

Aus dem Institut für Hygiene

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

(Direktorin: Prof. Dr. med. habil. Marianne Borneff-Lipp)

**Der parodontale Sulkus als mögliche Infektionsquelle der chronischen
Lungeninfektion bei Patienten mit Cystischer Fibrose**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Annegret Huse

geboren am 11.01.1984 in Leipzig

Betreuer: PD Dr. med. habil. Dieter Worlitzsch

Gutachter/ Gutachterin: Herr PD Dr. Worlitzsch
Herr Prof. Dr. Sawers
Frau PD Dr. Staab

Eröffnungsdatum: 14.01.2014

Verteidigungsdatum: 15.01.2015

Meinen Eltern

Referat

Patienten mit Cystischer Fibrose (CF) entwickeln in Folge ihrer Erkrankung chronisch-bakterielle Lungeninfektionen, welche häufig den Grund für den vorzeitigen Tod der Patienten darstellen. In dieser Studie wurde untersucht, ob der parodontale Sulkus ein mögliches Reservoir für diese Bakterien darstellt, und somit eine mögliche Quelle der Kontamination bietet und ob die erhöhte Antibiotikagabe bei diesen Patienten zu einer erhöhten Resistenz der Bakterien führt. 26 CF-Patienten und 33 gesunde Probanden nahmen an dieser Studie teil. Bei allen Teilnehmern wurde eine zahnärztliche Untersuchung durchgeführt und mikrobiologische Proben aus den Zahntaschen entnommen. Somit konnte die mikrobielle Kolonisation der parodontalen Sulci von CF-Patienten mit derjenigen, gesunder Teilnehmer verglichen werden. 24 CF-Patienten expektorierten zusätzlich Sputum. Somit war ein Vergleich der in Zahntaschen und Sputum vorkommenden Spezies möglich. Mittels standardisierter Methoden wurden die Proben aerob und anaerob verarbeitet, die Bakterien auf ausgewählten Nährmedien angezüchtet, selektiert und über biochemische Identifizierungssysteme fakultative und obligate Anaerobier identifiziert. Im Anschluss wurde die antibiotische Empfindlichkeit isolierter Bakterien gegenüber Azithromycin, Colistin, Meropenem, Piperacillin/Tazobactam, Ceftazidim, Metronidazol sowie Clindamycin untersucht. Die mikrobielle Besiedlung der Zahntaschen von CF-Patienten unterschied sich hinsichtlich Bakterienart und -häufigkeit nicht von derjenigen gesunder Teilnehmer. Die CF-Patienten wiesen allerdings höhere Raten resistenter Stämme auf. Bei 21 der 24 Patienten (87,5%), welche fakultative Anaerobier im Sputum aufwiesen, konnten gleichzeitig identische Spezies aus den Zahntaschen isoliert werden. Derartige Paare konnten auch bei 17 von 19 Patienten mit obligaten Anaerobiern im Sputum nachgewiesen werden (89,5%). Die Resistenzmuster waren bei 10 von 21 (47,6%) dieser fakultativ anaeroben Bakterienpaare und bei 9 von 17 (52,9%) der obligat anaeroben Bakterienpaare identisch. Die Antibiotikatherapie der CF-Patienten führt, im Vergleich zu gesunden Personen, offensichtlich zu einer erhöhten Rate resistenter Bakterienstämme. Der Nachweis identischer Bakterien in den parodontalen Sulci und im Sputum von CF-Patienten legt einen Zusammenhang beider Kompartimente nahe. Zahntaschen könnten ein Reservoir dieser Bakterien darstellen und somit als mögliche Quelle der chronischen Lungeninfektion in Frage kommen.

Annegret Huse: Der parodontale Sulkus als mögliche Quelle der chronischen Lungeninfektion bei Patienten mit Cystischer Fibrose. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 74 Seiten, 2014

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Cystische Fibrose	1
1.2 Chronisch-bakterielle Lungenentzündungen bei Patienten mit CF	2
1.3. Mikrobiologie der chronischen Lungeninfektion bei CF	4
1.3.1 Fakultative Anaerobier	4
1.3.2 Obligate Anaerobier	6
1.4 Herkunft der Bakterien	7
1.5 Parodontaler Sulkus als Bakterienreservoir.....	9
2 Zielsetzung.....	11
3 Material und Methodik	12
3.1 Studienteilnehmer	12
3.1.1 CF-Patienten.....	12
3.1.2 Kontrollgruppe	12
3.1.3 Votum der Ethikkommission	12
3.2 Zahnärztliche Untersuchung	13
3.3 Probenentnahme	15
3.3.1 Zahnfleischtaschen.....	15
3.3.2 Sputumproben	16
3.4 Lungenfunktionsbestimmung	16
3.5 <i>In vitro</i> -Untersuchungen.....	16
3.5.1 Anzucht der Bakterien aus dem parodontalen Sulkus.....	16
3.5.2 Anzucht und Quantifizierung der Bakterien aus dem Sputum von CF-Patienten	19
3.5.3 Identifizierung fakultativ anaerober Bakterien.....	20
3.5.4 Identifizierung obligat anaerober Bakterien	22
3.5.5 Resistenzbestimmungen.....	23
3.5.6 Statistik	26
4 Ergebnisse	27
4.1 Mikrobielle Zusammensetzung des parodontalen Sulkus.....	27
4.1.1 Identifizierung fakultativer Anaerobier in Zahntaschen von CF-Patienten und Kontrollprobanden.....	27

4.1.2	Identifizierung obligater Anaerobier in Zahntaschen von CF-Patienten und Kontrollprobanden.....	30
4.2	Quantifizierung fakultativer und obligater Anaerobier im Sputum von CF-Patienten.....	33
4.3	Vergleich der mikrobiellen Zusammensetzung des Sputums von CF-Patienten mit der des parodontalen Sulkus von CF-Patienten und Gesunden	33
4.3.1	Fakultative Anaerobier	33
4.3.2	Obligate Anaerobier	38
4.4	Resistenzbestimmung.....	41
5	Diskussion	45
5.1	Einfluss der Antibiotikatherapie auf die mikrobielle Zusammensetzung der Zahntaschen von CF-Patienten	45
5.2	Identifizierung gleicher Bakterienspezies in den parodontalen Sulci von CF-Patienten und Gesunden	45
5.3	Vergleich der Bakterien in den Zahntaschen und Sputen von CF-Patienten.....	47
5.4	Nachweis identischer Bakterien in den parodontalen Sulci und Sputen von CF-Patienten.....	49
5.5	Vergleich der antibiotischen Empfindlichkeit	50
5.6	Vergleich der Resistenzprofile identischer Paare	52
5.7	Fazit	53
6	Zusammenfassung	54
7	Literaturverzeichnis	57
8	Anhang	64
9	Thesen	73

Lebenslauf

Selbstständigkeitserklärung

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Danksagung

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
±	plusminus
%	Prozent
Abb.	Abbildung
Art.-Nr.	Artikelnummer
ATP	Adenosintriphosphat
AZM	Azithromycin
bzw.	beziehungsweise
<i>B.</i>	<i>Burkholderia</i>
<i>Ba.</i>	<i>Bacteriodes</i>
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
<i>Ca.</i>	<i>Campylobacter</i>
CAZ	Ceftazidim
CD	Clindamycin
CDC	CDC-Anaerobier-Agar mit 5% Schafsblut
CF	cystic fibrosis, Cystische Fibrose
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CLSI	Clinical and Laboratory Institute
COPD	Chronic Obstructive Lung Disease
CS	Colistin
DMF-T Index	decayed, missing, filled-teeth, Kariesindex nach Klein und Palmer im permanenten (erwachsenen) Gebiss
dmf-t Index	decayed, missing, filled-teeth, Kariesindex nach Klein und Palmer im Milchgebiss
<i>E.</i>	<i>Eubacterium</i>
<i>F.</i>	<i>Fusobacterium</i>
FEV ₁	forced expiratory volume in one second, Forcierte Einsekundenkapazität
FVC	forced vital capacity, Forcierte Vitalkapazität
<i>G.</i>	<i>Gemella</i>
g	Gramm
H ₂ O	Wasser

Hz	Hertz
i	intermediär
KBE	Koloniebildende Einheit
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
LZ	Metronidazol
<i>M.</i>	<i>Mobiluncus</i>
mg	Milligramm
MHK	Minimale Hemmkonzentration
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRP	Meropenem
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Dinatriumphosphat
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NL	normale Clearance
O_2^-	Hyperoxid-Anion
O_2^{2-}	Peroxid-Anion
OHI-S	oral-Hygiene-Index simplified nach Greene und Vermillion
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PBI	Papillen-Blutungs-Index nach Saxer und Mühlemann
PBS	phosphat buffert saline, Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion</i>
pH-Wert	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
<i>Pr.</i>	<i>Prevotella</i>
<i>Pro.</i>	<i>Probionibacterium</i>
<i>Ps.</i>	<i>Peptostreptococcus</i>
Q.	Quadrant
Q_{O_2}	epithelialer Sauerstoffverbrauch
r	resistent
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
s	sensibel

SCS	Schaedler-Agar mit 5% Hammelblut
Sp.	Sputum
spp.	Spezies
<i>St.</i>	<i>Stenotrophomonas</i>
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
Tab.	Tabelle
TSB	Tryptone Soya Broth
TZP	Piperacillin/Tazobactam
V	Volt

1 Einleitung

1.1 Cystische Fibrose

Die Cystische Fibrose (Cystic fibrosis, CF oder auch Mukoviszidose) ist die häufigste autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung in der kaukasischen Bevölkerung (Ratjen und Döring, 2003). Diese Erkrankung betrifft hier etwa eine unter 2500 Lebendgeburten. Weniger häufig tritt CF in der lateinamerikanischen (1:9000), asiatischen (1:32000) und afroamerikanischen Bevölkerung (1:15000) auf (Gibson et al., 2003).

Der genetische Defekt beruht auf einer Mutation des cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Genes, welches für ein gleichnamiges Protein kodiert, das wiederum als Chloridkanal in schleimsezernierenden Epithelien (Riordan et al., 1989) fungiert. Das verantwortliche Gen wurde 1989 auf dem langen Arm des Chromosoms 7 entdeckt (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989). Derzeit sind über 1900 Mutationen bekannt (The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, Cystic fibrosis Mutation Database, Zugriff Dezember 2013), welche dazu führen, dass das CFTR-Protein gar nicht oder fehlerhaft ausgebildet wird, zu geringfügig exprimiert wird oder nur geringfügige Leitfähigkeit von Chloridionen aufweist (Vankeerberghen et al., 2002; Gibson et al., 2003; Ratjen und Döring, 2003). In exokrinen Drüsen führt der resultierende pathologische Ionenfluss dazu, dass dehydratisiertes, hochvisköses Sekret sezerniert wird (Matsui et al., 1998; Hobbs et al., 2013).

Das klinische Bild der CF-Patienten kann sich, trotz gleichartiger Mutationen des CFTR-Genes, deutlich unterscheiden. Vermutet wird, dass Umwelteinflüsse und zusätzliche genetische Faktoren das phänotypische Erscheinungsbild beeinflussen (Vankeerberghen et al., 2002). Betroffen sind sekretorische Zellen, Nasennebenhöhlen, Lunge, Pankreas, Leber, Schweißdrüsen und Fortpflanzungsorgane (Ratjen und Döring, 2003). Aber vor allem die Entwicklung chronisch-bakterieller Lungeninfektionen, mit folgender Zerstörung von Lungengewebe (Koch und Høiby, 1993) und resultierendem Verlust der Lungenfunktion (Muramatu et al., 2013), stellen den Grund für den vorzeitigen Tod der Patienten dar (Döring und Gulbins, 2009).

1.2 Chronische bakterielle Lungeninfektionen bei Patienten mit CF

Die Atemwege sind stetig den Bakterien in der Umgebungsluft ausgesetzt, welche schließlich aspiriert werden. Trotz dieser Exposition ist die Lunge gesunder Menschen steril (Smith et al., 1996). Dafür ist vor allem die mukoziliäre Clearance verantwortlich, ein Selbstreinigungsprozess, welcher die Atemwegsepithelien reinigt. Über respiratorischen Epithelien liegt eine von den Zellen sezernierte periziliäre Flüssigkeitsschicht, welche über einen stetigen Ionentransport ein konstantes Volumen aufweist, in welchem sich die Kinozilien über ihre gesamte Länge ausbreiten können (Tarran et al., 2005). Darüber befindet sich eine schmale, niedrig-visköse Schleimschicht, auch airway surface liquid genannt, welche hauptsächlich aus Wasser besteht. Durch eine rachenwärts gerichtete Bewegung der Kinozilien werden inhalierte Partikel mit dieser Schleimschicht stetig nach außen befördert (Abb. 1a). Somit werden die Atemwege ohne jegliche Entzündungsreaktion von möglichen pathogenen Keimen gereinigt.

Bei CF-Patienten findet keine effiziente mukoziliäre Clearance statt. Durch die Mutation des CFTR-Proteins ist die Volumenregulation der periziliären Flüssigkeitsschicht gestört, diese wird absorbiert und es kommt zu einer Stauung des sezernierten Mukus, in dessen Folge Kinozilien abgewinkelt und komprimiert werden (Matsui et al., 1998; Tarran et al., 2005). Der gesteigerte Chlorid- und Natriumionen-Influx an der apikalen Zellmembran führt zu einem gesteigerten Einstrom von Wasser in die Zelle. Der Schleim wird viskös und verfestigt sich schließlich zu Mukusplaques (Abb. 1b). Infolge des starken ATP-Verbrauches von Natrium-Kalium-Pumpen, kommt es zusätzlich zu einem gesteigerten Sauerstoffverbrauch der Epithelzellen, wodurch ein Sauerstoffgradient innerhalb der Mukusplaques entsteht (Worlitzsch et al., 2002; Abb. 1c).

Dadurch, dass bereits die erste Abwehrmaßnahme, die mukoziliäre Clearance, versagt, kommt es häufig zu einer Ansiedlung normalerweise harmloser Bakterien in der Lunge (Davis, 2002). Diese setzen sich auf den Mukusplaques ab, dringen in hypoxische Zonen vor (Abb. 1d), und es kommt zu einer Kolonisation der Bakterien (Worlitzsch et al., 2002). Eine überhöhte, fortwährende und sich ausbreitende Entzündungsreaktion auf diese Bakterien, vor allem durch neutrophile Granulozyten, charakterisiert die Lungenerkrankung der CF-Patienten (Ratjen und Döring, 2003; Ulrich et al., 2010) und führt schließlich zu Gewebeerstörung, Verlust an

Lungengewebe und irreversibler Lungeninsuffizienz (Koch und Høiby, 1993; Ulrich et al., 2010).

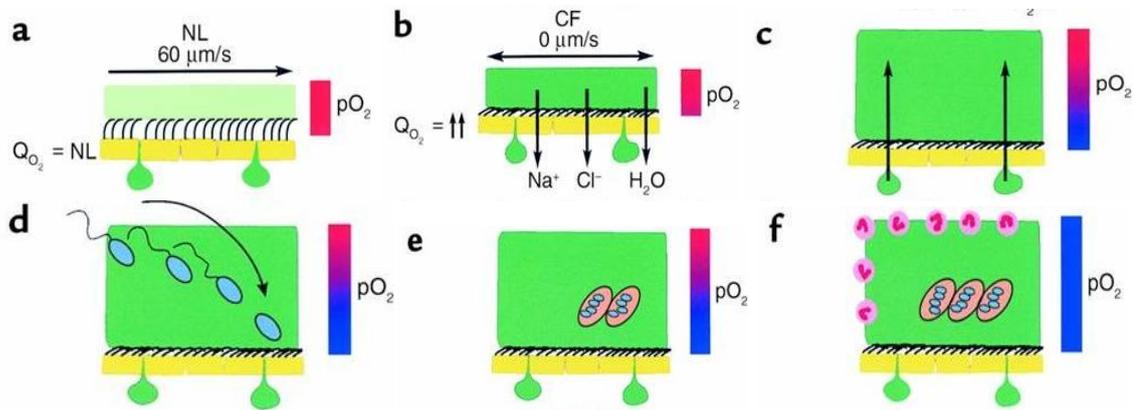


Abbildung 1: Schematische Darstellung der chronischen *P. aeruginosa*-Infektion in der Lunge von CF-Patienten (Worlitzsch et al., 2002)
Abkürzungen: NL: normale Clearance, pO_2 : Sauerstoffpartialdruck, Q_{O_2} : epithelialer Sauerstoffverbrauch

Nach der initialen Infektion können die Krankheitssymptome geringfügig ausgeprägt sein (Koch und Høiby, 1993). Husten ist das deutlichste Symptom aller Altersklassen, häufig assoziiert mit Sputumauswurf (Gibson et al., 2003). Erst mit Ausbildung chronischer Infektionen und Bildung spezifischer Antikörper entwickeln sich bronchopulmonale Entzündungen und Obstruktionen. Eine chronische Infektion führt zu einem Anstieg der Entzündungsreaktion und einer Abnahme der Lungenfunktion (Zemanick et al., 2013). Die immunologische Entzündung führt schließlich zu einer Gewebeerstörung (Koch und Høiby, 1993; Ulrich et al., 2010). Mit fortschreitender Erkrankung steigt das Volumen des täglich expektorierten Sputums, auch Bluthusten kann beobachtet werden (Gibson et al., 2003). Die Patienten leiden an Dyspnoe und Kurzatmigkeit, schließlich sind sie von ständiger Sauerstoffzufuhr abhängig (Gibson et al., 2003).

Derzeit gibt es noch keine kausale Therapie der CF. Eine Heilung wäre nur dadurch zu erreichen, die Funktion des CFTR-Proteins wiederherzustellen (Ratjen und Döring, 2003). Eine symptomatische Therapie richtet sich daher vor allem darauf, ein Fortschreiten und eine Verschlechterung der durch den Gendefekt hervorgerufenen

Organerkrankungen zu verhindern (Gibson et al., 2003) und beinhaltet unter anderem eine mukolytische Therapie, eine Physiotherapie sowie eine Ernährungstherapie (Döring et al., 2000). Vor allem aber die antibiotische Therapie der CF zeigt eine signifikant positive Auswirkung auf die Prognose und die steigende Lebenserwartung der Patienten (Döring und Høiby, 2004; LiPuma, 2010) und ist daher essentieller Teil in der Behandlung der Patienten (Gibson et al., 2003). In der frühen Phase der Erkrankung werden Antibiotika eingesetzt, um einen Ausbruch chronischer Infektionen zu verzögern. Später erfahren die Patienten eine Erhaltungstherapie, um die fortschreitende Verschlechterung der Lungenfunktion zu verlangsamen. Während der Phasen akuter Exazerbationen der CF kommt es zu einem besonders intensiven Einsatz von Antibiotika, häufig verbunden mit Krankenhausaufenthalten, um die Symptomatik zu lindern und die Lungenfunktion wieder herzustellen (Gibson et al., 2003). Eine antibiotische Therapie kann auch prophylaktisch eingeleitet werden mit der Absicht, vorzeitig die Folgen der CF für die Patienten positiv zu beeinflussen (Döring und Høiby, 2004) und chronische Infektionen zu vermeiden (Koch und Høiby, 1993). Der häufig massive und wiederholte Einsatz von Antibiotika geht mit dem erhöhten Risiko steigender Resistenzen einher (Ratjen und Döring, 2003).

1.3 Mikrobiologie der chronischen Lungeninfektion bei CF

1.3.1 Fakultative Anaerobier

Zu Beginn der Erkrankung dominieren besonders häufig Infektionen mit *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* und *Streptococcus pneumoniae*. Erst später kommt es zu chronischen Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* (Koch und Høiby, 1993). Auch *Stenotrophomonas maltophilia* und *Burkholderia cepacia* sind häufige mit CF assoziierte Keimarten. Vor allen anderen werden gerade diese Bakterien für die Entstehung und Progression chronischer Lungeninfekte bei CF-Patienten verantwortlich gemacht (Koch und Høiby, 1993; Ratjen und Döring, 2003).

S. aureus ist meist der erste und auch häufigste Erreger, der bei Patienten mit CF isoliert werden kann (LiPuma, 2010), es ist der einzige CF-typische Erreger, der auch bei immunkompetenten Personen krankheitsverursachend sein kann (Gibson et al., 2003). Der Erreger ist häufig auf der Haut und in den vorderen Abschnitten der Nase auch gesunder Personen lokalisiert (Döring und Høiby, 2004). Eine prophylaktische antimikrobielle Therapie gegen *S. aureus* geht mit einer niedrigeren Anzahl von *S. aureus*-Nachweisen einher sowie mit einer niedrigeren Rate von

Krankenhausaufenthalten (Ratjen und Döring, 2003). Allerdings weisen Patienten mit einer kontinuierlichen prophylaktischen Antibiose gegen *S. aureus* auch eine höhere Rate von *P. aeruginosa*-Nachweisen auf (Ratjen, 2001). Dramatisch ist auch die steigende Anzahl Methicillin-resistenter *S. aureus*-Stämme (LiPuma, 2010).

Infektionen mit *B. cepacia* sind seltener, können aber mit einer rapiden Verschlechterung der Lungenerkrankung einhergehen (Koch und Høiby, 1993), verbunden mit hohem Fieber, Bakteriämie und nekrotisierender Pneumonie (Gibson et al., 2003). Dagegen sind Infektionen mit *St. maltophilia* häufiger, aber weniger virulent (Gibson et al., 2003).

P. aeruginosa, der bedeutsamste pathogene Erreger der CF-Erkrankung (Gibson et al., 2003), ist ein ubiquitär vorkommender Umweltkeim, welcher häufig in Abflüssen und anderen Wasserreservoirs vorgefunden wird (Döring et al., 2000; Davies, 2002). Dieser Keim ist nicht spezifisch für CF, dennoch findet man ihn besonders häufig in Verbindung mit der Erkrankung (Koch und Høiby, 1993). Es handelt sich um ein gramnegatives Stäbchenbakterium, welches sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen wachsen kann und sich intraluminal in den CF-Atemwegen befindet (Worlitzsch et al., 2002). Seine genetische und phänotypische Plastizität ermöglicht eine Adaptation an die Umgebungsbedingungen (Gibson et al., 2003). Unter den anaeroben Bedingungen innerhalb der Mukusplaques kommt es zu einer Veränderung im Wachstum von *P. aeruginosa* von einem non-mukoiden zu einem mukoiden Typ (Koch und Høiby, 1993; Worlitzsch et al., 2002; Abb. 1e). *P. aeruginosa* wächst in Makrokolonien, geschützt von einem dreidimensionalen Biofilm mit gesteigerter Alginateproduktion (Koch und Høiby, 1993; Worlitzsch et al., 2002). Dieser Biofilm (Donlan und Costerton, 2002) sowie die bestehende Hypoxie (Worlitzsch et al., 2002) führen letztlich zu einer verminderten Funktion der Abwehrezellen (Worlitzsch et al., 2002; Jensen et al., 2007; Abb. 1f) und auch durch eine antibiotische Therapie lässt sich der etablierte Biofilm nicht mehr ausreichend therapieren (Anwar et al., 1992; Costerton, 2002; Drenkard, 2003; Worlitzsch et al., 2009). Durch Absiedlung von Tochterkolonien in den Verzweigungen des Bronchialbaumes ist *P. aeruginosa* schließlich in fast allen Teilen der unteren Atemwege vorzufinden (Koch und Høiby, 1993).

1.3.2 Obligate Anaerobier

Die Vorstellung, die chronisch-bakterielle Lungeninfektion würde durch nur wenige, spezifische fakultativ anaerobe Bakterien ausgelöst, änderte sich mit dem Nachweis hypoxischer Bedingungen in den Mukusplaques (Worlitzsch et al., 2002). Unter diesen anaeroben Bedingungen liegt es nahe, dass es sich bei der chronischen Lungeninfektion der CF-Patienten um eine Mischinfektion handeln müsse, bei der neben fakultativen Anaerobiern auch obligat anaerob wachsende Bakterien in der Lunge vorkommen (Tunney et al., 2008).

