

Aus der Stabsstelle Krankenhaushygiene

der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

(Chefarzt: PD Dr. med. habil. Dieter Worlitzsch)

**Der parodontale Sulkus als mögliche Quelle der chronischen Lungeninfektion
bei Kindern mit Cystischer Fibrose**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Franziska Schlosser

geboren am 24.09.1985 in Sangerhausen

Betreuer: PD Dr. med. habil. Dieter Worlitzsch

Gutachter/ Gutachterin: Herr Prof. J. Setz

Herr apl. Prof. S. Reichert

Frau Prof. A. Heiningen (Heidelberg)

02.05.2017

31.05.2018

Meinem Mann,
meinen Kindern und
Eltern

Referat

Die Cystische Fibrose (engl. cystic fibrosis, CF, Synonym: Mukoviszidose) ist eine der häufigsten und schwerwiegendsten autosomal rezessiv vererbten Krankheiten der kaukasischen Bevölkerung. Patienten mit dieser Erkrankung entwickeln in der Folge dieser Erkrankung chronisch-bakterielle Lungeninfektionen, welche häufig zum frühzeitigen Tod dieser Patienten führen. In dieser Studie wurde untersucht, ob der parodontale Sulkus von CF-erkrankten Kindern ein mögliches Reservoir für die untersuchten Bakterien darstellt und somit eine mögliche Quelle der Lungeninfektionen bietet. Des Weiteren wurde untersucht, ob die erhöhte Antibiotikagabe zur Therapie der Lungeninfektionen zu einer erhöhten Resistenz der Bakterien gegenüber den untersuchten Antibiotika führt. Es nahmen 20 CF-Kinder und 20 Kinder einer gesunden Kontrollgruppe an dieser Studie teil. Alle Teilnehmer wurden zuerst zahnmedizinisch untersucht. Im Anschluss wurden ihnen mikrobiologische Proben aus den Zahntaschen und bei den CF-Kindern, sofern möglich, eine Sputumprobe entnommen. Somit konnte die mikrobielle Kolonisation der Taschen von gesunden und CF-Kindern verglichen werden, sowie die mikrobielle Kolonisation der Sulki und des Sputums von CF-Kindern. Mittels standardisierter Methoden wurden die Proben anaerob und aerob bearbeitet und die Bakterien auf geeigneten Nährmedien angezüchtet, selektiert und mittels biochemischer Identifikationssysteme als fakultativ oder obligat anaerobe Bakterien identifiziert. Im Anschluss wurden gleiche Paare obligat anaerober Bakterien aus dem Sputum und den Sulki der CF-Kinder auf ihre antibiotische Empfindlichkeit gegenüber Piperacillin/Tazobaktam, Metronidazol, Meropenem, Clindamycin, Azithromycin, Ceftazidim und Colistin untersucht. Die mikrobielle Besiedelung der Zahntaschen unterschied sich bei beiden Gruppen nur unwesentlich voneinander. Ebenso wiesen die gleichen, mit Antibiotika beprobten, Paare nur wenig Unterschiede in ihren Resistenzmustern auf. Auf Grund dessen ist es naheliegend, einen Zusammenhang zwischen Lungeninfektionen mit Sputumabgabe und dem parodontalen Sulkus als mögliches Reservoir der Bakterien zu vermuten.

Schlosser, Franziska: Der parodontale Sulkus als mögliche Infektionsquelle der chronischen Lungeninfektion bei Kindern mit Cystischer Fibrose, Halle/Saale, Univ., Med. Fak., Diss., 71 Seiten, 2017

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung.....	1
1.1 Cystische Fibrose.....	1
1.2 Chronische bakterielle Lungeninfektion bei CF-Patienten.....	3
1.3 Mikrobiologie der chronischen Lungeninfektion bei CF.....	7
1.3.1 Fakultativ anaerobe Bakterien bei CF-Patienten.....	7
1.3.2 Obligat anaerobe Bakterien bei CF-Patienten.....	7
1.4 Herkunft der fakultativen und obligaten Bakterien.....	8
1.5 Parodontaler Sulkus als mögliche Kontaminationsquelle.....	9
2. Zielsetzung.....	11
3. Material und Methodik.....	12
3.1 Patienten.....	12
3.1.1 CF-Patienten.....	12
3.1.2 Ethikkommission.....	12
3.2 In vivo- Untersuchungen.....	13
3.2.1 Sputumproben.....	13
3.2.2 Zahntaschenproben.....	13
3.3 In vitro-Untersuchungen.....	14
3.3.1 Anzuchtmedien.....	14
3.3.2 Quantitativer Nachweis von fakultativen und obligaten Anaerobiern.....	15
3.3.3 Identifikation der fakultativ anaeroben und aeroben Bakterien.....	18
3.3.4 Identifikation der obligat anaeroben Bakterien.....	19
3.3.5 Resistenzbestimmungen.....	20
3.3.6 Einfrierkulturen.....	22
4. Ergebnisse.....	23
4.1 Identifikation der fakultativ und obligat anaeroben Bakterien in Sputumproben von CF-Patienten.....	23
1.2 Quantifizierung fakultativer und obligater Anaerobier im Sputum von CF-Patienten.....	25
4.3 Mikrobielle Zusammensetzung des parodontalen Sulkus bei Kindern mit cystischer Fibrose und der gesunden Kontrollgruppe.....	26

4.3.1	Identifikation der fakultativen Anaerobier in den Zahntaschen von Kindern mit CF und bei Gesunden.....	26
4.3.2	Identifikation der obligaten Anaerobier in den Zahntaschen von Kindern mit CF und bei Gesunden.....	28
4.3.3	Vergleich der obligat anaeroben Bakterien von Sputum- und Parodontaltaschenproben.....	30
4.4	Resistenzbestimmungen.....	33
5.	Diskussion.....	36
5.1	Identifikation gleicher Spezies bei Kindern mit CF und der gesunden Kontrollgruppe.....	36
5.2	Möglichkeiten der Kontamination mit den identifizierten Bakterienpezies bei Kindern mit Cystischer Fibrose und der gesunden Kontrollgruppe.....	36
5.3	Vergleich der Resistenzen gegenüber ausgewählten Antibiotika bei Paaren gleicher obligater Anaerobier aus Zahntaschen und Sputum.....	38
5.4	Ausblick.....	41
6.	Zusammenfassung.....	42
7.	Literaturverzeichnis.....	46
	Thesen.....	54
	Anhang.....	56

Lebenslauf

Selbständigkeitserklärung

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Danksagung

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
±	Plusminus
%	Prozent
®	Registrierte Marke
™	anerkannte, aber noch nicht registrierte Marke
Abb.	Abbildung
Art.-Nr.	Artikelnummer
ATP	Adenosintriphosphat
AZM	Azithromycin
B.	<i>Burkholderia</i>
bzw.	beziehungsweise
C.	<i>Clostridium</i>
CAZ	Ceftazidim
CD	Clindamycin
CDC	CDC-Anaerobier-Agar mit 5% Schafsblut
CF	cystische Fibrose; Mukoviszidose
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CS	Colistin
F.	<i>Fusobakterium</i>
G.	<i>Gemella</i>

g	Gramm
H.	<i>Haemophilus</i>
H ₂ O	Wasser
KBE	Koloniebildende Einheit
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
L.	<i>Lactobacillus</i>
mg	Milligramm
MHK	minimale Hemmkonzentration
ml	Millilieter
mm	Millimeter
MRP	Meropenem
MTZ	Metronidazol
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NL	normale Clearance
P.	<i>Pseudomonas</i>
PBS	phosphate buffert saline, Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase chain reaktion, Polymerasekettenreaktion
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
Ps.	<i>Peptostreptococcus</i>
Q _{O2}	epithelialer Sauerstoffverbrauch
r	resistant

rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
S.	<i>Staphylococcus</i>
s	sensible
SCS	Schaedler-Agar mit 5% Hammelblut
Sp.	Sputum
Spp.	Spezies
Stom.	<i>Stomatococcus</i>
Strep.	<i>Streptococcus</i>
Tab.	Tabelle
TSB	Tryptone Soya Broth
TZP	Piperacillin/Tazobaktam

1. Einleitung

1.1 Cystische Fibrose

Die Cystische Fibrose (engl. cystic fibrosis, CF, Synonym: Mukoviszidose) ist eine der häufigsten und schwerwiegendsten autosomal rezessiv vererbten Krankheiten der kaukasischen Bevölkerung mit einer Häufigkeit von 1:2500 Lebendgeburten. In Afrika (1:17.000) oder Asien (1:90.000) tritt sie weitaus seltener auf (Gibson et al., 2003; Ratjen und Döring, 2003).

Bei dieser Erkrankung handelt es sich um eine genetisch bedingte Stoffwechselstörung, bei der ein Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 7 mutiert ist. Dieses Gen wurde 1989 entdeckt (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989) und kodiert ein Protein (ein 1480 Aminosäuren-langes Polypeptid), welches als Chloridkanal in schleimsezernierenden Epithelzellen fungiert (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) (Zielenski et al., 1991; Collins, 1992). 1975 Mutationen dieses Gens sind derzeit bekannt (The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, Cystic Fibrosis Mutation Database, Zugriff Dezember 2016). In Folge der Mutation wird das CFTR-Protein gar nicht oder nur fehlerhaft gebildet, die Leitfähigkeit und Regulationsmechanismen der Chloridkanäle kann gestört sein, oder die Chloridkanäle sind fehlerhaft oder gar nicht gebildet (Vankeerberghen et al., 2002). Der so entstandene pathogene Ionenfluss führt dazu, dass ein hochvisköses, dehydriertes Sekret sezerniert wird (Matsui et al., 1998). Auf Grund dessen sind alle Sekrete endokriner Drüsen verändert (Ratjen und Döring, 2003). Bereits im Säuglings- und auch Kleinkindalter sind die ersten Symptome dieser Krankheit zu erkennen, welche je nach Schwere der Mutation phänotypisch stärker oder schwächer ausgeprägt sein können (Vankeerberghen et al., 2002).

Bei Gesunden werden die Chlorid-Ionen mit Hilfe des CFTR aus den Zellen transportiert. Unterbleibt dies, folgt Natrium dem nun entstandenen elektrischen Gradienten, um die zellinterne Negativität auszugleichen. Auf diesem Weg reichert sich immer mehr Salz in der Zelle an. Wasser diffundiert aus dem Lumen, um den entstandenen osmotischen Gradienten auszugleichen (Matsui et al., 1998). Somit werden die von den endokrinen Drüsen abgesonderten Sekrete, wie die der Leber, Bauchspeicheldrüse, Nasennebenhöhlen, Fortpflanzungsorgane, Lungen und den

dazugehörigen Luftwegen, immer visköser (Ratjen und Döring, 2003). Dies führt zu den verschiedensten Funktionsausfällen und -störungen in den einzelnen Organen.

Der größte Effekt dieser Erkrankung kann allerdings an den Luftwegen und der Lunge der CF-Patienten beobachtet werden. Die Kinozilien des respiratorischen Epithels der unteren Atemwege eines Gesunden transportieren die entstandenen Sekrete in Richtung der oberen Luftwege, wo diese dann abgehustet oder verschluckt und somit aus der Lunge entfernt werden. Bei CF-Patienten ist dies aber auf Grund der hohen Viskosität der abgesonderten Sekrete nicht möglich, da die Kinozilien nicht in der Lage sind zu schlagen und so den Mukus nicht abtransportieren können. Auf Grund dessen verbleibt der größte Teil des Schleims in den Luftwegen und ist eine der primären Ursachen, warum CF-Patienten vermehrt an chronischen Lungenentzündungen leiden (Worlitzsch et al., 2002). Der verbliebene Mukus verengt die Atemwege, behindert somit die Belüftung der Lunge und erschwert den Gasaustausch erheblich. Somit entstehen chronisch-bakterielle Infektionen der Atemwege mit Entzündungen, deren Folge chronischer Husten, Bronchiektasen- und Atelektasenbildungen sind (Valerius et al., 1991). Weiterhin kommt es zu einer schweren Atemwegsobstruktion, die den Verlust der Lungenfunktion verstärkt und somit beim Großteil der Patienten durch zunehmende Ateminsuffizienz zum frühen Tode führt. Die mittlere Lebenserwartung von CF-Patienten liegt heutzutage bei ca. 40 Jahren trotz der Entwicklung neuer erfolgreicher Diagnose- und Behandlungsmöglichkeiten (Cystic fibrosis foundation).

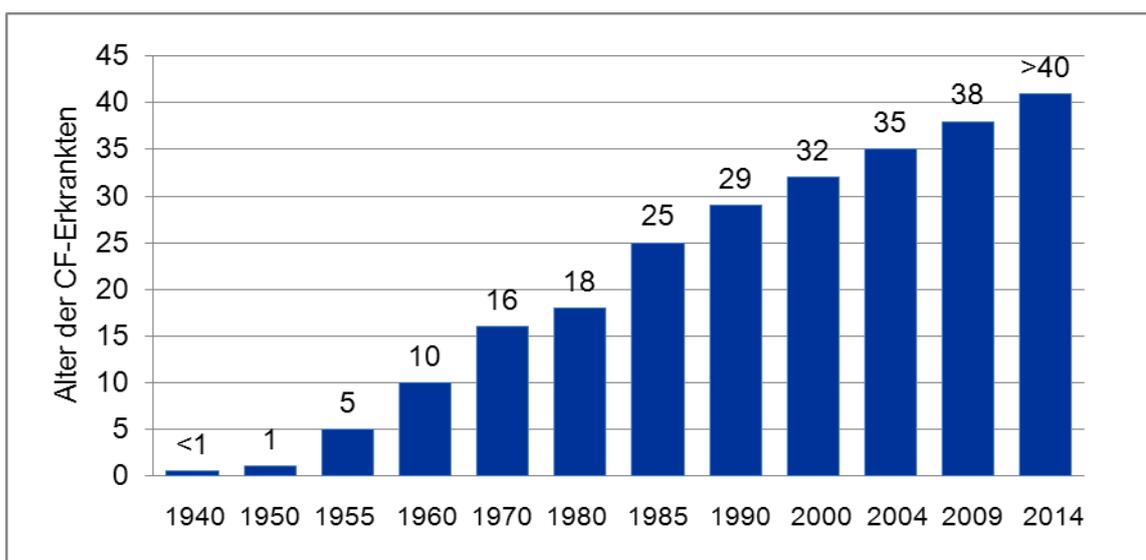


Abbildung 1: Entwicklung der mittleren Lebenserwartung von CF-Patienten von 1940 bis 2014 (Cystic fibrosis foundation, www.cff.org)

1.2 Chronische bakterielle Lungeninfektion bei CF-Patienten

Die Lunge der CF-Patienten wird immer wieder durch Atemwegsinfektionen angegriffen, welche das Gewebe mit der Zeit dauerhaft schädigen. Die Ursache der Pneumonien sind multiple Infektionen mit einer Vielzahl verschiedenster Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* und *Stenotrophomonas maltophilia*, die intraluminal in den Atemwegen lokalisiert sind (Ratjen und Döring , 2003)

2002 ergab sich aber nach der Veröffentlichung eines Artikels von Worlitzsch et al. eine ganz neue Sichtweise auf die Hintergründe der chronischen Lungenentzündungen von CF-Patienten und deren immer wiederkehrenden *P. aeruginosa*-Infektionen. Worlitzsch et al. fanden heraus, dass die Bakterien nicht, wie bisher angenommen, an das respiratorische Epithel der Luftwege und der Lunge binden, sondern sich in den Luftwegen befindlichen Mukus einlagern (Worlitzsch et al, 2002).

Der gesteigerte Natrium- und Chloridionen-Influx an der apikalen Zellmembran durch die Mutation des CFTR-Proteins führt zu einem gesteigerten Einstrom von Wasser in die Epithelzellen der Lunge. Der Schleim, welcher natürlich in der Lunge vorhanden ist, wird viskös und verfestigt sich zu Mukusplaques. Durch die Absorbtion der periziliären Flüssigkeitsschicht und der Bildung der Plaques werden die Kinozilien in ihrer Funktion sehr stark eingeschränkt und komprimiert. Eine natürliche effiziente Clearance der Lunge ist somit nicht mehr möglich (Matsui et al., 1998).

Auf Grund des erhöhten Sauerstoffverbrauchs der an den Mukusplaques anheftenden fakultativ anaeroben Bakterien (Worlitzsch et al., 2002) und der durch Chemotaxis zur Bekämpfung dieser Bakterien angelockten neutrophilen Granulozyten (Kolpen et al., 2010) kommt es zur Ausbildung eines Sauerstoffgradienten innerhalb der Plaques. Auch die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) durch die Granulozyten der Immunabwehr und der damit verbundenen Verbrauch von Sauerstoff (Kolpen et al., 2014) fördern die Entstehung eines Sauerstoffgefälles. Durch den so entstandenen Sauerstoffgradienten werden die an das Epithel grenzenden Gebiete anaerob. Die Pseudomonaden, die sich an der Oberfläche dieser Schleimschicht befinden, penetrieren diese Schicht nun aktiv oder auch passiv, um in die hypoxischen Gebiete vorzudringen. Aufgrund der dort vorherrschenden Sauerstoffarmut lagern sich die

Bakterien zu Tausenden zusammen und bilden eine so genannte Makrokolonie. Die vorherrschende Hypoxie bewirkt, dass die Keime beginnen, stark vermehrt ein für diese Art spezifisches Polysaccharid – das Alginat – abzusondern und die ganze Kolonie damit, wie einen Schutzmantel, zu umgeben (Worlitzsch et al., 2002; Bragonzi et al., 2005). Schmidt et al. identifizierten (2016) die Gensequenzen, welche die Enzyme codieren, die für die Bildung des Alginatfilms verantwortlich sind. Eine Mutation dieses Sauerstoff-abhängigen Alginat-Synthese-Aktivators oder -Inhibitors führt zur unkontrollierten Ausbildung des Alginat-Mantels.

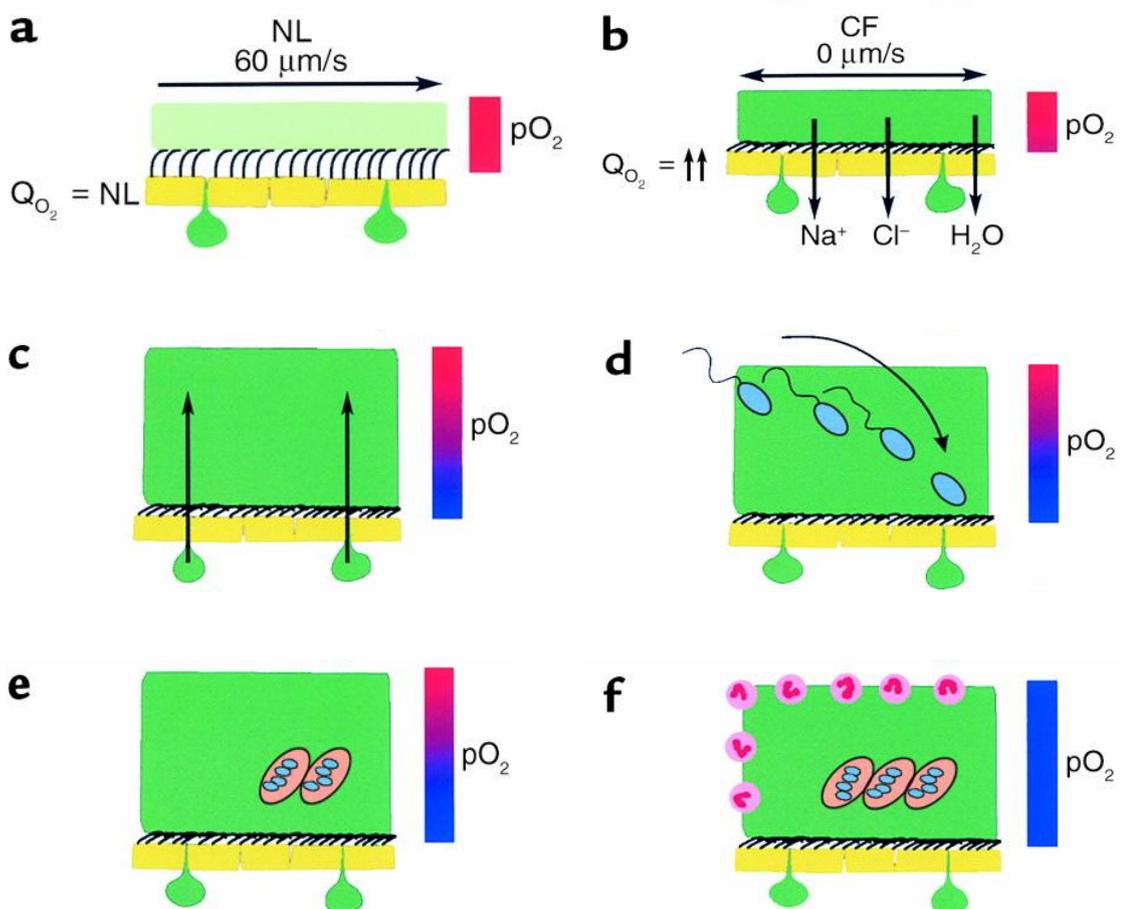


Abbildung 2: Schematische Darstellung der chronischen Lungeninfektion von CF-Patienten mit *P. aeruginosa* (Worlitzsch et al., 2002)
 Abkürzungen: NL: normale Clearance, pO_2 : Sauerstoffpartialdruck, Q_{O_2} : epitheliale Sauerstoffverbrauch

Da sich jedoch weiterhin Pseudomonaden auf der Oberfläche des Mukus befinden, versucht der Körper auch hier mit Neutrophilen Granulozyten, die durch die Chemotaxis der fakultativen Anaerobier angezogen wurden, diese zu bekämpfen. Die Abwehrzellen versuchen mit Hilfe von pro-inflammatorischen Enzymen (wie der

neutrophilen Elastase) (Goldstein et al., 1986; Worlitzsch et al., 2002; Carroll et al., 2005) die Membranen der Bakterien zu lysieren und diese somit zu zerstören. Die enzymatische Zersetzung der Pseudomonaden in den Makrokolonien ist allerdings nicht erfolgreich, da der Polysaccharid-Schutzfilm die Keime vor der Lyse schützt (Bjarnsholt et al., 2009; Döring et al., 2012). Lediglich die an der Oberfläche des Schleimfilmes verbliebenen Organismen werden angegriffen. Die Enzyme sind somit unwirksam.

