

Aus dem Institut für Hygiene der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg

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

**Phänotypische Veränderungen und Qualifikation von  
*Pseudomonas aeruginosa* bei Ko-Inkubation mit obligaten  
Anaerobiern**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Betreuer: PD Dr. med. Dieter Worlitzsch

von Astrid Liemen

geboren am 04.06.1984 in Waltershausen

Gutachter:

PD Dieter Worlitzsch, Halle

Prof. Rainer Finke, Halle

PD Joachim Riethmüller, Tübingen

Eröffnungsdatum: 29.04.2014

Verteidigungsdatum: 02.12.2015

## Referat

In der Lunge von Patienten mit Cystischer Fibrose wurden neben fakultativ anaeroben Bakterienspezies wie *Pseudomonas aeruginosa* auch verschiedene obligat anaerobe Bakterien nachgewiesen. Es sind 54 CF-Patientensputen zur Untersuchung gekommen, die aerobe und anaerobe Bakterienspezies aufwiesen. Es konnten bei 67% der Patienten *P. aeruginosa* und bei 81% obligate Anaerobier nachgewiesen werden. Dabei traten bei wiederholten Testungen bei 5 von 13 Patienten identische Anaerobier wiederholt auf. Nach einem Exazerbationsereignis waren nach Antibiose weder die aeroben noch die anaeroben Erreger in der Bakterienzahl deutlich reduziert. Zudem wurde das Resistenzverhalten der obligaten Anaerobier auf die in der CF-Therapie üblichen Antibiotika untersucht. Es zeigten sich eine sehr gute Wirksamkeit von Meropenem (92% der Stämme sensibel) und Piperacillin/Tazobactam (85% sensibel) sowie eine hohe Resistenzrate auf Ceftazidim (69% resistent).

Vor dem Hintergrund der immer noch unklaren Bedeutung dieser obligaten Anaerobier in der Pathogenese der CF wurde zusätzlich *in vitro* die Wechselwirkung zwischen ausgewählten obligaten Anaerobiern und *P. aeruginosa* untersucht. Dabei zeigte sich kein Einfluss durch *P. aeruginosa* auf das Wachstum von *Veillonella spp.*, *Clostridium difficile* und *Streptococcus constellatus* bei Inkubation über 24 Stunden. Auf *P. aeruginosa* hatte keiner der 3 Stämme Einfluss auf die Wachstumszahlen, jedoch auf die phänotypische Koloniebildung. Während *Veillonella spp.* nur gering die Koloniebildung hemmte, ist für *C. difficile* und *Str. constellatus* ein Hemmeffekt in unmittelbarer Nähe der Kolonien sowie in der Umgebung der Kolonien auf *P. aeruginosa* nachgewiesen worden. Dieser Effekt zeigte sich für *C. difficile* und *Str. constellatus* irreversibel.

In der Konsequenz dieser Arbeit ergibt sich die Notwendigkeit, weitere Untersuchungen zu den Wechselwirkungen von *P. aeruginosa* und den obligaten Anaerobiern durchzuführen. Denn nur in genauer Kenntnis der hier dargestellten potenziellen hemmenden und fördernden Einflüsse einzelner Spezies auf *P. aeruginosa*, der als wichtigster Pathogenitätsfaktor der CF gilt, können nach Ermittlung von Erregerspektrum und Resistenzen beim einzelnen Patienten neue Ansatzpunkte einer gezielten antibiotischen Therapie geschaffen werden.

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Genetik der Cystischen Fibrose	1
1.2 Pathophysiologie des Chloridkanals	1
1.3 Bakterienspektrum bei Cystischer Fibrose	3
1.4 Pathogenität der obligaten Anaerobier	5
1.4.1 <i>Streptococcus constellatus</i>	7
1.4.2 <i>Clostridium difficile</i>	7
1.4.3 <i>Veillonella spezies</i>	8
1.4.4 <i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	8
1.4.5 <i>Peptostreptococcus prevotii</i>	9
1.5 Obligate Anaerobier bei Cystischer Fibrose	9
<b>2 Zielsetzung</b>	<b>11</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>12</b>
3.1 Patientenstichprobe	12
3.1.2 Gewinnung von Sputum	12
3.1.3 Quantifikation	13
3.1.4 Identifikation	14
3.1.5 Resistenzbestimmungen	19
3.1.6 Nachweis und Resistenzverhalten unter Exazerbationen	20
3.1.7 Stamm-Konservierung und -Archivierung	21
3.1.8 Patienteneinverständnis	21
3.2 Pathogenitätstestungen	21
3.2.1 Verwendete Isolate	21
3.2.2 Vorabtestungen	22
3.2.3 Gemeinsame Inkubation von <i>P. aeruginosa</i> und obligaten Anaerobiern	23
3.2.4 Optische Phänomene gegenseitiger Beeinflussung von <i>P. aeruginosa</i> und obligaten Anaerobiern	24
3.3 Statistik	25

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>26</b>
4.1	Bakterien-Nachweis in CF-Sputen	26
4.1.1	Persistenz der Bakterien in CF-Sputen	26
4.1.2	Reduktion der Bakterien nach Therapie von Exazerbationen	29
4.1.3	Resistenzen	31
4.2	In-vitro Versuchsreihen	32
4.2.1	Selektion der obligaten Anaerobier	32
4.2.2	Wachstum der obligaten Anaerobier	33
4.2.3	Hemmwirkung der obligaten Anaerobier auf das Wachstum von <i>P. aeruginosa</i>	34
4.2.4	Reversibilität der anaeroben Hemmwirkung auf <i>P. aeruginosa</i>	37
4.2.5	Wachstumszahlen von <i>P. aeruginosa</i> bei gemeinsamer Inkubation mit obligaten Anaerobiern	39
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>40</b>
5.1	Nachgewiesenes Bakterienspektrum in den Sputen von CF-Patienten	40
5.2	Einfluss antibiotischer Therapie auf die Bakterienzahlen	41
5.3	Reagibilität der obligaten Anaerobier auf ausgewählte Antibiotika	41
5.4	Pathogenitätstestungen	43
5.4.1	Einfluss von <i>P. aeruginosa</i> auf die Wachstumszahlen der obligaten Anaerobier	44
5.4.2	Phänotyp der Kolonien von <i>P. aeruginosa</i> und der obligaten Anaerobier	44
5.4.3	Einfluss der obligaten Anaerobier auf die Wachstumszahlen von <i>P. aeruginosa</i>	46
5.4.4	Einfluss auf das Koloniewachstum von <i>P. aeruginosa</i> durch die Nährmedien	46
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>58</b>
<b>9</b>	<b>Thesen</b>	<b>62</b>
	<b>Lebenslauf</b>	
	<b>Erklärung</b>	
	<b>Danksagung</b>	

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

A.	<i>Actinomyces</i>
Abb.	Abbildung
B.	<i>Burkholderia</i>
Bac.	<i>Bacteroides</i>
Bif. spp.	<i>Bifidobacterium</i> Spezies
C.	<i>Clostridium</i>
CDC	Agar mit 5% Schafblut zur anaeroben Bebrütung
CF	Cystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
Chr.	<i>Chryseobacterium</i>
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
D.	<i>Delftia</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.	<i>Enterococcus</i>
FEV <sub>1</sub>	Einsekundenkapazität
FVC	forcierte Vitalkapazität
G.	<i>Gemella</i>
GNI+	Vitek-Testkarte für gramnegative Keime
GPI-	Vitek-Testkarte für grampositive Keime
h	Stunden
K.	<i>Klebsiella</i>
KBE	Koloniebildende Einheiten (CFU)
<i>Lact. lact.</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>cremoris</i>
M.	<i>Mannheimia</i>
MHK	minimale Hemmkonzentration
ml	Milliliter
Mob.	<i>Mobiluncus</i>
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
OD	optische Dichte
P.	<i>Pseudomonas</i>
PAO-1	Laborstamm <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCL	periziliärer Film
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Ps.	<i>Peptostreptococcus</i>

<i>Ps. asacchr.</i>	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>
<i>Pr.</i>	<i>Prevotella</i>
<i>Pr. melan.</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>Prop.</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
p-Wert	Signifikanzwert (Student`s T-Test)
RapID-ANA II	biochemisches Identifikationssystem für obligate Anaerobier
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
s.	siehe
SCS	Schaedler Agar + 5% Schafblut
SCV	small colony variants
SD	Standardabweichung
<i>spp.</i>	<i>Spezies</i> (Plural)
<i>S. sacchr.</i>	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>
<i>St.</i>	<i>Stenotrophomonas</i>
<i>Stomat. muc.</i>	<i>Stomatococcus mucilaginosus</i>
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
Tab.	Tabelle
TSB	Tryptic Soja Broth
vgl.	vergleiche
°C	Grad Celsius
%	Prozent
±	plusminus
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

# 1 Einleitung

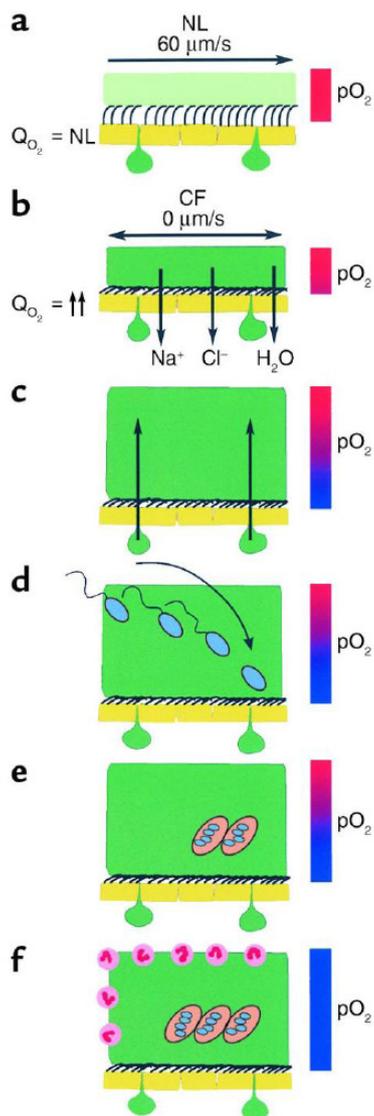
## 1.1 Genetik der Cystischen Fibrose

Die Cystische Fibrose (CF) ist eine genetisch bedingte Stoffwechselkrankheit. Mit einer Inzidenz von 1:2500 aller Lebendgeburten stellt sie die häufigste autosomal rezessiv vererbte Erkrankung der kaukasischen Bevölkerung dar [Ratjen und Döring 2003, Gibson 2003]. Ursache ist ein 1989 erstmals identifiziertes Gen auf dem langen Arm von Chromosom 7 mit dem Genprodukt des sogenannten Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR). Über 70 % der Mutationen sind auf eine Deletion dreier Basenpaare zurück zu führen. Diese hat den Verlust eines Phenylalanin-Restes auf Position 508 zur Folge. Damit wird der Chloridkanal CFTR nur unvollständig gebildet [Riordan et al. 1989, Kerem et al. 2005, Rommens et al. 1989]. Insgesamt konnten aber bisher über 1900 verschiedene Mutationen des CFTR-Gens nachgewiesen werden [The cystic fibrosis genetic analysis consortium 2013], welche in sechs Gruppen eingeteilt werden können [Vankeerberghen et al. 2002].

Die Mehrheit der Mutationen schließt nur drei oder weniger Nucleotide ein, die vorwiegend zum Austausch von Aminosäuren, Leserasterverschiebungen, Spleißstellen oder Nonsens-Mutationen führen [Gibson et al. 2003]. Es gibt keine strenge Korrelation zwischen Mutation und Ausprägung der Erkrankung [Vankeerberghen et al. 2002]. Die Bedeutung weiterer Einflussfaktoren auf den vielgestaltigen Phänotyp der Cystischen Fibrose, wie andere Gene und Umwelteinflüsse, bleibt zu untersuchen [Ratjen und Döring, 2003].

## 1.2 Pathophysiologie des Chloridkanals

Von der Erkrankung betroffen sein können viele Organe: Pankreas, hepatobiliäres System, Geschlechtsorgane, Lunge, Niere, Knochen, Dünndarm, Schweißdrüsen. Für die Patienten lebenslimitierend ist jedoch in über 90% der Fälle die pulmonale Beteiligung, die zu einer chronischen Infektion führt [Ratjen und Döring 2003, Gibson et al. 2003]. Pathophysiologisch liegt die Ursache in einem durch den Defekt des CFTR in seiner Funktion gestörten Chloridkanal. Die Abbildung 1 verdeutlicht diesen Zusammenhang.



a) In der gesunden Lunge liegt dem Epithel ein periziliärer Film (PCL, farblos) auf, dem eine dünne Mukusschicht (hellgrün) folgt. Die niedrig viskose PCL ermöglicht eine effiziente mukoziliäre Clearance (s. Pfeil). Durch den normalen  $O_2$ -Verbrauch ( $Q_{O_2}$ ) entsteht kein Sauerstoffgradient in dem dünnen Alveolarfilm (ASL, roter Balken rechts)

Epithel der CF- Lunge:

- b) Eine massive Abnahme des PCL (s. vertikale Pfeile) führt dazu, dass die Mukusschicht dem Epithel direkt anliegt. Es kommt zur Verringerung bis hin zur Einstellung des mukoziliären Transportes (zweiseitiger Pfeil). Der erhöhte  $O_2$ -Verbrauch (links) in Verbindung mit dem gesteigerten Ionentransport verursacht keine Gradienten in dünnen ASL-Filmen
- c) Die anhaltende Hypersekretion des Mucus (dargestellt als muköse sekretorische Drüse) vergrößert die Höhe der luminalen Mukusschicht bzw. der Pfropfen. Der erhöhte epitheliale  $O_2$ -Verbrauch erzeugt einen steilen hypoxischen Gradienten (blauer Anteil des Balkens) innerhalb der verdickten Mukusschicht.
- d) Die dem Mucus aufgelagerten *P. aeruginosa* dringen aktiv und/oder passiv (durch Verwirbelungen des Mucus) in die hypoxischen Bereiche der Mukusschicht vor.
- e) *P. aeruginosa* passt sich den hypoxischen Bereichen des Mucus durch die Produktion von Alginate und die Ausbildung von Makrokolonien an.
- f) Diese Makrokolonien widerstehen der Abwehr durch Neutrophile, was die chronische Infektion ermöglicht. Die erhöhte Dichte der Makrokolonien und in geringerem Ausmaß die Neutrophilen erhalten die jetzt mukopurulente Schicht hypoxisch.

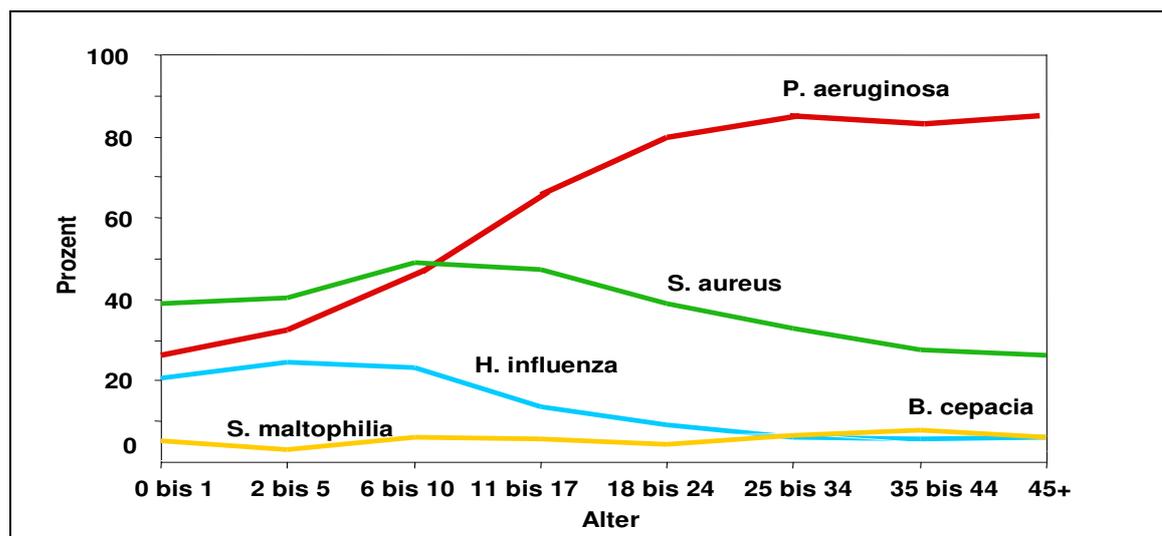
**Abb. 1:** Schema zur Hypothese der Pathogenese der chronischen Infektion mit *P. aeruginosa* bei Patienten mit CF [Worlitzsch et al. 2002]

Es kommt zu einer verminderten Sekretion von Chlorid aus dem Epithel, was zum Ladungsausgleich der intrazellulären Ionen und zu einer vermehrten Absorption von Natrium in die Epithelzelle führt. Der hohe Gehalt an Natrium- und Chloridionen hat

den vermehrten Einstrom von Wasser in die Zelle zur Folge, womit es zu einer Veränderung der Zusammensetzung des Alveolarfilms kommt: Der periziliäre Film (PCL) nimmt ab, während es zu einer Verdickung der Bronchialsekrete (Mucus) kommt. Durch den vermehrten Mucus und dessen Stase wird die intraluminale ziliäre Clearance stark beeinträchtigt [Matsui et al. 1998, Gibson et al. 2003, Worlitzsch et al. 2002], sodass der Abtransport eingedrungener Mikroorganismen erschwert wird. Dies hat eine chronische Infektion und Inflammation in der Lunge des CF-Patienten zur Folge.

### 1.3 Bakterienspektrum bei Cystischer Fibrose

Bei Untersuchungen der in der CF-Lunge vorkommenden Bakterien treten wiederkehrend gleiche Keime auf. *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* und *Burkholderia cepacia complex* sind die häufigsten [Koch und Hoiby, 1993]. Auf Abbildung 2 sind die Größenordnungen des Vorkommens dargestellt.



**Abb. 2:** Prävalenz einzelner Bakterienstämme in der Lunge von CF-Patienten, modifiziert nach [Koch und Hoiby, 1993]

Der dominante Erreger ist *P. aeruginosa* [Döring und Hoiby, 2004]. Die Spezies gehört zu den fakultativen Anaerobiern und ist in der Lage, sich den Bedingungen in der CF-Lunge anzupassen. Das Bakterium wächst unter aeroben Verhältnissen in einer nicht-mukoiden Variante, welche die Form der primären Besiedlung der Lunge darstellt. Während unter Mangel an Sauerstoff ein mukoider, Alginate-produzierender Phänotyp entsteht, der ein entscheidender Faktor für die Persistenz des Keimes und damit zur Chronifizierung der *P. aeruginosa* Infektion ist [Bragonzi et al. 2005]. Es kommt zur Bildung von Biofilmen, deren Hauptbestandteil das Exopolysaccharid Alginate ist

[Worlitzsch et al. 2002, Bragonzi et al. 2005]. Die anaerobe Umgebung stellt nicht etwa eine Herausforderung dar, sie ist die bevorzugte Umgebung für diesen Mikroorganismus und seine Wachstums- und Vermehrungsbedingungen [Costerton 2002].

So ist im Verlauf der Erkrankung mit einem Befall durch *P. aeruginosa* und dessen Chronifizierung zu rechnen, mit dem Alter des Patienten steigt die Häufigkeit des Nachweises [Valerius et al. 1991]. In der Lunge der CF-Patienten sind keineswegs nur aerobe oder fakultativ anaerobe Keime zu finden. Wie verschiedene Studien der letzten Jahre aufgezeigt haben, bieten die anaeroben Bereiche auch anderen Spezies, die nur unter Abschluss von Sauerstoff wachsen können, eine Nische.

So wiesen Rogers et al. (2004) erstmals die große Bandbreite von Bakterien in Sputumproben erwachsener CF-Patienten nach. Es wurden 71 Sputen von 34 Patienten ohne vorherige Inkubation der Keime nach Amplifikation durch PCR mittels terminalem Restriktionslängenpolymorphismus auf die Diversität der vorhandenen Keime hin überprüft, wobei 13,3 ( $\pm$  7,9) verschiedene Spezies pro Probe und 13,4 ( $\pm$ 6,7) Spezies pro Patient nachgewiesen worden sind. Die Analyse klonierter 16S rRNA wurde bei drei dieser Proben durchgeführt, um die einzelnen Spezies zu identifizieren. Dabei sind 14 Spezies entdeckt worden, welche vorher noch nicht in der CF-Lunge beschrieben wurden. Davon waren acht Spezies obligate Anaerobier: *Bacteroides gracilis*, *Eubacterium brachy*, *Mycoplasma salivarium*, *Porphyromonas sp.*, *Prevotella salivae*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella sp. oral clone* und *Veillonella atypica*.

Eine große Anzahl obligat anaerober Keime konnten auch Tunney et al. (2008) in den Sputen von CF-Patienten nachweisen. Die Proben wurden mittels PCR amplifiziert und Analyse der 16S rRNA identifiziert, ggf. mit Hilfe des RapID Ana II Systems. Es kamen 66 Proben von 50 Patienten mit der Diagnose CF zur Auswertung. In 64% der Proben, was 42 der 66 Proben entsprach, konnten Anaerobier 14 verschiedener Genera in großer Anzahl nachgewiesen werden. Am häufigsten traten *Prevotella*, *Actinomyces*, *Veillonella* und *Propionibacterium spp.* auf. Im Vergleich dazu sind Sputumproben von 20 gesunden Erwachsenen untersucht worden, in 16 der Proben wurden Anaerobier nachgewiesen. Die Anzahl der Keime war jedoch signifikant geringer und es handelte sich um andere Genera als bei den Proben von CF-Patienten. Außerdem konnte eine signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit für nachweisbare obligate Anaerobier festgestellt werden, sofern der Patient mit *P. aeruginosa* kolonisiert war.

2007 nutzten Harris et al. Proben aus bronchoalveolären Lavagen, um anaerobe Keime bei CF-Patienten sowie gesunden Probanden zu untersuchen. Es wurde zur Auswertung die Kultur-unabhängige Methode der rRNA Sequenz-Analyse verwendet, um in Routine-Untersuchungen eventuell nicht erkannte Keime nachzuweisen. In 28 Proben von CF-Patienten und 14 Kontrollen ergab sich für 13 CF-Proben der Nachweis von Bakterien, welche in Routine-Kontrollen nicht festgestellt worden waren. Darunter befanden sich *Prevotella denticola*, einmal *Lysobacter sp.* und Vertreter der Rickettsialen. Die Autoren vermuten im Nachweis eine mögliche Erklärung für die Inflammation der CF-Lunge ohne nachweisbare Pathogene und das Versagen der therapeutischen Interventionen.

