

Aus dem Institut für Hygiene  
der medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktorin: Prof. Dr. med. habil. Marianne Borneff-Lipp)

Quantifikation von obligaten  
Anaerobiern im Sputum von Mukoviszidose-  
Patienten  
und Interaktion von obligaten Anaerobiern mit  
*Pseudomonas aeruginosa*

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
von Katharina Böhm  
geboren am 13.04.1983 in München

Gutachter:

1. Prof. Marianne Borneff-Lipp
2. Prof. Thomas Seufferlein
3. Prof. Gerhard Dockter (Homburg)

05.08.2010  
29.03.2011

## Referat

Obligat anaerobe Bakterien im Sputum von CF-Patienten (CF = zystische Fibrose, synonym: Mukoviszidose) wurden häufig als Kontamination aus dem Mund-Rachen-Raum betrachtet. Der Nachweis von anaeroben Bereichen im Mucus von CF-Patienten legte die Annahme nahe, dass neben den fakultativen Anaerobiern wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* auch obligate Anaerobier bei der Lungeninfektion von CF-Patienten eine Rolle spielen könnten. Die Herkunft von obligaten Anaerobiern aus dem Sputum von CF-Patienten ist bislang noch nicht bewiesen worden.

Die vorliegende Studie identifiziert mithilfe des RapID ANA II Systems und quantifiziert mittels Verdünnungsreihen obligate Anaerobier in Sputum von CF-Patienten. Sie beschäftigt sich mit dem Argument der oralen Kontamination durch Keimzahlvergleich von Rachenabstrichen und Sputumproben. Außerdem untersucht die vorliegende Studie einen möglichen Ansatz zur Pathogenität von obligaten Anaerobiern durch den Vergleich von Wachstumskurven von *Prevotella intermedia* und *P. aeruginosa* bei gemeinsamer Bebrütung und bei separater Bebrütung.

Bei fast allen Patienten (86,9%) konnten mindestens einmal obligate Anaerobier im Sputum identifiziert werden. Am häufigsten identifiziert wurden die obligaten Anaerobier *S. saccharolyticus* (29,6%), *Peptostreptococcus spp.* (13,9%), *Clostridium spp.* (10,4%), *Veillonella spp.* (9,6%) und *Actinomyces spp.* (8,7%). Es wurden in 79 Sputumproben hohe Keimzahlen bei den obligaten Anaerobiern ( $1,6 \times 10^7 \pm 3,1 \times 10^7$  KBE/ml) gezählt. Eine orale Kontamination konnte durch den Vergleich mit Keimzahlen von obligaten Anaerobiern aus Rachenabstrichen von sieben CF-Patienten ( $1,0 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^4$  KBE/ml) ausgeschlossen werden. Ein möglicher Wachstumsvorteil von *P. aeruginosa* in Anwesenheit von *Pr. intermedia* stellte sich heraus, allerdings ist die Beteiligung von obligaten Anaerobiern an der chronischen Lungenentzündung der CF-Patienten weiterhin unklar.

Von Interesse ist insbesondere die Antibiotikaempfindlichkeit von obligaten Anaerobiern, um z.B. i.v. Therapien bei CF-Patienten zu optimieren. Auch der Einfluss von obligaten Anaerobiern auf Entzündungszellen könnte z.B. durch Zellkulturen erforscht werden. Weitere Studien könnten zeigen, ob obligate Anaerobier die Inflammationsreaktion in den Lungen von CF-Patienten beeinflussen. Außerdem ist die Produktion von Pathogenitätsfaktoren von obligaten Anaerobiern, z.B. Enzyme oder Exotoxine noch wenig erforscht.

Böhm, Katharina: Quantifikation von obligaten Anaerobiern im Sputum von Mukoviszidose-Patienten und Interaktion von obligaten Anaerobiern mit *Pseudomonas aeruginosa*  
Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 62 Seiten, 2010

## *Inhaltsverzeichnis*

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	III
Abkürzungsverzeichnis .....	IV
1 Einleitung .....	1
1.1 Charakteristika der Krankheit Zystische Fibrose .....	1
1.2 Chronische Lungeninfektion bei CF .....	1
1.3 Entstehung der Anaerobiosis in der Lunge von CF-Patienten.....	2
1.4 Pathogenität von fakultativen Anaerobiern unter Anaerobiosis .....	5
1.5 Obligate Anaerobier und CF .....	7
1.6 Ziel der Arbeit .....	9
2 Material und Methoden .....	10
2.1 Patienten.....	10
2.2 Identifikation der Bakterien .....	10
2.2.1 Probengewinnung.....	10
2.2.2 Nährböden für obligat und fakultativ anaerobe Bakterienanzucht.....	11
2.2.3 Identifikation obligat anaerober Bakterien .....	13
2.2.4 Fakultativ anaerobe und aerobe Keimidentifikation.....	16
2.3 Quantifikation der Bakterien .....	18
2.4 Rachenabstriche.....	21
2.5 Bronchiallavage-Flüssigkeiten .....	22
2.6 Reproduzierbarkeit .....	22
2.7 Interaktion von obligaten Anaerobiern mit <i>P. aeruginosa</i> .....	22
2.7.1 Wachstumskurven.....	23
2.7.2 Wachstumskurven mit Überstand.....	24
2.8 Statistik .....	25
3 Ergebnisse .....	26
3.1 Identifikation der Bakterien .....	26
3.1.1 Identifikation fakultativer Anaerobier .....	26
3.1.2 Identifikation obligater Anaerobier .....	27
3.2 Quantifikation.....	29
3.3 Rachenabstriche.....	31
3.4 Bronchiallavagen .....	32
3.5 Reproduzierbarkeit .....	33
3.6 Keimzahlen vor und nach i.v.-Therapie .....	34
3.7 Interaktion von obligaten Anaerobiern mit <i>P. aeruginosa</i> .....	35

---

3.7.1	Wachstum von <i>P. aeruginosa</i> und <i>Pr. intermedia</i> .....	35
3.7.2	Wachstum von <i>P. aeruginosa</i> und <i>Pr. intermedia</i> bei gemeinsamer Bebrütung .....	37
3.7.3	Wachstum von <i>P. aeruginosa</i> mit <i>Pr. intermedia</i> Überstand .....	38
4	Diskussion .....	40
4.1	Häufigkeit der Infektion mit obligaten Anaerobiern .....	40
4.2	Vergleich des obligat anaeroben Keimspektrums dieser und anderer Studien .. .....	40
4.3	Nachweis obligater Anaerobier in hoher Keimzahl in der Lunge von CF- Patienten .....	42
4.4	Obligate Anaerobier bei anderen Lungenerkrankungen .....	42
4.5	Einfluss von i.v. Antibiosen auf Bakterienzahl und Inflammationsreaktion in CF-Patienten-Lungen .....	43
4.6	Bedeutung obligater Anaerobier für die CF-spezifische Lungenerkrankung ..	45
5	Zusammenfassung .....	48
6	Literatur .....	50
7	Anhang .....	57
8	Thesen .....	61
9	Eigene Veröffentlichungen (Co-Autorenschaft) Publikationen Konferenzbeiträge und Poster Zitierfähige Abstracts	
10	Votum der Ethikkommission	
11	Lebenslauf	
12	Selbstständigkeitserklärung	
13	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
14	Danksagungs	

## Abkürzungsverzeichnis

±	plusminus
µg	Milligramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Art.-Nr.	Artikelnummer
ASL	Airway surface liquid
BAL	Bronchiallavage, bronchoalveoläre Lavage
BHI	Brain-Heart-Infusion-Agar
CDC	CDC-Anaerobier-Agar mit 5% Schafsblut
CF	cystic fibrosis, zystische Fibrose
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
COPD	chronic obstructive pulmonary disease, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FEV1	forced expiratory volume in one second, Einsekundenkapazität
FVC	forced vital capacity, forcierte Vitalkapazität
g	Gramm
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
ID-Karten	Identifikationskarten für das Vitek-Gerät
i.v.	intravenös
KBE	Koloniebildende Einheiten
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kalium-Dihydrogenphosphat
min	Minute
ml	Milliliter
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NL	normale Clearance
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte

## Abkürzungsverzeichnis

---

p	Signifikanzwert nach Student's t-test
PBS	phosphate buffered saline, phosphat-gepufferte Saline
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
QO <sub>2</sub>	epithelialer Sauerstoffverbrauch
SCS	Schaedler-Agar
SD	Standardabweichung
s	Sekunde/n
sp.	Spezies (Singular)
spp.	Spezies (Plural)
Tab.	Tabelle

## 1 Einleitung

### 1.1 Charakteristika der Krankheit Zystische Fibrose

Zystische Fibrose (int. cystic fibrosis (CF), synonym: Mukoviszidose) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung mit unterschiedlich starker Ausprägung.

Mehr als 1000 verschiedene Mutationen können ursächlich sein. [<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/> 2008]. Die Wahrscheinlichkeit in der nordeuropäischen Bevölkerung, dass ein Kind mit CF geboren wird, beträgt 1/2500, womit CF die häufigste schwerwiegende, genetisch bedingte Stoffwechselerkrankung ist (siehe Übersicht in [Ratjen and Döring 2003]). Der Gendefekt hat eine Mutation des Chlorid-Kanals CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) in der Membran von epithelialen Zellen zur Folge, so dass Cl<sup>-</sup> nicht ausreichend aus der Zelle entfernt werden kann. In Folge produzieren muköse Drüsen, v.a. der Bronchien und des Gastrointestinaltraktes, vermehrt stark viskösen Schleim [Gibson et al 2003]. Die gastrointestinalen Manifestationen äußern sich in Maldigestion, zystischer Pankreasfibrose mit anschließender Pankreasinsuffizienz, Diabetes mellitus und cholestatischer Leberzirrhose [Ratjen and Döring 2003].

Die Pankreasinsuffizienz kann durch Diät und die Therapie mit Pankreasenzymen weitgehend ausgeglichen werden, trotzdem liegt die Lebenserwartung eines CF-Patienten heute bei nur ca. 35 Lebensjahren [Gibson et al 2003]. Durch die Sekretion viskösen Schleims im Bronchialepithel kommt es zu Atelektasen und Reizhusten. Die meisten CF-Patienten versterben an einer respiratorischen Insuffizienz und Rechts-herzversagen. Dies ist die Folge irreparabler Beschädigung der Atemwege durch Inflammationsreaktionen im Zuge der chronischen Lungeninfektion [Gibson et al 2003].

### 1.2 Chronische Lungeninfektion bei CF

Erreger der Lungeninfektion bei CF-Patienten sind einige wenige fakultative Anaerobier, vorwiegend *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus*, sowie *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* und *Haemophilus influenzae*. [Gibson et al 2003; Valerius et al 1991]. Bei diesen Patienten chronifizieren Lungeninfektionen besonders schnell. Aus diesem Grund sollten Infektionen idealerweise sofort therapiert werden und demzufolge auch eine engmaschige Überwachung noch nicht infizierter Patienten und das Beachten der Hygienerichtlinien erfolgen [Taccetti et al 2005; Döring and Høiby 2004]. Die chronische Lungeninfektion eines CF-Patienten ist

jedoch lediglich mit dem Ziel der Keimzahlreduktion therapierbar, eine kurative Behandlung ist derzeit nicht möglich [Ratjen and Döring 2003]. Es wird diskutiert, ob die Entzündung der Lunge krankheitsbedingt durch ein Ungleichgewicht von Entzündungsmediatoren auch ohne Infektion eintritt, oder ob eine Entzündung immer in Zusammenhang mit einer Infektion stehen muss [Chmiel et al 2002]. Die Entzündungsreaktion in der Lunge wird aber zumindest durch Bakterienbefall verstärkt [Gibson et al 2003].

### 1.3 Entstehung der Anaerobiosis in der Lunge von CF-Patienten

Im Jahr 2002 wurde von der Forschungsgruppe um Worlitzsch, Tarran und Ulrich die Entdeckung gemacht, dass sowohl *in vivo* als auch *in vitro* der Sauerstoffpartialdruck im Mucus von CF-Patienten sehr niedrig ist [Worlitzsch et al 2002]. Es wurden *in vivo*  $pO_2$  Werte im Mucus von 2,5 mmHg gemessen, während unter Sauerstoffgabe normale Werte von 180 mmHg im Bronchus gemessen wurden [Worlitzsch et al 2002].

Mehrere Faktoren tragen zu dem hohen Sauerstoffgefälle in der CF-Lunge bei:

Zunächst verbrauchen Bakterien im Mucus Sauerstoff. Bei Versuchen mit *P. aeruginosa* in einem oben geöffneten Behälter konnte ab einer Bakterienanzahl von  $3 \times 10^7$ /ml kein Sauerstoff in der Bakterien suspension mehr nachgewiesen werden [Worlitzsch et al 2002]. Daraus lässt sich schließen, dass auch im Mucus von CF-Patienten der Sauerstoffgehalt mit zunehmender Bakterienzahl sinkt. Der mit den Bakterien in Kontakt tretende Sauerstoff wird sofort verbraucht [Yoon et al 2002].

Weiterhin benötigen von Entzündungsmediatoren angelockte neutrophile Granulozyten Sauerstoff für den Zellmetabolismus und auch zur Produktion von Sauerstoffradikalen. Diese werden als Abwehrmechanismus gegen phagozytierte Antigene genutzt, wodurch der Sauerstoffgehalt im Mucus der CF-Patienten noch weiter abnimmt.

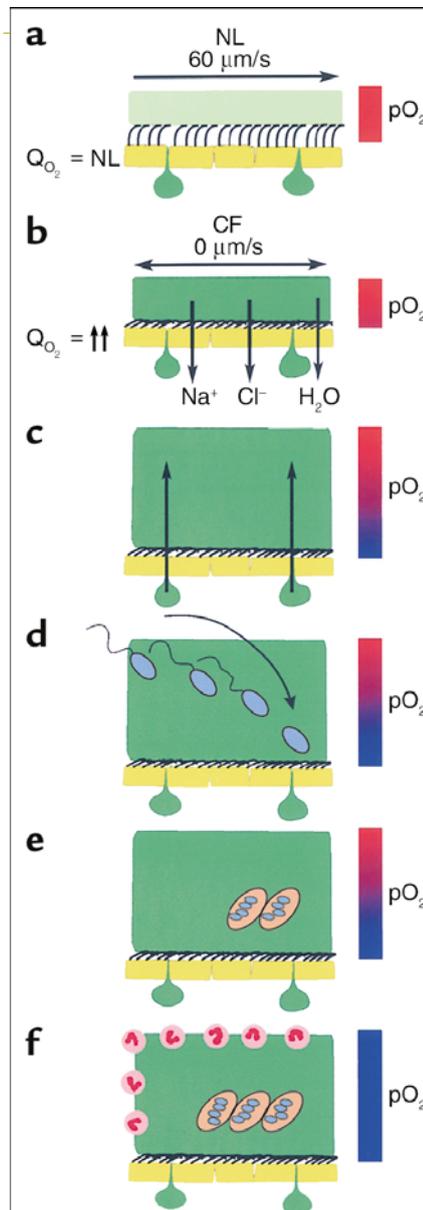
Zudem ist der Sauerstoffumsatz des Epithels eines CF-Patienten zwei- bis dreimal höher als der eines Gesunden [Worlitzsch et al 2002], möglicherweise bedingt durch eine Überaktivität der  $Na^+K^+$ -ATPase im Epithel durch den Defekt im Chloridkanal. Hierbei strömen vermehrt  $Na^+$ - und  $Cl^-$ -Ionen gefolgt von  $H_2O$  in die Epithelzelle ein, was durch erhöhte Aktivität der Austauschpumpe ausgeglichen werden muss. Diese verbraucht wiederum ATP, welches unter Sauerstoffverbrauch bereitgestellt werden muss.

Als letzter Faktor ist anzunehmen, dass die Diffusion von Sauerstoff durch eine dickere Mucusschicht erschwert ist, da Sauerstoff in Flüssigkeiten längere Diffusionszeiten benötigt, als in Luft [Logan 1998].

## 1 Einleitung

---

Die Kombination dieser Faktoren tragen zum nachfolgend dargestellten Mechanismus der Entstehung der hypoxischen bzw. anaeroben Verhältnisse im Mucus der CF-Patienten bei.



Formatiert: Schriftart: 10 pt

Abbildung 1: Entstehungsmechanismus der anaeroben Verhältnisse im Mucus von CF-Patienten [nach Worlitzsch et al 2002]

Es ist anzunehmen, dass neben der Anzahl der Bakterien und Phagozyten sowohl das Epithel als auch die Dicke des Mucus eine Rolle spielen, wobei vermutlich die Bakterienanzahl der wichtigste Einflussfaktor in Bezug auf den Sauerstoffverbrauch darstellt.

## 1.4 Pathogenität von fakultativen Anaerobiern unter Anaerobiosis

Bakterien können unterteilt werden in obligat aerobe, mikroaerophile, obligat anaerobe und fakultativ anaerobe Bakterien [Koneman et al 2005].

**Tabelle 1: Einteilung von Bakterien nach atmosphärischen Wachstumsbedingungen [Nach Koneman et al 2005].**

Übergeordnete Bezeichnung	Wachstumsart	Beschreibung	Optimaler pO <sub>2</sub> [%]	Beispiel
Aerobier	Obligat aerob	- Wachstum nur mit Sauerstoff - Sauerstoff zur Energiegewinnung	21 %	<i>Micrococcus spp</i>
Fakultative Anaerobier	Fak. anaerob	- Wachstum unabhängig von Sauerstoffgehalt	0-21%	<i>S. aureus</i>
	Mikroaerophil	- schlechtes Wachstum unter Anaerobiosis - kein Wachstum bei pO <sub>2</sub> von 21%	5%	<i>Streptococcus constellatus</i>
	Aerotolerant	- gutes Wachstum unter anaeroben Bedingungen - eingeschränktes Wachstum bei pO <sub>2</sub> von 5- 10%	3%	<i>C. histolyticum</i>
Obligate Anaerobier	Moderat obligat anaerob	- Wachstum nur ohne Sauerstoff - Energiegewinnung über Gärung - kurze Sauerstoffexposition möglich	3%	<i>Pr. intermedia</i>
	Strikt obligat anaerob	- Absterben nach etwa 10 min Sauerstoffexposition	< 0,5%	<i>C. botulinum</i>

Unter anaeroben Verhältnissen verhalten sich die bei CF vorkommenden Mikroorganismen anders als unter Wachstum mit Sauerstoff, da sie fakultative Anaerobier sind. Das bedeutet, wenn z.B. *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen wächst und

danach aerob bebrütet wird, stellt *P. aeruginosa* den Stoffwechsel um. Dies geschieht durch Gene-Expression-Regulation oder durch genetische Mutationen [Schreiber et al 2007; Pierre et al 2008].

*P. aeruginosa* produziert unter anaeroben Bedingungen das Mukopolysaccharid Alginate, somit wechselt das Bakterium zum mucoiden Phänotyp [Hassett 1996], was mit einer Chronifizierung der Infektion einhergeht [Ciofu et al 2008]. *P. aeruginosa* kann zudem durch Wachstum in Makrokolonien und Alginatebildung die Abwehrmechanismen des Wirts umgehen, da Alginate die Phagozytose inhibiert und einen mechanischen Schutz bietet [Mai et al 1993]. Auch *S. aureus* bildet während anaeroben Wachstums ein Polysaccharid, welches vor Angriffen neutrophiler Granulozyten schützt [Ulrich et al 2007]. Ähnlich verhält es sich mit *Burkholderia cepacia* [Cescutti et al 2000; Sousa et al 2007].

Auch die zelluläre Immunantwort wird durch die Anaerobiosis in der Lunge von CF-Patienten beeinflusst. Neutrophile Granulozyten bekämpfen Antigene, indem sie einerseits Proteasen, z.B. Elastase bilden, die Biomembranen zerstören können, andererseits produzieren diese Entzündungszellen Sauerstoffradikale, die mit vielerlei Molekülen reagieren. Sauerstoffradikale können unter den anaeroben Bedingungen im Mucus der CF-Patienten aufgrund Sauerstoffmangels überhaupt nicht gebildet werden [Simpson et al 1989; Hassett 1996]. Auch die Beweglichkeit der neutrophilen Granulozyten im Mucus von CF-Patienten ist eingeschränkt [Matsui et al, 2005]. Durch die von den Bakterien gebildeten Polysaccharide werden nicht nur neutrophile Granulozyten, sondern auch Makrophagen inhibiert [Leid et al 2005].

Bei der antibiotischen Therapie kommen durch die anaeroben Verhältnisse in den Mucusplaques noch weitere Probleme hinzu, beispielsweise die Antibiotikaempfindlichkeit von aeroben gegenüber anaeroben Stämmen. *P. aeruginosa* ändert sich oft vom mucoiden Phänotyp *in vivo* unter Anaerobiosis zum nicht-mucoiden Phänotyp nach *in vitro* Bebrütung unter normalen atmosphärischen Bedingungen [Bragonzi et al 2005]. Unter anaeroben Verhältnissen besitzt *P. aeruginosa* durch einen veränderten Stoffwechsel und durch Biofilmbildung demnach auch eine andersartige Antibiotikaempfindlichkeit als unter aeroben Verhältnissen [Hill et al 2005]. Da aber die Resistenzen in der Regel am unter aeroben Verhältnissen kultivierten Keim bestimmt werden, ist zunächst eine Verfälschung der Antibiotikaresistenzbestimmungen denkbar. Weiterhin wirken Antibiotika unter anaeroben Verhältnissen schlechter [Boriello et al 2004; Park et al 1992]. Zudem sind viele fakultativ anaerobe Bakterien resistent gegen die üblichen Chemotherapeutika [Moore et al 2008; Zhou J et al 2008;

San Gabriel et al 2004]. Zusammengenommen könnten diese Probleme unter Umständen zu Therapie-Mißerfolgen führen.