Obligat anaerobe Bakterien wachsen nur in der Abwesenheit von Sauerstoff. Sie gehören zur physiologischen Standortflora des Menschen, beispielsweise der Mundhöhle, des Gastrointestinaltraktes und der Haut (Koneman et al., 1997). Bei Reduktion von Sauerstoff entstehen Wasser sowie die Sauerstoffradikale O_2^{2-} und O_2^- . Das Peroxid-Anion O_2^{2-} , welches durch Protonenanlagerung zu Wasserstoffperoxid wird, sowie das Hyperoxid-Anion O_2^- sind toxisch. Für deren Entgiftung sind Katalase und Superoxid-Dismutase notwendig. Da obligat anaeroben Bakterien diese Enzyme fehlen, ist Sauerstoff für sie toxisch. Diese Bakterien gewinnen ihre Energie hauptsächlich durch Gärung (Brandis et al., 1994).

So wurden unter anderem durch die Forschungsgruppe um Tunney und Elborn obligate Anaerobier, wie *Bifidobacterium spp.*, *Prevotella spp.*, *Veillonella spp.*, *Peptostreptococcus spp.* und *Fusobacterium spp.*, in CF-Sputen nachgewiesen (Field et al., 2005, Tunney et al. 2008). Rogers und Mitarbeiter konnten neben fakultativen Anaerobiern auch diverse obligat anaerobe Bakterien, wie *Bacteriodes spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.* und *Veillonella spp.*, im Sputum von CF-Patienten nachweisen (Rogers et al., 2004). Auch die Arbeitsgruppe um Tunney wies eine hohe Anzahl anaerober Bakterien in CF-Sputen nach. Sie isolierten 14 anaerobe Genera, wobei es sich bei drei Genera um mikroaerophile Bakterienarten handelte. Der Nachweis gleicher anaerober Bakterienspezies in den Sputumproben, welche von den Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen wurden, bewies eine Persistenz dieser Bakterien in der CF-Lunge über einen längeren Zeitraum. Auch konnten sie aufzeigen, dass anaerobe Genera in Proben induzierten Sputums gesunder Kontrollprobanden in wesentlich geringerer Anzahl vorlagen (Tunney et al., 2008). Worlitzsch und Mitarbeiter wiesen ebenfalls obligate Anaerobier in vergleichbaren Anzahlen in den Sputen von Erwachsenen und Kindern mit CF über einen längeren Zeitraum nach. Sie zeigten, dass die antimikrobielle Therapie gegen *P. aeruginosa* in

der akuten Exazerbation der CF zwar die Lungenfunktion positiv beeinflusste, die Anzahl obligater Anaerobier allerdings nicht verringerte (Worlitzsch et al., 2009).

Obligate Anaerobier sind Teil des komplexen mikrobiologischen Systems der CF-Lunge, dennoch ist unklar, welche Rolle sie in der Pathophysiologie der chronischen Lungeninfektion bei CF spielen (Jones, 2011).

1.4 Herkunft der Bakterien

Mögliche Reservoirs für die CF-typischen pathogenen, fakultativ anaeroben Keimarten sind Abflüsse, von beispielsweise Duschen und Toiletten, Abwasserausflüsse an offenen Gewässern, medizinische Instrumente, wie beispielsweise Inhalationsgeräte, Whirlpools, Luftbefeuchter, Dentaleinheiten, der Erdboden an sich, Pflanzen und Nahrungsmittel, wie zum Beispiel Gemüse, aber auch kontaminierte gesunde Personen sowie bereits infizierte Patienten (Döring und Høiby, 2004). Die exakte Route der Bakterien in die unteren Atemwege bleibt allerdings unbekannt (Döring et al., 2000) und die Infektionsquelle lässt sich meistens für den einzelnen Patienten nicht mehr nachvollziehen (Döring und Høiby, 2004). Vermutet wird eine Übertragung von Bakterien in Aerosolen, die direkt durch Aspiration in die unteren Atemwege gelangen oder indirekt durch kontaminierte Hände. Aber auch eine Kolonisation der Atemwege und des Gastrointestinaltraktes durch Aufnahme kontaminierter Nahrungsmittel ist möglich. Enger und langanhaltender Kontakt zu kontaminierten bzw. infizierten Personen, beispielsweise in Wohnräumen oder auch an öffentlichen Plätzen, sowie eine Cross-Infektion in Krankenhäusern ist vorstellbar (Döring und Høiby, 2004).

Mögliche Quellen einer Kontamination mit obligaten Anaerobiern wurden bisher nicht beschrieben. Als mögliche Reservoirs wurden bereits verschiedene Körperkompartimente untersucht.

Bei den von Tunney und Mitarbeitern isolierten obligaten Anaerobier handelte es sich um solche, die normalerweise aus dem Oropharynx isoliert werden. Sie vermuteten daher, dass Bakterien aus den oberen in die unteren Atemwege gelangen, und es aufgrund der verminderten mukoziliären Clearance der CF-Patienten zu einer Kolonisation dieser obligaten Anaerobier in der Lunge kommt, welche dann die Infektion auslösen (Tunney et al., 2008).

Rhinogene Entzündungen und Entzündungen der Nasennebenhöhlen sind häufig assoziierte Symptome bei CF, in deren Folge der Sauerstoffgehalt in den Lumina der

Sinus stark absinkt. Der Sauerstoffpartialdruck der Mukosa ist bei CF-Patienten deutlich niedriger als derjenige gesunder Personen (Aanæs et al., 2011). Es wurden bereits in mehreren Studien *P. aeruginosa* und *S. aureus* in den Nasennebenhöhlen identifiziert (Mühlebach et al., 2006; Mainz et al., 2009; Aanæs et al., 2011). Schon im Kindesalter der CF-Patienten lassen sich die CF-typischen Keimarten in den Sinus maxillaris nachweisen, wobei *S. aureus* am häufigsten isoliert werden kann (Digoy et al., 2012). Auch konnten bei mehreren CF-Patienten in den Nasennebenhöhlen und in den Lungen jeweils zu 100% genotypisch identische *P. aeruginosa*-Stämme isoliert werden (Johansen et al., 2012) sowie eine Rekolonisation der Lunge mit dem genotypisch identischen *P. aeruginosa*-Stamm bei einigen Patienten nachgewiesen werden, obwohl der jeweilige Stamm zuvor durch eine antibiotische Therapie ausgerottet wurde (Johansen et al., 2012). Weiterhin wurde aufgezeigt, dass *P. aeruginosa* in den Nasennebenhöhlen in gleichen Biofilmstrukturen wächst, wie in der Lunge chronisch infizierter CF-Patienten (Johansen et al., 2012). Allerdings wurden in diesen Studien keine oder nur sehr wenige (Aanæs, 2013) obligat anaerob wachsende Bakterien in den Sinus nachgewiesen.

Die Mundhöhle wurde bereits als mögliche Kontaminationsquelle betrachtet. Komiyama und Mitarbeiter untersuchten unterschiedliche Regionen der Mundhöhle auf das Vorhandensein von *P. aeruginosa*. Sie konnten ein gehäuftes Vorkommen dieses pathogenen Keimes auf dem Zungenrücken und an der Wangenschleimhaut nachweisen. Allerdings konnten sie *P. aeruginosa* wesentlich seltener in Proben von Zahnbelag nachweisen. Ihre Ergebnisse ließen vermuten, dass es zu interbakteriellen Adhäsionen zwischen *P. aeruginosa* und standorttypischen Mikroorganismen kommt, und dass eine orale Kontamination mit diesem Erreger einen initialen Schritt in der Pathogenese der Lungeninfektion bei Patienten mit CF darstellt (Komiyama et al., 1985).

Die Arbeitsgruppe um Rogers stellte die Frage, in welchem Ausmaß expektoriertes Sputum bei der Passage durch die oberen Atemwege, insbesondere der Mundhöhle, durch dort lokalisierte Bakterien kontaminiert ist. Dazu typisierten sie den 16S rRNA-Lokus von Bakterien aus der Mundhöhle und aus dem Sputum von CF-Patienten hinsichtlich eines PCR-basierten Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus und verglichen die elektrophoretisch dargestellten Bandenmuster, welche die unterschiedlichen Bakterienspezies repräsentierten. Sie wiesen sowohl gleiche als auch unterschiedliche Arten und Häufigkeiten fakultativer und obligater Anaerobier in

beiden Kompartimenten nach, schlossen aber gleichzeitig eine mögliche Kontamination des Sputums durch Bakterien der Mundhöhle aus. Um eine mögliche „Kommunikation“ zwischen Mundhöhle und Lunge nachzuweisen, verglichen sie das Ausmaß an Ähnlichkeiten über hierarchische Clusteranalysen. 10% aller nachgewiesenen Keimarten aus der Mundhöhle waren spezifisch für diese, wohingegen 30% aller Bakterien aus den Sputumproben als spezifisch für die Lunge eingeordnet wurden, was die Annahme einer möglichen Kontamination der Lunge mit Bakterien aus der Mundhöhle bestätigte (Rogers et al., 2006).

Inwiefern explizit der parodontale Sulkus, ein natürliches Reservoir obligater Anaerobier (Moore und Moore, 1994; Boutaga et al., 2005), als mögliche Quelle der Kontamination der CF-Lunge in Frage kommt, blieb bislang ungeklärt.

1.5 Parodontaler Sulkus als Bakterienreservoir

Gingiva, Wurzelzement, Desmodont und Alveolarknochen bilden zusammen das Parodont, den Zahnhalteapparat. Dieses dient der Verankerung des Zahnes im Knochen, Dämpfung von Kaukräften, Abwehr äußerer Noxen und Trennung des Mundhöhlenmilieus von der Zahnwurzel. Der Gingivasaum verläuft etwa 0,5-2 mm koronal der Schmelz-Zementgrenze der Zähne. Die Gingiva wird unterteilt in ein dem Zahn zugewandtes orales Sulkusepithel, ein der Mundhöhle zugewandtes orales Epithel und das Saumepithel. Letzteres dient der Anheftung der Gingiva an die Zahnoberfläche über hemidesmosomale Verknüpfungen zwischen Epithelzellen und Basallamina. Das Saumepithel liegt kragenförmig um den Zahn herum und reicht von der Schmelz-Zement-Grenze bis zum Boden des Gingivalsulkus (Hellwig et al., 2009).

Die Vertiefung zwischen Gingivasaum und Zahnoberfläche bildet den gingivalen bzw. parodontalen Sulkus. Dieser wird begrenzt durch den zentral liegenden Zahnschmelz bzw. den Wurzelzement, lateral durch das orale Sulkusepithel und apikal durch die Oberfläche des Saumepithels. Der parodontale Sulkus ist etwa 0,1-0,5 mm tief. Aber auch bei parodontal-gesunden Patienten werden bis zu 3 mm Taschentiefe gemessen, da das Saumepithel häufig durch die Messsonde durchstoßen wird (Hellwig et al., 2009).

Vorhandener Zahnbelag, der sich von koronal in den parodontalen Sulkus ausbreitet, wird als subgingivale Plaque bezeichnet. Diese subgingivale Plaque enthält eine beträchtliche Anzahl bakterieller Spezies in einer komplexen Zusammensetzung. Es wird vermutet, dass mehr als 400 verschiedene Bakterienspezies in dieser Region

vorkommen (Socransky et al., 1998). Der vorkommende Bakterienkomplex kann dabei entweder einen präventiven oder aber gewebedestruktiven und somit gesundheitsgefährdenden Einfluss auf das Parodont darstellen (Haffajee und Socransky, 1994). Mit zunehmender Tiefe der Zahntaschen enthalten diese eine weitaus größere Anzahl von Bakterien. Beginnend mit der Kolonisation der Zahnoberfläche bis zur Entwicklung von Gingivitis und schließlich Parodontitis folgt die Zusammensetzung der bakteriellen Flora innerhalb der parodontalen Sulci einer vorhersehbaren Abfolge (Moore und Moore, 1994). Häufig vorkommende Keimarten sind *Streptococcus spp.*, *Gemella spp.*, *Eubacterium spp.*, *Veillonella spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Campylobacter spp.*, *Bacteroides spp.* und *Prevotella spp.* und weitere (Socransky et al., 1998; Aas et al., 2005).

Ein Zusammenhang zwischen respiratorischen Lungenerkrankungen und Bakterien aus supragingivaler Plaque konnte bereits nachgewiesen werden. In einer Studie von Heo und Mitarbeitern wurden genetisch identische Stämme von *P. aeruginosa* und *S. aureus* in Zahnbelag und Lunge bei Patienten mit beatmungsassoziiierter Pneumonie nachgewiesen. Es handelte sich um Traumapatienten einer Intensivstation, welche vor dem Stationsaufenthalt eine physiologisch sterile Lunge aufwiesen. Die Studie bekräftigt die Annahme der Mundhöhle als mögliche Eingangspforte lungenpathogener Erreger aus der Umgebung (Heo et al., 2008). Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass sich nosokomiale Lungeninfektionen durch antiseptische Desinfektion der Gingiva und des Oropharynx mittels Chlorhexidindigluconat reduzieren lassen (DeRiso et al., 1996; Fourrier et al., 2005; Koeman et al., 2006).

Vor diesem Hintergrund sollen in der vorliegenden Studie die in den parodontalen Sulci und Sputen von CF-Patienten vorkommenden fakultativ und obligat anaeroben Bakterienspezies hinsichtlich Art und Häufigkeit verglichen werden. Weiterhin gilt es zu klären, ob die regelmäßige Antibiotikatherapie der CF-Patienten zu einer erhöhten Rate resistenter Bakterienstämme führt. Aber auch eine Selektion sensibler Stämme und somit eine veränderte Zusammensetzung der mikrobiellen Flora in den Zahntaschen der CF-Patienten im Vergleich zu gesunden Personen ist denkbar. Der zeitgleiche Nachweis identischer Bakterienspezies in den parodontalen Sulci und in den Sputen der CF-Patienten könnte einen Zusammenhang beider Kompartimente, beispielsweise über Aspiration, nahelegen.

2 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels standardisierter mikrobiologischer Methoden folgende Aspekte bearbeitet:

- (1) Identifizierung fakultativer und obligater Anaerobier in den parodontalen Sulci von Patienten mit CF,
- (2) Identifizierung der Bakterienspezies aus den Zahntaschen einer gesunden Kontrollgruppe,
- (3) Nachweis obligater Anaerobier im Sputum von CF-Patienten, neben den CF-typischen, pathogenen, fakultativ anaeroben Keimarten *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cepacia* und *St. maltophilia*,
- (4) Vergleich der Häufigkeiten fakultativ und obligat anaerob wachsender Bakterien aus Sputum und Zahntaschen der CF-Patienten,
- (5) Quantifizierung der Bakterien aus den CF-Sputen,
- (6) Nachweis gleichzeitig in Zahntaschen und Sputum vorkommender identischer Bakterienspezies („Paare“) von Patienten mit CF,
- (7) Bestimmung der antibiotischen Empfindlichkeit identifizierter Bakterien gegenüber ausgewählten Antibiotika,
- (8) Vergleich der antibiotischen Sensibilität der Bakterien von CF-Patienten und gesunden Kontrollprobanden,
- (9) Vergleich der Resistenzmuster der als „Paare“ auftretenden Keime und somit
- (10) Beschreibung eines möglichen Einflusses der antibiotischen Therapie auf die mikrobielle Zusammensetzung in Sputum und Zahntaschen von CF-Patienten und die Resistenzsituation der Bakterien sowie
- (11) Nachweis einer möglichen Kontamination der Lunge mit den Bakterien aus dem parodontalen Sulkus.

3 Material und Methodik

3.1 Studienteilnehmer

3.1.1 CF-Patienten

Studienteilnehmer waren 26 erwachsene CF-Patienten der CF-Ambulanz der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Halle (Saale). Die Teilnehmer, 15 Männer und 11 Frauen, hatten ein durchschnittliches Alter von $28 \pm 7,3$ Jahren. Die Altersspanne lag zwischen 19 und 50 Jahren. Diagnostiziert wurde die CF bei allen Patienten durch einen Schweißtest und/oder eine Genotypisierung. Am Tag der Probenentnahme kamen die Patienten zu einer routinemäßigen Kontrolluntersuchung in die Ambulanz, keiner litt zu diesem Zeitpunkt unter einer akuten Exazerbation. Alle erhielten eine Standard-Antibiotikatherapie mit Tobramycin (2 x 300 mg/Tag) und/oder Colistin (2 x 80 mg/Tag) sowie Azithromycin (1 x 250 mg/Tag). Für die Teilnahme an der Studie gab es keinerlei Einschränkungen.

3.1.2 Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe bestand aus 30 gesunden Erwachsenen, 14 Männer und 16 Frauen, mit einem Durchschnittsalter von $26 \pm 4,6$ Jahren (von 18 bis 37 Jahren) sowie 3 gesunden Kindern, zwei Jungen und einem Mädchen im Alter von $8 \pm 0,6$ Jahren. Alle Probanden waren Nichtraucher und durften mindestens ein halbes Jahr lang vor Studienteilnahme kein Antibiotikum eingenommen haben.

3.1.3 Votum der Ethikkommission

Die Teilnahme an dieser Studie war für alle Probanden freiwillig. Von jedem Teilnehmer wurde – nach schriftlicher und mündlicher Aufklärung über Ziel und Durchführung der Studie – eine schriftliche Einverständniserklärung unterschrieben, bei Minderjährigen erfolgte das Einverständnis durch den Erziehungsberechtigten. Alle aus der Patientenakte erhobenen Daten, zahnärztliche Befunde sowie mikrobiologische Proben wurden anonymisiert weiterverarbeitet. Vor Durchführung dieser Studie wurde das Votum der Ethik-Kommission der Martin-Luther-Universität im September 2009 eingeholt (siehe Anhang).

3.2 Zahnärztliche Untersuchung

Bei allen Studienteilnehmern wurde eine orientierende zahnärztliche Untersuchung durchgeführt. Dazu gehörte die Erfassung des dentalen und parodontalen Status auf standardisierten Befundbögen (Abb. 2), wie sie in der zahnärztlichen Praxis angewendet werden. Die Untersuchung wurde mit zuvor sterilisierten zahnärztlichen Instrumenten vorgenommen, einem Mundspiegel (Spiegelgriff Cone Socket, Art.-Nr. MHE6, Hu-Friedy Mfg. B.V. Customer Care Department, Rotterdam, Niederlande; Mundspiegel Nr. 4/12 frontverspiegelt, plan, Art.-Nr. M4C, Hu-Friedy), einer zahnärztlichen Sonde (Sonde SE/ Satin Steel, Art.-Nr. EXS3A6, Hu-Friedy) und einer Parodontalsonde (Parodontometer, Art.-Nr. PCPUNC156, Hu-Friedy).

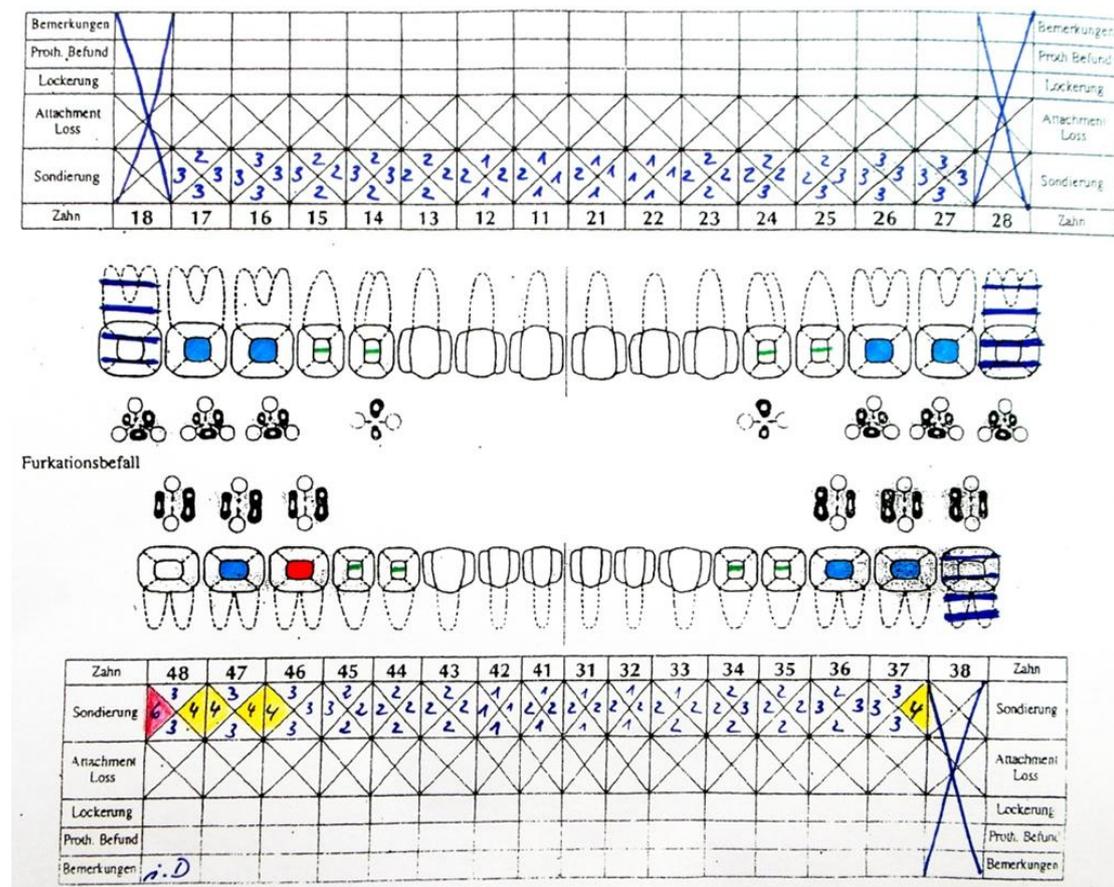


Abbildung 2: Dentaler und parodontaler Befundbogen eines Studienteilnehmers, ■ Füllung, ■ Karies, — Fissurenversiegelung, i.D. Zahn im Durchbruch, ⊗ Zahn fehlt, Sondierungsangaben in mm

Mit Hilfe des DMF-T-Index nach Klein und Palmer (decayed, missing, filled-teeth) wurde die Mundgesundheits der Teilnehmer beurteilt. Der DMF-T beschreibt die Summe kariöser, auf Grund von Karies oder parodontalen Erkrankungen fehlender und gefüllter Zähne (Klein und Palmer, 1938). Im erwachsenen Gebiss werden die Weisheitszähne nicht in die Messung einbezogen, daher kann der DMF-T einen Maximalwert von 28 erreichen. Der durchschnittliche DMF-T der CF-Patienten betrug $11 \pm 7,3$ (von 0 bis 24), der DMF-T der erwachsenen Kontrollprobanden $6 \pm 4,3$ (von 0 bis 16). Für die drei Kinder der Kontrollgruppe wurde aufgrund des vorhandenen Wechselgebisses sowohl der DMF-T, mit einem durchschnittlichen Wert von $2 \pm 0,6$ (von 1 bis 2), als auch der an das Milchgebiss angelehnte dmf-t erhoben, dieser lag bei durchschnittlich $6 \pm 2,3$ (von 4 bis 8).

Die Erhebung eines Parodontalstatus diente der Beurteilung der Mundhygiene der Teilnehmer. Mittels Parodontalsonde mit Millimeterskalierung wurde die Tiefe des parodontalen Sulkus eines jeden Zahnes an vier Messpunkten bestimmt, mesiobukkal, bukkal, distobukkal sowie oral. Die Sonde wurde drucklos in den Sulkus eingeführt und die Tiefe der Tasche am Gingivarand abgelesen. Bei Probanden mit mäßiger Mundhygiene konnten dabei Taschentiefen bis 6 mm gemessen werden.

Des Weiteren wurde der Papillen-Blutungs-Index (PBI) nach Saxer und Mühlemann (1975) ermittelt. Dabei wird der Parodontalsulkus jedes Zahnes von der Papillenbasis bis zur Papillenspitze mittels Parodontalsonde ausgestrichen und nach 20 Sekunden das Auftreten von Blutungen beurteilt und in vier Grade eingeteilt: Grad 0: keine Blutung; Grad 1: ein Blutungspunkt; Grad 2: mehrere Blutungspunkte oder Auftreten einer Blutungslinie; Grad 3: Ausfüllen des interdentalen Dreiecks mit Blut.