Der Frage nach der Wirksamkeit antimikrobieller Substanzen bezüglich anaerober Keime widmeten sich auch Worlitzsch et al. im Jahr 2009. Es wurden von 114 Sputumproben von 36 Erwachsenen und 9 Kindern mit der Diagnose CF Kulturen angefertigt und diese mittels mikrobiologischer Standardverfahren quantifiziert und identifiziert. 91% der Patienten wiesen obligate Anaerobier auf. Bei 93 der 114 Proben konnten eine oder mehrere Spezies obligater Anaerobier 16 verschiedener Genera nachgewiesen werden; eine Übersicht gibt Tab. 1.

Weiterhin wurden 12 Patienten unter akuter Exazerbation daraufhin getestet, ob eine konventionelle intravenöse antibiotische Therapie, ausgerichtet gegen *P. aeruginosa*, die Zahlen der obligaten Anaerobier vermindert. Dies war nicht der Fall, obgleich sich die zur Therapie-Kontrolle durchgeführten Lungenfunktionstestungen verbesserten. In-vitro zeigten sich große Unterschiede der Empfindlichkeit unter akuter Exazerbation nachgewiesener obligater Anaerobier gegenüber verschiedenen Antibiotika, insgesamt waren die Keime von 58% der Patienten resistent. In dieser Untersuchung konnte kein Anstieg der Wahrscheinlichkeit des Befalls mit obligaten Anaerobiern bei Infektion mit *P. aeruginosa* nachgewiesen werden [Worlitzsch et al. 2009].

#### **1.4 Pathogenität der obligaten Anaerobier**

Das Vorhandensein obligater Anaerobier in der Lunge des CF-Patienten ist unbestreitbar, jedoch ist die Frage nach der Pathogenität dieser Erreger bislang unklar. Es bleibt zu untersuchen, inwieweit sie selbst zur Erkrankung beitragen oder Wechselwirkungen mit anderen Keimen verursachen. Die pathogenen Faktoren der einzelnen Anaerobier sind für sich genommen bereits untersucht worden, im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die in der Arbeit relevanten obligaten Anaerobier gegeben. Prinzipiell lassen sich obligate Anaerobier verschieden definieren,

**Tab.1: tabellarische Übersicht des qualitativen Nachweises verschiedener obligat anaerober Bakterien in Sputen von CF-Patienten [Worlitzsch et al. 2009]**

Genus	n	species	n
Staphylococcus <i>spp.</i>	37	<i>saccharolyticus</i>	37
Peptostreptococcus <i>spp.</i>	34	<i>anaerobius</i>	6
		<i>micros</i>	1
		<i>prevotii</i>	20
		<i>tetradius</i>	7
Actinomyces <i>spp.</i>	19	<i>israelii</i>	2
		<i>meyeri</i>	3
		<i>naeslundii</i>	1
		<i>odontolyticus</i>	7
		<i>turicensis</i>	6
Veillonella <i>spp.</i>	15		15
Clostridium <i>spp.</i>	12	<i>bifermentans</i>	1
		<i>butyricum</i>	1
		<i>clostridioforme</i>	2
		<i>difficile</i>	3
		<i>hastiforme</i>	2
		<i>innocuum</i>	1
		<i>perfringens</i>	1
		<i>sporogenes</i>	1
Bacteroides <i>spp.</i>	7	<i>tectum</i>	6
		<i>stercoris</i>	1
Mobiluncus <i>spp.</i>	7	<i>curtsii</i>	1
		<i>mulieris</i>	6
Streptococcus <i>spp.</i>	7	<i>constellatus</i>	6
		<i>intermedius</i>	1
Capnocytophaga <i>spp.</i>	6		6
Gemella <i>spp.</i>	5	<i>morbillosum</i>	5
Prevotella <i>spp.</i>	4	<i>corporis</i>	2
		<i>melaninogenica</i>	2
Eubacterium <i>spp.</i>	3	<i>aerofaciens</i>	2
		<i>limosum</i>	1
Fusobacterium <i>spp.</i>	3	<i>necrophorum</i>	3
Lactobacillus <i>spp.</i>	3	<i>acidophilus</i>	2
		<i>jensenii</i>	1
Propionibacterium <i>spp.</i>	3	<i>acnes</i>	1
		<i>granulosum</i>	1
		<i>propionicum</i>	1
Wolinella <i>spp.</i>	3		3
<b>Gesamt</b>	<b>168</b>		<b>168</b>

allgemein lässt sich jedoch sagen, dass es sich um diejenigen Bakterien handelt, welche in der Abwesenheit freien Sauerstoffes wachsen und sich nicht mehr vermehren unter Anwesenheit von Sauerstoff [Koneman et al. 1997].

### **1.4.1 *Streptococcus constellatus***

Die Keime der *Streptococcus milleri* Gruppe, zu der auch *Streptococcus constellatus* gerechnet wird, werden üblicherweise zu den Kommensalen gezählt, jedoch gibt es häufig Assoziationen zu diversen pyogenen Infekten, die kardiale, abdominale, dermale und zentralnervöse Infektionen umfassen können. Auf Grund fehlender einheitlicher Klassifikationsmerkmale und Schwierigkeiten in der mikrobiellen Identifikation bleiben die Erreger jedoch oft unentdeckt [Piscitelli et al. 1992]. *Str. constellatus* hat eine führende Rolle bei purulenten orodentalen Infektionen [Siqueira et al. 2002].

Die Bedeutsamkeit der Erforschung der Interaktionen zwischen den Anaerobiern bei polymikrobiellen Infektionen unterstreicht eine Arbeit, bei der Mäusen submandibulär Kolonien von *Str. constellatus* und *Fusobacterium nucleatum* (beide  $2 \times 10^8$  CFU pro Maus) injiziert wurden. Die Versuchstiere verstarben ausnahmslos, im Gegensatz dazu überlebten alle Mäuse, die nur einen der beiden Keime injiziert bekommen hatten [Kuriyama et al. 2000].

Auch wurde gezeigt, dass im polymikrobiellen und dynamischen System CF-Lunge *Str. constellatus* die chronische pulmonale Infektion sowohl festigen, als auch akute Exazerbationen hervorrufen kann [Sibley et al. 2008], hierbei ermöglicht eine auf spezielle Gene gerichtete PCR die genaue Diagnostik [Olson et al. 2010]. Bemerkenswert ist zudem, dass sich bei der Untersuchung von *Str. milleri* Isolaten aus Patientenproben mittels Gel-Elektrophorese kein Hinweis auf eine Übertragung der Keime von Patient zu Patient ergab [Sibley et al. 2010].

### **1.4.2 *Clostridium difficile***

*C. difficile* ist ein gram-positiver Sporenbildner. Andere Vertreter des Genus, *Clostridium perfringens*, *novyi* und *septicum* sind Erreger des Gasbrandes, *Clostridium botulinum* verursacht Botulismus, *Clostridium tetani* Tetanus, während *C. difficile* einen häufigen Keim bei intestinalen Erkrankungen darstellt. *C. difficile* ist nicht aerotolerant und fermentiert Mannitol. Es bildet Toxin A und B sowie einen „Bewegungs-modifizierenden Faktor“ [Bartlett 1994].

Es ist ein ubiquitärer Keim, der auch bei Gesunden in den Fäzes nachweisbar ist. Sein Vorkommen in den Lungen bei CF ist erst seit Kurzem bekannt.

Die Pathogenität von *C. difficile* als Erreger der pseudomembranösen Kolitis ist ein bereits vielfach erforschtes Gebiet [Borriello 1998, Kelly und Lamont 1998], auch die

zur Infektion führenden Interaktionen von Pathogenitätsfaktoren und Darmmukosa sind Gegenstand vieler Arbeiten [Pothoulakis und Lamont 2001, Nam et al. 2010]. Die in der Lunge bedeutsamen Mechanismen sind allerdings weniger bekannt. Eine Arbeit, die den Einfluss des von *C. difficile* produzierten Toxins A auf menschliche Lungen-Fibroblasten untersuchte, zeigte einen Einfluss von Expositionszeit und Toxin-Menge ebenso wie auf den herrschenden pH-Wert, während die Temperatur keinen Einfluss auf die Bindung des Toxins an die Zelle hatte [Henriques et al. 1987]. Trotz der Tatsache, dass die durch den Keim verursachten Infektionen nicht länger nur als Komplikation von Antibiotika-Therapien angesehen werden [Rupnik et al. 2009], besteht durchaus offensichtlich noch Forschungsbedarf.

### **1.4.3 *Veillonella* spezies**

*Veillonella* spp. ist eine gram-negative Kokke, die Spezies *Veillonella parvula* gehört zur Normalflora der Mundhöhle, des Gastrointestinaltraktes und der Vagina des Menschen. Obwohl der Erreger oftmals als Kontamination angesehen wird, wird er als pathogener Erreger mit Infektionen der Nasennebenhöhlen, der Lunge, des Herzens, der Knochen und des ZNS in Verbindung gebracht [Bhatti und Frank 2000]. Die Bedeutung als pathogene Keimart ist schwierig zu definieren, da der Nachweis bei Infektionen nicht immer gelingt und der Rückschluss auf eine Bedeutung als alleiniger Verursacher kaum möglich ist. Ein Beispiel für diese raren Fälle bietet die Fallstudie zu einem Patienten mit Endokarditis, hervorgerufen durch *Veillonella montpellierensis* [Rovero et al. 2005]. Hingegen zeigte eine Auswertung des Keimspektrums von über 2000 Proben von Kindern mit verschiedensten Infektionen in 4% der Fälle das Vorkommen von *Veillonella* spp., wobei zu 95% Mischinfektion vorlagen [Brook 1996].

Als Erreger chronischer Infekte des Respirationstraktes ist *Veill. spp.* noch wenig erforscht, es ließ sich jedoch in einer Fallstudie eines Patienten mit einer chronischen anaeroben Pneumonie der Erreger nachweisen. Nach gezielter Antibiose war die Symptomatik des Probanden rückläufig [Shah et al. 2008]. Auch die Frage, ob die Veillonellen der oralen Standortflora als Infektionsquelle dienen, ist untersucht worden. Im Ergebnis zeigte sich keine Korrelation zwischen Stämmen und Phänotypen der subgingivalen Mikroflora und dem Auftreten von Parodontose oder COPD [Leuckfeld et al. 2010].

### **1.4.4 *Staphylococcus saccharolyticus***

*S. saccharolyticus* gehört zu den häufigsten nachgewiesenen Erregern bei Patienten mit CF [Worlitzsch et al. 2009]. Ursprünglich wurde der Erreger als *Peptococcus*

*saccharolyticus* klassifiziert und umbenannt, nachdem durch DNA-Analysen die Zugehörigkeit zum Genus *Staphylococcus* nachgewiesen wurde [Klipper et al. 1980, Ludwig et al. 1981]. Es handelt sich um eine gram-positive, nicht motile, nicht sporenbildende Kokke. Diese Staphylokokkenart gehört zur normalen Hautflora, jedoch wurde 1990 der erste Fall von Endokarditis beschrieben [Westbloom et al. 1990]. Die Autoren weisen auf aerobe *Staphylokokken* als bekannte Erreger von Endokarditiden hin, ein anaerober Vertreter dieses Genus war zuvor nicht als auslösender Erreger einer bakteriellen Infektion des Endokards nachgewiesen worden. Auch bei künstlichen Herzklappen wurde eine Infektion nachgewiesen [Krishnan et al. 1996]. Eine Fallstudie zum Erreger als alleinigem Verursacher einer Pneumonie wurde 2009 publiziert [Wu et al. 2009]. Dennoch bleibt die Datenlage zur Pathogenität dieses Keimes bislang unzureichend.

#### **1.4.5 *Peptostreptococcus prevotii***

Zu *Ps. prevotii* wurden mehrfach Studien zum Keimspektrum der Mundhöhle durchgeführt. Die Spezies wurde nachgewiesen im Rahmen odontogener Infektionen [Eckert et al. 2005a], wie auch bei Weichteilinfektion in der Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie [Eckert et al. 2005b]. Die Häufigkeit des Nachweises liegt hier unter der Häufigkeit anderer Anaerobier.

In Untersuchungen zum Keimspektrum bei CF konnte der Nachweis für *Ps. prevotii* erbracht werden [Worlitzsch et al. 2009], fraglich bleibt jedoch ein Zusammenhang zwischen Vorkommen von Anaerobiern der Mundhöhle und Anaerobiern in der Lunge von CF-Patienten.

### **1.5 Obligate Anaerobier bei Cystischer Fibrose**

Der Beitrag der einzelnen Bakterien und damit deren Stellenwert in der Pathogenese der CF sowie die Interaktionen der Anaerobier untereinander und mit den fakultativen Anaerobiern bleibt bislang unscharf. Die genauen Wechselwirkungen der einzelnen Keimarten, die zwar für sich mittlerweile Gegenstand zahlreicher Untersuchungen waren und deren Vorkommen in der CF-Lunge belegt ist, sind bisher kaum untersucht worden.

Gerade im Hinblick auf eine gezielte antibiotische Therapie im Exazerbationsereignis bestehen noch viele Fragen bezüglich der Sinnhaftigkeit einer gezielten Wirksamkeit der eingesetzten Antibiotika auf einzelne Erreger und damit auf das Gesamtkeimspektrum. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die bessere Erreichbarkeit *P.*

*aeruginosas* mit antimikrobiellen Substanzen, denn nicht nur dessen Abschottung im Biofilm ist eine suffiziente Überlebensstrategie, auch die Bildung von small colony variants ist eine Solche. *P. aeruginosa* wächst unter anaeroben Bedingungen in SCV, es handelt es sich um eine morphologische Variante kleinerer Kolonien mit gefurchter, unebener Oberfläche, die neben einem langsameren Wachstum als die Wildtyp-Variante auch eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika aufweist sowie eine hohe Affinität zur Bildung von Biofilmen besitzt [Starkey et al. 2009, Proctor et al. 2006].

Inwieweit also die obligaten Anaerobier im anaeroben Milieu der CF-Lunge den bisher vielfach fokussierten und therapierten *P. aeruginosa* beeinflussen, bleibt bisher nicht ausreichend geklärt. Erst wenn positive und negative Einflüsse einzelner Keime aufeinander und auf den Krankheitsverlauf der CF untersucht und geklärt sind, lässt sich über mögliche neue Ansatzpunkte in der Therapie nachdenken.

Die Bedeutung von *P. aeruginosa* für die Cystische Fibrose ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen. Die Auswirkungen der Erkenntnis, dass zahlreiche obligate Anaerobier ebenso wesentlicher Bestandteil des Mukus sind, wurden jedoch erst durch wenige Arbeiten untersucht. Unter diesem Gesichtspunkt soll in direkter Interaktion der Bakterien deren Einfluss aufeinander in der vorliegenden Studie untersucht werden

## 2 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit werden durch mikrobiologische Testungen folgende Punkte untersucht:

- Identifikation und Quantifikation der aeroben und anaeroben Bakterien im Sputum von CF-Patienten
- Änderung des Bakterienspektrums und der Bakterienzahl bei Exazerbationsereignissen
- Persistenz der Bakterien in der CF-Lunge
- Bestimmung des Resistenzverhaltens der nachgewiesenen obligat anaeroben Bakterien in CF-Sputen
- Selektion in der CF-Lunge relevanter obligater Anaerobier
- Einflussnahme obligater Anaerobier auf die Wachstumszahlen von *P. aeruginosa*
- Einflussnahme von *P. aeruginosa* auf die Wachstumszahlen der obligaten Anaerobier
- Einflussnahme durch Konzentrationsänderungen der obligaten Anaerobier und von *P. aeruginosa*
- Phänotypische Einflussnahme der obligaten Anaerobier auf das Wachstum von *P. aeruginosa*.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Patientenstichprobe**

Um das Keimvorkommen in den Lungen von Patienten mit Cystischer Fibrose bestimmen zu können, wurde das Sputum von Probanden der ambulanten Erwachsenen-Sprechstunde für CF im Universitätsklinikum Halle getestet. Es handelt sich um Patienten mit durch mehrfachen Schweißtest oder Gen-Analyse gesicherter Diagnose. In der Basismedikation sind inhalatives Tobramycin, Colistin und orales Azithromycin angewendet worden. So sind insgesamt 54 verwertbare Patientenproben von 21 verschiedenen Patienten zur Auswertung gelangt. Davon sind 12 weiblich, 9 männlich im Alter von 21 bis 66 Jahre ( $30,4 \pm 11,2$  Jahre) zum Zeitpunkt der letzten Sputumgabe. Der Zeitraum der Probennahmen erstreckte sich vom 1.10.2007 bis zum 15.4.2009.

#### **3.1.2 Gewinnung von Sputum**

Die Gewinnung der Sputumproben erfolgte, soweit den Patienten das kräftige Abhusten von Sekret während der Dauer ihres Aufenthaltes möglich war, im Rahmen ambulanter Termine. Sowohl bei Infekten und zur Therapie-Kontrolle als auch bei Routine-Vorstellungen bereits erfasster Probanden gaben diese eine Probe in ein Röhrchen (Zentrifugenröhrchen, TPP Products AG, Trasadingen, Schweiz) ab. Dieses wurde anschließend abgeholt und sofort im Labor bearbeitet.

Zu achten war bei der Bearbeitung der Proben neben der Einhaltung aller gebotenen hygienischen Maßnahmen im Laborbetrieb auch auf die ausschließliche Verwendung autoklavierter Utensilien (Autoklav Vakulab HP, Münchner Medizin Mechanik GmbH, Leipzig) und steriler Arbeitsgeräte. Sämtliche Arbeitsschritte wurden zügig durchgeführt, die maximale Exposition an Sauerstoff der anaeroben Keime betrug 25 Minuten, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden.

Die Vorgehensweise bei der Bearbeitung der Sputen folgte stets dem gleichen Ablauf. Sie wurden auf Grund ihrer oft sehr zähen Konsistenz gewogen (Präzisionswaage Kern 442, Gottl. Kern und Sohn GmbH, Albstadt) und mittels Pipetten (Reference, Eppendorf AG, Hamburg) und passenden Pipettenspitzen (Pipettenspitzen blau bzw. Universalspitzen, Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe) mit PBS (phosphate buffered saline) verdünnt.

Dazu wurde eine Lösung aus Tabletten (Merck, Darmstadt, Deutschland) und gereinigtem Wasser nach Packungsbeilage hergestellt und diese dann, um ein für die Bakterien geeignetes Milieu zu gewährleisten, auf eine 5-prozentige Zubereitung

verdünnt. Vor der Verwendung musste der PBS-Puffer autoklaviert werden und konnte dann in der dem Gewicht des Sputums entsprechenden Menge diesem hinzugefügt werden. Anschließend wurden die Sputen im Vortex (Reax top, Heidolph-Instruments GmbH und Co KG, Schwabach, Deutschland) so lange gemischt, bis eine zur Weiterverarbeitung geeignete homogene Mischung entstanden war.

### 3.1.3 Quantifikation

Zur Quantifikation der einzelnen in den Proben enthaltenen Bakterien wurden die Proben auf Nährböden ausplattiert und nach Inkubation die Einzelkolonien gezählt. Um zählbare Einzelkolonien zu erhalten, wurden Verdünnungsreihen angefertigt. Dazu wurden in acht Röhrchen (Tubes, Eppendorf AG, Hamburg) mit der Pipette jeweils 900µl steriles PBS gegeben. Nachfolgend sind ins erste der Röhrchen 100µl der Probe hinzugefügt und gemischt worden, ebenso wurde bis zum achten Röhrchen verfahren.

Im Anschluss konnte das Auftragen der so vorbereiteten Verdünnungsstufen auf verschiedene Agar-Nährböden, welche nach den Erfordernissen der Bakterien sowie der aeroben und anaeroben Anzucht ausgewählt worden sind, erfolgen. Zur aeroben Bebrütung wurden Columbia-Nährböden (Columbia-Agarplatte, Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe) verwendet, hierbei handelt es sich um ein nährstoffreiches Kulturmedium, welches ein breites Anwendungsspektrum aufweist und auch anspruchsvollen Bakterien gerecht wird.

Zielstellung war es, *P. aeruginosa*. und *S. aureus* sowie *B. cepacia* ideale Wachstumsbedingungen zu schaffen. Im anaeroben Milieu wurde ein SCS-Nährboden (Schaedler Agar + 5% Schafblut, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) ausgewählt.

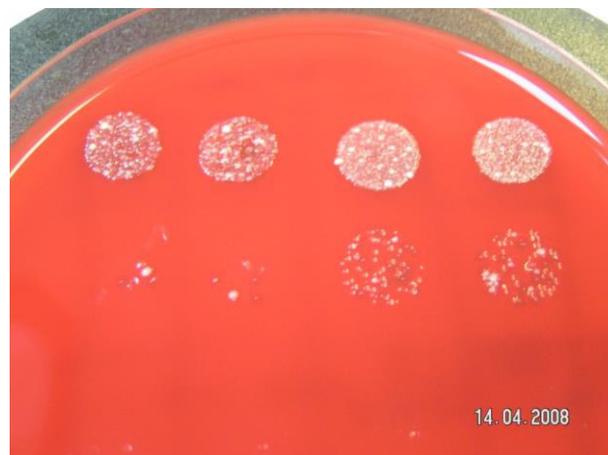
Durch den Gehalt an Vitamin K3, Hämin, Hefeextrakt, Glukose und 5% Schafblut eignet sich dieses Medium sehr gut zur Anzucht fakultativer Anaerobier sowie anspruchsvoller obligater anaerober Keime. Zur Durchführung wurden mittels Pipette von jeder Verdünnungsstufe jeweils 2 Tropfen á 10µl auf die vorher rasterartig (4 mal 4 Kästchen) auf der Rückseite markierten Agar-Platten gegeben.

Die Bebrütung der Nährböden wurde für den Columbia-Agar aerob 24 Stunden lang im Brutschrank (Kelvitron t, Heraeus instruments GmbH, Hanau, Deutschland) bei  $37^{\circ}\pm 2^{\circ}$  C und für den SCS-Agar anaerob 48 Stunden lang bei  $37^{\circ}\pm 2^{\circ}$  C unter der Anaerobier-Bank (modular atmosphere controlled system, Meintrup dws Laborgeräte, Lähden-Holte) durchgeführt. Die Anaerobierbank bietet ein sauerstoffreies Milieu mit einer Gaszusammensetzung von 80% Stickstoff, 10% Wasserstoff und 10% Kohlendioxid. Die Temperaturen ergaben sich aus der Körpertemperatur, da ein ähnliches Milieu wie

vor der Entnahme zur Anzucht herrschen soll. Die Zeiten ergeben sich daraus, dass ein Tag für die aeroben Keime zur Bildung von gut sichtbaren Kolonien ausreichend ist, während die anaeroben Bakterien durch ihr langsames Wachstum nach zwei Tagen erst eine gute optische Beurteilbarkeit aufweisen.

