

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

**Die Entwicklung von Antibiotika-Resistenzen bei obligat anaeroben
Bakterien im Sputum von Patienten mit Cystischer Fibrose**

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

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

von Ariane Lehmann
geboren am 06.08.1989 in Grimma

Betreuer: PD Dr. med. habil. Dieter Worlitzsch

Gutachter: PD Dr. med. habil. Dieter Worlitzsch
Prof. Dr. med. habil. Matthias Girndt
PD Dr. med. habil. Michael Hogardt

Verteidigungsdatum: 08.07.2014

Referat

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Untersuchung des Verlaufs der Antibiotikaresistenzen bei obligat anaeroben Bakterien im Sputum von Patienten mit Cystischer Fibrose (CF). Sieben verschiedene Antibiotika aus der Substitutionstherapie, der Therapie der akuten Exazerbation, aber auch solche, die zuvor in der CF-Therapie noch keine klinische Anwendung fanden, wurden betrachtet. Mithilfe biochemischer Testkits erfolgte die Identifikation aller im Sputum vorkommender fakultativer und obligater Anaerobier. Sowohl zur Identifikation als auch zur Antibiotikaresistenztestung der obligaten Anaerobier wurde eine Anaerobierbank verwendet. Die Bestimmung der Resistenzen erfolgte mit dem E-Test®.

Es wurden insgesamt 223 Sputumproben von 59 Patienten über einen maximalen Beobachtungszeitraum von drei Jahren und fünf Monaten untersucht. Dabei gelang die Identifikation von 640 fakultativen und 233 obligat anaeroben Bakterienstämmen.

Gegen Azithromycin waren 72% aller nachgewiesenen obligat anaeroben Stämme resistent, gegen Colistin 67%, Piperacillin/Tazobactam 12%, Meropenem 3%, Ceftazidim 36%, Clindamycin 32% und Metronidazol 57%. Zur Verlaufsbeobachtung der Antibiotikaresistenzen wurden alle Patienten betrachtet, bei denen die einzelnen obligat anaeroben Stämme im Verlauf mehrfach auftraten, was bei 19 der 59 Patienten möglich war. Bei diesen 19 Patienten betrug die Resistenzzunahme in Bezug auf alle sieben Antibiotika 37,4% ($\pm 25,5\%$). Bei allen obligat anaeroben Spezies kam es zu einer Zunahme der Antibiotikaresistenzen von 44,9% ($\pm 34,5\%$). In Bezug auf alle sieben Antibiotika betrug die Zunahme der Resistenzen 37,7% ($\pm 9,3\%$).

Bislang wurde bei CF-Patienten keine gezielte Antibiotika-Therapie gegen obligate Anaerobier durchgeführt, sondern hauptsächlich gegen *Pseudomonas aeruginosa*. Der hohe Prozentsatz der gegen die Exazerbationstherapeutika sensiblen obligaten Anaerobier bedingt möglicherweise den Erfolg der Therapien bei Exazerbationen. Dagegen ist der hohe Prozentsatz der gegen Substitutionstherapeutika resistenten obligaten Anaerobier damit in Übereinstimmung zu bringen, dass diese Therapie nicht zu einer Eradikation der Bakterien führt. Die im Untersuchungszeitraum nachgewiesenen zunehmenden Resistenzen bei den obligaten Anaerobiern schränken diese Therapieoptionen möglicherweise jedoch erheblich ein.

Lehmann, Ariane: Die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen bei obligat anaeroben Bakterien im Sputum von Patienten mit Cystischer Fibrose, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 53 Seiten, 2013

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Cystische Fibrose	1
1.2 Chronische Lungeninfektion bei Cystischer Fibrose	2
1.3 Obligat anaerobe Bakterien im Sputum von Patienten mit Cystischer Fibrose	6
1.4 Antibiotikatherapie bei Patienten mit Cystischer Fibrose	8
2 Zielstellung	10
3 Material und Methodik	11
3.1 Patienten	11
3.2 Sputumproben	11
3.3 <i>In vitro</i> -Untersuchungen	12
3.3.1 Anzuchtmedien	12
3.3.2 Identifikation der fakultativen Anaerobier	13
3.3.3 Identifikation der obligaten Anaerobier	16
3.3.4 Antibiotikaresistenzbestimmung bei obligat anaeroben Bakterien	18
3.4 Auswertung	20
4 Ergebnisse	21
4.1 Nachweis fakultativer und obligater Anaerobier	21
4.2 Antibiotikaresistenztestungen bei obligaten Anaerobiern	22
4.2.1 Gesamtresistenzen der Antibiotika	22
4.2.2 Resistenzentwicklung	28
4.2.3 Antibiotikaresistenzverlauf bei einzelnen Patienten	32
5 Diskussion	35
6 Zusammenfassung	41
7 Literaturverzeichnis	44
8 Tabellen- und Diagrammanhang	49
9 Thesen	52

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

%	Prozent
®	Registered Trademark
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding cassette
ASL	airway surface liquid
ATPasen	Adenosintriphosphatasen
AZM	Azithromycin
<i>B. cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
bzw.	beziehungsweise
<i>C. bifermentans</i>	<i>Clostridium bifermentans</i>
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
<i>Camp. gracilis</i>	<i>Campylobacter gracilis</i>
CAZ	Ceftazidim
CD	Clindamycin
CF	Cystische Fibrose, syn. Mukoviszidose
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
CS	Colistin
et al.	und andere
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
K ⁺	Kalium-Ion
kb	Kilobase
KBE	kolonie-bildende Einheiten
l	Liter
LZ	Metronidazol
MHK	minimale Hemmkonzentration
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MRP	Meropenem
Na ⁺	Natrium-Ion
O ₂	Sauerstoff, molekularer
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
<i>Prop. granulosum</i>	<i>Propionibacterium granulosum</i>

<i>Ps. assacharolyticus</i>	<i>Peptostreptococcus assacharolyticus</i>
<i>Ps. prevotii</i>	<i>Peptostreptococcus prevotii</i>
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. saccharolyticus</i>	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>
SMG	<i>Streptococcus milleri</i> -Gruppe
sp.	Spezies
spp.	<i>species pluralis</i>
<i>Ste. maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Str. constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>
<i>Str. intermedius</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Str. milleri</i>	<i>Streptococcus milleri</i>
<i>Str. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
TRFLP	terminal restriction fragment length polymorphism profiling
TZP	Piperacillin/ Tazobactam
vgl.	vergleiche
µg	Mikrogramm

1 Einleitung

1.1 Cystische Fibrose

Die Cystische Fibrose (Cystic Fibrosis, CF, Synonym: Mukoviszidose) ist die am häufigsten auftretende, schwerwiegende, autosomal rezessive Erbkrankheit in der kaukasischen Bevölkerung mit einer Häufigkeit von 1:2500 Lebendgeburten (Ratjen und Döring, 2003). Mit einer deutlich geringeren Häufigkeit kommt CF in der spanischen (1:9000), der asiatischen (1:32000) und der schwarz-amerikanischen (1:15000) Bevölkerung vor (Gibson et al., 2003).

1989 (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989) wurde das diese Krankheit verursachende Gen identifiziert. Dabei handelt es sich um ein 230 kb Gen auf dem langen Arm von Chromosom 7 (7q31.2), welches für ein 1480 Aminosäuren umfassendes Polypeptid kodiert. Dieses Genprodukt, der cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), ist ein ABC-Transportprotein (ATP-binding cassette), welches Chlorid-Ionen von intra- nach extrazellulär transportiert und in allen schleimsezernierenden Epithelien vorkommt (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989). Insgesamt können CFTR- Mutationen in sechs Klassen (Ratjen und Döring, 2003) unterteilt werden:

- (1) CFTR wird nicht synthetisiert
- (2) Defekte im Prozessing
- (3) Defekte in der Regulation
- (4) Defekte in der Übersetzung
- (5) partielle Defekte in der Produktion oder im Prozessing
- (6) Defekte in der Regulation anderer Kanäle.

Dabei kommen die Klassen 1–3 am häufigsten vor und sind meist mit einer Pankreasinsuffizienz verbunden, wohingegen die selteneren Klassen 4–6 typischerweise keine solche Insuffizienz aufweisen. Von den 1950 (Cystic fibrosis mutation data base, 2013) bekannten Mutationen weltweit ist die häufigste die Klasse 2, eine Deletion von Phenylalanin an der Position 508 des CFTR (F508del) (Ratjen und Döring, 2003).

Aufgrund der unterschiedlichen Schwere der Mutation, ist der bereits im Säuglings- und Kleinkindalter beginnende Verlauf der Krankheit mit verschiedenen Symptomen vorhanden. Die CFTR-Mutation manifestiert sich durch Bildung eines zähen, hochviskösen Mukus in allen drüsenhaltigen Organen. Darum zählen zu den Hauptsymptomen Husten und Dyspnoe durch Atemwegsobstruktionen bei chronischer

Lungeninfektion, wobei diese Komplikation für die Patienten meist lebenslimitierend ist. Hinzu kommen gastrointestinale Beschwerden mit Steatorrhoe und Mekonium-Ileus im Säuglingsalter sowie Pankreasentzündung und -insuffizienz im Erwachsenenalter. Ein weiteres Problem besteht in der, vor allem bei männlichen Patienten vorkommenden (98% der Fälle) Infertilität aufgrund einer Azoospermie. Diese beruht auf einer kongenitalen, bilateralen Aplasie des *vas deferens* (Gibson et al., 2003). Trotz der enormen Forschungsfortschritte auf dem Gebiet der CF in den letzten Jahrzehnten, liegt die mittlere Überlebenszeit von Erwachsenen mit CF bei über 35 Jahren (Cystic Fibrosis Foundation, 2013).

Eine ursächliche Behandlung der CF-Patienten in Form einer Gentherapie ist derzeit nicht möglich. Deshalb steht die symptomatische Behandlung im Vordergrund. Dazu zählen in erster Linie die antibiotische Behandlung der im Alter zunehmenden Lungeninfektionen, sowie eine hochkalorische Ernährungstherapie, aufgrund des vermehrten Energiebedarfes des Organismus. Hinzu kommt Physiotherapie in Form von Atemtherapie und Krankengymnastik zur gezielten Förderung der Sekretolyse.

Seit 2012 ist der Wirkstoff Ivacaftor (Kalydeco®, 150mg) als CFTR-Potentiator zur Behandlung von CF bei Patienten mit der G551D-Mutation im CFTR-Gen in Deutschland zugelassen. Er verstärkt den Chloridtransport in die Zelle. Bei der G551D-Mutation ist die Aminosäure Glycin gegen Asparaginsäure ausgetauscht, sodass das Gating dieses Kanals gestört ist. Dieses Medikament ist bereits für Kinder ab sechs Jahren zugelassen. Vor Behandlungsbeginn ist ein genetischer Test zur Bestätigung der Mutation notwendig (Hoffmann und Ramsey, 2013).

1.2 Chronische Lungeninfektion bei Cystischer Fibrose

Die klinisch schwerwiegendste Manifestation der CF äußert sich in Veränderungen der Atemwege und der Lunge. Hier entwickelt sich meist eine chronische Lungeninfektion. Der zähe, hochvisköse Schleim, verbunden mit einer fehlenden mukoziliären Clearance führt bereits im Kindesalter zu einem beginnenden Befall der Lunge mit vielen verschiedenen Pathogenen. Am häufigsten vertreten ist *Pseudomonas aeruginosa*, gefolgt von *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* und *Stenotrophomonas maltophilia* (Ratjen und Döring, 2003; vgl. Abb. 1). Die Folge der sich entwickelnden chronischen Infektion und Entzündung des Respirationstraktes ist die Zerstörung der Atemwege in Form von Atelektasen, Emphysemen und pulmonaler Hypertonie, verbunden mit rezidivierenden Pneumonien und einer Abnahme der Lungenfunktion (Gibson et al., 2003).

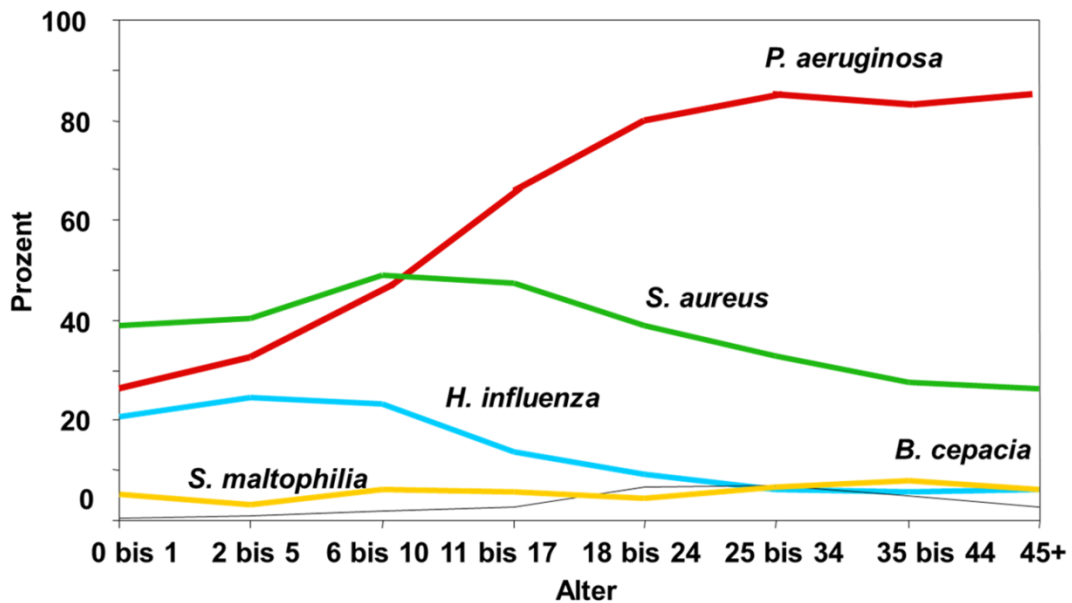


Abb. 1: Prävalenz verschiedener Bakterien in der CF-Lunge (nach Valerius et al.,1991)

Ein normales respiratorisches Epithel bei Gesunden ist mit einer dünnen, niedrigviskösen Mukusschicht (airway surface liquid, ASL) bedeckt. Diese wird durch die Zilien bei normaler Mukussekretion oralwärts transportiert (mukoziliäre Clearance). Der Sauerstoffpartialdruck im Mukus ist hoch und der epitheliale Sauerstoffverbrauch normal, wodurch ein ungehinderter Gasaustausch möglich ist. Dadurch ist eine bakterielle Besiedlung des Respirationstraktes bei Gesunden selten.

Bei einem CF-Patienten, dessen Lunge mit *P. aeruginosa* besiedelt ist, beginnt die Lungeninfektion damit, dass aus dem Mukus aufgrund des defekten Chloridkanals vermehrt Natrium und Chlorid nach intrazellulär resorbiert werden. Wasser folgt nach und vermindert damit den Flüssigkeitsfilm auf der Oberfläche und zwischen den Zilien. Die enorme Na^+ -Absorption hat eine vermehrte Tätigkeit der Na^+ - K^+ -ATPase zur Folge, woraus wiederum in diesen Bereichen ein erhöhter O_2 -Bedarf resultiert. Die Mukussekretion findet weiterhin statt, sodass an der Oberfläche Plaques entstehen. Aus dem vermehrten O_2 -Verbrauch und der verdickten Mukusschicht entsteht ein O_2 -Gradient im Mukusplaque. *P. aeruginosa*-Bakterien, die sich auf der Mukusoberfläche abgelagert haben, können nun aktiv oder passiv in hypoxische Areale des Mukusplaques vordringen. In diesem anaeroben Gebiet wächst *P. aeruginosa*, ebenfalls positiv beeinflusst durch das dort vorkommende Nitrat als terminaler Elektronenakzeptor (Hassett, 1996). Somit ist *P. aeruginosa* in der CF-Lunge intraluminal lokalisiert. Die Bakterien adaptieren sich an die hypoxischen Bedingungen und bilden Makrokolonien. Diese, teilweise mit dem bloßen Auge sichtbaren Kolonien,

überstehen auch die Abwehrmechanismen der sekundären Immunantwort, vor allem der neutrophilen Granulozyten. Die stark zunehmende Zahl an Makrokolonien verursacht, zusammen mit den neutrophilen Granulozyten eine Hypoxie des kompletten Mukus (Worlitzsch et al., 2002; vgl. Abb. 2).

Somit ist *P. aeruginosa*, neben *S. aureus*, als fakultativer Anaerobier in den meisten Fällen für die Entstehung der chronischen Lungeninfektion bei CF verantwortlich (Ratjen und Döring, 2003). *P. aeruginosa* kann als fakultativer Anaerobier angesehen werden, denn es kommt aufgrund der Verstoffwechslung von Nitrat (Hassett, 1996), von Arginin (Vander Wauwen et al., 1984) und von Pyruvat (Schobert und Jahn, 2010) zur Bildung eines Biofilms, in dem anaerobe Bedingungen vorherrschen.

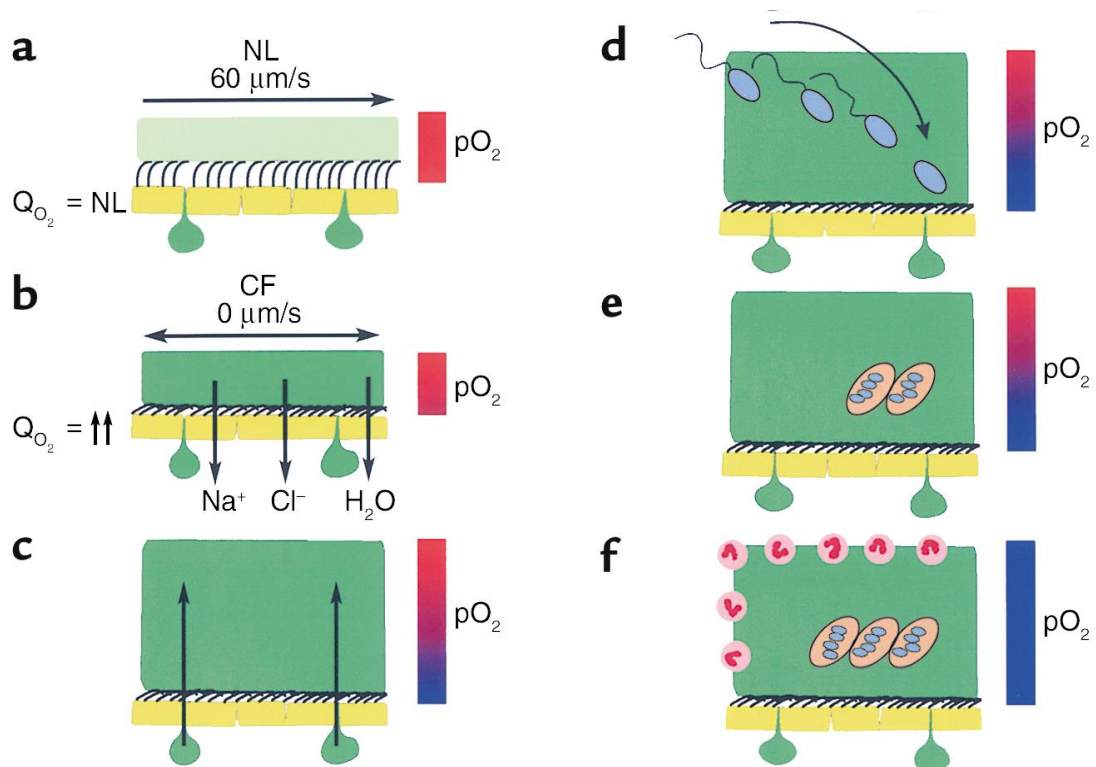


Abb. 2: Entstehung der chronischen Lungeninfektion mit *P. aeruginosa* (Worlitzsch et al., 2002)

Durch die ansteigende Hypoxie in der Lunge von Patienten mit CF werden die Bakterien nicht mehr ausreichend eliminiert. Sie setzen sich auf der Oberfläche des Epithels der Atemwege fest und können dort als Biofilme wachsen. Biofilme als strukturierte bakterielle Zellverbände die von einer gemeinsamen Matrix umgeben sind, bestehen vor allem aus Exopolysacchariden der Bakterien (Sauer et al., 2002).