Schließlich wurde der Oral-Hygiene-Index simplified (OHI-S) erhoben. Dieser nach Greene und Vermillion (1960) modifizierte Hygieneindex erfasst Plaque und Zahnstein ausgewählter Zähne. Beurteilt werden die Bukkalflächen der Zähne 16, 11, 26 sowie die Lingualflächen der Zähne 36, 31 und 46. Eingeteilt wird der OHI-S in vier Grade: Grad 0: keine Beläge, kein Zahnstein; Grad 1: Beläge und Zahnstein bedecken nicht mehr als $\frac{1}{3}$ der Zahnoberfläche; Grad 2: Beläge und Zahnstein bedecken nicht mehr als $\frac{2}{3}$ der Zahnoberfläche und Grad 4: Beläge und Zahnstein bedecken mehr als $\frac{2}{3}$ der Zahnoberfläche.

Diese Untersuchung sowie folgende Probenentnahme fand spontan und ohne vorherige desinfizierende Maßnahmen der Mundhöhle statt.

3.3 Probenentnahme

3.3.1 Zahnfleischtaschen

Bei allen Studienteilnehmern wurden zwei mikrobiologische Proben aus dem jeweils tiefsten parodontalen Sulkus eines jeden Quadranten der Mundhöhle entnommen. Dies fand statt mittels sterilisierter Papierspitzen (Roeko Papier-Spitzen color, Iso 15, Art.-Nr. 340215 sowie Iso 20, Art.-Nr: 340220, Coltène/Whaledent AG, Altstätten, Schweiz), welche in der zahnärztlichen Praxis zur Trocknung von Wurzelkanälen im Rahmen endodontischer Behandlungen verwendet werden. Es handelt sich dabei um eine schmerzfreie Probengewinnung, die keinerlei Anästhesie erfordert. Die Entnahmestellen wiesen bei allen Studienteilnehmern eine durchschnittliche Sulkustiefe von 3 mm auf, für die CF-Patienten $3 \pm 0,84$ mm, für die erwachsenen Kontrollprobanden $3 \pm 0,91$ mm bei den gesunden Kindern $3 \pm 0,4$ mm. Die Papierspitze wurde bis zum Sulkusboden eingeführt (Abb. 3) und verblieb für 10 Sekunden innerhalb der Zahnfleischtasche. Jede der acht Papierspitzen pro Teilnehmer wurde sofort separat in 10 ml TSB-Medium (Tryptone Soya Broth, Art.-Nr. TV5002E, Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) übertragen und innerhalb einer halben Stunde im Labor des Institutes für Hygiene des Universitätsklinikums Halle (Saale) unter standardisierten Methoden weiterverarbeitet.



Abbildung 3: Probenentnahme mittels steriler Papierspitze aus dem parodontalen Sulkus mesiobukkal des Zahnes 46

3.3.2 Sputumproben

24 der 26 CF-Patienten konnten eine Sputumprobe abgeben. Die Proben wurden durch die Patienten spontan in sterile 50 ml-Falcon-Röhrchen (Art.-Nr. 171020, TPP Products AG, Trasadingen, Schweiz) expektoriert. Es handelte sich bei allen Proben um nicht induziertes Sputum. Das durchschnittliche Sputumvolumen lag bei $0,97 \text{ g} \pm 0,5 \text{ g}$. Die Proben wurden nach spätestens einer halben Stunde im Labor des Institutes für Hygiene weiterverarbeitet.

3.4 Lungenfunktionsbestimmung

Zu den routinemäßigen Kontrolluntersuchungen wurden auch die Lungenfunktionsparameter der CF-Patienten durch das Personal der CF-Ambulanz erhoben. Bestimmt wurden dabei die expiratorische Sekundenkapazität (FEV_1) und die forcierte Vitalkapazität (FVC). FEV_1 beschreibt das innerhalb einer Sekunde ausgeatmete Volumen bei schneller und tiefer Ausatmung nach maximaler Inspiration (Tiffeneau-Test). Dieser Wert gibt Aufschluss über den Strömungswiderstand in der Lunge und wird angegeben als prozentualer Anteil eines altersentsprechenden Normalwertes. Bei obstruktiven Lungenfunktionsstörungen, wie beispielsweise CF oder COPD (Chronic Obstructive Lung Disease) ist der Strömungswiderstand durch erhöhte Bronchialmuskelkontraktion, Mukusproduktion und Mangel an elastischen Fasern erhöht (Zemanick et al., 2013; Martin et al., 2013). Durchschnittlich lag die FEV_1 der 26 CF-Patienten bei $59,88\% \pm 22,1\%$ und reichte von 19,2% bis 102,4%. Die FVC beschreibt das forcierte maximal ausgeatmete Lungenvolumen nach maximaler Einatmung. Diese lag im Durchschnitt bei $70,5\% \pm 19,2\%$, mit einer Spanne von 30,2% bis 109,2%.

3.5 *In vitro*-Untersuchungen

3.5.1 Anzucht der Bakterien aus dem parodontalen Sulkus

Von den acht pro Studienteilnehmer gewonnenen Proben – jeweils zwei aus der tiefsten Zahntasche eines Quadranten – wurden vier Proben für 24 Stunden unter aeroben Bedingungen bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ (Inkubator, Titramax 1000, Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland) in dem TSB-Medium bebrütet. Danach wurden die Proben auf einem Schüttelrührer (Reagenzglasschüttler, Reax-Top, Heidolph Instruments GmbH) durchmischt, anschließend erfolgte ein Drei-Ösen-Ausstrich mittels

handelsüblicher steriler 1 µl-Impfösen (Einweg-Impfschlinge, Art.-Nr. 731101, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) auf nichtselektivem Columbia-Agar mit Schafsblut (Art.-Nr. PB5008A, Oxoid GmbH, Abb. 4 links). Zudem wurde für *P. areuginosa* und *B. cepacia* ein Drei-Ösen-Ausstrich auf Cetrimid-Agar (P.-Cetrimid-Agar, Art.-Nr. PO5076A, Oxoid GmbH, Abb. 4 rechts), einem Selektivmedium, vorgenommen. Diese beimpften Agarplatten wurden für 24 Stunden bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ im Brutschrank (Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die phänotypisch zu unterscheidenden Bakterien selektiert und die Einzelkolonien mittels steriler 1 µl-Impföse auf Columbia-Agar überimpft und wieder für 24 Stunden bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ im Brutschrank inkubiert. Diese Selektion auf frische Blut-Agarplatten wurde solange wiederholt, bis Reinkulturen vorlagen.

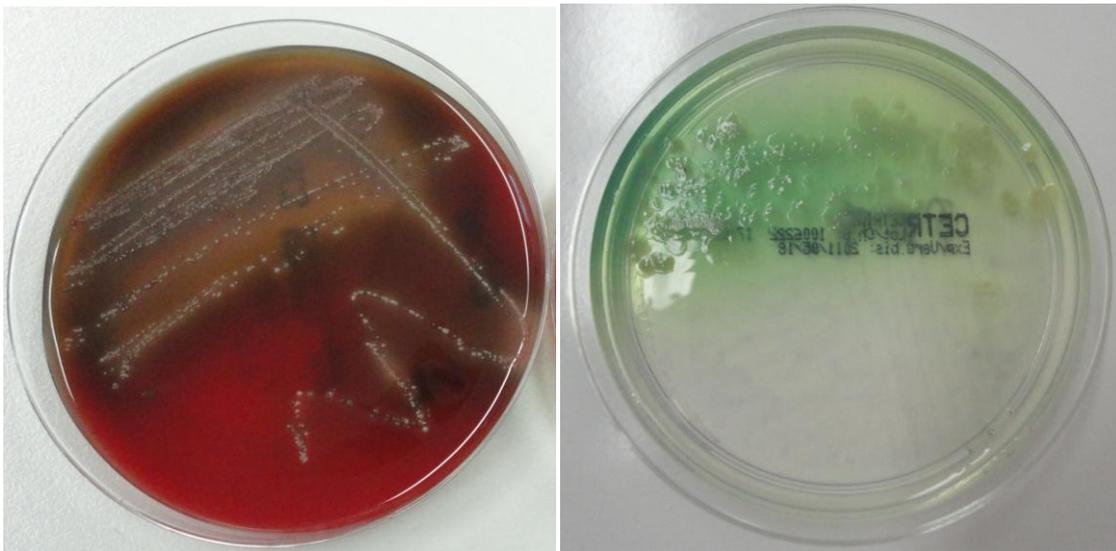


Abbildung 4: Drei-Ösen-Ausstrich auf Columbia-Agar (links) und Cetrimid-Agar (rechts) nach 24 Stunden aerober Inkubation

Die vier weiteren Proben aus den Zahntaschen, die bereits nach Entnahme in das TSB-Medium übertragen worden waren, wurden sofort nach Eintreffen im Labor unter streng anaeroben Bedingungen weiterverarbeitet. Die TSB-Röhrchen wurden für 48 Stunden in einer Anaerobierbank (Modular Atmosphere Controlled System, MG500, Meintrup dws, Löhden-Holte, Deutschland, Abb. 5) bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ inkubiert. Diese enthielt ein sauerstofffreies Gasgemisch aus 80% Stickstoff, 10% Wasserstoff und 10% Kohlenstoffdioxid, so dass eine konstante Hypoxie aufrecht erhalten werden konnte.



Abbildung 5: Anaerobierbank (Modular Atmosphere Controlled System, MG500, Meintrup dws, Löhden-Holte, Deutschland)

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden auch diese Proben auf dem Reagenzglasschüttler durchmischt und für jede Zahntaschenprobe Drei-Ösen-Ausstriche auf Schaedler-Agar mit 5% Hammelblut (SCS, Art.-Nr. 43401, bioMérieux® sa, Marcy l'Etoile, Frankreich) und CDC-Agar (CDC, Art.-Nr. PA256506, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Nach erneut 48 Stunden anaerober Inkubation erfolgte auch hier die Selektion phänotypisch unterschiedlicher Keime auf CDC-Agar. Sobald die Keime als Reinkulturen vorlagen, wurde eine Anaerobierkontrolle durchgeführt. Um fakultativ anaerob wachsende Bakterien auszuschließen, wurden die Keime dazu auf Columbia-Agar überimpft und für 24 Stunden unter Raumluft bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ inkubiert. Wenn kein Wachstum nachgewiesen werden konnte, wurden die Bakterien als obligate Anaerobier eingestuft und als diese weiterverarbeitet.

3.5.2 Anzucht und Quantifizierung der Bakterien aus dem Sputum von CF-Patienten

Die abgegebenen Sputumproben wurden im Labor gewogen (Feinwaage Adventure ARA 520, Ohaus GmbH, Gießen, Deutschland) und jede Probe mit autoklavierter 1:20 Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, phosphat buffert saline) im Verhältnis 1:1 verdünnt und auf dem Schüttelrührer durchmischt. Die PBS-Stammlösung wurde hergestellt aus 85 g NaCl, 14,23 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ sowie 1,35 g KH_2PO_4 (jeweils Merck, Darmstadt, Deutschland) in 500 ml destilliertem Wasser, eingestellt auf einen pH-Wert von 7,4. Für die Verdünnungsreihe wurde mittels steriler Pipettenspitze (Art.-Nr. B007.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) 100 μl der Bakteriensuspension aus den Falcon-Röhrchen in ein steriles Eppendorf-Röhrchen (Reaktionsgefäß 1,5ml, Art.-Nr. 7551.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) übertragen, diese mit 900 μl PBS-Lösung verdünnt und auf dem Schüttelrührer durchmischt. Aus dieser ersten Verdünnungsstufe (10^{-1}) wurden erneut 100 μl mit einer frischen Pipettenspitze entnommen und in einem weiteren Eppendorf-Röhrchen mit 900 μl PBS-Lösung durchmischt (10^{-2}). So wurde verfahren, bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-10} .

Für jede einzelne Sputumprobe wurden Verdünnungsreihen auf drei Columbia-Agarplatten, für die Anzucht fakultativer Anaerobier sowie auf jeweils drei SCS- und CDC-Agarplatten für die Anzucht obligater Anaerobier hergestellt. Die Blutplatten wurden auf der Rückseite beschriftet, eingeteilt in 16 Felder für die Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-10} , wobei für jede Verdünnungsstufe Doppelbestimmungen vorgesehen waren. Jedes Feld wurde mit 10 μl der entsprechenden Verdünnungsstufe inokuliert (Abb. 6). Zusätzlich wurde für jede Sputumprobe ein Drei-Ösen-Ausstrich auf Columbia-, Cetrimid-, SCS-, und CDC-Agar vorgenommen. Die Columbia- und Cetrimid-Agarplatten wurden für 24 Stunden unter aeroben Bedingungen bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ im Brutschrank inkubiert. Die Blutplatten für die Anzucht obligater Anaerobier wurden für 48 Stunden in der Anaerobierbank bebrütet.

Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeit wurden die gewachsenen Koloniebildenden Einheiten (KBE) auf den Verdünnungsreihen ausgezählt und dokumentiert sowie phänotypisch zu unterscheidende Kolonien mittels steriler Einwegimpföse selektiert und solange auf das entsprechende Nährmedium übertragen (Columbia-Agar für fakultative Anaerobier, SCS-Agar für obligate Anaerobier) bis Reinkulturen vorlagen. Auch hier wurde für die obligat anaeroben Bakterien eine Kontrolle zur Überprüfung aeroben Wachstums angelegt.

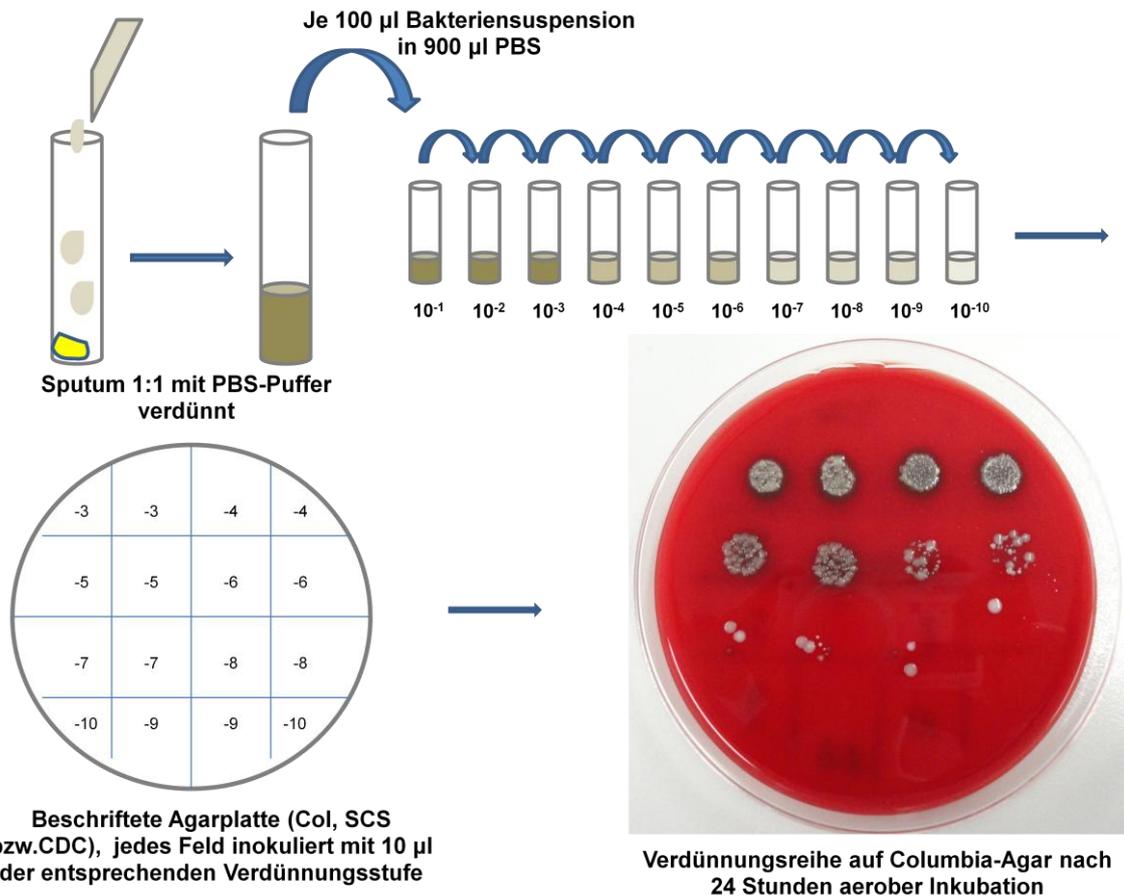


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Herstellung einer Verdünnungsreihe zur Quantifizierung der Bakterien aus dem Sputum von CF-Patienten

3.5.3 Identifizierung fakultativ anaerober Bakterien

Für die Auswahl des geeigneten Identifizierungssystems der fakultativen Anaerobier, welche als 24 Stunden alte Reinkulturen auf Columbia-Agar vorlagen, wurde eine Gramfärbung der zu identifizierenden Bakterien angefertigt, um deren Morphologie und Gramverhalten zu ermitteln. Mittels steriler 1 µl-Einwegimpföse wurde ein Tropfen 0,9%-ige isotonische Kochsalzlösung (Art.-Nr. 30911P, Braun, Melsungen, Deutschland) auf einem fettfreien Objektträger (Art.-Nr. M7620, Süsse GmbH, Gudensberg, Deutschland) aufgetragen und eine Einzelkultur mittels steriler 1 µl-Einwegimpföse in der Flüssigkeit verrieben und ausgestrichen. Nach erfolgter Lufttrocknung und Hitzefixierung wurden die Präparate nach Herstellerangaben eingefärbt (Färbe-Set, Gram-color modifiziert, phenolfrei, Art.-Nr. 1.01603-0001, Merck). Unter dem Mikroskop (Axiolab, Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland,

Vergrößerung 100fach) wurden die Präparate begutachtet und die Bakterien entsprechend in grampositive oder gramnegative Stäbchen bzw. Kokken eingeteilt und dokumentiert.

Weiterhin wurde ein Oxidase-Test (BBL™ Dry Slide™ Oxidase, Art.-Nr. 231746, Becton, Dickinson and Company, Maryland, USA) für die auf Cetrimid-Agar gewachsenen Keime durchgeführt.

Anschließend erfolgte die Identifizierung der fakultativ anaeroben Bakterien anhand der BBL Crystal Identifizierungssysteme (Testsystem zur Identifizierung von grampositiven Bakterien, Art.-Nr. 254140 sowie Testsystem zur Identifizierung von Enterobacteriaceae und anderen gramnegativen Stäbchen, Art.-Nr. 245000, jeweils Becton, Dickinson and Company). Mittels steriler Watteträger (Art. Nr. 132436, Böttger, Bodenmais, Deutschland) wurde die zu identifizierende Bakterienkultur in der BBL Crystal Inokulumsflüssigkeit (ANR, GP, RGP, N/H ID-Inokulumsflüssigkeit bzw. Entero/Stuhl ID- Inokulumsflüssigkeit, Becton, Dickinson and Company) suspendiert und ein McFarland-Trübungsstandard von 0,5 (Art.-Nr. 70900, bioMérieux® sa) eingestellt.

Die entsprechenden BBL Crystal Untersätze enthalten 30 Reaktionsvertiefungen und wurden nach Herstellerangaben mit der Bakteriensuspension befüllt und die Deckel (GP-ID-Panel bzw. E/NF-Panel, Becton, Dickinson and Company) aufgesetzt, bis diese hörbar einrasteten. Schließlich wurden die beimpften Panels unter aeroben Bedingungen bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ im Brutschrank für 18 bis 24 Stunden inkubiert. Der Deckel des Testsystems für grampositive Aerobier enthält auf den Spitzen von Plastikzapfen 29 dehydrierte Substrate und eine Fluoreszenzkontrolle. Auf dem Testpanel für gramnegative Stäbchen befinden sich 30 dehydratisierte Substrate. Mit Einrasten des Deckels rehydriert das Testinokulum aus den Reaktionsvertiefungen das getrocknete Substrat, und die Testreaktion wird eingeleitet.

Mit Hilfe des BBL Crystal Panel-Betrachters (Art.-Nr. 245032, Europäisches Modell, 220V, 50 Hz) konnte die Testreaktion anhand einer Farbreaktionstabelle abgelesen und auf einem Protokollblatt dokumentiert werden. Entsprechend der Herstellerangaben wurde die BBL Crystal Profilnummer für die Testkultur errechnet und diese anhand der BBL Crystal MIND-Software (Art.-Nr. 441010, Becton, Dickinson and Company) identifiziert.

3.5.4 Identifizierung obligat anaerober Bakterien

Zur Vorbereitung der Identifizierung obligater Anaerobier wurden die auf CDC-Agar vorliegenden Reinkulturen nach 48 Stunden Wachstum mittels Gramfärbung untersucht. Darauf folgte die Identifizierung durch das biochemische Identifizierungssystem RapID™ Ana II (remel, Lenexa, KS, USA). Die zu identifizierende Bakterienkultur wurde mit Hilfe eines sterilen Watteträgers in der RapID™-Inokulationsflüssigkeit (1ml, Art.-Nr. 8325102, remel) suspendiert, so dass der McFarland-Trübungsstandard Nr. 3 (bioMerieux® sa) erreicht wurde. Entsprechend der Herstellerangaben wurde die Bakteriensuspension in das RapID™-Panel (Art. Nr. R8311002, remel) eingefüllt und für vier bis sechs Stunden unter aeroben Bedingungen bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ im Brutschrank inkubiert.

Ein Reaktions-Panel enthält 10 Vertiefungen, in denen 18 verschiedene Reaktionen ablaufen, da in den Vertiefungen 3 bis 10 zwei separate Reaktionen stattfinden. Diese Vertiefungen enthalten dehydrierte Substanzen, welche durch Zugabe der Testorganismen rehydratisiert werden und eine Reaktion auslösen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden zunächst die Reaktionsergebnisse in den Vertiefungen 1 bis 10 beurteilt und aus dem Protokollblatt dokumentiert. Darauf erfolgt die Zugabe der RapID™ ANA II Reagenz (remel) in die Testvertiefungen 3 bis 9 sowie der RapID™ Spot-Indol-Reagenz (Art.-Nr. 8309002, remel) in die Vertiefung 10. Nach mindestens 30 Sekunden und maximal zwei Minuten wurde die Farbveränderung beurteilt und das Ergebnis auf dem Protokollblatt dokumentiert (Abb. 7).



Abbildung 7: Beurteilung des Farbumschlages innerhalb eines RapID™ ANA II Reaktionspanel nach Zugabe der RapID™ ANA II Reagenz und RapID™ ANA II Spot-Indol-Reagenz

Der ermittelte Reaktionscode sowie erhobene Informationen über Gramverhalten und Bakterienform wurde in die Eric®-Software (Elektronische RapID™ Kompendium) eingegeben. Alle Informationen zusammen ergeben ein Muster, welches einer bekannten Reaktivität für Taxa in der RapID™ System-Datenbank entspricht und somit das Bakterium identifiziert.

3.5.5 Resistenzbestimmungen

Zur Bestimmung der Empfindlichkeit gegenüber einzelnen Antibiotika wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) der in den Zahntaschen und Sputumproben identifizierten obligaten Anaerobier sowie einiger fakultativer Anaerobier mit Hilfe der MIC-Test Streifen (MIC Test Strip, Liofilchem s.r.l., Roseto degli Abruzzi, Italien) ermittelt. Der Test dient der Beschreibung der minimalen Hemmkonzentration als kleinste Konzentration eines antimikrobiellen Wirkstoffes, welche zu 99% das Wachstum von Mikroorganismen *in vitro* verhindert.

Ausgewählt wurden Azithromycin (AZM, Art.-Nr.920300) und Colistin (CS, Art.-Nr.921410), als Standardantibiotika in der CF-Therapie, des weiteren Meropenem (MRP, Art.-Nr.920840), Piperacillin/Tazobactam (TZP, Art.-Nr.921080) und Ceftazidim

(CAZ, Art.-Nr.921380) als Antibiotika während einer akuten Exazerbation der CF sowie Metronidazol (LZ, Art.-Nr.920870) und Clindamycin (CD, Art.-Nr.920720, jeweils Liofilchem), da diese eine sehr gute Wirksamkeit gegen Anaerobier aufweisen.

Die Teststreifen sind auf einer Seite mit einer antibiotischen Substanz beschichtet, welche in 15 zweifachen Verdünnungsschritten einen Konzentrationsgradienten aufweist. Auf der Vorderseite sind die Teststreifen mit dem Code des jeweiligen Antibiotikums sowie einer Skala in $\mu\text{g/ml}$ bedruckt, wodurch die minimale Hemmkonzentration der Substanz gegenüber den Bakterien quantitativ ermittelt werden kann.

