

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

***Streptococcus constellatus* bei der polymikrobiellen Lungeninfektion 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 Anne Luise Stotz (geb. Jaschinski)  
geboren am 14.11.1984 in Leisnig

Betreuer: PD Dr. med. habil. Dieter Worlitzsch

Gutachter: 1. Frau Prof. Dr. M. Borneff-Lipp  
2. Herr PD Dr. B. Schmidt  
3. Frau Prof. Dr. B. Kahl (Westfälische Wilhelms-Universität, Münster)

Verfahrenseröffnung: 14.01.2014

Verteidigung: 15.10.2014

## REFERAT

Seit kurzem ist bekannt, dass in der Lunge von Patienten mit Cystischer Fibrose (CF) anaerobe Verhältnisse herrschen und anaerobe Bakterien dort in hohen Keimzahlen vorkommen. Es konnte bisher keine Aussage dazu getroffen werden, inwiefern die Anaerobier das pathogenetische Geschehen in der CF-Lunge beeinflussen. In dieser Arbeit wurde *Streptococcus constellatus* als Bestandteil der polymikrobiellen Lungeninfektion genauer betrachtet.

Dazu wurden *in vitro* die Wechselwirkungen zwischen *Pseudomonas aeruginosa* und *S. constellatus* untersucht. Des Weiteren wurde die Laktat-Produktion dieses mikroaerophilen Erregers gemessen. Der Einfluss von Laktat auf das Wachstum von *P. aeruginosa* wurde untersucht. Zum Vergleich erfolgten die Untersuchungen auch für weitere aus der CF-Lunge isolierte Anaerobier.

*S. constellatus* ist in der Lage, die Keimzahl von *P. aeruginosa* um eine Zehnerpotenz von  $2,9 \pm 1,5 \times 10^9$  KBE/ml auf  $3,0 \pm 5,3 \times 10^8$  KBE/ml zu reduzieren ( $p < 0,05$ ). Der mikroaerophile Anaerobier profitiert von der Anwesenheit von *P. aeruginosa* und wächst selbst in höheren Keimzahlen. Für *Staphylococcus saccharolyticus* und *Veillonella spp.* waren keine vergleichbaren signifikanten Effekte nachweisbar. Für alle 3 untersuchten Erreger konnte gezeigt werden, dass kleinste Mengen ( $< 5 \times 10^0$  KBE/ml) der Anaerobier in einer hoch konzentrierten *P. aeruginosa*-Suspension proliferieren können. *S. constellatus* wächst nach zehnmillionenfacher Verdünnung innerhalb von 72 Stunden auf vergleichbar hohe Keimzahlen wie *P. aeruginosa* an. *S. constellatus* produziert mit  $22,0 \pm 0,3$  mmol/l große Mengen Laktat im Vergleich zu den anderen Anaerobiern.

Die Ergebnisse bestätigen die in der Literatur bekannte Sonderrolle von *S. constellatus* im CF-Krankheitsgeschehen. Sie unterstützen die Hypothese, dass die Anaerobier in der CF-Lunge aus der Mundhöhle stammen. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass *S. constellatus in vitro* in der Lage ist, das Wachstum des CF-Haupterregers *P. aeruginosa* zu hemmen. Das Ausmaß der Keimzahlverringeringung ist insofern beachtlich, als dass eine suffiziente Antibiotikatherapie die Keimzahl von *P. aeruginosa* um etwa zwei Zehnerpotenzen senkt. Es ist also durchaus berechtigt, *S. constellatus* in Diagnostik und Therapie der CF stärker zu berücksichtigen.

Stotz, Anne Luise: *Streptococcus constellatus* bei der polymikrobiellen Lungeninfektion von Patienten mit Cystischer Fibrose. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 70 Seiten, 2013.

# INHALTSVERZEICHNIS

Verzeichnis der Abkürzungen & Symbole .....	III
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG..... 1</b>
1.1	Cystische Fibrose ..... 1
1.2	Chronische Lungeninfektion ..... 2
1.3	Haupterreger <i>P. aeruginosa</i> ..... 4
1.4	Anaerobe Verhältnisse in der CF-Lunge ..... 5
1.5	Anaerobe Bakterien in der CF-Lunge ..... 6
1.6	Pathogenität anaerober Bakterien ..... 7
1.7	Spezielle Bedeutung von <i>S. constellatus</i> ..... 9
1.8	Bakterielle Interaktionen ..... 11
1.9	Laktat in der Lunge von CF-Patienten..... 11
1.10	Elastinabbau in der Lunge von CF-Patienten..... 12
<b>2</b>	<b>ZIELSTELLUNG ..... 14</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODIK..... 15</b>
3.1	Bakterien ..... 15
3.1.1	<i>S. constellatus</i> und weitere anaerobe Bakterien ..... 15
3.1.2	<i>P. aeruginosa</i> ..... 16
3.2	Identifikation der Bakterien ..... 17
3.2.1	<i>S. constellatus</i> und weitere anaerobe Bakterien ..... 17
3.2.2	<i>P. aeruginosa</i> ..... 18
3.3	Gemeinsame Wachstumsversuche ..... 19
3.3.1	Vorbereitung von <i>P. aeruginosa</i> ..... 19
3.3.2	Vorbereitung von <i>S. constellatus</i> und weiteren anaeroben Bakterien ..... 19
3.3.3	Gemeinsame Inkubation ..... 21
3.4	Laktat-Produktion von <i>S. constellatus</i> und weiteren anaeroben Bakterien ..... 23
3.5	Versuche zum Einfluss von L-Laktat auf das Wachstum von <i>P. aeruginosa</i> ..... 24
3.6	Versuche zur elastolytischen Aktivität der Bakterien ..... 25
3.6.1	Herstellung des elastinhaltigen Nährmediums ..... 25
3.6.2	Versuche zur elastolytischen Aktivität ..... 26
3.7	Versuche zur hämolytischen Aktivität der Bakterien..... 28
3.8	Statistik..... 28

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>29</b>
4.1	Ergebnisse von <i>S. constellatus</i> .....	29
4.2	Ergebnisse von <i>S. saccharolyticus</i> .....	35
4.3	Ergebnisse von <i>Veillonella spp.</i> .....	40
4.4	Vergleich der Ergebnisse der Anaerobier .....	45
4.5	Einfluss von L-Laktat auf das Wachstum von <i>P. aeruginosa</i> .....	46
4.6	Elastolytische Aktivität der anaeroben Bakterien .....	48
4.7	Hämolytische Aktivität der anaeroben Bakterien .....	49
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>51</b>
5.1	Wechselwirkungen von <i>S. constellatus</i> und <i>P. aeruginosa</i> .....	51
5.2	Laktatproduktion von <i>S. constellatus</i> .....	54
5.3	Elastolytische Aktivität von <i>S. constellatus</i> .....	55
5.4	Hämolytische Aktivität von <i>S. constellatus</i> .....	56
5.5	Diskussion zur klinischen Relevanz von <i>S. constellatus</i> .....	56
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>THESEN</b> .....	<b>69</b>

Tabellarischer Lebenslauf

Selbständigkeitserklärung

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Danksagung

## VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN & SYMBOLE

4-AAP	4-Aminoantipyrin
<i>A. israelii</i>	<i>Actinomyces israelii</i>
<i>A. turicensis</i>	<i>Actinomyces turicensis</i>
Abb.	Abbildung
Art.-Nr.	Artikel-Nummer
ASL	Airway Surface Liquid
ATCC	American Type Culture Collection
<i>B. cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
<i>Bacteroides spp.</i>	<i>Bacteroides species</i>
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
<i>Bifidobacterium spp.</i>	<i>Bifidobacterium species</i>
<i>C. hastiforme</i>	<i>Clostridium hastiforme</i>
<i>Capnocytophaga spp.</i>	<i>Capnocytophaga species</i>
CD 14	Cluster of differentiation 14
CDC-Platten	Spezielle Plattenmedien für Anaerobier
CF	Cystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
cm	Zentimeter
COL-Platten	Columbia-Agar-Platten
DCBSA	Dichlorbenzolsulfonsäure
<i>Eubacterium spp.</i>	<i>Eubacterium species</i>
Fe <sup>2+</sup>	Eisen(II)
Fe <sup>3+</sup>	Eisen(III)
FEV <sub>1</sub>	forcierte Einsekundenkapazität
FVC	forcierte Vitalkapazität
<i>Fusobacterium spp.</i>	<i>Fusobacterium species</i>
g	Gramm
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
KBE/ml	Koloniebildende Einheiten/Milliliter
l	Liter
<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
LBP	Lipopolysaccharid-binding-protein

---

LPS	Lipopolysaccharid
µmol/l	Mikromol/Litersekunde
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol/l	Millimol/Liter
<i>Mob. mulieris</i>	<i>Mobiluncus mulieris</i>
MW ± STABW	Mittelwert ± Standardabweichung
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>P. melaninogenica</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAO1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Stamm ATCC 15692
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
<i>Propionibacterium spp.</i>	<i>Propionibacterium species</i>
PsE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Elastase
rpm	Rounds per minute
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>S. saccharolyticus</i>	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>
<i>S. constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>
SCS-Platten	Schädler-Agar-Platten
SMG	Streptococcus milleri group
t	Zeitpunkt
t-test	Student's t-test
Tab.	Tabelle
T-RFLP	Terminaler-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
TSB	Tryptone Soy Broth
<i>Veillonella spp.</i>	<i>Veillonella species</i>
WHO	World Health Organization
<i>Wolinella spp.</i>	<i>Wolinella species</i>
°C	Grad Celsius
%	Prozent

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 CYSTISCHE FIBROSE

Die Cystische Fibrose (synonym Mukoviszidose, cystic fibrosis, CF) ist die häufigste schwerwiegende autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung. Sie betrifft eines von 2500 Lebendgeborenen. Die der CF zugrunde liegende Mutation wurde 1989 auf dem Chromosom 7 entdeckt (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989). Das entsprechende Gen kodiert für den Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR). Dieser fungiert unter anderem als Chlorid-Ionen-Kanal in der apikalen Membran von Epithelzellen. Außerdem ist er an der Regulation anderer Ionenkanäle beteiligt und interagiert mit zahlreichen intrazellulären Proteinen (Ratjen, 2009). Ein anormaler Ionentransport ist die Folge (Ratjen und Döring, 2003). Durch die defekte Chlorid-Ionen-Sekretion kann kein osmotischer Gradient aufgebaut werden, sodass weniger Wasser auf die Oberfläche des Epithels gelangt. Ein Fehlen oder die Fehlregulation des Chlorid-Ionen-Kanals führt so zur Bildung eines zähen, mukösen Schleims in den Organen, die CFTR exprimieren (Ratjen und Döring, 2003). Mehr als 1950 verschiedene Mutationen des CFTR-Gens sind bereits registriert (Cystic Fibrosis Mutation Database, Zugriff am 17.11.2013). Die mit ca. 70 % am häufigsten vorkommende ist die  $\Delta F508$ -Mutation (Zielenski und Tsui, 1995).

Betroffen sind insbesondere Lunge und Atemwege, Bauchspeicheldrüse, Gallenblase, Gastrointestinaltrakt und Leber sowie die Fortpflanzungsorgane. So leiden 85-90 % aller CF-Patienten an einer Pankreasinsuffizienz und eine Vielzahl erwirbt im Laufe ihres Lebens einen Diabetes mellitus. Chronische intestinale Obstruktionen sind ebenso ein häufig auftretendes Symptom (Ratjen und Döring, 2003). Pathophysiologisch stehen die Veränderungen der Lunge im Vordergrund. Sie spielen eine wesentliche Rolle für die verminderte Lebenserwartung von CF-Patienten. Diese betrug im Jahr 2005 im Durchschnitt 35 Jahre (Rogers et al., 2005). Tendenziell ist ein leichter Anstieg der durchschnittlichen Lebenserwartung von CF-Patienten durch therapeutische Fortschritte zu registrieren, jedoch nicht in allen CF-Zentren weltweit (Döring et al., 2012).

Als mögliche Zeichen einer CF gelten unter anderem chronisch produktiver Husten und die Besiedlung der Atemwege mit pathogenen Bakterien, wie z.B. *P. aeruginosa* (Ratjen und Döring, 2003). Der anormale Ionentransport wird im Rahmen der

Diagnostik genutzt, indem erhöhte Natrium- und Chloridkonzentrationen im Schweiß erfasst werden (Di Sant'Agnese et al., 1953; Koch und Høiby, 2000). Die Feststellung der Diagnose erfolgt so anhand der typischen klinischen Symptome sowie dem Ergebnis des Schweißtests als Goldstandard (Castellani et al., 2008). Eine genetische Mutationsanalyse ist nicht in allen Fällen nötig, sie kann die Diagnose allerdings bestätigen und gegebenenfalls eine pränatale Diagnostik ermöglichen (Castellani et al., 2008).

Die Therapie der Erkrankung erfolgt zum jetzigen Zeitpunkt hauptsächlich symptomatisch, mit einem Fokus auf die Veränderungen der Lunge und die Fehlfunktion der Bauchspeicheldrüse. Das therapeutische Repertoire umfasst dabei sowohl antiinflammatorische Medikamente, Antibiotika, Protease-Inhibitoren, Mukolytika und Ionenkanalblocker als auch Pankreasenzyme. Es existiert sogar eine Vakzine, die vor *P. aeruginosa*-Infektionen schützen soll (Malfroot et al., 2005). Kausale Therapien, die an der Ursache der Erkrankung angreifen, erfordern eine genaue Kenntnis der jeweils vorliegenden Mutation (Ratjen, 2009). Solche Therapieansätze sind durchaus vorhanden und vielversprechend, bisher aber noch wenig etabliert (Ratjen, 2009).

## 1.2 CHRONISCHE LUNGENINFEKTION

Der anormale Ionentransport bedingt eine Entwässerung der dünnen Flüssigkeitsschicht auf den Epithelzellen der Atemwege (airway surface liquid, ASL). Dies führt zu einer gestörten mukoziliären Clearance. Dadurch kommt es zur Obstruktion des in der CF-Lunge gebildeten zähen Mukus. Dies führt zur Infektion der Atemwege und damit einhergehender Inflammation (Ratjen, 2009). Neutrophile Granulozyten sezernieren im Rahmen der Inflammation Substanzen, wie beispielsweise Elastase, die wiederum die Mukussekretion anregen. Es entsteht ein Kreislauf aus Sputumretention, Infektion und Inflammation, der sich selbst aufrecht erhält (Ratjen, 2009; Ulrich et al., 2010b). Die daraus resultierende progressive Einschränkung der Lungenfunktion ist die häufigste Todesursache bei CF-Patienten (Rogers et al., 2004). Deshalb kommt der frühzeitigen Behandlung und Prävention der chronischen Lungeninfektion eine äußerst wichtige Bedeutung zu (Döring und Høiby, 2004). Ihre weitere Optimierung kann die Lebenserwartung der Patienten mit CF in Zukunft möglicherweise positiv beeinflussen.



Nachzuweisen ist eine Infektion mithilfe der Isolation von Bakterien aus dem Sputum der Patienten oder aus Proben, die während einer Bronchiallavage gewonnen wurden. Die meisten Patienten sind anfangs von einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* oder *Haemophilus influenzae* betroffen (Ratjen und Döring, 2003). Unter anderem begünstigt die Anti-Staphylokokken-Therapie mit zunehmendem Lebensalter die Besiedlung der Atemwege mit *P. aeruginosa* (Ratjen und Döring, 2003). Nach dem 10. Lebensjahr kommt *P. aeruginosa* mit Abstand als häufigster Erreger vor (Koch und Høiby, 1993). Während hierbei anfangs non-mukoide Stämme im Vordergrund stehen, erfolgt insbesondere bei unbehandelten Patienten im Krankheitsverlauf der Übergang zu mukoiden Stämmen mit erhöhter Antibiotika-Resistenz (Ratjen und Döring, 2003).

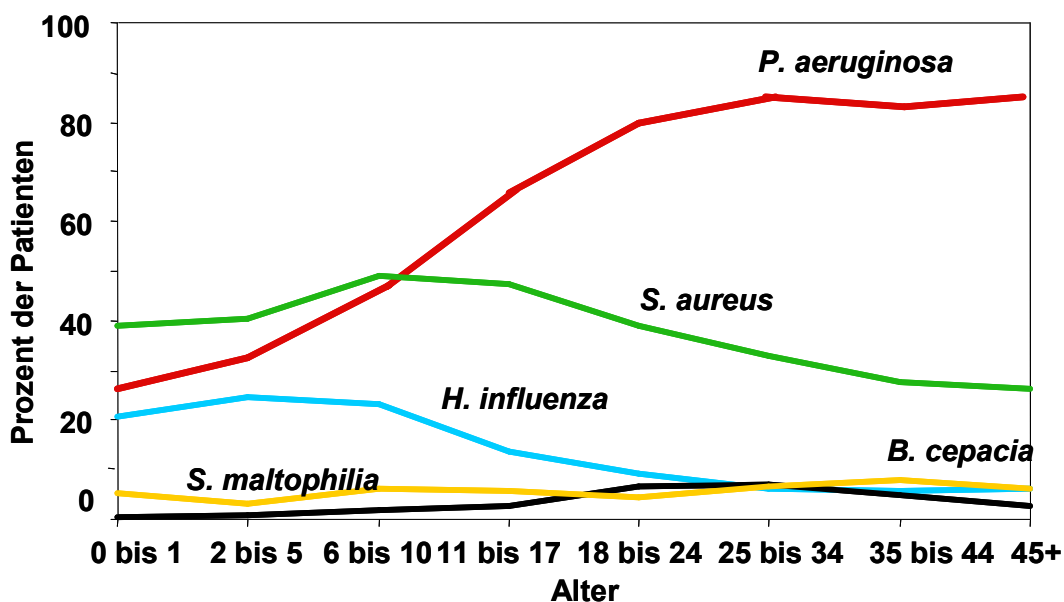


Abbildung 1: Keimbesiedlung der Atemwege von CF-Patienten in Abhängigkeit vom Lebensalter [nach Koch und Høiby 1993]

Eine temporäre Eradikation des Krankheitserregers ist in den frühen Phasen der Kolonisation durchaus möglich. Durch frühzeitige Interventionen ist es möglich, den Übergang von einer akuten Infektion in eine chronische Besiedlung mit *P. aeruginosa* zu verhindern (Valerius et al., 1991; Döring und Høiby, 2004; Döring et al., 2012). Dies erfordert allerdings neben einer regelmäßigen Diagnostik auch frühzeitige und konsequente Chemotherapie (Döring und Høiby, 2004). In Anbetracht des massiven Einflusses des Bakteriums auf die Morbidität und Mortalität der Erkrankung, erscheinen diese aufwendigen diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen jedoch durchaus sinnvoll (Valerius et al., 1991). Neben *P. aeruginosa* konnte noch eine Vielzahl von

Erregern mit der Lungeninfektion bei CF-Patienten in Zusammenhang gebracht werden. Dabei wurden bei einem Patienten in der Regel 4 bis 5 unterschiedliche Erreger nachgewiesen (Worlitzsch et al., 2009). Das individuelle Keimspektrum in Lunge und Atemwegen der Patienten wird von gegenseitiger Wachstumshemmung und anderen Wechselwirkungen zwischen den Bakterien beeinflusst. Eine Spezies ist dabei stets dominant, d.h. hinsichtlich der Keimzahl am stärksten vertreten. Hierbei handelt es sich in über 61 % der Fälle um *P. aeruginosa* (Rogers et al., 2004). Weitere häufig dominante Erreger sind *S. aureus*, *Burkholderia cepacia complex*, *Stenotrophomonas maltophilia* und *H. influenzae* (Rogers et al., 2004). Diese werden daher als Haupterreger bezeichnet (Rogers et al., 2004).

### 1.3 HAUPTERREGER *P. AERUGINOSA*

Auf die außerordentlich wichtige Rolle des Erregers *P. aeruginosa* im Krankheitsgeschehen der CF wurde bereits hingewiesen. Dieses ubiquitär vorkommende, fakultativ anaerobe Bakterium ist als Erreger von opportunistischen Infektionen seit langem bekannt. Besonders häufig von solchen Infektionen betroffen sind neben den CF-Patienten solche mit Brandwunden, akuten Leukämien, nach Organtransplantationen und mit intravenösem Drogenabusus (Bodey et al., 1983). *P. aeruginosa* ist des Weiteren ein wichtiger Erreger nosokomialer Infektionen. Er verursacht 17,7 % der beatmungsassoziierten Pneumonien auf Intensivstationen und 14,2 % der im Krankenhaus erworbenen Harnblasenkatheter-assoziierten Harnwegsinfektionen (Geffers und Gastmeier, 2011).

Die intrinsische Antibiotikaresistenz sowie eine außerordentliche Vielseitigkeit zeichnen diesen Erreger aus (Stover et al., 2000) und waren Anlass intensiver wissenschaftlicher Untersuchungen des Bakteriums. PAO1 ist ein *P. aeruginosa*-Stamm, dessen Genom vollständig sequenziert wurde (Stover et al., 2000). Der Krankheitserreger besitzt unter anderem 4 Chemotaxis-Systeme, von denen mindestens eins zu seiner Eigenschaft, Biofilme zu formen, beiträgt (Stover et al., 2000). Eine Vielzahl an regulatorischen Genen verhilft dem Bakterium, seine genetischen und biochemischen Fähigkeiten an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen (Smith et al., 2006). Sie sind außerdem von großem Stellenwert für die bemerkenswerte Resistenz gegenüber antibiotischen Medikamenten (Stover et al., 2000, Borriello et al., 2004). Alle entsprechenden Untersuchungen dieser Arbeit wurden mit dem *P. aeruginosa*-Stamm PAO1 durchgeführt.

Das Bakterium kann unter anaeroben Bedingungen beinahe genauso effektiv metabolisieren wie in Anwesenheit von Sauerstoff. Dabei sind mindestens 3 anaerobe Stoffwechselwege bekannt. Die Nitratatmung und die Argininfermentation sind zentrale Stoffwechselforgänge von *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen (Vander Wauven et al., 1984; Yoon et al., 2002; Yoon et al., 2006). Aber auch die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat und Azetat ermöglicht ein anaerobes Langzeitüberleben (Eschbach et al., 2004; Schreiber et al., 2006). Vereinfachend wird *P. aeruginosa* deshalb im Folgenden als fakultativer Anaerobier bezeichnet.

#### 1.4 ANAEROBE VERHÄLTNISSE IN DER CF-LUNGE

Seit kurzer Zeit ist bekannt, dass in der Lunge von CF-Patienten Bereiche existieren, in denen anaerobe Verhältnisse vorherrschen (Worlitzsch et al., 2002). Bei praktisch allen CF-Patienten konnten obligate Anaerobier in hohen Keimzahlen im Sputum nachgewiesen werden können (Jewes und Spencer, 1990; Rogers et al., 2004; Harris et al., 2007; Sibley et al., 2008; Tunney et al., 2008; Worlitzsch et al., 2009). Dabei waren bis zu 4 Spezies in einer Sputum-Probe vorhanden (Worlitzsch et al., 2009). Es werden aerotolerante obligate Anaerobier, welche ein eingeschränktes Wachstum bei einem Sauerstoffpartialdruck von 5-10 % aufweisen, von moderat obligaten Anaerobiern, die nur ohne Sauerstoff wachsen, unterschieden. Weiterhin existieren Bakterien, die als strikt obligat anaerob bezeichnet werden. Sie sterben bereits nach 10 min Sauerstoffexposition ab (Koneman et al., 1997). Die obligaten Anaerobier der CF-Patienten stammen möglicherweise aus der Mundhöhle und gelangen von dort in die Atemwege, wo sie im Sputum proliferieren (Worlitzsch et al., 2009). Die für das Überleben dieser Bakterien notwendigen mikroaerophilen oder anaeroben Verhältnisse in der Lunge entstehen durch einen erhöhten Sauerstoffverbrauch des Epithels, der Bakterien und der Phagozyten (Worlitzsch et al., 2002; Kolpen et al., 2010). Diese Verhältnisse konnten *in vitro*, aber auch direkt im Mukus von CF-Patienten nachgewiesen werden (Worlitzsch et al., 2002), (Abb. 2).

Als Reaktion auf eine solche anaerobe Umgebung produzieren sowohl *P. aeruginosa* (Worlitzsch et al., 2002; Bragonzi et al., 2005), als auch *S. aureus* (McKenney et al., 1999) vermehrt Exopolysaccharide, was den Bakterien ein mukoides Erscheinungsbild verleiht. Außerdem organisiert sich *P. aeruginosa* in so genannten Makrokolonien (Worlitzsch et al., 2002). Durch Positionierung in den zähen Mukus-Plaques im Lumen der Atemwege und nicht direkt auf dem Respirationsepithel ist es den Erregern möglich, der Abwehr durch den Wirt weitgehend zu entkommen (Worlitzsch et al.,

2002). Die Abwehrmechanismen der zellulären Immunantwort und die Wirksamkeit verabreichter Antibiotika sind durch das anaerobe Milieu eingeschränkt. Ein neuer möglicher Therapieansatz könnte demnach die Befreiung der Lunge von solchen Mukus-Plaques sein (Worlitzsch et al., 2002).

