

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

## **Obligat anaerobe Bakterien in den Lungen von Patienten mit Cystischer Fibrose**

### **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

vorgelegt

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

von Claudia Rintelen

geboren am 14.10.1979 in Steinfurt

Gutachter: 1. Gutachter: Frau Prof. M. Borneff-Lipp  
Direktorin des Instituts für Hygiene  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2. Gutachter: Herr Prof. L. Eberl  
Institut für Pflanzenbiologie  
Universität Zürich

Öffentlich verteidigt am 31.08.2009 in Halle/Saale.

### Kurzreferat

Neben den fakultativ anaeroben Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* können auch obligat anaerobe Keime bei der chronischen Lungeninfektion bei Patienten mit cystischer Fibrose (CF) vorkommen. Innerhalb dieser Studie wurden insgesamt 92 Sputumproben von 31 Erwachsenen und 8 Kindern mit CF auf das Vorhandensein von obligaten Anaerobiern untersucht. Bei fast allen CF-Patienten (93,5% der Erwachsenen, 75,0% der Kinder) wurde eine Vielzahl unterschiedlicher obligater Anaerobier (15 Genera, 35 Spezies) gefunden. Erstmals konnte demonstriert werden, dass diese Mikroorganismen in hohen Zahlen ( $1,3 \times 10^7 \pm 5,6 \times 10^7$  KBE/ml) vorliegen. Identische Keimarten konnten bis zu 11 Monate lang bei einem Patienten nachgewiesen werden. Die Resistenzbestimmung ergab eine gute Wirksamkeit von Meropenem (lediglich 3,6% resistente Stämme), reduzierte Wirkung von Piperazillin/Tazobactam (22,3%) und Clindamycin (23,7%), während Metronidazol (46,0%) und Ceftazidim (49,6%) erheblich schlechter wirkten. Nach Therapie von Exazerbationen verbesserten sich die Lungenfunktionsparameter der CF-Patienten signifikant, während sich die Keimzahlen im Sputum nicht veränderten. Bei 58% der Patienten mit Exazerbationen waren nach Therapie resistente obligate Anaerobier nachweisbar, was die unveränderten Keimzahlen erklärt. In Rachenabstrichen waren die Keimzahlen um mehr als drei Zehnerpotenzen niedriger als im Sputum. Dies spricht eindeutig für eine Vermehrung der Bakterien im CF-Sputum. Bei Patienten mit akuten Lungenentzündungen waren dagegen keine obligaten Anaerobier nachweisbar, was die Spezifität dieser Keime für chronische Lungeninfektionen betont. Das Ausmaß der Beteiligung der obligaten Anaerobier an der Pathogenese der chronischen Lungeninfektionen ist noch nicht bekannt. Möglicherweise kann eine Therapie mit spezifischen Antibiotika, die auch gegen obligate Anaerobier wirksam sind, die Behandlung der chronischen CF-Lungeninfektion und somit auch die Lebenserwartung der CF-Patienten verbessern. Die wichtigste Konsequenz der vorliegenden Arbeit besteht aber darin, dass alle zukünftigen Untersuchungen zur Pathogenese der chronischen Lungeninfektionen bei CF das obligatorische Vorkommen von obligaten Anaerobiern berücksichtigen müssen.

Bibliographische Angaben: Rintelen, Claudia: Obligat anaerobe Bakterien in den Lungen von Patienten mit Cystischer Fibrose. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 71 Seiten, 2009

### Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Cystische Fibrose .....	1
1.2	Chronisch bakterielle Lungeninfektion bei CF .....	2
1.3	Obligat anaerobe Bakterien bei CF-Patienten .....	9
<b>2</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
3.1	Patienten.....	13
3.1.1	CF-Patienten.....	13
3.1.2	Patienten mit anderen Lungenerkrankungen als CF .....	14
3.1.3	Ethikkommission .....	15
<b>3.2</b>	<b><i>In vivo</i>-Untersuchungen .....</b>	<b>15</b>
3.2.1	Sputumproben.....	15
3.2.2	Rachenabstriche .....	15
3.2.3	Lungenfunktionsbestimmung bei CF-Patienten.....	16
3.2.4	Bronchiallavage bei Patienten mit anderen Lungenerkrankungen als CF .....	16
<b>3.3</b>	<b><i>In vitro</i>-Untersuchungen.....</b>	<b>17</b>
3.3.1	Anzuchtmedien .....	17
3.3.2	Quantitativer Nachweis von fakultativen und obligaten Anaerobiern .....	18
3.3.3	Identifikation der fakultativ anaeroben Bakterien.....	21
3.3.4	Identifikation der obligat anaeroben Bakterien .....	23
3.3.5	Resistenzbestimmung.....	25
3.3.6	Einfrierkulturen.....	27
<b>3.4</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
4.1	Quantitativer Nachweis von fakultativ und obligat anaeroben Bakterien in Sputumproben.....	29
4.2	Identifikation der fakultativ und obligat anaeroben Bakterien in Sputumproben.....	32
4.3	Rachenabstriche und Vergleich der Keimzahlen mit denen der Sputumproben .....	35
4.4	Bronchoalveolarlavage.....	35
4.5	Resistenzbestimmung.....	36
4.6	Exazerbationen .....	37
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>39</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>6</b>	<b>Schlussfolgerungen .....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>49</b>
<b>9</b>	<b>Eigene Veröffentlichungen .....</b>	<b>57</b>
<b>10</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>60</b>
<b>11</b>	<b>Thesen .....</b>	<b>70</b>

**Lebenslauf**

**Selbstständigkeitserklärung**

**Erklärung über frühere Promotionsversuche**

**Danksagung**

## Abkürzungsverzeichnis

---

### 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, Cystische Fibrose
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CLSI	Clinical and Laboratory Institute
CM	Clindamycin
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
COPD	chronic obstructive pulmonary disease, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FEV <sub>1</sub>	forced expiratory volume in one second, Einsekundenkapazität
FVC	forced vital capacity, forcierte Vitalkapazität
g	Gramm
GPI-	Vitek-Testkarten für grampositive Keime
GNI+	Vitek-Testkarten für gramnegative Keime
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
MHK	Minimale Hemmkonzentration

## Abkürzungsverzeichnis

---

min	Minute
ml	Milliliter
MP	Meropenem
MZ	Metronidazol
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
p	Signifikanzwert nach Student's t-test
PIA	polysaccharide intercellular adhesin, interzelluläres Polysaccharid
PBS	phosphate buffered saline, phosphat-gepufferte Saline
PMN	polymorphonuclear neutrophil, polymorphkernige neutrophile Granulozyten
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PTC	Piperacillin/Tazobactam
Q <sub>o2</sub>	epithelialer Sauerstoffverbrauch
R	Pearson'scher Korrelationskoeffizient
SCS	Schaedler-Agar
SD	Standardabweichung
s	Sekunde/n
sp.	Spezies (Singular)
spp.	Spezies (Plural)
Tab.	Tabelle
TZ	Ceftazidim

# 1 Einleitung

## 1.1 Cystische Fibrose

Die cystische Fibrose (Cystic fibrosis, CF, Synonym: Mukoviszidose) ist eine autosomal-rezessiv erbliche Krankheit. Mit einer Inzidenz von 1:2.500 Neugeborenen gilt sie als die häufigste schwerwiegende angeborene Stoffwechselerkrankung der westlichen Industrienationen [Ratjen und Döring 2003; Gibson et al. 2003]. In Afrika (1:17.000) und Asien (1:90.000) kommt die cystische Fibrose wesentlich seltener vor [Gibson et al. 2003].

Im Jahr 1989 wurde das CF verursachende Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 7 entdeckt [Riordan et al. 1989]. Dieses codiert für ein Protein, welches als cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) bezeichnet wird und als Chloridkanal in normalen schleimsezernierenden Epithelien fungiert [Riordan et al. 1989]. Bis heute wurden über 1.500 verschiedene Mutationen des CFTR-Gens gefunden [The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Cystic Fibrosis Mutation Data base. <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>, Zugriff im Oktober 2008].

Der Verlauf und die sich bereits im Säuglings- oder Kindesalter manifestierenden Symptome bei CF sind je nach Schwere der Mutation mehr oder weniger stark ausgeprägt. Abhängig von der Mutation fehlt das CFTR-Protein ganz an der Zelloberfläche, es ist fehlerhaft ausgebildet oder es wird nur sehr geringfügig exprimiert. Es resultiert ein pathologischer Ionenfluss [Matsui et al. 1998], der dazu führt, dass alle exokrinen Drüsen im Organismus ein dehydriertes und hochvisköses Sekret absondern [Welsh und Ramsey 2001]. Die Folgen dieser Multiorganerkrankung zeigen sich vor allem in einer Dysfunktion von Lunge, Pankreas, Leber, Schweißdrüsen und den Ductuli deferentes [Ratjen und Döring 2003; Gibson et al. 2003].

In der Lunge erfolgt die Absonderung eines zähen, dickflüssigen Schleims, der sich auf den Schleimhäuten des Respirationstraktes festsetzt. Die entstandene Sekretretention führt in den Atemwegen zu chronisch-bakteriellen Infektionen und persistierenden Entzündungen, deren Folge ein cystisch-fibrotischer Umbau des Lungenparenchyms mit chronischem Husten, Bronchiektasen- und Atelektasenbildung ist. Durch die hochgradige Atemwegsobstruktion schreitet der Lungenfunktionsverlust voran, und der Großteil der

Patienten stirbt an zunehmender Ateminsuffizienz [Ratjen und Döring 2003; Gibson et al. 2003].

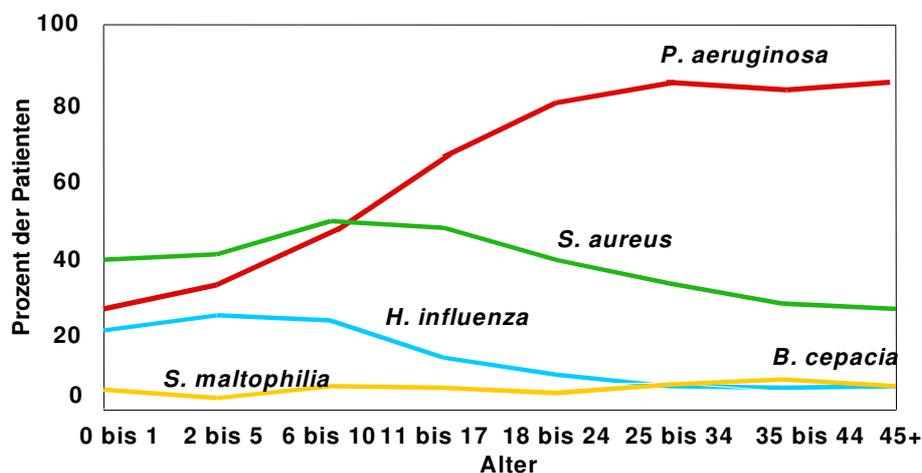
Während die meisten extrapulmonalen klinischen Manifestationen der Krankheit heutzutage erfolgreich behandelt werden können, bleibt der wichtigste Grund für den vorzeitigen Tod bei CF die chronische Lungeninfektion [Welsh und Ramsey 1998; Gibson et al. 2003; Ratjen und Döring 2003]. Der Hauptinfektionserreger ist *Pseudomonas aeruginosa* [Høiby und Koch 1990], ein gramnegatives Bakterium, das intraluminal in den CF-Atemwegen lokalisiert ist [Worlitzsch et al. 2002]. Die Patienten mit dem Krankheitsbild CF haben heutzutage eine erheblich bessere Prognose als noch vor wenigen Jahren [Cystic Fibrosis Foundation. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry Annual Report 2006. Bethesda: Cystic Fibrosis Foundation, 2007]. Ihre mittlere Lebenserwartung liegt aber immer noch bei weniger als 35 Jahren [Lyczak et al. 2002]. Trotz der Entwicklung von neuen und erfolgreichen Diagnose- und Behandlungsmethoden wie zum Beispiel der Frühbehandlung der *P. aeruginosa*-Infektion [Döring et al. 2004; Taccetti et al. 2005] oder vielversprechenden neuen Therapieansätzen wie der Impfung gegen *P. aeruginosa* [Döring et al. 2007] und trotz Einsatz einer breiten Palette von verschiedensten Antibiotika bleibt CF nach wie vor eine schwere und potentiell tödliche Krankheit [Valerius et al. 1991; Ratjen und Döring 2003].

Die derzeitige Behandlung wirkt nur symptomatisch, nicht ursächlich heilend. Deshalb sind genauere Untersuchungen und Beschreibungen der pathophysiologischen Mechanismen, die den chronischen Lungeninfektionen bei CF zugrunde liegen, wesentlich, um längerfristig die Therapie verbessern zu können und damit die Lebenserwartung der Menschen mit CF zu erhöhen.

## 1.2 Chronisch bakterielle Lungeninfektion bei CF

Die Lunge von Patienten mit CF wird von rezidivierenden Atemwegsinfekten heimgesucht, die das Gewebe dauerhaft schädigen [Valerius et al. 1991; Koch und Høiby 1993]. Charakteristisch für die Erkrankung ist die Keimbesiedlung der Lunge mit den fakultativen Anaerobiern *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia complex*-Bakterien und *Haemophilus influenzae*. Fakultative Anaerobier sind

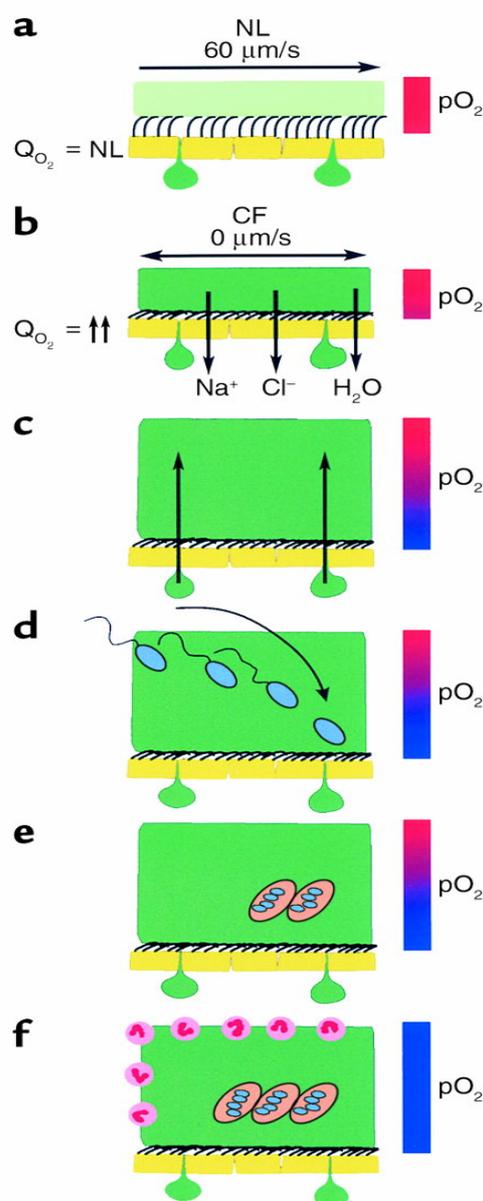
Bakterien, die sich an wechselnde Umweltbedingungen anpassen und sowohl aerob als auch anaerob metabolisieren können [Koneman et al. 1997]. Bei mikrobiologischen Untersuchungen des Sputums von CF-Patienten mit einer chronischen Lungeninfektion sind die genannten fakultativ anaeroben Bakterien die am häufigsten isolierten Keime [Koch und Høiby 1993; Ratjen 2001]. Diese Keime verursachen mit ansteigendem Alter zunehmend häufig die schweren chronischen Atemwegsinfektionen mit begleitender Entzündung, die mit einem irreversiblen Lungenfunktionsverlust einhergehen [Koch und Høiby 1993]. Initial wird die CF-Lunge überwiegend mit *S. aureus* und *H. influenzae* besiedelt. Mit zunehmendem Alter der CF-Patienten [Koch und Høiby 1993] dominieren und persistieren die *P. aeruginosa*-Infektionen (Abb. 1.1).



**Abbildung 1.1:** Altersverteilung der bakteriellen Besiedlung der Lunge von CF-Patienten (nach [Koch und Høiby 1993]).

Bei Vorhandensein eines intakten, respiratorischen Epithels bei Gesunden kommt es in der Regel nicht zur Kolonisation und Vermehrung von aeroben oder fakultativ bzw. obligat anaeroben Keimen. Eine bakterielle Infektion ist selten, da die Atemwege durch einen Selbstreinigungsprozess (mukoziliäre Clearance) des Flimmerepithels freigehalten werden. Auf einem gesunden Atemwegsepithel befindet sich eine dünne, niedrig-visköse Schleimschicht (airway surface liquid, ASL) über der periziliären Flüssigkeitszone, die über eine effiziente Clearance durch die Zilien gereinigt wird. Der normale epitheliale Sauerstoffverbrauch erzeugt keinen Sauerstoffgradienten innerhalb des ASL, der Sauerstoffpartialdruck ist hoch und ein normaler Gasaustausch kann stattfinden (Abb. 1.2a).

Bei einem an CF erkrankten Patienten ist der nach außen gerichtete Chlorid-Ionen-Strom an der apikalen Zellmembran der Epithelzelle gestört. Es resultiert ein vermehrter Influx von Natrium-Ionen. Der Wassergehalt der Sekrete ist sehr niedrig, und der Schleim wird extrem viskös (Abb. 1.2b). Zusätzlich führt nach Matsui et al. (1998) der Defekt im CFTR zur Volumenreduktion der ASL, und der hoch-visköse Schleim verfestigt sich auf den Epitheloberflächen (Mukusplaques). Die mukoziliäre Clearance wird behindert und durch die andauernde Mukussekrektion kommt es zur Sekretretention (Abb. 1.2c). Die mit den eingeatmeten Aerosoltröpfchen aufgenommenen Bakterien setzen sich an der hoch-viskösen Oberfläche ab und dringen innerhalb kurzer Zeit in die muköse Schicht ein (Abb. 1.2d). In dem hypoxischen Milieu ist die Bakterienadhärenz erleichtert [Boucher 1999] und eine chronische Besiedlung der CF-Lunge mit Bakterien, besonders mit *P. aeruginosa* ist möglich. Der abnehmende Sauerstoffpartialdruck hat viele verschiedene Folgen für die chronische Lungeninfektion: Es bilden sich eitrig Mukusfröpfe, die einzelne Bronchien der Lunge verstopfen. Innerhalb des Mukus wird langsam ein Sauerstoffgradient aufgebaut (Abb. 1.2e), und in dem resultierenden Sputum entstehen anaerobe Bereiche mit sehr steilen Sauerstoffgradienten (Abb. 1.2f). In diesem anaeroben Sputum liegt *P. aeruginosa* in Form von Mikrokolonien (dreidimensionaler Biofilm) vor (Abb. 1.2f).



**Abbildung 1.2:** Darstellung der chronischen *P. aeruginosa*-Infektion in der CF-Lunge (nach [Worlitzsch et al. 2002];  $pO_2$ =Sauerstoffpartialdruck, NL=normale Clearance,  $Q_{O_2}$ =epithelialer Sauerstoffquotient).

Im Folgenden sei auf mehrere im letzten Absatz eingeführte Begriffe im Detail eingegangen:

Der Biofilm ist definiert als ein strukturierter, bakterieller Zellverband, der von einer gemeinsamen Matrix umgeben ist, die biochemisch vorwiegend aus Exopoly-

sacchariden besteht [Costerton 1995]. Einige Bakterien können sowohl in Form planktonischer Zellen als auch in Form eines Biofilms vorkommen [Costerton 1995; O'Toole et al. 2000]. In der Lunge von Patienten mit CF werden die Bakterien durch die ansteigende Hypoxie nicht mehr ausreichend aus dem Respirationstrakt eliminiert. Pathogene Bakterien, wie *P. aeruginosa*, können sich auf der Oberfläche des Atemwegsepithels festsetzen und dort als Biofilme wachsen [Worlitzsch et al. 2002]. Die Sauerstoffkonzentration in den entstehenden bakteriellen Biofilmen nimmt langsam ab [Costerton 2002; Yoon et al. 2002; Borriello et al. 2004], eine Anaerobiose entsteht. Sie wird durch den Sauerstoffverbrauch der eindringenden Bakterien, der Abwehrzellen des Immunsystems und den Zellen des Atemwegsepithels verursacht [Worlitzsch et al. 2002].

Diese zunehmend anaerob werdende Umgebung fordert von den ortsständigen Bakterien eine große Umstellung. Zwar können Bakterien unter ungünstigen Umweltbedingungen überleben, indem sie über Regulatorgene ihr Virulenzverhalten und ihren Phänotyp ändern [Mekalanos 1992]. Aber um optimal unter wechselnden Umweltbedingungen existieren zu können, bedarf es auch für Mikroorganismen zahlreicher Adaptationen, woraus dann ein neuer, umweltresistenterer Phänotyp resultiert [Darwin 1859].

Auch *P. aeruginosa* stellt sich auf die wechselnden Bedingungen in den Mukusplaques ein: Um in der zunehmend anaerob werdenden Umgebung existieren zu können, reagiert *P. aeruginosa* nach einigen Jahren in der CF-Lunge mit der Ausbildung von stabilen Alginate-produzierenden Genotypen [Bragonzi et al. 2005]. Alginate besteht aus Polyuronsäurekomplexen, die aus den beim Menschen nicht vorkommenden Guluronsäuren und Mannuronsäuren zusammengesetzt sind [May 1994]. Die Alginateproduktion des fakultativen Keims kann durch verschiedene umweltbedingte Stressfaktoren wie Sauerstoffradikale [Hassett 1996],  $H_2O_2$  [Mathee et al. 1999], Temperatur [Schurr und Deretic 1997] oder Osmose [Firoved et al. 2002] induziert werden, wie dies *in vitro*-Tests an *P. aeruginosa* zeigten. Nur wenige dieser Faktoren haben eine bedeutende Rolle für das Verständnis des Pathomechanismus der chronischen Lungeninfektion bei CF. So ist  $H_2O_2$  zum Beispiel nicht für die Ausbildung

des stabilen mukoiden Phänotyps von *P. aeruginosa* verantwortlich. Die  $H_2O_2$ -Konzentration in den Atemkondensaten von CF-Patienten und Gesunden weist keine signifikanten Unterschiede auf [Worlitzsch et al. 1998]. Durch Messungen mittels einer Sauerstoffsonde *in vivo* wurde im Gegensatz dazu gezeigt, dass der Sauerstoffpartialdruck in der ASL der Atemwege von CF-Patienten stark reduziert ist [Worlitzsch et al. 2002]. Auch *in vitro* bewirkt Anaerobiosis eine erhebliche Induktion der Alginatproduktion [Worlitzsch et al. 2002]. Die übermäßige Alginatproduktion kann deshalb als Stressantwort auf die zunehmende Hypoxie betrachtet werden.