Es liegt die Annahme nahe, dass *P. aeruginosa* häufig die CF-Lunge besiedelt, da dieser Keim ein fakultativer Anaerobier ist. Diese These wird durch die Tatsache unterstützt, dass auch *S. aureus* und weitere Erreger einer Lungeninfektion bei CF-Patienten fakultative Anaerobier sind und dass das Keimspektrum bei diesen Patienten begrenzt ist. Diese Mikroorganismen finden im sauerstoffarmen Mucus von CF-Patienten einen optimalen Nährboden und sind durch ihre Fähigkeit zur Polysaccharidbildung vor Abwehrmechanismen geschützt.

### 1.5 Obligate Anaerobier und CF

2004 wurden erstmals obligate Anaerobier im Sputum von CF-Patienten gefunden [Rogers et al 2004]. Rogers wies mit Hilfe der T-RFLP- (terminal restriction fragment length polymorphism) Methode verschiedene Anaerobier im Sputum von CF-Patienten nach. Bei dieser Methode wird, nach Amplifikation durch die PCR-Methode und anschließender Bandenidentifikation nach Gelelektrophorese, rRNA nachgewiesen. Durch die PCR-Methode können selbst kleinste Mengen RNA nachgewiesen werden, aber es konnten keine Angaben über Keimzahlen gemacht werden. Da das Sputum den Mund-Rachen-Raum passiert, wäre es möglich, dass auch RNA von oropharyngeal vorkommenden Mikroorganismen bearbeitet wurde. Im Mund-Rachen-Raum, besonders in Zahn- und Zungentaschen, kommt eine Besiedlung mit obligat anaeroben Bakterien häufig vor [Hughes and MacNab 2008]. Somit konnten Kontaminationen aus dem Mund-Rachen-Raum nicht ausgeschlossen werden.

Auch weitere Untersuchungen wiesen obligate Anaerobier im Sputum von CF-Patienten nach. In 42 von 66 Sputumproben (64%) wurden obligate Anaerobier gefunden [Tunney et al 2008]. Auch in bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit von CF-Patienten wurden obligate Anaerobier identifiziert [Harris et al 2007]. Nachgewiesen wurden z.B. *Bacteroides gracilis*, *Veillonella atypica*, *Prevotella species* [Rogers et al 2004], aber auch Propionibakterien und Aktinomyzeten [Field et al 2005]. Obligate Anaerobier im Sputum von CF-Patienten wurden zum Zeitpunkt der Untersuchung noch nicht quantifiziert.

Die Kultivierung von obligaten Anaerobiern ist schwierig und bedarf spezieller technischer Voraussetzungen [Rogers et al 2005]. Oft werden deshalb bei akuten oder chronischen Lungenerkrankungen keine anaeroben Kulturen angelegt, so dass diese Mikroorganismen bei der Keimidentifikation negativ selektiert werden [Rogers et al 2005].

## 1 Einleitung

---

Somit ist unklar, inwiefern obligate Anaerobier auch bei anderen Lungenerkrankungen eine Rolle spielen. Während pulmonaler Exazerbationen bei CF-Patienten können nicht immer Bakterien im Sputum nachgewiesen werden. Da anaerobe Kulturen nicht routinemäßig angelegt werden, wäre es möglich, dass obligate Anaerobier bei diesen Exazerbationen eine Rolle spielen [Harris et al 2007].

Der Einfluss von obligaten Anaerobiern auf den Verlauf der Lungenerkrankung bei CF-Patienten ist noch unklar. Mögliche Pathomechanismen wie die Beeinflussung des Wachstums von aeroben Bakterien, z.B. Förderung oder Hemmung des Wachstums von *P. aeruginosa* sind denkbar. Es ist vorstellbar, dass obligate Anaerobier Substanzen bilden, die fakultativen Anaerobiern als Nahrung dienen und somit ihr Wachstum anregen.

Weiterhin unklar ist die Ausbildung von Virulenzfaktoren durch obligate Anaerobier, z.B. das Bilden einer Polysaccharidkapsel, wie bei einigen Bacteroidesarten beschrieben [Hahn et al 2005] oder die Bildung von Toxinen.

## 1.6 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht,

- in welchen Keimzahlen obligate Anaerobier im Sputum von CF-Patienten vorkommen.
- ob insbesondere im Sputum von pädiatrischen CF-Patienten obligate Anaerobier vorkommen.
- um welche obligat anaeroben Bakterien es sich in welcher Häufigkeit handelt.
- ob die Hypothese, es handele sich bei den gefundenen obligaten Anaerobiern um Kontamination aus dem Mundraum, zutreffend ist oder nicht.
- ob die anaerobe Keimbesiedlung der Lunge auf das Kollektiv der Mukoviszidosekranken beschränkt ist.
- welchen Einfluss das Einfrieren der Sputumproben auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hat.
- welchen Einfluss i.v. Antibiosen auf die Keimzahl von obligaten Anaerobiern im Sputum von CF-Patienten haben, durch Keimzahlenbestimmungen vor und nach i.v. Antibiotikatherapie.
- wie das Wachstum von *P. aeruginosa* durch obligate Anaerobier beeinflusst wird.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten

An der Studie nahmen 38 Patienten mit zystischer Fibrose im Alter von 6 bis 65 Jahren teil ( $25,2 \pm 10,4$  Jahre). Davon waren 16 männlich und 22 weiblich. Das Patientenkollektiv rekrutierte sich aus 32 erwachsenen Patienten mit zystischer Fibrose ( $27,8 \pm 9,0$  Jahre) aus der pulmonologischen Ambulanz (Leitung: Frau OÄ Dr. Wollschläger) der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums Halle-Wittenberg (Ärztlicher Direktor: Herr Prof. Dr. Seufferlein) und aus sechs minderjährigen Patienten von 6 bis 14 Jahren ( $11,2 \pm 3,1$  Jahre) der Kinderambulanz (Leitung der Mukoviszidosesprechstunde: Herr OA Dr. Merkel) der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Halle-Wittenberg (Ärztlicher Direktor: Herr Prof. Dr. Körholz). Es wurden 79 Sputumproben untersucht. Alle Patienten bzw. deren Erziehungsberechtigte, gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Vorsitzender der Ethik-Kommission: Herr Prof. Dr. Grond) genehmigt (siehe Anhang).

### 2.2 Identifikation der Bakterien

#### 2.2.1 Probengewinnung

Das Sputum wurde von den Patienten ohne weitere Hilfsmittel, wie z.B. Kochsalzprovokation, ausgehustet. Die Probe wurde in einem sterilen Röhrchen (TPP AG, Trasadingen, Schweiz) aufgefangen und innerhalb einer Stunde weiterverarbeitet.

Um im Verlauf der Verarbeitung das Sputum korrekt verdünnen zu können (siehe 2.3 Quantifikation der Bakterien), wurde die Sputummenge durch Wiegen festgestellt. Anschließend wurde ein Drei-Ösen-Ausstrich auf dem Festnährboden (siehe 2.2.2 Nährböden) Columbia-Agar mit 5% Schafsblut (Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) angefertigt, um die häufig in CF-Patientensputum vorkommenden fakultativ anaeroben Bakterien *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *H. influenza* oder *B. cepacia* in der nachfolgenden Differenzierung zu isolieren und nachzuweisen (Abb. 2).



Abbildung 2: Dreiösenausstrich von *P. aeruginosa* auf Columbia-Agar

### 2.2.2 Nährböden für obligat und fakultativ anaerobe Bakterienanzucht

Um die Bakterien identifizieren und quantifizieren zu können, wurden unterschiedliche Nährböden für das Wachstum der Kolonien genutzt. Zur Anzucht von fakultativen Anaerobiern und Aerobiern wurden Columbia-Agar mit 5% Schafsblut verwendet. Auf diesem Nährboden ist die Anzucht der meisten fakultativ anaeroben Bakterien möglich. Zudem kann eine optische Unterscheidung zwischen unterschiedlichen Bakterienarten begrenzt vorgenommen werden: Bakterien, die Hämolyse bilden, sind von einem Hämolysehof umgeben, andere Bakterien besitzen einen grünen Hof, der durch Entfärben der Erythrozyten bedingt wird.

Zusätzlich wurden Selektivnährböden wie Pseudomonas-Cetrimid-Selektivnährboden (Oxoid GmbH) und McConkey-Agar No. 3 (Oxoid GmbH) eingesetzt. Cetrimid-Agar ist ein Selektivmedium zur Identifikation von *P. aeruginosa*. Es enthält Cetyl Trimethyl Ammonium Bromid. *P. aeruginosa* färbt sich auf diesen Kulturplatten grün. (Abb. 3) McConkey-Agar selektiert Gram-negative Bakterien. Das Wachstum Gram-positiver Bakterien wird durch das zugesetzte Kristallviolett sowie durch Gallensalze verhindert.



**Abbildung 3: *P. aeruginosa* auf Cetrimid-Agar**

Um obligat anaeroben Bakterien optimale Wachstumsbedingungen zu liefern, wurden mehrere Nährböden ausgewählt. So handelt es sich bei SCS-Agar (Schaedler-Agar mit 5% Schafsblut, bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland) um einen Blutagar mit 5% Schafsblut, der zudem mit Wachstumsfaktoren wie Hämin, Hefeextrakt und Vitamin K3 angereichert ist. Durch diese Zusammenstellung werden andere Bakterien im Wachstum gehemmt. Durch Zugabe von L-Zystein und hochdosierter Dextrose wird das Wachstum der obligaten Anaerobier gut gefördert [<http://www.biomerieux-diagnostics.com>, 2008].

Um optimale Ergebnisse bei der Identifikation der obligaten Anaerobier mit dem Rapid ANA II System zu erzielen, wurden die obligaten Anaerobier vor der Identifikation auf CDC-Agar (CDC Anaerobe 5% Schafsblut Agar, Becton Dickinson AG, Heidelberg, Deutschland) überimpft. Es handelt sich hierbei um ein nicht-selektives Nährmedium welches sich besonders für die Kultivierung von obligat anaerob wachsenden Bakterien, isoliert aus klinischem Material eignet [<http://www.bd.com/ds/productCenter/221734.asp>, 2008].

BHI-Agar (Brain-Heart-Infusion Agar, heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim, Deutschland) setzt sich aus Hirn und Herzextrakt zusammen. Dieses liefert zusammen mit Peptonen die für das Bakterienwachstum wichtigen Stickstoff-, Kohlenstoff- und Schwefelverbindungen, Vitamine und Spurenelemente. Als zusätzlicher Nährstoff wird noch Glucose zugegeben. Das zugesetzte Natrium-Chlorid erhält die osmotische Ba-

## 2 Material und Methoden

---

lance und der Phosphatpuffer dient der Stabilisierung des pH-Wertes. Somit können auch anspruchsvolle Bakterien, wie viele obligate Anaerobier, auf BHI-Agar wachsen [[http://www.heipha.de/db/files/313e-1-0210\\_Brain-Heart-Infusion-Agar.pdf](http://www.heipha.de/db/files/313e-1-0210_Brain-Heart-Infusion-Agar.pdf), 2010].

### 2.2.3 Identifikation obligat anaerober Bakterien

Die Anaerobier wurden, wie in Kapitel 2.3 beschrieben, gezählt und Einzelkolonien auf SCS-Agar bzw. BHI-Agar ausgestrichen und mindestens 48 Stunden bei 37°C in der Anaerobierbank (MAKS MG500, Maintrup, Lähden-Holte, Deutschland) bebrütet. Die Gaszusammensetzung in der Anaerobierbank bestand aus 80% Stickstoff, 10% Wasserstoff und 10% Kohlendioxid (Abb. 4).



**Abbildung 4: Anaerobierbank MAKS MG500**

Um die obligaten Anaerobier von den fakultativen Anaerobiern unterscheiden zu können, wurde von jedem Stamm eine aerobe Kontrolle angelegt, indem dieser auf Columbia Agar ausgestrichen und bei 37°C unter aeroben Bedingungen 24 Stunden bebrütet wurde (Brutschrank Typ 6420: Heraeus, Hanau, Deutschland). Waren mehr als zweimal hintereinander koloniebildende Einheiten (KBE) zu erkennen, wurde davon ausgegangen, dass es sich nicht um einen obligaten Anaerobier handelt, und der Stamm wurde nicht weiter bearbeitet. Waren drei aerobe Kontrollen negativ, wurde der Stamm etwa 36 bis 48 Stunden auf CDC- bzw. BHI-Agar unter anaeroben Verhältnis-

## 2 Material und Methoden

---

sen bebrütet, um ihn anschließend mit dem RapID ANA II System (remel, Lenexa, KS, U.S.A.) identifizieren zu können. Da nach Herstellerangaben einige Testreaktionen durch die Zusammensetzung des SCS-Agar verfälscht werden können, wurden die auf SCS gewachsenen Stämme auf CDC-Agar überimpft, wie vom Hersteller empfohlen (siehe Kapitel 2.2.2).

Obligat anaerobe Bakterien wurden durch das RapID ANA II System identifiziert. Das System besteht aus dem RapID ANA II Panel (remel), dessen Reaktionsvertiefungen mit dehydrierten Reaktanten, sowie aus der RapID Inokulationsflüssigkeit (remel). Die Reinkultur wurde mit Hilfe eines sterilen Baumwolltupfers in die RapID Inokulationsflüssigkeit (1 ml) suspendiert bis eine Suspension, die einem McFarland Trübungsstandard Nr. 3 (bioMérieux) entspricht, hergestellt ist (Abb. 5).



**Abbildung 5: McFarland Trübungsstandard und RapID Inokulationsflüssigkeit**

Das RapID ANA II Panel wurde nun mit der Suspensionsflüssigkeit gleichmäßig beschickt. Die Panele wurden bei 37°C unter aeroben Bedingungen mindestens vier (höchstens sechs) Stunden inkubiert. Die Panele konnten nun entweder sofort oder, bei zwischenzeitlicher Lagerung im Kühlschrank bei 2-8 °C, innerhalb von 18 Stunden ausgewertet werden (Abb. 6).



**Abbildung 6: Rapid ANA II Panel befüllt mit Inokulationsflüssigkeit**

Um die Rapid ANA II Paneele auszuwerten, wurden die zehn Reaktionsvertiefungen auf Reaktivität untersucht. Die Farbveränderungen in den Reaktionsvertiefungen wurden ohne weitere Zugabe von Reagentien mit Hilfe der Interpretationshinweise in der Packungsbeilage beurteilt. Anschließend wurden in einige Reaktionsvertiefungen Reagenzien zugefügt, um eine Reaktion hervorzurufen (Abb. 7 und 8). Die Ergebnisse wurden auf den beiliegenden Protokollblättern eingetragen.



**Abbildung 7: Einbringen der Rapid ANA II Reagenz**

## 2 Material und Methoden

---

Das erhaltene Reaktionsmuster wurde nach Feststellung der Gram-Eigenschaft durch ein Präparat (Gramfärbeset: Merck, Darmstadt, Deutschland), durch die ERIC Software (Elektronisches RapID Kompendium, remel) mit einer Datenbank von Reaktionsmustern verglichen, und das Ergebnis wurde ausgedruckt. Bei nicht adäquaten Ergebnissen wurde der Stamm auf Reinheit überprüft, und die von der Software vorgeschlagenen weiteren Untersuchungen wurden durchgeführt.



**Abbildung 8: RapID ANA II Panel nach Zugabe von Testreaktion**

Das RapID ANA II System erkennt 68% der angebotenen obligaten Anaerobier. Mit zusätzlichen Untersuchungen werden 78% der Bakterien identifiziert [Marler et al, 1991]. Bei zufriedenstellenden Ergebnissen wurde der Stamm bei -18 bis -53°C in Skin milk (Oxoid GmbH) eingefroren, um das Ergebnis gegebenenfalls nachvollziehen zu können.

### **2.2.4 Fakultativ anaerobe und aerobe Keimidentifikation**

Die Identifikation der aeroben und fakultativ anaeroben Bakterien erfolgte mit den Systemen Vitek (bioMérieux) und BBL-Crystal (Becton Dickinson AG). Die aeroben Bakterien, vor allem die fakultativen Anaerobier, wurden wie in Kapitel 2.3 beschrieben quantifiziert und Einzelkolonien auf Columbia-Agar ausgestrichen. Um das Bakterium korrekt identifizieren zu können, wurde durch mehrmaliges Überimpfen eine Reinkultur hergestellt. Die zu untersuchende Reinkultur war nicht älter als 24 Stunden. Um die Identifikationssysteme Vitek und BBL-Crystal nutzen zu können, wurden die Gram-Eigenschaften der Bakterien durch Anfertigung eines Präparates ermittelt. Gram-

## 2 Material und Methoden

---

negative Stäbchen konnten auch auf einem Selektivnährboden für Gram-negative Stäbchen (McConkey-Agar) angezchtet und somit die Gram-Eigenschaft festgestellt werden (siehe Kapitel 2.2.2).

Desweiteren wurden Ergebnisse biochemischer Reaktionen ermittelt, die weiteren Einfluss auf die Identifizierung hatten. Das Identifikationssystem Vitek benötigt die Information, ob ein Gram-negatives Bakterium Oxidase-positiv oder -negativ ist. Diese biochemische Reaktion wurde mit Oxidasereagenz (Becton Dickinson) getestet, indem einige Einzelkolonien auf das Reaktionsfeld gerieben wurden. Bei einem Oxidase-positiven Keim verfärbt sich das Reaktionsfeld dunkel.

Gram-positive Bakterien wurden auf ihre Katalase- und Koagulase-Eigenschaften mit Hilfe von bioMérieux ID color Catalase (bioMérieux) und des Staphaurex plus Testlatex (remel) getestet. So ist *P. aeruginosa* beispielsweise Gram-negativ und Oxidase-positiv, während *S. aureus* Gram-positiv, Katalase-positiv und Koagulase-positiv ist.

Fakultativ anaerobe und aerobe Bakterien wurden zunächst durch das Vitek System identifiziert. (Abb. 9)



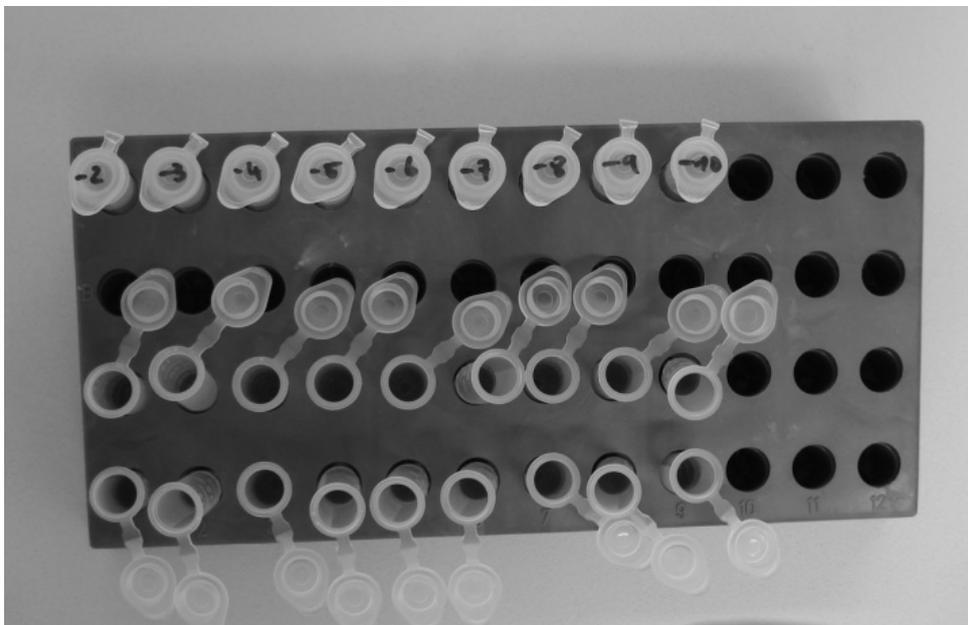
**Abbildung 9: Vitek Gerät zur Identifikation nicht-anaerober Bakterien**

Auch das Crystal Identifizierungssystem (BBL crystal, Becton Dickinson AG) unterschied Gram-positive von Gram-negativen und Oxidase-positive von Oxidase-

negativen Bakterien. Bei einem inadäquaten Ergebnis wurde die Kultur nochmals auf Reinheit überprüft und die Identifizierung wiederholt.

### 2.3 Quantifikation der Bakterien

Um die Keimzahl der Bakterien in den Proben zu bestimmen, wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, wobei die koloniebildenden Einheiten ab einer bestimmten Verdünnungsreihe gezählt werden konnten. Die Proben wurden 1:1 mit einfacher PBS (phosphat buffered saline, Phosphat gepufferte Salzlösung) verdünnt, um die Mikroorganismen vor pH-Änderungen zu schützen. Zur Herstellung des Puffers wurden 85,0g NaCl, 14,23g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 1,35g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  mit 500ml aqua dest gemischt. Diese 20-fache Stammlösung wurde zum Gebrauch mit aqua dest zu einfacher Lösung verdünnt. Mit Hilfe des Vortex-Schüttelrührers wurde die Probe homogenisiert. Um die Verdünnung in Zehnerpotenzschritten vorzubereiten, wurden acht Reaktionsgefäße (Multi®-Reaktionsgefäße 1,7ml farblos, DNase/RNase-frei, Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland) mit je 900 $\mu\text{l}$  PBS befüllte und anschließend von drei bis zehn nummeriert (Abb.10).