Mehrere, gleichzeitig auftretende Faktoren führen durch Sauerstoffverbrauch in den Biofilmen zur Entstehung anaerober Verhältnisse: die eindringenden pathogenen Bakterien wie *P. aeruginosa* (O'May et al., 2006), die Abwehrzellen des

Immunsystems, vor allem die neutrophilen Granulozyten sowie die Zellen des Atemwegsepithels. Somit schützt der Biofilm die pathogenen Bakterien nicht nur vor Sauerstoff und dessen Radikalen, sondern auch vor den Abwehrzellen des Immunsystems sowie vielen verabreichten Antibiotika (Park et al., 1992).

Um sich auf die nun vorherrschenden anaeroben Bedingungen einzustellen, kommt es nach einiger Zeit zur Ausbildung von Alginate-produzierenden Stämmen von *P. aeruginosa*. Alginate als Salz der Alginsäure, besteht aus Gularonsäure und Mannuronsäure und führt als Exopolysaccharid *P. aeruginosa* zur Ausbildung des Biofilms (Hassett, 1996). So kann unter zunehmender Hypoxie eine gesteigerte Alginate-Produktion in der CF-Lunge als Stressreaktion von *P. aeruginosa* betrachtet werden. (Worlitzsch et al., 2002)

Ein weiterer pathogenetischer Faktor der zur Entstehung der chronischen Lungeninfektion bei CF führt, ist das Vorkommen von Bakterien der *Streptococcus milleri*-Gruppe (SMG). Diese Bakteriengruppe, auch unter dem Namen der *Str. anginosus*-Gruppe bekannt, umfasst die untereinander nah verwandten Spezies *Str. constellatus*, *Str. intermedius* und *Str. anginosus* (Sibley et al., 2010). Diese Spezies kommen als Kommensalen sowohl in der Mundhöhle, als auch im Gastrointestinaltrakt und im weiblichen Genitaltrakt bei 15% bis 30% der gesunden Bevölkerung vor. Neben der Verursachung pyogener Infektionen, sowie Haut- und Weichteilinfektionen, sind sie mit verantwortlich für die Exazerbationen der chronischen Lungeninfektion bei CF (Olson et al., 2010).

Exazerbationen bei CF-Patienten sind definiert als akute Abnahme der Lungenfunktion und Zunahme der Sputumproduktion, können mehrmals im Jahr auftreten und bedürfen einer intensiven, vor allem antibiotischen Therapie. Gemeinsamkeiten in der *Str. milleri*-Gruppe bestehen im langsamen Wachstum, der Hydrolyse von Arginin, der Produktion von Aceton, sowie der verhinderten Fermentation von Sorbitol. Außerdem konnte in Studien gezeigt werden, dass beta-hämolyisierende *Str. constellatus* der Lancefield-Gruppe C und Arginin hydrolysierende–negative *Str. intermedius* bei Patienten mit CF klinisch relevant sind (Grinwis et al., 2010).

Des Weiteren tragen zur chronischen Lungeninfektion bei CF die Gruppe der Staphylokokken, vor allem *S. aureus* und *Staphylococcus epidermidis*, bei. Die Pathogenität dieser Stämme wird durch eine Reihe von extrazellulären Toxinen und der Expression verschiedener Oberflächenproteine bestimmt. So führt bei *S. aureus* die Synthese eines β -1,6-Glucosaminoglykans zur Zell-Zell-Adhäsion und damit zur Bildung eines Biofilms (McKenney et al., 1999; Cramton et al., 2001).

Seit längerer Zeit wird angenommen, dass die Mundhöhle als Reservoir verschiedener Pathogene für eine Vielzahl unterschiedlicher Atemwegsinfektionen mitverantwortlich

ist (Worlitzsch et al., 2009; Tunney et al., 2011). Bereits 2004 und 2005 identifizierten Rogers et al. Bakterien im Sputum von CF-Patienten die normalerweise nur in der Mundhöhle vorkommen. Somit nahmen sie an, dass die Mundhöhle sowohl als Reservoir, als auch als „Sprungbrett“ der bakteriellen Infektion der CF-Lunge dienen kann.

Insgesamt führt das Vorhandensein von aeroben und fakultativ anaeroben Bakterienstämmen, verbunden mit der Bildung von Biofilmen und der reduzierten Wirksamkeit von Antibiotika in der Lunge von Patienten mit CF zur chronischen Lungeninfektion. Dabei spielen die verminderte Wirkung des körpereigenen Immunsystems, sowie die fehlende mukoziliäre Clearance eine weitere wichtige Rolle. (Worlitzsch et al., 2002).

1.3 Obligat anaerobe Bakterien im Sputum von Patienten mit Cystischer Fibrose

Neben den häufig bei CF gefundenen Bakterien wie *P. aeruginosa*, *S. aureus*, und *Burkholderia cepacia*, welche als fakultative Anaerobier angesehen werden können, kommen im Sputum von Patienten mit CF auch obligat anaerobe Bakterienstämme vor. Zu diesen zählen vor allem *Staphylococcus saccharolyticus*, *Peptostreptococcus prevotii* und *Veillonella spp.* (Tunney et al., 2008; Worlitzsch et al., 2009; Sibley und Surette, 2011; Zemanick et al., 2011).

Der Ursprung dieser obligaten Anaerobier ist dabei nach wie vor noch nicht abschließend geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass die Bakterien aus der Mundhöhle in die Lunge gelangen und sich dort, aufgrund der vorherrschenden bereits beschriebenen anaeroben Verhältnisse bei CF, vermehren können.

Eine Studie zu diesem Thema im Jahr 2004 geleitet von G.B. Rogers, charakterisierte verschiedene Bakterienkolonien (Rogers et al., 2004). Als Untersuchungsmaterial verwendete auch diese Arbeitsgruppe Sputumproben von CF-Patienten. Diese Untersuchung wurde mithilfe der Methode des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (terminal restriction fragment length polymorphism profiling, TRFLP) in Verbindung mit 16S-rRNA Klon-Sequenzanalysen durchgeführt (Rogers et al., 2004).

Dabei wurden der Artenreichtum und die relative Größe einer Art durch TRFLP bestimmt, um damit die Komplexität der im Sputum vorkommenden Bakterienkolonien zu beschreiben. Die Studie zeigte, dass die Lunge eines jeden CF-Patienten mit vielen unterschiedlichen Bakterienarten befallen ist. Erstmals wurden neben Aerobieren und fakultativen Anaerobiern (*Abiothrophia adiacens*, *Abiothrophia paraadiacens*, *Ralstonia taiwanensis*) das Vorkommen von obligaten Anaerobiern (*Bacteroides gracilis*,

Eubacterium brachy, *Mycoplasma salivarum*, *Veillonella atypica*) im Sputum beschrieben.

Die Größe der Banden bei der TRFLP-Analyse spiegelte die relative Anzahl der vorkommenden Bakterien einer Art wider. Dadurch wurde nochmals bestätigt, dass *P. aeruginosa* die dominante Art ist, gefolgt vom *B. cepacia* Komplex, *Ste. maltophilia*, *S. aureus* und *H. influenzae*. Einschränkend wurde jedoch hinzugefügt, dass sich unter all den herausgefundenen Bakterienarten auch welche aus Oropharynx und Mundhöhle befinden könnten (Rogers et al., 2004).

In einer weiteren Studie derselben Arbeitsgruppe 2005 wurde untersucht, ob in der Lunge CF-erkrankter Kinder genauso viele verschiedene Bakterienkolonien vorkommen, wie in der Lunge eines erkrankten Erwachsenen. Die Untersuchungsmethoden waren dieselben wie im Jahr zuvor. Es zeigte sich, dass bereits im Sputum eines 8-jährigen Patienten die gleiche Anzahl verschiedener Bakterienstämme wie bei einem erwachsenen Erkrankten vorkommen kann (Rogers et al., 2005; Rintelen et al., 2008).

2009 wurden im Sputum von CF-Patienten neben den fakultativen auch obligate Anaerobier nicht nur nachgewiesen, sondern erstmals vollständig identifiziert (Worlitzsch et al., 2009). Zu den dabei insgesamt nachgewiesenen 15 verschiedenen Stämmen obligat anaerober Bakterien zählen, unabhängig vom Alter des Patienten, unter anderem die am weitesten verbreiteten *S. saccharolyticus* und *Ps. prevotii*. Die vorkommende Zellanzahl dieser Stämme unterscheidet sich dabei kaum von derjenigen der fakultativen Anaerobier, wobei bei 82% der CF-Kinder und bei 94% der Erwachsenen mit CF bis zu 2×10^7 KBE/ml vorkommen.

Des Weiteren ist die Wahrscheinlichkeit obligate Anaerobier im Sputum zu finden, bei bestehender chronischer Infektion mit *P. aeruginosa* nicht erhöht. In Langzeituntersuchungen fand die Arbeitsgruppe heraus, dass einzelne obligat anaerobe Bakterienstämme bis zu 11 Monate in der Lunge von Patienten vorkommen. Außerdem besteht bei Besiedlung der Lunge mit obligaten bzw. fakultativen Anaerobiern kein Unterschied in der Lungenfunktion. Diese verbessert sich unter der Antibiotikatherapie deutlich. Im Zuge der Bestimmung der Anzahl vorhandener obligat anaerober Bakterien in der Lunge der Patienten stellte sich heraus, dass durch die Antibiotikagabe diese nicht signifikant gesenkt werden konnte. Die der fakultativ anaeroben Bakterien blieb sogar konstant (Worlitzsch et al., 2009).

Noch immer ist es technisch anspruchsvoll, aus dem nativen Patientensputum bei einer Exazerbation obligate Anaerobier zu kultivieren und auf Antibiotikaresistenzen zu überprüfen. Außerdem gibt es Patienten, bei denen im Rahmen einer Exazerbation keine CF-typischen Bakterien nachweisbar sind. Diese Patienten sind jünger, haben keine chronischen Infektionen mit *P. aeruginosa*, eine bessere Lungenfunktion und einen besseren Ernährungszustand, sowie eine geringere systemische Entzündungsantwort (Zemanick et al., 2010).

Insgesamt variiert die mikrobielle Zusammensetzung der chronischen Lungeninfektion sehr wenig, außer im Rahmen einer Exazerbation verbunden mit einer Antibiotikatherapie. Auch hierbei ist ungefähr einen Monat nach Beendigung der Antibiose die Ausgangszusammensetzung der mikrobiologischen Flora wieder erreicht. Jede bakterielle Infektion der Lunge eines CF-Patienten stellt dabei eine einmalige, stabile, nur für den Patienten spezifische Zusammensetzung dar, welche hohe Anforderungen an die Antibiotikatherapie stellt (Van der Gast et al., 2011; Stressmann et al., 2012).

Im Rahmen der beginnenden Exazerbation zeigte sich, dass im Gegensatz zu hohen Konzentrationen an *P. aeruginosa*, hohe Konzentrationen an obligaten Anaerobiern eine geringere Entzündungsreaktion und eine bessere Lungenfunktion hervorriefen. Die Antibiotikatherapie der Exazerbation verändert die Zusammensetzung der obligaten Anaerobier, was eventuell auch im Zusammenhang mit nicht-typischen CF-Pathogenen gesehen werden kann (Zemanick et al., 2013).

1.4 Antibiotikatherapie bei Patienten mit Cystischer Fibrose

Der wichtigste Fokus in der Antibiotikatherapie bei Patienten mit CF liegt auf der Lungeninfektion, da diese meist lebenslimitierend ist. Die Therapie setzt sich aus einer täglichen Substitutionstherapie mit mindestens einem Antibiotikum sowie der Therapie der Exazerbation ebenfalls mit mindestens einem weiteren Antibiotikum zusammen. Sie ist vor allem gegen fakultative Anaerobier wie *S. aureus* und *P. aeruginosa* als dominierende Pathogene gerichtet. Aufgrund der beschriebenen Biofilmbildung entstehen anaerobe Bedingungen, die das Wachstum obligater Anaerobier fördern und gleichzeitig die Wirksamkeit von Antibiotika reduzieren (Park et al., 1992; Sauer et al., 2002).

In den verschiedenen Ländern sowie in den einzelnen Behandlungszentren wird dabei die Therapie sehr unterschiedlich gestaltet, da die *in vivo*-Interaktionen zwischen Wirt, Bakterium und Antibiotikum noch immer schwer vorhersagbar sind. Des Weiteren ist es nach wie vor unklar, warum es interindividuell in Bezug auf Bakterienflora, Exazerbationen und auch Lebensdauer so große Unterschiede gibt (Stressmann et al.,

2011). Darum gilt es, Kinder frühzeitig zu diagnostizieren und vor allem zu therapieren, denn es ist möglich, *P. aeruginosa* zwölf Wochen nach Erstdiagnose antibiotisch zu eradizieren (Rogers et al., 2011, Taccetti et al., 2012).

Neben der gezielten antibiotischen Therapie von *P. aeruginosa* hat diese ebenfalls einen Effekt auf gleichzeitig mit vorkommende, klinisch relevante Pathogene in Form einer Keimzahlreduktion (Hill et al., 2005; Daniels et al., 2013). Doch es ist nach wie vor unklar, welchen Einfluss alle verwendeten Antibiotika auf die obligaten Anaerobier haben.

Die Standardtherapeutika in der CF-Therapie sind Azithromycin, Tobramycin und Colistin. Aufgrund seiner Nephro- und Neurotoxizität wurde Colistin seit Anfang der 1980er Jahre kaum noch klinisch verwendet (Couet et al., 2012), erlebt aber mittlerweile einen Neueinsatz vor allem bei multiresistenten gram-negativen Bakterien, zu denen unter anderem *P. aeruginosa* und *Ste. maltophilia* zählen. Colistin wird dabei auch als Aerosol zum Inhalieren verwendet. Steigende Resistenzen von *P. aeruginosa* gegenüber Colistin stellen ein zunehmendes Problem dar (Yahav et al., 2012). Das Makrolid-Antibiotikum Azithromycin verbessert klinische Parameter, vor allem die FEV1 bei Patienten mit CF. Des Weiteren beeinflusst es die Aktivität der Makrophagen. Eine ursprünglich pro-inflammatorische Form wird durch Azithromycin in eine pro-fibrotische Form umgewandelt (Cory et al., 2013), sodass sich der subjektive Zustand der Patienten unter dieser Medikation verbessert.

Tobramycin als Aminoglykosid-Antibiotikum wird bei CF-Patienten vor allem inhalativ verabreicht und kann bei frühzeitigem klinischen Einsatz zur Eradikation von *P. aeruginosa* führen (Stanojevic et al., 2013).

Weitere Antibiotika, die Verwendung in der Therapie vor allem von Exazerbationen bei CF finden, sind Meropenem, Ceftazidim und Piperacillin/Tazobactam. Gegenüber diesen Antibiotika zeigten einige obligate Anaerobier bereits Resistenzen (Worlitzsch et al., 2009).

Die steigenden Resistenzen der verschiedenen Bakterienstämme bei CF-Patienten gegenüber den Antibiotika stellen ein wachsendes Problem dar. Mit dem primären Ziel bei Patienten mit CF die chronischen Lungeninfektionen, verbunden mit dem fortschreitendem Lungenfunktionsverlust, einzudämmen, bedarf die sich bereits herausgestellte Antibiotikaresistenz gegenüber obligat anaeroben Bakterien weiterer Untersuchungen.

2 Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit sollten mithilfe der Verwendung sowohl aerober als auch anaerober mikrobiologischer Untersuchungsmethoden folgende verschiedene Aspekte in der Therapie der CF untersucht werden:

- (1) die Identifikation aller vorhandener fakultativer und obligat anaeroben Bakterien im Sputum von Patienten mit CF,
- (2) die Durchführung von Antibiotikaresistenztestungen für die identifizierten obligat anaeroben Bakterienstämme,
- (3) die Untersuchung der Gesamtwirksamkeit der verschiedenen Antibiotika in der CF-Therapie gegenüber obligaten Anaerobiern,
- (4) die Bestimmung der Höhe der Antibiotikaresistenzen einzelner obligat anaerober Bakterien im Verlauf, wobei sowohl Antibiotika aus der klinischen Routinetherapie als auch in der CF-Therapie noch nie eingesetzte Antibiotika betrachtet werden sollten,
- (5) die Untersuchung der Entwicklung der Antibiotikaresistenzen bei obligaten Anaerobiern,
- (6) der Verlauf der Resistenzen von obligaten Anaerobiern gegenüber sieben verschiedenen Antibiotika bei ausgewählten Patienten.

3 Material und Methodik

3.1 Patienten

Von den an dieser Studie teilnehmenden 59 Patienten konnten insgesamt 223 Sputumproben gewonnen werden. Dabei handelt es sich um 52 Erwachsene und sieben Kinder aus den Universitätskliniken der Martin Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Die Einteilung der erwachsenen Patienten erfolgte anhand der Diagnose CF oder COPD (chronic obstructive pulmonary disease). 46 erhielten die der CF, sechs der COPD (Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin I). Bei den Kindern handelt es sich um fünf CF-Patienten, sowie jeweils ein Kind mit Bronchitis und mit Pneumonie. Die eindeutige Diagnose der CF erfolgt bei dem Vorliegen klinischer Symptome initial über einen Schweißtest. Bei diesem wird die Chloridionen-Konzentration auf der Haut gemessen. Wenn diese sich mit über 60 mmol/l auch im Wiederholungstest bestätigt, schließt sich eine Mutationsdiagnostik des CFTR-Gens an (Gibson et al., 2003). COPD als Diagnose wird anhand klinischer Symptome sowie mithilfe einer Lungenfunktionsuntersuchung gestellt, wobei die Einteilung in die Stadien I bis IV nach GOLD vorgenommen wird (Celli et al., 2004).

Zur Gewinnung der Sputumproben lag von jedem Patienten bzw. bei Kindern von jedem Erziehungsberechtigten eine Einverständniserklärung vor, oder wurde vor Abgabe des Sputums eingeholt.

Unter Einhaltung der Bestimmungen der Helsinki-Deklaration wurde die vorliegende Studie durchgeführt. Das Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vom 06.04.2006 lag vor.

3.2 Sputumproben

Es wurden sowohl Patienten, die sich zur stationären Behandlung im Klinikum befanden, als auch Patienten, die einen Kontrolltermin in der CF-Fachambulanz des Universitätsklinikums und der Poliklinik für Innere Medizin I hatten, zur Probenabgabe gebeten. Die Sammlung dieser Sputumproben begann im Jahr 2005 und erfolgte fortlaufend bis zum Jahr 2009. Dabei wurde das Sputum spontan expektoriert und nicht induziert abgegeben. Keiner der Patienten wurde für eine Probengabe einbestellt, sondern dies geschah immer im Zusammenhang mit einer Exazerbation der Krankheit mit folgender stationärer Aufnahme oder im Sinne einer Routinekontrolle in der Ambulanz. Somit besteht auch kein festgelegter Zeitabstand zwischen den einzelnen Probegaben eines Patienten.