Ein anderer Abwehrmechanismus der Phagozyten ist die Bildung von Sauerstoff-Radikalen, die, sobald sie auf eine fremde Zelle stoßen, anfangen, die Lipide und Proteine der Zellen zu oxidieren und diese somit so sehr schädigen, dass das Überleben nicht mehr gewährleistet ist (Worlitzsch et al., 2002; Kolpen et al., 2010, 2014, 2015).

Das Problem der körpereigenen Abwehr gegen die *P. aeruginosa*-Zellen besteht darin, dass die Phagozytose-Zellen zur Radikal-Bildung Sauerstoff benötigen, dieser jedoch nur in den oberen Schichten des Mukus vorhanden ist und der restliche, überwiegend größere Anteil, anaerob ist. Dem zu Folge können keine Sauerstoff-Radikale gebildet werden und der Abwehrmechanismus funktioniert nicht. Weiterhin wurde festgestellt, dass alle sich in den Atemwegen befindlichen aerob metabolisierenden Bakterien und Abwehrzellen, Sauerstoff benötigen und diesen auch verbrauchen (Kolpen et al., 2010). Da auf Grund des hohen Schleimanteils die luftleitenden Bereichen und die Lunge nur spärlich belüftet sind, reicht der Sauerstoff wegen des Eigenbedarfs aller Organismen nicht aus, um die Radikalbildung zu gewährleisten. Die Abwehrzellen versuchen mit der einzigen Möglichkeit die ihnen noch bleibt, nämlich der enzymatischen Zersetzung der Pseudomonaden, diese zu bekämpfen. Durch die verstärkte Absonderung von Enzymen und deren Unwirksamkeit den Makrokolonien gegenüber, kommt es zu einem Überschuss an Enzymen in der Lunge. Dies bewirkt das Gegenteil von dem, was die eigentliche Intention der Granulozyten war, nämlich die Bekämpfung und Beseitigung der Keime. Somit wird das respiratorische Epithel der Atemwege angegriffen und geschädigt (Ratjen und Döring, 2003). Es werden erneute Entzündungen in der Lunge hervorgerufen, die auch durch Antibiotikatherapie nicht behandelt werden können, da diese wiederum Sauerstoff benötigen, um gegen die Bakterien optimal wirken zu können (Park et al., 1992). Dies ist allerdings durch den geringen Sauerstoffgehalt in den durch den Mukus ausgekleideten Atemwegen und den Verbrauch des Sauerstoffes durch die Organismen nicht mehr gewährleistet. Es ist

somit zu erkennen, dass *P. aeruginosa* durch die Wanderschaft in den anaeroben Mukus, die Makrokoloniebildung und durch die Bildung des Alginate-Schutzmantels gegen alle Mechanismen zur Zerstörung der Bakterien gefeit ist (Worlitzsch et al., 2002). Jedoch ist es möglich, durch eine hyperbare Sauerstofftherapie die Wirkung der Antibiotika wieder herzustellen (Kolpen et al., 2015).

Die Krankheitssymptome der CF-Patienten können nach der initialen Infektion unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Das Husten, häufig in Verbindung mit Sputumauswurf, ist eines der deutlichsten Anzeichen einer Infektion in allen Altersklassen. Die Lungenfunktion nimmt in Folge der Infektion ab und die Entzündungsreaktionen, welche zu Zerstörungen des Lungengewebes führen, nehmen zu. Die Patienten leiden oftmals unter Dyspnoe und Kurzatmigkeit auf Grund der Abnahme der Lungenfunktion (Gibson et al., 2003; Ratjen und Döring, 2003).

Zum momentanen Zeitpunkt ist die cystische Fibrose nicht kausal heilbar, da zur Heilung die Funktion des CFTR-Proteins wieder hergestellt werden müsste. Die Therapie besteht aus einer symptomatischen Therapie mittels Mukolyse, Physio- und Antibiotikatherapie, die ein Fortschreiten und eine Verschlechterung des durch den Gendefekt hervorgerufenen Gesundheitszustands der Patienten verhindern soll. Eine positiv signifikante Auswirkung auf die steigende Lebenserwartung der CF-Patienten stellt die Antibiose dar, welche auch der Hauptbestandteil der Behandlung ist (Gibson et al., 2003; Ratjen und Döring, 2003).

Bereits in frühen Jahren werden Antibiotika eingesetzt, um den Ausbruch chronischer Lungeninfektionen heraus zu zögern. Später werden sie zur Erhaltungstherapie verwendet, um eine Verschlechterung der Lungenfunktionen zu verlangsamen. Die Therapie der Lungenentzündung mit Antibiotika, wie Piperacillin/Tazobactam, Ceftazidim, Colistin, Azithromycin oder Meropenem, lindert die Beschwerden, ist aber auf lange Sicht kein Garant für die Beseitigung der Keime (Fodor et al., 2012; Deschacht et al., 2013). Tests ergaben, dass trotz Antibiotikatherapie weiterhin Bakterien in der Lunge zu finden sind, die eine erneute Entzündung hervorrufen können. Somit erklären sich die immer wiederkehrenden Pneumonien, die dann zur chronischen Erkrankung werden (Gibson et al., 2003; Ratjen und Döring, 2003).

Einen besonders intensiven Einsatz erfahren die Antibiotika während der akuten

Exazerbation, wobei die Patienten oftmals stationär aufgenommen werden um den Verlauf der Therapie zu kontrollieren und die Lungenfunktion wieder herzustellen (Fodor et al., 2012; Deschacht et al., 2013). Durch den gesteigerten Einsatz der Antibiotika in der CF-Therapie erhöht sich auch das Risiko steigender Resistenzen (Ratjen und Döring , 2003).

1.3 Mikrobiologie der chronischen Lungeninfektion bei CF

1.3.1 Fakultativ anaerobe Bakterien bei CF-Patienten

Als Auslöser einer Lungeninfektion bei CF-Patienten wird nicht nur ein einzelner Keim in Betracht gezogen, sondern mehrere. Unter diesen Keimen befinden sich *S. aureus*, *H. influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* und *P. aeruginosa* (Ratjen und Döring, 2003). Alle diese Keime können auch bei gesunden Personen isoliert werden. Es wird davon ausgegangen, dass die Infektion mit den genannten Keimen bereits in den ersten Lebensmonaten einer an CF erkrankten Person stattfindet.

P. aeruginosa ist kein CF-spezifischer Keim, kann allerdings häufig in Verbindung mit der Erkrankung isoliert werden. Des Weiteren ist er einer der häufigen Erreger einer Lungeninfektion bei CF-Patienten. *P. aeruginosa* ist ein gramnegatives Stäbchenbakterium, welches sich intraluminal in den Atemwegen befindet. Das Bakterium ist in der Lage Makrokolonien zu bilden, die sich in den Mukusplaques festsetzen. Daraufhin kann der Keim sein Wachstum von einem non-mukoiden zu einem mukoiden Typ unter Bildung einer Alginathülle verändern (Worlitzsch et al., 2002, Bragonzi et al., 2005). Diese Makrokoloniebildung von *P. aeruginosa* und Mukusplaquesbildung an der Epithelschicht der Lunge auf Grund der Dysfunktion des CFTR-Proteins und der daraus entstandenen Hypoxie, vermindert die körpereigene Abwehr (Worlitzsch et al., 2002). Auch die Wirkung der Antibiotika ist nicht mehr ausreichend gegeben (Worlitzsch et al., 2009).

1.3.2 Obligat anaerobe Bakterien bei CF-Patienten

Dass in der Lunge, auf Grund der übermäßigen Schleimproduktion, anaerobe Bereiche entstehen, wirft die Frage auf, ob neben den fakultativ anaeroben Bakterien, wie *P. aeruginosa*, auch obligate Anaerobier zu finden sind. Die Mukusplaques stellen mit ihren hypoxischen Bereichen die ideale Nische dafür dar.

Obligate anaerobe Bakterien sind in der physiologischen Bakterienflora des Menschen zu finden, beispielsweise in der Mundhöhle (Boutaga et al., 2005; Gomes et al., 2005; Lee et al., 2006), in den Nasennebenhöhlen (Aanaes et al., 2011; Ciofu et al., 2013) und im Gastrointestinaltrakt (Marteyn et al., 2011). Dennoch ist es schwer vorstellbar, dass in dem bestbelüfteten Organ des menschlichen Körpers Organismen zu finden sind, für welche Sauerstoff ein Gift ist. Worlitzsch et al. (2009) fanden heraus, dass bei 91% aller Sputumproben von CF-Patienten verschiedene Spezies obligater Anaerobier zu finden sind, die mitunter über einen Zeitraum von 11 Monaten vereinzelt nachweisbar waren. Bei den identifizierten Bakterienarten handelte es sich vor allem um *Staphylococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Veillonella spp.*, *Clostridium spp.* und Aktinomyzeten (Worlitzsch et al., 2009). Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die Zellzahlen von *P. aeruginosa* und *S. aureus*, unabhängig von der Anwesenheit der obligaten Anaerobier, die Lungenfunktion nicht signifikant verändern. Es deutet somit alles darauf hin, dass die beiden Arten der Bakterien nebeneinander her existieren können, ohne sich zu beeinflussen. Es zeigte sich außerdem, dass die angewandte Antibiotikatherapie gegen *P. aeruginosa* während der akuten Exazerbation die Lungenfunktion zwar verbesserte, jedoch gegenüber den obligaten Anaerobiern kaum Wirksamkeit aufwies (Worlitzsch et al., 2009). Die obligaten Anaerobier sind somit Bestandteil des mikrobiellen Systems in der Lunge von CF-Patienten (Rogers et al., 2004, 2011; Tunney et al., 2008, 2013; LiPuma 2010; Zermanick et al., 2011; Caverly et al., 2015). Es ist jedoch noch nicht umfassend geklärt, welche Rolle sie in der Pathophysiologie der chronischen Lungeninfektionen einnehmen.

1.4 Herkunft der fakultativen und obligaten Bakterien

Die Vielzahl der im Sputum gefundenen obligaten und fakultativen Anaerobier (Worlitzsch et al., 2009) lassen die Frage aufkommen, wo die Quelle der obligaten Anaerobier liegt. Es ist bekannt, dass diese Bakterien in den verschiedensten

Nahrungsmitteln wie Schinken (Van Ermengem, 1897; Pickett, 2008) und Käse zu finden sind. Dennoch ist nicht geklärt, wie die Keime den Weg in die Lunge finden, da die Nahrung an den Luftwegen vorbei in den Magen transportiert wird und durch den Schutz der Epiglottis nicht mit dem respiratorischen Epithel der Atemwege in Berührung kommt.

Dass die Mundhöhle eine mögliche Kontaminationsquelle darstellt, belegte bereits Komiyama et al. (1985). Bei dieser Studie wurden verschiedene Regionen der Mundhöhle auf das Vorkommen von *P. aeruginosa* untersucht. Der Keim wurde in großer Anzahl am dorsalen Zungenrücken und an der Wangenschleimhaut nachgewiesen, sowie im Speichel und im Plaque. Diese Funde lassen darauf schließen, dass die Mundhöhle einen möglichen Ausgangspunkt der chronischen Lungeninfektion bei CF-Patienten darstellt (Komiyama et al., 1985; Lee et al., 2006).

1.5 Parodontaler Sulkus als mögliche Kontaminationsquelle

Das Parodont des Zahnes, der Zahnhalteapparat, dient der Verankerung des Zahnes im Alveolarknochen, dämpft die Kaukräfte, dient der Abwehr äußerer Noxen und trennt die Zahnwurzel von der Mundhöhle und deren Milieu. Das Parodont besteht aus Gingiva, Wurzelzement, Desmodont und Alveolarknochen. Der Saum der Gingiva verläuft ca. 0,5-2 mm koronal der Schmelz-Zement-Grenze der Zähne und unterteilt sich in ein der Mundhöhle zugewandtes orales Epithel, ein dem Zahn zugewandtes orales Sulkusepithel und in ein Saumepithel. Dieses liegt kragenförmig um den Zahn herum und dient der Anheftung der Gingiva an die Zahnoberfläche durch hemidesmosomale Verknüpfungen der Epithelzellen mit der internen Basallamina. Das Saumepithel reicht von der Schmelz-Zementgrenze bis zum Boden des Gingivasulkus (Hellwig et al., 2009)

Als parodontaler Sulkus wird die Vertiefung zwischen Gingivasaum und Zahnoberfläche bezeichnet, welche von der Schmelzoberfläche bzw. dem Wurzelzement, dem oralen Sulkusepithel und dem Saumepithel begrenzt wird. Der parodontale Sulkus ist ca. 0,1-0,5 mm tief, kann aber sogar bei gesunden Patienten bis zu 3 mm tief sein, da das Saumepithel beim Ausmessen mit einer parodontalen Messonde bis zur Schmelz-Zement-Grenze durchstoßen werden kann. Da die Epithelzellen erhalten bleiben, regeneriert sich der Riss innerhalb von 5 bis 7 Tagen

wieder (Hellwig et al., 2009).

Bakterien können in der Mundhöhle frei, nicht angeheftet, oder in einem den Zahn anhaftenden Biofilm vorkommen. Dies wird als Plaque bezeichnet. Dieser Zahnbelag befindet sich meist oberhalb der gingivalen Grenze (supragingivale Plaque) und kann durch mechanische Reinigung entfernt werden. Andererseits kann sich vorhandene Plaque von koronal her in den parodontalen Sulkus ausbreiten und wird somit als subgingivale Plaque bezeichnet. In diesem schwer zu reinigenden Raum können sich eine Vielzahl von Bakterien-Spezies ansammeln, die zu Entzündungen (Gingivitis) und Gewebedestruktion (Parodontitis: entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparats mit Alveolarknochenabbau) führen können (Hellwig et al., 2009). Des Weiteren begünstigt das sauerstoffarme Milieu des Sulkus die Ansammlung anaerober Keime (Hellwig et al., 2009). Bereits 2015 wiesen Caldas et al. obligat anaerobe Bakterien in der subgingivalen Plaque von CF-Patienten nach. Sie vermuteten eine mögliche Kontamination der Lunge und des parodontalen Sulkus, ausgehend von der mit Bakterien besiedelten Mundhöhle (Komiya et al., 1985; Lee et al., 2006), konnten es jedoch nicht verifizieren.

Auf Grund dieser Erkenntnisse sollen in der vorliegenden Studie die parodontalen Sulki und das Sputum von Kindern mit CF auf das Vorkommen von fakultativen und obligaten Anaerobiern untersucht werden und mit den parodontalen Sulki einer gesunden Kontrollgruppe verglichen werden. Die zeitgleiche Identifikation von Bakterien im Sputum und in den Zahntaschen könnte auf einen möglichen Zusammenhang der Kontamination der Lunge, beispielsweise über Aspiration, hinweisen. Es soll ebenso geklärt werden, ob durch die regelmäßig angewandte Antibiotikatherapie die Rate resistenter Stämme bei möglichen gleichen Paaren der obligat anaeroben Bakterien erhöht wird.

2. Zielstellung

In dieser Arbeit sollen durch standardisierte mikrobiologische Versuche folgende Aspekte eruiert werden:

- (1) Identifikation fakultativer und obligater Anaerobier in Zahntaschen von CF-Kindern
- (2) Identifikation fakultativer und obligater Anaerobier in Zahntaschen von gesunden Kindern einer Kontrollgruppe
- (3) Identifikation fakultativer und obligater Anaerobier im Sputum von CF-Kindern
- (4) Vergleich der Bakterienspezies aus Zahntasche und Lunge bei Kindern mit CF
- (5) Quantifizierung der Bakterien aus dem Sputum von CF-Kindern
- (6) Selektiver Nachweis identischer obligat anaerober Bakterienspezies (Paare) in Sputum und Zahntasche
- (7) Bestimmung der antibiotischen Empfindlichkeiten identifizierter obligat anaerober Bakterien-Paare bei CF-Kindern
- (8) Vergleich der Resistenzsituation obligat anaerober Bakterien-Paare
- (9) Beschreibung eines möglichen Einflusses der antibiotischen CF-Therapie auf vorhandene obligat anaerobe Bakterien-Paare und auf die mikrobielle Zusammensetzung im Sputum und in der Zahntasche
- (10) Korrelation zwischen Infektionen der Lunge und dem parodontalen Sulkus als mögliches Bakterienreservoir

3. Material und Methodik

3.1. Patienten

3.1.1 CF-Patienten

An dieser Studie nahmen 20 Jungen und Mädchen der CF-Kinder-Ambulanz der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Dieter Körholz, Leiter der Ambulanz: Oberarzt Dr. med. Nick Merkel) teil. Untersucht wurden 12 Jungen und 8 Mädchen im Alter von 1,4 bis 16,3 Jahren. Das Durchschnittsalter der Probanden betrug 9,7 Jahre. Von 6 der untersuchten Kinder konnte aus verschiedenen Gründen, die Kinder waren oft noch sehr klein oder konnten aktiv kein Sputum abhusten, keine Sputumprobe genommen werden, so dass nur bei 14 Kindern eine Sputumuntersuchung möglich war. Das Durchschnittsalter der Kinder mit Sputum betrug 10,7 Jahre. Es wurden 8 Jungen und 6 Mädchen im Alter von 2,8 bis 16,3 Jahren untersucht.

Die Cystische Fibrose wurde bei allen Probanden durch einen Schweißtest und/oder durch eine Genotypisierung diagnostiziert und bestätigt, welche die Standardmethoden zur Bestimmung der cystischen Fibrose darstellten. Alle untersuchten Kinder wurden in einem drei- bis viermonatigen Rhythmus in der CF-Kinder-Ambulanz der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin von Dr. med. Nick Merkel routinemäßig untersucht. In Ausnahmefällen fanden diese Untersuchungen in einem engmaschigeren Zeitraum statt. Als Ausnahme galt die akute Exazerbation.

3.1.2 Ethikkommission

Vor Beginn der Probenentnahme wurde für alle Probanden und deren Erziehungsberechtigte eine ausführliche Aufklärung vorgenommen, an deren Ende die schriftliche Einverständniserklärung der Eltern sowie der Kinder eingeholt wurde. Die Ethikkommission äußerte keine Bedenken zur Durchführung dieser Studie (Votum vom 3.9.2009), siehe Anlage.

3.2 *In vivo*-Untersuchung

3.2.1 Sputumproben

Die Probanden wurden während einer Routineuntersuchung gebeten, eine Sputumprobe in ein steriles 50ml-Falcon-Röhrchen (Art.-Nr. 17-1020, TPP Products AG, Trasadingen, Schweiz) durch Abhusten abzugeben. Da die CF-Kinder-Ambulanz der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin und das Labor des Instituts für Hygiene (Leiterin: Univ.-Prof. Dr. med. habil. Marianne Borneff-Lipp) sich im selben Gebäude befinden, konnten die Proben nach einem standardisierten Verfahren innerhalb von maximal 30 min verarbeitet werden. Das Sputumvolumen betrug durchschnittlich 0,4 g.

3.2.2 Zahntaschenproben

Alle Probanden wurden vor Beginn der Probenentnahme zahnärztlich untersucht. Mittels einer Parodontalsonde wurden die Zahnfleischtaschen ausgemessen. Die zwei tiefsten Taschen wurden für die parodontale Probenentnahme ausgewählt. Die Entnahme erfolgte mittels einer sterilen Papierspitze (Art.Nr. 344515, ISO 15, Roeko). Die Papierspitze wurde mit einer sterilen Pinzette entnommen und mit der Spitze in die ausgewählte Tasche eingelegt und für 5 Sekunden dort belassen. Nach der Entfernung wurde die Papierspitze in einen Nährbouillon gegeben. Es wurden jeweils zwei Proben pro Tasche entnommen, welche für 24 Stunden aerob und für 48 Stunden anaerob bei 36°C inkubiert wurden.

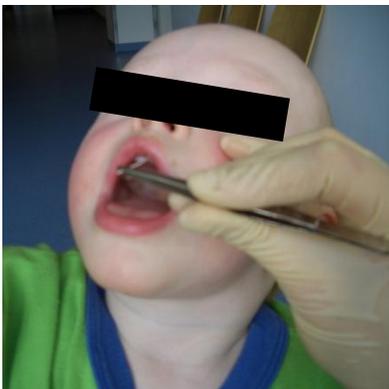


Abbildung 3: Probenentnahme mit steriler Papierspitze aus parodontalem Papierspitze aus parodontalem Sulkus bei einem 1,5 jährigen Jungen mit CF sowie bei einem 8-jährigen Mädchen der Kontrollgruppe

3.3 *In vitro*-Untersuchungen

3.3.1 Anzuchtmedien

Für die Anzucht der in dieser Studie zu untersuchenden Keime wurden verschiedene Anzuchtmedien verwendet. Für die quantitative Bestimmung und Identifikation der fakultativ aeroben Bakterien wurde ein Columbia-Agar mit Schafblut (Art.-Nr. PB5008A, Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) verwendet. Zur Bestimmung von *P. aeruginosa* und *Burkholderia cepacia* wurde ein Cetrimid-Agar (Ps.-Cetrimid-Agar, Art.-Nr. PO5076A, Oxoid GmbH) als Nährboden verwendet.



