

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. A. S. Kekulé)



**Untersuchungen zur Ermittlung der Galleempfindlichkeit anaerober
Keime mit einem standardisierten Blättchendiffusionstest**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Ronald Jürgen Steudte, geb. Klohs
geboren am 04.03.1974 in Halle / Saale

Betreuer: Prof. Dr. med. Claus Höhne

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. C. Höhne
2. Prof. Dr. med. A. C. Rodloff
3. Prof. Dr. med. W. Pfister

20.01.2004

25.08.2004

urn:nbn:de:gbv:3-000007137

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007137>]

Referat

Das Wachstumsverhalten gegenüber Galle stellt für die Differenzierung gramnegativer obligat anaerober Stäbchen ein wichtiges Kriterium dar. Besonders gilt das für die Abgrenzung der galleresistenten intestinalen Arten des Genus *Bacteroides* von den gallesensiblen Spezies der Genera *Porphyromonas* und *Prevotella*. Als „goldener Standard“ gilt das Wachstumsverhaltens der Keime in flüssigen Medien mit 20% Rindergalle. Dieses Verfahren ist sehr aufwendig und kann durch Präzipitationen von Komponenten der Rindergalle zu Trübungen des Mediums führen, was die Interpretation der Ergebnisse erschwert. Die Verwendung von Selektivmedien (Galle-Eskulin-Agar) bringt auf Grund der sich anschließend notwendigen weiteren Differenzierung auf Basismedien keine entscheidenden Vorteile. Eine methodische Alternative stellt der Blättchendiffusionstest mit Galle getränkten Filterpapierblättchen dar. Dieser erlaubt es, auch bei denjenigen Anaerobiern eine gallebedingte Wachstumshemmung zweifelsfrei zu erkennen, die hohe Ansprüche an das Kultivierungsmedium haben. Unabhängig vom Verfahren ist von Nachteil, dass Rindergalle ein hygroskopisches, schwer zu dosierendes Naturprodukt wechselnder Zusammensetzung mit unterschiedlich wirksamen Teilkomponenten darstellt.

An 316 anaeroben gramnegativen sporenlösen Stäbchen (120 galleresistente *Bacteroides*, *Fusobakterien*; 196 gallesensible *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Fusobakterien*) wurde die Galleempfindlichkeit gegenüber den chemisch reinen, gut zu dosierenden, mikrobiell wirksamen Natriumsalzen der Gallensäuren Cholsäure, Desoxycholsäure und Taurocholsäure im Vergleich zur Rindergalle getestet. Es kamen Blättchen mit Konzentrationen von 1, 5 und 10 mg für die Gallensäuren und 20 und 25 mg für die Rindergalle zum Einsatz. Natriumtaurocholat ist nicht geeignet. Ähnliche Ergebnisse wie Rindergalle erbrachten Natriumcholat bzw. -desoxycholat mit einer Blättchenkonzentration von je 10 mg. Auf Grund besserer Verarbeitungseigenschaften und geringfügig größerer Hemmhofdurchmesser eignet sich Natriumcholat zur Bestimmung der Galleempfindlichkeit. Als sensibel gelten dabei Stämme der Genera *Bacteroides*, *Prevotella* und *Porphyromonas* mit einem Hemmhofdurchmesser ab 15 mm. Für die Vertreter des Genus *Fusobacterium* können alternativ auch Hemmhöfe ab 13 mm als sensibel gelten. Das Ablesen der Testergebnisse ist nach spätestens 48 h zu empfehlen.

Die Bedeutung der Bestimmung der Galleempfindlichkeit konnte anhand eines Vergleiches der Ergebnisse für zwei kommerzielle Kits (Rapid ANA II und BBL Crystal) für die Spezies *P. heparinolytica* und *B. uniformis* besonders herausgestellt werden.

Stedte, Ronald: Untersuchungen zur Ermittlung der Galleempfindlichkeit anaerober Keime mit einem standardisierten Blättchendiffusionstest.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 76 Seiten, 2004

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|-------|---|
| 1 | Einleitung und Aufgabenstellung..... 1 |
| 2 | Material..... 9 |
| 2.1 | Testkeime..... 9 |
| 2.2 | Testsubstanzen..... 11 |
| 2.2.1 | Rindergalle..... 11 |
| 2.2.2 | Natriumdesoxycholat..... 11 |
| 2.2.3 | Natriumcholat..... 11 |
| 2.2.4 | Natriumtaurocholat..... 12 |
| 2.3 | Medien..... 12 |
| 2.3.1 | Anaerobiermedium Nr. 5..... 12 |
| 2.3.2 | Hammelblut-Agar..... 13 |
| 2.3.3 | Brucella-Agar..... 13 |
| 2.4 | Testblättchen..... 14 |
| 3 | Methodik..... 15 |
| 3.1 | Anaerobioseverfahren..... 15 |
| 3.1.1 | Topfverfahren..... 15 |
| 3.2 | Herstellung der Testblättchen..... 16 |
| 3.3 | Versuchsdurchführung..... 17 |
| 3.3.1 | Vorkultur..... 17 |
| 3.3.2 | Herstellung der Keimsuspension..... 17 |
| 3.3.3 | Durchführung des Blättchendiffusionstestes..... 17 |
| 3.3.4 | Ablezen der Testergebnisse..... 18 |
| 3.4 | Testung der Galleempfindlichkeit in präreduzierten Medien..... 18 |
| 3.5 | PCR-Fingerprinting..... 18 |
| 4 | Ergebnisse..... 19 |
| 5 | Diskussion..... 48 |
| 6 | Zusammenfassung..... 62 |
| 7 | Literaturverzeichnis..... 66 |
| 8 | Thesen..... 73 |

Abkürzungsverzeichnis

| | | |
|------|---|--|
| Abb. | - | Abbildung |
| ATCC | - | American Type Culture Collection, Rockville, USA |
| DNS | - | Desoxyribonucleinsäure |
| DSM | - | Deutsche Sammlung Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, BRD |
| HH | - | Hemmhof |
| HHD | - | Hemmhofdurchmesser |
| MLU | - | Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle, BRD |
| NC | - | Natriumcholat |
| NCTC | - | National Collection of Type Cultures, London, England |
| NDC | - | Natriumdesoxycholat |
| NTC | - | Natriumtaurocholat |
| OMZ | - | Institut für Orale Mikrobiologie der Universität Zürich, Schweiz |
| PCR | - | Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. polymerase chain reaction) |
| pKa | - | Dissoziationskonstante einer Säure |
| RG | - | Rindergalle |
| RMA | - | Rosemary Alden Research Laboratory, Santa Monica, USA |
| VIP | - | Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, USA |
| WAL | - | Wadsworth Anaerobic Laboratory, Los Angeles, USA |

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Lange schon vor der Erstbeschreibung anaerober Bakterien kannte man Krankheitsbilder, für deren Entstehung sie ursächlich verantwortlich waren. So lieferte Hippokrates eine Schilderung des Tetanus, und Xenon beschrieb bei griechischen Soldaten die akute nekrotisierende Gingivostomatitis. Aber erst Louis Pasteur stieß 1861 auf das Phänomen des Lebens ohne Sauerstoff, der Anaerobiose. Er gab deshalb Organismen, die unter Ausschluss von Luft lebensfähig sind, die Bezeichnung „Anaérobies“. Die erste Reinkultur eines anaerob lebenden Keimes auf festem Medium gelang Kitasato 1889 mit *Clostridium tetani*. 1893 entdeckte Veillon die anaeroben Kokken als Infektionserreger und beschrieb danach zusammen mit Zuber diverse anaerobe Arten als Erreger gangränöser und fötider Eiterungen [18, 19].

Als Anaerobier werden jene Bakterien eingestuft, für die freier Sauerstoff mehr oder weniger toxisch ist, und die sich daher nur in Sauerstoffabwesenheit vermehren können bzw. lebensfähig sind. Allerdings bestehen hinsichtlich der Sensibilität gegenüber Sauerstoff z.T. erhebliche graduelle Unterschiede [43]. Dem folgend werden die klinisch relevanten Arten vor allem unter praktischen Gesichtspunkten zumeist folgenden drei Gruppen zugeordnet:

1. Mikroaerophile Anaerobier, die sich bei Luftanwesenheit zwar noch vermehren können, unter Anaerobiose aber die beste Entwicklung aufweisen. Hierzu zählen z.B. mehrere Spezies des Genus *Lactobacillus*.
2. Moderate Anaerobier, die in einer Atmosphäre mit nur sehr geringfügigem Sauerstoffgehalt - über festen Nährbodenoberflächen ca. 2% - Wachstum zeigen. Unter anderem gehört in diese Gruppe mit *Bacteroides fragilis* einer der am häufigsten in klinischen Untersuchungsproben anzutreffende anaerobe Erreger.
3. Strikte Anaerobier, für die bereits eine sehr geringe Sauerstoffkonzentration so toxisch ist, dass sie - einer solchen Atmosphäre ausgesetzt - bald absterben. Hier sind für Wachstum und Vermehrung weitgehend sauerstofffreie Verhältnisse notwendig. Dies betrifft vor allem viele der im Oropharynx und im Vaginalbereich angesiedelten *Prevotella*- und *Porphyromonas*-Arten [9, 43].

Von großer klinischer Bedeutung ist die Tatsache, dass Teile der inneren und äußeren Oberflächen des Makroorganismus Mensch nicht nur von aeroben und fakultativ anaeroben Erregern, sondern auch von obligat anaeroben Keimen besiedelt sein können und diese bei permanenter Anwesenheit zumeist den quantitativ dominierenden Anteil einer ortsansässigen Normalflora bilden. Die wichtigsten Biotope dieser Art sind die Schleimhautareale des Oropharynx, des Intestinaltraktes, des weiblichen Genitaltraktes sowie die äußere Haut. Besonders für die Haut erstaunt dieser Umstand, da es sich bei ihr um eine Körperregion handelt, die ständig direkt dem Einfluss des Luftsauerstoffes ausgesetzt ist. Die vielfältigen Standorte begünstigen in unterschiedlicher Weise Haftung und Vermehrung differenter Spezies, so dass daraus eine für die jeweilige Körperregion charakteristische Keimzusammensetzung resultiert [22, 27, 44].

Unter normalen Verhältnissen steht der gesunde Makroorganismus mit dieser Standortflora in einem stabilen Gleichgewicht. In mancher Hinsicht, z.B. der so genannten Kolonisationsresistenz, profitiert der Körper sogar von der Anwesenheit dieser Mikroorganismen. Wenn jedoch dieses Gleichgewicht durch das Wirksamwerden von zumeist mehreren prädisponierenden Faktoren gestört wird, so können die auf den Haut- und Schleimhautgebieten siedelnden Anaerobier in das Gewebe eindringen und zu pyogenen Infektionen führen. Zu solchen prädisponierenden Faktoren zählen z.B. Sauerstoffmangel im Gewebe, lokale und/oder allgemeine Abwehrschwäche, Verletzungen (besonders solche der besiedelten Schleimhäute), Behandlung mit Immunsuppressiva bzw. Corticoiden und vor allem Mischinfektionen mit aeroben bzw. fakultativ anaeroben Erregern. Aus all dem wird ersichtlich, dass anaerobe Infektionen im Allgemeinen eine endogene Entstehungsweise haben und die sie verursachenden Keime aus den zugeordneten Haut- oder Schleimhautbereichen stammen. Das beinhaltet aber auch, dass die jeweilige Infektionslokalisation die Beteiligung von Anaerobiern erwarten lässt, die dem zugehörigen Haut- bzw. Schleimhautbiotop angehören und dass diese Infektionen in der Regel aerob-anaerobe Mischinfektionen darstellen. Ausnahmen hiervon sind die so genannten klassischen Wundinfektionen wie Tetanus und zumindest teilweise der Gasbrand bzw. das Gasödem sowie Infektionen nach Bissverletzungen [19, 29, 59].

Allerdings ist das beteiligte Keimspektrum einer endogenen Anaerobierinfektion nicht mit der Zusammensetzung der zugehörigen Standortflora identisch. Viele der ökologisch bedeutsamen Spezies sind im Gewebe unter den Bedingungen der Infektion gegenüber

anderen, darunter auch ökologisch nicht dominierenden Arten benachteiligt und können sich nicht im infektiösen Prozess behaupten bzw. durchsetzen. So spielt die im Dickdarm unter den anaeroben gramnegativen Stäbchen vorherrschende Spezies *Bacteroides vulgatus* bei infektiösen Prozessen nur eine geringe Rolle. Dagegen repräsentiert *Bacteroides fragilis* nur 12% der intestinalen Bacteroides-Arten, nimmt aber mit 80-90% der anaeroben Isolate bei pyogenen Infektionen im Abdominalbereich und anaeroben septischen Prozessen eine herausragende Stellung ein. Dieser Anaerobier ist damit als eine ökologisch nicht dominierende, aber hochvirulente Spezies einzustufen. Daraus darf man den Schluss ziehen, dass in infektiösen Prozessen wahrscheinlich eine Selektion potentiell virulenter Arten stattfindet, wobei im Einzelfall sehr unterschiedliche Virulenzfaktoren der Erreger beim Zustandekommen der Infektion mitwirken [12, 23, 29, 58, 60]. Welche der endogenen pyogenen anaeroben Infektionen auf Grund ihrer zahlenmäßigen Dominanz und häufig auch wegen ihres Schweregrades für die Klinik von besonderem Stellenwert sind, weist die Tabelle 1 aus.

Eine bakteriologische Labordiagnostik anaerober Krankheitserreger, die auf kultureller Anzucht, Keimdifferenzierung und möglichst auch Resistenzbestimmung beruht, ist zeit-, kosten- und materialaufwendig. Sie erfordert wegen der längeren Generationszeiten anaerober Keime und den zumeist vorliegenden Mischinfektionen mit der Notwendigkeit sich zum Teil mehrfach wiederholender Subkultivierungen bis zur Erzielung von Reinkulturen in der Regel einen viel längeren Bearbeitungszeitraum pro Untersuchungsprobe als eine entsprechende Diagnostik der Infektion durch aerobe bzw. fakultativ anaerobe Keime allein. Dies ist sicherlich mit ein Grund dafür, dass von klinischer Seite Sinn und Nutzen einer bakteriologischen Anaerobierdiagnostik häufig verkannt und daher auch nicht in Anspruch genommen wird. Hinzu kommt, dass Materialentnahme und dessen Transport in das Labor besonderen Ansprüchen genügen muss. Zum Glück setzt sich jedoch zunehmend die Einsicht durch, dass neben der Bedeutung für die Behandlung der betreffenden Patienten auch dem aus einer optimalen bakteriologischen Labordiagnostik resultierenden Erkenntnisgewinn zu vielen Aspekten anaerober Erreger und anaerober Infektionen ein hoher Stellenwert zukommt.

Tabelle 1: Pyogene Infektionen, bei denen Anaerobier eine bedeutende Rolle spielen nach 16, 19, 23, 29, 50, 59

| Infektionslokalisierung | Art der Infektion | dominierende Arten |
|--------------------------------|--|---|
| Kopf / Hals | Zahneiterungen, Gingivitis, Periodontitis, chronische Sinusitis, chronische Otitis media, Tonsillarabszess, Hirnabszess | Überwiegend orale Anaerobier |
| Thorax | Nekrotisierende Pneumonie, Aspirationspneumonie, Lungenabszess, Pleuraempyem, Bronchiektasen | Vorwiegend orale Anaerobier, beim Abszess bzw. Pleuraempyem in Abhängigkeit von der Genese auch intestinale Arten |
| Abdomen | Abszesse im gesamten inneren und äußeren Abdominalbereich, Appendizitis, Peritonitis, Divertikulitis, postoperative Wundinfektionen, Infektionen des weiblichen Genitaltraktes | Überwiegend intestinale Arten, bei Infektionen des weiblichen Genitaltraktes auch Keime der Vaginalflora |
| Haut | Gasbildende Zellulitis, Brustabszess, übrige Weichteilinfektionen | Je nach Lokalisation orale, intestinale, vaginale Arten oder hautständige Anaerobier |
| Herz / Kreislauf | Septikämie, Endokarditis | Alle Arten |

Es liegt in der Natur der Dinge, dass sich die Bemühungen um eine Optimierung der Labordiagnostik vor allem auf jene Anaerobier konzentrieren, die am häufigsten in klinischen Materialien als Verursacher anzutreffen sind und deren Behandlung oft eine antibiotische Therapie einschließt. Dies sind in erster Linie obligat anaerobe gramnegative Stäbchen der Genera *Bacteroides*, *Prevotella* und *Porphyromonas* [3, 9, 17, 23, 30, 37, 40, 50, 59]. Dabei ist die Differenzierung zwischen den galleresistenten Vertretern der intestinalen *Bacteroides*-Arten - der so genannten *Bacteroides fragilis*-Gruppe [16, 20, 23, 26, 29, 30, 47, 52] - und den gallesensiblen *Prevotella*- bzw. *Porphyromonas*-Arten, die zumeist oralen oder vaginalen Ursprungs sind, nicht nur von theoretischem Interesse, sondern wegen ihrer sehr unterschiedlichen Antibiotikaempfindlichkeit auch von ganz erheblicher Praxisrelevanz. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit einer zuverlässigen Methode zur Bestimmung der Galleresistenz bzw. Gallesensibilität gramnegativer obligat anaerober Stäbchen. Dies gilt um so mehr angesichts der Diskussionen, die um die Neuordnung gallesensibler, bisher dem Genus *Prevotella* angehörender Arten wie

Prevotella heparinolytica oder *Prevotella zoogloformans* zum Genus *Bacteroides* mit seinen zahlreichen galleresistenten intestinalen Vertretern geführt werden [34, 35, 38] oder auch in Bezug auf die Beschreibung pigmentierter galleresistenter Spezies [48].

Die Möglichkeit, über gallehaltige Selektivmedien die intestinalen Spezies bereits während der Erregeranzucht einer vorläufigen Identifizierung zuzuführen, ist für die Erarbeitung eines endgültigen Befundes, der zwangsläufig alle anzüchtbaren Keime zu berücksichtigen hat, kaum von Vorteil, da sie natürlich auch auf den immer mitzuführenden nicht selektiven Medien wachsen und somit mehrfach identifiziert und charakterisiert werden müssen. Hinzu kommt, dass einige der galleresistenten Arten auf dem zumeist als Selektivmedium eingesetzten Galle-Eskulin-Blutagar nicht zu wachsen vermögen und manche Stämme der an sich zu den galleresistenten intestinalen *Bacteroides* gehörenden Spezies *B. uniformis* nur eine eingeschränkte Galleresistenz aufweisen [36].

Methodisch gilt als so genannter „goldener Standard“ die Bestimmung des Wachstumsverhaltens isolierter Reinkulturen in vorreduzierten flüssigen Medien, die 20% Rindergalle enthalten. Diese müssen entweder in arbeitsaufwendigen Schritten selbst hergestellt und entsprechend bevorratet werden oder sind - allerdings nicht ganz billig - kommerziell zu beziehen. Einen zusätzlichen Aufwand bedeutet dabei die unerlässliche Mitführung einer gallefreien Wachstumskontrolle, da viele der klinisch bedeutsamen Anaerobier oropharyngealen und vaginalen Ursprungs selbst in so genannten optimalen flüssigen Medien ohne Gallezusatz häufig nur eine sehr zögerliche oder gar keine wachstumsbedingte Trübung erkennen lassen. Das Ausbleiben einer Trübung im gallehaltigen Milieu könnte bei solchen Keimen somit nicht zwangsläufig auf eine durch Galle verursachte Hemmung zurückgeführt werden. Hinzu kommt der nicht zu unterschätzende Nachteil flüssiger Kulturen allgemein, dass mögliche Kontaminanten als solche oft nicht zu erkennen sind und sich somit Möglichkeiten einer Fehlinterpretation des Ergebnisses nicht ausschließen lassen.

So ist es verständlich, dass man versuchte, die Galleempfindlichkeit anaerober Erreger auch auf festen Nährböden - allerdings in anderer Weise als über gallehaltige feste Anzuchtmedien - zu bestimmen. Von verschiedenen Autoren wurde hierzu der Blättchen-diffusionstest erfolgreich eingesetzt [1, 14, 30, 52, 57, 64], so dass von einigen Firmen kommerziell beziehbare Blättchen angeboten werden (Rosco, Remel) bzw. wurden (Oxoid, bioMérieux). Die Vorteile eines solchen Diffusionstestes liegen auf der Hand. Die

Auswahl der für den Diffusionstest geeigneten festen Medien kann sich an den Ergebnissen der kulturellen Anzuchtversuche orientieren. Selbst bei nur sehr zartem Wachstum lässt hier eine auftretende Hemmung in Form eines Hemmhofes um das Testblättchen dies eindeutig als gallebedingt erkennen. Darüber hinaus passt sich ein solcher Diffusionstest vorteilhaft in andere in der Anaerobierdiagnostik gebräuchliche Diffusionsteste zur Genus- bzw. Spezieserkennung ein. Hierzu zählen u.a. die ausschließlich zur Erregerdifferenzierung erfolgenden Resistenzbestimmungen gegenüber Kanamycin, Colistin, Vancomycin, Fosfomycin, Brilliantgrün und Natriumpolyanetholsulfonat [15, 24, 30, 52] sowie die Nachweise der Nitratreduktase [52] oder der Kohlenhydratfermentation [30, 46]. Darüber hinaus käme es einem methodischen Gesamtkonzept entgegen, möglichst viele Merkmale der Erreger mittels Diffusionstesten zu bestimmen. Dies betrifft z.B. auch die Bestimmung der Antibiotikaresistenz für therapeutische Zwecke mittels E-Test, jedoch nicht den von den meisten Autoren für anaerobe Keime abgelehnten oder in ihren methodischen Hinweisen nicht erwähnten Blättchendiffusionstest [21, 43, 55, 62, 65], obgleich für gewisse schnellwachsende Anaerobier auch bejahende Meinungen vertreten werden [2, 33]. Hinzu kommt, dass Kontaminanten auf festen Nährmedien leicht zu erkennen sind und selbst im Falle einer mäßigen kulturellen Verunreinigung oft noch ein korrektes Ergebnis für den zu testenden Stamm abgelesen werden kann.

Andererseits haften dem Galle-Diffusionstest aber auch Nachteile an. So ist die Beschickung der Testblättchen mit der von den meisten Autoren als optimal bezeichneten Menge von 20 bzw. 25 mg Trockengalle je Disk wegen der begrenzten Blättchengröße und der hohen Viskosität der zur Beschickung erforderlichen sehr konzentrierten Gallelösung im Ergebnis nicht frei von Schwankungen, die das Testresultat beeinflussen können. Allerdings sind die kommerziell beziehbaren Blättchen mit geringeren Konzentrationen beschickt (15 mg Remel, USA; ohne Angaben Rosco, Dänemark; nicht mehr im Lieferprogramm 5 mg bioMérieux Frankreich bzw. 8 mg Oxoid, England), weshalb die jeweiligen Hemmhofdurchmesser, die zur Unterscheidung zwischen gallesensibel bzw. galleresistent herangezogen werden, nicht untereinander austauschbar sind.

Wie schon seit langem bekannt, sind für den antimikrobiellen Effekt der Rindergalle in erster Linie die in ihr enthaltenen Gallensäuren verantwortlich [51]. Erstmals wurde eine antibakterielle Wirkung einer Gallensäure mit der Auflösung der Zellwand von *Streptococcus pneumoniae* durch Desoxycholsäure demonstriert [10]. Der genaue

Wirkungsmechanismus blieb jedoch unklar, könnte aber vielleicht mit der selektiven Zerstörung der Zellmembran dieses Erregers erklärt werden.

Hinsichtlich der antibakteriellen Effektivität der einzelnen Gallensäuren bestehen deutliche Unterschiede und die Anteile der einzelnen Gallensäuren an der Gesamtzusammensetzung der Galle unterliegen ebenfalls Schwankungen. Letzten Endes wird aber aus den verschiedenen antibakteriell wirkenden Komponenten ersichtlich, dass die Wirkung der Galle auf Bakterien sehr komplexer Natur ist und das Ausmaß der Beeinflussung einer Reihe von Faktoren unterliegt. Schließlich differiert die Galle in ihrer Zusammensetzung auch in Bezug auf andere Inhaltsstoffe, die die inhibitorischen oder auch wachstumsfördernden Eigenschaften einzelner Komponenten beeinflussen. So wirken sich Nahrung, enterohepatischer Kreislauf, Nervensystem und Krankheiten ganz wesentlich auf die Mengen der in der Galle vorkommenden Komponenten aus [28]. Hinzu kommt, dass die hygroskopischen Anteile in der getrockneten Galle für die Aufbewahrung und Handhabung der Blättchen nicht gerade von Vorteil sind.

An diesen Sachverhalten orientierte sich die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit. Es sollten kommerziell verfügbare wirkstofffreie und in Qualität und Abmessungen genormte Papierblättchen mit Mengen von 1, 5 und 10 mg der Natriumsalze verschiedener Gallensäuren beschickt werden. Hierzu wurden Cholsäure, Desoxycholsäure und Taurocholsäure ausgewählt, die wesentliche Bestandteile der Rindergalle ausmachen und von denen anzunehmen ist, dass sie die entscheidenden wachstumshemmenden Eigenschaften bedingen. Die ausgewählten Konzentrationen reflektieren dabei die Konzentrationen der Gallensäuren in der nativen Rindergalle [25, 42, 56]. Im Vergleich dazu sollten gemäß Empfehlungen der Literatur mit 20 und 25 mg Rindergalle beschickte Disk hergestellt [1, 14, 30, 57, 64] und in die Untersuchungen einbezogen werden. Die Mengenangaben der Rindergalle auf den Testblättchen beziehen sich auf getrocknete pulverisierte Ochsen-galle, die kommerziell bezogen werden kann. Mit den so präparierten Testblättchen waren unter den standardisierten Testbedingungen der DIN-Vorschrift 58940 [13] für die Resistenzbestimmung aerober Keime Diffusionsteste an einer größeren Zahl galleempfindlicher und gallesensibler Spezies der Genera *Bacteroides*, *Prevotella* und *Porphyromonas* durchzuführen. Ziel war es, diejenigen Gallensäuresalze und ihre Konzentrationen zu ermitteln, die auf Grund eindeutiger Unterschiede der Hemmhofdurchmesser eine zuverlässige Aussage bezüglich der Galleresistenz bzw. Gallesensibilität der untersuchten

Spezies ermöglichten. Zukünftig könnte dann mit einem bezüglich der Art und Menge der Testsubstanz standardisiertem Blättchendiffusionstest gearbeitet werden. Außerdem war herauszufinden, welche Inkubationszeiten zu reproduzierbaren Ergebnissen führen bzw. ob und in welcher Weise unterschiedliche Inkubationszeiten die Ergebnisse beeinflussen.

2. Material

2.1 Testkeime

In die Untersuchungen wurden insgesamt 316 Stämme gramnegativer obligat anaerober Erreger einbezogen. Es handelte sich bei allen Erregern um anaerobe gramnegative Stäbchen, für die die Ermittlung der Galleresistenz bzw. Gallesensibilität aus differentialdiagnostischer Sicht einen besonderen Stellenwert einnimmt. Davon entfielen 120 auf galleresistente Vertreter, die 13 Spezies der Genera *Bacteroides* bzw. *Fusobacterium* angehörten (Tabelle 2). Von den gallesensiblen Arten standen insgesamt 196 Isolate zur Verfügung, die sich auf 22 Spezies der Genera *Porphyromonas*, *Prevotella* (schwarzpigmentierte sowie nichtpigmentierte Arten), *Bacteroides* und *Fusobacterium* aufteilten. Dabei ist anzumerken, dass die Vertreter von *F. necrophorum* bei den gallesensiblen Arten aufgeführt wurden, obwohl von *F. necrophorum* ein differentes Verhalten gegenüber Galle bekannt ist (Tabelle 3).

Sowohl bei den galleresistenten als auch bei den gallesensiblen Keimen wurden einerseits Stämme bekannter internationaler Stammsammlungen mit eindeutiger Spezieszugehörigkeit und andererseits eigene Isolate aus klinischen Untersuchungsmaterialien, die nach bewährten Verfahren in der Routinediagnostik des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg auf Speziesebene identifiziert wurden, getestet. Aus folgenden Sammlungen standen Referenzstämme zur Verfügung: **American Type Culture Collection** (ATCC), Rockville, USA; **National Collection of Type Cultures** (NCTC), London, England; **Virginia Polytechnic Institute and State University** (VPI), Blacksburg, USA; **Wadsworth Anaerobic Laboratory** (WAL), Los Angeles, USA; **Rosemary Alden Research Laboratory** (RMA), Santa Monica, USA; **Deutsche Sammlung Mikroorganismen und Zellkulturen** (DSMZ), Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland; **Institut für Orale Mikrobiologie der Universität Zürich** (OMZ), Zürich, Schweiz; **Institute of Physical and Chemical Research**, Wako, Japan; **Department of Oral Microbiology**, Vrije Universiteit Amsterdam, Niederlande; **National Public Health Institute, Anaerobe Reference Laboratory**, Helsinki, Finnland; **Department of Microbiology**, Virginia Commonwealth University, Richmond, USA; **Forsyth Dental Center**, Boston, USA; **Department of Oral Microbiology**, Umeå, Schweden.

