer P wurden zum Lysat hinzupipettiert, kurz gemischt und der Ansatz wurde vollständig auf die Membran des *RTA Säulenfilters* gegeben. Nach einminütiger Inkubation bei RT und einer zweiminütigen Zentrifugation bei 9300 × g wurde der Durchlauf verworfen. Der *RTA Säulenfilter* wurde zuerst mit 500 µl Waschpuffer I und anschließend mit 700 µl Waschpuffer II gewaschen. Dabei wurde jeweils bei 9300 × g (1 min, RT) zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Der *RTA Säulenfilter* wurde wiederholt zentrifugiert (3 min, 13400 × g, RT) und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zum Eluieren der DNA wurden 100 µl temperierter (70 °C) Elutionspuffer D auf den Filter der Säule gegeben und 3 min bei RT inkubiert. Abschließend wurde bei 9300 × g 1 min bei RT zentrifugiert. Die Nukleinsäurekonzentration wurde photometrisch bestimmt (s. 5.2.5) und bei -20 °C gelagert.

### 5.2.4 DNA-Extraktion aus humanem und animaleem Fäzes und Umweltproben

Die Nukleinsäuren aus Fäzes und Umweltproben wurden mit Hilfe des *NucliSENS easyMag* (BioMérieux, Nürtingen), einem automatisiertem DNA-Isolationsverfahren, extrahiert. Bei diesem Verfahren werden die Nukleinsäuren an die Oberfläche magnetischer Silikapartikel gebunden. Nach mehreren Waschschritten und der Elution wird die DNA durch einen Hitzeschritt von den magnetischen Silikapartikeln gelöst und

das Extrakt kann in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Die Vorbereitung der homogenisierten fäkalen Proben (etwa 150 mg) bzw. 100 µl der resuspendierten Umweltproben (s. 5.1.2) erfolgte in 1 ml PBS durch fünfminütiges Mischen und zehnminütige Inkubation bei RT und anschließendes Zentrifugieren für 2 min bei 12000 × g. 200 µl des Überstandes wurden zum Extrahieren der Gesamt-DNA eingesetzt. Nach einer Prälyse wurden jeweils 100 µl magnetische Silikapartikel (1:1 mit *A. dest.*) hinzugegeben und mit den Proben gemischt. Abschließend wurde die DNA in 55 µl Elutionspuffer eluiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

### 5.2.5 Quantifizierung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration und die Reinheit der DNA wurde mit Hilfe des NanoDrop2000 (PeqLab Biotechnologie, Erlangen) ermittelt, indem die Extinktion der Nukleinsäuren bei 260 nm und 280 nm gemessen wurde. Dazu wurde 1 µl der DNA-Lösung auf den Probenarm des Gerätes aufgetragen, der Arm geschlossen und die Messung erfolgte über die Geräte-Software. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz kann die Reinheit und Konzentration der gereinigten Nukleinsäuren durch die Bildung des Quotienten aus 260 nm und 280 nm ermittelt werden. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei 260 nm. Ein Quotient der Absorptionen von 1,8 weist auf reine DNA hin.

### 5.2.6 Polymerase-Ketten-Reaktion im Block-Thermocycler

Die Polymerase Ketten Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) bezeichnet einen *in vitro* Vorgang, der bestimmte DNA-Sequenzen durch eine DNA-Polymerase mittels spezifischer *forward* und *reverse* Primer vervielfältigt. Im Anschluss der Denaturierungsphase, in der die doppelsträngige DNA aufgetrennt wird, schließt sich die *Annealing*-Phase, bei der die spezifischen Oligonukleotide sich an die DNA anlagern können, an. Die komplementären Primer werden in der Elongationsphase entsprechend der Matrize verlängert. Der Prozess aus Denaturierung, *Annealing*- und Elongationsphase wird zyklisch wiederholt. Dabei fungiert das synthetisierte PCR-Produkt als Matrize für folgende PCR-Zyklen, sodass es zu einem exponentiellen Anstieg des Amplifikates kommt. Die PCR wurde im Gradient *Cycler* von Biometra GmbH (Göttingen) durchgeführt. Die Kontrolle der amplifizierten Produkte erfolgte im Agarosegel (s. 5.2.9). In Tabelle 5.1 ist ein Standard-PCR-Protokoll aufgelistet. Für die Standard-PCR wurde die HotMaster-*Taq*-DNA-Polymerase von 5Prime (Hamburg) verwendet. Die Oligonukleotidvolumina variierten entsprechend der Zielsetzung. Für

die Amplifikation der Haushaltsgene des *Multilocus Sequence Typing* (MLST) wurden 2 µl (800 nM), für das Superoxiddismutasegen (*sodA*) (400 nM) wurde 1 µl und für das *tanA*-Gen wurden 0,5 µl (200 nM) eingesetzt.

**Tabelle 5.1: Standard-PCR Ansatz.**

Reagenz	Konzentration	Endkonzentration	1 x Volumen [µl]
HotMaster- <i>Taq</i> -Puffer	10 x	1x	5
Primer_F	20 µM	400 nM	1
Primer_R	20 µM	400 nM	1
dNTP	je 5 mM	200 µM	2
HotMaster- <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	5 U/µl	-	0,25
<i>A. dest.</i>	-	-	38,75
<i>Template</i> -DNA	-	-	2
<b>Summe</b>	-	-	<b>50</b>

Die DNA-Amplifikation erfolgte nach folgendem Temperaturprofil:

**Tabelle 5.2: Standardtemperaturprofil einer PCR.**

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
initiale Denaturierung	95	3	1
Denaturierung	95	1	
<i>Annealing</i>	s. 6.7	0,5	30
Elongation	72	produktabhängig (30-60 bp/s)	
finale Elongation	72	produktabhängig	1

### 5.2.7 Real-Time PCR

Die *Real-Time* PCR ist eine (Echtzeit-)PCR, die die Amplifikation eines spezifischen Fragments eines spezifischen Zielgens aufgrund einer 3'-terminalen fluoreszierenden sequenzspezifischen Sonde oder eines interkalierenden Farbstoffes mit dessen Detektion verknüpft. Dabei ist die Intensität der gebildeten Fluoreszenz proportional zur Menge des synthetisierten Produktes. Somit kann der Anstieg des PCR-Produktes in Echtzeit verfolgt werden.

Zur spezifischen Detektion des *tanA*-Gens wurde in dieser Arbeit ein *TaqMan*-MGB (*Minor-Groove-Binder*)-basierendes Sonden-System eingesetzt. Dabei wird die Sonde am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter (Donor-Fluorochrom) und das 3'-

Ende mit einem nichtfluoreszierendem Quencher (Akzeptor-Fluorochrom), welcher mit einem MGB-Molekül verknüpft ist, versehen. Diese beiden Fluorochrome besitzen überlappende Emissions- und Absorptionsspektren. Das zugrundeliegende Prinzip ist der *fluorescence resonance energy transfer* (FRET). Die hybridisierte Sonde wird während der DNA-Replikation durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase degradiert, wodurch der Abstand zwischen den Fluorochromen zunimmt. Dadurch verringert sich der FRET und somit auch das Signal des Akzeptors, sodass das Fluoreszenzsignal des Donors ansteigt und detektiert werden kann. Durch die zusätzliche terminale Modifikation der Sonde mit einem *Minor-Groove-Binder* wird die Hybridisierung der Sonde mit der einzelsträngigen DNA verstärkt.

Die spezifische Detektion von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in DNA-Extrakten aus Stuhl (s. 5.2.3 und 5.2.4) erfolgte nach dem in Tabelle 5.3 angegebenen Reaktionsansatz.

**Tabelle 5.3: Reaktionsansatz für die *Real-Time*-PCR.**

Reagenz	Konzentration	Endkonzentration	1 x Volumen [µl]
<i>A. dest.</i>	-	-	22,1
Platinum- <i>Taq</i> -Puffer (-MgCl <sub>2</sub> )	10 x	1 x	5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	5 µM	10
tanA-961-F	20 µM	200 nM	0,5
tanA-1025-R	20 µM	200 nM	0,5
tanA-984-S	20 µM	100 nM	0,25
CMV-DNA	1,27 x 10 <sup>3</sup> CMV-Kopien/ml	2,54 CMV/Kopien	2
CMV-Kontrollmix <sup>A</sup>	20 µM	200 nM bzw. 100 nM <sup>A</sup>	2
dNTPs	je 5 mM	240 µM	2,4
Platinum- <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	5 U/µl	-	0,25
<i>Template</i> -DNA	-	-	5
<b>Summe</b>	-	-	<b>50</b>

<sup>A</sup> je 200 nM CMV-TM2-F bzw. CMV-TM2-R (20 µM), 100 nM CMV-TM2-S (20 µM) und 0,55 µl *A. dest.*

Die Amplifikation des *tanA*-Gens wurde nach folgendem Temperaturprofil in *Rotor-Gene* Q (Qiagen, Hilden) und *Rotor-Gene* 3000 (Corbett Res., Sydney, Australien) durchgeführt (Tab. 5.4). Am Ende jedes *Annealings*schrittes wurde die Fluoreszenz in den Kanälen FAM und Cy5 gemessen.

**Tabelle 5.4: Real-Time PCR Temperaturprofil *tanA*.**

Zyklus	Zeit [s]	Temperatur [°C]	Zyklen
initiale Denaturierung	90	95	1
Denaturierung	18	94	
Annealing	25	55	50
Elongation	30	72	
finale Elongation	15	37	1

Als Vergleichsmethode wurde die publizierte *recN*-Nachweismethode (Lopes *et al.*, 2014) sowie die etablierte *tanA*-Real-Time PCR ohne MGB-Sonde (Hinse, 2012) angewandt. Der Nachweis des *tanA*-Gens nach Hinse (2012) erfolgte mit 6 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung sowie dem Einsatz von Lambda-DNA als interne Kontrolle (Primer: Lambda-R, Lambda-TM-F, je 600 nM; Lambda-S, 100 nM) und 10 µl Matrizen-DNA. Das Temperaturprofil ist in Tabelle 5.4 angegeben (Hinse, 2012).

Von den Primern für den Nachweis von *recN* wurden jeweils 800 nM und von den MGB-Sonden zum Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bzw. *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* 200 nM eingesetzt (Lopes *et al.*, 2014).

Die Amplifikation des *recN*-Gens erfolgte über eine 2-Stufen-PCR und ist in Tabelle 5.5 dargestellt.

**Tabelle 5.5: Real-Time PCR Temperaturprofil *recN* (Lopes *et al.*, 2014).**

Zyklus	Zeit [s]	Temperatur [°C]	Zyklen
initiale Denaturierung	600	95	1
Denaturierung	15	95	
<i>Annealing</i> und Elongation	60	60	50

### 5.2.8 Genomisches *Fingerprinting* (ERIC-PCR)

Beim genomischen *Fingerprinting* erfolgt eine lineare PCR mit dem spezifischen ERIC2-Primer, der bei geringen *Annealing*-Temperaturen in intergenischen Regionen des bakteriellen Genoms binden kann. Eine elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate erzeugt ein charakteristisches DNA-Bandenmuster, einen sogenannten „genetischen Fingerabdruck“. Dieser kann für Verwandtschaftsverhältnisse und klonale Identitäten genutzt werden. Der Reaktionsansatz und das dazugehörige Temperaturprofil des genomischen *Fingerprintings* sind in der Tabelle 5.6 bzw. der Tabelle 5.7 dargestellt.

**Tabelle 5.6: ERIC2-PCR-Ansatz.**

Reagenz	Konzentration	Endkonzentration	1 x Volumen [ $\mu$ l]
Ampli- <i>Taq</i> -Puffer (+ 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	10 x	1 x	5
ERIC2-Primer	20 $\mu$ M	2 $\mu$ M	5
dNTP	je 5 mM	200 $\mu$ M	2
Ampli- <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	5 U/ $\mu$ l	-	1
<i>A. dest.</i>	-	-	32
<i>Template</i> -DNA	50 ng/ $\mu$ l	5 ng/ $\mu$ l	5
<b>Summe</b>	-	-	<b>50</b>

**Tabelle 5.7: Temperaturprofil einer ERIC-PCR.**

	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Zeit [min]	Zyklen
initiale Denaturierung	94	5	1
Denaturierung	94	1	
<i>Annealing</i>	25	1	40
Elongation	72	2	
finale Elongation	72	5	1

### 5.2.9 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung beim Anlegen eines elektrischen Feldes ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Größere DNA-Moleküle werden im Agarosegel stärker zurückgehalten als kleinere. Demnach richtet sich die einzusetzende Agarosegelkonzentration nach der zu detektierenden Amplifikatgröße.

In dieser Arbeit wurden 1,5 g Agarose für ein 1,5 %-iges Gel eingewogen, in 100 ml 0,5 x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht und mit 5  $\mu$ l Ethidiumbromidlösung (1 %-ig in wässriger Lösung) versetzt. Das flüssige Agarosegel wurde in einer Gelkammer mit einem eingesetzten Gelkamm polymerisiert. Vor dem Auftragen in die Geltaschen wurden 5  $\mu$ l der aufzutrennenden DNA mit 2  $\mu$ l 1:5 verdünntem Ladepuffer versetzt. Als Größenstandard wurden 5  $\mu$ l des pUC-Mix Marker 8 bzw. des 50 bp DNA-Markers eingesetzt. Die Agarosegelelektrophorese wurde in einer 0,5 x TBE-Puffer-gefüllten Elektrophoresekammer (Biorad, München) bei 120 V für 0,7 h durchgeführt. Aufgrund der interkalierenden Eigenschaften des Ethidiumbromids wurden die aufgetrennten DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht (Absorption 320 nm, Emission 590 nm), dokumentiert und analysiert.

### 5.2.10 Kapillargelelektrophorese zur Analyse der ERIC-PCR-Amplifikate

Die mittels ERIC-PCR (s. 5.2.8) gewonnenen Amplifikate wurden elektrophoretisch auf einem Mikrofluidtechnikchip (*DiversiLab Chip Kit*, BioMérieux, Nürtingen) aufgetrennt. Bei dieser Technik werden die 16 Kavitäten des Chips über Kapillaren miteinander verbunden. Der Chip wird mit einer Gelmatrix beladen, sodass eine Auftrennung der aufgetragenen PCR-Produkte beim Anlegen einer Spannung ermöglicht wird. Die Kapillarelektrophorese wurde nach den Angaben des Herstellers absolviert. Damit Luftblasen vermieden wurde, wurde revers pipettiert.

Die DNA-Chip-Reagenzien wurden vor Beginn der Analyse 30 min bei RT erwärmt. Die Gelmatrix wurde zuvor aus 200 µl DNA-Gelmatrix und 10 µl DNA-Dye-Konzentrat angesetzt, gemischt, auf einen Filter gegeben und bei 1500 × g für 10 min bei RT zentrifugiert. Nachdem der DNA-Chip in die DNA-*Priming*-Station (Basisplatte in Position C) gelegt und der Spritzenkolben auf 10 ml justiert wurde, wurden 9 µl Gel-Dye Mix in Position G pipettiert und die *Priming*-Station geschlossen. Anschließend wurde der Kolben heruntergedrückt, sodass durch den ausgeübten Druck (30 sec) der Farbstoffmix gleichmäßig in den Kapillaren verteilt wurde. Dabei sollte sich der Kolben wieder selbständig in die Ausgangsposition zurückbewegen. Dann wurden 9 µl des Gel-Dye-Mixes in die zwei „Abfall“-Kavitäten G und 5 µl DNA-Marker in die 12 Probenkavitäten und die Markerkavität pipettiert. Diese 13 Kavitäten wurden im Folgenden mit je 1 µl PCR-Produkt beladen. Der Chip wurde 1 min bei 2200 × g geschüttelt. Im *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Waldbronn) erfolgten die elektrophoretische Auftrennung und die Detektion der DNA, die durch den DNA-Marker fluoreszenzmarkiert wurde. Die erstellten Daten wurden automatisiert an die *Online-Analysesoftware* von *DiversiLab* (BioMérieux, Nürtingen) gesendet und konnten von dort aus exportiert werden, um die Kapillarelektrophorese mit der *Bionumerics Software 6.6* (AppliedMath, Sint-Martens-Latem, Belgien) auszuwerten.

## 5.3 DNA-Sequenzierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Didesoxymethode, auch als Kettenabbruchmethode bezeichnet, nach Sanger zum Sequenzieren der DNA angewandt. In den Sequenzieransatz werden vier spezifische fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotid-Derivate (ddNTPs) hinzugefügt. Dabei fehlt bei den ddNTPs die Hydroxylgruppe am dritten C-Atom der Didesoxyribose. Werden die ddNTPs während der Amplifikation des Matrizenstranges durch die DNA-Polymerase eingebaut, kommt es zum Kettenabbruch durch die fehlende Hydroxylgruppe. Durch den zufälligen Einbau der Derivate

resultieren unterschiedlich lange DNA-Fragmente. In der sich anschließenden Kapillarelektrophorese werden die DNA-Fragmente der Länge nach aufgetrennt und entsprechend der Fluoreszenzmarkierung nach Laseranregung spezifisch detektiert, sodass die Basenabfolge der DNA entschlüsselt werden kann.

### **5.3.1 Aufreinigung der PCR-Amplifikate für die Sequenzierung**

Bevor die amplifizierten PCR-Produkte sequenziert werden können, mussten die dNTPs und Primer aus der PCR-Reaktion entfernt werden. Dies erfolgte zum einen enzymatisch und zum anderen mit Hilfe eines Kits, welches angewandt wurde, wenn die Ausbeute des PCR-Produktes gering ausfiel.

#### **5.3.1.1 Enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte**

Eine enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe der Exonuklease I, die beim Vorhandensein einer terminalen 3'-OH-Gruppe einzelsträngige DNA in 3'-5' Richtung spaltet, und der *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP), die 5'-Phosphatreste abspaltet. Je 1 µl der Exonuklease I-Lösung (s. 6.4) und der SAP wurden mit 5 µl Amplifikat gemischt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Eine Hitzeinaktivierung der Enzyme erfolgte bei 80 °C für 15 min. Beide Schritte wurden im *Thermocycler* (Biometra GmbH, Göttingen) durchgeführt.

#### **5.3.1.2 MSB-Spin PCRapace Kit**

Bei PCR-Produkten mit geringer Ausbeute wurden diese über eine Säule aufgereinigt und aufkonzentriert. Dafür wurde das *MSB-Spin PCRapace Kit* (Invitex, Berlin) eingesetzt. Das Protokoll wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Zu 250 µl Bindepuffer wurden 40 µl des PCR-Produktes gegeben und auf eine Säule mit einer Silikamembran pipettiert. Bei der einminütigen Zentrifugation bei 9000 × g wurde durch die chaotropen Bedingungen des Puffers die DNA an die Membran gebunden. Verunreinigungen wurden im Durchlauf aufgefangen und verworfen. Die Säule wurde in ein neues Auffanggefäß überführt und erneut 3 min bei 9000 × g zentrifugiert, um Pufferreste zu entfernen. Abschließend wurden 20 µl Elutionspuffer mittig auf die Säule pipettiert, 1 min bei RT inkubiert und die DNA durch Zentrifugieren (1 min, 6000 × g) eluiert.

### 5.3.2 Sequenzierreaktion mit dem *BigDye Terminator Kit*

Das *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* von Applied Biosystems (Darmstadt) wurde in dieser Arbeit zum Ansetzen der Sequenzierreaktion verwendet. In diesem Kit waren die unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Didesoxyderivate (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) enthalten. Der Sequenzieransatz wurde wie in Tabelle 5.8 hergestellt und die Sequenzierreaktion mit dem in Tabelle 5.9 abgebildetem Temperaturprofil im *Thermocycler* durchgeführt.

**Tabelle 5.8: Standard-Sequenzieransatz.**

Reagenz	Konzentration	Endkonzentration	1 x Volumen [µl]
Prämix	10 x	1 x	2
<i>BigDye</i> -Puffer	5 x	0,5 x	2
Primer <i>forward</i> bzw. <i>reverse</i>	20 µM	1,5 µM	1,5
aufgereinigtes Amplifikat	-	-	2
<i>A. dest.</i>	-	-	12,5
<b>Summe</b>	-	-	<b>20</b>

**Tabelle 5.9: Temperaturprofil für die Sequenzierreaktion.**

	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
initiale Denaturierung	95	120	1
Denaturierung	95	10	25
<i>Annealing</i> und Elongation	60	240	

### 5.3.3 Aufreinigung der Sequenzierprodukte mittels Sephadex-G50-Gelfiltration

Damit Hintergrundsignale beim Sequenzieren vermieden werden, wurde das Sequenzierprodukt mittels Sephadex-G50-Gelfiltration aufgereinigt. Sephadex besteht aus Dextranskügeln. Das Polysaccharid ist quervernetzt, sodass eine dreidimensionale Struktur resultiert (stationäre Phase), die es ermöglicht, Salze, Nukleotide und Farbstoffe zurückzuhalten, während größere Moleküle (Amplifikate der Sequenzierreaktion) sich in der Laufmittelfront befinden. In Abhängigkeit von der Beschaffenheit (Porengröße) des Sephadex können große und kleine Moleküle separiert werden.