Die auf SCS- bzw. Columbia-Agar gewachsenen Reinkulturen wurden jeweils mit einem sterilen Watteträger in 3 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung übertragen und ein McFarland-Trübungsstandard von 0,5 eingestellt. Mittels steriler Pipettenspitzen wurden 100 μl dieser Bakteriensuspension auf SCS- bzw. Columbia-Agar überimpft und mit Hilfe eines Drigalski-Spatels (Art.-Nr. 23162185, VWR, Darmstadt, Deutschland) die Oberfläche der Blutplatte gleichmäßig bestrichen.

Sobald die Plattenoberfläche getrocknet war, wurde der MIC-Teststreifen mit einer sterilen Pinzette auf die Agarplatte luftblasenfrei aufgelegt, die Skala auf dem Streifen zeigte dabei nach oben.

Die SCS-Agarplatten wurden im Anschluss für 48 Stunden in der Anaerobierbank inkubiert, die Columbia-Agarplatten für 24 Stunden unter aeroben Bedingungen bebrütet. Der Konzentrationsgradient der antibiotischen Substanz transferiert von dem Teststreifen auf das inokulierte Nährmedium. Nach Ablauf der Inkubationszeit bildete sich eine symmetrische Hemmellipse, welche die MHK in $\mu\text{g/ml}$ angab und am Schnittpunkt mit dem MIC-Teststreifen abgelesen werden konnte (Abb. 8).

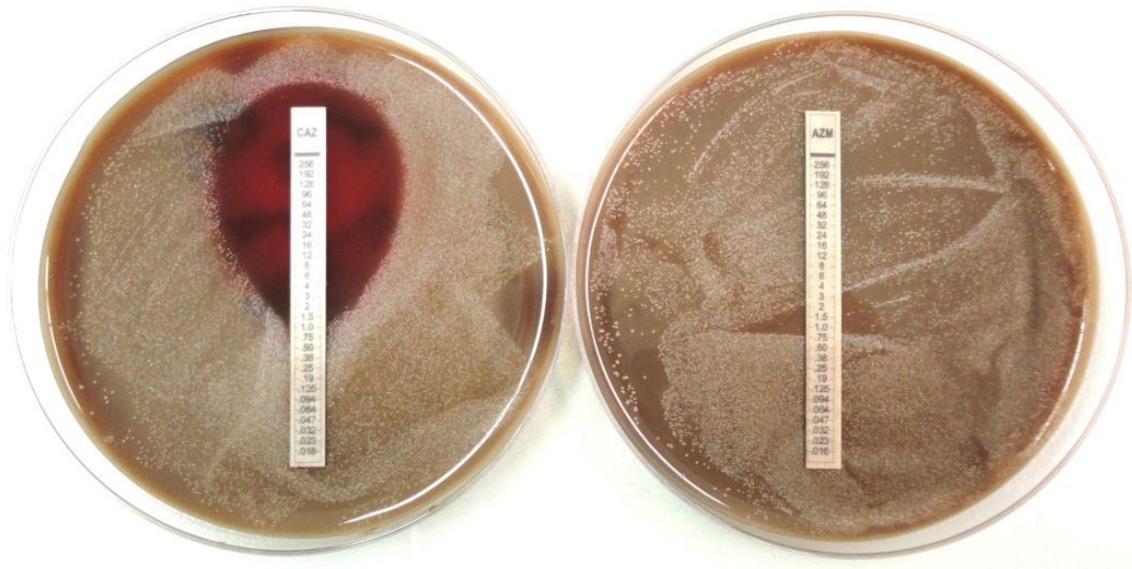


Abbildung 8: Resistenzbestimmung eines obligaten Anaerobiers gegenüber Ceftazidim (CAZ, links) und Azithromycin (AZM, rechts) mittels MIC Test Strips auf SCS-Agar nach 48 Stunden anaerober Inkubation

Anhand der abgelesenen Konzentrationen wurden die Bakterien einer Empfindlichkeitskategorie (sensibel, intermediär oder resistent) zugeteilt. Entsprechende Grenzkonzentrationen für diese Interpretation wurden den Herstellerangaben und der CLSI-Richtlinie (Clinical and Laboratory Institute/ NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards; NCCLS/CLSI M100-S20 guideline, Wayne, PA, USA) entnommen.

Für die obligaten Anaerobier wurden folgende Grenzwerte (s - i - r) in µg/ml festgelegt: für AZM ≥ 4 , für CS ≥ 2 , für MRP 4 - 8 - 16, für TZP 32 - 64 - 128, für CAZ ≥ 8 , für LZ 8 - 16 - 32 und für CD 2 - 4 - 8.

Für fakultativ anaerobe Bakterien wurden vereinzelt unterschiedliche Grenzwerte für die verschiedenen Genera erhoben:

Bei AZM betragen die Werte 2 - 4 - 8 für *Staphylococcus spp.* und 0,5 - 1 - 2 für *Streptococcus spp.*, bei CS 2 - 4 - 8. Für MRP wurden 4 - 8 - 16 als Grenzkonzentrationen für fakultative Anaerobier festgelegt, für *Str. pneumoniae* allerdings 0,25 - 0,5 - 1.

Die Grenzwerte bei TZP lagen bei 64 - - 128 für *P. aeruginosa* und 8 - - 16 für *Staphylococcus spp.*, ein Wert für intermediär wurde nicht angegeben, für gramnegative aerobe Bakterien wurden die Grenzwerte 16 - 32/ 64 - 128 festgelegt.

Bei CAZ betragen die Grenzwerte 8 - 16 - 32 und für LZ 8 - 16 - 32. Bei CD betrug die Grenzkonzentration für *Staphylococcus spp.* 0,5 - 1/ 2 - 4 und für *Streptococcus spp.* 0,25 - 0,5 - 1.

3.6 Statistik

Für alle Ergebnisse wurden Mittelwerte und deren Standardabweichung angegeben. Deren Berechnung erfolgte mittels Excel (Microsoft Excel 2007 Redmont, WA, USA). Die Signifikanzberechnungen erfolgten mittels Fisher's Exact Test (<http://www.langsrud.com/stat/Fishertest.html>). Als signifikant wurden p-Werte <0,05 angesehen. Die p-Werte wurden dabei nicht für die multiplen Testungen korrigiert.

4 Ergebnisse

4.1 Mikrobielle Zusammensetzung des parodontalen Sulkus

4.1.1 Identifizierung fakultativer Anaerobier in Zahntaschen von CF-Patienten und Kontrollprobanden

Dieser Studie liegt die Hypothese zugrunde, dass Bakterien des parodontalen Sulkus eine mögliche Infektionsquelle der chronischen Lungeninfektion bei Patienten mit CF darstellen. Vor diesem Hintergrund wurde die bakterielle Zusammensetzung in Zahntaschen von CF-Patienten und diejenige von gesunden Kontrollprobanden untersucht und mit der bakteriellen Besiedlung des Sputums von CF-Patienten verglichen. Dafür wurden insgesamt 236 Proben aus Zahntaschen (104 Proben von CF-Patienten und 132 von gesunden Probanden) und 24 Sputumproben von Patienten mit CF auf das Vorkommen fakultativ und obligat anaerober Bakterien untersucht.

Bei allen 59 Studienteilnehmern (100%) konnten fakultative Anaerobier in den Zahntaschen nachgewiesen werden. Bei den 26 CF-Patienten wurden insgesamt 366 unterschiedliche fakultative Anaerobier identifiziert, durchschnittlich $14,1 \pm 3,9$ Keime pro Patient. Dabei konnte in jeder der vier untersuchten Zahntaschen eines jeden Patienten mindestens ein aerob wachsendes Bakterium nachgewiesen werden. Durchschnittlich wurden $3,5 \pm 1,6$ Keime in einem parodontalen Sulkus vorgefunden.

In der Kontrollgruppe fanden sich insgesamt 446 fakultativ anaerobe Bakterien, 391 Keimarten bei den 30 Erwachsenen und 55 bei den drei Kindern. Pro Patient lagen hier im Durchschnitt $13 \pm 3,5$ unterschiedliche Keime in der Gruppe der über 18-Jährigen vor, bei den Kindern $18,3 \pm 4,5$. Mit Ausnahme eines Probanden, bei welchem nur in zwei von vier untersuchten Zahntaschen fakultativ anaerobe Keime isoliert wurden, konnten auch in der Kontrollgruppe in jeder Zahntasche eines oder mehrere fakultativ anaerobe Bakterien identifiziert werden. Im Schnitt konnten $3,4 \pm 1,4$ fakultative Anaerobier in jeder Zahntasche nachgewiesen werden ($3,3 \pm 1,29$ bei den erwachsenen Probanden und $4,6 \pm 1,4$ bei den Kindern).

Unter den 366 identifizierten fakultativen Anaerobiern in der CF-Gruppe, konnten 12 unterschiedliche Genera und 37 verschiedene Spezies aufgezeigt werden. Bei den 446 fakultativ anaeroben Keimen der Kontrollgruppe waren es acht verschiedene Genera und 26 Spezies. Für beide Studiengruppen wurden insgesamt 14 Genera und 37 Spezies unterschieden (Tab.1).

Tabelle 1: Anzahl fakultativer Anaerobier im parodontalen Sulkus von CF-Patienten (n=26) und Kontrollprobanden (n=33) (in %)

Genus	Spezies	CF-Patienten	Kontrollgruppe
<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>	19 (73,1)	27 (81,8)
	<i>salivarius</i>	17 (65,4)	22 (66,7)
	<i>parasanguis</i>	17 (65,4)	27 (81,8)
	<i>gordonii</i>	12 (46,2)	21 (63,6)
	<i>vestibularis</i>	12 (46,2)	15 (45,5)
	<i>uberis</i>	10 (38,5)	3 (9,1)
	<i>crictetus</i>	9 (34,6)	6 (18,2)
	<i>oralis</i>	8 (30,8)	14 (42,4)
	<i>crista</i>	7 (26,9)	16 (48,5)
	<i>anginosus</i>	6 (23,1)	4 (12,1)
	<i>intermedius</i>	6 (23,1)	16 (48,4)
	<i>mutans</i>	6 (23,1)	2 (6,1)
	<i>sanguis</i>	3 (11,5)	7 (21,2)
	<i>constellatus</i>	3 (11,5)	5 (15,2)
		<i>bovis</i>	
<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	9 (34,6)	8 (24,2)
	<i>aureus</i>	8 (30,8)	11 (33,3)
	<i>haemolyticus</i>	2 (7,7)	
	<i>lentus</i>	2 (7,7)	
	<i>simulans</i>	1 (3,8)	1 (3,0)
	<i>saprophyticus</i>	1 (3,8)	3 (9,1)
<i>Stomatococcus</i>	<i>mucilaginosus</i>	14 (53,8)	20 (60,6)
<i>Micrococcus</i>	<i>sedentarius</i>	6 (23,1)	4 (12,1)
	<i>luteus</i>	2 (7,7)	
	<i>kristinae</i>	1 (3,8)	2 (6,1)
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	4 (15,4)	1 (3,0)
	<i>cloacae</i>	1 (3,8)	
	<i>hirae</i>	1 (3,8)	
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	3 (11,5)	
<i>Bacillus</i>	<i>brevis</i>	1 (3,8)	
	<i>subtilis</i>	1 (3,8)	
	<i>sphaericus</i>	1 (3,8)	
<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	2 (7,7)	3 (9,1)

Genus	Spezies	CF-Patienten	Kontrollgruppe
<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	1 (3,8)	1 (3,0)
<i>Arcanobacterium</i>	<i>haemolyticum</i>	1 (3,8)	
<i>Actinomyces</i>	<i>pyogenes</i>	1 (3,8)	
Miscellaneous Gram negativ bacille		1 (3,8)	
<i>Pediococcus</i>		1 (3,8)	
<i>Gemella</i>	<i>haemolysans</i>		4 (12,1)
Gesamtanzahl		200	245

Hinsichtlich Art und Häufigkeit vorkommender fakultativer anaerober Bakteriengenera war zwischen beiden Studiengruppen kein signifikanter Unterschied festzustellen (siehe Anhang, Tab. 10A).

In beiden Studiengruppen, CF-Patienten und Kontrollprobanden, waren die am häufigsten identifizierten fakultativen Anaerobier *Streptococcus spp.*, welche unter den 26 CF-Patienten bei 25 Patienten (96,2%) mindestens einmal nachgewiesen werden konnten. Insgesamt wurden 258 Streptokokken in den 104 Zahntaschen der CF-Patienten isoliert. In der Kontrollgruppe wiesen alle 33 Teilnehmer (100%) in mindestens einer Zahntasche einen Vertreter dieser Bakteriengruppe auf, insgesamt lagen hier 333 dieser Keime vor. Insgesamt konnten 15 verschiedene Streptokokken Spezies unterschieden werden. Bei den CF-Patienten konnten *Staphylococcus spp.* am zweithäufigsten nachgewiesen werden, 16 CF-Patienten (61,5%) wiesen diesen Keim auf (insgesamt 41 Keime in allen untersuchten Zahntaschen), gefolgt von *Stomatococcus spp.* (53%), *Micrococcus spp.* (26,9%), *Enterococcus spp.* (19,2%), und *Pseudomonas spp.* (11,5%).

In der Kontrollgruppe kamen *Stomatococcus spp.* (60,6%) geringfügig häufiger vor als *Staphylococcus spp.* (54,5%), ihnen folgten ebenfalls *Micrococcus spp.* (18,2%) (Abb. 9).

Der humanpathogene Keim *P. aeruginosa* konnte nur bei drei CF-Patienten nachgewiesen werden. *S. aureus* war bei acht CF-Patienten und elf gesunden Studienteilnehmern in den Zahntaschen vorzufinden.

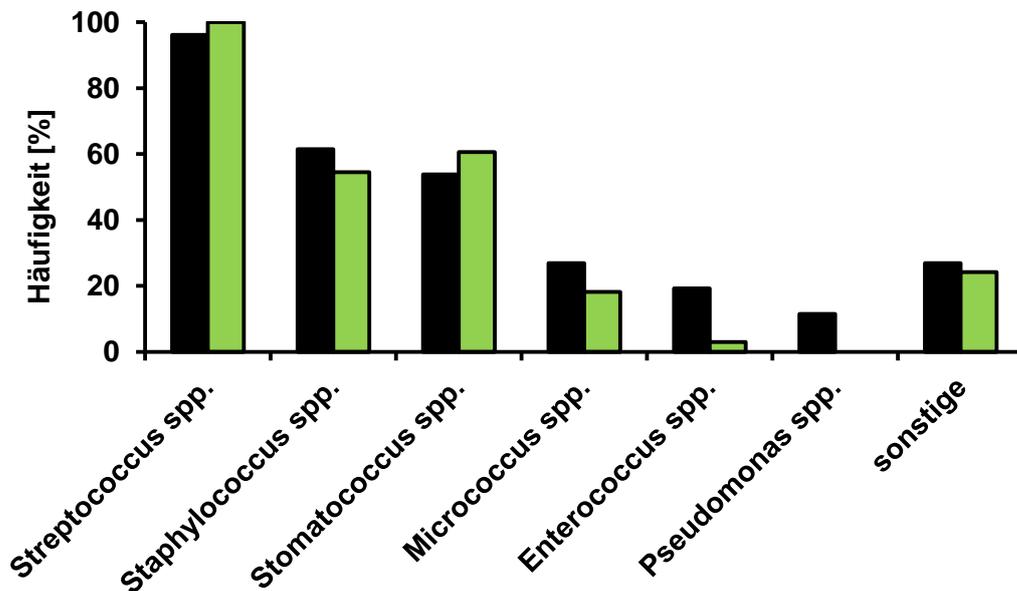


Abbildung 9: Häufigkeiten (%) fakultativ anaerober Genera im parodontalen Sulkus von ■ CF-Patienten (n=26) und ■ Kontrollprobanden (n=33)

4.1.2 Identifizierung obligater Anaerobier in Zahntaschen von CF-Patienten und Kontrollprobanden

Unter streng anaeroben Bedingungen konnten bei 58 der 59 Studienteilnehmern (98,3%) obligat anaerobe Bakterien im parodontalen Sulkus nachgewiesen werden. 169 Bakterien konnten insgesamt bei den CF-Patienten isoliert werden, wobei durchschnittlich $6,4 \pm 3,2$ Keime pro Patient und $1,6 \pm 1,0$ Keime in jeder untersuchten Zahntasche vorlagen. Nur bei lediglich einem CF-Patienten konnte kein obligat anaerobes Bakterium identifiziert werden.

Innerhalb der Kontrollgruppe wiesen alle Teilnehmer (100%) obligat anaerobe Bakterien auf. Insgesamt konnten 247 obligate Anaerobier vorgefunden werden (235 unter den Erwachsenen und 12 bei den Kindern). Durchschnittlich wurden für jeden Probanden $7,5 \pm 3,1$ Bakterien identifiziert ($7,8 \pm 3,0$ für die erwachsenen Teilnehmer und $4,0 \pm 1,7$ bei den Kindern). Pro Zahntasche waren $1,9 \pm 1,1$ Keime aufzuweisen ($2,0 \pm 1,1$ bei den über 18 jährigen und $1,0 \pm 1,0$ bei den Kindern).

Bei den obligaten Anaerobiern konnten insgesamt 16 Genera und 25 Spezies isoliert werden, auf die CF-Patienten entfielen dabei 14 verschiedene Genera und 21 Spezies, auf die Kontrollgruppe 13 unterschiedliche Genera und 22 Spezies (Tab. 2).

Tabelle 2: Obligate Anaerobier im parodontalen Sulkus von CF-Patienten (n=26) und Kontrollprobanden (n=33) (in %)

Genus	Spezies	CF-Patienten	Kontrollgruppe
<i>Staphylococcus</i>	<i>saccharolyticus</i>	23 (88,5)	33 (100)
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>prevotii</i>	9 (34,6)	17 (51,5)
	<i>anaerobius</i>	4 (15,4)	4 (12,1)
	<i>micros</i>	1 (3,8)	4 (12,1)
	<i>asaccharolyticus</i>	1 (3,8)	
<i>Clostridium</i>	<i>limosum</i>	4 (15,4)	1 (3,0)
	<i>difficile</i>	2 (7,7)	8 (24,2)
	<i>hastiforme</i>	2 (7,7)	3 (9,1)
	<i>butyricum</i>	2 (7,7)	
	<i>bifermentans</i>		2 (6,1)
	<i>novyi A</i>		1 (3,0)
<i>Veillonella</i>		7 (26,9)	15 (45,5)
<i>Eubacterium</i>	<i>limosum</i>	6 (23,1)	3 (9,1)
<i>Fusobacterium</i>	<i>necrophorum</i>	5 (19,2)	9 (27,3)
	<i>mortiferum</i>		1 (3,0)
<i>Wolinella</i>		5 (19,2)	7 (21,2)
<i>Streptococcus</i>	<i>constellatus</i>	2 (7,7)	
<i>Prevotella</i>	<i>corporis</i>	1 (3,8)	4 (12,1)
	<i>loescheii</i>	1 (3,8)	
	<i>stercoris</i>		2 (6,1)
<i>Propionibacterium</i>	<i>acnes</i>	1 (3,8)	
	<i>granulosum</i>		2 (6,1)
<i>Capnocytophaga</i>		1 (3,8)	
<i>Gemella</i>	<i>morbillosum</i>	1 (3,8)	2 (6,1)
<i>Bacteroides</i>	<i>stercoris</i>	1 (3,8)	1 (3,0)
	<i>tectum</i>		1 (3,0)
<i>Bifidobacterium</i>		1 (3,8)	
<i>Mobiluncus</i>	<i>curtisii</i>		7 (21,2)
<i>Campylobacter</i>	<i>gracilis</i>		2 (6,1)
Gesamtanzahl		80	129

Auch für die obligaten Anaerobier ließen sich vergleichbare Werte für die Häufigkeiten der in den Zahntaschen beider Studiengruppen identifizierten Genera nachweisen (Abb. 10). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen CF-Patienten und gesunden Kontrollprobanden (siehe Anhang, Tab. 11A). Sowohl bei den CF-Patienten als auch bei den Kontrollprobanden waren *Staphylococcus spp.* die am häufigsten nachzuweisenden obligat anaeroben Bakterienarten. Diese lagen bei 88,5% der CF-Patienten und 100% der gesunden Teilnehmer vor. Insgesamt konnte in den 104 untersuchten Zahntaschen der CF-Patienten 85-mal *S. saccharolyticus* isoliert werden, in den 132 Zahntaschenproben der Kontrollprobanden 113-mal. Es folgten *Peptostreptococcus spp.* (46,2% der CF-Patienten, 60,6% der Kontrollgruppe), *Veillonella spp.* (30,8% der CF-Patienten, 45,5% der Gesunden) und *Clostridium spp.* (26,9% unter den CF-Patienten und 42,4% der Kontrollprobanden). Insgesamt, mit Ausnahme von *Eubacterium spp.* und *Wolinella spp.*, konnten die einzelnen Genera bei den gesunden Studienteilnehmer geringfügig häufiger nachgewiesen werden.

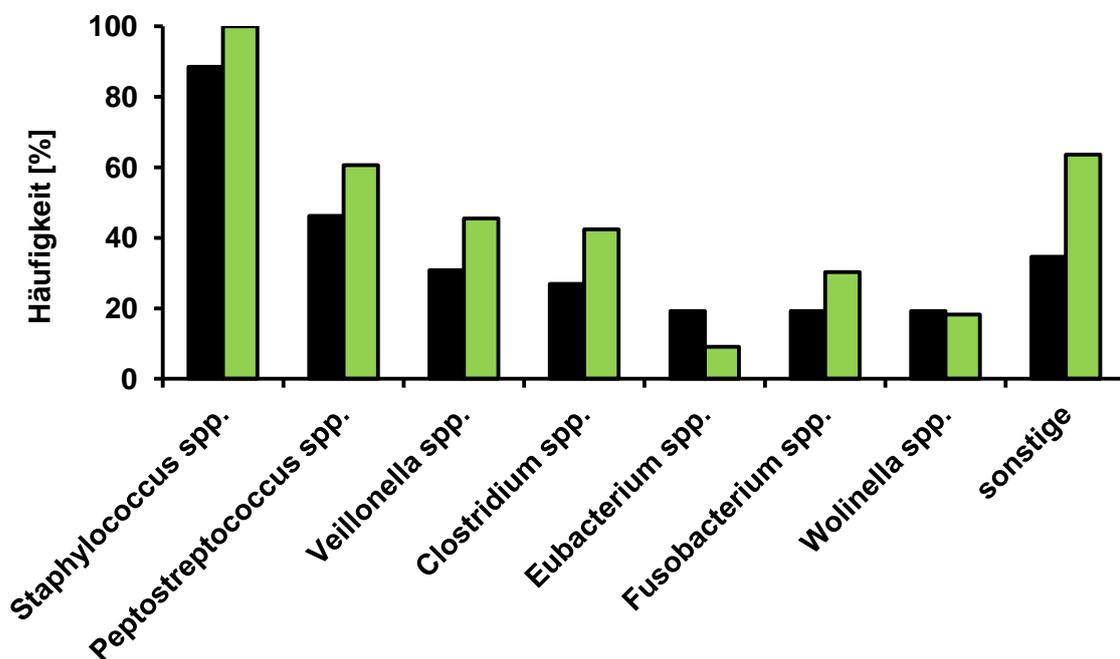


Abbildung 10: Häufigkeiten (%) obligat anaerober Genera im parodontalen Sulkus von ■ CF-Patienten (n=26) und ■ Kontrollprobanden (n=33)

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

24 der 26 CF-Patienten konnten spontan Sputum expektorieren, welches auf das Vorhandensein fakultativer und obligat anaerober Bakterien untersucht wurde. Bei allen Teilnehmern konnten fakultative Anaerobier nachgewiesen werden, bei 19 Patienten konnten, unter streng anaeroben Bedingungen, daneben auch obligate Anaerobier im Sputum isoliert werden. Die mittleren Keimzahlen betragen für die fakultativen Anaerobier $8,6 \times 10^7 \pm 7,5 \times 10^7$ KBE/ml ($3,5 \times 10^6$ KBE/ml bis $2,3 \times 10^8$ KBE/ml), unter den obligaten Anaerobiern lag diese bei $1,2 \times 10^7 \pm 1,0 \times 10^7$ KBE/ml ($1,1 \times 10^6$ KBE/ml bis $3,5 \times 10^7$; siehe Anhang, Tab. 3A).

