

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

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

**Obligat anaerob lebende Bakterien im Sputum von Patienten
mit chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Betreuer: Herr Chefarzt PD Dr. med. habil. Dieter Worlitzsch

von Juliane Künzel

geboren am 03.06.1983 in Weißenfels

Gutachter:

PD Dr. med. Shneh Sethi

Prof. Dr. med. Patrick Nichl

PD Dr. med. Dieter Worlitzsch

15.09. 2015

08.04.2016

Referat

Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) leiden unter Lungeninfektionen mit fakultativen Anaerobiern. Ob auch obligat anaerobe Bakterien daran beteiligt sind, ist bislang unbekannt. In dieser Arbeit wurden 20 COPD-Patienten auf das Vorhandensein von obligaten und fakultativen Anaerobiern untersucht. Es wurden 14 Sputumproben von COPD Grad IV-, vier Proben von COPD Grad III- und drei Proben von COPD-Patienten mit zusätzlichem Bronchialkarzinom mikrobiologisch aufgearbeitet. Die Bakterien wurden mit spezifischen Verfahren zum Nachweis der fakultativen und obligaten Anaerobier identifiziert und quantifiziert. Der Sauerstoffgehalt (pO_2) im Sputum wurde gemessen. Bei allen Probanden (100%) wurden obligate Anaerobier (sieben Genera mit 10 Species) gefunden. Die Bakterien kamen in hohen Keimzahlen ($1,8 \times 10^7 \pm 4,5 \times 10^7$ KBE/ml) vor. Die Bestimmung des pO_2 im Sputum ergab eine Reduktion um ein Viertel auf $16,3 \pm 2,4\%$ des Ausgangswertes (21%). Auch im Sputum von COPD-Patienten mit Bronchialkarzinom waren obligate Anaerobier ($7 \times 10^7 \pm 8,0 \times 10^7$ KBE/ml) nachweisbar. In den Schweregraden COPD III ($2,6 \times 10^7 \pm 5,6 \times 10^7$ KBE/ml) und COPD IV ($4,0 \times 10^6 \pm 7,0 \times 10^6$ KBE/ml) lagen signifikant ($p=0,009$) unterschiedliche Keimzahlen vor. Der Nachweis obligater Anaerobier bei allen COPD-Patienten legt nahe, dass in der COPD-Lunge anaerobe Bereiche existieren. Da im Sputum aber nur eine Reduktion des pO_2 auf 16,3% dargestellt werden konnte, liegt dort sicherlich eine Mischinfektion von fakultativ und obligat anaeroben Bakterien vor. Die signifikante Keimzahldifferenz der obligaten Anaerobier zwischen Patienten mit COPD III und COPD IV lässt vermuten, dass die Therapie mit nicht-invasiven Beatmungsformen unter Nutzung von reinem Sauerstoff eine Reduktion dieser Bakterien bewirken könnte, zumal die 14 an COPD Grad IV erkrankten Probanden nicht unter Antibiotikatherapie standen. Möglicherweise könnte der frühzeitige Gebrauch von nicht-invasiven Beatmungsformen mit reinem Sauerstoff bei Patienten mit COPD Grad III den hohen Keimzahlen der obligaten Anaerobier entgegenwirken. Dies könnte eine neue Therapieoption bei COPD darstellen. Die wichtigste Konsequenz der vorliegenden Arbeit besteht jedoch darin, dass alle zukünftigen Untersuchungen zur Pathogenese der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung und deren Therapie das obligatorische Vorkommen von obligaten und fakultativen Anaerobiern berücksichtigen müssen.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	III
1 Einleitung	1
1.1 Die Lungenerkrankung COPD	1
1.2 Zystische Fibrose	3
1.3 Pathomechanismen zur Entstehung der Inflammation bei CF und COPD.....	4
1.4 Mikrobiologische Aspekte bei CF und COPD.....	8
2 Zielstellung.....	12
3 Material und Methodik.....	13
3.1 Patientengruppen	13
3.1.1 COPD-Patienten.....	13
3.1.2 COPD-Patienten mit akuter Exazerbation.....	14
3.1.3 COPD-Patienten mit Bronchialkarzinom	14
3.1.4 Ethikkommission.....	15
3.2 <i>In vivo</i> -Untersuchungen.....	15
3.2.1 Sputumprobengewinnung.....	15
3.2.2 Bestimmung der Lungenfunktionsparameter	16
3.3 <i>In vitro</i> -Untersuchungen	16
3.3.1 Bestimmung des Sauerstoffgehaltes im Sputum.....	16
3.3.2 Nachweis obligater und fakultativer Anaerobier	17
3.3.3 Identifikation der fakultativ anaerob wachsenden Bakterien.....	20
3.3.4 Identifikation der obligat anaerob wachsenden Bakterien	21
3.3.5 Archivierung	24
3.4 Statistik.....	25
4 Ergebnisse	26
4.1 Bestimmung des Sauerstoffgehaltes im Sputum.....	26
4.2 Qualitative Bestimmung der obligaten und fakultativen Anaerobier.....	27
4.2.1 Obligat anaerobe Bakterien bei COPD-Patienten	27
4.2.2 Fakultativ anaerobe Bakterien bei COPD-Patienten	29
4.3 Quantitative Bestimmung der obligaten und fakultativen Anaerobier	31
4.3.1 Obligat anaerobe Bakterien bei COPD-Patienten	31

4.3.2	Fakultativ anaerobe Bakterien bei COPD-Patienten	34
5	Diskussion	36
5.1	Nachweis obligater und fakultativer Anaerobier bei COPD-Patienten	36
5.2	Identifikation von obligaten und fakultativen Anaerobier bei COPD- Patienten	37
5.3	Reduzierter Sauerstoffgehalt im Sputum von COPD-Patienten	39
5.4	Quantifikation obligater und fakultativer Anaerobier bei COPD-Patienten	39
5.5	Keimzahlvergleich obligater Anaerobier bei COPD Grad III und COPD Grad IV	41
6	Zusammenfassung.....	43
7	Literaturverzeichnis	46
8	Thesen.....	55
9	Anlagen.....	57
9.1	Ethikvotum.....	57
9.2	Keimzahlen obligater und fakultativer Anaerobier aller COPD- Sputumproben.....	58
	Tabellarischer Lebenslauf	
	Selbstständigkeitserklärung	
	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
	Danksagung	

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

±	Plusminuszeichen
µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
%	Prozent
>	Größer-als-Zeichen
<	Kleiner-als-Zeichen
Abb.	Abbildung
Art.-Nr.	Artikelnummer
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATS	American Thoracic Society
<i>B.</i>	<i>Burkholderia</i>
CD	cluster determinant
CDC	CDC-Anaerobier-Agar mit 5 % Schafblut
CF	cystic fibrosis, Zystische Fibrose, Mukoviszidose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
ca.	circa
Cl ⁻	Chlorid-Ion
COPD	chronic obstructive pulmonary disease, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
ERS	European Respiratory Society
FEV ₁	forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde, Einsekundenkapazität
FVC	forcierte Vitalkapazität
g	Gramm

GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
<i>H.</i>	<i>Hämophilus</i>
H ₂ O	Wasser
KBE	Koloniebildende Einheit
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kPa	Kilopascal
l	Liter
LTOT	long-term oxygen therapy, Sauerstoff-Langzeittherapie
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NIB	nicht-invasive Beatmung
NIPPV	non-invasive positive pressure ventilation
NL	normale Clearance
Nr.	Nummer
NTHI	non-typable Haemophilus influenzae
NVL	Nationale Versorgungsleitlinie
O ₂	Sauerstoff
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
p	Signifikanzwert nach Student's t-test
paCO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck

paO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	phosphate buffered saline
pH	potentia Hydrogenii, pondus Hydrogenii
pO ₂	partieller Sauerstoffdruck
Q _{O₂}	epithelialer Sauerstoffquotient
S.	<i>Staphylococcus</i>
SBS	Säure-Basen-Status
SCS	Schaedler-Agar mit 5% Hammelblut
SD	Standardabweichung
spp.	Species (Plural)
Tab.	Tabelle
U/min	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett

1 Einleitung

1.1 Die Lungenerkrankung COPD

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung COPD („chronic obstructive pulmonary disease“) ist zur Volkskrankheit geworden und entwickelt sich zu einer der führenden Krankheiten, die für erhöhte Morbidität und Mortalität weltweit stehen. Die Prävalenz wird stark unterschätzt, da eine Diagnosestellung erst beim Auftreten klinisch apparenten Symptomen erfolgt. Aufgrund des schleichenden Krankheitsverlaufs wird erst in einem fortgeschrittenen Stadium COPD diagnostiziert (Celli et al., 2004). Studien in den USA haben gezeigt, dass bei Personen zwischen 25 und 75 Jahren eine geschätzte Prävalenz für eine leichte COPD bei 6,9% liegt. Eine mittelschwere COPD-Erkrankung wurde bei 6,6% der Personen diagnostiziert. In Deutschland liegt die Prävalenz der COPD (Grad II-IV) bei 13,2% (Geldmacher et al., 2008), wobei die Dunkelziffer auf 40% nicht diagnostizierter COPD-Erkrankungen geschätzt wird (Buist et al., 2007). In Deutschland haben Querschnittstudien gezeigt, dass etwa bei 14% der Erwachsenen mit einer Lungenfunktionseinschränkung zu rechnen ist (Konietzko und Fabel, 2005). Etwa 10.000 Männer und Frauen versterben pro Jahr an einer COPD (Statistisches Bundesamt 1999). Weltweit starben 2003 2,3 Millionen Menschen an dieser Lungenerkrankung (Lopez et al., 2006). Der Anteil an erkrankten Frauen ist in den letzten 20 Jahren um fast das Doppelte gestiegen (Mannino et al., 2002). Weltweit liegt die COPD-Erkrankung gegenwärtig an vierter Stelle der Todesursachen. Es ist davon auszugehen, dass die Prävalenz, Mortalität und Morbidität in den nächsten Jahrzehnten weiter ansteigen werden (Murray und Lopez, 1996; Lopez und Murray, 1998). Voraussagen haben ergeben, dass die COPD-Erkrankung im Jahre 2020 die dritthäufigste Todesursache sein wird (Chapmann et al., 2006).

COPD ist eine chronisch, progressiv verlaufende, entzündliche Erkrankung des Lungenparenchyms (Döring et al., 2010). Diese Lungenerkrankung tritt in der vierten und fünften Lebensdekade vermehrt auf (Celli et al., 2004). Als Hauptursache der COPD wird Zigarettenrauch angesehen. Der Rauch lähmt das Flimmerepithel und es kommt zur vermehrten Produktion von Sputum und Husten. Werden die Noxen, z.B. der Zigarettenrauch, die umweltbedingten (gefährliche Gase) oder arbeitsbedingten Belastungen (Feinstaub) nicht vermieden, entwickelt sich langsam aus einer chronischen Bronchitis eine COPD und im Endstadium ein Lungenemphysem (Celli et al., 2004).

Es kommt zur vollständigen Zerstörung des Flimmerepithels, zur Verdickung der chronisch entzündeten Schleimhaut der Lunge und schließlich zur Obstruktion des Bronchialsystems (Abb.1). Die Entzündung der Schleimhaut der Lunge lässt diese atrophieren. Infolgedessen werden die Alveolen bei der Expiration instabil. Die so entstandene Instabilität führt zum Kollabieren der Alveolen und zur Dyspnoe und trägt somit zur Leistungsminderung bei. Im weiteren Verlauf der COPD werden die Alveolarsepten zerstört. Da die gasaustauschende Fläche stark durch den Verlust der Alveolen abnimmt, verliert die Lunge zusätzlich an Funktionalität. Es entwickelt sich ein irreversibles Lungenemphysem (Cosio et al., 2009).

Je nach Schwere der Erkrankung wird die COPD in fünf Stadien eingeteilt (Tab.1). Die hier genutzte Einteilung bezieht sich auf den Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD)-Standard (Pauwels et al., 2001). Bis 2012 wurde zur COPD-Schweregradeinteilung die Lungenfunktion (FEV_1) als entscheidendes Kriterium genutzt. Im aktuellen GOLD-Report werden die Kriterien für die Schweregradeinteilung erweitert, indem die Anzahlen der akuten Exazerbationen pro Jahr und die Schwere der Symptomatik mit einbezogen werden (Vogelmeier und Vestbo, 2014). Weitere Einteilungen der COPD sind nach ATS (American Thoracic Society, 1995) und ERS (European Respiratory Society; Siafakas et al., 1995) möglich.

Zusätzlich zur chronischen Erkrankung der COPD kann es zu einer akuten Verschlechterung kommen. Eine sogenannte Exazerbation wird meist durch eine bakterielle oder virale Kontamination hervorgerufen. Es kommt zur akuten Verschlechterung der typischen Symptome der COPD (vermehrter und gefärbter Auswurf, lebensbedrohliche Dyspnoe, zunehmender Husten). Eine intensiviertere Therapie, zum Teil mit Krankenhausaufenthalt, ist bei einer Exazerbation indiziert (Hill et al., 1999a, b; Celli et al., 2004).

Tabelle 1: Schweregradeinteilung der COPD nach GOLD-Standard

Schweregrad	FEV ₁ /FVC	FEV ₁	Beschwerden
0 (gefährdet)	>70%	>80%	chronische Symptomatik Husten, Auswurf, Dyspnoe
1 (leicht)	<70 %	80 %	ohne/mit chronischer Symptomatik (Husten, Auswurf, Dyspnoe)
2 (mittel)	<70 %	50-80 %	mit/ohne chronischen Symptomen (Dyspnoe, Husten und Auswurf)
3 (schwer)	<70 %	30-50 %	ohne/mit chronische Symptome (Dyspnoe, Husten und Auswurf)
4 (sehr schwer)	<70 %	<30 % oder <50 % und chron. respiratorische Insuffizienz	Lebensqualität merklich beeinträchtigt, Exazerbationen können lebensbedrohlich sein

COPD-Schweregradeinteilung (die Messungen erfolgten nach Anwendung eines Bronchodilatators) FEV₁: forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde, Einsekundenkapazität; FVC: forcierte Vitalkapazität (Pauwels et al., 2001)

1.2 Zystische Fibrose (cystic fibrosis, CF, Synonym: Mukoviszidose)

Im Vergleich zur erworbenen COPD, ist die CF eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung. Mit einer Neuerkrankungsrate von 1: 2500 Neugeborenen ist die CF eine der häufigsten hereditären Stoffwechselerkrankungen in der westlichen Gesellschaft (Ratjen und Döring, 2003; Gibson et al., 2003).

Bei der CF liegt ein Defekt oder gar ein Nichtvorhandensein von Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Kanälen (CFTR-Kanäle) vor. Diese sind spezielle Chlorid-Transport-Kanäle in schleimsezernierenden Epithelien. Aufgrund der Fehlfunktion, respektive des Fehlens dieser CFTR-Kanäle bei CF, kommt es zu einem pathologischen Ionenaustausch (Matsui et al., 1998). Dieser führt in allen exokrinen Drüsen zu einer hochviskösen und dehydrierenden Sekretabsonderung (Welsh und Ramsey, 1998). Dieser Sekretverhalt beeinträchtigt speziell die Funktion der Lunge,

des Pankreas, der Leber, der Schweißdrüsen und des Ductus deferens (Ratjen und Döring, 2003; Gibson et al., 2003).

Durch die pathologische Sekretabsonderung in der Lunge kommt es zu einer Auflagerung des Sputums auf das Lungenepithel. Die Folge ist eine chronisch bakterielle Infektion und eine dauerhafte Entzündung des Lungengewebes. Aufgrund dieser permanenten Reizung und Schädigung des Lungenepithels kommt es als Reaktion zu einem zystisch-fibrotischen Umbau. Dieser geht mit einer Obstruktion der Atemwege und vermehrten Lungenfunktionsverlusten einher (Ratjen und Döring 2003; Gibson et al., 2003).

Die Symptome der CF sind mit den Symptomen der COPD vergleichbar. Bei CF hängt die Symptomausprägung allerdings von dem Schweregrad der Mutation des CFTR-Gens ab. Des Weiteren treten die Symptome bei CF-Patienten bereits im Säuglings- und Kleinkindalter auf. Hingegen befinden sich COPD-Erkrankte, meist in der 4. und 5. Lebensdekade (Gibson et al., 2003).

Vorherrschende Krankheitszeichen sind chronische Hustenzustände, bakterielle Infektionen, Bronchiektasen- und Atelektasenbildung sowie der voranschreitende Lungenfunktionsverlust (Ratjen und Döring, 2003; Gibson et al., 2003). Die extrapulmonal auftretenden Symptome bei CF sind heutzutage gut behandelbar. Eine Exazerbation der chronischen Lungeninfektion bei CF-Patienten führt, wie auch bei COPD-Patienten, häufig zum Tod (Welsh und Ramsey, 1998; Gibson et al., 2003).

1.3 Pathomechanismen zur Entstehung der Inflammation bei CF und COPD

In einer gesunden Lunge liegt die physiologisch muköse Schleimschicht auf den respiratorischen Epithelzellen. Bakterien können diesen Mukus durchdringen. Wenn keine Erkrankung (CF oder COPD) vorliegt, können die Abwehrmechanismen des Körpers tätig werden. Neutrophile Granulozyten bekämpfen mit Enzymen, wie z.B. Elastase, Myeloperoxidase und Lysoszym die pathogenen Mikroorganismen. Makrophagen nehmen durch Phagozytose die Bakterien auf und zerstören sie. Durch die auf dem respiratorischen Epithel sitzenden Zilien wird der Mukus nach oral transportiert. Durch den Schleimfluss ist keine Anheftung bzw. Eindringen in die Zellen des Respirationstraktes möglich (Abb. 1a).

Bei CF-Patienten ist der physiologische Mechanismus gestört (Abb. 1b-f).