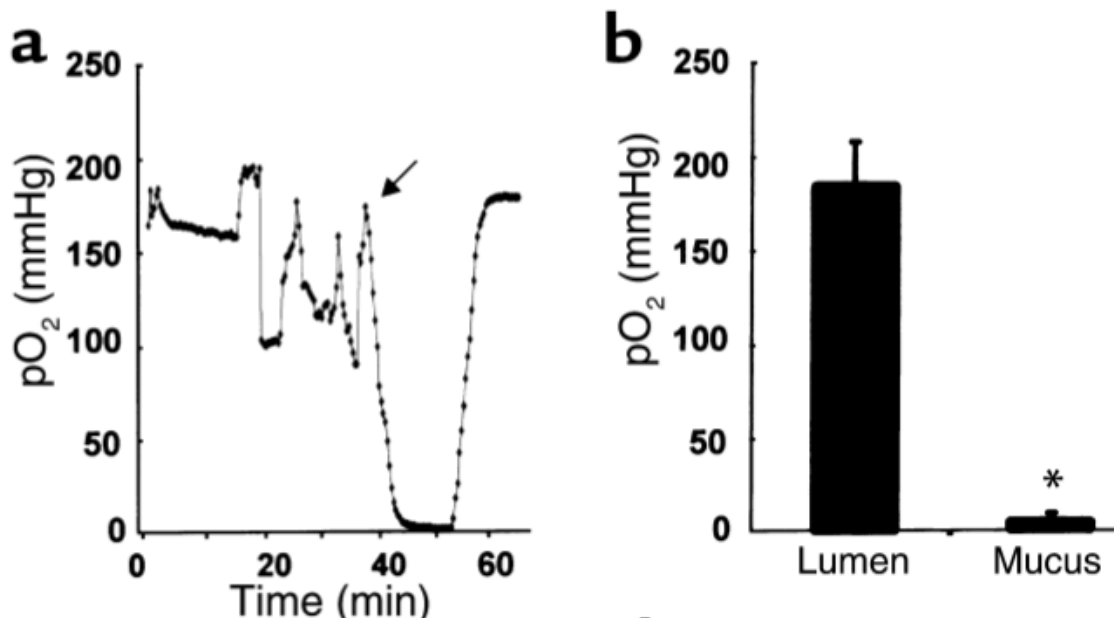


Abbildung 2: Nachweis anaerober Verhältnisse mittels Messung des Sauerstoffpartialdrucks (pO<sub>2</sub>) im Respirationstrakt eines CF-Patienten. a) Die ersten 30 Minuten zeigen eine Messung in nicht-obstruktiven Bereichen der Atemwege. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt des Eingringsens der Sonde in einen Mukus-Plaques. Nach Rückkehr in nicht-obstruktive Areale nimmt der pO<sub>2</sub> wieder die initialen Werte an. b) pO<sub>2</sub> in nicht-obstruktiven Atemwegsarealen im Vergleich zum pO<sub>2</sub> in einem Mukus-Plaques (n = 3 Patienten), (Worlitzsch et al., 2002)

### 1.5 ANAEROBE BAKTERIEN IN DER CF-LUNGE

In nahezu allen Sputumproben von CF-Patienten sind, unabhängig vom Lebensalter, Anaerobier in hohen Keimzahlen nachweisbar (Worlitzsch et al., 2009), (Abb. 3). Die Existenz der Anaerobier im Respirationstrakt von CF-Patienten ist nicht vom Vorhandensein eines bestimmten fakultativen Anaerobiers abhängig. Auch bei Patienten, die mit *S. aureus*, *B. cepacia complex* oder *S. maltophilia* infiziert sind, können Anaerobier im Sputum nachgewiesen werden (Worlitzsch et al., 2009). Einige der obligaten Anaerobier sind durchaus in der Lage, über einen längeren Zeitraum in Lunge und Atemwegen der CF-Patienten zu persistieren (Worlitzsch et al., 2009). Dies deutet darauf hin, dass es möglicherweise notwendig ist, therapeutische Konzepte auch auf die Anaerobier abzustimmen. Die am häufigsten nachweisbaren Anaerobier

sind *Staphylococcus saccharolyticus* und *Peptostreptococcus species*. Außerdem sind *Actinomyces spp.*, *Veillonella spp.* und *Clostridium spp.* zu finden. Weniger häufig konnten *Bacteroides spp.*, *Mobiluncus spp.*, *Streptococcus spp.* und *Capnocytophaga spp.* ebenso wie *Gemella spp.* gefunden werden. Auch *Prevotella spp.*, *Eubacterium spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Propionibacterium spp.* und *Wolinella spp.* konnten im Sputum nachgewiesen werden (Worlitzsch et al., 2009). Allerdings kommt z.B. in Nordirland am häufigsten *Prevotella spp.* vor (Tunney et al., 2008). Auch im induzierten Sputum von Nicht-CF-Patienten konnten obligate Anaerobier nachgewiesen werden, jedoch in viel geringerer Keimzahl (Tunney et al., 2008).

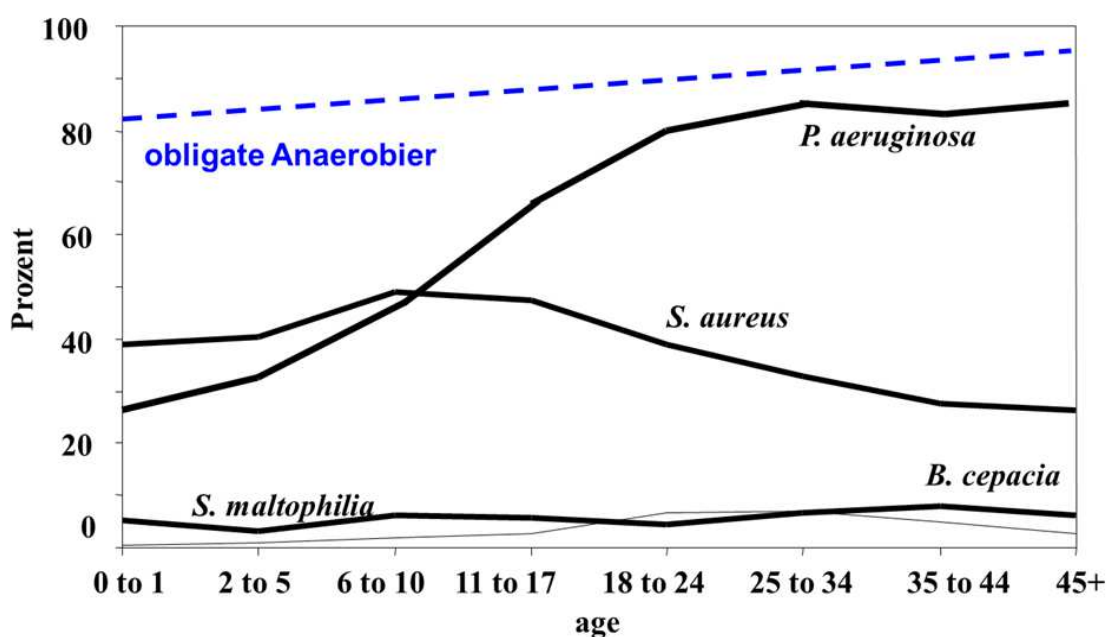


Abbildung 3: Keimbesiedlung der Atemwege von CF-Patienten in Abhängigkeit vom Lebensalter [modifiziert nach Worlitzsch 2009]

## 1.6 PATHOGENITÄT ANAEROBER BAKTERIEN

Es ist jedoch bisher unbekannt, welche Rolle obligate Anaerobier bei der Pathogenese der CF-Lungeninfektion spielen. Die meisten der oben genannten Erreger konnten aber bereits mit anderen Krankheitsgeschehen in Zusammenhang gebracht werden. Grampositive, aerobe Staphylokokken sind durchaus dafür bekannt, dass sie in der Lage sind, eine bakterielle Endokarditis auszulösen. Doch auch das anaerobe Bakterium *S. saccharolyticus*, bekannt als Kommensale der Haut des Menschen, kann eine Endokarditis verursachen (Westblom et al., 1990). Des Weiteren ist bekannt, dass *Peptostreptococcus micros* paraspinale Abszesse und Spondylodiszitis verursachen

kann. Das grampositive Bakterium konnte mithilfe von molekularen Methoden als deren Auslöser identifiziert werden (Moinia et al., 2007). Darüber hinaus konnte unter anderem *Peptostreptococcus prevotii* aus Magenbiopsien von Kindern mit chronischer Gastritis isoliert werden (Kazmirova et al., 2007). Sinusitiden mit dentalem Ursprung und assoziierten intrakraniellen Abszessen konnten in eindeutigen Zusammenhang mit anaeroben Bakterien gebracht werden. Bei entsprechenden Untersuchungen wurden unter anderem *Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.* und *Peptostreptococcus spp.* isoliert (Brook, 2006). *Fusobacterium necrophorum*, ein gramnegatives Bakterium, ist außerdem in der Lage, eine chronisch persistierende oder rezidivierende Tonsillitis zu verursachen. Als lebensbedrohliche Komplikation einer durch *Fusobacterium necrophorum* bedingten Tonsillitis ist das Lemière-Syndrom bekannt. Der Tonsillitis folgen in diesem Falle eine Thrombophlebitis der Vena jugularis, eine Sepsis und schließlich eine septische Lungenembolie (Riordan, 2007). Außerdem konnte der Erreger bei septischen Arthritiden des Knies nachgewiesen werden (Sonsale et al., 2004).

*Prevotella* ist als Bestandteil der physiologischen Mikroflora des Menschen bekannt. Nachweisbar ist das Bakterium im Gastrointestinaltrakt, der Vagina und auch im Mund. Es konnte aber außerdem gezeigt werden, dass *Prevotella spp.* mit dentoalveolären Infektionen in Verbindung gebracht werden können (Yanagisawa et al., 2006). Dabei spielt der Erreger bei der Entstehung und dem Voranschreiten der Infektion eine wichtige Rolle. So ist *P. intermedia* mithilfe von Proteasen in der Lage, CD14 und Lipopolysaccharid-binding-protein (LBP) zu spalten und damit die Virulenz von Lipopolysaccharid (LPS) im Rahmen der Parodontitis zu beeinflussen (Deschner et al., 2003). Die Zytotoxizität von *P. intermedia* auf Epithelzellen des Respirationstraktes konnte bereits *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. Dabei ist die Virulenz des Erregers von der Keimzahl abhängig (Ulrich et al., 2010a).

Streptokokken können entsprechend ihrem Hämolyseverhalten auf hämoglobinhaltigen festen Nährmedien in verschiedene Gruppen unterteilt werden (Hahn et al., 2009). Bei der  $\alpha$ -Hämolyse kommt es durch Bildung von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) zur Oxidation von  $Fe^{2+}$  im Hämoglobin zu  $Fe^{3+}$ . Dadurch ändert sich das Absorptionsspektrum des Hämoglobins, was zur Bildung eines grünen Hofes um die Bakterienkolonie führt. Die Erythrozyten sind dort intakt. Bei der  $\beta$ -Hämolyse handelt es sich um eine vollständige Hämolyse, d.h. die Erythrozyten werden zerstört. Der Hof um die Bakterienkolonie ist klar durchsichtig. Die  $\gamma$ -Hämolyse bezeichnet eine fehlende Hämolyse. Während die vergrünenden Streptokokken meist zur physiologischen Schleimhautflora gehören,

handelt es sich bei den  $\beta$ -hämolyisierenden Streptokokken meist um obligat pathogene Erreger (Hahn et al., 2009). *Streptococcus intermedius* und *S. constellatus* werden häufig mit eitrigen Infektionen in Zusammenhang gebracht. Es wird davon ausgegangen, dass die Bakterien im Rahmen solcher Infektionen von ihren natürlichen Standorten aus in die betroffenen Gebiete einwandern (Poole und Wilson, 1979). *S. intermedius* konnte aus Abszessen der Leber und des Gehirns isoliert werden. Außerdem spielt der Erreger eine Rolle für die Entstehung von dentalem Plaque (Whiley et al., 1992). *S. constellatus* ist in unterschiedliche Krankheitsgeschehen involviert. Unter anderem ist der Erreger in der Lage myokardiale Abszesse mit zystischen Läsionen oder auch eine Cerebritis mit computertomographisch nachweisbaren Schwellungen des Gehirns zu verursachen (Tsai et al., 2004).

Es ist also durchaus vorstellbar, dass obligate Anaerobier in der Lunge von CF-Patienten mehr als bisher bekannt am pathogenetischen Geschehen beteiligt sind. Vor diesem Hintergrund soll mit dieser Arbeit die Rolle von *S. constellatus* und anderen Anaerobiern in der Pathogenese der CF genauer untersucht werden.

## 1.7 SPEZIELLE BEDEUTUNG VON *S. CONSTELLATUS*

*S. constellatus* ist ein mikroaerophiles Bakterium der *Streptococcus viridans*-Gruppe. Der Erreger ist kein strikt obligater Anaerobier, er ist kapnophil. Das bedeutet, zum Wachsen wird eine  $\text{CO}_2$ -Konzentration von 5 – 10 % in der Atmosphäre benötigt (Hahn et al., 2009). Innerhalb der *Streptococcus viridans*-Gruppe werden die anaeroben oder mikroaerophilen Bakterien (Shinzato und Saito, 1994) *S. constellatus*, *S. intermedius* und *S. anginosus* als *Streptococcus milleri*-group (SMG) bezeichnet (Whiley et al., 1992). Diese drei Erreger können phänotypisch voneinander abgegrenzt und mittels biochemischer Tests von anderen *Streptococcus viridans*-Stämmen differenziert werden (Whiley et al., 1992). Sie sind als Teil der Normalflora in Mundhöhle, oberen Atemwegen, Gastrointestinal- und weiblichem Urogenitaltrakt des Menschen zu finden (Whiley et al., 1990). Durch lokale Invasion aus ihren natürlichen Standorten kann es zu purulenten Infektionen der inneren Organe (Shinzato und Saito, 1994), z.B. der Leber, der Lunge, der Milz und des Gehirns kommen. So konnten sie in Fällen von Appendizitis, Peritonitis, Endokarditis, Meningitis, Hautinfektionen und neonatalen Infektionen nachgewiesen werden (Whiley et al., 1990; Porta et al., 1998).

*S. intermedius* und *S. constellatus* konnten neben anderen Krankheitserregern aus dem Sputum von CF-Patienten isoliert werden (Tunney et al., 2008; Worlitzsch et al.,

2009). Auch sie haben demnach eine Bedeutung bei der Lungeninfektion von CF-Patienten. Es wird sogar davon ausgegangen, dass die SMG eine wichtigere Rolle bei der CF-Lungeninfektion spielt als bisher bekannt (Sibley et al., 2008). Es wird angenommen, dass die üblichen Methoden, SMG bisher nicht in repräsentativer Keimzahl nachweisen konnten.

Akute Exazerbationen im Krankheitsverlauf der CF werden durch Veränderungen des mikrobiellen Gleichgewichts getriggert (Sibley et al., 2008). Während nun die Keimzahl von *P. aeruginosa* sowohl in stabilen Krankheitsphasen, als auch während einer Exazerbation konstant bleibt, korreliert die Keimzahl von SMG mit dem Krankheitsverlauf. In einer stabilen Krankheitsphase sind *S. intermedius* und *S. constellatus* nicht oder nur in geringer Keimzahl nachweisbar. Während einer Exazerbation dagegen ist die Keimzahl bis zu 1000-fach erhöht (Sibley et al., 2008). Des Weiteren ist bekannt, dass 74,4 % der bei CF-Patienten nachgewiesenen *S. constellatus*-Stämme  $\beta$ -hämolytisch sind (Grinwis et al., 2010a). Ausschließlich dieser *S. constellatus*-Biotyp wurde bei bronchopulmonalen Exazerbationen nachgewiesen (Grinwis et al., 2010a). Es ist also davon auszugehen, dass der  $\beta$ -hämolytische *S. constellatus*-Biotyp für CF-Patienten stärker pathogen ist.

Es ist bekannt, dass Bakterien der *Streptococcus viridans*-Gruppe die Pathogenität von *P. aeruginosa* verstärken können. So konnte beobachtet werden, dass die Virulenz von *P. aeruginosa* in Anwesenheit eines *Streptococcus*-Stamms im Vergleich zur alleinigen Infektion steigt (Duan et al., 2003). Während Veränderungen der Expression von Genen als Reaktion auf Umweltbedingungen schon länger bekannt waren, konnte hier gezeigt werden, dass es durch Interspezies-Kommunikation mit der Residentflora zur Modulation der Genexpression kam (Duan et al., 2003). Offen ist, welche Konsequenzen aus einer gleichzeitigen Infektion eines Patienten mit SMG und *P. aeruginosa* im Rahmen der polymikrobiellen Lungeninfektion bei CF resultieren.

Obwohl die Pathogenitätsmechanismen von *S. constellatus* in der CF-Lunge nicht genau bekannt sind, sprechen sich Sibley et al. dafür aus, SMG in die Liste der klinisch relevanten CF-Erreger aufzunehmen (Sibley et al., 2008). Die Arbeitsgruppe um Sibley schlägt ebenfalls das Führen von patientenspezifischen mikrobiellen Protokollen vor, um das Patienten-Outcome mit speziell ausgerichteten Therapiestrategien zu verbessern (Sibley et al., 2009). Das Arbeiten mit individuellen Behandlungsprotokollen erlaubt eine gezielte Antibiotikatherapie mit Rücksicht auf die speziellen Erreger und Resistenzen des jeweiligen Patienten. Dies ist insofern von Bedeutung, da auch bei



SMG bereits Antibiotika-Resistenzen bekannt sind. So konnte gezeigt werden, dass in Kanada untersuchte SMG-Stämme bei CF-Patienten in 22 % gegen Tetracycline resistent und in mehr als der Hälfte aller Fälle gegen Azithromycin, Erythromycin und Clindamycin resistent waren (Grinwis et al., 2010b). Ähnliche Untersuchungen in Halle (Saale) ergaben, dass aus Sputum von CF-Patienten isolierte *S. constellatus*-Stämme zu 40 % Azithromycin-resistent und zu 70 % Metronidazol-resistent waren (Künzel et al., 2012). Hierbei erwiesen sich die Stämme als sensibel auf Meropenem, Ceftazidin und Piperacillin/Tazobactam (Künzel et al., 2012).

## 1.8 BAKTERIELLE INTERAKTIONEN

Ist ein Organismus zum gleichen Zeitpunkt mit unterschiedlichen Erregern besiedelt, so wird die Zusammensetzung der mikrobiologischen Flora im Wesentlichen durch die bakteriellen Interaktionen bestimmt. Die einfachste Form des Zusammenlebens von mehreren Bakterienspezies ist die Koexistenz. Hierbei resultieren aus der gemeinsamen Existenz für die jeweiligen Spezies keine Vor- oder Nachteile. Des Weiteren spielen sowohl konkurrentes als auch unterstützendes Verhalten eine Rolle. Konkurreren Bakterien um ein bestimmtes Substrat, so führt dies zur gegenseitigen Wachstumshemmung (Hahn et al., 2005). Dies wird als Antagonismus bezeichnet. Ein ebenfalls antagonistischer Effekt ist die Metabolithemmung, bei der eine Spezies Abfallprodukte erzeugt, die für eine andere toxisch sind (Hahn et al., 2005).

Doch das gleichzeitige Existieren unterschiedlicher Bakterien an einem Standort kann auch Vorteile bringen. Bei der kreuzweisen Entgiftung eines Milieus kann beispielsweise ein aerober Erreger durch respiratorische Entfernung von Sauerstoff bessere Umweltbedingungen für einen Anaerobier schaffen (Hahn et al., 2005). Dieser wiederum kann ein für den Aerobier wichtiges Substrat produzieren und diesem damit Vorteil verschaffen (Hahn et al., 2005). Es ist bisher unklar, ob auch *P. aeruginosa* von der Anwesenheit der Anaerobier in der CF-Lunge profitiert.

## 1.9 LAKTAT IN DER LUNGE VON CF-PATIENTEN

In praktisch jeder Sputum-Probe von CF-Patienten konnte in einer von Bensele et al. durchgeführten Studie Laktat nachgewiesen werden (Bensele et al., 2011). Es wird angenommen, dass das Laktat hauptsächlich von den polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) stammt, welche im Rahmen des Entzündungsgeschehens in die CF-Lunge einwandern (Bensele et al., 2011). Es wurde untersucht, ob die CF-Haupterreger als Produzenten des Laktats in Frage kommen. Dabei zeigte sich, dass

*P. aeruginosa* und *B. cenocepacia* unter anaeroben Bedingungen *in vitro* kein Laktat produzieren, während *S. aureus* dagegen als Laktatproduzent identifiziert wurde (Bensel et al., 2011). Allerdings findet eine Produktion von Laktat nur in der logarithmischen Wachstumsphase statt (Bensel et al., 2011). Außerdem sind im Erwachsenenalter nur ca. 30% der Patienten mit *S. aureus* infiziert (Koch und Høiby, 1993). Die Laktatproduktion von *S. aureus* kann den Nachweis von Laktat in fast allen Sputumproben demnach nicht erklären. Es existiert außerdem eine negative Korrelation zwischen dem Lungenfunktionsparameter FEV1 (forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde) und der Laktatkonzentration im Sputum der CF-Patienten. Laktat könnte zukünftig als nichtinvasiver Entzündungsmarker bei CF verwendet werden (Bensel et al., 2011).

Unklar ist bisher, ob auch obligate Anaerobier in der Lunge von CF-Patienten im Rahmen des Entzündungsgeschehens Laktat produzieren. Wäre dies der Fall, so könnte Laktat als nichtinvasiver Entzündungsmarker auch die Aktivität der obligaten Anaerobier widerspiegeln.

### **1.10 ELASTINABBAU IN DER LUNGE VON CF-PATIENTEN**

Durch Freisetzung von Interleukinen und Wachstumsfaktoren im Rahmen des Inflammationsgeschehens in der CF-Lunge, kommt es zu einer vermehrten Kollagensynthese. Dies führt zur Fibrosierung von Lungengewebe (Konietzko et al., 1995; Ulrich et al., 2010b). Durch eine Verlängerung des Diffusionsweges wird damit der Gasaustausch beeinträchtigt. Außerdem findet in der Lunge von CF-Patienten ein vermehrter Elastinabbau statt (Stone et al., 1995). Als Korrelat der Ab- und Umbauprozesse, ist Elastin im CF-Lungengewebe deutlich vermindert, während die Kollagenkonzentration im Vergleich zu gesundem Lungengewebe erhöht ist (Ulrich et al., 2010b). Elastische Fasern finden sich in der Submukosa der Bronchien und der Alveolarmembran der Lunge. Der Abbau von Elastin erfolgt enzymatisch durch Elastasen. Spezifische Abbauprodukte des Elastins, Desmosin und Isodesmosin, können im Urin nachgewiesen und quantifiziert werden (Viglio et al., 2000; Ulrich et al., 2010b). Bei CF-Patienten sind diese Abbauprodukte im Urin signifikant erhöht (Ulrich et al., 2010b).

Im Sputum und im Serum von CF-Patienten liegt eine hohe Konzentration einer von neutrophilen Granulozyten gebildeten Elastase (PMN-Elastase) vor (Goldstein und Döring, 1986). Die PMN-Elastase hat neben dem Elastinabbau noch weitere

pathogenetische Bedeutungen. Unter anderem spaltet sie Immunkomplexe und kann damit direkten Einfluss auf ein Inflammationsgeschehen nehmen (Döring et al., 1986). Auch *P. aeruginosa* ist in der Lage Elastase (*Pseudomonas-aeruginosa*-Elastase, PsE) zu bilden (Viglio et al., 1999). Im Sputum oder in Sekreten, die bei einer Bronchiallavage gewonnen werden, können die Aktivitäten der PsE und der PMN-Elastase simultan gemessen werden (Viglio et al., 1999). Ebenso konnte gezeigt werden, dass der obligat anaerobe Erreger *P. intermedia* eine elastolytische Serinprotease produziert (Shibata et al., 1993). Bisher ist nicht bekannt, ob auch *S. constellatus* oder andere anaerobe Bakterien durch Bildung von Elastase pathogenetischen Einfluss auf die Strukturveränderungen in einer CF-Lunge haben.

## 2 ZIELSTELLUNG

Ziel der Arbeit ist die Gewinnung von Erkenntnissen zu den Wechselwirkungen von *S. constellatus* in der Lunge von CF-Patienten. Zum Vergleich wurden *S. saccharolyticus* und *Veillonella spp.* gleichen Untersuchungen unterzogen. Mithilfe von *in-vitro*-Versuchen soll eine Aussage zur Pathogenität von *S. constellatus* in der CF-Lunge getroffen werden. Dazu wurden folgende Aspekte untersucht:

- Wachstum von *P. aeruginosa* bei gemeinsamer Inkubation mit *S. constellatus*
- Vergleich dieser Erkenntnisse mit dem Wachstum von *P. aeruginosa* bei gemeinsamer Inkubation mit anderen obligaten Anaerobiern
- Einfluss von *P. aeruginosa* auf das Wachstum der Anaerobier
- Untersuchungen der minimalen Anaerobier-Keimzahl für die Proliferation in einer *P. aeruginosa*-Suspension
- Vergleich der Keimzahlen beim gemeinsamen Wachstum von Anaerobiern und *P. aeruginosa* mit unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen
- Laktatproduktion der anaeroben Bakterien nach unterschiedlichen Zeitintervallen
- Einfluss von Laktat auf das Wachstum von *P. aeruginosa*
- Untersuchung des elastolytischen Verhaltens anaerober Bakterien mithilfe von speziell für diesen Versuch hergestelltem elastinhaltigen Nährmedium
- Untersuchung des hämolytischen Verhaltens anaerober Bakterien

### 3 MATERIAL UND METHODIK

#### 3.1 BAKTERIEN

##### 3.1.1 *S. constellatus* und weitere anaerobe Bakterien

Alle anaeroben Bakterien, mit denen gearbeitet wurde, stammen aus einer Sammlung an Isolaten, welche bei -51 °C in Skim-Milk-Gläsern (Gewindepräparateglas mit Schraubkappe, Art. Nr. 391H6110, Scherf Europa GmbH, Meiningen Deutschland, 1,8 ml Skim milk, Magermilch gepulvert, Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) gelagert wurden. Diese Isolate wurden zuvor im Rahmen ihrer Forschungsarbeiten von Rintelen (2009) und Böhm (2011) im Zeitraum von 2006 bis 2008 hergestellt. Es handelt sich um Isolate von 31 erwachsenen Patienten und 8 Kindern. Das Durchschnittsalter der erwachsenen Patienten betrug  $25,3 \pm 9,0$  Jahre, das der Kinder  $12,9 \pm 4,3$  Jahre (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) (Worlitzsch et al., 2009). Sämtliche Anaerobier stammen demnach von CF-Patienten, die sich in der Ambulanz der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin I und in der CF-Kinder-Ambulanz der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin im Universitätsklinikum Halle (Saale) vorstellten.