96-Kavitäten-Säulenplatten wurden eingesetzt, um eine große Probenmenge zu bearbeiten. Die Kavitäten der Säulenplatte wurden mit 900 µl Sephadex-G50 beladen, bei 850 × g 2 min zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und die Säulen in eine Sequenzierplatte gestellt. Die Sequenzieransätze (etwa 20 µl) wurden mittig auf die

Säule gegeben. Es wurde erneut bei  $850 \times g$  (4 min) zentrifugiert und die Säulen verworfen. Der Sequenzieransatz wurde mit HPLC-Wasser auf 40  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Nach der Denaturierung bei  $95\text{ }^\circ\text{C}$  (2 min) schloss sich die Kapillargelelektrophorese im Kapillarsequencer an (s. 5.3.4).

#### 5.3.4 Kapillargelelektrophorese zur Analyse der DNA-Sequenzierprodukte

Die über Sephadex-Gelfiltration aufgereinigten Sequenzierprodukte wurden im 3500 *Genetic Analyzer DNA Sequencer* (Applied Biosystems, Darmstadt) analysiert. Über eine mit Gelmatrix gefüllte feine Kapillare wurden die unterschiedlich langen DNA-Ketten elektrophoretisch aufgetrennt. Entsprechend der Kettenlänge (1 bis 1000 bp) und der Fluoreszenzmarkierung der DNA-Fragmente erfolgte die fluorimetrische Detektion der Sequenzen, die dann in einem Fluoreszenzkurvendiagramm mittels *Sequencing Analysis Software* (Applied Biosystems, Darmstadt) dokumentiert wurden. Zur Analyse wurde das Standardprogramm „Std\_Seq\_Assay-POP7“ verwendet (Tab. 5.10).

**Tabelle 5.10: Programm zur DNA-Sequenzierung.**

	Temperatur [ $^\circ\text{C}$ ]	Spannung [kV]	Zeit [s]
elektrophoretische Injektion	-	10	30
Kapillargelelektrophorese	50	8,5	5400

#### 5.4 Identifizierung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* mittels MALDI-TOF-MS

Die Kopplung der matrixunterstützten Laser Ionisation (*matrix assisted laser desorption*, MALDI) mit der Massenspektrometrie (MS) mit Flugzeitanalysator (*time of flight*, TOF) ermöglicht die Identifizierung von Reinkulturen durch einen Abgleich der erzeugten Massenspektren mit Referenzspektren aus einer frei zugänglichen Datenbank. Diese Methode basiert auf der spezifischen Zusammensetzung der bakteriellen ribosomalen Proteine, die einen sogenannten „Massenfingerabdruck“ darstellen.

#### 5.4.1 Probenvorbereitung und -analyse

Die zu identifizierenden Bakterien wurden zuerst auf einer COS-Agarplatte von BioMérieux (Nürtingen) bei 37 °C über Nacht im Brutschrank kultiviert. Mit einem Zahnstocher wurden die Bakterien in Doppelbestimmung auf den Metallträger (Bruker Diagnostics GmbH, Bremen) aufgetragen, jeweils mit 1 µl  $\alpha$ -Cyano-3-(4-Hydroxyphenyl)-Acrylsäure-(HCCA)-Lösung (s. 6.4) versetzt und etwa 2 min bei RT getrocknet. Der beladene Metallträger wurde in den MALDI-*Biotyper* (Bruker, Diagnostics GmbH, Bremen) gestellt und die Analyse mit der mitgelieferten *MALDI Biotyper automation 2.0 Software* durchgeführt. Anhand der charakteristischen Proteinzusammensetzung der Bakterien wurden spezifische Massenspektren generiert, die es durch einen nachgeschalteten Datenbankabgleich ermöglichten die Spezies zu identifizieren. Zur Identifizierung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wurden die vom Hersteller empfohlenen *Score Cutoffs* (Gattung: 1,700 bis 1,999 oder Spezies:  $\geq 2,000$ ) verwendet.

### 5.5 Fall-Kontrollstudie

Bei der Fall-Kontrollstudie handelt es sich um eine diagnostisch wissenschaftliche Studie, wobei die Ergebnisse der Studie eine Bewertung einer potentiellen Zoonose von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* dienen sollten. Ein weiterer Aspekt der Studie sollte mögliche Infektion mit dem Gram-positiven fakultativen Pathogen aufgreifen.

Die Fall-Kontrollstudie wurde am Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen (HDZ NRW) in einem Zeitraum von Dezember 2012 bis Juli 2015 durchgeführt. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ruhr-Universität Bochum genehmigt. Alle Studienteilnehmer wurden vor der Teilnahme an der biomedizinischen Studie von dem behandelnden Arzt oder durch den Studienkoordinator aufgeklärt und unterzeichneten eine Einwilligungserklärung.

#### 5.5.1 Probanden

Bei den 135 Versuchsteilnehmern handelte es sich um freiwillige Probanden nach direkter Ansprache (115), erkrankte Patienten mit einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung oder einer neoplastischen Veränderungen im Kolon (13) (Johannes Wesling Klinikum Minden, Klinik für Visceral-, Thorax und Gefäßchirurgie, Darmkrebszentrum Minden), Patienten aus dem HDZ NRW (sieben), die eine *S. gallolyticus/S. bovis* induzierte Endokarditis und einen positiven Nachweis des

Bakteriums im Blut aufwiesen. Weiterhin wurden innerhalb des Beobachtungszeitraumes 8 Probanden (ein infektiöser Endokarditispatient, sieben gesunde Versuchsteilnehmer) mehrfach auf die Kolonisation mit dem Bakterium untersucht (*Follow-up*).

### 5.5.2 Einschlusskriterien

Die Teilnahme an der Studie setzte die Bereitschaft und die schriftliche Einwilligung voraus, einen Fragebogen auszufüllen und eine Stuhlprobe für die Analysen abzugeben. Dabei war ein Mindestalter von 18 Jahren erforderlich. Für Patienten des Darmkrebszentrums in Minden stellte die gesicherte Diagnose einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung bzw. einer Neoplasie im Kolon eine Voraussetzung für den Einschluss in die Studie dar. Eine gesicherte Diagnose einer durch *S. gallolyticus*/*S. bovis*-induzierten Endokarditis oder ein positiver Nachweis des Erregers in der Blutkultur war bei dem Einschluss der Patienten des HDZ NRW in die Studie vorausgesetzt.

### 5.5.3 Maßnahmen

Die DNA der Stuhlprobe jedes Versuchsteilnehmers wurde, wie unter Abschnitt 5.2.4 beschrieben, extrahiert und mit der unter Abschnitt 5.2.7 geschilderten *Real-Time* PCR molekulargenetisch untersucht. Bei einem positiven Befund der PCR wurde dieser als Fall, die im *Screening* negativen Probanden wurden als Fall-Kontrolle gewertet. Die Stuhlproben mit einem positiven Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wurden wie unter Abschnitt 5.1.2 bearbeitet, auf dem Selektionsmedium kultiviert, nach 2 d Inkubation selektiert und auf Columbia Agar vereinzelt. Zur Identifizierung der Spezies wurden die gewonnenen Isolate der Analyse mit dem Massenspektrometer und der *sodA*-Sequenzierung unterzogen (s. 5.3 und 5.4). Zum Erfassen epidemiologischer Zusammenhänge wurden die als *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-determinierten Isolate molekulargenetisch mittels MLST charakterisiert. Darüber hinaus wurden Informationen zur Person (z. B. Alter, Geschlecht, Erkrankungen, Medikamente), zu Ernährungsgewohnheiten (z. B. Diäten (z. B. vegan, halal), Aufnahme von rohem Fleisch oder Rohmilchprodukten) und dem Kontakt zu Tieren im privaten und im beruflichen Lebensbereichen anhand eines Fragebogens erhoben (s. 10.1.1).

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten wurden pseudonymisiert behandelt, sodass die Analyse und Auswertung nur unter Angabe der Studienteilnehmernummer erfolgte.

#### 5.5.4 Statistische Auswertung

Die Datenanalyse erfolgte mit der Statistikanalysesoftware SPSS 23. Zum Darstellen einfacher Assoziationen wurden Kontingenztafeln (Vierfeldertafeln/Kreuztabellen) generiert, um die beobachteten (absoluten) Häufigkeiten der binären Merkmale darzustellen. Die zugrundeliegende Assoziation (Abhängigkeit zweier Parameter) zwischen der Ausprägung (Exposition; *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* positiv/negativ) und einem Risikofaktor wurde anhand des Chi-Quadrat-Tests berechnet. Chi-Quadrat wurde nach Yates korrigiert (Kontinuitätskorrektur). Wenn weniger als fünf absolute Häufigkeiten beobachtet wurden, wurde der Fisher's Exakt-Test angewandt, um eine Signifikanz zu bestimmen. Der Ausprägungsgrad (Effektmaß) eines Risikofaktors wurde bestimmt, in dem das *Odds Ratio* (OR; Chancenverhältnis) exponierter Probanden und nicht-exponierter Personen ermittelt wurde. Die Stärke und Richtung der Ausprägung des Risikofaktors wurde anhand von Kreuztabellen berechnet. Dabei wurden ein Konfidenzintervall von 95 % und ein Signifikanzniveau ( $\alpha$ ) von 0,05 % festgelegt.

Da mehrere potentielle Risikofaktoren einen Einfluss auf die Ausprägung haben könnten, wurde die logistische Regression angewandt, um das Effektmaß (*Odds Ratios*, OR) zu bestimmen. Als Voraussetzung für die Anwendung der logistischen Regression gilt das binäre Messniveau der Zielvariablen (*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* positiv/negativ). Es wurde ein 95 %-Konfidenzintervall festgelegt, um die Stärke der potentiellen Determinanten auf die Kolonisation des Darms mit dem Bakterium zu beurteilen. Die Signifikanz wurde anhand des Chi-Quadrat-Tests berechnet und eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 festgelegt.

Ein *Odds Ratio* kleiner eins deutete auf einen potentiellen protektiven Effekt bzw. einen möglichen Ausschluss des Risikofaktors hin. Kein Zusammenhang zwischen dem Expositionsfaktor und der Ausprägung wurde durch einen OR von eins angegeben. Ein OR größer als eins zeigte einen Risikofaktor an.

## 5.6 Programme zum Auswerten der Klassifizierung mittels MLST

Zur Analyse der epidemiologischen Zusammenhänge einer Bakterienpopulation wurden verschiedene Programme angewandt. Zum Charakterisieren von Verwandtschaftsverhältnissen wurde ein UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*) Dendrogramm mit der *BioNumerics Software 6.6* erstellt. Basierend auf den errechneten Allelprofilen konnten die klonalen Linien ermittelt werden, wobei die klonalen Komplexe (*clonal complex*, CC) als Gruppen definiert wurden, wenn sechs von sieben Allelen übereinstimmten (eBURST) (Feil *et al.*, 2004). Das Programm START Version 2 ([www.mlst.net](http://www.mlst.net)) wurde genutzt, um die Nukleotidvariationen zu berechnen, indem die Anzahl der Nukleotidveränderungen, die einen Aminosäureaustausch hervorrufen (nicht-synonym,  $d_N$ ), und stille Mutationen (synonym,  $d_S$ ) ermittelt wurden ( $d_S/d_N$ -Verhältnis) (Jolley *et al.*, 2001). Die polymorphen Positionen und der Assoziationsindex ( $I_A$ ) wurde ebenfalls mit dieser *Software* berechnet (Jolley *et al.*, 2001). Der  $I_A$  wurde berechnet, um die Kopplung eines Ungleichgewichtes innerhalb der sieben Loci zu detektieren (Smith *et al.*, 1993). Basierend auf dem molekularen Muster der Haushaltsgene wurde unter Zuhilfenahme der *Comparing partitions website* der *Simpson's Index of Diversity* (SID) ermittelt. Ein Wert nahe 1 definiert dabei eine hohe Diversität und eine Zahl nahe 0 gibt eine geringe Vielfalt an.

## 6 Material

### 6.1 Bakterienstämme

**Tabelle 6.1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Stämme.**

Stamm	Spezies	Ursprung	Isolationsquelle	Jahr	Ort
DSM 15351	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	-	-	-	-
DSM 16831	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Koala	-	1990	Australien
DSM 13808	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Umwelt	anaerober Fermenter, Faulschlamm	1997	Afrika
Isolat 12932/01	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Endokarditispatient	2001	Deutschland
Isolat 000718/98	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Endokarditispatient	1998	Deutschland
Isolat 010288/01	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Endokarditispatient	2001	Deutschland
Isolat 003080/00	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Endokarditispatient	2000	Deutschland
Isolat 010672/01	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Endokarditispatient	2001	Deutschland
Isolat 006718/00	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Endokarditispatient	2000	Deutschland
Isolat 007849/02	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Endokarditispatient	2002	Deutschland
Isolat 021702/06	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Endokarditispatient	2006	Deutschland
ATCC 49475	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat	1992	USA
ATCC 49147	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat	1992	-
0134257/1	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Endokarditispatient	2001	Deutschland
ATCC 9809	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	unbekannt	-	1977	England
Isolat 005950/03	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Endokarditispatient	2003	Deutschland
ATCC BAA-2069	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Endokarditispatient	2001	Deutschland
K6236/35_MS	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Blutkultur; Endokarditispatient	-	-
05WDK 43740 002	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Kalb	-	-	-
AC 6860	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat	-	Aachen, Deutschland
AC 1016	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat	-	Aachen, Deutschland
AC 1135	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat	-	Aachen, Deutschland
AC 1181	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat	-	Aachen, Deutschland
AC 1242	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat	-	Aachen, Deutschland
AC 582	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat	-	Aachen, Deutschland
AC 7070	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat	-	Aachen, Deutschland
AC 6827	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat	-	Aachen, Deutschland
LMG 14621	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Taube	Abszess	1994	Belgien
LMG 14622	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Taube	-	1994	Belgien
LMG 14623	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Taube	Leber	1994	Belgien
LMG 14634	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Rind	Intestinum	1994	Belgien
LMG 14821	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Taube	-	1994	Belgien
LMG 14823	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Taube	-	1994	Belgien
LMG 14855	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Pferd	Intestinum	1994	Belgien
LMG 14856	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Pferd	Intestinum	1994	Belgien
LMG 14870	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Rind	Intestinum	1994	Belgien
LMG 14876	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Rind	Mandeln	1994	Belgien
LMG 14878	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Taube	Lunge	1994	Belgien
LMG 15572	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Wildziege	Pansen	1994	Australien
LMG 15573	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Wildziege	Pansen	1994	Australien

Stamm	Spezies	Ursprung	Isolationsquelle	Jahr	Ort
LMG 16005	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Rind	Intestinum	1995	Belgien
LMG 17956	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Kalb	-	1997	Niederlande
LMG 22782	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Hund	-	2000	Belgien
LMG 14625	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Hämokultur	1994	Belgien
LMG 14631	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Hämokultur	1994	Belgien
LMG 14632	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Hämokultur	1994	Belgien
LMG 14879	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Taube	Lunge	1994	Belgien
LMG 15049	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Rind	Mastitis, Milch	1970	England
LMG 15053	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Rind	Mastitis	1977	England
LMG 15063	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Rind	Mastitis, Rumen	1982	England
LMG 17082	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Rind	Mandeln	1996	Belgien
LMG 17091	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Kalb	Mandeln	1996	Belgien
Sp 001	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien
Sp 006	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien
Sp 012	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien
Sp 014	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien
Sp 015	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien
Sp 020	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien
Sp 023	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien
Sp 029	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien
Sp 030	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien
Sp 036	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien
Sp 042	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien
Sp 043	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien
Sp 050	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien
Sp 052	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien
Sp 053	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien
UCN 34	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Blutkultur	2001	Frankreich
904	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Endokarditis, Kolonkarzinom	-	Korea
99146B3313	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Blutkultur, Fieber, unklare Infektion	2012	Geesthacht, Deutschland
Isolat 52 F2	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Fäzes	2012	Bad Oeynhausen, Deutschland
Isolat 52 G9	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Fäzes	2012	Bad Oeynhausen, Deutschland
99208B2062	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Blutkultur, kardiale Dekomposition, Fieber, Endokarditis, Harnwegsinfekt, Kolonkarzinom	2012	Geesthacht, Deutschland
ATCC 43143	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Blutkultur	1985	Belgien
HDZ 1001	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Taube	Sammelkot Taubenstall 1	2012	Hannover, Deutschland
HDZ 1002	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Taube	Sammelkot Taubenstall 1	2012	Hannover, Deutschland
HDZ 1003	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Taube	Sammelkot Taubenstall 1	2012	Hannover, Deutschland
HDZ 1004	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Taube	Sammelkot Taubenstall 1	2012	Hannover, Deutschland
HDZ 1005	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Taube	Sammelkot Taubenstall 1	2012	Hannover, Deutschland
HDZ 1006	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Taube	Sammelkot Taubenstall 1	2012	Hannover, Deutschland
HDZ 1007	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Taube	Sammelkot Taubenstall 1	2012	Hannover, Deutschland
HDZ 1008	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Taube	Sammelkot Taubenstall 1	2012	Hannover, Deutschland
1458-1	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Studie	2012	-
1527/HDZ 1251	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Studie	2012	-
HDZ 1009	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Taube	Sammelkot Taubenstall 2	2012	Hannover, Deutschland





Stamm	Spezies	Ursprung	Isolationsquelle	Jahr	Ort
HDZ 1131	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 9, Herde 17; Niedersachsen	2013	Hannover, Deutschland
HDZ 1132	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 9, Herde 17; Niedersachsen	2013	Hannover, Deutschland
HDZ 1133	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 9, Herde 17; Niedersachsen	2013	Hannover, Deutschland
HDZ 1134	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Pute	Einzelkotprobe Putenstall 20	2013	Hannover, Deutschland
HDZ 1139	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 10, Herde 18; Mecklenburg-Vorpommern	2013	Hannover, Deutschland
HDZ 1140	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Blutkultur, Endokarditispatient, FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1141	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1146	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1151	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1153	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Umwelt	Gülleverrat Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1158	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Blutkultur, Endokarditispatient, FKS_011_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1159	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	Mensch	Fäzes; FKS_022_M	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1168	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1169	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1172	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1178	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1179	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1180	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1184	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Umwelt	Gülleverrat Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1194	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1199	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1204	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1210	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1212	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1223	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1224	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1225	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1226	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1228	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1229	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1230	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1233	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1235	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1237	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1238	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1240	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1242	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1244	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1246	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1250	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1252	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1257	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1260	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1267	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1277	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland

Stamm	Spezies	Ursprung	Isolationsquelle	Jahr	Ort
HDZ 1282	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1287	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1293	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Maus	Sammelkot im Stall FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1298	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Umwelt	Scharrmatte Hühnerstall FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1303	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Umwelt	Eierschale im Stall von FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1305	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Umwelt	Sammelstaubprobe Hühnerstall FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1306	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 13; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland
HDZ 1307	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 14; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland
HDZ 1308	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 1, Herde 12; Bayern	2012	Hannover, Deutschland
HDZ 1309	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 15; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland
HDZ 1310	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Schwein	Sammelkot	2014	Hannover, Deutschland
HDZ 1311	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Schwein	Sammelkot	2014	Hannover, Deutschland
HDZ 1314	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Blutkultur	2015	Bochum, Deutschland
HDZ 1317	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Blutkultur	2014	Bochum, Deutschland
HDZ 1319	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Blutkultur	2014	Bochum, Deutschland
HDZ 1323	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Fäzes; FKS_032	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1328	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	Mensch	Fäzes; FKS_045	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1330	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Fäzes; FKS_098	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1331	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	Mensch	Fäzes; FKS_110	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1332	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Fäzes; FKS_117	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1334	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Urinkultur	2014	Bochum, Deutschland
HDZ 1338	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Mensch	Blutkultur	2014	Bochum, Deutschland
HDZ 1340	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	Mensch	Fäzes; FKS_133	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1344	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 13; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland
HDZ 1345	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 13; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland
HDZ 1346	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 13; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland
HDZ 1347	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 13; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland
HDZ 1348	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 14; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland
HDZ 1349	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 14; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland
HDZ 1350	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 14; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland
HDZ 1351	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 14; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland
HDZ 1352	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 15; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland
HDZ 1353	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 15; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland
HDZ 1354	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 15; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland
HDZ 1355	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 15; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland
-	<i>E. faecalis</i>	Mensch	Fäzes	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
-	<i>E. flavus</i>	Huhn	Sammelkot Huhn	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
-	<i>E. avium</i>	Huhn	Sammelkot Huhn	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
-	<i>A. viridans</i>	Huhn	Sammelkot Huhn	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
-	<i>E. aquimarinus</i>	Huhn	Sammelkot Huhn	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
DSM 20523	<i>S. mutans</i>	Mensch	Karies	1924	DSMZ
ATCC 29212	<i>E. faecalis</i>	Mensch	Urin	-	ATCC
ATCC 25922	<i>E. coli</i>	Mensch	klinisches Isolat	1946	ATCC