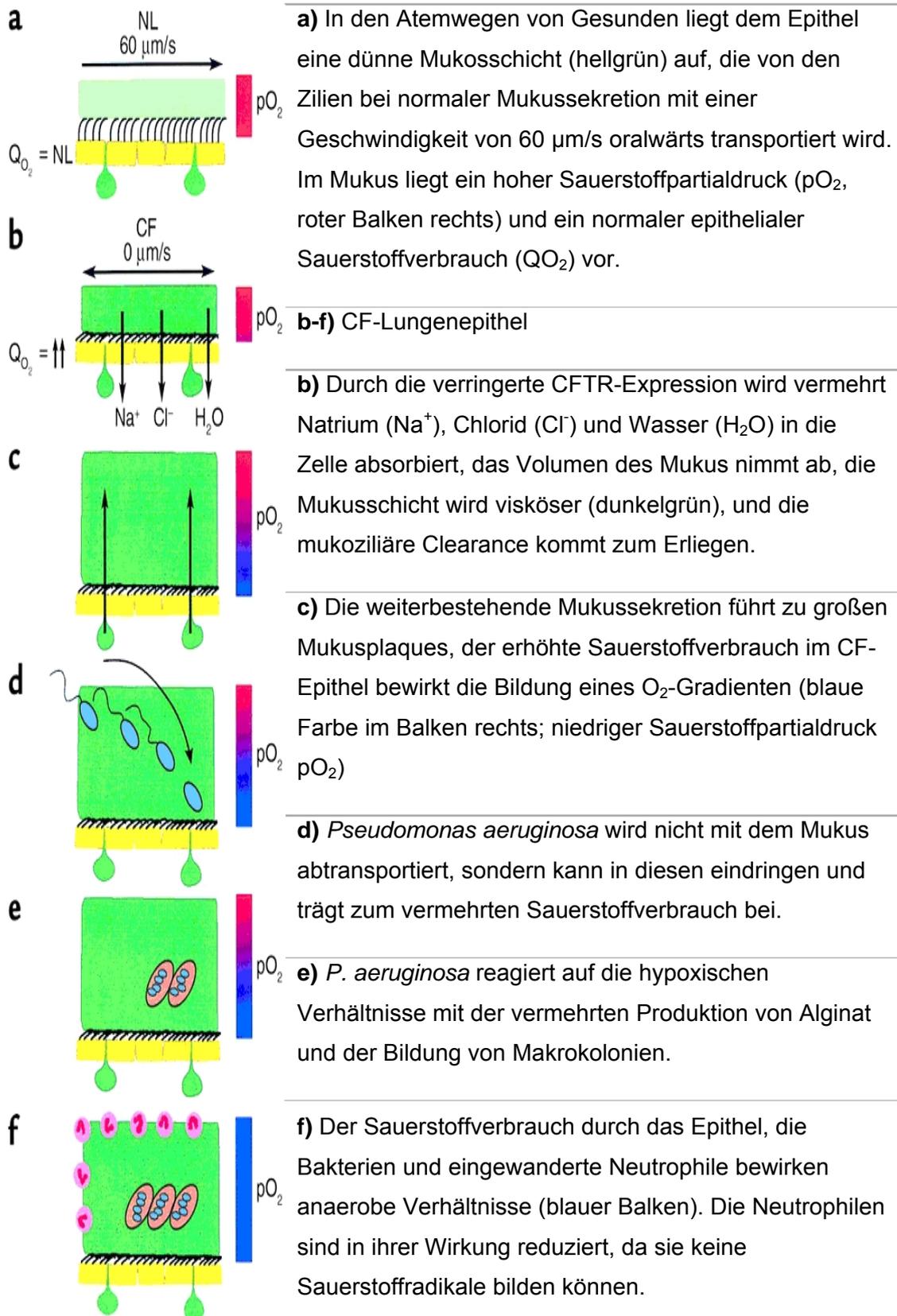


Abbildung 1: Pathophysiologische Vorgänge bei Befall mit *P. aeruginosa* bei CF (Worlitzsch et al., 2002); pO_2 Sauerstoffpartialdruck; NL normale Clearance; QO_2 epithelialer Sauerstoffquotient

Der Mechanismus zur Abtötung von pathogenen Bakterien ist bei CF-Patienten gestört, sodass es zu einer typischen Besiedlung kommt. Die in hoher Keimzahl nachweisbaren *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Burkholderia cepacia complex*-Bakterien dominieren in Sputumproben. Auch obligate anaerobe Bakterien konnten nachgewiesen und klassifiziert werden (Worlitzsch et al., 2009). Dabei dominiert *Staphylococcus sacharolyticus* (n=37). Als zweite Gruppe der obligaten Anaerobier wurden *Peptostreptococcus* (n=34) mit den vier Species *Anaerobius* (n=6), *Micros* (n=1), *Prevotii* (n=20) und *Tetradium* (n=7) gefunden. *Actinomyces* (n=19) mit fünf Untergruppen wurde am dritthäufigsten in den Sputumproben nachgewiesen. *Veillonella spp.* (n=15) und *Clostridium spp.* (n=12) als obligate Anaerobier waren ebenfalls in den Proben von CF-Erkrankten vorhanden. *Streptococcus intermedius* (n=1) und *Streptococcus constellatus* (n=6) waren bei der Gesamtanzahl von 168 Bakterien in 114 Sputumproben von CF-Patienten nachweisbar (Worlitzsch et al., 2009).

Der Pathomechanismus bei COPD ist anderer Natur. Hierbei handelt es sich um eine Entzündung (Barnes, 2000; Celli et al., 2004). Im Unterschied zur CF ist der Mukus bei COPD-Patienten nicht immer hochviskös.

Das Problem bei COPD ist der durch den Zigarettenrauch und andere Expositionen verursachte Untergang der Zilien des Respirationsgewebes und damit der begrenzte Schleimtransport nach oral (Hogg und Timens, 2009). Die Entzündung wird nicht immer von den Patienten bemerkt. Erst ab einem gewissen Schweregrad wird die Exazerbation mit den sich verschlechternden Symptomen der COPD wahrgenommen (Hill et al., 1999a, b).

Die Noxen aktivieren das angeborene Immunsystem. Makrophagen gelangen in das entzündete Gebiet und rekrutieren ihrerseits weitere Immunzellen (neutrophile Granulozyten, Lymphozyten) (Barnes, 2004). Durch die hohe Anzahl der Immunzellen kommt es in dünnen Bronchiolen zur Verengung, da die Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten (Abb. 2) die Gefäßwände infiltrieren und eine Verdickung hervorrufen (Hogg et al., 2004). Lymphozyten des Typs CD8 (cluster determinant) bewirken zusätzlich zur Verdickung der Gefäßwand die Entstehung von Kollagen (Cosio et al., 2009).

Eine weitere Folge von entzündungsbedingter Infiltration ist die Zerstörung der Alveolarwände. Daraus resultiert eine Vergrößerung des luftleitenden Systems, welches die Dyspnoe erklärt. Durch die zugrundeliegende Entzündung wird die gasaustauschende Fläche irreversibel verkleinert und ein Lungenemphysem entsteht

(Cosio et al., 2009). Bei der chronischen Lungenentzündung liegt eine Dysbalance zwischen Proteasen und Antiproteasen vor (Stockley, 1999). Zu den Proteasen zählt Elastase. Sie zerstört das Elastin in den Alveolarwänden. Die Destruktion des Elastins führt zur Fehlreparatur der beschädigten Alveolarwände mittels Kollagen.

Dieser Abbau kann fakultativ im Urin von Lungenerkrankten durch die Bestimmung von Desmosin und Isodesmosin (Elastin-crosslink-Aminosäurederivat) nachgewiesen werden (Viglio et al., 2000).

Die strukturellen Veränderungen in der Lunge von COPD-Patienten sind nicht verallgemeinerbar. Es liegen viele variable, krankheitsbedingte Veränderungen in den Luftwegen, Alveolen und in den Lungengefäßen vor (Hogg und Timens, 2009). Typisch hingegen ist die Keimbefestigung der Patienten (Murphy und Parameswaran, 2009). Da die Alveolarmakrophagen die Sensibilität gegenüber *Haemophilus influenzae* (nontypable *Haemophilus influenzae*, NTHI) verloren haben, ist dieses Bakterium sehr häufig bei COPD-Patienten zu finden (Berenson et al., 2006a, b; Erwin und Smith, 2007).

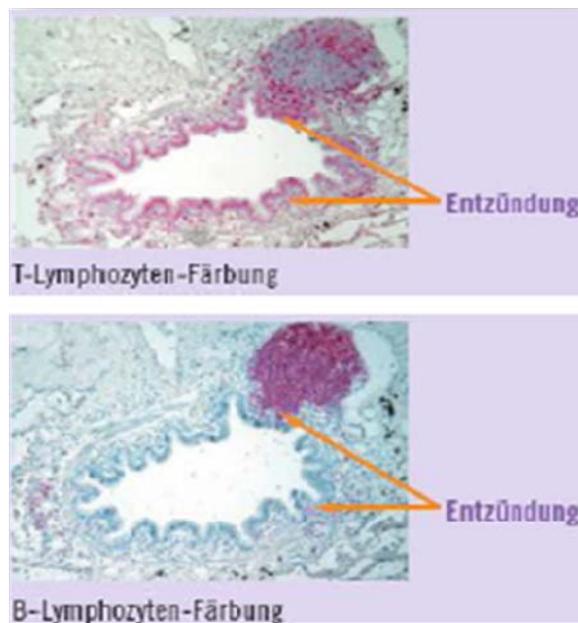


Abbildung 2: Infiltration der Bronchioli stabiler COPD-Patienten mit Entzündungszelle, hier T-Lymphozyten, B-Lymphozyten (Hogg et al., 2004).

1.4 Mikrobiologische Aspekte bei CF und COPD

Rezidivierende Atemwegsinfektionen sind bei CF-Patienten sehr häufig, da es zur Schädigung des Lungenparenchyms kommt (Koch und Høiby 1993). Die charakteristische Keimbesiedlung bei CF-Patienten in der Lunge besteht aus fakultativen Anaerobiern wie *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cepacia* und *H. influenzae* (Høiby und Frederiksen, 2000).

Fakultative Anaerobier passen sich an veränderte Umweltbedingungen rasch an und können sowohl mit als auch ohne Sauerstoff überleben (Koneman et al., 2005). Die Bakterienbesiedlung bei CF ist altersabhängig. Kinder im Alter von 0-9 Jahren zeigen vermehrte Bakterien von Typ *S. aureus* (55%). Diese Zahl ändert sich mit fortschreitendem Lebensalter. 81% Keimbesiedlung mit *P. aeruginosa* ist bei älteren CF-Patienten die Regel. Die Bakteriengattung ändert sich während der Erkrankung und mit zunehmendem Alter (Høiby und Frederiksen, 2000) (Abb. 3).

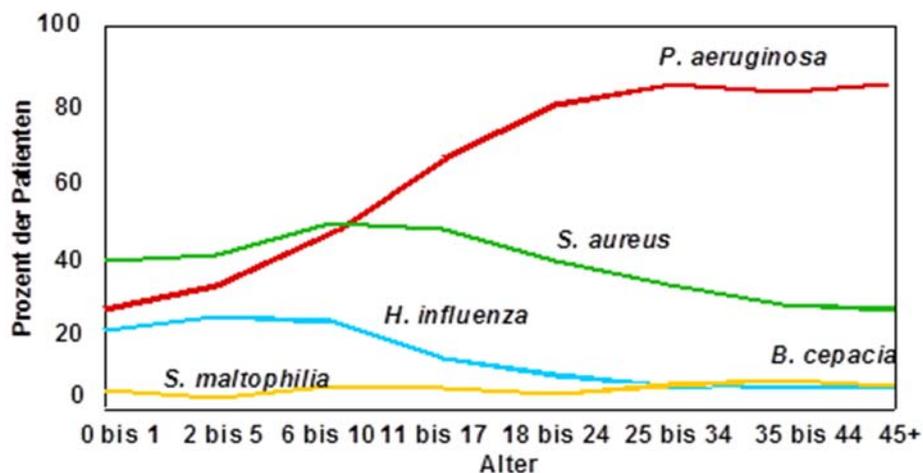


Abbildung 3: Bakterielle Besiedlung der Lunge von CF-Patienten in Abhängigkeit vom Lebensalter (Koch und Høiby, 1993).

Zusätzlich wurden obligat anaerobe Bakterien ($>10^5$ KBE/ml) nachgewiesen (Brook und Fink, 1983; Jewes und Spencer, 1990; Tunney et al., 2008; Worlitzsch et al., 2009). Diese obligat anaeroben Bakterien gehören zu den Gattungen *Prevotella*, *Bifidobacterium*, *Veillonella*, *Peptostreptococcus* und *Fusobacterium* (Worlitzsch et al., 2009).

P. aeruginosa kann verschiedene Virulenzfaktoren bilden. Dabei werden zellassozierte und extrazelluläre Virulenzfaktoren unterschieden (D' Argenio, 2004; Hogardt et al., 2004, 2007; van Delden und Iglewski 1998; Ramsey und Wozniak, 2005; Lee et al., 2006; Williams und Cámara, 2009; Winstanley und Fothergill, 2009). Zellassozierte Virulenzfaktoren sind unter anderen drei unterschiedliche Exopolysaccharide, darunter das Exopolysaccharid Alginate. Die Alginateproduktion ist bei CF-Patienten hochreguliert (Worlitzsch et al., 2002; Bragonzi et al., 2005). Dies ist für die Widerstandsfähigkeit von *P. aeruginosa* bei CF-Erkrankten von großer Bedeutung, da die Abwehrmechanismen des Körpers durch die Bildung von Alginate und der daraus resultierenden Biofilmbildung stark behindert sind (Hoffmann et al., 2005) (Abb. 4).

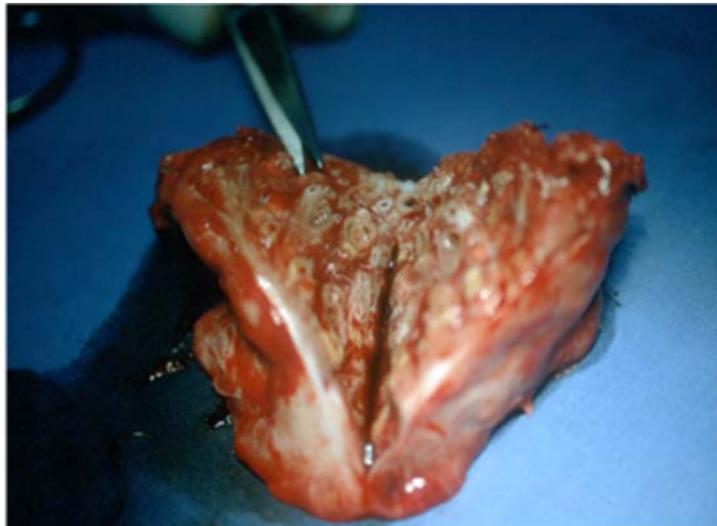


Abbildung 4: Explantierter Lungenlappen (mit Explorationsschnitt) eines CF-Patienten mit chronischer *P. aeruginosa*-Lungeninfektion (Foto überlassen von PD Dr. med. Worlitzsch, 2003)

Auch *S. aureus* ist ein fakultativ anaerobes Bakterium. *S. aureus* wie auch Koagulase-negative Staphylokokken produzieren Exopolysaccharide. Dieser kann ebenfalls als Biofilm genutzt werden und sich schützend um das pathogene Bakterium legen. Es kommt zur Bildung von Mikrokolonien (Mc Kenney et al., 1999; Cramton et al., 2001; Ulrich et al., 2007).

B. cepacia tritt mit niedrigerer Prävalenz als *P. aeruginosa* auf. Da dem stark viskösen Muskus der Sauerstoff fehlt, können keine Sauerstoffradikale entstehen. So kann *B. cepacia* nicht abgetötet werden und verbleibt wegen des fehlenden

Transportmechanismen des Mukus vor Ort. Das Immunsystem reagiert mit Anfluten von neutrophilen Granulozyten. Diese setzen Elastase frei. Elastase wirkt toxisch auf die respiratorischen Zellen. In seltenen Fällen kann es zu einer fulminanten, nekrotisierenden Lungenentzündung und zu einer Septikämie kommen (Corey und Farewell, 1996; Jones et al., 2001).

Sputumproben von COPD-Erkrankten ergeben ein anderes Keimspektrum als bei CF-Patienten. In 25-50% der Fälle von klinisch stabilen Patienten werden *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* und *P. aeruginosa* nachgewiesen (Sethi und Murphy, 2008). Pathogene Bakterien in den tieferen Atemwegen fördern eine schwerere Inflammation, die zum Teil symptomlos verläuft (Soler et al., 1999). Diese Beobachtung stützt die Hypothese, dass die pathogenen Bakterien, die für die Zerstörung des Lungengewebes mitverantwortlich sind, in höherer Anzahl bei schwerer COPD-Erkrankung vorhanden sind (Eller et al., 1998). Die typischen pathogenen Bakterien bei COPD-Patienten können zu 50% bei einer akuten Exazerbation nachgewiesen werden. In 30% (Sethi und Murphy, 2008) der Fälle sind Rhinoviren, Adenoviren oder Inflenzaviren für eine akute Exazerbation verantwortlich (Greenberg et al., 2000; Seemungal et al., 2001).

Das am häufigsten nachgewiesene Bakterium bei einer akuten Exazerbation ist *H. influenzae*. Die Virulenz dieses Bakteriums ist definiert über Lipooligosaccharide (Schweda et al., 2007). Auch *H. influenzae* besitzt die Fähigkeit, einen Biofilm zu bilden (Starner et al., 2006). Über die Pathogenese wird noch diskutiert.

M. catarrhalis ist ein gramnegatives Bakterium, das ubiquitäre Oberflächenproteine als Virulenzfaktoren besitzt und zur Keimbesiedlung bei COPD-Patienten beiträgt (de Vries et al., 2009; Murphy und Parameswaran, 2009). Speziell das ubiquitäre Oberflächenprotein A1 bindet an α -Antichymotrypsin. Es erhöht die Proteaseaktivität und führt zur vermehrten Inflammation bei COPD (Perez und Riesbeck, 2009). Untersuchungen zeigten, dass das Immunsystem gegen diese Art des Bakterienbefalls gute Abwehrmechanismen besitzt und diese Keimbesiedlung nur 10% zur akuten Exazerbation beiträgt.

P. aeruginosa spielt bei der Inflammationsreaktion eine stark untergeordnete Rolle. Dies ist der wesentlichste Unterschied in der Keimbesiedlung von CF- und COPD-Patienten. Studien zeigen, dass die meisten COPD-Patienten sporadisch intermittierende Infektionen mit *P. aeruginosa* haben, diese aber gut durch das eigene Immunsystem bekämpft werden (Rakhimova et al., 2009). Eine Besiedlung mit *P.*

aeruginosa tritt gehäuft bei höheren Stadien der COPD auf (Miravittles et al., 1999; Ferrer et al., 2005; Rosell et al., 2005; Nseir et al., 2006) (Tab. 1).