4.3 Vergleich der mikrobiellen Zusammensetzung des Sputums von CF-Patienten mit der des parodontalen Sulkus von CF-Patienten und Gesunden

4.3.1 Fakultative Anaerobier

In jeder der 24 Sputumproben (100%) wurden fakultative Anaerobier nachgewiesen. Durchschnittlich wurden $4,25 \pm 1,5$ Bakterien in jeder Sputumprobe isoliert, wobei jeweils ein bis zu acht Bakterienarten vorlagen.

Es konnten 10 Genera und 25 Spezies unterschieden werden (Tab. 3). Insgesamt wurden 102 fakultativ anaerobe Bakterien identifiziert. In 21 von 24 Sputumproben konnte mindestens ein *Streptococcus spp.* isoliert werden, mit 87,5% stellen diese Bakterien damit die häufigsten fakultativen Anaerobier im Sputum dar. Es folgten *Pseudomonas spp.* (58,3%), *Staphylococcus spp.* (45,8%) und *Burkholderia spp.* (29,2%).

Tabelle 3: Anzahl fakultativer Anaerobier im Sputum von CF-Patienten (n=24) (in %)

Genus	Spezies	Anzahl
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	15 (62,5)
	<i>pneumoniae</i>	13 (54,2)
	<i>parasanguis</i>	10 (41,7)
	<i>intermedius</i>	4 (16,7)
	<i>gordonii</i>	4 (16,7)
	<i>uberis</i>	3 (12,5)
	<i>cricketus</i>	2 (8,3)
	<i>crista</i>	2 (8,3)
	<i>sanguis</i>	1 (4,2)
	<i>anginosus</i>	1 (4,2)
	<i>agalactinae</i>	1 (4,2)
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	8 (33,3)
	<i>epidermidis</i>	2 (8,3)
	<i>simulans</i>	1 (4,2)
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	14 (58,3)
<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>	6 (25)
	<i>gladiolii</i>	1 (4,2)
<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	2 (8,3)
	<i>sedentarius</i>	1 (4,2)
<i>Enterococcus</i>	<i>rafinosus</i>	3 (12,5)
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	2 (8,3)
	<i>brevis</i>	1 (4,2)
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	2 (8,3)
<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	2 (8,3)
<i>Gemella</i>	<i>haemolysans</i>	1 (4,2)
Gesamtanzahl		102

P. aeruginosa, ein charakteristischer Keim der CF-Lunge, konnte aus 14 von 24 Proben (58,3%) isoliert werden, dies war auch der am zweithäufigsten vorkommende fakultative Anaerobier unter den 25 identifizierten Spezies. *S. aureus* (8 x, 33,3%), ebenfalls ein CF-typischer Keim, lag am fünfthäufigsten vor. *B. cepacia* konnte in 6 Proben (25%) isoliert werden, und auch *St. maltophilia* lag in 2 Sputen (8,3%) vor.

Bei sieben Patienten wurde *P. aeruginosa* als einziger Vertreter der CF-typischen fakultativen Anaerobier nachgewiesen. Bei weiteren sieben Patienten wurde mindestens ein zusätzlicher charakteristischer CF-Keim identifiziert (2 x *P. aeruginosa* zusammen mit *S. aureus* und *B. cepacia*, 2 x *P. aeruginosa* zusammen mit *B. cepacia*, 2 x *P. aeruginosa* zusammen mit *St. maltophilia* und 1 x *P. aeruginosa* zusammen mit *S. aureus*). In einer Probe lagen *S. aureus* und *B. cepacia* zusammen vor. In vier Sputen lag *S. aureus* isoliert vor, in einer weiteren Probe *B. cepacia* als alleiniger Vertreter der CF-typischen Keime. Insgesamt wurde in 20 Sputen (83,3%) das Vorkommen dieser fakultativen Anaerobier nachgewiesen.

Sowohl im Sputum der CF-Patienten, als auch in den Zahntaschen aller Studienteilnehmer waren *Streptococcus spp.* die am häufigsten nachzuweisenden fakultativen Anaerobier. In 87,5% aller CF-Sputen und in mindestens einer Zahntasche von 96,2% der CF-Patienten und 100% der Kontrollprobanden konnte wenigstens ein mikroaerophiler Streptokokkus nachgewiesen werden. Auch *Staphylococcus spp.* wurden im Sputum und Zahntaschen, sowohl bei CF-Patienten als auch bei gesunden Teilnehmern, in vergleichbarer Anzahl nachgewiesen. *Pseudomonas spp.* konnten nur bei den CF-Patienten isoliert werden, im Sputum (58,3%) lagen sie dabei etwa fünfmal häufiger vor als in den Zahntaschen (11,5%). *Burkholderia spp.* und *Stenotrophomonas spp.* konnten nur in den Sputen der CF-Patienten nachgewiesen werden (Abb. 11). *Burkholderia spp.* konnte aus sieben Sputumproben isoliert werden. Nur für diese Bakterien konnte ein signifikanter Unterschied ($p=0,003$) in der Häufigkeit zwischen den in den Zahntaschen und Sputum von CF-Patienten vorkommenden Keimarten aufgezeigt werden (siehe Anhang, Tab. 12A).

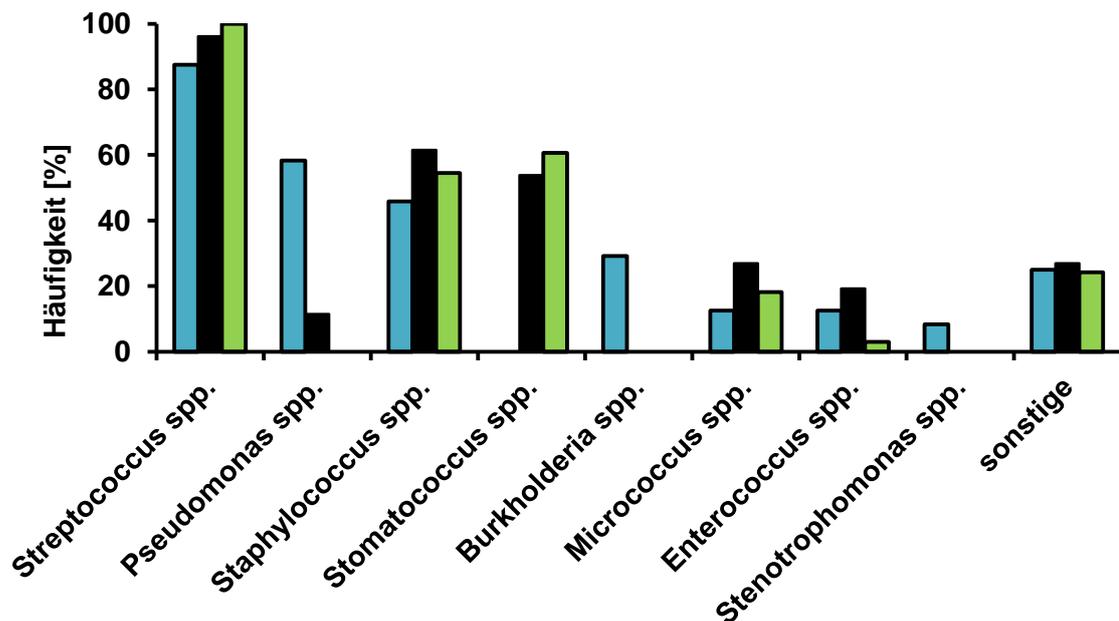


Abbildung 11: Vergleich der Häufigkeiten (%) fakultativ anaerober Genera im Sputum von ■ CF-Patienten (n=24) und im parodontalen Sulkus von ■ CF-Patienten (n=26) und ■ Kontrollprobanden (n=33)

Bei 21 der 24 CF-Patienten, die Sputum abgeben konnten (87,5%), wurden identische Spezies sowohl im Sputum als auch in mindestens einer Zahntasche identifiziert (in der vorliegenden Arbeit als „Paare“ bezeichnet, Abb. 13). Insgesamt konnten 39 fakultative Anaerobier als solche „Paare“ nachgewiesen werden (Tab. 4). Von 14 Patienten die *P. aeruginosa* im Sputum aufwiesen, trat dieser bei zwei Patienten auch in mindestens einer Zahntasche auf (14,3%). *S. aureus* konnte bei drei von acht Patienten (37,5%) zur gleichen Zeit in beiden Kompartimenten nachgewiesen werden.

Bei den weiteren Paaren handelte es sich um *Streptococcus spp.*, wobei *Str. salivarius* und *Str. pneumoniae* bei jeweils elf Patienten, *Str. parasangius* bei sieben, *Str. gordonii* bei zwei und *Str. cricetus* und *Str. uberis* jeweils bei einem Patienten gleichzeitig im Sputum und parodontalen Sulkus auftraten. Andere Spezies konnten nicht als Paare nachgewiesen werden. Bei elf Patienten traten mehrere Paare nebeneinander auf, ein Patient wies vier Paare auf. In acht Fällen trat der gleiche Keim gleichzeitig sowohl im Sputum, als auch in allen vier untersuchten Zahntaschen eines Patienten auf. Bei zehn Paaren konnte der Keim im Sputum und drei Zahntaschen nachgewiesen werden, 12-mal in Sputum und zwei Zahntaschen und neunmal im Sputum und nur einer Zahntasche.

Tabelle 4: Verteilung der zeitgleich in Sputum und parodontalen Sulkus nachgewiesenen fakultativen Anaerobier (Paare) nach Kompartimenten

Probe	Paar	Lokalisation				
		Sputum	I.Quadrant	II.Quadrant	III.Quadrant	IV.Quadrant
CF 01	<i>Str. parasanguis</i>	X	X	X	X	
	<i>Str. salivarius</i>	X	X	X		X
CF 02	<i>S. aureus</i>	X		X	X	X
	<i>Str. pneumoniae</i>	X	X	X		
	<i>Str. gordonii</i>	X			X	
CF 03	<i>Str. salivarius</i>	X		X		X
	<i>Str. pneumoniae</i>	X		X		
CF 04	<i>S. aureus</i>	X				X
CF 05	<i>P. aeruginosa</i>	X				X
	<i>Str. salivarius</i>	X			X	X
	<i>Str. pneumoniae</i>	X			X	X
CF 06	<i>Str. pneumoniae</i>	X		X	X	
	<i>Str. salivarius</i>	X	X	X	X	X
	<i>Str. parasanguis</i>	X	X	X		
CF 07	<i>Str. pneumoniae</i>	X			X	X
CF 08	<i>S. aureus</i>	X	X	X	X	X
CF 10	<i>Str. salivarius</i>	X		X		
	<i>Str. parasanguis</i>	X	X	X		X
CF 12	<i>Str. salivarius</i>	X		X		X
	<i>Str. pneumoniae</i>	X	X	X	X	X
	<i>Str. gordonii</i>	X				X
CF 15	<i>P. aeruginosa</i>	X	X			
CF 16	<i>Str. parasanguis</i>	X		X	X	
CF 17	<i>Str. salivarius</i>	X	X	X	X	X
CF 18	<i>Str. salivarius</i>	X			X	X
CF 19	<i>Str. pneumoniae</i>	X	X		X	X
CF 20	<i>S. aureus</i>	X	X	X		X
CF 21	<i>Str. salivarius</i>	X	X	X	X	X
	<i>Str. pneumoniae</i>	X	X			
	<i>Str. cricetus</i>	X	X	X		X
	<i>Str. uberis</i>	X	X	X	X	X

Probe	Paar	Lokalisation				
		Sputum	I.Quadrant	II.Quadrant	III.Quadrant	IV.Quadrant
CF 23	<i>Str. pneumoniae</i>	X	X	X		X
CF 24	<i>Str. salivarius</i>	X	X	X	X	X
	<i>Str. parasanguis</i>	X	X	X	X	
CF 25	<i>Str. salivarius</i>	X		X		X
	<i>Str. parasanguis</i>	X		X	X	X
	<i>Str. pneumonia</i>	X		X		X
CF 26	<i>Str. parasanguis</i>	X		X		
	<i>Str. pneumoniae</i>	X	X	X	X	X

4.3.2 Obligate Anaerobier

Unter den 24 Sputumproben konnten in 19 Sputen obligate Anaerobier nachgewiesen werden (79,2%). Im Durchschnitt lagen $1,4 \pm 1,2$ Bakterien in jeder Probe vor. Maximal vier Keime konnten aus einer Sputumprobe isoliert werden.

Insgesamt wurden 33 obligate Anaerobier in allen Proben identifiziert, wobei sieben Genera und zehn Spezies unterschieden werden konnten (Tab. 5). *S. saccharolyticus* (17 x) und *P. prevotii* (6 x) waren die am häufigsten nachgewiesenen Spezies. *C. difficile*, *Veillonella spp.* wurden jeweils aus zwei Sputen isoliert, weitere Spezies lagen jeweils nur einmal vor.

Tabelle 5: Anzahl obligater Anaerobier im Sputum von CF-Patienten (n=24) (in %)

Genus	Spezies	Anzahl
<i>Staphylococcus</i>	<i>saccharolyticus</i>	17 (70,8)
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>prevotii</i>	6 (25)
<i>Clostridium</i>	<i>difficile</i>	2 (8,3)
	<i>limosum</i>	1 (4,2)
	<i>butyricum</i>	1 (4,2)
	<i>clostridioforme</i>	1 (4,2)
<i>Veillonella</i>		2 (8,3)
<i>Wolinella</i>		1 (4,2)
<i>Fusobacterium</i>	<i>necrophorum</i>	1 (4,2)
<i>Propionibacterium</i>	<i>acnes</i>	1 (4,2)
Gesamtanzahl		33

Der Vergleich von Sputumproben mit Proben des parodontalen Sulkus von CF-Patienten und denjenigen gesunder Kontrollprobanden zeigte eine vergleichbare Verteilung der häufigsten Genera (Abb. 12). Überwiegend konnte in allen drei Gruppen *Staphylococcus spp.* nachgewiesen werden, gefolgt von *Peptostreptococcus spp.*, *Clostridium spp.* und *Veillonella spp.*, wobei der jeweilige Genus am häufigsten in den Zahntaschen der Kontrollgruppe vorlag, und in geringerer Anzahl in den Sputumproben. Allein *Wolinella spp.* konnte geringfügig häufiger in den Zahntaschen der CF-Patienten nachgewiesen werden als in den Zahntaschen der gesunden Studienteilnehmer und *Propionibacterium spp.* lag geringfügig häufiger im Sputum vor als in den Zahntaschen der CF-Patienten. Ein signifikanter Unterschied nachgewiesener Keimarten bestand zwischen beiden Studiengruppen nicht (siehe Anhang, Tab. 11A).

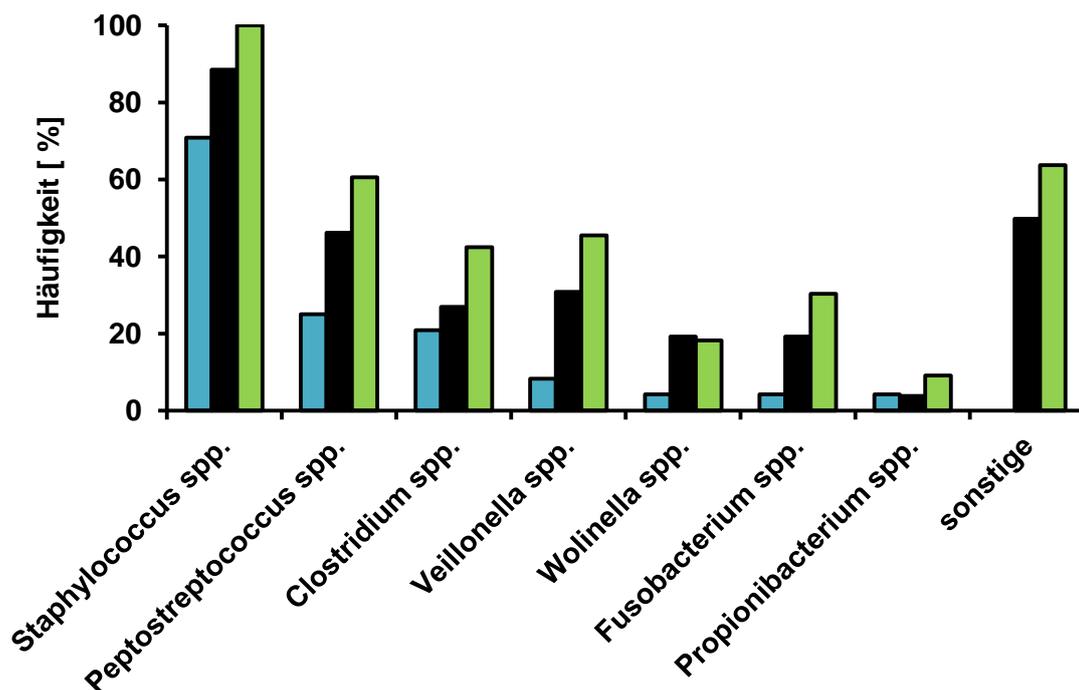


Abbildung 12: Vergleich der Häufigkeiten (%) obligat anaerober Genera im Sputum von ■ CF-Patienten (n=24) und im parodontalen Sulkus von ■ CF-Patienten (n=26) und ■ Kontrollprobanden (n=33)

17 der 19 CF- Patienten, bei denen obligate Anaerobier in den Sputumproben vorlagen (89,5%) wiesen gleichzeitig identische Spezies obligater Anaerobier in Sputum und

Zahntaschen auf (bezogen auf die 24 CF-Patienten, welche Sputum expektorierten 70,83%, Abb. 13). Insgesamt wurden 22 Paare isoliert (Tab. 6), wobei allein 16-mal (72,7%) *S. saccharolyticus* vorlag. *Ps. prevotii* wurde viermal, *Veillonella spp.* und *C. butyricum* jeweils einmal zeitgleich in Sputum und mindestens einer Zahntasche nachgewiesen. Bei vier Patienten konnten mehrere Paare nebeneinander identifiziert werden. Bei 13 Paaren konnte das jeweilige Bakterium sowohl im Sputum, als auch in allen vier untersuchten Zahntaschen des Patienten isoliert werden, wobei hier immer *S. saccharolyticus* vorzufinden war. In zwei Fällen lag der Keim neben dem Sputum auch in drei Zahntaschen vor, viermal in zwei Zahntaschen und dreimal in nur einer einzigen Zahntasche.

Tabelle 6: Verteilung der zeitgleich in Sputum und parodontalen Sulkus nachgewiesenen obligaten Anaerobier (Paare) nach Kompartimenten

Probe	Paar	Lokalisation				
		Sputum	I. Quadrant	II. Quadrant	III. Quadrant	IV. Quadrant
CF 02	<i>S. saccharolyticus</i>	X	X	X	X	X
	<i>Ps. prevotii</i>	X			X	
CF 03	<i>S. saccharolyticus</i>	X	X	X	X	X
CF 04	<i>Ps. prevotii</i>	X		X		
CF 06	<i>S. saccharolyticus</i>	X	X	X	X	X
CF 07	<i>S. saccharolyticus</i>	X	X	X		X
CF 08	<i>S. saccharolyticus</i>	X	X	X	X	X
	<i>C. butyricum</i>	X	X		X	
CF 10	<i>S. saccharolyticus</i>	X		X		X
	<i>Ps. prevotii</i>	X		X		X
CF 12	<i>S. saccharolyticus</i>	X	X	X	X	X
CF 14	<i>S. saccharolyticus</i>	X	X	X	X	X
CF 15	<i>S. saccharolyticus</i>	X	X	X	X	X
CF 16	<i>S. saccharolyticus</i>	X	X	X	X	X
CF 18	<i>S. saccharolyticus</i>	X	X	X	X	X
CF 19	<i>S. saccharolyticus</i>		X	X	X	X
CF 20	<i>S. saccharolyticus</i>	X	X	X		X
CF 22	<i>S. saccharolyticus</i>	X	X	X	X	X
	<i>Ps. prevotii</i>	X		X		
	<i>Veillonella spp.</i>	X		X		X
CF 24	<i>S. saccharolyticus</i>	X	X	X	X	X
CF 26	<i>S. saccharolyticus</i>	X	X	X	X	X

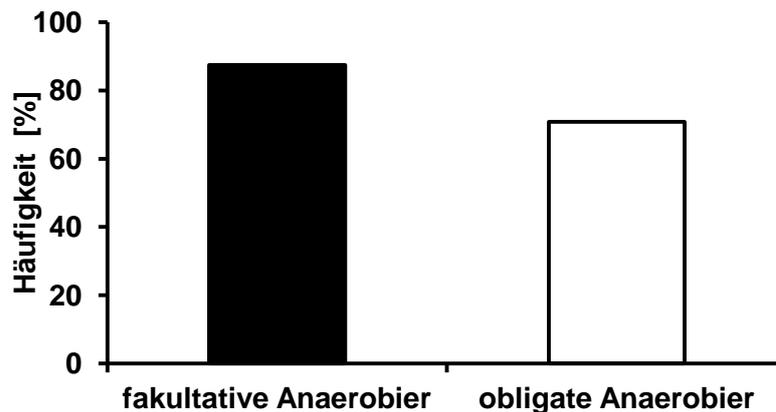


Abbildung 13: Häufigkeit (%) gleichzeitig in Sputum und mindestens einer Zahntasche auftretender identischer Spezies von CF-Patienten (n=24) für fakultative Anaerobier (■) und obligate Anaerobier (□)

4.4 Resistenzbestimmung

Unter der Annahme, dass die regelmäßige Antibiose der CF-Patienten zu einer höheren Resistenzrate der Bakterien führt, wurden insgesamt 388 obligate Anaerobier auf ihre antibiotische Empfindlichkeit gegenüber Azithromycin (AZM), Colistin (CS), Meropenem (MRP), Piperacilin/Tazobactam (TZP), Ceftazidim (CAZ), Metronidazol (LZ) und Clindamycin (CD) untersucht. Getestet wurden 160 Keime aus den parodontalen Sulci der CF-Patienten, 202 obligate Anaerobier aus den Zahntaschen der Kontrollgruppe und 26 Bakterien aus dem Sputum der CF-Patienten.

In beiden Studiengruppen konnte eine hohe Anzahl resistenter obligat anaerober Bakterien nachgewiesen werden (Abb. 14). Über die Hälfte der 160 getesteten obligaten Anaerobier aus den Zahntaschen der CF-Patienten waren resistent gegenüber Ceftazidim (67,5%) und Azithromycin (54,4%). Auch die obligat anaeroben Bakterien aus den Sputumproben zeigten vergleichbar hohe Resistenzen gegenüber diesen beiden Antibiotika (61,5% gegenüber Azithromycin und 57,7% gegenüber Ceftazidim). Auch wies Piperacillin/Tazobactam bei annähernd der Hälfte der untersuchten Keime der CF-Patienten nur eine geringe Wirksamkeit auf. 46,2% der Zahntaschenbakterien und 42,3% der Sputumkeime waren resistent gegenüber dieser antibiotischen Substanz. Gegenüber Metronidazol, einem Antibiotikum, welches nicht in der CF-Therapie eingesetzt wird, ließen sich unter den CF-Patienten mehr resistente Bakterien nachweisen (28,8% der Bakterien aus den parodontalen Sulci, 42,3% der Sputumkeime), als gegenüber Colistin, ein häufig in der CF-Therapie verwendetes

Antibiotikum (25,6% der Zahntaschenkeime, 34,6% der Sputumbakterien). Eine hohe antibiotische Empfindlichkeit ließ sich dagegen gegenüber Clindamycin nachweisen, über 90% aller getesteten obligaten Anaerobier waren sensibel.

Für die obligaten Anaerobier aus den Zahntaschen der Kontrollgruppe ergaben sich ebenfalls hohe Anzahlen resistenter Stämme. Auch in dieser Gruppe waren fast die Hälfte der untersuchten Bakterien gegenüber Ceftazidim (48%) und Piperacillin/Tazobactam (43,1%) resistent. Eine hohe Anzahl sensibler obligat anaerober Keime konnte gegenüber Meropenem und Clindamycin nachgewiesen werden. Unter den 202 untersuchten Bakterien waren nur 12 (5,9%) resistent gegenüber Meropenem und nur 7 (3,5%) gegenüber Clindamycin.