Die Anzucht der Bakterien erfolgte jeweils mittels Dreiösenausstrich (Einweg-Impfschlinge, Art.-Nr. 731101, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) auf Schädler-Agar-Platten (Schaedler-Agar, Art.-Nr. 43401, bioMérieux® sa, Marcy-l'Etoile, Frankreich) (SCS-Platten) aus den bei Raumtemperatur aufgetauten Isolaten. SCS-Platten enthalten 5 % Hammelblut. Es handelt sich dabei um ein Nährmedium, welches durch die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren wie Hefeextrakt, Vitamin K3 und Hämin besonders für die Anzucht obligat und fakultativ anaerober Bakterien geeignet ist. Eine hohe Glukosekonzentration sowie das reduzierte Agenz (L-Cystin) begünstigen ebenfalls das Wachstum dieser äußerst anspruchsvollen Mikroorganismen auf dem Agar (bioMérieux Deutschland URL: [http://www.biomerieux.de/servlet/srt/bio/germany/dynPage?open=GRM\\_CLN\\_PRD&doc=GRM\\_CLN\\_PRD\\_G\\_PRD\\_CLN\\_61&pubparams.sform=6&lang=de](http://www.biomerieux.de/servlet/srt/bio/germany/dynPage?open=GRM_CLN_PRD&doc=GRM_CLN_PRD_G_PRD_CLN_61&pubparams.sform=6&lang=de), Zugriff am 01.03.2011).

Im Umgang mit den anaeroben Bakterien wurde stets darauf geachtet, die Sauerstoffexposition so gering wie möglich zu halten. Nach Entnahme des Erregers aus der Einfrierkultur wurde diese sofort wieder bei -51 °C eingelagert. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C unter einer Anaerobierbank (Modular Atmosphere Controlled

System, MG500, Meintrup dws, Löhden-Holte, Deutschland), welche ein sauerstoffreies Gasgemisch aus 80 % Stickstoff, 10 % Wasserstoff und 10 % Kohlenstoffdioxid enthält. Bevor die weitere Bearbeitung des jeweiligen Erregers erfolgte, wurde eine aerobe Wachstumskontrolle durchgeführt. Dazu wurde eine gewachsene Kolonie auf eine Columbia-Agar-Platte (Art.-Nr. PB5008A, Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) (COL-Platte) ausgestrichen und bei 37 °C im aeroben Brutschrank (Heraeus Typ B6420, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland) bebrütet. Nach 24 und 48 Stunden wurde diese Platte auf ein mögliches Wachstum kontrolliert. Die obligat anaeroben Bakterien wurden nur unter der Bedingung einer negativen aeroben Wachstumskontrolle weiterverwendet. *S. constellatus*, als mikroaerophiler Erreger, musste davon ausgenommen werden, da dieser unter Umständen auch ein aerobes Wachstum präsentieren kann. Kontamination oder der Nachweis von mehr als einer Spezies führten zum Ausschluss eines angezüchteten Erregers und erforderten dessen neue Anzucht. Aufgrund der langen Generationszeiten der Anaerobier kommt es erst nach 2 bis 5 Tagen zur Ausbildung sichtbarer Kolonien (Hahn et al., 2009). Nach 48 bis 120 Stunden lagen Reinkulturen des jeweiligen Anaerobiers zur weiteren Bearbeitung vor.

### 3.1.2 *P. aeruginosa*

Bei dem verwendeten fakultativen Anaerobier *P. aeruginosa* handelt es sich um ein Isolat des Stammes PAO1 (ATCC 15692) (Stover et al., 2000). Auch dieser Erreger wurde als Einfrierkultur in Skim-Milk-Gläsern bei - 51 °C gelagert.

Der Erreger wurde bei Raumtemperatur vorsichtig aufgetaut. Zur Anzucht des fakultativ anaeroben Bakteriums erfolgte ein Dreiösenausstrich mittels steriler Einwegimpfeschlinge auf COL-Platten, welche mit 5 % Schafblut versetzt sind. Diese Platten sind besonders gut dazu geeignet, anspruchsvolle Mikroorganismen zu kultivieren (bioMérieux). Das Skim-Milk-Glas wurde sofort wieder der Lagerung bei - 51 °C zugeführt. Die Bebrütung wurde im aeroben Brutschrank bei 37 °C durchgeführt. Im Falle einer Kontamination wurde der Erreger nicht verwendet. Nach 24 Stunden Bebrütung lagen Reinkulturen von *P. aeruginosa* zur weiteren Bearbeitung vor.

## 3.2 IDENTIFIKATION DER BAKTERIEN

### 3.2.1 *S. constellatus* und weitere anaerobe Bakterien

Zur Identifizierung der anaeroben Bakterien wurde das RapID™ ANA II System verwendet. Dazu wurde eine Kolonie des auf SCS-Agar angezüchteten Erregers auf CDC-Platten (Art.-Nr. PA256506, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) ausgestrichen und für weitere mindestens 48 und maximal 72 Stunden anaerob bei 37 °C bebrütet. Das direkte Übernehmen einer Kolonie von SCS-Agar wird vom Hersteller nicht empfohlen, da hierbei Interaktionen der Inhaltsstoffe des Agars mit den Reaktionsflüssigkeiten auftreten und somit das Ergebnis beeinflussen können.

Eine weitere Kolonie wurde zur Herstellung einer Gram-Färbung des Bakteriums verwendet. Sie dient als taxonomisches Merkmal und ist Voraussetzung für die Erregeridentifikation. Diese erfolgte mithilfe eines Gramfärbe-Sets (Gram-color modifiziert, Färbe-Set, phenolfrei, Art. Nr. 1.01603-0001, Merck, Darmstadt, Deutschland). Dazu wurde die Kolonie mit einer Einwegimpfeschlinge auf einen beschrifteten Objektträger (Art.-Nr. M 7620, Süsse GmbH, Gudensburg, Deutschland) in einen Tropfen 0,9 %-iger NaCl-Lösung (isotonische Kochsalzlösung, steril, Art.-Nr. 30911P, B. Braun, Melsungen, Deutschland) gegeben. Das Präparat wurde luftgetrocknet und anschließend hitzefixiert. Der Objektträger wurde in der Färbevorrichtung unter einem Luftabzug positioniert. Auf die Präparate wurde Kristallviolettlösung mit Natriumhydrogencarbonatlösung gegeben. Grampositive Bakterien nehmen diese in ihre Zellwand auf. Im Anschluss erfolgte das Beträufeln mit Iodlösung zur weiteren Fixierung des Farbstoffs. Nach Auftragen einer Entfärbelösung wurde eine Gegenfärbung mit Fuchsinlösung durchgeführt, welche für die Rotfärbung der gramnegativen Bakterien verantwortlich ist. Es erfolgte die Einteilung in grampositive, dunkelblau gefärbte, und gramnegative, rot gefärbte, Bakterien am Mikroskop (Axiolab, Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland). Des Weiteren wurden die Bakterien nach ihrer Morphologie in Kokken oder Stäbchen eingeteilt (vgl. Morphologische Grundformen, Hahn 2009: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, S. 175).

Nach 48 bis 72 Stunden Bebrütung wurde ausreichend Kulturmaterial mithilfe eines sterilen Watteträgers (Art.-Nr. 132436, Böttger, Bodenmais, Deutschland) in die RapID™-Inokulationsgläschen mit 1 ml Flüssigkeit (Art.-Nr. 8325102, remel) gegeben, bis die hergestellte Suspension einem McFarland-Trübungsstandard Nr. 3 (Art.-Nr. 70900, bioMérieux® sa) entsprach. Aus dieser Suspension wurde nun ein

Dreiösenausstrich als Reinheitstest abgenommen und auf eine SCS-Platte zur anaeroben und eine COL-Platte zur aeroben Bebrütung gegeben. Anschließend wurde die gesamte Inokulationsflüssigkeit in das RapID™-Panel (Art. Nr. R 8311002, remel) eingebracht, dieses wieder verschlossen und vorsichtig um 45 ° gekippt, so dass die Flüssigkeit in die Reaktionskammern gelangen konnte. Es musste kontrolliert werden, ob jede Kammer Flüssigkeit enthält. Die beschrifteten und befüllten Panels wurden bei 37 °C mindestens 4 und maximal 6 Stunden gelagert und im Anschluss ausgewertet. Dazu wurden die Farbveränderungen direkt nach der Lagerung sowie nach Zugabe der vorgegebenen Reagenzien (RapID™-Reagenz und RapID™-Spot-Indolreagenz) dokumentiert. Der Test basiert auf dem jeweiligen unterschiedlichen Reaktionsmuster der einzelnen Bakterien. Dabei werden mithilfe des zum System gehörenden Panels, welches 2 monofunktionale und 8 bifunktionale Kammern besitzt, 18 verschiedene biochemische Reaktionen getestet. Positive und negative Reaktionen werden durch unterschiedliche Farbveränderungen repräsentiert, die mit einem Farbstandard verglichen und dokumentiert werden. Nach dem Eintragen der Reaktionsergebnisse auf dem zum System gehörenden Auswertungsbogen ergibt sich schließlich der zur Identifikation erforderliche Microcode.

Die Auswertung des Tests erfolgte mittels Angabe der Morphologie, dem Ergebnis der Gram-Färbung und des erhaltenen Microcodes. Dafür wurde das ERIC™ Electronic RapID Compendium System, Version 1.0.76 (Art.Nr. R 8323600, remel Inc Lenexa, Kansas) verwendet. Es gibt an, um welchen Erreger es sich handelt und mit welcher Wahrscheinlichkeit dies anhand der eingegebenen Daten zutrifft. Nach 24 und 48 Stunden wurden die aeroben und anaeroben Reinheitskontrollen auf eine mögliche Kontamination der Probe kontrolliert. Das Ergebnis der Identifikation war nur unter der Voraussetzung gültig, dass es sich um eine nicht kontaminierte Probe handelte.

### **3.2.2 *P. aeruginosa***

Als Kontrolle erfolgte die biochemische Identifizierung von *P. aeruginosa* mittels Vitek®-System (bioMérieux® sa). Dafür wurde zuvor eine Gram-Färbung vorgenommen. Der gram-negative fakultative Anaerobier wurde dann einem Oxidase-Test (BBL™ Dry Slide™ Oxidase, Art. Nr. 231746, Becton Dickinson GmbH) unterzogen, bei dem sich nach Aufbringen einer Kolonie auf die Reaktionsfläche eine Violettfärbung als Positivergebnis zeigte. Es erfolgte nun die Herstellung einer Bakterien-Suspension mit vorgeschriebener optischer Dichte (OD). Dazu wurde eine Kolonie des auf COL-Agar gewachsenen Erregers mittels Einwegimpföse in ein steriles Röhrchen (Art. Nr. 55.476,



Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit 1,8 ml 0,45 %-iger NaCl-Lösung (Art.-Nr. V 1204, bioMérieux® sa) eingebracht. Für gramnegative Bakterien wird vom Hersteller eine Trübung entsprechend McFarland-Standard Nr. 1,0 (bioMérieux® sa) empfohlen. Die Vitek®-ID-Karte GNI+ (ID-Karten, Art.-Nr. V 1305, bioMérieux® sa) wurde dem Erreger entsprechend beschriftet und schließlich mit der hergestellten Bakterien-Suspension in Verbindung gebracht. Nachdem die Testkarte die Suspension unter Vakuumbedingungen aufgenommen hatte, erfolgte die Versiegelung mit dem Vitek®-Sealer (bioMérieux® sa) und schließlich die Platzierung im Vitek®-Gerät. Die Vitek®-Software ermittelte nun die Reaktionen des Bakteriums auf die biochemischen Tests in den einzelnen Kammern und interpretierte das Reaktionsmuster automatisch.

### 3.3 GEMEINSAME WACHSTUMSVERSUCHE

#### 3.3.1 Vorbereitung von *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* wurde aus einer Einfrierkultur auf eine COL-Platte ausgestrichen und 24 Stunden im aeroben Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Nach 24 Stunden wurde eine Kolonie mit einer sterilen Einwegimpfeschlinge in flüssiges TSB-Medium (Tryptone Soy Broth, Caseinpepton-Sojamehl-Pepton-Lösung, Art.-Nr. TV 5002 E, Oxoid, Basingstoke, Großbritannien) gegeben und weitere 24 Stunden im aeroben Schüttelbrutschrank bei 37 °C und aufgedrehtem Deckel bebrütet. Nach 24 Stunden wurde der Erreger 1:10 mit 900 µl TSB-Medium in einem 1 ml Eppendorf-Tube verdünnt (Eppendorf-Pipette, Art.-Nr. B007.1, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland). Es erfolgte die Messung der Extinktion dieser Verdünnung (CADAS 30 / CADAS 50 DR LANGE, Dr. Bruno Lange GmbH Berlin, Deutschland), um 10 ml einer Suspension mit definierter OD 0,05 in einem sterilen Röhrchen (PP-Tube, 14 ml, steril, Greiner bio-one) herzustellen. In 9 weitere sterile Röhrchen wurden daraus jeweils 800 µl der *P. aeruginosa*-Suspension gegeben. In diesen Röhrchen sollte die Infektion der Suspension mit den Anaerobiern stattfinden.

#### 3.3.2 Vorbereitung von *S. constellatus* und weiteren anaeroben Bakterien

Dieser Versuch wurde mit *S. constellatus* und drei weiteren obligaten Anaerobiern zum Vergleich durchgeführt. Dafür wurden *S. saccharolyticus*, *Veillonella spp.* sowie *Prevotella melaninogenica* ausgewählt. Sie erwiesen sich zuvor als zuverlässig anzüchtbare Bakterien mit günstigen Generationszeiten.

Eine SCS-Platte wurde für das Auftragen einer Verdünnungsreihe mit 8 Stufen vorbereitet. Außerdem wurden für die Verdünnungsreihe 8 Eppendorf-Tubes mit 900 µl TSB-Medium befüllt. Ein weiteres Eppendorf-Tube wurde für die Herstellung der

Suspension mit OD 0,05 bereit gestellt (Abb. 4a). Nun erst wurde die sichtbar eingetrübte zuvor hergestellte Anaerobier-TSB-Suspension aus dem anaeroben Schüttelbrutschrank (HTMR-133, MS-Laborgeräte Schröder OHG, Wiesloch, Deutschland) genommen und im Photometer deren Extinktion bestimmt. Von dem Anaerobier wurde 1 ml Suspension mit definierter OD 0,05 hergestellt. Ausgehend von dieser Suspension wurde eine Verdünnungsreihe mit 8 Stufen hergestellt (Abb. 4a). Jeweils 2-mal 10 µl einer Verdünnungsstufe wurden auf die vorbereitete SCS-Platte aufgetragen. Die Verdünnungsreihe wurde für 24 bzw. 48 Stunden anaerob bei 37 °C bebrütet. Nach maximal 48 Stunden erfolgte deren Auszählung. Die Agar-Platte wurde weiter im anaeroben Brutschrank belassen, um sie später zur Identifikation des Anaerobiers zu nutzen. Weitere 800 µl einer jeden Verdünnungsstufe und der Suspension mit OD 0,05 wurden in die vorbereiteten Röhrchen gegeben, in denen sich bereits 800 µl *P. aeruginosa*-Suspension befanden (Abb. 4b). Beide Erreger, *P. aeruginosa* und der jeweilige Anaerobier, befanden sich nun in einem Röhrchen.

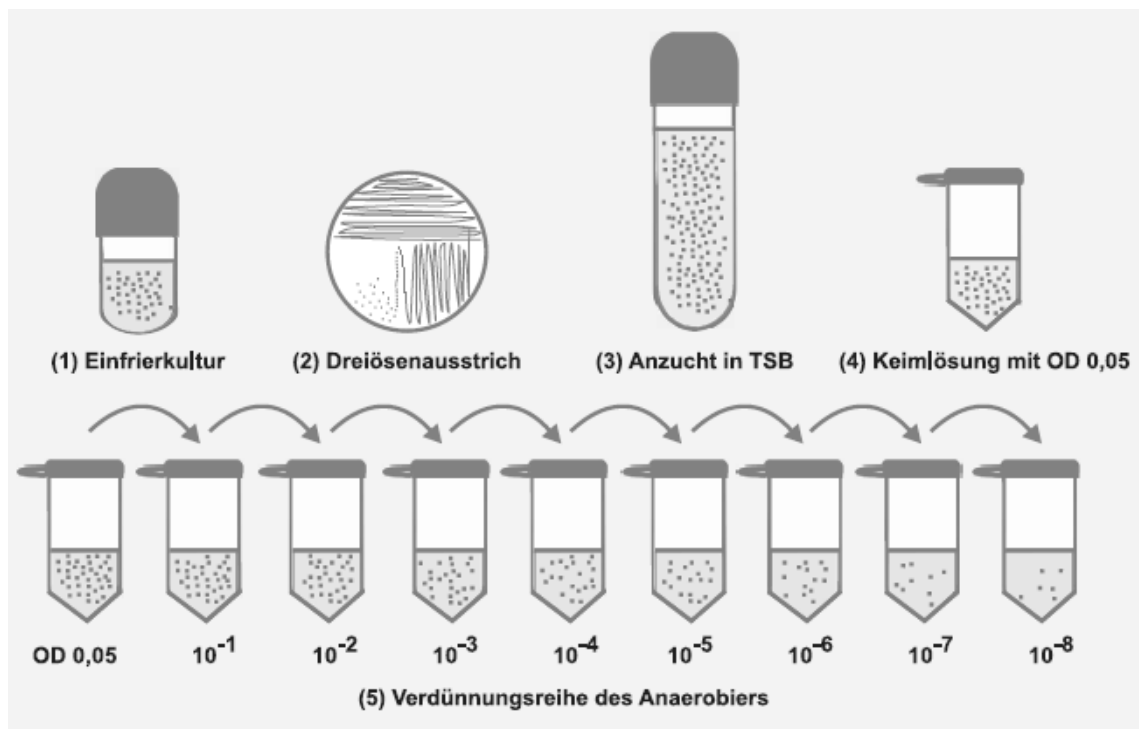


Abbildung 4a: Vorbereitung des Anaerobiers (*S. constellatus*) für die gemeinsame Inkubation. Aus einer Einfrierkultur (1) wird ein Dreiösenausstrich (2) hergestellt. Eine Kolonie wird in flüssiges TSB-Medium eingebracht und anaerob angezchtet (3). Daraus Herstellung einer Bakterien-Suspension mit OD 0,05 (4) und anschließende Verdünnung (5).

### 3.3.3 Gemeinsame Inkubation

Im Anschluss erfolgte die gemeinsame Inkubation der beiden Mikroorganismen. Dazu wurden die 9 Röhrrchen, in denen sich jeweils 800 µl *P. aeruginosa*-Suspension mit OD 0,05 und 800 µl Anaerobier-Suspension in ansteigender Verdünnung befanden, für 72 Stunden anaerob bei 37 °C bebrütet. In ein weiteres 10. Röhrrchen wurden anstatt der Anaerobier-Suspension 800 µl TSB-Medium gegeben, um zum Vergleich auch das alleinige Wachstum von *P. aeruginosa* unter gleichen Bedingungen zu erfassen (Abb. 4b). Nach 72 Stunden wurde für jedes der 10 Röhrrchen die Herstellung einer Verdünnungsreihe vorbereitet. Die 10 Röhrrchen wurden dann einzeln der Anaerobierbank entnommen und jeweils eine Verdünnungsreihe erstellt (Abb. 4c). Diese wurde auf die vorbereitete SCS-Platte aufgetragen. Insgesamt wurden 10 Verdünnungsreihen erstellt, die alle nach ihrer Herstellung sofort wieder in die Anaerobierbank eingeschleust wurden. Nach 24 bzw. 48 Stunden konnten beide Erreger, der Anaerobier und *P. aeruginosa*, gezählt und fotodokumentiert werden (Abb. 4c). Die 10 SCS-Platten wurden weitere 24 Stunden aerob bei 37 °C bebrütet und anschließend kontrolliert. Die Keimzahlen wurden mit denen verglichen, die unter gleichen äußeren Bedingungen bei alleiniger Inkubation ermittelt werden konnten. Außerdem wurden die einzelnen Platten danach ausgewertet, bis zu welcher Verdünnung ein Anaerobier in der Lage ist, in einer *P. aeruginosa*-Suspension anzuwachsen. Ebenfalls dokumentiert wurde das phänotypische Wachstum von *P. aeruginosa*.

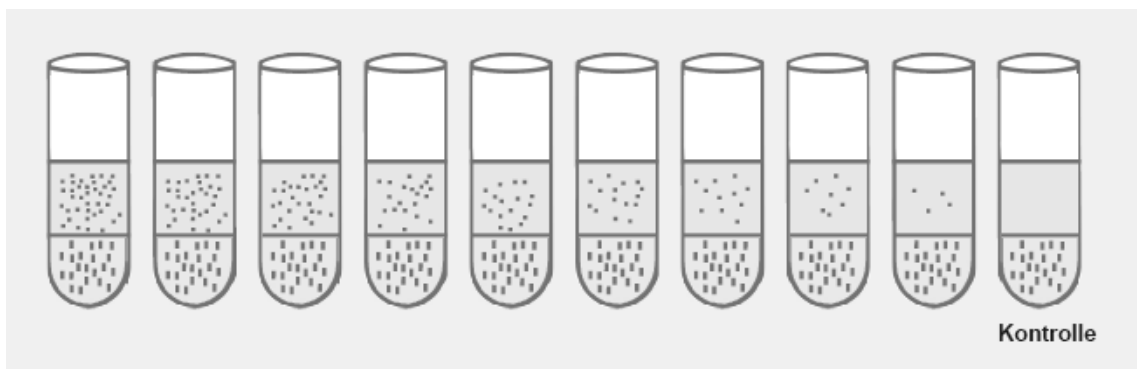


Abbildung 4b: Gemeinsame Inkubation von *P. aeruginosa* (Striche) und dem Anaerobier (Punkte). Erstes Röhrrchen Ausgangskonzentration beider Erreger gleich. Die Ausgangskonzentration des Anaerobiers nimmt ab, die von *P. aeruginosa* bleibt gleich. Kontrollröhrrchen ohne Anaerobier.

Um ebenso den Einfluss von *P. aeruginosa* auf das Wachstum von *S. constellatus* und der Anaerobier erfassen zu können, wurde bei jedem Versuch auch der Anaerobier allein unter gleichen äußeren Bedingungen inkubiert. Der Versuch wurde für *Veillonella* spp., *S. saccharolyticus* und *P. melaninogenica* jeweils 3-mal und für *S. constellatus* 4-mal unabhängig voneinander durchgeführt.

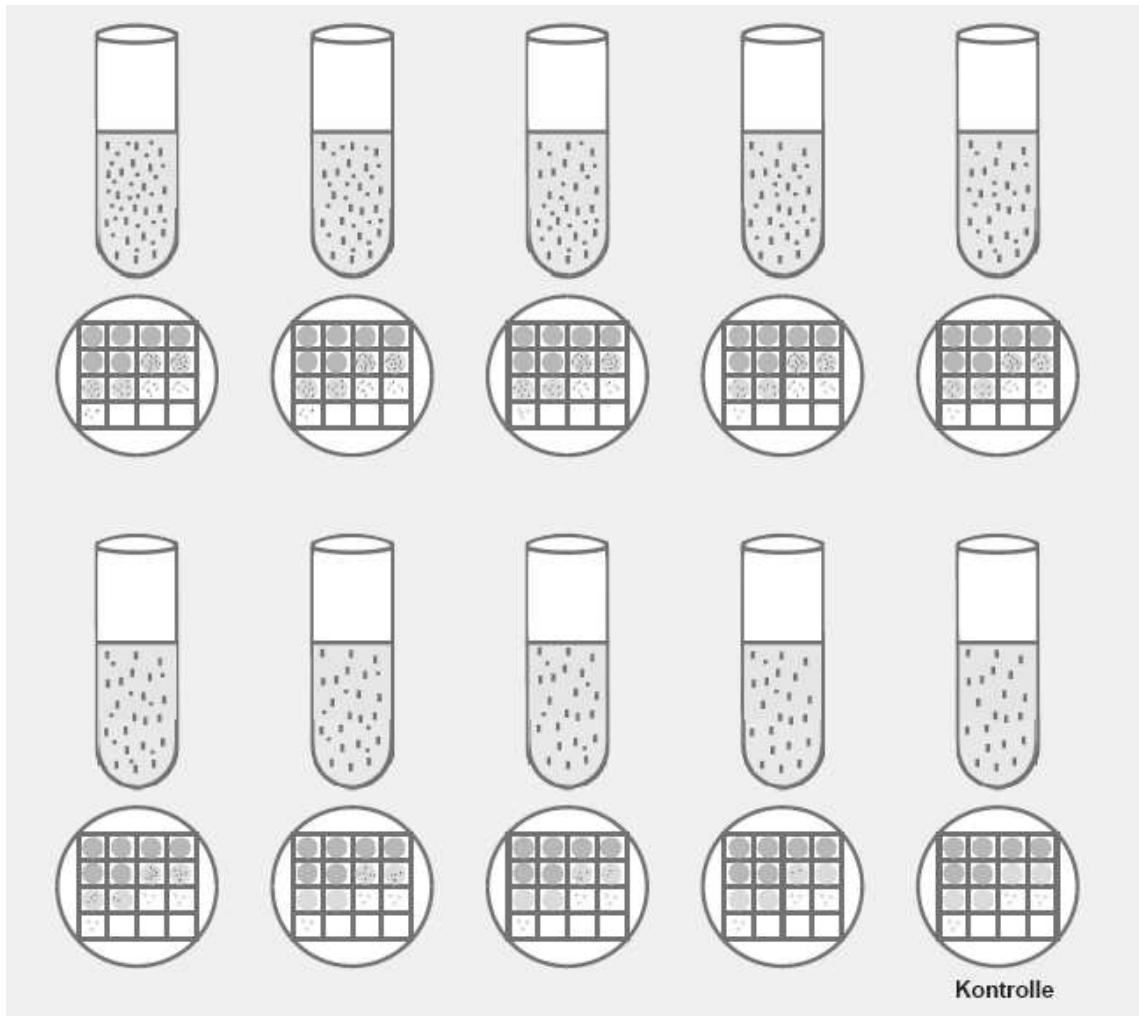


Abbildung 4c: Beurteilung des jeweiligen Wachstums nach gemeinsamer Inkubation. Für jedes der 10 Röhrchen wurde eine Verdünnungsreihe erstellt und auf SCS-Platten aufgetragen. Nach der Bebrütung wurden beide Erreger ausgezählt. Mit der Kontrolle wurde das alleinige Wachstum von *P. aeruginosa* ermittelt.