ATCC: American Type Culture Collection, DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, LMG: Laboratorium für Mikrobiologie, Universität Gent, HDZ: Herz- und Diabeteszentrum NRW

## 6.2 Enzyme

**Tabelle 6.2: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme.**

Enzym	Hersteller
Ampli- <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Darmstadt
Exonuklease I	USB, Cleveland, USA
HotMaster- <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	5Prime, Hamburg
Lysozym	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Platinum- <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Invitrogen, San Diego, USA
<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> (SAP)	USB, Cleveland, USA

## 6.3 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 6.3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien.**

Reagenz	Hersteller
Acetonitril	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agarose	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Hohenbrunn
Bruker Matrix HCCA ( $\alpha$ -Cyano-3-(4-Hydroxyphenyl) Acrylsäure)	Bruker Diagnostik GmbH, Bremen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
dNTPs	Fermentas, Leon-Rot
Essigsäure 20 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol 96 %	Merck, Hohenbrunn
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Haltbare Milch	Milbona, Zeven
HPLC-Wasser	Fisher Chemical, Schwerte
Kollagen I (human, Plazenta)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kollagen IV (human, Plazenta)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
Lysozym	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchloridhexahydrat	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
Oligonukleotide	Biomers, Ulm
PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline)	Invitrogen, San Diego, USA
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Saccharose	Sigma, Taufkirchen
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Sephadex-G50	Amersham, Braunschweig

Reagenz	Hersteller
Tanninsäure reinst	AppliChem GmbH, Darmstadt
TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	Invitrogen, San Diego, USA
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tween-20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasser	Braun, Melsungen
Wasser <i>bidest.</i>	Merck, Darmstadt

## 6.4 Puffer und Lösungen

**Tabelle 6.4: Übersicht zu den Puffern.**

Puffer	Zusammensetzung	Lösungsmittel	Anwendung
AK I -Puffer	6,7 % Saccharose 50 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 4-9	<i>A. dest.</i>	Stabilität von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> bei verschiedenen pH-Werten
Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer)	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA 70 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM DTT	<i>A. dest.</i>	Lösungsmittel (z. B. Exonuklease I-Lösung)
Blockierungslösung	1 % BSA 0,05 % Tween-20	1 x PBS-Puffer	Kollagenadhäsion
α-Cyano-3-(4-Hydroxyphenyl)-Acrylsäure-(HCCA)-Lösung	50 % Acetonitril 47,5 % <i>A. dest.</i> 2,5 % Trifluoressigsäure	250 µl zum Lösen der HCCA-Matrix (10 mg/ml)	Analyse mit dem MALDI- <i>Biotyper</i>
Exonuklease I-Lösung	5 % Exonuklease I Stammlösung 10 % Glycerin	1 x TE-Puffer	Aufreinigung von PCR-Produkten
Sephadex-G50	50 g Sephadex-G50, in 750 ml über Nacht quellen lassen, autoklavieren	1 x TE-Puffer	Aufreinigung von Sequenzierprodukten
Kollagen I-Stammlösung	1 mg/ml Kollagen I	<i>A. dest.</i> pH 3,0	Kollagenadhäsion
Kollagen IV-Stammlösung	1 mg/ml Kollagen IV	1 x PBS-Puffer	Kollagenadhäsion
BSA-Stammlösung	1 mg/ml BSA	1 x PBS-Puffer	Kollagenadhäsion
Lysispuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA 70 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM DTT, autoklavieren, 10 mg/ml Lysozym vor Anwendung hinzugeben	<i>A. dest.</i>	Nukleinsäureextraktion aus Reinkulturen

## 6.5 Nährmedien

**Tabelle 6.5: Übersicht der verwendeten Nährmedien zur Kultivierung von Bakterien.**

Medium	Zusammensetzung
<i>Tryptone Soya-Agar</i> (Trypton Soja-Agar) (TSA) (Oxoid)	40 g Medium, H <sub>2</sub> O <i>bideest.</i> , add. 1000 ml, autoklavieren, in Petrischalen gießen und bei 4 °C lagern
Tannin-Natriumazid-TSA	40 g Medium, H <sub>2</sub> O <i>bideest.</i> , add. 950 ml, autoklavieren, auf 55 °C abkühlen 0,25 g/l Natriumazid unter Rühren hinzufügen, langsam 50 ml Tanninsäure hinzutropfen (0,5 %/l), in Petrischalen gießen und bei 4 °C dunkel lagern (Schulz <i>et al.</i> , 2015)
<i>Brain Heart Infusion Broth</i> (BHI-Medium) (Oxoid)	37 g Medium, H <sub>2</sub> O <i>bideest.</i> , add. 1000 ml, autoklavieren, in Petrischalen gießen und bei 4 °C lagern
<i>Brain Heart Infusion Agar</i> (BHI-Agar) (Oxoid)	37 g Medium, H <sub>2</sub> O <i>bideest.</i> , add. 1000 ml autoklavieren, in Petrischalen gießen und bei 4 °C lagern
Blutagar (BioMérieux, Nürtingen)	Columbia Agar mit 5 % Schafsblut (COS-Agar)

## 6.6 Testkits

**Tabelle 6.6: Übersicht zu den in dieser Arbeit verwendeten Testkits.**

Kit	Hersteller
<i>Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit</i>	Applied Biosystems, Darmstadt
<i>DiversiLab LabChip Kit</i>	BioMérieux, Nürtingen
<i>MSB Spin PCRapace Kit</i>	Invitek GmbH, Berlin
<i>NucliSENS easyMag</i>	BioMérieux, Nürtingen
<i>QIAamp DNA Blood Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Spin Stool DNA Kit</i>	Invitek GmbH, Berlin
<i>UltraClean Microbial DNA Isolation Kit</i>	Mo Bio Laboratories, Carlsbad, USA

## 6.7 Oligonukleotide

**Tabelle 6.7: Oligonukleotide für die Amplifikation und Sequenzierung von *sodA*.**

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Annea- ling- Temp. [°C]	Frag- ment [bp]	Quelle
sodA d1	CCITAYICITAYGAYGCIYTIGARCC*	56	438	(Poyart <i>et al.</i> , 1998)
sodA d2	ARRTARTAIGCRTGYTCCCAIACRTC*			

\* I: Inosin; Y: Pyrimidin, C oder T; R: Purin, A oder G

Tabelle 6.8: Oligonukleotide für das genomische *Fingerprinting*.

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Annea- ling- Temp. [°C]	Frag- ment [bp]	Quelle
ERIC2	AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG	35	-	(Endtz <i>et al.</i> , 1993)

Tabelle 6.9: Oligonukleotide für das MLST-Schema.

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Annea- ling- Temp. [°C]	Frag- ment [bp]	Quelle
aroE_F	CCTACGCTTGTAGCATTG	56	596	(Dumke <i>et al.</i> , 2014; Hinse, 2012)
aroE_R	CTTAGCTGCGGTTGTTG			
glgB_F	CAGCAGCAGTTCTTACAG	56	950	
glgB_R	ACCGTGAACCACTTCATC			
nifS_F	GATTCGGACAGCTGATTG	56	859	
nifS_R	GTCTGGTGGTACAGAAAG			
p20_F	TATTTACGCCACGTCTG	56	493	
p20_R	CATAGCGCAATAGGTCAC			
tkt_F	GTCAAACGGTGGATACTC	56	550	
tkt_R	CCGAATACGGTCATACTG			
trpD_F	CGACGCCATGTGTAATTG	56	643	
trpD_R	AAGGTAAGGGCTAGGTTG			
uvrA_F	CTCGCAAGGTACGTAAAC	56	675	
uvrA_R	GGCAACACCTTGATTGTC			

Tabelle 6.10: Oligonukleotide für die *Real-Time PCR*.

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Annea- ling- Temp. [°C]	Frag- ment [bp]	Quelle
tanA-961-F	TTCATCGCTCAAATCAGAACGT	55	65	diese Arbeit
tanA-1025-R	TTGATACCGCAAATGAAGCTTATG			
tanA-984-S	<b>FAM</b> -TCGATCCCATGTTCCAT- <b>MGB</b>			
F-recN SGG/P	GATTTTCAAGTCCAATTCACCAAAG	60	98	(Lopes <i>et al.</i> , 2014)
R-recN SGG/P	GGTTYGTTGAAATGTAATTC AACAG			
Pf-recN SGG/P	<b>FAM</b> -TTCAATCGTGATGGCAA- <b>MGB</b>			
Pv-recN SGG/P	<b>VIC</b> -TCAACCGTGATGGAAA- <b>MGB</b>	55-60	63	(Yun <i>et al.</i> , 2000)
CMV-TM2-F	TTYTTAGCACGGGCCTTAGC			
CMV-TM2-R	AAGGAGCTGCATGATGTGASC			
CMV-TM2-S	<b>CY5</b> -TGCAGTGCACCCCAACTTGT- <b>BHQ2</b>			

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Annea- ling- Temp. [°C]	Frag- ment [bp]	Quelle
tanA_F	GGTGACGGTAACAGCGTTCA	55	48	(Hinse, 2012)
tanA_R	AAGGCTTCTTCGTAATCTGTTCC			
tanA_S	<b>FAM</b> -TGGGACTCAACCTTGGGAGATTTGKTC- <b>BHQ1</b>			
Lambda_TM_F	GCAGGTCGAAAAATGGGTGGA	55	89	(Tomaso <i>et al.</i> , 2004)
Lambda_R	GCATAACGAAGCAGTCGAGT			
Lambda_S	<b>JOE</b> -TCATTGCGTCGCTTTTTGCTGTCC- <b>BHQ2</b>			

\*K: Keto, G oder T; Y: Pyrimidin, C oder T; S: *Strong (binding bases)* Purin, C oder G

Tabelle 6.11: Oligonukleotide zum Etablieren des MGB-Real-Time PCR Systems.

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Annea- ling- Temp. [°C]	Frag- ment [bp]	Quelle
tanA1_F	TCACCTCGCAATAACCTCTG	65	1268	diese Arbeit
tanA1_R	TCGGTGCTGTCAAGGTGTC	65		

## 6.8 DNA-Größenmarker

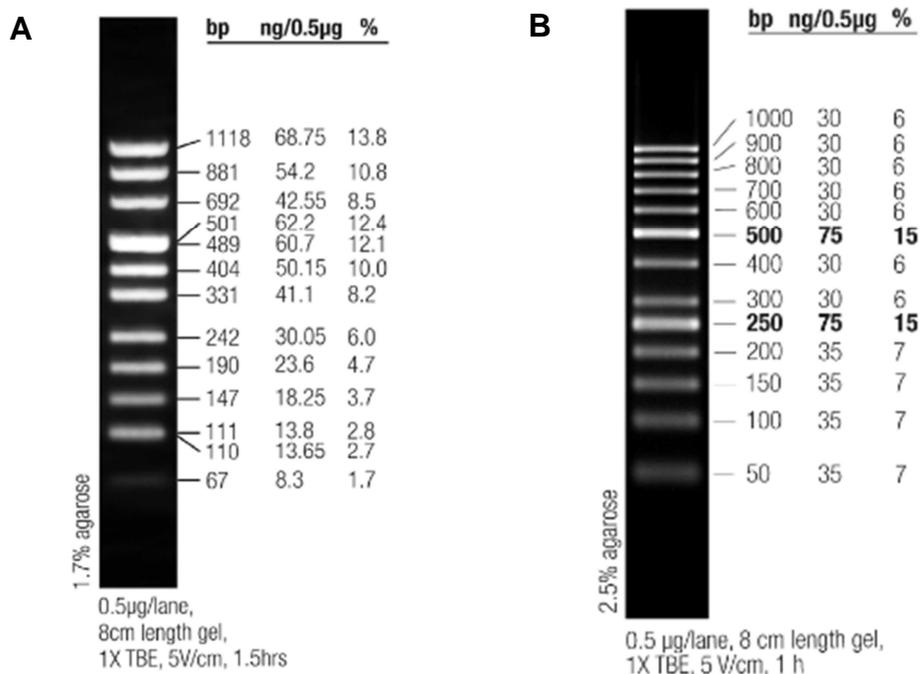


Abbildung 6.1: In dieser Arbeit verwendete DNA-Längenstandards. **A** pUC-Mix Marker 8 (Fermentas GmbH, Leon-Rot), **B** 50 bp Marker (Fermentas GmbH, Leon-Rot).

## 6.9 Software

**Tabelle 6.12: Übersicht der verwendeten Software.**

Programm	Hersteller	Verwendungszweck
<i>ABI Prism 310 Collection</i>	Applied Biosystems, Darmstadt	Sequenzierung
<i>aCOLyte 3.0.5.0 Software</i>	Synbiosis, Cambridge, England	Bestimmung der KBE/ml
<i>BioNumerics 6.6</i>	AppliedMath, Sint-Martens-Latem, Belgien	Phylogenetische Analysen, MLST-Auswertung
<i>BLAST</i>	National Library of Medicine	Sequenzanalyse
<i>Clone Manager 4.01</i>	Scientific & Educational Software, Cary, U.S.A.	Sequenzanalyse/-vergleich, Oligonukleotidkonstruktion
<i>Comparing Partition website</i>	<a href="http://darwin.phyloviz.net/ComparingPartitions">http://darwin.phyloviz.net/ComparingPartitions</a>	MLST-Analyse
<i>DiversiLab-Software 3.4</i> ( <a href="https://iltmhdz.diversilab.com/">https://iltmhdz.diversilab.com/</a> )	BioMérieux, Nürtingen	ERIC-PCR Analyse
<i>DNASIS Max 2.0.6</i>	Hitachi Software	Sequenzanalysen
<i>eBURST version 3</i>	<a href="http://www.mlst.net">www.mlst.net</a>	MLST-Analyse
<i>EDGAR 1.2</i>	<a href="https://edgar.cebitec.uni-bielefeld.de/">https://edgar.cebitec.uni-bielefeld.de/</a>	Genomanalyse/-vergleich
<i>Fusion 15.18</i>	Vilber, Eberhardzell	Geldokumentation
<i>GraphPad Prism 4.0</i>	GraphPad Software Inc., U.S.A.	Statistikanalyse und Darstellung
<i>IBM® SPSS® Statistics Version 23</i>	IBM Deutschland GmbH, Ehningen	Statistikanalyse
<i>i-control™-Microplate Reader Software</i>	Tecan, Schweiz	Absorptionsmessung
<i>Lightcycler Software 4.0</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Nachstellen des Pasteurisierungsvorgangs
<i>MALDI Biotyper automation 2.0 Software</i>	Bruker Diagnostik GmbH, Bremen	MALDI-TOF-MS Analyse
<i>Microsoft Office</i>	Microsoft Corporation, Redmond, USA	Statistische Analyse, Textverarbeitung
<i>NanoDrop 2000/2000c Version 1.4.1</i>	PeqLab Biotechnologie, Erlangen	DNA-Quantifizierung
<i>Primer-Express 2.0</i>	Applied Biosystems, Darmstadt	<i>Real-Time</i> Oligonukleotidkonstruktion
PubMLST ( <a href="http://www.pubmlst.org">www.pubmlst.org</a> )	Universität Oxford, England	Erstellen einer <i>online</i> -MLST-Datenbank
<i>Rotor-Gene Analysis Ver. 6.0 und 6.1</i>	Corbett Research, Sydney, Australien	Analyse der DNA-Quantifizierung
<i>Seq Man Pro</i>	DNASTAR, Inc., Madison, USA	Definition von <i>Trimming</i> sequenzen
<i>Sequencing Analysis Software v.5.1</i>	Applied Biosystems, Darmstadt	Sequenzanalysen
<i>START version 2</i>	<a href="http://www.mlst.org">www.mlst.org</a>	MLST-Analyse

## 6.10 Geräte

**Tabelle 6.13: Übersicht der verwendeten Geräte.**

Gerät	Hersteller
<i>ABI 3500 Genetic Analyzer</i>	<i>Applied Biosystems</i> , Darmstadt
<i>Agilent 2100 Bioanalyzer</i>	Agilent Technologies, Waldbronn

Gerät	Hersteller
Analysewaage BP 160 P	Sartorius, Göttingen
Bioblock scientific, Code 92617	Barnstead-Thermolyne, Dubuque, USA
Brutschrank	Memmert, Schwabach
CB 210 CO <sub>2</sub> - Brutschrank	Binder, Tuttlingen
<i>ColonyCounter</i>	Synbiosis, Camebridge, England
DNA- <i>Priming</i> -Station	Agilent Technologies, Waldbronn
<i>eLine</i> -Pipette	Sartorius, Göttingen
Feinwaage XP105 DR/M	Metler Toledo GmbH, Greifensee
<i>Fireboy plus</i>	Integra Bioscience, Fernwald
Fusion-SL 3500 Bio-Imaging System	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Gelelektrophoresekammer	BioRad, München
GENios Plattenleser	Tecan, Crailsheim
Gradient <i>Cycler</i> TGradient 96	Biometra, Göttingen
Inkubator Unimax 1000 mit Schüttler 1010	Heidolph, Schwabach
Kolbenhubpipetten, verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg
Koloniezähler	Fisher Scientific, Schwerte
Laborschüttler Environmental Shaker ES-20	Dewert, Bünde
<i>Lightcycler 2.0</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>MagNA Lyzer</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
MALDI- <i>Biotyper</i>	Bruker Diagnostics GmbH, Bremen
Metallträger	Bruker Diagnostics GmbH, Bremen
Mikrotiterplatten <i>Reader</i> Infinite® m200 PRO	Tecan, Schweiz
Mikrowelle	AEG, Nürnberg
Nanodrop 2000 Spektralphotometer	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
<i>NucliSENS easyMag</i>	Biomérieux, Nürtingen
pH-Meter 766	Knick, Berlin
Photometer Ultrospec 2100 pro	Amersham, Braunschweig
<i>Pipetboy plus</i>	Integra Bioscience, Fernwald
<i>Rotor-Gene 3000</i>	Corbett Res., Sydney, Australien
<i>Rotor-Gene Q</i>	Qiagen, Hilden
Sicherheitswerkbank, Biovizard	Kojair Tech Oy, Breitenbrunn
Sicherheitswerkbank, Safeflow 1.2	BioAir, Pero, Italien
Thermoblock	Bioer, Zhejiang, China
<i>Thermocycler</i> Tprofessional	Biometra, Göttingen
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2	Scientific Ind., New York USA
Vortex Mixer 7-2020	NeoLab, Heidelberg
Waage 440-33	Kern, Balingen-Frommern
Zentrifuge Rotanta 460R, 380R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifugen 5417C, 5424	Eppendorf, Hamburg

## 6.11 Sonstige Materialien

**Tabelle 6.14: In dieser Arbeit verwendete Materialien.**

Material	Hersteller
24-Kavitätenplatte	Greiner Bio One, Frickenhausen
8-er PCR-Streifen, flach	ThermoFisherScientific, Darmstadt
96-er PCR-Platten	Sartorius, Göttingen
<i>Cellstar</i> , 96 Well Cell Culture Platte (steril)	Greiner Bio One, Frickenhausen
Einwegpipetten	Greiner Bio One, Frickenhausen
Eppendorf Reaktionsgefäße 0,5/1,5/2/5 ml	Eppendorf, Hamburg
Glasgeräte	Schott, Mainz
Glasperlen 3 mm	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Impfösen	Greiner Bio One, Frickenhausen
Klebefolie für 96er PCR-Platten	Eppendorf, Hamburg
Kryoröhrchen Viabank	Abtek Biologicals, Liverpool, England
Küvetten 1,5 ml	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
<i>Lightcycler</i> kapillaren 0,1 ml	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Millex-GV4 Sterilfilter	Millipore, Schwalbach/Ts.
Parafilm	Fleischhacker, Meckenheim
Pasteurpipetten, Glas	Brand, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	Corbett Res., Sydney, Australien
Petrischalen	Greiner Bio One, Frickenhausen
Pipettenspitzen (DNase, RNase frei/mit Filter) variable Größe	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Pipettenspitzen (DNase, RNase, Endotoxin frei/mit Filter) 50-1200 µl	Sartorius, Göttingen
<i>Receiver Columns</i> , 20 µm	Machery und Nagel, Düren
<i>Receiver Plates</i>	Machery und Nagel, Düren
Sterilfilter	Light Labs, Dallas, USA
Stuhlröhre 76 x 20 mm mit Löffel, Schraubverschluss	Sarstedt, Nürnbrecht
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner Bio One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner Bio One, Frickenhausen