Die Abgabe durch den Patienten, sowie die Lagerung aller Sputumproben erfolgte in sterile 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Art.Nr. 572-7001, Dr. Schubert Laborfachhandel, Leipzig, Deutschland) in einer Tiefkühltruhe (Thermo Fischer, Langenselbold, Deutschland) bei -53°C im Labor des Instituts für Hygiene des Universitätsklinikums Halle (Saale).

3.3 *In vitro*-Untersuchungen

3.3.1 Anzuchtmedien

Für die Identifikation und die Untersuchung der fakultativen und obligaten Anaerobier in dieser Studie wurden verschiedene Nährböden als Anzuchtmedium verwendet.

Dabei wurden für die fakultativen Anaerobier sowohl der nicht-selektive Columbia-Agar mit 5% Schafsblut (Art. Nr. PB6008A, Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland), als auch für die gram-negativen Bakterien, wie *P. aeruginosa* und *B. cepacia*-Bakterien, der Cetrimid-Agar (Ps.-Cetrimid-Agar, Art. Nr. PO5076A, Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland; vgl. Abb. 3) ausgewählt.

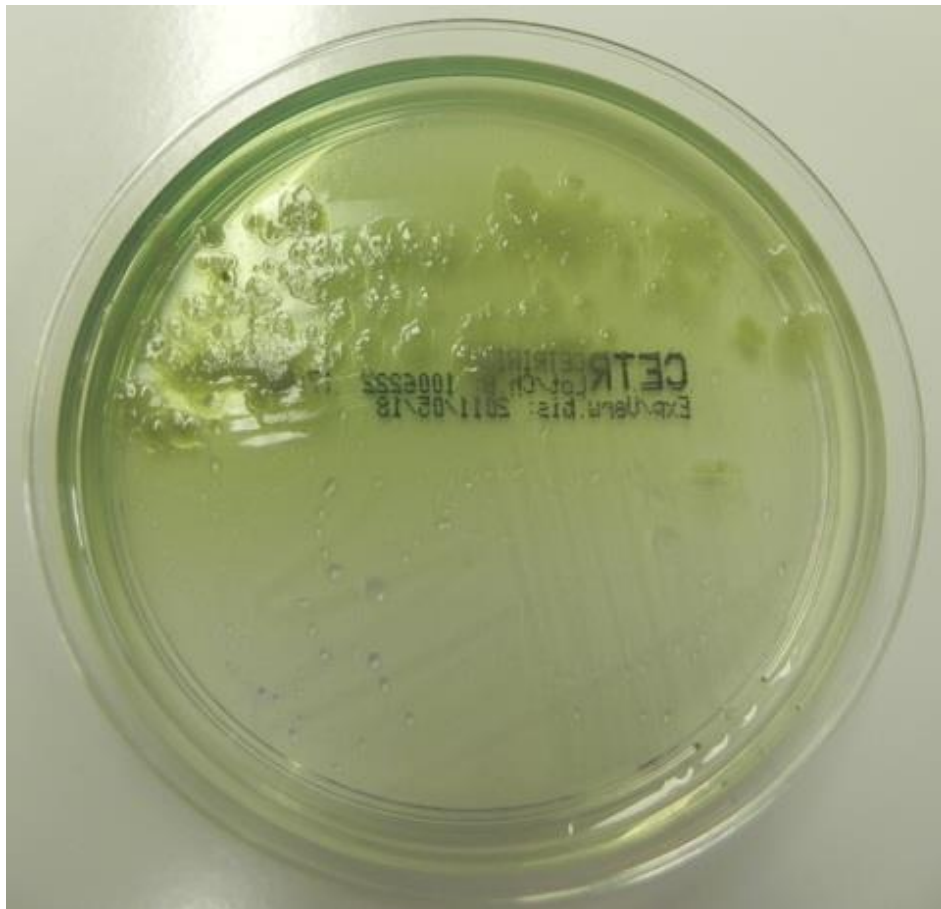


Abb. 3: Cetrimid-Agar mit *P. aeruginosa*-Kolonien

Als nicht-selektive Anzuchtmedien für die obligaten Anaerobier wurden der CDC-Agar mit 5% Schafsblut (Art. Nr. PA256506, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) und der SCS-Agar (Schaedler-Agar) mit 5% Hammelblut (Art. Nr. 43401, bioMérieux@sa, Marcy-l'Etoile, Frankreich) verwendet. Dieser Agar enthält zusätzlich Hämin und Vitamin K1 zur Verbesserung des Wachstums obligat anaerober Bakterienstämme.

Bei der Auswahl dieser Agar-Platten wurden die Herstellerangaben beachtet, da vor allem die obligaten Anaerobier einen hohen Anspruch an ihre Wachstums- und Umgebungsbedingungen haben. Außerdem kommt es bei einigen Bakterien-Spezies aufgrund von Enzymhemmung oder Enzyminduktion durch Agar-Bestandteile zur Beeinflussung des Wachstums.

3.3.2 Identifikation der fakultativen Anaerobier

Das 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit der Sputumprobe wurde aus der Tiefkühltruhe entnommen und im Brutschrank (Typ B6420, Thermo Fischer) auf 37°C erwärmt. Frisch eingeholte Proben von Patienten wurden sofort im Labor weiterverarbeitet. Pro Probe wurden für die Anzucht zwei Columbia-Agarplatten sowie jeweils eine Platte Cetrimid-, SCS- und CDC-Agar verwendet. Diese wurden auf Raumtemperatur erwärmt und beschriftet.

Nach der vollständigen Erwärmung der Probe, erfolgte die Durchmischung mit dem Vortexer (Reax Top, Art.Nr. 110110200, Heidolph Instruments GmbH, Kelheim, Deutschland). Danach folgten Drei-Ösen-Ausstriche der Probe mithilfe steriler Impfschlingen (1 µl und 10 µl, Art. Nr. 731101, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) auf die entsprechenden Agar-Platten. Anschließend wurden die Platten für die fakultativen Anaerobier für mindestens 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank (Thermo Fischer) inkubiert.

Der auf der Platte gewachsenen Bakterienrasen wurde mit Impfschlingen selektiert. Dabei erfolgte die Überimpfung jeder einzelnen unterschiedlichen Kolonie auf eine neue Columbia-Platte. Diese Selektion wurde durchgeführt, bis jede Kolonie makroskopisch in Reinkultur vorlag. Zwischen den einzelnen Selektionsritten erfolgte die Inkubation im Brutschrank für jeweils 24 Stunden.

Anschließend wurde die Differenzierung der verschiedenen Reinkulturen in Gram-positive und Gram-negative Stämme vorgenommen. Spezielle selektive MacConkey-Agarplatten (MacConkey-Nährböden Nr. 3, Art. Nr. 1030183, Oxoid GmbH) fanden dabei ihre Anwendung. Diesem Agar sind Gallesalze sowie Kristallviolett zugesetzt, sodass das Wachstum von Gram-positiven Stämmen inhibiert wird (Oxoid Microbiology Products, 2013) Es erfolgte die Überimpfung einer Einzelkolonie von jeder Reinkultur-

Platte auf eine MacConkey-Platte und die Inkubation dieser bei 37°C für 24 Stunden im Brutschrank. Zeigte sich nach dieser Zeit kein Bakterienwachstum auf dieser Agar-Platte, sprach das laut Herstellerangaben für einen Gram-positiven Keim, wohingegen bei Wachstum von Vorliegen eines Gram-negativen Keims ausgegangen werden konnte.

Des Weiteren wurde der für die endgültige Identifikation notwendige Oxidase-Test (BBL™ DrySlide™ Oxidase, Art. Nr. 231746, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) für alle Gram-negativen Stämme durchgeführt und für alle Gram-positiven Stämme der Katalase-Test (ID Color Katalase (ID-Ase), Art. Nr. 55561, bioMérieux®sa, Marcy-l'Etoile, Frankreich). Dabei handelt es sich um Schnelltest-Kits, die anhand eines Farbumschlages innerhalb von 10 Sekunden nach Aufbringen einer Einzelkolonie mit einer sterilen Impföse auf die Oberfläche nachweisen, dass die Bakterienstämme die Enzyme Cytochrom c-Oxidase und Katalase produzieren.

Anschließend erfolgte die Identifikation der einzelnen fakultativ anaeroben Bakterienstämme mit dem BBL-Crystal™-Identifikations-System (Art Nr. BBL-Crystal GP 245140, BBL-Crystal E/ NF 245000, Becton Dickinson GmbH; vgl. Abb. 4) sowohl für Gram-positive, als auch Gram-negative Bakterien. Dieses standardisierte Testsystem beruht auf unterschiedlichen biochemischen Reaktionen, die von den Bakterien durchgeführt werden können.

Nach einer Inkubationszeit von mindestens 18 Stunden, jedoch nicht mehr als 24 Stunden bei 37°C, werden verschiedene Farbumschlagreaktionen mithilfe einer Auswertungskarte abgelesen. Anhand eines daraus resultierenden Zahlenkodes, der in die BBL-Crystal™-Computer-Software eingegeben wurde, konnten die Bakterienstämme identifiziert werden. Die Wahrscheinlichkeitsgrenze dieses Identifikations-Systems liegt bei 80%. Wurde diese nicht erreicht, erfolgten, wenn diese notwendig waren, zwei Wiederholungen der Identifikation. Alle Bakterienstämme, die nach der dritten Wiederholung nicht eindeutig identifiziert werden konnten, wurden verworfen.



Abb. 4: BBL-Crystal™-Identifikations-System

Es folgte die Vorbereitung der nun eindeutig identifizierten fakultativen Anaerobier für die Archivierung. Dazu wurde für jeden Stamm ein Zentrifugenröhrchen (14 ml, steril, Art. Nr. 91016, Dr. Schubert Laborfachhandel) mit 4 ml Casobouillon (Caseinpepton-Sojamehrpepton-Lösung USP, Art. Nr. 1041122, Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) steril befüllt. Anschließend erfolgte die Aufnahme mehrerer Einzelkolonien mit einer Impfschlinge von der Columbia-Agar-Platte. Diese wurden in die Casobouillon gegeben und die Röhrchen beschriftet. Eine 24-stündige Inkubation bei 37°C auf dem Reagenzglasschüttler (Reax-Top, Heidolph Instruments GmbH, Kelheim, Deutschland) schloss sich an.

100 µl einer Glycerin-Lösung (Glycerin > 98%, wasserfrei, Art. Nr. 7530.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurden pro identifiziertem Bakterienstamm mit einer sterilen Pipettenspitze (1-200 µl, Art. Nr. B007.1, Carl Roth GmbH) in ein steriles 2 ml Röhrchen (Twist Top Vials, Art. Nr. N449.1, BioScience, Inc., Salt Lake City, USA) gegeben. Mit einer weiteren sterilen Pipettenspitze (1000 µl, Art. Nr. B007.2, Carl Roth GmbH) wurden 900 µl der entstandenen Bakteriensuspension entnommen und zu der Glycerin-Lösung gegeben. Nach erfolgter Beschriftung der einzelnen Röhrchen mit

Archiv-Nummer und Datum wurden diese bei -21°C in einem Tiefkühlschrank (BioCompact II, Gram Deutschland GmbH, Sarstedt, Deutschland) eingefroren.

3.3.3 Identifikation der obligaten Anaerobier

Die für die Anzucht obligater Anaerobier verwendeten SCS- und CDC-Agarplatten wurden nach erfolgtem Drei-Ösen-Ausstrich für mindestens 48 Stunden, meist jedoch für bis zu fünf Tage, bei 37°C in der Anaerobierbank (Modular Atmosphere Controlled System, MG500, Meintrup dws, Lähden-Holte, Deutschland; vgl. Abb. 5) inkubiert. In dieser Bank werden anaerobe Bedingungen durch das Vorhandensein von 80% Stickstoff, 10% Wasserstoff und 10% Kohlendioxid erzeugt. Diese ermöglichen aber auch ein Wachstum von fakultativ anaeroben Bakterienstämmen.



Abb. 5: Anaerobierbank

Die Selektion des Bakterienrasens erfolgte bis makroskopisch eine Reinkultur erreicht war. Zwischen den einzelnen Selektionsschritten wurden die beimpften Agarplatten wieder für mindestens 48 Stunden inkubiert. Während der Überimpfung mit Impfösen war darauf zu achten, dass die Bakterienstämme nicht länger als 20 Minuten Kontakt mit Sauerstoff hatten, da ansonsten ein Überleben der Stämme nicht gesichert werden konnte.

Für den nächsten Schritt wurden alle Stämme auf CDC-Nährböden überimpft, um eine Wachstumshemmung durch Enzyminduktion zu verhindern. Es folgte die Anaerobierkontrolle, bei welcher die fakultativen Anaerobier identifiziert wurden. Dazu wurde eine Kolonie eines jeden einzelnen Stammes von der CDC-Agarplatte auf eine Columbia-Platte übertragen und diese bei 37°C für 24 Stunden im Brutschrank aerob inkubiert. Die CDC-Platte wurde wieder in die Anaerobierbank zurückgestellt. Zeigte sich nach einem Tag Bakterienwachstum auf der Columbia-Platte, wurde dieser Stamm als fakultativer Anaerobier gewertet und entsprechend weiterbehandelt. Die dazugehörige CDC-Agarplatte wurde verworfen. Bei nicht eindeutigen Ergebnissen folgte eine zweite Ablesung nach 48 Stunden und in Einzelfällen auch eine Wiederholung des Tests.

Für die obligaten Anaerobier wurde zur weiteren Differenzierung eine Gram-Färbung entsprechend der Herstellerangaben mithilfe eines Standard-Testkits (Färbe-Set, Gram-color modifiziert, phenolfrei, art. Nr. 1.01603-0001, Merck, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt.

Anschließend erfolgte die endgültige Identifikation der obligat anaeroben Bakterien mit dem RapID™ ANA II System (remel, Lenexa, Art. Nr. R 8311002, KS, USA). Dazu wurde eine Kolonie mit einem sterilen Wattestäbchen (Böttger, Art. Nr. 10-00649, Bodenmais, Deutschland) von dem CDC-Nährboden genommen und in RapID™ ANA II Inokulum-Fluid (remel, Art. Nr. R 8325102) überführt, welches wiederum in ein Testkit gefüllt wurde.

Dieses wurde für mindestens vier, aber nicht länger als sechs Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit folgte die Zugabe von RapID™ ANA II-Reagenz sowie RapID™ ANA II-Spot-Indolreagenz (beides remel) in die vorgeschriebenen Testmulden. Der nun erfolgte Farbumschlag (vgl. Abb. 6) wurde mit einer Skala verglichen und abgelesen. Der daraus erstellte Zahlencode wurde in die dazugehörige PC-Software (ERIC® Software, Elektronisches RapID™ Kompendium, Version 1.0, Art. Nr. R 8323600, remel) eingegeben und damit die einzelnen Stämme identifiziert.

War keine eindeutige Identifikation möglich, erfolgte die zweimalige Wiederholung dieses Verfahrens, zusammen mit der Anaerobierkontrolle und der Gram-Färbung, alle übrigen Stämme wurden verworfen.



Abb. 6: Rapid™ ANA II Testkit nach Zugabe von Rapid™ ANA II-Reagenz sowie Rapid™ ANA II-Spot-Indolreagenz und erfolgtem Farbumschlag

Ein Teil aller eindeutig identifizierten Kolonien auf den CDC-Nährböden wurde mit einer Impfschlinge auf eine SCS-Agarplatte übertragen und zum erneuten Wachstum in der Anaerobierbank inkubiert. Diese Stämme wurden zur abschließenden Antibiotikaresistenztestung verwendet.

Die übrigen Kolonien auf den CDC-Platten wurden für die Archivierung der Stämme verwendet. Diese erfolgte analog zu der Archivierung der fakultativ anaeroben Bakterien, außer dass die Inkubation der Casoboullion bei 37°C für 48 Stunden in der Anaerobierbank stattfand.

3.3.4 Antibiotikaresistenzbestimmung bei obligat anaeroben Bakterien

Die Antibiotikaresistenztestung erfolgte nur bei obligaten Anaerobiern. Außerdem wurden nur jene Stämme getestet, welche bei einem Patienten mindestens zweimalig oder öfter im Verlauf nachweisbar waren.

Jeder Stamm wurde auf jedes folgende Antibiotikum getestet:

- Colistin (CS, 0,016-256 µg/ ml, Art. Nr. 921410, Alere GmbH, Köln, Deutschland)
- Azithromycin (AZM, 0,016-256 µg/ ml, Art. Nr. 920300, Alere)
- Piperacillin/ Tazobactam (TZP, 0,016-256 µg/ ml, Art. Nr. 921080, Alere)
- Meropenem (MRP, 0,002-32 µg/ ml, Art. Nr. 920840, Alere)
- Ceftazidim (CAZ, 0,016-256 µg /ml, Art. Nr. 921380, Alere)
- Metronidazol (LZ, 0,016-256 µg/ ml, Art. Nr. 920870, Alere)
- Clindamycin (CD, 0,016-256 µg/ ml, Art. Nr. 920720, Alere)

Von den gewachsenen Reinkulturen auf den SCS-Nährböden wurde jeweils eine Suspension hergestellt. Dazu wurden 3 ml einer NaCl-Lösung mit einer sterilen Pipettenspitze in ein Reagenzröhrchen (PP Tube, 14 ml, steril, art. Nr. 187261, Greiner bio-one) gegeben. Pro Stamm wurden sieben SCS-Platten beschriftet und jeweils mit 100 µl der Suspension versehen. Diese wurde mit einem sterilen Spatel (Drigalski-

Spatel, VWR, Art. Nr. 23162185, Darmstadt, Deutschland) gleichmäßig auf der Agaroberfläche verteilt. Nachdem die Suspension kurz auf der Agarplatte angetrocknet war, wurde der Antibiotikateststreifen (MIC Test Strip, E-Test®) mit einer Pinzette auf die Oberfläche aufgebracht.

Dieser Teststreifen ist ein spezieller Papierstreifen, dessen Oberfläche mit einem definierten Konzentrationsgradienten eines Antibiotikums über 15 Zweifach-Verdünnungsstufen imprägniert ist. Auf der Rückseite ist eine entsprechende Skala zur Ablesung aufgebracht. Es folgte die Inkubation in der Anaerobierbank für 48 Stunden und danach die Ablesung der MHK-Werte (minimale Hemm-Konzentration) an der Stelle auf dem Teststreifen, an der sich die beiden Hemmellipsen schneiden (vgl. Abb 7).

Dieser MHK-Wert ist die minimale Konzentration des Antibiotikums in µg/ml, bei der das Antibiotikum die Bakterien je nach Wirkmechanismus abtötet oder im Wachstum stoppt. Die Unterteilung der erhaltenen Werte erfolgte nach CLSI-Vorgaben (Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth informational supplement, vol. 30, no. 1, Pennsylvania, USA, 2010) in sensibel, intermediär und resistent für die Antibiotika Clindamycin, Metronidazol, Meropenem und Piperacillin/Tazobactam. Für Ceftazidim erfolgte eine Unterteilung in sensibel und resistent. Da es für die Antibiotika Azithromycin und Colistin keine Angaben gibt, erfolgte die Festlegung dieser Werte anhand der anderen Antibiotika



Abb. 7: SCS-Agar mit MIC Test Strip nach 48h Inkubation unter anaeroben Bedingungen. Links resistent für Azithromycin, rechts sensibel für Ceftazidim.

3.4 Auswertung

Alle identifizierten fakultativen und obligat anaeroben Bakterienstämme wurden mit einer fortlaufenden Nummerierung versehen (vgl. Abb. 8) sowie die dazugehörigen MHK-Werte der obligaten Anaerobier in einer Tabelle festgehalten. Hierin wurden neben Name, Vorname und Geburtsdatum des jeweiligen Patienten auch das Expektorationsdatum der entsprechenden Probe, die identifizierten fakultativen Anaerobier und die obligaten Anaerobier mit dazugehörigen MHK-Werten sowie das Datum der Archivierung und die Archivnummer festgehalten. Nach Fertigstellung erfolgte eine Anonymisierung der gesamten Patientendaten.