Tabelle 2: Zusammenfassung der in der Arbeit verwendeten als galleresistent eingestuften obligat anaeroben gramnegativen Stäbchen - gesondert nach Referenzstämmen aus international anerkannten Stammsammlungen bzw. nach eigenen klinischen Isolaten (MLU).

| Bakterienart | Gesamtzahl | Zahl aus Sammlungen | Zahl eigener klinischer Isolate |
|-------------------------------------|------------|---------------------|---------------------------------|
| <i>Bacteroides fragilis</i> | 27 | 6 | 21 |
| <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> | 10 | 5 | 5 |
| <i>Bacteroides ovatus</i> | 6 | 3 | 3 |
| <i>Bacteroides uniformis</i> | 40 | 7 | 33 |
| <i>Bacteroides distasonis</i> | 3 | 2 | 1 |
| <i>Bacteroides vulgatus</i> | 3 | 2 | 1 |
| <i>Bacteroides eggerthii</i> | 3 | 2 | 1 |
| <i>Bacteroides splanchnicus</i> | 2 | 1 | 1 |
| <i>Bacteroides stercoris</i> | 1 | 1 | |
| <i>Bacteroides merdae</i> | 1 | 1 | |
| <i>Bacteroides caccae</i> | 1 | 1 | |
| <i>Fusobacterium varium</i> | 19 | 6 | 13 |
| <i>Fusobacterium mortiferum</i> | 4 | | 4 |
| Gesamt | 120 | 37 | 83 |

Tabelle 3: Zusammenfassung der in der Arbeit verwendeten als galle sensibel eingestuften obligat anaeroben gramnegativen Erreger - gesondert nach Referenzstämmen aus international anerkannten Stammsammlungen bzw. nach eigenen klinischen Isolaten (MLU).

| Bakterienart | Gesamtzahl | Zahl aus Sammlungen | Zahl eigener klinischer Isolate |
|--------------------------------------|------------|---------------------|---------------------------------|
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 8 | 5 | 3 |
| <i>Porphyromonas endodontalis</i> | 5 | 5 | |
| <i>Porphyromonas assacharolytica</i> | 7 | 2 | 5 |
| <i>Porphyromonas levii</i> | 2 | 1 | 1 |
| <i>Prevotella intermedia</i> | 20 | 3 | 17 |
| <i>Prevotella nigrescens</i> | 6 | 1 | 5 |
| <i>Prevotella melaninogenica</i> | 10 | | 10 |
| <i>Prevotella loescheii</i> | 3 | 1 | 2 |
| <i>Prevotella corporis</i> | 2 | 1 | 1 |
| <i>Prevotella denticola</i> | 1 | | 1 |
| <i>Prevotella heparinolytica</i> | 24 | 1 | 23 |
| <i>Prevotella zooglyphiformans</i> | 4 | 1 | 3 |
| <i>Prevotella bivia</i> | 14 | 1 | 13 |
| <i>Prevotella disiens</i> | 1 | 1 | |
| <i>Prevotella buccae</i> | 9 | 1 | 8 |
| <i>Prevotella oris</i> | 12 | | 12 |
| <i>Prevotella oralis</i> | 4 | 1 | 3 |
| <i>Prevotella buccalis</i> | 2 | | 2 |
| <i>Bacteroides capillosus</i> | 1 | | 1 |
| <i>Bacteroides gracilis</i> | 1 | 1 | |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | 32 | 1 | 31 |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> * | 28 | 1 | 27 |
| Gesamt | 196 | 28 | 168 |

* *F. necrophorum* zeigt ein unterschiedliches Verhalten gegenüber Galle.

2.2 Testsubstanzen

2.2.1 Rindergalle

getrocknet, rein; Firma Merck KGaA, Darmstadt

aus dem Analysezertifikat:

| | |
|-------------------------|--------|
| Gehalt an Gallensäuren | 49,9 % |
| pH-Wert (5 %ige Lösung) | 6,7 |
| Asche | 11,1 % |
| Wasser | 3,0 % |

2.2.2 Natriumdesoxycholat

Firma Serva, Feinbiochemica Heidelberg/New York

$C_{24}H_{39}O_4 \cdot Na$; Mr=414,6

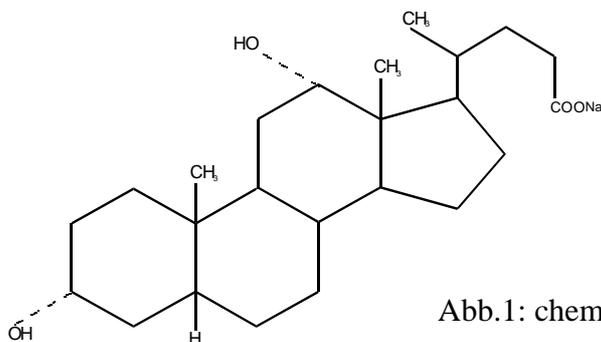


Abb.1: chemische Formel Natriumdesoxycholat

2.2.3 Natriumcholat

Firma Serva, Feinbiochemica Heidelberg/New York

$C_{24}H_{39}O_5 \cdot Na$; Mr=430,5

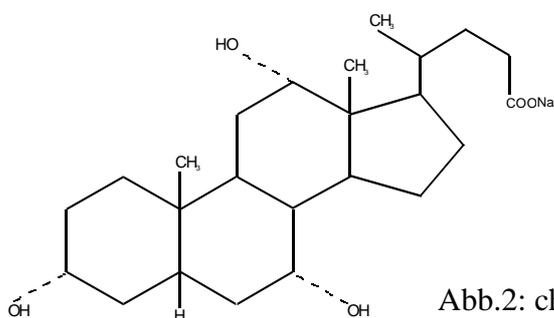


Abb.2: chemische Formel Natriumcholat

2.2.4 Natriumtaurocholat

Firma Serva, Feinbiochemica Heidelberg/New York

$C_{26}H_{44}NO_7S \cdot Na$; $M_r=537,7$

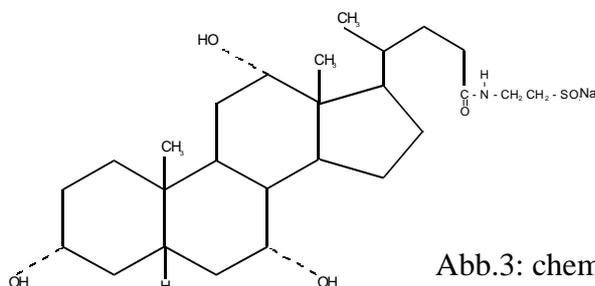


Abb.3: chemische Formel Natriumtaurocholat

Alle drei Gallensäurenalze lagen als gereinigte, sterile, pulverförmige Substanzen vor.

2.3 Medien

Es wurden folgende drei feste Nährböden verwandt: Anaerobiermedium Nr. 5, Hammelblut-Agar und Brucella-Agar.

2.3.1 Anaerobiermedium Nr. 5 (nach HÖHNE, supplementierter Hammelblutagar)

Dieser Nährboden wurde für die Anzuchtung der Vorkulturen verwendet.

Zusammensetzung:

| | |
|---------------------------------|------------|
| Nähragar I (SIFIN): | 36,00 g |
| Agar | 5,00 g |
| Fleischextrakt | 3,00 g |
| L-Cysteinhydrochlorid | 0,30 g |
| Haemin - Lösung | 10,00 ml |
| Vitamin K ₁ - Lösung | 1,00 ml |
| Hammelblut | 50,00 ml |
| Aqua dest. | 1000,00 ml |

Zubereitung: Die Substanzen wurden in Aqua dest. gelöst (außer 50,00 ml Hammelblut) und ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Danach wurde der Nährboden für 15 min bei 121°C im Autoklav sterilisiert. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C erfolgte die Zugabe der 50,00 ml Hammelblut und das Ausgießen in sterile Kunststoffpetrischalen (90 mm Durchmesser). Es wurden ca. 20 ml Nährboden in eine Platte gegeben, so dass der Agar eine Schichtdicke von ca. 3 mm aufwies.

2.3.2 Hammelblut-Agar

Auf diesem Agar wurden die aeroben Wachstumskontrollen der Vorkulturen und der Testansätze durchgeführt.

Zusammensetzung:

| | |
|---------------------------|------------|
| Nähragar I (SIFIN) | 35,00 g |
| Agar | 5,00 g |
| Hammelblut (defibriniert) | 50,00 ml |
| Aqua dest. | 1000,00 ml |

Zubereitung: Die Substanzen (außer Hammelblut) wurden in Aqua dest. gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Danach erfolgte die Sterilisation im Autoklav für 15 min bei 121°C. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurden die 50,00 ml defibriniertes Hammelblut zugegeben und der Nährboden in sterile Kunststoffpetrischalen (90 mm Durchmesser) gegossen. Mit 20 ml Agar pro Platte wurde eine Schichtdicke von ca. 3 mm erreicht.

Die Bereitstellung dieser beiden Nährböden (Anaerobiermedium Nr. 5 und Hammelblutagar) erfolgte freundlicherweise durch die Mitarbeiter des Institutes für Mikrobiologie der MLU Halle-Wittenberg.

2.3.3 Brucella-Agar

Dieser Nährboden diente als Grundlage für den Agarblättchendiffusionstest. Da die Zusammensetzung des Nährmediums das Wachstum und damit die Größe der Hemmhöfe beeinflussen könnte, wurde ein standardisiertes Testmedium mit hoher Reinheit und Chargenkonstanz verwendet.

Herstellung und Vertrieb erfolgte durch die Firma Heipha Diagnostika / Heidelberg.

Zusammensetzung:

| | |
|--------------------|------------|
| Fleischpepton | 10,00 g |
| Caseinpepton | 10,00 g |
| Hefeextrakt | 2,00 g |
| Glukose | 1,00 g |
| NaCl | 5,00 g |
| Agar | 16,00 g |
| Hammelblut | 50,00 ml |
| Vitamin K / Haemin | 1,00 ml |
| pH-Wert | 7,00 ± 0,2 |

Das Volumen des Nährbodens in den Kunststoffpetrischalen (90 mm Durchmesser) betrug 23 ml entsprechend einer Höhe der Nährbodenschicht von $3,5 \text{ mm} \pm 0,5 \text{ mm}$.

Die Lagerung aller Nähragarplatten erfolgte im Kühlschrank bei $+4^\circ\text{C}$ bis $+8^\circ\text{C}$. Vor dem jeweiligen Gebrauch der Platten wurden diese für mindestens 30 min im Brutraum bei 37°C und für weitere 15 min bei Raumtemperatur getrocknet.

2.4 Testblättchen

Für die Beschickung mit den Testsubstanzen wurden sterile, nicht imprägnierte, 6 mm im Durchmesser große Filterpapierblättchen der Firma bioMérieux verwendet.

(zur Herstellung der Testblättchen siehe 3.2, Seite 16)

3. Methodik

3.1 Anaerobioseverfahren

Da Anaerobier empfindlich gegenüber Sauerstoff sind, müssen sie unter strikter Anaerobiose, also einem Milieu mit niedrigem Redoxpotential, kultiviert werden. Dies kann mit speziellen Kulturverfahren, bei denen der Sauerstoff auf physikalischem, chemischem oder biologischem Wege weitgehend entfernt wird, erreicht werden [11, 41].

3.1.1 Topfverfahren (Anaerostaten)

Gas-Pak®-System

Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf einer chemischen Entfernung des Sauerstoffs. In einem luftdicht verschlossenen durchsichtigen Topf aus Kunststoff oder Glas wird der verbleibende Sauerstoff mit Hilfe von Wasserstoffgas katalytisch zu Wasser verbrannt. Der Wasserstoff entsteht durch Zugabe von 10 ml Aqua dest. zu der sich in einem Beutel befindlichen Natriumborhydrid-Tablette. Als Katalysator dienen etwa 50 mit Palladium überzogene Aluminiumoxidpellets, welche sich in einem aus doppeltem Maschendraht bestehenden Körbchen an der Unterseite des Deckels eines jeden Topfes befanden. Nach einmaligem Gebrauch wurden diese Aluminiumoxidpellets im Heißluftsterilisator bei 180°C regeneriert. Eine erhöhte Kohlendioxidspannung von ca. 4 bis 10% wurde durch die gleichzeitige Reaktion von Natriumbikarbonat, Zitronensäure und Aqua dest. erreicht [6]. Die Freisetzung des Wasserstoffs erfolgte rasch nach Zugabe des Aqua dest., weshalb der Topf sofort verschlossen werden musste.

Zur Kontrolle der Anaerobiose diente ein Anaerobenindikator der Firma Oxid [7].

AnaeroGen™-System

Auch dieses Verfahren entfernt den Luftsauerstoff auf chemischem Weg. Der AnaeroGen™ Beutel absorbiert den im verschlossenen Anaerobiertopf befindlichen atmosphärischen Sauerstoff und entwickelt gleichzeitig Kohlendioxid. Ascorbinsäure bindet in einer exothermen Reaktion den Sauerstoff. Der Kohlendioxidgehalt liegt bei ca. 9 bis 13 %. Nach dem Aufreißen des Schutzbeutels beginnt die Absorption des Sauerstoffs sofort. Aus diesem Grund ist ein schneller Verschluss des Anaerobiertopfes erforderlich [5].

Zur Kontrolle der anaeroben Verhältnisse im Topf wurde auch hier der o.g. Anaerobenindikator verwendet.

3.2 Herstellung der Testblättchen

Für die Versuchsdurchführung war es notwendig, die Testblättchen selbst herzustellen. Dies erfolgte in Anlehnung an ein von HÖHNE [31] angegebenes Verfahren.

Für die Herstellung der mit Gallensäuren imprägnierten Testblättchen wurde von zwei unterschiedlich konzentrierten Stammlösungen ausgegangen. Lösung 1 enthielt 0,25 g der Gallensäuresalze pro ml Aqua dest., so dass beim Beschicken der Blättchen mit 20 µl ein Gehalt von 5 mg pro Blättchen erreicht wurde und entsprechend 40 µl einen Gehalt von 10 mg pro Blättchen ergab.

Für die Herstellung von Blättchen mit 1 mg Wirkstoff kam die Lösung 2 mit einer Konzentration von 0,05 g Gallensäuresalzen pro ml Aqua dest. zur Anwendung, die durch Verdünnen der Lösung 1 mit Aqua dest. im Verhältnis 1 : 5 erhalten wurde. Eine Beschickung der Blättchen mit jeweils 20 µl dieser Lösung ergab den gewünschten Gehalt von 1 mg pro Blättchen.

Für die Testblättchen mit Rindergalle wurden in Anlehnung an Arbeiten von DRAPER / BARRY [14] und YAMAZAKI et al. [64] Konzentrationen von 20 mg bzw. 25 mg gewählt. Dazu wurden 10 g pulverisierte, reine Ochsen-galle (Merck) abgewogen und in 20 ml Aqua dest. gelöst. Diese Lösung 3 hatte nach dem Autoklavieren ein Volumen von 27 ml, so dass sich eine Konzentration von 0,37 g/ml ergab. Das Tränken der Blättchen mit Rindergalle erfolgte zweizeitig, um zu verhindern, dass Flüssigkeit von den Blättchen abließ. Für die Blättchen mit 20 mg ergaben sich 2 x 27 µl pro Blättchen, für die 25 mg – Blättchen 2 x 33,75 µl (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Überblick über Stammlösungen und die pro Blättchen aufpipettierte Flüssigkeitsmenge

| Stammlösung | Konzentration in g/ml | pro Blättchen aufpipettierte Menge | Konzentration pro Blättchen |
|--------------------|------------------------------|---|------------------------------------|
| 1 | 0,25 | 40 µl | 10 mg |
| 1 | 0,25 | 20 µl | 5 mg |
| 2 | 0,05 | 20 µl | 1 mg |
| 3 | 0,37 | 2 x 27 µl | 20 mg |
| 3 | 0,37 | 2 x 34 µl | 25 mg |

Nicht imprägnierte, sterile Blättchen (bioMérieux) wurden in eine sterile Petrischale gegeben und mit Hilfe von handelsüblichen Nähnadeln, welche vorher in Petrischalen im Heißluftsterilisator bei 180°C sterilisiert wurden, einzeln aufgespießt. Die Nähnadeln wurden nun mit dem freien Ende so in eine dafür vorbereitete PVC-Platte gestellt, dass die Blättchen nach oben zeigten. Sodann konnten die Blättchen mit den Lösungen der einzelnen Testsubstanzen mit Hilfe einer Mikroliterpipette getränkt werden.

Die Blättchen wurden anschließend in einem Exsikkator über Silikagel für ca. 24 h getrocknet. Die Aufbewahrung erfolgte in kleinen gut verschließbaren Glasbehältern über etwas Silikagel [31].

3.3 Versuchsdurchführung

3.3.1 Vorkultur

Von den zu testenden Keimen wurde eine Vorkultur auf Anaerobiermedium Nr. 5 angelegt. Diese wurde für zwei Tage im Brutraum bei 37°C unter anaeroben Bedingungen bebrütet und zur Herstellung der Keimsuspensionen verwendet. Gleichzeitig erfolgte eine aerobe Kontrolle auf einer Hammelblut-Agarplatte.

3.3.2 Herstellung der Keimsuspension

Es wurden einige einzelne Kolonien der zwei Tage alten Vorkultur mit einem sterilen, hölzernen Watteträger aufgenommen, in steriler physiologischer NaCl-Lösung (ca. 2 ml) eingebracht und homogenisiert. Um eine einheitliche Dichte der Bakteriensuspension zu garantieren, wurde die Keimsuspensionen auf einen Wert von 0,5 nach dem Mc Farland Trübungsstandard eingestellt. Dies entspricht einer Bakteriendichte von ca. $1,5 \times 10^8$ Keimen/ml [8].

3.3.3 Durchführung des Blättchendiffusionstestes

Auf die getrockneten (siehe 2.3.4) und beschrifteten Brucella-Agarplatten wurden 0,1 ml Keimsuspension aufpipettiert und mit einem Drigalskispatel gleichmäßig solange verteilt, bis die Feuchtigkeit vom Agar aufgenommen war. Danach erfolgte das Aufbringen der Testblättchen. Es wurden pro Platte drei Testblättchen mit einer sterilen Pinzette aufgelegt und etwas angedrückt. Danach wurden mehrere Platten in einen Anaerobiertopf gebracht und mit dem AnaeroGen™-System von Oxid / Gas-Pack®-System bei 37°C im Brutraum

bebrütet. Die Anaerobiose wurde mit einem Indikator überwacht. Die Bebrütung erfolgte über einen Zeitraum von 96 Stunden.

Gleichzeitig wurde eine aerobe Kontrolle des Inokulums auf Hammelblutplatten mitgeführt.

3.3.4 Ablesen der Testergebnisse

Das Ablesen erfolgte mit unbewaffnetem Auge und einem Stechzirkel, mit dessen Hilfe die Größe der Hemmhofdurchmesser auf ein Lineal übertragen und abgelesen werden konnte. Die erste Ablesung erfolgte für alle Stämme nach 48 Stunden. Für 160 Stämme wurde danach noch zweimal für jeweils weitere 24 Stunden bebrütet und nochmals die Größe der Hemmhöfe bestimmt, so dass zusätzliche Messwtergebnisse nach 72 und 96 Stunden vorlagen.

3.4 Testung der Galleempfindlichkeit in präreduzierten Medien

Für ausgewählte Stämme der Spezies *B. uniformis*, *P. heparinolytica* und *P. zoogloformans* erfolgte die Bestimmung der Galleempfindlichkeit darüber hinaus in präreduzierten Medien.

Für die Durchführung dieser Versuche sind wir Herrn Prof. Dr. med. A. C. Rodloff und seiner Mitarbeiterin Frau D. Adler vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Leipzig zu großem Dank verpflichtet.

3.5 PCR-Fingerprinting

Für die unter 3.4 genannten Stämme wurde außerdem ein PCR-Fingerprinting zur Stammcharakterisierung durchgeführt. Auch diese Untersuchungen wurden von den Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Universität Leipzig unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. A. C. Rodloff verwirklicht, wofür wir ebenfalls ganz herzlich danken.

4. Ergebnisse

Ohne bereits an dieser Stelle auf Einzelheiten bezüglich der getesteten Substanzen einzugehen, darf als ein wesentliches Ergebnis der Untersuchungen festgestellt werden, dass auch Papierblättchen, die mit den reinen Natriumsalzen der Gallensäuren anstelle getrockneter Rindergalle imprägniert sind, zur Bestimmung der Galleempfindlichkeit von obligat anaeroben gramnegativen Stäbchen im Blättchendiffusionstest eingesetzt werden können. Die Möglichkeit, Testblättchen mit Galle an Stelle der Testung in gallehaltigen Flüssigkulturen für diese Zwecke zu verwenden, wurde bereits in früheren Untersuchungen für einen Teil der in die vorliegende Arbeit einbezogenen Keime belegt [30].

Um auf der Suche nach einer optimalen Bebrütungszeit zunächst den Einfluss variierender Inkubationszeiten auf die Testergebnisse zu erfassen, kamen die Hemmhofdurchmesser von 160 der insgesamt 316 Teststämme nach 48, 72 und 96 Stunden Inkubation zur Ablesung. Wie in den späteren Versuchen mit den verbleibenden 156 Stämmen auch, wurden in den Diffusionstesten Blättchen eingesetzt, die mit 1, 5 bzw. 10 mg der drei Gallensäuresalze Natriumcholat, Natriumdesoxycholat und Natriumtaurocholat sowie mit 20 bzw. 25 mg trockener Rindergalle beschickt waren. Einen Überblick über die Ergebnisse geben die Tabellen 5 bis 8. In ihnen sind die übereinstimmenden sowie die differierenden Anteile der HHD bis zu einer Differenz von ± 1 mm, ± 2 mm und $> \pm 2$ mm zu den drei Ablesezeiten separat aufgeführt, wobei zur Erzielung einer besseren Übersichtlichkeit eine Einteilung der getesteten Erreger infolgende vier Gruppen vorgenommen wurde: Galleresistente intestinale Stämme der *Bacteroides fragilis*-Gruppe ohne die ebenfalls als galleresistent geltende intestinale Art *B. uniformis* (Tabelle 5), separat aufgeführt die Isolate von *B. uniformis* selbst (Tabelle 6), gallesensible nichtpigmentierte Stämme des Genus *Prevotella* (Tabelle 7) und schließlich gallesensible schwarzpigmentierte Stämme der Genera *Porphyromonas* und *Prevotella* (Tabelle 8). In der zentralen Spalte „keine“ sind jeweils die Anzahl und Prozente (in Klammern) derjenigen Stämme aufgeführt, deren HHD beim Vergleich zweier Inkubationszeiten keine Unterschiede aufwiesen.

Tabelle 5: Verteilung und Prozentanteile der Differenzen der Hemmhofdurchmesser in mm für 31 galleresistente intestinale *Bacteroides*-Stämme (ohne *B. uniformis*) nach Inkubationszeiten von 48, 72 und 96 h

| Substanzen | Menge in mg | Differenz der Hemmhöhe in mm nach 48 und 72 h | | | | | | Übereinstimmung der | | |
|------------|-------------|--|-----|-----|----------|---------------------|-----|---------------------|---------------------|------------|
| | | > - 2 | - 2 | - 1 | keine(%) | + 1 | + 2 | > + 2 | HH-Durchmesser in % | |
| | | HH nach 48 h < 72 h | | | | HH nach 48 h > 72 h | | | - / + 1 mm | - / + 2 mm |
| RG | 20 | - | - | 1 | 30(96,8) | - | - | - | 100 | 100 |
| | 25 | - | - | 1 | 30(96,8) | - | - | - | 100 | 100 |
| NDC | 1 | - | - | - | 31(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| | 5 | - | - | 1 | 29(93,5) | 1 | - | - | 100 | 100 |
| NC | 10 | - | - | 3 | 28(90,3) | - | - | - | 100 | 100 |
| | 1 | - | - | - | 31(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| NTC | 5 | - | - | - | 31(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| | 10 | - | - | 2 | 28(90,3) | 1 | - | - | 100 | 100 |
| NTC | 1 | - | - | - | 31(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| | 5 | - | - | - | 31(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| NTC | 10 | - | - | - | 31(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| | | | | | | | | | | |
| | | Differenz der Hemmhöhe in mm nach 72 und 96 h | | | | | | | | |
| | | > - 2 | - 2 | - 1 | keine(%) | + 1 | + 2 | > + 2 | | |
| | | HH nach 72 h < 96 h | | | | HH nach 72 h > 96 h | | | | |
| RG | 20 | - | - | - | 30(96,8) | 1 | - | - | 100 | 100 |
| | 25 | - | - | - | 30(96,8) | 1 | - | - | 100 | 100 |
| NDC | 1 | - | - | - | 31(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| | 5 | - | - | 4 | 26(83,9) | 1 | - | - | 100 | 100 |
| NC | 10 | - | - | 1 | 29(93,5) | 1 | - | - | 100 | 100 |
| | 1 | - | - | - | 31(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| NTC | 5 | - | - | 1 | 30(96,8) | - | - | - | 100 | 100 |
| | 10 | - | - | 1 | 28(90,3) | 2 | - | - | 100 | 100 |
| NTC | 1 | - | - | - | 31(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| | 5 | - | - | - | 31(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| NTC | 10 | - | - | - | 31(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| | | | | | | | | | | |
| | | Differenz der Hemmhöhe in mm nach 48 und 96 h | | | | | | | | |
| | | > - 2 | - 2 | - 1 | keine(%) | + 1 | + 2 | > + 2 | | |
| | | HH nach 48 h < 96 h | | | | HH nach 48 h > 96 h | | | | |
| RG | 20 | - | - | - | 31(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| | 25 | - | - | - | 31(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| NDC | 1 | - | - | - | 31(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| | 5 | - | - | 5 | 25(80,6) | 1 | - | - | 100 | 100 |
| NC | 10 | - | - | 4 | 26(83,9) | 1 | - | - | 100 | 100 |
| | 1 | - | - | - | 31(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| NTC | 5 | - | - | 1 | 30(96,8) | - | - | - | 100 | 100 |
| | 10 | - | - | 2 | 27(87,1) | 2 | - | - | 100 | 100 |
| NTC | 1 | - | - | - | 31(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| | 5 | - | - | - | 31(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| NTC | 10 | - | - | - | 31(100) | - | - | - | 100 | 100 |

Tabelle 6: Verteilung und Prozentanteile der Differenzen der Hemmhofdurchmesser in mm für 32 galleresistente Stämme von *B. uniformis* nach Inkubationszeiten von 48, 72 und 96 h

| Substanzen | Menge in mg | Differenz der Hemmhöhe in mm nach 48 und 72 h | | | | | | | Übereinstimmung der HH-Durchmesser in % | |
|------------|-------------|---|-----|-----|----------|---------------------|-----|-------|---|------------|
| | | > - 2 | - 2 | - 1 | keine(%) | + 1 | + 2 | > + 2 | - / + 1 mm | - / + 2 mm |
| | | HH nach 48 h < 72 h | | | | HH nach 48 h > 72 h | | | | |
| RG | 20 | - | - | - | 18(56,3) | 13 | 1 | - | 96,9 | 100 |
| | 25 | - | - | 2 | 16(50,0) | 12 | 2 | - | 93,8 | 100 |
| NDC | 1 | - | - | 1 | 31(96,9) | - | - | - | 100 | 100 |
| | 5 | - | - | - | 27(84,4) | 5 | - | - | 100 | 100 |
| NC | 10 | - | - | 1 | 18(56,3) | 13 | - | - | 100 | 100 |
| | 1 | - | - | - | 32(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| NTC | 5 | - | - | 4 | 21(65,5) | 7 | - | - | 100 | 100 |
| | 10 | - | 1 | 6 | 16(50,0) | 9 | - | - | 96,9 | 100 |
| NTC | 1 | - | - | - | 32(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| | 5 | - | - | - | 32(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| | 10 | - | - | - | 32(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| | | Differenz der Hemmhöhe in mm nach 72 und 96 h | | | | | | | | |
| | | > - 2 | - 2 | - 1 | keine(%) | + 1 | + 2 | > + 2 | | |
| | | HH nach 72 h < 96 h | | | | HH nach 72 h > 96 h | | | | |
| RG | 20 | - | - | - | 23(71,9) | 9 | - | - | 100 | 100 |
| | 25 | - | - | - | 21(65,6) | 11 | - | - | 100 | 100 |
| NDC | 1 | - | - | - | 32(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| | 5 | - | - | - | 27(84,4) | 5 | - | - | 100 | 100 |
| NC | 10 | - | - | 2 | 24(75,0) | 6 | - | - | 100 | 100 |
| | 1 | - | - | - | 32(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| NTC | 5 | - | - | - | 26(81,3) | 6 | - | - | 100 | 100 |
| | 10 | - | - | 4 | 21(65,6) | 7 | - | - | 100 | 100 |
| NTC | 1 | - | - | - | 32(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| | 5 | - | - | - | 32(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| | 10 | - | - | - | 32(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| | | Differenz der Hemmhöhe in mm nach 48 und 96 h | | | | | | | | |
| | | > - 2 | - 2 | - 1 | keine(%) | + 1 | + 2 | > + 2 | | |
| | | HH nach 48 h < 96 h | | | | HH nach 48 h > 96 h | | | | |
| RG | 20 | - | - | - | 12(37,5) | 18 | 1 | 1 | 93,8 | 96,9 |
| | 25 | - | - | 2 | 8(25,0) | 19 | 2 | 1 | 90,6 | 96,9 |
| NDC | 1 | - | - | 1 | 31(96,9) | - | - | - | 100 | 100 |
| | 5 | - | - | - | 22(68,8) | 10 | - | - | 100 | 100 |
| NC | 10 | - | - | - | 16(50,0) | 16 | - | - | 100 | 100 |
| | 1 | - | - | - | 32(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| NTC | 5 | - | - | 4 | 18(56,3) | 10 | - | - | 100 | 100 |
| | 10 | - | 1 | 6 | 15(46,9) | 9 | 1 | - | 93,8 | 100 |
| NTC | 1 | - | - | - | 32(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| | 5 | - | - | - | 32(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| | 10 | - | - | - | 32(100) | - | - | - | 100 | 100 |

Wie man erwarten konnte, zeigten die Hemmhöhe der galleresistenten intestinalen *Bacteroides*-Arten – sofern überhaupt welche auftraten – für alle Inkubationszeiten nahezu

eine 100-prozentige Übereinstimmung innerhalb eines Toleranzbereiches von ± 1 mm, was der Fehlerbreite von Diffusionstesten entspricht. Dies ist mit den meist fehlenden oder – im Falle des Vorhandenseins – äußerst geringen HHD zu erklären. Die abweichenden Ausnahmen von einer vollständigen Übereinstimmung betrafen ausschließlich einige wenige Stämme der ebenfalls als galleresistent einzuordnenden Spezies *Bacteroides uniformis* (Tabellen 5 und 6).