Eine längere Inkubation führt bei aeroben Keimen zu einem weiteren Wachstum und Konfluieren der Einzelkolonien, während längeres Warten bei den Anaerobiern durch ihre Empfindlichkeit eine verschlechterte Qualität der Keime bei der Weiterverarbeitung nach sich zieht. Sofern im Folgenden nicht anders angegeben, erfolgte die Bebrütung deshalb stets unter diesen Modalitäten.

Die Einzelkolonien wurden ausgezählt und optisch verschiedenen Spezies zugeordnet, (Abb. 3). Da pro Verdünnungsstufe jeweils zwei Rasterfelder benetzt worden waren, ergab die Auszählung je Verdünnungsstufe zwei Werte. Um eine um den Verdünnungsfaktor bereinigte Kolonieanzahl für die einzelnen Keimarten zu erhalten, wurde der Mittelwert aus den Werten der beiden gleichen Verdünnungsstufen gebildet, die Werte der einzelnen Verdünnungsstufen sind hochgerechnet und aus diesen ein Wert gemittelt worden.



**Abb 3:** Verdünnungsreihe aus Sputumprobe auf Columbia-Agar nach 24-stündiger Inkubation: verschiedene Spezies in fallender Koloniezahl entsprechend der jeweiligen Verdünnungsstufe

### 3.1.4 Identifikation

Zur Identifikation der ausgezählten Bakterien mussten diese isoliert und angezüchtet werden. Von jeder optisch als eigenständige Spezies angenommenen Kolonieart wurde mittels einer sterilen Impföse (Einwegimpföschlinge, Greiner bio-one, GmbH, Kremsmünster, Österreich) eine Einzelkolonie entnommen und ein Drei-Ösen-Ausstrich auf einem Columbia-bzw. SCS-Agar angefertigt. Es sind alle nachweisbaren

Bakterien quantifiziert und identifiziert worden, außer die Gruppe der vergrünenden Streptokokken, es handelt sich hierbei um fakultative Anaerobier, deren Vorkommen auf eine Kontamination der oberen Atemwege während der Expektoration zurück zu führen ist [Taylor et al. 2006].

Die beimpften Platten wurden wie oben beschrieben aerob bei  $37^{\circ}\pm 2^{\circ}$  C für 24 Stunden beziehungsweise anaerob bei  $37^{\circ}\pm 2^{\circ}$  C für 48 Stunden erneut bebrütet und optisch auf ihre Reinheit überprüft. Im Weiteren wurden die gefundenen Erreger in zwei Gruppen eingeteilt, Aerobier und Anaerobier, auf eine weitere Unterscheidung der Anaerobier in aerotolerant, strikt und moderat anaerob wurde verzichtet [Koneman et al. 1997].

### **Identifikation der aeroben Spezies**

Für die Aerobier wurde das biochemische Identifikationssystem Vitek (bioMérieux, Marcy l`Etoile, Frankreich) verwendet, dessen Prinzip die Inkubation mit Bakterienlösung gefüllter Testkarten ist. Letztere enthalten 30 kleine Reaktionskammern (Mikroküvetten), welche mit verschiedenen Substraten beschichtet sind. Die hierin ablaufenden Reaktionsprozesse ergeben ein für die Bakterienspezies und -subspezies charakteristisches Profil, welches durch das Analysegerät Vitek ausgewertet wird und zur Identifikation der Keimart führt. Das Gerät benötigte bestimmte Informationen vorab, was einige Voruntersuchungen notwendig machte; die Bestimmung der Gramnegativität, Oxidase-Reaktion, Koagulase- und Staphylococcus aureus-Testung. Die Differenzierung in gram-positive und gram-negative Keime erfolgte mittels Gram-Färbung (Färbeset, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

Hierzu wurde eine geringe Probe des zu testenden Erregers mittels Impföse auf einen Objektträger (Süsse GmbH, Gudensberg, Deutschland) in einen Tropfen 0,9%iger NaCl-Lösung (Braun, Melsungen, Deutschland) gegeben. Die nach Anleitung des Herstellers gefärbten Präparate wurden unter dem Mikroskop (Axiolab, Carl Zeiss Microscope Division, Oberkochen, Deutschland) bei 100-facher Vergrößerung ausgewertet. Mit den gram-negativen Keimen wurde nun der Oxidase-Test (Dryslide, BD, Sparks, Maryland, USA) durchgeführt.

Dazu wurden einige Kolonien mit einer Impföse entnommen und auf dem Testplättchen auf einer geringen Fläche mit leichtem Druck eingerieben. Zeigte sich nach höchstens 10 Sekunden eine intensiv azurblaue Verfärbung, so war die Kolonie als Oxidase-positiv einzustufen. Mit den gram-positiven Kolonien wurde so verfahren, dass ein Katalase-Test (ID Color Katalase (ID-Ase), bioMérieux, Marcy l`Etoile, Frankreich) zur

Differenzierung von Katalase-positiven und -negativen Keimen erfolgte sowie ein Latexagglutinations-Schnelltest zum Nachweis von *S. aureus* (Staphaurex Plus\*, remel, Lenexa, KS, USA).

Dazu wurden einige Kolonien mit Hilfe einer Impföse mit einem auf eine Papp-Karte (disposable cards, remel, Lenexa, KS, USA) aufgetragenen Tropfen Koagulase-Test bzw. Staph-aurex-Test (remel, Lenexa, KS, USA) vermischt. Kam es hierbei zu einer Agglutination, fielen die Tests positiv aus. Mit den nun gewonnenen Informationen konnten die für die Nutzung des Vitek notwendigen Karten für gram-positive (GPI-Karte, bioMerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) oder gram-negative (GNI+- Karte, bioMerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) Bakterien ausgewählt und markiert werden.

Zur Identifizierung wurden in ein steriles Röhrchen (Reagenzglas, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) 6ml unsteriles Natriumchlorid 0,45 % (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) gegeben und mittels Impföse einige Kolonien der zu identifizierenden Bakterienart hinzugefügt. Die erforderliche Menge der Kolonien im Reagenz richtete sich nach der gram-Negativität und wurde mit dem Vitek Colorimeter (Hach Company, Loveland, Colorado, USA) bestimmt. So konnten die Reagenzien mit Hilfe des Vortex auf eine standardisierte Trübung eingestellt werden. Diese wurde durch den McFarland Trübungsstandard (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) überprüft, es handelt sich hierbei um Lösungen standardisierter OD (optischer Dichte). Mc Farland Standard 1,0 für gram-negative Bakterien und Mc Farland 0,5 für gram-positive Bakterien wurden eingestellt.

Anschließend konnte die Bakterienlösung durch ein Röhrchen in die Karten eingegeben werden (Red transfer Tubes, bioMerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich). In der Vakuum-Kammer im Vitek (Filler/Sealer, bioMerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) erfolgte ein Ansaugen und die Verteilung geringster Mengen des Reagenzes in die Reaktionskammern. Nach Abtrennung des Röhrchens und Versiegelung der Öffnung im Gerät wurde die Karte in den Vitek (Vitek Classic, bioMerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) eingelegt, welcher in einer ca. 6-stündigen Bearbeitungszeit mittels Messung der Lichtdurchlässigkeit in den einzelnen Kammern aus den wiederholt gemessenen Einzelreaktionen ein Muster bildet.

Die daraus resultierende Spezies und Subspezies wird mit einer prozentualen Wahrscheinlichkeit angegeben. Lag diese unter 85%, wurde das Ergebnis nicht gewertet.

## Identifikation der anaeroben Spezies

Das Procedere zur Identifikation der Anaerobier war nicht nur durch deren hohe Ansprüche an das Wachstumsmilieu, sondern auch durch das komplexe Verfahren des verwendeten biochemischen Identifikationssystems RapID ANA II Systems (Oxoid, Basingstoke, Hants, UK) ungleich aufwändiger.

Nach der Sicherstellung, dass es sich bei der zu untersuchenden Probe um eine Reinkultur handelte, erfolgte nun die Testung der Sauerstoff-Reagibilität, um fakultative Anaerobier zu selektieren und von weiteren Testungen auszuschließen, da das Interesse dieses Versuchsteiles ausschließlich den obligaten Anaerobiern galt.

Dazu wurde mit einigen Kolonien ein Columbia-Agar beimpft und für 24 Stunden aerob bei 37° Celsius bebrütet. Waren nach mehrfachen Wiederholungen dieser Kontrolle unter aeroben Bedingungen dreimalig Kolonien gewachsen, so wurde die jeweilige Kolonieart von weiteren Testungen ausgenommen. Konnte analog dreimalig kein Wachstum festgestellt werden, wurde das Bakterium als strikter Anaerobier eingestuft und zur Identifikation vorgehalten, (Abb. 4).



**Abb 4:** Wachstumskontrolle mit zu testenden Anaerobiern nach 24 Stunden aerober Inkubation: in vier von fünf Feldern zeigt sich Wachstum, damit handelt es sich nicht um strikte Anaerobier, das obere Feld zeigt kein Wachstum, der Ausstrich stammt somit von einem obligaten Anaerobier (zwei weitere Negativ-Kontrollen erforderlich)

Da im RapID ANA II System der SCS-Nährboden auf Grund seiner Zusammensetzung laut Herstellerempfehlungen keine Anwendung finden kann, wurde der zu identifizierende Keim mittels Öse auf CDC-Agar (BD Diagnostic Systems, Heidelberg, Deutschland) überimpft und unter anaeroben Bedingungen für 48 Stunden bei 37° C angezüchtet.

Die Identifikationsmethode beruht ebenfalls auf der unterschiedlichen Reaktion der einzelnen Bakterien auf bestimmte Reagenzien. Eine Bakterienlösung wird in ein

Paneel mit zehn Vertiefungen, die mit verschiedenen Enzymen beschichtet sind, gegeben und inkubiert. Nach der Bebrütung erfolgt die erste Auswertung, es wird der Farbumschlag beurteilt. Danach werden weitere Reagenzien hinzugegeben und erneut muss der Farbumschlag beurteilt und anschließend das Ergebnis mittels eines Computer-Programmes ausgewertet werden.

Zur Durchführung wurden die Kolonien mit einem sterilen Wattetupfer (Paul Böttger oHG, Bodenmais, Deutschland) entnommen und sorgfältig im RapID-Inokulations-Röhrchen (Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) in Lösung (exakt 1ml) gebracht. Die benötigte Menge wurde optisch dem Trübungsgrad des McFarland-Standards 3 (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) angeglichen und in die beschichteten Tubes des Paneels übertragen. Die anschließende Inkubation erfolgte aerob für 4-6 Stunden bei  $37^{\circ}\pm 2^{\circ}$  Celsius, die Auswertung konnte im Anschluss oder innerhalb der folgenden 24 Stunden erfolgen, sofern die Paneele im Kühlschrank (Heraeus instruments GmbH, Hanau, Deutschland) bei  $7^{\circ}\text{ C} \pm 2^{\circ}\text{ C}$  aufbewahrt worden sind.

Zur Beurteilung wurde eine vom Hersteller konzipierte Farbskala verwendet, anhand derer ein Farbumschlag nach dem ja/nein-Prinzip auf einem ebenfalls mitgelieferten Auswertungsbogen (remel, Lenexa, KS, USA) vermerkt wurde. Zunächst wurden alle 10 Tubes bewertet, anschließend folgte die Zugabe jeweils eines Tropfens zweier weiterer Reaktionslösungen, RapID ANA II Reagens (Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) für die Tubes 3 bis 9 und RapID ANA II Spot Indole (Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) für Tube 10. Die Auswertungsmodalitäten blieben gleich, sodass zum Schluss durch Addition der den positiven Ergebnissen zugeordneten Zahlenwerten auf dem Auswertungsbogen ein siebenstelliger Zahlencode errechnet wurde. Dieser konnte nun im ERIC Programm (ERIC-Software, Elektronisches RapID Kompendium, Version 1.0, remel, Lenexa, KS, USA) eingegeben werden.

Das Programm benötigte als Voreinstellung die Information, ob es sich um gram-positive Stäbchen, gram-negative Stäbchen oder Kokken handelt. Dazu wurden von allen Anaerobiern Präparate in der Gram-Färbung angefertigt (Färbeset, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und unter dem Lichtmikroskop kategorisiert (Axiolab, Carl Zeiss Microscope Division, Oberkochen, Deutschland), die Anfertigung der Präparate erfolgte wie bereits beschrieben. Die eingegebenen Zahlenwerte aus den Auswertungsbögen glich das Programm nun mit in bekannten Datenbanken gespeicherten Mustern ab. Daraus wurden Identifikationsmöglichkeiten der zu identifizierenden Spezies errechnet und mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit versehen. Wahrscheinlichkeitswerte über 80% wurden akzeptiert, darunter liegende

Werte hatten eine Wiederholung des gesamten Identifikationsvorganges ab dem Ausstrich des Bakteriums zur Folge.

### **3.1.5 Resistenzbestimmung**

Um einen Überblick über die Reagibilität der in den Patientenproben nachgewiesenen Erreger gegenüber Antibiotika zu erlangen, wurde eine Resistenztestung durchgeführt. Dazu wurden Antibiotika nach klinischen Gesichtspunkten und Wirkspektrum ausgewählt [Worlitzsch et al. 2009]. Metronidazol und Clindamycin auf Grund ihrer guten Wirksamkeit gegen obligate Anaerobier [Park et al. 1992], sowie Meropenem, Ceftazidim und Piperacillin/Tazobactam, die auf Grund der Wirksamkeit gegen fakultative Anaerobier wie *P. aeruginosa* zu den häufig verwendeten Substanzen in der Therapie der Cystischen Fibrose gehören [Döring et al. 2000].

Es wurden 59 Tests durchgeführt, von denen 44 verwertbar waren. Diese stammten von 12 verschiedenen Patienten aus insgesamt 21 Proben. Es kamen E-Tests (BIODISK, Solna, Schweden) mit Ceftazidim, Clindamycin, Meropenem, Metronidazol und Piperacillin/Tazobactam zur Anwendung. Sie beinhalten Test-Streifen, welche auf einer Seite eine zu einem Ende des Streifens hin ansteigend konzentrierte Antibiotika-Beschichtung aufweisen, auf der anderen Seite eine entsprechende Skalierung der Mengenangaben in µg/ml. Sie werden auf eine mit Bakterienlösung benetzten Agar aufgelegt und nach Inkubation kann an Hand des Kolonie-Wachstums die MHK (minimale Hemmkonzentration) bestimmt werden.

Von den aus den Patientenproben für 48 Stunden auf SCS-Agar vorbereiteten Isolaten wurden mittels eines sterilen Watteträgers (Paul Böttger oHG, Bodenmais, Deutschland) 3-10 Einzelkolonien je nach Wachstumsgröße entnommen. Diese wurden in einem sterilen Röhrchen (PP-Tube, 14 ml, Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich) in 2 ml ebenfalls sterilen Natriumchlorids (NaCl 0,85%, 2ml, bioMerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) eingebracht und im Vortex zu einer Suspension gemischt. Die OD der Lösung wurde auf McFarland Standard 0,5 eingestellt. Mittels eines Watteträgers wurde pro getestetem Erreger und Antibiotikum je eine SCS-Platte mit dem homogenen Gemisch gleichmäßig über der gesamten Fläche beimpft. Nach Abtrocknen der Oberfläche wurde auf je einen Nährboden ein Teststreifen aufgebracht. Anschließend wurden die Platten für 48 Stunden unter der Anaerobier-Bank inkubiert.

Zur Auswertung ist die im Wachstum der Kolonien entstandene Hemmellipse in ihrer Ausdehnung am Schnittpunkt mit der Skala auf dem Teststreifen bestimmt worden. Die in der Produktbeschreibung des Tests aufgeführte Tabelle zur Beurteilung der

Zahlenwerte (Bewertungskriterientabelle CLSI 2007, BIODISK, Solna, Schweden) erlaubte die Einordnung des Resistenzverhaltens in die Kategorien resistent, sensibel und intermediär (Abb. 5).



**Abb. 5:** E-Test-Streifen mit obligaten Anaerobiern, es zeigen sich Hemmellipsen verschiedener Größe. *Fusobacterium necrophorum* bildet diese bis zur geringsten Konzentration von Piperacillin/Tazobactam (A), *Bacteroides stercorum* bis zu einer mittleren Konzentration von Meropenem (B) und *B. stercoris* bildet keine Hemmeclipse durch Clindamycin (C)

### 3.1.6 Nachweis und Resistenzverhalten unter Exazerbationen

Zur Fragestellung, ob es einen Unterschied in Bakterienzahl und -spektrum unter Exazerbation und antibiotischer Therapie gibt, wurden die entnommenen Patientenproben jedes Patienten nach den Zeitpunkten vor, unter und nach Therapie sowie im Intervall gruppiert. Dabei galt als Exazerbation das Eintreten von mindestens vier Punkten aus einem Katalog von 12 festgelegten Kriterien:

- Veränderungen des Sputums wie vermehrte Hämoptysen
- Zunahme des Hustens, Zunahme der Dyspnoe
- Allgemeines Unwohlsein
- Zunehmender Erschöpfungszustand oder Lethargie
- Temperaturanstieg auf  $>38^{\circ}\text{C}$
- Anorexie und/oder großer Gewichtsverlust
- Nasennebenhöhlensymptome
- Veränderungen bei Auskultation und Perkussion
- Abfall der Lungenfunktionswerte von 10%
- Radiologische Veränderungen der Thorax-Aufnahme, die für eine Lungeninfektion kennzeichnend sind [vgl. Fuchs et al. 1994]

Unter Therapie wurde während einer intravenösen Antibiose bei Exazerbation und nach Therapie bis spätestens 14 Tage nach einer Therapie bei Exazerbation definiert. Es erfolgte bei den Patienten die intravenöse Antibiose über 2 bis 3 Wochen mit Piperacillin/Tazobactam, Imipenem, Cefepim, Ceftazidim oder Moxifloxacin.

### **3.1.7 Stamm-Konservierung und -Archivierung**

Nachdem die Identifikationen abgeschlossen waren, wurden zur Archivierung sowohl von Aerobiern als auch von obligaten Anaerobiern von jedem Stamm Einfrierkulturen hergestellt. Dazu wurden mittels einer Impföse alle Kolonien einer Reinkultur, die nicht älter als 2 Tage für aerobe beziehungsweise 5 Tage für anaerobe Bakterien waren, aufgenommen. Als konservierendes Medium wurde vorab autoklavierte Skim milk (Oxoid, GmbH, Wesel, Deutschland) in sterilen Glaszylindern (Gewindepräparatgläser mit Schraubkappe, Scherf Europa GmbH, Meinigen, Deutschland) verwendet. Die hierhin verbrachten Keime wurden in einem Tiefkühlschrank bei  $-52^{\circ}\pm 5^{\circ}$  C eingelagert.

### **3.1.8 Patienteneinverständnis**

Zum Zeitpunkt der Studie lagen Einverständniserklärungen aller getesteten Patienten zur Teilnahme an dieser Studie in schriftlicher Form vor. Klinische Angaben sind den Behandlungsakten entnommen und anonymisiert worden. Die vorliegende Studie wurde unter Einhaltung der Bestimmungen der Helsinki-Deklaration durchgeführt. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg äußerte Anfang 2006 (Votum siehe Anhang) keine Bedenken gegen die Durchführung der Studie.

## **3.2 Pathogenitätstestungen**

Verschiedene obligate Anaerobier wurden mit *P. aeruginosa* in unterschiedlichen Testanordnungen gemeinsam inkubiert, um eine gegenseitige Beeinflussung zu untersuchen. Verwendet wurden jeweils 2 SCS-Agar-Böden, welche sich in Voruntersuchungen als geeignet für die Anzucht von Anaerobiern herausgestellt haben [Worlitzsch et al. 2009] sowie 2 CDC-Böden, welche eine besondere Eignung für anspruchsvolle und langsam wachsende Keime aufweisen. Die Bebrütung erfolgte unter stets gleichen Bedingungen in der Anaerobierbank bei  $37^{\circ}\pm 2^{\circ}$ C. Um valide Ergebnisse zu erhalten, wurde bei jeder Änderung der Modalitäten die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse durch jeweils dreimaliges Wiederholen der Versuchsanordnungen kontrolliert und die Ergebnisse gemittelt.

### **3.2.1 Verwendete Isolate**

Die in den einzelnen Testreihen verwendeten Spezies entstammen den Einfrierkulturen des Instituts für Hygiene der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, bei *P. aeruginosa* handelt es sich um den Laborstamm PAO-1, die obligaten Anaerobier

entstammen Patientenisolaten und stellen eine Auswahl der häufig nachgewiesenen obligaten Anaerobier in Sputumproben von CF-Patienten dar [Worlitzsch et al. 2009], s. Tab. 2.

**Tab. 2: Herkunft der Testmikroorganismen**

Testspezies	Herkunft
<i>P. aeruginosa</i>	Laborstamm PAO-1
<i>S. saccharolyticus</i>	Patientenisolat
<i>Ps. prevotii</i>	Patientenisolat
<i>Veillonella spp.</i>	Patientenisolat
<i>C. difficile</i>	Patientenisolat
<i>Str. constellatus</i>	Patientenisolat

### 3.2.2 Vorabtestungen

Die Versuchsanordnung sollte die am schnellsten und besten wachsenden Bakterien aus oben genannter Auswahl selektieren. Der Versuch bestand in einer 3-tägigen Inkubation der Keime mit Auszählungen des Wachstums der Kolonien alle 8 Stunden.

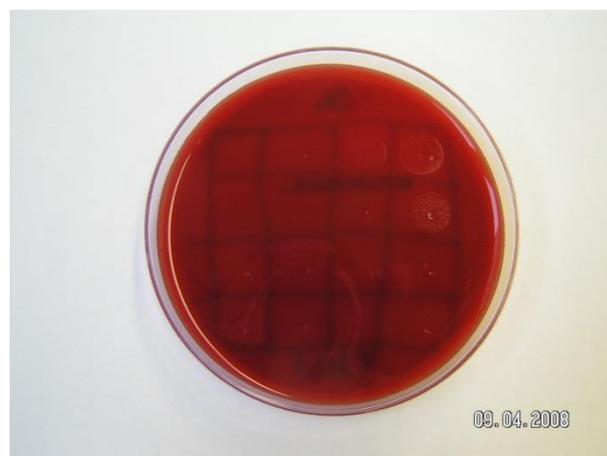
Die aus den Einfrierkulturen angelegten Kulturen auf SCS-Agar wurden nach Kontrolle der Reinheit erneut mit dem System Rapid Ana II identifiziert und eigene Einfrierkulturen präpariert. Der Ansatz wurde in sterilem TSB (Tryptone Soya broth USP, Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) durchgeführt, einem Flüssigmedium mit hoher Nährstoffdichte und Eignung für zahlreiche Organismen, um größere Mengen von Bakterien als auf den Agar-Platten in kurzer Zeit kultivieren zu können.