Abbildung 4: Drei-Ösen-Ausstrich auf Columbia-Agar nach 24-stündiger aerober Inkubation

Zur Anzucht der obligat anaeroben Bakterien sowie zu deren Quantifizierung wurden ebenfalls zwei verschiedene Medien verwendet: ein Schaedler-Agar mit 5% Hammelblut (SCS, bioMérieux® sa) und ein CDC-Agar (CDC, Art.-Nr. PA256506, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland), welcher weiterführend auch zur Identifikation der zu untersuchenden Bakterienarten verwendet wurde.

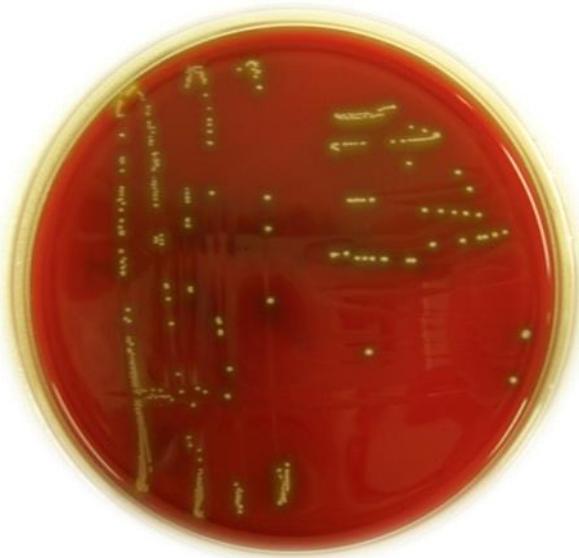


Abbildung 5: Drei-Ösen-Ausstrich auf CDC-Agar nach 48-stündiger anaerober Inkubation

3.3.2 Quantitativer Nachweis von fakultativen und obligaten Anaerobiern

Die in den Falcon-Röhrchen befindlichen Sputumproben wurden nach der Ankunft im Labor mit einer Feinwaage (Adventure ARA 520, Ohaus GmbH, Gießen, Deutschland) gewogen. Anschließend wurde das stark visköse Sputum mittels einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS-Puffer, Verhältnis 1:20) 1:1 verdünnt. Diese Salzlösung wurde hergestellt aus 85 g NaCl, 14,23 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ und 1,35 g KH_2PO_4 (alle Chemikalien von Merck, Darmstadt, Deutschland) und in 500 ml destilliertem Wasser suspendiert. Die so entstandene Lösung wurde auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Nach Zugabe der Pufferlösung wurde das Sputum-PBS-Puffer-Gemisch mit Hilfe eines Vortex-Rüttlers (Reagenzglasschüttler, Reax-Top, Heidolph Instruments GmbH, Kelheim, Deutschland) suspendiert. Anschließend wurden für die Anfertigung der Verdünnungsreihe 100 μl der angefertigten Suspension mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze (Art.-Nr. B007.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in ein steriles 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen (Reaktionsgefäße 1,5 ml, Art.-Nr. 7551.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) überführt.

Um die erste Stufe der Verdünnungsreihe herzustellen, wurden zu den 100 μl entnommener Probensuspension 900 μl PBS-Pufferlösung gegeben und erneut mit Hilfe des Vortex-Rüttlers durchmischt. Der so entstandenen Verdünnung von 10^{-1} wurde wie zuvor der Ausgangssuspension 100 μl mit einer frischen sterilen Pipette

entnommen und in ein weiteres frisches steriles 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Es wurden wiederum 900 μl PBS-Pufferlösung hinzugegeben und mit Hilfe des Vortex-Rüttlers durchgemengt. Mit der so entstandenen Verdünnung von 10^{-2} wurde in den gleichen Schritten, wie bereits beschrieben, bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-10} , weiterverfahren.

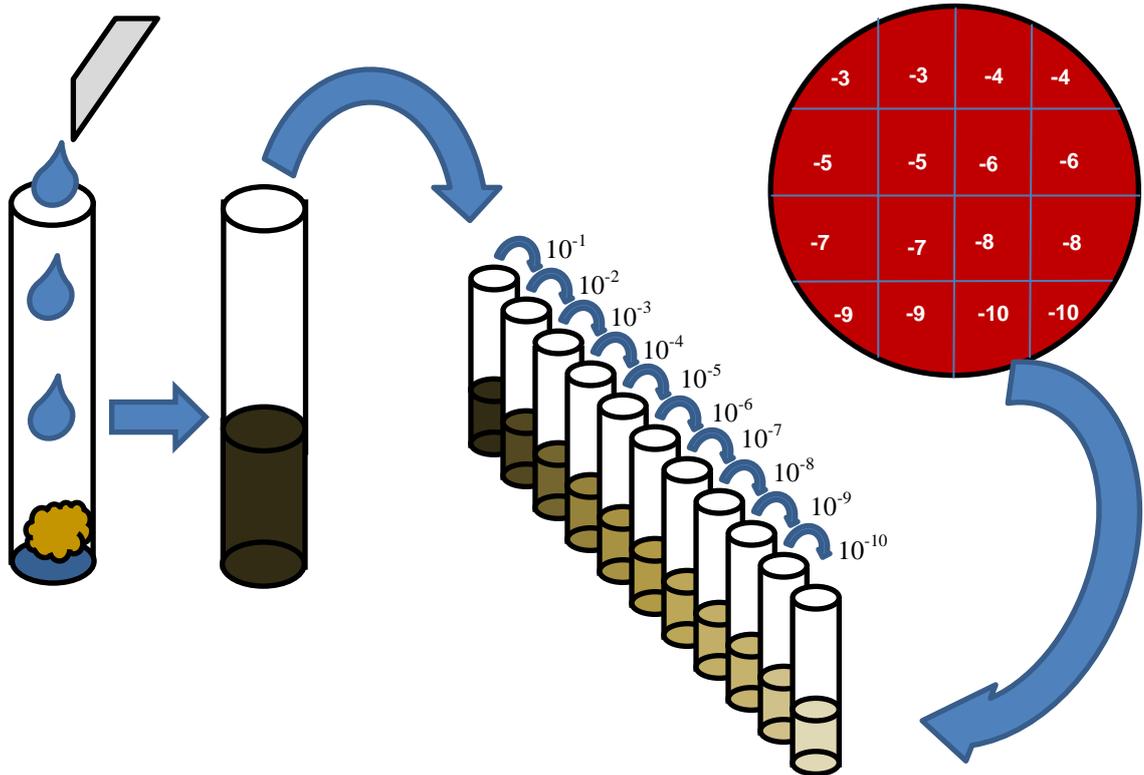


Abbildung 6: Schematische Darstellung zur Herstellung einer Verdünnungsreihe zur Quantifizierung der Bakterien

Die benötigten Agarplatten wurden mit einzelnen Feldern der Verdünnungsstufen beschriftet. Für die aerob inkubierte Verdünnungsreihe wurde ein Columbia-Agar und für die anaerobe Inkubation ein SCS- sowie ein CDC-Agar verwendet. Es wurden 10 μl der einzelnen Verdünnungsstufen in jeweils doppelter Ausführung auf den vorgesehenen Agar aufgebracht. Anschließend erfolgte die Inkubation der inokulierten Columbia-Agarplatten bei 36°C für 24 Stunden in einem Brutschrank (Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland).

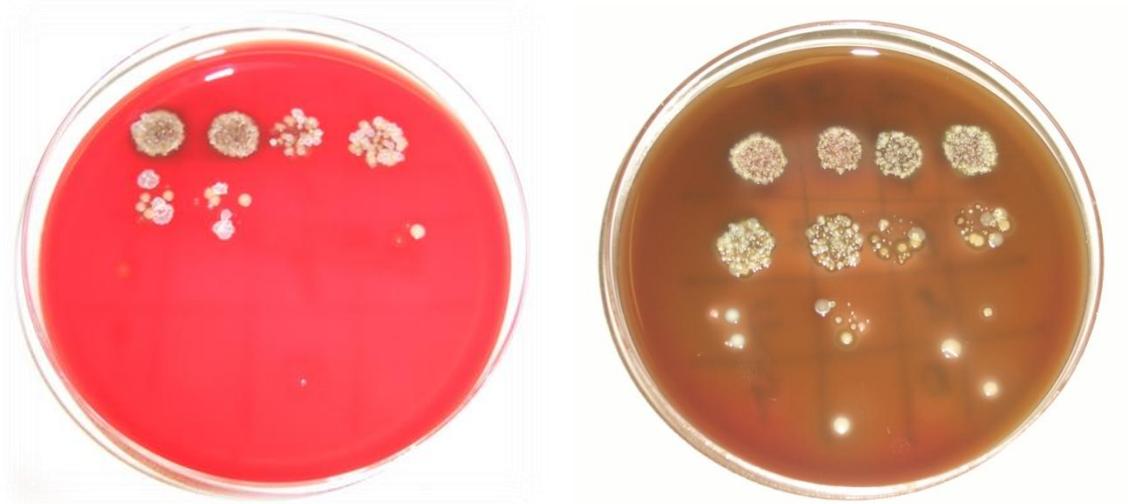


Abbildung 7: Verdünnungsreihe auf Columbia-Agar (links) nach 24-stündiger aerober Inkubation und auf CDC-Agar (rechts) nach 48-stündiger anaerober Inkubation

Nach 24 Stunden wurden die phänotypisch unterschiedlich gewachsenen Bakterienkolonien ausgezählt und dokumentiert. Anschließend wurde jeweils eine der phänotypisch gleich aussehenden Kolonien für weitere Untersuchungen und Analysen mit einer sterilen Impföse (Einwegimpfeschlinge, Art.-Nr. 731101, Greiner bio-one) auf eine neue Columbia-Agarplatte überimpft, beschriftet und erneut bebrütet.

Die anaerob zu inkubierenden Platten wurden bei 36°C für 48 Stunden in einer Anaerobierbank (Modular Atmosphere Controlled System, MG500, Meintrup dws, Lähden-Holte, Deutschland) bebrütet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die gewachsenen Kulturen analog zu den Aerobiern phänotypisch unterschieden, dokumentiert und mit Hilfe einer sterilen Impföse auf neue CDC-Agarplatten übertragen und erneut bebrütet. Alle so entstandenen anaeroben Reinkulturen wurden auf aerobes Wachstum untersucht, um die fakultativ von den obligat anaerob wachsenden Bakterienarten zu unterscheiden. Hierzu wurde jeweils eine der anaerob gewachsenen Kolonien mit einer sterilen Impföse auf einen Columbia-Agar überimpft und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Zeigte sich ein Wachstum von Kolonien auf dem Columbia-Agar, wurden die somit verifizierten fakultativ anaeroben Bakterien zur weiteren Untersuchung und Analyse den aeroben Bakterienarten zugeordnet und die dazugehörigen anaerob bebrüteten CDC-Agarplatten aus der Anaerobierbank entfernt.



Abbildung 8: Anaerobierbank (Modular Atmosphere Controlled System, MG500, Meinstrup dws, Lähden-Holte, Deutschland)

3.3.3 Identifikation der fakultativ anaeroben und aeroben Bakterien

Zur Identifikation wurden ausschließlich Reinkulturen der selektierten Bakterienkolonien aus Sputum- und Sulkusproben verwendet. Die einzelnen Kolonien wurden zur Gram-Testung auf einen MacConkey-Agar (Art.-Nr. 1252336, Oxoid GmbH, Wesel) übertragen und für 24 Stunden bei 36°C in einem Brutschrank inkubiert. Der MacConkey-Agar ist ein Selektivnährboden für gramnegative Bakterien und bestätigt bei Wachstum der Kolonien die gramnegativen Organismen. Ist jedoch kein Wachstum erkennbar, so wurden die getesteten Bakterien als grampositiv identifiziert und dokumentiert. Die gramnegativen Bakterien wurden zusätzlich auf Oxidase (BBL™ Dry Slide™ Oxidase, Art.-Nr. 231746, Becton Dickinson GmbH) getestet und das Ergebnis ebenfalls dokumentiert. Gramnegativ wurden lediglich 2 Proben getestet.

Alle Proben wurden mit dem BBL-Crystal™-Identikations-System (Art.-Nr. 245140 und 245000, Becton Dickinson GmbH) untersucht und analysiert. Es wurde eine Reinkultur des zu untersuchenden Bakteriums mittels eines sterilen Wattetupfers (Art.-Nr. 09.119.9100, Böttger oHG) in die mitgelieferte BBL-Crystal™-Identikations-Systems-Lösung (2,3 ml, Art.-Nr. 245038, Becton Dickinson GmbH) gegeben und suspensiert. Die Lösung wurde in das dafür vorgesehene Panel gegeben und in einer feuchten Kammer für 24 Stunden bei 36°C im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der

Inkubationszeit wurde mit Hilfe des BBL™ Crystal™ Panel Viewer (Modell:4345031, Becton Dickinson GmbH) die Farb- und Fluoreszenzänderung untersucht und auf dem beiliegenden Analysebogen registriert. Der so entstandene Microcode wurde in das Crystal™-Computerprogramm eingegeben und das Bakterium identifiziert.

3.3.4 Identifikation der obligat anaeroben Bakterien

Die selektierten obligat anaeroben Bakterienreinkulturen der Sputum- und Sulkusproben wurden mit Hilfe des Identifizierungssystems RapID™ ANA II und der dazugehörigen Computersoftware (ERIC® Software, Elektronisches RapID™ Kompendium, Version 1.0., Art.-Nr. R 8323600, remel) biochemisch untersucht und analysiert. Die Proben wurden hierfür auf einem CDC-Agar angezüchtet (siehe 3.3.2).

Vor Beginn der Analyse wurden die Kulturen mittels einer Gramfärbung (Färbe-Set, Gram-color modifiziert, phenolfrei, Art.-Nr. 1.01603-0001, Merck) in grampositive und gramnegative, sowie in Kokken oder Stäbchen unterteilt. Dazu wurde ein Tropfen 0.9%-ige NaCl-Lösung auf einen beschrifteten Objektträger (Art.-Nr. M 7620, Süsse GmbH, Gudensberg, Deutschland) gegeben und eine Kolonie der zu untersuchenden Agarplatten mit einer sterilen Öse der Platte entnommen und mit dem auf dem Objektträger befindlichen Tropfen vermischt. Anschließend wurden die nach Herstellerangaben fixierten und gefärbten Präparate mikroskopisch (100fache Vergrößerung, Axiolab, Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) untersucht und die Ergebnisse auf dem RapID™ ANA II beiliegenden Analysebogen dokumentiert.

Für die Identifikation der obligat anaeroben Bakterien wurde jeweils eine Reinkultur mittels eines sterilen Applikators in die RapID™ ANA II Inokulations-Lösung (1ml, Art.-Nr. 8325102, remel) gegeben und suspensiert. Die so entstandene Testsuspension wurde nach Herstelleranweisung in das RapID™-Panel (Art.-Nr. R8311002, remel) hineingegeben und für 4 bis 6 Stunden bei 37°C aerob inkubiert.

Das RapID™-Panel verfügt über 10 Reaktionsmulden, von denen die 3. bis 10. Mulde bifunktional ist und somit durch 2 Testreihen 18 verschiedene Ergebnisse erzielt werden können.

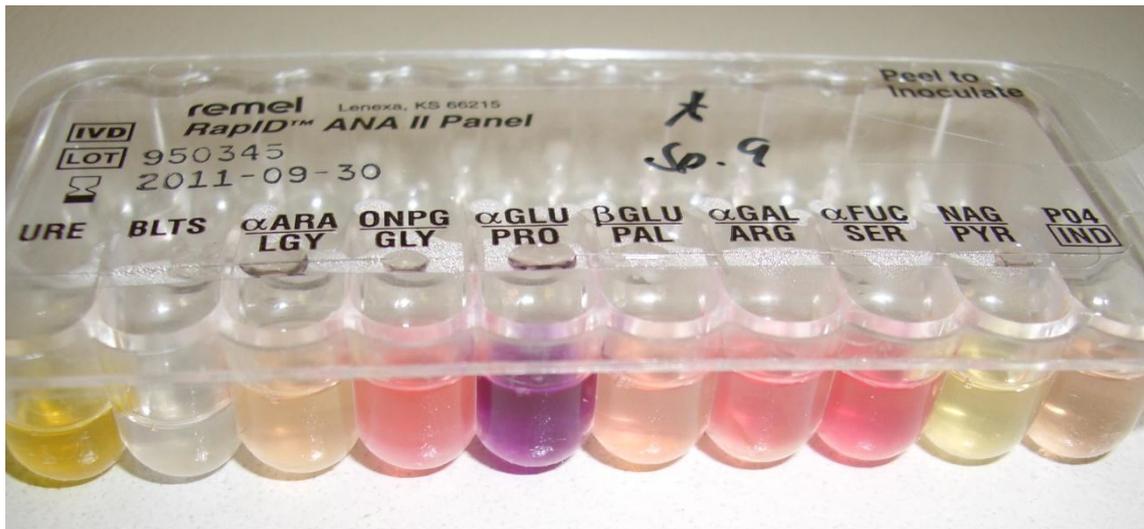


Abbildung 9: Kammer nach Färbung mit RapID™ ANA II-Reagenz und -Spot-Indolreagenz

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde nach Herstelleranweisung die Farbveränderung der Kammern 1 bis 10 auf dem mitgelieferten Untersuchungsbogen dokumentiert. Im Anschluss wurde in die bifunktionalen Kammern 3 bis 9 jeweils zwei Tropfen der RapID™ ANA II-Reagenz und in die letzte Kammer zwei Tropfen der RapID™ ANA II-Spot-Indolreagenz gegeben, und die Farbveränderung auf dem mitgelieferten Analysebogen registriert. So wurde der Microcode für die zum RapID™ ANA II dazugehörigen Software (ERIC® Software, Elektronisches RapID™ Kompendium, Version 1.0., Art.-Nr. R 8323600, remel) erstellt. Die einzeln gesammelten Daten (Gramfärbung, Bakterienform und Microcode) wurden in die ERIC® Software zur Identifikation der untersuchten anaeroben Organismen gegeben und das Ergebnis aufgezeichnet.

3.3.5 Resistenzbestimmungen

Für die Bestimmung der Empfindlichkeiten der obligaten Anaerobier gegenüber einigen Antibiotika wurden Paare des gleichen Keims aus parodontalem Sulkus und Sputumprobe des gleichen Patienten ausgewählt. Getestet wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) der ausgewählten Paare mittels MIC-Test Streifen (MIC Test Strip, Liofilchem s.r.l., Roseto degli Abruzzi, Italien), welche die kleinste Konzentration des Wirkstoffes angibt, die *in vitro* das Wachstum der untersuchten Mikroorganismen verhindert.

Für diese Testreihe wurden Piperacillin/Tazobaktam (TZP, Art.-Nr.921080), Metronidazol (MTZ, Art.-Nr.920870), Meropenem (MRP Art.-Nr.920840), Clindamycin (CD, Art.-Nr. 920720), Azithromycin (AZM, Art.-Nr.920300), Ceftazidim (CAZ, Art.-Nr.921380) und Colistin (CS, Art.-Nr. 921080) ausgewählt. Diese 7 Antibiotika wurden ausgewählt, da Azithromycin und Colistin in der CF-Therapie als Standardantibiotika eingesetzt werden, wobei Piperacillin/Tazobaktam, Meropenem und Ceftazidim während der akuten Exazerbation zum Einsatz kommen. Auf Grund der sehr guten Wirksamkeit gegen Anaerobier wurden Metronidazol und Clindamycin zusätzlich ausgewählt, obwohl diese beiden Antibiotika in der CF-Therapie nicht angewendet werden.

Die MIC-Test Streifen sind in sinkender Konzentration mit dem zu untersuchenden Antibiotikum beschichtet. Auf der Vorderseite sind die Streifen mit der Abkürzung des jeweiligen Antibiotikums sowie mit einer Skala in µg/ml beschriftet, auf der die minimale Hemmkonzentration abgelesen werden kann.

Die angezüchteten Kulturen lagen auf SCS-Agar in Reinkultur vor und wurden mittels eines sterilen Wattetupfers in 3 ml 0,9%-iger Natriumchloridlösung suspensiert, woraufhin ein McFarland-Trübungsstandard von 0,5 eingestellt wurde. Anschließend wurden 100 µl der so entstandenen Bakteriensuspension mittels steriler Pipettenspitzen auf einen SCS-Agar überimpft und mit einem Drigalski-Spatel (Art.-Nr. 23162185, VWR, Darmstadt, Deutschland) auf der Oberfläche der Agar-Platte gleichmäßig verteilt.

Darauf folgend wurde der MIC-Test Streifen mit einer sterilen Pinzette gleichmäßig aufliegend mit der beschrifteten Seite nach oben auf die Blutplatte mittig aufgetragen. Die Platten wurden im Anschluss für 48 Stunden in der Anaerobierbank inkubiert.

Nach Ablauf dieser Inkubationszeit war ein Hemmhof erkennbar, welcher die minimale Hemmkonzentration am Schnittpunkt des Hemmhofs mit dem Teststreifen angab. Diese Schnittstelle und somit zu ermittelnde minimale Hemmkonzentration konnte auf Grund der Skala auf dem Teststreifen abgelesen werden.



Abbildung 10: Empfindlichkeiten gegenüber ausgewählten Antibiotika;
links: resistent; mitte: intermediär; rechts: sensibel

Die untersuchten Kulturen konnten somit einer Empfindlichkeitskategorie (resistent, intermediär, sensibel) zugeordnet werden. Die Grenzkonzentrationen, die diese Einteilung ermöglichte, wurden den Herstellerangaben und CLSI-Richtlinien (Clinical and Laboratory Institute/ NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards; NCCLS/CLSI m100-S20 guideline, Wayne, PA, USA) entnommen.

Folgende Grenzwerte (S - I - R) wurden in $\mu\text{g/ml}$ festgelegt:

Für TZP 32 - 64 - 128, für MTZ 8 - 16 - 32, für MRP 4 - 8 - 16, für CD 2 - 4 - 8, für AZM ≥ 4 , für CAZ ≥ 8 und für CS ≥ 2 .