## 7 Abkürzungen

× <i>g</i>	Erdbeschleunigung
°C	Grad Celsius
<b>Abb.</b>	<b>Abbildung</b>
Add.	addieren
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>BHI</b>	<b><i>Brain Heart Infusion</i></b>
BHQ	<i>BlackHole Dark Quencher</i>
<i>bidest.</i>	doppelt destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
<b>ca.</b>	<b>circa</b>
CC	<i>clonal complex</i> (klonaler Komplex)
CMV	Cytomegalievirus
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
C <sub>T</sub>	<i>Cycle Threshold</i>
Cy5	Cyanidin-Fluoreszenzfarbstoff, Absorption 646 nm, Emission 669 nm
<b>d</b>	<b>Tag</b>
ddNTPs	Didesoxynukleosidtriphosphat
d <sub>N</sub>	nicht-synonyme Nukleotidvariation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
d <sub>s</sub>	synonyme Nukleotidvariation
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;
DTT	Dithiothreitol
<b>eBURST</b>	<b><i>based upon related sequence types</i></b>
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERIC	<i>enterobacterial repetitive intergenic consensus</i>
<b>FAM</b>	<b>6-Carboxy-Fluorescein, Absorption 495 nm, Emission 520 nm</b>
FKS	Fall-Kontrollstudie
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer ( <i>fluorescence resonance energy transfer</i> )
<b>g</b>	<b>Gramm</b>
<b>h</b>	<b>Stunden</b>
HCCA	α-Cyano-3-(4-Hydroxylphenyl)-Acrylsäure
HCl	Chlorwasserstoff
I <sub>A</sub>	<b>Assoziationsindex (<i>Index of Association</i>)</b>
IE	infektiöse Endokarditis
<b>JOE</b>	<b>Dichlorofluoresceinderivat, Absorption 529 nm, Emission 555 nm</b>
<b>KBE</b>	<b>koloniebildende Einheiten</b>
<b>l</b>	<b>Liter</b>
LMG	Laboratorium voor Microbiologie
LOD	<i>Limit of Detection</i>
LPxTG	Lysin-Prolin-beliebige Aminosäure-Threonin-Glycin

<b>μ</b>	<b>mikro</b>
m	milli
m	Meter
M	molar
MALDI-TOF-MS	<i>matrix assisted laser desorption-time of flight mass spectrometry</i>
MGB	<i>Minor-Groove-Binder</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MSCRAMMs	<i>microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule</i>
MST	<i>Minimum Spannig Tree</i>
<b>NaCl</b>	<b>Natriumchlorid</b>
NaOH	Natriumhydroxid
n. g.	nicht getestet
nm	Nanometer
<b>OD</b>	<b>optische Dichte</b>
OR	<i>Odds Ratio</i>
<b>PBS</b>	<b><i>Phosphate Buffered Saline</i></b>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	positive Hydroxylionenkonzentration
RAPD	<i>random amplified polymorphic DNA</i>
RT	Raumtemperatur
<b>s.</b>	<b>siehe</b>
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sec	Sekunden
SID	<i>Simpson´s Index of Diversity</i>
ST	Sequenztyp
<b>Tab.</b>	<b>Tabelle</b>
TBE	Trisborat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Temp.	Temperatur
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
TSA	Trypton Soja-Agar
<b>u. a.</b>	<b>unter anderem</b>
UPGMA	<i>unweighted pair group method with arithmetic mean</i>
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
<b>V</b>	<b>Volt</b>
VIC	Fluoreszenzfarbstoff, Absorption 538 nm, Emission 554 nm
<b>z. B.</b>	<b>zum Beispiel</b>

## 8 Literatur

- Abdulmir, A., Hafidh, R., Mahdi, L., Al-jeboori Tarik, Abubaker, F. (2009). Investigation into the controversial association of *Streptococcus gallolyticus* with colorectal cancer and adenoma. *BMC Cancer* 9, 403.
- Abdulmir, A. S., Hafidh, R. R., Bakar, F. A. (2010). Molecular detection, quantification, and isolation of *Streptococcus gallolyticus* bacteria colonizing colorectal tumors: inflammation-driven potential of carcinogenesis via IL-1, COX-2, and IL-8. *Molecular Cancer* 9, 249–249.
- Abdulmir, A. S., Hafidh, R. R., Bakar, F. A. (2011). The association of *Streptococcus bovis/gallolyticus* with colorectal tumors: the nature and the underlying mechanisms of its etiological role. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 30, 11–11.
- Abeni, C., Rota, L., Ogliosi, C., Bertocchi, P., Centurini, P. B., Zaniboni, A. (2013). Correlation among *Streptococcus bovis*, endocarditis and septicemia in a patient with advanced colon cancer: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 7, 185.
- Aksoy, N., Akinci, O. F. (2004). Mucin macromolecules in normal, adenomatous, and carcinomatous colon: evidence for the neotransformation. *Macromol Biosci* 4, 483–496.
- Allen, B. L., Katz, B., Höök, M. (2002). *Streptococcus anginosus* adheres to vascular endothelium basement membrane and purified extracellular matrix proteins. *Microb Pathog* 32, 191–204.
- Andreasen, A. S., Krabbe, K. S., Krogh-Madsen, R., Taudorf, S., Pedersen, B. K., Møller, K. (2008). Human endotoxemia as a model of systemic inflammation. *Curr Med Chem* 15, 1697–1705.
- Baele, M., Vanrobaeys, M., Vanechoutte, M., De Herdt, P., Devriese, L., Haesebrouck, F. (2000). Genomic fingerprinting of pigeon *Streptococcus gallolyticus* strains of different virulence by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Veterinary Microbiology* 71, 103–111.
- Ballet, M., Gevigney, G., Garé, J., Delahaye, F., Etienne, J., Delahaye, J. (1995). Infective endocarditis due to *Streptococcus bovis* a report of 53 cases. *European Heart Journal* 16, 1975–1980.
- Barnett, J., Ainsworth, H., Boon, J., Twomey, D. (2008). *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* septicaemia in goslings. *The Veterinary Journal* 176, 251–253.
- Bayer, A. S., Sullam, P. M., Ramos, M., Li, C., Cheung, A. L., Yeaman, M. R. (1995). *Staphylococcus aureus* induces platelet aggregation via a fibrinogen-dependent mechanism which is independent of principal platelet glycoprotein IIb/IIIa fibrinogen-binding domains. *Infection and Immunity* 63, 3634–3641.
- Bhat, T. K., Singh, B., Sharma, O. P. (1998). Microbial degradation of tannins-a current perspective. *Biodegradation* 9, 343–357.
- Bi, X., Lin, Q., Foo, T. W., Joshi, S., You, T., Shen, H.-M., Ong, C. N., Cheah, P. Y., Eu, K. W., Hew, C.-L. (2006). Proteomic analysis of colorectal cancer reveals alterations in metabolic pathways mechanism of tumorigenesis. *Molecular & Cellular Proteomics* 5, 1119–1130.
- Biarç, J., Nguyen, I. S., Pini, A., Gossé, F., Richert, S., Thiersé, D., Van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E., Raul, F., Klein, J.-P., Schöller-Guinardm, M. (2004). Carcinogenic properties of proteins with pro-inflammatory activity from *Streptococcus infantarius* (formerly *S. bovis*). *Carcinogenesis* 25, 1477–1484.
- Blaser, M., Hardesty, H., Powers, B., Wang, W. (1980). Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus. *Journal of Clinical Microbiology* 11, 309–313.

- Blom, J., Albaum, S., Doppmeier, D., Pühler, A., Vorhölter, F.-J., Zakrzewski, M., Goesmann, A. (2009). EDGAR: a software framework for the comparative analysis of prokaryotic genomes. *BMC Bioinformatics* 10, 154.
- van den Bogaard, A., Willems, R., London, N., Top, J., Stobberingh, E. (2002). Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49, 497–505.
- Boleij, A., Dutilh, B. E., Kortman, G. A. M., Roelofs, R., Laarakkers, C. M., Engelke, U. F., Tjalsma, H. (2012). Bacterial responses to a simulated colon tumor microenvironment. *Mol Cell Proteomics* 11, 851–862.
- Boleij, A., van Gelder, M. M. H. J., Swinkels, D. W., Tjalsma, H. (2011 a). Clinical importance of *Streptococcus gallolyticus* infection among colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases* 53, 870–878.
- Boleij, A., Muytjens, C. M., Bukhari, S. I., Cayet, N., Glaser, P., Hermans, P. W., Swinkels, D. W., Bolhuis, A., Tjalsma, H. (2011 b). Novel clues on the specific association of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* with colorectal cancer. *Journal of Infectious Diseases* 203, 1101–1109.
- Boleij, A., Schaeps, R. M., Tjalsma, H. (2009). Association between *Streptococcus bovis* and colon cancer. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 516–516.
- Boleij, A., Tjalsma, H. (2013). The itinerary of *Streptococcus gallolyticus* infection in patients with colonic malignant disease. *The Lancet Infectious Diseases*.
- Boltin, D., Goldberg, E., Bugaevsky, O., Kelner, E., Birkenfeld, S., Gingold-Belfer, R., Keller, N., Niv, Y., Dickman, R. (2015). Colonic carriage of *Streptococcus bovis* and colorectal neoplasia: a prospective 17-year longitudinal case-control study. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*.
- Bordes-Benitez, A., Sánchez-Oñoro, M., Suárez-Bordón, P., Garcia-Rojas, A., Saéz-Nieto, J., González-García, A., Álamo-Antúnez, I., Sánchez-Maroto, A., Bolaños-Rivero, M. (2006). Outbreak of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* infections on the island of Gran Canaria associated with the consumption of inadequately pasteurized cheese. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 25, 242–246.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55, 611–622.
- Byappanahalli, M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R., Harwood, V. J. (2012). Enterococci in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76, 685–706.
- Card, R. M., Mafura, M., Hunt, T., Kirchner, M., Weile, J., Rashid, M.-U., Weintraub, A., Nord, C. E., Anjum, M. F. (2015). The impact of ciprofloxacin and clindamycin administration on Gram-negative bacteria isolated from healthy volunteers and characterizing the resistance genes they harbour. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* AAC-00068.
- Carrique-Mas, J., Davies, R. (2008). *Salmonella enteritidis* in commercial layer flocks in Europe: Legislative background, on-farm sampling and main challenges. *Brazilian Journal of Poultry Science* 10, 1–9.
- Chadfield, M. S., Christensen, J. P., Decostere, A., Christensen, H., Bisgaard, M. (2007). Geno- and phenotypic diversity of avian isolates of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*Streptococcus bovis*) and associated diagnostic problems. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 822–827.
- Chamkha, M., Patel, B. K., Traore, A., Garcia, J.-L., Labat, M. (2002). Isolation from a shea cake digester of a tannin-degrading *Streptococcus gallolyticus* strain that decarboxylates protocatechuic and hydroxycinnamic acids, and emendation of the species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 939–944.

- Chirouze, C., Patry, I., Duval, X., Baty, V., Tattevin, P., Aparicio, T., Pagenault, M., Carbonnel, F., Couetdic, G., Hoen, B. (2013). *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex fecal carriage, colorectal carcinoma, and infective endocarditis: a new appraisal of a complex connection. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 1–6.
- Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J., Palucka, A. K. (2000). IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* 1, 510–514.
- Coffey, S., Nadarasa, K., Pan, A., van der Linden, A., Chu, J., Schultz, M. (2012). The increasing incidence of *Streptococcus bovis* endocarditis and bacteraemia: A case series from 1997 to 2010. *International Journal of Cardiology* 161, 111–113.
- Conway, P. L., Gorbach, S. L., Goldin, B. R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J Dairy Sci* 70, 1–12.
- Corredoira, J., Alonso, M. P., Pita, J., Alonso-Mesonero, D. (2008). Association between rural residency, group D streptococcal endocarditis and colon cancer? *Clin Microbiol Infect* 14, 190.
- Corredoira, J., Grau, I., Garcia-Rodriguez, J. F., Alonso-Garcia, P., Garcia-Pais, M., Rabuñal, R., Garcia-Garrote, F., Ardanuy, C., Coira, A., Lopez-Alvarez, M., Palelres, R. (2015). The clinical epidemiology and malignancies associated with *Streptococcus bovis* biotypes in 506 cases of bloodstream infections. *Journal of Infection*.
- Cox, N. A., Stern, N. J., Hiett, K. L., Berrang, M. E. (2002). Identification of a new source of *Campylobacter* contamination in poultry: transmission from breeder hens to broiler chickens. *Avian Diseases* 46, 535–541.
- Cuny, C., Nathaus, R., Layer, F., Strommenger, B., Altmann, D., Witte, W. (2009). Nasal colonization of humans with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 with and without exposure to pigs. *PLoS One* 4, e6800.
- Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T., Dowson, C. G. (2004). Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 5644–5649.
- Danne, C., Dubrac, S., Trieu-Cuot, P., Dramsi, S. (2014). Single cell stochastic regulation of pilus phase variation by an attenuation-like mechanism. *PLoS Pathogens* 10, e1003860.
- Danne, C., Entenza, J.M., Mallet, A., Briandet, R., Débarbouillé, M., Nato, F., Glaser, P., Jouvion, G., Moreillon, P., Trieu-Cuot, P., Dramsi, S. (2011). Molecular characterization of a *Streptococcus gallolyticus* genomic island encoding a pilus involved in endocarditis. *Journal of Infectious Diseases* 204, 1960–1970.
- Danne, C., Guérillot, R., Glaser, P., Trieu-Cuot, P., Dramsi, S. (2013). Construction of isogenic mutants in *Streptococcus gallolyticus* based on the development of new mobilizable vectors. *Research in Microbiology* 164, 973–978.
- Davies, R., Breslin, M. (2003). Observations on *Salmonella* contamination of commercial laying farms before and after cleaning and disinfection. *Veterinary Record* 152, 283–287.
- Devriese, L., Uyttebroek, E., Gevaert, D., Vandekerckhove, P., Ceysens, K. (1990). *Streptococcus bovis* infections in pigeons. *Avian Pathology* 19, 429–434.
- Devriese, L. A., Vandamme, P., Pot, B., Vanrobaeys, M., Kersters, K., Haesebrouck, F. (1998). Differentiation between *Streptococcus gallolyticus* strains of human clinical and veterinary origins and *Streptococcus bovis* strains from the intestinal tracts of ruminants. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 3520–3523.
- Droual, R., Ghazikhanian, G. Y., Shivaprasad, H. L., Barr, B. C., Bland, M. B. (1997). *Streptococcus bovis* infection in turkey poults. *Avian Pathol* 26, 433–439.
- Dumke, J., Hinse, D., Vollmer, T., Knabbe, C., Dreier, J. (2014). Development and application of a multilocus sequence typing Scheme for *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. *Journal of Clinical Microbiology* 52 (7), 2472–2478.

- Dumke, J., Hinse, D., Vollmer, T., Schulz, J., Knabbe, C., Dreier, J. (2015). Potential Transmission Pathways of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. *PLoS ONE* 10(5): e0126507.
- Durack, D., Beeson, P. (1972). Experimental bacterial endocarditis: I. Colonization of a sterile vegetation. *British Journal of Experimental Pathology* 53, 44.
- El-Adawy, H., Hotzel, H., Tomaso, H., Neubauer, H., Hafez, H. (2012). Elucidation of colonization time and prevalence of thermophilic *Campylobacter* species during turkey rearing using multiplex polymerase chain reaction. *Poultry Science* 91, 454–459.
- Ellmerich, S., Schöller, M., Duranton, B., Gossé, F., Galluser, M., Klein, J.-P., Raul, F. (2000). Promotion of intestinal carcinogenesis by *Streptococcus bovis*. *Carcinogenesis* 21, 753–756.
- Endtz, H., Giesendorf, B., Van Belkum, A., Lauwers, S., Jansen, W., Quint, W. (1993). PCR-mediated DNA typing of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with recurrent infections. *Research in Microbiology* 144, 703–708.
- Enright, M.C., Spratt, B. G., Kalia, A., Cross, J.H., Bessen, D.E. (2001). Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between *emm* type and clone. *Infection and Immunity* 69, 2416–2427.
- Euzeby, J. (2006). List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 1–6.
- Evans, D., Pye, G., Bramley, R., Clark, A., Dyson, T., Hardcastle, J. (1988). Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut* 29, 1035–1041.
- Facklam, R. (2002). What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* 15, 613–630.
- Facklam, R. R. (1972). Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests. *Appl Microbiol* 23, 1131–1139.
- Fallingborg, J. (1999). Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Danish Medical Bulletin* 46, 183–196.
- Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P., Spratt, B. G. (2004). eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology* 186, 1518–1530.
- Fine, D. (1975). Pneumococcal type-associated variability in alternate complement pathway activation. *Infection and Immunity* 12, 772–778.
- Fisher, K., Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of enterococcus. *Microbiology* 155, 1749–1757.
- Fitzgerald, J. R., Foster, T. J., Cox, D. (2006). The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Microbiol* 4, 445–457.
- Fong, T.-T., Mansfield, L. S., Wilson, D.L., Schwab, D.J., Molloy, S. L., Rose, J.B. (2007). Massive microbiological groundwater contamination associated with a waterborne outbreak in Lake Erie, South Bass Island, Ohio. *Environmental Health Perspectives* 856–864.
- Forte, W. C. N., Mario, A. C., Costa, A. da, Henriques, L. S., Gonzales, C. L., Franken, R. A. (2001). Immunologic evaluation in infective endocarditis. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 76, 48–52.
- Fortin, M., Messier, S., Paré, J., Higgins, R. (2003). Identification of catalase-negative, non-beta-hemolytic, gram-positive cocci isolated from milk samples. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 106–109.
- Fowler, V. G., McIntyre, L. M., Yeaman, M. R., Peterson, G. E., Reller, L. B., Corey, G. R., Wray, D., Bayer, A. S. (2000). *In vitro* resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein in isolates of *Staphylococcus aureus* from endocarditis patients correlates with an intravascular device source. *Journal of Infectious Diseases* 182, 1251–1254.