Im Gegensatz zu den CF-Patienten sind über das Vorkommen von obligat anaeroben Bakterien bei COPD-Patienten keine Untersuchungen bekannt.

2 Zielstellung

Die vorliegende Studie hatte folgende Ziele:

- (1) den Beweis von obligat und fakultativ anaerob lebenden Bakterien im Sputum von COPD-Patienten zu führen,
- (2) obligat und fakultativ anaerob lebende Bakterien zu identifizieren,
- (3) obligat und fakultativ anaerob lebende Bakterien zu quantifizieren,
- (4) das Vorkommen von obligat und fakultativ anaerob lebenden Bakterien in den Patientengruppen COPD Grad IV, COPD Grad III und COPD mit zusätzlichem Bronchialkarzinom zu vergleichen,
- (5) den Sauerstoffgehalt in den gewonnenen Sputumproben mittels Sauerstoffpartialdruckmessungen zu bestimmen,
- (6) zwei Krankenhäuser mit unterschiedlichen Therapieregimen zur Behandlung der COPD in die Studie zu integrieren.

3 Material und Methodik

3.1 Patientengruppen

3.1.1 COPD-Patienten

An der Studie über obligat anaerobe Bakterien im Sputum von COPD-Patienten nahmen insgesamt 20 Probanden teil. Von diesen 20 Patienten stammten 17 Proben von stationär aufgenommenen COPD-Erkrankten aus dem Krankenhaus Martha-Maria, Halle-Dölau (Klinik für Innere Medizin II) und vier Proben von Patienten des Universitätsklinikums Halle/Saale (Department für Innere Medizin II). Eine Patientin, die zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme an einer Exazerbation der COPD litt, wurde gebeten zweimal Sputum zu expektorieren (siehe 3.1.2).

Bei den Probanden handelte es sich um Erwachsene im Alter von 53 bis 86 Jahren. Der Altersdurchschnitt betrug bei allen beteiligten Probanden $69,1 \pm 9,95$ Standardabweichung (SD) Jahre. Es nahmen an dieser Studie sieben an COPD erkrankte Frauen und neun Männer des Krankenhauses Martha-Maria Halle-Dölau und eine an COPD erkrankte Frau und drei Männer des Universitätsklinikums Halle (Saale) teil. Der Altersdurchschnitt der Frauen im Krankenhaus Martha-Maria betrug $65,7 \pm 11,6$ Jahre, derjenigen der im Universitätsklinikum behandelten Patientinnen 55 Jahre. Männliche COPD-Patienten im Krankenhaus Martha-Maria waren durchschnittlich $70,9 \pm 8,3$ Jahre alt und im Universitätsklinikum $76,3 \pm 5,5$ Jahre.

Die 21 Sputumproben wurden nach der Schweregradeinteilung laut GOLD-Standard klassifiziert (Tab. 1). 14 Patienten zeigten Merkmale, die dem COPD Grad IV entsprachen ($FEV_1/FVC < 70\%$; $FEV_1 < 30\%$ oder $< 50\%$ und chronischer respiratorischer Insuffizienz; Lebensqualität merklich beeinträchtigt, Exazerbationen unter Umständen lebensbedrohlich). Vier Sputumproben wurden von Patienten mit der GOLD-Einteilung Grad III gewonnen ($FEV_1/FVC < 70\%$; $FEV_1 < 30-50\%$; mit/ohne chronischen Symptomen, Kurzatmigkeit, Husten und Auswurf). Niedrigere Gradeinteilungen (Grad I-II) konnten nicht in die Studie eingeschlossen werden, da dieser Schweregrad der COPD-Erkrankung keine stationäre Aufnahme erfordert. Des Weiteren expektorieren COPD-erkrankte Patienten im Grad I-II kaum Sputum, sodass es nicht zur experimentellen Verarbeitung und Auswertung dessen kommen konnte. Bei allen an der Studie teilnehmenden Probanden bestand eine Dauermedikation mit inhalativ verabreichten Bronchodilatoren. Mindestens ein inhalativer Bronchodilatator ($n=5$) und

bis vier inhalativ verabreichte Medikamente (n=3) kamen bei der Behandlung der COPD als Therapieoption zum Einsatz.

11 Probanden mit COPD Grad IV hatten eine Langzeittherapie mit einer nicht-invasiven Beatmung (NIB) zur intermittierenden Heimbeatmung oder wurden im Rahmen des stationären Aufenthaltes mit einer NIB therapiert. Diese Studienteilnehmer wurden im Krankenhaus Martha-Maria Halle-Dörlau behandelt. Drei COPD Grad IV-Patienten wurden im Universitätsklinikum Halle (Saale) stationär behandelt. Diese Patienten wurden zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses mit einer Sauerstoff-Langzeittherapie (LTOT, long-term oxygen therapy, Langzeit-Sauerstofftherapie) mit 3 bis 4 Litern Sauerstoff pro Minute ($l\ O_2/min$) behandelt. Drei COPD Grad III-Erkrankte, die an der Studie teilnahmen, wurden supportiv mit LTOT therapiert ($3-4l\ O_2/min$).

3.1.2 COPD-Patienten mit akuter Exazerbation

Eine COPD-Patientin wurde gebeten zweimal eine Sputumprobe abzugeben, da diese eine Exazerbation ihrer Grunderkrankung erlitten hatte (vermehrter und gefärbter Auswurf, lebensbedrohliche Dyspnoe, zunehmender Husten). Die erste Probe wurde kurz nach der stationären Aufnahme und ohne begonnene antibiotische Therapie gewonnen. Die Kontrollprobe wurde zwei Tage vor Entlassung und mit abgeschlossener antibiotischer Therapie abgegeben.

3.1.3 COPD-Patienten mit Bronchialkarzinom

Es wurden insgesamt drei Patienten in die Studie eingeschlossen, die zu ihrer Grunderkrankung COPD ein zusätzliches Bronchialkarzinom entwickelt hatten. Hierbei ging es hauptsächlich um den Nachweis von obligat und fakultativ anaeroben Bakterien im Sputum. Es wurde bei der Auswahl an Patienten kein Unterschied in Art, Ausbreitung und Histologie des Tumorleidens vorgenommen. Bei diesen stationär behandelten Patienten wurde ebenfalls eine Lungenfunktionsmessung durchgeführt, so dass der Nachweis der Grunderkrankung COPD gegeben war. Die gemessenen Lungenfunktionsparameter ergaben dabei einmal den COPD Grad III und zweimal COPD Grad IV laut GOLD-Standard. Die drei Probanden waren männlich und im Alter von 65 bis 86 Jahren. Der Altersdurchschnitt betrug $76,7 \pm 9,9$ Jahre.

Die Einteilung des Schweregrades der COPD bei den teilnehmenden Probanden erfolgte durch die Lungenfunktionsparameter FEV₁, FVC, FEV₁/FVC und die gebotenen klinischen Symptome (Tab. 1) sowie die ermittelte chronische respiratorische Insuffizienz mittels Säure-Basen-Status (SBS) im Blut.

3.1.4 Ethikkommission

Alle Patienten und Patientinnen haben freiwillig die Einverständniserklärung für die Studie über obligat anaerob lebende Bakterien im Sputum von COPD-Patienten unterschrieben. Während des Aufklärungsgespräches zu dieser Studie wurde mehrfach auf die Freiwilligkeit der Teilnahme hingewiesen. Die Möglichkeit des Rückzuges des Einverständnisses aus der Studie wurde ausführlich mit den Probanden besprochen. Die Medikation und die Lungenfunktionsparameter der teilnehmenden Probanden wurden aus den jeweiligen Patientenakten entnommen, anonymisiert, bearbeitet und ausgewertet. Diese Studie wurde unter Einhaltung der Bestimmung der Helsinki-Deklaration durchgeführt. Keine Bedenken gegen diese Studie über obligat anaerob lebende Bakterien im Sputum von COPD-Patienten äußerte am 17.08.2010 die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg (Votum siehe Anlage).

3.2 *In vivo*-Untersuchungen

3.2.1 Sputumprobengewinnung

Insgesamt wurden 21 Sputumproben auf das Vorhandensein von obligat anaeroben Bakterien untersucht. Die Proben wurden alle mit dem gleichen Verarbeitungsschema bearbeitet und ausgewertet. Die Sputumprobengewinnung erfolgte spontan durch die Patienten ohne Manipulation mittels Inhalation oder anderer Verfahren. Nach dem Erhalt wurde die Probe zügig in das Labor des Institutes für Hygiene im Universitätsklinikum Halle (Saale) gebracht. Der Transport der Sputumproben erfolgte in einem 50 Milliliter (ml) Falcon Röhrchen (Art.-Nr.: 171020, TPP Products AG, Trasadingen, Schweiz). Bei der Expektoration wurde stets darauf geachtet, dass es sich um Sputum und nicht um Saliva handelte.

3.2.2 Bestimmung der Lungenfunktionsparameter

Die Ermittlung der Lungenfunktionsparameter zur Schweregradeinteilung der COPD erfolgte durch eine Lungenfunktionstestung. Die Testung wurde stets durch Ärzte und deren Mitarbeiter durchgeführt. Die Messung der Lungenfunktion erfolgte mit Hilfe des MasterScreen Body (Jaeger, Hoechberg, Deutschland). Bei der Lungenfunktionstestung wurden die Werte der FEV₁, FVC und FEV₁/FVC erhoben, da diese das Maß der vorherrschenden Obstruktion am besten widerspiegelt. Des Weiteren wurde die Schweregradeinteilung der COPD-Krankheit mit den erhobenen Werten vorgenommen.

3.3 *In vitro*-Untersuchungen

3.3.1 Bestimmung des Sauerstoffgehaltes im Sputum

Nach der Gewinnung der Sputumproben und dem unverzüglichen Transport in das Institut für Hygiene des Universitätsklinikums Halle (Saale) wurde der O₂-Gehalt im Sputum mittels MI-730 dip typ Oxygen Electrode (Mircoelectrodes consumption, INC., Bedford, NH03110-6805 USA) gemessen (Abb. 5). Nach Kalibrierung der Mikroelektrode auf exakt 21% O₂-Gehalt in der Raumluft konnte die Messsonde in das Sputum gehalten werden. Die Messsonde wurde in einer Tiefe von 10-20 mm eingebracht. An der Anzeige wurde sichtbar, dass der O₂-Gehalt stetig abnahm. Nach dem die Messung beendet war, wurde die Elektrode mit sterilem destillierten Wasser (Aqua dest., Art.-Nr.: 1428, Braun, Melsungen, Deutschland) abgespült. So blieben keine Sputumrückstände an der Elektrode zurück.



Abbildung 5: MI-730 dip typ Oxygen Electrode (Microelectrodes consumption, INC., Bedford, NH03110-6805 USA)

3.3.2 Nachweis obligater und fakultativer Anaerobier

Nach der Bestimmung des O₂-Gehaltes im Sputum wurde das Sputumröhrchen einschließlich der enthaltenen Patientenprobe gewogen (Feinwaage Adventure ARA 520, Ohaus GmbH, Gießen). Der gemessene Wert wurde 1:1 mit autoklavierter und Phosphat gepufferter Saline (phosphate buffered saline, PBS) in dem Falcon-Röhrchen verdünnt. Die 20 fach-konzentrierte PBS-Lösung setzt sich zusammen aus: 85 Gramm (g) Natriumchlorid (NaCl), 14,23g Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) • 12H₂O und 1,35g Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) (MERCK, Darmstadt, Deutschland) in 500ml Aqua dest. und einem eingestellten pH-Wert von 7,4. Das Röhrchen mit der Sputumprobe und dem dazugegebenen PBS wurde durch starkes Schütteln eines Vortexers (Reax Top, Art.-Nr.: 110110200, Heidolph Instruments GmbH, Kelheim, Deutschland) vermischt.

Im darauffolgenden Arbeitsschritt konnte eine Verdünnungsreihe mit sterilen Eppendorf-Röhrchen (PP Tubes, 14ml, Art.-Nr.: 187261, Greiner bio-one, 72636 Frickenhausen, Deutschland), steriler PBS-Lösung und der verdünnten Sputumprobe hergestellt werden.

Die Verdünnungsreihe wurde bis zur zehnfachen Verdünnung (10¹⁰) hergestellt. In die Eppendorf-Röhrchen wurde mit einer sterilen Pipettenspitze (Art.-Nr.: B007.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) jeweils 900 Mikroliter (µl) sterile PBS-Lösung und

in das erste Röhrchen 100µl der verdünnten Sputumprobe gegeben. Dieses Eppendorf-Röhrchen (Verdünnungsstufe 10^{-1}) wurde auf dem Vortexer durchmischt. Mit einer neuen sterilen Pipettenspitze konnten 100µl von der Suspension entfernt und in ein neues mit 900µl PSB-Puffer gefülltes Röhrchen (Verdünnungsstufe 10^{-2}) gegeben werden. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis die Verdünnungsstufe 10^{-10} erreicht wurde.

Um die Anzucht der Bakterienkulturen zu ermöglichen, wurden im nächsten Arbeitsschritt die Verdünnungslösungen auf die Agarplatten aufgetragen (Abb. 6). Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. So wurden jeweils zweimal 10µl Verdünnungssuspension mit sterilen Pipettenspitzen in den einzelnen Verdünnungsstufen auf die Agarplatte aufgetragen. Nach dem Auftragen der Verdünnungslösungen konnten die unterschiedlichen Agarplatten mit verschiedenen Bebrütungsmethoden inkubiert werden.



Abbildung 6: Columbia-Agar mit Bakterienwachstum je nach Verdünnungsgrad

Die verwendeten Agarplatten dienten als spezielles Nährmedium, um den einzelnen Anforderungen der unterschiedlichen Bakterienstämme gerecht zu werden. So wurden Columbia-Agar mit Schafblut (Art.-Nr.: PB5008A, Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) als Anzuchtmedium für fakultativ anaerobe Bakterien, Schaedler-Agar mit 5% Hammelblut (SCS, Art.-Nr.: 43401, bioMérieux® sa, Marcy-l'Etoile, Frankreich) und

Anaerobier-Agar mit 5% Schafblut (CDC, Art.-Nr.: PA256506, Becton, Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) für die Bestimmung von obligat anaeroben Bakterien verwandt. Für die Bestimmung des Bakteriums *P. aeruginosa* wurde Cetrimid-Agar (Art.-Nr.: PO5076A, Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) genutzt.

Die Columbia-Agarplatten wurden für maximal 24 Stunden und bei einer Temperatur von 36 ± 1 Grad Celsius ($^{\circ}\text{C}$) in einem Brutschrank (Typ B6420, Thermo Fischer, 63505 Langenselbold, Deutschland) inkubiert. Die SCS- und CDC-Agarplatten, die ein Nährmedium für obligat anaerobe Bakterien beinhalten, wurden in einer Anaerobierbank (Modular Atmosphere Controlled System, MG 500, Meintrup dws, Löhden-Holte) für mindestens 48 Stunden bei 36 ± 1 $^{\circ}\text{C}$ bebrütet (Abb. 7).



Abbildung 7: Anaerobierbank zur Inkubation der SCS- und CDC-Agarplatten zur Kultivierung der obligat anaerob wachsenden Bakterien

In dieser Anaerobierbank wurde eine obligat anaerobe Bakterienanzüchtung gewährleistet, da eine Atmosphäre ohne das Vorhandensein von O_2 geschaffen wurde (Anoxie). Das Gasmisch dieser Bank besteht aus 80% Stickstoff, 10% Wasserstoff und 10% Kohlendioxid.

Nach den vorgeschriebenen Inkubationszeiten wurden alle Agarplatten und deren Bakterienwachstum optisch begutachtet und bei phänotypisch unterschiedlichen

Bakterienstämmen ein Abstrich mit einer sterilen Impföse (Einwegimpföse, Art.-Nr.: 731101, Greiner bio-one) vorgenommen. Anschließend wurden die unterschiedlichen Bakterienstämme qualifiziert und es erfolgte eine fachgerechte Dokumentation. Dabei wurden die fakultativ anaerob wachsenden Bakterien wieder auf Columbia-Agarplatten ausgestrichen. Die obligat anaerob wachsenden Bakterien wurden lediglich auf die CDC-Agarplatten übernommen. Dies diente als Vorbereitung der Identifikation (siehe Abschnitt 3.3.4) mit dem RapID™ ANA II-System (Art.-Nr.: R 8311002, remel, Lenexa, KS, USA). Die Inkubationsmedien für die entstandenen Einzelkolonien sowie die Bebrütungsbedingungen wurden beibehalten.

Die Einzelkolonien der vermutlich obligat anaerob wachsenden Bakterien wurden zusätzlich auf Columbia-Agarplatten übertragen und für mindestens 24 Stunden im Brutschrank bei 21% O₂/Raumlufte bebrütet. Dieser Schritt diente als Nachweis, dass es sich um obligat anaerobe Bakterien handelt, sofern innerhalb von 24 Stunden kein Bakterienwachstum nachgewiesen wurde. Ein Wachstum wurde als Beweis für das Vorhandensein von fakultativen Anaerobiern angesehen.

3.3.3 Identifikation der fakultativ anaerob wachsenden Bakterien

Die in Reinkultur vorliegenden Bakterien wurden weiter in grampositive und gramnegative Bakterientypen mittels Differenzierungsmedien unterschieden, damit das Crystal-Identifikationssystem (Art.-Nr.: BAL Crystal GP 245140 und BBL Crystal E/NF 245000, Becton, Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) optimale Identifikationsergebnisse liefern konnte.

Die Unterscheidung wurde durch MacConkey-Nährboden Nr. 3 (BD MacConkey II-Agar/ Columbia-CNA-Agar mit 5% Schafblut, Art.-Nr.: 1030183, Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) vorgenommen. Die Einzelkolonien der fakultativen Anaerobier wurden mit sterilen Impfösen auf die Agarplatten übertragen, ausgestrichen und für mindestens 24 Stunden im Brutschrank bei 36 ± 1 °C inkubiert.

Wurde ein Wachstum nach Ablauf der Inkubationszeit nachgewiesen, lagen gramnegative fakultativ anaerobe Bakterienstämme vor.

Diese gramnegativen Stämme wurden auf das Vorhandensein von Oxidase (BBL™ Dry Slide™ Oxidase, Art.-Nr.: 231746, Becton, Dickinson GmbH) getestet. Dabei wurde mit einer sterilen Impföse Material aus der Einzelkolonie auf das Testpapier aufgetragen und ausgestrichen. Ein positives Ergebnis wurde angenommen, wenn sich das Testpapier dunkelblau bis dunkelviolet färbte.