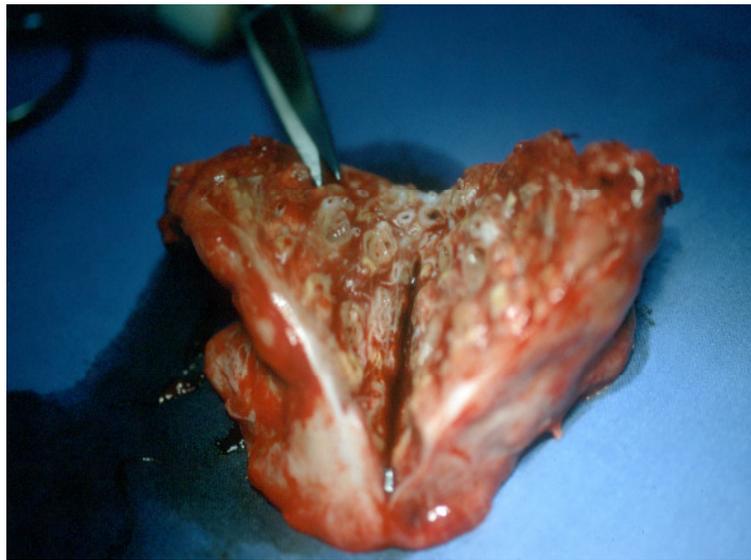
Auch andere bei CF vorkommende fakultative Anaerobier reagieren auf die Anaerobiose mit einer gesteigerten Produktion von Exopolysacchariden: *S. aureus* produziert ein interzelluläres Polysaccharid (polysaccharide intercellular adhesin, PIA) [McKenney et al. 1999; Ulrich et al. 2007] und der Großteil der *B. cepacia complex*-Bakterien generiert Exopolysaccharide [Cescutti et al. 2000; Conway et al. 2002; Sousa et al. 2007]. Die Bakterien umgeben sich mit einem Exopolysaccharidmantel und lagern sich zu Makrokolonien (oder auch dreidimensionalen Biofilmen) zusammen. Der Exopolysaccharidmantel ermöglicht den Bakterien, an Oberflächen zu adhären und dort zu wachsen [Costerton et al. 1999].

Der dreidimensionale Biofilm schützt die eindringenden Erreger auch vor dem menschlichen Immunsystem [Worlitzsch et al. 2002; Leid et al. 2005]. Im Pathomechanismus chronischer Infektionen bei CF spielen die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (polymorphonuclear neutrophils, PMN) als Virulenzfaktoren eine bedeutende Rolle [Govan und Deretic 1996]. Für die körpereigenen Abwehrmechanismen der PMN [Høiby et al. 1995] werden die Biofilme unangreifbar, da sie eine mechanische Phagozytose für diese Zellen darstellen. Die entstehenden Biofilme reduzieren die Sauerstoffdiffusion [Walters III et al. 2003] und vermindern damit auch die Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen [Hassett 1996; Worlitzsch et al. 1998; Borriello et al. 2004]. Die Abwehrzellen können ohne Vorhandensein von Sauerstoff keine Sauerstoffradikale bilden und sind damit in ihrer Abwehrfunktion wesentlich eingeschränkt. Die Folge der ansteigenden Hypoxie zeigt sich also auch in einer reduzierten Funktion der Abwehrzellen des Organismus, denn trotz der schnellen

Wanderung von PMN in infizierte CF-Atemwege werden *P. aeruginosa*-Infektionen chronisch [Worlitzsch et al. 2002].

Durch die ansteigende Hypoxie können *P. aeruginosa* und andere fakultativ anaerobe Keime auch trotz antibiotischer Therapien in der CF-Lunge weiter existieren [Stewart und Costerton 2001]. Die Abwesenheit von Sauerstoff reduziert die antimikrobielle Wirkung der Antibiotika [Anwar et al. 1992; Park et al. 1992; Stewart und Costerton 2001; Høiby 2002; Walters III et al. 2003; Hill et al. 2005], die speziell gegen *P. aeruginosa* wirksam sind [Borriello et al. 2004]. In Biofilmen, wie sie in der CF-Lunge vorkommen, entsteht so zum Beispiel eine verminderte Empfindlichkeit von *P. aeruginosa* gegenüber Tobramycin [Costerton 2002; Walters III et al. 2003; Field et al. 2005]. Die fakultativ anaerob wachsenden Bakterien sind bei den chronischen CF-Lungeninfektionen antibiotisch nicht auszurotten, lediglich ihre Keimzahlen können vorübergehend reduziert werden [Döring et al. 2000].

Die Lungenfibrose bewirkt eine hochgradige obstruktive Ventilationsstörung, bei der es zur Einengung der großen und kleinen Atemwege kommt, und die dort zu einer deutlichen Erhöhung des Strömungswiderstandes führt. Auch die Ausdehnung der Lunge ist durch pathologische Prozesse (Restriktion) eingeschränkt. Die chronisch bakterielle Infektion mit den verschiedenen Erregern führt also zu einer zunehmenden Destruktion der Atemwege und des Lungenparenchyms (Abb. 1.2). Diese obstruktiv-restriktive Zerstörung ist auch Ursache dafür, dass ein normaler Gasaustausch nicht mehr gewährleistet werden kann und bestimmte Lungenfunktionswerte, insbesondere FEV<sub>1</sub> (forced expiratory volume in one second, forcierte Einsekundenkapazität) und FVC (forced vital capacity, forcierte Vitalkapazität), stark abnehmen. Zusätzlich zu den kontinuierlichen Veränderungen durch die Lungenfibrose treten auch bei CF-Patienten akute Verschlechterungen der Symptomatik auf, die sich als Exazerbationen [Fuchs et al. 1994] äußern. Derartige Exazerbationen können mehrmals pro Jahr auftreten und erfordern in der Regel eine sofortige Zusatztherapie.



**Abbildung 1.3:** Explantierter Lungenlappen (mit Explorationsschnitt) eines CF-Patienten mit chronischer *Pseudomonas aeruginosa*-Lungeninfektion ([Worlitzsch 2003]).

Insgesamt betrachtet führt die lokale Anaerobiose im Sputum von CF-Patienten zu einer Einwanderung von fakultativ anaeroben Bakterien wie *P. aeruginosa* und *S. aureus* in die intraluminalen, mukopurulenten Sekrete, zu einer Änderung ihres Phänotyps, zu einer gesteigerten Biofilmproduktion und somit zu einer reduzierten neutrophilen Abwehr und einer verminderten antibiotischen Wirkung. Alle diese Faktoren zusammengenommen sind nach dem derzeitigen Wissenstand die Ursachen, die zu einer chronischen bakteriellen Lungeninfektion führen [Worlitzsch et al. 2002].

### 1.3 Obligat anaerobe Bakterien bei CF-Patienten

Schon lange ist bekannt, dass es aerob-anaerobe Mischinfektionen bei einer Reihe von Erkrankungen gibt. Im Falle von polybakteriellen Infektionen wird angenommen, dass es zunächst zur Vermehrung von fakultativ anaerob wachsenden Erregern kommt [Rodloff 2005]. Diese können sich auf sich verändernde Umweltbedingungen wie auf die ansteigende Hypoxie im Sputum von CF-Patienten einstellen [Worlitzsch et al. 2002; Bragonzi et al. 2005]. Wenn Bakterien an Sauerstoff exponiert werden, entstehen durch eine Reihe von enzymatisch katalysierten Reaktionen Wasserstoffperoxid und Sauerstoffradikale. Diese Produkte sind für Bakterien sehr toxisch; zur Entgiftung werden sie sofort durch die Enzyme Katalase und Peroxid-Dismutase in Wasser und Sauerstoff

überführt. Beide Enzyme sind bei obligaten Anaerobiern nicht oder nur in geringen Mengen vorhanden [Werner und Heizmann 1992; Rodloff 2005]. Sie können sich nicht von den toxischen Produkten befreien und sterben deshalb in Gegenwart von Sauerstoff. Die fakultativen Anaerobier können durch ihren Sauerstoffverbrauch aber dessen Konzentration im Gewebe so weit senken, dass auch die Vermehrung von obligaten Anaerobiern ermöglicht wird [Rodloff 2005].

Die meisten anaeroben Keime sind Teil des physiologischen Keimspektrums des Menschen; sie gehören zur Standortflora im Oropharynxbereich, im Intestinaltrakt und in der Genitalschleimhaut. Ihr Anteil an der sogenannten menschlichen Normalflora ist im Allgemeinen wesentlich höher als derjenige der fakultativ anaeroben Bakterien [Werner und Heizmann 1992]. Infektionen durch obligate Anaerobier entstehen durch Verschleppung von physiologischer Standortflora in normalerweise sterile Körpergebiete, wie zum Beispiel in die Lunge [Rodloff 1992].

Es ist möglich, dass obligat anaerobe Bakterien aufgrund schwieriger kultureller Bedingungen und/oder aus Identifizierungsproblemen bei bestimmten Krankheitsprozessen bisher noch nicht isoliert und beschrieben wurden. Um die sauerstoffempfindlichen obligaten Anaerobier nachweisen zu können, müssen bei der Materialgewinnung, beim Transport und bei der Bearbeitung der anaeroben Proben im Labor besondere Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden [Werner und Heizmann 1992].

Bis heute haben verschiedene Forschungsgruppen Nachweise für die Existenz von obligat anaeroben Bakterien im CF-Sputum gesammelt [Rogers et al. 2004; Field et al. 2005; Harris et al. 2005]. Die obligaten Anaerobier konnten in einer großen Anzahl von Proben nachgewiesen werden. Rogers und Mitarbeiter identifizierten rRNA der obligaten Anaerobier *Bacteroides gracilis*, *Eubacterium brachy*, *Mycoplasma salivarium*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella salivae*, *Prevotella melanogenica*, *Prevotella spp.* und *Veillonella atypica* im CF-Sputum [Rogers et al. 2004]. Das Team um Harris entdeckte in 57% der untersuchten CF-Sputumproben rRNA, die für *Prevotella spp.* codiert [Harris et al. 2005]. Die CF-Sputen, die Field und Mitarbeiter untersuchten, enthielten in 75% der Fälle obligate Anaerobier, die den Gattungen *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Peptostreptococcus* und *Fusobacterium* angehören [Field et al. 2005].

Bei den nachgewiesenen Anaerobiern handelt es sich um solche Bakterien, wie sie auch im Zusammenhang mit anderen Studien zu anaeroben Lungeninfektionen wie der Aspirationspneumonie [Rodloff 1992], der nosokomialen Pneumonie [Dore et al. 1996; Robert 2003], Lungenabszessen [Hammond et al. 1995] und Empyemen [Brook und Frazier 1993] beschrieben wurden. Die Bakterien kommen in polybakteriellen Mischinfektionen vor und werden als klinisch relevant betrachtet.

Die oben erwähnten rRNA-Techniken eignen sich zwar sehr gut zur Bakterienidentifikation, sie können aber keine Aussage über die Keimzahlen der obligat anaerob wachsenden Bakterien treffen. Um die Keimzahlen im Sputum von CF-Patienten quantifizieren zu können, bedarf es anderer mikrobiologischer Untersuchungen. Bis heute ist unklar, ob es sich bei diesen obligat anaeroben Bakterien um eine orale Kontamination oder um eine Vermehrung von Keimen in der CF-Lunge handelt, da auch in der Mundhöhle häufig obligate Anaerobier gefunden werden [Boutaga et al. 2005; Lee et al. 2006; Gura 2008]. Bisher wurde auch nicht geklärt, ob identische obligate Anaerobier bei Patienten nur sporadisch oder für einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden können. Die Lungenfunktionswerte der CF-Patienten nehmen in Gegenwart von fakultativen Anaerobiern wie *P. aeruginosa* deutlich ab. Der Einfluss von obligaten Anaerobiern auf die Lungenfunktion vor allem auch während Exazerbationen wurde bisher nicht untersucht. Außerdem ist das Resistenzverhalten von Anaerobiern bei CF weitestgehend unbekannt. Es bleibt unklar, ob sie therapiert werden können, und ob bestimmte Antibiotika in der CF-Therapie erfolgversprechend sind.

Die bislang von beinahe allen CF-Infektiologen vertretene Annahme, dass fakultative Anaerobier die einzigen Erreger bei den fortschreitenden Lungeninfektionen sind, hat möglicherweise den potentiellen Beitrag der obligaten Anaerobier zur Pathophysiologie bei CF verdeckt. Um die pathophysiologischen Mechanismen der chronisch bakteriellen Lungeninfektion besser verstehen und letztlich auch therapieren zu können, muss geklärt werden, in welchem Ausmaß obligate Anaerobier im Sputum in Lungen von CF-Patienten vorkommen und welche Bedeutung ihnen bei CF zukommt.

## 2 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollten mittels von streng anaeroben mikrobiologischen Methoden die folgenden Aspekte durchgeführt werden:

- (1) die Untersuchung des Ausmaßes der Existenz von fakultativen Anaerobiern wie *P. aeruginosa* und *S. aureus* neben obligaten Anaerobiern im Sputum von Patienten mit CF,
- (2) eine genaue Identifikation aller fakultativ und obligat anaerob wachsenden Keime,
- (3) eine Quantifikation aller Keime,
- (4) eine Untersuchung von Bronchiallavagen auf ihren Keimgehalt von Patienten mit anderen Lungenerkrankungen als CF,
- (5) eine Untersuchung einer möglicherweise stattfindenden Kontamination des Sputums mit obligat anaeroben Keimen aus der Mundhöhle während der Expektoration,
- (6) der Nachweis von identischen, obligat anaeroben Keimen bei CF-Patienten über einen längeren Zeitraum,
- (7) die Testung der Empfindlichkeit der gefundenen obligaten Anaerobier gegenüber ausgesuchten Antibiotika,
- (8) eine Evaluation eines möglichen Therapieerfolges mit anti-anaerob wirksamen Antibiotika bei CF-Patienten,
- (9) eine Quantifikation und Identifikation der fakultativen und obligaten Keime vor und nach der Behandlung von Exazerbationen und
- (10) eine Untersuchung der routinemäßig erhobenen Lungenfunktionsparameter FEV<sub>1</sub> und FVC der CF-Patienten vor und nach der Behandlung von Exazerbationen.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Patienten**

#### **3.1.1 CF-Patienten**

Insgesamt nahmen 39 Patienten der Universitätsklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg an der vorliegenden klinischen Studie teil. Es handelte sich um 31 Erwachsene der CF-Ambulanz des Universitätsklinikums und der Poliklinik für Innere Medizin II (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Bernd Osten, Leiterin der Ambulanz: Oberärztin Dr. med. Bettina Wollschläger) und acht Kinder der CF-Kinder-Ambulanz der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Dieter Körholz, Leiter der Ambulanz: Oberarzt Dr. med. Nick Merkel). Es handelte sich bei den Patienten um 20 Frauen und elf Männer sowie um fünf Mädchen und drei Jungen. Das Durchschnittsalter der Patienten der Erwachsenen-Ambulanz betrug  $25,3 \pm 9,0$  Jahre, und dasjenige der Patienten der Kinder-Ambulanz  $12,9 \pm 4,3$  Jahre. Das Alter der untersuchten CF-Patienten umfasste die Altersspanne von 6 - 64 Jahren.

Die Diagnose CF wurde bei allen untersuchten Patienten durch einen Schweißtest und/oder eine Genotypisierung bestätigt. Dies sind Standardverfahren zur Diagnostik von CF. Alle untersuchten Patienten inhalierten als Basis-Medikation Tobramycin und/oder Colistin sowie orales Azithromycin.

In regelmäßigen Abständen von drei bis vier Monaten wurden die Patienten der CF-Ambulanzen im Universitätsklinikum zur Kontrolluntersuchung einbestellt. Nur in Ausnahmefällen kamen sie häufiger in die CF-Ambulanz. Ein Beispiel für einen solchen Ausnahmefall stellten Exazerbationen dar. Exazerbationen sind definiert als eine Verschlechterung des physischen Zustandes der CF-Patienten. Um den klinischen Zustand des Patienten als Exazerbation werten zu können, müssen mindestens vier der hier aufgeführten zwölf Veränderungen bzw. Symptome des Krankheitsbildes vorliegen: Veränderungen des Sputums wie vermehrte Hämoptyse (Aushusten von blutig tingiertem Sputum), vermehrter Husten, vermehrte Dyspnoe, allgemeines Unwohlsein, ein zunehmender Erschöpfungszustand oder Lethargie, eine Temperatur von  $>38^{\circ}\text{C}$ , Anorexie und/oder großer Gewichtsverlust, Nasennebenhöhlensymptome wie zum

Beispiel erhöhter Sekretfluss, Veränderungen bei Perkussion und Auskultation, Abfall der Lungenfunktionswerte von 10% oder mehr und röntgenologisch-sichtbare Änderungen, die für eine Lungeninfektion kennzeichnend sind [Fuchs et al. 1994]. In dem Fall einer Exazerbation wurden die CF-Patienten stationär oder ambulant intravenös mit hochdosierten Antibiotika-Gaben über eine Dauer von zwei oder drei Wochen therapiert. Die Patienten erhielten dabei Piperacillin/Tazobactam, Ceftazidim, Moxifloxacin, Imipenem oder Cefepim. Die Wahl des Antibiotikums erfolgte in Abhängigkeit vom Antibiogramm des jeweiligen fakultativen Anaerobiers.

### **3.1.2 Patienten mit anderen Lungenerkrankungen als CF**

Zu Kontrollzwecken wurden bei insgesamt sechs Patienten in der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin Bronchiallavagen (bronchoalveoläre Lavage, BAL) durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob in Lungen von Patienten mit anderen pulmonologischen Erkrankungen auch fakultative und/oder obligate Anaerobier existieren.

Das durchschnittliche Alter dieser Patienten betrug  $7,0 \pm 5,2$  Jahre und reichte von zwei bis 16 Jahren; es waren vier Jungen und zwei Mädchen. Die Kinder mussten sich aus unterschiedlichen Gründen einer diagnostischen Bronchoskopie unterziehen. Sie alle hatten unterschiedliche Lungenerkrankungen, aber keine CF. Die Indikationen zur Durchführung der BAL waren im ersten Fall die Verdachtsdiagnose der Laryngo-Tracheomalazie, im zweiten Fall ein heterozygoter Alpha-1-AT-Mangel, im dritten Fall ein Zustand nach Oberlappenatektase (OP-Abbruch) und im vierten und fünften Fall je eine rezidivierende Pneumonie unklarer Genese. Es bestand bei diesen fünf Patienten eine akute Symptomatik.

Bei einem weiteren Patienten bestand eine rezidivierende rechtsseitige Atektase mit Retentionspneumonie bei Zustand nach peripartaler Aspiration mit zerebralen Schädigungen und Skoliose. Lediglich dieser sechste Patient litt unter einer seit Jahren bestehenden chronischen Lungenerkrankung mit reichlich eitrigem Sekret. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen wurde kein Patient antibiotisch behandelt.

### 3.1.3 Ethikkommission

Von allen Patienten wurde eine schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an dieser Studie abgegeben. Für minderjährige Patienten wurde das Einverständnis der Erziehungsberechtigten eingeholt. Die Angaben zur jeweiligen Medikation und die Lungenfunktionswerte wurden aus der Patientenakte erhoben und anonymisiert. Die vorliegende Studie wurde unter Einhaltung der Bestimmungen der Helsinki-Deklaration durchgeführt. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg äußerte Anfang 2006 (Votum siehe Anhang) keine Bedenken gegen eine Durchführung der Studie.

## 3.2 *In vivo*-Untersuchungen

### 3.2.1 Sputumproben

Insgesamt 92 Sputumproben wurden sämtlich nach einem standardisierten Verfahren gewonnen und weiterverarbeitet. Die CF-Patienten bekamen während einer routinemäßigen Kontrolluntersuchung ein steriles 50ml-Falcon-Röhrchen (Art.-Nr. 17-1020, TPP Products AG, Trasadingen, Schweiz) und wurden gebeten, in dieses Röhrchen eine Sputumprobe abzugeben. Die Sputumprobe wurde nicht nach Induktion, sondern spontan abgegeben. Das Sputumvolumen betrug durchschnittlich  $2,15\text{g} \pm 1,75\text{g}$ . Alle Proben wurden innerhalb von 30 Minuten im Labor bearbeitet. Durch eine geringe Entfernung zwischen den CF-Ambulanzen und dem Labor des Institutes für Hygiene im Universitätsklinikum konnte dies gewährleistet werden.

### 3.2.2 Rachenabstriche

Um zu demonstrieren, dass es bei der Expektoration des Sputums zu keiner Kontamination durch Bakterien des Mund-Rachen-Raumes kommt, wurde bei sieben Patienten der CF-Erwachsenen-Ambulanz ein Rachenabstrich vorgenommen. Die Abstriche wurden mithilfe eines sterilen Watteträgers (Art.-Nr. 132436, Böttger, Bodenmais, Deutschland), der kurz zuvor mit sterilem Aqua dest. (Art.-Nr. 1428, Braun, Melsungen, Deutschland) befeuchtet worden war, so tief wie möglich aus dem Rachen entnommen. Der Watteträger mit den Keimen wurde anschließend in ein kleines Falcon-

Röhrchen (Art.-Nr. 187261, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) mit 1ml 0,9%-iger NaCl-Lösung (Isotonische Kochsalzlösung, steril, Art.-Nr. 30911P, Braun) gegeben.

Die Identifikation und Quantifikation des Untersuchungsmaterials der Rachenabstriche wurde analog zu denen der Sputumproben durchgeführt. Es wurde zunächst eine Verdünnungsreihe mit 1ml NaCl auf SCS-Agar (Schaedler-Agar, Art.-Nr. 43401, bioMérieux® sa, Marcy-l'Etoile, Frankreich) hergestellt. Die Agarplatten wurden wie im weiteren beschrieben inkubiert, quantifiziert und identifiziert.

### **3.2.3 Lungenfunktionsbestimmung bei CF-Patienten**

Um die Veränderungen der Lungenfunktionswerte der CF-Patienten untersuchen und auswerten zu können, wurden Messungen durch die Ärzte der Ambulanzen mithilfe des MasterScreen Body (Jaeger, Hoechberg, Deutschland) vorgenommen. Hinweise auf das Vorliegen einer obstruktiven Ventilationsstörung liefert vor allem die Einsekundenkapazität FEV<sub>1</sub>. Es ist dasjenige Volumen, das nach stärkster Einatmung innerhalb von 1s so schnell wie möglich ausgeatmet werden kann. Dieses Volumen wird als prozentualer Anteil eines altersentsprechenden Normalwertes angegeben. Als ein zweiter Messwert wurde die forcierte Vitalkapazität FVC gemessen. Die Lungenfunktionsmessungen wurden während der routinemäßigen Besuche in den CF-Ambulanzen etwa alle drei Monate durchgeführt. Im Falle von Exazerbationen wurden zu deren Beginn und spätestens zwei Wochen (im Durchschnitt  $6 \pm 5$  Tage) nach Ende der i.v.-Behandlung zusätzliche Messungen vorgenommen.

### **3.2.4 Bronchiallavage bei Patienten mit anderen Lungenerkrankungen als CF**

Um Informationen darüber zu erhalten, ob auch in der Lunge von Patienten ohne CF-Erkrankung obligate Anaerobier vorhanden sind, wurden Aliquots der gewonnenen BAL von sechs Patienten auf ihren Keimgehalt untersucht. Die BAL-Untersuchung wurde von den Ärzten des Zentrums für Kinderheilkunde des Universitätsklinikums mithilfe von flexiblen Bronchoskopen durchgeführt. Die Details der Untersuchungen wurden der Arbeit von Paul et al. (2004) entnommen. Auch diese Proben wurden in das Labor des

Institutes für Hygiene gebracht und dort innerhalb von 30 Minuten bearbeitet; sie wurden ohne vorherige Verdünnung weiter quantifiziert.