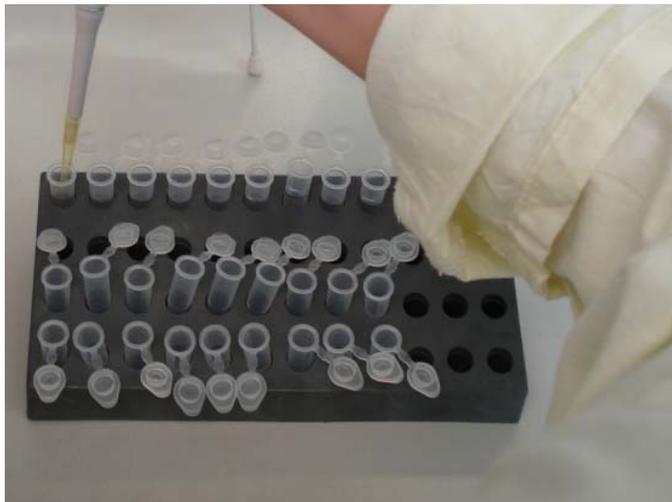
**Abbildung 10: Numerierte Reaktionsgefäße mit PBS**

Mit einer 100 $\mu\text{l}$  Pipette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurden 100 $\mu\text{l}$  der einfach verdünnten Probe in das erste der acht Reaktionsgefäße gegeben (Abb. 11). Mit dem

## 2 Material und Methoden

---

Vortex-Schüttelrührer wurde das Gemisch vermengt. Aus dem ersten Reaktionsgefäß wurden wiederum 100µl mit einer Pipette entnommen, in das nächste Reaktionsgefäß eingebracht und gemischt. Somit wurde die Probe um einen weiteren Zehnerpotenzschritt verdünnt. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis eine Verdünnungsgrad um zehn Zehnerpotenzen im letzten Reaktionsgefäß erreicht wurde. So wurde im ersten Reaktionsgefäß eine um drei Zehnerpotenzen und im achten Reaktionsgefäß eine um zehn Zehnerpotenzen niedrigere Keimzahl als in der Sputumprobe erstellt.



**Abbildung 11: Verdünnen der Sputumproben**

Nun wurden die Nährböden (siehe 2.2.2) für das Auftragen der verdünnten Probe vorbereitet. Die Platten wurden mit Datum und Probennummer beschriftet und entsprechend der Beschriftung beimpft (Abb. 12). Aus jedem der acht Reaktionsgefäße wurden je zweimal 10µl Suspension mit einer 10 µl Pipette auf die entsprechenden Felder der Agarplatten gebracht (Abb. 13).



Abbildung 12: Beschriftung der Agar-Platten für die Verdünnungsreihe

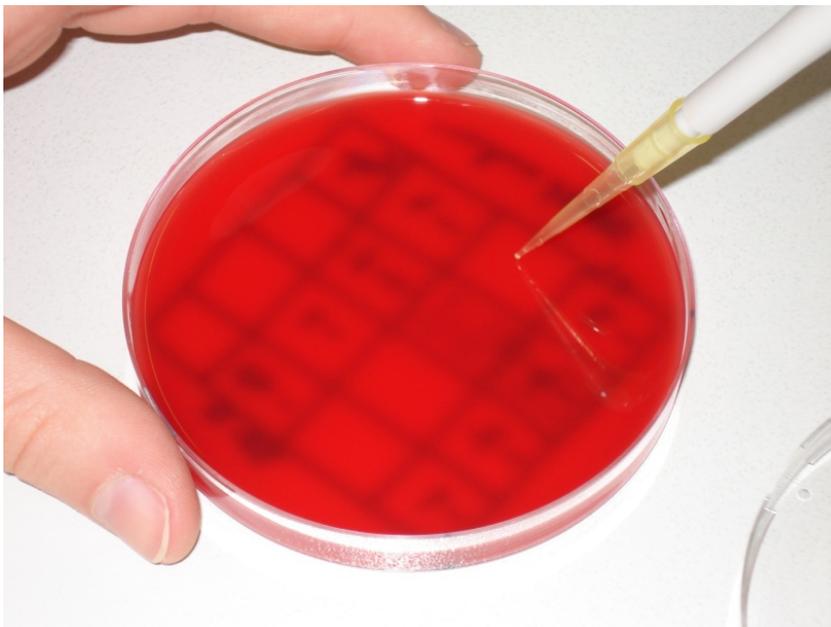


Abbildung 13: Beimpfung mit den verdünnten Sputumproben

Nachdem die verdünnte Sputumprobe auf den Nährböden getrocknet war, wurden die Platten bei 37°C, Columbia- und Cetrimidplatten unter aeroben, SCS- und BHI-

## 2 Material und Methoden

---

Agarplatten unter aneroben Bedingungen inkubiert. Die aerobe Verdünnungsreihe wurde nach 18 bis 24 Stunden abgelesen.

Da Anaerobier in der Regel eine langsamere Wachstumsphase haben, wurden die anaeroben Verdünnungsreihen nach ca. 48 Stunden und ein weiteres Mal nach sieben Tagen abgelesen, um langsam wachsende Anaerobier ebenfalls quantifizieren und identifizieren zu können. Es wurden die KBE auf den einzelnen Feldern gezählt, wobei unterschiedlich visuell imponierende Mikroorganismen separat gezählt wurden. Da die Felder mit immer stärker verdünnter Probesuspension beimpft wurden, ließ sich nun die Keimzahl ermitteln (Abb.14).



**Abbildung 14: Keimzahlermittlung durch Auszählen der KBE**

Anschließend wurden die unterschiedlichen Mikroorganismen identifiziert. Um die Bakterien zu identifizieren, wurden Einzelkolonien auf entsprechende Nährböden mit einem Drei-Ösen-Ausstrich überimpft und wie in Kapitel 2.2.3 und 2.2.4 beschrieben weiter bearbeitet.

### 2.4 Rachenabstriche

Um die Hypothese, dass obligate Anaerobier eine Kontamination der Sputumproben durch die physiologische Mund- und Rachenflora seien, zu untersuchen, wurden die Keimzahlen in der Mundflora von CF-Patienten bestimmt und die gefundenen Bakterien identifiziert (siehe Kapitel 2.2.3 und 2.2.4).

Die Rachenabstriche wurden mithilfe eines sterilen Baumwolltupfers aus dem Rachenraum von sieben CF-Patienten gewonnen. Der Baumwolltupfer wurde in ein steriles

Röhrchen (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) mit 1 ml 0,9% NaCl getaucht und an der Wand ausgedrückt. Mit diesem Vorgang sollte der Weg des Sputums durch den Mund-Rachen-Raum simuliert werden. Da eine geringere Keimzahl als in den Sputumproben erwartet wurde, wurden Verdünnungsstufen von -1 bis -8 gewählt, um die Keimzahl zu ermitteln. Wie in Kapitel 2.3 beschrieben, wurde die Probe verdünnt und sowohl aerob als auch anaerob bei 37°C 24 bzw. 48 Stunden lang inkubiert.

### 2.5 Bronchiallavage-Flüssigkeiten

Um zu überprüfen, ob auch bei Nicht-CF-Patienten obligate Anaerobier in der Lunge zu finden sind, wurden die bronchoalveoläre Lavage- (BAL-) Flüssigkeit von sechs Kindern ohne Mukoviszidose untersucht. Sie wurde nach den Richtlinien der European Respiratory Society zu diagnostischen Zwecken gewonnen [European Respiratory Society, 2000]. Ein Teil der Spülflüssigkeit wurde direkt nach der Bronchoskopie weiterverarbeitet. Es wurde eine Verdünnungsreihe ab  $10^2$  hergestellt (100µl BAL-Flüssigkeit in 900µl PBS usw.), und die Bakterien quantifiziert und identifiziert (siehe Kapitel 2.2.3, 2.2.4 und 2.3).

### 2.6 Reproduzierbarkeit

Um den Einfluss des Einfrierens von Sputumproben zu erfassen, wurden fünf Proben doppelt untersucht. Sie waren vor der zweiten Bearbeitung mindestens zwei Wochen nach dem ersten Verdünnungsschritt mit PBS bei -18°C eingefroren. Die Keimzahlen wurden wie in Kapitel 2.3 dargestellt bestimmt, und die Bakterienstämme mit Hilfe von Vitek, BBL Crystal und dem RapID ANA II System identifiziert (siehe Kapitel 2.2.3 und 2.2.4). Die Ergebnisse wurden mit denen der Erstbearbeitung verglichen, um die Reproduzierbarkeit beurteilen zu können.

### 2.7 Interaktion von obligaten Anaerobiern mit *P. aeruginosa*

Um den Einfluss von obligaten Anaerobiern auf das Wachstum von *P. aeruginosa* festzustellen, wurde *P. aeruginosa* in Anwesenheit von *Pr. intermedia* sowie von Überstand von *Pr. intermedia* bebrütet, und die Wachstumskurven ermittelt. Um die Werte vergleichen zu können, wurden außerdem die Wachstumskurven von *P. aeruginosa* und *Pr. intermedia* separat bestimmt. Es wurden der *P. aeruginosa*-Stamm PAO1 und

der ATCC- (American Type Culture Collection-) Stamm Nummer 25611 *Pr. intermedia* gewählt.

### 2.7.1 Wachstumskurven

Es wurde zunächst eine Über-Nacht-Kultur von *P. aeruginosa* angelegt. Hierfür wurden ein bis zwei KBE einer Reinkultur des Stammes PAO1 in ein steriles Röhrchen mit 10ml Hirn-Herz-Glucose-Bouillon (BHI-Bouillon, Oxoid) eingepflegt und über Nacht aerob bei 37°C im Schüttelrührer (heidolph) bei 400 upm inkubiert. *Pr. intermedia* wurde im gleichen Kulturmedium unter anaeroben Bedingungen bei 37°C im Heiz-Thermo-Mixer KTMR-133 (HLC - Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland) für etwa 48 Stunden inkubiert.

Um *Pr. intermedia* optimale Wachstumsbedingungen bieten zu können, wurde die BHI-Bouillon 10 Minuten bei 99,9°C erhitzt und somit der in der Bouillon gelöste Sauerstoff weitestgehend eliminiert. Die Bouillon wurde anschließend unter anaeroben Bedingungen bis zu 3 Tage gelagert, bis sie weiter verarbeitet wurde. Die Bebrütung von *P. aeruginosa* erfolgte unter anaeroben Bedingungen, um eine bessere Vergleichbarkeit mit den Werten bei gemeinsamem Wachstum mit *Pr. intermedia* zu erhalten.

Um eine vergleichbare Keimzahl bei Beginn der Wachstumsmessung zu erhalten, wurde die optische Dichte (OD) der Bakterien-Nährmediumsuspension bestimmt. Die Kulturen wurden mit Hilfe des Photometers Cadas 50 (Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Deutschland) auf eine OD von 0,05 eingestellt, was einer Keimzahl von  $1,3 \times 10^7$  KBE für *P. aeruginosa* und einer Keimzahl von  $1,4 \times 10^7$  für *Pr. intermedia* entspricht. Zur OD Bestimmung wurden halb-mikro Küvetten (Roth) mit 1 ml Bakteriensuspension befüllt und die Absorption der schwebenden Teilchen im Photometer gemessen.

Es wurden die jeweilige OD im Abstand von vier Stunden gemessen, d.h. es wurden acht verschiedene Röhrchen mit 2 ml Suspension mit vergleichbarer Keimzahl (ermittelt durch die OD) befüllt und unter anaeroben Bedingungen bei 37°C bei 400 upm inkubiert. Die Veränderung der OD wurde bei dem ersten Röhrchen nach vier Stunden gemessen, bei dem zweiten Röhrchen nach acht Stunden usw. (nach 12, 16, 20, 24 Stunden) bis zum sechsten Röhrchen, die Veränderung im siebten Röhrchen wurden nach 48 Stunden festgestellt, und die im Achten nach weiteren 24 Stunden.

Außer der OD-Änderung wurde noch die Keimzahländerung ermittelt, um eine Verfälschung der Werte durch bereits abgestorbene Bakterien zu verhindern und um eine

genauere Keimzahlangabe zu erhalten. Es wurde eine Verdünnungsreihe (s. 2.3) mit 100µl Bakteriensuspension hergestellt, und für die Suspension mit *P. aeruginosa* auf Columbia Agar, für die Suspension mit *Pr. intermedia* auf SCS Agar und für die gemischte Suspension auf beiden Nährböden angelegt. Diese Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt, um einen Mittelwert für die Wachstumskurven bilden zu können und somit zufällige Schwankungen auszuschließen.

### 2.7.2 Wachstumskurven mit Überstand

Um einen Einfluss von Stoffen, die von *Pr. intermedia* gebildet werden, auf das Wachstum von *P. aeruginosa* erkennen zu können, wurde *P. aeruginosa* in einer Mischung von BHI Bouillon und *Pr. intermedia* Überstand inkubiert und das Wachstum gemessen. Stoffe, die einen Einfluss auf *P. aeruginosa* haben könnten, sind z.B. verschiedene Enzyme, Endotoxine, Wachstumsfaktoren.

Um einen Überstand von *Pr. intermedia*, ohne die Bakterien, zu erlangen, wurde *Pr. intermedia* mindestens 48 Stunden bei 37°C im Schüttelrührer unter der Anaerobierbank inkubiert, bis eine deutliche Trübung der Bouillon zu erkennen war. Die Keimzahl dieser Suspension wurde mit einer Verdünnungsreihe ermittelt. Die Suspension wurde bei 4000 upm 20 min zentrifugiert. Die festen Bestandteile der Suspension, hauptsächlich das Bakterium *Pr. intermedia*, setzten sich auf dem Boden des Röhrchens ab, so dass der Überstand vorsichtig in ein neues steriles Röhrchen gegeben werden konnte. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde der Überstand mit Hilfe einer Einmalspritze und eines Sterilfilteraufsatzes (bioMérieux) steril filtriert. Um zu kontrollieren, ob der Überstand keimfrei ist, wurden eine SCS- und eine Columbia-Agarplatte mit einer Impföse, die in den Überstand getaucht wurde, bestrichen und aerob und anaerob bebrütet.

Nun wurde erneut eine Über-Nacht-Kultur von *P. aeruginosa* angelegt und bebrütet. Die Suspension wurde auf eine Start OD von 0,05 eingestellt. Allerdings wurde die Hälfte der BHI-Bouillon durch *Pr. intermedia* Überstand ersetzt. Nun wurden wieder acht verschiedene Röhrchen mit der Suspension derselben OD befüllt und unterschiedlich lang bebrütet (siehe 2.8.1). Auch diese Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt.

## 2.8 Statistik

Die Daten werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (MW $\pm$ SD) berechnet mit excel (Microsoft, Redumont, WA, U.S.A.)

Die Singnifikanz-Berechnung erfolgt mittels Student's t-test (excel), p-Werte  $\leq 0,05$  wurden als signifikant erachtet. Die p-Werte wurden nicht für multiples Testen korrigiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Identifikation der Bakterien

##### 3.1.1 Identifikation fakultativer Anaerobier

Es wurden 79 Sputumproben von 38 CF-Patienten untersucht, somit wurden pro Patient mehrere Sputumproben untersucht.

Es wurden in insgesamt 79 Sputumproben 117 fakultative Anaerobier nachgewiesen. In allen Sputumproben wurde mindestens ein fakultativer Anaerobier gefunden. Eine Sputumprobe enthielt 1 bis 4 verschiedene fakultative Anaerobier ( $1,5 \pm 0,8$  fakultative Anaerobier/Probe). Pro Patient wurden mindestens eine und höchstens fünf Sputumproben untersucht ( $2,2 \pm 1,2$  Proben), allerdings waren die Ergebnisse nicht in jeder Probe eines Patienten reproduzierbar.

Bei 19 der 38 CF-Patienten konnte mindestens einmal *P. aeruginosa* im Sputum nachgewiesen werden (50,0%). *S. aureus* konnte bei 14 Patienten identifiziert werden (36,8%), *B. cepacia* hingegen nur bei zwei (5,3%), und *S. maltophilia* nur bei drei Patienten (7,9%).

Am häufigsten wurde *P. aeruginosa* identifiziert (31,3% der Sputumproben), gefolgt von *S. aureus* (23,5%). *B. cepacia* wurde in 4,3% der Proben gefunden, und *S. maltophilia* in 3,5% aller Proben.

**Tabelle 2: Nachweis von fakultativen Anaerobiern im Sputum von 38 CF-Patienten**

<u>Fakultative Anaerobier</u>	<u>absolute Häufigkeit</u>	<u>relative Häufigkeit</u>
<i>P. aeruginosa</i>	36	31,3%
<i>S. aureus</i>	27	23,5%
<i>S. maltophilia</i>	4	3,5%
<i>B. cepacia</i>	5	4,3%

Es wurden 70 Sputumproben von 32 erwachsenen CF-Patienten untersucht. Insgesamt wurden 101 fakultative Anaerobier nachgewiesen. Die Häufigkeiten waren ähnlich wie in der Gesamtgruppe. Am häufigsten wurde *P. aeruginosa* identifiziert (35,3%), gefolgt von *S. aureus* (22,6%).

Es wurden darüber hinaus neun Sputumproben von sechs pädiatrischen CF-Patienten untersucht. In allen Proben wurde mindestens ein fakultativer Anaerobier nachgewiesen. Insgesamt wurden 16 fakultative Anaerobier identifiziert, wobei *S. aureus* der am häufigsten gefundene war (25,0%). Im Gegensatz zu den Sputumproben der erwachsenen Studienteilnehmer wurde *P. aeruginosa* in keiner Sputumprobe gefunden. Die

pädiatrischen CF-Patienten wiesen somit ein breiteres Keimspektrum als die erwachsenen Patienten auf.

#### **3.1.2 Identifikation obligater Anaerobier**

Bei der Untersuchung auf obligate Anaerobier wurden in 58 von 79 Proben (73,4%) obligate Anaerobier gefunden. Bei 33 von 38 Patienten (86,9%) wurden in mindestens einer Sputumprobe obligate Anaerobier identifiziert. In einer Sputumprobe sind höchstens fünf verschiedene obligate Anaerobier gefunden worden ( $1,46 \pm 1,26$  obligate Anaerobier/ Probe).

Bei den erwachsenen CF-Patienten wurden in 52 von 70 Proben (74,0%) obligate Anaerobier gefunden. Allerdings wurden bei fast allen erwachsenen Patienten in mindestens einer Sputumprobe obligate Anaerobier nachgewiesen, und zwar bei 29 von 32 Patienten (90,0%). In neun Sputumproben der Kinder wurden in sechs Proben obligate Anaerobier gefunden (66,6%). Bei vier der sechs Patienten war mindestens eine Sputumprobe mit obligaten Anaerobiern besiedelt (66,6%). Im Erwachsenenalter können bei Mukoviszidosepatienten somit häufiger obligat anaerobe Bakterien gefunden werden, als im Kindesalter. In 79 Sputumproben der Kinder und Erwachsenen wurden insgesamt 115 Anaerobier gefunden. Es handelte sich um 29 verschiedene Bakterien. Ihre Häufigkeit ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Häufigkeit von identifizierten obligaten Anaerobiern in 79 Sputumproben von 38 CF Patienten

	<b>obligater Anaerobier</b>	<b>absolute Häufigkeit</b>	<b>relative Häufigkeit</b>
<b>Actinomyces</b>	<i>odontolyticus</i>	4	
	<i>turicensis</i>	6	
	<b>Gesamt</b>	<b>10</b>	<b>8,7%</b>
<b>Bacteroides</b>	<i>tectum</i>	1	
	<i>ureolyticus</i>	1	
	<b>Gesamt</b>	<b>2</b>	<b>1,7%</b>
<b>Clostridium</b>	<i>butyricum</i>	1	
	<i>difficile</i>	3	
	<i>hastiforme</i>	3	
	<i>innocuum</i>	2	
	<i>perfringens</i>	1	
	<i>sporogens</i>	1	
	<i>sp</i>	1	
	<b>Gesamt</b>	<b>12</b>	<b>10,4%</b>
<b>Capnocytophaga</b>	<i>spp</i>	6	<b>5,2%</b>
<b>Eubacterium</b>	<i>limosum</i>	1	<b>0,9%</b>
<b>Fusobacterium</b>	<i>necrophorum</i>	2	
	<i>sp</i>	1	
	<b>Gesamt</b>	<b>3</b>	<b>2,6%</b>
<b>Gemella</b>	<i>morbilorum</i>	4	<b>3,5%</b>
<b>Lactobacillus</b>	<i>fermentum</i>	1	
	<i>jensenii</i>	2	
	<b>Gesamt</b>	<b>3</b>	<b>2,6%</b>
<b>Mobiluncus</b>	<i>curtisii</i>	2	
	<i>mulieris</i>	4	
	<b>Gesamt</b>	<b>6</b>	<b>5,2%</b>
<b>Prevotella</b>	<i>corporis</i>	1	
	<i>melaninogenica</i>	2	
	<b>Gesamt</b>	<b>3</b>	<b>2,6%</b>
<b>Propionibacterium</b>	<i>propionicus</i>	1	<b>0,9%</b>
<b>Peptostreptococcus</b>	<i>anaerobius</i>	2	
	<i>micros</i>	1	
	<i>prevotii</i>	11	
	<i>tetradius</i>	2	
	<b>gesamt</b>	<b>17</b>	<b>13,9%</b>
<b>Staphylococcus</b>	<i>saccharolyticus</i>	34	<b>29,6%</b>
<b>Veillonella</b>	<i>spp</i>	11	<b>9,6%</b>
<b>Wolinella</b>	<i>spp</i>	3	<b>2,6%</b>
<b>Gesamt</b>		<b>115</b>	<b>100%</b>

In 70,0% der Proben, in denen *P. aeruginosa* als fakultativer Anaerobier gefunden wurde, wurden auch obligate Anaerobier gefunden. War in der Sputumprobe *S. aureus* gefunden worden, wurden in 80,0% dieser Proben auch obligate Anaerobier gefunden. In den fünf Sputumproben, in denen *B. cepacia* gefunden wurde, erfolgte der Nachweis obligater Anaerobier, wie auch in den vier Sputumproben mit *S. maltophilia*. Wurden

### 3 Ergebnisse

---

sowohl *S. aureus*, als auch *P. aeruginosa* identifiziert, fanden sich nur in 14,3% dieser Proben obligate Anaerobier (Abb. 15).