Nach 24 Stunden Bebrütung unter der Anaerobierbank waren nun als Ausgangspunkt der Testungen Bakterien gleichen zeitlichen Ursprungs gewährleistet. Da jedoch bereits in diesem Stadium eine unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Stämme wahrscheinlich gewesen ist, musste eine vergleichbare Ausgangskonzentration der Bakterien für reliable Ergebnisse garantiert werden. Dies geschah durch eine Messung der optischen Dichte der Bakterienlösungen. Je 1 ml der Lösungen wurde in eine Küvette (Plastibrand, Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe) pipettiert und deren optische Eigenschaften im Extinktionsmessgerät (Cadas 50, Spectral photometer, DR Lange, Düsseldorf) analysiert. Der Dichte-Wert konnte nun in eine mathematische Formel eingesetzt werden und somit das adäquate Mischungsverhältnis der Bakterienlösungen mit sterilem TSB ermittelt werden, um den gleichen Extinktionswert aller Ansätze von 0,05 zu erreichen. So wurde für jeden Stamm ein TSB-Röhrchen gleicher Bakteriendichte hergestellt und anaerob inkubiert.

Eine Auszählung des Keimwachstums wurde alle acht Stunden durchgeführt. Hierzu wurden aus jedem Ansatz jeweils 100µl entnommen und eine Verdünnungsreihe auf SCS-Agar angefertigt, welche nach 24-stündiger anaerober Bebrütung ausgezählt worden ist. So wurde in den folgenden 72 Stunden vorgegangen, sodass pro Keim ein Ausgangswert und zehn Werte aus den Verdünnungsreihen zur Erstellung einer Wachstumskurve zur Verfügung standen.

### **3.2.3 Gemeinsame Inkubation von *P. aeruginosa* und obligaten Anaerobiern**

Als Ausgang dieses und aller folgenden Versuche wurden, sofern nicht anders beschrieben, die Stämme zunächst einzeln kultiviert nach bereits im vorherigen Abschnitt beschriebenem Vorgehen, *P. aeruginosa* wurde auf Columbia-Agar vorbereitet. Zudem sind Wachstumskontrollen zum Ausschluss aeroben Wachstums angefertigt worden. Die Versuche wurden jeweils mit PAO1 in gemeinsamem Ansatz mit den jeweiligen obligaten Anaerobiern und unter alleiniger Inkubation durchgeführt. Die anaeroben Keime wurden jeweils nach 48h ausgezählt, die SCV von *P. aeruginosa* konnten hingegen erst nach einem weiteren Tag aerober Inkubation beurteilt werden (Abb. 6). Ausgewertet wurde sowohl die Zahl als auch der Phänotyp der Stämme, letzterer wurde photographisch dokumentiert.



**Abb 6:** SCV von *P. aeruginosa* nach 24 Stunden anaerober Inkubation

### **Inkubation schnell wachsender obligater Anaerobier und *P. aeruginosa***

Der Versuch wurde mit *Veillonella spp*, *C. difficile* und *Str. constellatus* nach Herstellung der Ausgangs-Lösung durchgeführt. Dazu wurden jeweils 5ml der TSB-Lösung des zu testenden Anaerobiers zusammen mit 5ml PAO-1-Ansatzes gemischt und eine Verdünnungsreihe angelegt, eine weitere nach 24 Stunden anaerober

Inkubation des gemeinsamen Ansatzes. Analog wurde für die Einzelansätze der Keime verfahren. Es erfolgte abschließend die photographische Dokumentation.

### **3.2.4 Optische Phänomene gegenseitiger Beeinflussung von *P. aeruginosa* und obligaten Anaerobiern**

In den folgenden Versuchen war die Zielstellung, optische Phänomene der gegenseitigen Beeinflussung unter gemeinsamer Bebrütung von *Veillonella spp*, *C. difficile*, *Str. constellatus* mit *P. aeruginosa* sichtbar zu machen.

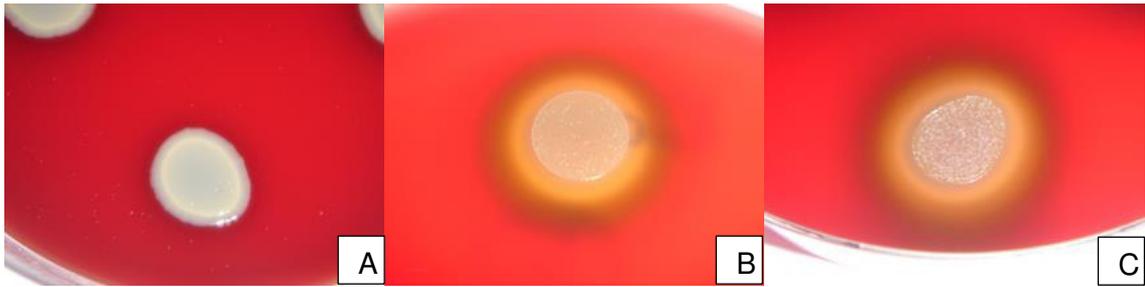
Dazu wurde eine neue Versuchsanordnung mit photographischer Dokumentation der Ergebnisse verbunden. Je 100µl der *P. aeruginosa*-Ausgangs-Lösung wurde auf die Nährböden geträufelt und dann mit einem sterilen Spatel (Drigalski-Spatel, VWR, Darmstadt, Deutschland) sorgfältig flächig verteilt. Je zwei von diesen wurden als Kontrollen in diesem Zustand inkubiert.

Auf die verbleibenden 12 Agar-Platten wurde im Anschluss auf jeweils zwei der verschiedenen Platten ein obligat anaerober Stamm zusätzlich aufgetragen. Dies erfolgte an vier gleichmäßig verteilten Punkten mit je einem 10µl-Tropfen des Ansatzes eines der drei Stämme. In dieser Art wurden auch von den Stämmen Kontrollen zur Vergleichbarkeit des Wachstums angefertigt (Abb. 7).

Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden anaerob beziehungsweise 3 und 7 Tage anaerob und nach der ersten Auswertung noch einmal für 24 Stunden aerob zur zweiten Begutachtung. Es sollte hierbei herausgestellt werden, inwieweit das Wachstum von *P. aeruginosa* durch die Anwesenheit der anaeroben Stämme beeinflusst wird.

Die Vermutung lautete, dass PAO-1 unter anaeroben Bedingungen nicht sichtbar bzw. als SCV wächst [vgl. Schneider et al. 2008] und durch das erfolgte Wachstum der Anaerobier bei der anschließenden aeroben Bebrütung trotz günstiger Bedingungen am Wachsen gehindert wird.

In den Folgeversuchen sollten auch für die Anaerobier Vor- oder Nachteile im Wachstum beim Kontakt mit *P. aeruginosa* herausgestellt werden. Die Versuchsanordnung war entsprechend der eben Beschriebenen, nun sind auch die Anaerobier ausplattiert und mit Tropfen von PAO-1 benetzt worden.



**Abb. 7:** Obligate Anaerobier allein aufgetropft in OD 0,05 nach 24 Stunden anaerober Inkubation; *Veillonella. spp.* (A) wächst flächig, während *C. difficile* (B) und *Str. constellatus* (C) um den Kolonierasen herum eine Verfärbung des Agars zeigen

Desweiteren wurde untersucht, welchen Einfluss Konzentrationsänderungen des aufgetropften Materials auf das Wachstum des ausplattierten Keimes hatten. Die punktuell aufgetragenen 10µl der Lösungen waren nun einmal in der Konzentration der ausplattierten Keimart, einmal in der Verdünnung 1:10, einmal 1:100 aufpipettiert worden, je eine Verdünnungsstufe je Agar-Platte, anschließend um die Verdünnungsstufe 1:1000 erweitert, alle 4 Verdünnungsstufen auf einer Agarplatte, um den Einfluss der Konzentrationsänderung differenzierter beurteilen zu können.

Zusätzlich zur Beurteilung des Phänotyps wurden Wachstumskontrollen angefertigt. Hierzu sind mittels Impföse nach beendeter Inkubation und Auswertung sowie photographischer Dokumentation aus dem Zentrum der Kolonie-Inseln Proben entnommen worden. Diese wurden auf Columbia-Agar übertragen und für 24 Stunden aerob bebrütet. Als Kontrolle wurden jeweils Kolonien aus der Umgebung der Inseln entnommen und ebenfalls inkubiert. Die Fragestellung dieser Anordnung war, ob sich nicht sichtbare lebensfähige Pseudomonaden in den Inseln nachweisen lassen.

### 3.3 Statistik

Metrische Variablen wie Bakterienzahlen wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben. Zudem wurden von den als explorative Testungen angelegten Versuchsreihen mit dem Student`s T-Test die p-Werte bestimmt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Bakterien-Nachweis in CF-Sputen

Es kamen 54 Sputumproben von 21 Patienten zur Auswertung, in welchen sich 70 Aerobier und 67 obligate Anaerobier nachweisen ließen. Es wurden in den Proben maximal 3 unterschiedliche aerobe und 4 anaerobe Bakterien nachgewiesen, die durchschnittliche Anzahl nachgewiesener unterschiedlicher aerober Bakterienspezies betrug pro entnommener Probe 1,3 (Bereich von 1 bis 3), die durchschnittliche Anzahl nachgewiesener obligater Anaerobier betrug pro Probe 1,2 (Bereich 0 bis 4).

Bei 14 der 21 Patienten konnte *P. aeruginosa* nachgewiesen werden (66,6%). In 23 der 54 Proben wurde *P. aeruginosa* nachgewiesen (42,6%), und in 8 Proben *S. aureus* (14,8%). Auch *S. sciuri* (9,3%) und *Burkholderia cepacia* (14,8%) konnten häufig nachgewiesen werden, eine Übersicht gibt Tab. 3.

Bei 17 Patienten konnten obligate Anaerobier nachgewiesen werden (80,9%). Die häufigste nachgewiesene Spezies war *Veillonella spp.*, danach sind in absteigender Häufigkeit *Peptostreptococcus spp.*, *Bacteroides spp.* und *Prevotella spp.* nachweisbar, s. Tab. 4.

#### 4.1.1 Persistenz der Bakterien in CF-Sputen

Eine wiederholte Beprobung war bei 13 der CF-Patienten möglich, 47 Proben gelangten zur Auswertung, in einer Probe waren keine Spezies identifizierbar. Pro Patient (n=21) wurden durchschnittlich 3,6 Proben untersucht (Bereich 2 bis 7); dabei traten pro Patient durchschnittlich 2,9 verschiedene Aerobier (Bereich 1 bis 7) und 2,9 verschiedene obligate Anaerobier (Bereich 0 bis 6) auf.

Ein wiederholtes Auftreten von Aerobiern war bei 8 der 13 Patienten (62 %) nachweisbar. Bei 2 der Probanden waren es zwei verschiedene wiederholt auftretende Bakterienspezies, die Bakterien wiederholten sich durchschnittlich 2,6 mal (Bereich 2 bis 4). Im anaeroben Bereich waren bei 5 der 13 Patienten (38 %) gleiche Bakterien wiederholt nachweisbar, in einem Fall waren es jeweils zwei verschiedene, sich wiederholende Bakterienspezies bei einem Probanden. Die Abb. 8 verdeutlicht exemplarisch das Keimspektrum eines Patienten.

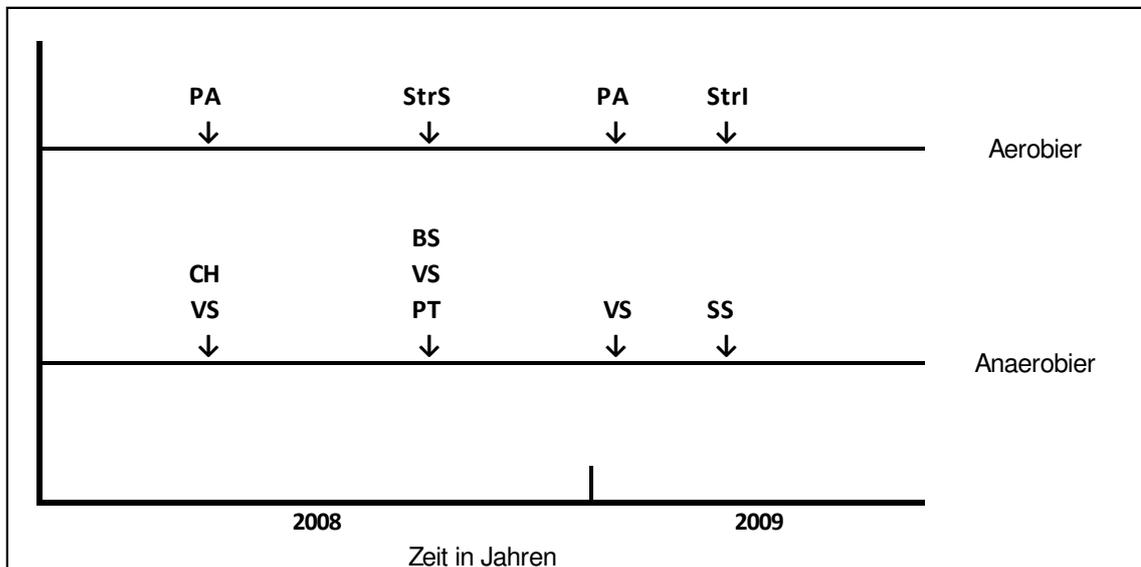
**Tab. 3: Aerobe Bakterien in CF-Sputen**

<b>Spezies</b>	<b>n=</b>	<b>Subspezies</b>	<b>n=</b>
<b><i>Pseudomonas</i></b>	26	<i>aeruginosa</i>	23
		<i>putida</i>	2
		<i>fluorescens</i>	1
<b><i>Staphylococcus</i></b>	15	<i>aureus</i>	8
		<i>sciuri</i>	5
		<i>haemolyticus</i>	1
		<i>simulans</i>	1
<b><i>Burkholderia</i></b>	9	<i>cepacia</i>	8
		<i>pickettii</i>	1
<b><i>Streptococcus</i></b>	8	<i>salivarius</i>	3
		<i>uberis</i>	2
		<i>mitis</i>	1
		<i>anginosus</i>	1
		<i>intermedius</i>	1
<b><i>Stomatococcus</i></b>	3	<i>mucilaginosus</i>	3
<b><i>Listeria</i></b>	2	<i>spp.</i>	2
<b><i>Chryseobacterium</i></b>	1	<i>gleum</i>	1
<b><i>Delftia</i></b>	1	<i>acidovorans</i>	1
<b><i>Enterococcus</i></b>	1	<i>faecalis (group D)</i>	1
<b><i>Lactococcus lactis</i></b>	1	<i>cremoris</i>	1
<b><i>Klebsiella</i></b>	1	<i>pneumoniae</i>	1
<b><i>Mannheimia</i></b>	1	<i>haemolytica</i>	1
<b><i>Stenotrophomonas</i></b>	1	<i>maltophilia</i>	1
<b>Gesamt</b>	<b>70</b>		<b>70</b>

**Tab. 4: Anaerobe Bakterien in CF-Sputen**

<b>Spezies</b>	<b>n=</b>	<b>Subspezies</b>	<b>n=</b>
<i>Veillonella spp.</i>	14		14
<i>Peptostreptococcus</i>	9	<i>prevotii</i>	4
		<i>tetradius</i>	2
		<i>anaerobius</i>	1
		<i>asaccharolyticus</i>	1
		<i>magnus</i>	1
<i>Bacteroides</i>	8	<i>stercoris</i>	5
		<i>tectum</i>	1
		<i>capillosus</i>	1
		<i>ureolyticus</i>	1
<i>Prevotella</i>	7	<i>loeschii</i>	2
		<i>melaninogenica</i>	2
		<i>corporis</i>	1
		<i>intermedia</i>	1
		<i>denticola</i>	1
<i>Staphylococcus</i>	6	<i>saccharolyticus</i>	6
<i>Clostridium</i>	6	<i>hastiforme</i>	2
		<i>limosum</i>	1
		<i>novyi</i>	1
		<i>perfringens</i>	1
		<i>tetani</i>	1
<i>Actinomyces</i>	3	<i>turicensis</i>	2
		<i>israelii</i>	1
<i>Streptococcus</i>	3	<i>constellatus</i>	2
		<i>intermedius</i>	1
<i>Bifidobacterium</i>	2	<i>spp.</i>	2
<i>Capnocytophaga</i>	2	<i>spp.</i>	2
<i>Gemella</i>	2	<i>morbilorum</i>	2
<i>Mobiluncus</i>	2	<i>curtisii</i>	2
<i>Fusobacterium</i>	1	<i>necrophorum</i>	1
<i>Propionibacterium</i>	1	<i>acnes</i>	1
<i>Wolinella</i>	1	<i>spp.</i>	1
<b>Gesamt</b>	<b>67</b>		<b>67</b>

Damit waren bei der Hälfte der Patienten mit Mehrfachbestimmungen identische Bakterien im Sputum nachzuweisen. In den anderen Fällen kam es zu einem Wechsel der Spezies.



**Abb. 8:** Exemplarische Darstellung der Mehrfachbestimmungen eines CF-Patienten  
 BS: *Bacteroides spezieis*, CH: *Clostridium hastiforme*, PT: *Peptostreptococcus tetradius*, PA: *Pseudomonas aeruginosa*, SS: *Staphylococcus saccharolyticus*, StrI: *Streptococcus intermedius*, StrS: *Streptococcus salivarius*, VS: *Veillonella spezieis*

#### 4.1.2 Reduktion der Bakterien nach Therapie von Exazerbationen

Es wurden 38 Proben von 16 verschiedenen Patienten zu den Zeitpunkten vor und nach antibiotischer i.v. Therapie ausgewertet. In 3 Fällen konnten Paare für den gleichen Patienten gebildet werden, es waren bei allen 3 die gleiche aerobe Spezies vor und nach antibiotischer i.v.-Therapie nachweisbar. Es handelte sich um *P. aeruginosa* und *S. sciuri* in einer Probe, um *P. aeruginosa* in der zweiten und um *Burkholderia cepacia* in der dritten Probe, zudem konnten auch unterschiedliche Spezies nachgewiesen werden (Tab. 5). *P. aeruginosa* und *S. sciuri* zeigten nach Therapie gefallene Koloniezahlen, während diese für *B. cepacia* anstiegen.

Im anaeroben Spektrum konnten von 4 Patienten Paare gebildet werden. *Veillonella spp.* ist hierbei neben anderen Spezies bei allen Patienten nachweisbar (Tab. 6).

Bei Betrachtung einzelner obligater Anaerobier bezüglich einer Reduktion der Bakterienzahl nach antibiotischer Therapie war das Ergebnis inhomogen. Exemplarisch ausgewählt war *Veillonella spp.* in der Keimzahl nach der Therapie nur

**Tab. 5: Aerobe Bakterienzahlen im Sputum dreier ausgewählter CF-Patienten**

Patienten	vor Therapie	nach Therapie
<b>Patient 1</b>	<i>P. aeruginosa</i> $1,0 \times 10^9$	<i>P. aeruginosa</i> $6,5 \times 10^5$
	<i>S. sciuri</i> $5,6 \times 10^5$	<i>S. sciuri</i> $2,5 \times 10^3$
	<i>S. aureus</i> $3,0 \times 10^5$	<i>Str. mitis</i> $8,0 \times 10^6$
<b>Patient 2</b>	<i>P. aeruginosa</i> $8,8 \times 10^7$	<i>P. aeruginosa</i> $2,4 \times 10^5$
		<i>Str. intermedius</i> $8,5 \times 10^5$
<b>Patient 3</b>	<i>B. cepacia</i> $2,5 \times 10^7$	<i>B. cepacia</i> $1,75 \times 10^8$

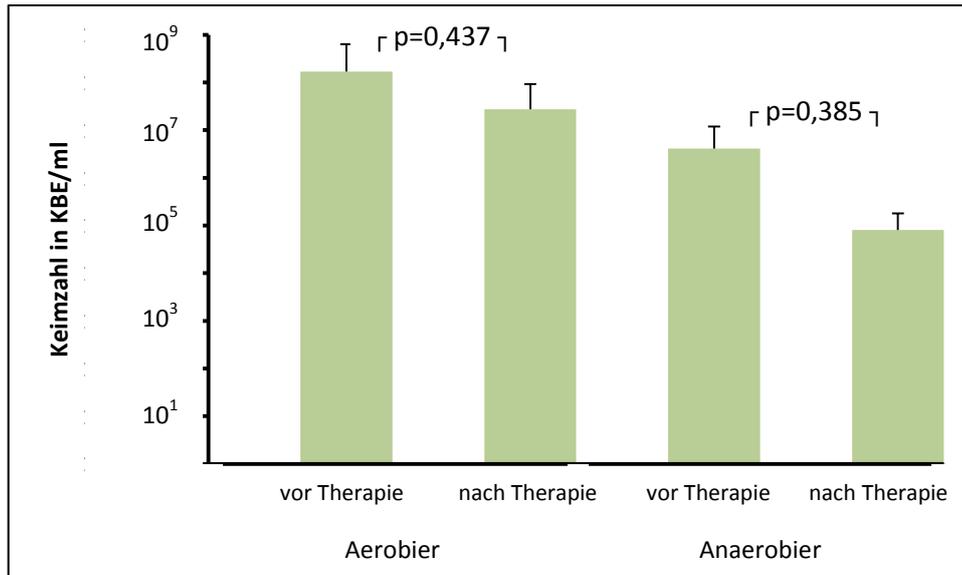
**Tab. 6: Anaerobe Bakterienzahlen von vier ausgewählten CF-Patientenpaaren**

	vor Therapie	nach Therapie
<b>Patient 1</b>	<i>Veillonella spp.</i> $5,5 \times 10^5$	<i>Capnocytophaga spp.</i> $2,5 \times 10^5$
	<i>Pr. corporis</i> $9,5 \times 10^6$	
<b>Patient 2</b>	<i>Veillonella spp.</i> $9 \times 10^6$	<i>Staph. saccharolyticus</i> $1,9 \times 10^5$
<b>Patient 3</b>	<i>Veillonella spp.</i> $5 \times 10^5$	<i>Veillonella spp.</i> $7,5 \times 10^6$
	<i>Ps. anaerobius</i> $1,3 \times 10^5$	<i>A. turicensis</i> $5 \times 10^6$
<b>Patient 4</b>	<i>Pr. loeschii</i> $1,5 \times 10^6$	<i>Veillonella spp.</i> $5,0 \times 10^4$

geringfügig verändert:  $4,4 \pm 6,3 \times 10^6$  vor Therapie und  $3,8 \pm 5,3 \times 10^6$  nach Therapie ( $p=0,897$ ).