Bei der Identifikation und Quantifikation des Probenmaterials der durchgeführten BAL wurde analog zu denen der Sputumproben vorgegangen. Ein Unterschied jedoch war, dass die höchste Verdünnungsstufe bei  $10^{-8}$  lag.

### **3.3 *In vitro*-Untersuchungen**

#### **3.3.1 Anzuchtmedien**

Für die Untersuchungen in dieser Studie wurden verschiedene Nährböden ausgewählt. Zur Identifikation und Quantifizierung der fakultativen Anaerobier wurde der nicht-selektive Columbia-Agar mit Schafsblut (Art.-Nr. PB5008A, Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) verwendet. Zusätzlich wurde als Selektivmedium für *P. aeruginosa* und *B. cepacia complex*-Bakterien ein Cefrimid-Agar (Ps.-Cefrimid-Agar, Art.-Nr. PO5076A, Oxoid GmbH) benutzt.

Die Identifikation und Quantifikation der obligaten Anaerobier sowie die Resistenzbestimmung wurden mithilfe von verschiedenen nicht-selektiven Agarnährmedien durchgeführt. Neben den jeweiligen Wachstumseigenschaften der meist anspruchsvollen obligat anaeroben Spezies waren auch die Empfehlungen der Hersteller zu beachten. Zum Beispiel beeinflusst die Anwesenheit von bestimmten Wachstumsfaktoren wie Hefeextrakt, Hämin, Vitamin K3 oder der Zusatz von Hammelblut das Wachstum von obligat anaeroben Bakterien positiv [Rodloff 2005]. Deshalb wurde der reichhaltige Schaedler-Agar mit 5% Hammelblut (SCS, bioMérieux® sa) verwendet. Die herkömmlichen Formulierungen von Schaedler-Agar enthalten zu viel Dextrose, die die Glykosidase-aktivität stört, und dadurch die Testaktivität des RapID™ ANA II Systems (remel, Lenexa, KS, USA) reduziert, welches zur Identifikation der obligaten Anaerobier genutzt wurde. Der Schaedler-Agar wird vom Hersteller deshalb für dieses System nicht empfohlen. Stattdessen wurde der nicht-selektive CDC-Agar (CDC, Art.-Nr. PA256506, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) ohne Dextrose empfohlen und in der vorliegenden Studie benutzt. Manche obligate Anaerobier, wie einige *Peptostreptococcus spp.*, werden durch Natriumpolyanetholsulfonat in ihrem Wachstum gehemmt. Diese

Substanz ist häufig ein Bestandteil von Blutkulturmedien. Um eine derartige Wachstumshemmung zu vermeiden, wurde zusätzlich der Brain-Heart-Infusion-Agar, (BHI, Art.-Nr. 313e, heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim, Deutschland) für die obligat anaerobe Bakterienanzucht verwendet.

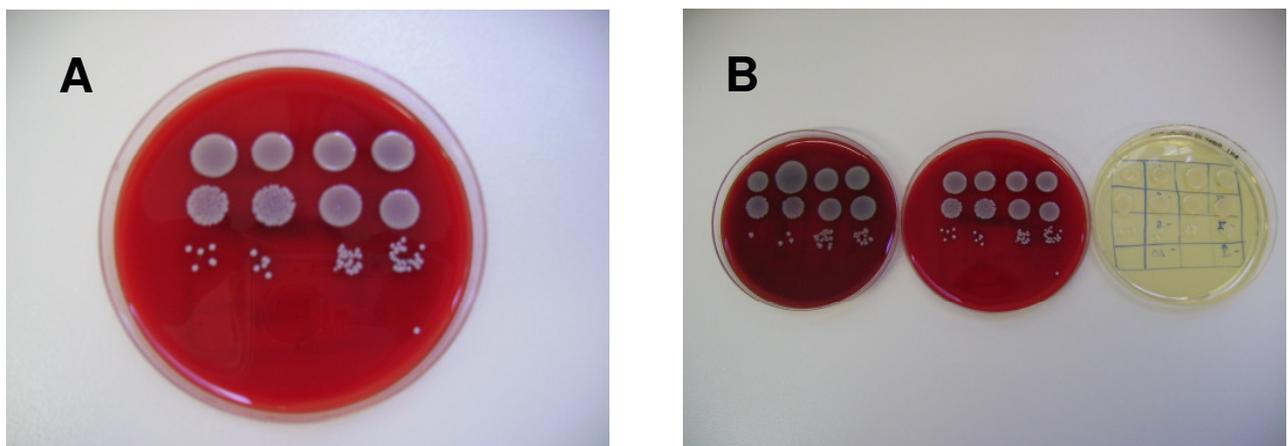
### **3.3.2 Quantitativer Nachweis von fakultativen und obligaten Anaerobiern**

Unmittelbar nach dem Eintreffen im Labor wurden die Sputumproben in den Falcon-Röhrchen gewogen (Feinwaage Adventure ARA 520, Ohaus GmbH, Gießen, Deutschland). Das hochvisköse Sputum eines jeden CF-Patienten wurde 1:1 mit autoklavierter Phosphat-gepufferter Saline (phosphate buffered saline, PBS) verdünnt und kräftig auf dem Schüttelrührer (Reagenzglasschüttler, Reax-Top, Heidolph Instruments GmbH, Kelheim, Deutschland) durchmischt. Eine 20-fache PBS-Stammlösung besteht aus: 85g NaCl, 14,23g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 12 H<sub>2</sub>O und 1,35g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (alles Merck, Darmstadt, Deutschland) in 500ml destilliertem Wasser und wird auf den pH-Wert von 7,4 eingestellt. 100µl der Bakteriensuspension wurden mithilfe einer sterilen Pipettenspitze (Art.-Nr. B007.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) aus dem Falcon-Röhrchen entnommen und in sterile kleine Eppendorf-Röhrchen (Reaktionsgefäße 1,5ml, Art.-Nr. 7551.1, Carl Roth GmbH) gefüllt. Um eine Verdünnungsreihe in zehnfachen Verdünnungsschritten herzustellen, wurden 900µl PBS steril zugegeben. Die hergestellte Suspension wurde erneut mithilfe des Schüttelrührers vermischt. Dann wurden mit einer frischen sterilen Pipettenspitze 100µl der ersten Verdünnungsstufe (10<sup>-1</sup>) in ein neues steriles Eppendorf-Röhrchen eingebracht. Um eine weitere Verdünnung zu erreichen (10<sup>-2</sup>), wurden wieder 900µl PBS dazu pipettiert. Es wurde bis zu einer Verdünnungsstufe von 10<sup>-10</sup> weiter so verfahren.

Die Agarplatten wurden auf Raumtemperatur gebracht, und die Felder für die einzelnen Verdünnungsschritte der zehnfachen Verdünnungsreihe wurden beschriftet. Für die fakultativ anaerobe Bakterienanzucht wurden die Verdünnungsreihen auf Columbia-Agar (Oxoid GmbH) aufgebracht. Schaedler- und BHI-Agarplatten (SCS, bioMérieux<sup>®</sup> sa, BHI, heipha Dr. Müller GmbH) dienten zur Herstellung der Verdünnungsreihen von den obligat anaerob wachsenden Bakterien. Um Doppelbestimmungen (Abb. 3.1A) zu ermöglichen,

wurde zu diesem Zweck zweimal 10µl der einzelnen Verdünnungsstufen mit sterilen Pipettenspitzen auf die jeweiligen Agarplatten aufgebracht. Die inokulierten Columbia-Agarplatten wurden dann für maximal 24 Stunden bei 37°C in einem Brutschrank (Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) inkubiert.

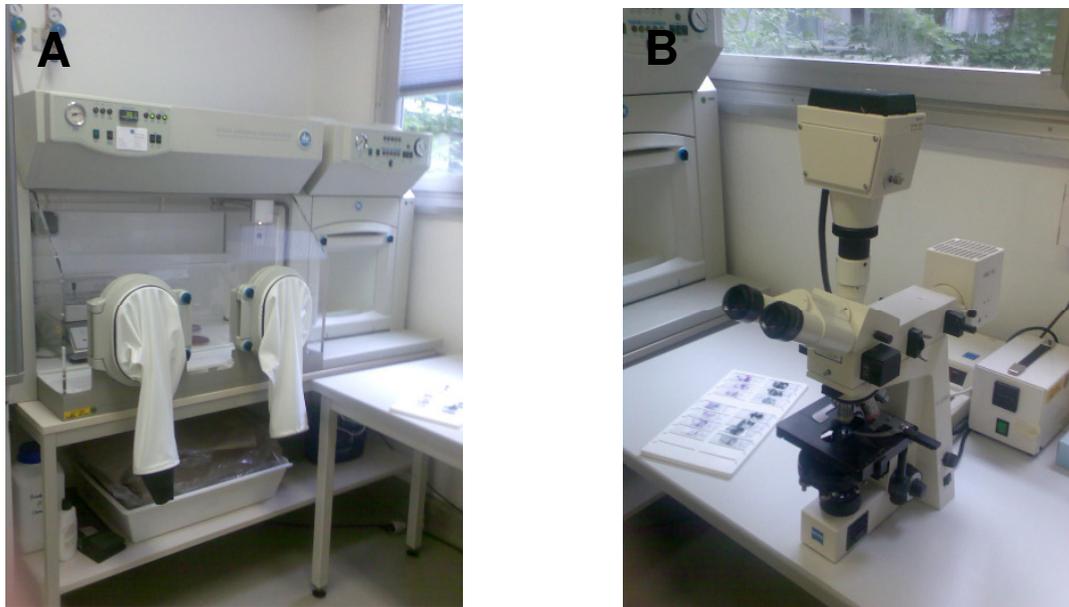
Die phänotypisch unterschiedlich gewachsenen fakultativ anaeroben Bakterienkolonien wurden am nächsten Tag separat ausgezählt und dokumentiert. Bis zu drei phänotypisch verschiedene Arten wurden gezählt. Für die weiteren Untersuchungen wurden die verschiedenen Einzelkolonien mit einer sterilen handelsüblichen Impföse (Einwegimpfeschlinge, Art.-Nr. 731101, Greiner bio-one) auf Columbia-Agar überimpft und unter den gleichen Bedingungen wieder inkubiert.



**Abbildung 3.1:** Verdünnungsreihen auf den verschiedenen Agarplatten mit den gewachsenen Keimen: (A) *S. aureus* auf Columbia-, (B) obligate Anaerobier auf CDC-, SCS- und BHI-Agar.

Obligat anaerob wachsende Bakterien können im Gegensatz zu fakultativen Anaerobiern nur sehr schwer Energie erzeugen und haben deshalb vergleichsweise längere Generationszeiten [Werner und Heizmann, 1992]. Sie wurden für mindestens 48 Stunden, meistens aber bis zu 7 Tage bei konstanten 37°C unter einer Anaerobierbank (Modular Atmosphere Controlled System, MG500, Meintrup dws, Lähden-Holte, Deutschland, Abb. 3.2.A) bebrütet. Die sauerstofffreie Gasmischung dieser Anaerobierbank enthält 80% Stickstoff, 10% Wasserstoff und 10% Kohlendioxid. Mithilfe der Anaerobierbank konnte die für obligate Anaerobier wichtige Anaerobiose/Hypoxie

konstant aufrechterhalten werden.



**Abbildung 3.2:** Anaerobierbank (MG500, Meintrup, Lähden-Holte, **A**) und Mikroskop (Axiolab, Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland, Vergrößerung 100fach, **B**).

Frühestens nach 48 Stunden anaerober Inkubationszeit wurden die ersten gewachsenen Kolonien gezählt und dokumentiert. In einem Zeitraum von bis zu 7 Tagen wurden jeden Tag die Agarplatten unter der Anaerobierbank wiederholt auf das Vorhandensein von neu gewachsenen Keimen untersucht. Bis zu vier phänotypisch unterschiedliche obligat anaerobe Keime wurden gezählt. Auch hier wurden analog zu den fakultativen Anaerobiern wieder die gezählten Kolonien für weitere Untersuchungen auf Schaedler-, BHI- oder CDC-Agar (Abb. 3.1B) überimpft und wie beschrieben inkubiert. Alle unter der Anaerobierbank quantifizierten Bakterien wurden einer aeroben Wachstumskontrolle in Raumluft unterzogen, um fakultative oder aerotolerante Anaerobier auszuschließen. Wenn sie dreimal in Gegenwart von Sauerstoff bei dieser Kontrolle kein Wachstum zeigten, wurden sie als obligate Anaerobier betrachtet und in den folgenden Untersuchungen weiter analysiert und identifiziert. Sputumproben mit anaeroben Werten von weniger als  $1 \times 10^5$  KBE/ml wurden zwar dokumentiert, waren aber von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Dies betraf aber lediglich eine Probe.

### 3.3.3 Identifikation der fakultativ anaeroben Bakterien

Für die Identifizierung von fakultativen Anaerobiern wurden die quantifizierten Übernachtkulturen mithilfe weiterer Tests untersucht. Für diese Tests müssen je nach Bakterientyp (grampositiv oder gramnegativ) ein Oxidase-Test bzw. ein Katalase-Test und ein Koagulase-Test durchgeführt werden. Die Bakterien wurden so lange auf frische Columbia- und Cetrimid-Agarplatten (beides Oxoid GmbH) überimpft, bis sie in Reinkultur vorlagen. Die auf Cetrimid-Agar, dem *P. aeruginosa* und *B. cepacia complex*-Selektivmedium (heipha Dr. Müller GmbH), gewachsenen Bakterien wurden zusätzlich auf Oxidase (BBL™ Dry Slide™ Oxidase, Art.-Nr. 231746, Becton Dickinson GmbH) getestet. Dazu wurde eine Einzelkolonie des Bakteriums mittels einer sterilen Impföse auf die Reaktionsfläche gebracht. Oxidasepositive Organismen wie *P. aeruginosa*, zeigten innerhalb von 20 s eine Dunkelviolett-färbung, die als Ergebnis dokumentiert wurde.

Bei *S. aureus*-Stämmen, die nicht auf Cetrimid wuchsen, wurde ein Katalase-Test (ID Color Katalase (ID-Ase), Art.-Nr. 55561, bioMérieux® sa) durchgeführt, um die Anwesenheit von Katalase nachzuweisen und so eine vorläufige Differenzierung von Katalase-positiven und Katalase-negativen Bakterien zu ermöglichen. Diese Information wurde genau wie das Ergebnis des Staphaurex Plus\* Assays, einem Latex-agglutinations-Schnelltest zum Nachweis von *S. aureus* (Staphaurex Plus\*, Art.-Nr. ZL 33, remel, Lenexa, KS, USA) für die weitere Identifikation der Keime dokumentiert.

Um die zu identifizierenden Erreger der richtigen Identifizierungskarte für das Vitek®-System (bioMérieux® sa), einem biochemischen Identifizierungssystem, zuordnen zu können, wurde ein Grampräparat der jeweiligen Kolonien benötigt. Die Gramfärbung (Färbe-Set, Gram-color modifiziert, phenolfrei, Art.-Nr. 1.01603-0001, Merck) dient als Hilfsmittel zur Taxonomie von Bakterien. Diese Methode zur Einfärbung mikrobiologischer Präparate unterteilt Bakterienzellen in grampositive und gramnegative Keime bzw. in Stäbchen und Kokken. Auf einen beschrifteten Objektträger (Art.-Nr. M 7620, Süsse GmbH, Gudensberg, Deutschland) wurde dazu mit einer großen sterilen Einweg-Öse (Einwegimpfeschlinge, Art.-Nr. 731170, Greiner bio-one) ein Tropfen 0,9%-iger NaCl-Lösung (Braun) aufgetragen. Jeweils eine Einzelkolonie der zu testenden Bakterienkultur

wurde mittels einer kleineren Öse (Greiner bio-one) mit der Flüssigkeit auf dem Objektträger vermischt. Die nach Herstellerangaben fixierten und gefärbten Präparate wurden mikroskopisch (Axiolab, Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland, Abb. 3.2.B) untersucht und die Ergebnisse dokumentiert (Vergrößerung 100fach).

Nachdem die gesammelten Informationen für die Identifikation der quantifizierten fakultativen Anaerobier zusammengetragen worden waren, wurden spezielle Testkarten (ID-Karten, Art.-Nr. V 1305 und V 1316, bioMérieux® sa) mit einer standardisierten Keimsuspension beschickt. Ausgehend von einer Reinkultur des zu identifizierenden Keims (maximal 24 Stunden alt) auf Columbia-Agar wurde eine Einzelkolonie dieser Kultur mittels einer sterilen Einwegimpföse in ein steriles Röhrchen (Art.-Nr. 55.476, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit 1,8ml 0,45%-iger NaCl-Lösung (Art.-Nr. V 1204, bioMérieux® sa) eingebracht und anschließend für 10 s auf dem Schüttelrührer durchmischt. Um eine Trübung entsprechend für gramnegative (McFarland Nr. 1,0) oder grampositive Keime (McFarland Nr. 0,5) zu erhalten, wurde der McFarland-Standard stets am Vitek-Colorimeter (Hach Company, Loveland, Colorado, USA) überprüft. Der McFarland-Trübungsstandard (Art.-Nr. 70900, bioMérieux® sa) besitzt eine definierte optische Dichte (OD) und wird zur Einstellung des Inokulums auf eine gewünschte OD benutzt. Nachdem die gewünschte Trübung erreicht wurde, wurde die Vitek-ID-Karte mit der Suspension befüllt. Die nach der Gramfärbung gewählten und zugeordneten ID-Karten (GNI+ bei gramnegativen und GPI- bei grampositiven Keimen) wurden nun entsprechend der Probe beschriftet und über ein Transferröhrchen (in der Packung mit den Testkarten enthalten, bioMérieux® sa) mit der Bakteriensuspension verbunden. In der Vakuumkammer des Vitek-Gerätes wird diese Suspension in die Karte aufgenommen. Die ID-Karte wurde mit dem Vitek-Sealer (bioMérieux® sa) versiegelt und in dem Vitek-Gerät, einer Inkubator-Ableseeinheit, platziert. Es folgte eine Bebrütung bei 35°C und alle 30 Minuten eine Messung der verschiedenen Reaktionen.

Auf der Vitek-Identifizierungskarte sind 30 Mikroküvetten untergebracht, in denen biochemischen Substrate vorgegeben sind. Eine Küvette dient als Negativkontrolle. Positive Reaktionen werden durch die Vitek-Software ermittelt. Dabei werden die einzelnen Reaktionskammern auf Verminderung der Lichtdurchlässigkeit gemessen und die Reaktionsmuster automatisch interpretiert. Nach 2 bis 18 Stunden Inkubationszeit erfolgt die Auswertung dieser Reaktionsmuster unter Angabe der Wahrscheinlichkeit des

Resultates. Im Falle von Identifikationswahrscheinlichkeiten von weniger als 85% wurde eine zusätzliche Bestätigung mithilfe des BBL-Crystal™-Identifikations-Systems (Art.-Nr. 245140 und 245000, Becton Dickinson GmbH) ausgeführt (Wahrscheinlichkeitsgrenze: 80%).

### 3.3.4 Identifikation der obligat anaeroben Bakterien

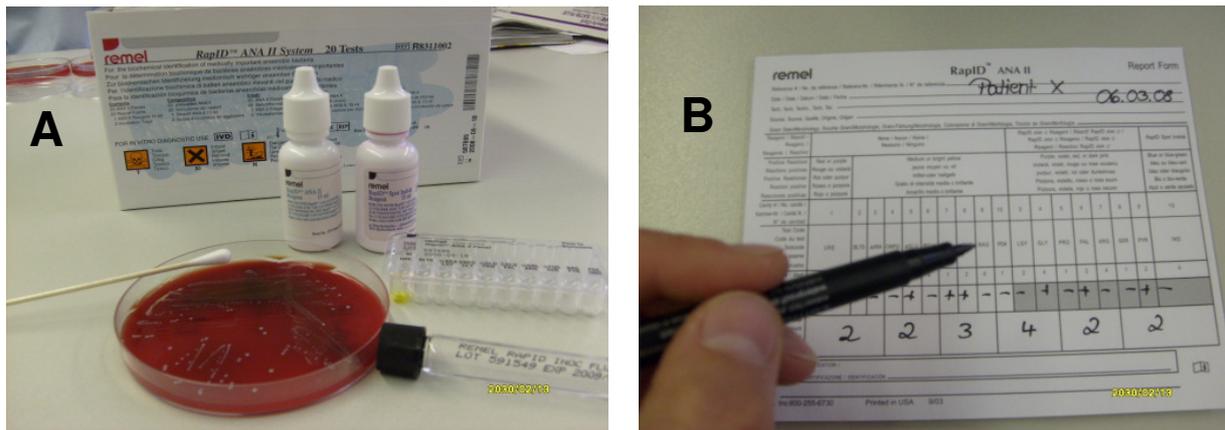
Die quantifizierten obligat anaeroben Kulturoisolate wurden mithilfe des biochemischen Identifizierungssystems RapID™ ANA II und der dazugehörigen Software (ERIC® Software, Elektronisches RapID™ Kompendium, Version 1.0., Art.-Nr. R 8323600, remel) identifiziert. Wichtig dabei war, dass die Bakterienkolonien für diese Untersuchungen auf dem CDC-Agar gewachsen waren (siehe auch Abschnitt 3.3.1).

Zunächst musste das Gramverhalten der gefundenen Keime mittels der Gramfärbung, die analog zu der der fakultativ anaeroben Keime durchgeführt wurde, bestimmt werden. Für die weitere Auswertung musste dann ein Inokulum hergestellt werden. Dazu wurden die Testorganismen in Reinkultur mithilfe eines sterilen Baumwollträgers (Böttger) in die mitgelieferte RapID™-Inokulationsflüssigkeit (1ml, Art.-Nr. 8325102, remel) eingebracht, bis eine Suspension entstand, die dem FcFarland-Trübungsstandard Nr. 3 (bioMérieux® sa) entsprach. Das frisch hergestellte Testisolat wurde in das RapID™-Panel (Art.-Nr. R 8311002, remel) nach Herstelleranweisungen eingebracht und für mindestens vier, aber nicht mehr als sechs Stunden bei 37°C inkubiert. Es war dabei wichtig, dass das Panel in einem Brutschrank ohne CO<sub>2</sub>-Zufuhr bebrütet wurde.

Nach der Inkubation konnte das Panel sofort oder nach Aufbewahrung im Kühlschrank (Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland) bei 2 - 8°C am nächsten Tag ausgewertet werden. Die RapID™ ANA II-Panel enthalten zehn Reaktionsvertiefungen, von denen die dritte bis zehnte Vertiefung bifunktional sind. Es sind 18 verschiedene Reaktionsabläufe möglich, da zwei separate Tests in einer Vertiefung durchgeführt werden können. Zunächst wurde das erste Testergebnis, die Farbveränderung auf Reaktivität in den Vertiefungen 1 bis 10, ausgewertet und auf dem Protokollblatt dokumentiert. In die bifunktionalen Vertiefungen 3 bis 9 wurden dann das RapID™ ANA II-Reagenz und in Vertiefung 10 das RapID™ ANA II-Spot-Indolreagenz (beides remel, Abb. 3.3A)

eingetroppt.