Die Vermutung, dass bei den gallesensiblen Arten der Genera *Prevotella* (Tabellen 7 und 8) und *Porphyromonas* (Tabelle 8) die durch steigenden Wirkstoffgehalt bedingten größeren HHD mit größeren Anteilen differierender HHD korreliert sind, ließ sich zwar im Trend – nicht aber für alle Substanzen und Inkubationszeiten in gleicher Weise bestätigen. So war bei der Verwendung von Rindergalle mehrheitlich die bessere Übereinstimmung der HHD innerhalb der Toleranzgrenze von ± 1 mm bei der Blättchenkonzentration von 25 mg zu finden. Teilweise konnten solche besseren Übereinstimmungen der HHD bei höheren Wirkstoffkonzentrationen auch für einige der Gallensäuresalze gefunden werden, wobei diese Übereinstimmungen mehr die nichtpigmentierten als die schwarzpigmentierten Arten betrafen.

Beim Vergleich der Inkubationszeiten waren die Unterschiede der HHD zwischen 48- und 72- bzw. 72- und 96-stündiger Bebrütung jeweils geringer als zwischen einer Inkubation von 48 bzw. 96 Stunden. Dies bedeutet, dass mit ansteigender Bebrütungszeit auch die Abweichungen der HHD zunahmen. Bei den nichtpigmentierten *Prevotella*-Spezies (Tabelle 7) betragen für alle Konzentrationen der Gallensalze nach 48- bzw. 72-stündiger Bebrütung die Übereinstimmungen der HHD innerhalb des Toleranzbereiches von ± 1 mm mindestens 89%. Für die schwarzpigmentierten Arten (Tabelle 8) lag die unterste Grenze übereinstimmender HHD noch über 80%. Aus diesen Gründen und unter dem Aspekt des in der Routinediagnostik bestehenden Zeitdruckes wurde eine Ablesung nach 48 Stunden Inkubation – auch für die weiteren in der vorliegenden Arbeit noch zu testenden Stämme – als geeignet angesehen.

Tabelle 7: Verteilung und Prozentanteile der Differenzen der Hemmhofdurchmesser in mm für 46 galleensible nichtpigmentierte Stämme des Genus *Prevotella* nach Inkubationszeiten von 48, 72 und 96 h

| Substanzen | Menge in mg | Differenz der Hemmhöhe in mm nach 48 und 72 h | | | | | | | Übereinstimmung der HH-Durchmesser in % | |
|------------|-------------|---|-----|-----|----------|---------------------|-----|-------|---|------------|
| | | > - 2 | - 2 | - 1 | keine(%) | + 1 | + 2 | > + 2 | - / + 1 mm | - / + 2 mm |
| | | HH nach 48 h < 72 h | | | | HH nach 48 h > 72 h | | | | |
| RG | 20 | - | 1 | 9 | 14(30,4) | 17 | 5 | - | 87,0 | 100 |
| | 25 | - | - | 8 | 23(50,0) | 12 | 3 | - | 93,5 | 100 |
| NDC | 1 | - | 1 | 7 | 25(54,3) | 13 | - | - | 97,8 | 100 |
| | 5 | 2 | 1 | 7 | 19(41,3) | 16 | 1 | - | 91,3 | 95,6 |
| NC | 10 | - | 2 | 11 | 18(39,1) | 14 | 1 | - | 93,5 | 100 |
| | 1 | - | - | 1 | 39(84,8) | 6 | - | - | 100 | 100 |
| NTC | 5 | 1 | 2 | 10 | 19(41,3) | 13 | 1 | - | 91,3 | 97,8 |
| | 10 | - | 3 | 7 | 27(58,7) | 7 | 2 | - | 89,1 | 100 |
| NTC | 1 | - | - | - | 46(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| | 5 | - | - | 3 | 27(58,7) | 12 | 4 | - | 91,3 | 100 |
| | 10 | - | - | 5 | 25(54,3) | 14 | 1 | 1 | 95,6 | 97,8 |
| | | Differenz der Hemmhöhe in mm nach 72 und 96 h | | | | | | | | |
| | | > - 2 | - 2 | - 1 | keine(%) | + 1 | + 2 | > + 2 | | |
| | | HH nach 72 h < 96 h | | | | HH nach 72 h > 96 h | | | | |
| RG | 20 | - | 1 | 7 | 26(56,6) | 11 | 1 | - | 95,6 | 100 |
| | 25 | - | - | 8 | 25(54,3) | 12 | 1 | - | 97,8 | 100 |
| NDC | 1 | - | 2 | 8 | 32(69,6) | 4 | - | - | 95,6 | 100 |
| | 5 | - | 4 | 13 | 22(47,8) | 7 | - | - | 91,3 | 100 |
| NC | 10 | - | 7 | 9 | 20(43,5) | 10 | - | - | 84,8 | 100 |
| | 1 | - | - | 3 | 37(80,4) | 6 | - | - | 100 | 100 |
| NTC | 5 | - | 2 | 4 | 31(67,4) | 8 | - | 1 | 93,5 | 97,8 |
| | 10 | - | 3 | 6 | 27(58,7) | 10 | - | - | 93,5 | 100 |
| NTC | 1 | - | - | - | 46(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| | 5 | - | - | 3 | 35(76,1) | 8 | - | - | 100 | 100 |
| | 10 | - | - | 8 | 31(67,4) | 7 | - | - | 100 | 100 |
| | | Differenz der Hemmhöhe in mm nach 48 und 96 h | | | | | | | | |
| | | > - 2 | - 2 | - 1 | keine(%) | + 1 | + 2 | > + 2 | | |
| | | HH nach 48 h < 96 h | | | | HH nach 48 h > 96 h | | | | |
| RG | 20 | - | 2 | 7 | 15(32,6) | 15 | 6 | 1 | 80,4 | 97,8 |
| | 25 | - | 1 | 6 | 21(45,7) | 13 | 5 | - | 87,0 | 100 |
| NDC | 1 | 2 | 2 | 8 | 18(39,1) | 16 | - | - | 91,3 | 95,6 |
| | 5 | 3 | 2 | 10 | 18(39,1) | 13 | - | - | 89,1 | 93,5 |
| NC | 10 | 3 | 5 | 8 | 15(32,6) | 15 | - | - | 82,6 | 93,5 |
| | 1 | - | - | 2 | 35(76,1) | 8 | 1 | - | 97,8 | 100 |
| NTC | 5 | - | 2 | 7 | 24(52,2) | 12 | 1 | - | 93,5 | 100 |
| | 10 | 2 | 1 | 8 | 21(45,7) | 13 | 1 | - | 91,3 | 95,6 |
| NTC | 1 | - | - | - | 46(100) | - | - | - | 100 | 100 |
| | 5 | - | - | 4 | 25(54,3) | 13 | 4 | - | 91,3 | 100 |
| | 10 | - | 1 | 7 | 19(41,3) | 16 | 2 | 1 | 91,3 | 97,8 |

Tabelle 8: Verteilung und Prozentanteile der Differenzen der Hemmhofdurchmesser in mm für 51 galle sensible schwarzpigmentierte Stämme der Genera *Porphyromonas* und *Prevotella* nach Inkubationszeiten von 48, 72 und 96 h

| Substanzen | Menge in mg | Differenz der Hemmhöhe in mm nach 48 und 72 h | | | | | | | Übereinstimmung der HH-Durchmesser in % | |
|------------|--|---|-----|-----|----------|---------------------|-----|-------|---|------------|
| | | > - 2 | - 2 | - 1 | keine(%) | + 1 | + 2 | > + 2 | - / + 1 mm | - / + 2 mm |
| | | HH nach 48 h < 72 h | | | | HH nach 48 h > 72 h | | | | |
| RG | 20 | 1 | 4 | 12 | 21(41,2) | 9 | 3 | 1 | 82,4 | 96,1 |
| | 25 | - | 2 | 11 | 21(41,2) | 13 | 2 | 2 | 88,2 | 96,1 |
| NDC | 1 | - | 7 | 11 | 20(39,2) | 10 | 2 | 1 | 80,4 | 98,0 |
| | 5 | 3 | 3 | 10 | 19(37,3) | 13 | 2 | 1 | 82,4 | 92,2 |
| NC | 10 | 1 | 4 | 8 | 22(43,1) | 11 | 4 | 1 | 80,4 | 96,1 |
| | 1 | - | - | 5 | 33(64,7) | 11 | 1 | 1 | 96,1 | 98,0 |
| NTC | 5 | 2 | 1 | 11 | 22(43,1) | 11 | 3 | 1 | 86,3 | 94,1 |
| | 10 | 2 | 2 | 12 | 19(37,3) | 11 | 4 | 1 | 82,4 | 94,1 |
| NDC | 1 | - | - | - | 46(90,2) | 5 | - | - | 100 | 100 |
| | 5 | - | - | 7 | 25(49,0) | 14 | 4 | 1 | 90,2 | 98,0 |
| NDC | 10 | 1 | 3 | 7 | 20(39,2) | 16 | 1 | 3 | 84,3 | 92,2 |
| | Differenz der Hemmhöhe in mm nach 72 und 96 h | | | | | | | | | |
| | | > - 2 | - 2 | - 1 | keine(%) | + 1 | + 2 | > + 2 | | |
| | | HH nach 72 h < 96 h | | | | HH nach 72 h > 96 h | | | | |
| RG | 20 | 3 | 4 | 16 | 14(27,5) | 10 | 4 | - | 78,4 | 94,1 |
| | 25 | 1 | 4 | 11 | 18(35,3) | 11 | 6 | - | 78,4 | 98,0 |
| NDC | 1 | 1 | 2 | 7 | 32(62,7) | 8 | 1 | - | 92,2 | 98,0 |
| | 5 | 1 | 3 | 14 | 19(37,3) | 10 | 2 | 2 | 84,3 | 94,1 |
| NC | 10 | 1 | 6 | 8 | 27(52,9) | 7 | 1 | 1 | 82,4 | 96,1 |
| | 1 | 1 | 1 | 1 | 37(72,5) | 10 | - | 1 | 94,1 | 96,1 |
| NDC | 5 | - | 2 | 13 | 21(41,2) | 11 | 4 | - | 88,2 | 100 |
| | 10 | 1 | 3 | 10 | 23(45,1) | 12 | 2 | - | 88,2 | 98,0 |
| NDC | 1 | - | - | 3 | 45(88,2) | 3 | - | - | 100 | 100 |
| | 5 | - | 1 | 2 | 34(66,7) | 10 | 4 | - | 90,2 | 100 |
| NDC | 10 | 1 | 4 | 5 | 22(43,1) | 15 | 2 | 2 | 82,4 | 94,1 |
| | Differenz der Hemmhöhe in mm nach 48 und 96 h | | | | | | | | | |
| | | > - 2 | - 2 | - 1 | keine(%) | + 1 | + 2 | > + 2 | | |
| | | HH nach 48 h < 96 h | | | | HH nach 48 h > 96 h | | | | |
| RG | 20 | 6 | 2 | 13 | 18(35,3) | 5 | 5 | 2 | 70,6 | 84,3 |
| | 25 | 4 | 3 | 6 | 16(31,4) | 13 | 5 | 4 | 68,6 | 84,3 |
| NDC | 1 | 3 | 6 | 8 | 19(37,3) | 13 | 1 | 1 | 78,4 | 92,2 |
| | 5 | 3 | 8 | 10 | 13(25,5) | 9 | 7 | 1 | 62,7 | 92,2 |
| NC | 10 | 5 | 5 | 9 | 13(25,5) | 13 | 4 | 2 | 68,6 | 86,3 |
| | 1 | 1 | 2 | 1 | 30(58,8) | 11 | 4 | 2 | 82,4 | 94,1 |
| NDC | 5 | 4 | 2 | 9 | 19(37,3) | 11 | 3 | 3 | 76,5 | 86,3 |
| | 10 | 4 | 5 | 8 | 14(27,5) | 11 | 8 | 1 | 64,7 | 90,2 |
| NDC | 1 | - | - | - | 45(88,2) | 5 | 1 | - | 98,0 | 100 |
| | 5 | - | 1 | 2 | 23(45,1) | 17 | 4 | 4 | 82,4 | 92,2 |
| NDC | 10 | 4 | 2 | 7 | 12(23,5) | 15 | 8 | 3 | 66,7 | 86,3 |

In den folgenden Tabellen 9 bis 15 sind die Ergebnisse der Blättchendiffusionsteste speziesbezogen für die galleresistenten und in den Tabellen 16 bis 26 für die gallesensiblen Arten dargestellt. Für jede Erregergruppe und Wirkstoffkonzentration wurden die Bereiche der HHD, die Modalwerte und die Medianwerte aufgeführt. Da bei den galleresistenten anaeroben gramnegativen Stäbchen die jeweils mit 1 mg aller drei untersuchten Gallensäuresalze sowie die mit 5 mg Natriumtaurocholat beschickten Testblättchen zumeist zu keiner Hemmhofbildung führten bzw. bestenfalls nur sehr gering dimensionierte Hemmhöfe auftraten, wurde aus Platzgründen auf deren tabellarische Ergebnisdarstellung verzichtet. Diese Konzentrationen wurden nur bei den gallesensiblen Vertretern in die Ergebnistabellen mit einbezogen.

Wie den Tabellen 9 und 10 zu entnehmen ist, zeigte die Mehrheit der galleresistenten intestinalen Stämme für Rindergalle ein bis an den Rand des Testblättchens reichendes ungehemmtes Wachstum, wobei wegen des Blättchendurchmessers von 6 mm ein HHD von 7 mm real nur einer gerade noch sichtbaren Wachstumshemmung von 0,5 mm bis zum Blättchenrand entspricht. Erwartungsgemäß fielen im Falle des Auftretens kleiner Hemmhöfe diese bei 25 mg Galle etwas größer aus als bei der Blättchenkonzentration von 20 mg. Ausnahmen hiervon betrafen zahlreiche der 40 untersuchten Stämme von *Bacteroides uniformis* sowie die beiden Stämme von *B. splanchnicus*. Dies ist vor allem für die Erkennung von *B. uniformis* – zu den als galleresistent geltenden intestinalen Spezies gehörend – bedeutungsvoll, da dieser im Gegensatz zu *B. splanchnicus* häufig in klinischen Patientenmaterialien angetroffen wird. Immerhin variierte der Bereich der Hemmhöfe für Blättchen mit 20 bzw. 25 mg Galle zwischen 0 – 17 bzw. 0 – 18 mm Durchmesser bei einem Medianwert von 9,2 bzw. 10 mm. Wie weiter unten beschrieben, spielt dies für die Abgrenzung der indolpositiven Art *B. uniformis* zu der gallesensiblen und ebenfalls indolpositiven Spezies *Prevotella heparinolytica* in der Routinediagnostik eine nicht zu unterschätzende Rolle.

Tabelle 9: Ergebnisse der Resistenzbestimmungen von 120 galleresistenten Stämmen im Blättchendiffusionstest gegenüber Galle 20 mg. Die Zahlenangaben in den drei rechten Spalten betreffen die Hemmhofdurchmesser in mm.

| Bakterienart | Anzahl | Bereich | Modalwert | Medianwert |
|-------------------------------------|---------------|----------------|------------------|-------------------|
| <i>Bacteroides fragilis</i> | 27 | 0,0 – 10,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> | 10 | 0,0 – 8,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Bacteroides ovatus</i> | 6 | 0,0 | 0,0 | |
| <i>Bacteroides uniformis</i> | 40 | 0,0 – 17,0 | 0,0* | 9,2 |
| <i>Bacteroides distasonis</i> | 3 | 0,0 | 0,0 | |
| <i>Bacteroides vulgatus</i> | 3 | 7,0 – 9,0 | 7,0* | 8,0 |
| <i>Bacteroides eggerthii</i> | 3 | 0,0 – 10,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Bacteroides splanchnicus</i> | 2 | 10,0 – 23,0 | | |
| <i>Bacteroides stercoris</i> | 1 | 10,0 | | |
| <i>Bacteroides merdae</i> | 1 | 0,0 | | |
| <i>Bacteroides caccae</i> | 1 | 0,0 | | |
| <i>Fusobacterium varium</i> | 19 | 0,0 – 8,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Fusobacterium mortiferum</i> | 4 | 0,0 – 7,0 | 0,0* | 3,5 |
| Gesamt | 120 | | | |

* Wenn mehrere Modalwerte vorhanden sind, wird der kleinste angezeigt. Gilt auch für die Tabellen 10 bis 26.

Tabelle 10: Ergebnisse der Resistenzbestimmungen von 120 galleresistenten Stämmen im Blättchendiffusionstest gegenüber Galle 25 mg. Die Zahlenangaben in den drei rechten Spalten betreffen die Hemmhofdurchmesser in mm.

| Bakterienart | Anzahl | Bereich | Modalwert | Medianwert |
|-------------------------------------|---------------|----------------|------------------|-------------------|
| <i>Bacteroides fragilis</i> | 27 | 0,0 – 12,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> | 10 | 0,0 – 8,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Bacteroides ovatus</i> | 6 | 0,0 – 7,5 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Bacteroides uniformis</i> | 40 | 0,0 – 18,0 | 10,0 | 10,0 |
| <i>Bacteroides distasonis</i> | 3 | 0,0 | 0,0 | |
| <i>Bacteroides vulgatus</i> | 3 | 0,0 – 10,0 | 8,0* | 9,0 |
| <i>Bacteroides eggerthii</i> | 3 | 0,0 – 11,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Bacteroides splanchnicus</i> | 2 | 10,0 – 23,0 | | |
| <i>Bacteroides stercoris</i> | 1 | 10,0 | | |
| <i>Bacteroides merdae</i> | 1 | 0,0 | | |
| <i>Bacteroides caccae</i> | 1 | 0,0 | | |
| <i>Fusobacterium varium</i> | 19 | 0,0 – 8,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Fusobacterium mortiferum</i> | 4 | 0,0 – 10,0 | 0,0 | 3,5 |
| Gesamt | 120 | | | |

Zu vergleichbaren Resultaten führt die Verwendung von Blättchen, die mit Gallensäuresalzen anstatt mit Rindergalle beschickt waren. Dies ist in den Tabellen 11 bis 15 ausgewiesen. Der Vergleich der einzelnen Natriumsalze zeigt, dass Natriumdesoxycholat (Tabellen 11 und 12) zu nur sehr geringfügig größeren HHD führte als Natriumcholat (Tabellen 13 und 14) und dieses wiederum stärker wirkte als Natriumtaurocholat (Tabelle 15), wobei in allen Fällen höhere Blättchenkonzentrationen mit größeren HHD parallel gingen. Die größten HHD waren wiederum bei *B. uniformis* bzw. *B. splanchnicus* anzutreffen. Mit vereinzelt Maximalwerten von immerhin 16 bzw. 18,5 mm für 5 bzw. 10 mg Natriumdesoxycholat (Tabellen 11 und 12) oder 13 mm bzw. 16 mm für 5 bzw. 10 mg Natriumcholat (Tabellen 13 und 14) wurden für galleresistente Spezies HHD ungewöhnlicher Dimensionierung erreicht, die allerdings gut mit denen übereinstimmten, die bei Verwendung von Rindergalle erhalten wurden. Geringfügig kleinere Abmessungen der größten HHD fanden sich vergleichsweise bei *B. splanchnicus*. Bei Verwendung von Testblättchen mit 10 mg Natriumtaurocholat waren für beide Spezies die HHD deutlich geringer (Tabelle 15).

Tabelle 11: Ergebnisse der Resistenzbestimmungen von 120 galleresistenten Stämmen im Blättchendiffusionstest gegenüber Natriumdesoxycholat 5 mg. Die Zahlenangaben in den drei rechten Spalten betreffen die Hemmhofdurchmesser in mm.

| Bakterienart | Anzahl | Bereich | Modalwert | Medianwert |
|-------------------------------------|---------------|----------------|------------------|-------------------|
| <i>Bacteroides fragilis</i> | 27 | 0,0 – 8,5 | 0,0 | 7,0 |
| <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> | 10 | 0,0 – 10,0 | 8,0 | 7,8 |
| <i>Bacteroides ovatus</i> | 6 | 0,0 – 7,0 | 0,0* | 3,5 |
| <i>Bacteroides uniformis</i> | 40 | 0,0 – 18,0 | 9,0 | 9,0 |
| <i>Bacteroides distasonis</i> | 3 | 7,0 – 7,5 | 7,0 | 7,0 |
| <i>Bacteroides vulgatus</i> | 3 | 8,0 – 9,0 | 9,0 | 9,0 |
| <i>Bacteroides eggerthii</i> | 3 | 7,0 – 9,5 | 7,0* | 8,0 |
| <i>Bacteroides splanchnicus</i> | 2 | 11,0 | | |
| <i>Bacteroides stercoris</i> | 1 | 10,0 | | |
| <i>Bacteroides merdae</i> | 1 | 0,0 | | |
| <i>Bacteroides caccae</i> | 1 | 8,0 | | |
| <i>Fusobacterium varium</i> | 19 | 0,0 – 7,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Fusobacterium mortiferum</i> | 4 | 0,0 | 0,0 | |
| Gesamt | 120 | | | |

Tabelle 12: Ergebnisse der Resistenzbestimmungen von 120 galleresistenten Stämmen im Blättchendiffusionstest gegenüber Natriumdesoxycholat 10 mg. Die Zahlenangaben in den drei rechten Spalten betreffen die Hemmhofdurchmesser in mm.

| Bakterienart | Anzahl | Bereich | Modalwert | Medianwert |
|-------------------------------------|---------------|----------------|------------------|-------------------|
| <i>Bacteroides fragilis</i> | 27 | 0,0 – 10,0 | 8,0 | 8,0 |
| <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> | 10 | 0,0 – 10,0 | 10,0 | 9,2 |
| <i>Bacteroides ovatus</i> | 6 | 7,0 – 10,0 | 8,0 | 8,0 |
| <i>Bacteroides uniformis</i> | 40 | 7,0 – 18,5 | 10,0 | 9,8 |
| <i>Bacteroides distasonis</i> | 3 | 7,0 – 9,0 | 7,0* | 8,0 |
| <i>Bacteroides vulgatus</i> | 3 | 9,0 | 9,0 | |
| <i>Bacteroides eggerthii</i> | 3 | 8,0 – 10,5 | 8,0* | 9,0 |
| <i>Bacteroides splanchnicus</i> | 2 | 11,0 – 15,0 | | |
| <i>Bacteroides stercoris</i> | 1 | 10,0 | | |
| <i>Bacteroides merdae</i> | 1 | 0,0 | | |
| <i>Bacteroides caccae</i> | 1 | 9,0 | | |
| <i>Fusobacterium varium</i> | 19 | 0,0 – 9,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Fusobacterium mortiferum</i> | 4 | 0,0 – 10,0 | 0,0* | 5,0 |
| Gesamt | 120 | | | |

Tabelle 13: Ergebnisse der Resistenzbestimmungen von 120 galleresistenten Stämmen im Blättchendiffusionstest gegenüber Natriumcholat 5 mg. Die Zahlenangaben in den drei rechten Spalten betreffen die Hemmhofdurchmesser in mm.

| Bakterienart | Anzahl | Bereich | Modalwert | Medianwert |
|-------------------------------------|---------------|----------------|------------------|-------------------|
| <i>Bacteroides fragilis</i> | 27 | 0,0 – 7,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> | 10 | 0,0 – 7,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Bacteroides ovatus</i> | 6 | 0,0 – 7,0 | 0,0* | 3,5 |
| <i>Bacteroides uniformis</i> | 40 | 0,0 – 13,0 | 7,0 | 8,0 |
| <i>Bacteroides distasonis</i> | 3 | 0,0 – 7,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Bacteroides vulgatus</i> | 3 | 7,0 – 9,0 | 7,0* | 7,5 |
| <i>Bacteroides eggerthii</i> | 3 | 0,0 – 9,0 | 0,0* | 7,0 |
| <i>Bacteroides splanchnicus</i> | 2 | 11,0 – 12,0 | | |
| <i>Bacteroides stercoris</i> | 1 | 7,0 | | |
| <i>Bacteroides merdae</i> | 1 | 0,0 | | |
| <i>Bacteroides caccae</i> | 1 | 0,0 | | |
| <i>Fusobacterium varium</i> | 19 | 0,0 – 8,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Fusobacterium mortiferum</i> | 4 | 0,0 – 8,5 | 0,0 | 0,0 |
| Gesamt | 120 | | | |

Tabelle 14: Ergebnisse der Resistenzbestimmungen von 120 galleresistenten Stämmen im Blättchendiffusionstest gegenüber Natriumcholat 10 mg. Die Zahlenangaben in den drei rechten Spalten betreffen die Hemmhofdurchmesser in mm.

| Bakterienart | Anzahl | Bereich | Modalwert | Medianwert |
|-------------------------------------|---------------|----------------|------------------|-------------------|
| <i>Bacteroides fragilis</i> | 27 | 0,0 – 12,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> | 10 | 0,0 – 10,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Bacteroides ovatus</i> | 6 | 0,0 – 9,0 | 0,0 | 4,2 |
| <i>Bacteroides uniformis</i> | 40 | 0,0 – 16,0 | 12,0 | 11,0 |
| <i>Bacteroides distasonis</i> | 3 | 0,0 – 8,0 | 0,0* | 7,0 |
| <i>Bacteroides vulgatus</i> | 3 | 8,5 – 11,0 | 8,5* | 10,0 |
| <i>Bacteroides eggerthii</i> | 3 | 7,0 – 12,0 | 7,0* | 10,0 |
| <i>Bacteroides splanchnicus</i> | 2 | 12,0 – 16,0 | | |
| <i>Bacteroides stercoris</i> | 1 | 8,0 | | |
| <i>Bacteroides merdae</i> | 1 | 0,0 | | |
| <i>Bacteroides caccae</i> | 1 | 8,0 | | |
| <i>Fusobacterium varium</i> | 19 | 0,0 – 10,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Fusobacterium mortiferum</i> | 4 | 8,0 – 12,0 | 12,0 | 10,5 |
| Gesamt | 120 | | | |

Tabelle 15: Ergebnisse der Resistenzbestimmungen von 120 galleresistenten Stämmen im Blättchendiffusionstest gegenüber Natriumtaurocholat 10 mg. Die Zahlenangaben in den drei rechten Spalten betreffen die Hemmhofdurchmesser in mm.

| Bakterienart | Anzahl | Bereich | Modalwert | Medianwert |
|-------------------------------------|---------------|----------------|------------------|-------------------|
| <i>Bacteroides fragilis</i> | 27 | 0,0 | 0,0 | |
| <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> | 10 | 0,0 | 0,0 | |
| <i>Bacteroides ovatus</i> | 6 | 0,0 | 0,0 | |
| <i>Bacteroides uniformis</i> | 40 | 0,0 – 11,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Bacteroides distasonis</i> | 3 | 0,0 | 0,0 | |
| <i>Bacteroides vulgatus</i> | 3 | 0,0 | 0,0 | |
| <i>Bacteroides eggerthii</i> | 3 | 0,0 – 7,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Bacteroides splanchnicus</i> | 2 | 7,0 – 13,0 | | |
| <i>Bacteroides stercoris</i> | 1 | 0,0 | | |
| <i>Bacteroides merdae</i> | 1 | 0,0 | | |
| <i>Bacteroides caccae</i> | 1 | 0,0 | | |
| <i>Fusobacterium varium</i> | 19 | 0,0 – 9,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Fusobacterium mortiferum</i> | 4 | 0,0 – 10,0 | 0,0 | 0,0 |
| Gesamt | 120 | | | |

Eindeutig größer dimensionierte Hemmhöfe erbrachten die Diffusionsteste bei der überwiegenden Mehrheit der gallesensiblen anaeroben gramnegativen Stäbchen, sowohl für Rindergalle (Tabellen 16 und 17) als auch für die Gallensäuresalze (Tabellen 18 bis 26). Zwar zeigten die schwarzpigmentierten Stämme der Genera *Porphyromonas* und *Prevotella* mehrheitlich etwas größere HHD als die Vertreter der nichtpigmentierten *Prevotella*-Spezies bzw. der *Fusobakterien*, doch galt dies nicht generell. Es betraf die Testung gegen Galle bzw. die Gallensäuresalze gleichermaßen. Im Durchschnitt wurden bei einer Konzentration von 10 mg etwas größere HHD durch Natriumcholat (Tabelle 23), gefolgt von Natriumdesoxycholat (Tabelle 20), gebildet. Bei den Blättchenkonzentrationen 5 mg und 1 mg zeigte hingegen Natriumdesoxycholat (Tabellen 18 und 19) im Durchschnitt geringfügig größere HHD. Allerdings konnten bei manchen Spezies vereinzelt auch davon abweichende Ergebnisse erzielt werden. Die kleinsten HHD bei allen Blättchenkonzentrationen wies Natriumtaurocholat (Tabellen 24 bis 26) auf.