3.3.6 Einfrierkulturen

Die identifizierten aerob und obligat anaerob gewachsenen Bakterien wurden zur längerfristigen Aufbewahrung eingefroren. Hierzu wurden alle Organismen der einzelnen Agarplatten nach der Identifikation mittels einer sterilen Impföse in ein beschriftetes steriles verschließbares Reaktionsgefäß mit 4 ml Caseinpepton-Sojamehlpepton-Lösung USP (Art.-Nr. CM0129, OXOID) gegeben und für 48 Stunden aerob bzw. anaerob inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 100 μl flüssiges Glycerin und 900 μl der Bakterienlösung mit möglichst vielen sichtbar gewachsenen Kulturen in ein beschriftetes Twist-Top-Röhrchen gegeben und bei -53°C eingelagert.

4. Ergebnisse

4.1 Identifikation der fakultativ und obligat anaeroben Bakterien in Sputumproben von CF-Patienten

In der durchgeführten Studie wurden insgesamt 20 Kinder mit CF untersucht. Auf Grund des Alters sowie der zum Untersuchungszeitpunkt bestehenden gesundheitlichen Verfassung der Kinder konnten nur 14 der 20 Probanden (70%) eine Sputumprobe abgeben. Diese wurde im weiteren Verlauf auf fakultative Aerobier sowie auf obligate Anaerobier untersucht und die einzelnen enthaltenen Keime selektiert und analysiert. Bei nur zwei der 14 Probanden (14,3%) konnten keine obligaten Anaerobier im Sputum nachgewiesen werden.

Staphylococcus saccharolyticus konnte bei 8 der 14 Probanden (57,1%) als vorherrschender obligater Anaerobier identifiziert werden. Desweiteren wurden *Peptostreptococcus anaerobius* und *Peptostreptococcus prevotii* bei jeweils 4 von 14 Probanden (28,6%) nachgewiesen. In allen 14 Proben der Studienteilnehmer (100%) konnten fakultative Aerobier in den Sputumproben nachgewiesen werden (siehe Tab. 2A).

Bei den fakultativen Anaerobiern war *Rothia dentocariosa* mit 78,6% (11 von 14 Patienten) der Keim, der bei den meisten Patienten nachgewiesen werden konnte. *Streptococcus vestibularis* konnte bei 8 (57,1%), *Str. pneumoniae* und *Streptococcus sanguis* bei jeweils 7 Probanden (jeweils 50%) identifiziert werden. Der bei Erwachsenen mit CF häufig auftretende Keim *P. aeruginosa* konnte jedoch nur bei einem Patienten (7,1%) nachgewiesen werden. Die Untersuchungen ergaben, dass im Sputum von 3 der 14 Patienten (21,4%) eine Infektion mit *S. aureus* vorlag. Jedoch war kein Kind mit beiden Keimen gleichzeitig infiziert (siehe Anhang Tab. 6A).

Bei 12 der 14 Probanden (85,7%), die eine Sputumprobe abgaben, konnten obligate Anaerobier im Sputum nachgewiesen werden. In den 14 Proben wurden insgesamt 34 obligate Anaerobier identifiziert (7 verschiedene Genus und 8 verschiedene Spezies). Im Durchschnitt wurden pro Probanden $1,5 \pm 1,02$ unterschiedliche obligat anaerobe Bakterien analysiert (siehe Anhang Tab. 4A).

Die am häufigsten nachzuweisenden Vertreter der obligaten Anaerobier waren *Staphylococcus spp.* mit 44,1%, welche bei 8 der 14 Probanden (57,1%) im Sputum

nachgewiesen werden konnten. Darauf folgten *Peptostreptococcus spp.* (41,2%), welche auch bei 8 der 14 Kinder identifiziert wurden. Desweiteren konnten *Clostridium spp.*, *Wollinella spp.*, *Veillonella spp.* und *Bacteroides spp.* mit jeweils einem Vertreter (je 3%) identifiziert werden (siehe Anhang Tab. 4A)

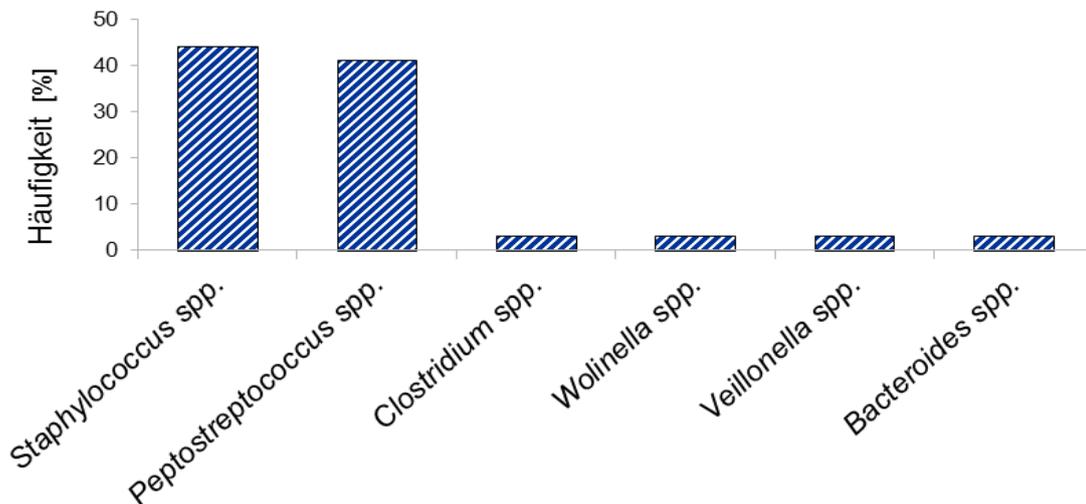


Abbildung 11: Verteilung der Häufigkeit obligater Anaerobier im Sputum von CF-Patienten

Pro Probe konnten höchstens 3 verschiedene obligat anaerob wachsende Spezies bestimmt werden. Dies traf auf 3 der 14 Kinder zu (21,4%). Bei 2 dieser 3 Patienten ließen sich die gleichen Keime nachweisen. Hierbei handelte es sich um *Ps. prevotii*, *Ps. anaerobius* und *S. saccharolyticus*. Bei dem anderen Kind konnten die beiden zuerst genannten Keime sowie *Streptococcus constellatus* nachgewiesen werden. Bei 6 der 14 Probanden (42,9%) konnte jeweils nur ein obligater Anaerobier im Sputum identifiziert werden. Dieser war zu 66,7% *S. saccharolyticus*. Bei nur 2 der 14 Patienten (14,3%) konnten keine obligat anaeroben Bakterien in den Sputumproben nachgewiesen werden.

Desweiteren konnten bei allen 14 Probanden (100%) 204 fakultative Aerobier (10 verschiedene Genus und 24 verschiedene Spezies) im Sputum identifiziert werden. Im Höchstfall wurden 9 verschiedene Spezies pro Sputumprobe analysiert, mindestens jedoch 5. Im Durchschnitt lagen $8,5 \pm 8,6$ unterschiedliche Keime pro Patient vor.

Streptococcus spp. war mit 60,3% mit Abstand der häufigste Vertreter der fakultativen Anaerobier im Sputum der Kinder. An zweiter Stelle folgten *Rothia spp.* mit 13,7%, gefolgt von *Staphylococcus spp.* mit 6,9%. *Micrococcus spp.*, *Pedunculus spp.*,

Stomatococcus spp., *Gemella spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Pseudomonas spp.* und *Rhodococcus spp.* waren nur in geringen Prozentzahlen nachweisbar (siehe Anhang Tab. 5A).

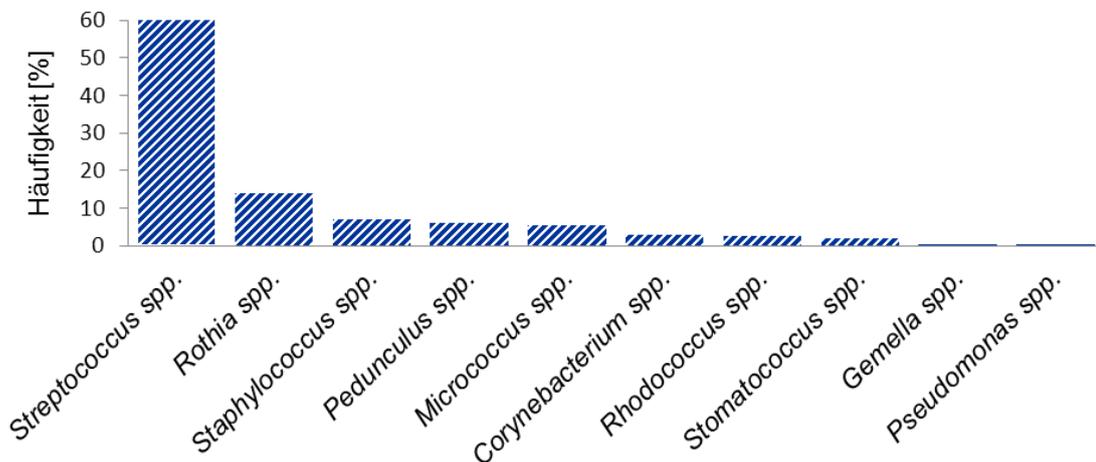


Abbildung 12: Verteilung der Häufigkeit fakultativer Anaerobier im Sputum von CF-Patienten

Str. constellatus, der sowohl aerob als auch anaerob zur Vermehrung in der Lage ist, konnte bei 5 Patienten (35,7%) im Sputum identifiziert werden: 4 mal als Aerobier und 1 mal als obligat anaerob wachsendes Bakterium (siehe Anhang Tab. 4A + 6A).

4.2 Quantifikation fakultativer und obligater Anaerobier im Sputum von CF-Patienten

14 der 20 Studienteilnehmer waren in der Lage, eine Sputumprobe zu expektorieren, welche im weiteren Verlauf auf das Vorhandensein von obligat und fakultativ anaerob wachsenden Bakterien untersucht wurden. Bei allen Probanden konnten fakultative Anaerobier nachgewiesen werden. Jedoch konnten nur bei 12 der 14 Kinder, unter streng anaeroben Bedingungen, obligate Anaerobier aus den Sputumproben isoliert werden. Für die fakultativen Anaerobier betragen die mittleren Keimzahlen $9,8 \times 10^5 \pm 1,6 \times 10^4$ KBE/ml ($1,3 \times 10^4$ KBE/ml bis 5×10^6 KBE/ml), bei den obligat anaerob wachsenden Bakterien lag diese bei $1,0 \times 10^4 \pm 2,5 \times 10^4$ KBE/ml ($1,4 \times 10^4$ KBE/ml bis $4,5 \times 10^6$ KBE/ml) (siehe Anhang Tab. 13 A).

4.3 Mikrobielle Zusammensetzung des parodontalen Sulkus bei Kindern mit CF und der gesunden Kontrollgruppe

4.3.1 Identifikation der fakultativen Anaerobier in den Zahntaschen von Kindern mit CF und bei Gesunden

Für die Untersuchung der bakteriellen Zusammensetzung des parodontalen Sulkus wurden für diese Studie Proben aus 84 Zahntaschen (44 Proben von 20 Kindern mit CF und 40 Proben von 20 gesunden Kindern) mittels einer sterilen Papierspitze entnommen und auf das Vorhandensein von fakultativ sowie obligat anaeroben Bakterien untersucht.

Bei allen 40 Studienteilnehmern konnten fakultative Anaerobier nachgewiesen werden. Bei den 20 CF-Kindern wurden insgesamt 170 fakultative Anaerobier selektiert und identifiziert (10 verschiedene Genus und 26 verschiedene Spezies). Im Durchschnitt konnten $6,5 \pm 7$ Keime pro Proband nachgewiesen werden. Dabei wurde in jedem Sulkus eines jeden Probanden mindestens ein aerob wachsendes Bakterium nachgewiesen (siehe Anhang Tab. 1A).

In der Kontrollgruppe konnten insgesamt 177 fakultativ anaerobe Bakterien identifiziert werden (13 verschiedene Genus und 33 verschiedene Spezies). Die durchschnittliche Keimbesiedlung betrug hier $5,4 \pm 5,3$. Auch in dieser Gruppe konnte in jeder Tasche mindestens ein fakultativer Anaerobier nachgewiesen werden. In Hinblick auf die Art und Häufigkeit der nachgewiesenen fakultativen Anaerobier in beiden Studiengruppen konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden (siehe Anhang Tab. 1A).

In den beiden untersuchten Gruppen dieser Studie, CF-Kinder und Kontrollgruppe, konnte *Streptococcus spp.* als der am häufigsten aufgetretene fakultative Anaerobier nachgewiesen werden. Bei den CF-Patienten wurde er bei jedem Kind (100%) mindestens einmal identifiziert, wohingegen er bei der Kontrollgruppe in einem Fall nicht nachweisbar war und somit mit einer Häufigkeit von 95% vorlag. Insgesamt wurden 17 verschiedene Streptokokken-Spezies nachgewiesen. Bei den CF-Patienten wurde *R. dentocariosa* mit 22,7% am zweithäufigsten nachgewiesen. 7 der 20 CF-Probanden (35%) wiesen eine Besiedelung des parodontalen Sulkus mit diesem Keim

auf. Weitere Vertreter der fakultativen Anaerobier in den Sulki der Patienten waren *Corynebacterium spp.* (20,5%), *Staphylococcus spp.* (20,4%) und *Pedunculus spp.* (18,2%) sowie 5 weitere vereinzelte Spezies (siehe Anhang Tab. 1A).

In der Kontrollgruppe war *Pedunculus pentosaceus* (37,5%) der zweithäufigste nachgewiesene Vertreter der fakultativen Anaerobier in den Zahntaschen. Er konnte bei 10 der 20 Probanden (50%) im parodontalen Sulkus nachgewiesen werden. Auch hier konnte *Corynebacterium spp.* mit einer Häufigkeit von 20% nachgewiesen werden, gefolgt von *Micrococcus spp.* mit ebenfalls 20% und *Staphylococcus spp.* mit 17,5%. *P. aeruginosa* konnte als humanpathogener Keim bei keinem der CF-Patienten in der Zahntasche nachgewiesen werden, wohingegen *S. aureus* bei 4 (20%) der CF-Kinder und der Kontrollgruppen-Kinder nachweisbar war (siehe Anhang Tab. 1A).

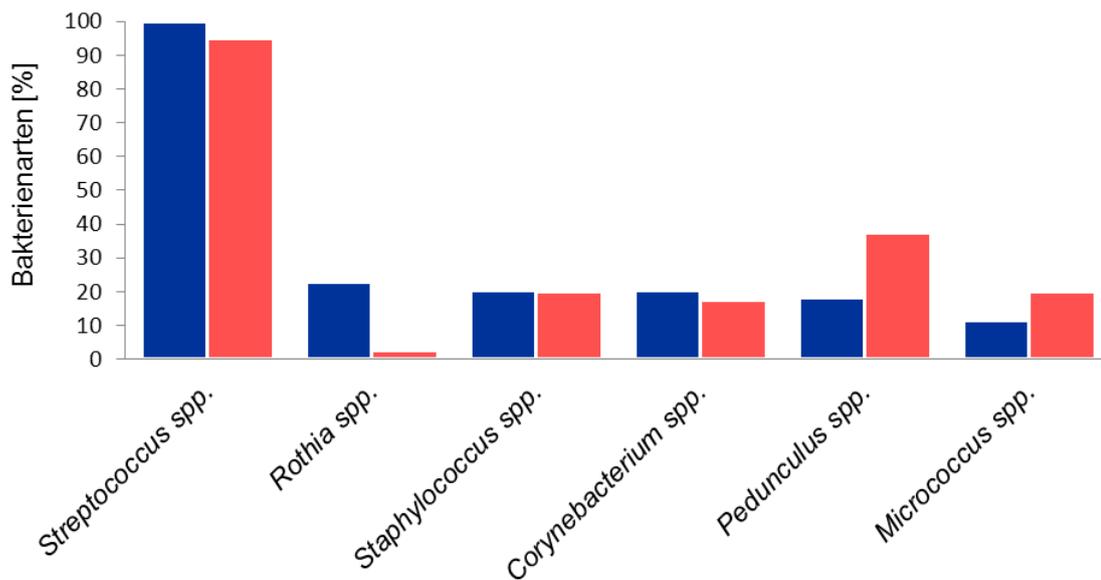


Abbildung 13: Häufigkeiten (in %) von fakultativ anaeroben Genera im parodontalen Sulkus von Kindern mit CF (■, n=44) und den Kontroll-Kindern (■, n=40)

4.3.2 Identifikation der obligaten Anaerobier in Zahntaschen von Kindern mit CF und bei Gesunden

Der Nachweis der obligaten Anaerobier erfolgte unter streng anaeroben Bedingungen. Dadurch konnte bei allen CF-Patienten mindestens ein obligater Anaerobier im parodontalen Sulkus identifiziert werden. Es konnten 77 Bakterien isoliert werden, wobei im Durchschnitt $7,7 \pm 8,6$ Keime pro Patient vorlagen. Die identifizierten obligaten Anaerobier der CF-Probandengruppe lagen in 7 verschiedenen Genera und 10 unterschiedlichen Spezies vor, wobei *Staphylococcus spp.* (68,2%) und *Peptostreptococcus spp.* (67,3%) die am häufigsten nachgewiesenen Vertreter waren.

In der Kontrollgruppe konnten 65 verschiedene Keime selektiert und analysiert werden. Somit konnten bei allen 20 Probanden im Durchschnitt $8,1 \pm 12$ verschiedene Keime pro Zahntasche nachgewiesen werden. Die obligaten Anaerobier lagen in dieser Studiengruppe in 7 verschiedenen Genera und 8 verschiedenen Spezies vor. Der häufigste Vertreter dieser Keime war mit 55,4% *S. saccharolyticus*, gefolgt von *Peptostreptococcus spp.* (29,3%) (siehe Anhang Tab. 3A).

Obligate Anaerobier in Zahntaschen

Tabelle 1: Obligate Anaerobier in 44 Zahntaschen von 20 Kindern mit CF und in 40 Zahntaschen der 20 gesunden Kontrollen (Angabe in absoluten Zahlen).

Genus	Spezies	CF-Kinder (n=20)	Kontrollgruppe (n=20)
<i>Streptococcus</i>	<i>constellatus</i>	2	
<i>Staphylococcus</i>	<i>saccharolyticus</i>	17	19
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>anaerobius</i>	7	5
	<i>prevotii</i>	10	11
	<i>asaccharolyticus</i>	5	
<i>Clostridium</i>	<i>difficile</i>	4	1
	<i>hastiforme</i>	2	
<i>Veillonella</i>		4	4
<i>Fusobacterium</i>	<i>necrophorum</i>	2	
<i>Capnocytophaga</i>		1	
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>		1
<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>		3
<i>Bifidobacterium</i>			1

Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den obligaten Anaerobiern der zwei Studiengruppen erkennen. In beiden Fällen waren *Staphylococcus spp.* die am häufigsten nachzuweisende Art der obligat anaerob wachsenden Bakterien. Diese konnte bei 17 (85%) der CF-Kinder und bei 19 (95%) der Kinder der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Insgesamt konnte dieser Keim von 142 identifizierten Bakterien 66 mal (46,5%) in den 84 Zahntaschen (44 Sulki der CF-Probenden und 40 der Kontrollgruppe) identifiziert werden. Es folgte *Peptostreptococcus spp.*, welcher bei maximal 10 (50%) der CF-Patienten und bei maximal 11 (55%) der Kontrollgruppe identifiziert wurde. Dieses Bakterium wurde 49 mal (13,4%) nachgewiesen (30 mal bei den CF-Patienten und 19 mal bei der Kontrollgruppe). Des weiteren konnten *Veillonella spp.* bei 20% der CF-Kinder und 20% der Gesunden und *Clostridium spp.* bei 30% der CF-Kinder und 5% der Gesunden bestimmt werden. *Streptococcus spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Capnocytophaga*, *Lactobacillus spp.*, *Dentolyticus* und *Bifidobacterium* konnten nur in Einzelfällen analysiert werden (siehe Anhang tab. 8A).

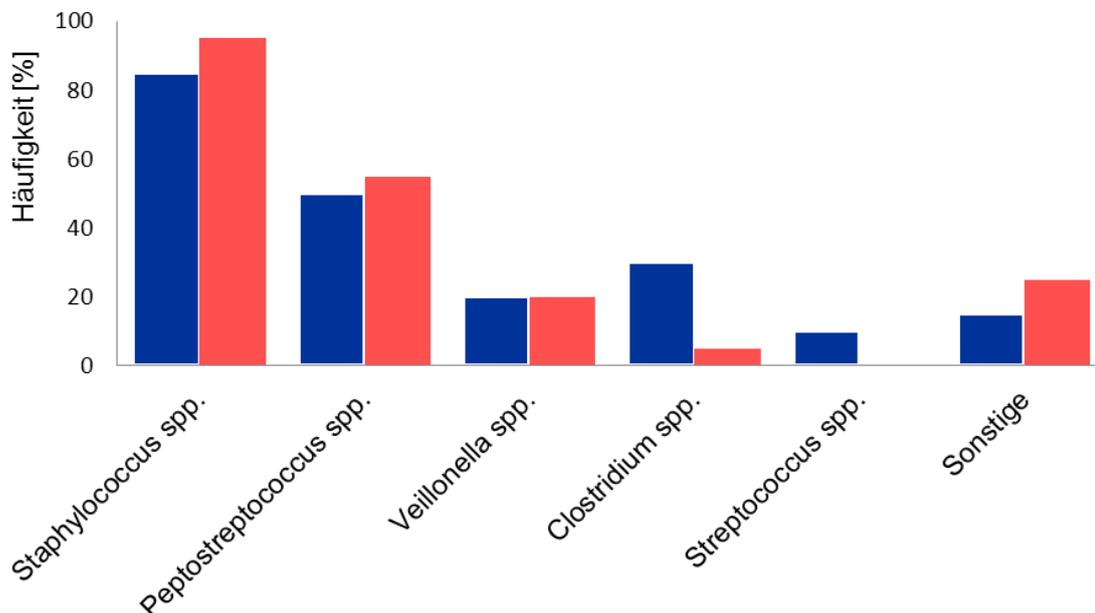


Abbildung 14: Häufigkeiten (in %) von obligat anaeroben Genera im parodontalen Sulkus von Kindern mit CF (■, n=44) und den Kontroll-Kindern (■, n=40)

4.3.3 Vergleich der obligat anaeroben Bakterien von Sputum- und Parodontaltaschenproben bei Kindern mit CF

Bei allen 14 Probanden, die am Tag der Probenentnahme Sputum abgeben konnten, sowie bei 6 weiteren Probanden ohne Abgabe von Sputum wurden mittels einer sterilen Papierspitze Proben aus den beiden tiefsten, zuvor ausgemessenen, parodontalen Sulki entnommen. Es konnten insgesamt bei allen 20 Probanden 111 obligat anaerob wachsende Bakterien im Sputum und in den Zahntaschen identifiziert werden (9 Genus und 12 verschiedene Spezies) (siehe Anhang Tab. 11A).