Nach Anweisungen des Herstellers wurde dann diese zweite Testung ebenfalls abgelesen und dokumentiert. Mithilfe des Protokollblattes konnte ein Microcode (Abb. 3.3B) für die dazugehörige Software erstellt werden.



**Abbildung 3.3:** Materialien für das Rapid ANA™ II System (A) und das Protokollblatt mit dem erstellten Microcode (B).

Die individuellen Testergebnisse des Panels und der anderen Laborinformationen ergaben zusammen ein bestimmtes Reaktionsmuster, das statistisch einer bekannten Reaktion für *Taxa* in den Datenbanken oder der Software entspricht (Abb. 3.3A, B). So wurden die gesammelten Daten (Gramverhalten, Bakterienform und der Microcode) der gefundenen Keime in die zum Rapid™ ANA II System gehörende Eric®-Software zur Identifizierung der anaeroben Bakterien eingegeben, oder im Rapid™ ANA II Code-Kopendium nachgeschlagen und verglichen. Im Falle von Identifikationswahrscheinlichkeiten von weniger als 80% wurde das gesamte Verfahren wiederholt. Keime mit einer Identifikationswahrscheinlichkeit von weniger als 80% bei der wiederholten Untersuchung wurden von weiterer Untersuchung ausgeschlossen. Dies traf auf lediglich vier Keime zu. Für Taxonomie und Nomenklatur wurden die Angaben der Hersteller der verschiedenen Identifikationssysteme verwendet. Zwei Flussdiagramme zur Übersicht über das Vorgehen bei der Identifikation und -quantifikation der verschiedenen Bakterien sind im Anhang (Abb. 10.1, Abb. 10.2) zu finden.

### 3.3.5 Resistenzbestimmung

Um herauszufinden, ob die obligaten Anaerobier *in vitro* Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Substanzen aufzeigen, wurden Resistenzbestimmungen durchgeführt. Es wurden alle 139 identifizierten und quantifizierten obligaten Anaerobier der CF-Patienten (136 Keime aus den Sputumproben und 3 Keime von den Rachenabstrichen) in die Untersuchung miteinbezogen. Für die Resistenzbestimmung wurden fünf Antibiotika nach Absprache mit den behandelnden Ärzten ausgewählt. Es handelte sich dabei um Clindamycin (CM, Art.-Nr. 16 V 00958), Ceftazidim (TZ, Art.-Nr. 16 V 00678), Meropenem (MP, Art.-Nr. 16 V 01388), Metronidazol (MZ, Art.-Nr. 16 V 03008) und Piperacillin/Tazobactam (PTC, Art.-Nr. 16 V 02148, alles AB Biodisk, Solna, Schweden). Die beiden Antibiotika Clindamycin und Metronidazol wurden getestet, da ihre gute Wirksamkeit gegen obligate Anaerobier bekannt ist [u.a. Park et al. 1992]. Während Clindamycin auf anaerobe Keime bakteriostatisch wirkt, schädigt Metronidazol, ein bakterizides Nitroimidazol-Derivat, in obligat anaerob wachsenden Bakterien die Nukleinsäuresynthese [Simon und Stille 1989]. Bei Meropenem (Carbapenem), Piperacillin/Tazobactam (Breitspektrum-Penicillin) und Ceftazidim (Cephalosporin der 3. Generation) handelt es sich um heutzutage häufig in der CF-Therapie eingesetzte Antibiotika, die vorwiegend gegen fakultative Anaerobier wirksam sind [Döring et al. 2000].

Zur Resistenzbestimmung bzw. zur Bestimmung der Minimalen-Hemm-Konzentrationen (MHK) von antimikrobiellen Substanzen gegen die in den Sputumproben gefundenen obligaten Anaerobier wurden E-Tests<sup>®</sup> der Firma AB Biodisk, Solna, Schweden, verwendet. Es handelt sich hierbei um eine quantitative Methode zur Bestimmung der MHK von antimikrobiellen Substanzen gegen Mikroorganismen. Die MHK ist die Konzentration eines Antibiotikums, die 99% einer Bakterienkultur *in vitro* abtötet. Die Kriterien für die Bewertung der MHK-Grenzkonzentrationen werden von dem CLSI (Clinical and Laboratory Institute/ NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards; NCCLS/CLSI M11-A6 guideline, Wayne, PA, USA) festgelegt. Sie wurden zur Interpretation der MHK-Werte benutzt.

Die E-Tests<sup>®</sup> bestehen aus einem Plastikstreifen, welcher auf einer Seite mit einer

Konzentrationskala in  $\mu\text{g/ml}$  und einem Buchstabencode zur Identifizierung der jeweiligen antibiotischen Substanz bedruckt wurde. Auf der Rückseite der E-Test<sup>®</sup>-Streifen befindet sich die antibiotische Substanz in verschiedenen Konzentrationen in einem Bereich von 15 zweifachen Verdünnungsschritten.

Für die Resistenztestung musste ein Inokulum, ein Nährmedium mit eingebrachten Keimen, hergestellt werden. Hierfür wurden die zu testenden Keime (Übernachtskultur) mithilfe eines sterilen Watteträgers in ein Röhrchen mit 3ml sterilem 0,9%-igen NaCl gegeben, bis der McFarland-Trübungsstandard von 0,5 erreicht wurde. Der Träger wurde dabei innen gegen die Röhrchenwand gedrückt, um die überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. Mittels eines sterilen Spatels (Drigalski-Spatel, Art.-Nr. 23162185, VWR, Darmstadt, Deutschland) wurde eine SCS-Blutagarplatte mit 100 $\mu\text{l}$  dieser Keimsuspension inokuliert. Die gesamte Agaroberfläche wurde gleichmäßig in drei Richtungen bestrichen.

Nachdem die überschüssige Flüssigkeit absorbiert war, und die Agaroberfläche komplett abgetrocknet war, wurde der E-Test<sup>®</sup>-Streifen mit zwei sterilen Pinzetten auf die vorbereitete Agarplatte aufgelegt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Rückseite des Streifens vollständig Kontakt zu dem Agar hatte und keine Luftbläschen vorhanden waren. Der vorgefertigte exponentielle Gradient der antibiotischen Substanz transfundierte sofort nach Aufbringen des Streifens in den Agarnährboden. Die anaeroben Ansätze mit dem E-Test<sup>®</sup>-Streifen (Abb. 3.4) wurden mindestens über 48 Stunden, meistens länger (bis zu 7 Tagen) unter der Anaerobierbank bei 37°C inkubiert.

Da der Konzentrationsgradient über einen längeren Zeitraum stabil bleibt, kann die MHK sowohl sofort nach 48 Stunden als auch einige Zeit später abgelesen werden. Sie wird direkt von der Skala in  $\mu\text{g/ml}$  an dem Schnittpunkt der E-Test<sup>®</sup>-Streifen mit der entstandenen Hemmellipse bestimmt.



**Abbildung 3.4:** Resistenztestung mithilfe des E-Test<sup>®</sup> (AB Biodisk) bei einem obligaten Anaerobier gegen Piperacillin/Tazobactam (PTC) auf SCS-Agar.

Die MHK der einzelnen Antibiotika werden in sensible, intermediäre und resistente Bereiche unterteilt. Als Grenzen zwischen sensibel, intermediär und resistent gelten laut Herstellerangaben die Werte für obligate Anaerobier wie folgt: bei sensibel - intermediär - resistent gilt für CM 2 - 4 - 8 (für obligat anaerobe Streptokokken 0,5 - 1 - 2), für MZ 8 - 16 - 32, für MP 4 - 8 - 16, für PTC 32 - 64 - 128 (für obligat anaerobe Staphylokokken 8 - 16; es wurde kein Wert für intermediär angegeben) und für TZ  $\geq 8$ .

### 3.3.6 Einfrierkulturen

Die Einfrierkulturen dienen der längerfristigen Aufbewahrung der identifizierten Bakterien. Für die fakultativ anaeroben Keime wurden Kolonien einer Übernachtkultur verwendet. Die obligat anaerob wachsenden Bakterien wurden je nach Generationszeit sofort bei gutem Wachstum auf SCS-Agar verwendet. Nach der optischen Prüfung auf Reinheit eines Keimes wurde dieser mithilfe einer sterilen Impföse von der Agarplatte abgesammelt und in ein steriles, beschriftetes Gläschen (Gewindepräparategläser mit Schraubkappe, Art.-Nr. 391H6110, Scherf Europa GmbH, Meiningen, Deutschland) mit 1,8ml Skim milk (Magermilch gepulvert, Oxoid GmbH) gegeben und gut vermischt. Die komplett abgeernteten Kulturen wurden in einer Tiefkühltruhe (Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) bei  $-53^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.4 Statistik**

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben (Excel, Microsoft, Redmont, Wash, USA). Signifikanzberechnungen (Student's t-test) wurden gleichfalls in Excel ausgeführt. p-Werte  $<0,05$  wurden als signifikant angesehen. Zur Bestimmung der Korrelation wurde der Pearson'sche Korrelationskoeffizient  $R^2$  mit winstat (Microsoft) berechnet.

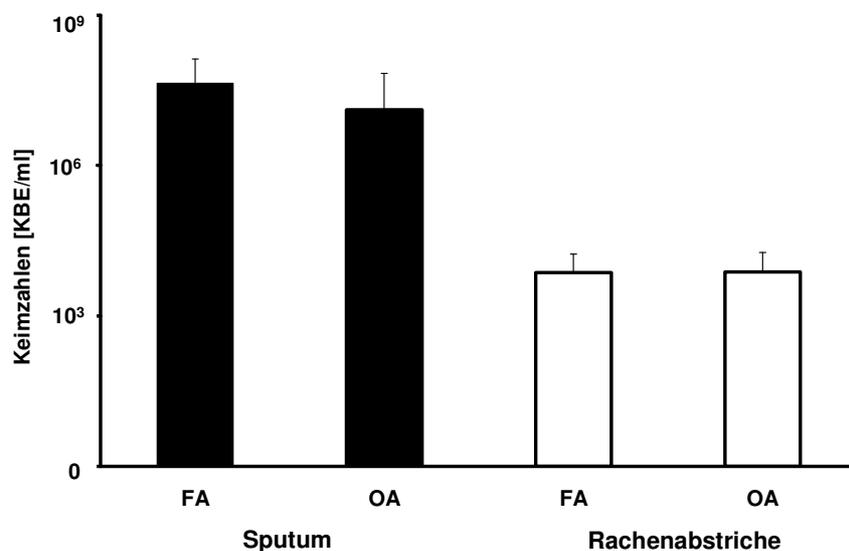
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Quantitativer Nachweis von fakultativ und obligat anaeroben Bakterien in Sputumproben

Insgesamt wurden innerhalb der vorliegenden Studie 92 Sputumproben von 39 CF-Patienten (78 Proben von 31 Erwachsenen und 14 Proben von 8 Kindern) auf das Vorhandensein von fakultativ und obligat anaeroben Keimen untersucht (Tab. 10.1, im Anhang). Fakultative Anaerobier wie *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *B. cepacia complex*-Bakterien konnten in 83 der gesammelten Proben (90,2%) nachgewiesen werden. Lediglich in neun Proben wurden zum Zeitpunkt der Untersuchung keine fakultativen Anaerobier gefunden. Die mittleren Keimzahlen für die fakultativen Anaerobier in den Sputumproben lagen bei  $4,4 \times 10^7 \pm 9,0 \times 10^7$  KBE/ml (im Bereich von  $1 \times 10^5$  bis zu  $4 \times 10^8$  KBE/ml) (Abb. 4.1).

Um herauszufinden, ob und in welchem Ausmaß neben den fakultativ anaeroben Bakterien auch obligat anaerobe Bakterien im Sputum von CF-Patienten existieren, wurden die 92 Sputumproben mithilfe von streng anaeroben mikrobiologischen Methoden untersucht. In 75 der untersuchten Sputumproben (81,5%) und bei 35 der 39 Patienten (89,7%) wurden obligat anaerobe Bakterien nachgewiesen. Die mittleren Keimzahlen betragen  $1,3 \times 10^7 \pm 5,6 \times 10^7$  KBE/ml und reichten von  $1 \times 10^5$  bis zu  $5,5 \times 10^8$  KBE/ml (Abb. 4.1).

Die Keimzahlen der fakultativ anaeroben Bakterien waren verglichen mit denen der obligat anaeroben Bakterien in den Sputumproben von CF-Patienten ähnlich hoch (Abb. 4.1). Zwar lagen die Keimzahlen der obligat anaeroben Bakterien geringfügig höher als diejenigen der fakultativ anaeroben Keime, eine Korrelation zwischen fakultativ und obligat anaeroben Keimzahlen in allen untersuchten Sputumproben bestand nicht ( $R^2=0.0009$ ).



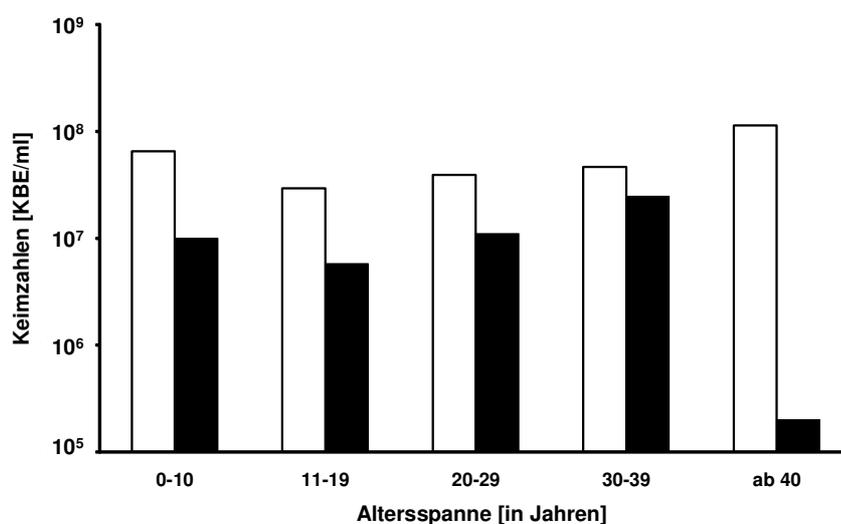
**Abbildung 4.1:** Keimzahlen von fakultativen Anaerobiern (FA) und obligaten Anaerobiern (OA) in 92 Sputumproben (■) und sieben Rachenabstrichen (□), Mittelwert aus dreifacher Doppelbestimmung.

Um die Frage zu beantworten, ob die Anwesenheit bzw. das Vorkommen von obligaten Anaerobiern im Sputum einen Einfluss auf die Keimzahlen der fakultativen Anaerobier *P. aeruginosa* und *S. aureus* nimmt, wurden die Keimzahlen der fakultativen und obligaten Keimarten aller Sputumproben korreliert. Der Vergleich von Keimzahlen in Sputum, das *P. aeruginosa* zusammen mit obligaten Anaerobiern (24 Proben,  $5,7 \times 10^7 \pm 1,1 \times 10^8$  KBE/ml) enthält, und Sputum, welches *P. aeruginosa*, aber keine obligaten Anaerobier enthält (11 Proben,  $4,9 \times 10^7 \pm 8,8 \times 10^7$  KBE/ml) zeigte keinen Unterschied ( $p=0,825$ ). Gleiches galt für Sputumproben mit *S. aureus* mit (28 Proben,  $1,7 \times 10^7 \pm 3,2 \times 10^7$  KBE/ml) und ohne obligate Anaerobier (5 Sputen,  $9,3 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^7$  KBE/ml;  $p=0,628$ ). Eine weitere Korrelation ergab, dass auch der Unterschied zwischen den Keimzahlen der obligaten Anaerobier in Sputumproben mit *P. aeruginosa* oder *S. aureus* statistisch nicht signifikant war ( $p=0,584$ ).

Von den acht untersuchten Kindern ( $\leq 18$  Jahre) wurden 14 Sputumproben gesammelt und auf fakultative und obligate Anaerobier untersucht. Bei sechs der Kinder (75,0%) enthielten 9 Sputumproben (78,6%) obligate Anaerobier.

Bei den Erwachsenen waren in 94,9% der Sputen obligat anaerob wachsende Keime nachweisbar. Zwischen den Keimzahlen der Erwachsenen und Kinder mit CF gab es keine signifikanten Unterschiede (fakultative Keime  $p=0,238$ ; obligate Keime  $p=0,629$ ). Die mittleren Keimzahlen der Erwachsenen betragen für die fakultativen Anaerobier  $4,8 \times 10^7 \pm 9,4 \times 10^7$  KBE/ml und für die obligaten Anaerobier  $1,5 \times 10^7 \pm 6,2 \times 10^7$  KBE/ml. Bei den Kindern konnten fakultative Keime mit Zahlen von  $8,6 \times 10^6 \pm 1,9 \times 10^7$  KBE/ml und die obligaten Keime mit  $5,6 \times 10^6 \pm 4,5 \times 10^6$  KBE/ml nachgewiesen werden. Von einem Kind wurden fünf Sputumproben untersucht. Es konnten vier obligate Keimarten (*Peptostreptococcus prevotii*, *Staphylococcus saccharolyticus*, *Actinomyces odontolyticus* und *Actinomyces turicensis*) bis zu 63 Tage lang wiederholt nachgewiesen werden.

Eine weitere Untersuchung ergab, dass die Keimzahlen in den Sputumproben verschiedener Altersspannen der CF-Patienten keine bedeutenden Unterschiede zeigten (Abb. 4.2). Lediglich in der Altersspanne ab 40 Jahre sind die Keimzahlen der obligaten Anaerobier viel geringer als in den Altersspannen zuvor. In dieser Gruppe konnte nur eine Probe von einer CF-Patientin im Alter von 64 Jahren untersucht werden. Das Alter dieser Patientin liegt weit über dem Durchschnittsalter eines normalen CF-Patienten (siehe Einleitung) und lässt sich möglicherweise durch eine geringe Mutation oder einen nur geringen Defekt des Chromosoms 7 erklären.



**Abbildung 4.2:** Mittlere Keimzahlen (n=92 Sputumproben) von fakultativen und obligaten Anaerobiern in fünf verschiedenen Altersspannen.

## 4.2 Identifikation der fakultativ und obligat anaeroben Bakterien in Sputumproben

Von den insgesamt 39 CF-Patienten waren sowohl 14 Patienten chronisch mit *P. aeruginosa*, als auch 14 von ihnen mit *S. aureus* infiziert. Drei der Patienten wiesen gleichzeitig eine Besiedlung mit den Keimen *P. aeruginosa* und *S. aureus* auf, drei weitere Patienten *B. cepacia complex*-Bakterien und ein Patient *Stenotrophomonas maltophilia*. Bei fünf Patienten wurden zwei fakultativ anaerobe Bakterien gleichzeitig identifiziert (3 x *P. aeruginosa* zusammen mit *S. aureus*, 1 x *P. aeruginosa* mit *Stenotrophomonas maltophilia*, 1 x *S. aureus* mit *Stenotrophomonas maltophilia*). In insgesamt 42 der gesammelten Sputumproben wurden mikroaerophile Streptokokken gefunden. Sie stellen üblicherweise Kontaminationen der oberen Atemwege dar [Gilligan 1991; Taylor et al. 2006] und wurden in die weitere Auswertung nicht miteinbezogen.

Bei 35 von 39 Patienten (89,7%) wurden einer oder mehrere obligate Anaerobier gefunden. In den 75 positiven Sputumproben wurden insgesamt 136 obligate Anaerobier (15 verschiedene Genus und 35 verschiedene Spezies) identifiziert (Tab. 4.1). Pro Sputumprobe wurden im Höchstfall fünf verschiedene Keime gefunden. Es wurden ausschließlich Keimzahlen von  $1 \times 10^5$  KBE/ml oder mehr in die Studie aufgenommen. Daher wurde eine Sputumprobe mit vier identifizierten obligaten Anaerobiern (*Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius*, *S. saccharolyticus* und *Ps. prevotii*) und Keimzahlen von je  $1 \times 10^4$  KBE/ml nicht mit in die Auswertung einbezogen.

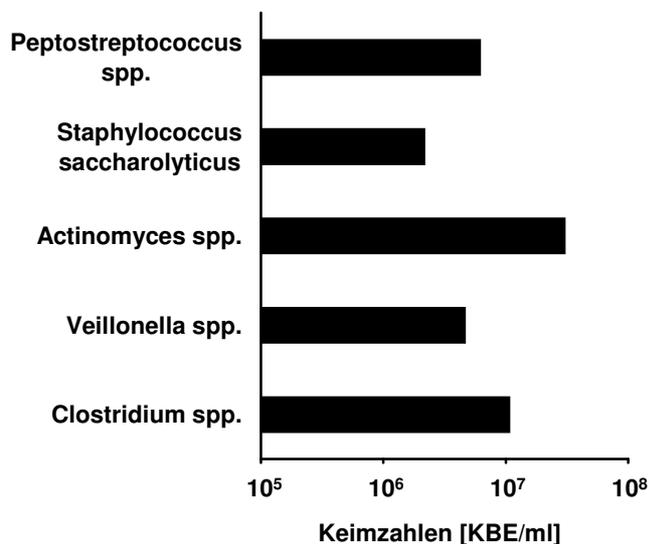
Von 26 der insgesamt 39 CF-Patienten (66,7%) wurden während des Untersuchungszeitraumes zwei oder mehrere (maximal sechs) Sputumproben abgegeben und ausgewertet. Während bei neun dieser Patienten (34,6%) dieselbe Spezies wiederholt gefunden wurde, wurden bei zwei der Patienten bis zu drei obligat anaerobe Spezies gleichzeitig festgestellt. Eine identische Spezies konnte bis zu elf Monate lang wiederholt nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass einzelne obligate Anaerobier für einen längeren Zeitraum in der CF-Lunge existieren können.

**Tabelle 4.1:** Obligate Anaerobier in 92 Sputumproben von CF-Patienten (n=39).

Genus	Anzahl	Spezies	Anzahl
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	32	<i>anaerobius</i>	6
		<i>micros</i>	1
		<i>prevotii</i>	19
		<i>tetradius</i>	6
<i>Staphylococcus spp.</i>	23	<i>sacharolyticus</i>	23
<i>Actinomyces spp.</i>	19	<i>israelii</i>	2
		<i>meyeri</i>	3
		<i>naeslundii</i>	1
		<i>odontolyticus</i>	7
		<i>turicensis</i>	6
<i>Veillonella spp.</i>	14		14
<i>Clostridium spp.</i>	9	<i>bifermentans</i>	1
		<i>butyricum</i>	1
		<i>clostridioforme</i>	2
		<i>difficile</i>	2
		<i>hastiforme</i>	2
		<i>innocuum</i>	1
<i>Streptococcus spp.</i>	8	<i>constellatus</i>	7
		<i>intermedius</i>	1
<i>Bacteroides spp.</i>	7	<i>tectum</i>	6
		<i>stercoris</i>	1
<i>Gemella spp.</i>	4	<i>morbilorum</i>	4
<i>Capnocytophaga spp.</i>	3		3
<i>Eubacterium spp.</i>	3	<i>aerofaciens</i>	2
		<i>limosum</i>	1
<i>Lactobacillus spp.</i>	3	<i>acidophilus</i>	2
		<i>jensenii</i>	1
<i>Mobiluncus spp.</i>	3	<i>curtisii</i>	2
		<i>mulieris</i>	1
<i>Prevotella spp.</i>	3	<i>corporis</i>	1
		<i>melaninogenica</i>	2
<i>Propionibacterium spp.</i>	3	<i>acnes</i>	1
		<i>granulosum</i>	1
		<i>propionicum</i>	1
<i>Wolinella spp.</i>	2		2
<b>Gesamtzahl</b>	<b>136</b>		<b>136</b>

Die insgesamt häufigsten nachgewiesenen Keime waren *Peptostreptococcus spp.* (32x) und *Staphylococcus spp.* (23x). Ihnen folgten *Actinomyces spp.* (19x), *Veillonella spp.* (14x), *Clostridium spp.* (9x), *Streptococcus spp.* (8x) und *Bacteroides spp.* (7x). Acht weitere Gattungen traten insgesamt 24-mal auf (Tab. 4.1).