### 3.4 LAKTAT-PRODUKTION VON *S. CONSTELLATUS* UND WEITEREN ANAEROBEN BAKTERIEN

Es wurde die Laktat-Produktion von *S. constellatus* und den weiteren Anaerobiern zum Vergleich untersucht. *S. constellatus*, *S. saccharolyticus* und *Veillonella spp.* wurden dazu wie zuvor beschrieben für die Kultivierung in flüssigem TSB-Medium vorbereitet. *Veillonella spp.* und *S. saccharolyticus* wurden anschließend anaerob 48 Stunden bebrütet. Danach wurden die Bakterien der Anaerobierbank entnommen und 1 ml der Suspension in ein steriles Eppendorf-Tube gegeben. Die Bestimmung von Laktat erfolgte im Zentrallabor. Dieser Versuch wurde für *Veillonella spp.* und *S. saccharolyticus* jeweils 3-fach durchgeführt. Des Weiteren wurde die Laktat-Konzentration des TSB-Mediums bestimmt. Diese lag bei 0,7 mmol/l.

Die Laktat-Produktion von *S. constellatus* wurde nach 2, 5 und 10 Tagen ermittelt. Dazu wurde der Erreger aus 4 verschiedenen Einfrierkulturen kultiviert und in TSB-Medium gegeben. Zur Laktat-Bestimmung zum jeweiligen Zeitpunkt wurde die Bakterien-Suspension der Anaerobierbank entnommen, 1 ml der Suspension abpipettiert und der Rest anschließend zur weiteren Bebrütung zurück gestellt. Die Ermittlung des Laktat-Wertes erfolgte ebenfalls im Zentrallabor.

Im Zentrallabor des Universitätsklinikums Halle (Saale) erfolgte die quantitative Bestimmung der Konzentration an L-Laktat mit dem SYNCHRON LX<sup>®</sup>-System (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland). Zur Bestimmung sind mindestens 300 µl einer Probe erforderlich, die in ein Primärröhrchen gegeben wurden. Das SYNCHRON<sup>®</sup>-System dosiert weitere Proben- und Reagenzvolumina automatisch. Das in der Probe enthaltene Laktat wird durch die Laktatoxidase in Pyruvat umgewandelt, wobei Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) entsteht. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reagiert, katalysiert durch Peroxidase, mit Dichlorbenzolsulfonsäure (DCBSA) und 4-Aminoantipyrin (4-AAP) zu einem Chromophor. Die Bestimmung der Laktat-Konzentration erfolgt durch spektrophotometrische Messung der Extinktion, welche durch das Chromophor bewirkt wird. Das System misst die Extinktionsänderung bei einer Wellenlänge von 520 nm. Diese Extinktionsänderung ist direkt proportional zur Laktat-Konzentration der Probe und dient zur Berechnung des Wertes durch das System (Methodenblatt, SYNCHRON<sup>®</sup>-System).

### 3.5 VERSUCHE ZUM EINFLUSS VON L-LAKTAT AUF DAS WACHSTUM VON *P. AERUGINOSA*

Es sollte das Wachstum von *P. aeruginosa* in einer Lösung, welche eine Laktat-Konzentration von 20 mmol/l hat, untersucht werden. Von *P. aeruginosa* wurde eine Kolonie in TSB-Medium gegeben und für 18 h aerob im Schüttelrührer bebrütet (18 Stunden / 400 rpm / 37 °C). Danach wurde eine Stammlösung mit einer vorgegebenen Laktat-Konzentration von 400 mmol/l produziert. Dazu wurden 50 ml PBS-Puffer 1:20 (phosphate buffered saline, Phosphat gepufferte Saline) in ein steriles 250 ml Glasgefäß gegeben. Die Molare Masse (M) des Laktats (Sodium-L-lactate, Natrium-L-Lactat, Art.-Nr. 07323/970, Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) beträgt laut Herstellerangabe 112,06 g. Somit wurden für 50 ml Lösung mit einer Konzentration von 400 mmol/l genau 2,24 g Laktat benötigt. Dies wurde mit einer Waage (Feinwaage Adventure ARA 520, Ohaus GmbH, Gießen, Deutschland) abgewogen und dem PBS-Puffer zugefügt und untergemischt. Die Lösung wurde autoklaviert und zur Konzentrationsmessung ins Zentrallabor des Universitätsklinikums Halle (Saale) gegeben.

Es wurde eine Laktat-Konzentration von 438,9 mmol/l gemessen. Es folgte die Herstellung einer *P. aeruginosa*-Suspension mit OD 0,05 hergestellt. Jeweils 9,5 ml der Suspension wurden in 5 sterile Röhrchen gegeben. In 4 der 5 Röhrchen wurden zusätzlich 0,5 ml der Laktat-Lösung gegeben, so dass die Laktat-Konzentration in diesen Röhrchen etwa 20 mmol/l betrug. Die Konzentrationsbestimmung ergab einen Wert von  $21,1 \pm 1,3$  mmol/l Laktat in den Lösungen. In das 5. Röhrchen wurden 0,5 ml PBS-Puffer gegeben, um einen Kontrollversuch ohne Zugabe von Laktat durchführen zu können. Die Laktat-Konzentration in den Kontroll-Lösungen lag bei  $0,6 \pm 0,2$  mmol/l. Von dem ersten Röhrchen wurde sofort eine Verdünnungsreihe zur Keimzahlbestimmung angefertigt. Es erfolgte eine Zentrifugation (Heraeus Instruments Biofuge Primo, Kendro Laboratory Products) für 20 Minuten bei 4000 rpm und die anschließende Entnahme von 900 µl des Überstandes zur Bestimmung der Laktat-Konzentration. Vom 5. Röhrchen (ohne Laktat) wurde ebenfalls eine Verdünnungsreihe angefertigt, um einen Vergleichswert zu erhalten. Die restlichen 3 Röhrchen und das 5. Röhrchen (ohne Laktat) wurden anaerob auf dem Schüttler bei 37 °C jeweils unterschiedlich lang bebrütet (Tab. 1).

Das 5. Röhrchen wurde stets zum gleichen Zeitpunkt bearbeitet und diente als Vergleichswert (Tab. 1). Danach wurde es sofort zurück unter die Anaerobierbank gestellt. Dieser Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Tabelle 1: Bearbeitung der 5 Proben nach unterschiedlicher Lagerungsdauer

Röhrchen Nr.	Zeitpunkt der Keimzahlbestimmung
1	Nach 0 Stunden
2	Nach 24 Stunden
3	Nach 36 Stunden
4	Nach 48 Stunden
5 (ohne Laktat)	Nach 0, 24, 36 und 48 Stunden

### **3.6 VERSUCHE ZUR ELASTOLYTISCHEN AKTIVITÄT DER BAKTERIEN**

#### **3.6.1 Herstellung des elastinhaltigen Nährmediums**

Für diese Versuche wurden Agar-Platten hergestellt, welche Elastin enthalten und für die Anzucht der anspruchsvollen anaeroben Bakterien geeignet sind. Die Zusammensetzung des zur Untersuchung verwendeten Mediums orientierte sich an den Angaben von Shibata et al., (1993). Zur Herstellung der elastinhaltigen Platten wurde als Medium Hirn-Herz-Agar (Art.-Nr. 715-9580, VWR, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Dieser wurde zusätzlich versetzt mit 0,2 % Hefeextrakt (Art.-Nr. LP 0021 B, Oxoid), 5 µg/ml Hämin (Art.-Nr. DIAS 22549021, VWR) und 0,5 µg/ml Phytomenadion (Vitamin K1, Art.-Nr. SAFF 95271-250MG, VWR) (Shibata et al., 1993). Für die Herstellung von 500 ml Agar bedeutete dies im Einzelnen: In 490 ml destilliertes Wasser wurden 23,5 g Hirn-Herz-Agar-Pulver (BHI-Agar) sowie 1 g Hefeextrakt gegeben. Die Lösung wurde vorsichtig geschüttelt und im Wasserbad bei 85 °C erwärmt. In 10 ml destilliertem Wasser wurden 2,5 g Hämin aufgelöst und zur restlichen Lösung gegeben. Hinzugegeben wurden des Weiteren 0,25 g in Ethanol gelöstes Phytomenadion und dieses durch vorsichtiges Schütteln untergemischt.

Das hergestellte Gemisch wurde bei 121 °C autoklaviert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 Volumenprozent Elastin (Art.-Nr. E1625-10G, Sigma-Aldrich, USA). Nach Verabreichen von 5 g Elastin wurde die Lösung vorsichtig geschüttelt und für 10 Minuten in ein Wasserbad bei 70 °C gestellt. Nach dem Ausgießen in die Petrischalen

musste der Agar langsam abkühlen und fest werden. Die Lagerung der Agar-Platten erfolgte bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank (Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland) bei 2 bis 8 °C.

Da das Elastin nicht mit dem restlichen Agar autoklaviert werden konnte, musste vor Versuchsbeginn eine mögliche Kontamination des Elastinpulvers ausgeschlossen werden. Dazu erfolgte eine Leerbebrütung der hergestellten Platten im 37 °C warmen aeroben Brutschrank. Es wurde kein Wachstum festgestellt, die Platten waren nicht kontaminiert. Die Funktionalität der für diesen Versuch hergestellten Platten konnte mithilfe von *P. aeruginosa* demonstriert werden. Dieser zeigte nach 48 Stunden aerober Bebrütung eine deutliche Elastolyse (Abb. 5). Eine elastolytische Aktivität des flüssigen TSB-Nährmediums konnte im Leerversuch ausgeschlossen werden.

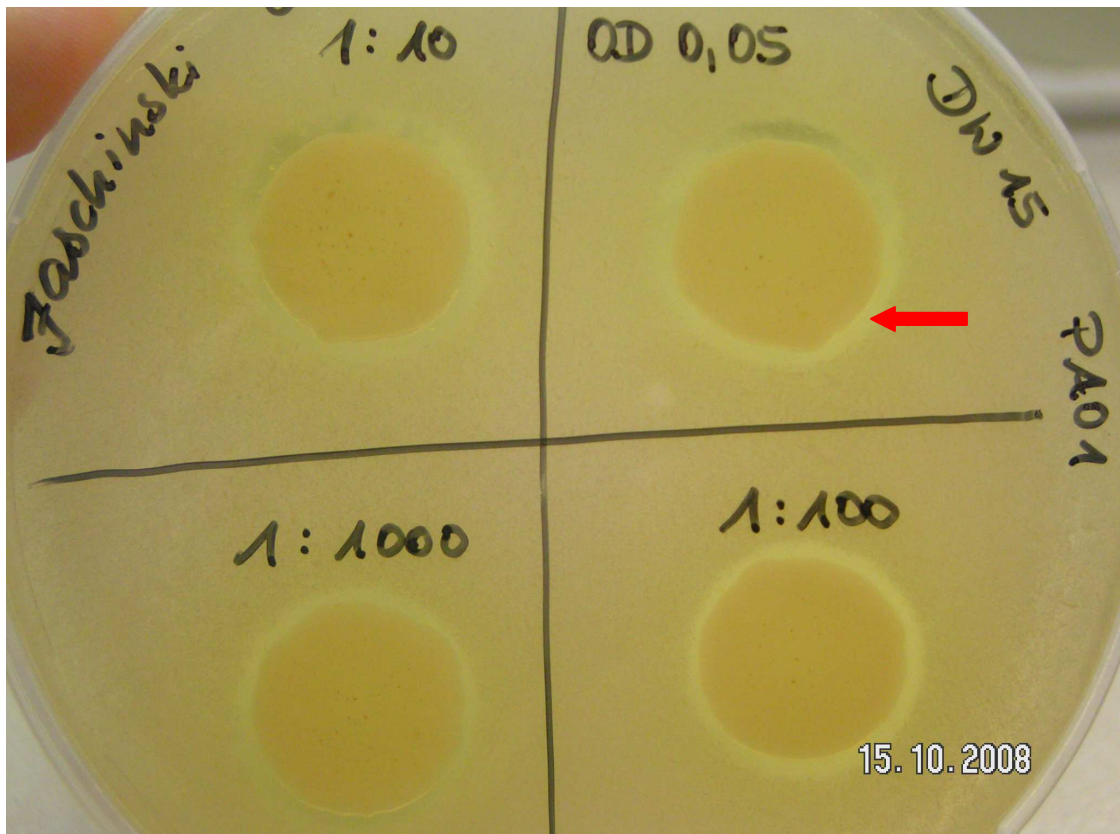


Abbildung 5: *P. aeruginosa* zeigt nach 48 Stunden aerober Bebrütung eine deutliche Elastolyse (→) in allen 4 Quadranten

### 3.6.2 Versuche zur elastolytischen Aktivität

Bei den auf elastolytische Aktivität untersuchten anaeroben Bakterien handelt es sich neben *S. constellatus* (4) im Einzelnen um folgende Patientenisolat (Tab. 2): *Veillonella* spp. (10), *S. saccharolyticus* (2), *Clostridium hastiforme* (2), *Actinomyces*



*turicensis* (2), *P. melaninogenica* (1), *Lactobacillus acidophilus* (1), *Bifidobacterium spp.* (1), *Mobiluncus mulieris* (1) sowie *Actinomyces israelii* (1). Außerdem wurde *P. aeruginosa* zweimal unabhängig voneinander unter anaeroben Bedingungen getestet.

Tabelle 2: Anzahl der auf elastolytische und hämolytische Aktivität untersuchten Anaerobierspezies (n=25)

Anaerobierspezies	Anzahl
<i>Veillonella spp.</i>	10
<i>S. constellatus</i>	4
<i>S. saccharolyticus</i>	2
<i>C. hastiforme</i>	2
<i>A. turicensis</i>	2
<i>P. melaninogenica</i>	1
<i>L. acidophilus</i>	1
<i>Bifidobacterium sp.</i>	1
<i>Mob. mulieris</i>	1
<i>A. israelii</i>	1

Es wurden einzelne Kolonien des jeweiligen Anaerobiers in 10 ml TSB-Medium gegeben und mindestens 24 Stunden bei 37 °C anaerob im Schüttelbrutschrank bei 400 rpm bebrütet. *P. aeruginosa* konnte stets nach 24 Stunden weiter verwendet werden. Die Anzucht der Anaerobier im TSB-Medium dauerte zwischen 24 und 72 Stunden. Es wurden 10 ml einer Bakterien-Suspension mit OD 0,05 hergestellt. Anschließend erfolgte die gründliche Durchmischung der entstandenen Lösung auf dem Schüttelrührer (Reagenzglasschüttler, Reax-Top, Heidolph Instruments GmbH, Kelheim, Deutschland). Diese Lösung wurde mittels Verdünnungsreihe 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt.

Die elastolytische Aktivität von *P. aeruginosa* wurde sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen untersucht. Aerob, um die Funktionalität der Platten zu testen und anaerob zum Vergleich mit *S. constellatus* und den anderen obligat anaeroben Bakterien. Die elastinhaltigen Platten wurden vor der Beimpfung in 4

Quadranten aufgeteilt und entsprechend beschriftet. Nach erneutem Durchmischen der Bakterien-Suspension wurden in die Quadranten je 10 µl der Lösung mit OD 0,05 oder einer Verdünnungsstufe aufgetragen. Anschließend wurden die beimpften Platten anaerob bebrütet. Die entstandene Elastolysezone wurde zu 3 unterschiedlichen Zeitpunkten beurteilt. Die Untersuchung der Elastolysezonen nach festgelegten Zeitintervallen war aufgrund der unterschiedlichen Generationszeiten der Bakterien nicht möglich. Insgesamt wurden 29 Proben mit Anaerobiern bearbeitet. Davon wuchsen 3 Erreger nach der Anzucht im TSB-Medium auch nach mehrmaligen Versuchen nicht mehr auf einer Agar-Platte an. Eine Probe wurde wegen Kontamination ausgeschlossen. Es konnten also 25 Proben ausgewertet werden. Um eine mögliche Beeinträchtigung des Versuchs durch das verwendete Nährmedium zu erfassen, wurde parallel im Leerversuch eine mögliche elastolytische Aktivität des flüssigen TSB-Mediums ausgeschlossen.

### **3.7 VERSUCHE ZUR HÄMOLYTISCHEN AKTIVITÄT DER BAKTERIEN**

Von den zu untersuchenden Bakterien wurden in vorgenannter Weise Suspensionen mit OD 0,05 hergestellt. In sterilen Eppendorf-Gefäßen wurden Verdünnungsreihen bis 1:1000 erstellt. Die Untersuchung der hämolytischen Aktivität der anaeroben Bakterien und von *P. aeruginosa* erfolgte auf SCS-Platten. Diese Agar-Platten enthalten 5 % Schafblut und sind damit zur Beurteilung des Hämolyseverhaltens von obligaten und fakultativen Anaerobiern geeignet (bioMérieux). Die Agar-Platten wurden in 4 Quadranten unterteilt und entsprechend beschriftet. Auf die Platten wurden nun je 10 µl Bakterien-Suspension pipettiert. Dieser Versuch wurde ebenfalls mit 25 Anaerobier-Proben und *P. aeruginosa* aerob und anaerob durchgeführt. Die Bebrütung und das Ablesen der hämolytischen Aktivität erfolgten in gleicher Weise wie bei den Versuchen zur Erfassung der elastolytischen Aktivität. Die jeweilige Hämolysezone wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit einem Lineal ausgemessen und beurteilt. Eine hämolytische Aktivität des flüssigen TSB-Mediums konnte im zweimaligen Leerversuch ausgeschlossen werden.

### **3.8 STATISTIK**

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (MW  $\pm$  STABW) angegeben (Excel, Microsoft, Redmont, Wash, U.S.A.). Der Vergleich der Keimzahlen beider Gruppen erfolgte mittels t-Test. Als signifikant wurde  $p < 0,05$  angesehen.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 ERGEBNISSE VON *S. CONSTELLATUS*

In 4 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass *P. aeruginosa* in Anwesenheit von *S. constellatus* signifikant schlechter wächst im Vergleich zur Anzucht allein. Während der Erreger allein nach 72 Stunden Bebrütung unter anaeroben Bedingungen in Keimzahlen von  $2,9 \pm 1,5 \times 10^9$  KBE/ml nachzuweisen ist (Tab. 3), wächst er nach gemeinsamer Inkubation mit *S. constellatus* unter gleichen Bedingungen mit  $3,0 \pm 5,3 \times 10^8$  KBE/ml (als MW  $\pm$  STABW aller Keimzahlen nach gemeinsamer Inkubation unabhängig von der Verdünnung des Anaerobiers) deutlich schlechter ( $p < 0,05$ ). *S. constellatus* ist somit in der Lage, das Wachstum von *P. aeruginosa* um eine Zehnerpotenz zu reduzieren.

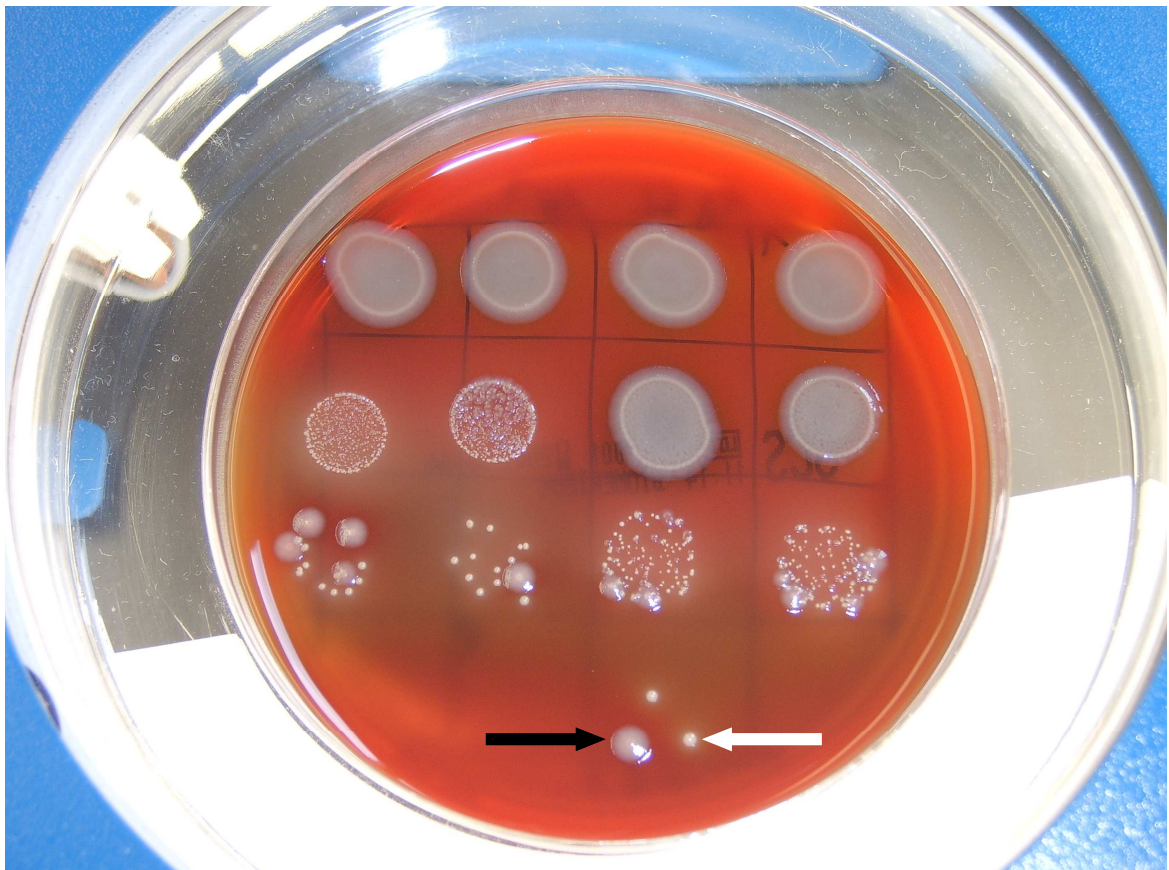


Abbildung 6: Gemeinsame Inkubation von *S. constellatus* (weißer Pfeil) und *P. aeruginosa* (schwarzer Pfeil). Noch  $10^7$ -fach verdünnt ist *S. constellatus* in der Lage in der *P. aeruginosa*-Suspension zu proliferieren. Nach 72 Stunden gemeinsamer Inkubation in flüssigem TSB-Medium sind beide Erreger auf der SCS-Platte gewachsen. *P. aeruginosa* wächst als mukoide Kolonie und in geringeren Keimzahlen als bei alleiniger Inkubation.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass *S. constellatus*, noch  $10^7$ -fach verdünnt, regelmäßig in der Lage ist, in einer unverdünnten *P. aeruginosa*-Suspension anzuwachsen (Abb. 6). Dies konnte bei 4 von 4 Versuchen erfasst werden.

Tabelle 3: Keimzahlen von *P. aeruginosa* in KBE/ml nach 72 Stunden alleiniger Inkubation

Prozessdaten	<i>P. aeruginosa</i>
1. Durchführung	$2,5 \times 10^9$
2. Durchführung	$4,5 \times 10^9$
3. Durchführung	$1,6 \times 10^9$
MW $\pm$ STABW	$2,9 \pm 1,5 \times 10^9$

Tabelle 4: Keimzahlen von *P. aeruginosa* in KBE/ml nach 72 Stunden Inkubation mit *S. constellatus* (*S. constellatus* Stamm 1, 2, 3 und 4 in ansteigender Verdünnung)

Verdünnung	<i>P. aeruginosa</i> + Stamm 1	<i>P. aeruginosa</i> + Stamm 2	<i>P. aeruginosa</i> + Stamm 3	<i>P. aeruginosa</i> + Stamm 4
OD 0,05	$3,1 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$	$3,6 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$
$10^{-1}$	$2,2 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$	$32 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$
$10^{-2}$	$1,8 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	$0,1 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$
$10^{-3}$	$1,4 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$
$10^{-4}$	$9,5 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$	$0,9 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$
$10^{-5}$	$2,7 \times 10^8$	$0,9 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$
$10^{-6}$	$1,1 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
$10^{-7}$	$2,1 \times 10^8$	$0,8 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$
$10^{-8}$	$2,0 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$	$0,8 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$

Es ist ein eingeschränktes Wachstum von *P. aeruginosa* in jeder Verdünnungsstufe des mikroaerophilen Anaerobiers zu registrieren (Tab. 4, Tab. 5).

In der Verdünnungsstufe, in der *S. constellatus* nicht mehr nachweisbar war (Verdünnungsstufe  $10^{-8}$ ), ist die Keimzahlreduktion von *P. aeruginosa* um eine Zehnerpotenz ebenfalls noch zu registrieren. Mit  $3,1 \pm 5,6 \times 10^8$  KBE/ml in den Suspensionen, in denen der mikroaerophile Anaerobier nachweislich anwächst (Verdünnungsstufen OD 0,05 bis  $10^{-7}$ ), unterscheiden sich die MW der Keimzahlen nicht wesentlich von der Suspension, in der *S. constellatus* nicht mehr anzüchtbar ist (Verdünnungsstufe  $10^{-8}$ ). Diese beträgt  $2,2 \pm 1,2 \times 10^8$  KBE/ml (Tab. 4, Tab. 5).

Tabelle 5: Keimzahlen von *P. aeruginosa* in KBE/ml als MW  $\pm$  STABW der 4 Versuche nach 72 Stunden Inkubation mit *S. constellatus*

Verdünnung <i>S. constellatus</i>	Keimzahlen von <i>P. aeruginosa</i> bei gemeinsamem Wachstum mit <i>S. constellatus</i>
OD 0,05	$4,1 \pm 2,3 \times 10^8$
$10^{-1}$	$9,5 \pm 15,0 \times 10^8$
$10^{-2}$	$1,7 \pm 0,6 \times 10^8$
$10^{-3}$	$1,5 \pm 0,5 \times 10^8$
$10^{-4}$	$3,8 \pm 4,0 \times 10^8$
$10^{-5}$	$1,7 \pm 0,8 \times 10^8$
$10^{-6}$	$1,3 \pm 0,4 \times 10^8$
$10^{-7}$	$1,5 \pm 0,6 \times 10^8$
$10^{-8}$	$2,2 \pm 1,2 \times 10^8$

Die Ermittlung des Einflusses von *P. aeruginosa* auf das Wachstum von *S. constellatus* ergab folgende Ergebnisse:

*S. constellatus* in OD 0,05 wächst nach alleiniger Inkubation für 72 Stunden unter anaeroben Verhältnissen mit  $8,4 \pm 6,6 \times 10^7$  KBE/ml (Tab. 6). Das Ergebnis wird als MW  $\pm$  STABW der 4 Versuche angegeben. Wird der mikroaerophile Anaerobier unter gleichen Bedingungen gemeinsam mit *P. aeruginosa* inkubiert, wächst er mit  $1,3 \pm 1,0 \times 10^8$  KBE/ml.