Bei allen Probanden konnten fakultative sowie obligate Anaerobier in den Sulki identifiziert werden. Bei 4 der beprobten Kinder konnte jeweils nur ein obligater Anaerobier nachgewiesen werden. In drei Fällen handelte es sich um *S. saccharolyticus* und in einem Fall um *Veilonella spp.*

Auch in der Analyse der Keime aller 20 Probanden, zeigte sich die gleiche Tendenz der Verteilung der obligat anaerob wachsenden Bakterien wie in den Sputumproben. Der häufigste Vertreter der obligaten Anaerobier war *S. saccharolyticus* im Sulkus von 17 Patienten und im Sputum von 8, gefolgt von *Ps. prevotii*, welcher bei 10 Patienten im Sulkus und bei 4 Sputum nachgewiesen werden konnte. Ähnlich verhält es sich mit *Ps. anaerobius*, welcher bei 7 Patienten im Sulkus und bei 4 im Sputum identifiziert wurde (siehe Anhang Tab. 9A).

Die Verteilung der Häufigkeit der identifizierten obligaten Anaerobier in Sputum und parodontalem Sulkus bei Patienten mit Sputumabgabe insgesamt unterscheidet sich nur unwesentlich voneinander. Der in beiden Fällen am häufigsten vorliegende Keim ist *S. saccharolyticus* (44,1% im Sputum; 36,8% in den Taschen). Im Sputum ist *Ps. prevotii* (26,5%) häufiger nachzuweisen als *Ps. anaerobius* (14,7%). In den Zahntaschen ist *Ps. anaerobius* (19,3%) jedoch öfter identifiziert worden als *Ps. prevotii* (10,5%). Es wurden fast doppelt so viele Keime in den Taschen identifiziert (57) als im Sputum (34) (siehe Anhang Tab. 10A).

Obligate Anaerobier im Sputum und den Zahntaschen

Tabelle 2: Obligate Anaerobier im Sputum und in den Zahntaschen (n=44) von Kindern mit CF (Angabe in absoluten Zahlen).

Genus	Spezies	Sputum	Zahntasche
		n=14	n=20
<i>Streptococcus</i>	<i>constellatus</i>	1	2
<i>Staphylococcus</i>	<i>saccharolyticus</i>	8	17
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>anaerobius</i>	4	7
	<i>prevotii</i>	4	10
	<i>asaccharolyticus</i>		5
<i>Clostridium</i>	<i>difficile</i>		4
	<i>hastiforme</i>	1	2
<i>Wolinella</i>	<i>sp.</i>	1	
<i>Veillonella</i>	<i>spp.</i>	1	4
<i>Fusobacterium</i>	<i>necrophorum</i>		2
<i>Bacteroidis</i>	<i>stercoris</i>	1	
<i>Capnocytophaga</i>	<i>sp.</i>		1

Die am häufigsten nachgewiesene Keime aller Proben, Sputum sowie parodontaler Sulkus bei allen 20 Probanden, waren *S. saccharolyticus* (45x) und *Peptostreptococcus spp.* (44x). Ihnen folgte mit großen Abstand *Clostridium spp.* (8x) und *Veillonella spp.* (6x). Fünf weitere Arten traten insgesamt 8-mal auf (siehe Anhang Tab. 11A).

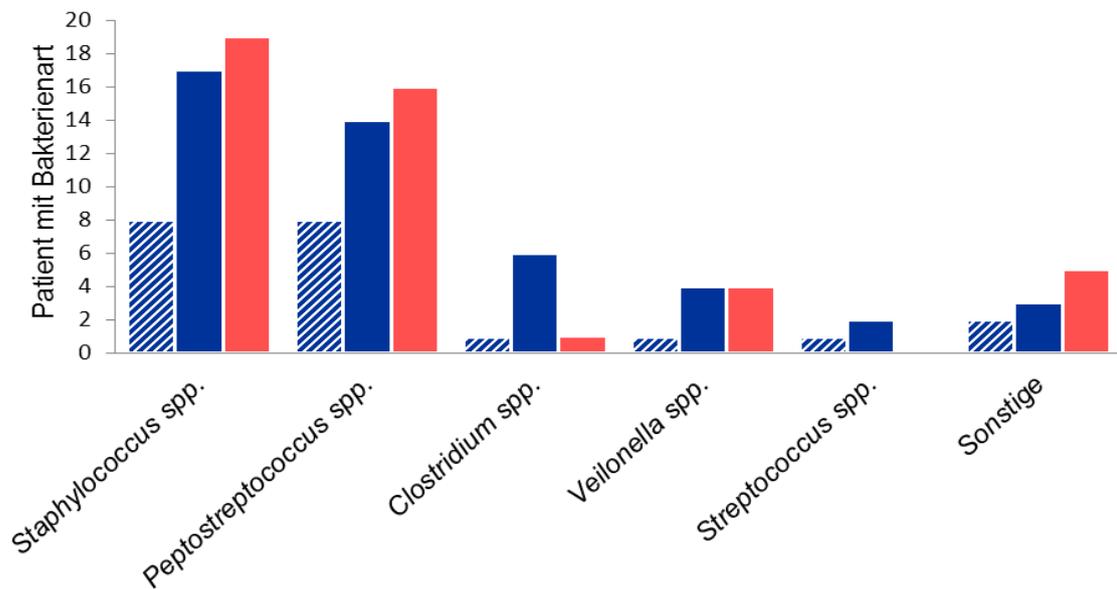


Abbildung 15: Häufigkeiten von obligat anaeroben Genera im Sputum von CF-Patienten (■, n=14) und im parodontalen Sulkus von Kindern mit CF (■, n=20) und den Kontroll-Kindern (■, n=20)

Bei 10 der CF-Patienten konnten insgesamt 11 identische Keim-Paare obligat anaerob wachsender Bakterien in Sputum und Zahntasche der CF-Probanden nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich 7 mal um *S. saccharolyticus* und jeweils einmal um *Veilonella spp.*, *Clostridium hastiforme*, *Ps. anaerobius* und *Str. constellatus*, wobei *Ps. anaerobius* und *Str. constellatus* bei dem gleichen Patienten nachweisbar waren.

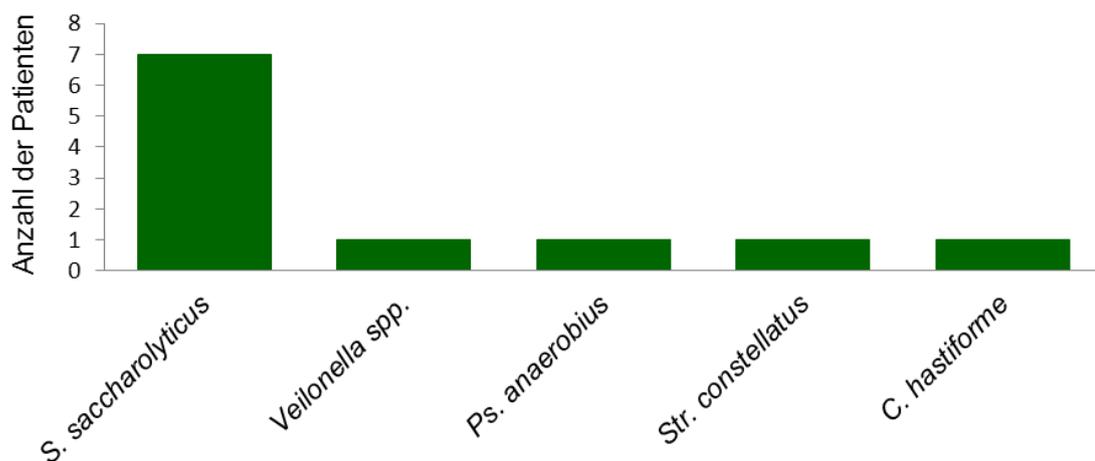


Abbildung 16: Anzahl der CF-Patienten mit identischen Paaren obligater Anaerobier in Sulkus und Sputum

4.4 Resistenzbestimmungen

Für die Resistenzbestimmungen wurden in dieser Studie gleiche Paare der obligaten Anaerobier aus parodontalem Sulkus und Sputum aus den archivierten Einfrierkulturen untersucht. Es lagen 11 Paarmöglichkeiten von 10 verschiedenen Patienten zur Untersuchung vor. Insgesamt wurden 33 Proben angesetzt, von denen 6 Proben nicht mehr angezüchtet werden konnten. Auf Grund dessen konnten nur Paare von 7 Patienten zur Resistenzbestimmung verwendet werden. Bei diesen Paaren handelte es sich um 9 archivierte obligate Anaerobier aus dem Sputum sowie 13 archivierte obligate Anaerobier aus den parodontalen Sulki der gleichen Patienten. Somit lagen 15 Paare zur Analyse vor. Als obligate Anaerobier wurden *S. saccharolyticus* (bei 4 Patienten), *Veilonella spp.* (bei einem Patienten), *C. hastiforme* (bei einem Patienten) sowie *Str. constellatus* (bei einem Patienten) getestet. Diese Proben wurden auf die Empfindlichkeiten gegenüber 7 verschiedenen Antibiotika untersucht (Piperacillin/Tazobaktam, Metronidazol, Meropenem, Clindamycin, Azithromycin, Ceftazidim und Colistin) (siehe Anhang Tab. 12A).

Es ergaben sich durch die mit E-Test[®] durchgeführten Resistenzbestimmungen hohe Empfindlichkeiten bei Clindamycin (0% resistente Stämme), Meropenem (18,2%), Colistin (18,2%) sowie Azithromycin (27,3%) und Metronidazol (31,8%). Ein hoher Prozentsatz an resistenten Stämmen konnten jedoch gegen Piperacillin/Tazobaktam (50%) und Ceftazidim (63,6%) nachgewiesen werden.

Bei den einzelnen Bakterienarten zeichneten sich, bezogen auf die Empfindlichkeiten, unterschiedliche Ergebnisse ab. *S. saccharolyticus* (21 Proben; 9x Sputum, 13x parodont. Sulkus) wies eine hohe Prozentzahl resistenter Stämme gegen Ceftazidim (62,5% resistent, 10 Proben) und Piperacillin/Tazobaktam (56,3%, 9 Proben) und eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Clindamycin (100% sensibel, 16 Proben) und Meropenem (75%, 12 Proben) auf.

Veilonella spp. (2 Proben; 1x Sputum, 1x Zahntasche) wies 100% resistente Stämme gegen Piperacillin/Tazobaktam, Azithromycin und Ceftazidim auf. Gegen die weiteren 4 Antibiotika war der Keim zu 100% sensibel.

Str. constellatus (2 Proben; 1x Sputum, 1x Zahntasche) wies ebenso 100% resistente Stämme gegenüber Metronidazol, Meropenem, Ceftazidim und Colistin auf.

Piperacillin/Tazobaktam und Clindamycin waren zu 100% sensibel.

Antibiotische Empfindlichkeit obligater Anaerobiern

Tabelle 3: Antibiotische Empfindlichkeit von obligaten Anaerobiern.

Genus	n	TZP	MTZ	MRP	CD	AZM	CAZ	CS
<i>S. saccharolyticus</i>	16	9 (56,3)	4 (25)	2 (12,5)	0	3 (18,8)	10 (62,5)	1 (6,25)
<i>Veillonella spp.</i>	2	2 (100)	0	0	0	2 (100)	2 (100)	0
<i>C. hastiforme</i>	2	0	1 (50)	0	0	0	0	1 (50)
<i>Str. constellatus</i>	2	0	2 (100)	2 (100)	0	1 (50)	2 (100)	2 (100)
gesamt	22	11 (50)	7 (31,8)	4 (18,3)	0 (0)	6 (27,3)	14 (63,6)	4 (18,2)

Zahl der resistenten Stämme (in %); TZP: Piperacillin/Tazobaktam, MTZ: Metronidazol, MRP: Meropenem, CD: Clindamycin, AZM: Azithromycin, CAZ: Ceftazidim, CS: Colistin

Den einzigen Unterschied stellte *C. hastiforme* dar (2 Proben; 1x Sputum, 1x Sulkus). Dieses Paar war zu 50% resistent gegenüber Metronidazol und Colistin. In diesem Fall war der selektierte Keim aus dem Sputum derjenige, welcher resistent gegen die eben genannten Antibiotika war. Die Probe aus dem Sulkus war zu 100% sensibel gegenüber allen Antibiotika. Der Keim aus der Sputumprobe war gegenüber den restlichen 5 Antibiotika zu 100% sensibel.

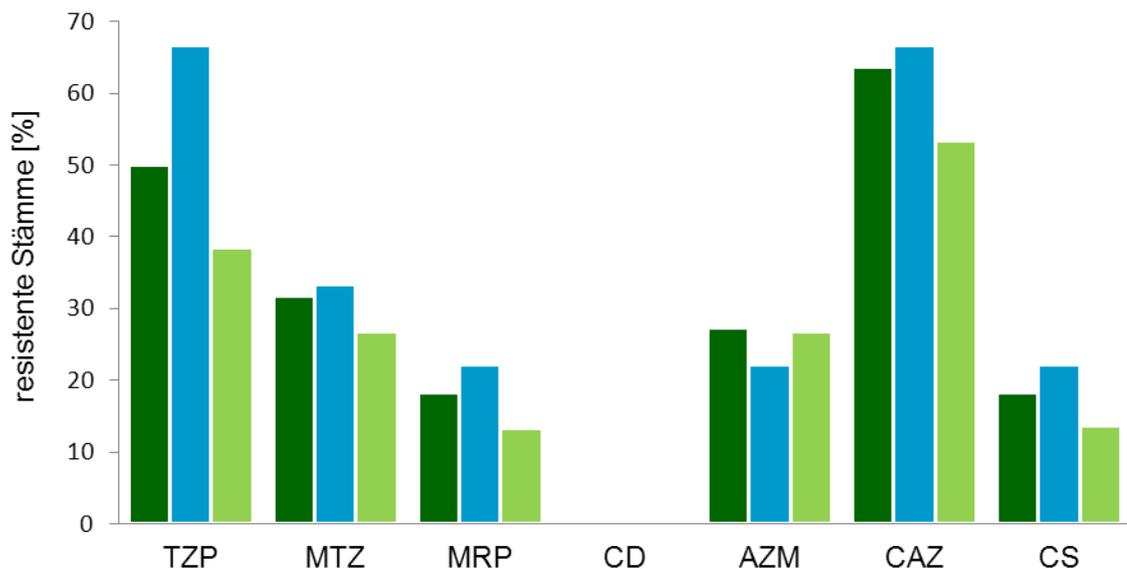


Abbildung 17: Prozentuale Häufigkeiten resistenter Stämme obligater Anaerobier insgesamt (■, n=22), in Sputumproben (■, n=9) und in parodontalen Sulki (■, n=13) von CF-Kindern.

TZP: Piperacillin/Tazobaktam, MTZ: Metronidazol, MRP: Meropenem, CD: Clindamycin, AZM: Azithromycin, CAZ: Ceftazidim, CS: Colistin

Der Vergleich der Sensibilitäten in Taschen und Sputum ergab, dass bei 5 der 7 Patienten entweder die Probe aus der Zahntasche oder die aus dem Sputum resistent gegenüber den ausgewählten Antibiotika war. So konnten 10 Proben ermittelt werden, bei denen die untersuchten Stämme sowohl im Sulkus als auch im Sputum resistent gegenüber den getesteten Antibiotika waren. Bei nur einer Probe konnte lediglich dem im Sputum befindlichen Keim eine resistente Wirkung gegenüber dem getesteten Antibiotikum nachgewiesen werden, nicht jedoch dem im Sulkus befindlichen Keim. Bei den meisten der untersuchten Keime konnte in etwa die gleiche Wirkung der Antibiotika gegenüber der Bakterien von Sputum und Tasche nachgewiesen werden.

5. Diskussion

5.1 Identifikation gleicher Spezies bei Kindern mit CF und der gesunden Kontrollgruppe

Bei allen in dieser Studie untersuchten CF-Kindern konnten obligat und fakultativ anaerobe Bakterienarten nachgewiesen werden. Mehrere Autoren (Tunney et al., 2008, Worlitzsch et al., 2006; Rogers et al., 2013) konnten bereits in ihren Studien aus den Jahren 2004 bis 2013 annähernd die gleichen Bakterienarten im Sputum von CF-Patienten identifizieren, die auch in dieser Studie nachgewiesen werden konnten. Diese waren sowohl im Sputum als auch in den untersuchten Zahntaschen nachweisbar. Aber auch bei der gesunden Kontrollgruppe konnte die gleiche Keimbesiedelung in den untersuchten Zahntaschen nachgewiesen werden. Somit stellt die Besiedelung des parodontalen Sulkus mit den nachgewiesenen fakultativen und obligaten Anaerobiern keine Ausnahme dar, sondern ist vielmehr die Regel in allen Zahntaschen.

5.2 Möglichkeiten der Kontamination mit den identifizierten Bakterienspezies bei Kindern mit CF und der gesunden Kontrollgruppe

Der Nachweis gleicher Spezies obligat und fakultativ anaerober Bakterien in den parodontalen Sulki der untersuchten Kinder lässt annehmen, dass diese Keimarten aus der Umwelt aufgenommen wurden. Somit sind viele Möglichkeiten einer Kontamination mit den identifizierten Keimen möglich. Es ist durchaus denkbar, dass diese zum Teil apathogenen Keime aus der Umwelt über die Nahrung aufgenommen werden. So fand Worlitzsch et al. 2006 heraus, dass in seltenen Fällen Pseudomonaden auf Salaten, Gurken und Tomaten zu finden sind. Eine Kontamination dieser Lebensmittel mit *P. aeruginosa* oder auch Enterokokken und *Escherichia coli* durch das Trinkwasser beim Abwaschen und Reinigen ist unwahrscheinlich, da der Grenzwert laut Trinkwasserverordnung (Trinkwasserverordnung, Zugriff 16.12.2016) bei 0/250ml (in verschlossenen Behältnissen) bzw. 0/100ml liegt. Es sollte somit frei von den genannten Bakterien sein. Auch konnten bereits 1896 Clostridien auf Schinken nachgewiesen werden (Van Ermengem, 1897; Pickett, 2008). Desweiteren kann durch engen Körperkontakt zu anderen Personen oder Familienmitgliedern (Jones et al., 2003; Döring und Høiby, 2004) oder über kontaminierte Gegenstände (Jones et al., 2003), wie zum Beispiel schon das Spielzeug im Babyalter, oder Zahnbürsten (Hingst, 1989) einen ersten möglichen Schritt zur Entstehung chronisch-bakterieller

Lungeninfektionen darstellen. Dies gilt sowohl für die CF-typischen fakultativ anaeroben Bakterien, wie beispielsweise *P. aeruginosa*, als auch für die obligaten Anaerobier. Ebenso sind weitere Übertragungsarten für *P. aeruginosa* aus der Umgebung möglich. So konnte eben dieser Keim in Bädern, Waschbecken und Duschen, welche von CF-Patienten benutzt wurden, nachweisen werden (Jones et al., 2003; Heirali et al., 2016). Auch in der Raumluft von Krankenhausstationen mit CF-Patienten und in den von CF-Patienten besuchten Ambulanzen und Untersuchungsräumen (z.B. Räume für Lungenfunktionstests und Inhalationen) konnte *P. aeruginosa* nachgewiesen werden (Döring et al. 1991; Döring und Høiby, 2004). Somit besteht die Möglichkeit, dass sich bereits Kleinkinder und Säuglinge bei Vorsorgeuntersuchungen in den CF-Ambulanzen durch die in der Raumluft befindlichen Keime mit *P. aeruginosa* infizieren oder durch den direkten Kontakt mit anderen zu behandelnden Patienten. Diese ist vor allem bei dem gemeinsamen Spielen von Kindern in den CF-Ambulanzen denkbar (Koch et al., 1993; Gibson et al., 2003)

In dieser Studie konnten neben *P. aeruginosa*, welcher nur in einem Fall identifiziert werden konnte, auch noch andere für CF-Patienten typische Bakterien nachgewiesen werden (Rogers et al., 2004; Worlitzsch et al., 2006; Tunney et al., 2013), die nicht nur bei diesen Patienten diverse Infektionen hervorrufen können. So können grampositive Staphylokokken und auch das auf der Haut befindliche anaerobe Bakterium *S. saccharolyticus* eine bakteriell induzierte Endokarditis auslösen (Westblom et al., 1990). Kazimrova et al. wiesen 2007 *Ps. prevotii* in Magenbiopsien von Kindern mit chronischer Gastritis nach. Weitere Peptostreptokokkenarten konnten wie auch *Fusobacterium spp.* und *Prevotella spp.* in direkten Zusammenhang mit der Entstehung von dental verursachten Sinusitiden gebracht werden (Sonsale et al., 2004; Brook, 2006). *Fusobacterium necrophorum*, ein nachgewiesenes gramnegatives Bakterium, ist des Weiteren dafür bekannt, eine chronische oder rezidivierende Tonsillitis zu verursachen, deren lebensbedrohlicher Verlauf als Lemière-Syndrom bekannt ist. Dabei folgt auf die Tonsillitis eine Thrombophlebitis der Vena jugularis, gefolgt von einer Sepsis und im Anschluss eine septische Lungenembolie (Riordan, 2007). Der Erreger konnte ebenso 2004 bei septischen Arthritiden des Knies von Sonsale et al. nachgewiesen werden.