Die Keimzahlen der Aerobier in allen Sputumproben vor und nach Therapie betragen vor Therapie  $1,7 \pm 4,6 \times 10^8$  und nach Therapie  $2,7 \pm 6,5 \times 10^7$  ( $p=0,437$ ). Die obligaten Anaerobier zeigten vor Therapie Zahlen von  $4,1 \pm 7,7 \times 10^6$  und von  $8,0 \pm 9,8 \times 10^4$  nach Therapie ( $p=0,385$ ), s. Abb. 9. Da die Werte in beiden Fällen nicht deutlich verändert waren, kann nicht von einer generellen Keimzahlreduktion durch die antibiotische Therapie ausgegangen werden. Auch für *P. aeruginosa* ließ sich im Vergleich der Keimzahlen vor und nach Therapie keine deutliche Keimzahlreduktion nachweisen ( $3,17 \pm 6,4 \times 10^8$  vor Therapie und  $5,63 \pm 9,0 \times 10^6$  nach Therapie;  $p=0,430$ ).

Eine deutliche Keimzahlreduktion nach einer Antibiose bei Exazerbation ließ sich somit weder für die Aerobier noch für die obligaten Anaerobier nachweisen.



**Abb. 9:** Gesamtzahlen der aeroben und der obligat anaeroben Bakterien im Vergleich vor und nach Therapie

#### 4.1.3 Resistenzen

Bei den obligaten Anaerobiern zeigten sich am häufigsten Resistenzen gegen Ceftazidim (69%), am seltensten gegen Meropenem (8%). Die höchste Sensibilität der Keime war für Meropenem und Piperacillin/Tazobactam nachweisbar (92% und 85%). Tab. 7 fasst die Ergebnisse für die einzelnen Stämme ohne Differenzierung in Subspezies zusammen.

**Tab. 7: Resistenztestung der obligat anaeroben Stämme (n= 13)**

Antibiotikum	sensibel	resistent
<b>Ceftazidim</b>	4 (31%)	9 (69%)
<b>Clindamycin</b>	9 (69%)	4 (31%)
<b>Meropenem</b>	12 (92%)	1 (8%)
<b>Metronidazol</b>	8 (62%)	5 (38%)
<b>Piperacillin/ Tazobactam</b>	11 (85%)	2 (15%)

Bei *Veillonella spp.* (n=10) waren geringe Abweichungen der Resistenzlage bei gleichen sowie bei unterschiedlichen Patienten und den einzelnen Antibiotika feststellbar. Während alle 10 getesteten *Veillonella*-Isolate resistent gegen

Piperacillin/Tazobactam und Ceftazidim sowie sensibel auf Metronidazol waren, ergaben sich für Clindamycin und Meropenem divergierende Ergebnisse (Tab. 8).

**Tab. 8: Resistenzmuster von *Veillonella spp.* aus CF-Patientenisolaten (n=10)**

	Zahl resistenter Stämme in %				
	Metronidazol	Clindamycin	Piperacillin/ Tazobactam	Meropenem	Ceftazidim
<b><i>Veillonella spp.</i></b>	0%	10%	100%	20%	100%

*S. saccharolyticus* hingegen lieferte bei 2 unterschiedlichen Patienten (n=5) unabhängig von einer stattgehabten Antibiose konsistente Ergebnisse (sensibel auf Metronidazol, Clindamycin, Meropenem, resistent gegen Piperacillin/Tazobactam, Ceftazidim).

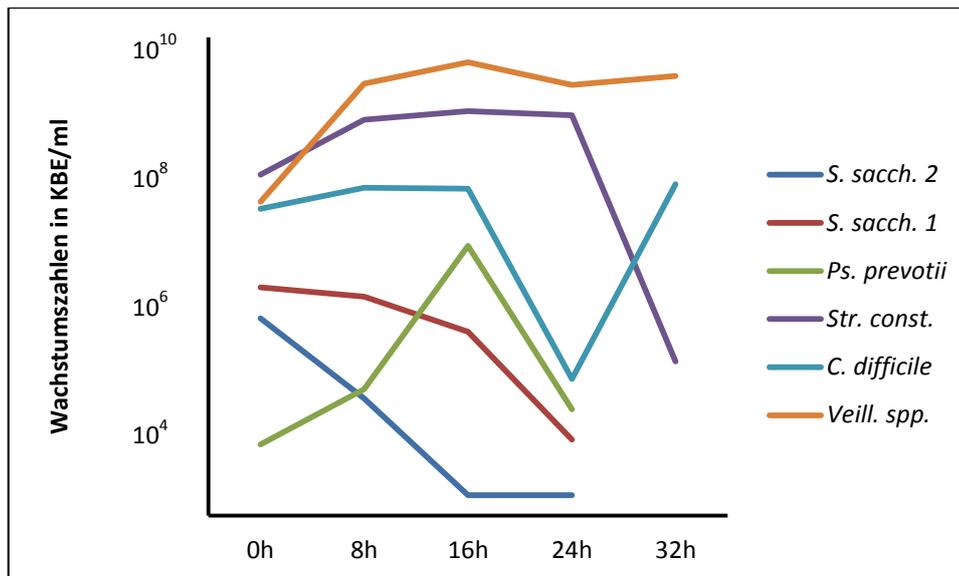
Ob zum Entnahmezeitpunkt der Probe eine antibiotische Therapie des Patienten stattgefunden hatte oder kürzlich abgeschlossen worden war, hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Resistenzlage. Desweiteren hatte die Herkunft der Bakterien von gleichen oder unterschiedlichen Patienten im Rahmen der antibiotischen Testungen keine Bedeutung. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zeigte sich eher abhängig von der Spezies und dem getesteten Antibiotikum; insgesamt waren die Ergebnisse für die einzelnen Bakterien deutlich heterogen.

## 4.2 *In vitro* Versuchsreihen

### 4.2.1 Selektion der obligaten Anaerobier

Aus einer Reihe von Anaerobiern wurden in Vorversuchen die drei am schnellsten wachsenden Bakterien ausgesucht. Dabei wurde postuliert, dass schnelles Wachstum mit einer erhöhten Pathogenität einhergeht.

Die Stämme *S. saccharolyticus* und *Ps. prevotii* zeigten geringere Wachstumszahlen und eine kürzere Lebensdauer, sie waren nach 24 Stunden das letzte Mal nachweisbar, während *Veillonella spp.*, *C. difficile* und *Str. constellatus* in höheren Zahlen wuchsen und *Str. constellatus* bis 32 Stunden, *Veillonella spp.* und *C. difficile* bis zum Endpunkt nach 72 Stunden noch nachweisbar waren, s. Abb. 10.



**Abb. 10:** Obligate Anaerobier bei alleiniger Inkubation in Flüssigmedium (*S. sacch.*: *Staphylococcus saccharolyticus*, *Str. const.*: *Streptococcus constellatus*, *Veill.spp.*: *Veillonella spezie*, h: Stunden)

Somit zeigten sich *Veillonella spp.*, *C. difficile* und *Str. constellatus* als schneller wachsend. Es erfolgte die Unterteilung der Anaerobier in zwei Gruppen (Tab. 9). Im Weiteren wurden nur die drei schnell wachsenden Isolate für die Pathogenitätsversuche verwendet.

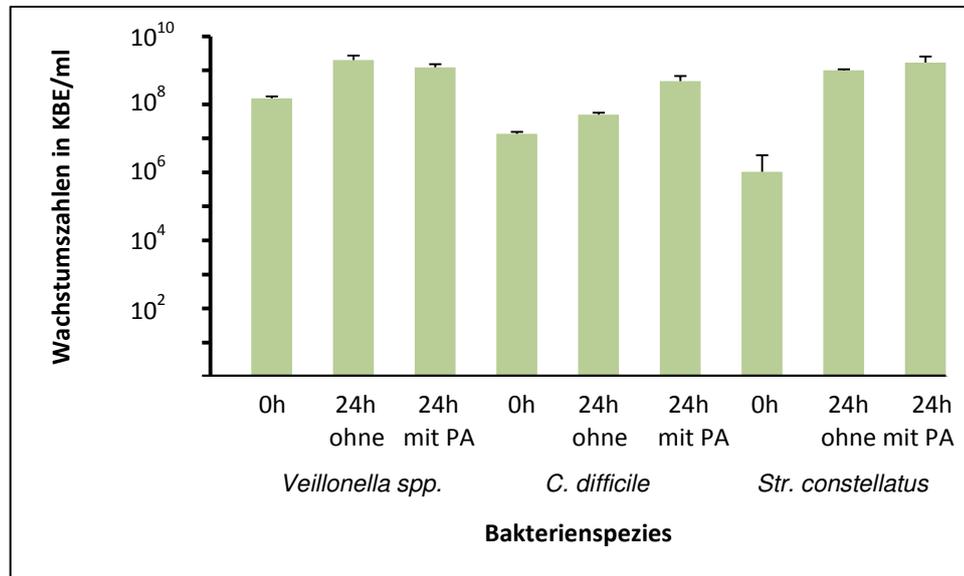
**Tab. 9: Gruppierung der getesteten Bakterienspezies nach Wachstumsgeschwindigkeit**

Schnell wachsende Spezies	Langsam wachsende Spezies
<i>Veillonella spp.</i>	<i>S. saccharolyticus</i> (n=2)
<i>Str. constellatus</i>	<i>Ps. prevotii</i>
<i>C. difficile</i>	

#### 4.2.2 Wachstum der obligaten Anaerobier

Alle drei obligaten Anaerobier zeigten, ob allein inkubiert oder mit *P. aeruginosa* gemeinsam, einen Anstieg im Wachstum um bis zu drei Zehnerpotenzen nach 24 Stunden Bebrütung für *Veillonella spp.* [ $1,5 \pm 0,2 \times 10^8$  zum Zeitpunkt 0 Stunden,  $2,0 \pm 0,7 \times 10^9$  allein nach 24 Stunden ( $p=0,067$ ),  $1,2 \pm 0,3 \times 10^9$  mit *P. aeruginosa* nach 24 Stunden ( $p=0,052$ )], *C. difficile* [ $1,4 \pm 0,2 \times 10^7$  allein nach 0 Stunden,  $5,0 \pm 0,7 \times 10^7$  allein nach 24 Stunden, ( $p=0,016$ );  $4,8 \pm 1,9 \times 10^8$  mit *P. aeruginosa* nach 24h ( $p<0,001$ )] und *S. constellatus* [ $1,1 \pm 2,1 \times 10^6$  allein zum Zeitpunkt 0 Stunden,  $1 \pm 0,07 \times 10^9$  allein nach 24 Stunden ( $p=0,002$ ),  $1,7 \pm 0,9 \times 10^9$  mit *P. aeruginosa* nach 24h ( $p=0,011$ )].

Dabei ließ sich für beide Zeitpunkte insgesamt kein Unterschied in den Keimzahlen der Anaerobier zwischen alleinigem und gemeinsamem Wachstum mit *P. aeruginosa* feststellen, lediglich *C. difficile* wuchs allein deutlich schlechter bei 24 Stunden ( $p < 0,001$ ), s. Abb. 11. Es kam zu einer erheblichen und zügigen Keimvermehrung der Anaerobier im Testzeitraum mit und ohne *P. aeruginosa*.



**Abb. 11:** Wachstum von obligaten Anaerobiern mit und ohne *P. aeruginosa* nach 0 und 24 Stunden Inkubationszeit (h: Stunden, PA: *Pseudomonas aeruginosa*)

#### 4.2.3 Hemmwirkung der obligaten Anaerobier auf das Wachstum von *P. aeruginosa*

Um die Wechselwirkung zwischen *Veillonella spp.* und *P. aeruginosa* darzustellen, wurden beide Bakterien mit einer Start-Keimzahl von  $5 \times 10^7$  KBE/ml für 24 Stunden inkubiert und dann in einer Verdünnungsreihe ( $10^{-3}$  bis  $10^{-10}$  KBE/ml) gemeinsam ausplattiert (Abb. 12A). *Veillonella spp.* waren bis zur Verdünnung  $10^{-5}$  nachzuweisen, während *P. aeruginosa* bis zu dieser Verdünnung nicht nachzuweisen war. Erst in den folgenden Verdünnungsstufen ( $10^{-6}$  bis  $10^{-9}$ ), bei denen kein Wachstum von *Veillonella spp.* mehr vorlag, waren die Pseudomonaden sichtbar. In einem weiteren Versuch wurde die Lösung mit gleicher Start-Keimzahl sowie in Verdünnung ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) in Tropfen auf eine mit *P. aeruginosa*-Lösung beimpften Agarplatte aufgebracht. Es zeigte sich kein Koloniewachstum von *P. aeruginosa* dort, wo Kolonien von *Veillonella spp.* wuchsen, jedoch bis an die Tropfen heran (Abb. 12B).

Analog wurde mit den anderen Anaerobiern verfahren. Das Koloniewachstum von *C. difficile* war bis zu einer Verdünnung von  $10^{-3}$  nachweisbar, dort waren keine Kolonien

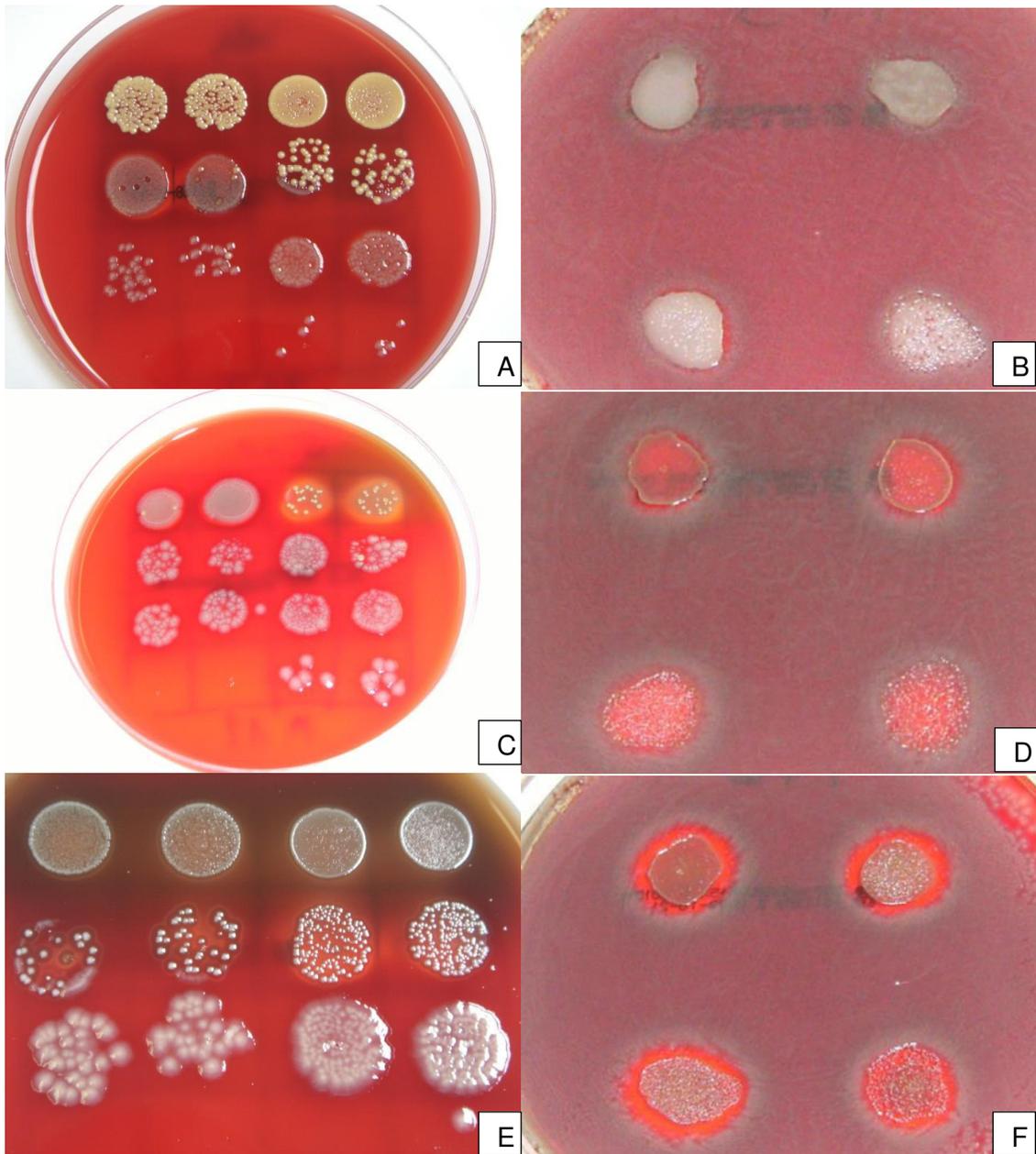
von *P. aeruginosa* sichtbar, erst danach (ab  $10^{-4}$ ) waren in Abwesenheit des obligaten Anaerobiers Kolonien von *P. aeruginosa* gewachsen (Abb. 12C). Der Auftropfversuch zeigte ebenfalls keine Kolonien von *P. aeruginosa* dort, wo Kolonien von *C. difficile* wuchsen (Abb. 12D), in den höheren Konzentrationen (beide oberen Tropfen, entspricht Start-OD und  $10^{-1}$ ) war diese Wirkung auch in einem Hof um den Tropfen herum nachweisbar. Auch für *Str. constellatus*, der bis zu einer Verdünnung von  $10^{-6}$  wuchs, war diese Hemmwirkung auf das Koloniewachstum von *P. aeruginosa* nachweisbar. Erst danach (ab  $10^{-7}$ ) waren die Kolonien von *P. aeruginosa* flächig gewachsen (Abb. 12E). Der Auftropfversuch (Abb. 12F) zeigte bis zur geringsten Verdünnung von *Str. constellatus* eine Hemmwirkung auf das Wachstum von *P. aeruginosa*, dies traf auch für den Hof um den Tropfen herum zu. Auch hier war keine Kolonie von *P. aeruginosa* gewachsen.

### **Hemmwirkung der obligaten Anaerobier auf das Wachstum von *P. aeruginosa* in veränderter Versuchsanordnung**

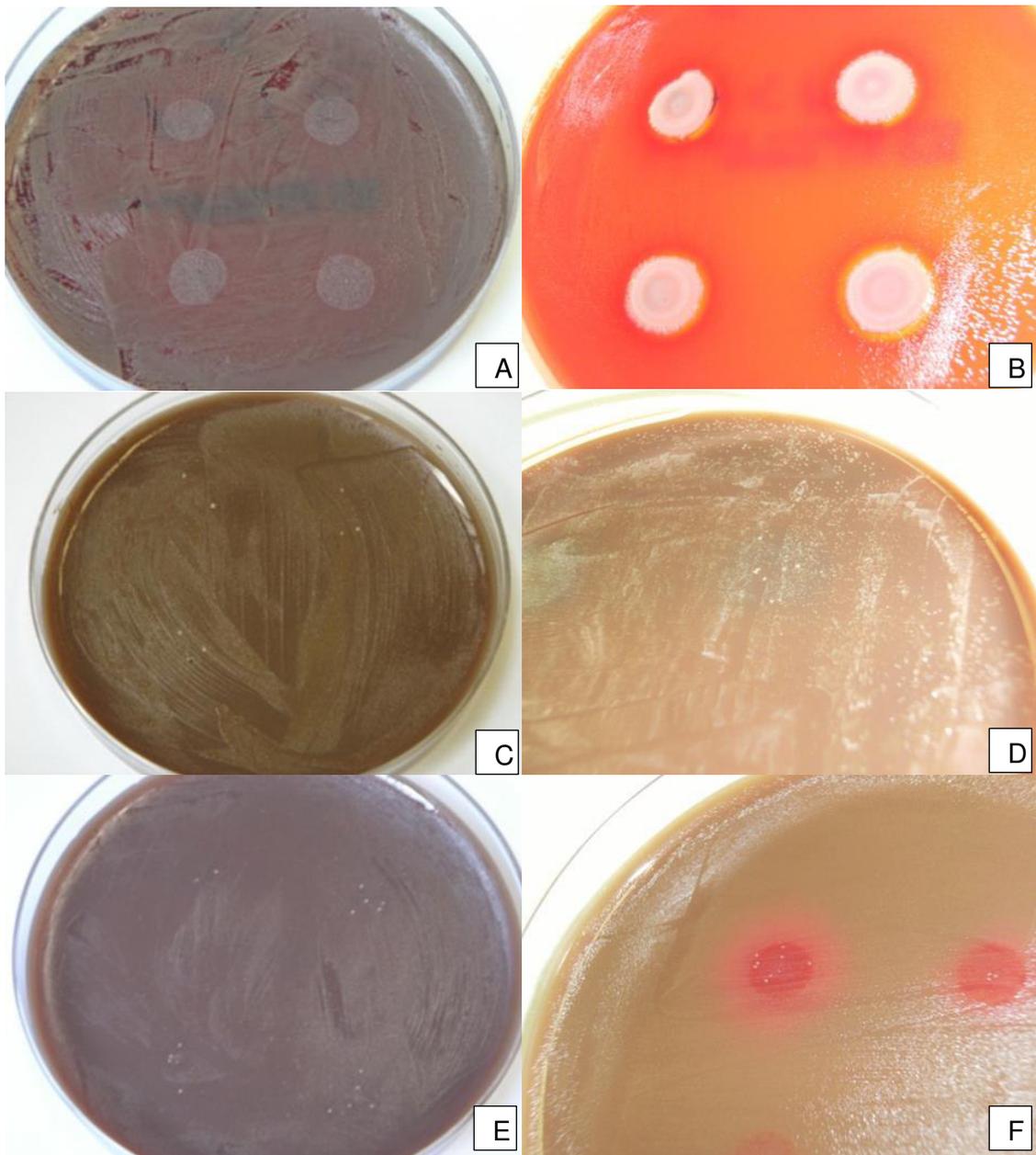
Die nun ausplattierten obligaten Anaerobier in gleichbleibender Start-Konzentration mit aufgetropfter *P. aeruginosa*-Lösung in unterschiedlichen Konzentrationen ließen in keiner Konzentration unter anaerober Inkubation eine sichtbare Durchsetzung mit SCV zu. Sie selbst bildeten kleine Kolonien in großer Dichte, es fiel zudem eine flächige Verfärbung des Agars trotz kurzer Inkubationszeit auf.