Die durchschnittlichen Keimzahlen für die fünf häufigsten obligaten Anaerobier reichten von  $2,2 \times 10^6$  KBE/ml für *S. saccharolyticus* bis zu  $3,1 \times 10^7$  KBE/ml für *Actinomyces spp.* (Abb. 4.3).



**Abbildung 4.3:** Keimzahlen (n=92 Sputumproben) der fünf am häufigsten nachgewiesenen obligaten Anaerobier.

Um genauer zu untersuchen, welchen Beitrag die identifizierten und quantifizierten obligaten Anaerobier zur Pathogenese der chronischen Lungeninfektion haben, wurden die Lungenfunktionsparameter FEV<sub>1</sub> und FVC aller 39 CF-Patienten bestimmt. Es stellte sich heraus, dass die Lungenfunktionswerte der Patienten mit Nachweis von obligaten Anaerobiern sich nicht signifikant von denjenigen der Patienten ohne obligate Anaerobier ( $p=0,087$  für FEV<sub>1</sub>,  $p=0,880$  für FVC) unterschieden.

### 4.3 Rachenabstriche und Vergleich der Keimzahlen mit denen der Sputumproben

Bei sieben CF-Patienten wurde ein Rachenabstrich entnommen, um eine mögliche orale Kontamination des Sputums durch Bakterien des Mund-Rachen-Raumes zu erfassen. Sowohl fakultative Anaerobier als auch obligate Anaerobier konnten in ihren Sputumproben nachgewiesen werden. Die Keimzahlen im Sputum lagen bei  $1,4 \pm 1,5 \times 10^7$  KBE/ml für die fakultativen und bei  $3,8 \pm 5,8 \times 10^7$  KBE/ml für die obligaten Anaerobier.

Bei den Untersuchungen der Rachenabstriche wurde bei allen Patienten *P. aeruginosa* in der Mundhöhle gefunden ( $7,3 \times 10^3 \pm 9,9 \times 10^3$  KBE/ml, Abb. 4.1). Es wurden bei drei von sieben Rachenabstrichen (42,9%) obligat anaerobe Bakterien mit einer Keimzahl von  $7,5 \times 10^3 \pm 1,1 \times 10^4$  KBE/ml ermittelt. Im Vergleich zu den Keimzahlen im untersuchten Sputum lagen die Bakterienzahlen in den Rachenabstrichen mehr als drei Potenzen niedriger. Eine Kontamination des Sputums mit Bakterien aus der Mundhöhle während der Expektoration kann somit ausgeschlossen werden (Abb. 4.1).

### 4.4 Bronchoalveolarlavage

Um beurteilen zu können, ob das Vorkommen von obligaten Anaerobiern in respiratorischen Proben spezifisch für CF-Patienten ist, wurde bei sechs Kindern mit anderen Lungenerkrankungen als CF eine diagnostische BAL durchgeführt. Bei drei der Patienten war die Lunge steril; es konnten keine Keime in der Lunge nachgewiesen werden. In den BALs von drei anderen Patienten wurden Streptokokken nachgewiesen, die als Kontamination der oberen Atemwege anzusehen sind [Gilligan 1991; Taylor 2006]. Zusätzlich fanden sich in dem Probenmaterial fakultativ anaerobe Bakterien in geringen Keimzahlen ( $\leq 4 \times 10^4$  KBE/ml).

Lediglich bei der Untersuchung der BAL des Patienten mit chronischer Retentionspneumonie und eitrigen Sekretionen wurde der fakultative Anaerobier *S. aureus* ( $2 \times 10^2$  KBE/ml) zusammen mit dem obligat anaerob wachsenden Bakterium *S. saccharolyticus* ( $1 \times 10^2$  KBE/ml) nachgewiesen. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass große Mengen von hypoxischem Sputum vorliegen müssen, damit obligat anaerobe Bakterien in hohen Keimzahlen gefunden werden können.

## 4.5 Resistenzbestimmung

Die 139 mithilfe von E-Tests<sup>®</sup> durchgeführten Resistenzbestimmungen der obligat anaeroben Keime (136 aus Sputumproben, 3 aus Rachenabstrichen, Tab. 4.2) ergaben hohe Empfindlichkeiten der obligaten Anaerobier auf die Antibiotika Meropenem (lediglich 3,6% resistente Stämme), Piperacillin/Tazobactam (22,3%) und Clindamycin (23,7%). Im Gegensatz dazu wiesen die Antibiotika Metronidazol (46,0%) und Ceftazidim (49,6%) eine erheblich geringere Wirksamkeit vor.

**Tabelle 4.2:** Antibiotische Empfindlichkeit von obligat anaeroben Bakterien, Zahl der resistenten Stämme (in %). PTC: Piperacillin/Tazobactam, CM: Clindamycin, MZ: Metronidazol, MP: Meropenem, TZ: Ceftazidim.

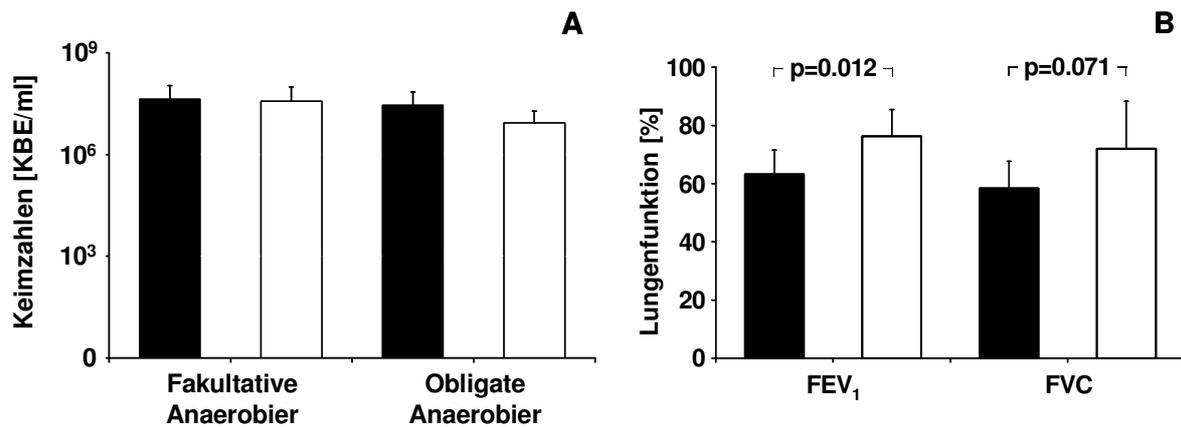
Genus	Anzahl	PTC	CM	MZ	MP	TZ
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	32	1 (3)	9 (28)	28 (88)	0 (0)	5 (16)
<i>S. saccharolyticus</i>	23	18 (78)	1 (4)	2 (9)	1 (4)	21 (91)
<i>Actinomyces spp.</i>	19	1 (5)	7 (35)	8 (40)	2 (10)	10 (50)
<i>Veillonella spp.</i>	14	9 (60)	0 (0)	3 (20)	1 (7)	12 (80)
<i>Clostridium spp.</i>	9	1 (11)	3 (33)	2 (22)	0 (0)	4 (44)
<i>Streptococcus spp.</i>	8	0 (0)	2 (25)	7 (88)	0 (0)	2 (25)
<i>Bacteroides spp.</i>	7	0 (0)	2 (29)	0 (0)	0 (0)	5 (74)
<i>Gemella morbillorum</i>	4	0 (0)	2 (40)	3 (60)	0 (0)	3 (60)
<i>Capnocytophaga spp.</i>	3	0 (0)	1 (33)	3 (100)	1 (33)	1 (33)
<i>Eubacterium spp.</i>	3	0 (0)	2 (67)	2 (67)	0 (0)	2 (67)
<i>Lactobacillus spp.</i>	3	0 (0)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (33)
<i>Mobiluncus spp.</i>	3	0 (0)	0 (0)	1 (33)	0 (0)	0 (0)
<i>Prevotella spp.</i>	3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (67)
<i>Propionibacterium spp.</i>	3	0 (0)	0 (0)	3 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>Wolinella spp.</i>	2	1 (50)	1 (50)	2 (100)	0 (0)	1 (50)
<b>Insgesamt</b>	<b>139</b>	<b>22,3%</b>	<b>23,7%</b>	<b>46,0%</b>	<b>3,6%</b>	<b>49,6%</b>

Bezogen auf die einzelnen Bakterienarten ergaben sich zudem inhomogene Ergebnisse. *Peptostreptococcus spp.* wurde am häufigsten getestet (32 quantifizierte und identifizierte Keime). Alle Peptostreptokokken waren auf Meropenem empfindlich, während 87,5% von ihnen gegen Metronidazol resistent waren. Meropenem zeigte auch eine gute Wirkung gegen *S. saccharolyticus* (23 Isolate, nur eines war resistent), *Actinomyces spp.* (19 Isolate, 10,0% resistent), *Veillonella spp.* (14 Keime, 7,0% resistent), *Clostridium spp.* (neun Keime, alle zu 100% sensibel), *Streptococcus spp.* (acht Keime, alle zu 100% sensibel), und *Bacteroides spp.* (sieben Keime, alle zu 100% sensibel). Kein anderes Antibiotikum war ebenso effizient bezüglich der sieben häufigsten Bakterienarten. Ceftazidim war in dieser Hinsicht das am geringsten wirksame Antibiotikum (Tab. 4.2).

## 4.6 Exazerbationen

Während des gesamten Untersuchungszeitraumes wurden bei 12 CF-Patienten Exazerbationen [Fuchs 1994] festgestellt. Der reduzierte klinische Zustand der Patienten zu Beginn der Exazerbation spiegelte sich in signifikant reduzierten Lungenfunktionsparametern im Vergleich zu der Gesamtheit der innerhalb dieser Studie untersuchten CF-Patienten wider: FEV<sub>1</sub> betrug  $63,2 \pm 8,3\%$  versus  $73,6 \pm 14,2\%$ ,  $p=0,056$ , FVC betrug  $58,4 \pm 9,2$  versus  $72,2 \pm 17,5\%$ ,  $p=0,040$ . Die Keimzahlen der Sputumproben von den 12 Patienten mit Exazerbationen vor Therapie waren den Keimzahlen der insgesamt untersuchten CF-Patienten sehr ähnlich ( $5,6 \times 10^7 \pm 1,0 \times 10^8$  versus  $4,3 \times 10^7 \pm 6,4 \times 10^7$  KBE/ml,  $p=0,642$  für die fakultativen Anaerobier, und  $2,5 \times 10^7 \pm 7,9 \times 10^7$  versus  $2,9 \times 10^7 \pm 4,0 \times 10^7$  KBE/ml,  $p=0,862$  für die obligaten Anaerobier, Abb. 4.4).

Alle Patienten mit Exazerbationen erhielten zusätzlich zur normalen Therapie eine zwei- oder dreiwöchige i.v.-Behandlung mit spezifisch gegen *P. aeruginosa* wirksamen Antibiotika wie Piperacillin/Tazobactam, Ceftazidim, Meropenem oder Cefepim. Nach Beendigung der Therapie hatten sich die beiden Lungenfunktionsparameter FEV<sub>1</sub> und FVC stark verbessert (Abb. 4.4A): FEV<sub>1</sub> stieg signifikant von  $63,2 \pm 8,3\%$  auf  $76,2 \pm 9,3\%$  ( $p=0,012$ ) an. FVC zeigte mit  $58,4 \pm 9,2\%$  auf  $71,9 \pm 16,4\%$  ( $p=0,071$ ) einen deutlich positiven Trend an.



**Abbildung 4.4:** Nahezu unveränderte Keimzahlen der Anaerobier (A) bei signifikantem Anstieg der Lungenfunktionswerte (B) von 12 CF-Patienten mit Exazerbationen vor Beginn der Therapie (■) und nach Therapieende (□), FEV<sub>1</sub>=Einsekundenkapazität, FVC=Vitalkapazität.

Bei allen Patienten mit Exazerbationen konnten in den Sputumproben obligate Anaerobier nachgewiesen werden. Die Keimzahlen der fakultativ und obligat anaeroben Bakterien veränderten sich nur geringfügig nach Therapieende (Abb. 4.4A): für die fakultativen Anaerobier sanken die Keimzahlen von  $4,3 \times 10^7 \pm 6,4 \times 10^7$  auf  $3,7 \times 10^7 \pm 6,1 \times 10^7$ ,  $p=0,807$ , und für die obligaten Anaerobier von  $2,9 \times 10^7 \pm 4,0 \times 10^7$  auf  $8,4 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^7$  KBE/ml,  $p=0,134$  (Abb. 4.4B). Die Keimreduktion war nur gering, obwohl die fakultativen Anaerobier im Antibiogramm empfindlich gegen das jeweilige eingesetzte Antibiotikum waren. Bei sieben der 12 Patienten (58%) mit akuten Exazerbationen fanden sich nach Therapieende ein oder mehrere obligate Anaerobier, die eine Resistenz gegen das jeweilige zur Therapie genutzte Antibiotikum zeigten.

## 5 Diskussion

**Nachweis von obligaten Anaerobiern im Sputum von Patienten mit CF.** In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der überwiegenden Zahl der Sputumproben (81,5%) und bei 35 CF-Patienten (89,7%) obligate Anaerobier in einer Vielzahl von Spezies vorhanden sind. Bereits bei CF-Kindern sind diese Keimarten fast so häufig zu finden wie bei CF-Erwachsenen. Damit handelt es sich beim Nachweis von obligat anaeroben Bakterien bei CF-Patienten nicht um eine Ausnahme, diese bakterielle Besiedlung der Lunge stellt vielmehr für CF-Patienten die Regel dar.

Dieses Ergebnis ist in weitgehender Übereinstimmung mit den Untersuchungen anderer Forschergruppen [Rogers et al. 2004; Field et al. 2005; Harris et al. 2005]. Zwar wurden in unserer Studie nicht so häufig *Prevotella spp.* nachgewiesen wie bei Harris et al. oder Rogers et al., die *Prevotella spp.* in bis zu 57% [Harris et al. 2005] oder 71% [Rogers et al. 2004] der Sputumproben fanden. Diese Differenzen sind möglicherweise auf eventuelle regionale Unterschiede oder unterschiedliche Nachweistechiken zurückzuführen. So wurden zum Beispiel in der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zu Field [Field et al. 2005] keine Antibiotika-haltigen Nährmedien verwendet. Außerdem ist es gut möglich, dass die rRNA-Methode eine höhere Sensitivität bezüglich des Nachweises von niedrigen Keimkonzentrationen der obligaten Anaerobier aufweist. Eine zusätzliche Erklärung für die Unterschiede zwischen den anaeroben Identifikationen könnte durch unterschiedliche Taxonomie und Nomenklatur der obligaten Anaerobier gegeben sein. (Die Bezeichnungen für die obligaten Anaerobier werden kontinuierlich modifiziert [Koneman et al. 1997; Vandamme 2003]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Taxonomie verwendet, die durch die Hersteller der jeweiligen biochemischen Identifikationssysteme vorgegeben worden war.)

**Identifikation von obligaten Anaerobiern.** Zwischen dem Nachweis von bestimmten obligat anaeroben Bakterienspezies (Tab. 4.1) und dem Nachweis von *P. aeruginosa* oder *S. aureus* bestand keine signifikante Korrelation. Auch die Keimzahlen der einzelnen identifizierten obligaten Anaerobierspezies unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit der Begriff "obligate Anaerobier" ohne weitere Spezifikation verwendet. Da jeder einzelne anaerobe Stamm in dieser

Arbeit auf Wachstum in normaler Luft getestet wurde, und jeder Stamm, der unter diesen Wachstumsbedingungen überlebte, im Rahmen der weiteren Evaluation unberücksichtigt blieb, sind mit dieser Maßnahme fakultative und aerotolerante Anaerobier aus der Untersuchung ausgeschlossen worden. Somit wurden ausschließlich strikte und moderat obligate Anaerobier im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Im Umkehrschluss bedeutet der häufige Nachweis dieser obligaten Anaerobier in hohen Keimzahlen allerdings auch, dass große Teile dieses Sputums hypoxisch oder anaerob sein müssen, wie dies bereits früher in einer Untersuchung von Worlitzsch et al. (2002) gezeigt worden war.

Anaerobier sind bei den standardmäßigen aeroben Kultivierungsmethoden nicht nachweisbar, da sie aufgrund ihrer Sauerstoffempfindlichkeit bei Zutritt von Luftsauerstoff auf Nährböden keine Kolonien ausbilden. Sie werden nach ihrer Fähigkeit, in Gegenwart von Luftsauerstoff existieren zu können, eingeteilt in obligat anaerobe und aerotolerante Bakterien. Letztere zeigen kein oder ein nur sehr geringes Wachstum auf Agarnährmedien bei Raumluft oder in einem Inkubator mit 5 - 10% Kohlendioxid auf. Unter strengen anaeroben Bedingungen dagegen bilden sie normale Kolonien auf den Nährmedien. Die obligaten Anaerobier werden weiter unterschieden in strikte und moderate obligate Anaerobier. Für die strikt-obligaten Anaerobier ist der atmosphärische Sauerstoff hochgradig toxisch. Sie wachsen nicht auf Agaroberflächen, wenn der Sauerstoffgehalt der Umgebung größer als 0,5% ist. Die am häufigsten aus Laborproben isolierten Anaerobier sind die moderaten obligaten Anaerobier. Der Luftsauerstoff ist auch für diese Bakterien toxisch. Da diese Bakterien eine höhere Toleranz gegenüber den toxischen Wirkungen des Sauerstoffs haben, können sie in Gegenwart von Sauerstoffkonzentrationen von 2 - 8% (Durchschnitt: 3%) eine kurze Zeit lang existieren [Koneman et al. 1994].

**Quantifikation der obligaten Anaerobier.** Die obligat anaerob wachsenden Bakterien im CF-Sputum erreichten mit  $2,2 \times 10^7 \pm 6,9 \times 10^7$  KBE/ml sehr hohe Keimzahlen (Abb. 4.1). Der Nachweis von Anaerobiern mithilfe der modernen und häufig verwendeten rRNA-Technik [Rogers et al. 2004; Harris et al. 2005] konnte die Möglichkeit einer oralen Kontamination nicht ausschließen [Boutaga et al. 2005; Lee et al. 2006; Gura 2008]. Da die Sensitivität dieser Methode extrem hoch ist, genügt möglicherweise bereits ein kurzer Kontakt des ausgehusteten Sputums mit der kontaminierten Mundschleimhaut für einen positiven rRNA-Nachweis von obligaten Anaerobiern.

**Ausschluss einer oralen Kontamination des Sputums.** Es wurden Rachenabstriche bei CF-Patienten durchgeführt, die sowohl *P. aeruginosa* als auch obligate Anaerobier im Sputum mit Keimzahlen von mehr als  $1 \times 10^7$  KBE/ml aufwiesen. Nach erfolgter Expektoratation des Sputums war *P. aeruginosa* in allen Rachenabstrichen nachweisbar, während nur bei wenigen CF-Patienten auch obligate Anaerobier gefunden wurden. Die Keimzahlen für *P. aeruginosa* und die obligaten Anaerobier waren sehr ähnlich (Abb. 4.1). Beide lagen um mehr als drei Zehnerpotenzen unter den Keimzahlen des Sputums. Dieses Ergebnis zeigt, dass die obligaten Anaerobier mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit nicht eine Verunreinigung aus der Mundhöhle darstellen, sondern dass diese Bakterien aus dem Sputum stammen, wo sie sich auch bis auf die gemessenen Keimzahlen vermehren können müssen. Trotzdem können natürlich obligate Anaerobier aus der Mundhöhle eine Quelle für die Lungeninfektion mit diesen Keimen darstellen, wobei dann eine Vermehrung im Sputum unabdingbar ist.

**Untersuchungen der Bronchiallavagen bei Patienten mit anderen pulmonologischen Erkrankungen.** Um zu vergleichen, ob obligate Anaerobier auch in Lungen von Patienten ohne CF vorkommen können, wurden Proben aus Bronchiallavagen von sechs Kindern untersucht. Diese Kinder litten unter akuten Lungenentzündungen. Es wurden BAL-Proben untersucht, da diese Kinder nicht spontan Sputum produzieren würden. Lediglich bei einem dieser Kinder wurden der obligate Anaerobier *S. saccharolyticus* ( $1 \times 10^2$  KBE/ml) zusammen mit dem fakultativen Anaerobier *S. aureus* ( $2 \times 10^2$  KBE/ml) in geringer Keimzahl in der Bronchiallavage gefunden. Dieser 16-jährige Patient litt von Geburt an an einer chronischen Retentionspneumonie mit Skoliose auf Grund von perinatalen zerebralen Insulten, und produzierte chronisch purulente Sekrete, die sehr ähnliche Bedingungen wie das Sputum von CF-Patienten darstellten. Dies Ergebnis bedeutet, dass möglicherweise obligate Anaerobier auch in der Lunge von Patienten mit anderen chronischen Lungenerkrankungen gefunden werden können, bei denen es auch zu Sputumproduktion kommt, wie zum Beispiel bei COPD oder Bronchialkarzinomen.

**Persistenz der nachgewiesenen obligaten Anaerobier.** Bei 11 von 26 CF-Patienten (42,3%), von denen mehrfache Sputumproben abgegeben wurden, wurde dieselbe anaerobe Spezies wiederholt gefunden. Identische Spezies konnten für die Dauer von bis zu 11 Monaten nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bedeutet, dass auch obligate

Anaerobier für längere Zeit in der CF-Lunge persistieren können, was für *P. aeruginosa* und *S. aureus* bereits nachgewiesen worden war [Goerke et al. 2000; Jelsbak et al. 2007].