Tabelle 6: Keimzahlen von *S. constellatus* in KBE/ml nach alleiniger Inkubation für 72 Stunden

Verdünnung	Stamm 1	Stamm 2	Stamm 3	Stamm 4
OD 0,05	$1,7 \times 10^8$	$3,5 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$
$10^{-1}$	$7,0 \times 10^7$	$5,4 \times 10^7$	$5,3 \times 10^7$	$6,5 \times 10^7$
$10^{-2}$	$6,2 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	$2,5 \times 10^8$
$10^{-3}$	$6,0 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	0	$6,4 \times 10^7$
$10^{-4}$	$6,1 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$	0	$6,3 \times 10^7$
$10^{-5}$	$6,2 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$	0	$4,7 \times 10^7$
$10^{-6}$	$7,0 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$	0	$6,6 \times 10^7$
$10^{-7}$	$5,0 \times 10^7$	0	0	0
$10^{-8}$	0	0	0	0

Bei stärkerer Ausgangsverdünnung des mikroaerophilen Anaerobiers vor der gemeinsamen Inkubation wird ein positiver Effekt der Anwesenheit von *P. aeruginosa* auf das Wachstum von *S. constellatus* deutlich. Bei  $10^6$ -facher Verdünnung erhöhen sich die Keimzahlen von *S. constellatus* bei Vorhandensein von *P. aeruginosa* von  $4,5 \pm 3,2 \times 10^7$  KBE/ml auf  $7,7 \pm 2,5 \times 10^8$  KBE/ml (Tab. 6, Tab. 7). Werden nur die 3 Versuche betrachtet, bei denen *S. constellatus* im Kontrollversuch in dieser Verdünnung noch anwuchs, verändern sich die Keimzahlen von  $6,0 \pm 1,5 \times 10^7$  KBE/ml auf  $8,2 \pm 2,8 \times 10^8$  KBE/ml. Die Keimzahlerhöhung ist noch immer vorhanden.

Der mikroaerophile Anaerobier *S. constellatus* wächst demnach in Anwesenheit des fakultativen Anaerobiers *P. aeruginosa* etwa eine Zehnerpotenz besser als allein (Tab. 8). Dabei ist nicht nur ein besseres Wachstum in Form von höheren Keimzahlen zu registrieren. *S. constellatus* wächst bei gemeinsamer Inkubation in noch stärkerer Ausgangsverdünnung regelmäßig wieder an (Tab. 7).

Sowohl bei alleiniger als auch bei Inkubation mit *P. aeruginosa* wächst *S. constellatus* nach  $10^8$ -facher Verdünnung nicht mehr an (Tab. 7, Tab. 8).

Tabelle 7: Keimzahlen von *S. constellatus* in ansteigender Verdünnung in KBE/ml nach Inkubation mit *P. aeruginosa*

Verdünnung	Stamm 1 + <i>P. aeruginosa</i>	Stamm 2 + <i>P. aeruginosa</i>	Stamm 3 + <i>P. aeruginosa</i>	Stamm 4 + <i>P. aeruginosa</i>
OD 0,05	$4,5 \times 10^7$	$1,5 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$7,5 \times 10^7$
$10^{-1}$	$7,0 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	$6,5 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
$10^{-2}$	$8,5 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$	$3,9 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$
$10^{-3}$	$2,9 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$	$5,2 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$
$10^{-4}$	$5,6 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$6,5 \times 10^8$	$6,0 \times 10^7$
$10^{-5}$	$3,5 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$	$4,0 \times 10^8$	$3,6 \times 10^8$
$10^{-6}$	$8,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$	$6,0 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$
$10^{-7}$	$1,3 \times 10^9$	$9,5 \times 10^7$	$5,0 \times 10^8$	$1,2 \times 10^9$
$10^{-8}$	0	0	0	0

Tabelle 8: MW ± STABW der Keimzahlen von *S. constellatus* in KBE/ml nach 72 Stunden alleiniger Inkubation im Vergleich zur gemeinsamen Inkubation mit *P. aeruginosa*

Verdünnung <i>S. constellatus</i>	<i>S. constellatus</i>	<i>S. constellatus</i> + <i>P. aeruginosa</i>
OD 0,05	$8,4 \pm 6,6 \times 10^7$	$1,3 \pm 1,0 \times 10^8$
$10^{-1}$	$6,1 \pm 0,8 \times 10^7$	$2,5 \pm 2,7 \times 10^8$
$10^{-2}$	$9,3 \pm 10,6 \times 10^7$	$2,1 \pm 1,3 \times 10^8$
$10^{-3}$	$3,7 \pm 3,0 \times 10^7$	$4,3 \pm 2,7 \times 10^8$
$10^{-4}$	$7,1 \pm 6,6 \times 10^7$	$3,7 \pm 2,8 \times 10^8$
$10^{-5}$	$3,4 \pm 2,7 \times 10^7$	$5,5 \pm 3,7 \times 10^8$
$10^{-6}$	$4,5 \pm 3,2 \times 10^7$	$7,7 \pm 2,5 \times 10^8$
$10^{-7}$	$1,3 \pm 2,5 \times 10^7$	$7,7 \pm 5,8 \times 10^8$
$10^{-8}$	0	0

Werden *P. aeruginosa* und *S. constellatus* in gleicher Ausgangskonzentration gemeinsam anaerob inkubiert, wachsen beide Erreger nach 72 Stunden noch immer in annähernd gleichen Keimzahlen. Werden beide Bakterien in OD 0,05 zusammengegeben, wächst *S. constellatus* mit  $1,3 \pm 1,0 \times 10^8$  KBE/ml ähnlich stark wie *P. aeruginosa* mit  $4,1 \pm 2,3 \times 10^8$  KBE/ml. Wird *S. constellatus* vor der gemeinsamen Inkubation  $10^7$ -fach verdünnt, sind beide Erreger nach 72 Stunden gemeinsamer Inkubation trotzdem gleich stark in der Suspension konzentriert. Die Keimzahlen sind mit  $7,7 \pm 5,8 \times 10^8$  KBE/ml (*S. constellatus*) und  $1,5 \pm 0,6 \times 10^8$  KBE/ml (*P. aeruginosa*) vergleichbar (Tab. 9).

Tabelle 9: Vergleich der Keimzahlen von *S. constellatus* und *P. aeruginosa* in KBE/ml nach 72 Stunden gemeinsamer Inkubation. Zeile 1 und 2: beide Erreger in OD 0,05. Zeile 3 und 4: *P. aeruginosa* in OD 0,05 und *S. constellatus*  $10^7$ -fach verdünnt

Bakterien-Suspension	Stamm 1	Stamm 2	Stamm 3	Stamm 4	MW $\pm$ STABW
<i>S. constellatus</i> OD 0,05	$4,5 \times 10^7$	$1,5 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$7,5 \times 10^7$	$1,3 \pm 1,0 \times 10^8$
<i>P. aeruginosa</i> OD 0,05	$3,1 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$	$3,6 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$4,1 \pm 2,3 \times 10^8$
<i>S. constellatus</i> $10^{-7}$	$1,3 \times 10^9$	$9,5 \times 10^7$	$5,0 \times 10^8$	$1,2 \times 10^9$	$7,7 \pm 5,6 \times 10^8$
<i>P. aeruginosa</i> OD 0,05	$2,1 \times 10^8$	$7,5 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$1,5 \pm 0,6 \times 10^8$

Die Laktat-Konzentration in der *S. constellatus*-Suspension beträgt nach 2 Tagen durchschnittlich  $22,0 \pm 0,3$  mmol/l. Nach 5 Tagen lag die Laktat-Konzentration in der Bakterien-Suspension bei  $23,2 \pm 1,2$  mmol/l, nach 10 Tagen bei  $24,1 \pm 0,6$  mmol/l. Diese Werte liegen deutlich über dem Leerwert für das TSB-Medium. Das gemessene Laktat wurde demnach von *S. constellatus* produziert (Tab. 10).



Tabelle 10: Laktat-Konzentration in mmol/l einer *S. constellatus*-Suspension

Zeitpunkt	Stamm 1	Stamm 2	Stamm 3	Stamm 4
2 Tage	22,3	22,1	21,6	21,9
5 Tage	22,9	23,9	21,6	24,3
10 Tage	24,0	23,3	24,8	24,2

#### 4.2 ERGEBNISSE VON *S. SACCHAROLYTICUS*

Die gemeinsame Inkubation von *P. aeruginosa* mit dem obligaten Anaerobier *S. saccharolyticus* hat keinen Einfluss auf dessen Wachstum. *P. aeruginosa* wächst unabhängig von der Anwesenheit des obligaten Anaerobiers gleich stark (Tab. 11, Tab. 12). Die MW der Keimzahlen der Suspensionen aller Verdünnungsstufen mit dem obligaten Anaerobier sind mit  $2,3 \pm 1,0 \times 10^9$  KBE/ml mit denjenigen vergleichbar, in der *P. aeruginosa* allein inkubiert wurde. Diese beträgt  $2,9 \pm 1,5 \times 10^9$  KBE/ml. Dies konnte 3-mal unabhängig voneinander demonstriert werden.

Tabelle 11: Keimzahlen von *P. aeruginosa* in KBE/ml nach 72 Stunden gemeinsamer Inkubation mit *S. saccharolyticus* in ansteigender Verdünnung

Verdünnung	<i>P. aeruginosa</i> + <i>S. saccharolyticus</i> 1	<i>P. aeruginosa</i> + <i>S. saccharolyticus</i> 2	<i>P. aeruginosa</i> + <i>S. saccharolyticus</i> 3
OD 0,05	$2,3 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$	$2,1 \times 10^8$
$10^{-1}$	$3,2 \times 10^9$	$3,1 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$
$10^{-2}$	$1,9 \times 10^9$	$2,7 \times 10^9$	$2,8 \times 10^9$
$10^{-3}$	$2,0 \times 10^9$	$3,6 \times 10^9$	$2,8 \times 10^9$
$10^{-4}$	$3,1 \times 10^9$	$4,4 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$
$10^{-5}$	$1,8 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	$3,4 \times 10^9$
$10^{-6}$	$2,2 \times 10^9$	$2,6 \times 10^9$	$7,5 \times 10^8$
$10^{-7}$	$3,1 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$	$2,0 \times 10^8$
$10^{-8}$	$1,5 \times 10^9$	$2,9 \times 10^9$	$2,0 \times 10^8$

Während *S. constellatus* also in der Lage ist, das Wachstum von *P. aeruginosa* nach 72 Stunden gemeinsamer Inkubation von  $2,9 \pm 1,5 \times 10^9$  KBE/ml auf  $3,0 \pm 5,3 \times 10^8$  KBE/ml zu reduzieren, hat die Anwesenheit von *S. saccharolyticus* keinen Einfluss auf dessen Wachstum.

Tabelle 12: Keimzahlen von *P. aeruginosa* in KBE/ml als MW  $\pm$  STABW der 3 Versuche nach 72 Stunden Inkubation mit *S. saccharolyticus*

Verdünnung <i>S. saccharolyticus</i>	<i>P. aeruginosa</i> + <i>S. saccharolyticus</i> in KBE/ml
OD 0,05	$1,8 \pm 1,4 \times 10^9$
$10^{-1}$	$2,7 \pm 0,7 \times 10^9$
$10^{-2}$	$2,4 \pm 0,5 \times 10^9$
$10^{-3}$	$2,8 \pm 0,7 \times 10^9$
$10^{-4}$	$3,1 \pm 1,2 \times 10^9$
$10^{-5}$	$2,5 \pm 0,8 \times 10^9$
$10^{-6}$	$1,9 \pm 1,0 \times 10^9$
$10^{-7}$	$2,1 \pm 1,6 \times 10^9$
$10^{-8}$	$1,5 \pm 1,3 \times 10^9$

*S. saccharolyticus* ist in der Lage, in einer unverdünnten *P. aeruginosa*-Suspension bis zu einer  $10^6$ -fachen Verdünnung anzuwachsen. Dies konnte bei 2 von 3 Versuchen gezeigt werden. Ebenso wie *S. constellatus* wächst der obligate Anaerobier auch nach starker Verdünnung noch in der Suspension an. Die Keimzahlen von *P. aeruginosa* in einer Suspension in der auch *S. saccharolyticus* noch anwächst (OD 0,05 bis Verdünnungsstufe  $10^6$ ) waren mit  $2,5 \pm 0,9 \times 10^9$  KBE/ml mit denen vergleichbar, in denen der obligate Anaerobier nicht mehr nachzuweisen ist (Verdünnungsstufe  $10^{-7}$  und  $10^{-8}$ ). Diese lagen bei  $1,8 \pm 1,4 \times 10^9$  KBE/ml.

Bei *S. saccharolyticus* kann hinsichtlich der Keimzahlveränderung kein Vorteil aus der Anwesenheit des fakultativen Anaerobiers *P. aeruginosa* registriert werden. Es ist kein signifikanter Wachstumsunterschied zu registrieren.

Tabelle 13: Keimzahlen von *S. saccharolyticus* in KBE/ml nach alleiniger Inkubation

Verdünnung	<i>S. saccharolyticus</i> 1	<i>S. saccharolyticus</i> 2	<i>S. saccharolyticus</i> 3
OD 0,05	$3,7 \times 10^8$	$6,5 \times 10^4$	$2,8 \times 10^6$
$10^{-1}$	$4,4 \times 10^8$	$3,4 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$
$10^{-2}$	0	0	0
$10^{-3}$	0	0	0
$10^{-4}$	0	0	0
$10^{-5}$	0	0	0
$10^{-6}$	0	0	0
$10^{-7}$	0	0	0
$10^{-8}$	0	0	0

Tabelle 14: Keimzahlen von *S. saccharolyticus* in KBE/ml nach gemeinsamer Inkubation mit *P. aeruginosa*

Verdünnung	<i>S. saccharolyticus</i> 1 + <i>P. aeruginosa</i>	<i>S. saccharolyticus</i> 2 + <i>P. aeruginosa</i>	<i>S. saccharolyticus</i> 3 + <i>P. aeruginosa</i>
OD 0,05	$8,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$7,0 \times 10^6$
$10^{-1}$	$1,1 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$
$10^{-2}$	$8,0 \times 10^6$	$1,3 \times 10^5$	$4,2 \times 10^7$
$10^{-3}$	$3,0 \times 10^6$	$2,4 \times 10^5$	$3,8 \times 10^7$
$10^{-4}$	$8,5 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$6,0 \times 10^7$
$10^{-5}$	$6,5 \times 10^6$	$4,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^7$
$10^{-6}$	$4,3 \times 10^5$	0	$1,1 \times 10^7$
$10^{-7}$	$1,3 \times 10^5$	0	0
$10^{-8}$	0	0	0

In 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen, konnte jedoch gezeigt werden, dass *S. saccharolyticus* nach 72 h alleiniger Inkubation bereits nach  $10^2$ -facher Verdünnung nicht mehr anwächst (Tab. 13). Die Keimzahlen von

*S. saccharolyticus* OD 0,05 ändern sich von  $1,2 \pm 2,1 \times 10^8$  KBE/ml (allein) auf  $3,2 \pm 4,1 \times 10^7$  KBE/ml (mit *P. aeruginosa*). Bei 10-facher Verdünnung des obligaten Anaerobiers ändern sich die Werte von  $1,5 \pm 2,5 \times 10^8$  KBE/ml auf  $1,8 \pm 0,9 \times 10^7$  KBE/ml. Die Anwesenheit des fakultativen Anaerobiers hat in Bezug auf die Keimzahlen in diesen Verdünnungsstufen eher einen negativen Effekt auf das Wachstum des obligaten Anaerobiers.

Tabelle 15: Keimzahlen von *S. saccharolyticus* in KBE/ml in ansteigender Verdünnung nach 72 Stunden alleiniger Inkubation im Vergleich zur gemeinsamen Inkubation mit *P. aeruginosa*

Verdünnung <i>S. saccharolyticus</i>	<i>S. saccharolyticus</i>	<i>S. saccharolyticus</i> + <i>P. aeruginosa</i>
OD 0,05	$1,2 \pm 2,1 \times 10^8$	$3,2 \pm 4,1 \times 10^7$
$10^{-1}$	$1,5 \pm 2,5 \times 10^8$	$1,7 \pm 0,9 \times 10^7$
$10^{-2}$	0	$1,7 \pm 2,2 \times 10^7$
$10^{-3}$	0	$1,6 \pm 2,1 \times 10^7$
$10^{-4}$	0	$2,0 \pm 3,4 \times 10^7$
$10^{-5}$	0	$6,3 \pm 5,7 \times 10^6$
$10^{-6}$	0	$3,8 \pm 6,2 \times 10^6$
$10^{-7}$	0	$4,3 \pm 7,5 \times 10^4$
$10^{-8}$	0	0

Der obligate Anaerobier *S. saccharolyticus* wächst nach gemeinsamer Inkubation mit dem fakultativen Anaerobier *P. aeruginosa* zwar in geringeren Keimzahlen, jedoch ist er regelmäßig bis zu einer  $10^5$ -fachen Verdünnung nachweisbar (Tab. 14, Tab. 15). Dies konnte in 3 von 3 Versuchen gezeigt werden. Diesen Aspekt betrachtend, kann ein positiver Effekt aus der Anwesenheit des fakultativen Anaerobiers ermittelt werden.

Werden *P. aeruginosa* und *S. saccharolyticus* in gleicher Konzentration gemeinsam anaerob inkubiert, wächst *P. aeruginosa* deutlich stärker als der obligate Anaerobier. Werden beide Bakterien in OD 0,05 zusammengegeben, wächst *S. saccharolyticus* mit  $3,2 \pm 4,1 \times 10^7$  KBE/ml eindeutig schwächer als *P. aeruginosa* mit  $1,8 \pm 1,4 \times 10^9$  KBE/ml. Wird *S. saccharolyticus* vor der gemeinsamen Inkubation  $10^5$ -fach verdünnt, kann der Erreger die Keimzahlen von *P. aeruginosa* ebenso nicht erreichen. Die

Auszählung der Keimzahlen ergab für *S. saccharolyticus*  $6,3 \pm 5,8 \times 10^6$  KBE/ml und  $2,5 \pm 0,8 \times 10^9$  KBE/ml für *P. aeruginosa* (Tab. 16).

Tabelle 16: Vergleich der Keimzahlen von *S. saccharolyticus* und *P. aeruginosa* in KBE/ml nach 72 Stunden gemeinsamer Inkubation. Zeile 1 und 2: beide Erreger in OD 0,05. Zeile 3 und 4: *S. saccharolyticus*  $10^5$ -fach verdünnt und *P. aeruginosa* in OD 0,05

Bakterien-Suspension	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	MW $\pm$ STABW
<i>S. saccharolyticus</i> OD 0,05	$8,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$7,0 \times 10^6$	$3,2 \pm 4,1 \times 10^7$
<i>P. aeruginosa</i> OD 0,05	$2,3 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$	$2,1 \times 10^8$	$1,8 \pm 1,4 \times 10^9$
<i>S. saccharolyticus</i> $10^{-5}$	$6,5 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^7$	$6,3 \pm 5,8 \times 10^6$
<i>P. aeruginosa</i> OD 0,05	$1,8 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	$3,4 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,8 \times 10^9$

Die Messung der Laktat-Konzentrationen in einer *S. saccharolyticus*-Suspension nach unterschiedlichen Zeiten ergab folgende Werte:

Nach 2 Tagen lag die Laktat-Konzentration der *S. saccharolyticus*-Suspension durchschnittlich bei  $0,6 \pm 0,5$  mmol/l. Dieser Wert liegt unterhalb des für das Medium ermittelten Leerwertes. Es kann davon ausgegangen werden, dass *S. saccharolyticus* kein Laktat produziert (Tab. 17).

Tabelle 17: Laktat-Konzentration in mmol/l einer *S. saccharolyticus*-Suspension

Substrat	<i>S. saccharolyticus</i> 1	<i>S. saccharolyticus</i> 2	<i>S. sachharolyticus</i> 3
Laktat	< 0,3	1,2	< 0,3

**4.3 ERGEBNISSE VON VEILLONELLA SPP.**

*Veillonella spp.* hat ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum von *P. aeruginosa*. Der fakultative Anaerobier *P. aeruginosa* wächst unbeeinflusst von der Anwesenheit des obligaten Anaerobiers (Tab. 18, Tab. 19). Die Keimzahlen mit obligatem Anaerobier ( $1,9 \pm 1,4 \times 10^9$  KBE/ml) sind vergleichbar mit den Keimzahlen nach alleiniger Inkubation ( $2,9 \pm 1,5 \times 10^9$  KBE/ml). Dies konnte in 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen gezeigt werden.

Tabelle 18: Keimzahlen von *P. aeruginosa* in KBE/ml nach 72 Stunden Inkubation mit *Veillonella spp.* in ansteigender Verdünnung

Verdünnung	<i>P. aeruginosa</i> + <i>Veillonella spp.</i> 1	<i>P. aeruginosa</i> + <i>Veillonella spp.</i> 2	<i>P. aeruginosa</i> + <i>Veillonella spp.</i> 3
OD 0,05	$1,2 \times 10^8$	$3,0 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$
$10^{-1}$	$1,1 \times 10^8$	$3,4 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$
$10^{-2}$	$1,5 \times 10^8$	$3,3 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$
$10^{-3}$	$1,4 \times 10^8$	$3,6 \times 10^9$	$3,5 \times 10^9$
$10^{-4}$	$1,2 \times 10^8$	$3,8 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$
$10^{-5}$	$1,4 \times 10^8$	$2,2 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$
$10^{-6}$	$1,0 \times 10^8$	$3,8 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$
$10^{-7}$	$1,3 \times 10^8$	$2,7 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$
$10^{-8}$	$4,4 \times 10^8$	$3,1 \times 10^9$	$2,9 \times 10^9$

Im Vergleich zu *S. constellatus*, der das Wachstum von *P. aeruginosa* nach 72 Stunden gemeinsamer Inkubation um eine Zehnerpotenz reduziert, hat *Veillonella spp.* keinen Einfluss auf das Wachstum des fakultativen Anaerobiers.

*Veillonella spp.* ist in der Lage trotz einer  $10^7$ -fachen Verdünnung, in einer unverdünnten *P. aeruginosa*-Suspension anzuwachsen. Dies konnte in 2 von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen gezeigt werden. In ebenso starker Verdünnung wie *S. constellatus*, ist *Veillonella spp.* in der Lage, in der Suspension mit dem fakultativen Anaerobier anzuwachsen. Dabei sind die MW der Keimzahlen von *P. aeruginosa* in den Verdünnungsstufen, in denen der obligate Anaerobier nachweisbar ist (Verdünnungsstufen OD 0,05 bis  $10^{-7}$ ) mit  $1,9 \pm 1,4 \times 10^9$  KBE/ml mit

der vergleichbar, in der *Veillonella spp.* nicht mehr anwächst (Verdünnungsstufe  $10^{-8}$ ). Diese beträgt  $2,2 \pm 1,5 \times 10^9$  KBE/ml.

Tabelle 19: Keimzahlen von *P. aeruginosa* in KBE/ml als MW  $\pm$  STABW der 3 Versuche nach 72 Stunden Inkubation mit *Veillonella spp.*

Verdünnung <i>Veillonella spp.</i>	<i>P. aeruginosa</i> + <i>Veillonella spp.</i> In KBE/ml
OD 0,05	$1,9 \pm 1,5 \times 10^9$
$10^{-1}$	$1,6 \pm 1,6 \times 10^9$
$10^{-2}$	$1,9 \pm 1,6 \times 10^9$
$10^{-3}$	$2,4 \pm 2,0 \times 10^9$
$10^{-4}$	$2,0 \pm 1,8 \times 10^9$
$10^{-5}$	$1,6 \pm 1,3 \times 10^9$
$10^{-6}$	$2,0 \pm 1,9 \times 10^9$
$10^{-7}$	$1,5 \pm 1,3 \times 10^9$
$10^{-8}$	$2,2 \pm 1,5 \times 10^9$

*Veillonella spp.* wächst unabhängig von der Anwesenheit von *P. aeruginosa* in annähernd gleichen Keimzahlen (Tab. 20). In der Suspension mit OD 0,05 wächst *Veillonella spp.* mit  $3,2 \pm 1,6 \times 10^8$  KBE/ml (allein) und  $1,7 \pm 1,8 \times 10^8$  KBE/ml (mit *P. aeruginosa*) annähernd gleich. Es ist kein Wachstumsunterschied zu registrieren (Tab. 22).

Bei alleiniger Inkubation ist der obligate Anaerobier, *Veillonella spp.*, nach  $10^2$ -facher Verdünnung in 2 von 3 Versuchen nicht mehr nachweisbar (Tab. 20). Bei Inkubation mit *P. aeruginosa* wächst *Veillonella spp.* in 2 von 3 Versuchen auch nach  $10^7$ -facher Verdünnung noch an (Tab. 21, Abb. 7).