Die Abhängigkeit der HHD von der Blättchenkonzentration blieb weitgehend gewahrt. Bei dem Vergleich der Bereiche der HHD zeigten sich aber auch Überschneidungen bezüglich der größten Werte für die galleresistenten und den geringsten Werten für die gallesensiblen Spezies, was die Festlegung von Grenzwerten für die Zuordnung zu einer der beiden Gruppen natürlich erschwert. So fanden sich beispielsweise für 10 mg Natriumcholat u.a. minimale HHD von 15 mm für die gallesensiblen Spezies *P. buccae* und *P. oris* (Tabelle 23), während der größte HHD der galleresistenten Spezies *B. uniformis* diesen Wert bei der gleichen Konzentration der gleichen Testsubstanz mit 16 mm knapp übertraf (Tabelle 14). Weitere Beispiele dieser Art ließen sich auch für die Galle selbst sowie für andere Konzentrationsvergleiche aufführen.

Tabelle 16: Ergebnisse der Resistenzbestimmungen von 196 gallesensiblen Stämmen im Blättchendiffusionstest gegenüber Galle 20 mg. Die Zahlenangaben in den drei rechten Spalten betreffen die Hemmhofdurchmesser in mm.

| Bakterienart | Anzahl | Bereich | Modalwert | Medianwert |
|--------------------------------------|--------|-------------|-----------|------------|
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 8 | 19,0 – 33,0 | 29,0 | 29,0 |
| <i>Porphyromonas endodontalis</i> | 5 | 28,0 – 41,0 | 28,0 | 31,0 |
| <i>Porphyromonas assacharolytica</i> | 7 | 20,0 – 33,0 | 30,0 | 30,0 |
| <i>Porphyromonas levii</i> | 2 | 23,0 – 27,0 | | |
| <i>Prevotella intermedia</i> | 20 | 21,0 – 32,0 | 24,0 | 24,5 |
| <i>Prevotella nigrescens</i> | 6 | 16,0 – 23,0 | 22,0 | 21,8 |
| <i>Prevotella melaninogenica</i> | 10 | 20,0 – 31,0 | 26,0* | 26,0 |
| <i>Prevotella loescheii</i> | 3 | 22,0 – 29,0 | 22,0* | 25,0 |
| <i>Prevotella corporis</i> | 2 | 25,0 – 27,0 | | |
| <i>Prevotella denticola</i> | 1 | 31,0 | | |
| <i>Prevotella heparinolytica</i> | 24 | 18,0 – 31,0 | 24,0 | 24,0 |
| <i>Prevotella zoogloformans</i> | 4 | 17,0 – 23,0 | 17,0* | 22,2 |
| <i>Prevotella bivia</i> | 14 | 13,0 – 25,5 | 17,0* | 18,8 |
| <i>Prevotella disiens</i> | 1 | 17,0 | | |
| <i>Prevotella buccae</i> | 9 | 13,5 – 27,0 | 16,0* | 17,0 |
| <i>Prevotella oris</i> | 12 | 17,0 – 29,0 | 21,0 | 22,5 |
| <i>Prevotella oralis</i> | 4 | 20,0 – 26,0 | 20,0* | 22,5 |
| <i>Prevotella buccalis</i> | 2 | 15,0 – 20,0 | | |
| <i>Bacteroides capillosus</i> | 1 | 17,0 | | |
| <i>Bacteroides gracilis</i> | 1 | 10,0 | | |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | 32 | 10,5 – 30,0 | 22,0 | 19,0 |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> ** | 28 | 12,0 – 20,0 | 14,0 | 16,0 |
| Gesamt | 196 | | | |

** *F. necrophorum* zeigt ein unterschiedliches Verhalten gegenüber Galle. Gilt auch für die Tabellen 17 bis 26.

Tabelle 17: Ergebnisse der Resistenzbestimmungen von 196 gallesensiblen Stämmen im Blättchendiffusionstest gegenüber Galle 25 mg. Die Zahlenangaben in den drei rechten Spalten betreffen die Hemmhofdurchmesser in mm.

| Bakterienart | Anzahl | Bereich | Modalwert | Medianwert |
|--------------------------------------|--------|-------------|-----------|------------|
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 8 | 22,0 – 36,0 | 32,0 | 31,5 |
| <i>Porphyromonas endodontalis</i> | 5 | 30,0 – 41,0 | 30,0* | 31,0 |
| <i>Porphyromonas assacharolytica</i> | 7 | 22,0 – 35,0 | 34,0 | 33,0 |
| <i>Porphyromonas levii</i> | 2 | 25,0 – 27,0 | | |
| <i>Prevotella intermedia</i> | 20 | 21,0 – 33,0 | 23,0* | 26,5 |
| <i>Prevotella nigrescens</i> | 6 | 17,0 – 26,0 | 17,0* | 24,2 |
| <i>Prevotella melaninogenica</i> | 10 | 22,0 – 33,0 | 29,0* | 28,5 |
| <i>Prevotella loescheii</i> | 3 | 25,0 – 31,0 | 25,0 | 25,0 |
| <i>Prevotella corporis</i> | 2 | 26,0 – 28,5 | | |
| <i>Prevotella denticola</i> | 1 | 35,0 | | |
| <i>Prevotella heparinolytica</i> | 24 | 22,0 – 33,0 | 23,0* | 26,0 |
| <i>Prevotella zoogloformans</i> | 4 | 18,5 – 26,0 | 18,5* | 24,2 |
| <i>Prevotella bivia</i> | 14 | 14,0 – 26,0 | 20,0 | 20,0 |
| <i>Prevotella disiens</i> | 1 | 18,0 | | |
| <i>Prevotella buccae</i> | 9 | 15,5 – 28,0 | 22,0 | 20,0 |
| <i>Prevotella oris</i> | 12 | 18,0 – 30,0 | 23,0* | 23,8 |
| <i>Prevotella oralis</i> | 4 | 22,0 – 28,0 | 22,0* | 24,0 |
| <i>Prevotella buccalis</i> | 2 | 16,0 – 22,0 | | |
| <i>Bacteroides capillosus</i> | 1 | 20,0 | | |
| <i>Bacteroides gracilis</i> | 1 | 10,0 | | |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | 32 | 12,0 – 33,0 | 12,0 | 20,5 |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> ** | 28 | 12,0 – 20,5 | 15,0 | 17,5 |
| Gesamt | 196 | | | |

Tabelle 18: Ergebnisse der Resistenzbestimmungen von 196 gallesensiblen Stämmen im Blättchendiffusionstest gegenüber Natriumdesoxycholat 1 mg. Die Zahlenangaben in den drei rechten Spalten betreffen die HHD in mm.

| Bakterienart | Anzahl | Bereich | Modalwert | Medianwert |
|--------------------------------------|---------------|----------------|------------------|-------------------|
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 8 | 12,0 – 22,0 | 16,0 | 16,0 |
| <i>Porphyromonas endodontalis</i> | 5 | 13,0 – 29,0 | 13,0* | 19,5 |
| <i>Porphyromonas assacharolytica</i> | 7 | 9,0 – 21,0 | 17,0 | 17,0 |
| <i>Porphyromonas levii</i> | 2 | 13,0 – 15,0 | | |
| <i>Prevotella intermedia</i> | 20 | 10,5 – 27,0 | 15,0 | 15,0 |
| <i>Prevotella nigrescens</i> | 6 | 8,0 – 17,0 | 8,0* | 12,2 |
| <i>Prevotella melaninogenica</i> | 10 | 11,0 – 18,0 | 14,0* | 14,5 |
| <i>Prevotella loescheii</i> | 3 | 12,0 – 20,0 | 12,0* | 14,5 |
| <i>Prevotella corporis</i> | 2 | 15,0 – 16,0 | | |
| <i>Prevotella denticola</i> | 1 | 17,0 | | |
| <i>Prevotella heparinolytica</i> | 24 | 11,0 – 19,0 | 13,0 | 13,0 |
| <i>Prevotella zoogloformans</i> | 4 | 10,0 – 17,0 | 10,0* | 14,5 |
| <i>Prevotella bivia</i> | 14 | 8,0 – 14,0 | 11,0 | 11,0 |
| <i>Prevotella disiens</i> | 1 | 10,0 | | |
| <i>Prevotella buccae</i> | 9 | 7,0 – 14,5 | 8,0* | 9,0 |
| <i>Prevotella oris</i> | 12 | 10,0 – 18,0 | 18,0 | 13,5 |
| <i>Prevotella oralis</i> | 4 | 9,0 – 14,5 | 12,0 | 11,0 |
| <i>Prevotella buccalis</i> | 2 | 10,0 – 11,0 | | |
| <i>Bacteroides capillosus</i> | 1 | 12,0 | | |
| <i>Bacteroides gracilis</i> | 1 | 7,0 | | |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | 32 | 0,0 – 11,0 | 8,0 | 8,0 |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> ** | 28 | 0,0 – 11,0 | 0,0 | 0,0 |
| Gesamt | 196 | | | |

Tabelle 19: Ergebnisse der Resistenzbestimmungen von 196 gallesensiblen Stämmen im Blättchendiffusionstest gegenüber Natriumdesoxycholat 5 mg. Die Zahlenangaben in den drei rechten Spalten betreffen die HHD in mm.

| Bakterienart | Anzahl | Bereich | Modalwert | Medianwert |
|--------------------------------------|---------------|----------------|------------------|-------------------|
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 8 | 16,0 – 27,0 | 23,0* | 23,5 |
| <i>Porphyromonas endodontalis</i> | 5 | 21,0 – 31,5 | 31,0 | 31,0 |
| <i>Porphyromonas assacharolytica</i> | 7 | 12,0 – 25,0 | 24,0 | 24,0 |
| <i>Porphyromonas levii</i> | 2 | 16,0 – 21,0 | | |
| <i>Prevotella intermedia</i> | 20 | 14,0 – 30,0 | 19,0* | 19,5 |
| <i>Prevotella nigrescens</i> | 6 | 12,0 – 23,0 | 17,0 | 17,0 |
| <i>Prevotella melaninogenica</i> | 10 | 15,0 – 26,0 | 19,0 | 19,0 |
| <i>Prevotella loescheii</i> | 3 | 16,0 – 25,0 | 16,0* | 21,0 |
| <i>Prevotella corporis</i> | 2 | 18,0 – 20,5 | | |
| <i>Prevotella denticola</i> | 1 | 23,0 | | |
| <i>Prevotella heparinolytica</i> | 24 | 17,5 – 28,0 | 23,0 | 21,8 |
| <i>Prevotella zoogloformans</i> | 4 | 13,0 – 23,0 | 13,0* | 20,2 |
| <i>Prevotella bivia</i> | 14 | 10,0 – 17,5 | 12,0* | 13,8 |
| <i>Prevotella disiens</i> | 1 | 15,0 | | |
| <i>Prevotella buccae</i> | 9 | 10,0 – 20,0 | 10,0 | 12,0 |
| <i>Prevotella oris</i> | 12 | 13,0 – 24,0 | 18,0 | 18,0 |
| <i>Prevotella oralis</i> | 4 | 15,0 – 17,0 | 15,0 | 15,8 |
| <i>Prevotella buccalis</i> | 2 | 12,0 – 16,0 | | |
| <i>Bacteroides capillosus</i> | 1 | 17,0 | | |
| <i>Bacteroides gracilis</i> | 1 | 7,0 | | |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | 32 | 7,0 – 16,0 | 9,0 | 10,5 |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> ** | 28 | 0,0 – 12,0 | 8,0 | 9,0 |
| Gesamt | 196 | | | |

Tabelle 20: Ergebnisse der Resistenzbestimmungen von 196 gallesensiblen Stämmen im Blättchendiffusionstest gegenüber Natriumdesoxycholat 10 mg. Die Zahlenangaben in den drei rechten Spalten betreffen die HHD in mm.

| Bakterienart | Anzahl | Bereich | Modalwert | Medianwert |
|--------------------------------------|---------------|----------------|------------------|-------------------|
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 8 | 22,0 – 28,0 | 28,0 | 25,5 |
| <i>Porphyromonas endodontalis</i> | 5 | 23,0 – 35,0 | 35,0 | 33,0 |
| <i>Porphyromonas assacharolytica</i> | 7 | 16,0 – 27,0 | 27,0 | 27,0 |
| <i>Porphyromonas levii</i> | 2 | 21,0 – 23,0 | | |
| <i>Prevotella intermedia</i> | 20 | 19,0 – 34,0 | 22,0* | 24,0 |
| <i>Prevotella nigrescens</i> | 6 | 16,0 – 25,0 | 21,0 | 21,0 |
| <i>Prevotella melaninogenica</i> | 10 | 20,0 – 30,0 | 23,0 | 23,5 |
| <i>Prevotella loescheii</i> | 3 | 20,0 – 34,0 | 20,0* | 22,0 |
| <i>Prevotella corporis</i> | 2 | 23,0 – 24,0 | | |
| <i>Prevotella denticola</i> | 1 | 30,0 | | |
| <i>Prevotella heparinolytica</i> | 24 | 19,0 – 30,0 | 33,0 | 23,8 |
| <i>Prevotella zooglooformans</i> | 4 | 14,0 – 24,0 | 14,0* | 21,8 |
| <i>Prevotella bivia</i> | 14 | 12,0 – 20,0 | 16,0 | 15,8 |
| <i>Prevotella disiens</i> | 1 | 18,0 | | |
| <i>Prevotella buccae</i> | 9 | 12,5 – 24,0 | 13,0* | 14,0 |
| <i>Prevotella oris</i> | 12 | 15,5 – 25,0 | 19,5 | 19,0 |
| <i>Prevotella oralis</i> | 4 | 15,5 – 21,0 | 15,5* | 18,5 |
| <i>Prevotella buccalis</i> | 2 | 13,0 – 17,0 | | |
| <i>Bacteroides capillosus</i> | 1 | 18,0 | | |
| <i>Bacteroides gracilis</i> | 1 | 8,0 | | |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | 32 | 7,0 – 21,0 | 12,0 | 15,0 |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> ** | 28 | 10,0 – 19,0 | 12,0* | 12,5 |
| Gesamt | 196 | | | |

Tabelle 21: Ergebnisse der Resistenzbestimmungen von 196 gallesensiblen Stämmen im Blättchendiffusionstest gegenüber Natriumcholat 1 mg. Die Zahlenangaben in den drei rechten Spalten betreffen die HHD in mm.

| Bakterienart | Anzahl | Bereich | Modalwert | Medianwert |
|--------------------------------------|---------------|----------------|------------------|-------------------|
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 8 | 8,0 – 15,0 | 8,0* | 9,5 |
| <i>Porphyromonas endodontalis</i> | 5 | 0,0 – 17,0 | 0,0* | 12,0 |
| <i>Porphyromonas assacharolytica</i> | 7 | 0,0 – 20,0 | 0,0* | 11,0 |
| <i>Porphyromonas levii</i> | 2 | 0,0 – 12,0 | | |
| <i>Prevotella intermedia</i> | 20 | 0,0 – 18,0 | 9,0 | 9,5 |
| <i>Prevotella nigrescens</i> | 6 | 7,0 – 10,0 | 8,0 | 8,0 |
| <i>Prevotella melaninogenica</i> | 10 | 0,0 – 11,0 | 8,0 | 8,0 |
| <i>Prevotella loescheii</i> | 3 | 0,0 – 11,0 | 0,0* | 8,0 |
| <i>Prevotella corporis</i> | 2 | 10,5 – 11,0 | | |
| <i>Prevotella denticola</i> | 1 | 21,0 | | |
| <i>Prevotella heparinolytica</i> | 24 | 0,0 – 10,0 | 7,0 | 7,0 |
| <i>Prevotella zooglooformans</i> | 4 | 0,0 – 10,0 | 0,0* | 7,5 |
| <i>Prevotella bivia</i> | 14 | 0,0 – 10,0 | 8,0 | 8,0 |
| <i>Prevotella disiens</i> | 1 | 8,0 | | |
| <i>Prevotella buccae</i> | 9 | 0,0 – 9,0 | 0,0 | 7,0 |
| <i>Prevotella oris</i> | 12 | 8,0 – 12,0 | 9,0 | 9,0 |
| <i>Prevotella oralis</i> | 4 | 0,0 – 9,5 | 0,0* | 7,8 |
| <i>Prevotella buccalis</i> | 2 | 8,0 | | |
| <i>Bacteroides capillosus</i> | 1 | 8,5 | | |
| <i>Bacteroides gracilis</i> | 1 | 0,0 | | |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | 32 | 0,0 – 19,0 | 9,0* | 11,0 |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> ** | 28 | 0,0 – 12,0 | 11,0 | 10,0 |
| Gesamt | 196 | | | |

Tabelle 22: Ergebnisse der Resistenzbestimmungen von 196 gallesensiblen Stämmen im Blättchendiffusionstest gegenüber Natriumcholat 5 mg. Die Zahlenangaben in den drei rechten Spalten betreffen die HHD in mm.

| Bakterienart | Anzahl | Bereich | Modalwert | Medianwert |
|--------------------------------------|---------------|----------------|------------------|-------------------|
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 8 | 13,0 – 28,0 | 13,0* | 23,8 |
| <i>Porphyromonas endodontalis</i> | 5 | 22,0 – 36,0 | 22,0* | 25,0 |
| <i>Porphyromonas assacharolytica</i> | 7 | 14,0 – 32,0 | 24,0 | 24,0 |
| <i>Porphyromonas levii</i> | 2 | 20,0 – 24,0 | | |
| <i>Prevotella intermedia</i> | 20 | 14,0 – 24,0 | 16,0 | 18,0 |
| <i>Prevotella nigrescens</i> | 6 | 13,0 – 16,0 | 14,5 | 14,5 |
| <i>Prevotella melaninogenica</i> | 10 | 15,0 – 24,0 | 18,0* | 18,5 |
| <i>Prevotella loescheii</i> | 3 | 15,0 – 20,0 | 15,0* | 16,5 |
| <i>Prevotella corporis</i> | 2 | 20,0 | | |
| <i>Prevotella denticola</i> | 1 | 23,0 | | |
| <i>Prevotella heparinolytica</i> | 24 | 10,0 – 19,0 | 13,0 | 13,0 |
| <i>Prevotella zooglooformans</i> | 4 | 11,5 – 16,0 | 11,5* | 13,8 |
| <i>Prevotella bivia</i> | 14 | 10,0 – 22,0 | 13,0 | 13,8 |
| <i>Prevotella disiens</i> | 1 | 13,0 | | |
| <i>Prevotella buccae</i> | 9 | 10,5 – 20,0 | 12,0 | 12,0 |
| <i>Prevotella oris</i> | 12 | 12,5 – 19,5 | 18,0 | 18,0 |
| <i>Prevotella oralis</i> | 4 | 12,0 – 16,0 | 12,0* | 14,5 |
| <i>Prevotella buccalis</i> | 2 | 13,0 – 15,0 | | |
| <i>Bacteroides capillosus</i> | 1 | 13,0 | | |
| <i>Bacteroides gracilis</i> | 1 | 9,0 | | |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | 32 | 10,0 – 27,0 | 10,0* | 14,8 |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> ** | 28 | 10,5 – 17,0 | 12,0 | 12,0 |
| Gesamt | 196 | | | |

Tabelle 23: Ergebnisse der Resistenzbestimmungen von 196 gallesensiblen Stämmen im Blättchendiffusionstest gegenüber Natriumcholat 10 mg. Die Zahlenangaben in den drei rechten Spalten betreffen die HHD in mm.

| Bakterienart | Anzahl | Bereich | Modalwert | Medianwert |
|--------------------------------------|---------------|----------------|------------------|-------------------|
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 8 | 21,0 – 32,0 | 32,0 | 28,5 |
| <i>Porphyromonas endodontalis</i> | 5 | 28,5 – 41,0 | 28,5* | 31,0 |
| <i>Porphyromonas assacharolytica</i> | 7 | 24,0 – 39,0 | 24,0* | 28,0 |
| <i>Porphyromonas levii</i> | 2 | 22,0 – 27,0 | | |
| <i>Prevotella intermedia</i> | 20 | 21,0 – 29,0 | 23,0 | 24,8 |
| <i>Prevotella nigrescens</i> | 6 | 19,0 – 23,0 | 21,0 | 21,0 |
| <i>Prevotella melaninogenica</i> | 10 | 20,0 – 33,0 | 20,0* | 25,0 |
| <i>Prevotella loescheii</i> | 3 | 19,0 – 24,0 | 19,0* | 22,0 |
| <i>Prevotella corporis</i> | 2 | 24,0 – 26,0 | | |
| <i>Prevotella denticola</i> | 1 | 30,0 | | |
| <i>Prevotella heparinolytica</i> | 24 | 17,0 – 26,5 | 19,0* | 21,0 |
| <i>Prevotella zooglooformans</i> | 4 | 17,0 – 21,0 | 17,0 | 17,2 |
| <i>Prevotella bivia</i> | 14 | 12,5 – 25,0 | 16,0* | 17,0 |
| <i>Prevotella disiens</i> | 1 | 17,0 | | |
| <i>Prevotella buccae</i> | 9 | 15,0 – 26,0 | 18,0 | 17,0 |
| <i>Prevotella oris</i> | 12 | 15,0 – 27,0 | 23,0 | 23,0 |
| <i>Prevotella oralis</i> | 4 | 19,0 – 23,0 | 19,0* | 20,2 |
| <i>Prevotella buccalis</i> | 2 | 16,0 – 19,0 | | |
| <i>Bacteroides capillosus</i> | 1 | 16,0 | | |
| <i>Bacteroides gracilis</i> | 1 | 11,0 | | |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | 32 | 13,0 – 38,0 | 26,0 | 24,0 |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> ** | 28 | 13,0 – 23,0 | 20,0 | 19,5 |
| Gesamt | 196 | | | |

Tabelle 24: Ergebnisse der Resistenzbestimmungen von 196 gallesensiblen Stämmen im Blättchendiffusionstest gegenüber Natriumtaurocholat 1 mg. Die Zahlenangaben in den drei rechten Spalten betreffen die HHD in mm.

| Bakterienart | Anzahl | Bereich | Modalwert | Medianwert |
|--------------------------------------|--------|------------|-----------|------------|
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 8 | 0,0 | 0,0 | |
| <i>Porphyromonas endodontalis</i> | 5 | 0,0 – 7,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Porphyromonas assacharolytica</i> | 7 | 0,0 – 15,0 | 0,0 | 8,0 |
| <i>Porphyromonas levii</i> | 2 | 0,0 | | |
| <i>Prevotella intermedia</i> | 20 | 0,0 – 9,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Prevotella nigrescens</i> | 6 | 0,0 – 7,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Prevotella melaninogenica</i> | 10 | 0,0 – 10,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Prevotella loescheii</i> | 3 | 0,0 | 0,0 | |
| <i>Prevotella corporis</i> | 2 | 0,0 | | |
| <i>Prevotella denticola</i> | 1 | 0,0 | | |
| <i>Prevotella heparinolytica</i> | 24 | 0,0 | 0,0 | |
| <i>Prevotella zooglooformans</i> | 4 | 0,0 | 0,0 | |
| <i>Prevotella bivia</i> | 14 | 0,0 – 7,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Prevotella disiens</i> | 1 | 0,0 | | |
| <i>Prevotella buccae</i> | 9 | 0,0 | 0,0 | |
| <i>Prevotella oris</i> | 12 | 0,0 – 7,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Prevotella oralis</i> | 4 | 0,0 | 0,0 | |
| <i>Prevotella buccalis</i> | 2 | 0,0 | | |
| <i>Bacteroides capillosus</i> | 1 | 0,0 | | |
| <i>Bacteroides gracilis</i> | 1 | 0,0 | | |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | 32 | 0,0 – 12,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> ** | 28 | 0,0 – 8,0 | 0,0 | 0,0 |
| Gesamt | 196 | | | |

Tabelle 25: Ergebnisse der Resistenzbestimmungen von 196 gallesensiblen Stämmen im Blättchendiffusionstest gegenüber Natriumtaurocholat 5 mg. Die Zahlenangaben in den drei rechten Spalten betreffen die HHD in mm.

| Bakterienart | Anzahl | Bereich | Modalwert | Medianwert |
|--------------------------------------|--------|-------------|-----------|------------|
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 8 | 0,0 – 20,0 | 15,0 | 15,0 |
| <i>Porphyromonas endodontalis</i> | 5 | 12,0 – 21,0 | 17,0 | 17,0 |
| <i>Porphyromonas assacharolytica</i> | 7 | 0,0 – 24,0 | 17,0* | 17,0 |
| <i>Porphyromonas levii</i> | 2 | 0,0 – 17,5 | | |
| <i>Prevotella intermedia</i> | 20 | 11,0 – 19,0 | 14,0 | 14,0 |
| <i>Prevotella nigrescens</i> | 6 | 9,0 – 11,0 | 9,0* | 10,0 |
| <i>Prevotella melaninogenica</i> | 10 | 8,0 – 15,0 | 9,0 | 11,0 |
| <i>Prevotella loescheii</i> | 3 | 9,0 – 14,0 | 9,0* | 10,0 |
| <i>Prevotella corporis</i> | 2 | 11,0 – 14,5 | | |
| <i>Prevotella denticola</i> | 1 | 16,0 | | |
| <i>Prevotella heparinolytica</i> | 24 | 0,0 – 11,0 | 0,0 | 7,5 |
| <i>Prevotella zooglooformans</i> | 4 | 7,0 – 11,0 | 7,0* | 8,5 |
| <i>Prevotella bivia</i> | 14 | 0,0 – 14,5 | 0,0 | 9,5 |
| <i>Prevotella disiens</i> | 1 | 10,0 | | |
| <i>Prevotella buccae</i> | 9 | 0,0 – 12,0 | 0,0 | 8,5 |
| <i>Prevotella oris</i> | 12 | 8,0 – 15,0 | 8,0 | 10,2 |
| <i>Prevotella oralis</i> | 4 | 0,0 – 10,0 | 10,0 | 8,5 |
| <i>Prevotella buccalis</i> | 2 | 0,0 – 11,5 | | |
| <i>Bacteroides capillosus</i> | 1 | 8,5 | | |
| <i>Bacteroides gracilis</i> | 1 | 0,0 | | |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | 32 | 0,0 – 21,0 | 11,0 | 11,0 |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> ** | 28 | 0,0 – 14,0 | 11,0 | 11,0 |
| Gesamt | 196 | | | |

Tabelle 26: Ergebnisse der Resistenzbestimmungen von 196 gallesensiblen Stämmen im Blättchendiffusionstest gegenüber Natriumtaurocholat 10 mg. Die Zahlenangaben in den drei rechten Spalten betreffen die HHD in mm.

| Bakterienart | Anzahl | Bereich | Modalwert | Medianwert |
|--------------------------------------|---------------|----------------|------------------|-------------------|
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 8 | 0,0 – 25,0 | 0,0* | 21,0 |
| <i>Porphyromonas endodontalis</i> | 5 | 19,5 – 31,0 | 19,0* | 21,0 |
| <i>Porphyromonas assacharolytica</i> | 7 | 11,0 – 30,0 | 22,0 | 22,0 |
| <i>Porphyromonas levii</i> | 2 | 16,0 – 23,0 | | |
| <i>Prevotella intermedia</i> | 20 | 13,0 – 24,0 | 18,0 | 18,5 |
| <i>Prevotella nigrescens</i> | 6 | 11,0 – 16,0 | 11,0* | 13,0 |
| <i>Prevotella melaninogenica</i> | 10 | 11,0 – 20,0 | 15,0 | 15,5 |
| <i>Prevotella loescheii</i> | 3 | 11,0 – 21,0 | 11,0* | 16,0 |
| <i>Prevotella corporis</i> | 2 | 14,5 – 16,5 | | |
| <i>Prevotella denticola</i> | 1 | 21,0 | | |
| <i>Prevotella heparinolytica</i> | 24 | 7,0 – 14,0 | 9,0 | 11,0 |
| <i>Prevotella zooglyphiformans</i> | 4 | 8,0 – 13,5 | 8,0* | 10,5 |
| <i>Prevotella bivia</i> | 14 | 0,0 – 17,5 | 12,0 | 12,0 |
| <i>Prevotella disiens</i> | 1 | 12,0 | | |
| <i>Prevotella buccae</i> | 9 | 0,0 – 13,0 | 9,0* | 10,5 |
| <i>Prevotella oris</i> | 12 | 10,0 – 17,5 | 10,0* | 15,0 |
| <i>Prevotella oralis</i> | 4 | 0,0 – 15,0 | 0,0* | 11,5 |
| <i>Prevotella buccalis</i> | 2 | 8,0 – 15,0 | | |
| <i>Bacteroides capillosus</i> | 1 | 11,0 | | |
| <i>Bacteroides gracilis</i> | 1 | 0,0 | | |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | 32 | 0,0 – 28,0 | 14,0 | 14,0 |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> ** | 28 | 7,0 – 17,0 | 14,0 | 13,5 |
| Gesamt | 196 | | | |