Auch verschiedene Streptokokkenarten konnten in dieser Studie identifiziert werden. So werden *Streptococcus intermedius* und *Str. constellatus* häufig mit eitrigen

Infektionen in Verbindung gebracht, wobei davon ausgegangen werden kann, dass diese Bakterien von den Orten ihres apathogenen Vorkommens aus in die verletzten Areale vordringen und eine Infektion auslösen können (Sibley et al., 2010). *Str. intermedius* konnte in Abszessen der Leber und des Gehirns nachgewiesen werden und spielt zudem eine Rolle bei der Entstehung von dentalem Plaque (Whiley et al., 1992), welche dann durch kariöse Läsionen der Zähne verschiedene eitrige Abszesse auslösen können. Tsai et al. fanden 2004 heraus, dass *Str. constellatus* unter anderem ein Erreger myokardialer Abszesse mit zystischen Läsionen ist. Auch mit computertomographisch nachweisbaren Schwellungen des Gehirns auf Grund einer Encephalitis konnte dieser Keim in Verbindung gebracht werden (Tsai et al., 2004).

Da die CF-Patienten eine ähnliche Keimbesiedelung im Sputum und Sulkus aufweisen, ist zu überlegen, wie die Kontamination zustande kommt. Es ist möglich, dass die Keime aus der Umwelt bereits im Säuglingsalter, vor dem Durchbruch des ersten Zahns und somit vor der Entstehung der ersten Zahntasche, die Lunge infiltrieren. Da bereits in diesem Alter der Abtransport des Mukus erschwert ist (Tarran et al., 2005) und sich ein dickerer Mukusfilm auf dem Lungenepithel entwickeln kann, ist es möglich, dass sich die aufgenommenen Keime in der Lunge ansiedeln und spätere Infektionen hervorrufen können. Da aber die gesunde Kontrollgruppe die gleiche Keimbesiedelung in den Taschen aufweist, ist es wahrscheinlicher, dass der Sulkus ein mögliches Reservoir darstellt, von dem die Kontamination der Lunge ausgeht. Dies belegt wiederum die Tatsache, dass Paare gleicher Bakterienarten in Sputum und Zahntasche nachgewiesen werden konnten. Jedoch wurden die Bakterien in dieser Studie nicht einer Genotypisierung unterzogen, sondern als Lebendkultur gezüchtet und den gleichen Genera und Spezies zugeordnet. Eine Genotypisierung wäre ein eindeutiger Beweis für die gleiche Identität der Stämme. Auch kann durch eine Genotypisierung eine größere Vielfalt an unterschiedliche Bakterien-DNA und damit eine größere Vielfalt an Bakterienarten nachgewiesen werden (Tunney et al., 2008). Bei der visuellen Selektion können auf Grund der minimalen Größe einer Kultur oder des starken Wachstums anderer Kulturen, Kleinere übersehen werden. Dies könnte jedoch in zukünftigen Studien untersucht werden.

5.3 Vergleich der Resistenzen gegenüber ausgewählten Antibiotika bei Paaren gleicher obligater Anaerobier aus Zahntaschen und Sputum

In dieser Studie wurden Lebendkulturen verwendet, um mögliche Resistenzen gleicher Paare obligat anaerober Bakterien gegenüber verschiedenen Antibiotika zu

untersuchen (Piperacillin/Tazobaktam, Metronidazol, Meropenem, Clindamycin, Azithromycin, Ceftazidim und Colistin). Das ist nur mit lebenden Bakterien durchführbar und nach einer Genotypisierung, bei der die Bakterien-DNA selektiert wurde, ist dieses Verfahren nicht mehr möglich (Rogers et al, 2004; Tunney et al., 2008).

Die Resistenzbestimmungen ergaben, dass bei vielen der getesteten Paare (87,8%) die gleiche Wirkung der beprobten Antibiotika gegenüber den Bakterien im Sputum und im Sulkus nachgewiesen werden konnte. Dies deutet wiederum darauf hin, dass es einen Zusammenhang zwischen der Keimbesiedelung der Lunge und dem Bakterienreservoir in den parodontalen Sulki gibt und es sich somit um die gleichen Keime im Sputum und in den Sulki handeln könnte. Diese Tatsache bestätigt die Annahme, dass die Kontamination der Lunge mit obligat anaeroben Bakterien ihren Ursprung möglicherweise aus dem Bakterienreservoir der Sulki nimmt (Caldas, 2015).

Jedoch ist noch nicht geklärt, wo die unterschiedlichen Bakterienarten ihre resistente Wirkung gegenüber den Antibiotika erworben haben (Döring et al., 2012). Es konnte nicht nachgewiesen werden, ob die Bakterien bereits in resistenter Form aus der Umwelt aufgenommen wurden (Govan et al. 1993, 1996; Jones et al. 2001, 2003), oder ob sie im Laufe der CF-Behandlung und der Behandlungen mit Antibiotika während und nach der akuten Exazerbation diese Resistenzen entwickelten. Da bei der gesunden Kontrollgruppe keine Resistenzbestimmungen durchgeführt wurden (keine Sputumproben), ist auch nicht bekannt, ob sich bereits bei dieser Gruppe resistente Stämme obligat anaerober Bakterien in den Sulki befinden. Jedoch konnte in einer vorhergehenden Studie bei erwachsenen CF-Patienten ein ähnliches Resistenzmuster gegenüber den untersuchten Antibiotika nachgewiesen werden (Huse, 2015). Auch die Untersuchung der parodontalen Sulki der gesunden Kontrollgruppe ergab eine ähnliche Entwicklung der Resistenzen wie bei CF-Sputumproben und Zahntaschen. Dies deutet wiederum darauf hin, dass es möglich ist, dass die resistenten Keime aus der Umwelt aufgenommen wurden (Govan et al. 1993, 1996; Jones et al. 2001, 2003).

Es ist nicht verwunderlich, dass die untersuchten Keimpaare eine hohe Resistenz gegenüber Piperacillin/Tazobaktam und Ceftazidim aufwiesen. Beide Antibiotika werden standartmäßig in der CF-Therapie angewandt (Döring et al., 2012), Ceftazidim als Standardantibiotikum gegen *P. aeruginosa* und Piperacillin/Tazobaktam als Antibiotikum bei der akuten Exazerbation. Diese Antibiotika sind gegen die in dieser

Studie untersuchten obligaten Anaerobier zum größten Teil nicht mehr wirksam (Resistenzen von über 50%).

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die prozentuale Häufigkeit der resistenten obligat anaeroben Stämme gegenüber Piperacillin/Tazobaktam und Ceftazidim in den Sputum- und Sulkusproben annähernd gleich ist. Dies deutet darauf hin, dass die obligaten Anaerobier der Zahntasche mit den untersuchten Antibiotika in Kontakt gekommen sind und somit ein systemischer und kein lokaler Zusammenhang besteht. Es ist nicht möglich Aussagen darüber zu treffen, wo die Bakterien ihre Resistenzen entwickelt haben, ob in der Lunge, in der Tasche oder in der Umwelt. Es ist somit nur anzunehmen, dass die Keime beider Reservoirs, Zahntasche und Sputum, den gleichen Ursprung haben könnten.

Ähnliche Ergebnisse konnten bei Colistin und Azithromycin nachgewiesen werden, welche als kontinuierliche Antibiose der CF-Therapie verwendet werden (Döring 2012). Jedoch ist die prozentuale Häufigkeit resistenter obligat anaerober Bakterien geringer als bei Ceftazidim und Piperacillin/Tazobaktam. Auch Meropenem, welches selten in der CF-Therapie verwendet wird, wies eine ähnlich hohe Rate resistenter Keime auf wie Azithromycin und Colistin. Dies deutet darauf hin, dass es durchaus möglich ist, dass diese Bakterien als teilweise resistente Form aus der Umwelt aufgenommen wurden und sich in den Reservoirs Lunge und Zahntasche ansiedelten.

Allein bei Clindamycin konnten keine resistenten Stämme obligater Anaerobier nachgewiesen werden. Dieses Antibiotikum wird auch nicht in der CF-Therapie eingesetzt. Aber auf Grund der hohen Wirksamkeit dieses Antibiotikums und der hohen Resistenzraten der CF-typischen Antibiotika wäre es möglich, Clindamycin trotz seiner schlechten Verträglichkeit als Antibiotikum gegen die obligat anaeroben Bakterien bei akuten Exazerbationen einzusetzen (Döring et al., 2012)

Metronidazol, welches so gut wie nie in der CF-Therapie zum Einsatz kommt, wies eine ähnlich hohe Resistenzrate der obligat anaeroben Bakterien gegenüber den Antibiotika auf wie Meropenem und Azithromycin. Metronidazol wird allerdings häufiger bei Infektionen mit obligaten Anaerobiern verordnet, so zum Beispiel bei Infektionen im Magen-Darm-, Vaginal-, Hals-Nasen-Ohren- und im Mundbereich (Forth et al., 1992). So ist Metronidazol ein wichtiger Bestandteil des in der Zahnmedizin verwendeten „Van Winkelhoff-Cocktails“ zur Behandlung der aggressiven nekrotisierend ulcerierenden Parodontitis (ANUG), bei der 3x500mg Amoxicillin + 3x400mg Metronidazol pro Tag für

7 Tage verordnet werden (Loesche et al., 1984; van Winkelhoff et al., 1989, 1992). Auf Grund dieser Anwendungsbereiche ist es denkbar, dass sich resistente Stämme entwickelt haben, welche möglicherweise aus der Umwelt aufgenommen wurden (Govan et al. 1993, 1996; Jones et al. 2001, 2003).

Eine gezielte Antibiose gegen die obligat anaeroben Bakterien als Monotherapie ist bei CF nicht indiziert, da bei dieser Erkrankung eine Mischinfektion vorliegt. Somit müsste die Therapie ähnlich dem in der Zahnmedizin verwendeten „Van Winkelhoff-Cocktail“ sein (Van Winkelhoff et al., 2003), bei dem die Infektion von fakultativen und obligaten Anaerobiern in den Zahntaschen der Patienten mit einer gezielten Antibiose gegen diese beiden Keimarten behandelt wird. Denn auch in der CF-Lunge liegt diese Mischinfektion vor. Dies konnte in dieser Studie und in vorher durchgeführten Studien (Worlitzsch et al., 2006; Huse 2015) belegt werden und stellt somit die Regel und keine Ausnahme dar. Auf Grund dessen ist es erstrebenswert, eine duale Therapie gegen beide Keimarten durchzuführen und nicht nur, wie bisher, gegen die fakultativ anaeroben Bakterien. Dies könnte speziell im Falle von therapieresistenten durch *P. aeruginosa* verursachten Exazerbationen indiziert sein, wenn gleichzeitig resistente obligate Anaerobier nachweisbar sind.

5.4 Ausblick

Als Konsequenz aus der vorliegenden Studie ergibt sich, dass eine Reihe von neu aufgetauchten Fragen beantwortet werden müssen: Überrepräsentation von *S. saccharolyticus*, ggf. verschiedene regionale Verteilungen (Tunney 2010). Genotypisierung mit PFGE gibt viel exaktere Ergebnisse darüber, ob Stämme identisch sind. Darum wären Paralleluntersuchungen (PFGE und Resistenzbestimmungen) wünschenswert.

Als Fazit lässt sich sagen, dass das Vorkommen gleicher Spezies obligat anaerober Bakterien in den Zahntaschen und in der Lunge von Kindern mit CF und in den parodontalen Sulki der Kontrollgruppe auf eine mögliche Kontamination der Lunge aus den Bakterienreservoirs der Zahntaschen hinweist. Die Ergebnisse der durchgeführten Resistenzbestimmungen deuten ebenfalls darauf hin. Jedoch ist dies kein endgültiger Beweis des Weges der Kontamination, was weitere Studien erforderlich macht.

6. Zusammenfassung

Die Cystische Fibrose ist eine der häufigsten und schwerwiegendsten autosomal-rezessiv vererbten Stoffwechselerkrankungen der kaukasischen Bevölkerung. Auf Grund eines Gendefekts wird ein Protein gar nicht oder nur fehlerhaft gebildet und bedingt die Anreicherung von Mukus auf dem Epithel der Lunge. In Folge des Krankheitsverlaufs entwickeln die Patienten häufig chronische bakterielle Lungenentzündungen, welche oftmals zum frühzeitigen Tod der Patienten führen. Die Ursache der Pneumonien sind multiple Infektionen mit einer Vielzahl verschiedenster Bakterien wie *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *H. influenzae* und *Stenotrophomonas maltophilia*, die in den Atemwegen lokalisiert sind. Durch die Anreicherung des Mukus und die Entstehung von Mukusplaques in den Atemwegen kommt es in diesem hypoxischen Milieu zur vermehrten Ansiedelung von obligat anaeroben Bakterienarten. Jedoch ist noch nicht endgültig geklärt, welche Rolle diese Keime in der Pathophysiologie der Lungeninfektionen der CF-Patienten spielen.

Es sind zahlreiche Kontaminationsquellen und Vorkommen der CF-pathogenen fakultativen Anaerobier bislang bekannt. So konnten die verschiedensten Keime in der Umwelt nachgewiesen werden, mit denen die CF-Patienten im Laufe ihres Lebens unweigerlich in Kontakt kommen. Es konnten verschiedene Bakterien auf Nahrungsmitteln nachgewiesen werden, wie zum Beispiel der CF-pathogene Keim *P. aeruginosa* auf Salaten, Tomaten und Gurken und Clostridien auf Schinken. Auch durch Körperkontakt zu Gesunden oder anderen CF-Patienten kann eine Infektion oder Kontamination zustande kommen. So ist es möglich, dass sich die Kinder bereits im Säuglings- oder Kleinkindalter durch den Kontakt mit anderen CF-Patienten in Ambulanzen oder auf Krankenhausstationen mit *P. aeruginosa* infizieren, welche dort vermehrt in sanitären Anlagen oder in der Raumluft nachweisbar waren. Auch Abszesse in der Mundhöhle, Plaque an den Zähnen oder Sinusitiden stellen eine mögliche Kontaminationsquelle dar. Es ist bisher jedoch noch unklar, wo die mögliche Kontaminationsquelle der Lunge mit obligaten Anaerobiern zu finden ist. Obligat anaerobe Bakterien gehören zu Standardbakterienflora des Oropharynx und sind dort sowohl bei gesunden als auch bei erkrankten Patienten nachzuweisen.

Zur Zeit besteht keine Heilung für CF. Es ist nur möglich, die Erkrankung symptomatisch zu behandeln. So konnte die durchschnittliche Lebenserwartung der

CF-Patienten in den letzten 70 Jahren deutlich gesteigert werden. Starben 1940 die Erkrankten noch vor ihrem ersten Lebensjahr, liegt die Lebenserwartung heutzutage bei durchschnittlich über 40 Jahren. Dies liegt vor allem an der positiven Auswirkung der antibiotischen Therapie gegen die fakultativen Anaerobier. Jedoch besteht somit die Gefahr steigender Resistenzen.

Von diesem Hintergrund ausgehend, wurde in dieser Studie untersucht, ob der parodontale Sulkus eine mögliche Kontaminationsquelle mit obligat anaeroben Bakterien bereits im Kindesalter darstellt. Des Weiteren wurde die Empfindlichkeit gleicher Paare obligater Anaerobier im Sputum und in den Zahntaschen gegenüber ausgewählten Antibiotika untersucht.

An dieser Studie nahmen insgesamt 40 Kinder teil, 20 an CF erkrankte und 20 gesunde Kinder. Bei allen Kindern wurde eine eingehende zahnärztliche Untersuchung durchgeführt. Die 2 tiefsten Zahntaschen wurden nach Sondierung mit einer Parodontalsonde zur Probenentnahme ausgewählt. Diese erfolgte im Anschluss ohne vorherige desinfizierende Maßnahmen des Mundraumes mit einer sterilen Papierspitze. Somit konnte nach der Analyse der Keime die Kolonisation der parodontalen Sulki aller Patienten, CF und gesund, miteinander verglichen werden. 14 der 20 CF-Kinder expektorierten zusätzlich nach der parodontalen Probenentnahme Sputum, um somit die Keimbesiedelung von Sputum und Zahntasche vergleichen zu können. Bei einigen Probanden war auf Grund des Alters oder der Non-Compliance keine Sputumabgabe möglich. Die Proben wurden nach der Entnahme anaerob und aerob inkubiert, anschließend auf ausgewählten Nährmedien mikrobiologisch kultiviert, selektiert und abschließend biochemisch identifiziert.

Es konnte bei allen Studienteilnehmern in etwa die gleiche Keimbesiedelung nachgewiesen werden. So war *Streptococcus spp.* bei allen Untersuchten der vorherrschende fakultativ anaerobe Keim in den Zahntaschen. Auch wiesen alle Probanden obligate Anaerobier in ihren Zahntaschen auf. Hier waren *Staphylococcus spp.* und *Peptostreptococcus spp.* die vorherrschenden Bakterienarten. Dass beide Gruppen die gleichen Keime aufwiesen zeigt, dass kein relevanter Unterschied zwischen der Keimbesiedelung der parodontalen Sulki von CF- und gesunden Kindern besteht. Auch besteht kein offensichtlicher Zusammenhang zwischen dem Vorkommen

von fakultativ und obligat anaeroben Bakterien und der Mundgesundheit der untersuchten Kinder.

So konnten in den Sputumproben der CF-Kinder sowohl fakultative als auch obligat anaerobe Bakterien identifiziert werden. Alle 14 Probanden wiesen eine Keimbesiedelung mit fakultativen Anaerobiern auf, wobei bei 3 der 14 Kinder eine Infektion mit *S. aureus* und bei einem Probanden eine *P. aeruginosa*-Infektion nachgewiesen werden konnte. Diese beiden Keime waren nur in den Sputumproben, jedoch nicht in denen der parodontalen Sulki zu finden. Der am häufigsten nachzuweisenden fakultative Anaerobier im Sputum der Patienten war *R. dentocariosa*. Bei 12 der 14 CF-Kinder konnten obligate Anaerobier im Sputum nachgewiesen werden. Der hier vorherrschende Keim war *S. saccharolyticus*. Bei 10 der CF-Patienten konnten insgesamt 11 identische Keim-Paare obligat anaerob wachsender Bakterien in Sputum und Zahntasche nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich 7 mal um *S. saccharolyticus* sowie *Veilonella spp.*, *C. hastiforme*, *Ps. anaerobius* und *Str. constellatus*. Diese Tatsache spricht dafür, dass es einen Zusammenhang zwischen Zahntasche und Sputum geben kann.

Vor dem Hintergrund, dass der parodontale Sulkus eine mögliche Kontaminationsquelle für die Pneumonie bei CF-Patienten darstellt, wurden die 15 identischen Keim-Paare einer Resistenztestung auf 7 unterschiedliche Antibiotika der CF-Therapie unterzogen. Azithromycin und Colistin sind Medikamente zur Standard- und Erhaltungstherapie bei der Behandlung von CF. Piperacillin/Tazobaktam, Meropenem und Ceftazidim sind die Antibiotika der Wahl bei akuten Exazerbationen. Metronidazol und Clindamycin werden in anderen Gebieten der Medizin gegen obligate Anaerobier eingesetzt, zum Beispiel bei oralen Abszessen, jedoch nicht in der Therapie von CF. So ergaben sich bei den durchgeführten Resistenzbestimmungen hohe Empfindlichkeiten bei Clindamycin (3,7% resistente Stämme), Meropenem (14,8%), Colistin (22,2%) sowie Azithromycin und Metronidazol (je 29,6%). Jedoch wies ein hoher Prozentsatz der Stämme eine geringe Empfindlichkeit gegenüber Piperacillin/Tazobaktam (44,4%) und Ceftazidim (59,3%) auf. Der vorherrschende Keim in Zahntasche und Sputum, *S. saccharolyticus*, zeigte sich resistent gegenüber Ceftazidim und Piperacillin/Tazobaktam, die Antibiotika, welche bei akuten Exazerbationen eingesetzt werden. Alle Keime wiesen jedoch eine hohe Sensibilität gegenüber Clindamycin auf.

Der Nachweis gleicher Bakterien zur selben Zeit der Probenentnahme von 7 der 14 Patienten, die Sputum expektorieren konnten (50%), deutet auf eine mögliche Interaktion beider untersuchter Kompartimente hin. Jedoch konnte auch in dieser Studie der Nachweis der Kontamination und des Kontaminationsweges nicht erbracht werden. Es besteht die Möglichkeit der Lungenkontamination durch Aspiration der Keime bereits im frühen Kindesalter. Dafür spricht die gleiche Keimbesiedelung der parodontalen Sulki von CF- und gesunden Kindern. Bei den Gesunden löst die Aspiration dieser Bakterien jedoch keine Pneumonie aus, da die Mukusschicht auf dem Lungenepithel nicht hypoxisch ist und abtransportiert wird. Es ist aber auch denkbar, dass die Lunge noch vor dem Durchbruch des ersten Zahnes mit ca. 6 Monaten kontaminiert wird. Somit besteht die Möglichkeit, dass die Zahntasche nach dem Zahndurchbruch als Reservoir dient und für Reinfektionen der Lunge verantwortlich sein könnte.