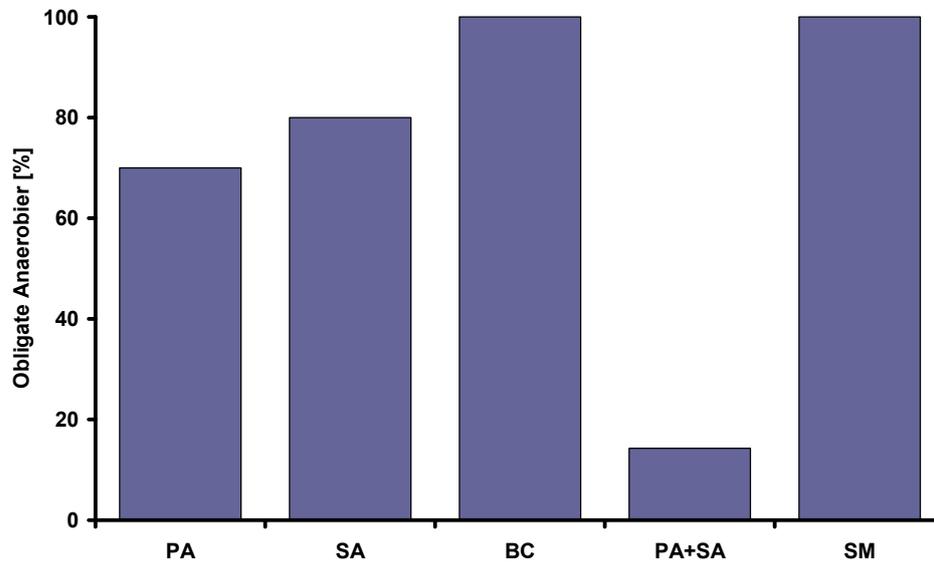
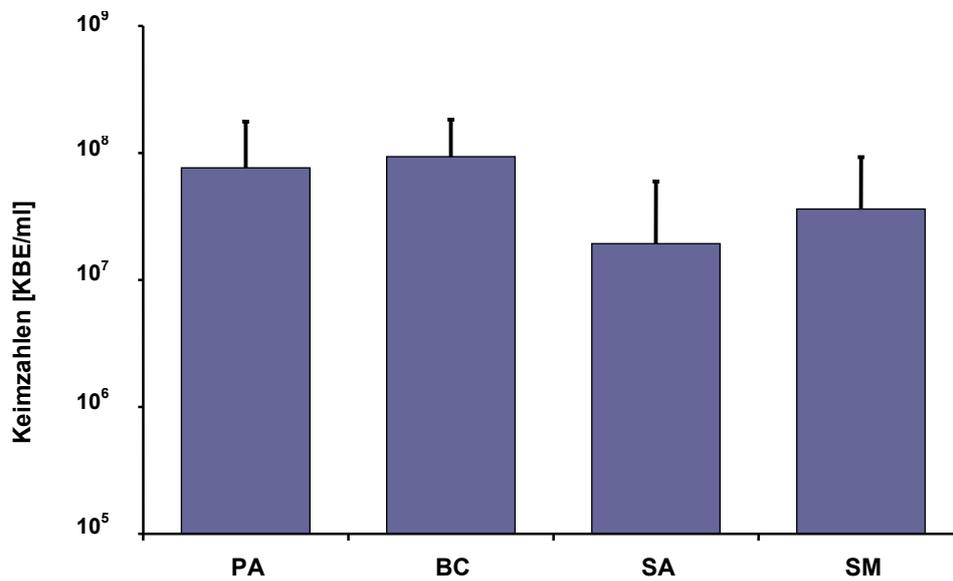


Abbildung 15: Zeitgleicher Nachweis von fakultativen Anaerobiern und obligaten Anaerobiern im Sputum von 38 CF-Patienten. PA: *P. aeruginosa*, SA: *S. aureus*, BC: *B. cepacia*, SM: *S. maltophilia*

### 3.2 Quantifikation

Es wurden bei 118 fakultativen Anaerobiern im Sputum von CF-Patienten Keimzahlen zwischen  $5,0 \times 10^4$  und  $4,0 \times 10^8$  KBE/ml gezählt. Wie in Abb.16 dargestellt, wurden in allen Sputumproben hohe Keimzahlen gefunden ( $5,8 \times 10^7 \pm 8,8 \times 10^7$ ).

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,732$ ) zwischen den Keimzahlen der Sputumproben von Kindern ( $4,7 \times 10^7 \pm 7,7 \times 10^7$  KBE/ml) und denen der Erwachsenen ( $5,9 \times 10^7 \pm 9,0 \times 10^7$  KBE/ml).



**Abbildung 16: Keimzahlen der wichtigsten fakultativen Anaerobier in 79 Sputumproben.**  
PA: *P. aeruginosa*, BC: *B. cepacia*, SA: *S. aureus*, SM: *S. maltophilia*

Es wurden bei 115 obligaten Anaerobiern Keimzahlen von  $1,0 \times 10^5$  bis  $1,0 \times 10^8$  gezählt. In allen Sputumproben wurden hohe Keimzahlen gezählt ( $1,6 \times 10^7 \pm 3,1 \times 10^7$  KBE/ml). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Keimzahlen der Sputumproben der Kinder ( $3,8 \times 10^7 \pm 3,9 \times 10^7$ ) und denen der Erwachsenen ( $1,3 \times 10^7 \pm 2,9 \times 10^7$ ) ( $p=0,059$ ).

Obwohl fakultative Anaerobier in signifikant höheren Keimzahlen vorkamen als obligate Anaerobier ( $p=0,0003$ ), befinden sich die Keimzahlen in derselben Größenordnung (Abb. 17).

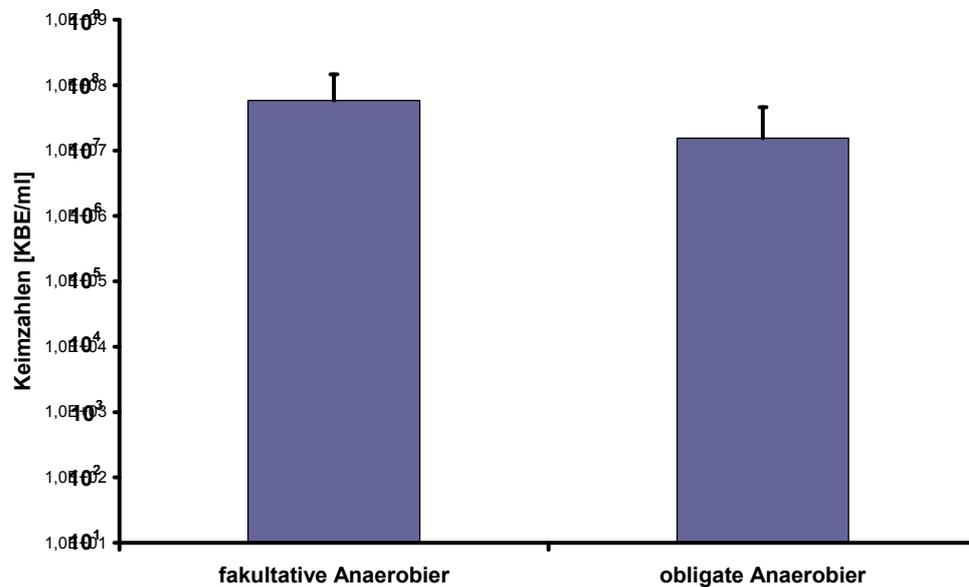


Abbildung 17: Keimzahlenvergleich von fakultativen und obligaten Anaerobiern in 79 Sputumproben ( $p = 0,0003$ )

### 3.3 Rachenabstriche

Es wurde je ein Rachenabstrich von sieben CF-Patienten untersucht. In lediglich zwei dieser Proben wurden obligate Anaerobier gefunden. Sie ließen sich allerdings nur in geringen Keimmengen nachweisen. Bei einem Patienten wurde *Veillonella spp.* in einer Keimzahl von  $1,0 \times 10^2$  und bei dem zweiten Patienten *Gemella morbillorum* in einer Keimzahl von  $2,0 \times 10^4$  gefunden. In den Sputumproben wurden im Durchschnitt Keimzahlen von  $7,7 \times 10^6$  gezählt. Das ist ein Unterschied von beinahe drei Zehnerpotenzen ( $p = 0,0001$ ) (Abb. 18).

Bei den anderen fünf Patienten (71,4%) ließen sich keine obligaten Anaerobier im Rachenabstrich nachweisen. Allerdings wurden bei allen Patienten fakultative Anaerobier in den Rachenabstrichen identifiziert (Tab. 4).

### 3 Ergebnisse

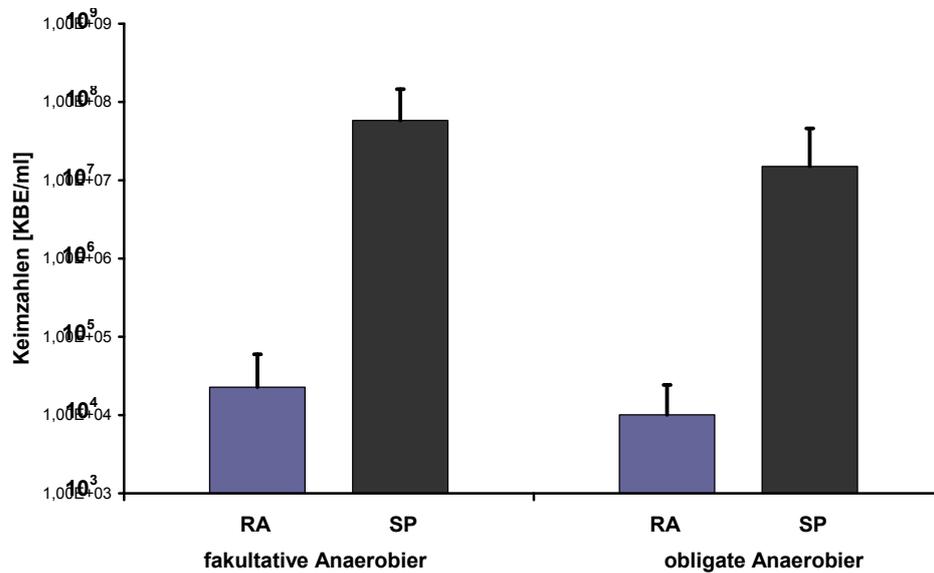


Abbildung 18: Durchschnittliche Keimzahlen von fakultativen und obligaten Anaerobiern in 7 Rachenabstrichen (RA) und 79 Sputumproben (SP) ( $p=0,0001$ )

Tabelle 4: Fakultative und obligate Anaerobier in Rachenabstrichen von 7 CF-Patienten.

<u>Probennummer</u>	<u>Fakultative Anaerobier</u>	<u>Obligate Anaerobier</u>	<u>Keimzahl</u>
RA1	<i>S. auricularis</i>	-	$2,0 \times 10^2$
		<i>Veillonella spp.</i>	$1,0 \times 10^2$
RA2	<i>S. aureus</i>	-	$2,0 \times 10^2$
RA3	<i>Strept. pneumoniae</i>	-	$3,0 \times 10^4$
	<i>S. auricularis</i>	-	$1,0 \times 10^4$
RA4	<i>Nonfermenting gram neg. Bacillus</i>	-	$4,0 \times 10^3$
	<i>Strept. sanguis</i>	-	$8,0 \times 10^3$
		<i>Gemella morbillorum</i>	$2,0 \times 10^4$
RA5	<i>Strept. pneumoniae</i>	-	$1,0 \times 10^2$
RA6	<i>Strept. intermedius</i>	-	$1,0 \times 10^5$
RA7	<i>S. auricularis</i>	-	$6,0 \times 10^3$
	<i>C. xerosis</i>	-	$3,0 \times 10^2$

### 3.4 Bronchiallavagen

Es wurden sechs BAL-Flüssigkeiten von pädiatrischen Patienten untersucht. Es handelt sich nicht um Patienten mit zystischer Fibrose. Die Diagnosen der Patienten sind Tab.5 zu entnehmen. In einer Probe wurde ein Anaerobier in geringer Keimzahl gefunden. Auch andere Bakterien wurden in nur geringer Keimzahl gefunden (Tab. 5).

**Tabelle 5: Diagnosen und Keimzahlen von fakultativen und obligaten Anaerobiern in BAL-Flüssigkeit bei 6 Nicht-CF-Patienten**

Diagnose	Fakultative Anaerobier	Obligate Anaerobier	Keimzahlen [KBE/ml]
Chronisch rezidivierende Pneumonie mit eitrigem Sekret	<i>S. aureus</i>		$2,0 \times 10^2$
		<i>S. saccharolyticus</i>	$1,0 \times 10^2$
leichte Bronchitis, kein pathologisches Sekret	<i>Strept. pneumoniae</i>	-	$2,0 \times 10^2$
heterozygoter Alpha-1-AT-Mangel, glasiges Sekret	<i>E. corrodens</i>	-	$4,0 \times 10^4$
	<i>Strept. mitis</i>		$2,0 \times 10^4$
nicht-eitrige Tracheitis, kein Sekret	-	-	-
leichte Bronchitis, kein Sekret	-	-	-
V.a. akute Pneumonie, wenig Sekret	-	-	-

### 3.5 Reproduzierbarkeit

Fünf Proben wurden nach mehrwöchigem Einfrieren der Sputumproben noch einmal untersucht. In nur einer von fünf Untersuchungen konnte nach Einfrieren derselbe fakultative Anaerobier gefunden werden. Vor Einfrieren der Sputumproben konnten 13 obligate Anaerobier identifiziert werden, danach nur noch vier. Die Keimzahlen unterschieden sich signifikant ( $p=0,003$ ) (Abb. 19).

Es konnte nur einmal derselbe obligate Anaerobier identifiziert werden. Da sich das Einfrieren offenbar negativ auf die Keimzahlen und auf die Identifikation auswirkt, wurden in dieser Studie die Sputumproben sofort bearbeitet.

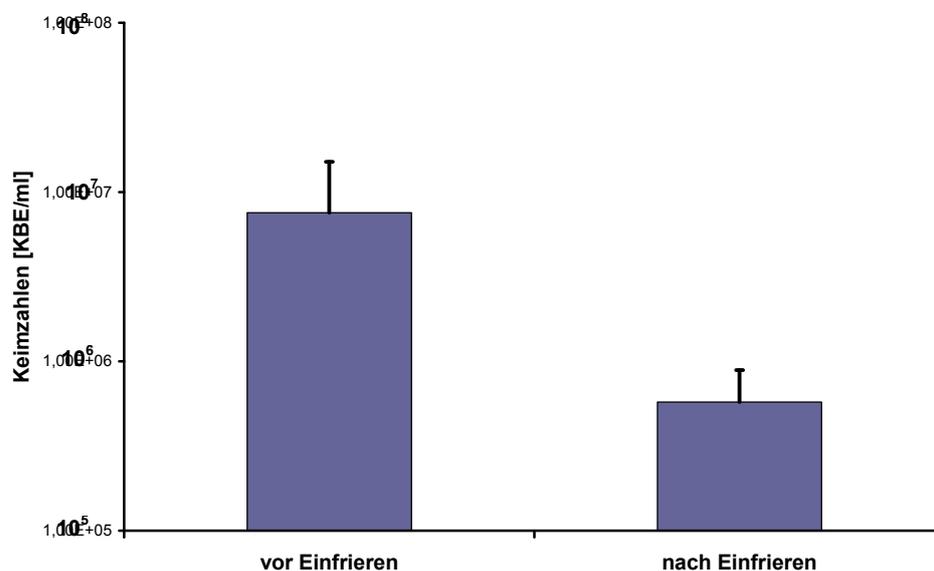


Abbildung 19: Keimzahlen obligater Anaerobier vor und nach Einfrieren von fünf Sputumproben

### 3.6 Keimzahlen vor und nach i.v.-Therapie

Es wurden je zwei Sputumproben von acht erwachsenen CF-Patienten untersucht. Die Patienten wurden auf Grund einer pulmonalen Exacerbation für 14 Tage intravenös mit Antibiotika behandelt. Die Antibiotikaresistenzen der fakultativen Anaerobier wurden berücksichtigt. Die identifizierten Hauptkeime der Patienten wurden auf ihre Antibiotikaempfindlichkeit getestet. Die i.v. Antibiose richtete sich nach dem erstellten Antibiogramm. Es wurde je eine Sputumprobe vor der i.v. Therapie untersucht und eine Sputumprobe nach der i.v. Antibiose.

Die Keimzahlen der fakultativen Anaerobier vor und nach der Therapie unterschieden sich nicht signifikant voneinander ( $p=0,330$ ). Die Keimzahlen der fakultativen Anaerobier vor Therapie beliefen sich auf  $6,7 \times 10^7 \pm 8,3 \times 10^7$  KBE/ml und die Keimzahlen nach Therapie auf  $3,5 \times 10^7 \pm 4,5 \times 10^7$  KBE/ml (Abb. 20).

Die Keimzahlen der obligaten Anaerobier vor und nach der i.v. Antibiose unterschieden sich gleichfalls nicht signifikant voneinander ( $p=0,792$ ). Vor der Therapie wurden Keimzahlen von  $2,6 \times 10^7 \pm 3,7 \times 10^7$  KBE/ml, nach der Therapie Keimzahlen von  $2,8 \times 10^7 \pm 5,6 \times 10^7$  KBE/ml gefunden (Abb. 20).

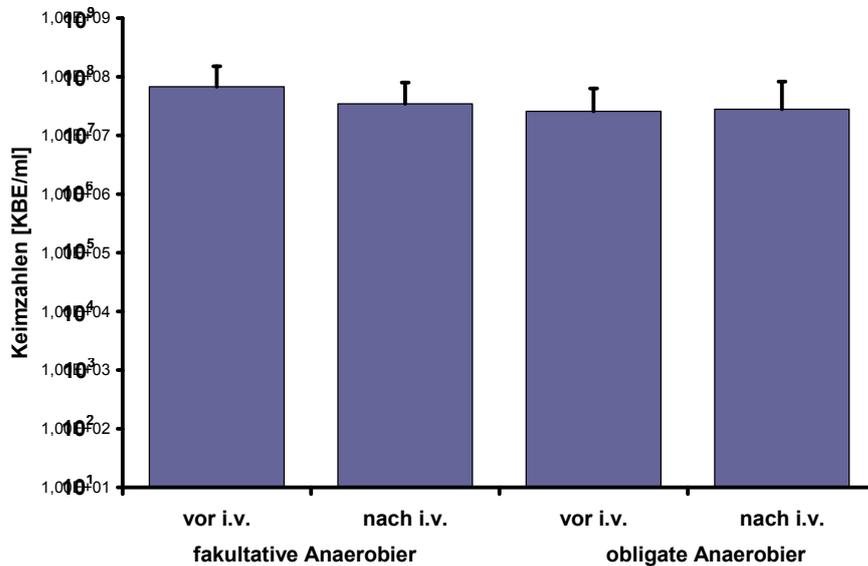


Abbildung 20: Keimzahlen von obligaten und fakultativen Anaerobiern im Sputum von acht CF-Patienten vor und nach i.v. Therapie

### 3.7 Interaktion von obligaten Anaerobiern mit *P. aeruginosa*

#### 3.7.1 Wachstum von *P. aeruginosa* und *Pr. intermedia*

Es wurden die Wachstumskurven von *P. aeruginosa* und *Pr. intermedia* ermittelt (Abb. 21 und 22). Nach Bebrütung von *P. aeruginosa* in BHI-Bouillon wurde eine Keim-Nährmedium-Suspension mit einer OD von 0,05 hergestellt. Dies entspricht den Keimzahlen ohne Bebrütung, also bei 0 Stunden. Für *P. aeruginosa* entspricht eine Start-OD von 0,05 einer Keimzahl von  $1,3 \times 10^7$ . Die Wachstumskurve errechnet sich aus den Mittelwerten von sieben Versuchsreihen (Abb. 21).