Je nach Bakterientyp (grampositiv oder gramnegativ) wurde das Crystal-Identifikationssystem genutzt. Die einzelnen Bakterienstämme wurden mit einem

sterilen Wattetupfer (Art.-Nr.: 10-00649, Böttger, 94249 Bodenmais, Deutschland) in spezielle Crystal-Solutionen (je nach Gramverhalten) überführt. Durch Ausdrehen des Wattetupfers lösten sich die Bakterien in der Lösung. Die entstandene Lösung wurde nun in die vom Hersteller vorgegebene Plastikkammer überführt, sodass jedes Identifikationsfeld mit der Flüssigkeit benetzt werden konnte. Nach Verschluss des Unterbodens wurden die Plastikkammern für maximal 24 Stunden bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ in den Brutschrank gestellt.

Nach Ablauf der Inkubationsfrist wurden die Plastikkammern aus dem Brutschrank genommen und auf einer ultravioletten (UV) Lampe (BBL CRYSTAL, Panel Viewer, Becton Dickinson, F-38240 Meylan, France) ausgelesen. Die einzelnen Identifikationsfelder reagierten je nach Bakterienart unterschiedlich in der Farb- und UV-Reaktionen, sodass ein Zahlencode entstand. Dieser Wert wurde in den Computer übertragen. Aufgrund der gezeigten und abgelesenen Reaktionen der Proben modifizierte das Computerprogramm eine Identifizierung der einzelnen Bakterien.

3.3.4 Identifikation von obligat anaerob wachsenden Bakterien

Bei der Identifikation von obligat anaerob wachsenden Bakterien wurde das RapID™ ANA II-System (Art.-Nr.: R 8311002, remel, Lenexa, KS, USA) einschließlich der Computer- Software (ERIC® Software, Elektronisches RapID™ Kompendium, Version 1.0, Art.-Nr.: R 8323600, remel) genutzt.

Die Bakterienstämme wurden jeweils mit einem sterilen Wattetupfer von den CDC-Agarplatten abgenommen und in die speziell für dieses Verfahren hergestellte RapID™ -Inokulationslösung (1ml, Art.-Nr.: 8325102, remel) gegeben. Es konnte ein McFarland-Trübungsstandard Nr. 3 (bioMérieux® sa) entstehen. Die hergestellte Lösung wurde für jedes Bakterium in ein gesondertes RapID™-Panel (Art.-Nr.: R 8311002, remel) gegossen und für mindestens vier, maximal sechs Stunden im Brutschrank bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ inkubiert (Abb. 8).



Abbildung 8: RapID™-Panel mit vorhandener Farbreaktion zur Identifikation von obligaten Anaerobiern

Jedes Panel bestand aus zehn Ausbuchtungen, in die sich gleichmäßig die Inokulationsflüssigkeit verteilte. Die erste Auswertung einer Farbreaktion aller Ausbuchtungen erfolgte ohne Zusatz von Reagenzien. Danach wurden in die Ausbuchtungen 3 bis 9 des RapID™-Panels die RapID™ ANA II-Reagenz und in die letzte Ausbuchtung RapID™ ANA II-Spot-Indolreagenz (Abb. 9) gegeben. Nach circa 20 Sekunden zeigte sich eine Farbreaktion.

Wie bei der Auswertung des Crystal-Identifikationssystems wurde ein Zahlencode für das RapID™ ANA II-System wegen der einzelnen Farbreaktionen generiert. Dieser Zahlenwert wurde notiert und in das vorgegebene Computerprogramm eingetragen.



Abbildung 9: RapID™-Panel mit Farbreaktion, RapID™ ANA II-Reagenz und RapID™ ANA II-Spot-Indolreagenz, RapID™ ANA II-Zahlencodebogen

Um eine Identifikation obligat anaerob wachsender Bakterien zu ermöglichen, wurde zusätzlich eine Gramfärbung durchgeführt. Diese zusätzliche Information benötigt das Computerprogramm zur Identifikation der einzelnen Bakterienstämme.

Mit einer sterilen Impföse wurde von der CDC-Agarplatte Reinkolonien entfernt und auf einen Objektträger (Art.-Nr. M 7620, Süsse GmbH, Gudenberg, Deutschland) gegeben und mit einem auf dem Objektträger befindlichen Tropfen 0,9% NaCl-Lösung (Art.-Nr.: 30911 P, Braun, Melsungen, Deutschland) vermischt. Nach Herstellervorgaben wurde der Objektträger mit den Bakterienkolonien gefärbt und fixiert. Zur Analyse des Gramverhaltens und der Bakterienform erfolgte die weitere Untersuchung des Objektträgers unter dem Mikroskop (Axiolab, Carl Zeiss GmbH, Jena, Vergrößerung 100fach) (Abb. 10).

Gemeinsam mit dem erhaltenen Zahlencode der Farbreaktion, dem Gramverhalten und der Bakterienform konnte eine Identifikation über die ERIC®-Software (ERIC® Software, Elektronisches RapID™ Kompendium, Version 1.0, Art.-Nr.: R 8323600, remel) erfolgen. Die gewonnenen Ergebnisse wurden dokumentiert und eine Archivierungsliste erstellt.



Abbildung 10: Mikroskop Axiolab (Carl Zeiss GmbH, Jena, Vergrößerung 100fach) zur Beurteilung des Gramverhaltens der Bakterien und der Bakterienform

3.3.5 Archivierung

Nach der Identifikation der fakultativen und obligat wachsenden Bakterien wurden die reinen Bakterienstämme von den Agarplatten durch sterile Impfösen abgetragen. Die Kulturen für die fakultativen Anaerobier wurden für mindestens einen Tag in eine Casobouillon (Caseinpepton-Sojamehlpepton-Lösung, Art-Nr.: 1041122, Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) gegeben und auf einen Reagenzglasschüttler (Reax-Top, Heidolph Instruments GmbH, Kelheim, Deutschland) mit 320 Umdrehungen pro Minute (U/min) und 36 ± 1 °C gestellt. Die obligat wachsenden Anaerobier wurden ebenfalls in eine Casobouillon gegeben, jedoch zum Wachstum für mindestens 24 Stunden in der Anaerobierbank aufbewahrt.

Zur endgültigen Archivierung wurden von den einzelnen Stämmen jeweils 900µl Flüssigkeit aus der Nährboullion mit sterilen Pipettenspitzen in ein spezielles Röhrchen (Twist top Vials, 2ml, freistehend, Art.-Nr.: N 449.1, Berenson, BioScience, Inc.; SALT Lake City, USA) abpipettiert. Zusätzlich wurden 100 µl Glycerin ($\geq 98\%$, $C_3H_8O_3$, Ph.Eur., wasserfrei, Art.-Nr.: 7530.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in dieses Röhrchen gefüllt. Nach exakter Beschriftung der einzelnen Röhrchen wurden die identifizierten Stämme im Tiefkühlschrank (Biocompact II, Gram Deutschland GmbH, Sarstedt) bei $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

3.4 Statistik

Die errechneten Ergebnisse wurden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben (Exel, Microsoft, Redmont, Wash, USA). Ebenfalls wurde die Signifikanzberechnung (Student's t-test) im Exelprogramm ausgeführt. Als signifikante Werte wurden Werte von $p < 0,05$ erachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung des Sauerstoffgehaltes im Sputum

Bei allen gewonnenen 21 Sputumproben von COPD-Patienten konnte eine Reduktion des Sauerstoffpartialdruckes nachgewiesen werden. Die Messung wurde bei jeder Probe mit dem Ausgangswert von 21% Sauerstoff begonnen. Nach weniger als 30 Sekunden und einer Messsondeneindringtiefe von ca. 10-20 mm stellte sich der reduzierte Sauerstoffwert bei den Proben ein. Dabei ließ sich ein Bereich bei niedrigster O₂-Messung von 12,9% und höchster O₂-Messung von 19,7% auf $16,3 \pm 2,4\%$ ermitteln. Der erniedrigte O₂-Gehalt um knapp ein Viertel des Ausgangswertes zeigt eine partielle Hypoxie in den Sputumproben. Damit obligat und fakultativ anaerobe Bakterien wachsen können, müssen optimale Wachstumsbedingungen für die jeweiligen Bakterienstämme vorherrschen. So wächst z.B. *Streptococcus constellatus* bei einem optimalen pO₂-Gehalt von 5%. Ein Wachstum dieser Bakteriengattung bei 21,0% O₂-Raumluft ist nicht möglich (Koneman et al., 2005).

Bei der Betrachtung der einzelnen Patientenproben zeigt sich ein reduzierter Sauerstoffgehalt bei COPD Grad IV von 21,0% auf $16,6 \pm 2,5\%$, COPD Grad III auf $15,4 \pm 1,4\%$, und bei den Sputumproben von Patienten mit Bronchialkarzinom auf $16,6 \pm 0,8\%$ (Abb. 11). Signifikante Unterschiede in den pO₂-Messungen zwischen den Patientengruppen zeigten sich nicht (COPD IV versus COPD III p=0,16; COPD IV versus Karzinom p=0,49; COPD III versus Karzinom p=0,12).

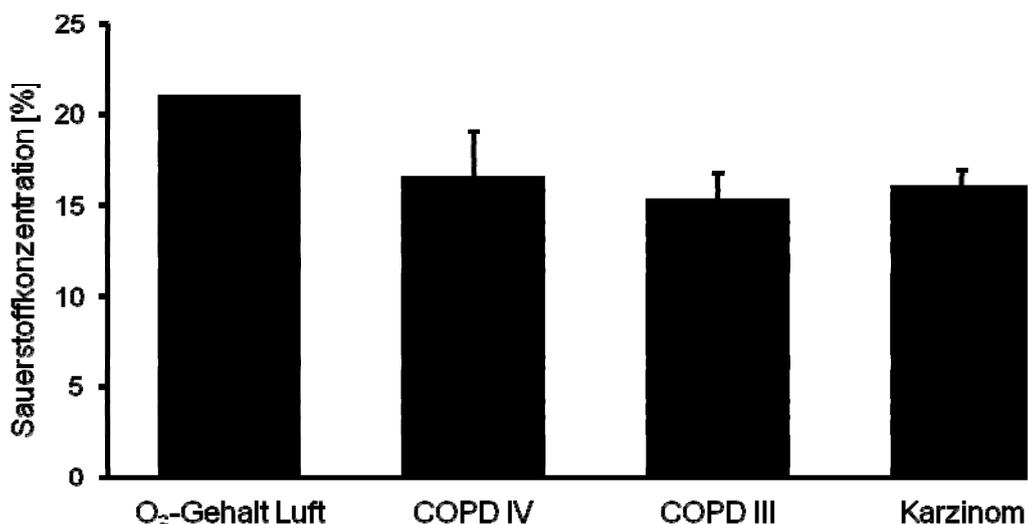


Abbildung 11: O₂-Gehalt in den verschiedenen untersuchten Patientengruppen

4.2 Qualitative Bestimmung der obligaten und fakultativen Anaerobier

4.2.1 Obligat anaerobe Bakterien bei COPD-Patienten

In sämtlichen Sputumproben von 21 COPD-Patienten (100%) ließen sich obligate Anaerobier nachweisen. Dabei konnten sieben verschiedene Genera mit zehn Species kultiviert werden (Tab. 2).

Tabelle 2: Obligate Anaerobier im Sputum von COPD-Patienten (n=21)

Genus	n	Species	n	Häufigkeit in %
<i>Streptococcus</i>	15	<i>intermedius</i>	13	61,9
		<i>constellatus</i>	4	19,0
<i>Staphylococcus</i>	13	<i>saccharolyticus</i>	13	61,9
<i>Peptostreptococcus</i>	12	<i>prevotii</i>	10	47,6
		<i>anaerobius</i>	5	23,8
		<i>asaccharolyticus</i>	1	4,8
<i>Gemella</i>	9	<i>morbillosum</i>	9	42,9
<i>Clostridium</i>	4	<i>difficile</i>	3	14,3
		<i>histolyticum</i>	1	4,8
<i>Campylobacter</i>	4	<i>gracilis</i>	4	19,0
<i>Veillonella spp.</i>	3		3	14,3
Gesamtzahl:	60		66	

Zu den insgesamt am häufigsten nachgewiesenen obligaten Anaerobiern zählen *Streptococcus spp.* (15x), *Staphylococcus saccharolyticus* (13x) und *Peptostreptococcus spp.* (12x).

Die Anzahl der Genera in den Sputen variiert von minimal einer kultivierten Gattung in drei Sputumproben (14,3%) bis zu sechs unterschiedlichen Bakteriengattungen in einer Probe (4,8%). Bei den neun an der Studie teilnehmenden Frauen wurden sechs unterschiedliche Genera an obligat anaerob wachsenden Bakterien mit neun Species gefunden. Bei den zwölf männlichen Probanden wurden ebenfalls sechs verschiedene

Genera und neun Species ermittelt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied beim Vorkommen obligat anaerober Bakterien bezüglich der Geschlechter.

Werden die obligat lebenden Bakterienspezien auf das Vorkommen in den Sputumproben betrachtet, lässt sich ebenfalls eine Mehrheit bei *Streptococcus intermedius* und *Staphylococcus saccharolyticus* mit jeweils 61,9% feststellen, gefolgt von *Peptostreptococcus prevotii* mit 47,6% und *Gemella morbillorum* (42,9%). Prozentual betrachtet kommen *Clostridium histolyticum* und *Peptostreptococcus asaccharolyticus* mit jeweils 4,8% am seltensten vor (Tab. 2).

In den Patientengruppen von COPD Grad IV, COPD Grad III und COPD mit zusätzlichem Bronchialkarzinom traten *Streptococcus intermedius*, *Staphylococcus saccharolyticus*, *Peptostreptococcus prevotii* und *Gemella morbillorum* in der Überzahl auf. Dieser Trend deutete sich bei der gesamten Betrachtung der obligaten Anaerobier der COPD-Patienten an und ist auf die einzelnen Gruppen übertragbar. Die stark variierenden Prozentzahlen lassen sich auf die unterschiedlichen Probandenzahlen zurückführen. In die Bronchialkarzinomgruppe wurden drei Probanden eingeschlossen, in die COPD Grad III-Gruppe vier Probanden und in die COPD Grad IV-Gruppe 14 Probanden. Sieben verschiedene Gattungen der Bakterien wurden in der COPD Grad IV-Gruppe nachgewiesen. Bei COPD Grad III erfolgte kein Nachweis von *Clostridium histolyticum* und *Peptostreptococcus asaccharolyticus*.

Veillonella spp., *Clostridium spp.* und *Peptostreptococcus anaerobius* und *Peptostreptococcus asaccharolyticus* konnten bei der Gruppe der Bronchialkarzinome nicht identifiziert werden (Tab. 3).

Tabelle 3: Prozentualer Anteil obligater Anaerobier in den einzelnen Patientengruppen

Genus	Species	COPD IV	COPD III	Bronchialkarzinom
<i>Streptococcus</i>	<i>intermedius</i>	64,3%	40,0%	66,7%
	<i>constellatus</i>	14,3%	20%	33,3%
<i>Staphylococcus</i>	<i>saccharolyticus</i>	71,4%	40%	33,3%
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>prevotii</i>	28,6%	100%	33,3%
	<i>anaerobius</i>	28,6%	20%	-
	<i>asaccharolyticus</i>	7,1%	-	-
<i>Gemella</i>	<i>morbilorum</i>	28,6%	60%	66,7%
<i>Clostridium</i>	<i>difficile</i>	7,1%	40%	-
	<i>histolyticum</i>	7,1%	-	-
<i>Campylobacter</i>	<i>gracilis</i>	14,3%	20%	33,3%
<i>Veillonella spp.</i>		7,1%	40%	-

4.2.2 Fakultativ anaerobe Bakterien bei COPD-Patienten

In sämtlichen Sputumproben von 21 Patienten (100%) wurden fakultativ anaerob wachsende Bakterien nachgewiesen. Bei der Auswertung zeigte sich, dass insgesamt zehn fakultativ anaerobe Genera mit den jeweiligen Species zu finden waren (n=30) (Tab. 4).

Streptococcus ssp. (17x), *Corynebacterium spp.* (16x), und *Lactococcus lactis spp.* (14x) gehörten bei den fakultativen Anaerobiern zu den am häufigsten nachgewiesenen Bakterien in den Sputumproben von COPD-Erkrankten.

Die maximale Anzahl an kultivierten fakultativ anaerob wachsenden Bakterien wurde mit acht Genera in fünf Sputumproben (23,8%) ermittelt. In einer Probe wurde nur ein fakultativ anaerob wachsendes Bakterium nachgewiesen (4,8%). Bei den in die Studie eingeschlossenen Frauen (n=9) wurden acht Genera mit 23 Species nachgewiesen. Bei den männlichen Probanden (n=12) wurden zehn Genera der fakultativ anaerob lebenden Bakterien mit 25 Species gefunden. Wie auch schon bei den obligaten Anaerobiern zeigte sich kein signifikanter Unterschied der fakultativ anaeroben Bakterien bezüglich der Geschlechter.