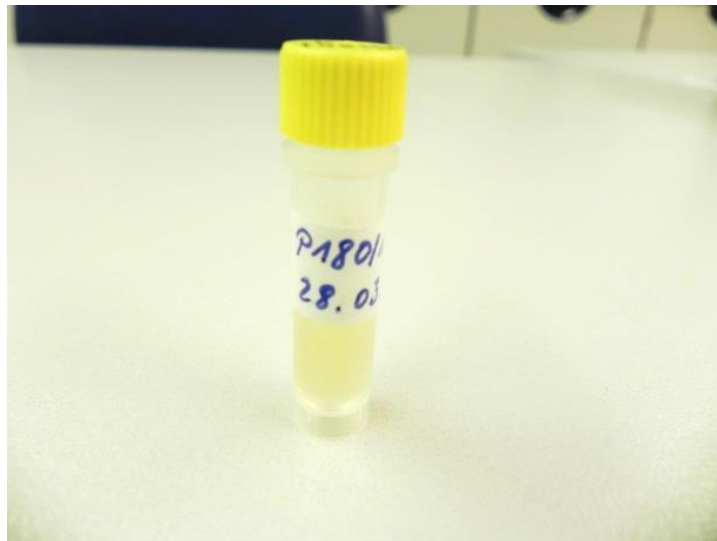


Abb. 8: Glycerinröhrchen zur Archivierung

Da es nicht für alle verwendeten Antibiotika die vollständige Unterteilung der MHK-Werte in sensibel, intermediär und resistent von der CLSI gibt, wurden die intermediären Werte dem sensiblen Bereich zugeordnet.

Die Angabe der Ergebnisse erfolgte als Prozentangabe. Die Differenz der einzelnen Prozentangaben wurde mit Prozentpunkten beschrieben. Die Werte wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben (Microsoft Excel, 2010, Redmond, WA, U. S. A.).

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis fakultativer und obligater Anaerobier

An der vorliegenden retro- und prospektiven Studie nahmen insgesamt 59 Patienten des Universitätsklinikum Halle (Saale) teil. Bei diesen Patienten handelte es sich um 52 Erwachsene aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin I sowie um sieben Kinder aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin. Dabei wurden Sputumproben von 28 Männern (47%) und 24 Frauen (41%) sowie von vier Jungen (7%) und drei Mädchen (5%) analysiert.

Das durchschnittliche Alter der CF-Patienten lag bei 20,0 Jahren, das der Patienten mit COPD bei 66,8 Jahren. Die Altersspanne der untersuchten CF-Patienten betrug 3–66 Jahre, diejenige der COPD-Patienten 57–78 Jahre.

Die maximale Anzahl abgegebener Sputumproben pro Patient lag bei zwölf, die minimale bei einer Probe. Die längste Beobachtungszeit innerhalb der von einem Patienten Proben abgegeben wurden, lag bei drei Jahren und fünf Monaten vom Tag der ersten bis zum Tag der letzten Sputumgabe, die kürzeste bei der Gabe von nur einer Probe bei einem Tag.

Aus allen vorliegenden nativen Sputumproben erfolgte die Identifikation von Aerobiern sowie fakultativen Anaerobiern. Pro Probe konnte mindestens ein fakultativer Anaerobier bis maximal sieben identifiziert werden. In den 223 Proben wurden insgesamt 21 Genera von aeroben und fakultativ anaeroben Bakterien nachgewiesen. Diesen wiederum konnten 53 Spezies zugeordnet werden (siehe Anhang Tabelle 1). Insgesamt erfolgte die Identifikation von 640 aeroben und fakultativ anaeroben Bakterienstämmen aus 223 Proben, was einen Nachweis von durchschnittlich 2,9 Stämmen pro Sputumprobe bedeutet.

Bei sieben Kindern im Alter von drei bis 16 Jahren gelang bei allen die Identifikation fakultativer Anaerobier (1–3 Spezies pro Probe), aber nur bei drei die obligater Anaerobier (2–4 Spezies pro Probe). Alle Kinder bis auf eines gaben nur eine Probe ab, sodass eine Verlaufsbeobachtung ausgeschlossen war.

Die fünf Patienten mit der Diagnose COPD im Alter von 57 bis 78 Jahren gaben alle nur eine Sputumprobe ab, sodass auch hier eine Verlaufsbeobachtung nicht möglich wurde. Bei drei der fünf Patienten gelang der Nachweis obligater Anaerobier (1–2 Spezies pro Probe), bei allen die Identifikation fakultativer Anaerobier (2–4 Spezies pro Probe).

Am häufigsten nachgewiesen werden konnte *S. aureus* (85 Stämme, 13,3%), gefolgt von *Str. pneumoniae* (70 Stämme, 10,9%). Bei den vor allem bei CF auftretenden, typischen aeroben und fakultativ anaeroben Bakterienstämmen, gelang der Nachweis von 35 *B. cepacia*-Stämmen (5,5%), 31 *P. aeruginosa*-Stämmen (4,8%) und von sieben *Ste. maltophilia*-Stämmen (1,1%).

In 168 der 223 Sputumproben (68%) war der Nachweis von obligat anaeroben Bakterienstämmen möglich. Dabei konnte pro Probe mindestens einer bis maximal fünf obligate Anaerobier nachgewiesen werden. 13 Genera denen 19 Spezies zugeordnet werden konnten (siehe Anhang Tabelle 2), wurden identifiziert. Mit durchschnittlich 1,4 Bakterienstämmen pro Probe konnten in den 168 Sputumproben mit Nachweis von obligaten Anaerobiern, insgesamt 233 obligat anaerobe Bakterienstämme identifiziert werden.

Ps. prevotii (73 Stämme, 31,3%) gefolgt von *S. saccharolyticus* (42 Stämme, 18%) traten dabei am häufigsten auf. Des Weiteren war vor allem *Veillonella spp.* (24 Stämme, 10,3%), *Clostridium difficile* (18 Stämme, 7,7%) und *Str. constellatus* (15 Stämme, 6,4%) nachweisbar (siehe Anhang Tabelle 2).

4.2 Antibiotikaresistenztestungen bei obligaten Anaerobiern

Antibiotikaresistenztestungen mit E-Tests[®] wurden bei den obligat anaeroben Bakterienstämmen durchgeführt, um den Verlauf der Entwicklung der Resistenzen darzustellen. Insgesamt wurde bei 170 von den 233 vorliegenden obligaten Anaerobiern (73%) dieser Test angewandt. Dabei wurde nur bei denjenigen Stämmen ein Test durchgeführt, die bei einem Patienten im Verlauf mehrfach auftraten. Sieben verschiedene Antibiotika konnten gegenüber jedem obligat anaeroben Bakterienstamm getestet werden. Dabei handelte es sich um Colistin, Azithromycin, Piperacillin/Tazobactam, Meropenem, Ceftazidim, Metronidazol und Clindamycin.

4.2.1 Gesamtresistenzen der Antibiotika

Die Gesamtresistenzen einzelner Antibiotika in der CF-Therapie zeigten sich sehr unterschiedlich. 72% aller nachgewiesenen obligat anaeroben Bakterienstämme waren gegen Azithromycin resistent, gegenüber Colistin waren es 67%. Gegenüber den Antibiotika zur Therapie der akuten Exazerbation, Piperacillin/ Tazobactam waren 12% der obligaten Anaerobier resistent, gegen Meropenem 3% und gegen Ceftazidim 36%. Die obligat anaeroben Stämme waren zu 32% resistent gegenüber Clindamycin und 57% gegenüber Metronidazol, beides Antibiotika, die in der klinischen CF-Therapie zuvor noch nicht eingesetzt wurden (siehe Anhang Tabelle 3).

Bei Betrachtung des Substitutionstherapeutikums Azithromycin sind mehr als die Hälfte der 19 obligat anaeroben Spezies zu 100% resistent, in jedem Fall sind sie aber zu 50% resistent (vgl. Abb. 9).



Abb. 9: Resistente obligate Anaerobier (in %) gegenüber Azithromycin

Sehr ähnlich verhalten sich die obligaten Anaerobier gegenüber Colistin (vgl. Abb. 10). Lediglich der nur einmalig auftretende *Ps. assacharolyticus* war sensibel für Colistin. Auch *S. saccharolyticus* als häufig auftretender obligater Anaerobier war mit nur 17% resistent. Ganz anders waren die ebenfalls häufig vorkommenden Stämme *Ps. prevotii* zu 81% und *C. difficile* zu 80% resistent.

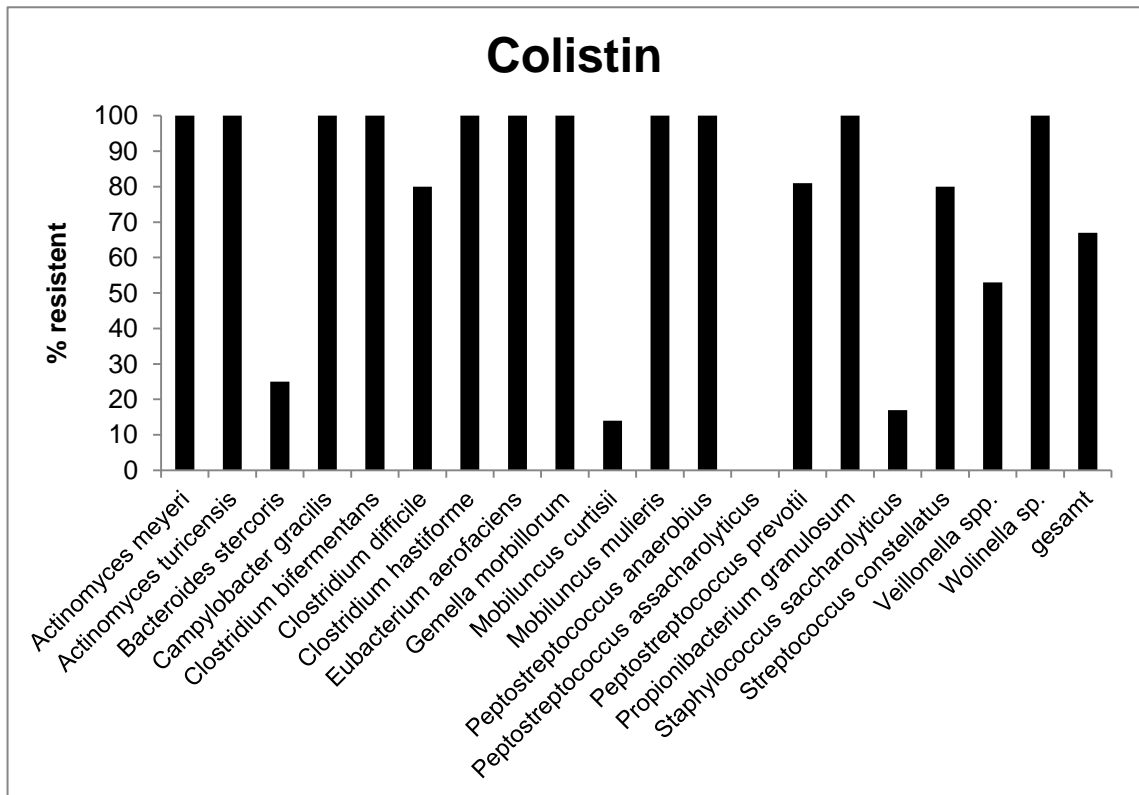


Abb. 10: Resistente obligate Anaerobier (in %) gegenüber Colistin

Die Antibiotika in der Therapie der akuten Exazerbation Piperacillin/ Tazobactam, Meropenem und Ceftazidim zeigen insgesamt deutlich bessere Wirksamkeiten gegenüber den obligaten Anaerobiern. In Bezug auf Piperacillin/Tazobactam sind lediglich *S. saccharolyticus* mit 43% und *Veillonella spp.* mit 13% resistent. Alle anderen 17 obligaten Anaerobier sind sensibel gegenüber diesem Antibiotikum (vgl. Abb 11). Sehr ähnlich stellt sich die Situation bei Meropenem dar. Nur *Campylobacter gracilis* ist zu 100% resistent gegenüber diesem Antibiotikum, doch wurde dieser Bakterienstamm lediglich einmal nachgewiesen. Insgesamt sind 15 der 19 obligat anaeroben Bakterienstämme für Meropenem sensibel (vgl. Abb. 12).

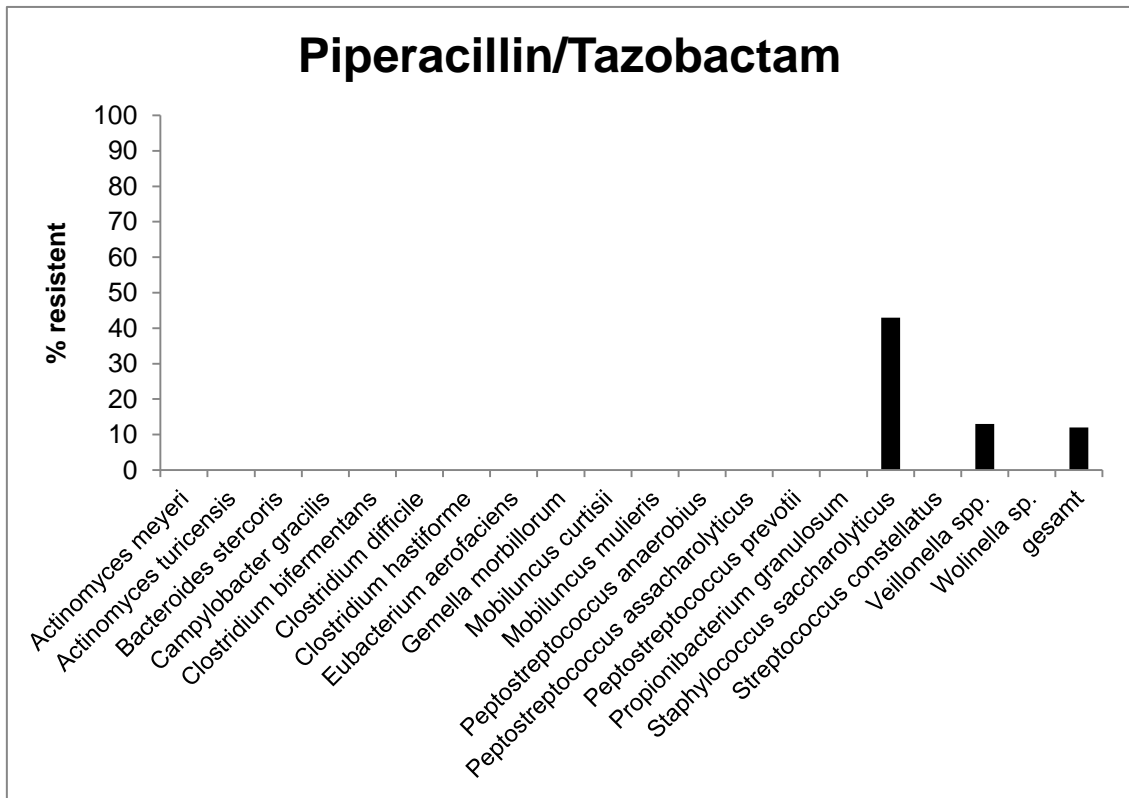


Abb. 11: Resistente obligate Anaerobier (in %) gegenüber Piperacillin/Tazobactam

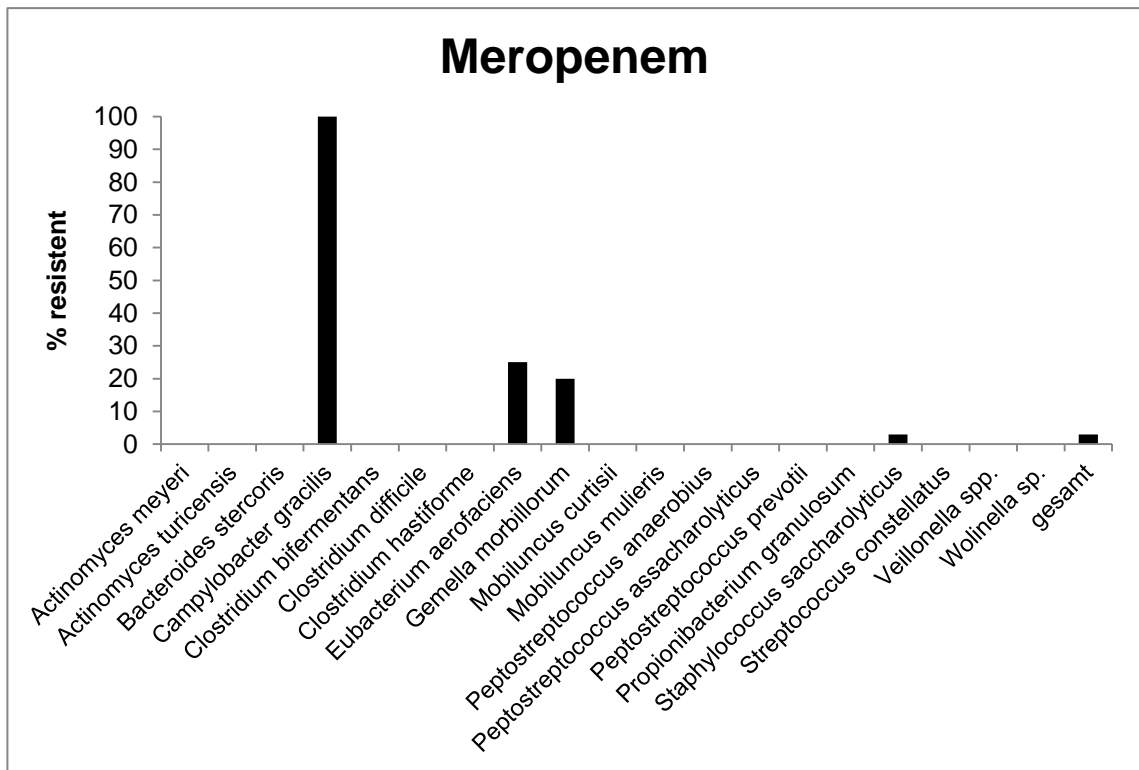


Abb. 12: Resistente obligate Anaerobier (in %) gegenüber Meropenem

Bei Ceftazidim fallen die Resistenzwerte etwas höher aus, da es am Universitätsklinikum Halle (Saale) am häufigsten in der Therapie der Exazerbation eingesetzt wird¹. Vier der 19 obligaten Anaerobier sind noch zu 100% sensibel gegenüber Ceftazidim. (vgl. Abb. 13).