### 3 Ergebnisse

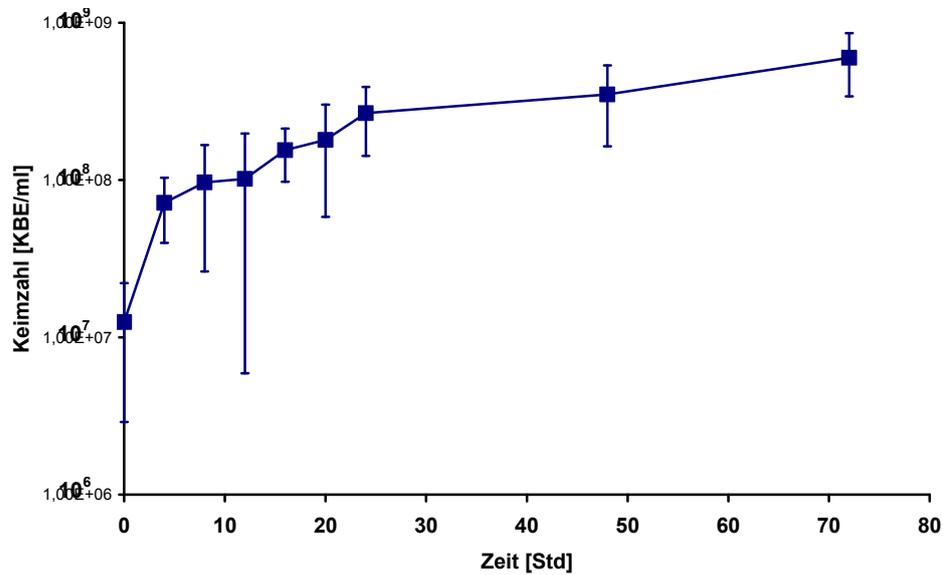


Abbildung 21: Wachstumskurve von *P. aeruginosa* bei anaerobem Wachstum in BHI-Bouillon

Die Start- OD von 0,05 entspricht bei *Pr. intermedia* einer Keimzahl von  $1,4 \times 10^7$ . Die Wachstumskurve errechnet sich aus den Mittelwerten von drei Versuchsreihen (Abb. 22).

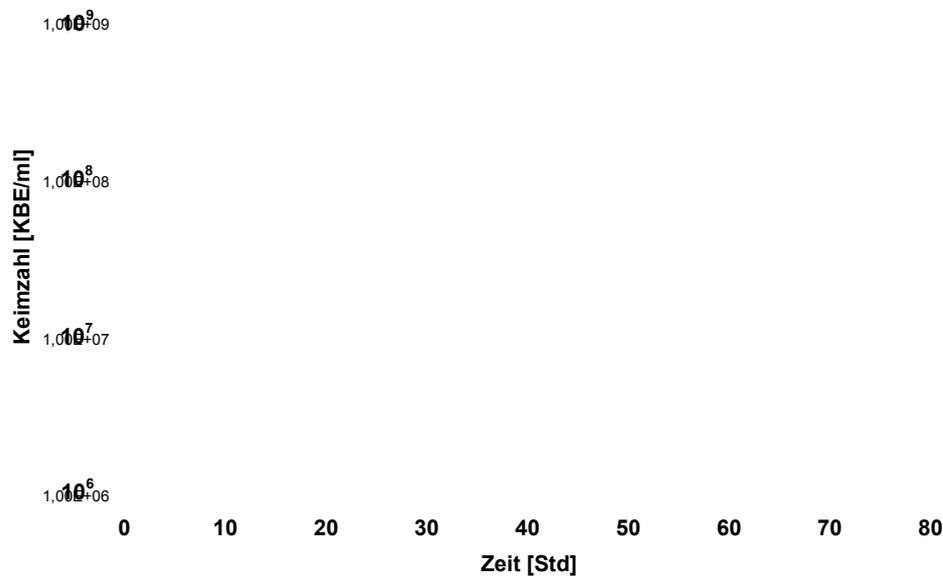


Abbildung 22: Wachstumskurve von *Pr. intermedia* bei anaerobem Wachstum in BHI-Bouillon

### 3.7.2 Wachstum von *P. aeruginosa* und *Pr. intermedia* bei gemeinsamer Bebrütung

*P. aeruginosa* und *Pr. intermedia* wurden gemeinsam in BHI Bouillon bebrütet und die Keimzahlen ermittelt. Die t-Tests für die einzelnen Zeitpunkte ergaben sämtlich keinen signifikanten Unterschied zwischen der Wachstumskurve von *Pr. intermedia* mit und ohne *P. aeruginosa*. Die Standardabweichungen überlappen sich größtenteils erheblich, weswegen kein signifikanter Unterschied zwischen den Wachstumskurven zu finden ist ( $p > 0,05$ ) (Abb. 23).

Die t-Tests bei den Datenpunkten 4 Stunden bis 24 Stunden ergaben signifikante Unterschiede zwischen den Keimzahlen bei Wachstum von *P. aeruginosa* mit oder ohne *Pr. intermedia* (4 Std.:  $p = 0,017$ ; 8 Std.:  $p = 0,034$ ; 12 Std.:  $p = 0,031$ ; 16 Std.:  $p = 0,021$ ; 20 Std.: 24 Std.:  $p = 0,031$ ;  $p = 0,021$ ) (Abb. 24).

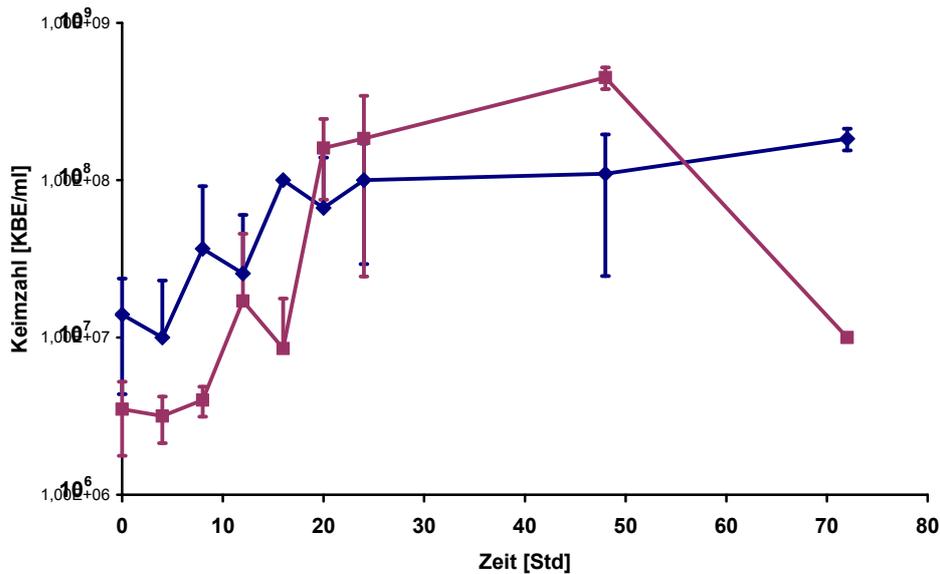


Abbildung 23: Wachstum von *Pr. intermedia* mit und ohne *P. aeruginosa* in BHI-Bouillon  
Blau: Wachstumskurve ohne PAO1; lila: Wachstumskurve mit PAO1

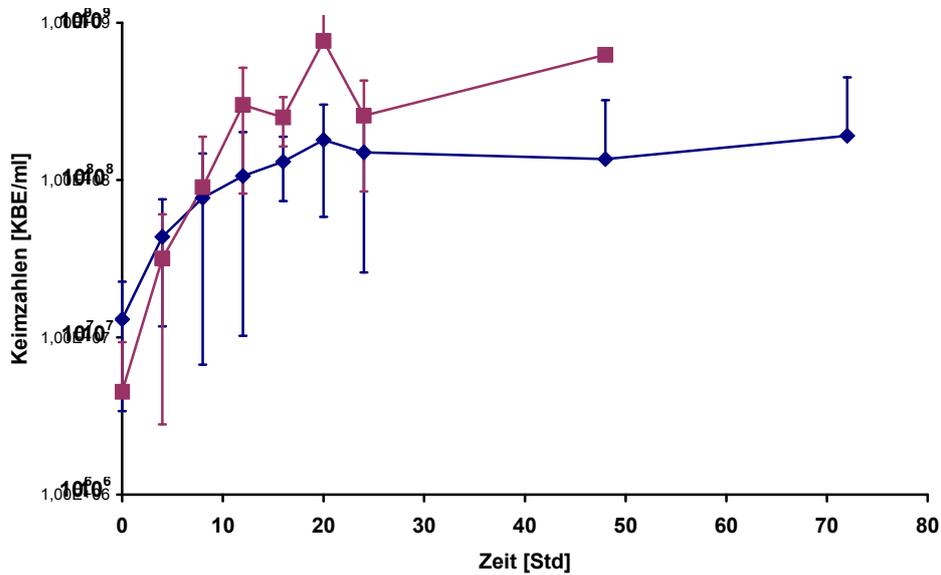


Abbildung 24: Wachstum von *P. aeruginosa* mit und ohne *Pr. intermedia* in BHI-Bouillon  
 Blau: Wachstumskurve ohne *Pr. intermedia*; lila: Wachstumskurve mit *Pr. intermedia*

### 3.7.3 Wachstum von *P. aeruginosa* mit *Pr. intermedia* Überstand

PAO1 wurde mit BHI-Bouillon und *Pr. intermedia*-Überstand unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Es wurde die Wachstumskurve von PAO1 ermittelt. Es findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Wachstumskurven von *P. aeruginosa* mit und ohne *Pr. intermedia*-Überstand ( $p > 0,05$ ) (Abb. 25).

### 3 Ergebnisse

---

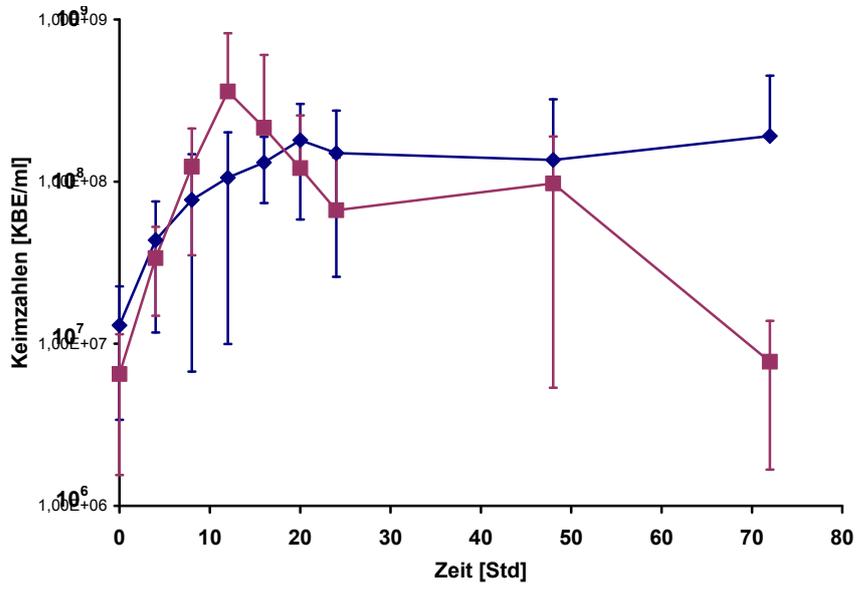


Abbildung 25: Wachstumskurve von PAO1 mit und ohne *Pr. intermedia*-Überstand. Blau: ohne Überstand; lila: mit Überstand

## 4 Diskussion

Die chronische Lungenentzündung ist die Haupttodesursache von CF-Patienten. Dank verbesserter Therapie ist deren Lebenserwartung mittlerweile auf etwa 35 Jahre angestiegen [Gibson et al 2003]. Allerdings sind viele Pathomechanismen im Bezug auf die pulmonale Infektion und Inflammation noch nicht erforscht.

In dieser Studie sind obligate Anaerobier verschiedener Genera in hohen Keimzahlen gefunden worden. Durch i.v. Antibiosen wird die Keimzahl der obligaten Anaerobier nicht vermindert und ihre Pathogenität ist weiterhin unklar.

### 4.1 Häufigkeit der Infektion mit obligaten Anaerobiern

Bei fast allen CF-Patienten (86,9%) unserer Stichprobe konnten in mindestens einer Sputumprobe obligate Anaerobier nachgewiesen werden; bei erwachsenen Patienten sind es sogar 90%. Da auch in dieser Untersuchung in 74% der Sputumproben obligate Anaerobier gefunden wurden, wurden die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen bestätigt. So wurden von Tunney in 64% der Sputumproben und bei 66% der Patienten obligate Anaerobier identifiziert [Tunney et al 2008]. Damit liegen die Ergebnisse in der gleichen Größenordnung.

Die Besiedelung mit obligaten Anaerobiern erfolgt schon im Kindesalter. Viele pädiatrische Patienten unserer Stichprobe (66,6%) haben schon Kontakt zu diesen Bakterien gehabt. Bei den gefundenen Keimarten handelt es sich vorwiegend um Bakterien, die auch im Mund-Rachen-Raum zu finden sind. Daher ist anzunehmen, dass die Besiedelung auf diesem Wege erfolgt.

### 4.2 Vergleich des obligat anaeroben Keimspektrums dieser und anderer Studien

In verschiedenen Studien über obligate Anaerobier in der Lunge von CF-Patienten wurden unterschiedliche Bakterienarten identifiziert. In einer Studie wurden am häufigsten obligate Anaerobier der Genera *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Peptostreptococcus* und *Fusobacterium* gefunden [Field et al 2005]. In einer weiteren Studie wurden obligate Anaerobier der Genera *Prevotella*, *Lysobacterium* und *Rickettsiales* gefunden [Harris et al 2007]. In dieser Studie hingegen wurden am häufigsten *S. saccharolyticus* (29,6%), *Peptostreptococcus spp.* (13,9%), *Clostridium spp.* (10,4%), *Veillonella spp* (9,6%) und *Actinomyces spp* (8,7%) gefunden.

Diese Unterschiede können wie folgt begründet werden:

Zunächst gibt es wahrscheinlich regionale Unterschiede im Keimspektrum von CF-Patienten. In dieser Studie wurden CF-Patienten aus einer begrenzten Region untersucht, die sich womöglich durch ihr Keimspektrum von anderen CF-Patienten unterscheidet.

Ein weiterer Grund liegt möglicherweise in den unterschiedlichen Nomenklaturen und Terminologien in verschiedenen Arbeiten und bei verschiedenen Identifizierungssystemen. Ausserdem ist die Terminologie dank neuer Technologien im Umbruch begriffen [Gevers et al 2006]. So wird *Peptostreptococcus prevotii* auch als *Anaerococcus prevotii* bezeichnet; sowie *Staphylococcus saccharolyticus* ehemals als *Peptococcus saccharolyticus* geführt wurde.

Desweiteren haben Tunney et al 2008 bei der Identifikation von obligaten Anaerobiern Selektivnährböden mit Antibiotikazugabe genutzt, so dass Kanamycin- oder Vancomycin-sensible Stämme selektiert wurden. In dieser Studie hingegen wurden Nährböden verwendet, die allen obligaten Anaerobiern gute Wachstumsbedingungen bieten.

Auch die Identifikation von obligaten Anaerobiern selbst birgt einige Probleme. Es gilt, fakultative Anaerobier und mikroaerophile Bakterien herauszufiltern. Besonders langsam wachsende oder sehr empfindliche Bakterien können leicht übersehen werden. Auch das Einfrieren von Sputumproben schadet vielen obligat anaeroben Bakterien. Die Doppeluntersuchungen der eingefrorenen Sputumproben zeigen, dass nach Einfrieren der Sputumproben keine dem ursprünglichen Befund entsprechende Ergebnisse mehr erzielt werden können. Es ist von großer Bedeutung für die Aussagekraft der Ergebnisse, die Sputumproben sofort zu bearbeiten. In dieser Studie wurden die Sputumproben innerhalb einer Stunde nach Gewinnung bearbeitet. Somit konnte mit genauen Identifikations- und Quantifikationsergebnissen gerechnet werden. In anderen Studien wurden unter Umständen schon einmal eingefrorenen Proben verwendet und somit ein anderes Keimspektrum gefunden. Zudem ist die Identifikation mit dem RapID ANA II System und mit anderen biochemischen Identifikationssystemen nicht immer zuverlässig. Diese fünf Punkte können die Unterschiede in der Keimidentifikation in den verschiedenen Studien erklären.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich zwar definitiv obligate Anaerobier im Sputum von CF-Patienten befinden und auch verschiedene Genera identifiziert werden können. Eine genaue Identifikation der Spezies ist vor dem genannten Hintergrund allerdings nicht sinnvoll. Deshalb wird in dieser Arbeit zusammenfassend von obligaten Anaerobiern gesprochen.

### 4.3 Nachweis obligater Anaerobier in hoher Keimzahl in der Lunge von CF-Patienten

Obligate Anaerobier im Sputum von CF-Patienten sind zum Zeitpunkt dieser Studie unseres Wissens noch nicht quantifiziert worden. So wurde zwar die Aussage gemacht, dass obligate Anaerobier im Sputum [Field et al 2005] und auch in der BAL-Flüssigkeit [Harris et al 2007] von CF-Patienten zu finden seien, aber in welcher Größenordnung sich die Keimzahlen der gefundenen Bakterien bewegten, war bislang unklar. Deshalb wurde in dieser Studie eine andere Methodik als in den genannten Studien angewandt, um obligat anaerobe Bakterien quantifizieren zu können. Besondere Bedeutung gewinnt dies vor dem Hintergrund des Argumentes der oralen Kontamination. So wurden obligate Anaerobier als orale Kontamination aus dem Oropharynx angesehen [Lee et al 2006; Boutaga et al 2006], da zur Identifikation rRNA der Bakterien genutzt wurde und somit schon kleinste Mengen an Bakterien nachgewiesen werden konnten. Zwar konnte bei Rogers [Rogers et al 2004] und Harris [Harris et al 2007] eine Aussage über die relative Häufigkeit von Bakteriengenera in einer Sputumprobe gemacht werden, allerdings wurden keine genauen Keimzahlen ermittelt.

In dieser Studie hingegen wurden sowohl fakultative als auch obligate Anaerobier in hohen Keimzahlen gefunden. Die Keimzahlen von obligaten und fakultativen Anaerobiern befinden sich in vergleichbaren Größenordnungen (fakultative Anaerobier:  $5,8 \times 10^7 \pm 8,8 \times 10^7$  KBE/ml; obligate Anaerobier:  $1,5 \times 10^7 \pm 3,1 \times 10^7$  KBE/ml).

Um eine orale Kontamination auszuschließen, wurde mit Rachenabstrichen die Passage des Sputums durch den Mund-Rachen-Raum simuliert. Die CF-Patienten husten das Sputum recht zügig aus, so dass es nicht lange im Oropharynx verweilt. Die Keimzahlen der obligaten Anaerobier der Rachenabstriche lagen signifikant unter den hohen Keimzahlen in den Sputumproben und es konnten in nur wenigen Proben (29%) überhaupt obligate Anaerobier identifiziert werden. Zwar werden in der Literatur Keimzahlen für den Oropharynx mit bis zu  $10^{12}$  Bakterien/ml Exsudat angegeben, aber diese Keimzahlen beziehen sich auf den Sulcus gingivalis [Hahn et al 2005]. Es ist nicht anzunehmen, dass große Zahlen von Bakterien des Sulcus gingivalis bei Passage des Mundraums in das Sputum gelangen. Die sehr hohen Keimzahlen von obligaten Anaerobiern im Sputum im Gegensatz zu den niedrigen Keimzahlen im Rachenabstrich sind somit beweisend für ihre Herkunft aus den unteren Luftwegen.

### 4.4 Obligate Anaerobier bei anderen Lungenerkrankungen

Es stellt sich die Frage, ob obligate Anaerobier auch bei anderen Lungenerkrankungen eine Rolle spielen oder ob die Besiedlung mit diesen Bakterien auf Lungen der CF-

Patienten beschränkt ist. Die gesunde Lunge ist steril. Bakterien, die in die Atemwege gelangen, werden durch mechanische Barrieren, mukoziliäre Clearance, humorale und zelluläre Abwehrmechanismen entfernt [Renz-Polster et al 2004]. Ausserdem kann davon ausgegangen werden, dass in der gesunden Lunge keine anaeroben Bereiche zu finden sind und somit anaerobe Bakterien ungünstige Wachstumsbedingungen vorfinden.

In einem ml bronchoalveolärer Lavage von nicht CF-erkrankten Kindern befanden sich in fünf von sechs Proben keine obligaten Anaerobier. Diese fünf Proben waren Proben von Patienten mit akuten Lungenerkrankungen. Der Patient mit dem positiven Befund litt an einer chronisch rezidivierenden Pneumonie mit eitrigem Sekret. Es handelt sich also um eine chronische Lungenerkrankung mit Mucus-Bildung. Es ist denkbar, dass auch bei anderen chronischen Lungenerkrankungen obligate Anaerobier zu finden sind, z.B. bei der COPD des Rauchers, wo Sputumbildung und Anaerobiosis wie beim CF-Patienten wahrscheinlich eine Rolle spielen. Spezifische Antikörper gegen *Pr. intermedia* und *Fusobacterium nucleatum* sind bei Exazerbationen von chronischen Bronchitiden gefunden worden [Brook 2002], was für eine Besiedlung der Lungen dieser Patienten mit obligaten Anaerobiern spricht. Auch in BAL-Flüssigkeit von COPD-Patienten wurden obligate Anaerobier der Genera *Prevotella*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium* und *Veillonella* kultiviert [Chylak et al 2002].