**Antibiogramm der obligaten Anaerobier.** Die *in vitro*-Daten der Resistenztestung von 139 obligaten Anaerobiern (Tabelle 4.2) erlauben weitere Schlüsse: Ceftazidim, Piperazillin/Tazobactam, und Meropenem wurden für die Resistenztestung ausgesucht, weil diese Antibiotika häufig in der Therapie der chronischen Lungeninfektion von CF-Patienten verwendet werden [Kerem et al. 2005]. Zusätzlich zeigen diese Antibiotika in der Regel eine gute Wirksamkeit gegen eine Reihe von Anaerobiern [Park et al. 1992]. Weiterhin wurden Metronidazol und Clindamycin zur Resistenztestung ausgewählt, weil diese Antibiotika ebenfalls gegen viele Anaerobier wirksam sind, aber normalerweise nicht in der Therapie von chronischen Lungeninfektionen bei CF-Patienten verwendet werden [Park et al. 1992; Kerem et al. 2005]. Für Ceftazidim wurde ein vergleichsweise hoher Prozentsatz an resistenten Stämmen (51,4%, Tab. 4.2) festgestellt. Dieses Antibiotikum wird am Universitätsklinikum Halle häufig in der Therapie von CF-Patienten verwendet. Insofern ist der hohe Prozentsatz an Resistenzen nicht überraschend. Für Piperazillin/Tazobactam wurde mit 18,8% ein niedrigerer Satz an Resistenzen gefunden, was durch eine seltenere Verwendung dieses Antibiotikums in der CF-Therapie zu erklären ist. Unklar bleibt dagegen, wodurch die Resistenzen gegen Clindamycin (23,2%) oder Metronidazol (48,6%, Tab. 4.2) zu erklären sind. Diese Antibiotika werden in der Regel nicht in der CF-Therapie verwendet [Park et al. 1992; Kerem et al. 2005]. Sie spielen als Reserveantibiotika bei Penicillin-Allergien eine Rolle und werden in der Zahnheilkunde als Reserveantibiotikum zur Antibiotika-Prophylaxe vor Eingriffen bei Patienten mit gesteigertem Endokarditis-Risiko (Klappenersatz o.Ä.) eingesetzt.

Die beste Resistenzsituation liegt bei Meropenem vor: lediglich 3,6% der untersuchten Stämme waren resistent. Somit würde dieses Antibiotikum (bei gleichzeitiger *in vitro*-Wirksamkeit gegen *P. aeruginosa*) eine gute Möglichkeit zur antibiotischen Therapie der obligaten Anaerobier abgeben. Ob eine solche Therapie allerdings sinnvoll ist, kann erst entschieden werden, wenn der Beitrag der obligaten Anaerobier zur Pathogenese der CF-Lungeninfektion näher untersucht ist. Eine Empfehlung zur Therapie der obligaten Anaerobier beim derzeitigen Wissensstand wäre verfrüht.

**Keimzahlen und Lungenfunktionswerte bei Patienten mit Exazerbationen.** Aus den vorliegenden Daten zur Therapie von CF-Patienten mit Exazerbationen lassen sich dennoch eine Reihe von Schlüssen ziehen. Bei allen 12 CF-Patienten mit Exazerbationen wurden ein oder mehrere obligate Anaerobier sowohl vor als auch nach i.v.-Therapie im Sputum gefunden. Die Keimzahlen im Sputum waren sowohl für die fakultativen wie auch die obligaten Anaerobier nahezu gleich. Allerdings verbesserte sich der klinische Zustand der Patienten nach Therapie erheblich, was sich an den signifikant verbesserten Lungenfunktionswerten zeigte.

**In vivo-Therapieerfolg gegen die obligaten Anaerobier.** Dass gegen *P. aeruginosa* gerichtete Antibiotika diesen Mikroorganismus bei Vorliegen einer chronischen Infektion nicht vollständig eradizieren können, ist aus eine Reihe von Publikationen bekannt [Döring et al. 2000; Gibson et al. 2003; Ratjen und Döring 2003; Kerem et al. 2005; Taccetti et al. 2005]. In dieser Arbeit konnte allerdings erstmalig gezeigt werden, dass obligate Anaerobier ebenfalls nicht eradiziert werden können. Für die Mehrzahl der untersuchten Patienten mit Exazerbationen liess sich dies durch die Tatsache erklären, dass die nach Therapie vorhandenen obligaten Anaerobier gegen das in der Therapie verwendete Antibiotikum resistent waren. In diesen Fällen scheint es also zu einer Selektion von resistenten Anaerobiern gekommen zu sein. Seltener mag eine Persistenz von resistenten obligaten Anaerobiern vorgelegen haben. Dieser Vorgang kann durch die Verwendung von gegen *P. aeruginosa* gerichteten Antibiotika wie z.B. Ceftazidim verursacht worden sein. Außerdem stimmt auch die niedrige Prozentzahl von obligaten Anaerobiern, die gegen Meropenem resistent sind, mit der seltenen Verwendung dieses Antibiotikums in der CF-Therapie überein.

Die gleichen Bedingungen, die für das Versagen einer Therapie gegen *P. aeruginosa* verantwortlich gemacht werden, liegen auch bei der Therapie der obligaten Anaerobier vor. Dies kann teilweise durch das hochvisköse Sputum verursacht sein, welches große Mengen an DNA und anderen Makromolekülen enthält [Gibson et al. 2003; Ratjen und Döring 2003; Paul et al. 2004]. Der massiv reduzierte Sauerstoffpartialdruck im Sputum trägt ebenfalls zu einer verminderten Wirksamkeit zahlreicher Antibiotika bei [Worlitzsch et al. 2002; Park et al. 2004; Hill et al. 2005]. Trotzdem hat natürlich die i.v.-Therapie mit Antibiotika erhebliche Bedeutung bezüglich der Verbesserung des klinischen Status der CF-Patienten. Dies zeigte auch in unserer Studie der signifikante Anstieg der

Lungenfunktionsparameter nach Therapie (Abb. 4.4A).

Die im Rahmen der Arbeit erhobenen Daten weisen darauf hin, dass obligate Anaerobier bei der Mehrzahl der chronischen Lungeninfektionen von CF-Patienten vorhanden sind. Speziell bei Exazerbationen scheinen sie eine bedeutende Rolle zu spielen. Liegen Mischinfektionen vor, so kann mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass das Vorkommen von obligaten Anaerobiern durch das Vorhandensein von fakultativen Anaerobiern wie *P. aeruginosa* oder *S. aureus* unterstützt wird. Die letzteren Bakterien metabolisieren vorzugsweise aerob, und schützen damit die obligaten Anaerobier vor dem für diese Bakterien toxischen Sauerstoff [McKenney et al. 1999; Worlitzsch et al. 2002; Yoon et al. 2002, Ulrich et al. 2007]. Auf welche Weise aber die fakultativen Anaerobier letztlich von der Gegenwart der obligaten Anaerobier profitieren, kann bislang auf Basis der aktuellen Literatur noch nicht hinreichend erklärt werden.

## 6 Schlussfolgerungen

Zurzeit gibt es keine kausale, also die Cystische Fibrose selbst bekämpfende Therapie. Bisher können nur bestimmte Symptome verbessert, gemildert oder beseitigt werden. Trotz des Fehlens einer kausalen Therapie ist die durchschnittliche Lebenserwartung der CF-Patienten in den letzten Jahrzehnten erheblich angestiegen. Um die Lebensqualität und letztlich auch die Lebenserwartung der CF-Patienten weiterhin verbessern zu können, bedarf es genauerer Untersuchungen der pathophysiologischen Mechanismen vor allem der chronischen Lungeninfektion, da sie den wichtigsten Grund für den vorzeitigen Tod bei CF darstellt.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse beinhalten grundsätzlich neue Erkenntnisse zur Pathogenese und Therapie der chronischen CF-Lungeninfektion. Die Tatsache, dass obligat anaerobe Bakterien in hohen Keimzahlen im Sputum beinahe aller CF-Patienten zu finden waren, deutet darauf hin, dass die traditionellen derzeitigen pathogenetischen Modelle für die CF-Lungeninfektion bezüglich der beteiligten Mikroorganismen nicht ausreichen. Zukünftig sollten bei allen Untersuchungen, die sich mit dem Zusammenwirken von Mikroorganismen und der körperlichen Abwehr in der CF-Lunge beschäftigen, zusätzlich zu den fakultativen auch die obligaten Anaerobier berücksichtigt werden. Auch die bekannten Therapieansätze, die ausschließlich gegen fakultative Anaerobier gerichtet sind, sollten neu überdacht werden. Eine Therapie mit spezifischen, auch gegen obligate Anaerobier wirksamen Antibiotika kann möglicherweise die Behandlung der chronischen Lungenentzündung verbessern. Jedoch sollte vor Einsatz einer spezifisch gegen obligate Anaerobier gerichteten Therapie zunächst deren Bedeutung für die CF-Lungeninfektion in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Zusätzlich impliziert der Nachweis obligater Anaerobier in den Sputumproben bei den meisten CF-Kindern innerhalb dieser Studie, dass anaerobe Wachstumsbedingungen in deren Lungen verbreitet vorliegen. Eine Keimbesiedlung auch mit obligaten Anaerobiern findet bereits frühzeitig im Leben der CF-Patienten statt. Diese Tatsache beeinflusst höchstwahrscheinlich Phänotyp und Antibiotika-Empfindlichkeit der anaeroben Bakterien. Fortführende Untersuchungen sollten sich daher auch mit dieser neuen Erkenntnis befassen. Denn je früher mit der Behandlung der chronischen CF-Lungenentzündung begonnen wird, desto günstiger ist möglicherweise deren Prognose.

## 7 Zusammenfassung

Chronische bakterielle Lungenentzündungen sind die Hauptursache für die deutlich reduzierte Lebenserwartung der Patienten mit Mukoviszidose (Synonym: cystic fibrosis, CF). Die fakultativ anaeroben Erreger *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* sind bei der überwiegenden Zahl der Patienten zu finden. Allerdings können auch andere Bakterien wie obligate Anaerobier an der Entstehung der chronischen Lungenentzündung der CF-Patienten beteiligt sein.

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, in welchem Ausmaß obligate Anaerobier im Sputum von Patienten mit CF existieren. Es wurde eine genaue Identifikation aller fakultativ und obligat anaerob wachsenden Keime durchgeführt. Weiterhin erfolgte eine Quantifikation aller Keime. Um zu überprüfen, ob obligate Anaerobier nur in der CF-Lunge vorkommen, wurden Bronchiallavagen von Patienten mit anderen Lungenerkrankungen als CF auf ihren Keimgehalt untersucht. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, zu prüfen, ob eine Kontamination des Sputums mit obligat anaeroben Keimen aus der Mundhöhle während der Expektoration stattfindet, oder ob sich die Keime im Sputum der CF-Patienten vermehren. Zusätzlich wurde untersucht, ob identische obligat anaerobe Keime bei CF-Patienten über einen längeren Zeitraum nachweisbar sind. Weiterhin wurde getestet, gegen welche Antibiotika die gefundenen obligaten Anaerobier *in vitro* empfindlich sind, und ob eine Therapie mit anti-anaerob wirksamen Antibiotika auch *in vivo* erfolgsversprechend ist. Zu diesem Zweck wurden die Keimzahlen sowie die routinemäßig erhobenen Lungenfunktionparameter der CF-Patienten vor und nach der Behandlung von Exazerbationen untersucht.

Es wurden fakultative und obligate Anaerobier in 92 Sputumproben (8 Kinder und 31 Erwachsene) von CF-Patienten mithilfe von biochemischen Identifikationssystemen bestimmt. Die Quantifikation aller Bakterien erfolgte durch Verdünnungsreihen mit Doppelbestimmungen. Die Resistenztestung der obligaten Anaerobier wurde gegen die fünf Antibiotika Meropenem, Piperacillin/Tazobactam, Clindamycin, Metronidazol und Ceftazidim mithilfe von E-Tests<sup>®</sup> durchgeführt. Eine Quantifikation der obligaten Anaerobier erfolgte auch in Rachenabstrichen von sieben CF-Patienten sowie in Proben aus bronchoalveolären Lavagen von fünf Patienten mit akuten Lungeninfektionen. Zusätzlich wurde untersucht, ob eine konventionelle, gegen *P. aeruginosa* gerichtete

Antibiotika-Therapie die Keimzahlen der obligaten Anaerobier reduziert, und ob die routinemäßig erhobenen Lungenfunktionsparameter FEV<sub>1</sub> und FVC verändert werden.

Bei 89,7% der CF-Patienten (bei 78,6% der Kinder und bei 94,9% der Erwachsenen) wurden obligate Anaerobier nachgewiesen. Es handelte sich um 15 Genera und 35 Spezies. Die Bakterien *S. saccharolyticus* (23 x) und *Peptostreptococcus prevotii* (32 x) wurden am häufigsten identifiziert. Die Keimzahlen im Sputum (Mittelwert:  $1,3 \times 10^7 \pm \text{SD } 5,6 \times 10^7$  KBE/ml) lagen in der gleichen Größenordnung wie die Keimzahlen der fakultativen Anaerobier *P. aeruginosa* und *S. aureus* ( $4,4 \times 10^7 \pm 9,0 \times 10^7$  KBE/ml). Identische obligate Anaerobier konnten bis zu elf Monate lang bei einzelnen Patienten nachgewiesen werden. Niedrige Keimzahlen ( $7,5 \times 10^3 \pm 1,1 \times 10^4$  KBE/ml) in den Rachenabstrichen von lediglich drei der sieben untersuchten Patienten belegen, dass orale Kontaminationen der Sputumproben keinesfalls für die um drei Zehnerpotenzen höheren Keimzahlen im Sputum verantwortlich sein können, sondern dass eindeutig eine Vermehrung der obligaten Anaerobier im Sputum stattfinden muss. Die Resistenzbestimmungen ergaben eine gute Wirksamkeit von Meropenem (lediglich 3,6% resistente Stämme), eine reduzierte Wirkung von Piperazillin/Tazobactam (22,3%) und Clindamycin (23,7%), während Metronidazol (46,0%) und Ceftazidim (49,6%) erheblich schlechter wirkten. Eine i.v.-Therapie gegen *P. aeruginosa* im Rahmen von akut auftretenden Exazerbationen bei 12 CF-Patienten bewirkte zwar eine signifikante Verbesserung der Lungenfunktion (FEV<sub>1</sub> stieg von  $63,3 \pm 8,3\%$  auf  $76,2 \pm 9,3\%$ ,  $p=0,012$ ; FVC von  $58,4 \pm 9,2\%$  auf  $71,9 \pm 16,4\%$ ,  $p=0,071$ ), nicht aber eine Reduktion der fakultativen oder obligaten Anaerobier. Bei 58% der Patienten mit akuten Exazerbationen wurden obligate Anaerobier gefunden, die gegen das jeweilige bei Therapie verwendete Antibiotikum bereits resistent waren.

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit, dass bei der überwiegenden Mehrheit der CF-Patienten obligate Anaerobier im Sputum nachweisbar sind, deckt sich mit den Angaben aus der Literatur, und kann damit als gesicherte Tatsache angesehen werden. Die nachgewiesenen hohen Keimzahlen belegen eine Vermehrung der obligaten Anaerobier im Sputum, wie dies auch für die fakultativen Anaerobier der Fall ist. Während in fast allen Sputumproben obligate Anaerobier gefunden wurden, sind dagegen diese Keime in Bronchiallavagen von Kindern mit akuten Lungeninfektionen nicht nachweisbar.

Allerdings konnten auch bei einem Kind mit chronischer Retentionspneumonie und massenhaft purulenten Sekreten obligate Anaerobier nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass möglicherweise bei chronischen Lungeninfektionen mit Sputumproduktion obligate Anaerobier vorkommen können, während dies bei akuten Infekten ohne Sputumproduktion auf Grund der aeroben Verhältnisse nicht möglich ist. Die Persistenz identischer obligater Anaerobier für bis zu elf Monate trotz Antibiotika-Gabe gegen die fakultativen Anaerobier demonstriert eine gute Anpassung der Keime an die Verhältnisse in der CF-Lunge. Häufige Resistenzen der obligaten Anaerobier gegen Ceftazidim sind durch die häufige Verwendung dieses Antibiotikums in der Therapie gegen *P. aeruginosa* zu erklären. Auch der Nachweis von resistenten obligaten Anaerobiern nach Therapie von Exazerbationen in 58% der Patienten ist durch eine Selektion dieser Stämme unter subinhibitorischen Antibiotika-Konzentrationen erklärbar.

Inwieweit aber die obligaten Anaerobier zur Pathogenese der CF-Lungeninfektion beitragen, ist weiterhin unbekannt, insbesondere vor dem Hintergrund der zahlreichen unterschiedlichen nachgewiesenen Spezies. Möglicherweise könnte eine Therapie mit spezifischen, auch gegen obligate Anaerobier wirksamen Antibiotika (z.B. Meropenem), die Behandlung der chronischen Lungenentzündung und somit die Lebenserwartung der CF-Patienten verbessern. Eine derartige Therapie sollte aber erst nach erfolgtem *in vitro*-Nachweis ihrer Pathogenität unternommen werden. So ist es unter Umständen denkbar, dass die obligaten Anaerobier die CF-Patienten vor *P. aeruginosa* schützen, indem sie die Vermehrung dieser Bakterien reduzieren. Eine Therapie gegen obligate Anaerobier würde in diesem Fall eine Aufhebung des protektiven Effektes und damit eine Exazerbation bewirken.

Unabhängig von den therapeutischen Optionen besteht die wichtigste Konsequenz der vorliegenden Arbeit darin, dass bei allen zukünftigen Untersuchungen zur Pathogenese der chronischen Lungeninfektionen bei CF das obligatorische Vorkommen von antibiotika-resistenten obligaten Anaerobiern in hohen Keimzahlen bei CF-Patienten berücksichtigt werden muss.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Anwar H, Strap JL, Costerton JW: Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 36 (1992) 1347-1351
2. Borriello G, Werner E, Roe F, Kim AM, Ehrlich GD, Stewart PS: Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 48 (2004) 2659-2664
3. Boucher RC: Molecular insights into the physiology of the "thin film" of airway surface liquid. *J Physiol* 516 (1999) 631-638
4. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul, PHM: Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol* 45 (2005) 191-199
5. Bragonzi A, Worlitzsch D, Pier GB, Timpert P, Ulrich M, Henker M, Andresen JB, Givskov M, Conese M, Döring G: Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* expresses alginate in the lungs of patients with cystic fibrosis and in a mouse model. *J Infect Dis* 192 (2005) 410-419
6. Brook I, Frazier EH: Aerobic and anaerobic microbiology of empyema. A retrospective review in two military hospitals. *Chest* 103 (1993) 1502-1507
7. Cescutti P, Bosco M, Picotti F, Impallomeni G, Leitão JH, Richau JA, Sá-Correia I: Structural study of the exopolysaccharide produced by clinical isolate of *Burkholderia cepacia*. *Biochem Biophys Res Com* 273 (2000) 1088-1094
8. Conway B-AD, Venu V, Speert DP: Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in the *Burkholderia cepacia* complex. *J Bacteriol* 184 (2002) 5678-5685
9. Costerton JW: Anaerobic biofilm infections in cystic fibrosis. *Mol Cell* 10 (2002) 699-700

10. Costerton JW, Lewandowski Z: Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49 (1995) 711-745
11. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP: Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284 (1999) 1318-1322
12. Darwin C: *The origin of species*. London 1859. <http://www.literature.org/authors/darwin-charles/the-origin-of-species/> Zugriff: 16 Juli 2008
13. Döring G, Conway SP, Heijerman HGM, Hodson ME, Høiby N, Smyth A, Touw DJ, for the consensus committee: Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J* 16 (2000) 749-767
14. Döring G, Høiby N, for the Consensus Study Group: Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *J Cystic Fibrosis* 3 (2004) 67-91
15. Döring G, Meisner C, Stern M, for the Flagella Vaccine Trial Study Group: A double-blind randomized placebo-controlled phase III study of a *Pseudomonas aeruginosa* flagella vaccine in cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (2007) 11020-11025
16. Dore P, Robert R, Grollier G, Rouffineau J, Lanquetot H, Charriere JM, Fauchere JL: Incidence of anaerobes in ventilator-associated pneumonia with use of a protected specimen brush. *Am J Respir Crit Care Med* 153 (1996) 1292-1298
17. Field TR, McDowell A, Patrick S, Elborn JS, Tunney MM: Detection of anaerobic bacteria in the sputum of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibrosis* 4 (2005) 44
18. Field TR, White A, Elborn JS, Tunney MM: Effect of oxygen limitation on the in vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* grown planktonically and as biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24 (2005) 677-687

19. Firoved AM, Boucher JC, Deretic V: Global genomic analysis of AlgU ( $\sigma$ E)-dependent promoters (Sigmulon) in *Pseudomonas aeruginosa* and implications for inflammatory processes in cystic fibrosis. *J Bacteriol* 184 (2002) 1057-1064
20. Fuchs HJ, Borowitz DS, Christiansen DH, Morris EM, Nash ML, Ramsey BW, Rosenstein BJ, Smith AL, Wohl ME: Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 331 (10) (1994) 637-642
21. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW: Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168 (2003) 918-951
22. Gilligan PH: Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 4 (1991) 35-51
23. Goerke C, Kraning K, Stern M, Döring G, Botzenhart K, Wolz C: Molecular epidemiology of community-acquired *Staphylococcus aureus* in families with and without cystic fibrosis patients. *J Infect Dis* 181 (2000) 984-989
24. Govan JRW, Deretic V: Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 60 (1996) 539-574
25. Gura T: Just spit it out. *Nat Med* 14 (2008) 706-709
26. Hammond JM, Potgieter PD, Hanslo D, Scott H, Roditi D: The etiology and antimicrobial susceptibilities patterns of microorganisms in acute community-acquired lung abscess. *Chest* 108 (1995) 937-941
27. Harris JK, de Groote M, Sagel S, Kasper R, Penvari C, Kaess H, Heltshe S, Accurso F, Pace N: Ribosomal RNA sequence-based identification of unusual bacteria in the airway of children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 40 (suppl. 28) (2005) 287-288

28. Hassett DJ: Anaerobic production of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*: alginate restricts diffusion of oxygen. J Bacteriol 178 (1996) 7322-7325
29. Hill D, Rose B, Pajkos A, Robinson M, Bye P, Bell S, Elkins M, Thompson B, MacLeod C Aaron SD, Harbour C: Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. J Clin Microbiol 43 (2005) 5085-5090
30. Høiby N, Koch C: *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis and its management. Thorax 45 (1990) 881-884
31. Høiby N, Fomsgaard A, Jensen E: The immune response to bacterial biofilms. In: Lappin Scott HM, Costerton JW, (eds), An Introduction to Bacterial Biofilms. Cambridge: Cambridge University Press (1995) S. 233-250
32. Høiby N: Understanding bacterial biofilms in patients with cystic fibrosis: current and innovative approaches to potential therapies. J Cystic Fibrosis 1 (2002) 249-254
33. Jelsbak L, Johansen HK, Frost AL, Thøgersen R, Thomsen LE, Ciofu O, Yang L, Haagenen JAJ, Høiby N, Molin S: Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients. Infect Immun 75 (2007) 2214-2224
34. Kerem E, Conway S, Elborn S, Heijerman H, and For the Consensus Committee: Standards of care for patients with cystic fibrosis: A European consensus. J Cyst Fibrosis 4 (2005) 7-26
35. Koch C, Høiby N: Pathogenesis of cystic fibrosis. Lancet 341 (1993) 1065-1069
36. Koneman EW, Allend SD, Janda WM: The anaerobic bacteria. In: Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC jr., (eds), Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia - New York: Lippincott (1997) S. 709-784