Tabelle 20: Keimzahlen von *Veillonella spp.* in KBE/ml nach alleiniger Inkubation

Verdünnung	<i>Veillonella spp. 1</i>	<i>Veillonella spp. 2</i>	<i>Veillonella spp. 3</i>
OD 0,05	$2,9 \times 10^8$	$4,9 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$
$10^{-1}$	$9,5 \times 10^7$	$6,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
$10^{-2}$	0	$5,5 \times 10^8$	0
$10^{-3}$	0	$6,5 \times 10^8$	0
$10^{-4}$	0	$4,7 \times 10^8$	0
$10^{-5}$	0	$5,3 \times 10^8$	0
$10^{-6}$	0	$3,6 \times 10^8$	0
$10^{-7}$	0	0	0
$10^{-8}$	0	0	0

Tabelle 21: Keimzahlen von *Veillonella spp.* in KBE/ml nach gemeinsamer Inkubation mit *P. aeruginosa*

Verdünnung <i>Veillonella spp.</i>	<i>Veillonella spp. 1 + P. aeruginosa</i>	<i>Veillonella spp. 2 + P. aeruginosa</i>	<i>Veillonella spp. 3 + P. aeruginosa</i>
OD 0,05	$3,8 \times 10^8$	$6,1 \times 10^7$	$6,0 \times 10^7$
$10^{-1}$	$3,9 \times 10^8$	$5,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$
$10^{-2}$	$7,0 \times 10^8$	$5,2 \times 10^7$	$8,0 \times 10^7$
$10^{-3}$	$6,8 \times 10^8$	$2,6 \times 10^7$	$5,5 \times 10^7$
$10^{-4}$	$7,1 \times 10^8$	$4,8 \times 10^7$	$7,5 \times 10^7$
$10^{-5}$	$6,4 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	$6,5 \times 10^7$
$10^{-6}$	$4,8 \times 10^8$	$8,0 \times 10^7$	$8,5 \times 10^7$
$10^{-7}$	$5,9 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	0
$10^{-8}$	0	0	0



Tabelle 22: Keimzahlen von *Veillonella spp.* in KBE/ml als MW  $\pm$  STABW der 3 Versuche in ansteigender Verdünnung nach 72 Stunden alleiniger Inkubation im Vergleich zur gemeinsamen Inkubation mit *P. aeruginosa*

Verdünnung	<i>Veillonella spp.</i>	<i>Veillonella spp.</i> + <i>P. aeruginosa</i>
OD 0,05	$3,2 \pm 1,6 \times 10^8$	$1,7 \pm 1,8 \times 10^8$
$10^{-1}$	$2,9 \pm 3,1 \times 10^8$	$1,8 \pm 1,8 \times 10^8$
$10^{-2}$	$1,8 \pm 3,2 \times 10^8$	$2,8 \pm 3,7 \times 10^8$
$10^{-3}$	$2,2 \pm 3,8 \times 10^8$	$2,5 \pm 3,7 \times 10^8$
$10^{-4}$	$1,6 \pm 2,7 \times 10^8$	$2,8 \pm 3,7 \times 10^8$
$10^{-5}$	$1,8 \pm 3,1 \times 10^8$	$2,7 \pm 3,2 \times 10^8$
$10^{-6}$	$1,2 \pm 2,1 \times 10^8$	$2,2 \pm 2,3 \times 10^8$
$10^{-7}$	0	$2,3 \pm 3,2 \times 10^8$
$10^{-8}$	0	0

Werden *P. aeruginosa* und *Veillonella spp.* in gleicher Konzentration gemeinsam anaerob inkubiert, wächst *P. aeruginosa* stärker als der obligate Anaerobier. Werden beide Bakterien in OD 0,05 zusammengegeben, wächst *Veillonella spp.* mit  $1,7 \pm 1,8 \times 10^8$  KBE/ml schwächer als *P. aeruginosa* mit  $1,9 \pm 1,5 \times 10^9$  KBE/ml. Wird jedoch *Veillonella spp.* vor der gemeinsamen Inkubation  $10^5$ -fach verdünnt, ergeben sich folgende Keimzahlen: für *Veillonella spp.*  $2,2 \pm 2,3 \times 10^8$  KBE/ml und für *P. aeruginosa*  $2,0 \pm 1,9 \times 10^9$  KBE/ml (Tab. 23). Der Wachstumsunterschied ist im Vergleich nicht so groß wie bei *S. saccharolyticus*.

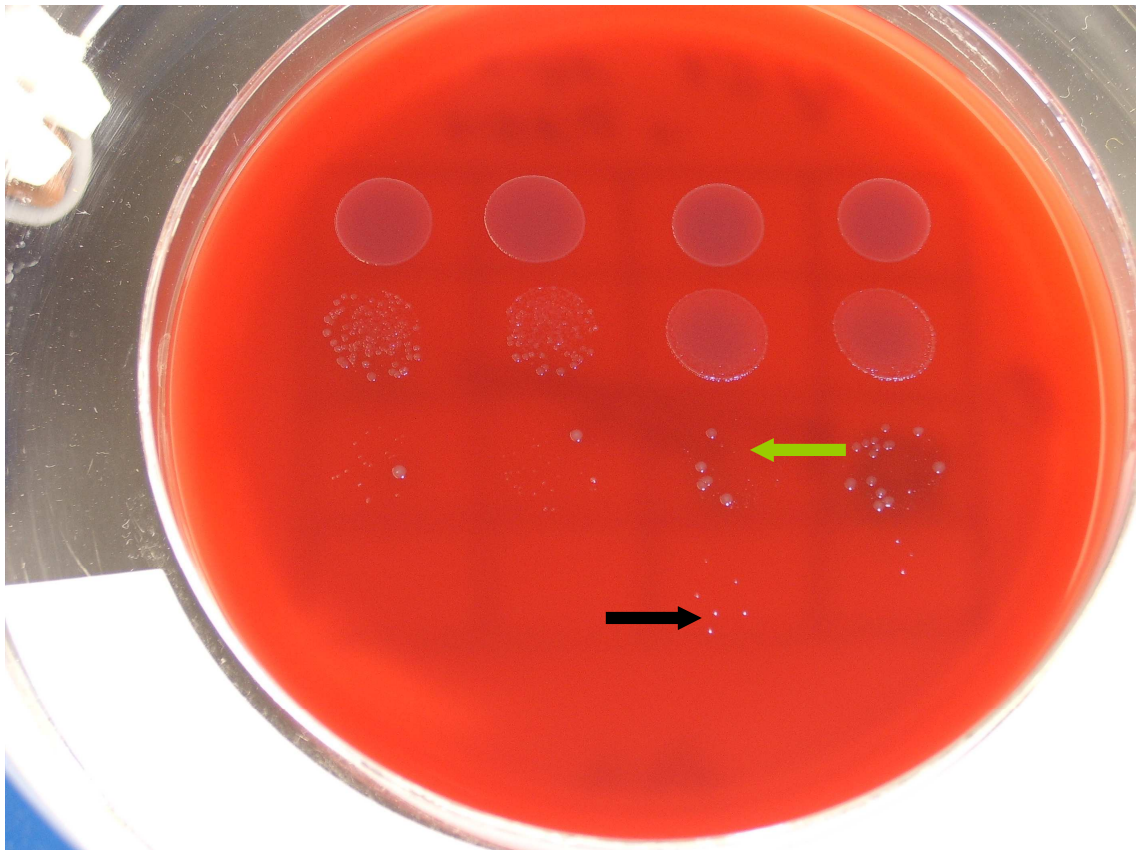


Abbildung 7: *Veillonella spp.* (→)  $10^7$ -fach verdünnt nach 72 Stunden gemeinsamer Inkubation mit *P. aeruginosa* OD 0,05; *P. aeruginosa* (→) wächst als „small colony“.

Tabelle 23: Vergleich der Keimzahlen von *Veillonella spp.* und *P. aeruginosa* in KBE/ml nach 72 Stunden gemeinsamer Inkubation. Zeile 1 und 2: beide Erreger in OD 0,05. Zeile 3 und 4: *P. aeruginosa* in OD 0,05 und *Veillonella spp.*  $10^5$ -fach verdünnt

Bakterien-Suspension	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	MW ± STABW
<i>Veillonella spp.</i> OD 0,05	$3,8 \times 10^8$	$6,1 \times 10^7$	$6,0 \times 10^7$	$1,7 \pm 1,8 \times 10^8$
<i>P. aeruginosa</i> OD 0,05	$1,2 \times 10^8$	$3,0 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$1,9 \pm 1,5 \times 10^9$
<i>Veillonella spp.</i> $10^{-5}$	$4,8 \times 10^8$	$8,0 \times 10^7$	$8,5 \times 10^7$	$2,2 \pm 2,3 \times 10^8$
<i>P. aeruginosa</i> OD 0,05	$1,0 \times 10^8$	$3,8 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$	$2,0 \pm 1,9 \times 10^9$

Die Laktat-Konzentration der *Veillonella spp.*-Suspension nach 2 Tagen lag durchschnittlich bei  $0,3 \pm 0$  mmol/l. Dieser Wert liegt unter dem für das Medium ermittelten Leerwert von 0,7 mmol/l. Es wird davon ausgegangen, dass *Veillonella spp.* kein Laktat produziert (Tab. 24).

Tabelle 24: Laktat-Konzentration in mmol/l einer *Veillonella spp.*-Suspension

Substrat	<i>Veillonella spp.</i> 1	<i>Veillonella spp.</i> 2	<i>Veillonella spp.</i> 3
Laktat	< 0,3	< 0,3	< 0,3

#### 4.4 VERGLEICH DER ERGEBNISSE DER ANAEROBIER

Während *S. constellatus* das Wachstum von *P. aeruginosa* reduziert, haben *S. saccharolyticus* und *Veillonella spp.* keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum des fakultativen Anaerobiers (Abb. 8).

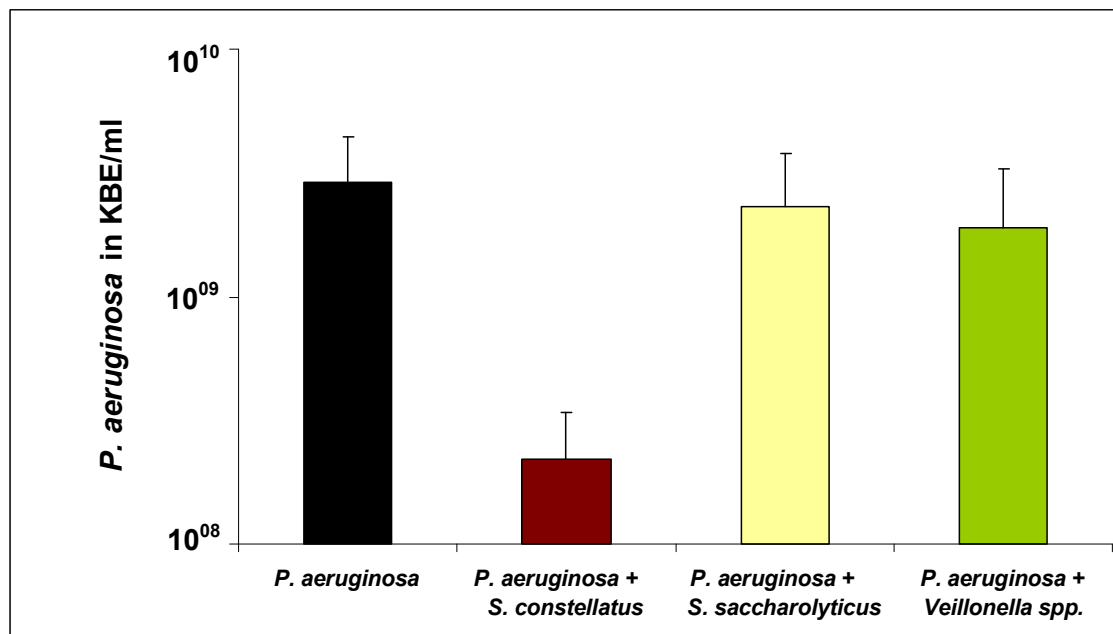


Abbildung 8: Keimzahlen von *P. aeruginosa* nach alleiniger Inkubation ■ ( $2,9 \pm 1,5 \times 10^9$  KBE/ml), Inkubation mit *S. constellatus* ■ ( $2,2 \pm 1,2 \times 10^8$  KBE/ml), *S. saccharolyticus* ■ ( $2,3 \pm 1,5 \times 10^9$  KBE/ml) und *Veillonella spp.* ■ ( $1,9 \pm 1,4 \times 10^9$  KBE/ml). Während die Anwesenheit von *S. saccharolyticus* und *Veillonella spp.* keinen Einfluss auf das Wachstum von *P. aeruginosa* hat, kommt es bei Inkubation mit *S. constellatus* zur Reduktion des Wachstums um eine Zehnerpotenz.

Die Wachstumsversuche nach vorheriger gemeinsamer Inkubation betrachtend, kann ebenso zusammenfassend festgehalten werden, dass sowohl *S. constellatus* als auch *S. saccharolyticus* und *Veillonella spp.*, selbst nach Verdünnung um mehrere Zehnerpotenzen, in der Lage sind, in einer unverdünnten *P. aeruginosa*-Suspension zu proliferieren.

Außerdem konnte registriert werden, dass *S. constellatus* von der Anwesenheit von *P. aeruginosa* profitiert. *S. saccharolyticus* profitiert insofern, als dass der Erreger zumindest in stärkerer Verdünnung weiter anwächst, jedoch in geringeren Keimzahlen. Auch *Veillonella spp.* kann mit dem fakultativen Anaerobier in höherer Verdünnung noch anwachsen, ein signifikanter Effekt auf die Keimzahlen des obligaten Anaerobiers ist jedoch nicht zu verzeichnen.

Die Laktat-Produktion von *S. constellatus* ist deutlich höher als die von *Veillonella spp.* und *S. saccharolyticus*. Die Laktat-Konzentration in der *S. constellatus*-Suspension war mehr als 20-fach höher als in den anderen Bakterien-Suspensionen (Abb. 9).

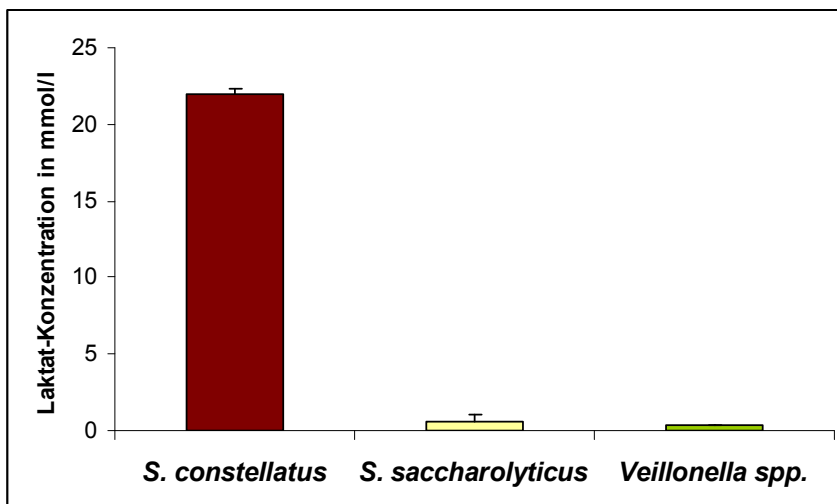


Abbildung 9: Laktat-Konzentration der Bakterien-Suspensionen nach 48 Stunden. *S. constellatus* ■ mit  $22,0 \pm 0,3$  mmol/l, *S. saccharolyticus* ■ mit  $0,6 \pm 0,5$  mmol/l und *Veillonella spp.* ■ mit  $0,3 \pm 0$  mmol/l Laktat

#### 4.5 EINFLUSS VON L-LAKTAT AUF DAS WACHSTUM VON *P. AERUGINOSA*

*P. aeruginosa* zeigte nach 24, 48 und 72 Stunden keinen relevanten Wachstumsunterschied bei Inkubation der Bakterien-Suspension mit L-Laktat im Vergleich zur alleinigen Bebrütung (Tab. 25). Dieses Ergebnis konnte in 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen erfasst werden.

Tabelle 25: Keimzahlen von *P. aeruginosa* (PAO1) in KBE/ml nach Inkubation mit L-Laktat und ohne Laktat als Kontrolle

Probenart	Nach 0 Stunden	Nach 24 Stunden	Nach 48 Stunden	Nach 72 Stunden
1. PAO1 + L	$5,1 \times 10^7$	$1,9 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$	$1,4 \times 10^9$
1. Kontrolle	$4,7 \times 10^7$	$2,6 \times 10^8$	$5,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$
2. PAO1 + L	$3,4 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$	$5,0 \times 10^8$	$5,1 \times 10^8$
2. Kontrolle	$3,1 \times 10^7$	$2,5 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$	$5,9 \times 10^8$
3. PAO1 + L	$8,5 \times 10^7$	$3,2 \times 10^8$	$7,2 \times 10^8$	$5,6 \times 10^8$
3. Kontrolle	$4,0 \times 10^7$	$7,5 \times 10^7$	$5,7 \times 10^8$	$4,0 \times 10^8$

Nach 72 Stunden Inkubation lag die Keimzahl der Kontroll-Suspensionen aller 3 Versuche bei  $8,2 \pm 5,0 \times 10^8$  KBE/ml. Die Keimzahl der mit L-Laktat inkubierten Suspensionen lag bei  $6,6 \pm 3,0 \times 10^8$  KBE/ml (Tab. 26).

Tabelle 26: Keimzahlen von *P. aeruginosa* (PAO1) in KBE/ml als MW  $\pm$  STABW nach Inkubation mit L-Laktat im Vergleich zur Kontrolle ohne Laktat

Zeitpunkt	PAO1 + Laktat	Kontrolle
Nach 0 Stunden	$5,7 \pm 2,6 \times 10^7$	$3,9 \pm 0,8 \times 10^7$
Nach 24 Stunden	$2,4 \pm 0,7 \times 10^8$	$2,0 \pm 1,0 \times 10^8$
Nach 48 Stunden	$6,1 \pm 1,1 \times 10^8$	$5,6 \pm 0,5 \times 10^8$
Nach 72 Stunden	$8,2 \pm 5,0 \times 10^8$	$6,6 \pm 3,0 \times 10^8$

Es konnte kein Einfluss von L-Laktat auf das Wachstum von *P. aeruginosa* registriert werden (Tab. 26, Abb. 10).

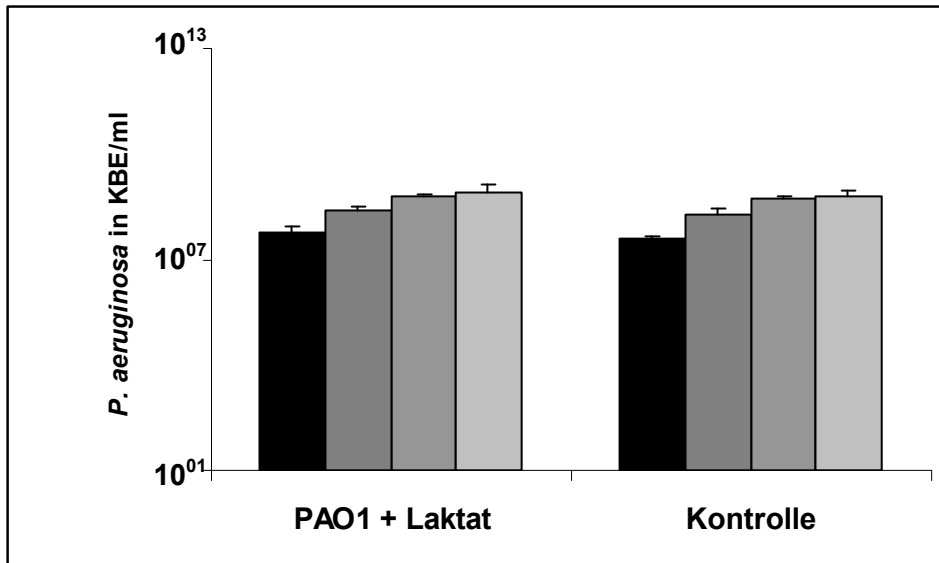


Abbildung 10: Vergleich des Wachstums von *P. aeruginosa* mit und ohne L-Laktat zu 4 verschiedenen Zeitpunkten. Nach 0 Stunden ■, nach 24 Stunden ■, nach 36 Stunden ■, nach 48 Stunden ■. Die Keimzahlen sind vergleichbar, unabhängig von der Anwesenheit von L-Laktat.

#### 4.6 ELASTOLYTISCHE AKTIVITÄT DER ANAEROBEN BAKTERIEN

Bei den 25 untersuchten anaeroben Bakterien konnte keine elastolytische Aktivität registriert werden. Bei keinem der Erreger kam es zur Bildung einer Elastolysezone (Abb. 11).

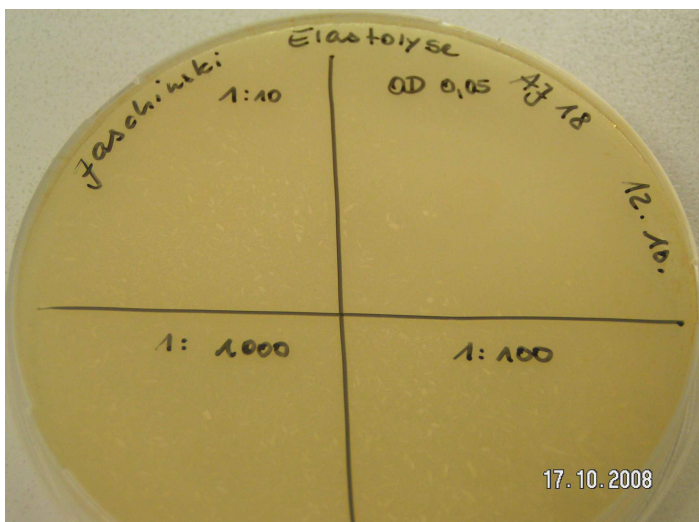


Abbildung 11: Für diesen Versuch hergestellte elastinhaltige Agar-Platte. Das Elastin ist als helle Struktur im Agar erkennbar. Der obligate Anaerobier zeigt keine Elastolyse. AJ 18 – *Veillonella* spp.

#### 4.7 HÄMOLYTISCHE AKTIVITÄT DER ANAEROBEN BAKTERIEN

Von den 25 untersuchten obligat anaeroben Bakterien, konnte bei 15 Isolaten eine Hämolyse registriert werden. Dies entspricht 60 % der Anaerobier.

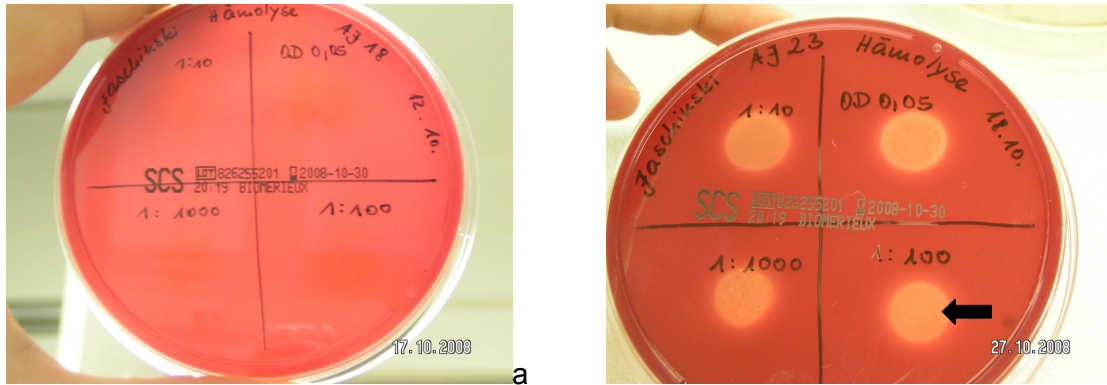


Abbildung 12: a) keine Hämolyse bei AJ 18 – *Veillonella* spp. b)  $\beta$ -Hämolyse (→) in allen 4 Quadranten bei AJ 23 – *Veillonella* spp.

Alle 4 untersuchten *S. constellatus*-Proben zeigten eine Hämolyse. Beide untersuchten *A. turicensis*-Stämme und beide *C. hastiforme*-Stämme sind hämolytisch. Nach 48 Stunden präsentierte *P. melaninogenica* eine deutliche Hämolysezone. Des Weiteren zeigten *Mob. mulieris*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp. und *A. israelii* eine Hämolyse. Zwei von 10 untersuchten *Veillonella* spp.-Proben zeigten eine Hämolyse (Abb. 12a, Abb. 12b). Beide untersuchten *S. saccharolyticus*-Stämme zeigten keine hämolytische Aktivität. Während *P. aeruginosa* aerob eine deutliche Hämolyse zeigte, konnte dies unter anaeroben Bedingungen nicht registriert werden.

Um die hämolytische Aktivität der obligaten Anaerobier beschreiben und vergleichen zu können, wurden die Werte bzw. bei mehreren untersuchten Stämmen die MW der größten gemessenen Hämolysezone in zusammengefasst (Tab. 27).

Tabelle 27: Größe der Hämolysezonen der obligaten Anaerobier in mm, bei mehreren untersuchten Stämmen als MW  $\pm$  STABW

Anaerobier	Hämolysezone in mm
<i>P. melaninogenica</i>	21
<i>L. acidophilus</i>	19
<i>Mob. mulieris</i>	19
<i>A. turicensis</i>	18,5 $\pm$ 2,1
<i>Bifidobacterium sp.</i>	18
<i>A. israelii</i>	18
<i>C. hastiforme</i>	15,5 $\pm$ 3,5
<i>Veillonella spp.</i>	13 $\pm$ 0
<i>S. constellatus</i>	12,5 $\pm$ 3,0

Der die größte Hämolysezone bildende obligate Anaerobier war *P. melaninogenica* (Tab. 27). *L. acidophilus*, *Mob. mulieris*, *A. turicensis*, *A. israelii* und *Bifidobacterium spp.* zeigten eine etwas kleinere Hämolysezone. *C. hastiforme* und *Veillonella spp.* waren noch schwächer hämolytisch aktiv. Die kleinste Hämolysezone präsentierte hier *S. constellatus*.

Die Ergebnisse bestätigen die in der Literatur bekannte Sonderrolle von *S. constellatus* im CF-Krankheitsgeschehen. Sie unterstützen die Hypothese, dass die Anaerobier in der CF-Lunge aus der Mundhöhle stammen. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass *S. constellatus in vitro* in der Lage ist, das Wachstum des CF-Haupterregers *P. aeruginosa* zu hemmen. Es ist also durchaus berechtigt, *S. constellatus* in Diagnostik und Therapie der CF stärker zu berücksichtigen.



## 5 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von *S. constellatus* bei der polymikrobiellen Lungeninfektion von CF-Patienten *in vitro* untersucht. Dafür wurden die aus dem Sputum isolierten Bakterienstämme hinsichtlich ihres Verhaltens bei der gemeinsamen Inkubation mit dem fakultativen Anaerobier *P. aeruginosa*, ihrer Fähigkeit Laktat zu produzieren und ihres Elastolyse- und Hämolyseverhaltens mit anderen aus der CF-Lunge isolierten obligaten Anaerobiern verglichen.