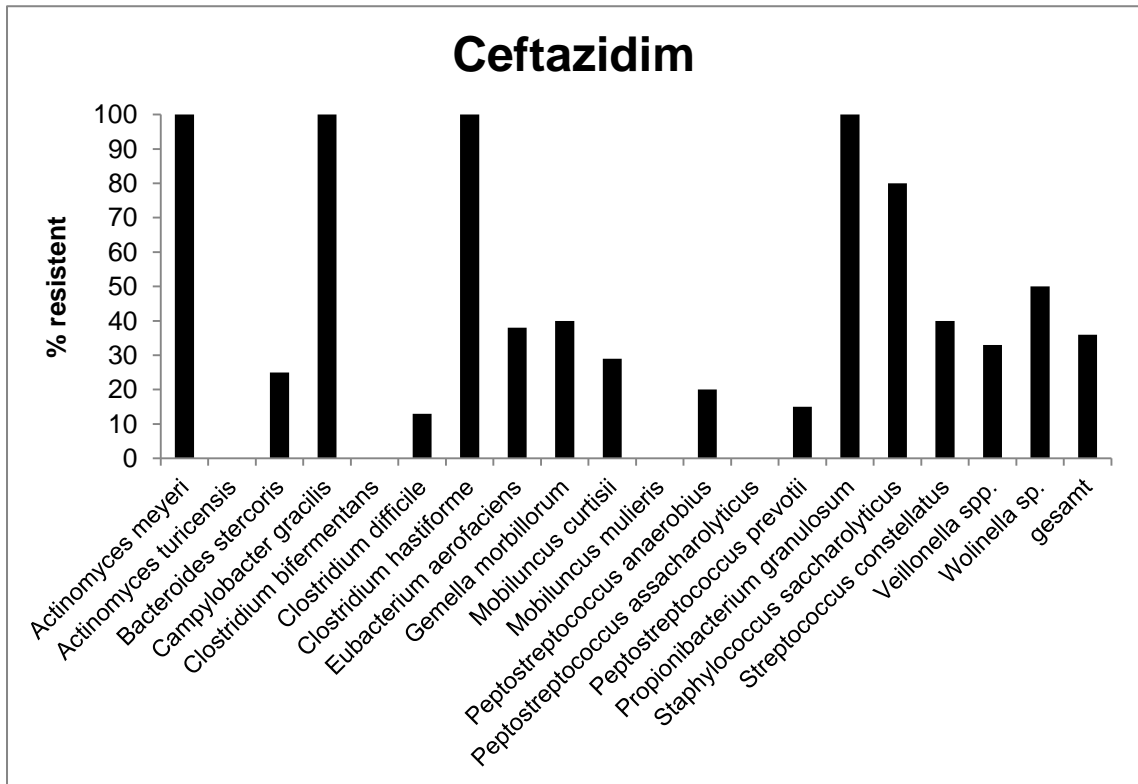


Abb. 13: Resistente obligate Anaerobier (in %) gegenüber Ceftazidim

Metronidazol und Clindamycin als spezifische Therapeutika bei Anaerobier-Infektionen zeigen wiederum höhere Resistenzwerte.

Die obligat anaeroben Stämme sind gegenüber dem Antibiotikum Metronidazol zu insgesamt 57% resistent. *Ps. prevotii* als am häufigsten auftretender obligater Anaerobier ist zu 86% resistent, *S. saccharolyticus* zu 6% und *C. difficile* zu 47%. Fünf der 19 obligat anaeroben Stämme sind sensibel gegenüber Metronidazol (vgl. Abb. 14). Gegenüber Clindamycin weisen insgesamt 32% der obligaten Anaerobier Resistenzen auf, wobei dieses Antibiotikum ebenfalls gegenüber fünf Stämmen sensibel ist, aber gerade bei den in nur geringer Anzahl vorkommenden einzelnen Stämmen treten teilweise 100%-ige Resistenzen auf (vgl. Abb. 15).

¹ Persönliche Mitteilung Frau OÄ Dr. med. B. Wollschläger, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Halle (Saale)

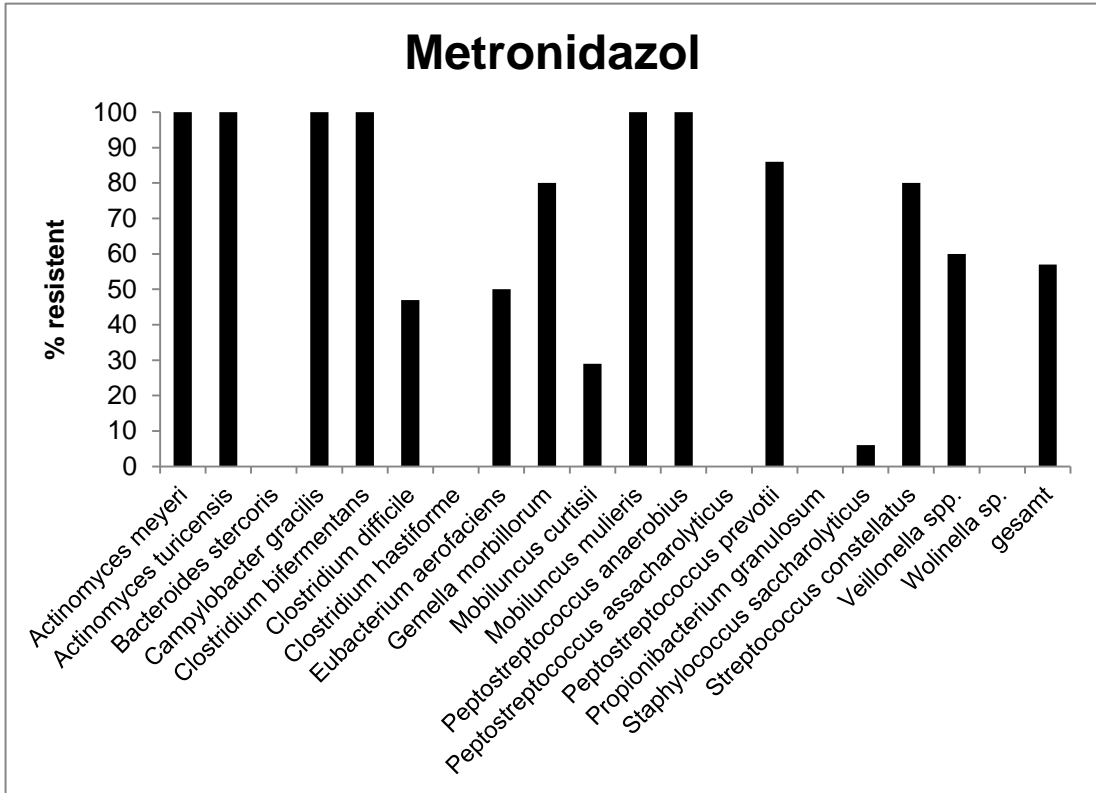


Abb. 14: Resistente obligate Anaerobier (in %) gegenüber Metronidazol

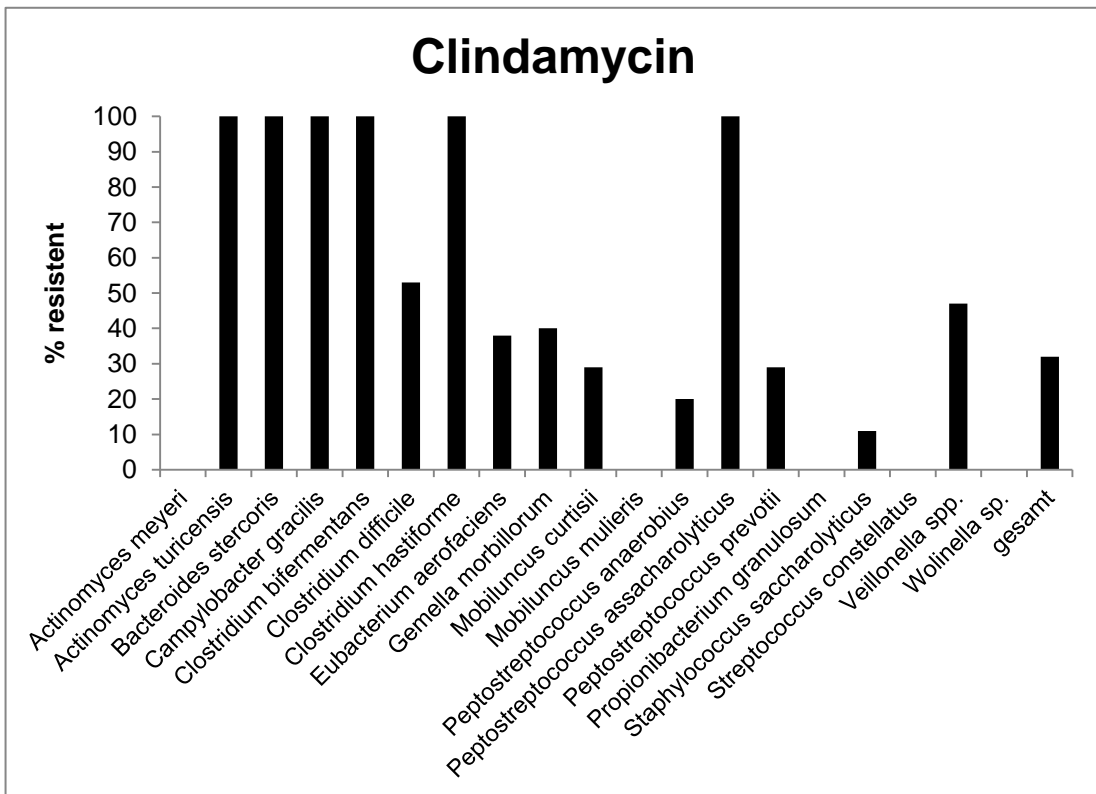


Abb. 15: Resistente obligate Anaerobier (in %) gegenüber Clindamycin

4.2.2 Resistenzentwicklung

Zur Verlaufsbeobachtung der Zunahme der Resistenzen der obligaten Anaerobier wurden alle Patienten herausgesucht, bei denen die einzelnen obligat anaeroben Stämme im Verlauf mehrfach auftraten. Insgesamt war bei 19 der 46 erwachsenen CF-Patienten eine Beobachtung des Verlaufs möglich.

Dabei waren obligate Anaerobier bei elf der 19 Patienten bereits im ersten Sputum des Beobachtungszeitraums nachweisbar. Hingegen waren bei den anderen acht Patienten zu Beginn ausschließlich fakultativ anaerobe Spezies nachweisbar. Der Nachweis obligater Anaerobier gelang erst zu einem späteren Zeitpunkt. War der erstmalige Nachweis obligat anaerober Bakterien bei einem Patienten gelungen, traten bei weiteren Sputumgaben obligate Anaerobier wieder auf (vgl. Abb. 16).

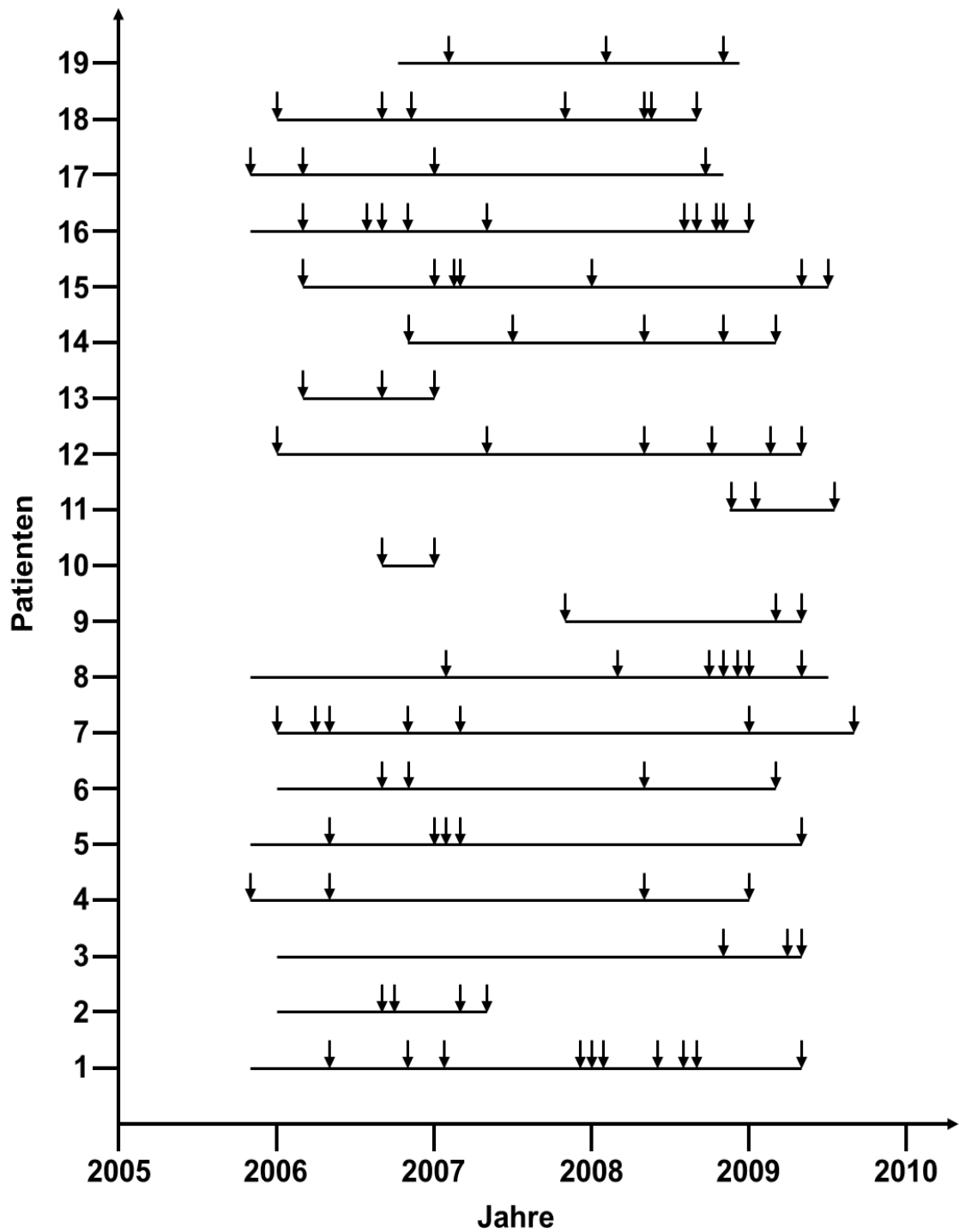


Abb. 16: Zeitraum der Sputumgaben bei 19 verschiedenen Patienten. Der Pfeil markiert dabei den Zeitpunkt der Abgabe eines Sputums mit dem Nachweis obligater Anaerobier.

Bei den einzelnen Patienten trat pro Patient mindestens ein Stamm, maximal jedoch drei verschiedene Stämme im Verlauf mehrfach auf. Zur Verlaufsbeurteilung musste der einzelne obligat anaerobe Bakterienstamm mindestens zweimal auftreten, einige der obligaten Anaerobier waren bis zu sechsmal im Verlauf nachweisbar. Bei 16 von 19 Patienten kam es im Laufe des Beobachtungszeitraumes zu einer Zunahme der Resistenzen aller Spezies von minimal 14% bis maximal 86% (vgl. Abb. 17). Beispielhaft sei hier auf Patient Nummer 16 hingewiesen, bei dem es in 86%, also gegenüber sechs von sieben Antibiotika zu einer Zunahme der Resistenzen der obligaten Anaerobier kam. Hingegen traten bei den Patienten 3, 9 und 14 eine Abnahme der Resistenzen auf. Bei allen 19 Patienten zusammen beträgt die Resistenzzunahme der obligaten Anaerobier in Bezug auf alle sieben Antibiotika 37,4% ($\pm 25,5\%$).

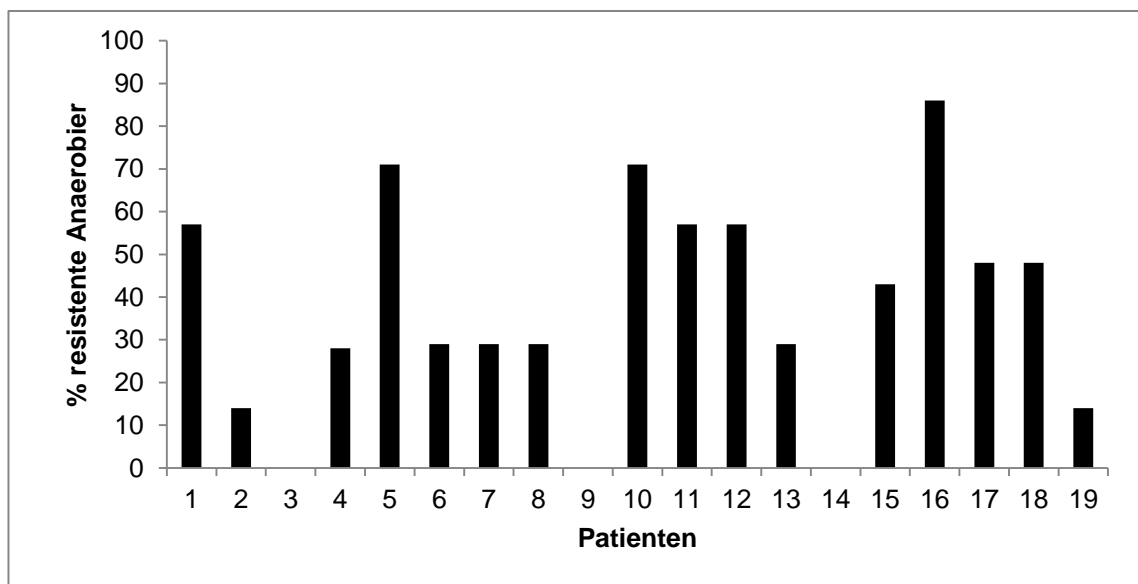


Abb. 17: Zunahme der Resistenzen der obligaten Anaerobiern bei Mehrfachbestimmungen, aufgeschlüsselt nach den untersuchten Patienten

Des Weiteren wurde die Resistenzentwicklung der einzelnen obligaten Anaerobier entsprechend der bereits beschriebenen Kriterien untersucht. Bei den dabei ausgewählten acht obligaten Anaerobiern handelt es sich um alle Spezies, die bei den 19 Patienten jeweils mehrfach auftraten. *P. prevotii*, *S. saccharolyticus* und *C. difficile* als am häufigsten auftretende obligat anaerobe Bakterien, weisen auch die höchsten Zunahmen der Resistenzen gegenüber den Antibiotika auf. So waren zum Beispiel 86% aller *S. saccharolyticus*-Stämme resistent gegenüber allen Antibiotika, wohingegen es bei den *Veilonella spp.*-Stämmen zu keiner Zunahme der Resistenzen kam. Insgesamt kam es bei allen obligat anaeroben Spezies über den

Beobachtungszeitraum zu einer Zunahme der Resistenzen gegenüber den Antibiotika von 44,9% ($\pm 34,5\%$) (vgl. Abb. 18).