Gemeinsam mit *Veillonella spp.* konnte *P. aeruginosa* in allen Konzentrationen Kolonien ausbilden. Sowohl nach kurzer Inkubationszeit von 24 Stunden (Abb. 13A) als auch nach verlängerter Inkubation von 72 Stunden (Abb. 13B).

Gemeinsam mit *C. difficile* konnte *P. aeruginosa* nach beiden Zeiträumen in allen Konzentrationen nur Einzelkolonien ausbilden (Abb. 13C und Abb. 13D), in geringeren Konzentrationen gar keine Kolonien mehr. Zusammen mit *Str. constellatus* konnten nur noch Einzelkolonien von *P. aeruginosa* wachsen, in den geringeren Konzentrationen wuchsen die Kolonien inhomogen (Abb. 13E), zudem fiel nach verlängerter Inkubation eine Verfärbung des Agars unter dem Tropfen auf (Abb. 13F).



**Abb. 12:** Wachstumshemmung von *P. aeruginosa* nach Inkubation im Flüssigmedium bis zu einer Verdünnung von  $10^{-5}$  durch *Veillonella* spp. (A),  $10^{-3}$  durch *C. difficile* (C), und  $10^{-6}$  durch *Str. constellatus* (E). Während für *Veillonella* spp. auf Nährböden nur ein geringer Hemmeffekt sichtbar war (B), entstanden unterschiedlich stark ausgeprägte Hemmhöfe und Zonen verdichteten Wachstums nach gleichzeitigem Aufbringen eines Rasens von *P. aeruginosa* und verdünnten Lösungen ( $10^0$  bis  $10^{-3}$ ) der obligaten Anaerobier *C. difficile* (D) und *Str. constellatus* (F).



**Abb. 13:** Darstellung der Interaktionen zwischen *P. aeruginosa* (aufgetropft) und den im Rasen ausgesäten obligaten Anaerobiern *Veillonella* spp. (A, B), *C. difficile* (C, D) und *Str. constellatus* (E, F)

Es zeigt sich nur ein geringer Hemmeffekt für *Veillonella* spp.. *C. difficile* und *Str. constellatus* dagegen zeigen auch bei dieser Versuchsanordnung einen erheblichen hemmenden Einfluss auf *P. aeruginosa*, ob nach einem Tag (C, E) oder nach verlängerter Inkubation (D, F). *Str. constellatus* bewirkt zusätzlich nach längerer Bebrütung eine rote Verfärbung im Bereich der Interaktionszone (F).

#### 4.2.4 Reversibilität der anaeroben Hemmwirkung auf *P. aeruginosa*

Da nicht auszuschließen war, dass *P. aeruginosa*, z.B. in Form von SCV innerhalb der aufgetropften Anaerobier-Lösungen nicht sichtbar vorlag, wurden aerobe Kontrollen

unter Verwendung der Nährmedien SCS und CDC durchgeführt, Tab. 10 fasst die Ergebnisse zusammen.

*P. aeruginosa* war nach Inkubation mit *Veillonella spp.* in allen Verdünnungen auf beiden Nährmedien nachweisbar. Der inhibitorische Effekt dieses Bakteriums war also nur vorübergehend.

Dagegen zeigte sich eine persistierende Hemmung des Wachstums von *P. aeruginosa* bei den geringen Verdünnungen von *C. difficile* und *Str. constellatus*. Bei den höheren Verdünnungen aber war *P. aeruginosa* nach aerober Inkubation wieder nachweisbar, der Effekt war also wiederum nur vorübergehend.

Somit handelte es sich bei der Wachstumshemmung von *P. aeruginosa* durch die obligaten Anaerobier überwiegend um ein Phänomen, welches unter anaerober Inkubation vorlag, in der Anwesenheit von Sauerstoff, aber zumindest bei geringen Keimzahlen der obligaten Anaerobier reversibel war.

**Tab. 10: Aerobe Kontrollen der aufgetropften obligaten Anaerobier auf ein Wachstum von *P. aeruginosa***

Ansatz	1	2 CDC	3	4	5 SCS	6
<b><i>Veillonella spp.</i></b>						
Verdünnung 1:1	+	+	+	+	+	+
Verdünnung 1:10	+	+	+	+	+	+
Verdünnung 1:100	+	+	+	+	+	+
Verdünnung 1.1000	+	+	+	+	+	+
<b><i>C. difficile</i></b>						
Verdünnung 1:1	-	-	-	-	-	-
Verdünnung 1:10	-	-	+	-	-	-
Verdünnung 1:100	+	+	+	-	-	-
Verdünnung 1.1000	+	+	+	-	-	+
<b><i>Str. constellatus</i></b>						
Verdünnung 1:1	-	-	-	-	-	-
Verdünnung 1:10	-	-	-	-	-	-
Verdünnung 1:100	-	-	-	-	-	-
Verdünnung 1.1000	-	+	+	-	-	+

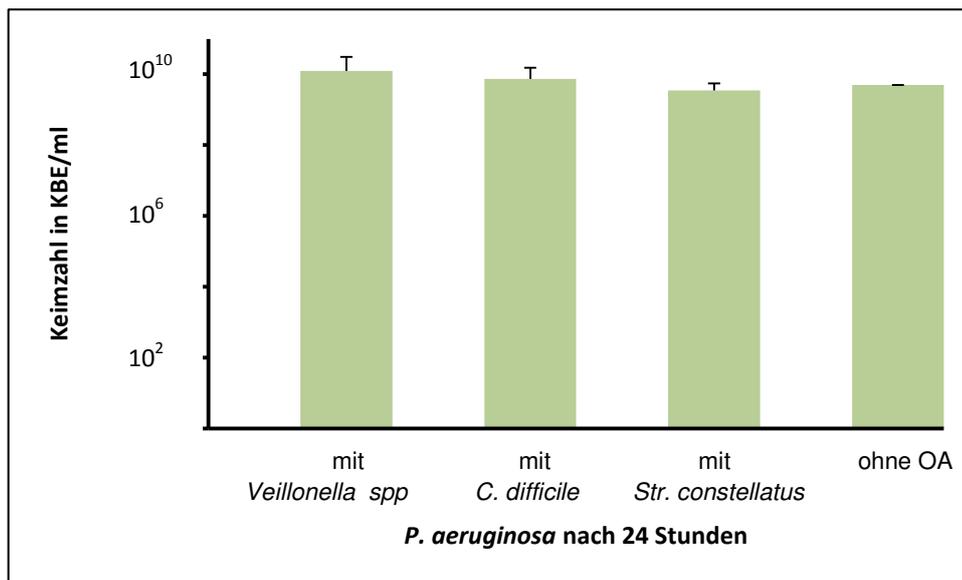
+: Wachstum, -: kein Wachstum von *P. aeruginosa*

Die aeroben Kontrollen der aufgetropften *P. aeruginosa*-Lösung auf die ausplattierten obligaten Anaerobier zeigten ausnahmslos einen positiven Nachweis von *P. aeruginosa* in allen Verdünnungsstufen auf den mit *Veillonella spp.* benetzten Agar-

Platten. Für *C. difficile* und *Str. constellatus* hingegen war die Testung stets und für alle Verdünnungsstufen negativ.

#### 4.2.5 Wachstumszahlen von *P. aeruginosa* bei gemeinsamer Inkubation mit obligaten Anaerobiern

Nach 24 Stunden gemeinsamer Inkubation zeigte sich kein Unterschied im Wachstum von *P. aeruginosa* mit und ohne gemeinsame Inkubation mit den drei untersuchten obligaten Anaerobiern. Auch nach Verlängerung der Inkubationszeit auf bis zu 7 Tage bestand kein Unterschied (Abb. 14).



**Abb. 14:** Wachstum von *P. aeruginosa* mit und ohne obligate Anaerobier nach 24 Stunden (OA: obligate Anaerobier)

Bei gemeinsamer Inkubation von *P. aeruginosa* gemeinsam mit *Veillonella spp*, *C. difficile* und *Str. constellatus* ließ sich kein deutlicher Unterschied in den Wachstumszahlen von *P. aeruginosa* nachweisen. Hingegen war phänotypisch eine hemmende Wirkung durch die obligaten Anaerobier auf *P. aeruginosa* aufgetreten. Hierbei zeigte sich ein Unterschied zwischen den obligaten Anaerobiern: Während die Wirkung *Veillonella spp* zwar hemmend war, ist dieser Effekt jedoch reversibel gewesen, also nach Umsetzen auf ein neues Medium konnten wieder Kolonien von *P. aeruginosa* wachsen. Hingegen wirkten *C. difficile* und noch ausgeprägter *Str. constellatus* persistierend inhibierend auf die Koloniebildung von *P. aeruginosa*.

## 5 Diskussion

### 5.1 Nachgewiesenes Bakterienspektrum in den Sputen von CF- Patienten

Im Vergleich zur vorangegangenen Untersuchung von Worlitzsch et al. [2009] ist das Vorkommen der häufigsten obligaten Anaerobier in Sputumproben von CF-Patienten bestätigt, wenngleich auch die Häufigkeit des Nachweises abweichend ist. So wurden *S. saccharolyticus* und *Actinomyces spp.* in der Vorstudie deutlich häufiger identifiziert als in dieser Erhebung, *Prevotella* und *Bacteroides spp.* deutlich seltener.

Die Prävalenz obligater Anaerobier bei den Patienten ist vergleichbar. Dies bestätigt unabhängig von der Identifikation der einzelnen Stämme eine hohe Prävalenz obligater Anaerobier in der Lunge der CF-Patienten.

Das durch Rogers et al. [2004] in den Sputen von CF-Patienten nachgewiesene Spektrum obligater Anaerobier von durchschnittlich 13 verschiedenen Spezies pro Probe und Patient konnte in dieser Breite in der vorliegenden Erhebung nicht bestätigt werden. Es waren bei 81% der Patienten (n=21) obligate Anaerobier nachweisbar, im Durchschnitt 2,9 verschiedene Spezies pro Patient.

Dies könnte in den unterschiedlichen Methoden liegen, eine PCR stellt eine wesentlich sensitivere Methodik zur Identifikation der Anaerobier dar, sodass auch geringere Bakterienzahlen ausreichen, um den Erreger nachzuweisen. Zudem wären auch Unterschiede auf Grund des sich unterscheidenden Patienten-Pools denkbar, ein Erregeraustausch könnte durch Kontakt der Patienten im Rahmen von ambulanten Vorstellungen oder stationären Aufenthalten stattfinden.

Letztlich wären eine weitere mögliche Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse der Spezies Unterschiede in der Taxonomie. Es handelt sich hierbei nicht um ein statisches Konstrukt, sondern um ein Änderungen unterworfenen System.

In dieser Arbeit wurde auf die durch Koneman et al. [1997] eingeteilte Klassifikation zurückgegriffen, jedoch keine Unterscheidung der Anaerobier in die Gruppen aerotolerant, strikt und moderat anaerob getroffen. Durch die Kultur im aeroben Milieu als Negativ-Kontrolle wurden alle Bakterien, die Wachstum zeigten, als aerob klassifiziert und nicht weiter anaerob inkubiert. Im Weiteren wurden die durch die Hersteller der Identifikationssysteme Vitek (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) und RapID ANA II (Oxoid, Basingstoke, Hants, UK) bzw. ERIC-Software (remel, Lenexa, KS, USA) festgelegten Namen und Unterscheidungen in aerob und anaerob beibehalten.

Das wiederholte Nachweisen identischer aerober (8 von 13 Patienten) und anaerober (5 von 13 Patienten) Bakterien bei Mehrfachbeprobungen der einzelnen Patienten weist in Zusammenschau der Biofilmbildung und damit einer herabgesetzten Wirksamkeit der Antibiosen sowie der Resistenzen der obligaten Anaerobier auf eine Persistenz der Bakterien in der CF-Lunge hin. Eine Persistenz von *P. aeruginosa* und *S. aureus* in den Lungen von CF-Patienten wurden bereits in anderen Studien nachgewiesen [Goerke et al. 2000, Jelsbak et al. 2007] sowie ein Nachweis gleicher obligater Anaerobier über 11 Monate [Worlitzsch et al. 2009] hinweg geführt. Natürlich ist auch eine Neu-Besiedlung nicht auszuschließen.

## **5.2 Einfluss antibiotischer Therapie auf die Bakterienzahlen**

Ein Vergleich der Bakterienzahlen von vor einer antibiotischen Therapie im Exazerbationsfall und nach einer solchen antibiotischen Therapie ergab keinen deutlichen Abfall der Bakterienzahlen. Dies traf sowohl für Aerobier als auch für Anaerobier zu.

Damit ist unabhängig von der Wirksamkeit einzelner Substanzen auf bestimmte Zielerreger - allen voran *P. aeruginosa* - generell *in vivo* nicht von einem nachhaltigen Effekt auszugehen. Nichtsdestotrotz ist die Reduktion der Bakterien nicht die Zielgröße einer antibiotischen Therapie, denn obwohl die Zahlen nicht fallen, kommt es zu einer klinischen Besserung der Patienten sowie einem Anstieg der Lungenfunktionsparameter FEV<sub>1</sub> und FVC [Worlitzsch et al. 2009]. Eine ausbleibende deutliche Reduktion der Bakterienzahlen nach antibiotischer Behandlung eines Exazerbationsereignisses bestätigt die Ergebnisse von Untersuchungen in der Vergangenheit [Worlitzsch 2009, Tunney 2008].

## **5.3 Reagibilität der obligaten Anaerobier auf ausgewählte Antibiotika**

Die Auswahl der Antibiotika in den Resistenztestungen der obligat anaeroben Patientenisolate erfolgte in dieser Studie nach deren Wirksamkeit gegen *P. aeruginosa*. Als hochpathogener Erreger in der CF-Lunge werden antibiotische Therapien im klinischen Alltag auf diesen ausgerichtet.

Es wurden hier Meropenem, Ceftazidim und Piperacillin/Tazobactam gewählt, da diese übliche Antibiotika in der Therapie von Exazerbationsereignissen darstellen [Kerem et al. 2005]. Zudem wurden Wirkstoffe nach deren Wirksamkeit gegen obligate Anaerobier ausgewählt - hier wurden Metronidazol und Clindamycin verwendet -, wobei es sich bei diesen Substanzen nicht um klassischerweise in der CF-Therapie verwendete Stoffe handelt [Kerem et al. 2005]. Das Ergebnis der Resistenzlage im

Sinne einer nur unzureichenden Wirkung auf die obligaten Anaerobier ist mit Untersuchungen anderer Autoren übereinstimmend [Worlitzsch 2009, Tunney 2008]. So zeigte sich eine unzureichende Wirkung von Ceftazidim auf die obligaten Anaerobier, wobei es sich hier um ein Präparat handelt, welches in der Therapie von Exazerbationsereignissen häufig als intravenöse Medikation im untersuchten Patienten-Pool der CF-Sprechstunde des Universitätsklinikums Halle (Saale) eingesetzt wird.

Geeigneter sind im Hinblick auf eine gute Wirksamkeit gegen obligate Anaerobier Meropenem und Piperacillin/Tazobactam mit Resistenzraten von 8% beziehungsweise 15%. Da diese Substanzen ebenfalls eine gute Wirksamkeit auf *P. aeruginosa* aufweisen, wären diese Antibiotika in der CF-Therapie als Therapeutika einsetzbar.

Gerade im Hinblick auf eine wirksame Antibiose in der Infektsituation muss, obgleich *P. aeruginosa* den Zielerreger der Antibiose darstellt, auf das unterschiedliche Resistenz-Spektrum der einzelnen obligaten Anaerobier hingewiesen werden. So konnte für *Veillonella spp.* eine Veränderung des Resistenzverhaltens nach Antibiose bei einem Exazerbationsereignis festgestellt werden, vor Therapie war der Erreger auf Clindamycin sensibel, danach resistent. Auch besteht bei *Veillonella spp.* zu 100% eine Resistenz gegen das bei den übrigen getesteten Anaerobiern so wirksame Piperacillin/Tazobactam.

Dies spielt in Zusammenschau mit dem Resistenzverhalten von *P. aeruginosa* zur Wahl der wirksamsten Antibiose eine entscheidende Rolle [vgl. Bauernfeind 1987]. Sofern auch eine Wirksamkeit auf die obligat anaeroben Keime beabsichtigt ist, stellt zur Wahl der geeigneten Antibiose die Kenntnis des individuellen Keim-Spektrums in der Lunge des zu therapierenden Patienten einen nicht zu vernachlässigenden Faktor dar.

Auf Grund der großen Varianz der nachgewiesenen obligaten Anaerobier mit jeweils divergierendem Resistenzverhalten kann eine kalkulierte antibiotische Behandlung kaum suffizient sein. Es besteht also hinsichtlich einer potenten Antibiose die Notwendigkeit, über die Wirksamkeit auf *P. aeruginosa* hinaus das deutlich inhomogene Resistenzspektrum der obligaten Anaerobier zu berücksichtigen. Auch auf ein jeweils durchgeführtes Antibiogramm kann angesichts des unterschiedlichen Resistenzspektrums innerhalb der Spezies nicht verzichtet werden. Nicht zuletzt muss die Frage geklärt werden, ob und in wieweit einzelne obligate Anaerobier-Spezies zukünftig Ziel einer Antibiose darstellen werden.

Ein weiterer Faktor in der Bewertung der Antibiotika-Wirksamkeit in der CF-Lunge stellt das sauerstoffarme bzw. -freie Milieu des Mukus dar [Worlitzsch et al. 2002]. Eine ausreichende Verteilung der Substanz und antibiotische Wirkung ist im hypoxischen Umfeld des Mukus nicht gewährleistet. Selbst wenn es sich um eine Substanz handelt, auf welche die vorhandenen Erreger sensibel reagieren, stellt die Umgebung der CF-Lunge eine größere Herausforderung dar, weil die Substanzen nur eingeschränkt wirken können.

#### **5.4 Pathogenitätstestungen**

Es wurden zur Bearbeitung der Frage, inwieweit es durch Wechselwirkungen von obligaten Anaerobiern und *P. aeruginosa* zu messbaren Veränderungen in Bakterienzahl- und Phänotyp kommt, verschiedene Versuchsanordnungen genutzt, die während der Studie mehrfach abgewandelt und angepasst worden sind. Um bestmögliche experimentelle Bedingungen für eine vergleichende Darstellung der Wachstumsverhältnisse von *P. aeruginosa* und den obligaten Anaerobiern zu schaffen, mussten zunächst geeignete Anaerobier selektiert werden. Die Auswahl wurde aus in Vorstudien [Worlitzsch et al. 2009] als häufig nachgewiesenen Keimen in den Sputen von CF-Patienten getroffen, um klinische Relevanz zu erreichen.

Es zeigte sich eine leichte Verbesserung des Wachstums von *S. saccharolyticus* und *Ps. prevotii*, wenn diese mit *P. aeruginosa* gemeinsam inkubiert worden waren. Dieses war zwar nicht signifikant, lässt jedoch einen protektiven Effekt durch *P. aeruginosa* auf die obligaten Anaerobier vermuten.

Unter Laborbedingungen lässt sich ein solcher Effekt erklären, da für die Bearbeitung der Nährmedien die Bakterien für kurze Zeit der für sie toxischen Raumluft ausgesetzt werden und durch *P. aeruginosa* schädliche Einwirkungen auf die Anaerobier verringert werden. Es handelt sich also tatsächlich um obligat anaerobe Spezies. *S. saccharolyticus* und *Ps. prevotii* fanden in dieser Arbeit keine weitere Beprobung unter der Annahme, dass auf Grund der geringeren Wachstumszahlen und der kürzeren Lebensdauer im Vergleich zu den verwendeten Testspezies nicht von einer hohen Pathogenität ausgegangen wurde.

Damit wäre der Einfluss auf *P. aeruginosa* gering und der Stellenwert im Erregerspektrum in der CF-Lunge als weniger hoch einzustufen. Natürlich bleibt unklar, wie sich in der polymikrobiellen Umgebung der CF-Lunge die Anwesenheit auch dieser Erreger auswirkt.

#### **5.4.1 Einfluss von *P. aeruginosa* auf die Wachstumszahlen der obligaten Anaerobier**

Es konnte eine deutliche Zunahme der Bakterienzahl von *Veillonella spp*, *C. difficile* und *Str. constellatus* gezeigt werden. Damit konnte zum Einen die Einhaltung des anaeroben Milieus gezeigt werden, zum Anderen bestand kein Unterschied in den Wachstumszahlen im Vergleich vom Wachstum der obligaten Anaerobier allein und mit *P. aeruginosa* gemeinsam.

Damit scheint die Anwesenheit von *P. aeruginosa* keinen Effekt auf die Anaerobier auszuüben. In vivo wäre durch die Bildung eines Biofilmes durch *P. aeruginosa* hingegen ein protektiver Effekt zu vermuten, in der künstlich erzeugten anaeroben Umgebung hingegen kommt dieser Unterschied nicht zum Tragen. Jedoch zeigten sich mit dem Ergebnis auch keine Konkurrenzsituationen um Nährstoffe auf.

#### **5.4.2 Phänotyp der Kolonien von *P. aeruginosa* und der obligaten Anaerobier**

Die Dokumentation phänotypischer Auffälligkeiten der Koloniebildung erfuhr einige Limitationen: Es wurden Photos der Verdünnungsreihen und der Auftropfversuche angefertigt. Dabei waren Abbildungen von SCV nicht möglich, da die Kolonien für die herkömmliche Kamera zu klein waren, ein Versuch mit der Mikroskop-Kamera scheiterte leider, auch hier waren die Kolonien nicht abbildbar. Die stets notwendige aerobe Nachinkubation verfälscht möglicherweise die Ergebnisse, jedoch war sonst ein Sichtbarmachen der Kolonien nicht möglich.

In dieser Untersuchung zeigten sich unter anaerober Inkubation SCV von *P. aeruginosa*, welche die an die sauerstoffarme Umgebung angepasste Kolonieform darstellen. In der CF-Lunge wurden aber auch Subtypen von *P. aeruginosa* nachgewiesen, die durch vermehrte Adhärenz und Pili-Bildung stärker zur Ausbildung von Biofilmen neigen [Häußler et al. 2003, Chiang und Burrows 2003].