Tabelle 4: Fakultative Anaerobier im Sputum von COPD-Patienten (n=21)

Genus	Anzahl	Species	Anzahl	Häufigkeit in %
<i>Streptococcus</i>	17	<i>sanguis</i>	9	42,9
		<i>parasanguis</i>	7	33,3
		<i>pneumoniae</i>	4	19,0
		<i>acidominus</i>	2	9,5
		<i>pyogenes</i>	1	4,8
		<i>mutans</i>	1	4,8
		<i>anginosus</i>	2	9,5
		<i>equinus</i>	1	4,8
<i>Corynebacterium</i>	16	<i>renale group</i>	9	42,9
		<i>diphtheriae</i>	7	33,3
		<i>genitalium</i>	5	23,8
		<i>species</i>	4	19,0
		<i>bovis</i>	5	23,8
		<i>jeikeium</i>	3	14,3
		<i>pseudotuberculosis</i>	2	9,5
<i>Lactococcus lactis spp.</i>	14	<i>cremoris</i>	14	66,7
		<i>lactis</i>	1	4,8
		<i>raffinolactis</i>	2	9,5
<i>Pediococcus</i>	11	<i>pentasaceus</i>	11	52,4
<i>Aerococcus</i>	10	<i>urinae</i>	10	47,6
<i>Staphylococcus</i>	8	<i>saprophyticus</i>	4	19,0
		<i>cohnii</i>	2	9,5
		<i>warnii</i>	3	14,3
		<i>haemolyticus</i>	1	4,8
<i>Enterococcus</i>	6	<i>faecium</i>	4	19,0
		<i>avium</i>	1	4,8
		<i>raffinosis</i>	1	4,8
<i>Micrococcus</i>	3	<i>sedentarius</i>	3	14,3
<i>Escherichia</i>	2	<i>coli</i>	2	9,5
<i>Flavimonas</i>	1	<i>oryzihabitans</i>	1	4,8
Gesamtzahl:	88		122	

4.3 Quantitative Bestimmung der obligaten und fakultativen Anaerobier

4.3.1 Obligat anaerobe Bakterien bei COPD-Patienten

In den Sputumproben (n=21) lag der Mittelwert der Keimanzahl bei $1,8 \times 10^7 \pm 4,5 \times 10^7$ KBE/ml, wobei der Bereich der niedrigsten Keimanzahl bei $3,9 \times 10^4$ KBE/ml und die höchste Keimanzahl bei $3,6 \times 10^7$ KBE/ml lag. Die quantitative Auswertung der obligaten Anaerobier zeigte, dass *Peptostreptococcus prevotii* mit insgesamt $3,6 \times 10^7 \pm 5,9 \times 10^7$ KBE/ml am häufigsten vorhanden war. *Peptostreptococcus prevotii* wurde bei zehn Probanden gefunden und lag bei der qualitativen Bestimmung hinter *Streptococcus intermedius* (13x). Die Keimanzahl pro Sputumprobe von *Streptococcus intermedius* lag bei $3,4 \times 10^7 \pm 7,8 \times 10^7$ KBE/m und damit niedriger als bei *Peptostreptococcus prevotii*. Ebenfalls in 13 Sputumproben vorkommend war *Staphylococcus saccharolyticus*. Die Quantifikation ergab allerdings im Vergleich zu *Peptostreptococcus prevotii* eine niedrigere Keimanzahl von $1,4 \times 10^7 \pm 3,6 \times 10^7$ KBE/ml. Mit $1,3 \times 10^7 \pm 1,7 \times 10^7$ KBE/ml zeigte *Veillonella spp.* eine ähnliche Keimanzahl wie *Staphylococcus saccharolyticus*. Die dritthöchste Keimzahl von obligat anaerob lebenden Bakterien wurde bei *Streptococcus constellatus* beobachtet ($2,0 \times 10^7 \pm 1,5 \times 10^7$ KBE/ml). Die niedrigste Keimanzahl lag bei *Clostridium histolyticum* mit $3,9 \times 10^4$ KBE/ml vor. Eine Korrelation der Häufigkeit des Vorkommens in Sputumproben und der Keimanzahl konnte nicht gezeigt werden.

Bei der quantitativen Betrachtung der Patientengruppen auf die Gesamtkeimanzahl pro Sputumprobe konnte gezeigt werden, dass bei den Patienten mit Bronchialkarzinom die höchste Keimzahl mit $7 \times 10^7 \pm 8,0 \times 10^7$ KBE/ml nachzuweisen war. Die Keimzahl der COPD Grad III-Patientengruppe ergab einen Wert von $2,6 \times 10^7 \pm 5,6 \times 10^7$ KBE/ml. Die Gruppe an COPD Grad IV-erkrankten Patienten bot die geringste Keimzahl von $4,0 \times 10^6 \pm 7,0 \times 10^6$ KBE/ml. Bei den Patienten mit zusätzlichem Bronchialkarzinom lag eine höhere Keimzahl obligater Anaerobier im Sputum vor als bei den Patienten mit COPD Grad IV und COPD Grad III (Abb. 12). Die mittlere Keimzahl von COPD Grad IV mit $4,0 \times 10^6 \pm 7,0 \times 10^6$ KBE/ml war signifikant kleiner als die mittlere Keimzahl der gesamten COPD-Gruppe mit $1,8 \times 10^7 \pm 4,5 \times 10^7$ KBE/ml ($p=0,03$). Auch konnte eine Signifikanz von $p=0,004$ zwischen der gesamten COPD-Gruppe ($1,8 \times 10^7 \pm 4,5 \times 10^7$ KBE/ml) und der Bronchialkarzinomgruppe ($7 \times 10^7 \pm 8,0 \times 10^7$ KBE/ml) nachgewiesen werden. Ein signifikanter Wert von $p=0,009$ ergab sich zwischen der Gruppen COPD Grad IV ($4,0 \times 10^6 \pm 7,0 \times 10^6$ KBE/ml) und COPD Grad III ($2,6 \times 10^7 \pm 5,6 \times 10^7$ KBE/ml). Es zeigte sich eine signifikant höhere Keimanzahl bei COPD Grad III zu COPD Grad IV.

Eine Tendenz zwischen COPD Grad III und der Bronchialkarzinomgruppe bei $p=0,06$ wurde ebenso deutlich. Keine signifikanten Werte ergab der Vergleich von COPD Grad IV zu Bronchialkarzinom ($p=2,2$) und gesamte COPD-Gruppe zu COPD Grad III ($p=0,27$).

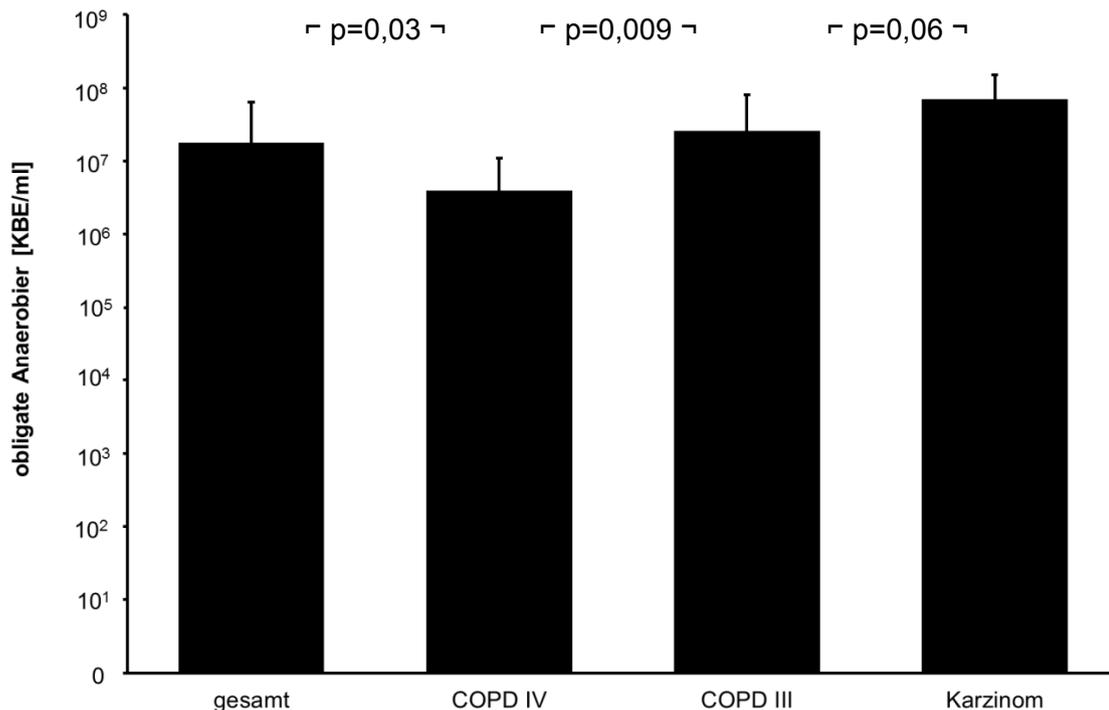


Abbildung 12: Keimzahlen (KBE/ml) der obligat anaeroben Bakterien in den untersuchten Patientengruppen

Bedingt durch die unterschiedliche Probenanzahl in den einzelnen Patientengruppen (COPD Grad IV, COPD Grad III, Bronchialkarzinom) kommt es zu variierenden Ergebnissen (Tab. 5). So konnten in der Gruppe der Bronchialkarzinom-Patienten ($n=3$) sechs verschiedene obligat anaerobe Bakterien bei einer Gesamtzahl von acht obligat wachsenden Anaerobiern quantifiziert werden, wobei *Streptococcus intermedius* ($1,1 \times 10^8 \pm 1,5 \times 10^8$ KBE/ml) und *Gemella morbillorum* ($7,7 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^7$ KBE/ml) jeweils in zwei der drei Proben vorhanden war. *Peptostreptococcus prevotii* ist in der Bronchialkarzinomgruppe das mit der höchsten Keimzahl vorkommende Bakterium mit $1,5 \times 10^8$ KBE/ml ($n=1$), gefolgt von *Staphylococcus saccharolyticus* mit $1,3 \times 10^8$ KBE/ml ($n=1$) und *Streptococcus intermedius*. Die geringste durchschnittliche Keimzahl zeigte *Gemella morbillorum* ($7,7 \times 10^6$ KBE/ml) (Tab. 5).

In der Patientengruppe der COPD Grad III-Erkrankten wurden in den vier Sputumproben neun verschiedene obligate Anaerobier nachgewiesen und quantifiziert, bei einer Gesamtanzahl von insgesamt 18 obligaten Anaerobiern. In jeder Probe wurde *Peptostreptococcus prevotii* mit durchschnittlich $3,7 \times 10^7 \pm 6,1 \times 10^7$ KBE/ml gefunden.

Die höchste quantitative Keimzahl von *Streptococcus intermedius* wurde wie bei den Karzinompatienten mit $1,1 \times 10^8 \pm 1,4 \times 10^8$ KBE/ml gefunden. *Streptococcus constellatus* folgte mit einer Zehnerpotenz weniger mit einer Keimzahl von $2,2 \times 10^7$ KBE/ml (n=1). Der Mittelwert der Keimzahl von *Campylobacter gracilis* blieb im Vergleich zu den Bronchialkarzinomproben bei $1,9 \times 10^7$ KBE/ml (n=1) gleich. Der Genus *Veillonella spp.* trat in den Sputumproben der COPD Grad III-Erkrankten im Vergleich zu den Bronchialkarzinompatienten mit $1,7 \times 10^7 \pm 2,3 \times 10^7$ KBE/ml neu hinzu.

In zwei von vier Proben wurden erstmalig *Peptostreptococcus anaerobius* ($6,5 \times 10^5$ KBE/ml) und *Clostridium difficile* nachgewiesen, welches wiederum in zwei der vier Proben gefunden wurde ($2,6 \times 10^6 \pm 3,5 \times 10^6$ KBE/ml). Es fanden sich *Staphylococcus saccharolyticus* ($2,3 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5$ KBE/ml) in zwei Sputumproben. Hier zeigte sich jedoch eine Reduktion der Keimzahl um drei Zehnerpotenzen im Vergleich zu der Gruppe der Karzinompatienten. Die Keimzahl von *Gemella morbillorum* zeigte ebenfalls einen Rückgang auf $9,0 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^5$ KBE/ml bei gleichzeitig häufigerem Auftreten in den Sputumproben (n=3) als bei den Bronchialkarzinom-Patienten (Tab. 5).

Bei einer Gesamtzahl von 39 nachgewiesenen obligat anaerob wachsenden Bakterien in der Gruppe der Patienten mit COPD Grad IV (n=14) wurden elf unterschiedliche obligate Anaerobier gefunden. Es zeigte sich, dass *Streptococcus constellatus* am häufigsten mit $1,0 \times 10^7 \pm 1,4 \times 10^7$ KBE/ml vorkam. Im Vergleich der COPD Grad IV-Erkrankten mit COPD Grad III-Patienten und den Bronchialkarzinompatienten bleibt die Keimzahl von *Streptococcus constellatus* annähernd konstant. Bei *Staphylococcus saccharolyticus* ($4,8 \times 10^6 \pm 8,2 \times 10^6$ KBE/ml) und *Gemella morbillorum* ($5,4 \times 10^6 \pm 6,0 \times 10^6$ KBE/ml) stiegen die Werte um eine Zehnerpotenz in dieser Patientengruppe im Vergleich zu den COPD Grad III-Erkrankten an. Eine Reduktion von *Streptococcus intermedius* ($1,8 \times 10^6 \pm 2,7 \times 10^6$ KBE/ml) wurde verzeichnet bei gleichzeitig erhöhtem Nachweis in neun von 14 Proben. Es zeigte sich eine reduzierte Keimzahl von *Peptostreptococcus prevotii* ($7,1 \times 10^6 \pm 1,4 \times 10^7$ KBE/ml) im Vergleich zu den zwei anderen Patientengruppen wie auch *Campylobacter gracilis* ($2,3 \times 10^5 \pm 2,4 \times 10^5$ KBE/ml). Eine Progredienz wurde bei *Peptostreptococcus anaerobius* sowohl quantitativ ($3,3 \times 10^6 \pm 4,7 \times 10^7$ KBE/ml) als auch qualitativ (n=4) sichtbar. *Peptostreptococcus asaccharolyticus* ($6,5 \times 10^5$ KBE/ml) und *Clostridium histolyticum*

($3,9 \times 10^4$ KBE/ml) wurden als neue Bakterienspezies in dieser Gruppe nachgewiesen (jeweils $n=1$) und quantifiziert (Tab. 5).

Tabelle 5: Keimanzahlen (KBE/ml) obligater Anaerobier in den verschiedenen Patientengruppen

Genus	Species	COPD IV	COPD III	Bronchialkarzinom
<i>Streptococcus</i>	<i>intermedius</i>	$1,8 \times 10^6$	$1,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$
	<i>constellatus</i>	$1,0 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$	$3,7 \times 10^7$
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>prevotii</i>	$7,1 \times 10^6$	$3,7 \times 10^7$	$1,5 \times 10^8$
	<i>anaerobius</i>	$3,3 \times 10^6$	$6,5 \times 10^5$	-
	<i>asaccharolyticus</i>	$6,5 \times 10^5$	-	-
<i>Staphylococcus</i>	<i>saccharolyticus</i>	$4,8 \times 10^6$	$2,3 \times 10^5$	$1,3 \times 10^8$
<i>Gemella</i>	<i>morbilorum</i>	$5,4 \times 10^6$	$9,0 \times 10^5$	$7,7 \times 10^6$
<i>Clostridium</i>	<i>difficile</i>	$1,0 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	-
	<i>histolyticum</i>	$3,9 \times 10^4$	-	-
<i>Veillonella spp.</i>		$6,0 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$	-
<i>Campylobacter</i>	<i>gracilis</i>	$2,3 \times 10^5$	$1,9 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$

4.3.2 Fakultativ anaerobe Bakterien bei COPD-Patienten

Die mittlere Keimzahl der fakultativ anaerob lebenden Bakterien beträgt $4,1 \times 10^8 \pm 2,3 \times 10^9$ KBE/ml. Die niedrigste Keimanzahl lag bei $1,0 \times 10^3$ KBE/ml, die höchste bei $7,7 \times 10^9$ KBE/ml. Die höchste Keimzahl wurde bei *Enterococcus spp.* ($6 \times 10^9 \pm 8,8 \times 10^9$ KBE/ml) nachgewiesen, gefolgt von *Aerococcus urinae* mit $8,4 \times 10^8 \pm 2,4 \times 10^9$ KBE/ml. *Corynebacterium spp.* ($8,5 \times 10^7 \pm 3,5 \times 10^8$ KBE/ml) wie auch *Flavimonas oryzihabitans* ($8,4 \times 10^7$ KBE/ml), *Micrococcus sedentarius* ($3,4 \times 10^7 \pm 5,7 \times 10^7$ KBE/ml), *Lactococcus lactis spp.* ($3,2 \times 10^7 \pm 5,2 \times 10^7$ KBE/ml), *Streptococcus spp.* ($3,1 \times 10^7 \pm 8,5 \times 10^7$ KBE/ml) und *Staphylococcus spp.* ($1,3 \times 10^7 \pm 3,1 \times 10^7$ KBE/ml) wurden mit einer Zehnerpotenz niedriger als die erstgenannten nachgewiesen. *Pediococcus pentosaceus* ($3,6 \times 10^6 \pm 5,1 \times 10^6$ KBE/ml) und *Escherichia coli* ($2,4 \times 10^5 \pm 5,7 \times 10^4$ KBE/ml) wurden am wenigsten bei den fakultativ anaerob wachsenden Bakterien gesehen.

Der Vergleich der Keimzahlen der fakultativ anaeroben Bakterien bei COPD Grad IV, COPD Grad III und Bronchialkarzinom zeigte, dass die höchste durchschnittliche

Keimzahl bei COPD Grad IV an fakultativen Anaerobier ausgemacht wurde ($5,8 \times 10^8 \pm 3,0 \times 10^9$ KBE/ml). Die niedrigste Keimzahl an fakultativ anaeroben Bakterien wurde in der Patientengruppe COPD Grad III nachgewiesen ($2,0 \times 10^7 \pm 3,1 \times 10^7$ KBE/ml). Die Patienten mit Bronchialkarzinom wiesen eine Keimzahl von $4,3 \times 10^8 \pm 1,6 \times 10^9$ KBE/ml auf (Abb.13). Auffallend bei der Betrachtung der Keimzahl war, dass die Bronchialkarzinomgruppe in beiden Auswertungspunkten (obligat anaerob; fakultativ anaerob) immer vor der COPD Grad III-Gruppe lag.

Bei den fakultativ anaerob lebenden Bakterien zeigten sich keine Signifikanzen unter den Patientengruppen sowie keine Signifikanzen bei dem Vergleich der gesamten Gruppe zu den einzelnen Patientengruppen. Trotz deutlich höherer Keimzahl bei COPD Grad IV ($5,8 \times 10^8 \pm 3,0 \times 10^9$ KBE/ml) an fakultativen Anaerobiern zu COPD Grad III ($2,0 \times 10^7 \pm 3,1 \times 10^7$ KBE/ml) ließen sich keine signifikanten Unterschiede ($p=0,14$) nachweisen.