Trotz ebenfalls hoher Anzahlen resistenter Keimarten in den Zahntaschen der gesunden Teilnehmer, bestehen im Vergleich zu den CF Patienten doch signifikante Unterschiede in der antibiotischen Empfindlichkeit gegenüber fünf der getesteten sieben Antibiotika. Eine signifikant höhere Anzahl von Bakterien aus den parodontalen Sulci der CF-Patienten, im Vergleich zur Kontrollgruppe, konnten als resistent gegenüber Meropenem ($p=0,001$), Ceftazidim ($p=0,001$), Metronidazol ($p=0,01$), Clindamycin ($p=0,02$) und vor allem gegenüber Azithromycin ($p=2,05 \times 10^{-10}$) eingestuft werden (siehe Anhang, Tab. 15A).

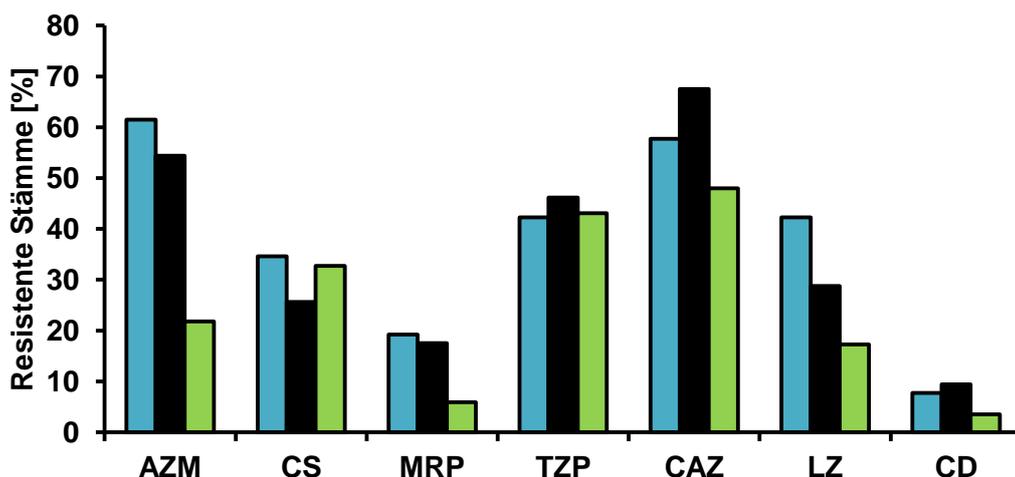


Abbildung 14: Häufigkeit (%) resistenter obligat anaerober Bakterien in ■ CF-Sputen (n=26), ■ CF-Zahntaschen (n=160) und Zahntaschen der ■ Kontrollgruppe (n= 202) AZM: Azithromycin, CS: Colistin, MRP: Meropenem, TZP: Piperacillin/Tazobactam, CAZ: Ceftazidim, LZ: Metronidazol, CD: Clindamycin

Vor dem Hintergrund, dass Bakterien des parodontalen Sulkus eine mögliche Quelle der chronischen Lungeninfektion bei Patienten mit CF darstellen, wurden explizit die gleichzeitig in Sputum und Zahntaschen vorkommenden Keime auf ihre antibiotische Empfindlichkeit getestet. Untersucht wurden die 91 obligaten und 134 fakultativen Anaerobier, welche als Paare nachgewiesen worden waren. Die minimale Hemmkonzentration in $\mu\text{g/ml}$ und das damit ermittelte Resistenzmuster eines im Sputum vorkommenden Keimes, wurde mit dem Resistenzmuster des dazugehörigen Keimes aus der Zahntasche verglichen (Tab. 7).

Tabelle 7: Vergleich der Resistenzmuster anhand der minimalen Hemmkonzentration in $\mu\text{g/ml}$, exemplarisch für zwei obligate Anaerobier

Probe	Lok.	Resistenzmuster						
		AZM	CS	MRP	TZP	CAZ	LZ	CD
<i>S. sacch.</i>	Sp.	r(256)	s(0,38)	s(0,032)	r(256)	r(24)	s(8)	s(1)
	I. Q.	r(256)	s(0,5)	s(0,094)	r(256)	r(16)	s(12)	s(1)
	II. Q.	r(256)	s(0,5)	s(0,047)	r(256)	r(16)	s(12)	s(0,75)
	III. Q.	r(256)	s(0,5)	s(0,032)	r(256)	r(24)	s(8)	s(0,75)
	IV. Q.	r(256)	s(0,38)	s(0,38)	r(256)	r(16)	i(16)	s(1)
<i>Ps. prevotii</i>	Sp.	r(256)	r(256)	s(0,047)	s(1)	s(0,75)	r(256)	r(256)
	III. Q.	s(0,5)	r(256)	s(0,008)	s(0,25)	s(0,19)	r(256)	s(0,023)

Abkürzungen: Lok.: Lokalisation, *S. sacch.*: *Staphylococcus saccharolyticus*, *Ps.*: *Peptostreptococcus*, Sp.: Sputum, Q.: Quadrant, AZM: Azithromycin, CS: Colistin, MRP: Meropenem, TZP: Piperacillin/Tazobactam, CAZ: Ceftazidim, LZ: Metronidazol, CD: Clindamycin, s: sensibel, i: intermediär, r: resistent

Unter den 17 CF-Patienten, bei denen obligaten Anaerobier als Paare auftraten, konnten bei neun Patienten (52,9%) Paare mit identischem Resistenzmuster nachgewiesen werden. Alle diese Paare konnten gegenüber den sieben untersuchten Antibiotika identisch in sensibel, intermediär und resistent eingeteilt werden. Es bestanden nur minimale Differenzen innerhalb der ermittelten minimalen Hemmkonzentration. Insgesamt wurden unter den 22 anaeroben Paaren zehn mit identischem Muster nachgewiesen. Es handelte sich dabei achtmal um *S. saccharolyticus*, einmal *Veillonella spp.* und einmal *Ps. prevotii*. Zusätzlich wurden

zwei Paare, jeweils erneut *S. saccharolyticus*, mit sehr ähnlichem Resistenzmuster ermittelt, wobei hier nur maximal ein Unterschied im Resistenzmuster vorlag und der entsprechende Keim gegenüber einem einzigen Antibiotikum als intermediär anstatt sensibel oder resistent eingestuft worden war (Tab. 7). Bezogen auf eine mögliche Mehrfach-Paarbildung, also das gleichzeitige Vorkommen eines Keimes im Sputum und in mehreren Zahntaschen, konnten insgesamt 17 Paare mit identischen Resistenzmustern und neun mit sehr ähnlichen Resistenzmustern identifiziert werden.

Bei zehn von 21 Patienten (47,6%), die fakultativ anaerobe Bakterien paarweise aufwiesen, konnten identische Resistenzmuster nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich hauptsächlich um *Streptococcus spp.*, nur jeweils einmal wurde für *P. aeruginosa* und *S. aureus* das gleiche Muster ermittelt.

Von insgesamt 39 fakultativ anaeroben Paaren konnten zwölf mit identischem und neun mit sehr ähnlichem Resistenzmuster, darunter zweimal *S. aureus*, aufgezeigt werden. Bei Betrachtung einer möglichen Mehrfach-Paarbildung eines Keimes, handelte es sich um 20 Paare mit identischen Resistenzmustern und 16 mit nahezu identischer antibiotischer Empfindlichkeit.

5 Diskussion

5.1 Einfluss der Antibiotikatherapie auf die mikrobielle Zusammensetzung der Zahntaschen von CF-Patienten

Patienten mit CF erhalten eine regelmäßige antibiotische Therapie, entweder als Standardantibiose oder als zusätzliche Therapie in der akuten Exazerbation. Unter der Annahme, diese Antibiotikatherapie könne zu einer veränderten Zusammensetzung der mikrobiellen Kolonisation führen, beispielsweise durch Ausrottung sensibler Bakterienstämme, wurde die bakterielle Besiedlung der parodontalen Sulci von CF-Patienten und Gesunden hinsichtlich Art und Häufigkeit vorkommender Spezies verglichen.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass kein Unterschied in der mikrobiellen Zusammensetzung zwischen CF-Patienten und Gesunden besteht. Die starke Antibiose der Patienten führt, im Gegensatz zu der Ausgangshypothese, offensichtlich zu keiner reduzierten Bakterienvielfalt in den parodontalen Sulci. Es besteht kein signifikanter Unterschied hinsichtlich Art und Häufigkeit vorkommender Bakterien zwischen beiden Studiengruppen (Abb. 9 und 10).

Die Identifizierung vielfältiger obligater Anaerobier in den parodontalen Sulci ist nicht überraschend. Zahntaschen sind ein bekanntes Reservoir obligat anaerob wachsender Bakterien (Socransky et al., 1998). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer Studie von Tunney, in der gezeigt wurde, dass eine antibiotische Therapie gegen fakultative Anaerobier nur einen minimalen Einfluss auf die Häufigkeit obligater Anaerobier im Sputum hat (Tunney et al., 2011), wurde in der vorliegenden Studie ebenfalls eine Vielfalt obligater Anaerobier auch in den parodontalen Sulci nachgewiesen.

5.2 Identifizierung gleicher Bakterienspezies in den parodontalen Sulci von CF-Patienten und Gesunden

Bei allen Studienteilnehmern konnten fakultative Anaerobier in den Zahntaschen nachgewiesen werden. Insgesamt wurden 14 Genera für beide Studiengruppen identifiziert, wobei 8 identische Genera bzw. 24 identische Spezies in beiden Gruppen in vergleichbarer Häufigkeit vorlagen. Es handelte sich dabei um die Bakterienarten, welche in beiden Studiengruppen jeweils sehr häufig nachgewiesen werden konnten. Genera, die ausschließlich bei CF-Patienten bzw. ausschließlich bei Gesunden isoliert wurden, waren jeweils nur sehr selten aufzuzeigen.

In beiden Studiengruppen waren *Streptococcus spp.* die am häufigsten isolierten Keimarten. Sie gehören zur Standortflora der parodontalen Sulci (Sokransky et al., 1998). Der CF-typische fakultativ anaerobe Keim *P. aeruginosa* konnte nur bei drei CF-Patienten isoliert werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von Komiyama und Mitarbeitern überein. Auch sie wiesen *P. aeruginosa* in nur 5 von 31 Proben von Zahnbelag bei Patienten mit CF nach, und nur bei einem einzigen gesunden Teilnehmer isolierten sie *P. aeruginosa* auf dem Zungenrücken, nicht jedoch in supragingivaler Plaque oder anderen Entnahmestellen der Mundhöhle (Komiyama et al., 1985).

Bei 98,3% aller Studienteilnehmer wurden obligate Anaerobier in den parodontalen Sulci nachgewiesen, wobei kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieser Bakterien und der Zahngesundheit bestand. Auch die drei untersuchten Kinder wiesen obligat anaerob wachsende Bakterien in den Zahntaschen auf. Die Tiefe der Zahntasche hatte keinen Einfluss auf die Anzahl unterschiedlicher nachgewiesener obligater Anaerobier. So wurden in den Proben aus Zahntaschen mit einer Tiefe von 2 mm teilweise höhere Anzahlen unterschiedlicher obligat anaerob wachsender Keimarten isoliert, als in Zahntaschen mit 6 mm Tiefe. Allerdings wurde in der vorliegenden Studie keine Quantifizierung der Zahntaschenbakterien durchgeführt. So konnten parodontal-pathogene Bakterien, wie beispielsweise *Ps. micros* und *Fusobacterium spp.* (Sokransky et al., 1998; Boutaga et al., 2005) zwar regelmäßig in den Zahntaschen mit einer Tiefe von über 4 mm isoliert werden, aber auch in den Sulci von 2-3 mm Tiefe waren diese Keime festzustellen. Jedoch war keine Aussage darüber möglich, ob in den tieferen Zahntaschen ein bestimmter parodontalpathogener Keim quantitativ häufiger kolonisiert war als in physiologischen Taschen.

Insgesamt wurden 16 Genera und 25 obligat anaerobe Spezies isoliert, wobei in den beiden Studiengruppen acht identische Genera bzw. 14 identische Spezies vorlagen. Wie für die fakultativ anaeroben Bakterien bestand auch bei den obligaten Anaerobiern kein Unterschied hinsichtlich Art und Häufigkeit vorkommender Genera zwischen beiden Studiengruppen.

Der Nachweis gleicher Bakterienspezies in den Zahntaschen von CF-Patienten und Gesunden spricht für die Aufnahme dieser Keimarten aus der Umwelt. Für ein ubiquitäres Vorkommen der Bakterien spricht auch, dass die Studienteilnehmer ihren Wohnsitz nicht alle direkt in Halle hatten. Es scheinen keine regionalen Unterschiede in der Exposition zu bestehen. Durch die vielfältigen Kontaminationsquellen in der Umwelt können CF-Patienten offensichtlich nicht spezifisch vor einer solchen

Kontamination oder gar Infektion geschützt werden. Eine Aufnahme der normalerweise apathogenen Bakterien aus der Umwelt, über beispielsweise Wasserreservoirs, kontaminierte Gegenstände, über die Nahrung oder durch engen Kontakt mit Familienmitgliedern oder anderen Personen (Döring und Høiby, 2004) ist unvermeidbar und könnte einen initialen Schritt in der Entstehung chronisch-bakterieller Lungeninfektionen darstellen. Dies gilt nicht nur für die CF-typischen, fakultativ anaeroben Pathogene, wie beispielsweise *P. aeruginosa*. Auch obligate Anaerobier, deren Rolle in der Entstehung und Progression chronischer Lungeninfekte derzeit noch nicht geklärt ist, finden sich in zahlreichen Umweltreservoirs und Lebensmitteln (Koneman et al., 1997).

5.3 Vergleich der Bakterien in den Zahntaschen und Sputumproben von CF-Patienten

Um zu untersuchen, ob der parodontale Sulkus eine mögliche Kontaminationsquelle der chronisch-bakteriellen Lungeninfektion bei Patienten mit CF darstellt, wurde die bakterielle Zusammensetzung der Zahntaschen mit derjenigen des Sputums der CF-Patienten verglichen. In allen untersuchten Sputumproben wurden fakultative Anaerobier nachgewiesen. Deren Keimzahlen lagen bei $8,6 \times 10^7 \pm 7,5 \times 10^7$ KBE/ml ($3,5 \times 10^6$ KBE/ml bis $2,3 \times 10^8$ KBE/ml). Auch in den Sputumproben der CF-Patienten waren *Streptococcus spp.* die am häufigsten isolierten Keimarten. *Str. intermedius*, *Str. anginosus* und *Str. constellatus* zählen zur sogenannten *Streptococcus milleri*-Gruppe, deren Rolle in der Pathophysiologie der CF nicht endgültig geklärt ist. Ihnen wird eine Triggerfunktion der akuten Exazerbation der CF postuliert (Sibley et al., 2008). In der Studie von Sibley und Mitarbeitern wird ein Zusammenhang im Auftreten akuter Exazerbationen und einem vermehrten Nachweis dieser Streptokokken nahegelegt. In der vorliegenden Studie wurden diese Bakterien vor allem in den Zahntaschen nachgewiesen, deutlich seltener jedoch in den Sputen der CF-Patienten. Dies ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass keiner der Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme unter einer akuten Exazerbation litt.

Die zweithäufigste Bakterienspezies in den Sputumproben war *P. aeruginosa* (58,3%). Wesentlich geringer, wenn auch nicht signifikant unterschiedlich, konnte dieser CF-typische Keim in den Zahntaschen der CF-Patienten nachgewiesen werden (11,5%). Auch in der Studie von Mainz wurde *P. aeruginosa* in den oberen Atemwegen seltener nachgewiesen (46%) als in den Sputumproben (90,5%) (Mainz et al., 2009). Die Arbeitsgruppe von Komiyama wies diesen Erreger in jeweils 45,2% der CF-Sputen und

der Mundhöhlenproben nach. Bezogen nur auf die supragingivale Plaque lag er jedoch nur bei 16,2% der CF-Patienten vor (Komiyama et al. 1985).

In 19 von 24 Sputumproben konnten obligate Anaerobier festgestellt werden. Die mittleren Keimzahlen lagen hier bei $1,2 \times 10^7 \pm 1,0 \times 10^7$ KBE/ml ($1,1 \times 10^6$ bis $3,5 \times 10^7$ KBE/ml). Dieses Ergebnis bestätigt frühere Studien, in denen obligate Anaerobier in den Sputen von CF-Patienten bereits in sehr hohen Keimzahlen nachgewiesen wurden (Rogers et al., 2004; Field et al., 2005; Tunney et al., 2008; Worlitzsch et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt sieben Genera und zehn Spezies in den CF-Sputen unterschieden. In den Studien von Rogers und Tunney wurden *Prevotella* spp. als häufigstes obligat anaerobes Genus nachgewiesen (Rogers et al., 2004, Tunney et al., 2008). In der Studie von Worlitzsch et al. (2009) und in der vorliegenden Studie waren *Staphylococcus* spp. die am häufigsten isolierten Bakterien. *Prevotella* spp. konnte in dieser Studie nicht in den Sputumproben nachgewiesen werden. Weitere in dieser Studie nachgewiesene obligat anaerobe Bakterien – *Peptostreptococcus* spp., *Clostridium* spp., *Veillonella* spp., *Wolinella* spp., *Fusobacterium* spp. und *Propionibacterium* spp. – wurden auch bereits in anderen Studien in den Sputumproben von CF-Patienten isoliert. Die Differenzen in der Häufigkeit nachgewiesener Bakterien zwischen den einzelnen Studien lassen sich eventuell durch regionale Unterschiede oder unterschiedliche Nachweistechiken, antibiotikahaltige Nährmedien sowie Identifizierungssysteme erklären.

Eine Untersuchung von Sputumproben gesunder Teilnehmer entfiel, da diese Sputum nicht spontan expektorieren können. Auf invasive Verfahren zur Gewinnung vergleichbarer Proben aus der Lunge wurde in dieser Studie nicht zurückgegriffen.

Alle in den Sputumproben identifizierten obligat anaeroben Bakteriengenera konnten auch aus den parodontalen Sulci der CF-Patienten isoliert werden. In den Zahntaschen der CF-Patienten fanden sich zusätzlich sechs obligat anaerobe Genera. Der Vergleich der jeweils häufigsten Genera zeigt jedoch, dass kein Unterschied zwischen den beiden Kompartimenten Zahntaschen und Sputum besteht.

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass, mit Ausnahme von *B. cepacia*, kein signifikanter Unterschied in der mikrobiellen Besiedlung von Sputum und Zahntaschen der CF-Patienten bestand. Art und Häufigkeit vorkommender fakultativ und obligat anaerober Genera waren vergleichbar (Abb. 11 und 12).

5.4 Nachweis identischer Bakterien in den parodontalen Sulci und Sputen von CF-Patienten

Bei 21 der 24 CF-Patienten (87,5%), welche fakultative Anaerobier im Sputum aufwiesen, wurden identische Spezies gleichzeitig aus Sputum und mindestens einer Zahntasche isoliert. Da einige Patienten mehrfach gleiche fakultativ anaerobe Bakterienspezies in Sputum und mindestens einer Zahntasche aufwiesen, konnten insgesamt 39 dieser „Paare“ festgestellt werden. Vor allem *Streptococcus spp.* waren als Paare isoliert worden – jedoch keiner der *Streptococcus-millieri*-Gruppe – aber auch *P. aeruginosa* und *S. aureus* traten vereinzelt sowohl in Sputum als auch in dem parodontalen Sulkus eines Patienten gleichzeitig auf.

17 der 19 Patienten, welche obligate Anaerobier im Sputum enthielten (89,5%), wiesen auch obligat anaerobe Bakterienspezies als Paare auf. Insgesamt konnte 22-mal ein identisches obligat anaerobes Bakterium in Sputum und mindestens einer Zahntasche nachgewiesen werden. *S. saccharolyticus* wurde dabei besonders häufig als Paar identifiziert, seltener *Ps. prevotii* und nur jeweils einmal *Veillonella spp.* und *C. butyricum*.

Eine mögliche Kontamination der Lunge durch physiologische Bakterienreservoirs des menschlichen Körpers wurde bereits in verschiedenen Studien vermutet. Der zeitgleiche Nachweis identischer, teilweise genotypisch übereinstimmender *P. aeruginosa*-Stämme in den Nasennebenhöhlen und der Lunge von CF-Patienten (Johansen et al., 2012) sowie die Isolation typischer Vertreter fakultativer und obligater Anaerobier der Standortflora des Oropharynx in den Sputumproben von CF-Patienten (Sibley et al., 2008; Tunney et al., 2008) sprechen für eine mögliche Kolonisation der Lunge mit Bakterien aus den oberen Atemwegen.

Der parodontale Sulkus wurde bislang allerdings noch nicht als mögliche Kontaminationsquelle betrachtet. Der Nachweis identischer Spezies in den Zahntaschen und Sputen von CF-Patienten (Abb. 13) legt aber einen Zusammenhang beider Kompartimente nahe. Eine Interaktion zwischen Sputum und Zahntaschen ist möglich, wobei der Weg der Kontamination durch diese Studie nicht klar bewiesen werden kann. So ist eine Kolonisation der Lunge mit Bakterien aus den parodontalen Sulci zwar wahrscheinlich, aber auch eine Kontamination der Zahntaschen aus der Lunge kann nicht ausgeschlossen werden.

Die Untersuchung von vier Entnahmestellen in der Mundhöhle jedes Patienten liefert nur einen Ausschnitt aller möglichen Zahntaschen, wodurch die Anzahl identischer

Paare vielleicht geringer ausfiel. Außerdem ist die Verwendung herkömmlicher mikrobiologischer Kulturen zur Differenzierung und Identifizierung von Bakterien den modernen molekularen Techniken unterlegen (Rogers et al., 2004; Bittar und Rolain, 2010; Zemanick et al., 2010). Jedoch ermöglichen sie den Nachweis lebender Bakterien und den Ausschluss falsch positiver Ergebnisse durch beispielsweise Verunreinigungen und nicht funktionierende Primer. PCR-Techniken weisen eine sehr hohe Sensitivität auf (Boutaga et al., 2005), so dass eine mögliche Kontamination des expektorierten Sputums nicht ausgeschlossen werden kann. Weiterhin ist durch die Isolation lebender Bakterien die Untersuchung ihrer antibiotischen Empfindlichkeit möglich (Worlitzsch et al., 2009; Tunney et al., 2011).

Eine mögliche Kontamination des expektorierten Sputums bei der Passage durch die Mundhöhle konnte in dieser Studie nicht ausgeschlossen werden. Dennoch legen die Ergebnisse dieser Studie eine Kolonisation der Lunge mit Bakterien aus den Zahntaschen nahe, da die gesunden Kontrollpersonen gleiche Keimarten in den Zahntaschen auswiesen. Insbesondere deswegen, da es sich um immunkompetente Personen handelte, die zum Zeitpunkt der Probenentnahme keinerlei Erkrankungen oder Infekte aufwiesen. Es ist davon auszugehen, dass die Bakterien aus der Mundhöhle, durch beispielsweise Aspiration, in die unteren Atemwege gelangen. Bei Gesunden kommt es durch eine effiziente mukoziliäre Clearance allerdings nicht zu einer Ansiedlung der Bakterien in der Lunge. Unterstützt wird diese Annahme durch andere Studien, wie von Worlitzsch et al. und Rogers et al.. Durch die von ihnen verwendeten Techniken und ihre Ergebnisse konnten sie eine Kontamination expektorierten Sputums von CF-Patienten ausschließen (Rogers et al., 2006; Worlitzsch et al., 2009).

5.5 Vergleich der antibiotischen Empfindlichkeit

Unter der Annahme, die erhöhte antibiotische Therapie der CF-Patienten könne zu einem Anstieg resistenter Bakterien führen, wurde die antibiotische Empfindlichkeit der Bakterien aus parodontalen Sulkus und Sputum von CF-Patienten mit derjenigen von Bakterien aus den Zahntaschen Gesunder verglichen. Eine Antibiose der CF-Patienten richtet sich im klinischen Alltag vor allem gegen fakultative Anaerobier wie *S. aureus* und *P. aeruginosa* (Gibson et al., 2003; Ratjen und Döring, 2003; Worlitzsch et al., 2009). Auch in der akuten Exazerbation werden AntibioGramme meist nur für diese Keimarten angefordert. Dies ist dadurch begründet, dass die pathophysiologische Bedeutung der obligaten Anaerobier noch nicht endgültig geklärt ist. Um einen möglichen Einfluss der Antibiose auf die Resistenzsituation der obligaten Anaerobier

zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Studie für diese Bakterien das Resistenzprofil erstellt.