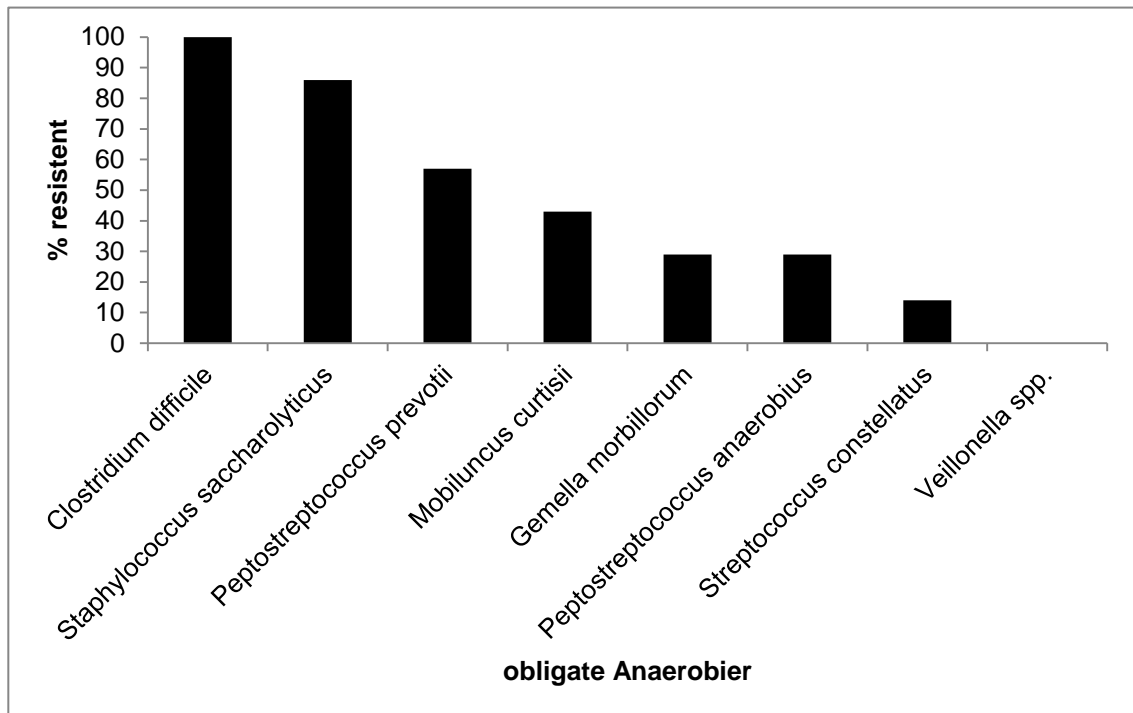


Abb. 18: Zunahme von Resistenzen bei Mehrfachnachweisen von obligaten Anaerobiern gegenüber den untersuchten Antibiotika

Außerdem wurde die Entwicklung der Resistenzen der obligat anaeroben Bakterienstämme in Mehrfachnachweisen in Bezug auf die sieben verwendeten Antibiotika betrachtet. Dabei kommt es bei allen *in vitro* getesteten Antibiotika zu einer Zunahme der Häufigkeit der resistenten obligaten Anaerobier (vgl. Abb. 19). Bei den wieder im Verlauf beobachteten 19 Patienten kam es bei allen gegen Azithromycin getesteten Stämmen in 53% zu einem Anstieg der Resistenzen, gegenüber Clindamycin in 47%, Colistin und Meropenem 37%, Cefotaxim und Piperacillin/Tazobactam in 32% sowie Metronidazol in 26%. Somit ist zu erkennen, dass gegenüber allen Antibiotika ansatzweise eine gleich hohe Zunahme der Resistenzen zu verzeichnen ist. Durchschnittlich beträgt sie 37,7% ($\pm 9,3\%$).

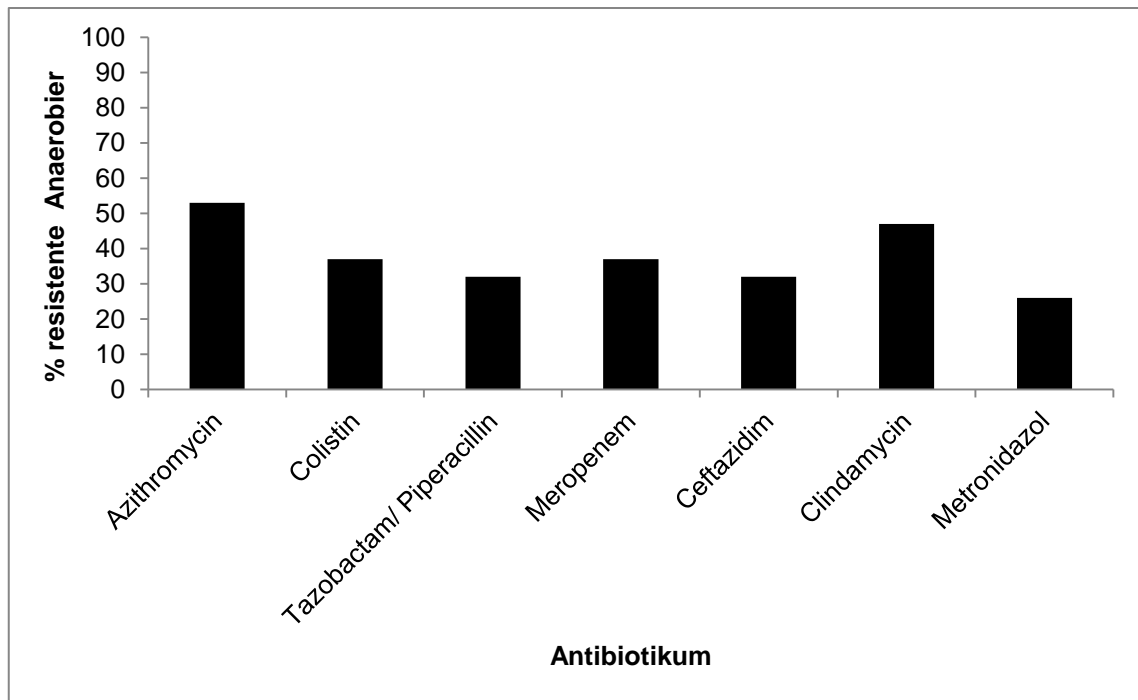


Abb. 19: Zunahme von resistenten obligaten Anaerobiern bei Mehrfachnachweisen, aufgeschlüsselt nach den untersuchten Antibiotika

4.2.3 Antibiotikaresistenzverlauf bei einzelnen Patienten

Um den Verlauf der Entwicklung der Antibiotikaresistenzen noch genauer darzustellen, wird im Folgenden auf zwei Patienten eingegangen.

Das erste Diagramm (vgl. Abb. 20) zeigt exemplarisch für Patient 1 den Verlauf der Resistenzen der obligaten Anaerobier während des Beobachtungszeitraumes. Dabei wurde für diesen Patienten der obligate Anaerobier *Ps. prevotii* ausgewählt. Es sind die MHK-Werte in $\mu\text{g/ml}$ in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die Abszisse ist linear in sechs-Monats Abstände gegliedert, beginnend mit dem 01. April 2006 bis zum 01. April 2009. Die Ordinate ist logarithmisch eingeteilt. Aufgrund der Übersichtlichkeit wurden die beiden Antibiotika Azithromycin und Ceftazidim ausgewählt, jeweils als ein Antibiotikum der Basistherapie und der Therapie der akuten Exazerbation.

Für die MHK-Werte von Azithromycin ist von Beginn an ein Anstieg zu verzeichnen. Nach über der Hälfte der Zeit kommt es aber einmalig am 20.05.2008 zu einer starken Abnahme der Resistenzwerte, welche im Folgenden auf den höchsten MHK-Wert von 256 $\mu\text{g/ml}$ ansteigen und konstant bleiben.

Die Kurve von Ceftazidim zeigt einen annähernd gleichen Verlauf, nur kommt es bei diesem Antibiotikum zweimalig zum Rückgang der Resistenzwerte, am 12.01.2007 und ebenfalls am 20.05.2008. Doch auch bei diesem Antibiotikum ist im Mittel ein Anstieg der Resistenzwerte zu verzeichnen.

Somit nehmen innerhalb von drei Jahren bei diesem einen Patienten die Resistenzen der obligat anaeroben Stämme, gemessen als MHK-Wert in $\mu\text{g/ml}$, bei diesen beiden Antibiotika im Mittel zu, sind aber teilweise dennoch starken Schwankungen von mehreren Zehnerpotenzen unterworfen.

Außerdem ist aus diesem Diagramm zu erkennen, dass ein und derselbe obligate Anaerobier bei diesem Patienten über 36 Monate phänotypisch nachweisbar war.

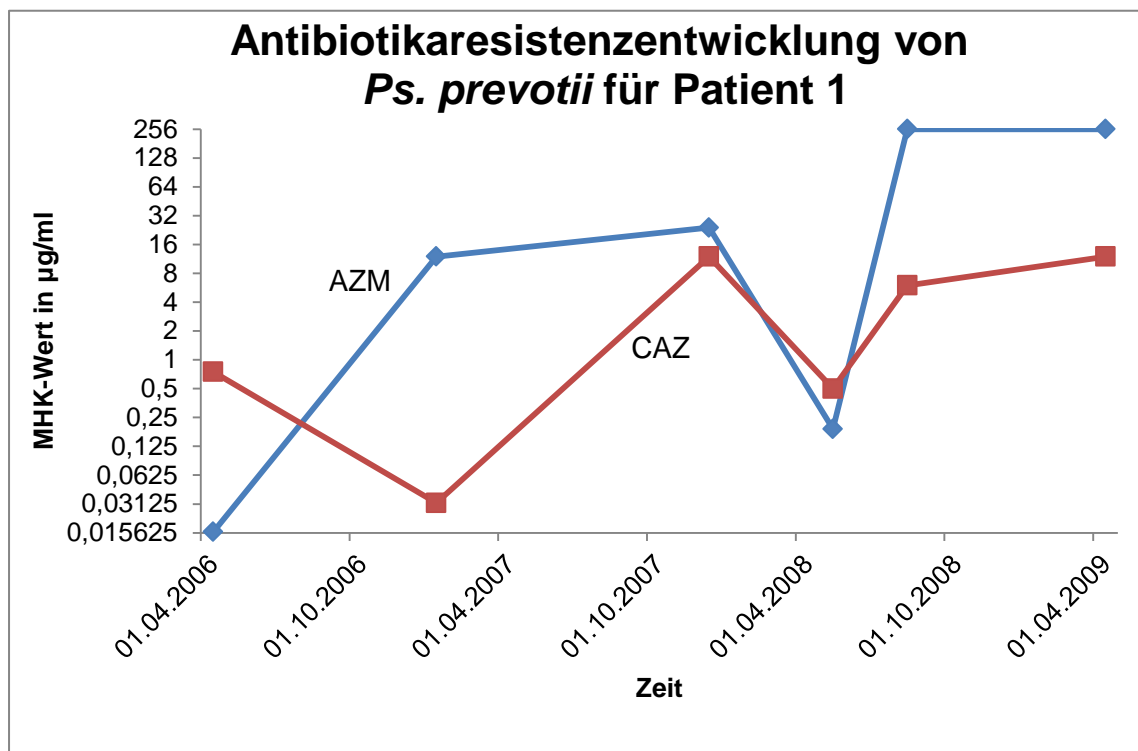


Abb. 20: Resistenzentwicklung des obligaten Anaerobiers *Ps. prevotii* gegenüber den Antibiotika Azithromycin (AZM) und Ceftazidim (CAZ) bei Patient 1

Das zweite Diagramm zeigt entsprechend des bereits beschriebenen Prinzips den Verlauf der Resistenzen des obligaten Anaerobiers *S. saccharolyticus* für den Patienten 16 (vgl. Abb. 21). In diesem Fall wurden die beiden Antibiotika Clindamycin und Ceftazidim ausgewählt, jeweils als ein Therapeutikum bei anderen anaeroben Infektionen sowie in der Therapie der akuten Exazerbation.

Der MHK-Wert von Ceftazidim stellt zu Beginn noch einen sensiblen Wert für *S. saccharolyticus* dar, steigt bei der nächsten Untersuchung an und ist somit resistent. *S. saccharolyticus* wird im Verlauf wieder sensibel und weist aber am Ende des Beobachtungszeitraumes wieder resistente Werte auf. Wodurch diese Schwankungen zustande kommen, ist nach wie vor unklar.

S. saccharolyticus ist bei der ersten Resistenztestung resistent gegenüber Clindamycin als gut wirksames Antibiotikum bei anaeroben Weichteilinfektionen, bei den folgenden vier Testungen jeweils sensibel und bei der letzten Testung innerhalb des 30-monatigen Beobachtungszeitraumes wieder resistent.

Somit schwanken bei diesem Patienten die Antibiotikaresistenzwerte für *S. saccharolyticus* sehr, vor allem Clindamycin weist unerwartet hohe Schwankungen von teilweise bis zu 16 Zehnerpotenzen auf, d.h. von sensibel (21.10.2008) zu einem Bestimmungszeitpunkt hin zu resistent (21.01.2009) zum nächsten Bestimmungszeitpunkt.

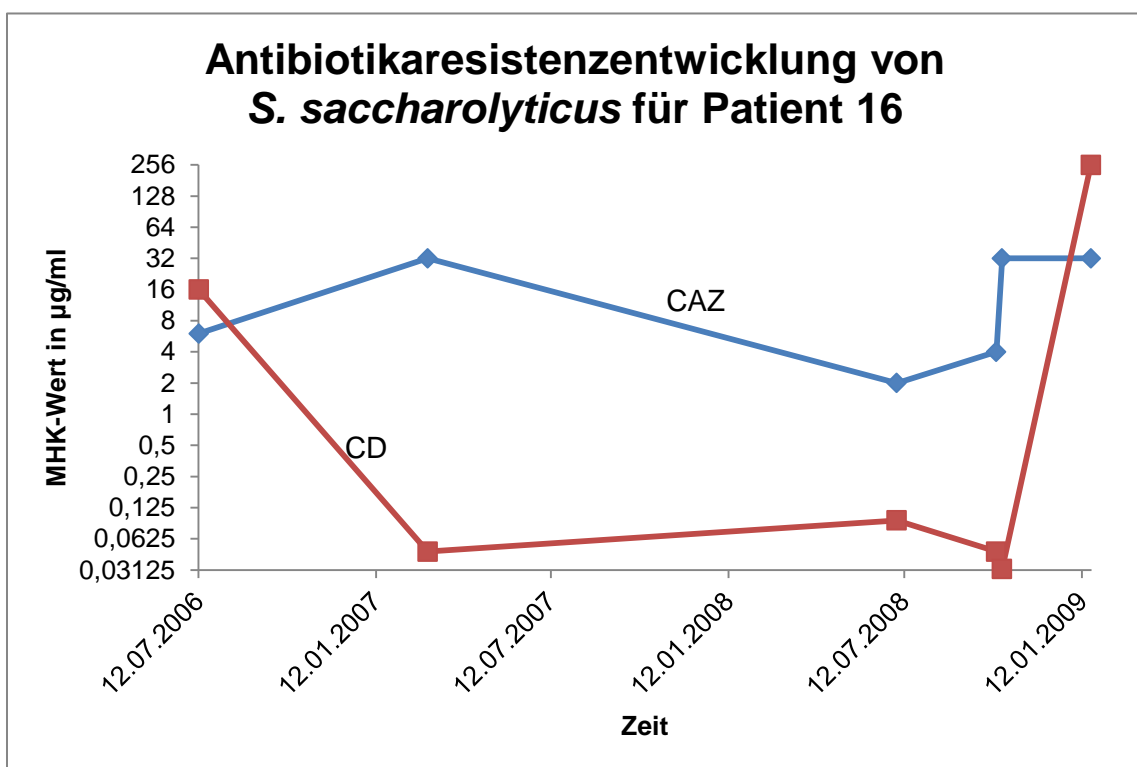


Abb. 21: Resistenzentwicklung des obligaten Anaerobiers *S. saccharolyticus* gegenüber den Antibiotika Ceftazidim (CAZ) und Clindamycin (CD) bei Patient 16

5 Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl fakultative als auch obligate Anaerobier im Sputum von Patienten mit CF zahlreich nachweisbar sind. Fakultative Anaerobier konnten in 100% und obligate Anaerobier in 68% aller Proben nachgewiesen werden. Auch bei Kindern sowie bei Patienten mit COPD gelang die Identifikation obligat anaerober Bakterien. Diese Ergebnisse sind in weitgehender Übereinstimmung mit denen anderer Forschungsgruppen (Tunney et al., 2008; Worlitzsch et al., 2009; Sibley und Surette, 2011; Zemanick et al., 2011).

Dass es sich auch um eine retrospektive Studie handelt und die Sputen teilweise mehrere Jahre als Einfrierkulturen in SkimMilk gelagert wurden, kann einerseits den Nachweis von lediglich 68% obligaten Anaerobiern erklären. Nach wie vor gibt es Empfehlungen in der Literatur, obligat anaerobe Bakterien in SkimMilk einzufrieren, doch neuere Forschungsergebnisse² belegen, dass die Aufbewahrung und Wieder-Anzucht von obligat anaeroben Bakterienstämmen aus 10%-iger Glycerin-Lösung erfolgreicher ist. Diese Lösung wurde auch in dieser Studie verwendet, um alle identifizierten Stämme bei -21°C zu archivieren. Des Weiteren handelt es sich bei den in dieser Studie verwendeten Proben um native Sputumproben von Patienten, welche technisch sehr anspruchsvoll in der Bearbeitung sind, sodass dabei laut Datenlage (Tunney et al., 2008) mit einer Verlustrate von mindestens 10% bis 20% zu rechnen ist. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich native Sputumproben analysiert und nicht mit Bronchiallavagen oder Rachenabstrichen verglichen, sodass es sich bei den nachgewiesenen Bakterienstämmen durchaus auch um orale Kontaminationen handeln könnte (Rogers et al., 2004; Rogers et al., 2005; Worlitzsch et al., 2009; Tunney et al., 2011). Doch ist es im Rahmen einer derart umfangreichen Studie schwer möglich, bei allen Patienten sowohl aus Kosten-, als auch aus Zeitgründen, eine Bronchiallavage durchzuführen und natürlich stellt eine solche Untersuchung für den Patienten selbst eine große Belastung dar.

In die Auswertung der Gesamtresistenzen wurden alle an CF erkrankten Erwachsenen und Kinder mit einbezogen, die COPD-Patienten blieben unberücksichtigt. In die Beurteilung des Resistenzverlaufs wurden ausschließlich erwachsene CF-Patienten eingeschlossen

Bei den CF-Kindern sowie bei den COPD-Patienten gelang zwar ein Nachweis obligater Anaerobier, jedoch war eine Verlaufsbeobachtung nicht möglich, da meist nur eine Sputumprobe abgegeben wurde. Die Identifikation von obligat anaeroben Bakterien in hoher Keimzahl bei an CF erkrankten Kindern gelang bereits 2009

² Persönliche Mitteilung Frau Dr. A. Schmidt, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Tübingen

(Worlitzsch et al., 2009), bei COPD-Patienten bedarf dies weiterer Untersuchungen bezüglich Pathogenese und Auswirkungen.

Bei 19 von 46 Erwachsenen mit der Diagnose CF konnte eine Verlaufsbeobachtung durchgeführt werden. Diese 19 Patienten haben über einen längeren Zeitraum Sputen abgegeben, in denen dieselben obligaten Anaerobier mehrfach nachgewiesen werden konnten. Alle anderen Patienten haben entweder nur eine Probe abgegeben, oder in mehreren Proben konnten nicht dieselben obligat anaeroben Bakterien nachgewiesen werden. Des Weiteren gab es keinen konkreten Abstand zwischen den einzelnen Probengaben, und es war aufgrund der bereits erfolgten Anonymisierung bei einem Großteil der Proben nicht mehr nachweisbar, ob die Patienten ihr Sputum zu einem Kontrolltermin in der CF-Fachambulanz gegeben hatten, oder ob sie sich zur stationären Behandlung im Rahmen einer akuten Exazerbation befanden.

Dadurch konnten einzelne Parameter der Patienten, wie der Allgemeinzustand, die Medikation und auch die Lungenfunktion (FEV1) nicht mit dem Vorkommen einzelner fakultativ und obligat anaerober Stämme verglichen werden. Zwar konnte in bisherigen Studien nachgewiesen werden, dass es unter Antibiotikatherapie zu einer deutlichen Verbesserung des subjektiven Befindens kommt, aber meist nicht zu einer Keimzahlreduktion (Worlitzsch et al., 2009). Somit besteht die Möglichkeit in zukünftigen Untersuchungen diese Parameter mit einzubeziehen.