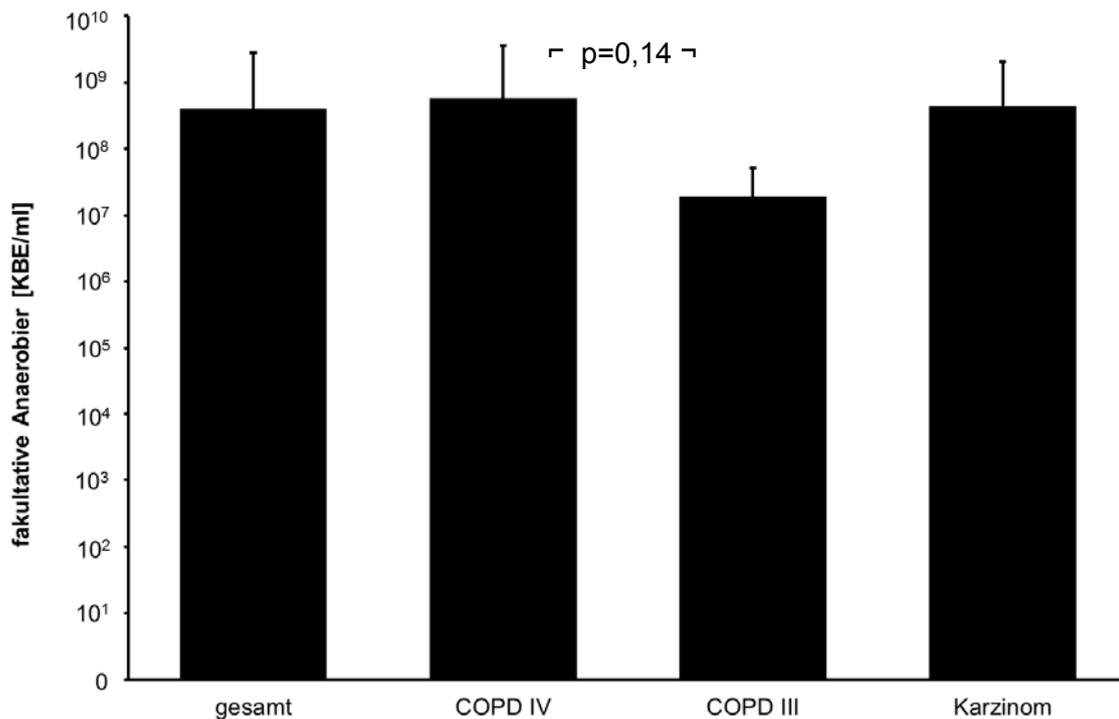


Abbildung 13: Keimzahlen (KBE/ml) der fakultativ anaeroben Bakterien in den verschiedenen untersuchten Patientengruppen

5 Diskussion

5.1 Nachweis obligater und fakultativer Anaerobier bei COPD-Patienten

Mit dieser Arbeit konnte der Nachweis erbracht werden, dass im Sputum von COPD-Erkrankten obligat anaerob lebende Bakterien mit unterschiedlichen Species vorhanden sind. Zudem zeigte die Arbeit, dass in den Patientengruppen (COPD Grad IV, COPD Grad III und COPD mit zusätzlichem Bronchialkarzinom) ebenfalls obligate Anaerobier existent sind. Da in jeder Sputumprobe der 20 Probanden mindestens ein Genus an obligaten Anaerobiern gefunden wurde (100%), ist es naheliegend, von einer obligatorischen Infektion ($>10^5$ Keime/ml) durch obligate Anaerobier in der Lunge von COPD-Patienten auszugehen.

Exakt die gleichen Aussagen können für die fakultativ anaeroben Bakterien getroffen werden. Ein 100%-iger Nachweis erfolgte in jeder Sputumprobe für fakultative Anaerobier bei COPD-Erkrankten und in den übrigen unterschiedlichen Patientengruppen.

Da keine vergleichbaren Arbeiten über obligate Anaerobier bei COPD vorliegen, ist ein Vergleich der in dieser Studie nachgewiesenen Bakterien nicht möglich. Sethi und Murphy (2008) haben in 25-50% der Fälle bei klinisch stabilen COPD-Patienten *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* und *P. aeruginosa* nachgewiesen. Hierbei ist zu beachten, dass es sich um fakultative Anaerobier (*Streptococcus pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae*) und obligate Aerobier (*Moraxella catarrhalis*) handelt.

In der vorliegenden Studie und bei stabilen COPD-Patienten wurde nur *Streptococcus pneumoniae* (n=4) beobachtet. Der Nachweis von *Streptococcus pneumoniae* kann hier als sporadisch beschrieben werden. Miravittles et al. (1999), Ferrer et al. (2005), Rosell et al. (2005) und Nseir et al. (2006) beschreiben in ihren Arbeiten eine gehäufte Infektion mit *P. aeruginosa* in höheren COPD-Stadien.

Diese Aussage konnte in der vorliegenden Studie nicht unterstützt werden, da trotz der Nutzung geeigneter Anzuchtmedien für *P. aeruginosa* (Cetrimid-Agar) bei keinem an der Studie teilnehmenden COPD-Patienten *P. aeruginosa* gefunden wurde. Dies kann an der mikrobiologischen Nachweismethode liegen. In dieser Arbeit wurden die Bakterienstämme optisch und phänotypisch begutachtet und entsprechend ihres

Wachstum es weiter mikrobiologisch aufgearbeitet, inkubiert und den entsprechenden Nachweisverfahren unterzogen.

Rogers et al. (2004) nutzten zum Nachweis von Anaerobiern bei CF-Patienten die aktuelle Methode der rRNA-Technik. Dieses Nachweisverfahren ist sensitiver als der mikrobiologische Nachweis und kann bei sehr geringen Keimzahlen bereits positiv ausfallen.

Bei CF-Patienten ist das Vorhandensein von obligaten Anaerobiern gut dokumentiert (Worlitzsch et al., 2009; Tunney et al., 2008). Der Vergleich von CF und COPD in Hinblick auf die obligaten Anaerobier zeigt, dass einige Genera in beiden Lungenerkrankungen vorkommen. So wurden bei CF und COPD Gemeinsamkeiten bei den Gattungen von *Staphylococcus saccharolyticus*, *Streptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Veillonella spp.*, *Gemella morbillorum* und *Clostridium difficile* aufgezeigt. Dabei traten in den Sputumproben der COPD-Erkrankten nur sieben obligat anaerobe Genera im Vergleich zu den CF-Patienten mit 16 obligat anaeroben Genera auf. Dies lässt sich durch die unterschiedliche Probandenanzahl erklären (COPD n=21; CF n=92).

Einen Unterschied gab es bei der Häufigkeit des Auftretens in den Sputumproben. So konnte bei den COPD-Patienten gezeigt werden, dass obligate Anaerobier in jeder Sputumprobe zu finden waren (100%). Bei CF-Patienten betraf die Rate 91% (Worlitzsch et al., 2009).

5.2 Identifikation von obligaten und fakultativen Anaerobiern bei COPD-Patienten

Damit es zum Wachstum obligater Anaerobier kommen kann, müssen bestimmte Bedingungen gegeben sein. In der Literatur wird das Wachstum von Bakterien in obligat aerob, fakultativ anaerob und obligat anaerob unterteilt (Koneman et al., 2005). Als obligat aerob werden Bakterien bezeichnet, die nur mit Sauerstoff wachsen können und deren optimaler pO_2 bei 21% liegt. Für fakultative Anaerobier ist ein Wachstum sowohl bei Vorhandensein von Sauerstoff als auch in dessen Abwesenheit das wichtigste Kriterium. Der optimale pO_2 liegt in dieser Gruppe bei 0-21%. Einen klassischen Vertreter dieser Gruppe stellt *S. aureus* dar. Ebenfalls in die Gruppe der fakultativen Anaerobier gehören die mikroaerophilen Bakterien. Sie zeigen ein optimales Wachstumsverhalten bei 5% O_2 und kein Wachstum bei 21% O_2 .

Eine weitere Unterteilung der fakultativen Anaerobier erfolgt in die Gruppe der aerotoleranten Anaerobier. Diese zeigen ein gutes Wachstumsverhalten unter anaeroben Bedingungen und ein eingeschränktes Wachstum bei 5-10% Sauerstoffgehalt, wobei der optimale pO_2 bei 3% O_2 liegt (Konemann et al., 2005).

Die Gruppe der obligaten Anaerobier wird in moderat und strikt obligat anaerob unterteilt. In der erstgenannten Untergruppe ist ein Wachstum lediglich ohne Sauerstoff möglich. Die Energiegewinnung erfolgt hierbei über die Gärung. Der optimale pO_2 liegt bei 3% O_2 . Somit ist in der Gruppe der moderat obligat anaerob wachsenden Bakterien eine kurze Sauerstoffexposition möglich. Nicht so bei den strikt obligaten Anaerobiern. In dieser Gruppe wird eine Sauerstoffexposition nicht toleriert. Es kommt bereits nach ca. 10 Minuten zum Absterben der Bakterien. Der optimal pO_2 in dieser Gruppe liegt unter 0,5% O_2 (Konemann et al., 2005).

Um zu demonstrieren, dass es sich um obligate Anaerobier im Sputum von COPD-Patienten handelt, wurden in dieser Arbeit Bedingungen geschaffen, die das obligat anaerobe Wachstum von Bakterien fördern. Es wurden in der vorliegenden Studie mit einer Anaerobierbank und einem speziellen Gasgemisch (80% Stickstoff, 10% Wasserstoff und 10% Kohlendioxid) gearbeitet. Unter diesen Voraussetzungen war lediglich das Wachstum von obligaten Anaerobiern möglich, da ein Sauerstoffgehalt von 0% vorlag.

Durch die speziell in dieser Arbeit verwandten Anzuchtnährböden (Schaedler-Agar mit 5% Hammelblut und Anaerobier-Agar mit 5% Schafblut) wurde eine weitere Voraussetzung für das obligat anaerobe Wachstum der Bakterien geschaffen. Auf diesen geeigneten Anzuchtnährböden können nur obligate Anaerobier wachsen. Die in jedem Arbeitsschritt durchgeführte Doppelbestimmung beim Ausstrich des Sputums der COPD-Patienten auf Anaerobiernährböden, auf Columbia-Agar mit Schafblut und die unterschiedliche Bebrütung (Anaerobierbank und Kühlschrank mit O_2 -Exposition) konnte ebenfalls eine Unterscheidung in obligate und fakultative Anaerobier erfolgen.

5.3 Reduzierter Sauerstoffgehalt im Sputum von COPD-Patienten

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Reduktion des Sauerstoffgehaltes um ein Viertel des Ausgangswertes (21%) bei COPD-Erkrankten dargestellt werden (Abb. 11). Die Anoxie, die obligat anaerob wachsende Bakterien als Wachstumsbedingungen benötigen, konnte dagegen nicht demonstriert werden. Ein Trend in der Reduktion des Sauerstoffgehaltes im Sputum von COPD-Patienten ist zu verzeichnen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass anaerobe und aerobe Bereiche im Sputum dieser Patienten vorhanden sind. Ebenfalls spricht dafür, dass Bedingungen für Anoxie im Sputum von COPD-Erkrankten vorhanden sein müssen, da obligate Anaerobier in dieser Arbeit nachgewiesen wurden.

In der Arbeit von Worlitzsch et al. (2002) wurde *in vivo* bei CF-Patienten eine Anoxie im Sputum dieser Patienten nachgewiesen. Die Messung des Sauerstoffgehaltes der Sputumproben von COPD-Probanden erfolgte in dieser Studie *in vitro*. Es muss davon ausgegangen werden, dass es zu einer Sauerstoffexposition beim Expektorieren des Sputums durch den Patienten gekommen ist. Vorstellbar wäre ebenfalls, dass der Verschluss des Falconröhrchens nicht luftdicht abgedichtet hat, sodass es zu einem minimalen Sauerstoffeinstrom während des Transportes ins Labor kam. Da die Menge an expektoriertem Sputum in den Proben der COPD-Probanden stark schwankte, ist es denkbar, dass die Sonde während des Messvorganges nicht gänzlich vom Sputum bedeckt wurde und es so nur zu reduzierten Sauerstoffwerten kam.

Allerdings ist hervorzuheben, dass die Konsistenz des Sputums von COPD-Patienten oft glasig und nicht so hoch viskös ist wie bei CF-Patienten. Durch diese geringere Viskosität, die auch bei COPD Grad IV zu beobachten ist, wird die O₂-Diffusion in das Sputum besser ermöglicht als bei dem hochviskösem Sputum von CF-Patienten. Dies könnte die gemessene Sauerstoffreduktion erklären.

5.4 Quantifikation obligater und fakultativer Anaerobier bei COPD-Patienten

In der vorliegenden Studie wurden obligat wachsende Bakterien quantitativ im Sputum von COPD-Patienten mit $1,8 \times 10^7 \pm 4,5 \times 10^7$ KBE/ml und fakultativ wachsende Bakterien mit $4,1 \times 10^8 \pm 2,3 \times 10^9$ KBE/ml nachgewiesen. Die hohen Werte lassen auf eine obligatorische Infektion schließen. Da bei der Quantifikation vergleichbare Werte (aus

der Literatur) für die COPD-Patienten fehlen, wurde ebenfalls ein Vergleich mit CF-Patienten unternommen. Bei CF-Patienten wurde eine Keimzahl von $2,2 \times 10^7$ KBE/ml an obligaten und eine Keimzahl von $5,5 \times 10^7$ KBE/ml an fakultativen Anaerobiern gefunden (Worlitzsch et al., 2009).

Die Keimzahlen der obligat anaerob wachsenden Bakterien bei CF und COPD sind nahezu gleich. Die Keimzahlen der fakultativ anaerob wachsenden Bakterien bei CF und COPD differieren dagegen stark. Der Wert für die fakultativen Anaerobier bei COPD ist höher als bei CF-Patienten. Dies kann daran liegen, dass sich CF-Patienten in dauerhafter Antibiotikatherapie befinden, sodass es zu einer Keimzahlreduktion der fakultativen Anaerobier kommen kann (Rogers et al., 2011). Bei COPD-Patienten ist dies in der Regel nicht der Fall. Die in der CF-Therapie häufig eingesetzten Antibiotika (Ceftazidim, Piperazillin/Tazobactam, Meropenem) zeigen in der Regel eine gute Wirkung gegen fakultative Anaerobier (Kerem et al., 2005, Park et al., 1992), sodass dies ebenfalls die niedrigere Keimzahl bei CF-Patienten erklären könnte im Vergleich zu den Keimzahlen der COPD-Erkrankten in dieser Studie.

Werden die Patientengruppen COPD Grad III und Bronchialkarzinom und deren Keimzahlen für obligat anaerob wachsende Bakterien mit den Keimzahlen von obligat anaerob wachsende Bakterien der CF-Patienten betrachtet und gegenübergestellt, zeigen sich ähnlich vergleichbare Keimzahlen (Abb. 12, Abb. 13). Einen leicht erhöhten Wert im Vergleich zu CF-Erkrankten zeigt die Gruppe der Bronchialkarzinome mit $7 \times 10^7 \pm 8,0 \times 10^7$ KBE/ml.

Einen signifikanten Unterschied in den Keimzahlen von obligat anaerob wachsende Bakterien der CF-Patienten ($2,2 \times 10^7$ KBE/ml) stellt die Gruppe der COPD Grad IV-Erkrankten ($4,0 \times 10^6 \pm 7,0 \times 10^6$ KBE/ml) dar. Der Wert bei COPD Grad IV zeigt eine deutlich niedrigere Keimzahl als derjenige der CF-Patienten. Ein Grund dieser Keimzahldifferenz könnte der hoch visköse Mukus bei CF sein. Durch die hohe Viskosität sind die obligaten Anaerobier besser im Biofilm gegen eine Sauerstoffexposition isoliert. Dies wirkt sich positiv auf die vorherrschenden anaeroben Wachstumsbedingungen aus. Ebenso stellt ein sehr zähes Sekret eine Barriere für applizierte Antibiotika und damit eine verminderte Wirksamkeit der antibiotischen Therapie dar (Høiby et al., 2014).

5.5 Keimzahlvergleich obligater Anaerobier bei COPD Grad III und COPD Grad IV

In dieser Studie wurden Keimzahlen bei COPD Grad III (n=4) von $2,6 \times 10^7 \pm 5,6 \times 10^7$ KBE/ml und bei COPD Grad IV (n=14) mit $4,0 \times 10^6 \pm 7,0 \times 10^6$ KBE/ml nachgewiesen. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,009$) in den Keimzahlen zwischen diesen Patientengruppen (Abb. 12). Mit dieser Beobachtung wurde die Hypothese von Eller et al. (1998) widerlegt, dass die pathogenen Bakterien, die für die Zerstörung des Lungengewebes mit verantwortlich sind, in höherer Anzahl bei fortgeschrittener COPD-Erkrankung vorhanden sein müssen. Mit dieser Arbeit konnte ein gegenteiliges Ergebnis aufgezeigt werden.

Bei der Auswertung des therapeutischen Vorgehens während des stationären Aufenthaltes der 14 Probanden mit COPD Grad IV konnte die Anwendung von nicht-invasiven Beatmungsformen beobachtet werden. Diese kam bei elf von 14 Patienten entweder dauerhaft (prä- als auch poststationär, Heimbeatmung) oder intermittierend während des Krankenhausaufenthaltes zum Einsatz. Eine nicht-invasive Beatmung (NIB) kommt bei COPD-Patienten im häuslichen Bereich zur Verwendung, sobald eine Hyperkapnie ($paCO_2 > 70 \text{ mmHg}$) wegen einer Überlastung und Erschöpfung der Atemmuskulatur vorliegt und diese durch den Gebrauch der NIB gemindert werden kann (Nationale VersorgungsLeitlinie COPD 2012, NVL).

Eine weitere Indikation ist die akute Exazerbation mit respiratorischer Insuffizienz ($paO_2 < 60 \text{ mmHg}$ bzw. $8,0 \text{ kPa}$, $paCO_2 > 50 \text{ mmHg}$ bzw. $6,0 \text{ kPa}$ unter O_2 -Zufuhr, $pH < 7,35$). Hierbei wird bevorzugt die non-invasive positive pressure ventilation (NIPPV) als Beatmungsmodus bevorzugt (Plant et al., 2000; Brochard et al., 1995; consensus conference report 1999).

Im Krankenhaus Martha-Maria Halle-Dölau wurden elf an der Studie teilnehmende Probanden mit einer nicht-invasiven Beatmung behandelt. Alle NIB-therapierten COPD-Grad IV-Patienten (n=11) bekamen zusätzlich eine Sauerstoffsufflation von 3-4l O_2 /min. Die Patienten des Universitätsklinikums Halle (Saale) mit COPD Grad IV (n=3) wurden mit LTOT und ebenfalls 3-4l O_2 /min beatmet. Von den COPD Grad III-Patienten (n=4) wurden drei supportiv mittels LTOT therapiert (3-4l O_2 /min).