Entscheidend für das Vorkommen von obligaten Anaerobiern sind also anaerobe Verhältnisse in Teilen der Lunge, z.B. in Mucusplaques. Dies lässt den Schluss zu, dass bei akuten Lungenerkrankungen obligate Anaerobier als pathogene Bakterien keine Rolle spielen, wahrscheinlich aber bei anderen chronischen Lungenerkrankungen.

### **4.5 Einfluss von i.v. Antibiosen auf Bakterienzahl und Inflammationsreaktion in CF-Patienten-Lungen**

Die Keimzahlen der fakultativen Anaerobier nahmen nach einer i.v. Therapie über 14 Tage nicht signifikant ab. Die Abnahme der Keimzahlen wäre zu erwarten, da die Antibiose auf die jeweiligen fakultativen Anaerobier und ihre Resistenzen abgestimmt war. Auch die Keimzahlen der obligaten Anaerobier unterschieden sich nach einer i.v. Therapie nicht von den vor Therapie bestimmten Keimzahlen. Da der Einfluss der obligaten Anaerobier auf die Lungenerkrankung von CF-Patienten noch weitgehend unklar ist, wäre sowohl ein Abfall, als auch ein Anstieg der Keimzahlen der obligaten Anaerobier denkbar gewesen.

Trotzdem profitieren die CF-Patienten von einer i.v. Antibiose. So nimmt zum Beispiel die FEV1 (Einsekundenkapazität) der Lunge nach der i.v. Antibiose signifikant zu

[Chiron et al 2008], was ein Zeichen von verbesserter Lungenfunktion ist [Ren et al, 2006]. Im Sputum von CF-Patienten werden häufig subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen gemessen [Moriarty et al 2007], wahrscheinlich weil Antibiotika unter anaeroben Verhältnissen schlechter wirksam sind [Borriello et al 2004; Park 1992]. Trotzdem wäre es denkbar, dass die Antibiotika auf Bakterien, die sich am Rande der Mucusplaques befinden, wirken können. Dort befindet sich noch Sauerstoff, die Antibiotika sind noch potent und neutrophile Granulozyten können Sauerstoffradikale bilden, um Bakterien zu zerstören. Zudem befinden sich die fakultativen Anaerobier an der Oberfläche der Mucusplaques noch im aeroben Metabolismus und haben somit noch keine Makrokolonien aus Alginate gebildet und sind noch nicht so gut vor der Phagozytose durch immunologische Zellen geschützt [Hassett 1996; Matsui et al 2005; Leid et al 2005]. Die Eindringtiefe von Sauerstoff in den Mucus von CF-Patienten ist allerdings nicht sehr tief [Worlitzsch et al 2002], und im Inneren des Mucus können Antibiotika und Entzündungszellen ihre Wirkung nur noch abgeschwächt entfalten.

Möglicherweise wird durch die Abnahme der Bakterienzahlen im äußeren Bereich des Mucus die Inflammationsreaktion des Körpers auf die Infektion gedämpft, da keine neue Aktivierung von neutrophilen Granulozyten erfolgt. Die Antibiose würde also zu einer verminderten Inflammationsreaktion und nicht zu einer nennenswerten Keimzahlreduktion führen, und somit würde sich die positive Wirkung der i.v. Therapie erklären lassen.

Ein spezifischer Entzündungsmarker zur Überprüfung dieser Hypothese ist noch nicht gefunden worden [Sagel et al 2007; Downey et al 2007]. Es wurden aber schon mehrere Entzündungsmediatoren in Zusammenhang mit Exazerbationen gemessen [Downey et al 2007]. Beispielsweise spielt IL-8 als Zytokin, welches neutrophile Granulozyten aktiviert, eine zentrale Rolle im inflammatorischen Prozess der Lungenentzündung bei CF. So wird postuliert, dass Varianten des IL-8 Gens bei CF-Patienten zu einer unterschiedlich starken Inflammationsreaktion führen [Hillian et al 2008]. Die Ursache für die vermehrte Inflammationsreaktion wäre also in einem CF- assoziierten Gendefekt zu finden. Auch oxidativer Stress in der CF- Lunge soll durch vermehrte Acetylierung zu einer erhöhten Transkriptionsrate von proinflammatorischen Genen wie dem von IL-8 führen [Bartling and Drumm 2008]. Allerdings ist die Forschung auf dem Gebiet der Inflammation bei der CF-Lungenentzündung sehr vielfältig und einheitliche Ergebnisse konnten noch nicht ermittelt werden.

#### 4.6 Bedeutung obligater Anaerobier für die CF-spezifische Lungen-erkrankung

Die Pathogenität von obligaten Anaerobiern ist noch nicht umfassend geklärt. Allerdings werden obligate Anaerobier immer wieder für schwerwiegende Erkrankungen, wie z.B. Endokarditiden und Septikämien verantwortlich gemacht [Brook and Frazier 2003]. In dieser Studie wird ein möglicher Ansatz zur Frage der Pathogenität von obligaten Anaerobiern am Beispiel von *Pr. intermedia* untersucht. *Pr. intermedia* wurde zwar durch das RapID ANA II System im Sputum der Studienteilnehmer nicht gefunden. Auch andere Prevotella-Arten wurden nur dreimal gefunden. Prevotella-Stämme wurden aber in einigen Studien zu obligaten Anaerobiern im Sputum von CF-Patienten gefunden [Tunney et al 2008; Rogers et al 2005; Harris et al 2007], und die Bakterien-spezies ist aus den oben genannten Gründen nicht vordergründig von Bedeutung. Zudem wurde in dieser Studie der ATCC Stamm Nr. 25611 von *Pr. intermedia* gewählt. ATCC-Stämme sind gut definiert, somit vergleichbar und die Ergebnisse können reproduziert werden.

Die *in vitro* Versuche geben einen Hinweis auf einen Einfluss von *Pr. intermedia* auf das Wachstum von *P. aeruginosa*. So wurden signifikant höhere Keimzahlen von *P. aeruginosa* bei gemeinsamem Wachstum von *P. aeruginosa* mit *Pr. intermedia* gezählt. Nach 24 Stunden Wachstum hob sich der Unterschied wieder auf, was wahrscheinlich auf das Erreichen der stationären Wachstumsphase zurückzuführen ist. Da es sich um eine relativ grobe Untersuchungsmethode handelt, sind weitere Untersuchungen notwendig, um diese Ergebnisse zu festigen. Der *Pr. intermedia*-Überstand hingegen und somit seine Stoffwechselprodukte, hatte in dieser Studie keinen sichtbaren Einfluss auf das Wachstum von *P. aeruginosa*.

Diese Ergebnisse lassen einen Wachstumsvorteil von *P. aeruginosa* bei Gegenwart von obligaten Anaerobiern vermuten. Trotzdem ist nicht auszuschließen, dass das Wachstum von *P. aeruginosa in vivo* durch obligate Anaerobier auch negativ oder gar nicht beeinflusst werden könnte.

Um die Pathogenität von obligaten Anaerobiern in der Lunge von CF-Patienten weiter zu erforschen, bieten sich mehrere Ansätze an:

Eine verstärkte Inflammationsreaktion [Konstan 2008; Nichols and Chmiel 2008; Armstrong et al 1997] könnte auch durch obligate Anaerobier ausgelöst werden. Es wurde zeitweise postuliert, dass erhöhte Inflammationsmarker (IL-8, hohe neutrophile Granulozytenzahlen etc.) in direktem Zusammenhang mit dem Gendefekt bei CF stehen, da auch bei Patienten mit negativen Bakterienkulturen höhere Entzündungsmarker als in der Kontrollgruppe gemessen wurden [Khan et al 1995]. Dementsprechend

wurde davon ausgegangen, dass es bei CF zu einer Lungeninflammation auch ohne Infektion kommt. Es wurden aber nur CF- assoziierte Bakterien kultiviert und keine obligaten Anaerobier [Khan et al 1995]. Es gibt auch Autoren, die die Inflammation nur als Reaktion auf eine Infektion mit Bakterien betrachten [Armstrong et al 1997]. Diese These wird durch die vorliegende Arbeit unterstützt, da gezeigt werden konnte, dass es sich bei der Lungenerkrankung von CF-Patienten um eine, vor allem im Hinblick auf obligate Anaerobier, polybakterielle Erkrankung handelt. In unserer Studie wurden in allen 79 Sputumproben fakultative oder obligate Anaerobier gefunden, dementsprechend könnten wahrscheinlich auch bei allen Patienten erhöhte Inflammationsmarker gemessen werden.

Möglich wäre aber auch, dass auf eine Besiedlung der CF- Lunge mit fakultativ pathogenen Bakterien eine verstärkte Inflammationsreaktion auf Grund der genetischen Erkrankung folgt. Immunologische Abwehrmechanismen könnten durch Anaerobiosis und Makrokoloniebildung behindert werden und die Atemwegs- schädigende Inflammation durch verstärkte Entzündungsmediatorbildung und abgeschwächte anti-inflammatorische Reaktionen verstärkt werden. Selbst eine heruntergeregelte Expression des CFTR-Gens unter Anaerobiosis konnte demonstriert werden [Guimbellot et al 2008].

Im Rahmen der Immunmodulation könnten obligate Anaerobier bestimmte Botenstoffe (Chemokine) produzieren, die Entzündungszellen anlocken. Eine Hemmung von Entzündungszellen oder die Induktion von Apoptose dieser Zellen durch Stoffwechselprodukte von obligaten Anaerobiern wäre auch denkbar. Um immunologische Mechanismen zu untersuchen, könnten Entzündungsparameter von CF-Patienten erfasst werden und ein möglicher Zusammenhang mit dem Vorkommen von obligaten Anaerobiern untersucht werden. Als Entzündungsparameter werden häufig die Zahlen neutrophiler Granulozyten, IL-8-Level und die Level der neutrophilen Elastase bestimmt [Khan et al 1995]. Der Einfluss von obligaten Anaerobiern auf Entzündungszellen könnte z.B. mit Hilfe von Zellkulturen erforscht werden.

Es wäre möglich, dass obligate Anaerobier besondere Pathogenitätsfaktoren bilden. So könnten bestimmte Exotoxine oder Enzyme eine Rolle für die Pathogenität von obligaten Anaerobiern spielen. Z. B. bilden Stämme von *Pr. intermedia* elastolytische Proteasen [Yanagisawa et al 2006; Shibata et al 2003]. Insbesondere ist die Bildung von Polysacchariden und somit von Makrokolonien, wie bei *P. aeruginosa* beobachtet, denkbar. Einige *Actinomyces spp.* sind in der Lage, Biofilme zu bilden [Nair et al 2008].

#### 4 Diskussion

---

Damit wären auch obligate Anaerobier vor Phagozytose durch immunologische Zellen und vor Antibiotika geschützt.

Zudem ist die Wirkung von verschiedenen Medikamenten, die CF-Patienten einnehmen und inhalieren auf obligate Anaerobier noch unklar. Auch die Antibiotikaempfindlichkeit von obligaten Anaerobiern ist von Interesse, um z.B. i.v. Therapien zu optimieren. Zudem könnte die Selektion von antibiotikaresistenten obligaten Anaerobiern zu späteren Therapieproblemen führen. Fakultative Anaerobier könnten ihre Resistenzen auch an obligate Anaerobier weitergeben (horizontaler Gentransfer).

Eventuell dämpfen obligate Anaerobier die Infektion mit fakultativen Anaerobiern ein. Stoffwechselprodukte von obligaten Anaerobiern oder Bakterientoxine könnten das Wachstum von fakultativen Anaerobiern hemmen und so könnten fulminante Infektionen vermieden werden.

Um zu untersuchen, ob obligate Anaerobier das Wachstum von fakultativen Anaerobiern beeinflussen wären weitere Studienmodelle denkbar. Ein Maus-Modell würde die Verhältnisse *in vivo* repräsentieren können und ein Einfluss von obligaten Anaerobiern auf z.B. *P. aeruginosa* könnte besser erfasst werden.

Wahrscheinlich spielen alle genannten Faktoren in die Pathogenitätsmechanismen hinein. Verschiedene Bakteriengenera und -spezies werden unterschiedliche Mechanismen nutzen, um ihre Pathogenität zu entfalten, andere Bakteriengenera werden nur einen geringfügig pathogenen Einfluss hervorrufen oder protektiv gegen überschießende Infektionen mit fakultativen Anaerobiern wirken.

## 5 Zusammenfassung

Die chronische Lungenentzündung bei Patienten mit zystischer Fibrose wird hauptsächlich für die stark verringerte Lebenserwartung dieser Patienten verantwortlich gemacht. Es wurden bisher einige wenige fakultativ anaerobe Bakterien als Erreger der chronischen Lungenentzündung angesehen. Nachgewiesene obligat anaerobe Bakterien wurden als Kontamination aus dem Mund-Rachen-Raum angesehen.

Nachdem aber sauerstofffreie Bereiche im Mucus von CF-Patienten festgestellt wurden, führte die Suche nach obligat anaerobe Bakterien zu deren Nachweis im Sputum und auch in der Bronchiallavage von CF-Patienten. Erkenntnisse über das Bakterienspektrum bei der Lungeninfektion von CF-Patienten und Wissen über die Pathogenitätsmechanismen dieser Bakterien sind entscheidend für die Therapie dieser Infektion. Auch die Einflüsse von bakteriellen Infektionen auf die Inflammationsreaktionen in der Lunge von CF-Patienten stellen wichtige Grundlagen für die weitere Erforschung von Therapieansätzen dar.

In der vorliegenden Studie wurden obligate Anaerobier in 79 Sputumproben von 38 CF-Patienten mit dem RapID Ana II-System identifiziert und mit Verdünnungsreihen quantifiziert. Durch die Keimzählermittlung obligater Anaerobier in Rachenabstrichen von CF-Patienten wurde die Theorie der oralen Kontamination untersucht. Weiterhin wurden die Keimzahlen von obligaten und fakultativ anaeroben Bakterien vor und nach einer Antibiotikatherapie ermittelt.

Zudem wurde ein möglicher Ansatz zur Pathogenität von obligaten Anaerobiern am Beispiel von *Prevotella intermedia* entwickelt. Es wurde das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* und *Pr. intermedia* untersucht und mögliche Wechselwirkungen wurden durch gemeinsame Bebrütung festgestellt. Hierzu wurden die Wachstumskurven von *P. aeruginosa* und *Pr. intermedia* bei separatem sowie bei gemeinsamem Wachstum ermittelt. Um den Einfluss von Stoffwechselprodukten von *Pr. intermedia* auf das Wachstum von *P. aeruginosa* zu untersuchen, wurde *P. aeruginosa* mit *Pr. intermedia* Überstand bebrütet.

Bei 86,9% der 38 Patienten konnten mindestens einmal obligate Anaerobier im Sputum identifiziert werden. Die häufigsten gefundenen obligaten Anaerobier waren *Staphylococcus saccharolyticus* (29,6%), *Peptostreptococcus* spp. (13,9%),

## 5 Zusammenfassung

---

*Clostridium spp.* (10,4%), *Veillonella spp* (9,6%) und *Actinomyces spp* (8,7%). Es wurden in 79 Sputumproben hohe Keimzahlen von fakultativen Anaerobiern ( $5,8 \times 10^7 \pm 8,8 \times 10^7$  KBE/ml) und obligaten Anaerobiern ( $1,6 \times 10^7 \pm 3,1 \times 10^7$  KBE/ml) gezählt. Eine orale Kontamination konnte durch den Vergleich mit Keimzahlen von Rachenabstrichen von sieben CF-Patienten ( $1,0 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^4$  KBE/ml) ausgeschlossen werden. Zudem wurden nur bei 31% dieser Rachenabstriche überhaupt obligate Anaerobier gefunden.

Vor und nach 14tägiger i.v. Antibiose konnte keine signifikante Keimzahländerung bei acht CF-Patienten festgestellt werden. Dies galt sowohl für die Keimzahlen der fakultativen, als auch der obligaten Anaerobier. Möglicherweise ist die Wirkung dieser Therapie auf eine verminderte Inflamationsreaktion nach Antibiotikagabe zurückzuführen.

Die Besiedlung mit obligat aneroben Bakterien erfolgt offenbar schon im Kindesalter. Bei 66% der untersuchten Sputumproben pädiatrischer CF- Patienten wurden obligat anerobe Bakterien in hohen Keimzahlen nachgewiesen.

Bei akuten Lungenerkrankungen spielen obligate Anaerobier offenbar keine Rolle. Nur bei chronischen Lungenerkrankungen mit Sputumproduktion sind obligate Anaerobier zu finden. So konnten in fünf von sechs BAL-Flüssigkeiten von Kindern ohne CF keine obligaten Anaerobier nachgewiesen werden. Lediglich bei dem sechsten Patient (er hatte eine chronisch rezidivierende Pneumonie mit Sekretbildung) fanden sich obligate Anaerobier in niedrigen Keimzahlen.

Der Einfluss obligater Anaerobier auf die chronische Lungeninfektion der CF-Patienten ist weiterhin unklar. In dieser Studie fand sich ein Hinweis, dass obligate Anaerobier möglicherweise das Wachstum von *P. aeruginosa* fördern. Es fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den Wachstumskurven von *P. aeruginosa* mit und ohne *Pr. intermedia*. Womöglich hat *P. aeruginosa* einen Wachstumsvorteil in Anwesenheit von *Pr. intermedia*.

Weitere Studien könnten zeigen, ob obligate Anaerobier die Inflamationsreaktion in den Lungen von CF-Patienten beeinflussen. Außerdem ist die Produktion von Pathogenitätsfaktoren von obligaten Anaerobiern, z.B. Enzyme oder Exotoxine noch wenig erforscht.

## 6 Literatur

Armstrong DS, Grimwood K, Carlin JB, Carzino R, Gutierrez JP, Hull J, Olinsky A, Phelan EM, Robertson CF, Phelan PD (1997) Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 1197-204

Bartling TR, Drumm ML (2008) Oxidative Stress Causes IL8 Promoter Hyperacetylation in Cystic Fibrosis Airway Cell Models. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40: 58-65

Borriello G, Wegner E, Roe F, Kim AM, Ehrlich GD, Stewart PS (2004) Oxygen limitation contributes to Antibiotic Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 2659-64

Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul, PHM (2005) Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol* 45: 191-9

Bragonzi A, Worlitzsch D, Pier GB, Timpert P, Ulrich M, Hentzer M, Andersen JB, Givskov M, Conese M, Doring G (2005) Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* expresses alginate in the lungs of patients with cystic fibrosis and in a mouse model. *J Infect Dis* 192: 410-9

Brook I, Frazier EH (2003) Immune response to *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella intermedia* in the sputum of patients with acute exacerbation of chronic bronchitis. *Chest* 124: 832-3

Brook I (2002) Endocarditis due to anaerobic bacteria. *Cardiology* 98: 1-5

Cescutti P, Bosco M, Picotti F, Impallomeni G, Leitao JH, Richau JA, et al (2000) Structural study of the exopolysaccharide produced by a clinical isolate of *Burkholderia cepacia*. *Biochem Biophys Res Com* 273: 1088-94

Chiron R, Grumbach YY, Quynh NV, Verriere V, Urbach V (2008) Lipoxin A(4) and interleukin-8 levels in cystic fibrosis sputum after antibiotherapy. *J Cyst Fibros* 7: 463-8

## 6 Literatur

---

Chmiel JF, Berger M, Konstan MW (2002) The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 23: 5-27

Chylak J, Michalska W, Paul M, Wengerek-Koczkowska M, Mynarczyk W (2002) Bacterial flora from bronchoalveolar lavage and occurrence of class IgG and IgA antibodies to *Chlamydia pneumoniae* in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) *Med Dosw Mikrobiol* 54: 259-64

Ciofu O, Lee B, Johannesson M, Hermansen NO, Meyer P, Høiby N (2008) Investigation of the algT operon sequence in mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 115 Scandinavian patients with cystic fibrosis and in 88 in vitro non-mucoid revertants. *Microbiology* 154: 103-13

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

Downey DG, Brockbank S, Martin SL, Ennis M, Elborn JS (2007) The effect of treatment of cystic fibrosis pulmonary exacerbations on airways and systemic inflammation. *Pediatr Pulmonol* 42: 729-35

European Respiratory Society (2000) Bronchoalveolar lavage in children. ERS Task Force on bronchoalveolar lavage in children. *Eur Respir J* 15: 217-31

Field TR, McDowell A, Patrick S, Elborn JS, Tunney MM (2005) Detection of anaerobic bacteria in the sputum of patients with Cystic Fibrosis. *J Cyst Fibros* 4: 44

Gevers D, Dawyndt P, Vandamme P, Willems A, Vancanneyt M, Swings J, De Vos P (2006) Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1911-6

Gibson R L, Burns J L, Ramsey B W (2003) Pathophysiology and Management of Pulmonary Infections in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 918-51

Gilligan PH (1991) Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 4: 35-51

## 6 Literatur

---

Guimbellot JS, Fortenberry JA, Siegal GP, Moore B, Wen H, Venglarik C, Chen YF, Oparil S, Sorscher EJ, Hong JS (2008) Role of Oxygen in Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Expression and Function. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39: 514-21

Hahn, Falke, Kaufmann, Ullman: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 5.Aufl. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2005, S.349-351.