Unter Berücksichtigung der vorliegenden Erkenntnisse, zeigt sich, dass an Stelle der kaum zu standardisierenden Rindergalle die exakt zu dosierenden Gallensäuresalze für den Blättchendiffusionstest von der Aussage des Ergebnisses her gleichwertig eingesetzt werden können. Es galt nun, aus den erhaltenen Resultaten jene Grenzwerte der HHD zu ermitteln, die unter Einbeziehung aller untersuchten Stämme, Substanzen und Konzentrationen am ehesten die Zuordnung eines Erregers als gallesensibel bzw. galle-resistent erlauben und die geringste Zahl überschneidender Ergebnisse aufweisen. Die Ergebnisse dieser Auswertungen sind in den Tabellen 27 und 28 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 27: Empfohlene Grenzwerte und Anzahl der damit "fehlbestimmten" Stämme der Genera *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Bacteroides* bezüglich gallesensibel und galleresistent

| Testsubstanz | Grenzwerte für sensible Stämme in mm \geq | Anzahl der "Fehlbestimmungen" für | | | | Summe |
|-----------------------|---|---|--|--|--|-------|
| | | galleresistente <i>B.uniformis</i> (40) (\geq Grenzwert) | galleresistente <i>Bacteroides</i> (57) (\geq Grenzwert) | gallesensibel Schwarzpig. Stäm.(64) (<Grenzwert) | gallesensibel Nichtschwarzpig. Stäm.(72) (<Grenzwert) | |
| Rindergalle 20 mg | 13 | 4 1 x 13mm, 1 x 14mm, 1 x 15mm, 1 x 17mm | 1 1 x 23mm (<i>B.splanchnicus</i>) | 0 | 1 1 x 10mm (<i>B.gracilis</i>) | 6 |
| Rindergalle 25 mg | 14 | 4 1 x 14mm, 1 x 15mm, 1 x 17mm, 1 x 18mm | 1 1 x 23mm (<i>B.splanchnicus</i>) | 0 | 1 1 x 10mm (<i>B.gracilis</i>) | 6 |
| Na-Desoxycholat 1 mg | 8 | 8 2 x 8mm, 2 x 8,5mm, 2 x 9mm, 1 x 10mm, 1 x 13mm | 0 | 0 | 2 2 x 7mm (<i>P.buccae</i> , <i>B.gracilis</i>) | 10 |
| Na-Desoxycholat 5 mg | 12 | 2 1 x 14mm, 1 x 18mm | 0 | 0 | 8 1 x 7mm, 3 x 10mm, 2 x 11mm, 2 x 11,5mm (4x <i>P.buccae</i> , 3x <i>P.bivia</i> , 1x <i>B.gracilis</i>) | 10 |
| Na-Desoxycholat 10 mg | 12 | 3 1 x 12mm, 1 x 16mm, 1 x 18,5mm | 1 1 x 15mm (<i>B.splanchnicus</i>) | 0 | 1 1 x 8mm (<i>B.gracilis</i>) | 5 |
| Na-Cholat 1 mg | 7 | 0 | 0 | 9 9 x kein HH | 13 13 x kein HH | 22 |
| Na-Cholat 5 mg | 10 | 4 2 x 11mm, 1 x 12mm, 1 x 13mm | 2 1 x 11mm, 1 x 12mm (2 x <i>B.splanchnicus</i>) | 0 | 1 1 x 9mm(<i>B.gracilis</i>) | 7 |
| Na-Cholat 10 mg | 15 | 2 2 x 16mm | 1 1 x 16mm (<i>B.splanchnicus</i>) | 0 | 3 1 x 11mm(<i>B.gracilis</i>), 1 x 12,5mm (<i>P.bivia</i>), 1 x 14mm (<i>P.bivia</i>) | 6 |
| Na-Taurocholat 1 mg | 7 | 0 | 0 | 50 50 x kein HH | 70 70 x kein HH | 120 |
| Na-Taurocholat 5 mg | 7 | 0 | 1 1 x 9mm (<i>B.splanchnicus</i>) | 3 3 x kein HH | 20 20 x kein HH | 24 |
| Na-Taurocholat 10 mg | 7 | 1 1 x 11mm | 2 2 x 7mm, 1 x 13mm (2x <i>B.splanchnicus</i> , <i>B.eggerthii</i>) | 1 1 x kein HH (<i>P.gingivalis</i>) | 4 4 x kein HH (<i>P.buccae</i> , <i>P.bivia</i> , <i>B.gracilis</i> , <i>P.oralis</i>) | 8 |

Tabelle 28: Empfohlene Grenzwerte und Anzahl der damit "fehlbestimmten" Stämme der Genera *F. varium*, *F. mortiferum*, *F. nucleatum* bezüglich gallesensibel und galleresistent einschließlich der Ergebnisse von *F. necrophorum*

| Testsubstanz | Grenzwerte für sensible Stämme in mm | <i>F. necrophorum</i> ** (28) | | Anzahl der "Fehlbestimmungen" für | | |
|--------------|--------------------------------------|-------------------------------|------------|--|---|-------|
| | | ≥ Grenzwert | <Grenzwert | resistente <i>F. varium</i> (19), <i>F. mortiferum</i> (4) (≥ Grenzwert) | sensible <i>F. nucleatum</i> (32) (<Grenzwerte) | Summe |
| RG 20 mg | 10 | 28 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RG 25 mg | 12 | 28 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| NDC 1 mg | 7 | 13 | 15 | 0 | 4 4 x kein HH | 4 |
| NDC 5 mg | 8 | 25 | 3 | 0 | 1 1 x 7mm | 1 |
| NDC 10 mg | 11 | 24 | 4 | 0 | 1 1 x 7mm | 1 |
| | 12* | 10 | 8 | 0 | 2 | 2 |
| NC 1 mg | 8 | 26 | 2 | 0 | 2 2 x kein HH | 2 |
| NC 5 mg | 10 | 28 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| NC 10 mg | 13 | 28 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 15* | 27 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| NTC 1 mg | 7 | 5 | 23 | 0 | 17 17 x kein HH | 17 |
| NTC 5 mg | 9 | 25 | 3 | 0 | 1 1 x kein HH | 1 |

*Grenzwerte für die Stämme der Genera *Prevotella*, *Porphyromonas* und *Bacteroides* (siehe Tabelle 27)

** von *F. necrophorum* ist ein differentes Wachstumsverhalten gegenüber Galle bekannt

Die in der zweiten Spalte „Grenzwerte“ benannten HHD in mm kennzeichnen einen Stamm demnach als gallesensibel, wenn der angegebene Wert erreicht oder überschritten wird. Entsprechend müssen Keime mit darunter liegenden HHD als galleresistent eingestuft werden. Wie bereits angedeutet wird in der Spalte „Summe“ die Gesamtzahl der unter diesen Bedingungen als falsch gallesensibel bzw. falsch galleresistent ermittelten Stämme angeführt. Diese Summen, der in den Tabellen 27 und 28 als Fehlbestimmungen deklarierten Stämme, sind - bezogen auf die angeführten HHD - das erreichbare Optimum der Unterscheidung zwischen den Empfindlichkeiten. Bei allen anderen Grenzwerten ergäben sich höhere Zahlen an Stämmen, die nicht „korrekt“, d.h. in Übereinstimmung mit ihrer üblichen Zuordnung als resistent bzw. empfindlich gegenüber Galle, bestimmt worden wären.

Wie man erkennt, entfielen die geringsten Fehlbestimmungen – von der zu ersetzenden Rindergalle selbst abgesehen – auf die Natriumsalze der Cholsäure bzw. Desoxycholsäure, wobei sich Blättchenkonzentrationen zu jeweils 10 mg als optimal herausstellten.

Natriumtaurocholat erwies sich vor allem wegen der fehlenden oder sehr kleinen HHD als am wenigsten geeignet und wird deshalb in die weiteren Betrachtungen nicht mehr einbezogen.

Lässt man die Ergebnisse bei den *Fusobakterien* mit Natriumcholat und 10 mm HHD bei 5 mg bzw. 13 mm HHD bei 10 mg Blättchenkonzentration außer Betracht, so waren bei allen Keimen trotz der optimalen HHD Überschneidungen zwischen den Zuordnungen bezüglich der Gallensensibilität nicht zu vermeiden. Ein in allen Fällen und für alle getesteten Arten einheitlich festlegbarer Grenzwert des HHD konnte somit für keine der untersuchten Substanzen und Konzentrationen ermittelt werden.

Die fehlerhaften Zuordnungen bei den mit 10 mg Natriumdesoxycholat bzw. 10 mg Natriumcholat beschickten Blättchen fokussierten sich einerseits auf die zwei galleresistenten Arten *B. uniformis* und *B. splanchnicus*, wobei von letzterer Spezies nur zwei Stämme verfügbar waren. Somit sind weitere Untersuchungen an einer größeren Stammzahl dieser Spezies angezeigt, bevor verallgemeinerungsfähige Schlussfolgerungen gezogen werden können. Für die zu den intestinalen *Bacteroides* gehörende und somit als galleresistent einzustufende Art *B. uniformis* ist dagegen eine relative Gallensensibilität für einen Teil der Stämme seit längerem auch aus Untersuchungen in flüssigen Medien bekannt und offenbarte sich auch in den vorgelegten Ergebnissen. Würde man den Grenzwert der HHD von 12 mm für Natriumdesoxycholat und von 15 mm für Natriumcholat so erhöhen, dass alle *B. uniformis* dann als resistent eingestuft werden könnten, so würde sich im Gegenzug die Zahl der Stämme der eigentlich gallensensiblen Spezies erhöhen, die als falsch galleresistent ermittelt würden. Andererseits traten für die beiden angeführten optimalen Grenzwerte von 12 bzw. 15 mm auch bei den galleempfindlichen Arten einige wenige Fehlbestimmungen auf. Dies betraf jeweils einen Stamm von *B. gracilis* (8 mm bzw. 11 mm) und bei Natriumcholat zusätzlich zwei Stämme von *Prevotella bivia* (12,5 mm und 14 mm).

Bei den *Fusobakterien* (Tabelle 28) wurden die besten Ergebnisse zur Unterscheidung zwischen gallensensibel und galleresistent mit etwas anderen HHD erhalten, und zwar lag für Natriumdesoxycholat der optimale Grenzwert bei 11 mm. Unter Zugrundelegung dieses Wertes wäre nur ein Stamm von *F. nucleatum* falsch als galleresistent ermittelt worden. Würde man hier wie bei den *Bacteroides*-, *Prevotella*- und *Porphyromonas*-Arten den gleichen Grenzwert von 12 mm HHD festlegen, so wäre ein Stamm mehr von *F.*

nucleatum (mit 14 mm) gegenüber dem erstgenannten Wert falsch als galleresistent zu beurteilen gewesen, ebenso zusätzlich vier Isolate von *F. necrophorum*.

Bei Natriumcholat 10 mg und einem grenzwertigen HHD von 13 mm ließen sich für die *Fusobakterien* Fehlbestimmungen ganz vermeiden. Besonders bemerkenswert und günstig im Sinne eines einheitlichen Speziesverhaltens wäre bei diesem HHD die geschlossene Erfassung aller untersuchten Stämme von *F. necrophorum* als gallesensibel. Hätte man in diesem Fall einen Grenzwert wie bei den Arten der Tabelle 27 von 15 mm HHD zu Grunde gelegt, so wäre *F. nucleatum* ATCC 25586, schlechthin **der** Referenzstamm dieser als grundsätzlich gallesensibel eingestuften Spezies, nunmehr als falsch resistent erfasst worden. Außerdem ein zuvor als sensibel bestimmter Stamm von *F. necrophorum* wäre als galleresistent ermittelt worden. Daraus ergibt sich die Frage, ob es sinnvoll ist, jeweils gesonderte Grenzwerte für *Fusobakterien*-Arten einerseits bzw. für die Genera *Bacteroides*, *Prevotella* und *Porphyromonas* andererseits festzulegen. Oder sollte man aus Gründen der Einheitlichkeit einen allgemeingültigen Grenzwert mit den möglichen Konsequenzen einer geringfügig höheren Quote an Fehlbestimmungen empfehlen? Beide Vorgehensweisen scheinen mit vertretbarem Aufwand praktikabel.

Was aus den vorgelegten Ergebnissen noch abzuleiten bleibt, ist die Entscheidung für eine der beiden Testsubstanzen zur Bestimmung der Galleempfindlichkeit anaerober obligat anaerober Stäbchen im Blättchendiffusionstest: Natriumcholat oder Natriumdesoxycholat. Hier empfiehlt sich trotz einer Fehlbestimmung mehr Natriumcholat 10 mg, da es folgende Vorteile gegenüber Natriumdesoxycholat aufweist: Bessere Löslichkeit; erheblich geringere Viskosität und damit bessere Dosierbarkeit bei der Blättchenpräparation verbunden mit Vorteilen für den Trocknungsprozess; entgegen früheren Berichten [10] offensichtlich eine größere Diffusionsfähigkeit des Natriumcholats gegenüber Natriumdesoxycholat und somit die Ausbildung größerer Hemmhöfe, was eine genauere Ablesung ermöglicht und weniger falsch resistente Stämme bei den *Fusobakterien*. **Deshalb wird bei vergleichbaren HHD wie bei den mit Rindergalle imprägnierten Testblättchen die Verwendung von Natriumcholat in einer Konzentration von 10 mg pro Blättchen zur Bestimmung der Galleempfindlichkeit obligat anaerober gramnegativer Stäbchen empfohlen. Als sensibel sind dabei Stämme der Genera *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* und eventuell auch des Genus *Fusobacterium* mit HHD ab 15 mm einzustufen. Für die Vertreter des Genus *Fusobacterium* könnten alternativ allerdings**

auch Hemmhöfe ab 13 mm Durchmesser für eine Zuordnung als sensibel gegenüber Galle zu Grunde gelegt werden.

Der Stellenwert eines solchen einfachen, möglicherweise auch als ergänzend anzusehenden Blättchendiffusionstestes sollte in diesem Zusammenhang an Hand eines Vergleiches zwischen der galleresistenten intestinalen Art *B. uniformis* und der gallesensiblen oralen Spezies *P. heparinolytica* belegt werden. Bei diesen sehr oft in klinischen Untersuchungsmaterialien nachweisbaren Arten handelt es sich um zwei indolpositive anaerobe gram-negative Stäbchen, die auf Grund sehr ähnlicher Fermentationsmuster und damit auch weitgehender Übereinstimmungen der in zahlreichen kommerziellen Identifizierungssystemen mit chromogenen Substraten nachweisbaren präformierten Enzymen oft auf Speziesebene fehlerhaft bestimmt bzw. auch einseitig miteinander verwechselt werden (einseitig, weil in den üblichen kommerziellen Kits dieser Art die Datenbank *P. heparinolytica* nicht enthalten ist). In den Tabellen 29 und 30 sind die für den Vergleich interessierenden Daten für die in dieser Arbeit untersuchten Vertreter beider genannten Spezies aufgeführt. Des Weiteren enthält die Tabelle 29 die Daten für vier Stämme von *P. zoogloformans* – einer indolnegativen, aber *P. heparinolytica* sehr nahe stehenden Spezies. Darüber hinaus werden für die meisten der genannten Stämme in den Abbildungen 1 bis 4 die Ergebnisse dargestellt, die im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie der Universität Leipzig mittels PCR-Fingerprinting zur Bestätigung der Spezieszugehörigkeit erhalten wurden.

Wie man sehen kann, wurden - mit Ausnahme des Stammes MLU 94-1574/1 – alle Isolate von *P. heparinolytica* nur mit der konventionellen Methode der „Bunten Reihe“ und dem PCR-Fingerprinting korrekt identifiziert. Die beiden kommerziellen Kits führten vorwiegend (Rapid Ana II) bzw. ausschließlich (BBL Crystal) zur fehlerhaften Bestimmung als *B. uniformis*. Man erkennt aber auch, dass die Ermittlung der Galleempfindlichkeit hier einen direkten Hinweis auf eine nicht korrekte Speziesbestimmung geben würde. Ohne Ausnahme zeigten alle Stämme von *P. heparinolytica* die mit der Spezieszugehörigkeit in Einklang stehende Empfindlichkeit gegenüber Natriumcholat an.

Tabelle 29: Ergebnisse der Speziesbestimmung für 24 Stämme von *P. heparinolytica* und vier Stämme von *P. zooglyphiformans* mittels Rapid Ana II, BBL Crystal, konventioneller Bestimmung (KB) über die „Bunte Reihe“ und PCR-Fingerprinting

| Nr. | Stamm-Nr. | Spezies | Zahlencode Rapid Ana II | Identifizierung | Zahlencode BBL Crystal | Identifizierung | KB | PCR-Fingerprint | Herkunft | Galle 25 mg | NC 10 mg |
|-----|----------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------|---------------------|----------------------------|----------------------------|-------------|-------------|----------|
| 1 | ATCC 35895 | <i>P. heparinolytica</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0004300767 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. heparinolytica</i> | <i>P. heparinolytica</i> | Mundhöhle | 22,0 | 17,5 |
| 2 | MLU 93-1108/2 | <i>P. heparinolytica</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0004307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. heparinolytica</i> | <i>P. heparinolytica</i> | Mundhöhle | 25,0 | 22,0 |
| 3 | MLU 94-1408/3 | <i>P. heparinolytica</i> | 677745 | <i>B. thetaiotaomicron</i> | 0004307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. heparinolytica</i> | <i>P. heparinolytica</i> | Mundhöhle | 26,5 | 23,0 |
| 4 | MLU 94-1446 | <i>P. heparinolytica</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0004307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. heparinolytica</i> | <i>P. heparinolytica</i> | Rachenraum | 25,5 | 21,0 |
| 5 | MLU 94-1574/1* | <i>P. heparinolytica</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0404307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. heparinolytica</i> | nicht untersucht | Trachea | 33,0 | 24,0 |
| 6 | MLU 94-1575/1* | <i>P. heparinolytica</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0004321467 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. heparinolytica</i> | <i>P. heparinolytica</i> | Rachenraum | 29,0 | 21,0 |
| 7 | MLU 94-1895/1 | <i>P. heparinolytica</i> | 677344 | <i>B. thetaiotaomicron</i> | 0004307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. heparinolytica</i> | <i>P. heparinolytica</i> | Rachenraum | 27,0 | 19,0 |
| 8 | MLU 96-30/3* | <i>P. heparinolytica</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0004307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. heparinolytica</i> | <i>P. heparinolytica</i> | Mundhöhle | 32,0 | 26,0 |
| 9 | MLU 96-41/1* | <i>P. heparinolytica</i> | 277304 | <i>B. uniformis</i> | 0004317767 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. heparinolytica</i> | <i>P. heparinolytica</i> | Pankreas ? | 31,0 | 26,0 |
| 10 | MLU 96-650 | <i>P. heparinolytica</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0004307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. heparinolytica</i> | <i>P. heparinolytica</i> | Mundhöhle | 23,0 | 19,0 |
| 11 | MLU 96-724 | <i>P. heparinolytica</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0004307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. heparinolytica</i> | <i>P. heparinolytica</i> | Kieferhöhle | 23,0 | 21,0 |
| 12 | MLU 96-1218/3 | <i>P. heparinolytica</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0004307667 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. heparinolytica</i> | <i>P. heparinolytica</i> | Rachenraum | 27,0 | 21,0 |
| 13 | MLU 96-1394/1 | <i>P. heparinolytica</i> | 277304 | <i>B. uniformis</i> | 2005300767 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. heparinolytica</i> | <i>P. heparinolytica</i> | Rachenraum | 27,0 | 19,0 |
| 14 | MLU 97-1415/2 | <i>P. heparinolytica</i> | 677745 | <i>B. thetaiotaomicron</i> | 0004300767 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. heparinolytica</i> | <i>P. heparinolytica</i> | Mundhöhle | 26,0 | 23,0 |
| 15 | MLU 97-1706/1 | <i>P. heparinolytica</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0004307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. heparinolytica</i> | <i>P. heparinolytica</i> | Rachenraum | 22,5 | 22,0 |
| 16 | MLU 97-1788/1 | <i>P. heparinolytica</i> | 677745 | <i>B. thetaiotaomicron</i> | 0004727767 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. heparinolytica</i> | <i>P. heparinolytica</i> | Mundhöhle | 24,0 | 19,0 |
| 17 | MLU 97-1838/1 | <i>P. heparinolytica</i> | 677345 | <i>B. thetaiotaomicron</i> | 0004307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. heparinolytica</i> | <i>P. heparinolytica</i> | Halsregion | 24,0 | 19,0 |
| 18 | MLU 98-12/1 | <i>P. heparinolytica</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0004307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. heparinolytica</i> | <i>P. heparinolytica</i> | Mundhöhle | 25,0 | 21,0 |
| 19 | MLU 98-304 | <i>P. heparinolytica</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0004307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. heparinolytica</i> | <i>P. heparinolytica</i> | Mundhöhle | 24,0 | 20,0 |
| 20 | MLU 99-57 | <i>P. heparinolytica</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0004307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. heparinolytica</i> | <i>P. heparinolytica</i> | Mundhöhle | 26,0 | 19,5 |
| 21 | MLU 99-143/1 | <i>P. heparinolytica</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0004301767 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. heparinolytica</i> | <i>P. heparinolytica</i> | Mundhöhle | 32,0 | 26,5 |
| 22 | MLU 99-498/1 | <i>P. heparinolytica</i> | 677745 | <i>B. thetaiotaomicron</i> | 0004307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. heparinolytica</i> | <i>P. heparinolytica</i> | Mundhöhle | 28,0 | 20,0 |
| 23 | MLU 99-499/1 | <i>P. heparinolytica</i> | 677745 | <i>B. thetaiotaomicron</i> | 0405307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. heparinolytica</i> | <i>P. heparinolytica</i> | Mundhöhle | 29,0 | 17,0 |
| 24 | MLU 00-1092 | <i>P. heparinolytica</i> | 677345 | <i>B. thetaiotaomicron</i> | 0000300767 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. heparinolytica</i> | <i>P. heparinolytica</i> | Mundhöhle | 23,0 | 19,5 |
| 25 | ATCC 33285 | <i>P. zooglyphiformans</i> | 677300 | <i>P. oris</i> | 0004200367 | <i>P. oris</i> | <i>P. zooglyphiformans</i> | <i>P. zooglyphiformans</i> | Mundhöhle | 26,0 | 17,0 |
| 26 | MLU 94-2534/1 | <i>P. zooglyphiformans</i> | 677341 | <i>P. oris</i> | 00043077767 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. zooglyphiformans</i> | <i>P. zooglyphiformans</i> | Rachenraum | 24,0 | 21,0 |
| 27 | MLU 95-1103 | <i>P. zooglyphiformans</i> | 277300 | <i>P. oralis</i> -Gruppe | 0444207767 | <i>B. ovatus</i> | <i>P. zooglyphiformans</i> | <i>P. zooglyphiformans</i> | Rachenraum | 18,5 | 17,0 |
| 28 | MLU 96-934/1 | <i>P. zooglyphiformans</i> | 677300 | <i>P. oris</i> | 0004307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>P. zooglyphiformans</i> | <i>P. zooglyphiformans</i> | Rachenraum | 24,5 | 17,5 |

* Stämme wurden an aufeinander folgenden Tagen jeweils von einem Patienten isoliert

Tabelle 30: Ergebnisse der Speziesbestimmung für 40 Stämme von *B. uniformis* mittels Rapid Ana II, BBL Crystal, konventioneller Bestimmung (KB) über die „Bunte Reihe“ und PCR-Fingerprinting

| Nr. | Stamm-Nr. | Spezies | Zahlencode Rapid Ana II | Identifizierung | Zahlencode BBL Crystal | Identifizierung | KB | PCR-Fingerprinting | Herkunft | Galle 25 mg | NC 10 mg |
|-----|-----------------|---------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|---------------------|-----------------------|----------|-------------|----------|
| 1 | ATCC 8492 | <i>B. uniformis</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0404307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | Abdomen | 10,0 | 12,0 |
| 2 | RMA 5405 | <i>B. uniformis</i> | 677704 | <i>B. ovatus</i> | 0004007763 | <i>B. ovatus</i> | <i>B. uniformis</i> | ? | ? | 10,0 | 7,0 |
| 3 | RMA 5506 | <i>B. uniformis</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0044347767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | ? | ? | 9,0 | 9,0 |
| 4 | RMA 5507 | <i>B. uniformis</i> | 677344 | <i>B. thetaiotaomicron</i> | 0044227767 | <i>B. thetaiotaomicron</i> | <i>B. uniformis</i> | ? | ? | 0,0 | 7,0 |
| 5 | RMA 5656 | <i>B. uniformis</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0044347767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | ? | ? | 0,0 | 0,0 |
| 6 | RMA 5825 | <i>B. uniformis</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0004107777 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | ? | ? | 7,0 | 9,0 |
| 7 | V 528 (Macrina) | <i>B. uniformis</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0044347767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | ? | ? | 9,0 | 11,0 |
| 8 | MLU 92-131/1 | <i>B. uniformis</i> | 677365 | <i>B. thetaiotaomicron</i> | 2444637767 | <i>B. thetaiotaomicron</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> ? | Abdomen | 0,0 | 0,0 |
| 9 | MLU 92-934/2 | <i>B. uniformis</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0404307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | Abdomen | 8,5 | 10,0 |
| 10 | MLU 92-1074/1 | <i>B. uniformis</i> | 677347 | <i>B. thetaiotaomicron</i> | 2444727767 | <i>B. thetaiotaomicron</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> ? | Abdomen | 7,0 | 7,5 |
| 11 | MLU 92-1470/1 | <i>B. uniformis</i> | 277304 | <i>B. uniformis</i> | 0404307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | ? | Haut | 9,5 | 10,0 |
| 12 | MLU 92-1548/2 | <i>B. uniformis</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0444307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | Abdomen | 11,5 | 12,0 |
| 13 | MLU 92-1787/1 | <i>B. uniformis</i> | 277765 | <i>B. thetaiotaomicron</i> | 2455727767 | <i>B. thetaiotaomicron</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> ? | Abdomen | 0,0 | 7,5 |
| 14 | MLU 93-399/1 | <i>B. uniformis</i> | 675304 | <i>B. eggerthii</i> | 0444007763 | <i>B. ovatus</i> | <i>B. uniformis</i> | ? | Abdomen | 12,0 | 11,0 |
| 15 | MLU 93-400/1 | <i>B. uniformis</i> | 675304 | <i>B. eggerthii</i> | 0444307763 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | ? | Abdomen | 11,0 | 11,0 |
| 16 | MLU 93-1513/3 | <i>B. uniformis</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0404307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | Abdomen | 10,0 | 11,0 |
| 17 | MLU 94-380/2 | <i>B. uniformis</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0444307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | Abdomen | 14,0 | 13,0 |
| 18 | MLU 94-865/1 | <i>B. uniformis</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0404307667 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | Abdomen | 11,0 | 12,0 |
| 19 | MLU 94-1908 | <i>B. uniformis</i> | 677324 | <i>B. uniformis</i> | 0044347767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | ? | Blut | 11,5 | 10,5 |
| 20 | MLU 94-2158/2 | <i>B. uniformis</i> | 677765 | <i>B. thetaiotaomicron</i> | 0044347767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | ? | Abdomen | 7,0 | 11,0 |
| 21 | MLU 94-2357 | <i>B. uniformis</i> | 277304 | <i>B. uniformis</i> | 0404307777 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | Lunge | 10,0 | 11,0 |
| 22 | MLU 95-485 | <i>B. uniformis</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0404307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | Abdomen | 10,0 | 12,0 |
| 23 | MLU 95-807/2 | <i>B. uniformis</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0444307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> ? | Abdomen | 13,0 | 13,0 |
| 24 | MLU 95-904/2 | <i>B. uniformis</i> | 477324 | <i>B. uniformis</i> | 0044347767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | ? | Abdomen | 10,0 | 12,0 |
| 25 | MLU 95-1016/1 | <i>B. uniformis</i> | 677704 | <i>B. ovatus</i> | 0444307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | Haut | 11,0 | 12,0 |
| 26 | MLU 95-1303/2 | <i>B. uniformis</i> | 077304 | <i>B. uniformis</i> | 0454347767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | ? | Abdomen | 7,0 | 0,0 |
| 27 | MLU 95-1530/1 | <i>B. uniformis</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0444307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | Abdomen | 11,0 | 12,0 |
| 28 | MLU 95-1712/1 | <i>B. uniformis</i> | 657765 | <i>B. thetaiotaomicron</i> | 0004200767 | <i>P. oris</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | Haut | 17,0 | 16,0 |
| 29 | MLU 95-1912/1 | <i>B. uniformis</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0444317767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | Uterus | 12,0 | 12,0 |
| 30 | MLU 96-582/1 | <i>B. uniformis</i> | 677704 | <i>B. ovatus</i> | 0444307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | ? | Ohr | 9,0 | 9,0 |
| 31 | MLU 96-619/1 | <i>B. uniformis</i> | 077765 | <i>B. thetaiotaomicron</i> | 2455627767 | <i>B. thetaiotaomicron</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> ? | Haut | 0,0 | 7,5 |
| 32 | MLU 96-649 | <i>B. uniformis</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0004307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | Haut | 10,5 | 13,0 |
| 33 | MLU 96-769/2 | <i>B. uniformis</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0004307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | Abdomen | 12,0 | 14,0 |
| 34 | MLU 96-810/1 | <i>B. uniformis</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0004307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | Ohr | 15,0 | 13,5 |
| 35 | MLU 96-1047/1 | <i>B. uniformis</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0004307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | Ovar | 12,0 | 10,0 |
| 36 | MLU 96-1239 | <i>B. uniformis</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0004307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | Ohr | 10,0 | 11,0 |
| 37 | MLU 96-1405/3 | <i>B. uniformis</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0004307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | Vulva | 18,0 | 16,0 |
| 38 | MLU 96-1461 | <i>B. uniformis</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0444307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | Ohr | 11,0 | 13,0 |
| 39 | MLU 96-1743/1 | <i>B. uniformis</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0404307767 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | Blut | 12,5 | 14,5 |
| 40 | MLU 00-385/3 | <i>B. uniformis</i> | 677304 | <i>B. uniformis</i> | 0454011467 | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | <i>B. uniformis</i> | Abdomen | 8,0 | 10,0 |