37. Lee Y, Straffon LH, Welch KB, Loesche WJ: The transmission of anaerobic periodontopathic organisms. *J Dent Res* 85 (2) (2006) 182-186
38. Leid JG, Willson CJ, Shirliff ME, Hassett DJ, Paresk MR, Jeffers AK: The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. *J Immunol* 175 (2005) 7512-7518
39. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB: Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 15 (2002) 194-222
40. Mathee K, Ciofu O, Sternberg C, Lindum PW, Campbell JIA, Jensen P, Johnsen AH, Givskov M, Ohman DE, Molin S, Høiby N, Kharazmi A: Mucoid conversion *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 145 (1999) 1349-1357
41. Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzky JT, Davis CW, Boucher RC: Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 95 (1998) 1005-1015
42. May TB, Chakrabarty AM: Isolation and assay of *Pseudomonas aeruginosa* alginate. *Methods in Enzymology* 235 (1994) 295-304
43. McKenney D, Pouliot KL, Wang Y, Murthy V, Ulrich M, Döring G, Lee JC, Goldman DA, Pier GB: Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science* 284 (1999) 1523-1527
44. Mekalanos JJ: Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* 174 (1992) 1-7
45. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R: Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54 (2000) 49-79
46. Park MK, Myers RAM, Marzella L: Oxygen tensions and infections: Modulation of microbial growth, activity of antimicrobial agents, and immunologic responses. *Clin Infect Dis* 14 (1992) 720-740

47. Paul K, Rietschel E, Ballmann M, Griese M, Worlitzsch D, Shute J, Chen C, Schink T, Döring G, van Koningsbruggen S, Wahn U, Ratjen F: Effect of treatment with dornase alpha on airway inflammation in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 169 (2004) 719-725
48. Ratjen F: Changes in strategies for optimal antibacterial therapy in cystic fibrosis. *Int J Antimicrob Agents* 17 (2001) 93-96
49. Ratjen F, Döring G: Cystic fibrosis. *Lancet* 361 (2003) 681-689
50. Richau JA, Leitão JH, Correia M, Lito L, Salgado MJ, Barreto C, Cescutti P, Sá-Correia I: Molecular typing and exopolysaccharide biosynthesis of *Burkholderia cepacia* isolates from a portugese cystic fibrosis center. *J Clin Microbiol* (2000) 1651-1655
51. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B-S, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou J-L, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui L-C: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. *Science* 245 (1989) 1066-1073
52. Robert R, Grollier G, Frat JP, Godet C, Adoun M, Fauchère JL, Dore P: Colonization of lower respiratory tract with anaerobic bacteria in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med* 29 (2003) 1062-1068
53. Rodloff AC: Nichtsporenbildende obligat anaerobe Bakterien. In: Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U, (eds), *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer Verlag Berlin - Heidelberg, 5. Auflage (2005) S. 349-353
54. Rogers GB, Carroll MP, Serisier DJ, Hockey PM, Jones GR, Bruce KD: Characterization of bacterial community diversity in cystic fibrosis lung infections by use of 16S ribosomal DNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *J Clin Microbiol* 42 (2004) 5176-5183

55. Schurr MJ, Deretic V: Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: co-ordinateregulation of heat-shock response and conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol 24 (1997) 411-420
56. Simon C, Stille W: Antibiotika-Therapie in Klinik und Praxis. 7. Auflage, Schattauer Verlag Stuttgart - New York (1989) S. 285
57. Sousa SA, Ulrich M, Bragonzi A, Burke M, Worlitzsch D, Leitao JH, Meisner C, Eberl L, Sá Correia I, Döring G: Virulence of *Burkholderia cepacia complex* strains in gp91<sup>phox-/-</sup> mice. Cell Microbiol, Published Online First: 11 July 2007. doi: 10.1111/j1462-5822.2007.00998.x
58. Stewart PS, Costerton JW: Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 358 (2001) 135-138
59. Taccetti G, Campana S, Festini F, Mascherini M, Döring G: Early eradication therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. Eur Respir J 26 (2005) 458-461
60. Taylor L, Corey M, Matlow A, Sweezey NB, Ratjen F: Comparison of throat swabs and nasopharyngeal suction specimens in non-sputum-producing patients with cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 41 (2006) 839-843
61. Ulrich M, Bastian M, Cramton SE, Ziegler K, Pragman AA, Bragonzi A, Memmi G, Wolz C, Schlievert PM, Cheung A, Döring G: 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 (2007) 1276-1287
62. Valerius NH, Koch C, Høiby N: Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in cystic fibrosis by early treatment. Lancet 338 (1991) 725-726
63. Vandamme PAR: Taxonomy and classification of bacteria. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, (eds), Manual of clinical microbiology. Washington, DC: ASM Press (2003) S. 271-285

64. Walters III MC, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS: Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 47 (2003) 317-323
65. Welsh MJ, Ramsey BW: Research on Cystic Fibrosis. A Journey from the Heart House. *Am J Respir Crit Care Med* 157 (1998) 148-154
66. Werner H, Heizmann WR: Bakteriologischer Teil Anaerobier: In: Burkhardt F, (ed), *Mikrobiologische Diagnostik*, Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York (1992) S. 188-194
67. Worlitzsch D, Herberth G, Ulrich M, Döring G: Catalase, myeloperoxidase and hydrogen peroxide in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 11 (1998) 377-383
68. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Çekici A, Meyer KC, Birrer P, Bellon G, Berger J, Weiss T, Botzenhart K, Yankaskas JR, Randell S, Boucher RC, Döring G: Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 109 (2002) 317-325
69. Yoon SS, Hennigan RF, Hilliard GM, Ochsner UA, Parvatiyar K, Kamani MC, Allen HL, DeKievit TR, Gardner PR, Schwab U, Rowe JJ, Iglewski BH, McDermott TR, Mason RP, Wozniak DJ, Hanock RE, Parsek Mr, Noah TL, Boucher RC, Hassett DJ: *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev Cell* 3 (2002) 593-603

## 9 Eigene Veröffentlichungen

### Publikationen

Worlitzsch D, **Rintelen C**, Böhm K, Wollschläger B, Merkel N, Borneff-Lipp M, Döring G: Antibiotic-resistant obligate anaerobes during exacerbations of cystic fibrosis patients. Clin Microbiol Infect 2008, zur Publikation angenommen am 09.07.2008.

**Rintelen C**, Borneff-Lipp M, Worlitzsch D: Strikt anaerobe Bakterien im Sputum von Kindern mit Cystischer Fibrose. Hyg Med 33 (2008) 456-462

### Konferenzbeiträge und Poster

Worlitzsch D, **Rintelen C**, Wollschläger B, Borneff-Lipp M, Döring G: High numbers of fastidious anaerobes in CF sputum. 20<sup>th</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Denver, USA, 02.-05.11.2006 (auf Einladung).

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

**Rintelen C**: Fastidious anaerobes in CF sputum. 1<sup>st</sup> European CF Young Investigator Meeting, Lille, France, 29.-31.08.2007 (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. 21<sup>st</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim, CA, USA, 03.-06.10.2007 (auf Einladung).

Worlitzsch D, **Rintelen C**, Wollschläger B, Merkel N, Borneff-Lipp M, Döring G: Aerobic-anaerobic niches. 31<sup>st</sup> European Cystic Fibrosis Conference, Prague, Czech Republic, 11.-14.06.2008 (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. 60<sup>th</sup> 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. 22<sup>nd</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, FL, USA, 23.-25.10.2008 (auf Einladung).

### Zitierfähige Abstracts

Worlitzsch D, **Rintelen C**, Wollschläger B, Borneff-Lipp M, Döring G: High numbers of fastidious anaerobes in CF sputum. *Pediatr Pulmonol* (suppl. 29) (2006) 312-313

Worlitzsch D, Boehm K, **Rintelen C**, Wollschlaeger B, Merkel N, Borneff-Lipp M, Döring G: Strict anaerobes persist in CF sputum despite antibiotic treatment. *J Cystic Fibrosis* 6 (suppl. 1) (2007) 21

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. *Int J Med Microbiol* 297 (suppl. 1) (2007) 116

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

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

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

# 10 Anhang

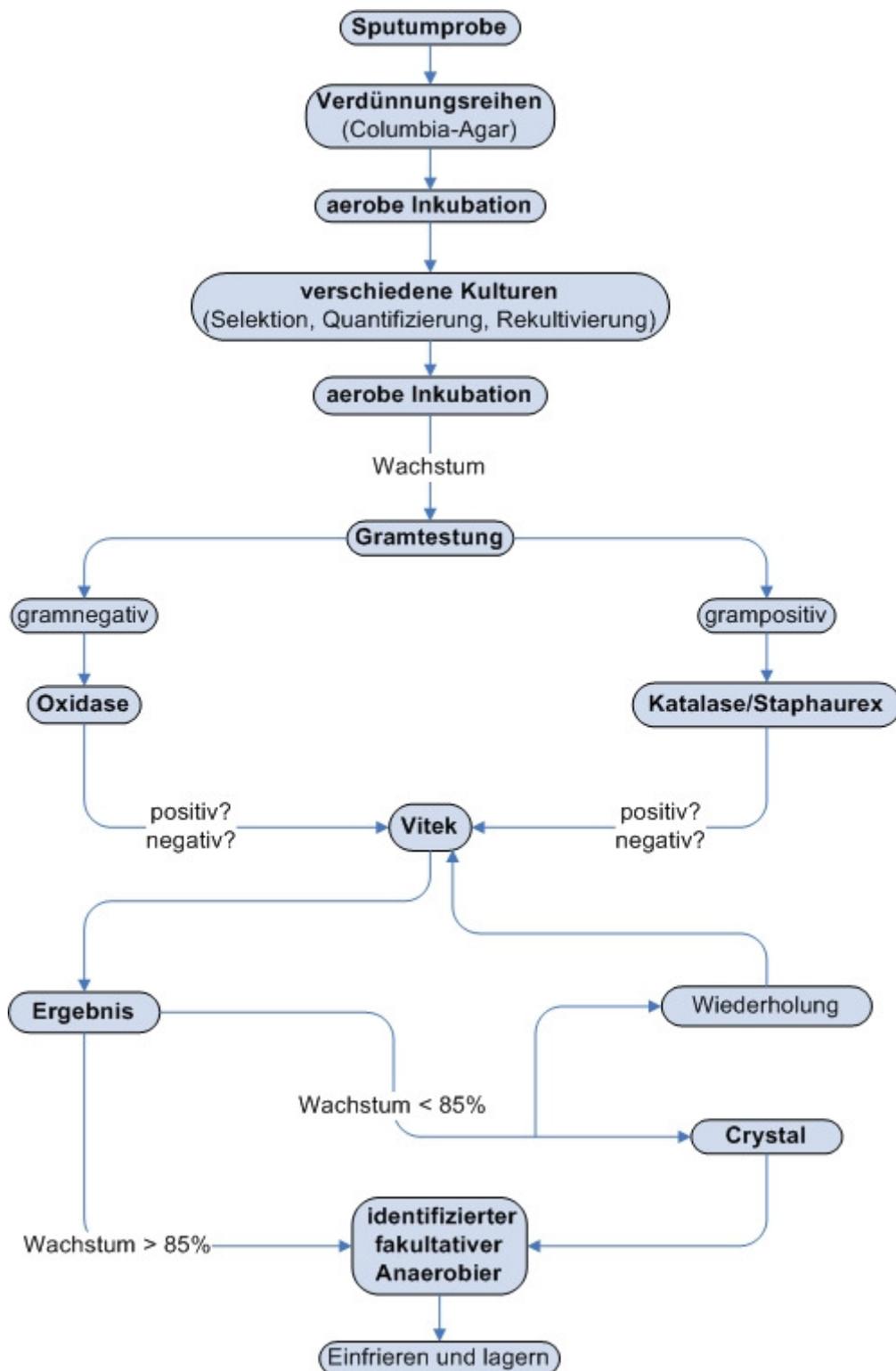


Abb. 10.1: Arbeitsschritte der Quantifikation und Identifikation von fakultativen Anaerobiern.

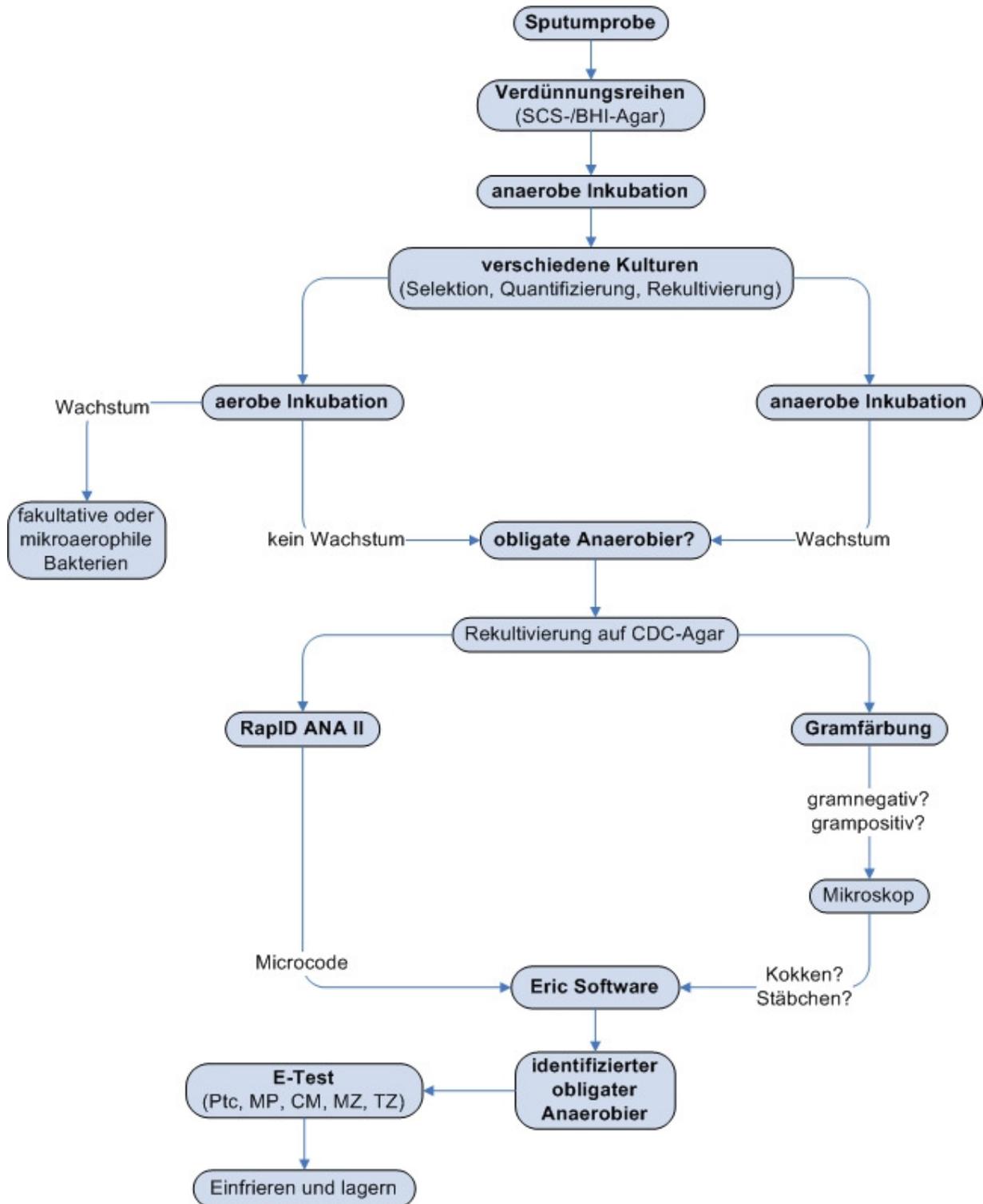


Abb. 10.2: Arbeitsschritte der Quantifikation und Identifikation von obligaten Anaerobiern.

**Tab. 10.1: Keimzahlen der nachgewiesenen fakultativen und obligaten Anaerobier in 92 Sputumproben**

Sputum-Nr.	Fakultative Anaerobier	KBE/ml	Obligate Anaerobier	KBE/ml
1	<i>S. aureus</i>	$1,5 \times 10^6$	<i>Ps. prevotii</i>	$2,0 \times 10^6$
2	<i>B. cepacia</i>	$6,0 \times 10^5$	<i>C. clostridioforme</i>	$9,0 \times 10^6$
	<i>Strept. intermedius</i>	$6,5 \times 10^5$		
3	<i>P. aeruginosa</i>	$3,5 \times 10^8$	<i>Ps. prevotii</i>	$2,5 \times 10^5$
	<i>Strept. spp.</i>	$4,5 \times 10^5$	<i>Prop. acnes</i>	$1,0 \times 10^6$
4	<i>P. aeruginosa</i>	$4,0 \times 10^6$	<i>Ps. prevotii</i>	$4,5 \times 10^5$
			<i>Strept. constellatus</i>	$1,0 \times 10^6$
5	<i>P. aeruginosa</i>	$2,5 \times 10^6$	<i>Ps. prevotii</i>	$2,5 \times 10^6$
			<i>S. saccharolyticus</i>	$1,0 \times 10^6$
			<i>Ps. anaerobius</i>	$2,0 \times 10^6$
6	<i>Strept. vestibularis</i>	$3,5 \times 10^8$	<i>A. turicensis</i>	$1,0 \times 10^5$
			<i>Ps. prevotii</i>	$5,0 \times 10^5$
			<i>Ps. anaerobius</i>	$1,0 \times 10^5$
7	<i>P. aeruginosa</i>	$2,0 \times 10^7$		
8	<i>P. aeruginosa</i>	$1,5 \times 10^7$	<i>C. bifemetans</i>	$1,0 \times 10^6$
9	<i>S. aureus</i>	$1,5 \times 10^8$	<i>S. saccharolyticus</i>	$3,0 \times 10^6$
10	<i>P. aeruginosa</i>	$1,0 \times 10^7$	<i>Ps. anaerobius</i>	$1,0 \times 10^6$
11	<i>P. aeruginosa</i>	$2,5 \times 10^7$	<i>L. acidophilus</i>	$4,5 \times 10^6$
12	<i>P. aeruginosa</i>	$3,0 \times 10^7$	<i>Ps. prevotii</i>	$2,5 \times 10^5$
			<i>Ps. tetradius</i>	$3,0 \times 10^5$
13	<i>S. aureus</i>	$1,5 \times 10^7$		
14	<i>P. aeruginosa</i>	$3,5 \times 10^7$	<i>A. meyeri</i>	$5,5 \times 10^8$
15	<i>S. aureus</i>	$2,5 \times 10^7$		
16	<i>P. aeruginosa</i>	$8,5 \times 10^7$		
17	<i>S. aureus</i>	$2,5 \times 10^7$	<i>E. aerofaciens</i>	$2,0 \times 10^7$
18	<i>P. aeruginosa</i>	$2,5 \times 10^6$	<i>S. saccharolyticus</i>	$1,3 \times 10^6$
19	<i>B. cepacia</i>	$3,5 \times 10^8$	<i>Ps. prevotii</i>	$2,5 \times 10^7$
20	<i>S. aureus</i>	$8,5 \times 10^6$	<i>C. difficile</i>	$2,5 \times 10^7$
			<i>Ps. tetradius</i>	$7,0 \times 10^6$
21	<i>S. aureus</i>	$2,5 \times 10^6$	<i>E. aerofaciens</i>	$2,5 \times 10^5$
	<i>Strept. spp.</i>	$6,0 \times 10^5$	<i>Wolinella spp.</i>	$6,5 \times 10^5$

**Tab. 10.1: Keimzahlen der nachgewiesenen fakultativen und obligaten Anaerobier in 92 Sputumproben (Fortsetzung)**

Sputum-Nr.	Fakultative Anaerobier	KBE/ml	Obligate Anaerobier	KBE/ml
22	<i>P. aeruginosa</i>	$1,4 \times 10^7$	<i>Gemella morbillorum</i>	$6,5 \times 10^5$
23	<i>P. aeruginosa</i>	$1,0 \times 10^6$		
24	<i>S. aureus</i>	$3,0 \times 10^6$	<i>A. odontolyticus</i>	$7,0 \times 10^6$
			<i>Ps. tetradius</i>	$1,0 \times 10^6$
25	<i>S. aureus</i>	$3,5 \times 10^6$	<i>A. naeslundii</i>	$1,0 \times 10^6$
26	<i>S. aureus</i>	$6,5 \times 10^6$	<i>Ps. anaerobius</i>	$1,0 \times 10^6$
27	<i>P. aeruginosa</i>	$5,0 \times 10^6$	<i>Veillonella spp.</i>	$3,0 \times 10^7$
28	<i>S. aureus</i>	$3,5 \times 10^7$	<i>A. odontolyticus</i>	$2,5 \times 10^5$
	<i>P. aeruginosa</i>	$1,0 \times 10^7$		
29	<i>S. aureus</i>	$8,0 \times 10^5$	<i>S. saccharolyticus</i>	$1,0 \times 10^6$
			<i>Ps. prevotii</i>	$2,5 \times 10^6$
30	<i>S. aureus</i>	$6,5 \times 10^7$	<i>Veillonella spp.</i>	$1,0 \times 10^7$
	<i>Strept. spp.</i>	$1,0 \times 10^6$		
31	<i>S. aureus</i>	$8,0 \times 10^7$	<i>Bac. tectum</i>	$3,0 \times 10^8$
32	<i>S. aureus</i>	$5,5 \times 10^7$	<i>Strept. constellatus</i>	$5,0 \times 10^7$
	<i>P. aeruginosa</i>	$2,0 \times 10^8$		
33*	<i>P. aeruginosa</i>	$2,5 \times 10^6$	<i>Strept. constellatus</i>	$1,0 \times 10^4$
			<i>Ps. prevotii</i>	$1,0 \times 10^4$
			<i>Strept. intermedius</i>	$1,0 \times 10^4$
			<i>S. saccharolyticus</i>	$1,0 \times 10^4$
34	<i>S. epidermidis</i>	$8,5 \times 10^7$	<i>E. limosum</i>	$2,0 \times 10^6$
			<i>A. odontolyticus</i>	$2,0 \times 10^6$
35	<i>S. aureus</i>	$2,5 \times 10^6$		
	<i>P. fluoreszens</i>	$3,5 \times 10^6$		
36	<i>P. aeruginosa</i>	$2,5 \times 10^7$		
37	<i>S. aureus</i>	$3,5 \times 10^7$	<i>Strept. constellatus</i>	$1,5 \times 10^8$
	<i>P. aeruginosa</i>	$4,0 \times 10^7$		
	<i>Strept. spp.</i>	$2,0 \times 10^6$		
38	<i>S. aureus</i>	$2,0 \times 10^7$	<i>Bac. tectum</i>	$5,0 \times 10^7$
	<i>Strept. spp.</i>	$2,5 \times 10^5$		
39	<i>Strept. intermedius</i>	$1,0 \times 10^7$	<i>Ps. prevotii</i>	$1,0 \times 10^8$