- Francisco, A. P., Bugalho, M., Ramirez, M., Carriço, J. A. (2009). Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics* 10, 152.
- Francois, B., Gissot, V., Ploy, M., Vignon, P. (1998). Recurrent septic shock due to *Streptococcus suis*. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 2395–2395.
- Garben, N. (2015). Grundlagen der Phagozytose von *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Masterarbeit Universität Bielefeld.
- Garcia-Graells, C., Valckx, C., Michiels, C. W. (2000). Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in milk by combined treatment with high hydrostatic pressure and the lactoperoxidase system. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4173–4179.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg.
- Garvie, E. I., Bramley, A. (1979). *Streptococcus bovis*—an approach to its classification and its importance as a cause of bovine mastitis. *Journal of Applied Microbiology* 46, 557–566.
- Geng, J., Song, Q., Tang, X., Liang, X., Fan, H., Peng, H., Guo, Q., Zhang, Z. (2014). Co-occurrence of driver and passenger bacteria in human colorectal cancer. *Gut Pathogens* 6, 26.
- Giannella, R., Broitman, S., Zamcheck, N. (1972). Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: studies *in vivo* and *in vitro*. *Gut* 13, 251–256.
- Giannitsioti, E., Chirouze, C., Bouvet, A., Béguinot, I., Delahaye, F., Mainardi, J.-L., Celard, M., Mihaila-Amrouche, L., Moing, V., Hoen, B. (2007). Characteristics and regional variations of group D streptococcal endocarditis in France. *Clinical Microbiology and Infection* 13, 770–776.
- van de Giessen, A., Bouwknegt, M., Dam-Deisz, W., Van Pelt, W., Wannet, W., Visser, G. (2006). Surveillance of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in poultry production flocks in the Netherlands. *Epidemiology and Infection* 134, 1266–1275.
- Goel, G., Kumar, A., Beniwal, V., Raghav, M., Puniya, A. K., Singh, K. (2011). Degradation of tannic acid and purification and characterization of tannase from *Enterococcus faecalis*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, 1061–1065.
- Gold, J. S., Bayar, S., Salem, R. R. (2004). Association of *Streptococcus bovis* bacteremia with colonic neoplasia and extracolonic malignancy. *Archives of Surgery* 139, 760–765.
- Gonzalez-Quintela, A., Martínez-Rey, C., Castroagudín, J., Rajo-Iglesias, M., Domínguez-Santalla, M. (2001). Prevalence of liver disease in patients with *Streptococcus bovis* bacteraemia. *Journal of Infection* 42, 116–119.
- Grace, D., Mutua, F., Ochungo, P., Kruska, R., Jones, K., Brierley, L., Lapar, L., Said, M., Herrero, M., Phuc, P. M., Thao, N. B., Akuku, I., Ogutu, F. (2012). Mapping of poverty and likely zoonoses hotspots.
- Grant, R. J., Whitehead, T. R., Orr, J. E. (2000). *Streptococcus bovis* meningitis in an infant. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 462–463.
- Gupta, A., Madani, R., Mukhtar, H. (2010). *Streptococcus bovis* endocarditis, a silent sign for colonic tumour. *Colorectal Disease* 12, 164–171.
- Haas, A. (2002). Wenn Fresszellen Verdauungsstörungen haben-ungewöhnliche Phagosomenbiogenese in Makrophagen. *Biospektrum-Heidelberg* 8, 243–247.
- Habib, G., Hoen, B., Tornos, P., Thuny, F., Prendergast, B., Vilacosta, I., Moreillon, P., de Jesus Antunes, M., Thilen, U., Lekakis, J., Lengyel, M., Müller, L., Naber, C. K., Nihoyannopoulos, P., Moritz, A., Zamorano, J. L. (2009). Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009). *European Heart Journal* 30, 2369–2413.

- Hammerschmidt, S., Wolff, S., Hocke, A., Rosseau, S., Müller, E., Rohde, M. (2005). Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infection and Immunity* 73, 4653–4667.
- Headings, D. L., Herrera, A., Mazzi, E., Bergman, M. A. (1978). Fulminant neonatal septicemia caused by *Streptococcus bovis*. *The Journal of Pediatrics* 92, 282–283.
- Hensler, M. E. (2011). *Streptococcus gallolyticus*, infective endocarditis, and colon carcinoma: new light on an intriguing coincidence. *Journal of Infectious Diseases* 203, 1040–1042.
- de Herdt, P., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., de Groote, B., Devriese, L. (1994). *Streptococcus bovis* infections in pigeons: virulence of different serotypes. *Veterinary Microbiology* 41, 321–332.
- Herzberg, M., MacFarlane, G., Gong, K., Armstrong, N., Witt, A., Erickson, P., Meyer, M. (1992). The platelet interactivity phenotype of *Streptococcus sanguis* influences the course of experimental endocarditis. *Infection and Immunity* 60, 4809–4818.
- Hinse, D. (2012). Molekulargenetische Charakterisierung von *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*: vergleichende Genomanalyse und Evaluation von Stammtypisierungsmethoden. Dissertation Universität Bielefeld.
- Hinse, D., Vollmer, T., Rückert, C., Blom, J., Kalinowski, J., Knabbe, C., Dreier, J. (2011). Complete genome and comparative analysis of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, an emerging pathogen of infective endocarditis. *BMC Genomics* 12, 400.
- Hirayama, A., Kami, K., Sugimoto, M., Sugawara, M., Toki, N., Onozuka, H., Kinoshita, T., Saito, N., Ochiai, A., Tomita, M., Esumi, H., Soga, T. (2009). Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Research* 69, 4918–4925.
- Hirota, K., Kanitani, H., Nemoto, K., Ono, T., Miyake, Y. (1995). Cross-reactivity between human sialyl Lewis<sup>x</sup> oligosaccharide and common causative oral bacteria of infective endocarditis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 12, 159–164.
- Hoën, B., Alla, F., Selton-Suty, C., Béguinot, I., Bouvet, A., Briançon, S., Casalta, J.-P., Danchin, N., Delahaye, F., Etienne, J., le Moing, V., Leport, C., Mainardi, J.-L., Ruimy, R., Vandenesch, F. (2002). Changing profile of infective endocarditis: results of a 1-year survey in France. *Jama* 288, 75–81.
- Hoën, B., Chirouze, C., Cabell, C. H., Selton-Suty, C., Duchene, F., Olaison, L., Miro, J., Habib, G., Abrutyn, E., Eykyn, S., Bernard, Y., Marco, F., Corey, G. R. (2005). Emergence of endocarditis due to group D streptococci: findings derived from the merged database of the International Collaboration on Endocarditis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 24, 12–16.
- Hogg, R., Pearson, A. (2009). *Streptococcus gallolyticus* subspecies *gallolyticus* infection in ducklings. *Veterinary Record* 165, 297–298.
- Holland, J., Louie, L., Simor, A., Louie, M. (2000). PCR detection of *Escherichia coli* O157: H7 directly from stools: evaluation of commercial extraction methods for purifying fecal DNA. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 4108–4113.
- Hutchison, M. L., Walters, L. D., Avery, S. M., Syngé, B. A., Moore, A. (2004). Levels of zoonotic agents in British livestock manures. *Lett Appl Microbiol* 39, 207–214.
- Jans, C., Meile, L., Lacroix, C., Stevens, M. J. (2014). Genomics, evolution, and molecular epidemiology of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex (SBSEC). *Infection, Genetics and Evolution*.
- Al-Jashamy, K., Murad, A., Zeehaida, M., Rohaini, M., Hasnan, J. (2010). Prevalence of colorectal cancer associated with *Streptococcus bovis* among inflammatory bowel and chronic gastrointestinal tract disease patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 11, 1765–1768.
- Jiménez, N., Barcenilla, J. M., de Felipe, F. L., de las Rivas, B., Muñoz, R. (2014). Characterization of a bacterial tannase from *Streptococcus gallolyticus* UCN34 suitable for tannin biodegradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1–9.

- Jolley, K. A., Feil, E., Chan, M.-S., Maiden, M. C. J. (2001). Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics* 17, 1230–1231.
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990–993.
- Jones, N., Bohnsack, J. F., Takahashi, S., Oliver, K. A., Chan, M.-S., Kunst, F., Glaser, P., Rusniok, C., Crook, D.W., Harding, R.M., Bisharat, N., Spratt, B. G. (2003). multilocus sequence typing system for group B *Streptococcus*. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 2530–2536.
- Kalupahana, R., Kottawatta, K., Kanankege, K., van Bergen, M., Abeynayake, P., Wagenaar, J. (2013). Colonization of *Campylobacter* spp. in broiler chickens and laying hens reared in tropical climates with low-biosecurity housing. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 393–395.
- Kang, M., Ko, Y.-P., Liang, X., Ross, C. L., Liu, Q., Murray, B.E., Höök, M. (2013). Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of Gram-positive bacteria inhibit complement activation via the classical pathway. *Journal of Biological Chemistry* 288, 20520–20531.
- Kargman, S. L., O'Neill, G. P., Vickers, P. J., Evans, J. F., Mancini, J. A., Jothy, S. (1995). Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Research* 55, 2556–2559.
- King, S. J., Heath, P. J., Luque, I., Tarradas, C., Dowson, C. G., Whatmore, A.M. (2001). Distribution and genetic diversity of suilysin in *Streptococcus suis* isolated from different diseases of pigs and characterization of the genetic basis of suilysin absence. *Infection and Immunity* 69, 7572–7582.
- King, S. J., Leigh, J. A., Heath, P. J., Luque, I., Tarradas, C., Dowson, C. G., Whatmore, A.M. (2002). Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 3671–3680.
- Klein, M., Wang, A. (2014). Infective Endocarditis. *Journal of Intensive Care Medicine*.
- Klein, R.S., Catalano, M.T., Edberg, S.C., Casey, J.I., Steigbigel, N.H. (1979). *Streptococcus bovis* septicemia and carcinoma of the colon. *Annals of Internal Medicine* 91, 560–562.
- Klein, R. S., Recco, R. A., Catalano, M. T., Edberg, S. C., Casey, J. I., Steigbigel, N. H. (1977). Association of *Streptococcus bovis* with carcinoma of the colon. *New England Journal of Medicine* 297, 800–802.
- Kleinbaum, D.G., Klein, M. (2010). Analysis of Matched data using logistic regression. *Springer*.
- Klug, S. J., Bender, R., Blettner, M., Lange, S. (2004). Wichtige epidemiologische Studientypen. *Dtsch Med Wochenschr* 129, T7–T11.
- Kolenbrander, P. E., London, J. (1993). Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *Journal of Bacteriology* 175, 3247.
- Koo, S.-P., Bayer, A. S., Kagan, B. L., Yeaman, M. R. (1999). Membrane permeabilization by thrombin-induced platelet microbicidal protein 1 is modulated by transmembrane voltage polarity and magnitude. *Infection and Immunity* 67, 2475–2481.
- Krishnan, S., Eslick, G. (2014). *Streptococcus bovis* infection and colorectal neoplasia: a meta-analysis. *Colorectal Disease*.
- Kupferwasser, I., Darius, H., Müller, A., Mohr-Kahaly, S., Westermeier, T., Oelert, H., Erbel, R., Meyer, J. (1998). Clinical and morphological characteristics in *Streptococcus bovis* endocarditis: a comparison with other causative microorganisms in 177 cases. *Heart* 80, 276–280.

- Kutyavin, I. V., Afonina, I. A., Mills, A., Gorn, V. V., Lukhtanov, E. A., Belousov, E. S., Singer, M. J., Walburger, D. K., Lokhov, S. G., Gall, A. A., Dempcy, R., Reed, M. W., Meyer, R. B. and Hedgpeth, J. (2000). 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research* 28, 655–661.
- Köck, R., Schaumburg, F., Mellmann, A., Köksal, M., Jurke, A., Becker, K., Friedrich, A. W. (2013). Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as causes of human infection and colonization in Germany. *PLoS One* 8, e55040.
- Leport, C., Bure, A., Leport, J., Vilde, J. (1987). Incidence of colonic lesions in *Streptococcus bovis* and enterococcal endocarditis. *The Lancet* 329, 748.
- Li, M., Gu, C., Zhang, W., Li, S., Liu, J., Qin, C., Su, J., Cheng, G., Hu, X. (2012). Isolation and characterization of *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* causing meningitis in ducklings. *Veterinary Microbiology*.
- Lichstein, H. C., Snyder, M. L. (1941). The inhibition of the spreading growth of *Proteus* and other bacteria to permit the isolation of associated streptococci. *Journal of Bacteriology* 42, 653.
- Lin, I.-H., Liu, T.-T., Teng, Y.-T., Wu, H.-L., Liu, Y.-M., Wu, K.-M., Chang, C.-H., Hsu, M.-T. (2011). Sequencing and comparative genome analysis of two pathogenic *Streptococcus gallolyticus* subspecies: genome plasticity, adaptation and virulence. *PloS One* 6, e20519.
- Lopes, P. G. M., Cantarelli, V. V., Agnes, G., Costabeber, A. M., d' Azevedo, P. A. (2014). Novel real-time PCR assays using TaqMan minor groove binder probes for identification of fecal carriage of *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex from rectal swab specimens. *Journal of Clinical-Microbiology* 52, 974–976.
- Lun, Z.-R., Wang, Q.-P., Chen, X.-G., Li, A.-X., Zhu, X.-Q. (2007). *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *The Lancet Infectious Diseases* 7, 201–209.
- MacNeal, W. J., Blevins, A. (1945). Bacteriological studies in endocarditis. *Journal of Bacteriology* 49, 603.
- Maiden, M. C. (2006). Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* 60, 561–588.
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M., Spratt, G. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 3140–3145.
- Malhotra, A., Rayner, J., Williams, T. M., Prendergast, B. (2014). Infective endocarditis: therapeutic options and indications for surgery. *Current Cardiology Reports* 16, 1–6.
- Marques, M. B., Kasper, D., Pangburn, M., Wessels, M. (1992). Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. *Infection and Immunity* 60, 3986–3993.
- Martins, M., Aymeric, L., du Merle, L., Danne, C., Robe-Masselot, C., Trieu-Cuot, P., Sansonetti, P., Dramsi, S. (2015). *Streptococcus gallolyticus* Pil3 pilus is required for adhesion to colonic mucus and for colonization of mouse distal colon. *Journal of Infectious Diseases* jiv307.
- Mater, D. D., Bretigny, L., Firmesse, O., Flores, M.-J., Mogenet, A., Bresson, J.-L., Corthier, G. (2005). *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. *FEMS Microbiology Letters* 250, 185–187.
- McAuley, C. M., Britz, M. L., Gobius, K. S., Craven, H. M. (2015). Prevalence, seasonality, and growth of enterococci in raw and pasteurized milk in Victoria, Australia. *Journal of Dairy Science*.

- McCoy, W., Mason 3rd, J. (1951). Enterococcal endocarditis associated with carcinoma of the sigmoid; report of a case. *Journal of the Medical Association of the State of Alabama* 21, 162.
- McDonald, J. R. (2009). Acute infective endocarditis. *Infectious Disease Clinics of North America* 23, 643–664.
- Milchverordnung (1993). Milchverordnung- Verordnung über Hygiene- und Qualitätsanforderungen an Milch.
- Millner, P. D. (2009). Bioaerosols associated with animal production operations. *Bioresource Technology* 100, 5379–5385.
- Müller, W., Wieser, P. (1987). Dust and microbial emissions from animal production. *World Animal Science (Netherlands)*.
- Naber, C.K. (2004). S2-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der infektiösen Endokarditis. *Zeitschrift Für Kardiologie* 93, 1005–1021.
- Neely, A. N., Maley, M. P. (2000). Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabrics and plastic. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 724–726.
- Nethercott, C., Mabbett, A. N., Totsika, M., Peters, P., Ortiz, J. C., Nimmo, G. R., Coombs, G. W., Walker, M. J., Schembri, M. A. (2013). Molecular characterization of endocarditis-associated *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 51, 2131–2138.
- Newell, D., Fearnley, C. (2003). Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 4343–4351.
- Niven Jr, C., Washburn, M.R., White, J. (1948). Nutrition of *Streptococcus bovis*. *Journal of Bacteriology* 55, 601.
- O'donovan, L., Brooker, J. D. (2001). Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. *Microbiology* 147, 1025–1033.
- Onoyama, S., Ogata, R., Wada, A., Saito, M., Okada, K., Harada, T. (2009). Neonatal bacterial meningitis caused by *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus*. *Journal of Medical Microbiology* 58, 1252–1254.
- Osawa, R., Fujisawa, T., Sly, L. I. (1995). *Streptococcus gallolyticus* sp. nov.; gallate degrading organisms formerly assigned to *Streptococcus bovis*. *Systematic and Applied Microbiology* 18, 74–78.
- Osawa, R., Mitsuoka, T. (1990). Selective medium for enumeration of tannin-protein complex-degrading *Streptococcus* spp. in feces of koalas. *Appl Environ Microbiol* 56, 3609–3611.
- Parker, M., Ball, L. C. (1976). Streptococci and aerococci associated with systemic infection in man. *Journal of Medical Microbiology* 9, 275–302.
- Parsonnet, J. (1995). Bacterial infection as a cause of cancer. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 8, 263–268.
- Patti, J. M., Allen, B. L., McGavin, M. J., Hook, M. (1994). MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annual Reviews in Microbiology* 48, 585–617.
- Pearce, N. (1996). Traditional epidemiology, modern epidemiology, and public health. *Am J Public Health* 86, 678–683.
- 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 superoxide dismutase. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 41–47.
- Prattes, J., Zollner-Schwetz, I. (2015). Infektiöse Endokarditis-Epidemiologie, Diagnostik und Therapie. *Wiener Klinische Wochenschrift Education* 10, 45–59.
- Randazzo, C. L., Vaughan, E. E., Caggia, C. (2006). Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR-DGGE analyses. *International Journal of Food Microbiology* 109, 1–8.

- Rashid, M.-U., Zaura, E., Buijs, M. J., Keijser, B. J., Crielaard, W., Nord, C. E., Weintraub, A. (2015). Determining the long-term effect of antibiotic administration on the human normal intestinal microbiota using culture and pyrosequencing methods. *Clinical Infectious Diseases* 60, S77–S84.
- Reverón, I., Rodríguez, H., Campos, G., Curiel, J. A., Ascaso, C., Carrascosa, A. V., Prieto, A., de Las Rivas, B., Muñoz, R., de Felipe, F. L. (2013). Tannic acid-dependent modulation of selected *Lactobacillus plantarum* traits linked to gastrointestinal survival. *PLoS ONE* 8, e66473.
- Righi, V., Durante, C., Cocchi, M., Calabrese, C., Di Febo, G., Lecce, F., Pisi, A., Tugnoli, V., Mucci, A., Schenetti, L. (2009). Discrimination of healthy and neoplastic human colon tissues by ex vivo HR-MAS NMR spectroscopy and chemometric analyses. *Journal of Proteome Research* 8, 1859–1869.
- Romero, B., Morosini, M.-I., Loza, E., Rodríguez-Baños, M., Navas, E., Cantón, R., del Campo, R. (2011). Reidentification of *Streptococcus bovis* isolates causing bacteremia according to the new taxonomy criteria: still an issue? *Journal of Clinical Microbiology* 49, 3228–3233.
- Romero-Hernández, B., Tedim, A. P., Sánchez-Herrero, J. F., Librado, P., Rozas, J., Muñoz, G., Baquero, F., Cantón, R., del Campo, R. (2015). *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* from human and animal origins: genetic diversity, antimicrobial susceptibility, and characterization of a vancomycin-resistant calf isolate carrying a *vanA-Tn1546*-like element. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59, 2006–2015.
- Ruiz-Garbajosa, P., Bonten, M. J., Robinson, D. A., Top, J., Nallapareddy, S. R., Torres, C., Coque, T. M., Cantón, R., Baquero, F., Murray, B. E., Campo, R. del, Willems, R. J. (2006). Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 2220–2228.
- Rusniok, C., Couvé, E., Da Cunha, V., El Gana, R., Zidane, N., Bouchier, C., Poyart, C., Leclercq, R., Trieu-Cuot, P., Glaser, P. (2010). Genome sequence of *Streptococcus gallolyticus*: insights into its adaptation to the bovine rumen and its ability to cause endocarditis. *Journal of Bacteriology* 192, 2266–2276.
- Sasaki, E., Osawa, R., Nishitani, Y., Whiley, R. A. (2004). ARDRA and RAPD analyses of human and animal isolates of *Streptococcus gallolyticus*. *Journal of Veterinary Medical Science* 66, 1467–1470.
- Schlegel, L., Grimont, F., Ageron, E., Grimont, P. A., Bouvet, A. (2003). Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 631–645.
- Schlegel, L., Grimont, F., Collins, M. D., Regnault, B., Grimont, P., Bouvet, A. (2000). *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1425–1434.
- Schlundt, J., Toyofuku, H., Jansen, J., Herbst, S. A. (2004). Emerging food-borne zoonoses. *Rev - Off Int Epizoot* 23, 513–533.
- Schulz, J., Dumke, J., Hinse, D., Dreier, J., Christin, H., Nicole, K. (2015). Organic Turkey Flocks: A Reservoir of *Streptococcus gallolyticus* subspecies *gallolyticus*. *PLoS One*. (accepted for publication)
- Schulz, J., Hinse, D., Dumke, J., Jens, D., Habich, C., Hartung, J. (2013). Isolation and detection of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* from organic turkey flocks. (Nanjing, China: 16th International Congress on Animal Hygiene (ISAH)).