Die Antibiose gegen die fakultativ anaeroben Bakterien, welche als Standardtherapie zur Behandlung von CF eingesetzt wird, ermöglicht den Patienten eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität und Lebensdauer. Des Weiteren wäre es denkbar, bei akuten Exazerbationen oder deren erfolgloser Behandlung mit den gewohnten Antibiotika gegen die fakultativen Anaerobier eine Therapie gegen obligate Anaerobier anzustreben, zum Beispiel mit Clindamycin. Vielleicht wäre somit eine weitere Verbesserung der Lebensdauer und -qualität der CF-Patienten zu erreichen.

7. Literaturverzeichnis

Aanaes K, Rickelt LF, Johansen HK, von Buchwald J, Pressler T, Høiby N, Jensen PØ (2011) Decreased mucosal oxygen tension in the maxillary sinuses in patients with cystic fibrosis. *J Cystic Fibros* 10: 114-120.

Bjarnsholt T, Jensen PO, Fiandaca MJ, Pedersen J, Hansen CR, Andersen CB, Pressler T, Givskov M, Høiby N (2009) *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in the Respiratory Tract of Cystic Fibrosis Patients. *Pediatric Pulmonology* 44:547-558.

Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH (2005) Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol* 45: 191-199.

Bragonzi A, Worlitzsch D, Pier GB, Timpert P, Ulrich M, Hentzer M, Andersen JB, Givskov M, Conese M, Döring G. (2005) Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* expresses alginate in the lungs of patients with cystic fibrosis and in a mouse model. *J Infect Dis* 192: 410-419.

Brook I (2006) Microbiology of intercranial abscesses associated with sinusitis of odontogenic origin. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 115(12):917-920.

Caldas RR, Boisramé S. (2015) Upper aero-digestive contamination by *Pseudomonas aeruginosa* and implications in Cystic Fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 14: 6-15.

Caverly L, Zhao J, LiPuma JJ (2015) Cystic fibrosis lung microbiome: Opportunities to reconsider management of airway infection. *Pediatr Pulmonol* 50: 31-38.

Carroll TP, Greene CM, Taggart CC, McElvaney NG, O'Neill SJ (2005) Interleukin-1, neutrophil elastase, and lipopolysaccharide: key pro-inflammatory stimuli regulating inflammation in cystic fibrosis. *Curr Respir Med Rev* 39: 452-456.

Ciofu O, Johansen HK, Aanaes K, Wassermann T, Alhede M, von Buchwald C, Høiby N (2013) *P. aeruginosa* in the paranasal sinuses and transplanted lungs have similar adaptive mutations as isolates from chronically infected CF lungs. *J Cystic Fibros* 12: 729-736.

Collins FS (1992) Cystic Fibrosis: Molecular Biology and Therapeutic Implications. Science 256.5058 : 774.

Cystic Fibrosis Foundation (2009) Cystic Fibrosis Foundation patient registry 2008 annual report. Bethesda, Maryland. Cystic Fibrosis Foundation, <http://www.cff.org>

<http://www.cff.org/UploadedFiles/research/ClinicalResearch/PatientRegistryReport/2012-CFF-Patient-Registry.pdf>

Deschacht P, Schelstraete P, van Simay L, Vanderkercken M, Raman A, Mahieu L, van Daele S, de Baets F, Vaneechoutte M (2013) Is the Improvement of CF Patients, Hospitalized for Pulmonary Exacerbation, Correlated to a Decrease in Bacterial Load PlosOne 8: e79010.

Döring G, Ulrich M, Müller W, Bitzer J, Schmidt-Koenig L, Grupp H, Wolz C, Stern M, Botzenhart (1991) Generation of Pseudomonas aeruginosa aerosols during handwashing from contaminated sink drains, transmission to hands of hospital personnel, and its prevention by use of a new heating device. Zbl Hyg 191: 494-505.

Döring G, Høiby N (2004) For the Consensus Study Group: Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. J Cystic Fibros 3: 67-91.

Döring G, Flume P, Heijerman H, Elborn JS (2012) Consensus Study Group. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies. J Cyst Fibros. 11(6):461-479.

Field TR, White A, Elborn JS, Tunney MM (2005) Effect of oxygen limitation on the in vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa grown planktonically and as biofilms. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 24: 577-587.

Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (1992) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. BI-Wiss.-Verlag, Mannheim/Leipzig/Wien/Zürich (6. Auflage), S. 705.

Fodor AA, Klem ER, Gilpin DF, Elborn JS, Boucher RC, Tunney MM, Wolfgang MC (2012) The Adult Cystic Fibrosis Airway Microbiota Is Stable over Time and Infection Type, and Highly Resilient to Antibiotic Treatment of Exacerbations. Plos One 7: e45001.

Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW (2003) Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 918-951.

Goldstein W, Döring G (1986) Lysosomal enzymes from polymorphonuclear leukocytes and proteinase inhibitors in patients with cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis.* 134:49–56.

Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa ELR, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ (2005) *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol* 20: 211-215.

Govan JRW, Nelson JW (1993) Microbiology of cystic fibrosis lung infections: themes and issues. *J Royal Soc Med* 86 (Suppl. 20): 11-8.

Govan JRW, Deretic V (1996) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 60: 539-74.

Heirali A, McKeon S, Purighalla S, Storey DG, Rossi L, Costilhes G, Drews SJ, Rabin HR, Surette MG, Parkins MD (2016) Assessment of the microbial constituents of the home environment of individuals with cystic fibrosis (CF) and their association with lower airways infection. *PLoS One* 11(2): e0148534.

Hellwig E, Klimek J, Attin T (2009) Einführung in die Zahnheilkunde, Prüfungswissen Kariologie, Endodontologie und Parodontologie. 5. Überarbeitete und erweiterte Auflage. Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln, S. 435-446.

Hingst V (1989) Die Bedeutung der Kontamination von Zahnpflegeartikeln. Ergebnisse einer Feldstudie. The importance of contaminated dental care commodities. Results of a field research. *Zbl Bakt Hyg B* 187: 337-364.

Huse A (2015) Der parodontale Sulkus als mögliche Infektionsquelle der chronischen Lungeninfektion bei Patienten mit Cystischer Fibrose. Halle, Univ., Medizinische Fakultät, Diss., 2014.

Jones AM, Govan JRW, Doherty CJ, Dodd ME, Isalska BJ, Stanbridge TN, Webb AK (2001) Spread of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis clinic. *Lancet* 358: 557-558.

Jones AM, Govan JRW, Doherty CJ, Dodd ME, Isalska BJ, Stanbridge TN, Webb AK (2003) Identification of airborne dissemination of epidemic multiresistant Strains of *Pseudomonas aeruginosa* at a CF-centre during a cross infection outbreak. *Thorax* 58:525-527.

Kazmirova AA, Volosnikov DK, Bakhareva LI, Kandelova EN (2007) Microbiocenosis of stomach in patients with chronic gastritis. *Zh Mikrobiol (Moscow)* 2:71-75.

Kerem BS, Rommens JM, Buchannan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245: 1073-1080.

Koch C, Høiby N (1993) Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet*. 24;341(8852):1065-9.

Kolpen M, Hansen CR, Bjarnsholt T, Moser C, Christensen LD, van Gennip M, Ciofu O, Mandsberg L, Kharazmi A, Döring G, Givskov M, Høiby N, Jensen PØ (2010) Polymorphonuclear leukocytes consume oxygen in sputum from chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in cystic fibrosis. *Thorax* 65: 57-62.

Kolpen M, Bjarnsholt T, Moser C, Hansen CR, Rickelt LF, Kukl M, Hempel C, Pressler T, Høiby N, Jensen PO (2014) Nitric oxide production by polymorphonuclear leucocytes in infected cystic fibrosis sputum consumes oxygen. *Clin Exp Immunol* 177: 310-319.

Kolpen M, Kuhl M, Bjarnsholt T, Moser C, Hansen CR, Liengaard L, Kharazmi A, Pressler T, Høiby N, Jensen PO (2014) Nitrous Oxide Production in Sputum from Cystic Fibrosis Patients with Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection. *Plos One* 9: e84353.

Kolpen M, Mousavi N, Sams T, Bjarnsholt T, Ciofu O, Moser C, Kühl M, Høiby N, Jensen PO (2015) Reinforcement of the bactericidal effect of ciprofloxacin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm by hyperbaric oxygen treatment. *Int J Antimicrob Agents* DOI: 10.1016/j.jantimicag.2015.12.005.

Komiyama K, Tynan JJ, Habbick BF, Duncan DE, Liepert DJ (1985) *Pseudomonas aeruginosa* in the oral cavity and sputum of patients with cystic fibrosis. *Oral Surg Oral med Oral Pathol* 59: 590-594.

Lee Y, Straffon LH, Welch KB, Loesche WJ (2006) The Transmission of Anaerobic Periodontopathic Organisms. *J Dent Res* 2006; 85: 530-535.

LiPuma JJ (2010) The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 23: 299-323.

Loesche WJ, Syed SA, Morrison EC, Kerry GA, Higgins T, Stoll J (1984) Metronidazole in Periodontitis: I. Clinical and Bacteriological Results after 15 to 30 Weeks *Journal of Periodontology* June 1984, Vol. 55, No. 6: 325-335.

Marteyn B, Scorza FB, Sansonetti PJ, Tang C (2011) Breathing life into pathogens: the influence of oxygen on bacterial virulence and host responses in the gastrointestinal tract. *Cell Microbiol* 13: 171-176.

Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzky JT, Davis CW, Boucher RC (1998) Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 95:1005-1015.

Park MK, Myers RA, Marzella L (1992) Oxygen tensions and infections: modulation of microbial growth, activity of antimicrobial agents, and immunologic responses. *Clin Infect Dis* 14: 720-740.

Pickett A (2008) On the discovery of *Bacillus botulinus*. *The Botulinum J.*, 2008 Vol.1, No.1, pp.5 – 6.

Ratjen F, Döring G (2003) Cystic fibrosis. *The Lancet* 361: 681-689.

Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. *Science* 245: 1066-1073.

Riordan T (2007) Human infection with fusobacterium necrophorum (necrobacillosis), with a focus on Lemièrre's syndrome. Clin Microbiol Rev 20(4): 622-659.

Rogers GB, Carroll MP, Serisier DJ, Hockey PM, Jones G, Bruce KD (2004) Characterization of bacterial community diversity in cystic fibrosis lung infections by use of 16S ribosomal DNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. J Clin Microbiol 42: 5176-5183.

Rogers GB, Hoffman LR, Doering G (2011) Novel concepts in evaluating antimicrobial therapy for bacterial lung infections in patients with cystic fibrosis. J Cyst Fibros 10: 387-400.

Rogers GB, Stressmann FA, Walker AW, Carroll MP, Bruce KD (2010) Lung infections in cystic fibrosis: deriving clinical insight from microbial complexity. Exp Rev Mol Diagn 10: 187-196.

Rogers GB, Cuthbertson L, Hoffman LR, Wing PA, Pope C, Hooftman DA, Lilley AK, Oliver A, Carroll MP, Bruce KD, van der Gast CJ (2013) Reducing bias in bacterial community analysis of lower respiratory infections. ISME J. Apr;7(4):697-706.

Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui LC, Collins FS (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. Science 245: 1059-1065.

Schmidt A, Hammerbacher AS, Bastian M, Nieken KJ, Klockgether J, Merighi M, Lapouge K, Poschgan C, Kölle J, Acharya KR, Ulrich M, Tümmler B, Unden G, Kaever V, Lory S, Haas D, Schwarz S, Döring G (2016) Oxygen-dependent regulation of c-di-GMP synthesis by SadC controls alginate production in Pseudomonas aeruginosa. Environmental Microbiology accepted article.

Sibley CD, Sibley KA, Leong TA, Grinwis ME, Parkins MD, Rabin HR, Surette MG (2010) The Streptococcus milleri population of a cystic fibrosis clinic reveals patient specificity and intraspecies Diversity. J Clin Microbiol 48(7): 2592-2594.

Sonsale PD, Philipson MR, Bowskill J (2004) Septic arthritis of the knee due to *Fusobacterium necrophorum*. *J Clin Microbiol* 42(7): 3369-3370.

Tarran R, Button B, Pichler M, Paradiso AM, Ribeiro CM, Lazarowski ER, Zhang L, Collins PL, Pickles RJ, Fredberg JJ, Boucher RC (2005) Normal and cystic fibrosis airway surface liquid homeostasis. The effects of phasic shear stress and viral infections. *J Biol Chem* 280:35751-35759.

Tsai WC, Chang LK, Lin TC (2004) *Streptococcus constellatus* causing myocardial abscess complicated by cerebritis. *J Microbiol Immunol Infect* 37: 63-66.

Trinkwasserverordnung

[http://www.bgbl.de/xaver/bgbl/start.xav?startbk=Bundesanzeiger_BGBl&jumpTo=bgbl116s0459.pdf#__bgbl__%2F%2F*\[%40attr_id%3D%27bgbl116s0459.pdf%27\]__1461444613675](http://www.bgbl.de/xaver/bgbl/start.xav?startbk=Bundesanzeiger_BGBl&jumpTo=bgbl116s0459.pdf#__bgbl__%2F%2F*[%40attr_id%3D%27bgbl116s0459.pdf%27]__1461444613675)

Fassung 16.03.2016

Tunney MM, Field TR, Moriarty TF, Patrick S, Doering G, Muhlebach MS, Wolfgang M, Boucher R, Gilpin DF, McDowell A, Elborn SJ (2008) Detection of Anaerobic Bacteria in High Numbers in Sputum from Patients with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 995-1001.

Tunney MM, Einarsson GG, Wei L, Drain M, Klem ER, Cardwell C, Ennis M, Boucher RC, Wolfgang MC, Elborn JS (2013) The Lung Microbiota and Bacterial Abundance in Patients With Bronchiectasis When Clinically Stable and During Exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* online first.

Valerius NH, Koch C, Høiby N (1991) Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in cystic fibrosis by early treatment. *Lancet*; 338: 725-726.

Van Ermengem E (1897) Über einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus. *Medical Microbiology and Immunology*. 26, Nr. 1, S. 1–56.

Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ (2002) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic function. *J Cyst Fibros* 1:13-29.

Van Winkelhoff AJ, Rodenburg JP, Goené RJ, Abbas F, Winkel EG, de Graaff J (1989) Metronidazole plus amoxicillin in the treatment of Actinobacillus associated periodontitis. Journal of Clinical Perodontology, Vol. 16(2): 128-131.

van Winkelhoff AJ, Tjihof CJ, de Graaff J (1992) Microbiological and Clinical Results of Metronidazole Plus Amoxicillin Therapy in Actinobacillus actinomycetemcomitans-Associated Periodontitis, Journal of Periodontology, Vol. 63(1): 52-57.

Westblom TU, Gorse GJ, Milligan TW, Schindzielorz AH (1990) Anaerobic endocarditis caused by Staphylococcus saccharolyticus. J Clin Microbiol 28(12): 2818-2819.

Whiley RA, Beighton D, Winstanley TG, Fraser HY, Hardie JM (1992) Streptococcus intermedius, Streptococcus constellatus, and Streptococcus anginosus (the streptococcus milleri group): Association with different body sites and clinical infections. J Clin Microbiol 30(1): 243-244.

Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, Birrer P, Bellon G, Berger J, Weiss T, Bozenhart K, Yankaskas JR, Randell S, Boucher RC, Döring G (2002) Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. J Clin Invest 109: 317-325.

Worlitzsch D, Lautrou S, Ulrich M, Döring G (2006) *Pseudomonas aeruginosa* in the oral cavity: implications for lung infection in patients with Cystic Fibrosis. 29th European Cystic Fibrosis Conference, Copenhagen, 15.-18.6.2006. Published in J Cyst Fibros 5 (suppl. 1):S16.

Worlitzsch D, Rintelen C, Böhm K, Wollschläger B, Merkel N, Borneff-Lipp M, Döring G (2009) Antibiotic-resistant obligate anaerobes during exacerbations of cystic fibrosis patients. Clinical Microbiology and Infection, 15: 454-460.

Zemanick ET, Sagel SD, Harris JK (2011) The airway microbiome in cystic fibrosis and implications for treatment. Curr Opin Pediatr 23: 319-324.

Zielenski J, Bozon D, Kerem B, Markiewicz D, Durie P, Rommens JM, Tsui LC (1991) Identification of mutations in exons 1 through 8 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. Genomics 10(1):229-35.

8. Thesen

1. Die Cystische Fibrose (CF), auch Mukoviszidose genannt, ist die häufigste autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung der kaukasischen Bevölkerung. Die Patienten entwickeln im Laufe der Erkrankung chronisch-bakterielle Lungeninfektionen, in deren Folge die Patienten oftmals frühzeitig versterben.
2. Die vielfältigen Kontaminationsquellen der Lunge mit fakultativ anaeroben Bakterien sind bereits bekannt, jedoch ist bis jetzt ungeklärt, wie es zur Kontamination mit obligat anaeroben Bakterien kommt.
3. In dieser Studie wurden die parodontalen Sulki (Zahntaschen) von Kindern mit CF und einer gesunden Kontrollgruppe mikrobiell untersucht und miteinander verglichen. Ebenso wurde das Sputum der CF-Kinder mit der Keimbesiedlung der Zahntaschen verglichen. Zusätzlich wurden Paare gleicher Bakterien aus Sputum und Zahntasche auf ihr Resistenzverhalten hin untersucht.
4. Obligat anaerobe Bakterien wurden in fast allen Zahntaschen und Sputumproben von CF-Kindern und der gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen.
5. Es konnte kein Unterschied zwischen der Keimbesiedlung der parodontalen Sulki von CF-Kindern und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden.
6. In allen Sputumproben konnten fakultativ und obligat anaerobe Bakterien in hoher Keimzahl nachgewiesen werden.
7. Bei allen CF-Kindern konnten obligate Anaerobier im Sputum nachgewiesen werden.
8. Bei 10 der CF-Patienten konnten insgesamt 11 identische Keim-Paare obligat anaerob wachsender Bakterien in Sputum und Zahntasche nachgewiesen werden.

9. Diese Paare wiesen sehr häufig die gleichen Resistenzmuster auf, was somit auf einen möglichen Zusammenhang der Keimbesiedlung der beiden Kompartimente hinweist.

9. Anhang

Votum der Ethikkommission 2009



MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT
HALLE-WITTENBERG



Medizinische Fakultät
Ethik-Kommission

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 06097 Halle (Saale)

Herrn Oberarzt Dr. D. Worlitzsch
Institut für Hygiene
Universitätsklinikum Halle (Saale)
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Magdeburger Str. 24
06097 Halle

Ihre Zeichen

Ihr Schreiben vom

Unsere Zeichen

Datum

hm-bu

03.09.2009

Postanschrift:
06097 Halle (Saale)

Einfluss von Antibiotika auf die Resistenzsituation von Bakterien im parodontalen Sulcus von Patienten mit Cystischer Fibrose

Hausanschrift:
Magdeburger Straße 8
06112 Halle (Saale)

Sehr geehrter Herr Dr. Worlitzsch,

mit Schreiben vom 26.08.2009 zur oben genannten Studie haben Sie zu unserem Votum vom 23.07.2009 Stellung genommen sowie folgende Unterlagen übersandt:

Geschäftsstelle:
Tel 0345 557-4476
Fax 0345 557-4477
E-Mail ethik-kommission@medizin.uni-halle.de
Internet: www.medizin.uni-halle.de/

- Antrag an die Ethik-Kommission mit Darstellung des Forschungsvorhabens vom 26.08.2009,
- Kurzzusammenfassung vom 19.08.2009,
- Patienteninformation vom 19.08.2009,
- Einwilligungserklärung vom 19.08.2009,
- Probandeninformation vom 19.08.2009,
- Einwilligungserklärung vom 19.08.2009.

Bankverbindung:
Deutsche Bundesbank,
Filiale Magdeburg
Konto: 80001530
BLZ: 81000000

IBAN:
DE3781000000080001530
BIC:
MARKDEF1810

Die Auflagen unseres Votums sind erfüllt. Ich kann Ihnen bestätigen, dass seitens der Ethik-Kommission keine Bedenken gegen die Durchführung der Studie bestehen.

Steuernummer: 111/144/02550
(Finanzamt Halle-Nord)

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. H. M. Behre
Vorsitzender der Ethik-Kommission

Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg arbeitet auf der Grundlage deutschen Rechts sowie in Anlehnung an die ICH-GCP-Richtlinien.

Die Ethik-Kommission weist darauf hin, dass die ethische und juristische Verantwortung für die Durchführung des Vorhabens unabhängig vom Beratungsergebnis bei den durchführenden Ärzten und Wissenschaftlern verbleibt.