In beiden Studiengruppen konnten hohe Anzahlen resistenter Bakterien festgestellt werden. Wobei die obligat anaeroben Bakterien der parodontalen Sulci der CF-Patienten signifikant höhere Resistenzen gegenüber Azithromycin, Meropenem, Ceftazidim, Metronidazol und Clindamycin aufwiesen, als diejenigen der Kontrollgruppe (Abb. 14). Die Ausgangshypothese steigender Resistenzen durch die starke Antibiose der CF-Patienten konnte demnach bestätigt werden.

Die hohe Anzahl an resistenten fakultativ anaeroben Bakterien bei den CF-Patienten ist nicht überraschend, vor allem gegenüber den sehr häufig verwendeten Antibiotika Azithromycin und Colistin. Es handelt sich um Antibiotika der Standard- bzw. Erhaltungstherapie der CF. Trotz der Tatsache, dass diese vor allem gegen fakultative Anaerobier eingesetzt werden, sind auch hohe Resistenzen bei den obligaten Anaerobiern festzustellen. Eine antibiotische Therapie der obligaten Anaerobier mit diesen Medikamenten scheint fraglich erfolgreich.

Gegenüber Ceftazidim ließen sich besonders hohe Raten resistenter Stämme nachweisen (67,5% resistente obligate Anaerobier in den Zahntaschen der CF-Patienten, 57,7% in den Sputumproben). Auch Worlitzsch und Mitarbeiter stellten insbesondere gegenüber diesem Antibiotikum hohe Anzahlen resistenter Keime fest (Worlitzsch et al., 2009). Die Ergebnisse dieser beiden Studien lassen sich beispielsweise dadurch erklären, dass Ceftazidim besonders häufig am Universitätsklinikum Halle (Saale) in der CF-Therapie eingesetzt wird. Auch konnten sie zeigen, dass eine antibiotische Therapie gegen *P. aeruginosa* in der akuten Exazerbation die Anzahl obligater Anaerobier nur geringfügig verringern konnte (Worlitzsch et al., 2009). In einer Studie von Tunney und Mitarbeitern wurde ebenfalls erkannt, dass die häufig gegen fakultative Anaerobier gerichtete Antibiose die Anzahl dieser Keime in den Sputen von CF-Patienten zwar deutlich verringerte, aber nur einen minimalen Effekt auf die Anzahl obligat anaerober Bakterien hatte (Tunney et al., 2011)

Die hohe Anzahl sensibler Stämme gegenüber Meropenem, welches vor allem in der akuten Exazerbation der CF eingesetzt wird, ist positiv zu vermerken. Weniger als 20% der obligaten Anaerobier der CF-Gruppe waren resistent gegenüber diesem Antibiotikum. Auch in Nordirland zeigte sich ein sehr hoher Prozentsatz von Meropenem-sensiblen Stämmen (Tunney et al., 2008). Eine antibiotische Therapie in

der akuten Exazerbation der CF scheint mit diesem Medikament weiterhin erfolgversprechend.

Gegenüber Metronidazol zeigten fakultative Anaerobier keinerlei Empfindlichkeit, alle untersuchten Keime (100%) waren resistent gegenüber diesem Medikament. Dies ist insofern nicht überraschend, da es sich um ein Antibiotikum handelt, welches hauptsächlich gegen obligate Anaerobier eingesetzt wird und gegen welches die aerob metabolisierenden Bakterien eine intrinsische Resistenz besitzen. Allerdings konnte ebenfalls eine vergleichsweise hohe Anzahl resistenter obligater Anaerobier festgestellt werden. Die obligaten Anaerobier der CF-Patienten wiesen gegenüber diesem Antibiotikum sogar höhere Resistenzen auf als gegenüber Colistin, dabei handelt es sich bei Metronidazol um ein Antibiotikum, welches nicht in der CF-Therapie eingesetzt wird.

Die hohen Raten resistenter Stämme der CF-Patienten gegenüber Metronidazol und Clindamycin, welche nicht in der CF-Therapie eingesetzt werden sowie die vergleichsweise hohen Resistenzen in der Kontrollgruppe gegenüber allen getesteten Antibiotika, lassen sich nur spekulativ erklären, beispielsweise durch den häufigen Einsatz von Clindamycin zur Endokarditisprophylaxe in der Zahnheilkunde (Brook et al., 2005), oder dem vielfältigen Einsatz von Metronidazol, als gegen Anaerobier wirksames Antibiotikum, beispielsweise in der Gynäkologie (Schmid et al., 2001), Gastroenterologie (Olekhnovich et al., 2013) oder auch Zahnmedizin (Socransky et al., 2013). Aber auch der zunehmende Einsatz verschiedener Antibiotika in der Tiermast stellt einen Grund steigender Resistenzen dar (Hurd et al., 2004). Auch ein Plasmidtransfer zur Resistenzübertragung zwischen gram-negativen Bakterien könnte einen Grund für die hohen Anzahlen resistenter Stämme darstellen (Wendt et al., 2012).

5.6 Vergleich der Resistenzprofile identischer Paare

Schließlich wurden die Resistenzprofile der als Paare auftretenden identischen Bakterien verglichen. Bei neun der 17 CF-Patienten, welche obligate Anaerobier als Paare aufwiesen (52,9%), konnten identische Resistenzmuster ermittelt werden. Bezogen auf alle 22 obligat anaeroben Paare waren es 17 Paare mit identischem Resistenzprofil (77,3%). Für die jeweiligen Paare ließen sich identische minimale Hemmkonzentrationen gegenüber allen sieben getesteten Antibiotika nachweisen. Auch unter den fakultativ anaeroben Bakterienpaaren lagen bei 10 von 21 Patienten

(47,6%) identische Resistenzprofile vor. Von allen 39 fakultativ anaeroben Paaren wurden 12 Paare identisch in sensibel, intermediär oder resistent eingeteilt (30,8%).

Dieses Ergebnis spricht für eine Interaktion der beiden Kompartimente Sputum und parodontaler Sulkus, wobei das Ergebnis identischer Resistenzprofile keinesfalls als Beweis dienen kann, da es sich nicht um einen genotypischen Vergleich der Stämme aus Lunge und Zahntaschen handelt.

5.7 Fazit

Der Nachweis gleicher Bakterienspezies in den Zahntaschen von CF-Patienten und Gesunden sowie in den Sputumproben der CF-Patienten und das zeitgleiche Auftreten identischer Spezies in den parodontalen Sulci und im Sputum bei über 70% der CF-Patienten spricht für eine mögliche Kontamination der Lunge aus den Zahntaschen. Ebenfalls darauf hinweisend ist, dass in etwa 50% der identischen Paare auch die Resistenzprofile übereinstimmten. Ein endgültiger Beweis des Kontaminationsweges aber fehlt, was fortführende Studien erforderlich macht.

6 Zusammenfassung

Die Cystische Fibrose (CF) ist eine schwerwiegende, autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung mit Multiorganbeteiligung. In deren Folge entwickeln die Patienten chronisch-bakterielle Lungeninfektionen, welche den Grund für den frühzeitigen Tod der Patienten darstellen. Vor allem die fakultativ anaeroben Bakterien *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cepacia*, *St. maltophilia*, und *H. influenzae* werden für die Entstehung und Progression dieser Lungeninfektionen bei Patienten mit CF verantwortlich gemacht. Das stark hypoxische Milieu innerhalb der Mukusplaques in den Lungen der CF-Patienten führt aber auch zu einer Ansiedlung obligater Anaerobier. Welche Rolle diese Bakterien in der Pathophysiologie der CF spielen, ist nicht endgültig geklärt.

Zahlreiche mögliche Kontaminationsquellen mit den CF-pathogenen, fakultativen Anaerobiern wurden bislang beschrieben. Nicht nur vielfältige Umweltreservoirs spielen dabei eine bedeutende Rolle, auch körpereigene Kompartimente, wie beispielsweise die Nasennebenhöhlen, werden als mögliche Ausgangspunkte einer Kontamination vermutet. Wo die Quelle der Kontamination mit obligaten Anaerobiern liegt, ist bislang unklar. Obligate Anaerobier gehören unter anderem zur Standortflora des Oropharynx. Bisher wurde allerdings nur in sehr wenigen Studien ein Zusammenhang zwischen obligaten Anaerobiern der oberen Atemwege und der Lunge angenommen.

Derzeit steht nur eine symptomatische Behandlung der CF-Erkrankung zur Verfügung. Vor allem eine antibiotische Therapie zeigt eine signifikant positive Auswirkung auf die Prognose der Patienten. Diese häufige Antibiose, vor allem gegen die fakultativ anaeroben Bakterien gerichtet, birgt die Gefahr steigender Resistenzraten.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Studie untersucht, ob der parodontale Sulkus, als natürliches Reservoir obligater Anaerobier, eine mögliche Infektionsquelle der chronischen Lungeninfektion darstellt und ob die erhöhte Antibiose der CF-Patienten einen Einfluss auf die Zusammensetzung der mikrobiologischen Flora von Sputum und Zahntaschen aufweist. Weiterhin wurde die antibiotische Empfindlichkeit, vor allem der obligaten Anaerobier, gegenüber ausgewählten Antibiotika untersucht.

26 CF-Patienten und 33 gesunde Probanden nahmen an dieser Studie teil. Bei allen Teilnehmern wurde eine zahnärztliche Untersuchung durchgeführt, also die Erfassung des dentalen und parodontalen Status sowie die Erhebung der Mundhygieneindizes. Im Anschluss wurden, spontan und ohne vorherige desinfizierende Maßnahmen der

Mundhöhle, bei jedem Teilnehmer mikrobiologische Proben aus den Zahntaschen entnommen. Somit konnte die mikrobielle Kolonisation der parodontalen Sulci von CF-Patienten mit derjenigen gesunder Teilnehmer verglichen werden. 24 CF-Patienten expektorierten zusätzlich Sputum. Somit war ein Vergleich der in Zahntaschen und Sputum vorkommenden Spezies möglich. Mittels mikrobiologischer Kultivierungsmethoden wurden die Proben jeweils aerob und anaerob inkubiert, die Bakterien auf ausgewählten Nährmedien angezüchtet und selektiert und schließlich erfolgte deren biochemische Identifizierung.

Alle Studienteilnehmer wiesen eine Vielzahl fakultativ anaerober Bakterienspezies in den Zahntaschen auf. *Streptococcus spp.* bildeten dabei erwartungsgemäß die dominierende Bakteriengruppe. *S. aureus* konnte sowohl bei CF-Patienten als auch bei Gesunden nachgewiesen werden, *P. aeruginosa* dagegen nur in den Zahntaschen von drei CF-Patienten. 58 von 59 Studienteilnehmern wiesen obligate Anaerobier in den Zahntaschen auf, wobei kein Zusammenhang zur Mundgesundheit bestand. Es handelte sich dabei um obligate Anaerobier, welche in der Literatur auch für die CF-Lunge bereits beschrieben wurden. Der Vergleich der häufigsten fakultativ und obligat anaeroben Bakteriengenera zeigte, dass kein signifikanter Unterschied der bakteriellen Besiedlung der Zahntaschen zwischen CF-Patienten und Gesunden bestand.

Im Sputum konnte, neben fakultativen Anaerobiern, auch eine Vielzahl obligater Anaerobier isoliert werden. Mit wenigen Ausnahmen konnten alle im Sputum identifizierten Bakterienspezies auch aus den Zahntaschen der CF-Patienten isoliert werden. Hinsichtlich Art und Häufigkeit vorkommender Bakteriengenera bestand, abgesehen von *Burkholderia spp.*, kein signifikanter Unterschied der bakteriellen Besiedlung von Sputum und Zahntaschen der CF-Patienten. Bei 21 der 24 Patienten (87,5%), welche fakultative Anaerobier im Sputum aufwiesen, konnten zeitgleich identische Spezies in den Zahntaschen isoliert werden. Derartige Paare konnten auch bei 17 von 19 Patienten mit obligaten Anaerobiern im Sputum nachgewiesen werden (89,5%). Diese Ergebnisse sprechen für einen Zusammenhang der beiden Kompartimente.

Die Resistenztestungen wurden mit Hilfe von MIC-Teststreifen für sieben verschiedene Antibiotika durchgeführt: Azithromycin und Colistin, als Medikamente der Standard- und Erhaltungstherapie der CF, Meropenem, Piperacillin/Tazobactam und Ceftazidim, als Antibiotika in der akuten Exazerbation der CF-Erkrankung sowie Metronidazol und Clindamycin, welche zwar nicht in der CF-Therapie eingesetzt werden, aber in anderen Fachgebieten als gegen Anaerobier wirksame Antibiotika.

Sowohl in den Zahntaschen der CF-Patienten, als auch in denjenigen der gesunden Teilnehmer, lagen hohe Anzahlen resistenter obligat anaerober Bakterien vor, wobei eine signifikant höhere Anzahl der Bakterien aus den parodontalen Sulci der CF-Patienten als resistent gegenüber Clindamycin ($p=0,02$), Metronidazol ($p=0,01$), Meropenem ($p=0,001$), Ceftazidim ($p=0,001$) und vor allem gegenüber Azithromycin ($p<0,0001$) eingestuft werden konnte. Dieses Ergebnis bestätigte die Ausgangshypothese, die starke Antibiose der CF-Patienten führe, im Vergleich zu gesunden Personen, zu einer erhöhten Rate resistenter Bakterienstämme.

Vor dem Hintergrund, der parodontale Sulkus könne eine mögliche Kontaminationsquelle der chronischen Lungeninfektion darstellen, wurden explizit die Resistenzprofile der gleichzeitig in Sputum und Zahntaschen vorkommenden Keime verglichen. Die Resistenzmuster waren bei 10 von 21 (47,6%) der fakultativ anaeroben Bakterienpaare und bei 9 von 17 (52,9%) der obligat anaeroben Bakterienpaare anhand der abgelesenen minimalen Hemmkonzentration in $\mu\text{g/ml}$ identisch.

Der zeitgleiche Nachweis identischer Bakterienspezies in den parodontalen Sulci und Sputumproben von über 70% der Patienten mit CF spricht für eine mögliche Interaktion dieser beiden Kompartimente. Der Weg der Kontamination konnte in dieser Studie allerdings nicht aufgezeigt werden. Eine Kontamination der Lunge mit Bakterien aus der Mundhöhle, beispielsweise über Aspiration, ist sehr wahrscheinlich. Dafür spricht auch, dass die Resistenzmuster der nachgewiesenen Bakterienpaare in über 50% übereinstimmten, und auch, dass bei Gesunden die gleichen Bakterienspezies in den Zahntaschen identifiziert wurden. Aber auch umgekehrt ist ein Kontaminationsweg möglich und kann nicht ausgeschlossen werden. In jedem Falle aber stellt der parodontale Sulkus ein mögliches Reservoir für die typischen fakultativ und obligat anaeroben Bakterien dar, welche auch in der Lunge von CF-Patienten in hohen Anzahlen gefunden werden, und welche für die Entstehung von Lungeninfektionen verantwortlich gemacht werden.

Eine gezielte Antibiose gegen die CF-typischen, fakultativ anaeroben pathogenen Mikroorganismen führt im klinischen Alltag zu einer deutlichen Verbesserung der Lebensqualität der Patienten. Aber auch eine antibiotische Therapie gegen die obligaten Anaerobier, könnte, im Falle einer erfolglosen Behandlung der akuten Exazerbation, eine mögliche Therapieoption darstellen.

7 Literaturverzeichnis

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

Aanæs K (2013) Bacterial sinusitis can be a focus for initial lung colonisation and chronic lung infection in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 12:1-20.

Aas J A, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE (2005) Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 43:5721-5732.

Anwar H, Strap JL, Costerton JW (1992) Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* 36:1347-1351.

Bittar F, Rolain JM (2010) Detection and accurate identification of new or emerging bacteria in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Infect* 16:809-820.

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

Brandis H, Köhler W, Eggert HJ, Pulverer G: *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*. 7. Aufl. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York, 1994, S.83-85.

Brook I, Lewis MAO, Sándor GKB, Jeffcoat M, Samaranayake LP, Rojas JV (2005) Clindamycin in dentistry: More than just effective prophylaxis for endocarditis? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 100: 550-558.

Costerton JW (2002) Anaerobic biofilm infections in cystic fibrosis. *J Bacteriol* 184:699.

Davis J (2002) *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. *Pediatr Respir Rev* 3:128-134.

DeRiso AJ 2nd, Ladowski JS, Dillon TA, Justice JW, Peterson AC (1996) Chlorhexidine gluconate 0.12% oral rinse reduces the incidence of total nosocomial respiratory infection and nonprophylactic systemic antibiotic use in patients undergoing heart surgery. *Chest* 109:1556-1561.

Digoy GP, Dunn JD, Stoner JA, Christie A, Jones DT (2012) Bacteriology of the paranasal sinuses in pediatric cystic fibrosis patients. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 76:934-938.

Döring G, Conway SP, Heijerman HGM, Hodson ME, Høiby N, Smyth A, Touw DJ for the Consensus Committee (2000) Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J* 16:749-767.

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

Döring G, Gulbins E (2009) Cystic fibrosis and innate immunity: how chloride channel mutations provoke lung disease. *Cell Microbiol* 11:208-216.

Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15:167-93.

Drenkard E (2003) Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect* 5:1213-1219.

Field TR, White A, Elborn JS, Tunney MM (2005) Effect of oxygen limitation on the in vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* grown planktonically and in biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24:677-687.

Fourrier F, Dubois D, Pronnier P, Herbecq P, Leroy O, Desmettre T, Pottier-Cau E, Boutigny H, Di Pompéo C, Durocher A, Roussel-Delvallez M; PIRAD Study Group (2005) Effect of gingival and dental plaque antiseptic decontamination on nosocomial infections acquired in the intensive care unit: a double-blind placebo-controlled multicenter study. *Crit Care Med* 33:1728-1735.

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

Greene JC, Vermillon JR (1960) The oral hygiene index: A method for classifying oral hygiene status. *J Am Dent Assoc* 61:172-179.

Haffajee AD, Socransky SS (1994) Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 5:78-111.

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

Heo SM, Haase EM, Lesse AJ, Gill SR, Scannapieco FA (2008) Genetic relationship between respiratory pathogens isolated from dental plaque and bronchoalveolar lavage fluid from patients in the intensive care unit undergoing mechanical ventilation. Clin Infect Dis 47:1562-1570.

Hobbs CA, Da Tan C, Tarran R.(2013) Does epithelial sodium channel hyperactivity contribute to cystic fibrosis lung disease? J Physiol 591:4377-4387.

Hurd HS, Doores S, Hayes D, Mathew A, Maurer J, Silley P, Singer RS, Jones RN (2004) Public health consequences of macrolide use in food animals: a deterministic risk assessment. J Food Prot 67: 980-992.

Jensen PØ, Bjarnsholt T, Phipps R, Rasmussen TB, Calum H, Christofferesen L, Moser C, Williams P, Pressler T, Givskov M, Høiby N (2007) Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol 153:1329-1338.

Johansen HK, Aanæs K, Pressler T, Nielsen KG, Fisker J, Skov M, Høiby N, von Buchwald C (2012) Colonisation and infection of the paranasal sinuses in cystic fibrosis patients is accompanied by a reduced PMN response. J Cyst Fibros 11:525-531.

Jones AM (2011) Anaerobic bacteria in cystic fibrosis: pathogens or harmless commensals? Thorax 66:558.

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

Klein H, Palmer C (1938) Studies on dental caries (I. Dental status and dental needs of elementary school children). Pub Health Rep 53:751-765.

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

Koeman M, van der Ven AJ, Hak E, Joore HC, Kaasjager K, de Smet AG, Ramsay G, Dormans TP, Aarts LP, de Bel EE, Hustinx WN, van der Tweel I, Hoepelman AM, Bonten MJ (2006) Oral decontamination with chlorhexidine reduces the incidence of ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 173:1348-1355.

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

Koneman EW, Allen SD, Janda Wm, Schreckenberger PC, Winn WC Jr: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th edition, Philadelphia – New York: Lippincott, 1997, pp. 709-711.

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

Mainz JG, Naehrlich L, Schien M, Käding M, Schiller I, Mayr S, Schneider G, Wiedemann B, Wiehlmann L, Cramer N, Pfister W, Kahl BC, Beck JF, Tümmler B (2009) Concordant genotype of upper and lower airways *P aeruginosa* and *S aureus* isolates in cystic fibrosis. *Thorax* 64:535-540.

Martin C, Frija J, Burgel PR (2013) Dysfunctional lung anatomy and small airways degeneration in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 8:7-13.

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

Moore WE, Moore LV (1994) The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 5:66-77.

Mühlebach MS, Miller MB, Moore C, Wedd JP, Drake AF, Leigh MW (2006) Are lower airway or throat cultures predictive of sinus bacteriology in cystic fibrosis? *Pediatr Pulmonol* 41:445-451.

Muramatu LH, Stirbulov R, Forte WC (2013) Pulmonary function parameters and use of bronchodilators in patients with cystic fibrosis. *J Bras Pneumol* 39:48-55.

Olekhnovich IN, Vitko S, Valliere M, Hoffman PS (2013) Response to Metronidazole and Oxidative Stress is Mediated Through Homeostatic Regulator HsrA (HP1043) in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* in press.

Ratjen F (2001) Review: Changes in strategies for optimal antibacterial therapy in cystic fibrosis. *Int J Antimicrob Agents* 17:93-96.

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

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

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

Rogers GB, Carroll MP, Serisier DJ, Hockey PM, Jones G, Kehagia V, Connett GJ, Bruce D (2006) use of 16S rRNA gene profiling by terminal restriction fragment length polymorphism analysis to compare bacterial communities in sputum and mouthwash samples from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 44:2601-2604.

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

Saxer UP, Mühlemann HP (1975) Motivation and education. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd* 85:905-919.

Schmid G, Narcisi E, Mosure D, Secor WE, Higgins J, Moreno H (2001) Prevalence of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* in a gynecology clinic. *J Reprod Med* 46:545-549.

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. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:15070-15075.

Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ (1996) Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 85:229-236.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25:134-144.

Socransky SS, Haffajee AD, Teles R, Wennstrom JL, Lindhe J, Bogren A, Hasturk H, van Dyke T, Wang X, Goodson JM (2013) Effect of periodontal therapy on the subgingival microbiota over a 2-year monitoring period. I. Overall effect and kinetics of change. *J Clin Periodontol* 40:771-780.

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

Tunney MM, Field TR, Moriarty TF, Patrick S, Doering G, Mühlebach 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.

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

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 E, Döring G (2010) Alveolar inflammation in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 9:217-227.

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

Wendt C, Baum H, Kaase M, Meyer E, Suger-Wiedeck H, Ruscher C (2012) Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen – Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (RKI), Bundesgesundheitsbl 55:1311-1354.

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. J Clin Invest 109:317-325.

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

Zemanick ET, Wagner BD, Sagel SD, Stevens MJ, Accurso FJ, Harris JK (2010) Reliability of quantitative real-time PCR for bacterial detection in cystic fibrosis airway specimens. PLoS One 5:1-25.

Zemanick ET, Harris JK, Wagner BD, Robertson CE, Sagel SD, Stevens MJ, Accurso FJ, Laguna TA (2013) Inflammation and airway microbiota during cystic fibrosis pulmonary exacerbations. PLoS One 8:1-13.