- Schulz, J., Van Hoorebeke, S., Hald, B., Hartung, J., Van Immerseel, F., Radtke, I., Kabell, S., Dewulf, J. (2011). The dynamics of *Salmonella* occurrence in commercial laying hen flocks throughout a laying period. *Avian Pathology* 40, 243–248.
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews* 90, 859–904.
- Sekizaki, T., Nishiya, H., Nakajima, S., Nishizono, M., Kawano, M., Okura, M., Takamatsu, D., Nishino, H., Ishiji, T., Osawa, R. (2008). Endocarditis in chickens caused by subclinical infection of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. *Avian Diseases* 52, 183–186.
- Shah, S.S., Matthews, R. P., Cohen, C. (2001). Group C streptococcal meningitis: case report and review of the literature. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 20, 445–448.
- Shibata, Y., Nomoto, R., Osawa, R. (2014). Development of a multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus gallolyticus*. *Microbiology* 160, 113–122.
- Shun, C.-T., Lu, S.-Y., Yeh, C.-Y., Chiang, C.-P., Chia, J.-S., Chen, J.-Y. (2005). Glucosyltransferases of viridans streptococci are modulins of interleukin-6 induction in infective endocarditis. *Infection and Immunity* 73, 3261–3270.
- Sillanpää, J., Nallapareddy, S. R., Qin, X., Singh, K. V., Muzny, D. M., Kovar, C. L., Nazareth, L. V., Gibbs, R. A., Ferraro, M. J., Steckelberg, J. M. (2009). A collagen-binding adhesin, Acb, and ten other putative MSCRAMM and pilus family proteins of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*Streptococcus bovis* group, biotype I). *Journal of Bacteriology* 191, 6643–6653.
- Sillanpää, J., Nallapareddy, S. R., Singh, K. V., Ferraro, M. J., Murray, B. E. (2008). Adherence characteristics of endocarditis-derived *Streptococcus gallolyticus* ssp. *gallolyticus* (*Streptococcus bovis* biotype I) isolates to host extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiology Letters* 289, 104–109.
- Smith, J. M., Smith, N. H., O'Rourke, M., Spratt, B. G. (1993). How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 4384–4388.
- Soler, A. P., Miller, R. D., Laughlin, K. V., Carp, N. Z., Klurfeld, D. M., Mullin, J.M. (1999). Increased tight junctional permeability is associated with the development of colon cancer. *Carcinogenesis* 20, 1425–1432.
- Spickler, A. R. (2005). *Streptococcus*.
- Sturt, A. S., Yang, L., Sandhu, K., Pei, Z., Cassai, N., Blaser, M. J. (2010). *Streptococcus gallolyticus* subspecies *pasteurianus* (biotype II/2), a newly reported cause of adult meningitis. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 2247–2249.
- Takeuchi, O., Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805–820.
- Talay, S. R. (2005). Gram—Positive Adhesins.
- Taylor, L. H., Latham, S. M., Mark, E. (2001). Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 356, 983–989.
- Teixeira, A. S., Monteiro, P. T., Carriço, J. A., Ramirez, M., Francisco, A. P. (2015). Not seeing the forest for the trees: size of the minimum spanning trees (MSTs) forest and branch significance in MST-based phylogenetic analysis. *PLoS One* 10, e0119315.
- Tjalsma, H., Boleij, A., Marchesi, J. R., Dutilh, B. E. (2012). A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol* 10, 575–582.
- Tomaso, H., Scholz, H. C., Al Dahouk, S., Pitt, T. L., Treu, T. M., Neubauer, H. (2004). Development of 5' nuclease real-time PCR assays for the rapid identification of the *Burkholderia mallei*/*Burkholderia pseudomallei* complex. *Diagnostic Molecular Pathology* 13, 247–253.

- Tripodi, M. F., Adinolfi, L. E., Ragone, E., Durante Mangoni, E., Fortunato, R., Iarussi, D., Ruggiero, G., Utili, R. (2004). *Streptococcus bovis* endocarditis and its association with chronic liver disease: an underestimated risk factor. *Clin Infect Dis* 38, 1394–1400.
- Tristan, A., Rasigade, J.-P., Ruizendaal, E., Laurent, F., Bes, M., Meugnier, H., Lina, G., Etienne, J., Celard, M., Tattevin, P., Monecke, S., le Monecke, V., Vandenesch, F. (2012). Rise of CC398 lineage of *Staphylococcus aureus* among infective endocarditis isolates revealed by two consecutive population-based studies in France.
- Tsakalidou, E., Zoidou, E., Pot, B., Wassill, L., Ludwig, W., Devriese, L., Kalantzopoulos, G., Schleifer, K., Kersters, K. (1998). Identification of streptococci from Greek Kasserli cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 519–527.
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B.A., Affourtit, J.P., Egholm, M., Henrissat, Heath, A. C., Knight, R., Gordon, J. I. (2008). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457, 480–484.
- Urwin, R., Maiden, M. C. (2003). Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends in Microbiology* 11, 479–487.
- Vanrobaeys, M., de Herdt, P., Charlier, G., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. (1999). Ultrastructure of surface components of *Streptococcus gallolyticus* (*S. bovis*) strains of differing virulence isolated from pigeons. *Microbiology* 145, 335–342.
- Vollmer, T., Hinse, D., Kleesiek, K., Dreier, J. (2010 a). Interactions between endocarditis-derived *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* isolates and human endothelial cells. *BMC Microbiology* 10, 78.
- Vollmer, T., Kleesiek, K., Dreier, J. (2009). Lipopolysaccharide-binding protein (LBP) gene polymorphisms: rapid genotyping by real-time PCR and association with infective endocarditis. *Clinical Biochemistry* 42, 1413–1419.
- Vollmer, T., Piper, C., Horstkotte, D., Körfer, R., Kleesiek, K., Dreier, J. (2010 b). 23S rDNA real-time polymerase chain reaction of heart valves: a decisive tool in the diagnosis of infective endocarditis. *European Heart Journal* 31, 1105–1113.
- de Vuyst, L., Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 23, 153–177.
- W. Ludwig, Schleifer, K.-H., Whitman, W. B. (2009). *Order II. Lactobacillales ord. nov.. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes.* (Springer-Verlag).
- Wales, A., Breslin, M., Carter, B., Sayers, R., Davies, R. (2007). A longitudinal study of environmental *Salmonella* contamination in caged and free-range layer flocks. *Avian Pathology* 36, 187–197.
- Watts, J. L. (1988). Characterization and identification of streptococci isolated from bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science* 71, 1616–1624.
- Weinstock, M. (2014). Inflammation, Pathogen-Zell-Interaktion und Stamm-Charakterisierung von *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* als Erreger der infektiösen Endokarditis. Dissertation Universität Bielefeld.
- Werdan, K., Dietz, S., Löffler, B., Niemann, S., Bushnaq, H., Silber, R.-E., Peters, G., Müller-Werdan, U. (2013). Mechanisms of infective endocarditis: pathogen-host interaction and risk states. *Nature Reviews Cardiology*.
- Willems, R. J., Top, J., van den Braak, N., van Belkum, A., Mevius, D. J., Hendriks, G., van Santen-Verheuevel, M., van Embden, J. D. (1999). Molecular diversity and evolutionary relationships of *Tn1546*-like elements in enterococci from humans and animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 483–491.
- Woodford, N., Adebisi, A. M., Palepou, M. F., Cookson, B. D. (1998). Diversity of VanA glycopeptide resistance elements in enterococci from humans and nonhuman sources. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 502–508.

- Woolhouse, M. E., Gowtage-Sequeria, S. (2006). Host range and emerging and reemerging pathogens. In *Ending the War Metaphor:: The Changing Agenda for Unraveling the Host-Microbe Relationship-Workshop Summary*.
- Yantiss, R. K., Goldman, H., Odze, R. D. (2001). Hyperplastic polyp with epithelial misplacement (inverted hyperplastic polyp): a clinicopathologic and immunohistochemical study of 19 cases. *Modern Pathology* 14, 869–875.
- Ye, C., Bai, X., Zhang, J., Jing, H., Zheng, H., Du, H., Cui, Z., Zhang, S., Jin, D., Xu, Y., Xiong, Y., Zhao, A., Luo, X., and Sun, Q., Gottschalk, M., Xu, J. (2008). *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China. *Emerging Infectious Diseases* 12, 1203.
- Yeaman, M. R., Tang, Y. Q., Shen, A. J., Bayer, A. S., Selsted, M. E. (1997). Purification and *in vitro* activities of rabbit platelet microbicidal proteins. *Infect Immun* 65, 1023–1031.
- Yun, Z., Lewensohn-Fuchs, I., Ljungman, P., Vahlne, A. (2000). Real-Time monitoring of Cytomegalovirus infections after stem cell transplantation using the TaqMan polymerase chain reaction assay. *Transplantation* 69, 1733–1736.
- Zarkin, B. A., Lillemo, K. D., Cameron, J. L., Effron, P. N., Magnuson, T. H., Pitt, H. A. (1990). The triad of *Streptococcus bovis* bacteremia, colonic pathology, and liver disease. *Annals of Surgery* 211, 786.

## 9 Publikationen und Kongressbeiträge

### Publikationen

- **Development and Application of a Multilocus Sequence Typing Scheme for *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*.** J. Dumke, D. Hinse, T. Vollmer, C. Knabbe, J. Dreier. *Journal of Clinical Microbiology*, July 2014 Vol. 52 No. 7 2472-2478, Epub April 2014
- **Potential Transmission Pathways of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*.** J. Dumke, D. Hinse, T. Vollmer, J. Schulz, C. Knabbe, J. Dreier (2015). *PLoS One* 10(5) May 15, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0126507
- **Organic Turkey Flocks: A Reservoir of *Streptococcus gallolyticus* subspecies *gallolyticus*.** J. Schulz, J. Dumke, D. Hinse, J. Dreier, C. Habig, N. Kemper (2015). (Manuskript angenommen zur Publikation; (*PLoS One*))

### Tagungsbeiträge

- **Molecular and microbial tools for the risk assessment for the zoonotic potential of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*.** D. Hinse, J. Dumke, J. Schulz and J. Dreier (2012), National Symposium on Zoonose Research, 11.-12.10.2012, Berlin, Germany. *Abstract-Sammlung*
- **Molecular genetic characterization of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* isolates from infectious endocarditis patients compared to animal isolates.** D. Hinse, T. Vollmer, J. Dumke, M. Weinstock, C. Knabbe and J. Dreier (2012). 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 30.09.-3.10.2012, Hamburg, Germany. *Int. J. Med. Microbiol.* 302 (S1): MPP31.
- **Isolation and Detection of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* from organic Turkey Flocks.** J. Schulz, D. Hinse, Dennis, J. Dumke, J. Dreier, C. Habich and J. Hartung (2013). *16th International Congress on Animal Hygiene (ISAH)*, 05.-9.05.2013, China. *Abstract-Sammlung*
- **Multi-Locus-Sequence-Typing (MLST) and DNA-fingerprinting for the risk assessment of the zoonotic potential of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*.** J. Dumke, D. Hinse, J. Dreier and C. Knabbe (2013). 65. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 22.-25.09.2013, Rostock, Germany. *Int. J. Med. Microbiol.* 303 (suppl 1): 115 (Z0V02).
- **Tenacity of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* as a potential zoonotic pathogen.** J. Dumke, F. Wandrer, D. Hinse, C. Knabbe and J. Dreier (2013). 65. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 22.-25.09.2013, Rostock, Germany. *Int. J. Med. Microbiol.* 303 (suppl 1): 106. ( ZOP05).

- **Multilocus Sequence Typing (MLST) for the identification of transmission routes of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*.** J. Dumke, D. Hinse, C. Knabbe, and J. Dreier (2014). 66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 05.-08.10.2015, Dresden, Germany. Biospektrum, Sonderausgabe 2014: 159 (ZOV02)
- ***Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* infections: An unknown Zoonosis?** J. Dumke, D. Hinse, T. Vollmer, C. Knabbe and J. Dreier (2014). FoRUM 01.10.2014, Bochum, Germany

## 10 Anhang

### 10.1 Fall-Kontrollstudie

#### 10.1.1 Fragebogen der Beobachtungsstudie

Fragebogen zu *Streptococcus gallolyticus*

Laufende Nr:
--------------

### Zu Ihrer Person

1. Alter   in Jahren
2. Geschlecht  männlich  weiblich
3. Sind Sie in Deutschland geboren?  
 Ja  Nein, sondern in: .....
4. Wie viele Personen leben in Ihrem Haushalt? .....
5. Haben Sie Kinder  
 Nein  Ja, Anzahl und Alter der Kinder: .....
6. Leben Sie überwiegend in Deutschland?  
 Ja, ersten drei Ziffern der Postleitzahl d. Wohnorts     
 Nein, sondern in: .....
7. Reisen sie häufig ins Ausland?  
 Ja  Nein  
 Falls ja, wie viele Wochen pro Jahr halten sie sich im Ausland auf? .....
8. Beschreiben Sie Ihren Wohnort. Handelt es sich um.....  
 Ländliches Gebiet (bis 10.000 Einwohner)  Kleinstadt (10.000 – 100.000 Einwohner)  
 Großstadt (mehr als 100.000 Einwohner)  Stadtrand einer Kleinstadt  
 Stadtrand einer Großstadt

9. Ist bei Ihnen eine der folgenden Erkrankungen/Leiden bekannt?		Kommentar (Welche?, Seit wann?, Therapie?)
Magen-Darm Erkrankung (Magengeschwür, Lactose-Intoleranz, Gluten-Unverträglichkeit, Polypen im Darm, ect.)	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> k.A. Falls ja, bitte Angaben zur diätischen Therapie unter <b>Frage 12.</b>	
Allergien	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> k.A.	

Fragebogen zu *Streptococcus galloyticus*

Laufende Nr:

10. Haben Sie in den letzten 2 Monaten regelmäßig Medikamente eingenommen (verschreibungspflichtig und nicht-verschreibungspflichtig, sowie Nahrungsergänzungsmittel oder Mittel zur Neutralisierung der Magensäure, etc.)?

Ja  Nein  k.A.

Falls ja, welche?.....

11. Haben Sie in den letzten 6 Monaten Antibiotika eingenommen?

Ja  Nein  k.A.

Falls ja, welche?.....

## Ernährungsgewohnheiten

12. Ernähren Sie sich vorwiegend nach folgenden Ernährungsweisen? Halten Sie eine bestimmte Diät ein?

Vegetarisch	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> k.A.
Vegan	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> k.A.
Halal (nach Speisegesetzen des Islam)	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> k.A.
Koscher (nach jüdischen Speisegesetzen)	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> k.A.
Bestimmte Diät (z.B. Trennkost, makrobiotische Diät, Laktose-freie Diät, Gluten-freie Diät)	<input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> k.A. <input type="checkbox"/> Ja, und zwar:.....

13. Nehmen sie folgende Nahrungsmittel zu sich?	k.A. = keine Angabe	Kommentar
Hackfleisch vom Rind, roh (z.B. Tatar, Schabefleisch)	<input type="checkbox"/> Jeden Tag <input type="checkbox"/> mind. 1x pro Woche <input type="checkbox"/> <1x pro Woche <input type="checkbox"/> Nie <input type="checkbox"/> k.A.	
Gemischtes Hackfleisch vom Schwein und Rind, roh	<input type="checkbox"/> Jeden Tag <input type="checkbox"/> mind. 1x pro Woche <input type="checkbox"/> <1x pro Woche <input type="checkbox"/> Nie <input type="checkbox"/> k.A.	
Hackfleisch vom Schwein, roh (z.B. Mett, Hackepeter)	<input type="checkbox"/> Jeden Tag <input type="checkbox"/> mind. 1x pro Woche <input type="checkbox"/> <1x pro Woche <input type="checkbox"/> Nie <input type="checkbox"/> k.A.	

Fragebogen zu *Streptococcus gallolyticus*

Laufende Nr:

Rohmilch (z.B. Milch vom Bauern bzw. Vorzugsmilch)	<input type="checkbox"/> Jeden Tag <input type="checkbox"/> mind.1x pro Woche <input type="checkbox"/> <1x pro Woche <input type="checkbox"/> Nie <input type="checkbox"/> k.A.	
Rohmilchprodukte (z.B. Rohmilchkäse oder selbstproduzierter Joghurt daraus)	<input type="checkbox"/> Jeden Tag <input type="checkbox"/> mind.1x pro Woche <input type="checkbox"/> <1x pro Woche <input type="checkbox"/> Nie <input type="checkbox"/> k.A.	Falls ja, welche...

k.A.: keine Angabe; w.n.: weiß nicht

14. Bauen Sie selber Gemüse im Garten/Balkon etc. an?  Ja  Nein  
 Falls ja, benutzen Sie Stallmist als Dünger?  Ja  Nein

15. Verarbeiten Sie regelmäßig in Ihrem Haushalt (z.B. beim Kochen oder als Tierfutter) rohes Fleisch (auch tiefgefroren) bzw. rohe Innereien?

- nein  ja, mehr als 1x pro Woche  ja, weniger als 1x pro Woche  weiß nicht

Falls ja, berühren Sie das rohe Fleisch/die rohen Innereien auch direkt mit der bloßen Hand?

- Ja, meistens  Nein, niemals

## Kontakt zu Tieren

16. Haben Sie beruflich oder privat Kontakt zu Tieren?  Nein  Ja

Falls ja, welche Tiere? .....

17. Halten Sie Haustiere?

- a) Hunde  Nein  Ja  
 b) Katzen  Nein  Ja  
 c) Kaninchen  Nein  Ja  
 d) Tauben  Nein  Ja  
 e) Papageien  Nein  Ja  
 f) Enten, Gänse, Puten  Nein  Ja  
 g) Andere Nagetiere (z.B. Mäuse, Ratten)  Nein  Ja, und zwar: .....  
 h) Andere Haustiere (z.B. Vögel, Reptilien)  Nein  Ja, und zwar: .....

Falls ja, werden die Tiere mit rohem (Schweine)-Fleisch und/oder Innereien gefüttert?

- Nein  Ja, und zwar: .....

18. Leben oder arbeiten Sie auf einem landwirtschaftlichen Hof?  Ja  Nein

Falls ja, mit welchen Tieren kommen Sie hier in Kontakt? .....

Fragebogen zu *Streptococcus gallolyticus*

Laufende Nr:

**19. Leben in unmittelbarer Nähe zu einem landwirtschaftlichen Hof?**  Ja  Nein

Falls ja, wie ist die Nähe zu dem nächstem landwirtschaftlichen Hof mit Tierhaltung (in km) und welche Tiere werden dort gehalten? .....

**20. Wie wohnen Sie? In der Nähe zu einem Wald oder mit Wildbesuch im Garten?** Ja  Nein

Falls ja, Nähe zu nächstem Wald, bzw. Häufigkeit des Wildbesuchs.....

**21. Halten Sie Nutztiere und wenn ja wieviele?**

- |                                    |  |
|------------------------------------|--|
| a) Hausschweine                    | <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Ja, Anzahl Tiere..... |
| b) Rinder                          | <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Ja, Anzahl Tiere..... |
| c) Geflügel (Enten, Hühner, Puten) | <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Ja, Anzahl Tiere..... |
| d) Tauben                          | <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Ja, Anzahl Tiere..... |
| e) Kaninchen                       | <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Ja, Anzahl Tiere..... |
| f) Andere                          | <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Ja, und zwar: .....   |

**22. Besuchen sie regelmäßig (mehr als 3 mal jährlich) einen landwirtschaftlichen Hof, Streichelzoo oder Wildgatter?**  Ja  Nein  k.A.

**Falls ja**, beantworten Sie bitte folgende Fragen:

Hatten Sie dort direkten Kontakt zu Tieren?  Ja  Nein  k.A.

**Falls ja**, um welche Tiere handelte es sich? .....

**Falls ja**, in welcher Form hatten Sie Kontakt zu den Tieren?

Streicheln  Ja  Nein  k.A.

Füttern / Kontakt zu Tierspeichel  Ja  Nein  k.A.

Kontakt zu Kot / Urin (z.B. Melken, Ausmisten/Käfigreinigung)  Ja  Nein  k.A.

**23. Sind Sie in Ihrer Freizeit oder beruflich als Jäger/Jagdgehilfe tätig?** Ja  Nein

**Falls ja**, welche Tiere jagen Sie für gewöhnlich?: .....

.....

**Falls Sie Schalenwild erlegt haben**, beantworten Sie bitte folgende Fragen:

Brechen Sie das Wild immer / meistens selber auf?  Ja  Nein

Benutzen Sie dabei Handschuhe?  Ja, immer  meistens  selten  nie

Essen Sie das selbst erlegte Wild?  häufig  selten  nie

**24. Sind Sie in Ihrer Freizeit oder beruflich als Arbeiter an einem Schlachthof bei der Zerlegung oder Verarbeitung von Fleischwaren beteiligt?** Ja  Nein

**Falls ja**, welche Tiere verarbeiten Sie für gewöhnlich?: .....

Fragebogen zu *Streptococcus gallolyticus*Laufende Nr. **25. Haben Sie direkten Kontakt zu Abwasser (Kläranlagen, Abwasserkanäle)?** Nein  Ja  nicht sicher**Falls ja**, beschreiben Sie den Kontakt (in Gummistiefeln jedoch Spritzer, hineingefallen, etc.)