Nachweise fakultativ und obligat anaerober Bakterien

Tabelle 1A: Anzahl fakultativ anaerober Bakterien im parodontalen Sulkus von Kindern mit CF (n= 44 Zahntaschen) und der gesunden Kontrollgruppe (n=40 Zahntaschen) (in %)

Genus	Spezies	CF-Patienten	Kontrollgruppe
<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	1 (2,3)	6 (15)
	<i>bovis</i>	3 (6,8)	5 (12,5)
	<i>constellatus</i>		5 (12,5)
	<i>crista</i>	3 (6,8)	2 (5)
	<i>intermedius</i>	10 (22,7)	13 (32,5)
	<i>mitis</i>	1 (2,3)	3 (7,5)
	<i>mucolagenosus</i>	3 (6,8)	1 (2,5)
	<i>oralis</i>	9 (20,5)	5 (12,5)
	<i>parasanguis</i>	25 (56,8)	21 (52,5)
	<i>pneumoniae</i>	26 (59,1)	18 (45)
	<i>salivarius</i>	6 (13,6)	5 (12,5)
	<i>sanguis</i>	19 (43,2)	13 (32,5)
	<i>vestibularis</i>	11 (25)	11 (27,5)
	<i>uberis</i>		6 (15,5)
	<i>equii ssp</i>		3 (7,5)
	<i>gordonii</i>		5 (12,5)
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	7 (15,9)	6 (15)
	<i>epidermidis</i>		1 (2,5)
	<i>saprophyticus</i>	2 (4,5)	
<i>Enterobacterium</i>	<i>cloacae</i>		4 (10)
<i>Leuconostoc</i>	<i>citreum</i>	1 (2,3)	
	<i>lactis</i>	1 (2,3)	3 (7,5)
	<i>lartis</i>	1 (2,3)	
<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	5 (11,4)	7 (17,5)
	<i>lylae</i>		1 (2,5)

	<i>sedentarius</i>		
<i>Gemella</i>	<i>haemolysans</i>	1 (2,3)	2 (5)
	<i>morbilorum</i>		2 (5)
<i>Stomatococcus</i>	<i>mucilaginosus</i>		
<i>Corynebacterium</i>	<i>aquaticus</i>	5 (11,4)	1 (2,5)
	<i>bovis</i>	3 (6,8)	1 (2,5)
	<i>jeikeium</i>	1 (2,3)	
	<i>genitalium</i>		6 (15)
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>		
<i>Aeromonas</i>	<i>hydrophilia</i>		1 (2,5)
<i>Pedunculus</i>	<i>pentosacceus</i>	8 (18,2)	15 (37,5)
<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	10 (22,7)	1 (2,5)
<i>Rhodococcus</i>	<i>equi</i>	7 (15,9)	2 (5)
<i>Bacillus</i>	<i>sphaericus</i>	1 (2,3)	
	<i>subtilis</i>		1 (2,5)
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>		1 (2,5)
Gesamt		170	177

Tabelle 2A: Patienten (n=14) mit obligaten
Anerobiern im Sputum

Genus	Spezies	n	%
		14	
<i>Streptococcus</i>	<i>constellatus</i>	1	7,1
<i>Staphylococcus</i>	<i>saccharolyticus</i>	8	57,1
<i>Ps.</i>	<i>anaerobius</i>	4	28,6
	<i>prevotii</i>	4	28,6
	<i>hastiforme</i>	1	7,1
<i>Wolinella</i>	<i>sp.</i>	1	7,1
<i>Veillonella</i>	<i>spp.</i>	1	7,1
<i>Bacterioidis</i>	<i>stercoris</i>	1	7,1
	gesamt	21	

Tabelle 3A: Anzahl obligat anaerober Bakterien im parodontalen Sulkus von Kindern mit CF (n= 44 Zahntaschen) und der gesunden Kontrollgruppe (n=40 Zahntaschen) (in %)

Genus	Spezies	CF-Patienten	Kontrollgruppe
<i>Streptococcus</i>	<i>constellatus</i>	2 (4,5)	
<i>Staphylococcus</i>	<i>saccharolyticus</i>	30 (68,2)	36 (90,0)
<i>Ps.</i>	<i>anaerobius</i>	12 (27,3)	5 (12,5)
	<i>prevotii</i>	11 (25,0)	14 (35,0)
	<i>asaccharolyticus</i>	7 (15,9)	
<i>Clostridium</i>	<i>difficile</i>	5 (11,4)	1 (2,5)
	<i>hastiforme</i>	2 (4,5)	
<i>Veillonella</i>	<i>spp.</i>	5 (11,4)	4 (10,0)
<i>L.</i>	<i>acidophilus</i>		1 (2,5)
<i>F.</i>	<i>necrophorum</i>	2 (4,5)	
<i>Dentolyticus</i>			3 (7,5)
<i>Bifidobacterium</i>	<i>sp.</i>		1 (2,5)
<i>Capnocytophaga</i>	<i>sp.</i>	1 (2,3)	
	gesamt	77	65

Tabelle 4A: Obligate Anaerobier im Sputum (n=34) (in %)

Genus	Spezies	n	%
		34	
<i>Streptococcus</i>	<i>constellatus</i>	1	2,9
<i>Staphylococcus</i>	<i>saccharolyticus</i>	15	44,1
<i>Ps.</i>	<i>anaerobius</i>	5	14,7
	<i>prevotii</i>	9	26,5
	<i>hastiforme</i>	1	2,9
<i>Wolinella</i>	<i>sp.</i>	1	2,9
<i>Veillonella</i>	<i>spp.</i>	1	2,9
<i>Bacteroidis</i>	<i>stercoris</i>	1	2,9
	gesamt	34	

Tabelle 5A: Patienten mit fakultativ anaeroben Bakterien im Sputum (n=204)

Genus	Spezies	n	%
		204	
<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	8	3,9
	<i>bovis</i>	1	0,5
	<i>constellatus</i>	5	2,5
	<i>intermedius</i>	10	4,9
	<i>oralis</i>	14	6,9
	<i>parasanguis</i>	13	6,4
	<i>pneumoniae</i>	14	6,9
	<i>salivarius</i>	6	2,9
	<i>sanguis</i>	34	16,7
	<i>vestibularis</i>	18	8,8
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	10	4,9
	<i>epidermidis</i>	2	1,0
	<i>saprophyticus</i>	1	0,5

<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	9	4,4
	<i>lylae</i>	1	0,5
	<i>sedentarius</i>	1	0,5
<i>Gemella</i>	<i>morbillorum</i>	1	0,5
<i>Stomatococcus</i>	<i>mucilaginosus</i>	4	2,0
<i>Corynebacterium</i>	<i>aquaticus</i>	5	2,5
	<i>bovis</i>	1	0,5
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	1	0,5
<i>Pedunculus</i>	<i>pentosacceus</i>	12	5,9
<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	28	13,7
<i>Rhodococcus</i>	<i>equi</i>	5	2,5
gesamt		204	

Tabelle 6A: Patienten mit fakultativen Anaerobiern im Sputum (pro Patient mit Sputum)

Genus	Spezies	n	%
		14	
<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	3	21,4
	<i>bovis</i>	1	7,1
	<i>constellatus</i>	4	28,6
	<i>intermedius</i>	6	42,9
	<i>oralis</i>	5	35,7
	<i>parasanguis</i>	6	42,9
	<i>pneumoniae</i>	7	50,0
	<i>salivarius</i>	4	28,6
	<i>sanguis</i>	7	50,0
	<i>vestibularis</i>	8	57,1
	<i>aureus</i>	4	28,6
	<i>epidermidis</i>	1	7,1
	<i>saprophyticus</i>	1	7,1

<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	3	21,4
<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	5	35,7
	<i>lylae</i>	1	7,1
	<i>sedentarius</i>	1	7,1
<i>Gemella</i>	<i>morbilorum</i>	1	7,1
<i>Stomatococcus</i>	<i>mucilaginosus</i>	3	21,4
<i>Corynebacterium</i>	<i>aquaticus</i>	3	21,4
	<i>bovis</i>	1	7,1
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	1	7,1
<i>Pedunculus</i>	<i>pentosacceus</i>	7	50,0
<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	11	78,6
<i>Rhodococcus</i>	<i>equi</i>	3	21,4
gesamt		94	

Tabelle 7A: Fakultative Anaerobier bei Kindern mit CF (Sputum- und Sulkusproben)

Genus	Spezies	n	%
		376	
<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	9	2,39
	<i>bovis</i>	4	1,06
	<i>constellatus</i>	5	1,33
	<i>crista</i>	3	0,80
	<i>intermedius</i>	20	5,32
	<i>mitis</i>	1	0,27
	<i>mucolaginosus</i>	3	0,80
	<i>oralis</i>	23	6,12
	<i>parasanguis</i>	38	10,11
	<i>pneumoniae</i>	40	10,64
	<i>salivarius</i>	12	3,19
	<i>sanguis</i>	53	14,10
	<i>vestibularis</i>	29	7,71

<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	17	4,52
	<i>epidermidis</i>	2	0,53
	<i>saprophyticus</i>	3	0,80
<i>Leuconostoc</i>	<i>citreum</i>	2	0,53
	<i>lactis</i>	1	0,27
	<i>lartis</i>	2	0,53
<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	14	3,72
	<i>lylae</i>	1	0,27
	<i>sedentarius</i>	1	0,27
<i>Gemella</i>	<i>haemolysans</i>	1	0,27
	<i>morbilorum</i>	1	0,27
<i>Stomatococcus</i>	<i>mucilaginosus</i>	4	1,06
<i>Corynebacterium</i>	<i>aquaticus</i>	10	2,66
	<i>bovis</i>	4	1,06
	<i>jeikeium</i>	1	0,27
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	1	0,27
<i>Pedunculus</i>	<i>pentosacceus</i>	20	5,32
<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	38	10,11
<i>Rhodococcus</i>	<i>equi</i>	12	3,19
<i>Bacillus</i>	<i>sphaericus</i>	1	0,27
	gesamt	376	

Tabelle 8A: Anzahl der Patienten mit obligat anaeroben Bakterien im parodontalen Sulkus von Kindern mit CF (n= 44 Zahntaschen) und der gesunden Kontrollgruppe (n=20) (in %)

Genus	Spezies	CF-Patienten	Kontrollgruppe
<i>Streptococcus</i>	<i>constellatus</i>	2 (10)	
<i>Staphylococcus</i>	<i>saccharolyticus</i>	17 (85)	19 (95)
<i>Ps.</i>	<i>anaerobius</i>	7 (35)	5 (25)
	<i>prevotii</i>	10 (50)	11 (55)
	<i>asaccharolyticus</i>	5 (25)	
<i>Clostridium</i>	<i>difficile</i>	4 (20)	1 (5)
	<i>hastiforme</i>	2 (10)	
<i>Veillonella</i>	<i>spp.</i>	4 (20)	4 (20)
<i>F.</i>	<i>necrophorum</i>	2 (10)	
<i>Dentolyticus</i>			3 (15)
<i>Bfidobacterium</i>	<i>sp.</i>		1 (5)
<i>Capnocytophaga</i>	<i>sp.</i>	1 (5)	
	gesamt	54	44

Tabelle 9A: Anzahl der Patienten mit obligat anaeroben Bakterien im parodontalen Sulkus (n=20) und im Sputum (n=14) von Kindern mit CF (in %)

Genus	Spezies	Sulkus (n=20)	Sputum (n=14)
<i>Streptococcus</i>	<i>constellatus</i>	2 (10)	1 (7,1)
<i>Staphylococcus</i>	<i>saccharolyticus</i>	17 (85)	8 (57,1)
<i>Ps.</i>	<i>anaerobius</i>	7 (35)	4 (28,6)
	<i>prevotii</i>	10 (50)	4 (28,6)
	<i>asaccharolyticus</i>	5 (25)	
<i>Clostridium</i>	<i>difficile</i>	4 (20)	
	<i>hastiforme</i>	2 (10)	1 (7,1)
<i>Veillonella</i>	<i>spp.</i>	4 (20)	1 (7,1)
<i>F.</i>	<i>ncerophorum</i>	2 (10)	
<i>Bacteroidis</i>	<i>stercoris</i>		1 (7,1)
<i>Capnocytophaga</i>	<i>sp.</i>	1 (5)	
	gesamt	54	21

Tabelle 10A: Anzahl obligat anaerober Bakterien im parodontalen Sulkus (n=57) und im Sputum (n=34) von Kindern mit CF (in %)

Genus	Spezies	Sputum	Sulkus
<i>Streptococcus</i>	<i>constellatus</i>	1 (2,9)	2 (3,5)
<i>Staphylococcus</i>	<i>saccharolyticus</i>	15 (44,1)	21 (36,8)
<i>Ps.</i>	<i>anaerobius</i>	5 (14,7)	11 (19,3)
	<i>prevotii</i>	9 (26,5)	6 (10,5)
	<i>asaccharolyticus</i>		7 (12,3)
<i>Clostridium</i>	<i>difficile</i>		4 (7,0)
	<i>hastiforme</i>	1 (2,9)	2 (3,5)
<i>Wolinella</i>	<i>sp.</i>	1 (2,9)	
<i>Veillonella</i>	<i>spp.</i>	1 (2,9)	3 (5,3)
<i>Capnocytophaga</i>	<i>sp.</i>		1 (1,8)
<i>Bacteroidis</i>	<i>stercoris</i>	1 (2,9)	
	gesamt	34	57

Tabelle 11A: Obligate Anaerobier bei Kindern mit CF (Sputum- und Sulkusproben)

Genus	Spezies	n	%
		111	
<i>Streptococcus</i>	<i>constellatus</i>	3	2,7
<i>Staphylococcus</i>	<i>saccharolyticus</i>	45	40,5
<i>Ps.</i>	<i>anaerobius</i>	17	15,3
	<i>prevotii</i>	21	18,9
	<i>asaccharolyticus</i>	6	5,4
<i>Clostridium</i>	<i>difficile</i>	5	4,5
	<i>hastiforme</i>	3	2,7
<i>Wolinella</i>	<i>sp.</i>	1	0,9
<i>Veillonella</i>	<i>spp.</i>	6	5,4
<i>F.</i>	<i>nerophorum</i>	2	1,8
<i>Bacteroidis</i>	<i>stercoris</i>	1	0,9
<i>Capnocytophaga</i>	<i>sp.</i>	1	0,9
	gesamt	111	

Tabelle 12A: Resistenzen gleicher Paare obligat anaerober Bakterien, die aus Einfrierkulturen gezüchtet werden konnten (□, n=15) gegenüber untersuchten Antibiotika; ■ sensibel, ■ intermediär, ■ resistent

ZT: Zahntasche; Sp.: Sputumprobe

TZP: Piperacillin/Tazobaktam, MTZ: Metronidazol, MRP: Meropenem, CD: Clindamycin, AZM: Azithromycin, CAZ: Ceftazidim, CS: Colistin

Stamm	Probe	TZP	MTZ	MRP	CD	AZM	CAZ	CS
S. <i>saccharolyticus</i>	ZT 1/19	0,064	2	0,012	0,047	2	256	0,09
	ZT 1/20	8	8	0,023	0,125	1,500	0,250	0,25
	ZT 1/21	0,064	1,5	0,008	0,016	0,064	0,094	0,04
	ZT 1/22	96	3	0,047	0,094	1,5	24	38
	ZT 1/23 Sp.	256	1	0,023	0,032	0,38	64	0,25
S. <i>saccharolyticus</i>	ZT 2/20	12	2	0,008	0,047	2	2	0,19
	ZT 2/21	16	1,5	0,012	0,032	1,5	256	0,19
	ZT 2/22	64	32	12	0,064	8	256	0,25
	ZT 2/23	256	12	0,380	0,047	1,5	192	0,25
	ZT 2/24 Sp.	64	256	6	0,064	8	256	0,25
S. <i>saccharolyticus</i>	ZT 3/24	16	2	0,008	0,125	3	4	0,25
	ZT 3/25 Sp.	Keine Anzucht möglich						
S. <i>saccharolyticus</i>	ZT 5/23	256	5	0,064	0,094	1,5	3	0,25
	ZT 5/24 Sp.	64	2	0,023	0,094	0,75	1,75	0,25
S. <i>saccharolyticus</i>	ZT 6/22	48	1,5	0,004	32	0,75	96	0,19
	ZT 6/23	32	12	0,257	0,094	1	24	0,38
	ZT 6/24 Sp.	Keine Anzucht möglich						

<i>Veilonella spp.</i>	ZT 8/15	256	3	0,750	0,5	256	96	0,25
	ZT 8/16							
	Sp.	256	6	0,094	0,75	256	48	0,09
<i>C. hastiforme</i>	ZT 10/20	0,094	1,5	0,016	0,38	0,19	1,5	0,38
	ZT 10/21							
	Sp.	6	256	0,006	0,047	1	0,38	256
<i>S. saccharolyticus</i>	ZT 17/18							
	Sp.	256	16	1	0,094	1,5	32	0,38
	ZT 17/19							
	Sp.	256	3	4	0,047	3	256	0,5
	ZT 17/20							
Sp.	0,094	0,19	0,008	0,016	0,125	0,094	0,06	
	ZT 17/21	16	3,5	0,094	0,064	5	256	0,38
<i>Ps. anaerobius</i>	ZT 18/23	Keine Anzucht möglich						
	Sp.	Keine Anzucht möglich						
	ZT 18/24	Keine Anzucht möglich						
	ZT 18/25	Keine Anzucht möglich						
<i>Strep. constellatus</i>	ZT 18/28							
	Sp.	1	256	52	0,5	0,38	256	256
	ZT 18/29	2	256	52	0,38	4	192	256
<i>S. saccharolyticus</i>	ZT 19/26	Keine Anzucht möglich						
	Sp.	Keine Anzucht möglich						
	ZT 19/27	12	2	0,008	0,064	24	6	0,25
	ZT 19/28	12	1,5	0,008	0,094	12	3,5	0,19

Tabelle 13 A: Quantifizierung der Sputumproben von Kindern mit CF

Sputumprobe	Gewicht [g]	fakultative Anaerobier [KBE/ml]	Obligate Anaerobier [KBE/ml]
CF 1	0,14	$1,30 \times 10^4$	$9,96 \times 10^5$
CF 2	0,49	$1,31 \times 10^4$	$1,14 \times 10^4$
CF 3	0,49	$3,29 \times 10^5$	$2,29 \times 10^5$
CF 4	0,17	$3,71 \times 10^5$	0
CF 5	0,29	$2,68 \times 10^6$	$3,42 \times 10^6$
CF 6	0,59	$4,95 \times 10^6$	$4,49 \times 10^6$
CF 8	0,21	$1,67 \times 10^4$	$9,16 \times 10^5$
CF 10	0,86	$1,84 \times 10^4$	$7,64 \times 10^5$
CF 13	0,23	$2,97 \times 10^5$	$3,03 \times 10^5$
CF 16	0,24	$2,12 \times 10^5$	$3,36 \times 10^5$
CF 17	0,36	$2,33 \times 10^6$	$3,35 \times 10^6$
Cf 18	0,8	$2,97 \times 10^6$	$3,71 \times 10^6$
CF 19	0,64	$3,30 \times 10^5$	$9,58 \times 10^4$
CF 20	0,22	$5,94 \times 10^4$	0

Tabelle 14A: Proben der CF-Kinder

Probe	Alter	Sputum	Gewicht in g
CF 1	16,0		0,14
CF 2	16,3		0,49
CF 3	11,8		0,49
CF 4	10,8		0,17
CF 5	5,3		0,29
CF 6	10,5		0,59
CF 7	2,8	kein Sputum	
CF 8	10,1		0,21
CF 9	12,0	Kein Sputum	
CF 10	13,3		0,86
CF 11	14,4	Kein Sputum	
CF 12	9,7	Kein Sputum	
CF 13	6,0		0,23
CF 14	4,3	Kein Sputum	
CF 15	1,4	Kein Sputum	
CF 16	7,6		0,24
CF 17	9,4		0,36
CF 18	12,3		0,8
CF 19	12,0		0,64
CF 20	7,1		0,22

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Zuname:	Franziska Schlosser	
Geburtsname:	Klenner	
Geburtsdatum und -ort:	24.09.1985, Sangerhausen	
Schulische Ausbildung:	1992 – 1996 Klostermansfeld	Grundschule
	1996 – 2005	Gottfried-August-Bürger-Gymnasium Benndorf
Schulabschluss:	2005	Abitur
Auslandsaufenthalt in den USA	08/2005 – 09/2006	Denver, Colorado
Hochschulstudium	10/2006 – 12/2012	Zahnmedizinstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abschluss:	11/2012	Zahnärztliche Prüfung, Staatsexamen
Berufsausübung:	2013- 2016	Vorbereitungsassistent in der Zahnarztpraxis, Halle/S.
	ab 2016	Angestellte Zahnärztin in der Zahnarztpraxis, Halle/S.

Franziska Schlosser

Halle/Saale, den 11.02.2017

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, Franziska Schlosser, geborene Klenner, geboren am 24.09.1985, an keiner in- oder ausländischen Fakultät ein Gesuch über die Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation eingereicht zu haben.

Halle, den 11.02.2017

Franziska Schlosser

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Franziska Schlosser, geborene Klenner, geboren am 24.09.1985, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe mich keiner anderen, als der von mir angegebenen Quellen und Hilfen bedient.

Halle, den 11.02.2017

Franziska Schlosser

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Allen beteiligten **CF-Kindern** der CF-Ambulanz der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und ihren Eltern für die Teilnahme an dieser Studie.

Allen **Kindern der Kontrollgruppe** und deren Eltern für die kooperative Zusammenarbeit.

Frau Prof. Dr. Marianne Borneff-Lipp, Direktorin des Institutes für Hygiene der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, die es mir ermöglicht hat, diese Arbeit in ihrem Institut beginnen zu können.

Herrn PD Dr. med. habil. Dieter Worlitzsch, Leiter der Stabsstelle Krankenhaushygiene der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, welcher es mir ermöglicht hat, diese Arbeit unter seine Leitung fertig zu stellen sowie für die hervorragende Zusammenarbeit, die an- und ausdauernde Hilfsbereitschaft und konstruktiven Diskussionsrunden in freundschaftlicher Arbeitsatmosphäre, welche einen großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. Dieter Körholz, ärztlicher Leiter der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin sowie dem Leiter der Ambulanz **Oberarzt Dr. med. Nick Merkel** für die hilfreiche und freundliche Zusammenarbeit.

Frau PD. Dr. Katrin Bekes, Oberärztin der Kinderzahnheilkunde der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg sowie den **Schwestern dieser Abteilung** für die gut Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Andreas Wienke, stellvertretender Direktor des Institutes für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Frau Nadine Wörfel, Frau Ina Feldmann, Frau Hinze sowie **Frau Koleczko**, technische Mitarbeiterinnen im Labor des Institutes für Hygiene der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die Hilfsbereitschaft und hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Meiner Chefin **Dr. Andrea Walther**, die es mir durch flexible Arbeitsbedingungen ermöglicht hat, Proben zu sammeln und zu verarbeiten. Ohne diese große Unterstützung wäre die termingebundene Laborarbeit kaum möglich gewesen.

Meinem **Mann Daniel**, der mich immer wieder angespornt hat, mir mit sehr ausdauerndem Rat und so mancher motivierender Tat zur Seite stand und mir über so manches kleinere und größere Tief hinweggeholfen hat.