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

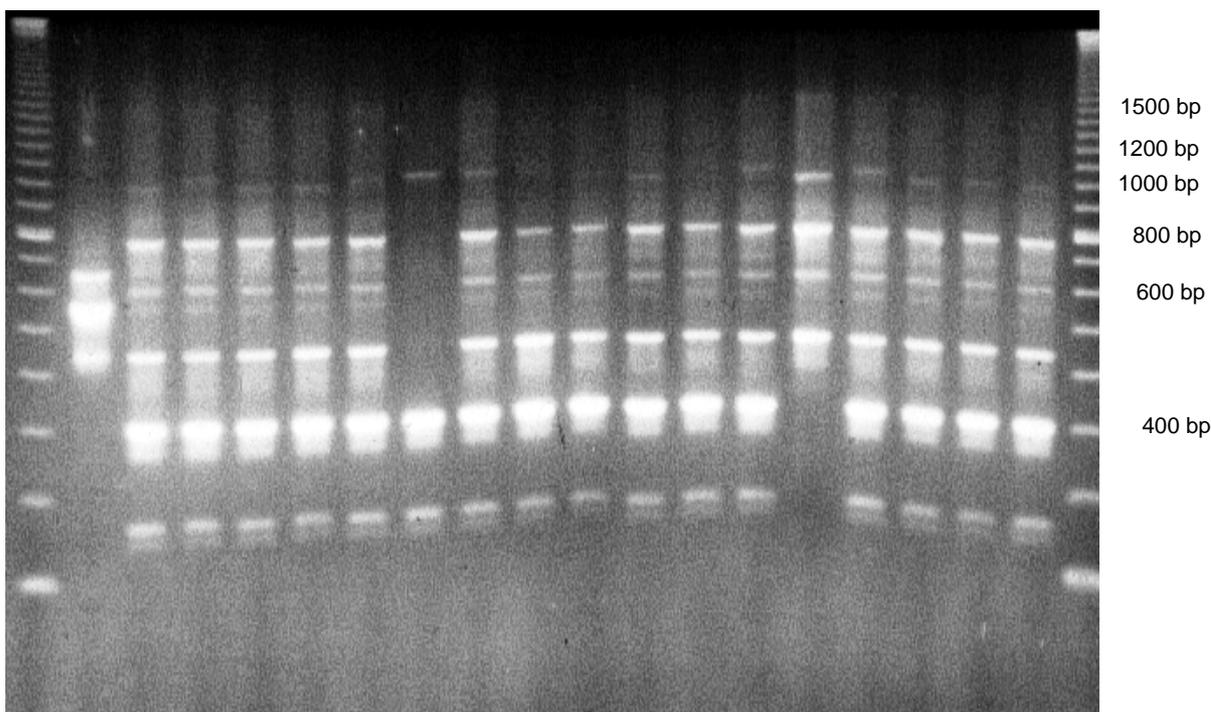


Abb. 4: PCR Fingerprinting eines Teiles der in die Untersuchungen einbezogenen Stämme von *B. uniformis* bzw. *P. heparinolytica* mit Primer T3B. Bahn 1 DNS Marker, Bahn 2 *B. uniformis* ATCC 8492, Bahnen 3 – 19 klinische Isolate von *P. heparinolytica*, Bahn 20 DNS Marker. (2 = *B. uniformis* ATCC 8492, 3 = *P. heparinolytica* MLU 93-1108, 4 = *P. heparinolytica* MLU 94-1408/3, 5 = *P. heparinolytica* MLU 94-1446, 6 = *P. heparinolytica* MLU 94-1575/1, 7 = *P. heparinolytica* MLU 94-1895/1, 8 = *P. heparinolytica* MLU 96-650, 9 = *P. heparinolytica* MLU 96-724, 10 = *P. heparinolytica* MLU 96-1218/3, 11 = *P. heparinolytica* MLU 96-1394/1, 12 = *P. heparinolytica* MLU 97-1415/2, 13 = *P. heparinolytica* MLU 97-1706/1, 14 = *P. heparinolytica* MLU 97-1788/1, 15 = *P. heparinolytica* MLU 97-1838/1, 16 = *P. heparinolytica* MLU 98-12/1, 17 = *P. heparinolytica* MLU 98-304, 18 = *P. heparinolytica* MLU 99-57, 19 = *P. heparinolytica* MLU 99-143/1, 20 = DNS Marker)

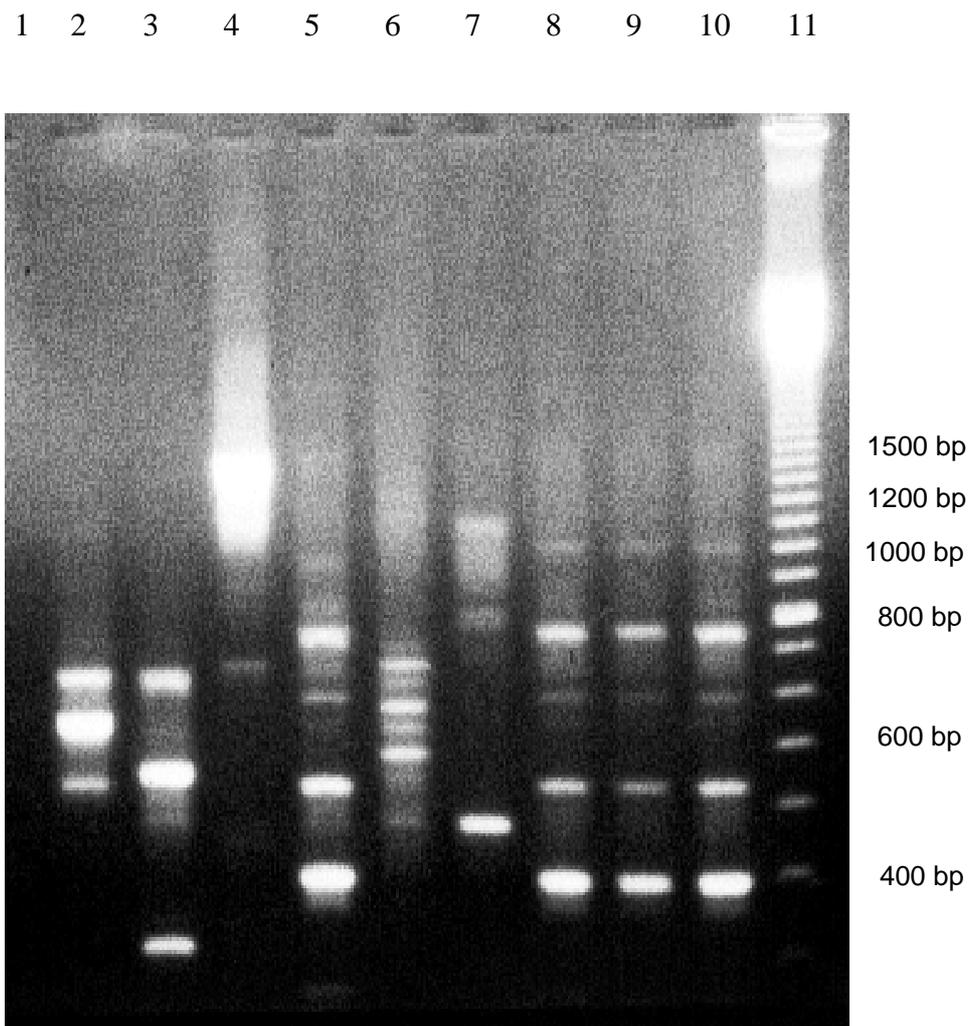


Abb. 5: PCR Fingerprinting eines Teiles der in die Untersuchungen einbezogenen Stämme von *B. uniformis*, *P. heparinolytica* und *P. zooglyphiformans*. (Bahn 1 = Leerprobe, 2 = *B. uniformis* ATCC 8492, 3 = *B. uniformis* (?) MLU 00-385/3, 4 = *B. uniformis* (?) MLU 95-1712/1, 5 = *P. zooglyphiformans* MLU 96-934/1, 6 = *P. zooglyphiformans* MLU 95-1103, 7 = *P. zooglyphiformans* MLU 94-2534/1, 8 = *P. heparinolytica* MLU 00-1092, 9 = *P. heparinolytica* MLU 99-499/1, 10 = *P. heparinolytica* MLU 99-498/1, 11 = DNS Marker)

Andererseits finden die vorgeschlagenen Grenzwerte der HHD für die Unterscheidung zwischen gallesensiblen und gallesistenten anaeroben gramnegativen Stäbchen am Beispiel der als gallesistent eingestuften Art *B. uniformis* insofern eine Bestätigung, als dass nur zwei der Isolate diese Werte überschritten, wenn mit jeweils 16 mm HHD auch nur um einen Millimeter. Jedoch lassen die Ergebnisse des PCR-Fingerprinting eine gewisse Heterogenität innerhalb der Spezies erkennen, die allerdings keine entsprechende

Parallelität in den ermittelten HHD erkennen lässt. Man kann aber auch an Hand der vorgelegten Daten die längst bekannte Erfahrung bestätigen, dass der Entnahmeort bzw. die Art des Untersuchungsmaterials wichtige Hinweise auf die mögliche Spezieszugehörigkeit liefert und zumindest bei ungewöhnlichen Speziesbestimmungen Anlass zu weiterführenden Identifizierungsschritten sein sollte.

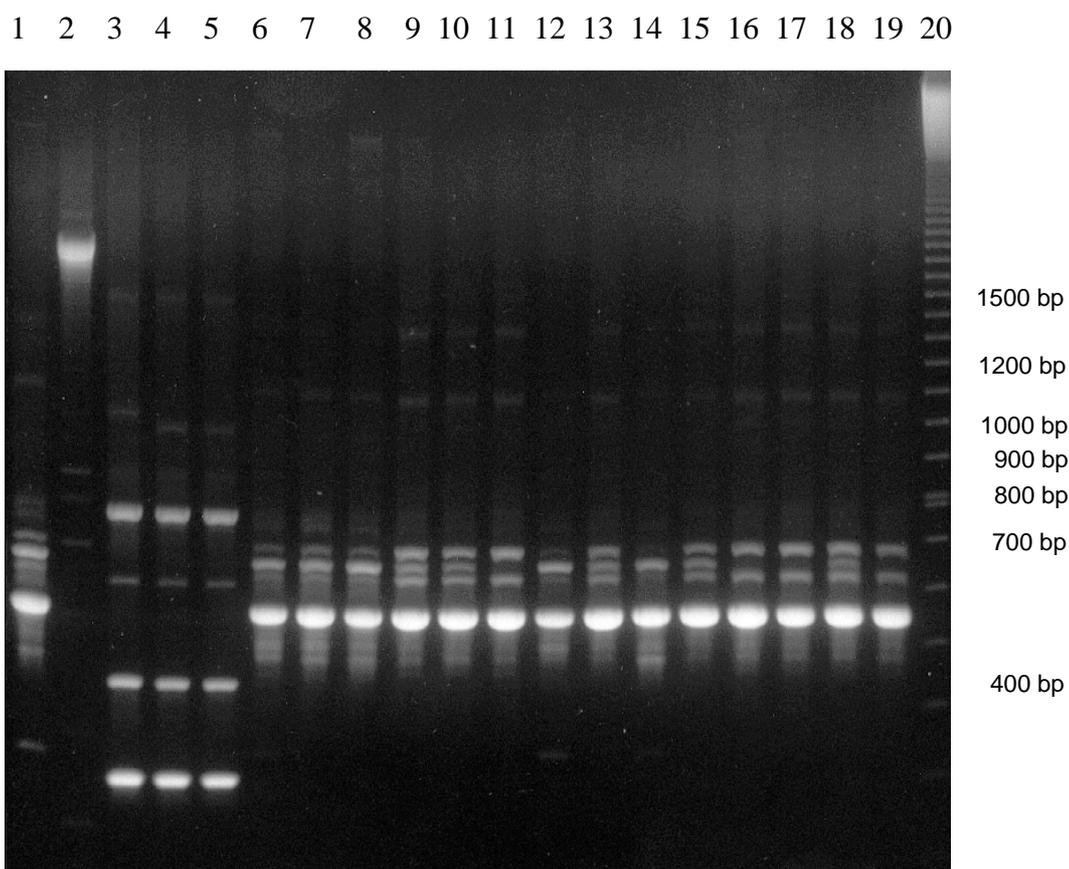


Abb. 6: PCR Fingerprinting eines Teiles der in die Untersuchungen einbezogenen Stämme von *B. uniformis* bzw. *P. heparinolytica* mit Primer T3B. Bahn 1 - 19 Referenzstämmen bzw. klinische Isolate, Bahn 20 DNS Marker. (1 = *B. uniformis* ATCC 8492, 2 = *P. zooglyphiformans* ATCC 33285, 3 = *P. heparinolytica* ATCC 35895, 4 = *P. heparinolytica* MLU 96-30/3, 5 = *P. heparinolytica* MLU 96-41/1, 6 = *B. uniformis* MLU 92-934/2, 7 = *B. uniformis* MLU 92-1470/1, 8 = *B. uniformis* MLU 92-1548/2, 9 = *B. uniformis* MLU 93-1513/3, 10 = *B. uniformis* MLU 94-380/2, 11 = *B. uniformis* MLU 94-865/1, 12 = *B. uniformis* MLU 94-2357, 13 = *B. uniformis* MLU 95-485, 14 = *B. uniformis* MLU 95-807/2, 15 = *B. uniformis* MLU 95-1016/1, 16 = *B. uniformis* MLU 95-1530/1, 17 = *B. uniformis* MLU 95-1912/1, 18 = *B. uniformis* MLU 96-649, 19 = *B. uniformis* MLU 96-769/2, 20 = DNS Marker)

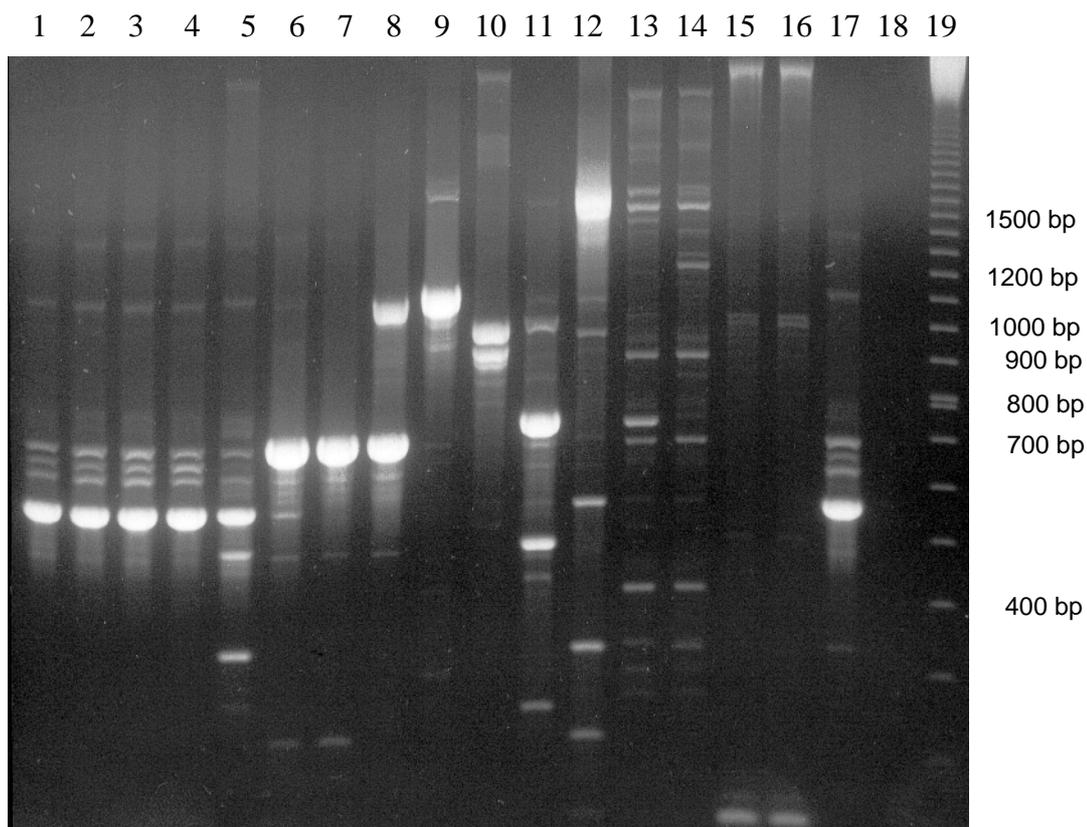


Abb. 7: PCR Fingerprinting eines Teiles der in die Untersuchungen einbezogenen Stämme von *B. uniformis* bzw. fraglichen *B. uniformis* mit Primer T3B. Bahn 1 – 17 klinische Isolate, Bahn 18 Leerprobe, Bahn 19 DNS Marker. (1 = *B. uniformis* MLU 96-810/1, 2 = *B. uniformis* MLU 96-1047/1, *B. uniformis* MLU 96-1461, 4 = *B. uniformis* MLU 96-1743/1, 5 = *B. uniformis* MLU 96-1405/3, 6 = *B. uniformis* (?) MLU 92-131/1, 7 = *B. uniformis* (?) MLU 96-619/1, 8 = *B. uniformis* (?) MLU 1787/1, 9 = *B. uniformis* (?) MLU 94-1908, 10 = *B. uniformis* (?) MLU 96-582/1, 11 = *B. uniformis* (?) MLU 95-1303/2, 12 = *B. uniformis* (?) MLU 92-1074/1, 13 = *B. uniformis* (?) 94-2158/2, 14 = *B. uniformis* (?) MLU 95-904/2, 15 = *B. uniformis* (?) MLU 93-399/1, 16 = *B. uniformis* (?) MLU 93-400/1, 17 = *B. uniformis* MLU 96-1239, 18 = Leerprobe, 19 = DNS Marker)

5. Diskussion

Die Bedeutung anaerober Keime für pyogene Infektionen des Menschen ist heute unumstritten [30, 50]. Insbesondere fällt den intestinalen *Bacteroides*-Arten – und hier speziell *B. fragilis* und *B. thetaiotaomicron* - eine dominierende Rolle zu. Auf Grund des häufigen Vorkommens in klinischen Proben, ihrer Verbindung zu schweren, z.T. lebensbedrohenden Infektionen und ihres Resistenzverhaltens gegenüber verschiedenen Antibiotika nehmen diese Anaerobier für den Kliniker eine bedeutsame Stellung ein.

Die zunehmenden Resistenzentwicklungen gegenüber verschiedenen anaerobierwirksamen Chemotherapeutika, wie z.B. Clindamycin, schränken, verbunden mit der primären Resistenz dieser Keime gegenüber Aminoglykosiden, die Einsatzmöglichkeiten der verfügbaren Mittel ein. Des Weiteren zeigen intestinale *Bacteroides*-Arten Resistenzen gegen Betalaktam-Antibiotika [47]. Aus klinischer Sicht ist es daher eine dringliche Information, die ein Labor dem behandelnden Arzt für die kalkulierte Antibiotikatherapie liefern kann, ob ein Vertreter der intestinalen *B. fragilis*-Gruppe in der Probe enthalten ist [57].

Auf Grund ähnlicher biochemischer Reaktionsmuster, z.B. bei der Kohlenhydratfermentation oder der Eskulinspaltung, kann die Abgrenzung der intestinalen *Bacteroidaceae* von anderen gramnegativen, sporenlösen, anaeroben Stäbchen der Genera *Prevotella* und *Porphyromonas* ohne Bestimmung der Galleempfindlichkeit erhebliche Schwierigkeiten bereiten bzw. unmöglich sein. Dies betrifft eine ganze Reihe der häufig in klinischen Materialien vorkommenden Spezies wie *P. bivia*, *P. disiens*, *P. heparinolytica*, *P. buccae* und zahlreiche weitere Spezies der Genera *Prevotella* und *Porphyromonas* [39, 52]. Deshalb stellt das Wachstumsverhalten gegenüber Rindergalle ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen den intestinalen *Bacteroides*-Arten und den oralen *Prevotella*- bzw. *Porphyromonas*-Spezies dar. Damit gelingt die Abgrenzung der intestinalen *Bacteroides*-Spezies, die durch Anwesenheit von Galle in ihrem Wachstum nicht gehemmt, zum Teil sogar gefördert werden [23, 51], von den Gattungen *Prevotella* und *Porphyromonas*, die sich durch ihre Gallesensibilität auszeichnen [43]. Diese differente Eigenschaft wurde von BEERENS / CASTEL [4] schon 1960 ausführlich beschrieben. Ähnliches gilt für die Abgrenzung der galleresistenten *Fusobakterien* *F. varium* oder *F. mortiferum* von den gallesensiblen Arten wie *F. nucleatum* und weiteren Spezies.

Die Testung der Galleempfindlichkeit kann methodisch in unterschiedlicher Weise erfolgen. Das älteste Verfahren beruht auf der Wachstumsprüfung der Keime in flüssigen Medien, die 20 % native Rindergalle enthalten [9, 52]. Die Interpretation der Ergebnisse des Röhrchentestes mit flüssigem Nährmedium ist insbesondere bei den empfindlichen Erregern allerdings häufig mit Schwierigkeiten behaftet, da sich im Medium auf Grund der Anwesenheit von Galle Präzipitationen bilden können, die die Beurteilung des Bakterienwachstums erschweren [64]. Hinzu kommt, dass viele orale Arten bzw. Keime in flüssigen Medien auch ohne Gallezusatz oft kein bzw. ein nur sehr verzögertes Wachstum zeigen, was im letztgenannten Fall eine mindestens bis zu einigen Tagen, manchmal sogar noch länger dauernde Verzögerung der endgültigen Befundermittlung nach sich ziehen würde. Sofern ein Wachstum im gallefreien Kontrollbouillon nicht sichtbar wäre, würde ein Ergebnis sogar ganz ausbleiben.

Eine andere methodische Möglichkeit besteht in der Prüfung des Wachstums auf festen gallehaltigen Nährböden wie dem *Bacteroides Bile Esculin Agar* [52], der nach manchen Rezepturen eventuell zusätzlich noch 0,1 % Desoxycholsäure enthält [51]. Solche gallehaltigen festen Nährböden werden in erster Linie als Selektivmedien verwendet, um direkt aus dem Untersuchungsmaterial die galleresistenten Anteile der an der Infektion beteiligten Anaerobier nachzuweisen. Die manchmal anzutreffende Interpretation dieses Vorgehens als eine vorteilhafte Komponente zur „schnelleren Diagnostik“ intestinaler Spezies ist jedoch nicht unproblematisch. Für Erreger, die über solche gallehaltigen Medien direkt angezüchtet werden, ist die Galleresistenz damit zwar bereits belegt, aber die üblichen anaeroben und zur Kontrolle auch aeroben bzw. in mit CO₂ angereicherter Atmosphäre erforderlichen Subkulturen müssen ebenso durchgeführt werden, wie die üblichen zur Identifizierung notwendigen Untersuchungen. Hinzu kommt, dass der alleinige Einsatz selektiver Medien nicht ausreichend ist. Deshalb kann auf eine Primäranzucht über nicht selektive Nährböden unter keinen Umständen verzichtet werden, da die gallesensiblen Erreger bei einer solchen Vorgehensweise nicht erfasst werden würden. Doch gallesensible *Prevotella*- und *Porphyromonas*-Arten finden sich nicht selten auch in Materialien nicht-oraler Herkunft, wie z.B. in Proben aus dem abdominalen Bereich oder weiteren Körperregionen. Dies wiederum bedeutet, dass auf den nicht selektiven Medien gewachsene Kolonietypen auf jeden Fall einer Differenzierung zugeführt werden müssen, was natürlich auch die Bestimmung der Galleempfindlichkeit einschließt. Im Falle des Vorliegens galleresistenter Keime, die ja auch auf den gallefreien Medien wachsen, würde mit Ausnahme

der Prüfung der Galleempfindlichkeit somit ein doppelter Aufwand der Identifizierungsschritte für ein und denselben Keim daraus resultieren. Dieser Umstand hat dazu geführt, dass – auch wegen des damit verbundenen größeren finanziellen Aufwandes – in zahlreichen mit einer guten Anaerobierdiagnostik befassten Laboratorien die zusätzliche Mitführung selektiver Medien speziellen Fragestellungen vorbehalten bleibt.

Als alternatives Verfahren zu den zuvor genannten Methoden kann ein Galleblättchendiffusionstest eingesetzt werden. Mit diesem Verfahren haben DRAPER / BARRY [14], YAMAZAKI et al. [64], WEINBERG et al. [57] und HÖHNE [30] gute Ergebnisse erzielen können, so dass einige Firmen entsprechende Testblättchen in ihr Produktionsprogramm aufnahmen (Rosco Diagnostika, Taastrup, Dänemark, bzw. bioMérieux, Charbonnières les Bains, Frankreich). Die genannten Autoren fanden mit diesem Test eine einfach zu handhabende Methode zur schnellen und zuverlässigen Unterscheidung von Stämmen der Genera *Bacteroides*, *Prevotella* und *Porphyromonas*. Der Diffusionstest erwies sich sowohl Zeit und Kosten sparend als auch in hohem Maße reproduzierbar und führte zu vergleichbaren Ergebnissen mit anderen Verfahren zur Prüfung der Galleempfindlichkeit. So verwundert es nicht, dass von einigen Autoren der Galle-Disk-Test inzwischen als fester Bestandteil der bakteriologischen Anaerobierdiagnostik in die Laborpraxis eingeführt wurde [1, 49] und zukünftig von einer noch allgemeineren Anwendung ausgegangen werden kann, zumal es sich anbietet, diesen Disk-Test in andere diagnostische Disk-Teste (Resistenzbestimmung zur Differenzierung, Nitratreduktion, Kohlenhydrat-Fermentation) ohne zusätzlichen Aufwand mit einzubeziehen [1, 15, 30, 49, 52].

Weitere Vorteile bietet diese Methode noch insofern, in dem viele der oralen Arten auf festen Nährböden ein besseres und damit genauer zu beurteilendes Wachstum zeigen und bei schnell wachsenden Spezies, z.B. den wichtigen intestinalen Arten, oft bereits nach 24 Stunden eine endgültige Beurteilung möglich ist. Dies unterstützt das Bemühen bezüglich einer zeitigen Verdachtsdiagnose, ob Vertreter aus der *B. fragilis*-Gruppe in der Probe anwesend sind. Stämme, die nach dieser Zeit ein nur zögerliches oder noch kein sichtbares Wachstum (für *Prevotella*- und *Porphyromonas*-Spezies ist meist eine längere Bebrütungsdauer vonnöten [26]) oder eine Hemmung gegenüber Galle zeigen, sind mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht der *B. fragilis*-Gruppe zugehörig [14].

Für den antimikrobiellen Effekt der Rindergalle sind hauptsächlich die in ihr enthaltenen Gallensäuren verantwortlich. Dieser Tatbestand ist schon seit langem bekannt. Erstmals wurde darüber 1929 im Zusammenhang mit der Auflösung der Zellwand von *Pneumokokken* durch Desoxycholsäure berichtet [10]. Der genaue Wirkmechanismus der Gallensäuren ist jedoch unklar. Dabei existieren zwischen den einzelnen Gallensäuren bezüglich ihrer bakterienhemmenden Wirkung deutliche Unterschiede. Dies ist auf differente chemische Eigenschaften zurückzuführen. BINDER et al. [10] zeigten, dass Dihydroxycholansäuren, wie z.B. Desoxycholsäure, eine bessere antimikrobielle Wirkung aufweisen als Trihydroxycholansäuren, wie z.B. Cholsäure und diese unkonjugierte Gallensäure wiederum eine bessere als die konjugierte Taurocholsäure. Auf Grund der unterschiedlichen Dissoziationskonstanten pKa der Gallensäuren spielt zudem der pH-Wert der Umgebung eine Rolle. Desoxycholsäure weist einen höheren pKa-Wert auf als Cholsäure und diese einen höheren als Taurocholsäure. Bei einem definiertem pH-Wert liegt also im Vergleich zu Cholsäure eine größere Menge der Desoxycholsäure in nichtionisierter Form vor, was eine bessere Diffusion zur Folge haben soll und so möglicherweise den von den Autoren beobachteten stärkeren antimikrobiellen Effekt der Desoxycholsäure bedingen könnte. Dies entspricht jedoch nur z.T. den Erfahrungen dieser Arbeit, da bei einer Blättchenkonzentration von 10 mg im Mittel Natriumcholat die größten HDD aller 3 Gallensalze aufwies, wenn auch die Unterschiede nur minimal ausfielen. Die Begründung hierfür könnte darin liegen, dass in den eigenen Versuchen die Natriumsalze und nicht die freien Säuren verwendet wurden. Für die Blättchenkonzentrationen 1 mg und 5 mg treffen die von BINDER et al. [10] festgestellten Fakten zu.

Des Weiteren fanden BINDER et al. [10], dass der inhibitorische Effekt der Gallensäuren abnimmt, wenn diese in Form von gemischten Mizellen (Zugabe von Lecithin) und nicht in reiner mizellärer Form vorliegen. Er führte dies auf eine geringere Diffusionsrate zurück. Auch daraus wird ersichtlich, dass die Wirkung der Galle auf Bakterien sehr komplexer Natur ist und in vielen Details noch Unklarheiten bestehen.

In der Zusammensetzung der Rindergalle dominiert ähnlich wie beim Menschen die Cholsäure. In der Blasengalle des Menschen kommt sie in konjugierter Form als Taurocholsäure und Glykocholsäure vor, wobei letztere mit 2/3 überwiegt[32]. Beim Rind ist das Verhältnis von Taurocholsäure zu Glykocholsäure unterschiedlich [56]. Neben

Chenodesoxycholsäure findet sich in Menschen- und Rindergalle als weitere wichtige Gallensäure Desoxycholsäure [25, 63]. Des Weiteren sind noch andere, mengenmäßig aber nicht dominierende Gallensäuren in der Rindergalle vorhanden. Der überwiegende Teil der Gallensäuren liegt in der Galle in konjugierter Form vor. Nur wenige Prozent befinden sich in unkonjugiertem Zustand. Die Gesamtmenge an konjugierten Gallensäuren beträgt in der Blasengalle beim Menschen 3-10 g/100ml und beim Rind ca. 7,2 g/100ml [42]. Das Verhältnis von primären zu sekundären (aus primären durch Einwirkung der Darmflora entstehenden) Gallensäuren beträgt ca. 3:1 [63], wobei die Zusammensetzung der Rindergalle als Naturprodukt natürlichen und z.T. erheblichen Schwankungen unterliegt [28]. So haben Nahrung, enterohepatischer Kreislauf, Nervensystem und Krankheiten Einfluss auf ihre Zusammensetzung.