Für die Resistenztestungen bei 170 obligaten Anaerobiern wurden sieben verschiedene Antibiotika gezielt ausgewählt. An erster Stelle standen dabei die Substitutionstherapeutika Azithromycin und Colistin. Da sie bei nahezu allen CF-Patienten täglich zum Einsatz kommen, weisen sie hohe Resistenzwerte auf. Der exakte Wirkmechanismus von Azithromycin bei CF ist noch nicht abschließend geklärt. Es besteht die Annahme, dass Azithromycin die Bildung von Alginat hemmt (Hassett, 1996) und damit die Ausbildung des Biofilms reduziert (O'May et al., 2006).

Dadurch werden die darin vorkommenden fakultativen und obligat anaeroben Bakterien besser zugänglich für andere Antibiotika und vor allem für den für sie toxischen Sauerstoff. Dennoch führt diese, vor allem gegen *P. aeruginosa* gerichtete Therapie nicht zu einer Eradikation der Bakterien, aber zu einer Steigerung des subjektiven Wohlbefindens der Patienten. Somit ist bei diesen beiden Antibiotika auch weiterhin von einem Einsatz in der klinischen Therapie auszugehen.

Die folgenden drei Antibiotika werden momentan überwiegend zur Therapie der akuten Exazerbation bei CF eingesetzt: Ceftazidim, Piperacillin/ Tazobactam und Meropenem. Da solch eine Exazerbation bei einem CF-Patienten durchschnittlich ein- bis viermal pro Jahr auftritt (Ratjen und Döring, 2003), ist hier die Dauer der Verabreichung

deutlich geringer. Somit sind die Resistenzen gegenüber den obligaten Anaerobiern auch weniger zahlreich, wobei nach wie vor die Rolle der obligat anaeroben Bakterien in der Pathogenese der akuten Exazerbation unklar ist.

Gegenüber Meropenem wurden in der vorliegenden Studie drei Prozent Resistenzen der obligaten Anaerobier bestimmt. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem der Arbeitsgruppe aus Belfast um Michael Tunney und Stuart Elborn, die gegenüber Meropenem 0%, also keine Resistenzen ermitteln konnten (Tunney et al., 2011).

Ceftazidim weist im Vergleich zu den anderen beiden Antibiotika dieser Gruppe höhere Resistenzen auf. Dieses Antibiotikum wird aber am Universitätsklinikum Halle (Saale) als erstes bei einer akuten Exazerbation verabreicht³, sodass auch hier die vergleichsweise höheren Resistenzen erklärbar sind.

Das Nitroimidazol-Antibiotikum Metronidazol und das Lincosamid-Antibiotikum Clindamycin werden normalerweise bei Infektionen mit Anaerobiern erfolgreich eingesetzt (Visceralchirurgie, Weichteil- oder Knocheninfektionen) und spielen als Reserveantibiotika bei Penicillin-Allergie oder als Antibiotika-Prophylaxe vor zahnärztlichen Eingriffen mit vermehrtem Endokarditis-Risiko (Klappenersatz) eine Rolle (Hahn et al., 2004). Da nun auch bei CF Anaerobier auftreten, wurden die Resistenzen gegenüber diesen beiden Antibiotika ebenfalls untersucht, um gegebenenfalls weitere neue Therapiemöglichkeiten zu evaluieren. 32% der obligaten Anaerobier waren in dieser Studie resistent gegenüber Clindamycin und sogar 57% gegenüber Metronidazol.

Diese beiden Antibiotika wurden bisher noch nicht in der klinischen CF-Therapie eingesetzt. Doch weisen sie nun *in vitro* unerwartet hohe Resistenzen auf, deren Ursache bisher unklar ist und weiterer Untersuchungen bedarf. Es gibt Anlass zu der Annahme, dass es sich einerseits um horizontalen Gentransfer handeln könnte, bei dem es durch asexuelle Weitergabe von Resistenzgenen zu erhöhten Resistenzen kommen kann.

Außerdem könnten Kreuzresistenzen zwischen einigen Stämmen bestehen, oder diese Resistenzen entstehen aufgrund des vermehrten Einsatzes von Metronidazol als Reserveantibiotikum in der Zahnmedizin sowie bei der Viehmast und in der Lebensmittelindustrie (Hahn et al., 2004). Somit ist davon auszugehen, dass weder Clindamycin noch Metronidazol in der CF-Therapie zum Einsatz kommen werden, da sie außerdem in der Regel auch unwirksam gegen Aerobier sind.

³ Persönliche Mitteilung Frau OÄ Dr. med. B. Wollschläger, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Halle (Saale)

In der Beurteilung der MHK-Werte wurden die CLSI-Vorgaben berücksichtigt, doch waren für einige Antibiotika keine Werte für den Resistenzbereich intermediär vorgegeben und für Azithromycin und Colistin waren keinerlei Werte vorhanden. Um eine Vereinheitlichung zu erzielen, wurden in der Auswertung alle intermediären den sensiblen Werten zugeordnet und für Azithromycin und Colistin erfolgte die willkürliche Festlegung der MHK-Werte entsprechend derjenigen der anderen Antibiotika. So stimmen die hohen Resistenzwerte für diese beiden Antibiotika mit den Forschungsergebnissen annähernd überein (Worlitzsch et al., 2009), doch kann es aufgrund dieser willkürlichen Zuordnung auch zu fälschlich hohen Werten (72% für Azithromycin und 67% für Colistin) gekommen sein.

Einige der insgesamt 19 obligat anaeroben Spezies, wie *Camp. gracilis*, *Clostridium bifermentans*, *Ps. assacharolyticus* und *Propionibacterium granulosum* wurden nur einmalig in allen Sputumproben nachgewiesen. Sie waren bei diesem einmaligen Nachweis zu 100% resistent gegenüber den meisten Antibiotika, sodass sie in der Gesamtauswertung der Resistenzen verhältnismäßig einen großen Anteil beitragen und damit die Gesamtresistenzen bezüglich des Vorkommens deutlich erhöhen. Doch insgesamt sind, wie bereits beschrieben, die erhaltenen Resistenzangaben sehr ähnlich zu denen anderer Forschungsgruppen (Tunney et al., 2008; Worlitzsch et al., 2009; Sibley und Surette, 2011; Zemanick et al., 2011).

Bei den Verlaufsbeobachtungen der Resistenzen kam es bei einigen obligaten Anaerobiern nach einem hohen Resistenzwert für einen Stamm in einem Sputum, im darauffolgenden Sputum zu einem niedrigeren Resistenzwert für denselben Stamm. Somit lassen einige obligat anaerobe Spezies einen genotypischen Stammwechsel vermuten, da die Identifikation der Stämme in dieser Studie mit biochemischen Testkits durchgeführt wurde.

Diese Testkits erlauben lediglich eine phänotypische Identifikation, sodass in späteren Untersuchungen der Einsatz genotypischer Identifikationsmethoden, zum Beispiel durch PCR zur exakteren Analyse und damit Beurteilung des Resistenzverlaufs möglich wäre (Tunney et al., 2008). Doch gerade in der klinischen Routine ist der Einsatz solcher Methoden mit enormen Kosten verbunden, wohingegen die Schnelligkeit des Nachweises mit einer PCR unübertroffen ist und damit für den Patienten vor allem in der initialen Therapie bessere Möglichkeiten bieten würde (Tunney et al., 2008).

Die Entwicklung der Antibiotikaresistenzen im Verlauf wurde betrachtet in Bezug auf die einzelnen 19 Patienten, die sieben Antibiotika und die acht verschiedenen obligat anaeroben Stämme, die bei denselben Patienten mehrfach auftraten.

Bei 16 der 19 Patienten kam es über den Beobachtungszeitraum zu einer Zunahme der Resistenzen, bei drei hingegen kam es zu einer Abnahme. Diese könnte durch den bereits erwähnten genotypischen Stammwechsel erklärt werden, denn es ist unwahrscheinlich, dass ein Bakterium *in vivo* von einer bestehenden Resistenz wieder sensibel gegenüber einem Antibiotikum wird. Doch stellen diese drei Patienten auch die Ausnahme dar. Die Spanne der Resistenzzunahmen beträgt zwischen den einzelnen Patienten 72 Prozentpunkte, sodass es im Krankheitsverlauf bei CF interindividuell doch zu erheblichen Unterschieden kommt. Dies könnte eventuell auch auf die unterschiedlichen bei CF vorkommenden Genmutationen zurückgeführt werden.

Des Weiteren wurden die Resistenzverläufe der acht obligaten Anaerobier gegenüber allen sieben Antibiotika betrachtet. Dabei weisen die am häufigsten vorkommenden Stämme *Ps. prevotii*, *S. saccharolyticus* und *C. difficile* auch die höchsten Resistenzzunahmen auf. Bei *Veillonella spp.* hingegen kam es zu einer Abnahme der Resistenzen, was wiederum auf den genotypischen Stammwechsel zurückgeführt werden könnte und außerdem wurde *Veillonella spp.* entsprechend der aktuellen Taxonomie nicht subtypisiert.

Als dritter Punkt der Resistenzentwicklung wurden die einzelnen Antibiotika in Bezug auf alle obligat anaeroben Stämme betrachtet. Dabei kam es bei allen *in vitro* getesteten Antibiotika zu einer Zunahme der Häufigkeit der Resistenzen. Die Spanne der Zunahme der Resistenzen lag zwischen 26% und 53%, betrug also 27 Prozentpunkte. Somit ist diese Spanne zwischen den einzelnen Antibiotika deutlich geringer, als zwischen den einzelnen Patienten, sodass anzunehmen ist, dass die Zunahme der Resistenzentwicklung unabhängig von den einzelnen Antibiotika stattfindet.

Somit konnten mit der vorliegenden Arbeit die bereits in früheren Studien erhobenen Ergebnisse bestätigt werden (Worlitzsch et al., 2002; Rintelen et al., 2008; Tunney et al., 2008; Worlitzsch et al., 2009; Sibley und Surette, 2011; Zemanick et al., 2011). Bisher erfolgte die Antibiotikatherapie bei CF hauptsächlich gegen *P. aeruginosa* und es wurde keine gezielte Therapie der ebenfalls vorkommenden obligaten Anaerobier durchgeführt. Ein großer Anteil der obligaten Anaerobier ist gegen die Antibiotika zur Substitutionstherapie, Azithromycin und Colistin zu einem hohen Prozentsatz resistent, sodass davon ausgegangen werden kann, dass diese Therapie nicht zu einer Eradikation der Bakterien führt.

Hingegen ist ein hoher Prozentsatz der obligaten Anaerobier sensibel gegenüber den Antibiotika zur Therapie der akuten Exazerbation, Ceftazidim, Piperacillin/ Tazobactam und Meropenem, sodass diese Therapeutika möglicherweise den Erfolg der Therapien bei den akuten Exazerbationen bedingen.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die obligat anaeroben Stämme gegenüber denjenigen Antibiotika, die zur Therapie sonstiger Anaerobier-Infektionen eingesetzt werden (Clindamycin und Metronidazol), bei CF ohne bisherigen klinischen Einsatz bereits unerwartet hohe Resistenzen aufweisen.

Allerdings werden diese aktuell bestehenden Therapieoptionen vor allem in der Exazerbationstherapie durch die ebenfalls in dieser Studie nachgewiesenen, über den Untersuchungszeitraum zunehmenden Resistenzen der obligaten Anaerobier eingeschränkt. Dennoch ist die antibiogrammgerechte Therapie der obligaten Anaerobier eine zusätzliche Option, wenn eine Wirkung der antibiotischen Behandlung gegen fakultative Anaerobier nicht eintritt. Daher sollte aufgrund dieser stetig zunehmenden Resistenzen weiterhin nach Optionen in der CF-Antibiotikatherapie geforscht werden, um eine adäquate Behandlung und damit Lebensqualität der Patienten auch in Zukunft zu gewährleisten.

6 Zusammenfassung

Bei der chronisch bakteriellen Lungeninfektion bei Patienten mit CF treten in den hoch viskösen Mukusplaques anaerobe Verhältnisse auf, die sowohl ein Wachstum fakultativer als auch obligat anaerober Bakterien fördern. Darum ist ein Einsatz von Antibiotika vor allem zur Prävention einer Exazerbation und aller, mit dieser verbundener Folgen bei den CF-Patienten in den meisten Fällen lebensnotwendig. Doch aufgrund der nahezu immer vorliegenden anaeroben Verhältnisse und der zunehmenden Resistenzen sind die Antibiotika in der Therapie der CF immer weniger wirksam.

Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Aspekte vor allem in der Antibiotikatherapie der CF untersucht. Dabei sollten sowohl Antibiotika aus der klinischen Routinetherapie als auch in der CF-Therapie noch nie eingesetzte Antibiotika betrachtet werden. Zunächst erfolgte die vollständige Identifikation aller vorhandenen Bakterien im Sputum von CF-Patienten. Für die identifizierten obligat anaeroben Bakterienstämme sollte eine Antibiotikaresistenztestung durchgeführt werden, um gegenüber diesen die Wirksamkeit beurteilen zu können.

Die Bestimmung des Verlaufs der Antibiotikaresistenzen einzelner obligat anaerober Bakterien bildete einen weiteren Untersuchungspunkt. Der Hauptfokus lag auf der Untersuchung der Entwicklung von Antibiotikaresistenzen bei obligaten Anaerobiern. Dabei sollte in Mehrfachuntersuchungen von den gleichen Patienten beschrieben werden, wie sich die Antibiotikaresistenzen im Verlauf entwickeln.

Es nahmen insgesamt 59 Patienten des Universitätsklinikums Halle (Saale) teil. Bei diesen Patienten handelte es sich um 52 Erwachsene, darunter sechs mit der Diagnose COPD sowie um sieben Kinder. Zunächst erfolgte die Anzucht und biochemische Identifikation von allen fakultativen und obligaten Anaerobiern aus den Sputumproben. Im Anschluss wurde für alle bei einem Patienten im Verlauf mehrfach auftretende obligate Anaerobier die Resistenztestung gegenüber Azithromycin, Colistin, Meropenem, Ceftazidim, Piperacillin/ Tazobactam, Clindamycin und Metronidazol mithilfe von E-Tests[®] durchgeführt.

Es wurden insgesamt 223 Sputumproben von den 59 Patienten untersucht. Bei 168 der 223 Sputumproben (68%) war der Nachweis von obligat anaeroben Bakterienstämmen möglich. Dabei gelang die Identifikation von 640 fakultativen Bakterienstämmen, die 21 Genera und 53 Spezies zugeordnet werden können sowie die Identifikation von 233 obligat anaeroben Bakterienstämmen, die 13 Genera und 19

Spezies zugeordnet werden können. *Ps. prevotii* und *S. saccharolyticus* traten bei den obligaten Anaerobiern am häufigsten auf.

Gegenüber dem Substitutionstherapeutikum Azithromycin waren 72% aller nachgewiesenen obligat anaeroben Stämme resistent, gegen Colistin 67%. Des Weiteren waren die obligaten Anaerobier gegenüber den Exazerbationstherapeutika Piperacillin/ Tazobactam zu 12% resistent, gegenüber Meropenem zu 3% und gegenüber Ceftazidim zu 36%. Gegen die sonst bei CF nicht eingesetzten Antibiotika Clindamycin und Metronidazol waren die obligat anaeroben Bakterienstämme zu 32% sowie zu 57% resistent.

Zur Beurteilung der Entwicklung der Antibiotikaresistenzen wurden alle Patienten betrachtet, bei denen die einzelnen obligat anaeroben Stämme im Verlauf mehrfach auftraten, was bei 19 der 46 erwachsenen CF-Patienten möglich war. An CF erkrankte Kinder sowie Erwachsene mit COPD konnten in die Auswertung nicht mit eingeschlossen werden. Der maximale Beobachtungszeitraum betrug dabei drei Jahre und fünf Monate. Bei allen 19 Patienten zusammen beträgt die Resistenzzunahme in Bezug auf alle sieben Antibiotika 37,4% ($\pm 25,5\%$). Bei allen obligat anaeroben Spezies kam es zu einer Zunahme der Antibiotikaresistenzen von 44,9% ($\pm 34,5\%$). In Bezug auf alle sieben Antibiotika beträgt die Zunahme der Resistenzen 37,7% ($\pm 9,3\%$).

Die Ergebnisse bezüglich des Auftretens und der Häufigkeit fakultativer und obligater Anaerobier sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern ist ähnlich zu den Studien aus der Literatur, sodass von einer gesicherten Tatsache ausgegangen werden kann. Ebenfalls gelang ein Nachweis obligater Anaerobier bei Patienten mit COPD. Diese Tatsache bedarf bezüglich der Pathogenese und der Auswirkungen weiterer Untersuchungen, da dies bisher ungeklärt ist.

Als Konsequenz dieser Ergebnisse ergibt sich für den klinischen Alltag in der CF-Therapie, dass Azithromycin und Colistin als Substitutionstherapeutika *in vitro* hohe Resistenzen aufweisen, bei den Patienten aber dennoch zur subjektiven Besserung des Allgemeinzustandes führen und eine Verbesserung der Lungenfunktion, in Form einer Erhöhung der FEV1 bewirken.

Es wird angenommen, dass Azithromycin die Alginatebildung reduziert und damit die Ausbildung des Biofilms vermindert. Dadurch werden die darin vorkommenden fakultativen und obligat anaeroben Bakterien besser zugänglich für andere Antibiotika

und vor allem für den für sie toxischen Sauerstoff. Dennoch führt diese, vor allem gegen *P. aeruginosa* gerichtete Therapie nicht zu einer Eradikation der Bakterien, aber zu einer Steigerung des subjektiven Wohlbefindens der Patienten, sodass davon auszugehen ist, dass beide Antibiotika weiterhin in der CF-Therapie eingesetzt werden.

Die obligaten Anaerobier zeigen gegenüber Ceftazidim, Meropenem und Piperacillin/Tazobactam als Antibiotika zur Therapie der akuten Exazerbation deutlich niedrigere Resistenzen, die wahrscheinlich vor allem auf den geringen Gebrauch zurückgeführt werden können. Ceftazidim weist in dieser Studie im Vergleich zu den anderen beiden Therapeutika höhere Resistenzen auf, da es am Universitätsklinikum Halle (Saale) primär zur Therapie der akuten Exazerbation eingesetzt wird. Meropenem mit lediglich drei Prozent Resistenzen zeigte von allen verwendeten Antibiotika die geringsten Resistenzen, was auch mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen übereinstimmt.

Ganz anders bei Clindamycin und Metronidazol: beide Antibiotika wurden bisher klinisch noch nicht in der CF-Therapie verwendet. Sie weisen aber unerwartet hohe Resistenzen auf, deren Ursache in dieser Studie nicht geklärt werden konnte. Normalerweise finden sie hauptsächlich ihren Einsatz bei Infektionen mit Anaerobiern und zeigen dabei auch gute Wirksamkeit. Deshalb werden diese beiden Antibiotika, zumal auch ihre Wirkung gegen Aerobier nicht sehr gut ist, in der CF-Therapie wahrscheinlich nicht zum Einsatz kommen.

Die über den gesamten Untersuchungszeitraum von drei Jahren und fünf Monaten nachgewiesenen ansteigenden Resistenzen bei den obligaten Anaerobiern schränken jedoch insgesamt die Therapiemöglichkeiten ein. Die gezielte Therapie der obligat anaeroben Bakterienstämme stellt im Fall einer ausbleibenden Wirkung einer antibiotischen Behandlung der fakultativen Anaerobier trotzdem eine mögliche Therapieoption dar.

Ungeklärt blieb in der vorliegenden Arbeit, welchen Einfluss die obligaten Anaerobier auf die Exazerbationen bei CF haben und weshalb die obligaten Anaerobier sowohl gegenüber Clindamycin, als auch Metronidazol bereits so hohe Resistenzen aufweisen, ohne dass sie bisher klinisch eingesetzt wurden.

7 Literaturverzeichnis

Celli BR, MacNee W and committee members (2004) Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. Eur Respir J 23:932-946.