Auch eine mukoide Variante existiert, deren Vorkommen im Sputum im Gegensatz zur nicht-mukoiden Variante mit einer schlechteren FEV<sub>1</sub> bei CF-erkrankten Kindern und Jugendlichen einhergeht [Henry et al. 1982]. In der Lunge von CF-Patienten existieren besondere Verhältnisse, an die sich *P. aeruginosa* in hohem Maße durch verschiedene Strategien anzupassen vermag. Welche Mechanismen jedoch von in vitro gewonnenen Erkenntnissen auf in vivo-Situationen übertragbar sind, ist noch Gegenstand der Forschung, und es bestehen Hinweise auf Abweichungen [Nelson et al. 2010].

Wie die Photos der Auftropfversuche, in denen *P. aeruginosa*-Lösung ausplattiert und Tropfen von *Veillonella spp.*, *C. difficile* und *Str. constellatus* in unterschiedlichen Verdünnungsstufen aufgebracht worden sind, zeigten, waren im Bereich aller obligaten Anaerobier keine Kolonien von *P. aeruginosa* sichtbar, aus den Inseln von *Veillonella spp.* waren allerdings in den Wachstumskontrollen nach Überimpfen auf eine neues Medium Kolonien anzüchtbar.

Es kommt es bei *C. difficile* und betonter noch bei *Str. constellatus* im Umkreis der Kolonien zu einer optischen Veränderung des Agars, in dem eine Koloniebildung von *P. aeruginosa* nicht möglich ist. Mehr noch ist sogar aus Ausstrichen aus diesen Höfen mehrfach keine Anzucht lebensfähiger Kolonien von *P. aeruginosa* möglich gewesen, es bestand also keine Reversibilität dieses Effektes. Es handelte sich also um eine hemmende Wirkung durch die obligaten Anaerobier, welche nicht nur in direktem Kontakt, sondern auch in unmittelbarer Umgebung nachweisbar ist.

Um die Hemmhöfe kam es zur Bildung von Zonen verdichteten Wachstums bei *P. aeruginosa*. Auch bei umgekehrter Versuchsanordnung mit Ausplattieren der obligaten Anaerobier und Auftropfen von *P. aeruginosa*-Lösung waren diese Phänomene nachweisbar, nur gering für *Veillonella spp.*, ausgeprägter für *C. difficile* und *Str. constellatus*.

Es kam bei beiden Letzteren nur zur Bildung von Einzelkolonien von *P. aeruginosa*, unabhängig von der aufgetragenen Konzentration. In den Wachstumskontrollen waren keine Kolonien nach Umsetzen auf ein neues Medium anzüchtbar, der Effekt war also vollständig nicht reversibel.

Hieraus lässt sich schließen, dass die hemmende Wirkung von einem durch die obligaten Anaerobier abgesonderten Stoffwechselprodukt verursacht wird, oder durch die direkte Konkurrenz um Nährstoffe, in der der obligate Anaerobier im Vorteil wäre.

Der Phänotyp der Verdünnungsreihen zeigte eine deutliche Hemmung von *P. aeruginosa* durch die Anwesenheit der Kolonien der obligaten Anaerobier, jedoch war hier der zeitliche Zusammenhang, der sich in den Keimzahlen zeigte, nicht nachweisbar.

Für alle Zeitpunkte war das Wachstum der Kolonien von *P. aeruginosa* gehemmt im Bereich der Kolonien der obligaten Anaerobier, für *Veillonella spp.* war dieser Effekt geringer ausgeprägt als für *C. difficile* und *Str. constellatus*. Auch in den hohen Verdünnungsstufen war dieser Einfluss noch nachweisbar.

### **5.4.3 Einfluss der obligaten Anaerobier auf die Wachstumszahlen von *P. aeruginosa***

Die Anwesenheit aller drei obligaten Anaerobier übte auf *P. aeruginosa* keinen deutlichen hemmenden Einfluss im frühen Wachstum nach 24 Stunden Inkubation aus ( $1,2 \pm 1,9 \times 10^{10}$  KBE/ml gemeinsam mit *Veillonella spp*,  $7,4 \pm 7,9 \times 10^9$  KBE/ml gemeinsam mit *C. difficile*,  $3,5 \pm 2,0 \times 10^9$  gemeinsam mit *Str. constellatus* und  $5,0 \pm 1,4 \times 10^5 \times 10^9$  ohne obligaten Anaerobier). Auch zu späteren Zeitpunkten nach verlängerter Inkubation bis zu 7 Tage Dauer waren keine Unterschiede in den Wachstumszahlen nachweisbar. In vivo stellt sich die Frage, inwieweit dieser frühe Zeitpunkt eine zutreffende Situation darstellt, denn einmal kolonisiert, findet kaum eine Eradikation von *P. aeruginosa* statt, es ist also in der CF-Lunge eher von einer fortgeschrittenen Wachstumssituation auszugehen.

### **5.4.4 Einfluss auf das Koloniewachstum von *P. aeruginosa* durch die Nährmedien**

Eine mögliche Einflussnahme entsteht durch die verwendeten Nährmedien: CDC-Agar ist für die anaerobe Bebrütung gedacht, es kann also bei den aeroben Nachbebrütungen zu Verfälschungen gekommen sein, da der Agar für die aerobe Bebrütung nicht konzipiert ist, also die Bedingungen für *P. aeruginosa* möglicherweise dadurch schlechter waren als für die Anaerobier.

Es ist außerdem ein Selektivmedium für anaerobe, langsam wachsende Keime, auf dem zwar auch die meisten anderen mikroaerophilen, fakultativ anaeroben und aeroben Erreger wachsen, jedoch ist natürlich die Zusammensetzung für deren Ansprüche nicht genau zugeschnitten.

Auch der SCS-Agar ist ein Medium zur Anzucht anaerober Keime und gram-negativer anaerober Stäbchen, besonders gute Bedingungen bietet er *Bacteroides spp.* und *Prevotella spp.* Eine Anzucht von *P. aeruginosa* oder die aerobe Inkubation sind nicht vorgesehen. Der deutliche Unterschied des Wachstums von *P. aeruginosa* auf den mit den obligaten Anaerobiern beimpften Agarplatten zwischen SCS-Agar und CDC-Agar in den Auftropfversuchen mit höherer Verdünnung führt zu der Annahme, dass es auf Grund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Nährmedien zu einem Wachstumsvorteil von *P. aeruginosa* auf dem CDC-Agar bzw. Nachteil auf SCS-Agar kommt.

Dieses Ergebnis war für alle drei obligaten Anaerobier nachweisbar. In der Versuchsanordnung erfolgte zunächst die anaerobe Inkubation, nach der das

Wachstum der obligaten Anaerobier nachweisbar war, jedoch von *P. aeruginosa* keine sichtbaren Kolonien, auch keine SCV, gebildet wurden.

In Anbetracht der Tatsache, dass auch bei alleiniger Inkubation von *P. aeruginosa* keine sichtbaren Kolonien nach 24 Stunden anaerober Bebrütung nachweisbar waren, jedoch nach aerober Nachbebrütung stets wuchsen, kann die Schlussfolgerung lauten, dass der negative Einfluss auf die Koloniebildung von *P. aeruginosa* auch bei anschließender aerober Inkubation mit einem Aufbrauchen der Nährstoffe durch die obligaten Anaerobier in Zusammenhang steht.

## Fazit

In der Therapie der Cystischen Fibrose nimmt die Behandlung pulmonaler Infekte einen großen Stellenwert ein. Die chronische Infektsituation ist bisher trotz aller Fortschritte der heutigen therapeutischen Möglichkeiten noch immer nicht beherrscht. Bisher ist keine suffiziente Strategie entwickelt worden, diese zu begrenzen, sodass es sich hierbei um den lebenslimitierenden Aspekt der Erkrankung für viele Betroffene handelt. Neue therapeutische Ansätze sind deshalb dringend erforderlich.

Aus der phänotypischen Wachstumshemmung durch *C. difficile* und *Str. constellatus* lässt sich schlussfolgern, dass deren negativer Einfluss auf *P. aeruginosa* nicht nur dessen Wachstum hemmt, sondern zu dessen Absterben führt, da keine lebensfähigen Erreger mehr nachweisbar waren. Es bleibt zu untersuchen, ob dieser Effekt nur *in vitro* besteht, oder ob auch in der CF-Lunge ein solch immenser hemmender Einfluss auf *P. aeruginosa* besteht, denn sollte dies der Fall sein, würden sich hieraus völlig neue Erkenntnisse der Pathogenese der Erkrankung und neue Therapieansätze ergeben. Es bleibt vor dem Hintergrund der Keimpersistenz der obligaten Anaerobier und auch von *P. aeruginosa* allerdings zu bedenken, dass im Milieu der CF-Lunge ein lange bestehendes Gleichgewicht vorherrscht, das sich einerseits zeitlich sehr lange hat entwickeln können und andererseits aus einer polymikrobiellen Umgebung besteht, in der sich die Wirkungen einzelner Erreger nur schwer werden differenzieren lassen. Hinzu kommt, dass nur im Zentrum der Mukus-Plaques vollständig anaerobe Verhältnisse existieren, während in deren Peripherie noch Sauerstoff vorhanden ist, der ein Wachstum von obligaten Anaerobiern unmöglich macht.

Auf Grund des großen Vorkommens obligater Anaerobier, welches auch in dieser Untersuchung gezeigt werden konnte, muss zukünftig vermehrt die Frage nach der Wirksamkeit der gängigen Therapeutika auf diese Erreger gestellt werden. Da sich

eine unzureichende Sensibilität der Anaerobier auf die gängigen, auf *P. aeruginosa* wirkenden Antibiotika gezeigt hat, müssen neue Therapieansätze erwogen werden. Denn weder die obligaten Anaerobier, noch der eigentliche Ziel-Erreger *P. aeruginosa* sinken tatsächlich in ihrer Koloniezahl.

Bezüglich einer Empfehlung einer suffizienten Antibiose bleibt natürlich die Beantwortung der Frage ausstehend, in wie weit eine hohe Bakterienlast obligater Anaerobier in der CF-Lunge eine Persistenz oder das Wachstum nachweislich pathogener Erreger wie *P. aeruginosa* beeinflussen, und ob eine Reduktion der anaeroben Spezies tatsächlich eine Veränderung in Milieu oder Erregerlast der Aerobier in der Lunge zur Folge haben. Letzten Endes entscheidend und zukünftig zu untersuchen bleibt jedoch die Frage, ob es zu einer klinischen Besserung der CF-Patienten führt, wenn durch eine wirksame Therapie gegen obligate Anaerobier eine Keimzahlreduktion erfolgt.

## 6 Zusammenfassung

In der Therapie der Cystischen Fibrose (Synonym: Mukoviszidose, CF) stehen bislang keine kausalen Therapie-Ansätze zur Verfügung, weshalb auch heute noch die Lebenserwartung der betroffenen Patienten deutlich reduziert ist. Hierbei ist der hauptsächlich lebenslimitierende Faktor der pulmonale Infekt. Ursächlich hierfür ist die chronische Besiedlung mit verschiedenen Erregern, allen voran *P. aeruginosa*, aber auch *S. aureus*. Zudem ist in der jüngeren Forschung der Nachweis der Besiedlung der CF-Lunge mit obligat anaeroben Bakterien erfolgt, die im von *P. aeruginosa* begünstigten, hypoxischen Biofilm ein geeignetes Milieu vorfinden.

In dieser Untersuchung wurden 54 Sputumproben von 21 CF-Patienten ausgewertet. Es wurden alle aeroben und anaeroben Bakterienspezies identifiziert und quantifiziert. Hierzu wurden die biochemischen Identifikationssysteme Vitek und RapID ANA II verwendet. Es wurden Mehrfachproben von den jeweiligen Patienten erhoben, um ein wiederholtes Auftreten gleicher Erreger zu untersuchen sowie um eine Veränderung des Erregerspektrums qualitativ und quantitativ zu messen.

Zudem wurden die anaeroben Bakterien auf ihr Resistenzverhalten gegenüber den Antibiotika Ceftazidim, Meropenem, Piperacillin/Tazobactam, Clindamycin und Metronidazol mit Hilfe des E-Tests untersucht.

Zusätzlich wurden Pathogenitätstestungen durchgeführt, diese hatten als gemeinsame Zielstellung, die gegenseitige Beeinflussung der in der Lunge der CF-Patienten vorkommenden Bakterien zu ermitteln. Der Fokus lag hierbei einmal auf *P. aeruginosa*, der bei Weitem als häufigster fakultativer Anaerobier im Sputum der Erkrankten nachgewiesen worden ist.

Zum anderen wurden die obligaten Anaerobier, deren Vorkommen in der CF-Lunge in jüngsten Untersuchungen bestätigt werden konnte, einbezogen. Es wurden in verschiedenen Versuchsanordnungen *P. aeruginosa* und die obligaten Anaerobier *Veillonella spp*, *C. difficile* und *Str. constellatus* gemeinsam und jeweils allein auf Agarplatten in Verdünnungsreihen inkubiert, in TSB in verschiedenen Konzentrationen inkubiert und in Auftropfversuchen auf den Phänotyp der Kolonien hin untersucht. All diese Versuchsanordnungen wurden quantitativ ausgewertet und photographisch dokumentiert.

Im Ergebnis konnte bei 14 der 21 Patienten *P. aeruginosa* nachgewiesen werden (67%), ebenfalls häufig waren *S. aureus* und *Burkholderia cepacia*. Bei 81% der Patienten waren obligate Anaerobier nachweisbar, hier traten am häufigsten *Veillonella spp.*, *Peptostreptococcus spp.* und *Bacteroides spp.* auf. Bei Mehrfachbeprobungen der Patienten traten identische anaerobe Erreger in 38% der Fälle wiederholt auf. Ein Vergleich der Bakterienzahlen vor und nach einem Exazerbationsereignis mit intravenöser antibiotischer Therapie ergab keine Reduktion der Bakterienzahlen, weder der aeroben noch der anaeroben Bakterien. In den Antibiotikatestungen zeigten sich die größten Resistenzen für Ceftazidim (69%), auch Metronidazol und Clindamycin wiesen hohe Resistenzraten auf (38% und 31%). Die besten Ergebnisse erzielten Piperacillin/Tazobactam (15% resistent) und Meropenem (8%).

Bei gemeinsamer Inkubation der obligaten Anaerobier mit *P. aeruginosa* konnte im Vergleich zur Inkubation der Anaerobier *Veillonella spp.*, *C. difficile* und *Str. constellatus* alleine kein Unterschied in den Wachstumszahlen nachgewiesen werden, es kam zu einem deutlichen Anstieg der Bakterienzahlen in jeweils beiden Gruppen im Zeitraum von 24 Stunden. Für *P. aeruginosa* konnte weder nach 24 Stunden noch nach verlängerter Inkubation bis zu 7 Tagen ein Unterschied in den Wachstumszahlen bei alleiniger Inkubation und Inkubation gemeinsam mit *Veillonella spp.*, *C. difficile* und *Str. constellatus* festgestellt werden. Phänotypisch trat unter anaerober Inkubation *P. aeruginosa* in SCV auf. Es kam bei gemeinsamer Inkubation in Auftropfversuchen zu einer Wachstumshemmung der Kolonien von *P. aeruginosa*.

Dies trat für *Veillonella spp.* nur auf dem jeweiligen Agar und in unmittelbarer Nähe der Kolonien auf. Hingegen war die Koloniebildung von *P. aeruginosa* in Gegenwart von *C. difficile* und *Str. constellatus* auch nach Umsetzen auf ein neues Medium gehemmt gewesen, die Wachstumshemmung war also nicht reversibel. Zudem trat sie auch in der Umgebung der Kolonien auf, es bildete sich ein deutlicher Hemmhof um die Tropfen herum. *P. aeruginosa* bildete Zonen verdichteten Wachstums jeweils um diesen Hemmhof herum liegend.

Es ließen sich in den Sputen der Patientenproben mit großer Häufigkeit obligate Anaerobier nachweisen. Auch nach mehrfachen Beprobungen und nach antibiotischen Therapien waren gleiche Erreger nachweisbar und ein Absinken der Keimzahlen blieb aus. Dies zeigt die nur ungenügsame Wirksamkeit der Antibiotika, die in dem für die obligaten Anaerobier idealen hypoxischen Milieu der CF-Lunge keinen ausreichenden Angriffspunkt finden. In dieser Umgebung ist auch *P. aeruginosa* gezwungen, sich den Verhältnissen anzupassen, was für den fakultativen Anaerobier keine Hürde darstellt.

Die Ausbildung von SCV, wie sie sich in den in-vitro-Versuchen zeigten, ist eine Möglichkeit. Zudem könnte sich der Erreger auch die Anwesenheit der obligaten Anaerobier zu Nutze machen, in dieser Arbeit allerdings war bei gemeinsamem Wachstum kein Einfluss auf die Koloniezahl von *P. aeruginosa* feststellbar.

Dies ließ sich nach kurzer Inkubationszeit von 24 Stunden und nach längerer Inkubation in den Wachstumszahlen zeigen. Allerdings war im Phänotyp durchaus ein negativer Effekt auf die Koloniebildung von *P. aeruginosa* nicht nur unmittelbar, sondern auch in einigem Abstand von den Kolonien der obligaten Anaerobier in unterschiedlicher Ausprägung nachweisbar, dieser Einfluss war teilweise irreversibel.

Es muss im Weiteren untersucht werden, ob dieser Einfluss auch in der CF-Lunge besteht und wie sich andere obligate Anaerobier auf *P. aeruginosa* auswirken und natürlich, wie ihre Wirkung aufeinander ist. Denn die Resistenzlage der obligaten Anaerobier auf die gängigen Antibiotika, die gegen *P. aeruginosa* wirken, erfordert zunehmend eine gezielte Therapie auf einzelne Erreger.

Um hierbei jedoch effizient diejenigen Bakterien zu bekämpfen, die das größte Pathogenitätspotential aufweisen, muss zunächst geklärt werden, inwieweit jeder dieser Erreger für sich und im Zusammenspiel mit den anderen Bakterien der CF-Lunge die chronische Infektion unterhält und befördert.

## 7 Literaturverzeichnis

Bartlett JG (1994) *Clostridium difficile*: history of its role as an enteric pathogen and current state of knowledge about the organism. *Clin Infect Dis* 18:18265-18272

Bauernfeind A, Emminger G, Hörl G, Ott S, Przyklenk B, Weisslein-Pfister C (1987) Bacteriological effects of anti-pseudomonas aeruginosa chemotherapy in cystic fibrosis. *Infection* 15:403-406

Bhatti MA, Frank MO (2000) *Veillonella parvula* Meningitis: Case Report and Review of *Veillonella* Infections. *Clin Infect Dis* 31:839-840

Borriello SP (1998) Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother* 41:13-19

Bragonzi A, Worlitzsch D, Pier GB, Timpert P, Ulrich M, Hentzer M, Andersen JB, Givskov M, Conese M, Döring G (2005) Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* Expresses Alginate in the Lungs of Patients with Cystic Fibrosis and in a Mouse Model. *J Infect Dis* 192:410-419

Brook I (1996) *Veillonella* infections in children. *J Clin Microbiol.* 34:1283- 1285

Chiang P, Burrows LL (2003) Biofilm Formation by Hyperpilated Mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 185:2374–2378

Costerton JW (2002) Anaerobic biofilm infections in cystic fibrosis. *Mol Cell* 10:699-700

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

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

Eckert AW, Maurer P, Wilhelms D, Schubert J (2005) Keimspektren und Antibiotika bei odontogenen Infektionen. *Mund Kiefer Gesichtschir* 9:377–383

Eckert AW, Maurer P, Wilhelms D, Schubert J (2005) Weichteilinfektionen in der Mund-Kiefer- und Plastischen Gesichtschirurgie. *Mund Kiefer Gesichtschir* 9:389–395

- Fuchs HJ, Borowitz DS, Christiansen DH, Morris EM, Nash ML, Ramsey BW, Rosenstein BJ, Smith AL, Wohl ME (1994): Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 331:637-642
- Goerke C, Kraning K, Stern M, Döring G, Botzenhart K, Wolz C (2000) Molecular epidemiology of community-acquired *Staphylococcus aureus* in families with and without cystic fibrosis patients. *J Infect Dis* 181:984-989
- 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
- Harris JK, De Groote MA, Sagel SD, Zemanick ET, Kapsner R, Penvari C, Kaess H, Deterding RR, Accurso FJ, Pace NR (2007) Molecular identification of bacteria in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:20529-20533
- Häußler S, Ziegler I, Löttel A, von Götz F, Rohde M, Wehmhöner D, Saravanamuthu S, Tümmler B, Steinmetz I (2003) Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *J Med Microbiol* 52:295-301
- Henriques B, Florin I, Thelestam M (1987) Cellular internalisation of *Clostridium difficile* toxin A. *Microb Pathog* 2:455-463
- Henry RL, Dorman DC, Brown J, Mellis C (1982) Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Paediatr Child Health* 18:43-45
- Jelsbak L, Johansen HK, Frost AL, Thøgersen R, Thomsen LE, Ciofu O, Yang L, Haagensen JAJ, Høiby N, Molin S (2007) Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients. *Infect Immun* 75:2214-2224
- Kelly CP, Lamont JT (1998) *Clostridium difficile* Infection. *Annu Rev Med* 49:375-390
- Kerem E, Conway S, Elborn S, Heijerman H, and For the Consensus Committee (2005) Standards of care for patients with cystic fibrosis: A European consensus. *J Cyst Fibros* 4:7-26
- Klipper R, Buhl U, Schleifer KH (1980) Nucleic acid homology studies between *Peptococcus saccharolyticus* and various anaerobic and facultative anaerobic gram-positive cocci. *FEMS Microbiol. Lett.* 8:205- 210