Für den Menschen wurde z.B. die Bildung von atypischen Gallensäuren bei hepatobiliären Erkrankungen beschrieben, was ebenfalls zu qualitativen Veränderungen der Galle führen kann. THADEPALLI et al. [54] untersuchten die antibakterielle Wirkung menschlicher Blasengalle von Gesunden im Vergleich zur Galle von Patienten mit Gallensteinen und akuter Cholezystitis. Sie fanden, dass normale Menschengalle einen bakteriostatischen Effekt auf *B. fragilis* ausübt, während Galle von kranken Patienten das Wachstum dieser Spezies in ca. 50 % der untersuchten Fälle gefördert hat. Daraus folgerten sie, dass bei Patienten mit hepatobiliären Erkrankungen ein Verlust der normalen inhibitorischen Qualität der Menschengalle auftreten kann. Hierzu ist jedoch anzumerken, dass eine Wachstumsstimulierung durch Rindergalle bei intestinalen Bacteroidaceae keine ungewöhnliche Beobachtung darstellt [4, 30].

Unabhängig von dem Verfahren zur Bestimmung des Wachstumsverhaltens gegenüber Galle stellt somit deren wechselnde Zusammensetzung aus unterschiedlich wirksamen Teilkomponenten einen Umstand dar, der dazu führt, dass die verschiedenen Laboratorien bei gleichen Stämmen zu differierenden Ergebnissen kommen. Die Methodik selbst ist von den meisten Konditionen her - wie Keimeinsaat, Nährmedium oder Bebrütungszeit - zwar weitgehend standardisierbar, der Zusammensetzung der Galle als einem biologischen Produkt wird man jedoch stets eine gewisse Inkonstanz zubilligen müssen. Hinzu kommt, dass hochkonzentrierte gallehaltige Lösungen, wie sie zur Herstellung von Galleblättchen mit ausreichenden Mengen an Galle benötigt werden, extrem viskös sind, so dass eine reproduzierbare Dosierung schwierig zu realisieren ist und mit gewissen Gehaltsschwankungen der Testblättchen gerechnet werden muss.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, in wie weit beim Blättchendiffusionstest auf festen Medien zur Bestimmung der Galleempfindlichkeit an Stelle des Naturproduktes Rindergalle, welches durch wechselnde Zusammensetzung belastet und deshalb kaum zu standardisieren ist, die Natriumsalze der drei wichtigsten Gallensäuren verwendet werden können. Diese sind für die inhibitorische Wirkung der Galle verantwortlich, chemisch wohl zu definieren und daher sehr exakt zu dosieren.

Dazu wurden die in der Rindergalle vorkommenden drei Gallensäuren Cholsäure, Desoxycholsäure und Taurocholsäure jeweils in drei verschiedenen Konzentrationen, und zwar zu 1 mg, 5 mg und 10 mg pro Testblättchen verwendet. Für die Rindergalle wurden als Referenz die beiden Konzentrationen 20 mg und 25 mg gewählt. Während WEINBERG et al. [57] eine Konzentration von 15 mg Rindergalle pro Blättchen für ausreichend fanden, empfehlen die Autoren DRAPER / BARRY [14], HÖHNE [30] und YAMAZAKI et al. [64] eine Konzentration von 25 mg pro Blättchen. Die letztgenannten Autoren untersuchten dabei auch eingehend den Zusammenhang zwischen Gallekonzentration und der Größe der Hemmhofdurchmesser. Sie fanden erwartungsgemäß eine konzentrationsabhängige Zunahme der HHD bei Gallekonzentration zwischen 1 und 20 mg pro Blättchen. Eine darüber hinausgehende Konzentrationserhöhung hatte nur eine verhältnismäßig geringe Steigerung der Hemmhofgröße zur Folge. Daraus schlossen sie, dass die optimale Konzentration der Rindergalle zwischen 20 und 35 mg pro Blättchen liegt. HÖHNE [30] schlug in seinen Untersuchungen für die Unterscheidung zwischen Galleresistenz und Gallesensibilität bei Blättchen mit 25 mg Rindergalle einen Grenzwert von 16 mm vor. Er fand den geringsten HHD nichtintestinaler Spezies für zwei Stämme von *P. melaninogenica* mit 16 mm – ermittelte jedoch auch einen Stamm von *B. uniformis*, der mit 18 mm HHD über diesem Grenzwert lag. WEINBERG et al. [57] konnten mit 15 mg Rindergalle pro Blättchen bei fünf getesteten Stämmen von *B. uniformis* keine Hemmhofbildung beobachten.

Die eigenen Untersuchungen wurden an 316 auf Speziesebene bestimmten obligat anaeroben gramnegativen Stäbchen aus der Sammlung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt, wovon 65 aus internationalen Stammsammlungen im Laufe der Zeit als Referenzstämme übernommen worden waren. Die verbleibenden 251 Erreger stellen eigene Isolate des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg dar, die aus klinischen Patientenmaterialien angezüchtet wurden. Zusammengefasst

handelte es sich um folgende Verteilung: Von 120 galleresistenten Stämmen gehörten 97 zu den intestinalen *Bacteroides* (zwölf Spezies) und 23 zum Genus *Fusobacterium* (zwei Spezies), wobei insgesamt 37 Referenzstämme waren und 83 eigene Isolate darstellten. Besondere Berücksichtigung bei der Stammauswahl der intestinalen *Bacteroides*-Arten fand zahlenmäßig mit 40 Stämmen die Spezies *B. uniformis*. Während für die meisten Vertreter der *B. fragilis*-Gruppe ein ungehemmtes Wachstum, z.T. sogar eine Wachstumsstimulation gegenüber Galle beschrieben wird, entspricht es der Erfahrung der Laborpraxis und mancher Autoren der internationalen Literatur, dass zahlreiche Stämme von *B. uniformis* nur schlecht bzw. mit erheblicher Verzögerung in Anwesenheit von Galle wachsen [9, 30, 52].

Bei den 196 gallesensiblen Erregern (22 Spezies) entfielen 22 auf das Genus *Porphyromonas* (vier Spezies), 42 auf schwarzpigmentierte (sechs Spezies) und 70 auf nichtpigmentierte (acht Spezies) des Genus *Prevotella*. Darüber hinaus gehörten in diese Gruppe noch 60 Stämme des Genus *Fusobacterium* (zwei Spezies) sowie je ein Isolat von *B. capillosus* und *B. gracilis*. Insgesamt entstammten 28 der galleempfindlichen Keime internationalen Referenzsammlungen, 168 waren wiederum eigene Isolate. Da Isolate von *B. uniformis* mit dem Trend zur Gallesensibilität am ehesten zu Verwechslungen mit der ebenfalls indolbildenden gallesensiblen Spezies *P. heparinolytica* führen können, wurde eine gegenüber dem Vorkommen in klinischen Materialien überproportionale Zahl an Stämmen dieser Spezies, nämlich 24, in die Untersuchungen einbezogen. Für die meisten Stämme der beiden Spezies *B. uniformis* und *P. heparinolytica* konnte mittels PCR-Fingerprinting die Artzugehörigkeit bestätigt werden, wobei wir für die Durchführung der dazu erforderlichen Versuche an dieser Stelle nochmals Herrn Prof. Dr. A.C. Rodloff und Frau D. Adler vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie der Universität Leipzig zu großem Dank verpflichtet sind.

Mit der getroffenen Auswahl wurde sowohl eine ausreichend große Zahl an resistenten und sensiblen Stämmen untersucht als auch – bis auf die aus besonderem Anlass überproportional vertretenen Spezies *B. uniformis* und *P. heparinolytica* – eine Häufigkeitsverteilung berücksichtigt, wie sie den tatsächlichen Verhältnissen in der routinemäßigen Labordiagnostik nahe kommt. Es wären in Abhängigkeit von dem Patientengut sowie dem Anteil der von den einzelnen Fachdisziplinen eingesandten Untersuchungsproben auch andere Häufigkeitsverteilungen möglich. Für die

verallgemeinerungsfähige Beantwortung der dieser Arbeit untersuchten Fragestellung dürfte dies jedoch ohne Belang sein.

An 63 ausgewählten galleresistenten intestinalen *Bacteroides* – darunter befanden sich 32 Isolate von *B. uniformis* – sowie 46 galleempfindlichen nichtpigmentierten *Prevotella* und 51 schwarzpigmentierten Stämmen der Genera *Prevotella* bzw. *Porphyromonas* wurde zunächst der Einfluss der Inkubationszeit (48, 72 bzw. 96 Stunden) auf die Größe der im Diffusionstest erhaltenen HHD untersucht. Wie in den weiteren Versuchen auch, kamen dabei im Diffusionstest Blättchen zum Einsatz, die mit 20 und 25 mg trockener Rindergalle bzw. mit jeweils 1, 5 oder 10 mg von entweder Natriumcholat, Natriumdesoxycholat oder Natriumtaurocholat beschickt waren. Wie zu erwarten, traten bei den galleresistenten Arten infolge fehlender oder nur schwach ausgebildeter Hemmhöfe keine signifikanten Unterschiede der HHD nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten auf. Für alle Inkubationszeiten bestand nahezu eine 100-prozentige Übereinstimmung innerhalb eines Toleranzbereiches von ± 1 mm, was innerhalb der Fehlerbreite von Diffusionstesten liegt. Lediglich bei einigen Stämmen von *B. uniformis* waren zwischen 48 und 72 h bzw. 48 und 96 h Inkubation vor allem bei Rindergalle über einen Bereich von ± 1 mm hinausgehende Differenzen der HHD festzustellen.

Ebenso nicht unerwartet ist der Befund zu werten, dass die Quote differierender HHD bei den galleempfindlichen Keimen größer als bei den galleresistenten Arten ausfiel und die Abweichungen zwischen 48 h und 72 h bzw. 72 h und 96 h Inkubation geringer waren als zwischen Bebrütungszeiten von 48 h und 96 h. Allerdings korrelierten durch höheren Wirkstoffgehalt der Testblättchen bedingte größere HHD nicht bei allen Substanzen zwangsläufig auch mit geringeren Übereinstimmungen innerhalb der Toleranzbereiche von ± 1 mm bzw. ± 2 mm. Bei den nichtpigmentierten *Prevotella*-Spezies betrug für alle Konzentrationen der Gallensalze nach 48- bzw. 72-stündiger Bebrütung die Übereinstimmungen der HHD innerhalb des Toleranzbereiches von ± 1 mm mindestens 89%. Für die schwarzpigmentierten Arten lag die unterste Grenze übereinstimmender HHD noch über 80%. Wegen der stets unter Zeitdruck stehenden Routinediagnostik wird deshalb bei den galleempfindlichen Spezies für den Galle-Disk-Test eine Inkubationszeit von 48 Stunden empfohlen. Von dieser Empfehlung sind die galleresistenten, in der Regel schnellwachsenden intestinalen *Bacteroides*-Arten nicht immer betroffen, da erfahrungsgemäß für diese Arten Inkubationszeiten von 24 Stunden oft ausreichend sind.

Sowohl bei der Verwendung von Galle als auch beim Einsatz der Natriumsalze der Gallensäuren zeigten sich fast ausnahmslos gut ablesbare, scharf begrenzte, runde Hemmhöfe. Zum Teil wurde das Wachstum der Stämme zum HH hin schwächer, so dass der Hemmhofrand durch einzeln stehende Kolonien gebildet wurde, die dann als Messpunkte für die Bestimmung der HHD dienten. In der Größe konzentrationsabhängig zeigten sich um die Testblättchen helle Hämolysehöfe, die durch die Gallensäuren verursacht wurden. Sie waren bei der Rindergalle am stärksten ausgeprägt. Diese auch von DRAPER / BARRY [14] beschriebenen Nährbodenveränderungen beeinträchtigten das Ablesen der Hemmhöfe jedoch nicht.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen für **Rindergalle** decken sich mit denen der in der Literatur angegebenen. Die beiden Konzentrationen 20 mg und 25 mg unterscheiden sich in ihren Hemmhofgrößen nur geringfügig. Zu gleichen Resultaten kamen YAMAZAKI et al. [64]. Für die üblicherweise benutzten 25 mg Galle enthaltenden Testblättchen finden sich die größten HHD bei den gallesensiblen schwarzpigmentierten Spezies. Geringer fielen die HHD bei den nichtpigmentierten *Prevotella*-Arten aus. Für *F. nucleatum*, eine als gallesensibel geltende Spezies lag der geringste HHD bei 12 mm, jedoch zeigten andere Stämme HH bis zu 33 mm. Für *F. necrophorum*, einer mit wechselnder Galleempfindlichkeit vorkommenden Spezies, wurden HHD zwischen 12 und 20,5 mm ermittelt, so dass sich – legt man einen Grenzwert von 12 mm zu Grunde – alle getesteten Stämme dieser Spezies als gallesensibel zeigten.

Die Vertreter aus der *B. fragilis*-Gruppe ließen bis auf jeweils einen Stamm von *B. fragilis* (HHD 10 mm) und *B. vulgatus* (HHD 7 mm) bei 20 mg Rindergalle pro Blättchen sowie jeweils einen Stamm von *B. fragilis* (HHD 12 mm), *B. ovatus* (HHD 8 mm) und *B. vulgatus* (HHD 8 mm) bei 25 mg generell keine Hemmung in ihrem Wachstum erkennen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Blättchen allein schon einen Durchmesser von 6 mm aufweisen, so dass ein HH von 7 mm nur einer Hemmzone von 0,5 mm bis zum Blättchenrand entspricht und somit gerade noch wahrnehmbar ist. Deutliche Ausnahmen bei den intestinalen *Bacteroides* betrafen neben einem von zwei getesteten Stämmen der als galleresistent einzustufenden Spezies *B. splanchnicus* einen größeren Anteil der Isolate von *B. uniformis* (siehe unten).

Vor allem die Ergebnisse des Diffusionstestes mit den gallesensiblen Vertretern der Genera *Prevotella*, *Porphyromonas* und *Fusobacterium* belegen, dass an Stelle der mit

Rindergalle imprägnierten Disk auch Papierblättchen verwendet werden können, die mit geeigneten Konzentrationen der Natriumsalze der Chol- bzw. Desoxycholsäure beladen sind. Dagegen ist Natriumtaurocholat für diese Zwecke nicht zu empfehlen. Für Taurocholsäure bestätigen sich somit die Angaben der Literatur [10], wonach konjugierte Gallensäuren eine geringere antimikrobielle Wirkung aufweisen als unkonjugierte. Fehlende Hemmhöfe der gallesensiblen Stämme und deutlich kleinere HHD im Vergleich zu Rindergalle sowie den beiden anderen Gallensäuresalzen lassen diese Substanz für die Bestimmung der Gallesensibilität unseren Ergebnissen zufolge ungeeignet erscheinen. Die zwei verbleibenden Gallensäuresalze erbrachten nahezu gleiche Ergebnisse, in einigen wenigen Fällen mit minimalen Vorteilen für Natriumdesoxycholat, in anderen Ansätzen mit den günstigeren HHD durch Natriumcholat, so dass diesen Unterschieden keine größere Bedeutung zukommt.

Für die drei Gallensäuren bestand hinsichtlich der Hemmhofgröße und der drei verschiedenen Konzentrationen ein deutlicher Zusammenhang. Eine größere Konzentration pro Blättchen hatte auch einen größeren HHD zur Folge. Da der Ablesefehler bei größeren Hemmhöfen relativ gesehen geringer ausfällt und somit eine sicherere Aussage bezüglich der stammspezifischen Sensibilitätsunterschiede zulässt, werden mit 10 mg der nicht konjugierten Gallensäuresalze imprägnierte Testblättchen für den Disk-Test zur Bestimmung der Galleempfindlichkeit vorgeschlagen.

Weder beim Natriumdesoxycholat noch beim Natriumcholat ließ sich für den HHD ein Grenzwert finden, bei dem für alle untersuchten Erreger Überschneidungen zwischen den Testergebnissen, die als empfindlich oder resistent einzuordnen sind, zu vermeiden gewesen wären. Aus der Fülle der experimentellen Daten erwiesen sich ein Grenzwert des HHD von 12 mm für Blättchen mit 10 mg Natriumdesoxycholat bzw. von 15 mm für Natriumcholat gleicher Konzentration als derjenige Wert, der zu den wenigsten Fehlbestimmungen führte. Letztgenannter Grenzwert könnte auch bei den *Fusobakterien* zu Grunde gelegt werden. Ein Stamm von *F. nucleatum* würde dann allerdings als falsch galleresistent eingestuft werden müssen, und zwar ausgerechnet der Referenzstamm ATCC 25586. Außerdem wäre ein zuvor als sensibel bestimmter Stamm von *F. necrophorum* als galleresistent ermittelt worden. Im Sinne einer möglichst einheitlichen Vorgehens- und somit auch Beurteilungsweise von Laborversuchen wäre die Fehlerquote von einer Fehlbestimmung bei 32 untersuchten Stämmen von *F. nucleatum* noch vertretbar.

Andererseits käme als Alternative auch ein Grenzwert von 13 mm für Natriumcholatblättchen mit 10 mg in Betracht, bei dem keine Überschneidungen bei den *Fusobakterien* auftraten. Für *Prevotella*- und *Porphyromonas*-Arten erwies sich dieser Grenzwert jedoch nicht als vorteilhaft. Die Beantwortung der Frage, ob es sinnvoll ist, einerseits genusspezifische Grenzwerte für *Fusobakterien*-Arten sowie andererseits für die Genera *Bacteroides*, *Prevotella* und *Porphyromonas* festzulegen, sollte der zukünftigen Laborpraxis überlassen bleiben.

Schließlich blieb noch zu klären, für welche der beiden verbliebenen Testsubstanzen man sich zur Bestimmung der Galleempfindlichkeit gramnegativer obligat anaerober Stäbchen im Blättchendiffusionstest entscheiden soll: Natriumcholat oder Natriumdesoxycholat. Obwohl mit einer Fehlbestimmung mehr „belastet“, überwiegen letztlich die Vorteile beim Natriumcholat. Zu nennen wären da bessere Löslichkeit; erheblich geringere Viskosität und damit bessere Dosierbarkeit bei der Blättchenpräparation verbunden mit Vorteilen für den Trocknungsprozess. Des weiteren scheint Natriumcholat gegenüber Natriumdesoxycholat entgegen früheren Berichten [10] offensichtlich eine größere Diffusionsfähigkeit zu besitzen und somit zur Ausbildung größerer Hemmhöfe zu führen (was eine genauere Ablesung ermöglicht), und nicht zuletzt weist Natriumcholat eine geringere Anzahl bei den als falsch resistent eingestuften Stämmen bei den *Fusobakterien* auf. **Deshalb wird bei vergleichbaren HHD wie bei den mit Rindergalle imprägnierten Testblättchen die Verwendung von Testblättchen mit 10 mg Natriumcholat zur Bestimmung der Galleempfindlichkeit gramnegativer obligat anaerober Stäbchen empfohlen. Als sensibel sind dabei Stämme der Genera *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* und eventuell auch des Genus *Fusobacterium* mit HHD ab 15 mm einzustufen. Für die Vertreter des Genus *Fusobacterium* könnten alternativ allerdings auch Hemmhöfe ab 13 mm Durchmesser für eine Zuordnung als sensibel gegenüber Galle zu Grunde gelegt werden.**

Die Vorteile eines solch einfach durchzuführenden und wie bereits erwähnt mit wenig zusätzlichem Aufwand realisierbaren Testes ließen sich am Beispiel der Abgrenzung von *B. uniformis* und *P. heparinolytica* zeigen. Während *B. uniformis* als Spezies der intestinalen *Bacteroides*-Arten, also der so genannten *B. fragilis*-Gruppe, als galleresistent anzusehen ist, findet man wie zuvor aufgeführt häufig Stämme, die eine gewisse Empfindlichkeit gegenüber Galle zeigen. Die Grade der Empfindlichkeit können dabei

schwanken und reichen in flüssigen gallehaltigen Medien von der Wachstumsförderung über ein um Tage verzögertes Wachstum in seltenen Fällen sogar bis zur nahezu vollständigen Wachstumshemmung. Ähnliches kann man auch auf festen Medien beobachten. Im Blättchendiffusionstest äußert sich dies durch die Ausbildung entsprechend dimensionierter Hemmhöfe. Von insgesamt 40 Isolaten wiesen in den eigenen Untersuchungen mit galleimprägnierten Disks nur fünf ein Wachstum bis an den Blättchenrand auf, zehn hatten HHD unter 10 mm und für 25 Stämme wurden HHD ab 10 mm gemessen, wovon viermal die HHD sogar über 13 mm maßen - mit zwei Extremen von 17 bzw. 18 mm HHD. Bei einem Grenzwert von 14 mm HHD für Blättchen mit 25 mg Rindergalle würden insgesamt vier Stämme von *B. uniformis* als falsch gallesensibel eingeordnet und damit auf Grund der Fermentationsleistungen wohl eher als *P. heparinolytica* angesehen werden. Neben den als falsch empfindlich bestimmten Stämmen von *B. uniformis* betraf dies auch ein Isolat von *B. splanchnicus*. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit Natriumcholat erzielt. Hier waren es immerhin noch zwei Stämme von *B. uniformis* sowie ein Isolat von *B. splanchnicus* bei denen dieser Irrtum möglich sein würde (Tabellen 27 und 30). Eine solche fehlerhafte Identifizierung eines Vertreters der intestinalen *Bacteroides* als eine orale Art könnte auch Anlass einer nicht korrekt kalkulierbaren Chemotherapie sein, wenn der Einsatz von β -Laktamantibiotika ohne Laktamasehemmer in Betracht gezogen würde.

Unbefriedigend für die bakteriologische Diagnostik sind die infolge unvollständiger Datenbanken der kommerziellen Kits als *B. uniformis* fehlbestimmten Isolate von *P. heparinolytica*. Für diese Spezies wird trotz ihrer Prädominanz im oralen Bereich neuerdings eine mögliche Zugehörigkeit zum Genus *Bacteroides* diskutiert [17, 34, 38]. Dieser Sachverhalt sowie die in der Einleitung hierzu erwähnten weiteren Zusammenhänge bekräftigen aus unserer Sicht die Forderung nach einer einfachen aber zuverlässigen Methode zur Bestimmung der Galleempfindlichkeit, wobei die Einbeziehung in andere Blättchendiffusionsteste zu Differenzierungszwecken ein zusätzliches Argument für diesen Test liefert. Dessen Eignung ließ sich u.a. am Beispiel der Abgrenzung von *B. uniformis* und *P. heparinolytica* belegen, wobei trotz z.T. differierender Bandenmuster für *B. uniformis* im PCR-Fingerprinting eine klare Abgrenzung von der einheitlich ausgewiesenen Art *P. heparinolytica* die Ergebnisse des Diffusionstestes bestätigten (Tabelle 29, Abbildungen 1-4). Sofern eine Bestimmung der Galleempfindlichkeit nicht in das labordiagnostische Repertoire einbezogen ist, stellt die fehlerhafte Identifizierung von

P. heparinolytica je nach verwendetem Kit als *B. uniformis* oder *B. thetaiotaomicron* (beide sind intestinale galleresistente Arten) durch Kits wie dem Rapid Ana II oder dem BBL Crystal, die Regel und nicht die Ausnahme dar. Kits dieser Art haben inzwischen eine weite Verbreitung in mikrobiologisch-diagnostisch tätigen Laboratorien erfahren, so dass solche Fehlbestimmungen vor allem die Laboratorien betreffen, die ihre Diagnostik auf die Anwendung kommerzieller Identifizierungssysteme wie BBL Crystal oder Rapid Ana II orientiert haben. Für die kalkulierte Chemotherapie wäre dies zwar nicht fatal, aber dem Kenntnissgewinn über die bei anaeroben Infektionen beteiligten Spezies ist es sicherlich nicht dienlich. Sämtliche Isolate von *P. heparinolytica*, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, konnten auf Grund ihrer HHD sowohl gegenüber Galle als auch gegenüber Natriumcholat eindeutig von *B. uniformis* abgegrenzt werden. Der kleinste HHD lag bei 17,5 mm, alle anderen deutlich darüber.

Nicht nur an diesem Beispiel kann gezeigt werden, wie bedeutungsvoll die Mitführung der Bestimmung der Galleempfindlichkeit für die Abgrenzung bzw. korrekte Identifizierung galleresistenter oder gallesensibler Spezies ist, was sich auch aus einer Reihe anderer, in dieser Arbeit erhobenen Befunde erkennen lässt. So wiesen bei Verwendung von 10 mg Natriumcholat und unter Zugrundelegung des vorgeschlagenen grenzwertigen HHD von 15 mm drei an sich gallesensible Stämme mit HHD von 11 mm (*B. gracilis*), 12,5 mm (*P. bivia*) und 14 mm (nochmals *P. bivia*) Zonen eingeschränkten Wachstums auf, die sie fälschlicherweise als galleresistent erfasst hätten. Bei den schwarzpigmentierten Spezies traten dagegen keine Überschneidungen auf. Dies ist deshalb von Interesse, da die pigmentierten *Prevotella*- bzw. *Porphyromonas*-Arten bislang als generell gallesensibel angesehen werden. Allerdings soll nicht verschwiegen werden, dass kürzlich über eine galleresistente Art mit brauner Pigmentbildung auf Nährböden, die hämolysiertes Blut enthielten, berichtet wurde [49].

Zusammenfassend lässt sich folgendes feststellen:

Der Blättchendiffusionstest ist

1. wegen der guten Übereinstimmung der Ergebnisse mit denen konventioneller Methoden sowie mit den realen Wachstumsverhältnissen der Keime in gallehaltigen Medien,
2. wegen seiner einfachen Handhabung und der Möglichkeit gleichen methodischen Vorgehens wie bei anderen in der Anaerobendiagnostik praktizierten Disk-Testen,

3. wegen seiner Einfachheit,
4. wegen der relativ kurzen Inkubationszeiten bis zum Vorliegen eines Ergebnisses und
5. nicht zuletzt wegen der Tatsache, dass insbesondere viele der galle-sensiblen Arten nur schlecht oder gar nicht in flüssigen Medien wachsen, wohl aber auf festen Nährböden,

den anderen Verfahren zur Bestimmung der Galleempfindlichkeit als überlegen einzustufen.

Dabei kommt die Möglichkeit, die nicht zu standardisierende und schwierig zu handhabende Rindergalle durch das chemisch eindeutig definierte und in hoher Reinheit einsetzbare Natriumcholat ersetzen zu können, dem Bedürfnis nach Standardisierung der Labormethoden entgegen, von den Möglichkeiten der Nutzung im Rahmen der internen Qualitätskontrolle ganz abgesehen. Aus unserer Sicht bedeutet der Blättchendiffusionstest mit Natriumcholat eine sichtbare Verbesserung des Blättchendiffusionstestes zur Bestimmung der Galleempfindlichkeit obligat anaerober Stäbchen der Genera *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* und *Fusobacterium*.

6. Zusammenfassung

Ein wichtiges Merkmal zur Differenzierung obligat anaerober gramnegativer Stäbchen ist deren Verhalten gegenüber Rindergalle. Abgesehen von der auch möglichen Wachstumsförderung bei einigen intestinalen *Bacteroides*-Arten wird zu Differenzierungszwecken vorrangig zwischen galleresistenten und gallesensiblen Genera bzw. Spezies unterschieden. Während die intestinalen *Bacteroides*-Arten oder *Fusobakterien*-Spezies wie *F. varium* und *F. mortiferum* sich durch Galleresistenz auszeichnen, sind die im oralen und vaginalen Bereich angesiedelten Spezies der Genera *Porphyromonas* und *Prevotella* sowie andere als die bereits erwähnten *Fusobakterien*-Spezies wie z.B. *F. nucleatum* gegenüber Galle empfindlich.

Die Galleempfindlichkeit wird durch das Wachstumsverhalten der Keime auf festen oder in flüssigen Medien, die 20% native Rindergalle enthalten, ermittelt. Dabei erfolgt die Bestimmung auf festen Medien zumeist über die zusätzliche Mitführung eines selektiven Nährbodens, wie etwa des *Bacteroides*-Galle-Eskulin-Agars. Da auf diesem jedoch die gallesensiblen Arten nicht anzüchtbar sind, sondern nur auf nicht selektiven Medien, ist die Bestimmung der Galleempfindlichkeit zumindest für diese Keime erst nach deren Primäranzucht möglich. Den so genannten „goldenen Standard“ bzw. die Methode der Wahl stellt die Testung in präreduzierten flüssigen Medien mit dem bereits erwähnten Zusatz nativer Rindergalle dar. Während bei den intestinalen *Bacteroides*- und galleresistenten *Fusobakterien*-Arten dabei methodisch keine Probleme zu erwarten sind, zeigen viele der gallesensiblen *Porphyromonas*-, *Prevotella* und *Fusobakterien*-Arten bereits in den flüssigen Kontrollmedien ohne Gallezusatz oft nur ein sehr spärliches Wachstum. Bleibt es sogar aus, so sind Aussagen über das tatsächliche Verhalten gegenüber Galle dann nicht möglich.