.....

**Falls ja**, war der Kontakt beruflich bedingt? Nein  Ja, aber zufällig  Ja, gehört zu meinem Beruf**Wir danken Ihnen vielmals für Ihre Bemühungen!****10.1.2 Kontingenztafeln der beobachteten Häufigkeiten****Tabelle 10.1: Verteilung der absoluten Häufigkeiten, Odds Ratios und das Signifikanzniveau der Assoziation der Charakteristika der Fälle und Fall-Kontrollen.**

potentieller Risikofaktor		absolute Häufigkeiten		OR (CI); $p^1$
		Fall	Fall-Kontrolle	
Alter [Jahre]	> 50	32	19	0,67 (0,30-1,52); 0,453
	≤ 50	40	16	
Geschlecht	männlich	35	16	1,12 (0,50-2,52); 0,940
	weiblich	37	19	
gastrointestinale Erkrankungen/Leiden	ja	4 <sup>A</sup>	6 <sup>B</sup>	0,28 (0,07-1,08); 0,115
	nein	68	29	
Allergien	ja	19	7	1,43 (0,54-3,82); 0,629
	nein	53	28	
sonstige Erkrankungen	ja	2	2	0,65 (0,09-4,73); 1,000 <sup>*</sup>
	nein	79	51	
Wohnort	Stadt	40	24	0,52 (0,22-1,22); 0,031
	Land	32	11	
Großstadt	Großstadt	9	4	0,77 (0,20-3,02); 0,990
	Land	32	11	
Kleinstadt	Kleinstadt	31	20	0,53 (0,22-1,29); 0,238
	Land	32	11	
Medikamente	ja	28	17	0,67 (0,30-1,52); 0,457
	nein	44	18	

<sup>1</sup> Chi-Quadrat-Test;  $\alpha = 0,05$ ; Kontinuitätskorrektur nach Yates; <sup>\*</sup> Fisher's-Exakt-Test; OR: Odds Ratio; CI: Konfidenzintervall (95 %); <sup>A</sup> aktuelle gastrointestinale Erkrankungen/Leiden: 3 (Morbus Crohn, Polypen im Darm, Colitis ulcerosa); in der Vergangenheit: 1 (Darmtumor); <sup>B</sup> aktuelle gastrointestinale Erkrankungen/Leiden: 4 (Darmtumor, Hämorrhoiden, Reizdarmsyndrom), in der Vergangenheit: 2 (Darmtumor)

**Tabelle 10.2: Verteilung der absoluten Häufigkeiten, Odds Ratio und das Signifikanzniveau der Assoziation der Ernährungsgewohnheiten der Fälle und Fall-Kontrollen.**

potentieller Risikofaktor		absolute Häufigkeiten		OR (CI); $p^1$
		Fall	Fall-Kontrolle	
vegetarische Ernährung	ja	4	0	n. d.; 0,300
	nein	67	35	
rohes Fleisch und Rohmilch/-produkte	ja	54	21	2,00 (0,85-4,73); 0,501
	nein	18	14	
Fleischkonsum ohne Rohmilch/-produkte	ja	25	8	1,73 (0,68-4,38); 0,349
	nein	47	26	
rohes Schweinefleisch	ja	48	18	1,78 (0,77-4,09); 0,416
	nein	24	16	
rohes Rindfleisch	ja	33	12	1,55 (0,67-3,60); 0,176
	nein	39	22	
Rohmilch/-produkte	ja	4	3	0,61 (0,13-2,88); 0,831
	nein	68	31	
Rohmilch/-produkte und rohes Rindfleisch	ja	21	10	0,99 (0,40-2,42); 1,000
	nein	51	24	
Verarbeitung von rohem Fleisch	ja	57	26	1,32 (0,51-3,39); 0,172
	nein	15	9	
Verarbeitung von rohem Fleisch mit bloßer Hand	ja	42	22	0,64 (0,26-1,59); 0,455
	nein	27	9	
Gemüseanbau	ja	32	19	0,67 (0,30-1,52); 0,453
	nein	40	16	
Gemüseanbau mit Stallmist	ja	16	8	0,96 (0,37-2,53); 1,000
	nein	56	27	

<sup>1</sup> Chi-Quadrat-Test,  $\alpha = 0,05$ , Kontinuitätskorrektur nach Yates; OR: Odds Ratio, CI: Konfidenzintervall (95 %); n. d.: nicht definiert

**Tabelle 10.3: Verteilung der absoluten Häufigkeiten, Odds Ratio und das Signifikanzniveau der Assoziation des Tierkontaktes der Fälle und Fall-Kontrollen.**

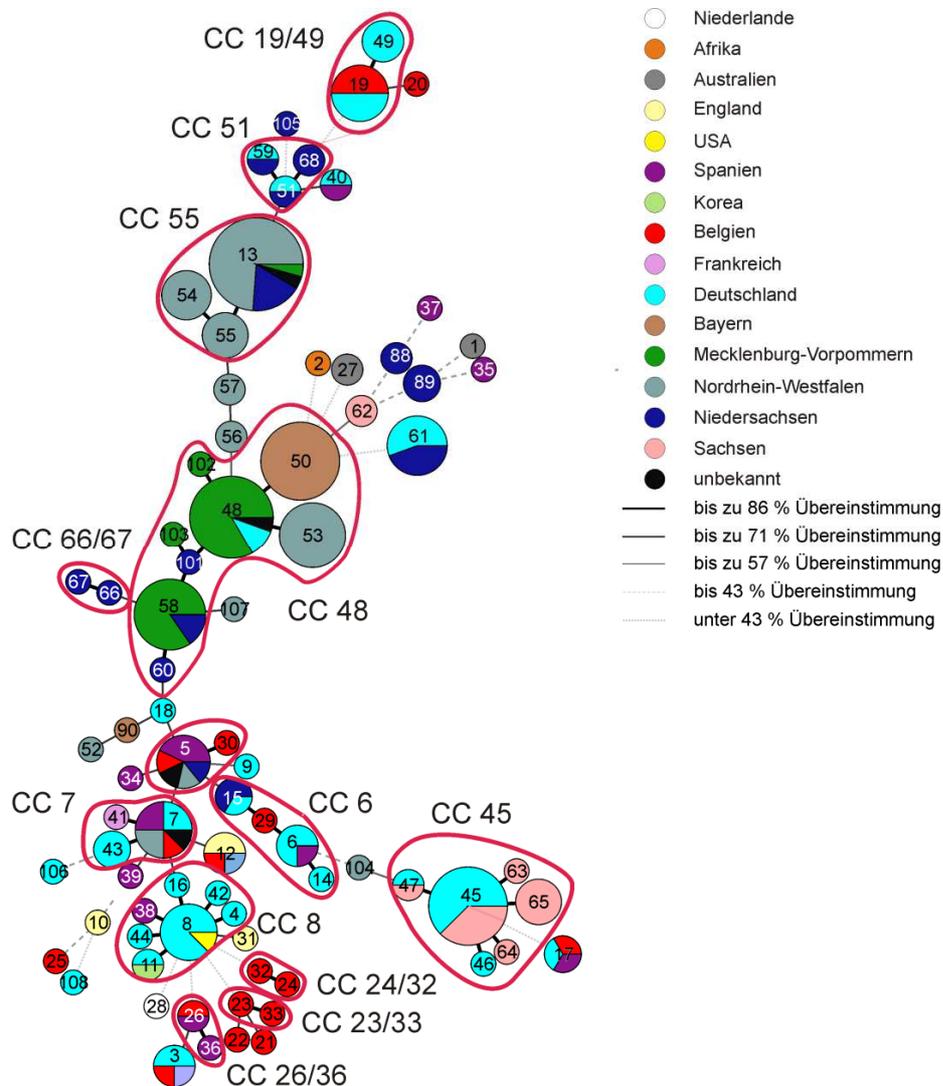
potentieller Risikofaktor		absolute Häufigkeiten		OR (CI); $p^1$
		Fall	Fall-Kontrolle	
privater oder beruflicher Tierkontakt	ja	47	24	0,86 (0,36-2,04); 0,904
	nein	25	11	
Leben oder Arbeiten auf einem landwirtschaftlichen Hof	ja	9	6	0,67 (0,22-2,05); 0,681
	nein	63	28	
Besitz eines Haustieres	ja	30	18	0,69 (0,31-1,56); 0,493
	nein	41	17	
Haltung von Nutztieren	ja	30	18	0,69 (0,31-1,56); 0,493
	nein	41	17	
enger Tierkontakt <sup>2</sup>	ja	13	17	0,24 (0,10-0,58); 0,002
	nein	58	18	
Leben in der Nähe eines landwirtschaftlichen Hofes	ja	30	13	1,21 (0,53-2,77); 0,812
	nein	42	22	
Besuch eines Bauernhofes oder eines Zoos	ja	21	20	0,31 (0,13-0,72); 0,010
	nein	51	15	
Waldnähe	ja	33	14	1,27 (0,56-2,88); 0,717
	nein	39	21	
Jäger	ja	4	1	2,00 (0,22-18,59); 1,000*
	nein	68	34	
Schlachthof	ja	2	0	n. d.; 0,808
	nein	69	35	

potentieller Risikofaktor	absolute Häufigkeiten		OR (CI); $p^1$
	Fall	Fall-Kontrolle	
Abwasserkontakt	ja	4	0,63 (0,13-2,97); 0,681*
	nein	68	

<sup>1</sup> Chi-Quadrat-Test,  $\alpha = 0,05$ , Kontinuitätskorrektur nach Yates, \* Fisher's-Exakt-Test, OR: Odds Ratio, CI: Konfidenzintervall (95 %); <sup>2</sup> Streicheln; Füttern, Kontakt zu Tierspeichel; Kontakt zu Urin oder Kot; n. d.: nicht definiert

## 10.2 Analyse der Epidemiologie von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* mittels MLST

### 10.2.1 Analyse der Epidemiologie



**Abbildung 10.1: Minimum Spanning Tree des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Kollektivs nach der regionalen Herkunft.** Basierend auf dem UPGMA-Algorithmus wurde der MST-Baum erstellt. Jeder ST symbolisiert einen Kreis, dessen Größe proportional zur eingeschlossenen Isolatanzahl ist. Die Farbkodierung gibt die Herkunftsregion an. Sofern es möglich war, wurden bei deutschen Isolaten die Bundesländer angegeben. Rot umrandet sind die mittels eBURST ermittelten klonalen Komplexe (CC).

Tabelle 10.4: Allelprofil von 250 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolaten.

Stamm	ST	glgB	nifS	uvrA	p20	trpD	tkf	aroE	Ursprung	Isolationsquelle	Jahr	Land
DSM 16831	1	1	1	1	1	1	1	1	Koala	-	1990	Australien
DSM 13808	2	2	2	2	2	2	2	2	Umwelt	anaerober Fermenter, Faulschlamm	1997	Afrika
Isolat 12932/01	3	3	3	3	3	3	3	3	Mensch	Endokarditispatient	2001	Deutschland
Isolat 000718/98	4	4	3	4	4	1	4	4	Mensch	Endokarditispatient	1998	Deutschland
Isolat 010288/01	3	3	3	3	3	3	3	3	Mensch	Endokarditispatient	2001	Deutschland
Isolat 003080/00	5	4	4	4	5	4	5	5	Mensch	Endokarditispatient	2000	Deutschland
Isolat 010672/01	6	5	4	5	6	5	5	5	Mensch	Endokarditispatient	2001	Deutschland
Isolat 006718/00	7	4	3	4	5	4	5	4	Mensch	Endokarditispatient	2000	Deutschland
Isolat 007849/02	8	4	3	4	4	1	3	4	Mensch	Endokarditispatient	2002	Deutschland
Isolat 021702/06	9	4	5	6	5	6	5	5	Mensch	Endokarditispatient	2006	Deutschland
ATCC 49475	8	4	3	4	4	1	3	4	Mensch	klinisches Isolat	1992	USA
ATCC 49147	7	4	3	4	5	4	5	4	Mensch	klinisches Isolat	1992	-
0134257/1	6	5	4	5	6	5	5	5	Mensch	Endokarditispatient	2001	Deutschland
ATCC 9809	10	4	6	7	7	7	6	6	unbekannt	-	1977	England
Isolat 005950/03	11	4	3	8	4	1	3	4	Mensch	Endokarditispatient	2003	Deutschland
Isolat 013366/01	6	5	4	5	6	5	5	5	Mensch	Endokarditispatient	2001	Deutschland
K6236/35_ MS	12	4	3	4	6	5	5	4	Mensch	Blutkultur; Endokarditispatient	-	-
05WDK 43740 002	13	6	4	1	8	8	7	7	Kalb	-	-	-
AC 6860	14	5	4	5	6	9	5	5	Mensch	klinisches Isolat	-	Aachen, Deutschland <sup>1</sup>
AC 1016	15	4	4	4	6	5	5	5	Mensch	klinisches Isolat	-	Aachen, Deutschland <sup>1</sup>
AC 1135	8	4	3	4	4	1	3	4	Mensch	klinisches Isolat	-	Aachen, Deutschland <sup>1</sup>
AC 1181	16	4	3	4	4	4	3	4	Mensch	klinisches Isolat	-	Aachen, Deutschland <sup>1</sup>
AC 1242	8	4	3	4	4	1	3	4	Mensch	klinisches Isolat	-	Aachen, Deutschland <sup>1</sup>
AC 582	7	4	3	4	5	4	5	4	Mensch	klinisches Isolat	-	Aachen, Deutschland <sup>1</sup>
AC 7070	17	7	7	9	9	10	8	8	Mensch	klinisches Isolat	-	Aachen, Deutschland <sup>1</sup>
AC 6827	18	4	4	4	10	11	5	5	Mensch	klinisches Isolat	-	Aachen, Deutschland <sup>1</sup>
LMG 14621	19	8	8	1	11	1	9	9	Taube	Abszess	1994	Belgien
LMG 14622	19	8	8	1	11	1	9	9	Taube	-	1994	Belgien
LMG 14623	20	8	9	1	11	1	9	10	Taube	Leber	1994	Belgien
LMG 14634	7	4	3	4	5	4	5	4	Rind	Intestinum	1994	Belgien
LMG 14821	21	9	10	10	12	12	10	11	Taube	-	1994	Belgien
LMG 14823	22	9	11	11	12	12	11	11	Taube	-	1994	Belgien
LMG 14855	23	10	12	12	13	1	3	8	Pferd	Intestinum	1994	Belgien
LMG 14856	24	10	12	12	13	13	3	8	Pferd	Intestinum	1994	Belgien
LMG 14870	25	11	6	7	14	14	10	6	Rind	Intestinum	1994	Belgien
LMG 14876	26	3	3	13	3	8	3	3	Rind	Mandeln	1994	Belgien
LMG 14878	19	8	8	1	11	1	9	9	Taube	Lunge	1994	Belgien
LMG 15572	27	2	13	14	15	8	9	12	Wildziege	Pansen	1994	Australien
LMG 15573	27	2	13	14	15	8	9	12	Wildziege	Pansen	1994	Australien
LMG 16005	3	3	3	3	3	3	3	3	Rind	Intestinum	1995	Belgien
LMG 17956	28	12	14	4	16	7	12	4	Kalb	-	1997	Niederlande
LMG 22782	17	7	7	9	9	10	8	8	Hund	-	2000	Belgien
LMG 14625	5	4	4	4	5	4	5	5	Mensch	Hämokultur	1994	Belgien
LMG 14631	29	4	4	5	6	5	5	5	Mensch	Hämokultur	1994	Belgien

Stamm	ST	glgB	nifS	uvrA	p20	trpD	tkf	aroE	Ursprung	Isolationsquelle	Jahr	Land
LMG 14632	30	4	4	15	5	4	5	5	Mensch	Hämokultur	1994	Belgien
LMG 14879	19	8	8	1	11	1	9	9	Taube	Lunge	1994	Belgien
LMG 15049	12	4	3	4	6	5	5	4	Rind	Mastitis, Milch	1970	England
LMG 15053	31	13	3	1	4	1	3	4	Rind	Mastitis	1977	England
LMG 15063	12	4	3	4	6	5	5	4	Rind	Mastitis, Rumen	1982	England
LMG 17082	32	9	10	11	12	12	3	11	Rind	Mandeln	1996	Belgien
LMG 17091	33	9	10	11	12	12	13	11	Kalb	Mandeln	1996	Belgien
Sp 001	34	4	4	4	17	12	5	5	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien <sup>2</sup>
Sp 006	35	2	15	16	18	14	14	13	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien <sup>2</sup>
Sp 012	7	4	3	4	5	4	5	4	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien <sup>2</sup>
Sp 014	36	3	16	13	3	8	3	3	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien <sup>2</sup>
Sp 015	5	4	4	4	5	4	5	5	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien <sup>2</sup>
Sp 020	7	4	3	4	5	4	5	4	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien <sup>2</sup>
Sp 023	37	2	17	4	19	15	14	8	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien <sup>2</sup>
Sp 029	38	14	3	4	4	1	3	4	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien <sup>2</sup>
Sp 030	39	4	6	4	5	4	5	6	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien <sup>2</sup>
Sp 036	26	3	3	13	3	8	3	3	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien <sup>2</sup>
Sp 042	5	4	4	4	5	4	5	5	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien <sup>2</sup>
Sp 043	17	7	7	9	9	10	8	8	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien <sup>2</sup>
Sp 050	6	5	4	5	6	5	5	5	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien <sup>2</sup>
Sp 052	40	4	4	1	20	8	7	7	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien <sup>2</sup>
Sp 053	5	4	4	4	5	4	5	5	Mensch	klinisches Isolat, Blutkultur	-	Spanien <sup>2</sup>
UCN 34	41	4	3	17	5	4	5	4	Mensch	Blutkultur	2001	Frankreich
904	11	4	3	8	4	1	3	4	Mensch	Endokarditis, Kolonkarzinom	-	Korea
99146B33 13	42	4	3	4	21	1	3	4	Mensch	Blutkultur, Fieber, unklare Infektion	2012	Geesthacht, Deutschland <sup>3</sup>
Isolat 52 F2	43	4	3	16	5	4	5	4	Mensch	Fäzes	2012	Bad Oeynhausen, Deutschland
Isolat 52 G9	43	4	3	16	5	4	5	4	Mensch	Fäzes	2012	Bad Oeynhausen, Deutschland
99208B20 62	44	4	3	4	4	1	3	14	Mensch	Blutkultur, kardiale Dekomposition, Fieber, Endokarditis, Harnwegsinfekt, Kolonkarzinom	2012	Geesthacht, Deutschland <sup>3</sup>
ATCC 43143	12	4	3	4	6	5	5	4	Mensch	Blutkultur	1985	Belgien
HDZ 1001	45	14	18	13	22	5	8	4	Taube	Sammelkot Taubenstall 1	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1002	46	14	18	13	22	5	5	4	Taube	Sammelkot Taubenstall 1	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1003	47	14	18	13	22	5	8	5	Taube	Sammelkot Taubenstall 1	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1004	45	14	18	13	22	5	8	4	Taube	Sammelkot Taubenstall 1	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1005	45	14	18	13	22	5	8	4	Taube	Sammelkot Taubenstall 1	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1006	45	14	18	13	22	5	8	4	Taube	Sammelkot Taubenstall 1	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1007	45	14	18	13	22	5	8	4	Taube	Sammelkot Taubenstall 1	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1008	45	14	18	13	22	5	8	4	Taube	Sammelkot Taubenstall 1	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
1458-1	48	8	19	4	10	16	15	13	Mensch	Studie	2012	-
1527/HDZ 1251	48	8	19	4	10	16	15	13	Mensch	Studie	2012	-
HDZ 1009	45	14	18	13	22	5	8	4	Taube	Sammelkot Taubenstall 2	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1010	45	14	18	13	22	5	8	4	Taube	Sammelkot Taubenstall 2	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1011	45	14	18	13	22	5	8	4	Taube	Sammelkot Taubenstall 2	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1012	45	14	18	13	22	5	8	4	Taube	Sammelkot Taubenstall 2	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1013	8	4	3	4	4	1	3	4	Masthuhn	Sammelkot Masthühner Stall 1	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1014	8	4	3	4	4	1	3	4	Masthuhn	Sammelkot Masthühner Stall 1	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>