- Koch C, Høiby N (1993) Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet* 341:1065-1069
- Koneman EW, Allend SD, Janda WM: The anaerobic bacteria. In: Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC jr. (eds): *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Lippincott, Philadelphia-New York, 1997, pp. 709-784
- Kuriyama T, Nakagawa K, Kawashiri S, Yamamoto E, Nakamura S, Karasawa T (2000) The virulence of mixed infection with *Streptococcus constellatus* and *Fusobacterium nucleatum* in a murine orofacial infection model. *Microbes Infect* 2:1425-1430
- Krishnan S, Haglund L, Ashfaq A, Leist P, Roat T (1996) Prosthetic Valve Endocarditis Due To *Staphylococcus saccharolyticus*. *Clin Infect Dis* 22:722- 723
- Leuckfeld I, Paster BJ, Kristoffersen AK, Olsen I (2010): Diversity of *Veillonella* spp. from subgingival plaque by polyphasic approach. *APMIS* 118:230- 243
- Ludwig W, Schleifer K, Fox GE, Seewaldt E, Stackebrandt E (1981) A phylogenetic analysis of staphylococci, *Peptococcus saccharolyticus* and *Micrococcus mucilaginosus*. *J Gen Microbiol* 125:357- 366
- Matsui H, Randell SH, Peretti SW, Davis CW, Boucher RC (1998) Coordinated clearance of periciliary liquid and mucus from airway surfaces. *J Clin Invest* 102:1125-31
- Nam HJ, Kang JK, Kim SK, Ahn KJ, Seok H, Park SJ, Chang JS, Pothoulakis C, Lamont JT, Kim H (2010) *Clostridium difficile* Toxin A Decreases Acetylation of Tubulin, Leading to Microtubule Depolymerization through Activation of Histone Deacetylase 6, and This Mediates Acute Inflammation. *J Biol Chem* 285:32888- 32896
- Nelson LK, Stanton MM, Elphinstone REA, Helwerda J, Turner RJ, Ceri H (2010) Phenotypic diversification in vivo: *Pseudomonas aeruginosa* gacS–strains generate small colony variants in vivo that are distinct from in vitro variants. *Microbiology* 156:3699-3709
- Olson AB, Sibley CD, Schmidt L, Wilcox MA, Surette MG, Corbett CR (2010) Development of Real-Time PCR Assays for Detection of the *Streptococcus milleri* Group from Cystic Fibrosis Clinical Specimens by Targeting the *cpn60* and 16S rRNA Genes. *J Clin Microbiol.* 48:1150-1160

- Piscitelli SC, Shwed J, Schreckenberger P, Danziger LH (1992) *Streptococcus milleri* group: Renewed interest in an elusive pathogen. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11:491-498
- Pothoulakis C, Lamont JT (2001) Microbes and Microbial Toxins: Paradigms for Microbial- Mucosal Interactions II. The integrated response of the intestine to *Clostridium difficile* toxins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:178- 183
- Proctor RA, Von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, Peters G (2006) Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* 4:295-305
- Ratjen F, Döring G (2003) Cystic fibrosis. *Lancet* 361 681-689
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B-S, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou J-L, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui L-C (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. *Science* 245:1066-1073
- Rogers GB, Carroll MP, Serisier DJ, Hockey PM, Jones 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
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, et al (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245:1059-65
- Rovero C, Etienne A, Foucault C, Berger P, Brouqui P (2005) *Veillonella montpellierensis* Endocarditis. *Emerg Infect Dis* 11:1112- 1114
- Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN (2009) *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 7:526-536
- Schneider M, Mühlemann K, Droz S, Couzinet S, Casaulta C, Zimmerli S (2008) Clinical Characteristics Associated with Isolation of Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from Respiratory Secretions of Patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol* 46:1832-1834
- Shah A, Panjabi C, Nair V, Chaudhry R, Thukral SS (2008) *Veillonella* as a cause of chronic anaerobic pneumonitis. *Int J Infect Dis.* 12:115- 117

- 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
- Sibley CD, Sibley KA, Leong TA, Grinwis ME, Parkins MD, Rabin HR, Surette MG (2010) The *Streptococcus milleri* population of a cystic fibrosis clinic reveals patient specificity and intraspecies diversity. *J Clin Microbiol.* 48:2592- 2594
- Siqueira JF, Rôças IN, Souto R, De Uzeda M, Colombo AP (2002) Actinomyces Species, Streptococci, and Enterococcus faecalis in Primary Root Canal Infections. *J Endod* 28:168-172
- Starkey M, Hickman JH, Ma L, Zhang N, De Long S, Hinz A, Palacios S, Manoil C, Kirisits MJ, Starner TD, Wozniak DJ, Harwood CS, Parsek MR (2009) *Pseudomonas aeruginosa* Rugose Small-Colony Variants Have Adaptations That Likely Promote Persistence in the Cystic Fibrosis Lung. *J Bacteriol* 191:3492-3503
- Taylor L, Corey M, Matlow A, Sweezey NB, Ratjen F (2006) Comparison of throat swabs and nasopharyngeal suction specimens in non-sputum-producing patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 41:839-843
- The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Cystic Fibrosis Mutation Data Base. <http://www.genet.sickkids.on.ca/ConsortiumDataPage1/> (am 27.01.2013)
- Tunney MM, Field TR, Moriarty TF, Patrick S, Döring G, Muhlebach S, 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
- Valerius NH, Koch C, Høiby N (1991) Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in cystic fibrosis by early treatment. *Lancet* 338:725-726
- Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ (2002) The Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros* 1:13-29
- Westbloom TU, Gorse GJ, Milligan TW, Schindzielorz AH (1990) Anaerobic Endocarditis Caused by *Staphylococcus saccharolyticus*. *J Clin Microbiol* 28:2818-2819

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

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

Wu X, Yu C, Wang X (2009) A case of *Staphylococcus saccharolyticus* pneumonia. *Int J Infect Dis* 13:43-46

## 8 Anhang

### 8.1 In-vivo-Versuchsreihen

Probe	Aerobier	Keimzahlen in KBE/ml	Anaerobier	Keimzahlen in KBE/ml
1			<i>Ps. anaerobius</i> <i>Veillonella spp.</i>	1,3x10 <sup>5</sup> 5,0x10 <sup>5</sup>
2	<i>Chr. gleum</i> <i>B. pickettii</i>	2,0x 10 <sup>4</sup>  2,0x10 <sup>5</sup>	<i>A. turicensis</i> <i>C. perfringens</i> <i>Str. intermedius</i> <i>Prop. acnes</i>	8,0x10 <sup>5</sup> 1,5x10 <sup>6</sup> 2,0x10 <sup>5</sup> 1,5x10 <sup>5</sup>
3	<i>S. sciuri</i>	3,0x10 <sup>4</sup>	<i>A. turicensis</i> <i>Veillonella spp.</i>	5,0x10 <sup>6</sup> 7,5x10 <sup>6</sup>
4	<i>P. aeruginosa</i> <i>Listeria spp.</i> <i>S. haemolyticus</i>	2,6x10 <sup>5</sup> 2,5x10 <sup>3</sup> 2,5x10 <sup>3</sup>		
5	<i>S. aureus</i>	3,5x10 <sup>4</sup>		
6	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. faecalis</i>	6,1x10 <sup>7</sup> 4,5x10 <sup>5</sup>	<i>Ps. prevotii</i> <i>S. sacchr.</i>	5,0x10 <sup>2</sup> 3,5x10 <sup>5</sup>
7	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>	3,3x10 <sup>6</sup> 3,5x10 <sup>6</sup>	<i>Pr. melan.</i>	5,0x10 <sup>7</sup>
8	<i>B. cepacia</i> <i>Stomat. muc.</i> <i>Str. uberis</i>	1,4x10 <sup>8</sup>		
9	<i>B. cepacia</i>	2,5x10 <sup>7</sup>	<i>Pr. loeschii</i> <i>B. stercoris</i>	1,5x10 <sup>6</sup>
10	<i>B. cepacia</i>	1,8x10 <sup>8</sup>	<i>Veillonella spp.</i>	5,0x10 <sup>4</sup>
11	<i>S. sciuri</i>	2,0x10 <sup>4</sup>		
12	<i>Str. uberis</i> <i>St. maltophilia</i>	2,4x10 <sup>6</sup> 5,0x10 <sup>6</sup>	<i>Veillonella spp.</i> <i>C. hastiforme</i>	1,5x10 <sup>6</sup> 4,0x10 <sup>5</sup>
13	<i>Str. salivarius</i> <i>B. cepacia</i>			
14	<i>P. aeruginosa</i> <i>Str. mitis</i> <i>S. sciuri</i>	6,5x10 <sup>5</sup> 8,0x10 <sup>6</sup> 2,5x10 <sup>3</sup>	<i>Capnocytophaga spp.</i>	2,5x10 <sup>5</sup>
15			<i>Ps. asacchr.</i>	6,7x10 <sup>6</sup>
16	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. sciuri</i>	6,6x10 <sup>6</sup> 5,6x10 <sup>5</sup>	<i>Pr. corporis</i> <i>Veillonella spp.</i>	9,5x10 <sup>6</sup> 5,5x10 <sup>5</sup>
17			<i>Mob. curtisii</i>	3,7x10 <sup>6</sup>
18	<i>P. aeruginosa</i>	2,0x10 <sup>9</sup>		

	<i>S. aureus</i>	3,0x10 <sup>5</sup>		
19	<i>P. aeruginosa</i> <i>P. putida</i>	8,5x10 <sup>7</sup> 3,5x10 <sup>7</sup>		
20	<i>S. simulans</i> <i>P. fluorescens</i>			
21	<i>B. cepacia</i>	2,8x10 <sup>8</sup>		
22	<i>P. aeruginosa</i>	1,2x10 <sup>8</sup>		
23	<i>P. aeruginosa</i>	2,8x10 <sup>8</sup>		
24	<i>S. aureus</i>	2,0x10 <sup>8</sup>		
25	<i>S. sciuri</i> <i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	5,0x10 <sup>6</sup> 5,0x10 <sup>6</sup> 1,4x10 <sup>8</sup>		
26	<i>P. aeruginosa</i>	7,00E+07	<i>Ps. prevotii</i> <i>G. morbillosum</i> <i>Veillonella spp.</i> <i>Str. constellatus</i>	1,1x10 <sup>6</sup> 4,0x10 <sup>4</sup> 5,0x10 <sup>2</sup> 5,0x10 <sup>2</sup>
27	<i>P. putida</i> <i>Str. salivarius</i>	6,0x10 <sup>6</sup> 2,5x10 <sup>6</sup>		
28	<i>K. pneumoniae</i> <i>M. haemolytica</i>	5,0x10 <sup>2</sup> 9,0x10 <sup>5</sup>	<i>Capnocytophaga</i> <i>spp.</i>	5,0x10 <sup>5</sup>
29			<i>Bif. spp.</i> <i>Bac. stercoris</i> <i>S. sacchr.</i> <i>Ps. magnus</i>	1,7x10 <sup>6</sup> 2,0x10 <sup>7</sup> 2,0x10 <sup>6</sup> 1,2x10 <sup>7</sup>
30	<i>Lact. lact.</i> <i>Stomat. muc.</i>		<i>A. israelii</i>	
31	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	1,7x10 <sup>7</sup> 2,5x10 <sup>3</sup>	<i>Pr. melan.</i> <i>G. morbillosum</i>	
32	<i>P. aeruginosa</i>	2,7x10 <sup>7</sup>	<i>C. hastiforme</i> <i>Veillonella spp.</i>	1,2x10 <sup>5</sup> 1,9x10 <sup>4</sup>
33	<i>Str. salivarius</i> <i>B. cepacia</i> <i>Stomat. muc.</i>	4,00E+06 1,00E+06	<i>Bif. spp.</i> <i>Veillonella spp.</i> <i>Ps. tetradius</i>	3,2x10 <sup>7</sup>
34	<i>P. aeruginosa</i>	8,8x10 <sup>7</sup>	<i>Veillonella spp.</i>	9,0x10 <sup>6</sup>
35	<i>Str. intermedius</i> <i>P. aeruginosa</i>	8,5x10 <sup>5</sup> 2,4x10 <sup>5</sup>	<i>S. sacchr.</i>	1,9x10 <sup>5</sup>
36	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	2,5x10 <sup>6</sup> 1,6x10 <sup>7</sup>	<i>Wolinella spp.</i> <i>Ps. prevotii</i> <i>Ps. tetradius</i>	2,3x10 <sup>6</sup> 3,5x10 <sup>5</sup> 1,0x10 <sup>5</sup>
37	<i>Listeria spp.</i>	4,0x10 <sup>7</sup>	<i>S. sacchr.</i>	3,0x10 <sup>7</sup>

38	<i>B. cepacia</i>	2,9x10 <sup>8</sup>	<i>Pr. intermedia</i> <i>S. sacchr.</i> <i>Bac. ureolyticus</i>	3,0x10 <sup>5</sup> 5,0x10 <sup>5</sup> 1,5x10 <sup>5</sup>
39	<i>P. aeruginosa</i>			
40	<i>S. aureus</i>	2,3x10 <sup>6</sup>	<i>Veillonella spp.</i>	1,5x10 <sup>5</sup>
41			<i>F. necrophorum</i>	4,0x10 <sup>6</sup>
42	<i>P. aeruginosa</i>	3,8x10 <sup>7</sup>	<i>C. tetani</i> <i>Ps. prevotii</i> <i>Pr. denticola</i> <i>Veillonella sp.</i>	1,0 x10 <sup>7</sup> 1,5x10 <sup>7</sup> 1,5x10 <sup>7</sup> 7,0x10 <sup>6</sup>
43			<i>Veillonella spp.</i>	
44	<i>B. cepacia</i> <i>Str. anginosus</i>	1,7x10 <sup>7</sup> 3,0x10 <sup>7</sup>		
45	<i>P. aeruginosa</i>	1,7x10 <sup>7</sup>	<i>C. novyi</i>	1,6x10 <sup>7</sup>
46	<i>P. aeruginosa</i>	1,6x10 <sup>7</sup>		
47	<i>P. aeruginosa</i>	3,9x10 <sup>7</sup>	<i>Pr. loescheii</i> <i>Bac. capillosus</i>	3,0x10 <sup>6</sup> 1,3x10 <sup>7</sup>
48	<i>P. aeruginosa</i>	6,5x10 <sup>4</sup>	<i>Str. constellatus</i> <i>Bac. tectum</i> <i>Bac. stercoris</i>	2,0x10 <sup>5</sup> 5,5x10 <sup>6</sup> 5,4x10 <sup>6</sup>
49	<i>P. aeruginosa</i>	5,1x10 <sup>7</sup>	<i>Bac. stercoris</i>	8,0x10 <sup>6</sup>
50	<i>D. acidovorans</i>	3,5x10 <sup>7</sup>		
51			<i>Veillonella spp.</i>	1,5x10 <sup>7</sup>
52			<i>S. sacchr.</i>	3,5x10 <sup>6</sup>
53			<i>C. limosum</i> <i>Veillonella spp.</i> <i>Mob. curtisii</i>	5,0x10 <sup>5</sup> 1,6x10 <sup>6</sup> 5,0x10 <sup>5</sup>
54			<i>Bac. stercoris</i>	1,3x10 <sup>6</sup>

## 8.2 In vitro-Versuchsreihen

### 8.2.1 Wachstumszahlen der obligaten Anaerobier

	<i>S. sacchr.1</i>	<i>S. sacchr.2</i>	<i>Ps. prevotii</i>	<i>Str. constellatus</i>	<i>C. difficile</i>	<i>Veillonella spp.</i>
0h	7,7x10 <sup>5</sup>	2,2x10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>4</sup>	9,8x10 <sup>7</sup>	3,1x10 <sup>7</sup>	3,9x10 <sup>7</sup>
8h	5,2x10 <sup>4</sup>	1,6x10 <sup>6</sup>	7,1x10 <sup>4</sup>	6,2x10 <sup>8</sup>	6,3x10 <sup>7</sup>	2,1x10 <sup>9</sup>
16h	2,0x10 <sup>3</sup>	4,9x10 <sup>5</sup>	8,9x10 <sup>6</sup>	8,3x10 <sup>8</sup>	6,1x10 <sup>7</sup>	4,3x10 <sup>9</sup>
24h	2,0x10 <sup>3</sup>	1,3x10 <sup>4</sup>	3,6x10 <sup>4</sup>	7,2x10 <sup>8</sup>	1,0x10 <sup>5</sup>	2,0x10 <sup>9</sup>
32h	-	-	-	1,8x10 <sup>5</sup>	7,1x10 <sup>7</sup>	2,7x10 <sup>9</sup>

### 8.2.2 Wachstumszahlen der obligaten Anaerobier mit und ohne *P. aeruginosa*

<i>Veillonella spp.</i>			
	0h	24h allein	24h mit <i>P. aeruginosa</i>
MW	$1,5 \times 10^8$	$2,0 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$
SD	$2,1 \times 10^7$	$7,1 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$

<i>C. difficile</i>			
	0h	24h allein	24h mit <i>P. aeruginosa</i>
MW	$1,4 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$	$4,8 \times 10^8$
SD	$2,1 \times 10^6$	$7,1 \times 10^6$	$1,9 \times 10^8$

<i>Str. constellatus</i>			
	0h	24h allein	24h mit <i>P. aeruginosa</i>
MW	$1,1 \times 10^6$	$1,0 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$
SD	$2,1 \times 10^6$	$7,1 \times 10^7$	$8,5 \times 10^8$

### 8.2.3 Wachstumszahlen von *P. aeruginosa* gemeinsam mit den obligaten Anaerobiern

	<i>P. aeruginosa</i> mit <i>Veillonella</i> <i>spp.</i>	<i>P. aeruginosa</i> mit <i>C. difficile</i>	<i>P. aeruginosa</i> mit <i>Str.</i> <i>constellatus</i>	<i>P. aeruginosa</i> ohne OA
MW	$1,2 \times 10^{10}$	$7,4 \times 10^9$	$3,5 \times 10^9$	$5,0 \times 10^9$
SD	$1,9 \times 10^{10}$	$7,9 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$

## 9 Thesen

1. In der CF-Lunge kommt es durch eine Störung der Bildung von Chloridkanälen zur Veränderung der Zusammensetzung des Alveolarfilms und zur Bildung eines zähen Mukus auf dem Alveolarepithel, in dem anaerobe Bereiche existieren, es bestehen chronische Infektion und Inflammation.
2. Die Bedeutung der in Vorstudien nachgewiesenen obligaten Anaerobier in der CF-Lunge bezüglich eines Einflusses auf *P. aeruginosa* als Hauptpathogen, der Unterhaltung der chronischen Infektsituation oder dem Auftreten von Exazerbationsereignissen ist bisher nicht geklärt.
3. Bei *in vivo*-Versuchen konnten in 54 Sputumproben von 21 Patienten bei 67% der Patienten *P. aeruginosa* nachgewiesen werden, ebenfalls häufig traten *Staphylococcus aureus* und *Burkholderia cepacia* auf.
4. Bei 81% der Patienten konnten anaerobe Spezies nachgewiesen werden, am häufigsten traten *Veillonella spp.*, *Peptostreptococcus spp.* und *Bacteroides spp.* auf.
5. Bei Mehrfachbeprobungen konnten bei 38% der Patienten gleiche anaerobe Spezies nachgewiesen werden, ein Vergleich der Bakterienzahlen vor und nach einem antibiotisch behandelten Exazerbationsereignis ergab keinen deutlichen Unterschied in den Keimzahlen.
6. Resistenztestungen der nachgewiesenen obligaten Anaerobier ergaben eine gute Wirksamkeit von Meropenem (8% der Stämme resistent) und Piperacillin/Tazobactam (15%), hingegen waren die Resistenzraten für Ceftazidim (69%), Metronidazol (38%) und Clindamycin (31%) hoch.
7. Die *in vitro*-Versuche beinhalteten die gemeinsame Inkubation von *P. aeruginosa* und *Veillonella spp.*, *Clostridium difficile* und *Streptococcus constellatus* als bereits in der CF-Lunge nachgewiesenen obligaten Anaerobiern

8. Es konnte keine Änderung in den Wachstumszahlen von *P. aeruginosa*, der unter anaeroben Bedingungen in small colony variants (SCV) wuchs, oder den obligaten Anaerobiern bei gemeinsamer Inkubation nachgewiesen werden.
9. Phänotypisch war ein hemmender Einfluss der obligaten Anaerobier auf *P. aeruginosa* feststellbar, gemeinsam mit *C. difficile* und *Str. constellatus* war dieser irreversibel, auch in der unmittelbaren Umgebung der Kolonien konnte dieser Effekt nachgewiesen werden.
10. Weitere Untersuchungen zu den Mechanismen der Einflussnahme der obligaten Anaerobier auf *P. aeruginosa* und deren Rolle im polymikrobiellen Milieu sowie der daraus resultierenden Bedeutung für die Infektsituation in der CF-Lunge müssen folgen.

## **Lebenslauf**

Name: Astrid Liemen  
Anschrift: Tirolerstraße 55  
87629 Füssen  
Geburtsdatum, -ort: 04.06.1984 in Waltershausen  
Familienstand: ledig

## **Schulische Ausbildung**

1991 - 1994 Grundschole Sättelstädt  
1994 - 2001 Albert-Schweitzer-Gymnasium Ruhla  
2001 - 2003 Ernst-Abbe-Gymnasium Eisenach, Abschluss Abitur

## **Studium**

2003 - 2010 Studium der Humanmedizin  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
06/2010 Staatsexamen Medizin

## **Berufliche Tätigkeit**

10/2010 - 09/2012 Assistenzärztin für Chirurgie  
Johanniter Krankenhaus Geesthacht,  
CA Dr. Frank Templin  
  
Seit 10/2012 Assistenzärztin für Chirurgie  
Klinik Füssen  
CA Dr. Kai Scriba

## **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet (Amtsblatt der MLU Nr. 5, 02.07.09).

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Füssen, den 16.03.2014

Astrid Liemen

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt:

**Allen beteiligten CF-Patienten** der CF-Ambulanz des Universitätsklinikums Halle (Saale) für die Teilnahme an dieser Studie

**Frau Prof. Dr. Marianne Borneff-Lipp**, Direktorin des Institutes für Hygiene des Universitätsklinikums Halle (Saale), für die freundliche Überlassung des Themas der Dissertation sowie für die ständige Bereitschaft, mit konstruktiven Fragen und kritischen Hinweisen die Arbeit voranzubringen, was eine immense Hilfe darstellte

**Herrn PD Dr. Dieter Worlitzsch**, Oberarzt des Institutes für Hygiene des Universitätsklinikums Halle (Saale), danke ich für die hervorragende Betreuung, den unermüdlichen Einsatz und die vielen hilfreichen Hinweise bei der Umsetzung der Arbeit

**Prof. Dr. Andreas Wienke**, stellv. Direktor des Institutes für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Medizinische Informatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, danke ich für die freundliche Unterstützung bei der statischen Auswertung der Arbeit

**Frau OÄ Dr. Bettina Wollschläger**, Leiterin der CF-Ambulanz der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums Halle (Saale), für die freundliche Unterstützung und Zusammenarbeit

**Frau Nadine Würfel, Frau Margit Koleczko, Frau Barbara Christgen, Frau Christiane Hinze und Frau Susanne Friebe**l, Mitarbeiterinnen des Institutes für Hygiene des Universitätsklinikums Halle (Saale), für ihre wertvolle Unterstützung bei der Labortätigkeit

**Herrn Sascha Schmidt**, EDV-Anwendungsbetreuer im Institut für Hygiene des Universitätsklinikums Halle (Saale), für die Hilfestellung bei der Umsetzung der Formalia.