Aus diesem Grunde wurden schon vor längerer Zeit Blättchendiffusionsteste auf festen Medien entwickelt, die auch den genannten Arten ein ausreichendes Wachstum garantieren. Dabei kamen mit Rindergalle getränkte Papierblättchen zur Anwendung. Aus der Größe des Hemmhofes konnte auf den Grad der Galleempfindlichkeit geschlossen werden. Einige Firmen bieten daher inzwischen solche Testblättchen kommerziell an. Allerdings ist auch dieses Verfahren nicht frei von einschränkenden Problemen. So ist die zur Beschickung mit 20 bis 25 mg Trockengalle pro Blättchen erforderliche Gallelösung so viskös, dass bei der Aufbringung auf die Blättchen Dosierungsfehler kaum zu verhindern

sind. Andererseits ist die Galle als Naturprodukt in ihrer Zusammensetzung Schwankungen unterworfen, die zumindest chargenabhängige Unterschiede im Gehalt der hemmenden Wirkstoffe nicht ausschließen können.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher als Alternative zur Ermittlung der Galleempfindlichkeit im Blättchendiffusionstest der Einsatz der gut dosierbaren Natriumsalze verschiedener Gallensäuren, und zwar von Natriumcholat, Natriumdesoxycholat und Natriumtaurocholat, als antimikrobiell wirksame Bestandteile der Galle untersucht. Ziel war es, dasjenige Gallensäuresalz und dessen Konzentration herauszufinden, das auf Grund eindeutiger Unterschiede der Hemmhofdurchmesser eine zuverlässige Aussage bezüglich der Galleresistenz bzw. Gallesensibilität ermöglicht.

Die Durchführung der Tests erfolgte mit selbst hergestellten Testblättchen, die folgenden Gehalt an Wirksubstanz pro Blättchen besaßen: Trockengalle 20 und 25 mg sowie jeweils 1, 5 und 10 mg für Natriumcholat, Natriumdesoxycholat und Natriumtaurocholat.

In die Untersuchungen wurden insgesamt 316 Stämme obligat anaerober gramnegativer Stäbchen einbezogen, die zum Teil als Referenzstämmen aus internationalen Stammsammlungen bezogen wurden, zum Teil institutseigene Isolate aus klinischen Untersuchungsmaterialien darstellten. Von 120 galleresistenten Stämmen entfielen 97 auf zwölf Spezies intestinaler *Bacteroidaceae* und 23 auf zwei Spezies des Genus *Fusobacterium*. Dem standen 196 gallesensible Vertreter mit 22 Spezies gegenüber, von denen 22 auf vier Spezies des Genus *Porphyromonas*, 42 auf sechs schwarzpigmentierte Spezies des Genus *Prevotella*, 70 auf acht nichtpigmentierte Spezies desselben Genus, 70 auf zwei Spezies des Genus *Fusobacterium* und je ein Isolat von *B. capillosus* sowie *B. gracilis* entfielen. Besondere zahlenmäßige Berücksichtigung in dem ansonsten einem Routinelabor entsprechenden Keimspektrum fanden 40 Stämme der galleresistenten Art *B. uniformis* und 24 Stämme der in den biochemischen Stoffwechselleistungen sehr ähnlichen aber gallesensiblen Art *P. heparinolytica*. Die Begründung hierfür liegt einerseits in den Erfahrungsberichten einiger Autoren, die für *B. uniformis* in Anwesenheit von Galle ein schlechtes bzw. erheblich verzögertes Wachstum angeben und somit eine Verwechslungsgefahr mit *P. heparinolytica* sehen. Andererseits werden Stämme der letztgenannten Spezies wegen ihres bisherigen Fehlens in den Datenbanken einiger kommerzieller Identifizierungssysteme falsch als *B. uniformis* ausgewiesen. Für die letztgenannten beiden Spezies wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie und

Infektionsepidemiologie der Universität Leipzig mit freundlicher Unterstützung von Herrn Prof. Dr. A. C. Rodloff die Spezieszugehörigkeiten zu *P. heparinolytica* vollständig und für *B. uniformis* für einen großen Teil der Isolate durch PCR-Fingerprinting und Wachstumsprüfung in gallehaltigen präreduzierten Medien bestätigt.

Für 160 Stämme wurden die Ergebnisse des Diffusionstestes nach 48, 72 und 96 Stunden Inkubation abgelesen, wonach sich keine wesentlichen Unterschiede der Hemmhofdurchmesser ergaben. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen erfolgte deshalb die endgültige Ergebnisablesung nach 48 Stunden. Diese Bebrütungszeit wird daher auch aus Gründen einer möglichst zügigen Labordiagnostik für die langsamer wachsenden sensiblen Arten als praxisrelevant empfohlen.

Für den Blättchendiffusionstest mit Rindergalle deckten sich die Ergebnisse mit denen der Literatur, wobei sich nur geringfügige Unterschiede zwischen den Konzentrationen mit 20 und 25 mg ergaben. Die größten Hemmhofdurchmesser traten bei den schwarzpigmentierten Spezies auf. Mit Ausnahme von *B. uniformis* zeigten die galleresistenten Stämme - von einigen wenigen mit extrem kleinem Hemmhof abgesehen - ein uneingeschränktes Wachstum bis an den Blättchenrand. Bei *B. uniformis* ergaben sich für vier Stämme mit 25 mg Rindergalle pro Blättchen Hemmhöfe von 14, 15, 17 und 18 mm Durchmesser und waren damit gleich (ein Stamm) oder größer als der Wert von 14 mm als Grenzwert mit der geringsten Zahl an Überschneidungen zwischen resistenten und sensiblen Stämmen. Bei Gallegehalten von 20 mg pro Blättchen und einem optimalen Grenzwert von 13 mm waren die Ergebnisse gleichwertig.

Während sich Natriumtaurocholat auf Grund seiner geringen antimikrobiellen Wirksamkeit und damit nur kleinen oder ganz fehlenden Hemmhöfen bei gallesensiblen Stämmen nicht für die Bestimmung der Galleempfindlichkeit eignet, zeigten sowohl mit 10 mg Natriumcholat als auch mit 10 mg Natriumdesoxycholat getränkte Blättchen Ergebnisse, die mit denen der Rindergalle sehr gut übereinstimmten. Größere Konzentrationen auf den Blättchen ergaben erwartungsgemäß auch größere Hemmhöfe. Der einfacheren Beschickung der Testblättchen mit geringeren Substanzmengen einerseits steht andererseits der geringere Ablesefehler beim Vorliegen größerer Hemmhöfe gegenüber, so dass aus der Sicht der vorliegenden Ergebnisse Testblättchen mit 10 mg Substanz eingesetzt werden sollten.

Weder mit Natriumcholat noch mit Natriumdesoxycholat konnten für die Hemmhofdurchmesser Grenzwerte gefunden werden, die für alle untersuchten Erreger Überschneidungen zwischen den Testergebnissen ausschließen, und somit verhindern, einen Keim als falsch resistent oder falsch empfindlich einzuordnen. So musste ein HHD als Grenzwert ermittelt werden, bei dem die geringsten Fehlbestimmungen auftraten. Dabei wird wegen besserer Löslichkeit und geringerer Viskosität der zur Imprägnierung der Testblättchen notwendigen Konzentrationen der Stammlösungen verbunden mit Vorteilen für den Trocknungsprozess die Verwendung von Natriumcholat günstiger eingestuft als die von Natriumdesoxycholat. Bei Anwendung von Testblättchen mit 10 mg Natriumcholat liegt der günstigste HHD für Vertreter der Genera *Bacteroides*, *Porphyromonas* und *Prevotella* bei 15 mm. Dieser Wert könnte aus Gründen der Einheitlichkeit auch für *Fusobakterien* festgelegt werden, allerdings ließen sich hier mit einem Grenzwert von 13 mm Überschneidungen zwischen galleresistenten und gallesensiblen *Fusobakterien* ganz vermeiden.

Die Bedeutung des Testes für eine korrekte Speziesbestimmung als wichtige Ergänzung bei der Anwendung kommerzieller Kits zur Identifizierung anaerober gramnegativer Stäbchen ließ sich an Hand von *B. uniformis* und *P. heparinolytica* belegen.

7. Literaturverzeichnis

1. Baron EJ, Citron DM: Anaerobic identification flowchart using laboratory resources. Clin Infect Dis 25 Suppl.2 (1997) 143-146
2. Barry AL, Fuchs PC, Gerlach EH, Allen SD, Acar JF, Aldridge KE, Bourgault A-M, Grimm H, Hall GS, Heizmann W, Jones RN, Swenson JM, Thornsberry C, Wexler H, Williams JD, Wüst J: Multilaboratory evaluation of an agar diffusion disk susceptibility test for rapidly growing anaerobic bacteria. Rev Infect Dis 12 Suppl.2 (1990) 210-217
3. Bartlett JG: Infections Caused by Anaerobic Bacteria. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (Hrsg): Infectious Diseases. W. B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto (usw.), 1992, S. 1555-1568
4. Beerens H, Castel MM: Acción de la bile sur la croissance de certaines bactéries anaérobies á gram négatif. Ann. Inst. Pasteur 99 (1960) 454-56
5. Beipackzettel: „AnaeroGen™“, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
6. Beipackzettel: „BBL® GasPak® Anaerobic System - User Quality Control“, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, USA
7. Beipackzettel: „Der Anaerobenindikator“, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
8. Beipackzettel: „Mc Farland Standard“, bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Frankreich
9. Bernhardt H, Knoke M: Humanpathogene Anaerobier. Gustav Fischer, Jena, 1988
10. Binder HJ, Filburn B, Floch M: Bile acid inhibition of intestinal anaerobic organisms. Am J Clin Nutr 28 (1975) 119-125
11. Boltze HP: Allgemeine technische Richtlinien. In: Burkhardt F (Hrsg): Mikrobiologische Diagnostik. Georg Thieme, Stuttgart, New York, 1992, S. 604-612
12. Collee JG: Virulence Factors of Anaerobes: An Overview. In: Borriello SP (Hrsg): Clinical and Molecular Aspects of Anaerobes. Wrightson Biomedical Publishing LTD, Petersfield, 1990, S. 127-136

13. DIN 58940: Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika. Beuth Verlag, Berlin, Köln, 1995
14. Draper DL, Barry AL: Rapid identification of *Bacteroides fragilis* with bile and antibiotic disks. *J Clin Microbiol* 5/4 (1977) 439-443
15. Essers L: Simple identification of anaerobic bacteria to genus level using typical antibiotic susceptibility patterns. *J Appl Bacteriol* 52 (1982) 319-323
16. Finegold SM, Baron EJ, Wexler HM, Tenover JC: A clinical guide to anaerobic infections. Star Publishing Company, Belmont, 1992, S. 3-9
17. Finegold SM, Jousimies-Somer H: Recently described clinically important anaerobic bacteria: medical aspects. *Clin Infect Dis* 25 Suppl.2 (1997) 88-93
18. Finegold SM: A century of anaerobes: a look backward and a call to arms. *Clin Infect Dis* 16 Suppl.4 (1993) 453-457
19. Finegold SM: Anaerobic Bacteria in Human Disease. Academic Press, New York, San Francisco, London, 1977
20. Finegold SM: Anaerobic Gram-Negative Rods: *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Bilophila*. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (Hrsg): Infectious Diseases. W. B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto (usw.), 1992, S. 1571-1580
21. Finegold SM: Anaerobes: problems and controversies in bacteriology, infections, and susceptibility testing. *Rev Infect Dis* 12 Suppl.2 (1990) 223-230
22. Gorbach SL, Bartlett JG, Tenover JC: Biology of Anaerobes. Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan, 1981, S. 8-28
23. Görtz G, Rodloff A, Tung LC: Sporelose Anaerobier in der Chirurgie. *Z ärztl Fortbild* 80 (1986) 333-338

24. Graves MH, Morello JA, Kocka FE: Sodium polyanethol sulfonate sensitivity of anaerobic cocci. *Appl Microbiol* 27/6 (1974) 1131-1133
25. Gürtler H: Physiologie der Verdauung und Absorption. In: Kolb E (Hrsg): *Lehrbuch der Physiologie der Haustiere*. Teil 1. 3.Aufl. Gustav Fischer, Jena, 1974, S. 351-359
26. Hammann R, Werner H: Bacteroidaceae. In: Burkhardt F (Hrsg): *Mikrobiologische Diagnostik*. Georg Thieme, Stuttgart, New York, 1992, S. 195-204
27. Hentges DJ: The anaerobic microflora of the human body. *Clin Infect Dis* 16 Suppl.4 (1993) 175-180
28. Hinsberg K, Bruns F: Galle. In: Hoppe-Seyler F, Thierfelder H (Hrsg): *Handbuch der physiologisch und pathologisch-chemischen Analyse*. Band 4. 10.Aufl. Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1953, S. 390-393
29. Höhne C, Brockmann J: Infektionen durch sporenlose Anaerobier. *Z ärztl Fortbild* 73 (1979) 1045-1050
30. Höhne C: *Klinisch-mikrobiologische Untersuchungen über Kultivierung, Differenzierung, Vorkommen und Chemotherapeutikaresistenz von Bacteroides*. Dissertation B, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1985
31. Höhne C: Über eine einfache Methode zur Herstellung von Testblättchen. *Z med Labortechnik* 17 (1976) 42-45
32. Hoppe-Seyler F, Thierfelder H: *Handbuch der physiologisch und pathologisch-chemischen Analyse*. 9.Aufl. Springer, Berlin, 1924, S. 908-912
33. Horn R, Bourgault A-M, Lamothe F: Disk diffusion susceptibility testing of the *Bacteroides fragilis* group. *Antimicrob Agents Chemother* 31 (1987) 1596-1599
34. Jousimies-Somer HR, Carlson P: Taxonomic changes among anaerobic Gram-negative bacteria. *Anaerobe* 8 (2002) 115

44. Mittermayer H: Mikrobielle Besiedlung des gesunden Menschen. In: Brandis H, Köhler W, Eggers HJ, Pulverer G (Hrsg): Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie. 7.Aufl. Gustav Fischer, Stuttgart, Jena, New York, 1994, S. 181-188
45. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. 1990 2. edition, approved standard. NCCLS publication M11-AZ, NCCLS, Villanova
46. Occhinero M, Luzzi I, Mastrantonio P, Panichi G, Pantosti AL: A note on fermentation reactions of anaerobic bacteria on a solid medium. *J Appl Bacteriol* 52 (1982) 449-451
47. Paster BJ, Dewhirst FE, Olsen I, Fraser GJ: Phylogeny of *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* spp. and related bacteria. *J Bacteriol* 176 (1994) 725-732
48. Rautio M, Eerola E, Jalava J, Jousimies-Somer HR: Phylogenetic description of a bile-resistant pigmenter, probably conforming to a new genus and species. *Rev Med Microbiol* 8, Suppl 1 (1997) 103
49. Rautio M, Lönnroth M, Saxén H, Nikku R, Väisänen M-L, Finegold SM, Jousimies-Somer H: Characteristics of an unusual anaerobic pigmented gram-negative rod isolated from normal and inflamed appendices. *Clin Infect Dis* 25 Suppl.2 (1997) 107-110
50. Rodloff AC: Anaerobe Infektionserreger - vom Patienten zum Labor. Upjohn, Heppenheim, 1991
51. Shimada K, Sutter VL, Finegold SM: Effect of bile and desoxycholate on gram-negative anaerobic bacteria. *Appl Microbiol* 20/5 (1970) 737-741
52. Summanen P, Baron EJ, Citron DM, Strong C, Wexler HM, Finegold SM: *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*. 5.Aufl. Star Publishing Company, Belmont, 1993
53. Suzuki K, Ikeda T, Nakamura H, Yoshimura F: Isolation and characterization of a nonpigmented variant of *Porphyromonas endodontalis*. *Oral Microbiol Immunol* 12 (1997) 155-161

54. Thadepalli H, Chuah SK, Bansal MB, Lou MA: The effect of human bile on *Bacteroides fragilis* in health and disease. *Microbios* 55 (1988) 17-24
55. Thornsberry C: Antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: review and update on the role of the national committee for clinical laboratory standards. *Rev Infect Dis* 12 Suppl.2 (1990) 218-222
56. Tschesche R, Reuber R: Gallensäuren. In: Hoppe-Seyler F, Thierfelder H (Hrsg): *Handbuch der physiologisch und pathologisch-chemischen Analyse*. Band 3/Teil 2. 10.Aufl. Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1955, S. 1412-1427
57. Weinberg LG, Smith LL, McTighe AH: Rapid identification of the *Bacteroides fragilis* group by bile disk and catalase tests. *Lab Med* 14/12 (1983) 785-788
58. Werner H, Heinzmann WR: Anaerobier. In: Burkhardt F (Hrsg): *Mikrobiologische Diagnostik*. Georg Thieme, Stuttgart, New York, 1992, S. 188-194
59. Werner H: *Anaerobierinfektionen - Pathogenese, Klinik, Therapie, Diagnostik*. 2. überarb. u. erw. Aufl. Georg Thieme, Stuttgart, New York, 1985
60. Werner H: Die Pathogenität der endogenen Anaerobier. In: Krasemann C, Werner H (Hrsg): *Anaerobier-Infektionen - und es gibt sie doch*. De Gruyter, Berlin, New York, 1984, S. 1-13
61. Wexler HM, Reeves D, Summanen PH, Molitoris E, McTeague M, Duncan J, Wilson KH, Finegold SM: *Sutterella wadsworthensis* gen. nov., sp. nov., bile-resistant microaerophilic *Campylobacter gracilis*-like clinical isolates. *Int J Syst Bacteriol* 46 (1996) 252-258
62. Wexler HM: Susceptibility testing of anaerobic bacteria: Myth, magic, or method? *Clin Microbiol Rev* 4/4 (1991) 470-484
63. *Wissenschaftliche Tabellen Geigy, Teilband Körperflüssigkeiten*. 8.Aufl. Basel, 1977
64. Yamazaki E, Sugimoto K, Niwano K, Okada J: A simple bile-disk method for the identification of *Bacteroides fragilis*. *Microbiol Immunol* 26/9 (1982) 759-765

65. Zabransky RJ: Revisiting anaerobe susceptibility testing. Clin Microbiol Newsl 11/24 (1989) 185-188

8. Thesen

1. Für die Differenzierung gramnegativer obligat anaerober Stäbchen stellt das Wachstumsverhalten gegenüber Galle ein wichtiges Kriterium dar. Dies gilt besonders hinsichtlich der Abgrenzung der galleresistenten intestinalen Arten des Genus *Bacteroides* von den gallesensiblen, vorwiegend oralen bzw. vaginalen Spezies der Genera *Porphyromonas* und *Prevotella*. Darüber hinaus kommt dieser Eigenschaft aber auch wegen der oft unzureichenden Datenbanken kommerzieller Differenzierungssysteme bei der Erkennung bestimmter Spezies sowie neuer taxonomischer Zuordnungen gallesensibler Arten in das Genus *Bacteroides* oder auch der Beschreibung galleresistenter pigmentierter Spezies bei der Speziesbestimmung eine erhebliche Bedeutung zu.
2. Als so genannter „goldener Standard“ der Galleempfindlichkeitsbestimmung gilt die Überprüfung des Wachstumsverhaltens der Keime in flüssigen vorreduzierten Medien, die 20% Rindergalle enthalten. Zum einen ist dieses Verfahren hinsichtlich Zeit und Material aufwendig und kann durch Präzipitationen von Komponenten der Rindergalle während der Inkubation zu nicht wachstumsbedingten Trübungen des Mediums führen. Dies hat Schwierigkeiten bei der Interpretation der Ergebnisse zur Folge. Andererseits erfordert diese Versuchsanordnung die Mitführung einer gallefreien Bouillon als Wachstumskontrolle. In dieser ist aber das Wachstum zahlreicher gallesensibler Arten oft zögerlich oder kann sogar ganz ausbleiben, so dass die Testergebnisse nicht zu verwerten sind.
3. Eine in vielen Laboratorien ausgeübte Praxis ist die Mitführung von Selektionsmedien wie dem Galle-Eskulin-Blutagar, der der primären Anzucht bzw. schnellen vorläufigen Identifizierung vor allem von Vertretern der *Bacteroides-fragilis*-Gruppe dient. Zwar werden damit galleresistente Isolate sehr zeitig erfasst, aber die nicht selektiven Basismedien im Kulturansatz können sie nicht ersetzen. Somit müssen die auf letzteren gewachsenen Keime einschließlich der galleresistenten Arten trotzdem den notwendigen Differenzierungsschritten unterzogen werden. Unter diesem Gesichtspunkt bedeutet der Einsatz gallehaltiger Selektionsmedien bei der Erstanzucht zumindest einen zusätzlichen Aufwand, der zwar galleresistente Arten eher erfassen

lässt, aber die sonstigen Aufwendungen bei Anzucht, Isolierung und Identifizierung nicht erspart.

4. Eine methodische Alternative stellt der Blättchendiffusionstest dar. Hierbei werden mit Galle getränkte Filterpapierblättchen verwendet. Gleichzeitig lässt sich dieser Test gut in das auf anderen Blättchendiffusionstesten beruhende System einer so genannten „presumptive diagnostic“ integrieren. Er ermöglicht die Prüfung jedes einzelnen auf nicht selektiven Medien gewachsenen Isolates auf solchen Nährböden, die auch sehr anspruchsvollen Anaerobiern ein eindeutiges Wachstum ermöglichen. Damit lässt sich eine gallebedingte Wachstumshemmung zweifelsfrei erkennen.
5. Unabhängig vom Verfahren zur Bestimmung der Galleempfindlichkeit mit Rindergalle ist von Nachteil, dass Rindergalle in der heute üblichen pulverisierten Form ein hygroskopisches Naturprodukt wechselnder Zusammensetzung mit mikrobiell unterschiedlich wirksamen Teilkomponenten darstellt. Hinzu kommt, dass hochkonzentrierte Gallelösungen, wie sie zur Herstellung der Testblättchen benötigt werden, sehr viskös sind und somit Schwierigkeiten bei der gleichmäßigen Dosierung der Testblättchen bestehen bzw. Dosisschwankungen vorprogrammiert sind.
6. Die Gallensäuren bzw. deren Natriumsalze als die wesentlichen mikrobiell aktiven Komponenten der Rindergalle sind dagegen chemisch reine, nicht hygroskopische und somit gut zu dosierende Substanzen. Sie müssen darüber hinaus entsprechend ihren Anteilen an der Rindergalle auch nicht so hoch wie diese dosiert werden. Die Zielstellung der Arbeit bestand deshalb darin, zu untersuchen, inwieweit die Natriumsalze der Cholsäure, Desoxycholsäure und Taurocholsäure im Blättchendiffusionstest an Stelle der Rindergalle zur Bestimmung der Galleempfindlichkeit anaerober gramnegativer Stäbchen verwendet werden können. Dabei war zu ermitteln, welche Konzentration pro Blättchen bei welchen Hemmhofdurchmessern zu welcher Bebrütungszeit die zuverlässigsten Aussagen ermöglichten.

7. Dazu wurden kommerziell beziehbare und genormte Filterpapierblättchen auf sterile Nadeln aufgespießt und mit Hilfe geeichter Mikroliterpipetten die jeweiligen Volumina entsprechend konzentrierter Lösungen der Wirkstoffe aufgetragen. Nach dem Trocknungsprozess über Kalziumchlorid im Exsikkator lagen die folgenden Endkonzentrationen pro Blättchen vor: Rindergalle 20 und 25 mg, Natriumcholat, Natriumdesoxycholat und Natriumtaurocholat je 1, 5 und 10 mg.
8. Die Untersuchungen wurden mit 316 auf Speziesebene bestimmten Stämmen gramnegativer obligat anaerober Stäbchen durchgeführt. 65 Stämme stammten aus internationalen Sammlungen. 251 Keime stellten klinische Isolate des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität dar. Es entfielen dabei insgesamt 120 Stämme auf galleresistente Arten. Dies betrafen 97 Vertreter des Genus *Bacteroides* mit zwölf Spezies und 23 Stämme des Genus *Fusobacterium* mit zwei Spezies. Gallesensible Erreger waren 196 mal vertreten: 22 mal das Genus *Porphyromonas* mit vier Spezies, 112 mal das Genus *Prevotella* mit 14 Spezies, zwei mal das Genus *Bacteroides* mit zwei Spezies und schließlich 60 mal das Genus *Fusobacterium* mit zwei Spezies.
9. Um den möglichen Einfluss der Inkubationszeit zu ermitteln, wurden für 160 Stämme die Hemmhofdurchmesser nach 48 h, 72 h und 96 h Inkubation abgelesen. Für die galleresistenten Arten ergaben sich nach den verschiedenen Bebrütungszeiten keine nennenswerten Unterschiede. Bei den gallesensiblen Arten lagen die Differenzen für die Mehrheit der Stämme in den üblichen Toleranzgrenzen von ± 2 mm. Um die Diagnosezeiten nicht unnötig zu verlängern, wird eine Ablesung nach 48 h Inkubation als optimal angesehen.
10. Natriumtaurocholat erwies sich auf Grund seiner geringen antimikrobiellen Wirkung für den Test als nicht geeignet. Sehr gute Übereinstimmungen mit den Ergebnissen der Rindergalle zeigten dagegen Natriumcholat und Natriumdesoxycholat.

11. Die Konzentrationen von 20 bzw. 25 mg Rindergalle führten nur zu unbedeutenden Unterschieden in den Hemmhofdurchmessern. Bei den Natriumsalzen der Gallensäuren zeigten sich eindeutige Zusammenhänge zwischen Blättchenkonzentration und Hemmhofgröße. Die besten Ergebnisse wurden bei einer Wirkstoffkonzentration von 10 mg pro Blättchen erzielt.
12. Trotz ähnlicher Ergebnisse von Natriumcholat und Natriumdesoxycholat bietet sich vor allem die erstgenannte Substanz als Ersatz für die Rindergalle bei der Bestimmung der Galleempfindlichkeit an. Die Gründe liegen in einer besseren Löslichkeit, erheblich geringeren Viskosität der wässrigen Lösung und damit genauerer Dosierbarkeit bei der Blättchenpräparation, Vorteilen beim Trocknungsprozess und z.T. größeren Hemmhöfen.
13. Als gallesensibel sind Stämme der Genera *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* und *Fusobacterium* einzustufen, die bei einer Blättchenkonzentration von 10 mg Natriumcholat einen Hemmhof von ≥ 15 mm aufweisen. Für *Fusobakterien* könnte auch ein Grenzwert ab ≥ 13 mm für die Aussage „sensibel gegenüber Galle“ zu Grunde gelegt werden.
14. Die Bedeutung der Galleempfindlichkeitsbestimmung konnte anhand der Ergebnisse für die biochemisch ähnlich reagierenden Spezies *P. heparinolytica* und *B. uniformis* besonders herausgestellt werden. Durch zwei kommerzielle Kits (Rapid ANA II und BBL Crystal) wurde *P. heparinolytica* regelmäßig als die zumeist galleresistente Art *B. uniformis* fehlbestimmt. Dagegen konnte die richtige Identifizierung dieser beiden Spezies auf Grund der Ergebnisse der üblichen biochemischen Reaktionen und des Diffusionstestes gegenüber Natriumcholat vorgenommen werden. Diese Resultate wurden durch PCR-Fingerprinting bestätigt.

Lebenslauf

Persönliches

Name Ronald Steudte, geb. Klohs
Geburtsdatum 04.03.1974
Geburtsort Halle / Saale
Staatsangehörigkeit deutsch
Familienstand verheiratet
Kinder Tochter Lara Sirka Steudte, geb. 24.08.2001

Schulbildung

1980 – 1990 Polytechnische Oberschule
Nauendorf; Mittlere Reife
1990 – 1992 Thomas – Müntzer – Gymnasium
Halle/Saale; Hochschulreife

Berufsausbildung

1992 – Beginn des Medizinstudiums an
der Martin – Luther – Universität Halle / Wittenberg
1994 – Physikum
1995 – 1. Staatsexamen
1997 – 2. Staatsexamen
01.10.1997 – 13.09.1998 Praktisches Jahr in den Fachgebieten
der Chirurgie (Saanen / Gstaad (Schweiz)), der Augenheilkunde
(Martin – Luther – Universität Halle / Wittenberg) und der
Inneren Medizin (Diakoniekrankenhaus Halle)
21.10.1998 – 3. Staatsexamen
01.05.1999 – 31.10.2000 Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der
Klinik für Innere Medizin II der MLU Halle
seit 01.11.2000 Tätigkeit als Assistenzarzt in der Klinik für
Innere Medizin II der MLU Halle (Direktor: Prof. Dr. med. B.
Osten)

Praktika / Famulaturen

auf den Gebieten der Radiologie, Inneren Medizin, Anästhesie,
Chirurgie, Augenheilkunde

Sonstiges

1995 Zertifikat – Fachkurs Englisch für Mediziner
1996 – Beginn einer Promotionsarbeit im Institut für
Medizinische Mikrobiologie der MLU Halle

Halle/Saale, 10.01.2004

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die hier vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine außer den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln benutzt zu haben.

Halle, 10.01.2004

Ronald Steudte

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, erstmalig und ausschließlich an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg um Eröffnung eines Promotionsverfahrens gebeten zu haben.

Halle, 10.01.2004

Ronald Steudte

Danksagung

Hiermit möchte ich Herrn Prof. Dr. med. C. Höhne, INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE der MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG für die freundliche Überlassung des Themas sowie für seine Hinweise, Unterstützung, Geduld und Ermutigungen bei der Erstellung dieser Arbeit ganz herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. A. S. Kekulé, Direktor des INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE der MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG sei gedankt, dass diese Arbeit unter seiner Institutsleitung beendet werden konnte.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. A. C. Rodloff, Direktor des INSTITUTES FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE der UNIVERSITÄT LEIPZIG sowie seiner Mitarbeiterin, Frau Daniela Adler, für die Durchführung der PCR-Fingerprinting und die Bestimmung der Galleempfindlichkeit in flüssigen Medien bei ausgewählten Stämmen.

Frau Margit Kolezcko, INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE der MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG, gilt mein Dank für die freundliche Bereitstellung der Stammkulturen sowie die zahlreichen praktischen Hinweise während der experimentellen Arbeiten. Darüber hinaus danke ich allen weiteren Mitarbeitern des Institutes, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.