Harris JK, Groote De MA, Sagel SD, Zemanick ET, Kapsner R, Penvari C, Kaess H, Detering RR, Accurso FJ, Pace NR (2007) Molecular identification of bacteria in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *PNAS* 104: 20529-33

Hassett DJ (1996) Anaerobic production of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*: alginate restricts diffusion of oxygen. *J Bacteriol* 178: 7322-5

Hill D, Rose B, Pajkos A, Robinson M, Bye P, Bell S, et al (2005) Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. *J Clin Microbiol* 43: 5085-90

Hillian AD, Londono D, Dunn JM, Goddard KA, Pace RG, Knowles MR, Drumm ML (2008) Modulation of cystic fibrosis lung disease by variants in interleukin-8. *Genes Immun* 9: 501-8

<http://genet.sickkids.on.ca/cftr/>, 2008

<http://www.bd.com/ds/productCenter/221734.asp>, 2008

<http://www.biomerieux-diagnostics.com>, 2008

[http://www.heipha.de/db/files/313e-1-0210\\_Brain-Heart-Infusion-Agar.pdf](http://www.heipha.de/db/files/313e-1-0210_Brain-Heart-Infusion-Agar.pdf), 2010

Hughes FJ, McNab R (2008) Oral malodour--a review. *Arch Oral Biol* 53: 1-7

Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW (1995) Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 151: 1075-82

## 6 Literatur

---

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, jr. editors: Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6. Aufl. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, New York, 2005

Konstan MW (2008) Dornase alfa and progression of lung disease in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 43: 24-8

Lee Y, Straffon LH, Welch KB, Loesche WJ (2006) The transmission of anaerobic periodontopathic organisms. *J Dent Res* 85: 182-6

Leid JG, Willson CJ, Shirliff ME, Hassett DJ, Parsek MR, Jeffers AK (2005) The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. *J Immunol* 175: 7512-8

Logan SR: Physical chemistry for the biomedical sciences. Taylor & Francis. London, United Kingdom, 1998, pp 251ff.

Mai GT , Seow WK , Pier GB , McCormack JG , Thong YH (1993) Suppression of lymphocyte and neutrophil functions by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide (alginate): reversal by physicochemical, alginase, and specific monoclonal antibody treatments. *Infect Immun* 61: 559-64

Marler L M, Siders J A, Wolters L C, Pettigrew Y, Skitt B L, Allen S D (1991) Evaluation of the new RapID-ANA II system for the identification of clinical anaerobic isolates. *J Clin Microbiol* 29: 874-8

Matsui H, Verghese M W, Kesimer M, Schwab U E, Randell S H, Sheehan J K, Grubb B R, Boucher R C (2005) Reduced Three-Dimensional Motility in Dehydrated Airway Mucus Prevents Neutrophil Capture and Killing Bacteria on Airway Epithelial Surfaces. *J Immunol* 175: 1090-9

Mayer-Hamblett N, Aitken ML, Accurso FJ, Kronmal RA, Konstan MW, Burns JL, Sagel SD, Ramsey BW (2007) Association between pulmonary function and sputum biomarkers in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 175: 822-8

## 6 Literatur

---

Moore ZS, Jerris RC, Hilinski JA (2008) High prevalence of inducible clindamycin resistance among *Staphylococcus aureus* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 7: 206-9

Moriarty TF, McElroy JC, Elborn JS, Tunney MM (2007) Sputum antibiotic concentrations: implications for treatment of cystic fibrosis lung infection. *Pediatr Pulmonol* 42: 1008-17

Nair PN, Brundin M, Sundqvist G, Sögren U (2008) Building biofilms in vital host tissues: a survival strategy of *Actinomyces radicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 106: 595-603

Nichols D, Chmiel J, Berger M (2008) Chronic inflammation in the cystic fibrosis lung: alterations in inter- and intracellular signaling. *Clin Rev Allergy Immunol* 34: 146-62

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: 720-40

Petit-Bertron AF, Tabary O, Corvol H, Jacquot J, Cement A, Cavaillon JM, Adib-Conquy M (2008) Circulating and airway neutrophils in cystic fibrosis display different TLR expression and responsiveness to interleukin-10. *Cytokine* 41: 54-60

Pierre M, Le Berre R, Tiesset H, Faure K, Guery B, Desseyn JL, Galabert C, Baghin L, Beermann C, Gottrand F, Husson MO (2008) Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* virulence gene expression during chronic lung infection in the murine model. *Med Mal Infect* 38: 318-23

Ratjen F, Döring G (2003) Cystic fibrosis. *Lancet* 361: 681-9

Ren CL, Brucker JL, Rovitelli AK, Bordeaux KA (2006) Changes in lung function measured by spirometry and the forced oscillation technique in cystic fibrosis patients undergoing treatment for respiratory tract exacerbation. *Pediatr Pulmonol* 41: 345-9

Renz-Polster, Krautzig, Braun Basislehrbuch Innere Medizin. 3. Aufl, Urban&Fischer Verlag, Elsevier GmbH, München, S.422-432

## 6 Literatur

---

Rogers GB, Carroll MP, Connett GJ, Serisier DJ, Hockey PM, Kehagia V, Jones GR, Bruce KD (2005) Bacterial community diversity in the CF lung. *Pediatr Pulmonol* 28: 95-97

Rogers GB, Carroll MP, Serisier DJ, Hockey PM, Jones G, Bruce KD (2004) Characterization of bacteria community diversity in cystic fibrosis lung infections by use of 16S ribosomal DNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *J Clin Microbiology* 42: 5176-83

Sagel SD, Chmiel JF, Konstan MW (2007) Sputum biomarkers of inflammation in cystic fibrosis lung disease. *Proc Am Thorac Soc* 4: 406-17

San Gabriel P, Zhou J, Tabibi S, Chen Y, Trauzzi M, Saiman L (2004) Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 168-71

Schreiber K, Krieger R, Benkert B, Eschbach M, Arai H, Schobert M, Jahn D (2007) The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration. *J Bacteriol* 189: 4310-4

Shibata Y, Miwa Y, Hirai K, Fujimura S (2003) Purification and partial characterization of a dipeptidyl peptidase from *Prevotella intermedia*. *Oral Microbiol Immunol* 18: 96-8

Sibley CD, Rabin H, Surette MG (2006) Cystic fibrosis: a polymicrobial infectious disease. *Future Microbiol* 1: 53-61

Simpson JA, Smith SE, Dean RT (1989) Scavenging by alginate of free radicals released by macrophages. *Free Radic Biol Med* 6: 347-53

Sousa SA, Ulrich M, Bragnozi A, Burke M, Worlitzsch D, Leitao JH, et al (2007) Virulence of *Burkholderia cepacia* complex strains in *gp91<sup>phox-/-</sup>* mice. *Cell Microbiol* 9: 2817-25

Taccetti G, Campana S, Festini F, Mascherini M, Döring G (2005) Early eradication therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 26: 458-61

## 6 Literatur

---

Taylor L, Corey M, Matlow A, Sweezey NB, Ratjen F (2006) Comparison of throat swabs and nasopharyngeal suction specimens in non-sputum-producing patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 41: 839-43

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

Ulrich M, Bastian M, Cramton S, Ziegler K, Pragman AA, Bragnozi A, et al (2007) The staphylococcal respiratory response regulator SrrAB induces ica gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions. *Mol Microbiol* 65: 1276-87

Valerius NH, Koch C, Høiby N (1991) Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in cystic fibrosis by early treatment. *Lancet* 338: 725-6

Worlitzsch D, Knoll M, Dürr M, Borneff-Lipp M (2006) Mikrobiologische Pathomechanismen der *Pseudomonas aeruginosa*-Lungeninfektion bei Patienten mit Cystischer Fibrose. *Hyg Med* 4: 161-6

Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, Birrer P, Bellom G, Berger J, Weiss T, Botzenhart 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: 317-25

Yanagisawa M, Kuriyama T, Williams DW, Nakagawa K, Karasawa T (2006) Proteinase activity of *Prevotella* species associated with oral purulent infection. *Curr Microbiol* 52: 375-8

Yoon SS, Hennigan RF, Hilliard GM, Ochsner UA, Parvatiyar K, Kamani MC, et al (2002) *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationship to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev Cell* 3: 593-603

Zhou J, Garber E, Saiman L (2008) Survey of infection control policies for patients with cystic fibrosis in the United States. *Am J Infect Control* 36: 220-2

## 7 Anhang

Tabelle 6: Keimzahlen und Bakterienarten von 79 Sputumproben von 38 CF-Patienten. K: Kinder

<u>Probe Nr.</u>	<u>fakultative Anaerobier</u>	<u>Keimzahl</u>	<u>Summe fakultative Anaerobier/ Probe</u>	<u>Obligate Anaerobier</u>	<u>Keimzahl</u>	<u>Summe obligate Anaerobier/Probe</u>
70	P. aeruginosa	9,00X10 <sup>6</sup>	<b>9,00X10<sup>6</sup></b>	L. jensenii	3,00X10 <sup>6</sup>	<b>8,00X10<sup>6</sup></b>
				Capnocytophaga sp	2,00X10 <sup>6</sup>	
				C. hastiforme	2,00X10 <sup>6</sup>	
				Mob. curtisii	1,00X10 <sup>6</sup>	
32	P. aeruginosa	2,00X10 <sup>8</sup>	<b>2,60X10<sup>8</sup></b>			
	S. aureus	6,00X10 <sup>7</sup>				
37	P. aeruginosa	4,00X10 <sup>7</sup>	<b>8,00X10<sup>7</sup></b>			
	S. aureus	4,00X10 <sup>7</sup>				
60	P. aeruginosa	6,00X10 <sup>7</sup>	<b>6,80X10<sup>7</sup></b>			
	S. aureus	8,00X10 <sup>6</sup>				
82	P. aeruginosa	2,50X10 <sup>7</sup>	<b>3,50X10<sup>7</sup></b>			
	S. aureus	1,00X10 <sup>7</sup>				
111	P. aeruginosa	3,00X10 <sup>8</sup>	<b>3,10X10<sup>8</sup></b>			
	S. aureus	1,00X10 <sup>7</sup>				
52	P. aeruginosa	5,00X10 <sup>6</sup>	<b>5,00X10<sup>6</sup></b>	Veillonella spp	2,00X10 <sup>6</sup>	<b>4,60X10<sup>6</sup></b>
				Ps. prevotii	1,00X10 <sup>6</sup>	
				Gemella morbillorum	1,00X10 <sup>6</sup>	
				S. saccharolyticus	6,00X10 <sup>5</sup>	
61	S. maltophilia	1,20X10 <sup>8</sup>	<b>1,20X10<sup>8</sup></b>	S. saccharolyticus	1,00X10 <sup>6</sup>	<b>2,00X10<sup>6</sup></b>
				Clostridium sp	1,00X10 <sup>6</sup>	
94	P. aeruginosa	1,00X10 <sup>7</sup>	<b>1,05X10<sup>7</sup></b>	S. saccharolyticus	5,00X10 <sup>5</sup>	<b>5,50X10<sup>6</sup></b>
	Strept. spp	5,00X10 <sup>5</sup>		Mob. mulieris	5,00X10 <sup>6</sup>	
97	S. aureus	2,00X10 <sup>6</sup>	<b>2,00X10<sup>6</sup></b>			
38	S. aureus	2,00X10 <sup>7</sup>	<b>2,00X10<sup>7</sup></b>			
40	S. aureus	3,00X10 <sup>6</sup>	<b>3,00X10<sup>6</sup></b>	Ps. prevotii	3,00X10 <sup>5</sup>	<b>3,00X10<sup>5</sup></b>
43	S. aureus	6,00X10 <sup>5</sup>	<b>6,00X10<sup>5</sup></b>	Ps. prevotii	3,00X10 <sup>5</sup>	<b>3,00X10<sup>5</sup></b>
83	S. aureus	3,00X10 <sup>7</sup>	<b>3,00X10<sup>7</sup></b>	S. saccharolyticus	1,00X10 <sup>6</sup>	<b>1,00X10<sup>6</sup></b>
91	Strept. spp	1,50X10 <sup>8</sup>	<b>1,52X10<sup>8</sup></b>	S. saccharolyticus	1,00X10 <sup>6</sup>	<b>1,50X10<sup>6</sup></b>
	Strept. spp	1,50x10 <sup>6</sup>		Fusobacterium sp	5,00X10 <sup>5</sup>	
	Stomatococcus mucilaginosus/ Andere	5,00X10 <sup>5</sup>				
34	S. epidermidis/ Andere	9,00X10 <sup>7</sup>	<b>9,00X10<sup>7</sup></b>	A. odontolyticus	2,00X10 <sup>5</sup>	<b>2,90X10<sup>6</sup></b>
				E. limosum	9,00X10 <sup>5</sup>	
87			<b>2,00X10<sup>7</sup></b>	A. odontolyticus	1,00X10 <sup>5</sup>	<b>1,40X10<sup>6</sup></b>
	S. maltophilia	2,00X10 <sup>7</sup>		L. jensenii	4,00X10 <sup>5</sup>	
99	Klebsiella pneumoniae/ Andere	5,00X10 <sup>6</sup>	<b>7,50X10<sup>6</sup></b>	S. saccharolyticus	5,00X10 <sup>6</sup>	<b>6,00X10<sup>6</sup></b>
	S. aureus	5,00X10 <sup>5</sup>		Mob. mulieris	1,00X10 <sup>6</sup>	
	Strept. spp	2,00X10 <sup>6</sup>				

## 7 Anhang

<u>Probe Nr.</u>	<u>fakultative Anaerobier</u>	<u>Keimzahl</u>	<u>Summe fakultative Anaerobier/Probe</u>	<u>Obligate Anaerobier</u>	<u>Keimzahl</u>	<u>Summe obligate Anaerobier/Probe</u>
112	P. aeruginosa	3,00X10 <sup>5</sup>	<b>1,30X10<sup>6</sup></b>	A. turicensis	4,00X10 <sup>7</sup>	<b>4,40X10<sup>6</sup></b>
	Strept. spp	1,00X10 <sup>6</sup>		Veillonella spp	1,50X10 <sup>6</sup>	
				S. saccharolyticus	2,50X10 <sup>5</sup>	
81	S. aureus	5,00X10 <sup>6</sup>	<b>5,20X10<sup>6</sup></b>	S. saccharolyticus	2,00X10 <sup>5</sup>	<b>2,00X10<sup>6</sup></b>
	Strept. spp	2,00X10 <sup>5</sup>				
102	S. aureus	5,00X10 <sup>6</sup>	<b>1,25X10<sup>7</sup></b>	S. saccharolyticus	4,00X10 <sup>6</sup>	<b>1,35X10<sup>7</sup></b>
	Strept. spp	5,00X10 <sup>6</sup>		F. necrophorum	4,50X10 <sup>6</sup>	
	Strept. spp	2,50X10 <sup>6</sup>		Capnocytophaga sp	5,00X10 <sup>6</sup>	
46	S. auricularis/ Andere	2,00X10 <sup>6</sup>	<b>2,00X10<sup>6</sup></b>	Ps. prevotii	1,00X10 <sup>5</sup>	<b>1,00X10<sup>5</sup></b>
90	P. aeruginosa	2,00X10 <sup>7</sup>	<b>2,00X10<sup>7</sup></b>	S. saccharolyticus	2,50X10 <sup>5</sup>	<b>2,50X10<sup>5</sup></b>
57	P. aeruginosa	3,00X10 <sup>7</sup>	<b>3,00X10<sup>7</sup></b>			
85	P. aeruginosa	1,50X10 <sup>5</sup>	<b>8,10X10<sup>6</sup></b>	Prop. propionicus	5,00X10 <sup>6</sup>	<b>6,50X10<sup>6</sup></b>
	S. epidermidis/ Andere	4,00X10 <sup>6</sup>		Mob. curtisii	1,50X10 <sup>6</sup>	
	S. capitis/ Andere	4,50X10 <sup>5</sup>				
	Strept. spp	3,50X10 <sup>6</sup>				
69	P. aeruginosa	2,00X10 <sup>7</sup>	<b>2,00X10<sup>7</sup></b>	L. fermentum	1,00X10 <sup>6</sup>	<b>1,00X10<sup>6</sup></b>
78	P. aeruginosa	3,00X10 <sup>6</sup>	<b>3,00X10<sup>6</sup></b>			
98	P. aeruginosa	1,00X10 <sup>8</sup>	<b>1,00X10<sup>8</sup></b>		5,00X10 <sup>7</sup>	<b>1,01X10<sup>8</sup></b>
				C. perfringens	5,00X10 <sup>7</sup>	
				F. necrophorum	5,00X10 <sup>5</sup>	
58	P. aeruginosa	3,00X10 <sup>7</sup>	<b>3,00X10<sup>7</sup></b>	Veillonella spp	4,00X10 <sup>6</sup>	<b>4,00X10<sup>6</sup></b>
64	P. aeruginosa	1,00X10 <sup>8</sup>	<b>1,00X10<sup>8</sup></b>	A. turicensis	5,00X10 <sup>5</sup>	<b>5,00X10<sup>5</sup></b>
86	P. aeruginosa	5,00X10 <sup>6</sup>	<b>5,00X10<sup>6</sup></b>	S. saccharolyticus	4,00X10 <sup>5</sup>	<b>4,00X10<sup>5</sup></b>
47	S. maltophilia	4,50X10 <sup>6</sup>	<b>4,50X10<sup>6</sup></b>	S. saccharolyticus	8,00X10 <sup>5</sup>	<b>8,00X10<sup>5</sup></b>
67	S. maltophilia	1,00X10 <sup>5</sup>	<b>1,00X10<sup>5</sup></b>	C. innocuum	1,00X10 <sup>6</sup>	<b>2,00X10<sup>6</sup></b>
				C. difficile	1,00X10 <sup>6</sup>	
115	Stomatococcus mucilaginosus/ Andere	1,50X10 <sup>6</sup>	<b>1,15X10<sup>7</sup></b>	S. saccharolyticus	8,50X10 <sup>5</sup>	<b>8,50X10<sup>5</sup></b>
	Strept. spp	1,50X10 <sup>6</sup>				
	Strept. spp	8,50X10 <sup>6</sup>				
53	S. aureus	1,50X10 <sup>7</sup>	<b>1,50X10<sup>7</sup></b>	Ps. prevotii	1,00X10 <sup>6</sup>	<b>2,10X10<sup>7</sup></b>
				S. saccharolyticus	2,00X10 <sup>7</sup>	
66	S. aureus	3,00X10 <sup>6</sup>	<b>3,00X10<sup>6</sup></b>	A. turicensis	3,00X10 <sup>6</sup>	<b>6,00X10<sup>6</sup></b>
				Wolinella sp.	1,00X10 <sup>6</sup>	
				S. saccharolyticus	2,00X10 <sup>6</sup>	
77	S. aureus	2,00X10 <sup>6</sup>	<b>2,00X10<sup>6</sup></b>	Ps. tetradius	1,00X10 <sup>6</sup>	<b>2,60X10<sup>6</sup></b>
				S. saccharolyticus	5,00X10 <sup>5</sup>	
				Ps. prevotii	5,00X10 <sup>5</sup>	
				C. butyricum	6,00X10 <sup>5</sup>	
79	Strept. spp	1,50X10 <sup>6</sup>	<b>1,50X10<sup>6</sup></b>	S. saccharolyticus	5,00X10 <sup>5</sup>	<b>5,00X10<sup>5</sup></b>
89	P. aeruginosa	3,00X10 <sup>7</sup>	<b>3,00X10<sup>7</sup></b>	Ps. prevotii	3,00X10 <sup>5</sup>	<b>4,50X10<sup>5</sup></b>
				Capnocytophaga sp	1,50X10 <sup>5</sup>	