Stamm	ST	glgB	nifS	uvrA	p20	trpD	tkf	aroE	Ursprung	Isolationsquelle	Jahr	Land
HDZ 1166	43	4	3	16	5	4	5	4	Mensch	Fäzes	2012	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1167	40	4	4	1	20	8	7	7	Mensch	Fäzes	2012	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1015	49	8	8	1	11	1	9	15	Brieftaube	Sammelkot Taubenstall 3	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1016	49	8	8	1	11	1	9	15	Brieftaube	Sammelkot Taubenstall 3	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1017	49	8	8	1	11	1	9	15	Brieftaube	Sammelkot Taubenstall 3	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1018	49	8	8	1	11	1	9	15	Brieftaube	Sammelkot Taubenstall 3	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1019	19	8	8	1	11	1	9	9	Brieftaube	Sammelkot Taubenstall 4	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1020	19	8	8	1	11	1	9	9	Brieftaube	Sammelkot Taubenstall 4	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1021	19	8	8	1	11	1	9	9	Brieftaube	Sammelkot Taubenstall 4	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1022	19	8	8	1	11	1	9	9	Brieftaube	Sammelkot Taubenstall 4	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1023	51	6	4	1	20	8	7	5	Mensch	Blutkultur FKS_001_H, Endokarditis, Darmerkrankungen	2012	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1024	50	2	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 1, Herde 1; Bayern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1025	50	2	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 1, Herde 1; Bayern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1026	50	2	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 1, Herde 1; Bayern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1027	50	2	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 1, Herde 1; Bayern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1028	50	2	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 1, Herde 1; Bayern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1029	50	2	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 1, Herde 1; Bayern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1030	50	2	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 1, Herde 1; Bayern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1031	50	2	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 1, Herde 1; Bayern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1032	50	2	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 1, Herde 1; Bayern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1045	48	8	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 2; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1046	48	8	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 2; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1047	48	8	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 2; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1048	48	8	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 2; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1049	48	8	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 2; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1050	48	8	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 3; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1051	58	4	19	4	10	11	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 3; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1053	48	8	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 3; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1054	58	4	19	4	10	11	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 3; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1055	58	4	19	4	10	11	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 3; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1056	59	6	4	1	20	8	17	5	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 6, Herde 8; Niedersachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1057	13	6	4	1	8	8	7	7	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 6, Herde 8; Niedersachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1058	60	4	19	4	10	11	15	5	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 6, Herde 8; Niedersachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1059	58	4	19	4	10	11	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 6, Herde 8; Niedersachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1060	58	4	19	4	10	11	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 6, Herde 8; Niedersachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1061	61	2	20	18	9	18	18	9	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 5, Herde 7; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1062	13	6	4	1	8	8	7	7	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 6, Herde 9; Niedersachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1063	88	2	17	13	1	5	7	8	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 6, Herde 9; Niedersachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1064	88	2	17	13	1	5	7	8	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 6, Herde 9; Niedersachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1065	13	6	4	1	8	8	7	7	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 6, Herde 9; Niedersachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1066	13	6	4	1	8	8	7	7	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 6, Herde 9; Niedersachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1067	61	2	20	18	9	18	18	9	Pute	Sammelkot Puten	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1068	61	2	20	18	9	18	18	9	Pute	Sammelkot Puten	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1069	61	2	20	18	9	18	18	9	Pute	Sammelkot Puten	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1070	61	2	20	18	9	18	18	9	Pute	Sammelkot Puten	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>

Stamm	ST	glgB	nifS	uvrA	p20	trpD	tkf	aroE	Ursprung	Isolationsquelle	Jahr	Land
HDZ 1071	61	2	20	18	9	18	18	9	Pute	Sammelkot Puten	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1072	62	2	19	4	1	5	5	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 3, Herde 4; Sachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1073	63	14	18	13	22	5	8	16	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 3, Herde 4; Sachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1074	64	14	18	13	22	5	8	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 3, Herde 4; Sachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1075	62	2	19	4	1	5	5	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 3, Herde 4; Sachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1076	45	14	18	13	22	5	8	4	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 3, Herde 4; Sachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1077	47	14	18	13	22	5	8	5	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 3, Herde 4; Sachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1078	65	14	18	19	22	5	8	4	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 3, Herde 5; Sachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1079	65	14	18	19	22	5	8	4	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 3, Herde 5; Sachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1080	65	14	18	19	22	5	8	4	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 3, Herde 5; Sachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1081	65	14	18	19	22	5	8	4	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 3, Herde 5; Sachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1082	65	14	18	19	22	5	8	4	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 3, Herde 5; Sachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1084	66	4	19	1	20	11	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 4, Herde 6; Niedersachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1085	67	4	19	1	20	11	15	9	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 4, Herde 6; Niedersachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1086	68	6	4	1	20	8	7	9	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 4, Herde 6; Niedersachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1087	68	6	4	1	20	8	7	9	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 4, Herde 6; Niedersachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1088	51	6	4	1	20	8	7	5	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 4, Herde 6; Niedersachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1089	61	2	20	18	9	18	18	9	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 5, Herde 7; Niedersachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1090	61	2	20	18	9	18	18	9	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 5, Herde 7; Niedersachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1091	61	2	20	18	9	18	18	9	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 5, Herde 7; Niedersachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1092	15	4	4	4	6	5	5	5	Mensch	Blutkultur, Endokarditispatient, FKS_002_H	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1093	15	4	4	4	6	5	5	5	Mensch	Fäzes, Endokarditispatient, FKS_002_H	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1098	50	2	19	4	10	16	15	13	Ökopute	Einzelkotprobe Putenfarm 1, Herde 11; Bayern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1099	50	2	19	4	10	16	15	13	Ökopute	Einzelkotprobe Putenfarm 1, Herde 11; Bayern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1103	50	2	19	4	10	16	15	13	Ökopute	Einzelkotprobe Putenfarm 1, Herde 11; Bayern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1104	50	2	19	4	10	16	15	13	Ökopute	Einzelkotprobe Putenfarm 1, Herde 11; Bayern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1107	50	2	19	4	10	16	15	13	Ökopute	Einzelkotprobe Putenfarm 1, Herde 11; Bayern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1108	50	2	19	4	10	16	15	13	Ökopute	Einzelkotprobe Putenfarm 1, Herde 11; Bayern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1113	50	2	19	4	10	16	15	13	Ökopute	Einzelkotprobe Putenfarm 1, Herde 12; Bayern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1118	7	4	3	4	5	4	5	4	Ökopute	Einzelkotprobe Putenfarm 1, Herde 12; Bayern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1121	45	14	18	13	22	5	8	4	Mensch	Blutkultur, Endokarditispatient, FKS_003_H	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1122	45	14	18	13	22	5	8	4	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 8, Herde 16; Sachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1123	45	14	18	13	22	5	8	4	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 8, Herde 16; Sachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1125	45	14	18	13	22	5	8	4	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 8, Herde 16; Sachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1125	45	14	18	13	22	5	8	4	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 8, Herde 16; Sachsen	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1126	13	6	4	1	8	8	7	7	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 7, Herde 10; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1127	48	8	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 7, Herde 10; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1128	48	8	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 7, Herde 10; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1129	89	1	15	16	1	1	5	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 9, Herde 17; Niedersachsen	2013	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1130	5	4	4	4	5	4	5	5	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 9, Herde 17; Niedersachsen	2013	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1131	101	8	19	4	10	11	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 9, Herde 17; Niedersachsen	2013	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1132	89	1	15	16	1	1	5	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 9, Herde 17; Niedersachsen	2013	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1133	89	1	15	16	1	1	5	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 9, Herde 17; Niedersachsen	2013	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1134	48	8	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenstall 20	2013	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>
HDZ 1139	58	4	19	4	10	11	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 10, Herde 18; Mecklenburg-Vorpommern	2013	Hannover, Deutschland <sup>d</sup>

Stamm	ST	glgB	nifS	uvrA	p20	trpD	tkf	aroE	Ursprung	Isolationsquelle	Jahr	Land
HDZ 1140	13	6	4	1	8	8	7	7	Mensch	Blutkultur, Endokarditispatient, FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1141	52	4	4	16	10	17	7	5	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1146	13	6	4	1	8	8	7	7	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1151	13	6	4	1	8	8	7	7	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1153	13	6	4	1	8	8	7	7	Umwelt	Gülleovorrat Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1158	104	2	4	13	22	5	22	5	Mensch	Blutkultur, Endokarditispatient, FKS_011_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1168	53	8	19	4	10	16	16	13	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1169	13	6	4	1	8	8	7	7	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1172	53	8	19	4	10	16	16	13	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1178	13	6	4	1	8	8	7	7	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1179	53	8	19	4	10	16	16	13	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1180	13	6	4	1	8	8	7	7	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1184	13	6	4	1	8	8	7	7	Umwelt	Gülleovorrat Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1194	54	4	4	1	8	17	7	7	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1199	53	8	19	4	10	16	16	13	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1204	55	6	4	1	8	17	7	7	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2013	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1210	53	8	19	4	10	16	16	13	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1212	53	8	19	4	10	16	16	13	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1223	53	8	19	4	10	16	16	13	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1224	13	6	4	1	8	8	7	7	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1225	53	8	19	4	10	16	16	13	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1226	13	6	4	1	8	8	7	7	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1228	56	6	19	1	10	16	7	13	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1229	57	6	4	1	10	16	7	7	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1230	57	6	4	1	10	16	7	7	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1233	53	8	19	4	10	16	16	13	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1235	13	6	4	1	8	8	7	7	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1237	55	6	4	1	8	17	7	7	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1238	55	6	4	1	8	17	7	7	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1240	54	4	4	1	8	17	7	7	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1242	53	8	19	4	10	16	16	13	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1244	55	6	4	1	8	17	7	7	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1246	13	6	4	1	8	8	7	7	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1250	54	4	4	1	8	17	7	7	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1252	13	6	4	1	8	8	7	7	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1257	53	8	19	4	10	16	16	13	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1262	13	6	4	1	8	8	7	7	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1267	54	4	4	1	8	17	7	7	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1277	54	4	4	1	8	17	7	7	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1282	54	4	4	1	8	17	7	7	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1287	55	6	4	1	8	17	7	7	Huhn	Sammelkot Hühner FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1293	13	6	4	1	8	8	7	7	Maus	Fäzes	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1298	13	6	4	1	8	8	7	7	Umwelt	Scharrmatte Hühnerstall FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1303	13	6	4	1	8	8	7	7	Umwelt	Eierschale im Stall von FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1305	56	6	19	1	10	16	7	13	Umwelt	Sammelstaubprobe Hühnerstall FKS_004_H	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland

Stamm	ST	glgB	nifS	uvrA	p20	trpD	tkf	aroE	Ursprung	Isolationsquelle	Jahr	Land
HDZ 1306	58	4	19	4	10	11	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 13; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1307	58	4	19	4	10	11	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 14; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1308	90	4	4	1	10	11	7	5	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 1, Herde 12; Bayern	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1309	48	8	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 15; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1310	8	4	3	4	4	1	3	4	Schwein	Sammelkot	2014	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1311	8	4	3	4	4	1	3	4	Schwein	Sammelkot	2014	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1314	5	4	4	4	5	4	5	5	Mensch	Blutkultur	2015	Bochum, Deutschland <sup>5</sup>
HDZ 1317	107	4	19	16	10	11	19	13	Mensch	Blutkultur	2014	Bochum, Deutschland <sup>5</sup>
HDZ 1319	59	6	4	1	20	8	17	5	Mensch	Blutkultur	2014	Bochum, Deutschland <sup>5</sup>
HDZ 1323	7	4	3	4	5	4	5	4	Mensch	Fäzes; FKS_032	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1330	3	3	3	3	3	3	3	3	Mensch	Fäzes; FKS_098	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1332	105	2	32	30	20	1	7	27	Mensch	Fäzes; FKS_117	2014	Bad Oeynhausen, Deutschland
HDZ 1334	108	15	33	7	7	14	19	10	Mensch	Urinkultur	2014	Bochum, Deutschland <sup>5</sup>
HDZ 1338	106	21	15	16	31	4	5	28	Mensch	Blutkultur	2014	Bochum, Deutschland <sup>5</sup>
HDZ 1344	48	8	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 13; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1345	48	8	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 13; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1346	48	8	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 13; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1347	48	8	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 13; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1348	58	4	19	4	10	11	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 14; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1349	58	4	19	4	10	11	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 14; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1350	58	4	19	4	10	11	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 14; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1351	102	4	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 14; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1352	103	8	19	16	10	11	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 15; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1353	58	4	19	4	10	11	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 15; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1354	58	4	19	4	10	11	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 15; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>
HDZ 1355	48	8	19	4	10	16	15	13	Pute	Einzelkotprobe Putenfarm 2, Herde 15; Mecklenburg-Vorpommern	2012	Hannover, Deutschland <sup>4</sup>

<sup>1</sup> Nationales Referenzzentrum für Streptokokken Institut für medizinischen Mikrobiologie, Universitätsklinik (RWTH), Aachen

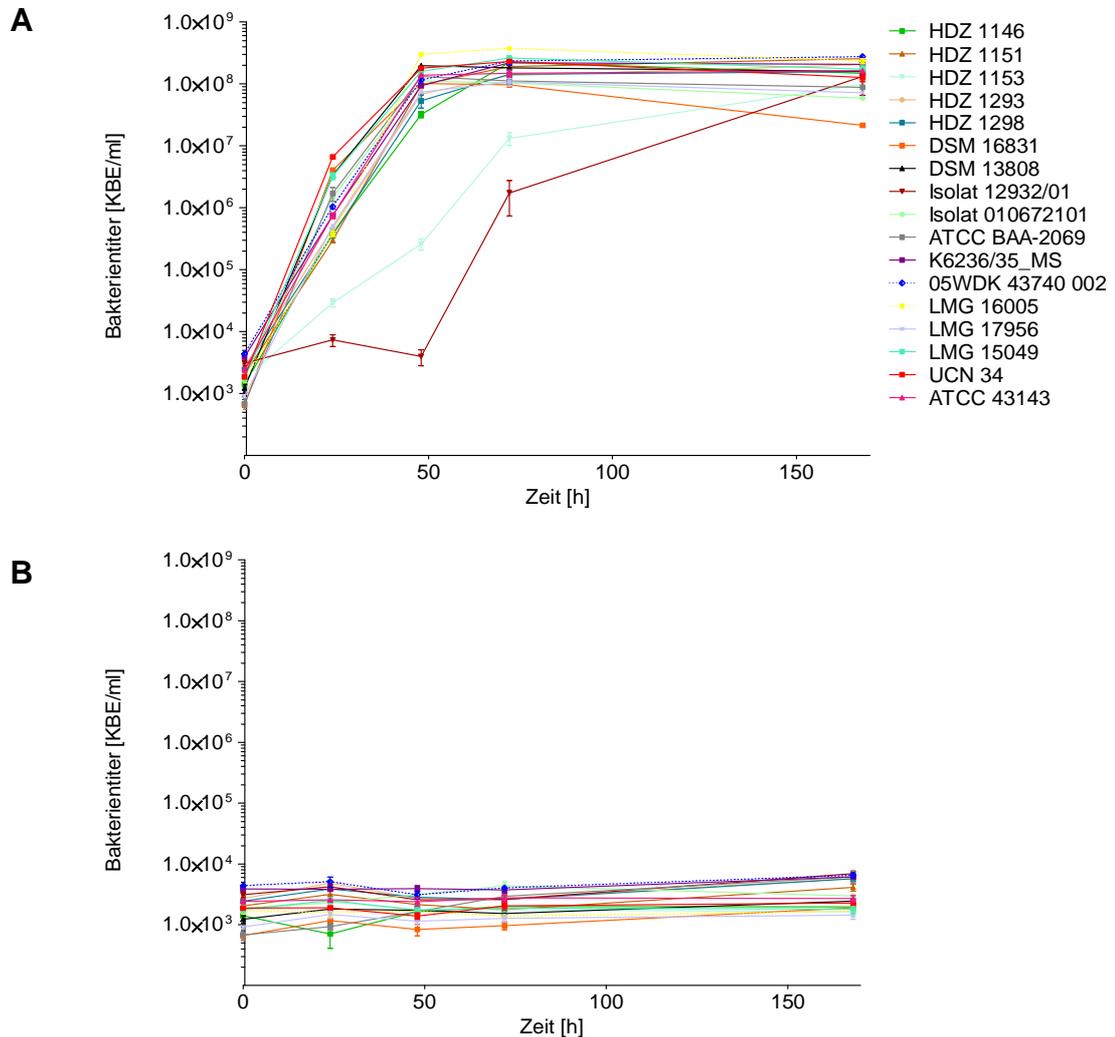
<sup>2</sup> LADR GmbH MVZ Dr. Kramer & Kollegen, Geesthacht

<sup>3</sup> Servicio de Microbiología, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid

<sup>4</sup> Institut für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover

<sup>5</sup> Ruhr-Universität Bochum, IML Bochum/Abteilung für Medizinische Mikrobiologie, Bochum

### 10.3 Stabilität in Milch



**Abbildung 10.2: Vitalität von 18 weiteren *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Isolaten in Milch.** Zum Inokulieren der haltbaren Milch wurden  $1 \times 10^3$  KBE/ml Bakterien eingesetzt und anschließend sieben Tage bei Raumtemperatur (A) bzw.  $4^\circ\text{C}$  (B) inkubiert. Die Wachstumskinetik wurde nach 24, 48, 72 und 168 h durch Ausplattieren auf TSA ermittelt (s. 5.1.5). Die Bestimmung der KBE/ml erfolgte in drei biologischen und drei technischen Replikaten. Dargestellt ist der Standardfehler.

## 10.4 Qualität des Trinkwassers

Tabelle 10.5: Qualität des in dieser Arbeit verwendeten Leitungswassers (Stadtwerke, Bad Oeynhausen).

Probe Nr.: A1500472/01 Eingang: 13.01.2015  
 Probenart: Trinkwasser  
 Probenahme: 13.01.2015 08:30 - 13.01.2015 09:15  
 Entnahmestelle: Bad Oeynhausen, Pumpwerk Rehme, Reinwasser  
 Probennehmer: Michael Kuhlmann  
 Prüfplan: Trinkwasser chemisch, Probenahme gemäß DIN 38402 A14  
 Prüfbeginn: 13.01.2015 Prüfende: 19.01.2015

Untersuchte Parameter	Einheit	Ermittelter Wert	Richt-/ Grenzwert	Verfahrenskennzeichen
Sauerstoff, gelöst (vor Ort)	mg/l O <sub>2</sub>	6,69		DIN EN 25814
Temperatur	°C	11,7		DIN 38404 C4
Farbe	1/m	<0,1	0,5	DIN EN ISO 7887
Geruch		ohne		DEV B1/2
Trübung		ohne		DIN EN 7027
pH-Wert		7,17	6,50-9,50	DIN 38404 C5
Leitfähigkeit 25°C	µS/cm	1.452	2.790	DIN EN 27888
Eisen	mg/l	0,02	0,2	DIN EN ISO 11885
Mangan	mg/l	<0,01	0,05	DIN EN ISO 11885
Kohlensäure, freie	mg/l	27,22		berechnet
Säurekapazität pH 4,3	mmol/l	3,85		DIN 38409 H7
Ammonium	mg/l	<0,1	0,5	DIN 38406 E5
Chlorid	mg/l	250	250	DIN EN ISO 10304
Nitrat	mg/l	19	50	DIN ISO 10304
Sulfat	mg/l	112	250	DIN EN 10304
Nitrit	mg/l	<0,02	0,5	DIN EN ISO 26777
Berechnung Nitrat/Nitrit-Quotient	mg/l	0,39	1	berechnet
Calcium	mg/l	94,1		DIN EN ISO 11885
Magnesium	mg/l	34,4		DIN EN ISO 11885
Natrium	mg/l	115	200	DIN EN ISO 11885
Kalium	mg/l	17,2		DIN EN ISO 11885
Härte, gesamt	°dH	21,1		DIN 38409 H6
Carbonathärte	°dH	10,8		DIN 38406 H6
Oxidierbarkeit	mg/l	<0,5	5	DIN EN ISO 8467
Fluorid	mg/l	<0,15	1,5	DIN EN ISO 10304

Parameter Härte, gesamt

ermittelter Wert: 21,1

bis 8,4 Grad dH Härtebereich "weich"

bis 14 Grad dH Härtebereich "mittel"

ab 14 Grad dH Härtebereich "hart"

**Beurteilung:** Die Resultate der chemischen Analyse zeigen keine Grenzwertüberschreitung gemäß Trinkwasserverordnung.

## 11 Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel, als die angegebenen, verwendet habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen sind, habe ich in jedem Falle durch Angabe der Quelle, als Entlehnung kenntlich gemacht.

---

Ort, Datum

Unterschrift