### 5.1 WECHSELWIRKUNGEN VON *S. CONSTELLATUS* UND *P. AERUGINOSA*

Die Untersuchungen konnten zeigen, dass *S. constellatus* in der Lage ist, das Wachstum von *P. aeruginosa* nach 72 Stunden gemeinsamer Inkubation, um eine Zehnerpotenz zu reduzieren. In der Lunge von CF-Patienten, insbesondere in den Mukus-Plaques, herrschen nachweislich anaerobe Verhältnisse (Worlitzsch et al., 2002). Dies bietet eine hervorragende Nische für die Anaerobier. Auch *P. aeruginosa* siedelt sich in den Mukus-Plaques an. Die gemeinsame Inkubation der Bakterien erfolgte daher unter anaeroben Bedingungen. Hierbei wurde die Keimzahl von *P. aeruginosa in vitro* durch die Anwesenheit von *S. constellatus* von  $2,9 \pm 1,5 \times 10^9$  KBE/ml auf  $3,0 \pm 5,3 \times 10^8$  KBE/ml im Vergleich zu einer allein inkubierten Kontrolle verringert. Das Ausmaß der Keimzahlverringerng ist insofern beachtlich, als dass eine suffiziente Antibiotikatherapie die Keimzahl von *P. aeruginosa* um etwa zwei Zehnerpotenzen senkt (Rogers et al., 2011) und den Patienten klinisch Besserung verschafft. Die Keimzahlverringerng von *P. aeruginosa* war unabhängig von der Ausgangsverdünnung von *S. constellatus*, in allen Proben nachweisbar.

Dies bedeutet einerseits, dass kleinste Mengen ( $5 \times 10^0$  KBE/ml) von *S. constellatus* innerhalb von 72 Stunden in einer *P. aeruginosa*-Suspension proliferieren können und bei *P. aeruginosa* zusätzlich noch eine Wachstumshemmung herbeiführen. Dabei ist für das Ausmaß der Keimzahlreduktion von *P. aeruginosa* nicht die Verdünnungsstufe von *S. constellatus* entscheidend. Die Keimzahlreduktion um eine Zehnerpotenz ist in gleichem Maße in allen Verdünnungsstufen von *S. constellatus* nachweisbar. Allein der Fakt, dass *S. constellatus* in der Suspension anwesend ist, bewirkt die Wachstumshemmung von *P. aeruginosa*. Somit kann vermutet werden, dass es sich ursächlich eher nicht um eine Substratkonkurrenz handelt, bei der zwei Erreger im Sinne eines Antagonismus um ein bestimmtes Substrat konkurrieren (Hahn et al., 2005).

Wahrscheinlicher wäre, dass es sich bei der Interaktion um eine antagonistische Metabolithemmung handelt. *S. constellatus* könnte ein Produkt sezernieren, welches die metabolischen Bedingungen für *P. aeruginosa* verschlechtert bzw. einen toxischen Effekt auf *P. aeruginosa* hat (Hahn et al., 2005). Bei der Konkurrenz um ein bestimmtes Substrat würde die Keimzahlverringerung eher mit der Dosis des hinzu gegebenen mikroaerophilen Anaerobiers korrelieren. Je mehr Anaerobier in der Suspension vorhanden sind, desto weniger Substrat bliebe für *P. aeruginosa* übrig und desto größer müsste die Wachstumshemmung sein.

*S. saccharolyticus* und *Veillonella spp.* beeinflussten das Wachstum von *P. aeruginosa* im Gegensatz zu *S. constellatus* nicht. Der fakultative Anaerobier wuchs in gleichen Keimzahlen, unabhängig davon, ob die obligaten Anaerobier mit inkubiert wurden oder nicht. Die bakterielle Interaktion könnte hierbei als Koexistenz beschrieben werden. Die gemeinsame Inkubation bringt für die Erreger weder Vor- noch Nachteile (Hahn et al., 2005). Es gibt bereits Untersuchungen, die ergeben haben, dass die Keimzahl von *P. aeruginosa* in Sputumproben von CF-Patienten unabhängig von der Anwesenheit der Anaerobier ist (Rintelen, 2009). Dafür wurden alle Proben der Studie, in denen Anaerobier und *P. aeruginosa* nachgewiesen wurden, mit denen ohne Anaerobier verglichen. Die Ergebnisse der Versuche mit *S. saccharolyticus* und *Veillonella spp.* dieser Arbeit bestätigen die Aussage. Die Ergebnisse belegen allerdings auch, dass dies nicht für *S. constellatus* gilt. In den Untersuchungen von Rintelen (2009) wurde nur in 8 von 92 untersuchten Proben *S. constellatus* nachgewiesen, was die Ursache dafür sein könnte, dass der keimzahlreduzierende Effekt in dieser Studie nicht entdeckt wurde.

Bei allen untersuchten Anaerobiern konnte ein gewisser positiver Effekt durch die gemeinsame Inkubation mit *P. aeruginosa* registriert werden. Auch wenn nicht immer die Keimzahlen im Vergleich zur Kontrolle dies signifikant widerspiegeln, so konnte doch ein Wachstum der Erreger bei Ausgangsverdünnungen beobachtet werden, in denen ohne *P. aeruginosa* kein Wachstum mehr zu verzeichnen war. Die Anaerobier haben in höherer Verdünnung demnach einen Überlebensvorteil durch die Anwesenheit von *P. aeruginosa*. Dies könnte unter anderem aus dem Sauerstoffverbrauch durch *P. aeruginosa* resultieren.

Auch wenn die sauerstoffempfindlichen Bakterien mit der kürzest möglichen Sauerstoffexposition bearbeitet und anschließend unter einer Anaerobierbank gelagert wurden, können die kleinen Mengen Sauerstoff einen toxischen Einfluss haben. Wird

dieser allerdings durch *P. aeruginosa* metabolisiert, erklärt sich möglicherweise der Wachstumsvorteil für die obligaten Anaerobier. Nicht allein erklären kann dieser Fakt den Überlebensvorteil von *S. constellatus*.

Dass *S. constellatus* als mikroaerophiler Erreger in Anwesenheit von Sauerstoff überleben kann, beweisen die positiven aeroben Wachstumskontrollen der Untersuchungen. Der Krankheitserreger profitierte nicht nur insofern, dass er in höherer Verdünnung anwuchs. Es konnten auch höhere Keimzahlen bei Anwesenheit von *P. aeruginosa* festgestellt werden. Eventuell existiert hier zusätzlich ein Wachstumsvorteil für *S. constellatus* durch ein von *P. aeruginosa* sezerniertes Produkt.

Zusammenfassend unterstützen die Ergebnisse der Wachstumsversuche die Sonderrolle von *S. constellatus* für die Pathogenese der CF-Lungeninfektion. Der Erreger profitiert vom gemeinsamen Wachstum mit *P. aeruginosa* und hemmt den fakultativen Anaerobier gleichzeitig in dessen Wachstum. Treffen beide Erreger in gleicher OD unter anaeroben Verhältnissen aufeinander, wachsen sie ähnlich stark. Die Keimzahlen von *S. constellatus* sind dann mit  $1,3 \pm 1,0 \times 10^8$  KBE/ml durchaus mit dem Wachstum von *P. aeruginosa* mit  $4,1 \pm 2,3 \times 10^8$  KBE/ml vergleichbar. Jedoch spiegelt dies wahrscheinlich nicht die Verhältnisse der CF-Lunge wider.

Auf eine existente chronische *P. aeruginosa*-Infektion (Rogers et al., 2004) mit hohen Keimzahlen, treffen *in vivo* wenige, wahrscheinlich aus der Mundhöhle stammende Anaerobier (Worlitzsch et al., 2009), die dann gegen *P. aeruginosa* anwachsen müssten. Auch bei Zugabe des zehnmillionenfach verdünnten *S. constellatus* resultieren aus der gemeinsamen 72-stündigen Inkubation ähnliche Keimzahlen beider Erreger (*S. constellatus*:  $7,7 \pm 5,8 \times 10^8$  KBE/ml; *P. aeruginosa*:  $1,5 \pm 0,6 \times 10^8$  KBE/ml).

Die Untersuchungen zeigen demnach, dass *S. constellatus in vitro* das Potenzial besitzt, gegen *P. aeruginosa* anzuwachsen und so durchaus die Pathogenese der CF-Lungeninfektion beeinflussen kann. Dieses Ergebnis kann die Theorie der aus der Mundhöhle stammenden und in die CF-Lunge gelangten anaeroben Bakterien unterstützen, denn die Untersuchungen zeigen, dass wenige Bakterien ausreichen, um eine Koinfektion in der CF-Lunge zu erreichen. Damit ist bewiesen, dass die Bakterien zumindest *in vitro* dazu in der Lage sind. Ob es sich tatsächlich um dieselben Bakterien in Mundhöhle und Lunge handelt, könnten molekularbiologische Untersuchungsverfahren zeigen.

## 5.2 LAKTATPRODUKTION VON *S. CONSTELLATUS*

Es ist bekannt, dass in jeder CF-Sputumprobe durchschnittlich  $3,0 \pm 3,1$  mmol/l Laktat nachweisbar ist (Bensel et al., 2011). Es wird derzeit untersucht, ob Laktat als Entzündungsmarker in der paraklinischen Diagnostik der CF eingesetzt werden kann (Bensel et al., 2011). Als Produzenten des Laktats wurden im Rahmen dieser Untersuchungen die PMNs ausgemacht. *P. aeruginosa* als führender CF-Erreger, der bei der Mehrheit aller CF-Patienten nachweisbar ist (Rogers et al., 2004), konnte mit einer durchschnittlichen Laktatproduktion von  $< 0,2$  mmol/l unter anaeroben Bedingungen als Hauptproduzent ausgeschlossen werden (Bensel et al., 2011). Der Erreger *B. cepacia* produzierte  $< 0,2$  mmol/l Laktat und *S. aureus* produzierte  $2,8 \pm 0,1$  mmol/l (Bensel et al., 2011). Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Laktatproduktion von *S. constellatus* untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass *S. constellatus* die zwanzigfache Menge an Laktat produziert im Vergleich zu den weiteren untersuchten obligaten Anaerobiern. Nach 48 Stunden lag die Menge an Laktat in der *S. saccharolyticus*-Suspension bei  $0,6 \pm 0,5$  mmol/l, die der *Veillonella spp.*-Suspension bei  $0,3 \pm 0$  mmol/l und die Menge an Laktat in der *S. constellatus*-Suspension lag bei  $22,0 \pm 0,3$  mmol/l. Damit produziert *S. constellatus* etwa siebenmal so viel Laktat wie der CF-Haupterreger *S. aureus* (Rogers et al., 2004, Bensel et al., 2011). Es ist also naheliegend, dass auch *S. constellatus* einen Anteil zu den im Sputum von CF-Patienten gemessenen Laktat-Werten beiträgt.

Eine Infektion mit *S. constellatus* vorausgesetzt, ist es also möglich, dass Laktat als non-invasiver Entzündungsmarker in der Paraklinik der CF nicht nur die Aktivität der PMNs, sondern auch die von *S. constellatus* widerspiegelt. Ein reduzierter Laktat-Wert im Sputum nach erfolgreicher antibiotischer Therapie könnte demnach sowohl durch die Modulation des Entzündungsgeschehens als auch durch Reduktion der Keimzahlen von *S. constellatus* bedingt sein. Genauere Aussagen dazu könnten Untersuchungen zur Korrelation des Laktat-Werts vor und nach Therapie und der Keimzahl von *S. constellatus* bringen.

*S. constellatus* produziert laut diesen Ergebnissen vergleichsweise viel Laktat und ist außerdem in der Lage, das Wachstum von *P. aeruginosa* um eine Zehnerpotenz zu reduzieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass dies auf eine Metabolithemmung zurückzuführen ist. Deshalb wurde untersucht, ob Laktat der Metabolit ist, der *P. aeruginosa* im Wachstum hemmt. Jedoch blieben die Keimzahlen von *P. aeruginosa* unabhängig von der Anwesenheit von Laktat in den Proben,

annähernd gleich. Es muss also ein anderes, bisher nicht bekanntes Produkt geben, welches den toxischen Effekt auf *P. aeruginosa* hervorruft.

Während aber eine hohe Laktat-Konzentration im Sputum bei allen untersuchten CF-Patienten registriert wurde (Bensel et al., 2011), konnten Erreger der SMG nur in 8 von 92 in Halle/Saale untersuchten Sputumproben gefunden werden (Worlitzsch et al., 2009), was einem Anteil von etwa 9 % entspricht. Sibley et al. dagegen konnten SMG in 39 % der Fälle als zahlenmäßig dominanten Erreger einer akuten Exazerbation ausmachen (Sibley et al., 2008). Dies könnte der unterschiedlichen Methodik beider Studien geschuldet sein. Während Sibley et al. die Bakterien mithilfe von Terminalem-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (T-RFLP) aufspürten, verwendeten Worlitzsch et al. Kulturmedien. Auf den Kulturmedien angewachsene anaerobe Bakterien aus dem Sputum von CF-Patienten wurden einer aeroben Kontrolle unterzogen. Mikroaerophile Streptokokken wurden wegen ihrer positiven aeroben Wachstumskontrollen als Kontamination aus der Mundhöhle und den oberen Atemwegen angesehen und aus der Studie ausgeschlossen. Insgesamt wurden bei 42 von 92 untersuchten Sputumproben mikroaerophile Kokken nachgewiesen (Rintelen, 2009). SMG ist so wahrscheinlich der Erfassung entgangen, was die wenigen registrierten *S. constellatus*-Infektionen in der CF-Ambulanz in Halle/Saale erklären könnte.

Allerdings existieren auch regionale Unterschiede im Keimspektrum der polymikrobiellen CF-Lungeninfektion. Während im Universitätsklinikum Halle (Saale) am häufigsten Staphylokokken und Peptostreptokokken im CF-Sputum gefunden wurden, war *Prevotella* der häufigste anaerobe Erreger in Studien aus Großbritannien, Colorado oder Nordirland (Rogers et al., 2004; Harris et al., 2007; Tunney et al., 2008). Es scheint in jedem Falle ratsam, Sputumproben von CF-Patienten auch speziell auf die Existenz von SMG hin zu untersuchen. Möglich wäre dies mittels McKay-Agar oder molekularbiologischen Methoden wie T-RFLP (Sibley et al., 2008; Sibley et al., 2010a).

### **5.3 ELASTOLYTISCHE AKTIVITÄT VON *S. CONSTELLATUS***

Die messbar erhöhte elastolytische Aktivität bei CF-Patienten und der damit verbundene fibrotische Umbau des Lungengewebes (Stone et al., 1995; Viglio et al., 2000, Ulrich et al., 2010b) können nach den hier vorliegenden Ergebnissen nicht mit *S. constellatus* oder anderen Anaerobiern in Verbindung gebracht werden. Ursächlich für den Abbau von Elastin in der CF-Lunge sind die PMN-Elastase und ebenso die

*P. aeruginosa*-Elastase (Goldstein und Döring, 1986; Viglio et al., 1999). Die von Shibata et al. entdeckte elastolytische Serinprotease von *P. intermedia* (Shibata et al., 1993) bewies, dass auch Anaerobier in der Lage sind, Elastin abzubauen. Fraglich war nun, ob die in der CF-Lunge gefunden Erreger dazu fähig sind. Die hier untersuchten Anaerobier aus der Lunge von CF-Patienten, darunter auch *P. melaninogenica*, erwiesen sich jedoch als nicht elastolytisch. Die Hypothese, dass die anaeroben Krankheitserreger so zum pathogenetischen Geschehen in der CF-Lunge beitragen, kann mit diesen Ergebnissen nicht bestätigt werden.

#### 5.4 HÄMOLYTISCHE AKTIVITÄT VON *S. CONSTELLATUS*

Untersuchungen haben gezeigt, dass lediglich der  $\beta$ -hämolytische Biotyp von *S. constellatus*, welcher 74,4 % der bei CF-Patienten nachgewiesenen *S. constellatus*-Isolate ausmacht, mit bronchopulmonalen Exazerbationen assoziiert ist (Grinwis et al., 2010a). Für alle Streptokokken ist bekannt, dass  $\alpha$ -Hämolyse betreibende Streptokokken häufig zur physiologischen Schleimhautflora gehören, während es sich bei  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken meist um obligat pathogene Erreger handelt (Hahn et al., 2009). Alle 4 *S. constellatus*-Stämme, mit denen für diese Untersuchungen gearbeitet wurde, zeigten eine  $\alpha$ -Hämolyse. Insgesamt präsentierten 60 % der aus der CF-Lunge stammenden, hier untersuchten Anaerobier, eine Hämolyse. Lediglich ein *Veillonella*-Stamm und ein *A. turicensis*-Stamm präsentierten eine  $\beta$ -Hämolyse. Bei allen anderen hämolysierenden Erregern handelte es sich um eine  $\alpha$ -Hämolyse. Dieses Ergebnis ist insofern nicht überraschend, da die in der CF-Lunge vorkommenden Anaerobier wahrscheinlich ursprünglich aus dem Mundraum stammen (Worlitzsch et al., 2009) und dort zur physiologischen, nicht pathogenen Standortflora gehören (Whiley et al., 1990; Westblom et al., 1990; Yanagisawa et al., 2006). Es konnten jedoch innerhalb der SMG-Population von CF-Patienten komplexe Inter- und Intraspeziesveränderungen beobachtet werden (Sibley et al., 2010b), so dass möglicherweise auch das Hämolyseverhalten Veränderungen unterliegen kann.

#### 5.5 DISKUSSION ZUR KLINISCHEN RELEVANZ VON *S. CONSTELLATUS*

Die Anwesenheit der Anaerobier in der CF-Lunge soll laut Literatur keine Auswirkung auf die Lungenfunktionsparameter FEV<sub>1</sub> und FVC (Forcierte Einsekundenkapazität und forcierte Vitalkapazität) haben. Dies konnten Worlitzsch et al. (2009) zeigen. Um diese Aussage treffen zu können, verglichen die Autoren die Lungenfunktionsparameter von CF-Patienten mit und ohne im Sputum nachweisbaren Anaerobiern. Worlitzsch et al. hatten jedoch vergleichsweise wenig Bakterien der SMG nachgewiesen. Es könnte

lohnenswert sein, die Korrelation zwischen den Lungenfunktionsparametern und dem Infektionsstatus mit *S. constellatus* gesondert zu betrachten.

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen auf, dass eine differenzierte Betrachtung der Anaerobier durchaus sinnvoll ist. Im Vergleich mit *S. constellatus* erscheinen *Veillonella spp.* und *S. saccharolyticus*, insbesondere die gemeinsamen Wachstumsversuche mit *P. aeruginosa* betrachtend, als weniger pathogen. Es fällt auf, dass *S. constellatus* unter anaeroben Bedingungen *in vitro* stets in der Lage ist, ähnlich stark wie *P. aeruginosa* zu wachsen. Dies ist insofern beachtlich, als dass *P. aeruginosa* als außerordentlich vielseitig gilt und in der Lage ist, seine genetischen und biochemischen Fähigkeiten an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen (Stover et al., 2000).

Als dominanter Erreger bei mehr als 61 % aller CF-Patienten, ist *P. aeruginosa* Hauptziel einer antibiotischen Therapie. Auf die weiteren in der CF-Lunge vorkommenden Bakterien ist die Therapie, trotz des Wissens um deren Vorhandensein, meist nicht ausgerichtet (Rogers et al., 2011). Um die Frage zu beantworten, ob die Anaerobier in der CF-Lunge generell zu therapieren sind, reichen die Ergebnisse dieser Untersuchungen nicht aus. Aber sie sind hinweisend, dass *S. constellatus* ein pathogenes Potenzial besitzt, welches in klinisch kritischem Zustand eines CF-Patienten durchaus beachtenswert ist. Eine Untersuchung des Sputums auf Vorhandensein des Erregers ist dann in jedem Falle sinnvoll. Ist ein Anstieg der Keimzahlen oder eine generell hohe Keimzahl zu verzeichnen, kann eine unter anderem auf diesen Erreger gezielte antibiotische Therapie klinische Besserung bringen. Jedoch zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit auch, dass *S. constellatus* das Wachstum von *P. aeruginosa* reduziert. Eine antibiotische Therapie gegen *S. constellatus* muss also auch gegen *P. aeruginosa* gerichtet sein, um diesem Erreger keinen iatrogenen Wachstumsvorteil zu verschaffen.

Ebenfalls für eine therapeutische Berücksichtigung von *S. constellatus* sprechen die Ergebnisse von Shinzato und Saito. Sie entdeckten einen Synergismus von *S. constellatus* und *P. intermedia*, der die bakteriziden Mechanismen des Wirts, durch messbare Unterdrückung der Aktivität der PMNs, stört. Eine Koinfektion mit beiden Erregern erhöhte die Mortalität einer Pneumonie bei Mäusen signifikant von 10 % auf 60 % (Shinzato und Saito, 1994). Für *P. intermedia* existieren inzwischen Daten, die vermuten lassen, dass der Erreger in der Lage ist, Lungenschäden bei CF-Patienten zu verursachen (Döring et al., 2012). Es konnte *in vitro* demonstriert werden, dass

*P. intermedia* Zytokine produziert und somit das CF-Entzündungsgeschehen anregt (Ulrich et al., 2010a).

Daher empfehlen Döring et al. *in vivo* eine therapeutische Berücksichtigung von *P. intermedia*. Die Versuche dieser Arbeit untersuchten lediglich die Interaktionen eines Anaerobiers mit *P. aeruginosa*. Es könnte weitere Einsicht in das pathogenetische Geschehen der polymikrobiell besiedelten CF-Lunge bringen, auch die Interaktionen von *S. constellatus* und anderen Anaerobiern zu untersuchen.

Sibley et al. sprechen sich bereits seit längerem dafür aus, *S. constellatus* als Erreger mit bedeutender Rolle im Entzündungsgeschehen bei CF anzusehen. Sie beobachteten, dass dessen Keimzahl im Gegensatz zu *P. aeruginosa* mit dem klinischen Zustand der CF-Patienten korreliert. Während einer Exazerbation registrierten sie eine tausendfach höhere Keimzahl von *S. constellatus* im Sputum als nach der Therapie (Sibley et al., 2008). Es ist also möglich, dass der positive Effekt einer Antibiotikatherapie bei Exazerbation neben der Modulation des Entzündungsgeschehens auch durch die Keimzahlverringerng von *S. constellatus* bedingt wird. Dies würde dafür sprechen, *S. constellatus* in der CF-Lunge als pathogen einzuordnen. Es ist bisweilen schwierig, den Erfolg einer antibiotischen Therapie der CF-Lungeninfektion zu erklären. Die Effekte der Therapie werden in der Klinik eher am Allgemeinzustand und den Lungenfunktionsparametern der Patienten festgemacht. Ob die Antibiotika direkt die chronische bakterielle Lungeninfektion therapieren oder hauptsächlich indirekt das Entzündungsgeschehen lindern, ist nicht ausreichend geklärt (Rogers et al., 2011).

Sollte nun der Verdacht bestehen, dass bei einem CF-Patienten eine *S. constellatus*-getriggerte bronchopulmonale Exazerbation vorliegt, so muss für die antibiotische Therapie auch die aktuelle Resistenzlage berücksichtigt werden. Untersuchungen in Halle (Saale) haben gezeigt, dass 70 % aller nachgewiesenen *S. constellatus*-Stämme resistent gegen Metronidazol und 40 % resistent gegen Azithromycin waren (Künzel et al., 2012). Grinwis et al. wiesen eine hohe Sensibilität von *S. constellatus* auf Ceftriaxon und Cefepim nach. Auch hier zeigten sich die Erreger in mehr als der Hälfte der Fälle resistent gegen Azithromycin, Erythromycin und zusätzlich Clindamycin (Grinwis et al., 2010b). Empfehlungen zur antibiotischen Behandlung von klinisch relevanten *S. constellatus*-Infektionen können anhand dieser Studien für Meropenem, Ceftazidim, Piperacillin/Tazobactam sowie Ceftriaxon und Cefepim gegeben werden (Grinwis et al., 2010b; Künzel et al., 2012). Da das Aktivitätsspektrum von



Piperacillin/Tazobactam auch *P. aeruginosa* beinhaltet, kann dieses also unter Berücksichtigung der individuellen Resistenzlage bei einer infektgetriggerten Exazerbation empfohlen werden.

Weitere Untersuchungen zu *S. constellatus* in der CF-Lunge scheinen sinnvoll. Zum Beispiel unter folgender Fragestellung: Inwieweit beeinflusst eine Koinfektion mit mehreren Bakterien die Pathogenität einzelner Krankheitserreger? Ein besseres Verständnis der komplexen mikrobiellen Umgebung, kann zu neuen Ansätzen in der Therapie der CF-Lungeninfektion führen (Zemanick et al., 2011). Dies ist insofern von Bedeutung, als eine suffiziente Antibiotikatherapie die Prognose der CF-Patienten entscheidend beeinflusst (Rogers et al., 2011).

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die pathophysiologischen Veränderungen der Lunge stehen im Vordergrund des CF-Krankheitsgeschehens. Seit kurzem ist bekannt, dass neben den CF-Haupterregern wie *P. aeruginosa* und *S. aureus* auch Anaerobier in hohen Keimzahlen in der CF-Lunge vorkommen. *S. constellatus* wird eine Sonderrolle zugesprochen, da er in der Lage ist bronchopulmonale Exazerbationen zu verursachen. *S. constellatus* war in einer Vielzahl von Exazerbationen als dominanter Erreger nachgewiesen worden. Die Pathomechanismen des Erregers in der CF-Lunge sind bisher nicht bekannt.

Im Sputum von CF-Patienten ist Laktat nachweisbar. Es wird derzeit diskutiert, ob Laktat als non-invasiver Entzündungsmarker bei CF eingesetzt werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde die Laktatproduktion von *S. constellatus* gemessen. Als Hauptproduzenten des Laktats im CF-Sputum gelten bisher die PMNs. Des Weiteren wurde der Effekt von Laktat auf das Wachstum von *P. aeruginosa* untersucht. Hämolyse und Elastolyse sind Pathomechanismen, die im Rahmen der CF-Lungeninfektion eine wichtige Rolle spielen. Bisher ist unklar, ob *S. constellatus* oder weitere Anaerobier mithilfe dieser Mechanismen in das CF-Lungeninfektionsgeschehen eingreifen.