8 Anhang

Votum der Ethikkommission 2009



MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT
HALLE - WITTENBERG

Medizinische Fakultät
Ethik-Kommission

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

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

Ihre Zeichen

Ihr Schreiben vom

Unsere Zeichen

Datum

hm-bu

03.09.2009

Postanschrift:
06097 Halle (Saale)

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

Hausanschrift:
Magdeburger Straße 8
06112 Halle (Saale)

Sehr geehrter Herr Dr. Worlitzsch,

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

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

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

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

IBAN:
DE3781000000080001530
BIC:
MARKDEF1810

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

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

Mit freundlichen Grüßen


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

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

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

Nachweis fakultativer und obligater Anaerobier**Tabelle 1A:** Anzahl fakultativer Anaerobier im parodontalen Sulkus von CF-Patienten (n= 104 Zahntaschen) und Kontrollprobanden (n=132 Zahntaschen) (in %)

Genus	Spezies	CF-Patienten	Kontrollgruppe
<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>	46 (44,2)	50 (37,9)
	<i>salivarius</i>	42 (40,4)	62 (47)
	<i>parasanguis</i>	33 (31,7)	58 (43,9)
	<i>gordonii</i>	22 (21,2)	7 (5,3)
	<i>vestibularis</i>	19 (18,3)	3 (2,3)
	<i>uberis</i>	18 (17,3)	36 (27,3)
	<i>cricetus</i>	18 (17,3)	22 (16,6)
	<i>oralis</i>	16 (1,5)	26 (19,7)
	<i>crista</i>	12 (11,5)	6 (4,5)
	<i>anginosus</i>	8 (7,7)	22 (16,6)
	<i>intermedius</i>	9 (8,6)	23 (17,4)
	<i>mutans</i>	8 (7,7)	2 (1,5)
	<i>sanguis</i>	4 (3,8)	6 (4,5)
	<i>constellatus</i>	3 (2,9)	7 (5,3)
		<i>bovis</i>	
<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	19 (18,3)	28 (21,2)
	<i>aureus</i>	14 (13,5)	11 (8,3)
	<i>haemolyticus</i>	3 (2,9)	
	<i>lentus</i>	2 (1,9)	3 (2,3)
	<i>simulans</i>	2 (1,9)	
	<i>saprophyticus</i>	1 (0,9)	1 (0,8)
<i>Stomatococcus</i>	<i>mucilaginosus</i>	26 (25)	47 (35,6)
<i>Micrococcus</i>	<i>sedentarius</i>	8 (7,7)	8 (6,1)
	<i>luteus</i>	2 (2,9)	
	<i>kristinae</i>	1 (0,9)	2 (1,5)
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	10 (9,6)	2 (1,5)
	<i>cloacae</i>	2 (1,9)	
	<i>hirae</i>	2 (1,9)	
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	5 (4,8)	
<i>Bacillus</i>	<i>brevis</i>	1 (0,9)	
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	1 (0,9)	
	<i>sphaericus</i>	1 (0,9)	
<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	1 (0,9)	1 (0,8)

Genus	Spezies	CF-Patienten	Kontrollgruppe
<i>Arcanobacterium</i>	<i>haemolyticum</i>	1 (0,9)	
<i>Actinomyces</i>	<i>pyogenes</i>	1 (0,9)	
<i>Miscellaneous Gram negativ bacille</i>		1 (0,9)	
<i>Pediococcus</i>		1 (0,9)	
<i>Gemella</i>	<i>haemolysans</i>		5 (3,8)
Gesamtanzahl		366	446

Tabelle 2A: Anzahl obligater Anaerobier im parodontalen Sulkus von CF-Patienten (n= 104 Zahntaschen) und Kontrollprobanden (n=132 Zahntaschen) (in %)

Genus	Spezies	CF-Patienten	Kontrollgruppe
<i>Staphylococcus</i>	<i>saccharolyticus</i>	85 (81,7)	113 (85,6)
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>prevotii</i>	11 (10,5)	22 (16,7)
	<i>anaerobius</i>	6 (5,8)	6 (4,5)
	<i>assacharolyticus</i>	4 (3,8)	
	<i>micros</i>	1 (0,9)	4 (3)
<i>Veillonella</i>		14 (13,5)	28 (21,2)
<i>Clostridium</i>	<i>limosum</i>	4 (3,8)	2 (1,5)
	<i>butyricum</i>	4 (3,8)	
	<i>hastiforme</i>	3 (2,9)	3 (2,3)
	<i>difficile</i>	2 (1,9)	10 (7,6)
	<i>bifermentans</i>		2 (1,5)
	<i>novyi A</i>		1 (0,8)
<i>Eubacterium</i>	<i>limosum</i>	10 (7,6)	3 (2,3)
<i>Wolinella</i>		7 (6,7)	11 (8,3)
<i>Fusobacterium</i>	<i>necrophorum</i>	6 (5,8)	14 (10,6)
	<i>mortiferum</i>		2 (1,5)
<i>Prevotella spp.</i>	<i>corporis</i>	1 (0,9)	7 (5,3)
	<i>loescheii</i>	1 (0,9)	
	<i>stercoris</i>		2 (1,5)
<i>Streptococcus</i>	<i>constellatus</i>	2 (1,9)	
	<i>granulosum</i>		2 (1,5)
<i>Capnocytophaga</i>		2 (1,9)	
<i>Gemella</i>	<i>morbilorum</i>	2 (1,9)	3 (2,3)
<i>Bacteroides</i>	<i>stercoris</i>	2 (1,9)	1 (0,8)
	<i>tectum</i>		1 (0,8)
<i>Bifidobacterium</i>		1 (0,9)	

Genus	Spezies	CF-Patienten	Kontrollgruppe
<i>Propionibacterium.</i>	<i>acnes</i>	1 (0,9)	
<i>Mobiluncus</i>	<i>curtisii</i>		8 (6,1)
<i>Campylobacter</i>	<i>gracilis</i>		2 (1,5)
Gesamtanzahl		169	247

Quantifizierung der Sputumproben

Tabelle 3A: Quantifizierung fakultativer und obligater Anaerobier im Sputum von CF-Patienten

Sputumprobe	Gewicht [g]	fakultative Anaerobier [KBE/ml]	obligate Anaerobier [KBE/ml]
CF 01	1,49	70,0 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁶
CF 02	0,77	21,3 x 10 ⁶	28,2 x 10 ⁶
CF 03	0,86	32,3 x 10 ⁶	5,4 x 10 ⁶
CF 04	0,58	32,3 x 10 ⁶	19,8 x 10 ⁶
CF 05	1,37	230,9 x 10 ⁶	15,0 x 10 ⁶
CF 06	1,59	224,2 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁶
CF 07	0,15	3,5 x 10 ⁶	3,8 x 10 ⁶
CF 08	1,17	219,2 x 10 ⁶	24,3 x 10 ⁶
CF 10	0,54	17,2 x 10 ⁶	18,5 x 10 ⁶
CF 12	0,99	124,2 x 10 ⁶	9,3 x 10 ⁶
CF 13	1,68	221,8 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁶
CF 14	0,3	21,3 x 10 ⁶	29,5 x 10 ⁶
CF 15	1,38	37,3 x 10 ⁶	8,8 x 10 ⁶
CF 16	0,48	36,4 x 10 ⁶	2,8 x 10 ⁶
CF 17	1,15	104,6 x 10 ⁶	34,9 x 10 ⁶
CF 18	1,45	84,2 x 10 ⁶	9,8 x 10 ⁶
CF 19	0,8	130,0 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁶
CF 20	1,06	62,0 x 10 ⁶	12,7 x 10 ⁶
CF 21	0,32	43,0 x 10 ⁶	5,4 x 10 ⁶
CF 22	0,2	10,0 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁶
CF 23	1,96	20,8 x 10 ⁶	13,1 x 10 ⁶
CF 24	0,77	87,0 x 10 ⁶	4,6 x 10 ⁶
CF 25	0,83	155,5 x 10 ⁶	20,0 x 10 ⁶
CF 26	1,32	76,3 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶

Resistenzuntersuchungen

Tabelle 4A: Anzahl und Häufigkeiten (%) resistenter obligater Anaerobier aus dem Sputum von CF-Patienten (n=26) sowie dem parodontalen Sulkus von CF-Patienten (n=160) und Kontrollprobanden (n=202)

Antibiotikum	CF-Sputum		CF-Zahntaschen		Kontroll-Zahntaschen	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
Azithromycin	16	61,5	87	54,4	44	21,8
Colistin	9	34,6	41	25,6	66	32,7
Meropenem	5	19,2	28	17,5	12	5,9
Piperacilin/Tazobactam	11	42,3	74	46,2	87	43,1
Ceftazidim	15	57,7	108	67,5	97	48
Metronidazol	11	42,3	46	28,8	35	17,3
Clindamycin	2	7,7	15	9,4	7	3,5

Tabelle 5A: Resistente obligate Anaerobier im Sputum von CF-Patienten in %

Keimart	n	AZM	CS	MRP	TZP	CAZ	LZ	CD
<i>S. saccharolyticus</i>	16	56,25	6,25	18,75	68,75	75	18,75	6,25
<i>Ps. prevotii</i>	4	100	100	0	0	0	100	25
<i>Veillonella spp.</i>	1	100	0	0	0	0	0	0
<i>Wolinella sp.</i>	1	100	100	100	0	100	100	0
<i>C. difficile</i>	1	0	100	100	0	100	100	0
<i>C. butyricum</i>	1	100	0	0	0	0	0	0
<i>Pro. acnes</i>	1	0	100	0	0	0	100	0
<i>C. clostridioforme</i>	1	0	100	0	0	0	100	0
Gesamt	26	61,5	34,6	19,2	42,3	57,7	42,3	7,7

Tabelle 6A: Resistente obligate Anaerobier in den Zahntaschen von CF-Patienten in %

Keimart	n	AZM	CS	MRP	TZP	CAZ	LZ	CD
<i>S. saccharolyticus</i>	85	61,2	0	11,8	70,6	84,7	9,4	0
<i>Veillonella spp.</i>	13	69,2	7,7	30,8	61,5	92,3	30,8	15,4
<i>Ps. prevotii</i>	9	44,4	88,9	22,2	0	0	100	22,2
<i>E. limosum</i>	7	42,9	57,1	14,3	14,3	57,1	42,9	28,6
<i>F. necrophorum</i>	6	0	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7
<i>Wolinella sp.</i>	5	80	80	20	20	60	20	20
<i>Ps. anaerobius</i>	5	40	100	0	0	60	100	0
<i>Ps. assacharolyticus</i>	4	25	0	100	0	100	0	0
<i>C. limosum</i>	4	25	25	0	50	25	25	0

Keimart	n	AZM	CS	MRP	TZP	CAZ	LZ	CD
<i>C. butyricum</i>	4	25	75	25	25	75	75	0
<i>C. hastiforme</i>	3	100	100	0	0	0	100	66,7
<i>C. difficile</i>	2	50	100	0	0	0	50	50
<i>Str. constellatus</i>	2	50	100	50	0	50	100	0
<i>Capnocytophaga sp.</i>	2	50	50	100	0	100	0	50
<i>G. morbilorum</i>	2	0	100	0	0	0	100	0
<i>Ba. stercoris</i>	2	100	0	0	0	0	0	100
<i>Pro. acnes</i>	1	0	100	0	0	0	100	0
<i>Ps. micros</i>	1	100	100	0	0	100	0	100
<i>Pr. loescheii</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pr. corporis</i>	1	100	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium sp.</i>	1	0	100	0	0	100	100	0
Gesamt	160	54,4	25,6	16,9	46,25	67,5	28,75	9,4

Tabelle 7A: Resistente obligate Anaerobier in den Zahntaschen der Kontrollgruppe in %

Keim	n	AZM	CS	MRP	TZP	CAZ	LZ	CD
<i>S. saccharolyticus</i>	109	20,2	4,45	3,7	66	67,9	3,7	3,7
<i>Veillonella spp.</i>	20	70	0	5	55	55	15	5
<i>Ps. prevotii</i>	14	7,1	100	0	0	0	85,7	0
<i>F. necrophorum</i>	11	0	18,2	0	0	0	9,1	0
<i>Wolinella sp.</i>	8	12,5	62,5	0	37,5	37,5	12,5	0
<i>M. curtisii</i>	8	0	100	12,5	0	0	25	0
<i>C. difficile</i>	7	14,3	100	42,9	0	42,85	71,4	0
<i>Pr. corporis</i>	4	25	50	0	0	25	25	0
<i>Ps. micros</i>	4	25	100	0	0	0	0	0
<i>Ps. anaerobius</i>	3	75	100	75	0	75	75	0
<i>C. hastiforme</i>	3	33,3	100	0	0	0	66,7	75
<i>G. morbilorum</i>	3	0	100	33,3	0	33,3	0	0
<i>E. limosum</i>	1	0	0	100	0	100	0	0
<i>C. bifermentans</i>	2	0	100	0	0	0	100	0
<i>Ca. gracilis</i>	1	0	0	0	100	100	0	0
<i>Pr. stercoris</i>	1	0	100	0	0	0	0	100
<i>C. limosum</i>	1	0	100	0	0	100	0	0
<i>Ba. stercoris</i>	1	100	100	0	0	0	100	0
<i>Ba. tectum</i>	1	0	100	0	0	0	0	0
Gesamt	202	21,8	32,7	5,9	43,1	48	17,3	3,4

Tabelle 8A: Resistente fakultative Anaerobier in den Zahntaschen der CF-Patienten in %

Keimart	n	AZM	CS	MRP	TZP	CAZ	LZ	CD
<i>Str. salivarius</i>	28	71,4	96,4	28,6	0	7,1	100	14,3
<i>Str. pneumoniae</i>	22	81,8	100	13,6	0	13,6	100	27,3
<i>Str. parasanguis</i>	16	81,25	93,75	12,5	0	12,5	100	31,25
<i>S. aureus</i>	11	90,9	100	9,1	27,3	27,3	100	36,4
<i>Str. uberis</i>	4	0	100	100	0	100	100	0
<i>Str. cricetus</i>	3	0	100	100	0	100	100	0
<i>P. aeruginosa</i>	2	100	0	50	50	50	100	100
<i>Str. gordonii</i>	2	100	100	0	0	0	100	0
Gesamt	88	73,9	95,45	25	4,5	20,45	100	23,9

Tabelle 9A: Resistente fakultative Anaerobier im Sputum der CF-Patienten in %

Keimart	n	AZM	CS	MRP	TZP	CAZ	LZ	CD
<i>Str. salivarius</i>	11	54,5	100	36,4	0	27,3	100	27,3
<i>Str. pneumoniae</i>	11	63,6	100	9,1	0	0	100	36,4
<i>Str. parasanguis</i>	5	60	100	0	0	0	100	0
<i>S. aureus</i>	4	100	100	25	25	50	100	25
<i>P. aeruginosa</i>	2	100	0	50	0	0	100	100
<i>Str. gordonii</i>	2	50	100	0	0	0	100	0
<i>Str. uberis</i>	1	0	100	100	0	100	100	0
<i>Str. cricetus</i>	1	0	100	100	0	100	100	0
Gesamt	37	62,2	94,6	24,3	2,7	18,9	100	32,4

Signifikanzberechnungen

Tabelle 10A: Häufigkeiten (%) fakultativ anaerober Genera in Zahntaschen von CF-Patienten (n=26) und Kontrollprobanden (n=33)

Genus	CF-Patienten		Kontrollgruppe		p-Wert
	Anzahl	%	Anzahl	%	
<i>Streptococcus spp.</i>	25	96,2	33	100	0,441
<i>Staphylococcus spp.</i>	16	61,5	18	54,5	0,608
<i>Stomatococcus spp.</i>	14	53,8	20	60,6	0,791
<i>Micrococcus spp.</i>	7	26,9	6	18,2	0,531
<i>Enterococcus spp.</i>	5	19,2	1	3	0,078

Tabelle 11A: Häufigkeiten (%) obligat anaerober Genera in Zahntaschen von CF-Patienten (n=26) und Kontrollprobanden (n=33)

Genus	CF-Patienten		Kontrollgruppe		p-Wert
	Anzahl	%	Anzahl	%	
<i>Staphylococcus spp.</i>	23	88,5	33	100	0,079
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	12	46,2	20	60,6	0,303
<i>Veillonella spp.</i>	8	30,8	15	45,5	0,292
<i>Clostridium spp.</i>	7	26,9	14	42,4	0,278
<i>Eubacterium spp.</i>	5	19,2	3	9,1	0,284
<i>Fusobacterium spp.</i>	5	19,2	10	30,3	0,381
<i>Wolinella spp.</i>	5	19,2	6	18,2	1

Tabelle 12A: Häufigkeiten (%) fakultativ anaerober Genera in Zahntaschen von CF-Patienten (n=26) und Sputumproben von CF-Patienten (n=24)

Genus	CF-Patienten		CF-Sputum		p-Wert
	Anzahl	%	Anzahl	%	
<i>Streptococcus spp.</i>	25	96,2	21	87,5	0,339
<i>Staphylococcus spp.</i>	16	61,5	11	45,8	0,395
<i>Pseudomonas spp.</i>	14	53,8	14	58,3	0,783
<i>Burkholderia spp.</i>	0	0	7	29,2	0,003
<i>Micrococcus spp.</i>	7	26,9	3	12,5	0,294
<i>Enterococcus spp.</i>	5	19,2	3	12,5	0,704
<i>Stenotrophomonas spp.</i>	0	0	2	8,3	0,225

Tabelle 13A: Häufigkeiten (%) obligat anaerober Genera in Zahntaschen von CF-Patienten (n=26) und Sputumproben von CF-Patienten (n=24)

Genus	CF-Patienten		CF-Sputum		p-Wert
	Anzahl	%	Anzahl	%	
<i>Staphylococcus spp.</i>	23	88,5	17	70,83	0,164
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	12	46,2	6	25	0,149
<i>Clostridium spp.</i>	7	26,9	5	20,83	0,745
<i>Veillonella spp.</i>	8	30,8	2	8,3	0,077
<i>Wolinella spp.</i>	5	19,2	1	4,2	0,192
<i>Fusobacterium spp.</i>	5	19,2	1	4,2	0,192
<i>Propionibacterium spp.</i>	1	3,8	1	4,2	1

Tabelle 14A: Häufigkeiten (%) resistenter obligater Anaerobier in Sputumproben (n=26) und Zahntaschen (n=160) von CF-Patienten

Antibiotikum	CF-Sputum		CF-Zahntaschen		p-Wert
	Anzahl	%	Anzahl	%	
Azithromycin	16	61,5	87	54,4	0,531
Colistin	9	34,6	41	25,6	0,346
Meropenem	5	19,2	28	17,5	0,786
Piperacilin/Tazobactam	11	42,3	74	46,2	0,833
Ceftazidim	15	57,7	108	67,5	0,374
Metronidazol	11	42,3	46	28,8	0,168
Clindamycin	2	7,7	15	9,4	1

Tabelle 15A: Häufigkeiten (%) resistenter obligater Anaerobier in Zahntaschen von CF-Patienten (n=160) und Kontrollprobanden (n=202)

Antibiotikum	CF-Zahntaschen		Kontroll-Zahntaschen		p-Wert
	Anzahl	%	Anzahl	%	
Azithromycin	87	54,4	44	21,8	2,05x10⁻¹⁰
Colistin	41	25,6	66	32,7	0,164
Meropenem	28	17,5	12	5,9	0,001
Piperacilin/Tazobactam	74	46,2	87	43,1	0,595
Ceftazidim	108	67,5	97	48	0,001
Metronidazol	46	28,8	35	17,3	0,016
Clindamycin	15	9,4	7	3,5	0,026

9 Thesen

- (1) Die Cystische Fibrose (CF) ist die häufigste autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung der westlichen Industrieländer, in deren Folge die Patienten chronisch-bakterielle Lungeninfektionen entwickeln, welche den Grund für den vorzeitigen Tod der Patienten darstellen.
- (2) Eine Vielzahl möglicher Kontaminationsquellen der CF-Lunge mit fakultativen Anaerobiern wurde bereits beschrieben. Bislang ist allerdings unklar, wie es zu einer Kontamination mit obligaten Anaerobiern kommt.
- (3) In dieser Studie wurde die bakterielle Zusammensetzung in Zahntaschen von CF-Patienten und Gesunden untersucht und mit der bakteriellen Besiedlung von CF-Sputen verglichen. Zusätzlich wurde der Einfluss der antibiotischen Therapie auf die Resistenzsituation der identifizierten Bakterien überprüft.
- (4) Obligate Anaerobier konnten in den parodontalen Sulci beinahe aller Studienteilnehmer identifiziert werden, auch bei Kindern. Dabei konnte kein Zusammenhang zwischen dem Nachweis obligater Anaerobier und der Zahngesundheit aufgezeigt werden.
- (5) Es bestand kein Unterschied der mikrobiellen Zusammensetzung des parodontalen Sulkus von CF-Patienten und Gesunden. Art und Häufigkeit fakultativer und obligater Anaerobier waren vergleichbar.
- (6) In den Sputen fast aller CF-Patienten lagen obligate Anaerobier in hohen Keimzahlen vor.
- (7) Bei über 70% der CF-Patienten konnten zeitgleich identische fakultativ bzw. obligat anaerobe Bakterienspezies aus Sputum und Zahntaschen isoliert werden.
- (8) Diese „Paare“ wiesen häufig identische Resistenzprofile auf, was gemeinsam mit dem zeitgleichen Nachweis identischer Spezies in Zahntaschen und Sputum von CF-Patienten für eine Interaktion dieser beiden Kompartimente spricht.

-
- (9) Die antibiotische Erhaltungstherapie, wie auch die Therapie von akuten Exazerbationen bei CF-Patienten führt zu einem signifikanten Anstieg resistenter Bakterien.
- (10) Eine eventuelle gezielte Therapie gegen obligate Anaerobier könnte, im Falle des Versagens einer „herkömmlichen“ antibiotischen Behandlung gegen fakultative Anaerobier, eine weitere Therapieoption darstellen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Zuname: Annegret Huse
Geburtsdatum, -ort: 11.01.1984, Leipzig
Anschrift: Hauptstraße 93, 04416 Markkleeberg
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung

Besuchte Schulen: 09/ 1990 - 07/ 1994 Lessing-Grundschule, Leipzig
09/ 1994 - 07/ 1998 König-Albert-Gymnasium, Leipzig
09/ 1998 - 06/ 2002 Rudolf-Hildebrand-Schule,
Markkleeberg
Schulabschluss: 06/ 2002 Abitur

Freiwillig Soziales Jahr

09/ 2002 - 08/ 2003 St. Elisabeth Krankenhaus, Leipzig

Weiterbildung

03/ 2004 - 06/ 2004 Ausbildung zum Rettungssanitäter,
DRK Bildungswerk Thüringen, Bodenstein

Hochschulstudium:

10/ 2006 - 12/ 2011 Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg
Studium der Zahnmedizin
Abschluss: 12/ 2011 Zahnärztliche Prüfung, Staatsexamen

Berufsausübung

01/ 2012 - 12/ 2013 Zahnarztpraxis Melanie Donix, Markranstädt,
Vorbereitungsassistenz
seit 01/ 2014 Zahnarztpraxis Melanie Donix, Markranstädt,
Angestellte Zahnärztin

Annegret Huse

Markkleeberg, den 04.01.2014

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, Annegret Huse, geboren am 11.01.1984, bisher an keiner in- und/oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um eine Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt zu haben.

Markkleeberg, den 04.01.2014

Annegret Huse

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Annegret Huse, geboren am 11.01. 1984, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige, fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe mich dabei keiner anderen, als der von mir angegebenen Quellen und Hilfen bedient.

Markkleeberg, den 04.01.2014

Annegret Huse

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

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

Allen Kontrollprobanden, welche diese Studie interessiert unterstützt haben.

Frau Prof. Dr. Marianne Borneff-Lipp, Direktorin des Institutes für Hygiene der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die Möglichkeit diese Arbeit unter Ihrer Leitung durchzuführen, die sehr gute Betreuung sowie die kritischen Ratschläge, welche für meine Arbeit eine große Unterstützung darstellten.

Herrn PD Dr. Dieter Worlitzsch, Oberarzt des Institutes für Hygiene, für die jederzeit hervorragende Zusammenarbeit, das uneingeschränkte Engagement, die kompetente Diskussions- und Hilfsbereitschaft unter stetig konstruktiver und freundschaftlicher Arbeitsatmosphäre, welche wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. Tobias Bense für die freundliche Einarbeitung in das Thema und die Techniken sowie die hilfreiche Unterstützung während der schwierigen Anlaufphase der Studie.

Frau Dr. Bettina Wollschläger, Oberärztin der CF-Ambulanz an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **sowie dem Pflegepersonal** der CF-Ambulanz, für die hilfreiche Unterstützung und freundliche Zusammenarbeit.

Frau PD Dr. Katrin Bekes, Oberärztin der Kinderzahnheilkunde an der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie (Sektion Präventive Zahnheilkunde und Kinderzahnheilkunde), für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Andreas Wienke, stellvertretender Direktor des Institutes für medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik, für die freundliche Beratung bei der statistischen Auswertung.

Frau Barbara Christgen, Frau Nadine Wörfel, Frau Koleczko, Frau Ina Feldmann, Frau Christiane Hinze sowie **Frau Susanne Friebe**, technische Mitarbeiterinnen des Institutes für Hygiene der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen sowie die Hilfsbereitschaft bei den alltäglichen labortechnischen Problemen.