## 7 Anhang

<b>Probe Nr.</b>	<b>fakultative Anaerobier</b>	<b>Keimzahl</b>	<b>Summe fakultative Anaerobier/Probe</b>	<b>Obligate Anaerobier</b>	<b>Keimzahl</b>	<b>Summe obligate Anaerobier/Probe</b>
44	S. aureus	5,00X10 <sup>6</sup>	<b>5,00X10<sup>6</sup></b>	Veillonella spp	1,00X10 <sup>6</sup>	<b>3,00X10<sup>6</sup></b>
				A. turicensis	2,00X10 <sup>6</sup>	
45	S. aureus	7,00X10 <sup>7</sup>	<b>7,00X10<sup>7</sup></b>	S. saccharolyticus	1,00X10 <sup>6</sup>	<b>1,00X10<sup>6</sup></b>
56	Flavimonas oryzihabitans/ Andere	1,00X10 <sup>6</sup>	<b>1,00X10<sup>6</sup></b>			
76	S. aureus	1,00X10 <sup>6</sup>	<b>1,00X10<sup>6</sup></b>	S. saccharolyticus	3,00X10 <sup>5</sup>	<b>3,00X10<sup>5</sup></b>
80	S. aureus	4,00X10 <sup>6</sup>	<b>4,00X10<sup>6</sup></b>			
101	S. aureus	1,00X10 <sup>6</sup>	<b>1,50X10<sup>6</sup></b>	S. saccharolyticus	1,50X10 <sup>6</sup>	<b>2,50X10<sup>6</sup></b>
	Micrococcus luteus	5,00X10 <sup>5</sup>		Gemella morbillorum	1,00X10 <sup>6</sup>	
106	Eikenella corrodens/ Andere	1,00X10 <sup>6</sup>	<b>1,01X10<sup>8</sup></b>	Mob. mulieris	5,00X10 <sup>6</sup>	<b>5,00X10<sup>6</sup></b>
	P. aeruginosa	1,00X10 <sup>8</sup>				
49	S. aureus	8,00X10 <sup>6</sup>	<b>8,00X10<sup>6</sup></b>	A. turicensis	5,00X10 <sup>5</sup>	<b>1,50X10<sup>5</sup></b>
				Capnocytophaga sp	1,00X10 <sup>6</sup>	
75	P. aeruginosa	7,00X10 <sup>5</sup>	<b>3,70X10<sup>6</sup></b>	S. saccharolyticus	3,00X10 <sup>5</sup>	<b>3,00X10<sup>5</sup></b>
	S. aureus	3,00X10 <sup>6</sup>				
48	P. aeruginosa	4,00X10 <sup>5</sup>	<b>4,00X10<sup>5</sup></b>			
74	P. aeruginosa	2,00X10 <sup>6</sup>	<b>2,00X10<sup>6</sup></b>	Veillonella spp	1,00X10 <sup>6</sup>	<b>1,00X10<sup>6</sup></b>
55	B. cepacia	2,00X10 <sup>8</sup>	<b>2,00X10<sup>8</sup></b>	Veillonella spp	1,00X10 <sup>6</sup>	<b>3,20X10<sup>6</sup></b>
				C. innocuum	2,00X10 <sup>5</sup>	
				Ps. prevotii	1,00X10 <sup>6</sup>	
				S. saccharolyticus	1,00X10 <sup>6</sup>	
59	B. cepacia	1,00X10 <sup>6</sup>	<b>2,00X10<sup>6</sup></b>	A. turicensis	1,00X10 <sup>6</sup>	<b>2,00X10<sup>6</sup></b>
	Strept. spp	1,00X10 <sup>6</sup>		Wolinella sp.	1,00X10 <sup>6</sup>	
68	B. cepacia	1,00X10 <sup>7</sup>	<b>1,06X10<sup>7</sup></b>	A. odontolyticus	1,00X10 <sup>6</sup>	<b>3,70X10<sup>6</sup></b>
	Strept. spp	6,00X10 <sup>5</sup>		C. difficile	1,00X10 <sup>6</sup>	
				Ps. anaerobius	1,00X10 <sup>6</sup>	
				Veillonella spp	3,00X10 <sup>5</sup>	
108	B. cepacia	1,00X10 <sup>8</sup>	<b>1,10X10<sup>8</sup></b>	S. saccharolyticus	5,00X10 <sup>6</sup>	<b>7,50X10<sup>6</sup></b>
	Strept. spp	1,00X10 <sup>7</sup>		Mob. mulieris	1,00X10 <sup>6</sup>	
				A. odontolyticus	5,00X10 <sup>5</sup>	
				Gemella morbillorum	1,00X10 <sup>6</sup>	
51	S. epidermidis/ Andere	7,00X10 <sup>6</sup>	<b>8,80X10<sup>6</sup></b>	Veillonella spp	4,00X10 <sup>6</sup>	<b>7,00X10<sup>6</sup></b>
	Strept. spp	1,50X10 <sup>6</sup>		Pr. melaninogenica	2,00X10 <sup>6</sup>	
	Stomatococcus mucilaginosus/ Andere	3,00X10 <sup>5</sup>		S. saccharolyticus	1,00X10 <sup>6</sup>	
72	P. aeruginosa	7,00X10 <sup>7</sup>	<b>7,00X10<sup>7</sup></b>			
88	P. aeruginosa	3,00X10 <sup>8</sup>	<b>3,00X10<sup>8</sup></b>			
114	P. aeruginosa	6,50X10 <sup>7</sup>	<b>6,60X10<sup>7</sup></b>			
	Strept. spp	1,00X10 <sup>6</sup>				
50	P. aeruginosa	5,00X10 <sup>7</sup>	<b>5,00X10<sup>7</sup></b>	Ps. micros	5,00X10 <sup>7</sup>	<b>5,00X10<sup>7</sup></b>
63	P. aeruginosa	1,00X10 <sup>8</sup>	<b>1,00X10<sup>8</sup></b>	Pr. melaninogenica	2,00X10 <sup>7</sup>	<b>3,00X10<sup>7</sup></b>
				S. saccharolyticus	1,00X10 <sup>7</sup>	

## 7 Anhang

<b>Probe Nr.</b>	<b>fakulative Anaerobier</b>	<b>Keimzahl</b>	<b>Summe fakultative Anaerobier/Probe</b>	<b>Obligate Anaerobier</b>	<b>Keimzahl</b>	<b>Summe obligate Anaerobier/Probe</b>
107	P. aeruginosa	5,00X10 <sup>7</sup>	<b>5,00X10<sup>7</sup></b>			
54	P. aeruginosa	4,00X10 <sup>8</sup>	<b>4,00X10<sup>8</sup></b>	B. tectum	4,00X10 <sup>6</sup>	<b>5,00X10<sup>6</sup></b>
				Veillonella spp	1,00X10 <sup>6</sup>	
93	P. aeruginosa	2,50X10 <sup>8</sup>	<b>2,51X10<sup>8</sup></b>	S. saccharolyticus	3,00X10 <sup>5</sup>	<b>3,00X10<sup>5</sup></b>
	P. fluorescens/ Andere	5,00X10 <sup>5</sup>				
	Strept. spp	5,00X10 <sup>5</sup>				
92	P. aeruginosa	2,00X10 <sup>8</sup>	<b>2,00X10<sup>8</sup></b>	C. sporogens	1,00X10 <sup>7</sup>	<b>1,90X10<sup>7</sup></b>
				S. saccharolyticus	2,00X10 <sup>6</sup>	
				Capnocytophaga sp	7,00X10 <sup>6</sup>	
39	B. gladioli/ Andere	2,00X10 <sup>8</sup>	<b>2,00X10<sup>8</sup></b>	Ps. prevotii	1,00X10 <sup>8</sup>	<b>1,00X10<sup>8</sup></b>
	S. epidermidis/ Andere	7,00X10 <sup>4</sup>				
62	P. aeruginosa	6,00X10 <sup>7</sup>	<b>6,00X10<sup>7</sup></b>	C. hastiforme	5,00X10 <sup>7</sup>	<b>1,50X10<sup>8</sup></b>
				Gemella morbillorum	2,00X10 <sup>5</sup>	
				B. ureolyticus	1,00X10 <sup>6</sup>	
33	P. aeruginosa	2,00X10 <sup>6</sup>	<b>2,00X10<sup>6</sup></b>			
36	P. aeruginosa	6,00X10 <sup>7</sup>	<b>6,00X10<sup>7</sup></b>			
110	B. cepacia	5,00X10 <sup>7</sup>	<b>2,57X10<sup>8</sup></b>	Ps. tetradius	7,00X10 <sup>6</sup>	<b>1,10X10<sup>7</sup></b>
	P. aeruginosa	2,00X10 <sup>8</sup>		S. saccharolyticus	4,00X10 <sup>6</sup>	
	Strept. spp	7,00X10 <sup>6</sup>				
95 K	Strept. salivarius	5,00X10 <sup>4</sup>	<b>5,00X10<sup>4</sup></b>	Ps. anaerobius	2,00X10 <sup>5</sup>	<b>3,00X10<sup>5</sup></b>
				S. saccharolyticus	1,00X10 <sup>5</sup>	
30 K	S. aureus	2,00X10 <sup>8</sup>	<b>2,00X10<sup>8</sup></b>	Veillonella spp	1,00X10 <sup>6</sup>	<b>1,00X10<sup>8</sup></b>
35 K	S. aureus	5,00X10 <sup>6</sup>	<b>5,00X10<sup>6</sup></b>			
	P. fluorescens	5,00X10 <sup>6</sup>	<b>5,00X10<sup>6</sup></b>			
84 K	Pasteurella multocida	3,50X10 <sup>6</sup>	<b>5,00X10<sup>6</sup></b>	S. saccharolyticus	1,00X10 <sup>7</sup>	<b>2,00X10<sup>7</sup></b>
	Strept. sanguis	1,00X10 <sup>6</sup>		Ps. prevotii	5,00X10 <sup>6</sup>	
	Shigella dysenteriae	5,00X10 <sup>5</sup>		Veillonella spp	5,00X10 <sup>6</sup>	
41 K	Strept. pneumoniae	1,00X10 <sup>8</sup>	<b>1,00X10<sup>8</sup></b>			
65 K	S. aureus	3,00X10 <sup>5</sup>	<b>3,00X10<sup>5</sup></b>			
42 K	S. aureus	1,00X10 <sup>7</sup>	<b>1,00X10<sup>7</sup></b>	S. saccharolyticus	1,00X10 <sup>5</sup>	<b>1,00X10<sup>5</sup></b>
96 K	Comanons acidovorans	1,00X10 <sup>8</sup>	<b>1,55X10<sup>8</sup></b>	Ps. prevotii	2,00X10 <sup>7</sup>	<b>6,05X10<sup>7</sup></b>
	Strept. pneumoniae	5,00X10 <sup>7</sup>		C. difficile	3,00X10 <sup>7</sup>	
	Stomatococcus mucilaginosus	5,00X10 <sup>6</sup>		Wolinella spp	5,00X10 <sup>6</sup>	
				S. saccharolyticus	5,00X10 <sup>6</sup>	
				C. hastiforme	5,00X10 <sup>5</sup>	
113 K	Strept. salivarius	1,00X10 <sup>7</sup>	<b>1,20X10<sup>7</sup></b>	S. saccharolyticus	1,00X10 <sup>7</sup>	<b>4,50X10<sup>7</sup></b>
	Micrococcus luteus	1,00X10 <sup>6</sup>		Capnocytophaga sp	3,50X10 <sup>7</sup>	
	Stomatococcus mucilaginosus	1,00X10 <sup>6</sup>				

## 8 Thesen

1. Die chronische Lungenentzündung bei Patienten mit Mukoviszidose (synonym: zystische Fibrose, CF) ist die Hauptursache für deren stark verringerte Lebenserwartung.
2. Bei der chronischen Lungenentzündung wird in den Atemwegen der CF-Patienten eine große Menge von zähem Mucus gebildet, der sauerstofffrei (anaerob) ist.
3. Für die chronische Lungeninfektion werden hauptsächlich fakultative Anaerobier wie *Pseudomonas aeruginosa* oder *Staphylococcus aureus* verantwortlich gemacht.
4. In drei aktuellen Studien werden auch obligate Anaerobier in der Lunge von CF-Patienten nachgewiesen.
5. Es liegt allerdings kein Beweis für eine Vermehrung der obligaten Anaerobier in der Lunge der Patienten vor, weswegen sie häufig als Kontamination aus dem Mund-Rachen-Raum betrachtet werden.
6. In der vorliegenden Arbeit werden obligate Anaerobier identifiziert, quantifiziert, und ihre Herkunft wird aufgeklärt. Ein möglicher Mechanismus zur pathogenetischen Bedeutung der obligaten Anaerobier wird untersucht.
7. In 73,4% der Sputumproben und bei 86,9% der Patienten sind obligate Anaerobier zu finden. Diese verteilen sich auf *Staphylococcus saccharolyticus* (29,6%), *Peptostreptococcus spp.* (13,9%), *Clostridium spp.* (10,4%), *Veillonella spp* (9,6%) und *Actinomyces spp* (8,7%).
8. Die obligaten Anaerobier sind in hohen Keimzahlen vorhanden ( $1,6 \times 10^7 \pm 3,1 \times 10^7$  KBE/ml). Diese Keimzahlen liegen in der gleichen Größenordnung wie diejenigen der fakultativen Anaerobier ( $5,8 \times 10^7 \pm 8,8 \times 10^7$  KBE/ml).
9. In Rachenabstrichen von CF-Patienten werden in nur 31% der Proben überhaupt obligate Anaerobier gefunden. Die Keimzahlen liegen um 3 Zehnerpotenzen niedriger als in den Sputumproben, womit eine orale Kontamination der Sputumproben mit obligaten Anaerobiern weitgehend ausgeschlossen werden kann.

10. Nach i.v.-Therapie mit Antibiotika auf Grund von Exazerbationen sind in dieser Studie keine signifikanten Keimzahländerungen der fakultativen und obligaten Anaerobier festzustellen. Dies ist wahrscheinlich auf die stark reduzierte Wirkung der Antibiotika unter Sauerstoffmangel zurückzuführen.

11. Bei akuten Lungenerkrankungen spielen obligate Anaerobier keine Rolle. Nur bei chronischen Lungenerkrankungen mit Sputumproduktion sind obligate Anaerobier zu finden.

12. Möglicherweise bewirkt *Prevotella intermedia* bei gemeinsamer Inkubation mit *Pseudomonas aeruginosa* einen Wachstumsvorteil für Pseudomonaden.

13. Das Ausmaß der Beteiligung von obligaten Anaerobiern an der chronischen Lungentzündung bei CF-Patienten ist weiterhin unklar.

## 9 Eigene Veröffentlichungen (Co-Autorenschaft)

### Publikationen

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. *Clin Microbiol Infect* 15: 454-460

### Konferenzbeiträge und Poster

Worlitzsch D, **Boehm K**, Rintelen C, Wollschlaeger B, Merkel N, Borneff-Lipp M, Döring G: Strict anaerobes persist in CF sputum despite antibiotic treatment. 30th European Cystic Fibrosis Conference, Belek, Turkey, 13.-16.06.2007 (auf Einladung).

Worlitzsch D, Rintelen C, **Böhm K**, Wollschläger B, Merkel N, Borneff-Lipp M, Döring G: Strictly anaerobic bacteria in sputum of patients with cystic fibrosis. 59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Göttingen, Deutschland, 30.09.-04.10.2007 (auf Einladung).

Worlitzsch D, Rintelen C, **Böhm K**, Wollschläger B, Merkel N, Borneff-Lipp M, Döring G: Persistence of antibiotic-resistant strict anaerobes in sputum. 21st Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim, CA, USA, 03.-06.10.2007 (auf Einladung).

Worlitzsch D, Rintelen C, **Böhm K**, Wollschläger B, Merkel N, Borneff-Lipp M, Döring G: Obligate anaerobes in sputum of patients with cystic fibrosis. XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology BAM-IUMS, Istanbul, Turkey, 05.-09.08.2008 (auf Einladung).

Rintelen C, Worlitzsch D, **Böhm K**, Wollschläger B, Merkel N, Borneff-Lipp M, Döring G: Persistence of antibiotic-resistant strict anaerobes in CF sputum. 60th annual Conference of DGHM, Dresden, Germany, 21.-24.09.2008 (auf Einladung).

Worlitzsch D, Rintelen C, **Böhm K**, Wollschläger B, Merkel N, Borneff-Lipp M, Döring G: Obligate anaerobes and exacerbations in cystic fibrosis patients. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, FL, USA, 23.-25.10.2008 (auf Einladung).

### Zitierfähige Abstracts

Worlitzsch D, **Boehm K**, Rintelen C, Wollschlaeger B, Merkel N, Borneff-Lipp M, Döring G (2007) Strict anaerobes persist in CF sputum despite antibiotic treatment. J Cystic Fibrosis 6: 21

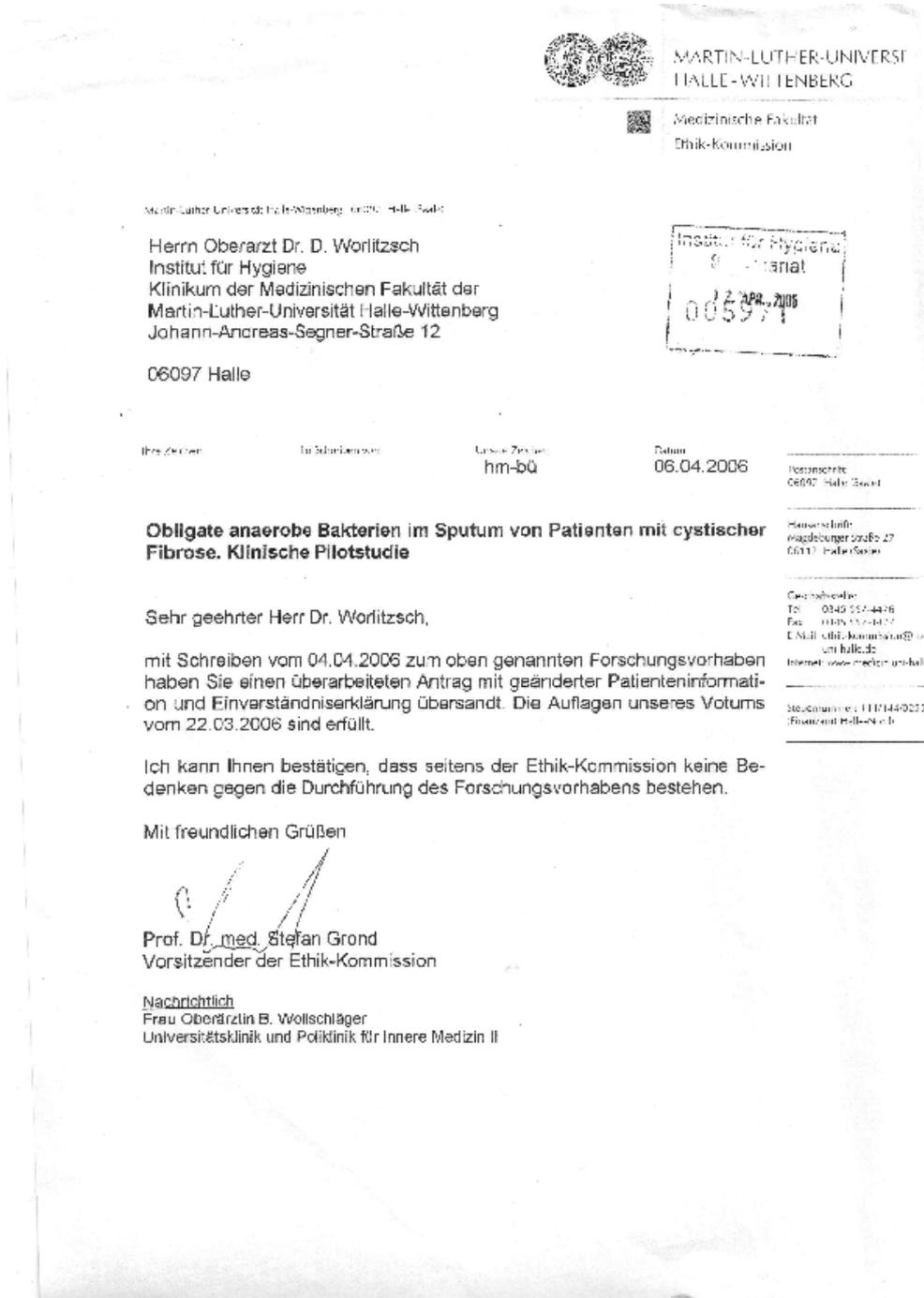
Worlitzsch D, Rintelen C, **Böhm K**, Wollschläger B, Merkel N, Borneff-Lipp M, Döring G (2007) Strictly anaerobic bacteria in sputum of patients with cystic fibrosis. Int J Med Microbiol 297: 116

Worlitzsch D, Rintelen C, **Böhm K**, Wollschläger B, Merkel N, Borneff-Lipp M, Döring G (2007) Persistence of antibiotic-resistant strict anaerobes in sputum. Pediatr Pulmonol (suppl.30): 317

Rintelen C, Worlitzsch D, **Böhm K**, Wollschläger B, Merkel N, Borneff-Lipp M, Döring G (2008) Persistence of antibiotic-resistant strict anaerobes in CF sputum. Int J Med Microbiol 2978: (suppl. 2) 50

Worlitzsch D, Rintelen C, **Böhm K**, Wollschläger B, Merkel N, Borneff-Lipp M, Döring G (2008) Obligate anaerobes and exacerbations in cystic fibrosis patients. Pediatr Pulmonol (suppl. 31): 329-330

10 Votum der Ethikkommission



## **12 Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, **Katharina Böhm, geb. 13.04.1983**, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe mich dabei keiner anderen als der von mir angegebenen Quellen und Hilfen bedient.

Hamburg den 25.07.2010

### **13 Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, **Katharina Böhm, geb. 13.04.1983**, bisher an keiner in- und/oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um eine Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt zu haben.

Hamburg den 25.07.2010

## 14 Danksagung

Besonderer Dank geht an:

**Alle beteiligten CF-Patienten** der CF-Ambulanz der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die Teilnahme an dieser Studie.

**Frau Prof. Dr. Marianne Borneff-Lipp**, Direktorin des Institutes für Hygiene der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die freundliche Überlassung des Themas der Dissertation sowie für die strukturierte Betreuung.

**Herrn OA Dr. Dieter Worlitzsch**, wissenschaftlicher Mitarbeiter des Institutes für Hygiene, danke ich für die umfangreiche Betreuung bei der Umsetzung der Arbeit.

**Frau Nadine Wörfel, Frau Margit Koleczko, Frau Barbara Christgen, Frau Christiane Hinze und Frau Susanne Friebe**l, technische Mitarbeiterinnen des Institutes für Hygiene der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit, während der experimentellen Arbeiten im Labor.

**Herrn OA Dr. Nick Merkel**, Leiter der CF-Ambulanz für Kinder am Universitätsklinikum Halle, für die engagierte Zusammenarbeit, insbesondere für die Bereitstellung der Bronchiallavageflüssigkeiten.

**Frau OÄ Dr. Bettina Wollschläger**, Leiterin der CF-Ambulanz für Erwachsene am Universitätsklinikum Halle, für die freundliche Unterstützung und Zusammenarbeit,

**Herrn PD Dr. Andreas Wienke**, Mitarbeiter des Institutes für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Medizinische Informatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die statistische Beratung.

**Meine Mutter Maria und meinen Freund André** für die Unterstützung bei der Kinderbetreuung und im Alltag.