Ziel dieser Arbeit war die Gewinnung von Erkenntnissen zur Pathogenität von *S. constellatus* bei der CF-Lungeninfektion. Dazu wurden 4 aus der CF-Lunge isolierte *S. constellatus*-Stämme und *P. aeruginosa* *in vitro* gemeinsamen Wachstumsversuchen unterzogen, die Laktatproduktion von *S. constellatus* wurde ermittelt, und das Hämolyse- und Elastolyseverhalten des Erregers wurde getestet. Die Ergebnisse von *S. constellatus* wurden im Anschluss mit weiteren Anaerobiern verglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass *S. constellatus* in der Lage ist, das Wachstum von *P. aeruginosa* um eine Zehnerpotenz, von  $2,9 \pm 1,5 \times 10^9$  KBE/ml auf  $3,0 \pm 5,3 \times 10^8$  KBE/ml ( $p < 0,05$ ), zu reduzieren. Für die weiteren untersuchten Anaerobier, *Veillonella* spp. und *S. saccharolyticus*, konnte kein vergleichbarer signifikanter Effekt auf das Wachstum von *P. aeruginosa* nachgewiesen werden. *S. constellatus* wächst zusammen mit *P. aeruginosa* in höheren Keimzahlen als allein. Wird der Erreger vor der gemeinsamen Inkubation tausendfach stärker verdünnt als *P. aeruginosa*, wächst er mit  $4,3 \pm 2,7 \times 10^8$  KBE/ml nach gemeinsamer Inkubation eine Zehnerpotenz besser

als mit  $3,7 \pm 3,0 \times 10^7$  KBE/ml nach alleiniger Inkubation. Auch die weiteren untersuchten Anaerobier profitieren von der Anwesenheit von *P. aeruginosa*, jedoch nicht in vergleichbarem Ausmaß. Nach 72 Stunden gemeinsamer Inkubation einer Bakterien-Suspension mit *P. aeruginosa* in OD 0,05 und *S. constellatus* zehnmillionenfach stärker verdünnt als Ausgangskonzentrationen, wachsen beide Erreger ähnlich stark. Die Keimzahlen sind mit  $1,5 \pm 0,6 \times 10^8$  KBE/ml (*P. aeruginosa*) und  $7,7 \pm 5,6 \times 10^8$  KBE/ml (*S. constellatus*) vergleichbar. *S. saccharolyticus* und *Veillonella spp.* wachsen bei einem solchen Versuch dagegen in deutlich geringeren Keimzahlen.

Die Laktat-Messungen haben ergeben, dass *S. constellatus* die 20-fache Menge produziert im Vergleich zu *S. saccharolyticus* und *Veillonella spp.* Die Laktat-Konzentration nach 2 Tagen lag durchschnittlich bei  $22,0 \pm 0,3$  mmol/l (*S. constellatus*),  $0,6 \pm 0,5$  mmol/l (*S. saccharolyticus*) und  $0,3 \pm 0$  mmol/l (*Veillonella spp.*). Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass Laktat das Wachstum von *P. aeruginosa* nicht hemmt. *P. aeruginosa* wächst unabhängig von der Anwesenheit des Laktats in gleichen Keimzahlen:  $6,6 \pm 3,0 \times 10^8$  KBE/ml (mit Laktat) und  $8,2 \pm 5,0 \times 10^8$  KBE/ml (ohne Laktat).

Alle 4 untersuchten *S. constellatus*-Stämme präsentierten eine  $\alpha$ -Hämolyse. Von insgesamt 25 aus der CF-Lunge stammenden anaeroben Bakterien, konnte bei 15 eine Hämolyse registriert werden (60%). Ein *Veillonella*- und ein untersuchter *A. turicensis*-Stamm waren  $\beta$ -hämolytisch. Die Versuche zur elastolytischen Aktivität der Anaerobier haben ergeben, dass keiner der untersuchten Stämme elastolytisch ist. Die Funktionalität der für diesen Versuch selbst hergestellten Platten war zuvor mithilfe von *P. aeruginosa* unter aeroben Bedingungen bewiesen worden.

*S. constellatus* ist demnach in der Lage, das Wachstum des CF-Haupterregers *P. aeruginosa* signifikant zu hemmen. Dabei beruht die Keimzahlreduktion wahrscheinlich auf einer Metabolithemmung. Dafür spricht, dass die reduzierte Keimzahl unabhängig von der Verdünnung von *S. constellatus* in jeder Probe nachweisbar war. Der positive Effekt der gemeinsamen Inkubation mit *P. aeruginosa* auf das Wachstum der Anaerobier erscheint durch die Metabolisierung des Sauerstoffs plausibel. Nicht allein erklären kann dies den Wachstumsvorteil des mikroaerophilen *S. constellatus*, für den eine Sauerstoffexposition nicht toxisch ist. Ein von *P. aeruginosa* produziertes Substrat könnte einen weiteren Wachstumsvorteil bedingen.

Kleinste Mengen der Anaerobier (bis zu  $5 \times 10^0$  KBE/ml) können in einer *P. aeruginosa*-Suspension proliferieren. *S. constellatus* kann zehnmillionenfach verdünnt in einer *P. aeruginosa*-Suspension zu hohen Keimzahlen anwachsen. Somit unterstützen diese Ergebnisse, die Theorie der aus der Mundhöhle in die CF-Lunge eingewanderten Erreger. Sie zeigen, dass *S. constellatus* und andere Anaerobier *in vitro* dazu in der Lage sind.

Bei den vier untersuchten *S. constellatus*-Stämmen, war keine  $\beta$ -Hämolyse nachweisbar. Ebenso waren weder *S. constellatus* noch weitere untersuchte Anaerobier elastolytisch. Hauptverantwortlich für die Strukturveränderungen in der CF-Lunge sind demnach weiterhin die PMN und *P. aeruginosa* mit der jeweiligen Elastase. Betahämolyse und Elastinabbau in der CF-Lunge konnten bei den hier untersuchten *S. constellatus*-Stämmen als mögliche Pathomechanismen ausgeschlossen werden. Es fiel jedoch auf, dass der Erreger *in vitro* außerordentlich große Mengen an Laktat produziert und damit sein Wachstumsmilieu beeinflusst. Ein Effekt des Laktats auf das Wachstum von *P. aeruginosa* konnte *in vitro* nicht nachgewiesen werden. Die klinische Relevanz der hohen Laktatproduktion bleibt demnach unklar. Bisher waren als Hauptquelle der im Sputum gemessenen erhöhten Laktat-Konzentration bei CF-Patienten die PMNs bekannt. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass auch *S. constellatus* einen Anteil dazu beiträgt. Aktuell wird untersucht, ob Laktat als non-invasiver Entzündungsmarker bei CF eingesetzt werden kann. Eine erhöhte Laktat-Konzentration im Sputum würde dann, eine Infektion mit *S. constellatus* vorausgesetzt, nicht nur die Aktivität der PMNs, sondern auch die von *S. constellatus* widerspiegeln.

*S. constellatus* nimmt nach Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit im Vergleich zu den anderen untersuchten anaeroben Bakterien eindeutig eine Sonderrolle ein. Neben der aus der Literatur bekannten Potenz, eine bronchopulmonale Exazerbation auszulösen, muss mit den hier vorliegenden Ergebnissen nun auch berücksichtigt werden, dass *S. constellatus* das Wachstum von *P. aeruginosa* einschränkt. Die Keimzahlverringerung um eine Zehnerpotenz ist insofern beachtlich, als dass eine suffiziente Antibiotikatherapie die Keimzahl von *P. aeruginosa* um etwa zwei Zehnerpotenzen senkt (Rogers et al., 2011). Es ist besonders in klinisch kritischen Situationen diskussionswürdig, eine antibiotische Therapie auch gegen diesen Erreger zu richten. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch auch, dass in diesem Falle ebenso *P. aeruginosa* Ziel der Antibiose sein muss, da sich sonst ein möglicher iatrogener Wachstumsvorteil für den CF-Haupterreger und damit eine Verschlechterung des klinischen Zustandes des Patienten ergeben könnte.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Bensel T, Stotz M, Borneff-Lipp M, Wollschläger B, Wienke A, Taccetti G, Campana S, Meyer KC, Jensen PØ, Lechner U, Ulrich M, Döring G, Worlitzsch D (2011) Lactate in cystic fibrosis sputum. *J Cyst Fibros* 10:37-44.

Biomerieux Deutschland URL:

[http://www.biomerieux.de/servlet/srt/bio/germany/dynPage?open=GRM\\_CLN\\_PRD&doc=GRM\\_CLN\\_PRD\\_G\\_PRD\\_CLN\\_61&pubparams.sform=5&lang=de](http://www.biomerieux.de/servlet/srt/bio/germany/dynPage?open=GRM_CLN_PRD&doc=GRM_CLN_PRD_G_PRD_CLN_61&pubparams.sform=5&lang=de) [01.03.2011].

Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja L (1983) Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* 5(2):279-313.

Böhm K (2011) Quantifikation von obligaten Anaerobiern im Sputum von Mukoviszidose-Patienten und Interaktion von obligaten Anaerobiern mit *P. aeruginosa*. Dissertation Universität Halle-Wittenberg.

Borriello G, Werner E, Roe F, Kim AM, Ehrlich GD, Stewart PS (2004) Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 48(7):2659-2664.

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

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

Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Ferec C, Girodon E, Johansson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojkovic D, Rizzotti, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetis M, Zielenski J, Elborn JS (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 7:179-196.

Cystic fibrosis mutation database URL:

<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html> [17.11.2013].

Deschner J, Singhal A, Long P, Liu C, Piesco N, Agarwai S (2003) Cleavage of CD14 and LBP by protease from *Prevotella intermedia*. *Arch Microbiol* 179:430-436.

Di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E (1953) Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *Pediatrics* 12(5):549-563.

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

Döring G, Goldstein W, Botzenhart K, Kharazmi A, Schiøtz P, Høiby N, and Dasgupta M (1986) Elastase from polymorphonuclear leucocytes: a regulatory enzyme in immune complex disease. *Clin Exp Immunol* 64:597-605.

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

Duan K, Dammel C, Stein J, Rabin H, Surette MG (2003) Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication. *Mol Microbiol* 50(5):1477-1491.

Eschbach M, Schreiber K, Trunk K, Buer J, Jahn D, Schobert M (2004) Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *J Bacteriol* 186:4596-4604.

Geffers C, Gastmeier P (2011) Nosokomiale Infektionen und multiresistente Erreger in Deutschland: Epidemiologische Daten aus dem Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System. *Dtsch Arztebl Int* 108(6):87-93.

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

Grinwis ME, Sibley SD, Parkins MD, Eshaghurshan CS, Rabin HR, Surette MG (2010a) Characterization of *Streptococcus milleri* Group from Expecterated Sputum of Adult Patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol* 48: 395-401.

Grinwis ME, Sibley SD, Parkins MD, Eshaghurshan CS, Rabin HR, Surette MG (2010b) Macrolide and Clindamycin Resistance in *Streptococcus milleri* Group Isolates from the Airways of Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 2823-2829.

Hahn H, Falke D, Kaufmann S, Ullmann U: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 5. Aufl., Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2005, S. 27.

Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, Suerbaum S: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 6. Aufl., Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2009, S. 175 und 203.

Harris JK, De Groote MA, Sagel SD, Zemanick ET, Kapsner R, Penvari C, Kaess H, Deterding RR, Accurso FJ, Pace NR (2007) Molecular identification of bacteria in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 20529-20533.

Jewes LA, Spencer RC (1990) The incidence of anaerobes in the sputum of patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 31(4):271-274.

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

Kerem BS, Rommens JM, Buchannan JA, et al. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245:1073-1080.

Koch C, Høiby N (1993) Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet* 341:1065-1069.

Koch C, Høiby N (2000) Diagnosis and treatment of cystic fibrosis. *Respiration* 67(3):239-247.

- Kolpen M, Hansen CR, Bjarnsholt T, Moser C, Christensen LD, van Gennip M, Ciofu O, Mandsberg L, Kharazmi A, Döring G, Givskov M, Høiby N, Jensen PØ (2010) Polymorphonuclear leukocytes consume oxygen in sputum from chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in cystic fibrosis. *Thorax* 65:57-62.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM: The anaerobic bacteria. In: Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC jr.: Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Lippincott, Philadelphia – New York, 1997, pp. 709-784.
- Konietzko N, Wendel H, Wiesner B: Erkrankungen der Lunge. Walter de Gruyter-Verlag, Berlin, New York, 1995, S. 617-627.
- Künzel J, Lehmann A, Blankenburg T, Wollschläger B, Borneff-Lipp M, Worlitzsch D (2012) Identical obligate anaerobic bacteria in sputum of patients with COPD and CF. *J Cyst Fibros* 11(1): 79.
- Malroot A, Adamb G, Ciofuc O, Döring G, Knoope C, Langf AB, Van Dammeg P, Daba I, Bushh A for the European Cystic Fibrosis Society Vaccination Group (2005) Immunisation in the current management of cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 4(2):77-87.
- 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.
- Moinia A, Theilera R, Gublerb J (2007) Spondylodiszitis durch *Peptostreptococcus micros*. *Schweiz Med Forum* 7:420-421.
- Poole PM, Wilson G (1979) Occurrence and cultural features of *Streptococcus milleri* in various body sites. *J Clin Pathol* 32:764-768.
- Porta G, Rodriguez-Carballeira M, Gomez L, Salavert M, Freixas N, Xercavins M, Garau J (1998) Thoracic infection caused by *Streptococcus milleri*. *Eur Respir J* 12:357-362.
- Ratjen F (2009) Cystic Fibrosis: Pathogenesis and future treatment strategies. *Respir Care* 54(5):595-602.
- Ratjen F, Döring G (2003) Cystic fibrosis. *Lancet* 361:681-689.
- Rintelen C (2009): Obligat anaerobe Bakterien in den Lungen von Patienten mit Cystischer Fibrose. Dissertation Universität Halle-Wittenberg.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Lok S, Plavisc N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245(4922):1066-1073.
- Riordan T (2007) Human infection with *fusobacterium necrophorum* (necrobacillosis), with a focus on Lemierre's syndrome. *Clin Microbiol Rev* 20(4):622-659.
- Rogers GB, Carroll MP, Connett GJ, Serisier DJ, Hockey PM, Kehagia V, Jones GR, Bruce KD (2005) Bacterial community diversity in the CF lung. *Pediatr Pulmonol* 28:95-97.

Rogers GB, Carroll MP, Serisier DJ, Hockey PM, Jones G, Bruce KD (2004) Characterization of bacterial community diversity in cystic fibrosis lung by use of 16S ribosomal DNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *J Clin Microbiol* 42(11):5176-5183.

Rogers GB, Hoffman 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 (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245:1059-1065.

Schreiber K, Boes N, Eschbach M, Jaensch L, Wehland J, Bjarnsholt T, Givskov M, Hentzer M, Schobert M (2006) Anaerobic survival of *Pseudomonas aeruginosa* by pyruvate fermentation requires an Usp-type stress protein. *J Bacteriol* 188:659-668.

Shibata Y, Fujimura S, Nakamura T (1993) Purification and partial characterization of an elastolytic serine protease of *Prevotella intermedia*. *Appl Environ Microbiol* 59(7):2107-2111.

Shinzato T, Saito A (1994) A mechanism of pathogenicity of „*Streptococcus milleri* group“ in pulmonary infection: synergy with an anaerobe. *J Med Microbiol* 40:118-123.

Sibley CD, Grinwis ME, Field TR, Parkins MD, Norgaard JC, Gregson DB, Rabin HR, Surette MG (2010a) McKay agar enables routine quantification of the ‘*Streptococcus milleri*’ group in cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol* 59: 534-540.

Sibley CD, Parkins MD, Rabin HR, Duan K, Norgaard JC, Surette MG (2008) A polymicrobial perspective of pulmonary infections exposes an enigmatic pathogen in cystic fibrosis patients. *PNAS* 105(39):15070-15075.

Sibley CD, Parkins MD, Rabin HR, Surette MG (2009) The relevance of the polymicrobial nature of airway infection in the acute and chronic management of patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Invest Dr* 10: 787-794.

Sibley CD, Sibley KA, Leong TA, Grinwis ME, Parkins MD, Rabin HR, Surette MG (2010b) The *Streptococcus milleri* population of a Cystic Fibrosis Clinic Reveals Patient Specificity and Intraspecies Diversity. *J Clin Microbiol* 48: 2592-2594.

Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Seanphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R, Olson MV (2006) Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airway of cystic fibrosis patients. *PNAS* 103(22):8487-8492.

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

Stone P, Konstan M, Berger M, Dorkin H, Franzblau C, Snider L (1995) Elastin and collagen degradation products in urine of patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 152:157-162.



Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warren P, Hickey MJ, Brinkman FSL, Hufnagl WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK-S, Wu Z, Paulsen IT, Relzer J, Saier MH, Hancock REW, Lory S, Olson MV (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406:959-964.

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

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

Ulrich M, Beer I, Braitmaier P, Dierkes M, Kummer F, Krismer B, Schumacher U, Gräpler-Mainka U, Riethmüller J, Jensen PO, Bjarnsholt T, Hoiby N, Bellon G, Döring G (2010a) Relative contribution of *Prevotella intermedia* and *Pseudomonas aeruginosa* to lung pathology in airways of patients with cystic fibrosis. *Thorax* 65:978-984.

Ulrich M, Worlitzsch D, Viglio S, Siegmann N, Iadarola P, Shute JK, Geiser M, Pier GB, Friedel G, Barr ML, Schuster A, Meyer KC, Ratjen F, Bjarnsholt T, Gulbins R, Döring G (2010b) Alveolar inflammation in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 9:217-227.

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

Vander Wauven C, Piérard A, Kley-Raymann M, Haas D (1984) *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *J Bacteriol* 160:928-34.

Viglio S, Iadarola P, Lupi A, Trisolini R, Tinelli C, Balbi B, Grassi V, Worlitzsch D, Döring G, Meloni F, Meyer K, Dowson L, Hill S, Stockley R, Luisetti M (2000) MEKC of desmosine and isodesmosine in urine of chronic destructive lung disease patients. *Eur Respir J* 15:1039-1045.

Viglio S, Luisetti M, Zanaboni G, Döring G, Worlitzsch D, Cetta G, Iadarola P (1999) Simultaneous determination of *Pseudomonas aeruginosa* elastase, human leukocyte elastase and cathepsin G activities by micellar electrokinetic chromatography. *J Chrom A* 846:125-13.

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

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

Whiley RA, Fraser H, Hardie JM, Beighton D (1990) Phenotypic differentiation of *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* strains within the *Streptococcus milleri* group. *J Clin Microbiol* 28(7):1497-1501.

- Worlitzsch D, Rintelen C, Böhm K, Wollschläger B, Merkel N, Borneff-Lipp M, Döring G (2009) Antibiotic-resistant obligate anaerobes during exacerbations of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect* 15:454-460.
- 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(3):317-325.
- Yanagisawa M, Kuriyama T, Williams DW, Nakagawa K, Karasawa T (2006) Proteinase activity of *Prevotella* species associated with oral purulent infection. *Curr Microbiol* 52:375-378.
- Yoon SS, Coakley R, Lau GW, Lyman SV, Gaston B, Karabulut AC, Hennigan RF, Hwang S-H, Buettner G, Schurr MJ, Mortensen JE, Burns JL, Speert D, Boucher RC, Hassett DJ (2006) Anaerobic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* by acidified nitrite derivatives under cystic fibrosis airway conditions. *J Clin Invest* 116:436-446.
- Yoon SS, Hennigan RF, Hilliard GM, Ochsner UA, Parvatiyar K, Kamani MC, Allen HL, DeKievit TR, Gardner PR, Schwab U, Rowe JJ, Iglewski BH, McDermott TR, Mason RP, Wozniak DJ, Hancock REW, Parsek MR, Noah TL, Boucher RC, Hassett DJ (2002) *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev Cell* 3:593-603.
- Zemanick ET, Sagel SD, Harris JK (2011) The airway microbiome in cystic fibrosis and implications for treatment. *Curr Opin Pediatr* 23:319-324.
- Zielenski J, Tsui LC (1995) Cystic fibrosis: Genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* 29:777-807.

## 8 THESEN

1. Die Cystische Fibrose ist die häufigste schwerwiegende autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung der westlichen Industrienationen. Die aus Infektion und Inflammation resultierende progressive Einschränkung der Lungenfunktion ist die häufigste Todesursache bei CF-Patienten.
2. Die CF-Haupterreger sind *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *H. influenzae*, *B. cepacia complex* und *S. maltophilia*. Seit kurzem ist bekannt, dass in der CF-Lunge anaerobe Bakterien in hohen Keimzahlen vorkommen. Unklar ist, inwiefern die Anaerobier das pathogenetische Geschehen in der CF-Lunge beeinflussen.
3. *S. constellatus* ist ein Erreger, welcher in aktuellen Veröffentlichungen in Zusammenhang mit bronchopulmonalen Exazerbationen gesehen wird, aufgrund seiner Mikroaerophilie mit üblichen Kulturnachweisverfahren aber häufig unentdeckt bleibt.
4. In der vorliegenden Arbeit wurde *S. constellatus* als Bestandteil der polymikrobiellen Lungeninfektion genauer betrachtet. Dazu wurden *in vitro* die Wechselwirkungen mit *P. aeruginosa*, dessen Laktatproduktion sowie hämolytisches und elastolytisches Verhalten getestet.
5. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass *S. constellatus* in der Lage ist, die Keimzahl von *P. aeruginosa* um eine Zehnerpotenz von  $2,9 \pm 1,5 \times 10^9$  KBE/ml auf  $3,0 \pm 5,3 \times 10^8$  KBE/ml zu reduzieren,  $p < 0,05$ . Der Anaerobier profitiert von der Anwesenheit von *P. aeruginosa* und wächst selbst in höheren Keimzahlen.
6. Die gemeinsamen Wachstumsversuche zeigten, dass kleinste Mengen eines Anaerobiers ( $< 5 \times 10^0$  KBE/ml) in einer hoch konzentrierten *P. aeruginosa*-Suspension proliferieren können. *S. constellatus* wächst selbst nach zehnmillionenfacher Verdünnung innerhalb von 72 Stunden auf vergleichbar hohe Keimzahlen wie *P. aeruginosa* an. Die Ergebnisse stützen die Theorie der aus der Mundhöhle in die CF-Lunge eingewanderten Anaerobier, da sie beweisen, dass die Erreger zumindest *in vitro* dazu in der Lage sind.

7. Betahämolyse und Elastinabbau konnten bei den hier untersuchten *S. constellatus*-Stämmen und weiteren untersuchten Anaerobiern als mögliche Pathomechanismen ausgeschlossen werden.
8. Es fiel auf, dass der Erreger *in vitro* mit  $22,0 \pm 0,3$  mmol/l nach 2 Tagen außerordentlich große Mengen an Laktat produziert und damit sein Wachstumsmilieu beeinflusst. Erhöhte Laktat-Werte im CF-Sputum während einer bronchopulmonalen Exazerbation können einen Hinweis auf eine bisher nicht entdeckte Infektion mit *S. constellatus* darstellen. Laktat ist jedoch nachweislich nicht der Metabolit, welcher das Wachstum von *P. aeruginosa* einschränkt.
9. Die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Sonderrolle von *S. constellatus* bei der polymikrobiellen Lungeninfektion. Sie sollten dazu führen, dass besonders in klinisch kritischen Situationen, Diagnostik und Therapie der Erkrankung auch auf dessen Vorhandensein abzustimmen sind.
10. Es ist jedoch zu bedenken, dass eine gegen *S. constellatus* gerichtete Therapie *P. aeruginosa* einen iatrogenen Wachstumsvorteil verschaffen kann.

# TABELLARISCHER LEBENS LAUF

Anne Luise Stotz (geb. Jaschinski) | Neuwerk 10 | 06108 Halle

## Angaben zur Person

Geburtstag	14.11.1984
Geburtsort	Leisnig
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

## Angaben zur Ausbildung

Schulbildung	
06/2003	Johann-Andreas-Schubert-Gymnasium, Dresden Allgemeine Hochschulreife
Hochschulbildung	
seit 10/2004	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Studium der Humanmedizin
09/2006	1. Staatsexamen
10/2010	2. Staatsexamen
11/2010	Approbation als Ärztin

## Berufserfahrung & Praktika

Krankenhaus Dresden-Friedrichstadt	
10/2003 – 12/2003	3-monatiges Krankenpflegepraktikum
Gemeinschaftspraxis Stotz, Gera	
12/2010 – 06/2012	angestellte Ärztin in der Praxis für Allgemeinmedizin und Frauenheilkunde
04/2011 – 06/2012	Mutterschutz und Elternzeit

Krankenhaus Martha-Maria Halle-Dörlau

Seit 07/2012

Assistenzärztin in Weiterbildung in der Klinik für  
Frauenheilkunde

Halle, 03.12.2013

Anne Luise Stotz

## **SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt zu haben. Dabei habe ich mich keiner anderen als der von mir angegebenen Quellen und Hilfen bedient.

Halle, 03.12.2013

Anne Luise Stotz

## **ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE**

Hiermit erkläre ich, bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt zu haben.

Halle, 03.12.2013

Anne Luise Stotz



## **DANKSAGUNG**

Meinen Dank möchte ich Frau Prof. Dr. med. Marianne Borneff-Lipp, Direktorin des Institutes für Hygiene der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit und die hilfreichen Diskussionen und Anregungen aussprechen.

Darüber hinaus gilt mein Dank insbesondere Herrn PD Dr. med. habil. Dieter Worlitzsch, Oberarzt des Institutes für Hygiene der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Ich bedanke mich für das mir entgegen gebrachte Vertrauen, dieses Thema bearbeiten zu dürfen und die wertvolle Unterstützung und Betreuung sowohl bei der Durchführung als auch beim Schreiben der hier vorliegenden Arbeit.

Mein Dank gilt ebenso Frau Dr. med. Bettina Wollschläger, Oberärztin der Klinik für Innere Medizin I, ohne deren wertvolle Arbeit mit den CF-Patienten diese Studie nicht möglich gewesen wäre.

Großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Andreas Wienke, stellvertretender Direktor vom Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Medizinische Informatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die Unterstützung und Hilfestellung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau Nadine Wörfel und Frau Barbara Christgen, den medizinisch-technischen Assistentinnen des Labors für Krankenhaushygiene des Institutes für Hygiene der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die freundliche Unterstützung und Hilfestellung bei der Durchführung meiner Experimente im Labor.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Hygiene der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, danke ich für die freundliche Zusammenarbeit.

Besonderer Dank gilt ebenso meinem ehemaligen Laborpartner und jetzigen Ehemann Martin Stotz, der mich zu jeder Unzeit geduldig und verständnisvoll zu meinen „kleinen anspruchsvollen anaeroben Freunden“ begleitete und mich mit Kritik und Anregungen bei den Experimenten unterstützte.