Cory TJ, Birket SE, Murphy BS, Hayes D Jr, Anstead MI, Kanga JF, Kuhn RJ, Bush HM, Feola DJ (2013) Impact of azithromycin treatment on macrophage gene expression in subjects with cystic fibrosis. J Cyst Fibros 13:140-149.

Couet W, Grégoire N, Marchand S, Mimoz O (2012) Colistin pharmacokinetics: the fog is lifting. Clin Microbiol Infect 18:30-39.

Cramton SE, Ulrich M, Götz F, Döring G (2001) Anaerobic conditions induce expression of intercellular Adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun 69:4079-4085.

Cystic Fibrosis Foundation (20.11.2013) What is the life expectancy for people who have CF (in the United States)? <http://www.cff.org/AboutCF/Faqs>.

Cystic fibrosis mutation data base (20.11.2013) <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>.

Daniels TW, Rogers GB, Stressmann FA, van der Gast CJ, Bruce KD, Jones JR, Connett GJ, Legg JP, Carroll MP (2013) Impact of antibiotic treatment for pulmonary exacerbations on bacterial diversity in cystic fibrosis. J Cyst Fibros 12:22-28.

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

Grinwis ME, Sibley CD, Parkins MD, Eshaghurshan CS, Rabin HR, Surette MG (2010) Characterization of *Streptococcus milleri* group isolates from expectorated sputum of adult patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 48:395-401.

Hahn H, Falke D, Kaufmann S, Ullmann U: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 5. Aufl. Springer, Berlin, 2004, S. 807, 839 und 850.

Hasset JD 8 (1996) Anaerobic production of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*: Alginate restricts diffusion of oxygen. J Bacteriol 178:7322-7325.

Hill D, Rose B, Pajkos A, Robinson M, Bye P, Bell S, Elkins M, Thompson B, MacLeod C, Aaron SD, Harbour C (2005) Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic and biofilm conditions. J Clin Microbiol 43:5085-5090.

Hoffman LR, Ramsey BW (2013) Cystic Fibrosis therapeutics: the road ahead. Chest. 143:207-213.

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

McKenney D, Pouliot KL, Wang Y, Murthy V, Ulrich M, Döring G, Lee JC, Goldmann DA, Pier GB (1999) Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. Science 284:1523-1527.

O'May CY, Reid DW, Kirov SM. Anaerobic culture conditions favor biofilm-like phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis (2006) FEMS Immunol Med Microbiol 48:373-380.

Olson AB, Sibley CD, Schmidt L, Wilcox MA, Surette MG, Corbett CR (2010) Development of real-time PCR assays for detection of the *Streptococcus milleri* group from cystic fibrosis clinical specimens by targeting the *cnp60* and 16S rRNA genes. J Clin Microbiol 48:1150-1160.

Oxoid Microbiology Products (10.12.2013) MacConkey Agar No. 3, http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail

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

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

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

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

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

Rogers GB, Carroll MP, Serisier DJ, Hockey PM, Kehagia V, Jones GR, Bruce KD (2005) Bacterial activity in cystic fibrosis lung infections. Respir Res 6:49.

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

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

Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies D (2002) Anaerobic biofilm infections in cystic fibrosis. J Bacteriol 184:1140-1154.

Schobert M, Jahn D (2010) Anaerobic physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. Int J Med Microbiol 300:549-556.

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

Sibley CD, Surette MG (2011) The polymicrobial nature of airway infections in cystic fibrosis: Cangene Gold Medal Lecture. Can J Microbiol 57:69-77.

Stanojevic S, Waters V, Mathew JL, Taylor L, Ratjen F (2013) Effectiveness of inhaled tobramycin in eradicating *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 13:152-155.

Stressmann FA, Rogers GB, Marsh P, Lilley AK, Daniels TWV, Carroll MP, Hoffmann LR, Jones G, Allen CE, Patel N, Forbes B, Tuck A, Bruce KD (2011) Does bacterial density in cystic fibrosis sputum increase prior to pulmonary exacerbation? *J Cyst Fibros* 10:357-365.

Stressmann FA, Rogers GB, van der Gast CJ, Marsh P, Vermeer LS, Carroll MP, Hoffman L, Daniels TW, Patel N, Forbes B, Bruce KD (2012) Long-term cultivation-independent microbial diversity analysis demonstrates that bacterial communities infecting the adult cystic fibrosis lung show stability and resilience, *Thorax* 67:867-873.

Taccetti G, Bianchini E, Cariani L, Buzzetti R, Constantini D, Trevisan F, Zavataro L, Campana S (2012) Early antibiotic treatment for *Pseudomonas aeruginosa* eradication in patients with cystic fibrosis: a randomized multicentre study comparing two different protocols. *Thorax* 67:853-859.

Tunney MM, Field TR, Moriarty TF, Patrick S, Doering G, Muhlebach MS, Wolfgang MC, Boucher R, Gilpin DF, McDowell E, Elborn JS (2008) Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 177:995-1001.

Tunney MM, Klem ER, Fodor AA, Gilpin DF, Moriarty TF, McGrath SJ, Muhlebach MS, Boucher RC, Cardwell C, Doering G, Elborn JS, Wolfgang MC (2011) Use of culture and molecular analysis to determine the effect of antibiotic treatment on microbial community diversity and abundance during exacerbation in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 66:579-584.

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

Van der Gast CJ, Walker AW, Stressmann FA, Rogers GB, Daniels TW, Carroll MP, Parkhill J, Bruce KD (2011) Partitioning core and satellite taxa from within cystic fibrosis lung bacterial communities. *The ISME Journal* 5:780-791.

Vander Wauwen C, Piérard A, Kley-Raymann M, Haas D (1984) *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence of a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *J Bacteriol* 160:928-934.

Worlitzsch D, Rintelen C, Böhm K, Wollschläger B, Merkel N, Borneff-Lipp M, Döring G (2009) Antibiotic-resistant obligate anaerobes during exacerbation of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect* 15:454-460.

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

Yahav D, Farbman L, Leibovici L, Paul M (2012) Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clin Microbiol Infect* 18:18-29.

Zemanick E, Harris J, Wagner BD, Robertson CE, Sagel SD, Stevens MJ, Accurso FJ, Laguna TA (2013) Inflammation and airway microbiota during cystic fibrosis pulmonary exacerbations, *PLoS One* 8:e62917.

Zemanick ET, Sagel SD, Harris JK (2011) The airway microbiome in cystic fibrosis and implications for treatment. *Current Opinion in Pediatrics* 23:319-324.

Zemanick ET, Wagner BD, Harris JK, Wagener JS, Accurso FJ, Sagel SD (2010) Pulmonary exacerbations in cystic fibrosis with negative bacterial cultures. *Pediatr Pulmonol* 45:569-577.

8 Anhang

Tabelle 1: Aerobe und fakultativ anaerobe Spezies

Genus	Anzahl	Spezies	Anzahl
<i>Acinetobacter spp.</i>	2	<i>baumanii</i>	2
<i>Aerococcus spp.</i>	1	<i>urinae</i>	1
<i>Burkholderia spp.</i>	35	<i>cepacia</i>	35
<i>Chryseobacterium spp.</i>	1	<i>meningosepticum</i>	1
<i>Corynebacterium spp.</i>	7	<i>diphtheriae</i>	7
<i>Enterococcus spp.</i>	20	<i>avium</i>	2
		<i>faecalis</i>	11
		<i>faecium</i>	2
		<i>raffinosis</i>	5
<i>Escherichia spp.</i>	2	<i>coli</i>	2
<i>Flavimonas spp.</i>	2	<i>oryzihabitans</i>	2
<i>Gemella spp.</i>	2	<i>haemolysans</i>	2
<i>Klebsiella spp.</i>	2	<i>pneumoniae</i>	1
		<i>pneumoniae ssp rhinoscleromatis</i>	1
<i>Lactococcus spp.</i>	9	<i>lactis ssp cremoris</i>	8
		<i>lactis ssp lactis</i>	1
<i>Leuconostoc spp.</i>	2	<i>citreum</i>	2
<i>Micrococcus spp.</i>	11	<i>kristinae</i>	2
		<i>luteus</i>	2
		<i>lylae</i>	5
		<i>sedentarius</i>	2
<i>Pediococcus spp.</i>	10	<i>pentosaceus</i>	10
<i>Providencia spp.</i>	1	<i>rettgeri</i>	1
<i>Pseudomonas spp.</i>	39	<i>aeruginosa</i>	31
		<i>fluorescens</i>	8
<i>Rhodococcus spp.</i>	4	<i>equi</i>	4
<i>Serratia spp.</i>	1	<i>fonticola</i>	1
<i>Staphylococcus spp.</i>	115	<i>aureus</i>	85
		<i>capitis</i>	2
		<i>cohnii ssp cohnii</i>	1
		<i>epidermidis</i>	9
		<i>haemolyticus</i>	1
		<i>intermedius</i>	15
		<i>vitulus</i>	1
		<i>xylosus</i>	1
<i>Stenotrophomonas spp.</i>	7	<i>maltophilia</i>	7
<i>Streptococcus spp.</i>	367	<i>agalactiae</i>	4
		<i>anginosus</i>	9
		<i>bovis</i>	13

Genus	Anzahl	Spezies	Anzahl
		<i>constellatus</i>	11
		<i>cricetus</i>	7
		<i>crista</i>	10
		<i>equinus</i>	1
		<i>gordonii</i>	5
		<i>intermedius</i>	42
		<i>mutans</i>	5
		<i>parasanguis</i>	63
		<i>pneumoniae</i>	70
		<i>porcinus</i>	3
		<i>salivarius</i>	56
		<i>sanguis</i>	61
		<i>sobriunus</i>	1
		<i>uberis</i>	6
Summe	640		640

spp.: species pluralis

Tabelle 2: Obligat anaerobe Spezies

Genus	Anzahl	Spezies	Anzahl
<i>Actinomyces spp.</i>	4	<i>meyeri</i>	2
		<i>turicensis</i>	2
<i>Bacteroides spp.</i>	7	<i>stercoris</i>	7
<i>Campylobacter spp.</i>	1	<i>gracilis</i>	1
<i>Clostridium spp.</i>	20	<i>bifermentans</i>	1
		<i>difficile</i>	18
		<i>hastiforme</i>	1
<i>Eubacterium spp.</i>	10	<i>aerofaciens</i>	10
<i>Gemella spp.</i>	11	<i>morbillosum</i>	11
<i>Mobiluncus spp.</i>	9	<i>curtisii</i>	7
		<i>mulieris</i>	2
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	86	<i>anaerobius</i>	12
		<i>assacharolyticus</i>	1
		<i>prevotii</i>	73
<i>Propionibacterium spp.</i>	1	<i>granulosum</i>	1
<i>Staphylococcus spp.</i>	42	<i>saccharolyticus</i>	42
<i>Streptococcus spp.</i>	15	<i>constellatus</i>	15
<i>Veillonella spp.</i>	24		24
<i>Wolinella sp.</i>	3		3
Summe	233		233

sp.: Spezies, spp.: species pluralis

Tabelle 3: Antibiotikaresistenzen obligater Anaerobier

Stamm	n	% resistent						
		AZM	CS	TZP	MRP	CAZ	CD	LZ
<i>A. meyeri</i>	1	100	100	0	0	100	0	100
<i>A. turicensis</i>	1	100	100	0	0	0	100	100
<i>B. stercoris</i>	4	100	25	0	0	25	100	0
<i>Camp. gracilis</i>	1	100	100	0	100	100	100	100
<i>C. bifementans</i>	1	100	100	0	0	0	100	100
<i>C. difficile</i>	15	80	80	0	0	13	53	47
<i>C. hastiforme</i>	1	100	100	0	0	100	100	0
<i>E. aerofaciens</i>	8	63	100	0	25	38	38	50
<i>G. morbillorum</i>	5	80	100	0	20	40	40	80
<i>Mob. curtisii</i>	7	71	14	0	0	29	29	29
<i>Mob. mulieris</i>	1	100	100	0	0	0	0	100
<i>Ps. anaerobius</i>	5	100	100	0	0	20	20	100
<i>Ps. assacharolyticus</i>	1	100	0	0	0	0	100	0
<i>Ps. prevotii</i>	59	80	81	0	0	15	29	86
<i>Prop. granulosum</i>	1	100	100	0	0	100	0	0
<i>S. saccharolyticus</i>	35	49	17	43	3	80	11	6
<i>Str. constellatus</i>	5	60	80	0	0	40	0	80
<i>Veillonella spp.</i>	15	67	53	13	0	33	47	60
<i>Wolinella sp.</i>	2	50	100	0	0	50	0	0
gesamt	168	72	67	12	3	36	32	57

A.: Actinomyces, B.: Bacteroides, Camp.: Campylobacter, C.: Clostridium, E.: Eubacterium, G.: Gemella, Mob.: Mobiluncus, Ps.: Peptostreptococcus, Prop.: Propionibacterium, S.: Staphylococcus, Str.: Streptococcus, spp.: species pluralis, sp.: Spezies

9 Thesen

1. Die Cystische Fibrose ist die am häufigsten auftretende, schwerwiegende, autosomal rezessive Erbkrankheit in der kaukasischen Bevölkerung (1:2.500). Nahezu alle Patienten erkranken an einer chronisch bakteriellen Lungeninfektion, welche meist lebenslimitierend wirkt.
2. Vor allem in der Lunge der CF-Patienten wird ein hochvisköser Mukus gebildet. Aufgrund verschiedener Stoffwechselprozesse liegen in diesem anaerobe Verhältnisse vor.
3. Die bakterielle Lungenbesiedlung erfolgt vor allem durch fakultativ anaerobe Bakterien wie *P. aeruginosa* und *S. aureus*. Aber auch obligate Anaerobier wie *S. saccharolyticus* und *Veillonella spp.* kommen häufig vor.
4. In der vorliegenden Arbeit wurden fakultative und obligate Anaerobier identifiziert. Für die im Verlauf bei einem Patienten auftretenden identischen obligaten Anaerobier wurden Antibiotikaresistenztestungen durchgeführt.
5. In 68% der Sputumproben der untersuchten Stichprobe wurden obligat anaerobe Bakterien gefunden. Diese verteilten sich auf 13 Genera, denen 19 Spezies zugeordnet werden konnten.
6. Auch bei Kindern mit CF und bei Patienten mit COPD waren obligate Anaerobier nachweisbar. Bei diesen Patienten traten bis zu vier verschiedene Spezies im Sputum gleichzeitig auf.
7. Die obligaten Anaerobier waren gegenüber den Antibiotika Colistin und Azithromycin als Substitutionstherapeutika zu 67% und 72% resistent. Dennoch führt eine Therapie mit diesen Substanzen meist zu einer deutlichen Verbesserung des Allgemeinzustandes der Patienten.
8. In Bezug auf die zur Therapie der akuten Exazerbation verwendeten Antibiotika Ceftazidim, Piperacillin/Tazobactam und Meropenem wiesen die obligaten Anaerobier deutlich geringere Resistenzen auf. Allerdings erfolgt bislang eine antibiotische Therapie überwiegend gegen die fakultativ anaeroben Bakterien.

9. Clindamycin und Metronidazol werden nicht in der klinischen CF-Therapie eingesetzt. Dennoch wiesen die obligaten Anaerobier gegenüber diesen Antibiotika aus ungeklärter Ursache hohe Resistenzen von 32% und 57% auf, und kommen somit weiterhin für eine CF-Therapie nicht in Frage.

10. Die deutliche Zunahme von resistenten obligaten Anaerobiern im Krankheitsverlauf, schränkt die Therapieoptionen ein. Trotzdem stellt die gezielte Behandlung der obligaten Anaerobier im Falle einer ausbleibenden Wirkung einer Therapie gegen fakultative Anaerobier eine zusätzliche Therapieoption dar.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Lehmann
Vorname: Ariane
Geburtsdatum: 06.08.1989 in Grimma
Anschrift: Schmorditz 3
04668 Grimma
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Telefon/ Mobil: 0163/4451495
E-Mail: arianelehmann@yahoo.de

Schulbildung

08/1995 – 07/1999 Grundschule Nerchau
08/1999 – 07/2007 Gymnasium St. Augustin Grimma, Abschluss: Abitur

Hochschulstudium

10/2007 bis 10/2013 Studium der Humanmedizin
an der Martin-Luther-Universität Halle/ Wittenberg
Abschluss: Approbation als Ärztin
seit 01/2010 Promotion am Institut für Hygiene der MLU Halle/ Wittenberg
„Die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen bei obligat
anaeroben Bakterien im Sputum von Patienten mit Cystischer
Fibrose“

Praktische Tätigkeiten

04-07/2013 PJ-Tertial Innere Medizin am Spital Zweisimmen/ Schweiz
12/2012-03/2013 PJ-Tertial Chirurgie am RSE Burgdorf/ Schweiz

08-11/2012	PJ-Tertial Wahlfach Orthopädie an der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie der MLU Halle/ Wittenberg
09/2011	Famulatur in der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie der MLU Halle/ Wittenberg
08/2011	Famulatur in den Muldentalkliniken GmbH, Kreiskrankenhaus Grimma, Chirurgie
02/2011	Famulatur in der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie der MLU Halle/ Wittenberg
2009/2010	Studentische Hilfskraft am Julius-Bernstein-Institut für Physiologie der MLU Halle/ Wittenberg
09/2010	Famulatur in der Arztpraxis für Allgemeinmedizin Dr. Steffi Lehmann, Nerchau
07/2010	Famulatur in der Klinik für Innere Medizin/ Rheumatologie der MLU Halle/ Wittenberg
03/2010	Famulatur in der Arztpraxis für Allgemeinmedizin Dr. Steffi Lehmann, Nerchau

Besondere Kenntnisse

Sprachen	Englisch (8 Jahre)
	Französisch (4 Jahre)
	Latein (Latinum)
PC	Grundkenntnisse, 10-Finger-Maschinenschreiben
Führerschein	Klasse B

Schmorditz, den 11.12.2013

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Ariane Lehmann, geb. 06.08.1989, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe mich dabei keiner anderen, als der von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel bedient.

Schmorditz, den 11.12.2013

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, Ariane Lehmann, geb. 06.08.1989, 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.

Schmorditz, den 11.12.2013

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die mich in der Phase der Themenfindung bis hin zur Fertigstellung meiner Dissertation begleitet haben. Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn PD Dr. med. habil. Dieter Worlitzsch für die Überlassung des Themas. Er gab mir neben spannenden Ideen neue Diskussionspunkte und Denkanstöße.

Des Weiteren meinen herzlichen Dank an Frau Prof. Dr. med. habil. Marianne Borneff-Lipp und allen Mitarbeiter des Instituts für Hygiene des Universitätsklinikums Halle (Saale), die jederzeit ein offenes Ohr hatten und mich vor allem während meiner Tätigkeiten im Labor sehr unterstützt haben.

Herrn PD Dr. med. habil. Bernd Schmidt als kommissarischer Direktor der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Halle (Saale), Frau OÄ Dr. med. Wollschläger als Leiterin der CF-Fachambulanz des Universitätsklinikums Halle (Saale) und Herrn OA Dr. med. Nick Merkel als Leiter der CF-Fachambulanz für Kinder des Universitätsklinikums Halle (Saale) gilt für die Unterstützung mein Dank.

Ebenso möchte ich mich für die Beratung in statistischen Fragen bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Andreas Wienke aus dem Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik bedanken.

Nicht minder aufreibend waren die vergangenen Jahre für meine Familie, die dieses Werk in allen Phasen mit jeder möglichen Unterstützung bedacht haben. Ihnen gilt mein außerordentlicher Dank.