**Tab. 10.1: Keimzahlen der nachgewiesenen fakultativen und obligaten Anaerobier in 92 Sputumproben (Fortsetzung)**

Sputum-Nr.	Fakultative Anaerobier	KBE/ml	Obligate Anaerobier	KBE/ml
	<i>B. gladioli</i>	$1,5 \times 10^8$		
	<i>S. epidermidis</i>	$1,0 \times 10^5$		
40	<i>Strept. spp.</i>	$1,5 \times 10^5$	<i>Ps. prevotii</i>	$2,5 \times 10^5$
	<i>S. aureus</i>	$3,0 \times 10^5$	<i>Bac. tectum</i>	$2,0 \times 10^7$
41	<i>Strept. pneumoniae</i>	$1,0 \times 10^8$		
42	<i>S. aureus</i>	$1,0 \times 10^7$	<i>S. saccharolyticus</i>	$1,0 \times 10^5$
43	<i>S. aureus</i>	$4,5 \times 10^5$	<i>Ps. prevotii</i>	$3,0 \times 10^5$
	<i>Strept. spp.</i>	$1,0 \times 10^5$		
44	<i>S. aureus</i>	$5,5 \times 10^6$	<i>Veillonella spp.</i>	$1,0 \times 10^6$
			<i>A. turicensis</i>	$2,0 \times 10^6$
45	<i>S. aureus</i>	$7,0 \times 10^6$	<i>S. saccharolyticus</i>	$2,0 \times 10^6$
46	<i>S. auricularis</i>	$1,5 \times 10^6$	<i>Ps. tetradius</i>	$1,0 \times 10^5$
	<i>Strept. vestibularis</i>	$2,0 \times 10^6$	<i>Ps. prevotii</i>	$1,0 \times 10^5$
47	<i>Sten. maltophilia</i>	$6,0 \times 10^6$	<i>Strept. intermedius</i>	$5,5 \times 10^5$
	<i>Strept. constellatus</i>	$2,5 \times 10^5$	<i>S. saccharolyticus</i>	$5,5 \times 10^5$
48	<i>Strept. sanguis</i>	$1,0 \times 10^6$		
	<i>P. aeruginosa</i>	$4,0 \times 10^5$		
49	<i>S. aureus</i>	$8,0 \times 10^6$	<i>Capnozytophaga spp.</i>	$6,0 \times 10^6$
	<i>Strept. vestibularis</i>	$8,0 \times 10^6$	<i>A. turicensis</i>	$1,0 \times 10^6$
	<i>Stom. mucilaginosus</i>	$1,0 \times 10^6$	<i>A. meyeri</i>	$1,0 \times 10^6$
50	<i>P. aeruginosa</i>	$4,5 \times 10^7$	<i>Ps. micros</i>	$4,5 \times 10^7$
51	<i>S. epidermidis</i>	$7,0 \times 10^6$	<i>S. saccharolyticus</i>	$1,5 \times 10^6$
	<i>Strept. salivarius</i>	$2,5 \times 10^6$	<i>Veillonella spp.</i>	$3,5 \times 10^6$
	<i>Stom. mucilaginosus</i>	$3,0 \times 10^5$	<i>C. clostridioforme</i>	$1,0 \times 10^6$
			<i>Pr. melaninogenica</i>	$2,0 \times 10^6$
52	<i>P. aeruginosa</i>	$5,5 \times 10^6$	<i>Gemella morbillorum</i>	$1,5 \times 10^5$
	<i>Strept. salivarius</i>	$2,0 \times 10^5$	<i>S. saccharolyticus</i>	$6,0 \times 10^5$
			<i>Ps. prevotii</i>	$1,0 \times 10^6$
			<i>Veillonella spp.</i>	$5,0 \times 10^6$
53	<i>S. aureus</i>	$1,3 \times 10^7$	<i>Ps. prevotii</i>	$1,0 \times 10^6$
	<i>Strept. sanguis</i>	$1,5 \times 10^6$	<i>S. saccharolyticus</i>	$4,5 \times 10^6$

**Tab. 10.1: Keimzahlen der nachgewiesenen fakultativen und obligaten Anaerobier in 92 Sputumproben (Fortsetzung)**

Sputum-Nr.	Fakultative Anaerobier	KBE/ml	Obligate Anaerobier	KBE/ml
54	<i>P. aeruginosa</i>	$4,0 \times 10^8$	<i>Bac. tectum</i>	$3,5 \times 10^6$
	<i>Strept. vestibularis</i>	$7,5 \times 10^5$	<i>Veillonella spp.</i>	$1,0 \times 10^6$
55	<i>B. cepacia</i>	$2,5 \times 10^8$	<i>S. saccharolyticus</i>	$4,0 \times 10^5$
	<i>Strept. salivarius</i>	$1,0 \times 10^5$	<i>Veillonella spp.</i>	$5,5 \times 10^5$
			<i>Ps. prevotii</i>	$2,0 \times 10^5$
56	<i>Strept. vestibularis*</i>	$4,5 \times 10^4$	<i>Strept. constellatus</i>	$1,0 \times 10^5$
	<i>Flav. oryzihabitans</i>	$2,0 \times 10^5$	<i>A. meyeri</i>	$1,0 \times 10^5$
57	<i>Strept. sanguis</i>	$4,5 \times 10^6$		
	<i>P. aeruginosa</i>	$8,5 \times 10^6$		
58	<i>P. aeruginosa</i>	$3,5 \times 10^7$	<i>Veillonella spp.</i>	$3,5 \times 10^6$
	<i>Strept. intermedius</i>	$2,5 \times 10^6$		
59	<i>B. cepacia</i>	$1,0 \times 10^6$	<i>S. saccharolyticus</i>	$1,0 \times 10^6$
	<i>Strept. salivarius</i>	$5,5 \times 10^6$	<i>Gemella morbillorum</i>	$1,5 \times 10^6$
60	<i>S. aureus</i>	$8,0 \times 10^6$	<i>Strept. constellatus</i>	$3,0 \times 10^7$
	<i>P. aeruginosa</i>	$6,0 \times 10^7$		
61	<i>Sten. maltophilia</i>	$4,0 \times 10^8$	<i>S. saccharolyticus</i>	$2,0 \times 10^6$
			<i>Strept. constellatus</i>	$4,0 \times 10^6$
62	<i>P. aeruginosa</i>	$6,0 \times 10^7$	<i>C. hastiforme</i>	$5,5 \times 10^7$
	<i>Strept. oralis</i>	$1,0 \times 10^5$	<i>Gemella morbillorum</i>	$3,0 \times 10^5$
			<i>Bac. tectum*</i>	$1,0 \times 10^4$
63	<i>P. aeruginosa</i>	$1,0 \times 10^8$	<i>S. saccharolyticus</i>	$1,0 \times 10^7$
			<i>Pr. melaninogenica</i>	$1,5 \times 10^7$
			<i>Pr. corporis</i>	$7,5 \times 10^5$
64	<i>P. aeruginosa</i>	$2,0 \times 10^8$	<i>A. turicensis</i>	$5,5 \times 10^6$
	<i>Strept. vestibularis</i>	$1,2 \times 10^7$		
65	<i>S. aureus</i>	$1,5 \times 10^5$		
	<i>S. capitis</i>	$2,0 \times 10^6$		
	<i>Strept. sanguis</i>	$5,0 \times 10^5$		
66	<i>S. aureus</i>	$3,0 \times 10^6$	<i>A. odontolyticus</i>	$2,5 \times 10^6$
	<i>Strept. sanguis</i>	$7,0 \times 10^5$	<i>A. turicensis</i>	$3,0 \times 10^6$
	<i>Stom. mucilaginosus</i>	$3,5 \times 10^5$	<i>S. saccharolyticus</i>	$2,0 \times 10^6$

**Tab. 10.1: Keimzahlen der nachgewiesenen fakultativen und obligaten Anaerobier in 92 Sputumproben (Fortsetzung)**

Sputum-Nr.	Fakultative Anaerobier	KBE/ml	Obligate Anaerobier	KBE/ml
			<i>Wolinella spp.</i>	$1,5 \times 10^6$
67	<i>Sten. maltophilia</i>	$1,0 \times 10^5$	<i>A. israelii</i>	$7,5 \times 10^5$
	<i>Strept. salivarius</i>	$3,0 \times 10^5$	<i>C. innocuum</i>	$2,5 \times 10^5$
68	<i>Strept. mitis</i>	$6,0 \times 10^5$	<i>A. odontolyticus</i>	$1,0 \times 10^6$
	<i>B. cepacia</i>	$1,0 \times 10^7$	<i>C. difficile</i>	$2,5 \times 10^6$
			<i>Ps. prevotii</i>	$4,0 \times 10^5$
			<i>Veillonella spp.</i>	$4,0 \times 10^5$
69	<i>P. aeruginosa</i>	$2,0 \times 10^7$		
	<i>Strept. spp.</i>	$4,0 \times 10^6$		
70	<i>P. aeruginosa</i>	$1,0 \times 10^7$	<i>C. hastiforme</i>	$2,5 \times 10^6$
	<i>S. epidermidis</i>	$2,5 \times 10^5$	<i>L. acidophilus</i>	$2,0 \times 10^6$
			<i>Mob. curtisii</i>	$3,0 \times 10^6$
			<i>L. jensenii</i>	$3,0 \times 10^6$
			<i>A. israelii</i>	$2,0 \times 10^6$
71	<i>S. aureus</i>	$4,5 \times 10^5$	<i>Ps. anaerobius</i>	$2,0 \times 10^5$
	<i>S. auricularis</i>	$1,0 \times 10^5$	<i>A. turicensis</i>	$1,0 \times 10^5$
	<i>Strept. intermedius</i>	$1,0 \times 10^5$	<i>A. odontolyticus</i>	$1,0 \times 10^5$
72	<i>P. aeruginosa</i>	$7,0 \times 10^7$		
73	<i>S. aureus</i>	$1,0 \times 10^6$	<i>Capnozytophaga spp.</i>	$2,5 \times 10^6$
	<i>Strept. salivarius</i>	$1,0 \times 10^6$	<i>Veillonella spp.</i>	$1,0 \times 10^6$
	<i>Strept. oralis</i>	$1,0 \times 10^6$	<i>Ps. anaerobius</i>	$1,0 \times 10^6$
74	<i>P. aeruginosa</i>	$2,0 \times 10^6$	<i>Veillonella spp.</i>	$3,5 \times 10^5$
75	<i>S. aureus</i>	$3,5 \times 10^6$	<i>Veillonella spp.</i>	$3,0 \times 10^6$
	<i>P. aeruginosa</i>	$7,5 \times 10^5$		
76	<i>S. aureus</i>	$1,0 \times 10^6$	<i>S. saccharolyticus</i>	$2,5 \times 10^5$
77	<i>Strept. pneumoniae</i>	$2,5 \times 10^6$	<i>Ps. prevotii</i>	$5,0 \times 10^5$
	<i>S. aureus</i>	$1,5 \times 10^6$	<i>Ps. tetradius</i>	$5,0 \times 10^5$
	<i>Strept. sanguis</i>	$1,0 \times 10^6$	<i>C. butyricum</i>	$5,5 \times 10^5$
	<i>Stom. mucilaginosus</i>	$1,0 \times 10^5$	<i>S. saccharolyticus</i>	$4,5 \times 10^5$
78	<i>P. aeruginosa</i>	$3,0 \times 10^6$		
	<i>Strept. sanguis</i>	$2,0 \times 10^6$		

**Tab. 10.1: Keimzahlen der nachgewiesenen fakultativen und obligaten Anaerobier in 92 Sputumproben (Fortsetzung)**

Sputum-Nr.	Fakultative Anaerobier	KBE/ml	Obligate Anaerobier	KBE/ml
	<i>Stom. mucilaginosus</i>	$3,5 \times 10^5$		
79	<i>Strept. constellatus</i>	$1,0 \times 10^6$	<i>S. saccharolyticus</i>	$4,5 \times 10^5$
	<i>Strept. pneumoniae</i>	$1,5 \times 10^6$		
	<i>Strept. vestibularis</i>	$1,0 \times 10^6$		
80	<i>S. aureus</i>	$4,0 \times 10^6$		
81	<i>S. aureus</i>	$1,5 \times 10^6$	<i>S. saccharolyticus</i>	$2,0 \times 10^6$
	<i>Strept. vestibularis</i>	$2,0 \times 10^5$		
82	<i>P. aeruginosa</i>	$1,5 \times 10^7$	<i>Strept. constellatus</i>	$1,5 \times 10^7$
	<i>S. aureus</i>	$9,0 \times 10^6$		
83	<i>S. aureus</i>	$3,5 \times 10^7$	<i>Mob. mulieris</i>	$8,5 \times 10^6$
	<i>Strept. salivarius</i>	$1,0 \times 10^7$	<i>S. saccharolyticus</i>	$8,0 \times 10^5$
84	<i>Strept. oralis</i>	$1,0 \times 10^6$	<i>S. saccharolyticus</i>	$1,0 \times 10^7$
			<i>Veillonella spp.</i>	$4,0 \times 10^6$
			<i>Bac. tectum</i>	$5,5 \times 10^6$
			<i>Ps. prevotii</i>	$2,5 \times 10^6$
85	<i>S. capitis</i>	$3,5 \times 10^6$	<i>Prop. granulosum</i>	$1,5 \times 10^6$
	<i>Strept. oralis</i>	$3,5 \times 10^6$	<i>Prop. propionicus</i>	$5,5 \times 10^6$
	<i>P. aeruginosa</i>	$1,5 \times 10^5$		
86	<i>P. aeruginosa</i>	$1,5 \times 10^7$	<i>S. saccharolyticus</i>	$3,0 \times 10^5$
87	<i>Sten. Maltophilia</i>	$1,5 \times 10^7$	<i>A. odontolyticus</i>	$1,0 \times 10^6$
			<i>Capnozytophaga spp.</i>	$3,5 \times 10^5$
88	<i>P. aeruginosa</i>	$3,0 \times 10^8$		
89	<i>Strept. sangius</i>	$8,5 \times 10^5$	<i>Ps. prevotii</i>	$1,0 \times 10^5$
	<i>P. aeruginosa</i>	$3,5 \times 10^5$		
90	<i>Strept. salivarius</i>	$1,0 \times 10^5$	<i>Bac. stercoris</i>	$2,0 \times 10^6$
	<i>Strept. intermedius</i>	$1,0 \times 10^5$	<i>Bac. tectum</i>	$1,0 \times 10^5$
	<i>P. aeruginosa</i>	$1,0 \times 10^5$	<i>Ps. tetradius</i>	$1,0 \times 10^5$
91	<i>S. aureus</i>	$1,0 \times 10^7$	<i>Veillonella spp.</i>	$2,0 \times 10^6$
	<i>Strept. spp.</i>	$2,0 \times 10^5$		
92	<i>S. aureus</i>	$5,0 \times 10^5$	<i>S. saccharolyticus</i>	$5,0 \times 10^6$
	<i>Strept. constellatus</i>	$2,0 \times 10^6$	<i>Mob. mulieris</i>	$1,0 \times 10^6$

**Tab. 10.1: Keimzahlen der nachgewiesenen fakultativen und obligaten Anaerobier in 92 Sputumproben- Legende der verwendeten Abkürzungen**

Abkürzungen	
A.	<i>Actinomyces</i>
B.	<i>Burkholderia</i>
Bac.	<i>Bacteroides</i>
C.	<i>Clostridium</i>
E.	<i>Eubacterium</i>
Flav.	<i>Flavimonas</i>
L.	<i>Lactobacillus</i>
Mob.	<i>Mobiluncus</i>
P.	<i>Pseudomonas</i>
Pr.	<i>Prevotella</i>
Prop.	<i>Propionibacterium</i>
Ps.	<i>Peptostreptococcus</i>
S.	<i>Staphylococcus</i>
spp.	<i>Spezies</i>
Sten.	<i>Stenotrophomonas</i>
Stom.	<i>Stomatococcus</i>
Strept.	<i>Streptococcus</i>
• wurden nicht mit in die Auswertung einbezogen	

## Votum der Ethikkommission



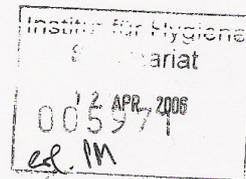
MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT  
HALLE - WITTENBERG

Medizinische Fakultät  
Ethik-Kommission

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

Herrn Oberarzt Dr. D. Worlitzsch  
Institut für Hygiene  
Klinikum der Medizinischen Fakultät der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Johann-Andreas-Segner-Straße 12

06097 Halle



Ihre Zeichen

Ihr Schreiben vom

Unsere Zeichen  
hm-bü

Datum  
06.04.2006

Postanschrift:  
06097 Halle (Saale)

### Obligate anaerobe Bakterien im Sputum von Patienten mit cystischer Fibrose. Klinische Pilotstudie

Hausanschrift:  
Magdeburger Straße 27  
06112 Halle (Saale)

Sehr geehrter Herr Dr. Worlitzsch,

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

mit Schreiben vom 04.04.2006 zum oben genannten Forschungsvorhaben haben Sie einen überarbeiteten Antrag mit geänderter Patienteninformation und Einverständniserklärung übersandt. Die Auflagen unseres Votums vom 22.03.2006 sind erfüllt.

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

Ich kann Ihnen bestätigen, dass seitens der Ethik-Kommission keine Bedenken gegen die Durchführung des Forschungsvorhabens bestehen.

Mit freundlichen Grüßen

  
Prof. Dr. med. Stefan Grond  
Vorsitzender der Ethik-Kommission

Nachrichtlich  
Frau Oberärztin B. Wollschläger  
Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin II

## 11 Thesen

1. Die Mukoviszidose (cystic fibrosis, CF) ist die häufigste schwerwiegende autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung der westlichen Industrienationen. Chronische bakterielle Lungenentzündungen stellen für Patienten mit CF die bei weitem häufigste Todesursache dar.
2. Charakteristisch für die Erkrankung ist die Lungenbesiedlung mit fakultativen Anaerobiern wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia complex*-Bakterien oder *Haemophilus influenzae*.
3. Bei der chronischen Entzündung werden große Mengen von viskösem Sputum gebildet, in dem auf Grund von bakteriellem und zellulärem Sauerstoffverbrauch sowie auf Grund von reduzierter Sauerstoffdiffusion anaerobe Verhältnisse vorliegen.
4. Aktuelle Veröffentlichungen gehen davon aus, dass im Sputum in der Lunge von Patienten mit CF neben den fakultativen Anaerobiern auch obligate Anaerobier existieren können.
5. In der vorliegenden Studie wurde diese These im Rahmen von *in vitro* und *in vivo*-Untersuchungen überprüft. Zusätzlich wurde erstmals die klinische Bedeutung der obligaten Anaerobier für die CF-Patienten während Exazerbationen untersucht, da rezidivierende Exazerbationen für die CF-Patienten potentiell lebensbedrohliche Situationen darstellen; ihre Genese ist unklar.
6. Es wurden insgesamt 92 Sputumproben von CF-Patienten auf das Vorkommen von obligaten Anaerobiern mithilfe biochemischer Klassifikationsmethoden untersucht; zusätzlich wurde eine Resistenztestung dieser Keime durchgeführt.
7. Bei 89,7% der untersuchten Patienten waren obligate Anaerobier (15 Genera und 35 Spezies) in hohen Keimzahlen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung:  $1,3 \times 10^7 \pm 5,6 \times 10^7$  KBE/ml) nachweisbar.
8. Der Nachweis identischer Stämme von obligaten Anaerobiern konnte nicht nur sporadisch, sondern für bis zu 11 Monate bei einzelnen CF-Patienten geführt werden.

9. Der Nachweis von obligaten Anaerobiern konnte bei Kindern mit akuten Lungeninfektionen nicht geführt werden, was eine Spezifität dieser Keime für CF-Patienten aufzeigt.
10. Bei der Therapie von akuten Exazerbationen, die sich in einer erheblichen Reduktion der routinemäßig erhobenen Lungenfunktionsparameter äußern, kam es nach konventioneller Antibiotika-Therapie gegen *P. aeruginosa* zwar nicht zur Reduktion von fakultativen und obligaten Anaerobiern, dennoch aber zu einer signifikanten Verbesserung der Lungenfunktion.
11. Die Resistenzbestimmungen zeigten hohe Prozentzahlen obligater Anaerobier für häufig in der Therapie von CF-Patienten verwendete Substanzen (wie z.B. Ceftazidim), während für seltener benutzte Präparate wie Meropenem die Empfindlichkeit fast vollständig erhalten blieb.
12. Nach konventioneller i.v.-Therapie gegen *P. aeruginosa* waren 58% der obligaten Anaerobier resistent gegen das jeweils verwendete Antibiotikum.
13. Der Nachweis von resistenten obligaten Anaerobiern in hohen Keimzahlen beweist, dass auch diese Keime sich im Sputum vermehren. Damit liegt eine pathogenetische Bedeutung für die chronische Lungenentzündung der CF-Patienten nah.
14. Aus den in dieser Arbeit erstmals durchgeführten Untersuchungen resultiert ein grundsätzlich neues Verständnis der mikrobiologischen Pathomechanismen der chronischen CF-Lungeninfektion.
15. Eine spezifische Therapie mit Antibiotika, die gegen fakultative Anaerobier wie auch gegen die jeweiligen obligaten Anaerobier wirksam sind, kann nach den vorliegenden klinischen Ergebnissen die Behandlung der chronischen Lungeninfektion der betroffenen CF-Patienten verbessern.
16. Weiterführende Untersuchungen zum Beitrag der obligaten Anaerobier zur Pathogenese der chronischen CF-Lungeninfektion müssen zeigen, ob die CF-Patienten von einer solchen Therapie profitieren können.

## **Lebenslauf**

Name: Claudia Rintelen

Anschrift  
am Studienort: Weidenplan 18, 06108 Halle

Heimatanschrift: Johanniterstr. 37, 48565 Steinfurt

Geburtstag: 14.10.1979

Geburtsort: Steinfurt-Borghorst

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

## **Schulbildung**

Besuchte Schulen: 1986-1990 Bismarckgrundschule in Steinfurt  
1990-1999 Gymnasium Arnoldinum in Steinfurt

Schulabschluss: Abitur im Juni 1999

## **Berufsausbildung**

Ausbildungsberuf: Zahnarzthelferin

Ausbildungsort: Praxis Dr. Wietzorke in Münster-Hiltrup  
Praxis Dr. Westermann in Münster

Ausbildungsdauer: 1999-2002

Berufsschule: Hansaschule in Münster

## **Hochschulausbildung**

Hochschule: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Studiengang: Zahnmedizin

Studienbeginn: Oktober 2002

Hochschulabschluss: Staatsexamen 2008

Halle, 05.01.09

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, **Claudia Rintelen, geb. 14.10.1979**, 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.

Halle, den 05.01.2009

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, **Claudia Rintelen, geb. 14.10.1979**, 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.

Halle, den 05.01.2009

## 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 ständige Bereitschaft, mit konstruktiven Fragen und kritischen Hinweisen die Arbeit voranzubringen, was eine große Hilfe für mich darstellte.

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

**Frau OÄ Dr. Bettina Wollschläger und Herrn OA Dr. Nick Merkel**, Leiter der CF-Ambulanzen an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die freundliche Unterstützung und Zusammenarbeit.

**Herrn Prof. Dr. Gerd Döring**, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, für die wertvollen und ausgesprochen hilfreichen Diskussionen.

**Herrn Prof. Dr. Johannes Haerting**, Direktor des Institutes für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Medizinische Informatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, danke ich für die freundliche Unterstützung bei den statistischen Auswertungen.

**Frau Nadine Höchst, 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 bei den alltäglichen labortechnischen Problemen.

Meinen Freund Daniel, meine Familie und meine Freunde.