Unter LTOT wird eine Langzeit-Sauerstofftherapie verstanden, die sowohl die Applikation von Sauerstoff für ± 16 Stunden/Tag als auch die Sauerstoffgabe nur bei körperlicher Belastung beinhaltet (Magnussen et al., 2008).

Es ist zu diskutieren, ob die Therapie mit den nicht-invasiven Beatmungsformen und die Kombination der Nutzung des reinen Sauerstoffes eine deutliche Keimzahlreduktion bei COPD Grad IV im Vergleich zu COPD Grad III hervorruft. Es liegt nahe, dass die nicht-invasive maschinelle Beatmung ein besseres Eindringen des reinen Sauerstoffes mit Hilfe der unterschiedlichen Beatmungsmodi in den Mukus begünstigt und damit die Wachstumsbedingungen für obligat anaerobe Bakterien herabsetzt, welches wiederum zu einer Keimzahlreduktion führt. Die angewandten Beatmungsmodi werden an die Patienten individuell adaptiert, bis eine subjektive Toleranz des Patienten erlangt wird und sich die respiratorische Insuffizienz in Normokapniebereichen befindet (Dreher et al., 2013). Eine antibiotische Therapie kann für diesen Effekt der reduzierten Keimzahl obligater Anaerobier bei COPD Grad IV nicht verantwortlich gemacht werden, da alle 14 Probanden sich in einem stabilen Krankheitsstadium befanden, keine Exazerbation vorlag, und daher keine Antibiotika appliziert wurden.

Das alleinige Therapieren mit LTOT und der Verzicht auf die NIB, so wie es bei COPD Grad III häufig angewendet wird, scheint auf die Keimzahlreduktion der obligaten Anaerobier keinen Einfluss zu haben. Die Keimzahlen ähneln denen der CF-Patienten. Die CF-Patienten werden häufig mit LTOT bei schwerer Hypoxämie ($\text{PaO}_2 < 55 \text{ mmHg}$; $7,3 \text{ kPa}$) behandelt (Magnussen et al., 2008).

Vermutlich reicht die Kraft der Atemmuskulatur nicht aus einen ausreichenden Druckgradienten aufzubauen. Doch nur so wäre ein effektives Eindringen des Sauerstoffes in das zähe Sputum möglich und die Wachstumsbedingungen der obligaten Anaerobier zu beeinflussbar.

Zur Diskussion steht, ob ein frühzeitiger Einsatz der NIB in niedrigeren Schweregraden bei COPD zur Keimzahlreduktion von obligat anaerob lebenden Bakterien führt. Inwieweit obligat wachsende Anaerobier den Krankheitsverlauf beeinflussen oder eine Exazerbation triggern, ist ebenfalls nicht geklärt und erfordert Abklärung.

Mit dem Wissen aus der vorliegenden Studie ist es denkbar, dass ein rechtzeitiger Gebrauch (COPD Grad III oder II) einer NIB die Keimzahl reduzieren könnte, so dass Exazerbationen vermieden, Krankenhausaufenthalte vermindert und Behandlungskosten herabgesetzt werden könnten, und somit die Lebensqualität der Erkrankten deutlich gesteigert werden würden. Die genaue Pathogenese und der Pathomechanismus von obligat und fakultativ lebenden Anaerobiern bei Infektionen der Lunge erfordern weitere Studien mit dem Ziel, die Lebensqualität der Erkrankten zu steigern und Mortalität und Morbidität zu senken.

7 Zusammenfassung

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung COPD („chronic obstructive pulmonary disease“) kann als Volkskrankheit verstanden werden, welche eine erhöhte Morbidität und Mortalität weltweit mit sich bringt (Celli et al., 2004). In Deutschland liegt die Prävalenz der COPD (Grad II-IV) bei 13,2% (Geldmacher et al., 2008), wobei eine Dunkelziffer von 40% nicht diagnostizierte COPD-Erkrankungen angenommen wird (Buist et al., 2007). Schätzungen haben ergeben, dass die COPD-Erkrankung im Jahr 2020 die dritthäufigste Todesursache weltweit sein wird (Chapmann et al., 2006).

Umso wichtiger ist es, die Pathogenese dieser Lungenerkrankung besser zu verstehen. In diesem Zusammenhang sind die mikrobiologischen Veränderungen im vermehrt produzierten Sputum bei COPD von wesentlicher Bedeutung. Ob und inwieweit obligat anaerob lebende Bakterien im Sputum von COPD-Patienten vorkommen blieb bislang ungeklärt und sollten daher in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Messung des pO_2 im Sputum dieser Patienten. Weiterhin sollten die Keimzahlen in den Sputumproben der Patientengruppen COPD Grad III, COPD Grad IV und COPD-Erkrankung mit zusätzlichem Bronchialkarzinom verglichen werden.

Mit Hilfe der mikrobiologischen Aufarbeitung der 21 Sputumproben von COPD-Erkrankten (14 Proben von COPD Grad IV-Erkrankten, vier Proben von COPD Grad III-Erkrankten und drei Proben von COPD-Erkrankten mit zusätzlichem Bronchialkarzinom) anhand spezieller Identifikationssysteme sowie einer Quantifikation erfolgte der Nachweis von obligat und fakultativ wachsenden Bakterien im Sputum der COPD-Patienten. Der Sauerstoffgehalt im Sputum der COPD-Patienten wurde *in vitro* über eine ins Sputum eingebrachte Messsonde bestimmt.

In allen Sputumproben (100%) der an COPD erkrankten Patienten wurden obligat anaerob Bakterien (sieben Genera und zehn Species) nachgewiesen. Ebenso wurde in sämtlichen Sputumproben (100%) der Nachweis von fakultativen Anaerobiern (zehn Genera mit 30 Species) erbracht. Bei der Messung des Sauerstoffgehaltes im Sputum der COPD-Patienten zeigte sich eine Reduktion des Sauerstoffpartialdruckes bei einem Ausgangswert von 21% auf $16,3 \pm 2,4\%$. Die Keimzahlen der obligaten und fakultativen Anaerobier variierten um eine Zehnerpotenz. Es zeigte sich eine niedrigere Keimzahl bei obligat anaeroben Bakterien im Bereich von $8 \times 10^7 \pm 4,5 \times 10^7$ KBE/ml als bei den fakultativen Anaerobiern mit einem Wert von $4,1 \times 10^8 \pm 2,3 \times 10^9$ KBE/ml.

Zu den insgesamt am häufigsten nachgewiesenen obligaten Anaerobiern zählen *Streptococcus spp.* (15x), *Staphylococcus saccharolyticus* (13x) und *Peptostreptococcus spp.* (12x). Bei der Quantifizierung der obligaten Anaerobier wiesen *Peptostreptococcus prevotii* mit $3,6 \times 10^7 \pm 5,9 \times 10^7$ KBE/ml, *Streptococcus intermedius* mit $3,4 \times 10^7 \pm 7,8 \times 10^7$ KBE/ml und *Staphylococcus saccharolyticus* mit $1,4 \times 10^7 \pm 3,6 \times 10^7$ KBE/ml die höchsten Keimzahlen auf.

Unter den fakultativen Anaerobiern waren *Streptococcus spp.* (17x), *Corynebacterium spp.* (16x), und *Lactococcus lactis spp.* (14x) die am häufigsten in den Sputumproben von COPD-Erkrankten nachgewiesenen Bakterien.

Die höchste Keimzahl wurde allerdings bei *Enterococcus spp.* ($6 \times 10^9 \pm 8,8 \times 10^9$ KBE/ml) nachgewiesen, gefolgt von *Aerococcus urinae* mit $8,4 \times 10^8 \pm 2,4 \times 10^9$ KBE/ml. *Corynebacterium spp.* ($8,5 \times 10^7 \pm 3,5 \times 10^8$ KBE/ml) als auch *Flavimonas oryzihabitans* ($8,4 \times 10^7$ KBE/ml), *Micrococcus sedentarius* ($3,4 \times 10^7 \pm 5,7 \times 10^7$ KBE/ml), *Lactococcus lactis ssp.* ($3,2 \times 10^7 \pm 5,2 \times 10^7$ KBE/ml), *Streptococcus spp.* ($3,1 \times 10^7 \pm 8,5 \times 10^7$ KBE/ml) und *Staphylococcus spp.* ($1,3 \times 10^7 \pm 3,1 \times 10^7$ KBE/ml) wurden mit einer Zehnerpotenz niedriger als die erstgenannten nachgewiesen.

Die Auswertung der Keimzahlen von fakultativen Anaerobiern bei COPD Grad IV, COPD Grad III und COPD-Erkrankung mit zusätzlichem Bronchialkarzinom ergab, dass in der Gruppe der COPD Grad IV-Patienten die höchste Keimzahl an fakultativ anaerob lebenden Bakterien mit $5,8 \times 10^8 \pm 3,0 \times 10^9$ KBE/ml vorlag. Bei COPD Grad III wurde die niedrigste Keimzahl von $2,0 \times 10^7 \pm 3,1 \times 10^7$ KBE/ml an fakultativen Anaerobiern ermittelt. Die Patientengruppe der COPD-Erkrankten mit zusätzlichem Bronchialkarzinom wies eine mittlere Keimanzahl an fakultativ anaeroben Bakterien von $4,3 \times 10^8 \pm 1,6 \times 10^9$ KBE/ml auf.

Bei der Auswertung von obligat anaeroben Bakterien in den Patientengruppen zeigte sich dagegen die höchste Keimzahl bei den COPD-Erkrankten mit zusätzlichem Bronchialkarzinom mit $7 \times 10^7 \pm 8,0 \times 10^7$ KBE/ml. Mit einer Keimzahl von $2,6 \times 10^7 \pm 5,6 \times 10^7$ KBE/ml folgte die Gruppe der COPD Grad III-Patienten. Die niedrigste Keimzahl wurde überraschenderweise in der Gruppe der COPD Grad IV-Patienten mit $4,0 \times 10^6 \pm 7,0 \times 10^6$ KBE/ml ermittelt. Der Vergleich der mittleren Keimzahlen von COPD Grad III zu COPD Grad IV zeigte eine Signifikanz von $p=0,009$.

Der Nachweis von obligaten Anaerobiern bei allen COPD-Patienten legt nahe, dass in der COPD-Lunge anaerobe Bereiche vorliegen müssen. Der gleichzeitige Nachweis auch fakultativ anaerober Bakterien legt eine obligatorische Mischinfektion bei der COPD-Lungenentzündung nahe. Diese Beobachtung wird auch durch die Reduktion

des Sauerstoffpartialdrucks im COPD-Sputum um ein Viertel des Ausgangswertes gestützt.

Die Auswertung des Therapieprotokolls mittels Patientenakte bei den COPD Grad IV-Patienten zeigte, dass bei elf Patienten die Nutzung einer nicht-invasiven Beatmung in Kombination mit reiner Sauerstoffapplikation vorlag. Es ist zu diskutieren, ob diese Therapieform die festgestellte Keimzahlreduktion bei COPD Grad IV im Vergleich zu COPD Grad III mit verursacht. Die unterschiedlichen Beatmungsmodi könnten einen Sauerstofftransport in den Mukus begünstigen und damit die Wachstumsbedingungen für obligat anaerobe Bakterien verschlechtern.

Wie und ob obligat anaerob lebende Bakterien den Krankheitsverlauf beeinflussen oder Exazerbationen triggern können, ist nicht geklärt. Es ist denkbar, dass durch den frühzeitigen Gebrauch der nicht-invasiven Beatmung die Keimzahl reduziert werden könnte, sodass Exazerbationen vermieden, Krankenhausaufenthalte vermindert und Behandlungskosten herabgesetzt werden könnten, sodass die Lebensqualität der Erkrankten deutlich gesteigert würde.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass in der vorliegenden Studie erstmals das Vorhandensein von obligat anaerob lebenden Mikroorganismen (zusätzlich zu den bereits bekannten fakultativen Anaerobiern) im Sputum aller COPD-Patienten nachgewiesen wurde. In welchem Ausmaß die obligaten Anaerobier die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung beeinflussen, ist allerdings weiterhin unbekannt. Wenngleich es für eine Änderung der therapeutischen Optionen noch weit zu früh ist, so muss das Vorkommen obligater Anaerobier zukünftig in Modelle zur Pathogenese der COPD-Lungenentzündung mit einbezogen werden.

7 Literaturverzeichnis

Anonymus (1999) Clinical indications for noninvasive positive pressure ventilation in chronic respiratory failure due to restrictive lung disease, COPD, and nocturnal hypoventilation (1999) - a consensus conference report. *Chest* 116 (2):521-34

Anonymus (2012) Nationale VersorgungsLeitlinie COPD (Januar 2012) Langfassung; basierend auf der Fassung Februar 2006, Version 1.9, AWMF-Reg.-Nr.: nvl/003; http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/nvl-003l_S3_COPD_abgelaufen.pdf; Aufruf: 07.06.2015

American Thoracic Society (1995) Standard for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 152: S77-S121

Barnes PJ (2000) Chronic obstructive pulmonary disease. *New Engl J Med* 343: 269-280

Barnes PJ (2004) Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *COPD* 1: 59-70

Berenson CS, Garlipp MA, Grove LJ, Maloney J, Sethi S (2006a) Impaired phagocytosis of nontypeable *Haemophilus influenzae* by human alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect Dis.* 194: 1375-1384

Berenson CS, Wrona CT, Grove LJ, Maloney J, Garlipp MA, Wallace PK, Stewart CC, Sethi S (2006b) Impaired alveolar macrophage response to *Haemophilus* antigens in chronic obstructive lung disease. *Am J Crit Care Med* 174: 31-40

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 lung of patients with cystic fibrosis and in a mouse model. *J Infect Dis* 192 (3): 410-419

Brochard L, Mancebo J, Wysocki M, Lofaso F, Conti G, Rauss A, Simonneau G, Benito S, Gasparetto A, Lemaire F, Isabey D, Harf A (1995) Noninvasive ventilation for acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Eng J Med* 333 (13): 817-22

Brook I, Fink R (1983) Transtracheal aspiration in pulmonary infection in children with cystic fibrosis. *Eur J Respir Dis* 64: 51-57

Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, Menezes AM, Sullivan SD, Lee TA, Weiss KB, Jensen RL, Marks GB, Gulsvik A, Nizankowska-Mogilnicka E and BOLD Collaborative Research Group (2007) International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet* 370 (9589): 741-750

Celli BR, MacNee W, Agusti A, Anzueto A, Berg B, Buist AS, Calverley PMA, Chavannes N, Dillard T, Fahy B, Fein A, Heffner J, Lareau S, Meek P, Martinez F, McNicholas W, Muris J, Austegard E, Pauwels R, Rennard S, Rossi A, Siafakas N, Tjep B, Vestbo J, Wouters E, ZuWallack R (2004) Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 23: 932–946; DOI: 10.1183/09031936.04.00014304

Chapmann KR, Mannino DM, Soriano JB, Vermeire PA, Buist AS, Thun MJ, Connell C, Jemal A, Lee TA, Miravitless M, Aldington S, Beasley R (2006) Epidemiology and costs of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 27 (1):188-207

Cosio MG, Saetta M, Agusti A (2009) Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* (23) 360: 2445-2454

Corey M, Farewell V (1996) Determinants of mortality from cystic fibrosis in Canada 1970-1989. *Am J Epidemiol* 143: 1007-1017

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

D'Argenio DA (2004) The pathogenic lifestyle of *Pseudomonas aeruginosa* in model systems of virulence. *Pseudomonas: Genomics, Life Style and Molecular Architecture*, Vol 1 (Ramos J-L, ed), pp.477-504. Kluwer Academics/Plenum Publishers, New York

de Vries SP, Bootsma HJ, Hays JP, Hermanns PW (2009) Molecular aspects of *Moraxella catarrhalis* pathogenesis. *Microbiol Mol Biol R* 73: 389-406

Dreher M, Schulte L, Ekkernkamp E, Zirlik A (2013) Influence of high-intensity noninvasive positive pressure ventilation on biomarkers in stable hypercapnic COPD patients, Abstract 1973, ERS 2013.

Döring G, Parameswaran IG, Timothy FM (2010) Differential adaptation of microbial pathogens to airways of patients with cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *FEMS Microbiol Rev* (24): 661-671

Eller J, Ede A, Schaberg T, Niederman MS, Mauch H, Lode H (1998) Infective exacerbations of chronic bronchitis: relation between bacteriologic etiology and lung function. *Chest* 113 (6): 1542-1548

Erwin AL, Smith AL (2007) Nontypeable *Haemophilus influenzae*: understanding virulence and commensal behavior. *Trends Microbiol.* 15: 355-362

Ferrer M, Ioanas M, Arancibia F, Marco MA, de la Bellacasa JP, Torres A (2005) Microbial airway colonization is associated with noninvasive ventilation failure in exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Crit Care Med* 33: 2003-2009

Geldmacher H, Biller H, Herbst A, Urbanski K, Allison M, Buist AS, Hohlfeld J, Welte T (2008) Die Prävalenz der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) in Deutschland. Ergebnisse der BOLD-Studie. *Dtsch Med Wochenschr* 133 (50): 2609-2614

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

Greenberg SB, Allen M, Wilson J, Atmar RL (2000) Respiratory viral infections in adults with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 167-173

Hill AT, Bayley D, Stockley RA (1999a) The interrelationship of sputum inflammatory markers in patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 893-898

Hill AT, Campbell EJ, Bayley DL, Hill SL, Stockley RA (1999b) Evidence for excessive bronchial inflammation during an acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease in patients with alpha (1)-antitrypsin deficiency (PiZ). *Am J Respir Crit Care Med* 160 (6): 1968-1975

Hoffmann N, Rasmussen TB, Jensen PO, Stub C, Hentzer M, Molin S, Ciofu O, Givskov M, Johansen HK, Hoiby N (2005) Novel mouse model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection mimicking cystic fibrosis. *Infect Immun* 73 (4): 2504- 2514

Hogardt M, Roeder M, Schreff AM, Eberl L, Heesemann J (2004) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* *exoS* is controlled by quorum sensing and RpoS. *Microbiology* 150: 843-851

Hogardt M, Hoboth C, Schmoltdt S, Henke C, Bader L, Heesemann J (2007) Stage-specific adaptation of hyper-mutable *Pseudomonas aeruginosa* isolates during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 195: 70-80

Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Pare PD (2004) The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *New Engl J Med* 350: 2645-2653

Hogg JC, Timens W (2009) The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Pathol* 4: 435-459

Høiby N, Frederiksen B (2000) Microbiology of Cystic Fibrosis. In: Hodson ME, Geddes D (Eds) *Cystic Fibrosis* 2nd Edition; 2000: p 83-108.

Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, Hall-Stoodley L, Holá V, Imbert C, Kirketerp-Møller K, Lebeaux D, Oliver A, Ullmann AJ, Williams C, Zimmerli W (2014) ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect* 2014: Volume 21, Supplement 1, Page S1-S25

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

Jones AM, Dodd ME, Webb AK (2001) *Burkholderia cepacia*: current clinical issues, environmental controversies and ethical dilemmas. Eur Respir J 17: 295-301

Kerem E, Conway S, Elborn S, Heijerman H, Consensus Committee (2005) Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus. J Cyst Fibros 4 (1): 7-26

Koch C, Høiby N (1993) Pathogenesis of cystic fibrosis. Lancet 341(8852):1065-9

Konietzko N, Fabel H, Weißbuch Lunge 2005: Defizite, Zukunftsperspektiven, Forschungsansätze. Die Lunge und ihre Erkrankungen; Zur Lage und Zukunft der Pneumologie in Deutschland. 3rd ed. Thieme Verlag, Stuttgart, 2005

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, jr. editors: Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6. Aufl. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, New York, 2005

Lee DG, Urbach JM, Wu G, Liberati NT, Feinbaum RL, Miyata S, Diggins LT, He J, Saucier M, Déziel E, Friedman L, Li L, Grills G, Montgomery K, Kucherlapati R, Rahme LG, Ausubel FM (2006) Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. Genome Biol 7 (10): R90

Lopez AD, Murray CC (1998) The global burden of disease, 1990-2020. Nat Med 4 (11): 1241-3

Lopez AD, Shibuya K, Rao C, Mathers CD, Hansell AL, Held LS, Schmid V, Buist S (2006) Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. Eur Respir J 27 (2): 397-412

Magnussen H, Kirsten AM, Köhler D, Morr H, Sitter H, Worth H (2008) Leitlinien zur Langzeit-Sauerstofftherapie. Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V. Pneumologie 62 (12): 748-756

Mannino DM, Homa DM, Akinbami LJ, Ford ES, Redd SC (2002) Chronic obstructive pulmonary disease surveillance-United States (1971-2000) MMWR Surveill Summ; 51: 1-16

Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzky JT, Davis CW, Boucher RC (1998) Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airway disease. *Cell* 95 (7): 1005-1015

McKenney D, Pouliot KL, Wang Y, Murthy V, Ulrich M, Döring G, Lee JC, Goldmann DA, Pier GB (1999) Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science* 284 (5491): 1523-1527

Miravittles M, Espinosa C, Fernández- Laso E, Martos JA, Maldonado Ja, Gallego M (1999) Relationship between bacterial flora in sputum and functional impairment in patients with acute exacerbations of COPD. Study Group of Bacterial Infection in COPD. *Chest* 116 (1): 40-46

Murphy TF, Parameswaran IG (2009) *Moraxella catarrhalis*, a human respiratory tract pathogen. *Clin Infect Dis* 49 (1): 124-131

Murray CJL, Lopez AD (1996) The global burden of disease, a comprehensive assessment of mortality and disability from disease, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020. Cambridge: Harvard University Press

Nseir S, Di Pompeo C, Cavestri B, Jozefowicz E, Nyunga M, Soubrier S, Roussel-Delvallez M, Saulnier F, Mathieu D, Durocher A (2006) Multiple-drug-resistant bacteria in patients with severe acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: Prevalence, risk factors, and outcome. *Crit Care Med* 34 (12): 2959-2966

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

Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS, the GOLD Scientific Committee (2001) Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 163 (5): 1256-1276

Perez Vidakovics ML, Riesbeck K (2009) Virulence mechanisms of *Moraxella catarrhalis* in the pathogenesis of infection. *Curr Opin Infect Dis* 22: 279-285

Plant PK, Owen JL, Elliott MW (2000) Early use of non-invasive ventilation for acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease on general respiratory wards: a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 355 (9219): 1931-5

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

Rakhimova E, Wiehlmann L, Brauer AL, Sethi S, Murphy TF, Tümmler B (2009) *Pseudomonas aeruginosa* population biology in chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect Dis* 200 (12): 1928-1935

Ramsey DM, Wozniak DJ (2005) Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol Microbiol* 56 (2): 309-322

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

Rogers GB, Hoffman LR, Döring G (2011) Novel concepts in evaluating antimicrobial therapy for bacterial lung infections in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 10 (6): 387-400

Rosell A, Monso E, Soler N, Torres F, Angrill J, Riise G, Zalacaín R, Morera J, Torres A (2005) Microbiologic determinants of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med* 165 (8): 891-897

Schweda EK, Richards JC, Hood DW, Moxon ER (2007) Expression and structural diversity of the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*: implication in virulence. *Int J Med Microbiol* 297 (5): 297-306

Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, Moric I, Sanderson G, Message S, Maccallum P, Meade TW, Jeffries DJ, Johnston SL, Wedzicha JA (2001) Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care* 164 (9): 1618-1623

Sethi S, Murphy TF (2008) Infection in the Pathogenesis and Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 359: 2355-2365

Siafakas NM, Vermeire P, Pride NB, Paoletti P, Gibson J, Howard P, Yernault JC, Decramer M, Higenbottam T, Postma DS, Rees J on behalf of the Task Force (1995) Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). A consensus statement of the European Respiratory Society (ERS). *Eur Respir J* 8: 1398-1420

Soler N, Ewig S, Torres A, Filella X, Gonzalez J, Zaubet A (1999) Airway inflammation and bronchial microbial patterns in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 14: 1015- 1022

Starner TD, Zhang N, Kim GH, Apicella MA, McCray PB Jr (2006) *Haemophilus influenzae* forms biofilms on airway epithelia: implications in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 174 (2): 213-220

Statistisches Bundesamt. Statistisches Jahrbuch. Jahrgänge 1968-1999. Stuttgart: Kohlhammer 1999

Stockley RA (1999) Neutrophils and protease/antiprotease imbalance. *Am J Resp Crit Care* 160: S49- S52.

Tunney MM, Field TR, Moriarty TF, Patrick S, Döring G, Muhlebach MS, Wolfgang MC, Boucher R, Gilpin DF, McDowell A, Elborn JS (2008) Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 177 (9): 955-1001

Ulrich M, Bastian M, Cramton SE, Ziegler K, Pragman AA, Bragonzi A, Memmi G, Wolz C, Schlievert PM, Cheung A, Döring G (2007) The staphylococcal respiratory response regulator SrrAB induces ica gene transcription and PIA expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions. *Mol Microbiol* 65 (5): 1276-1287

van Delden C, Iglewski BH (1998) Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis.* 1998 Oct-Dec; 4(4): 551–560.

Viglio S, Ladarola P, Lupi A, Trisolini R, Tinelli C, Balbi B, Grassi V, Worlitzsch D, Döring G, Meloni F, Meyer KC, Dowson L, Hill SL, Stockley RA, Luisetti M (2000) MEKC of desmosine and isodesmosine in urine of chronic destructive lung disease patients. *Eur Respir J* 15 (6): 1039-1045

Vogelmeier C, Vestbo J (2014) COPD assessment: I, II, III, IV and/or A, B, C, D. *Eur Respir J* 43 (4): 949-950

Welsh MJ, Ramsey BW (1998) Research on Cystic Fibrosis. A Journey from the Heart House. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 148-154

Williams P, Cámara M (2009) Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: atale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* 12 (2): 182-191

Winstanley C, Fothergill JL (2009) The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. *FEMS Microbiol Lett* 290 (1): 1-9

Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, Birrer P, Bellon G, Berger J, Weiss T, Botzenhart K, Yankaskas JR, Randell S, Boucher RC, Döring G. (2002) Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 109 (3): 317-325

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 (5): 454-460

8 Thesen

- (1) Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung COPD („chronic obstructive pulmonary disease“) kann als Volkskrankheit verstanden werden. Sie entwickelt sich mittlerweile zu einer der führenden Krankheiten, die für erhöhte Morbidität und Mortalität weltweit stehen. Es wird davon ausgegangen, dass die COPD-Erkrankung im Jahre 2020 die dritthäufigste Todesursache sein wird.
- (2) Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung leiden unter Infektionen der Lunge mit fakultativen Anaerobiern. Ob auch obligat anaerobe Bakterien an der Lungeninfektion beteiligt sind, ist bislang nicht untersucht worden.
- (3) In dieser Studie wurde das Vorhandensein von obligat anaeroben Bakterien im Sputum von COPD-Patienten untersucht, es erfolgte eine Identifikation und Quantifikation dieser Mikroorganismen, außerdem wurde der pO_2 in COPD-Sputumproben gemessen. Weiter wurden die Keimzahlen in den Sputen der Patientengruppen COPD Grad III, COPD Grad IV und COPD-Patienten mit zusätzlichem Bronchialkarzinom verglichen.
- (4) In allen 21 Sputumproben (100%) konnten obligate (sieben Genera und zehn Species) und fakultative (10 Genera und 30 Species) Anaerobier nachgewiesen werden.
- (5) Die Keimzahlen der obligat anaeroben Bakterien betragen $1,8 \times 10^7 \pm 4,5 \times 10^7$ KBE/ml, die der fakultativen Anaerobier $4,1 \times 10^8 \pm 2,3 \times 10^9$ KBE/ml.
- (6) Die Messung des pO_2 in den Sputumproben der COPD-Probanden zeigte eine Reduktion des Sauerstoffpartialdrucks auf $16,3 \pm 2,4\%$, was eine Erniedrigung um zirka ein Viertel des Ausgangswertes (21%) darstellt.
- (7) Eine Identifikation und Quantifikation von obligaten Anaerobiern gelang auch in den Patientengruppen COPD Grad IV ($4,0 \times 10^6 \pm 7,0 \times 10^6$ KBE/ml), COPD Grad III ($2,6 \times 10^7 \pm 5,6 \times 10^7$ KBE/ml) und COPD-Erkrankung mit zusätzlichem Bronchialkarzinom ($7 \times 10^7 \pm 8,0 \times 10^7$ KBE/ml).

- (8) Der Nachweis obligat anaerober Bakterien in allen Sputumproben zusätzlich zu den bekannten fakultativen Anaerobiern belegt das Vorhandensein von anaeroben Bereichen im COPD-Sputum. Deshalb ist bei der COPD-Lungeninfektion von einer obligatorischen Mischinfektion obligat und fakultativ anaerober Bakterien auszugehen.
- (9) Die signifikante ($p=0,009$) Keimzahldifferenz der obligaten Anaerobier zwischen Patienten mit COPD III und COPD IV lässt vermuten, dass die Therapie mit nicht-invasiven Beatmungsformen unter Nutzung von reinem Sauerstoff eine Reduktion dieser Bakterien bewirkte, zumal die 14 an COPD Grad IV erkrankten Probanden nicht unter Antibiotikatherapie standen.
- (10) Möglicherweise könnte der frühzeitige Gebrauch (COPD Grad III) von nicht-invasiven Beatmungsformen mit reinem Sauerstoff den hohen Keimzahlen der obligaten Anaerobier entgegenwirken, was eine neue Therapieoption bei COPD darstellen würde.

9 Anlagen

9.1 Ethikvotum

				MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE - WITTENBERG	
				Medizinische Fakultät Ethik-Kommission	
<small>Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 06097 Halle (Saale)</small>					
<p>Herrn Oberarzt Dr. D. Worlitzsch Institut für Hygiene Universitätsklinikum Halle (Saale) Johann-Andreas-Segner-Straße 12 06097 Halle</p>					
Ihre Zeichen	Ihr Schreiben vom	Unsere Zeichen	Datum		
		hm-bü	17.08.2010	Postanschrift: 06097 Halle (Saale)	
<p>Obligat anaerobe Bakterien und Laktat im Sputum von Patienten mit COPD</p>				Hausanschrift: Magdeburger Straße 8 06112 Halle (Saale)	
<p>Sehr geehrter Herr Dr. Worlitzsch,</p> <p>mit Schreiben vom 12.08.2010 zum oben genannten Forschungsvorhaben haben Sie zu unserem Votum vom 16.07.2010 Stellung genommen sowie folgende Unterlagen übersandt:</p> <ul style="list-style-type: none"> - geänderter Antrag mit Darstellung des Forschungsvorhabens, - Kurzzusammenfassung, - Patienteninformation Version 2 vom 16.07.2010, - Einwilligungserklärung Version 2 vom 16.07.2010. <p>Die Auflagen des genannten Votums sind erfüllt. Ich kann Ihnen bestätigen, dass seitens der Ethik-Kommission keine Bedenken gegen die Durchführung des Forschungsvorhabens bestehen.</p> <p>Mit freundlichen Grüßen</p>				Geschäftsstelle: Tel 0345 557-4476 Fax 0345 557-4477 E-Mail ethik-kommission@medizin.uni-halle.de Internet: www.medizin.uni-halle.de	
				Bankverbindung: Deutsche Bundesbank, Filiale Magdeburg Konto: 80001530 BLZ: 81000000	
				IBAN: DE3781000000080001530 BIC: MARKDEF1810	
				Steuernummer: 111/144/02550 (Finanzamt Halle-Nord)	
<p>Prof. Dr. med. Hermann M. Behre Vorsitzender der Ethik-Kommission</p> <p>Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg arbeitet auf der Grundlage deutschen Rechts sowie in Anlehnung an die ICH-GCP-Richtlinien.</p> <p>Die Ethik-Kommission weist darauf hin, dass die ärztliche und juristische Verantwortung für die Durchführung des Vorhabens unabhängig vom Beratungsergebnis bei den durchführenden Ärzten und Wissenschaftlern verbleibt.</p>					

9.2 Keimzahlen obligater und fakultativer Anaerobier aller COPD-Sputumproben

<u>Probe Nr.</u>	<u>Fakultative Anaerobier</u>	<u>Keimzahl</u>	<u>Obligate Anaerobier</u>	<u>Keimzahl</u>	
1	<i>Streptococcus sanguis</i>	$1,2 \times 10^7$	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	3×10^5	
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	$2,7 \times 10^7$	<i>Veillonella spp.</i>	$3,3 \times 10^7$	
	<i>Corynebacterium renale</i>	2×10^6	<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	$2,4 \times 10^7$	
	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	$2,2 \times 10^6$	<i>Streptococcus intermedius</i>	1×10^7	
	<i>Lactococcus lactis spp. cremoris</i>	$9,8 \times 10^6$			
	<i>Mikrococcus sedentarius</i>	1×10^8			
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1×10^5			
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2×10^6			
	2	<i>Streptococcus acidomininus</i>	$1,4 \times 10^6$	<i>Streptococcus intermedius</i>	1×10^5
		<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	$3,5 \times 10^7$	<i>Gemella morbillorum</i>	4×10^5
<i>Corynebacterium jeikeium</i>		$4,1 \times 10^6$			
<i>Corynebacterium species</i>		1×10^6			
<i>Corynebacterium renale</i>		2×10^6			
<i>Mikrococcus sedentarius</i>		1×10^6			
<i>Enterococcus faecium</i>		$18,9 \times 10^8$			

<u>Probe Nr.</u>	<u>Fakultative Anaerobier</u>	<u>Keimzahl</u>	<u>Obligate Anaerobier</u>	<u>Keimzahl</u>
3	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	2×10^5	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	$2,1 \times 10^7$
	<i>Corynebacterium genitalium</i>	1×10^5	<i>Streptococcus intermedius</i>	1×10^5
	<i>Corynebacterium species</i>	20×10^8		
	<i>Lactococcus lactis</i> <i>spp. cremoris</i>	$2,9 \times 10^7$		
	<i>Enterococcus faecium</i>	$13,2 \times 10^9$		
4	<i>Streptococcus sanguis</i>	2×10^6	<i>Gemella morbillorum</i>	$1,5 \times 10^7$
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	$1,3 \times 10^7$	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	$1,3 \times 10^8$
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	6×10^6	<i>Streptococcus constellatus</i>	$3,7 \times 10^7$
	<i>Corynebacterium renale</i>	$1,4 \times 10^7$		
	<i>Corynebacterium genitalium</i>	$1,2 \times 10^7$		
	<i>Corynebacterium species</i>	$5,1 \times 10^8$		
	<i>Corynebacterium bovis</i>	1×10^6		
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1×10^6		
5	<i>Streptococcus parasanguis</i>	2×10^6	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	$1,9 \times 10^7$
	<i>Corynebacterium species</i>	$2,3 \times 10^7$	<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	$2,8 \times 10^7$
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1×10^6	<i>Veillonella spp.</i>	6×10^6
	<i>Enterococcus faecium</i>	$2,9 \times 10^6$	<i>Streptococcus intermedius</i>	$2,1 \times 10^6$

<u>Probe Nr.</u>	<u>Fakultative Anaerobier</u>	<u>Keim-zahl</u>	<u>Obligate Anaerobier</u>	<u>Keim-zahl</u>
	<i>Aerococcus urinae</i>	$4,3 \times 10^6$	<i>Streptococcus constellatus</i>	2×10^7
			<i>Gemella morbillorum</i>	$1,1 \times 10^7$
6	<i>Corynebacterium renale</i>	4×10^5	<i>Gemella morbillorum</i>	1×10^7
	<i>Corynebacterium bovis</i>	$1,1 \times 10^7$	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	1×10^6
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	$1,4 \times 10^7$	<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	1×10^5
			<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1×10^7
			<i>Streptococcus intermedius</i>	1×10^5
7	<i>Streptococcus sanguis</i>	$4,3 \times 10^8$	<i>Clostridium difficile</i>	1×10^6
	<i>Corynebacterium renale</i>	$1,1 \times 10^6$	<i>Streptococcus intermedius</i>	$7,3 \times 10^6$
	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1×10^6		
	<i>Corynebacterium genitalium</i>	$1,1 \times 10^8$		
	<i>Lactococcus lactis</i> <i>spp. cremoris</i>	$2,6 \times 10^7$		
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1×10^7		
	<i>Aerococcus urinae</i>	$5,7 \times 10^8$		
8	<i>Lactococcus lactis</i> <i>spp. cremoris</i>	1×10^3	<i>Gemella morbillorum</i>	1×10^3
	<i>Mikrococcus sedentarius</i>	1×10^4	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	$1,1 \times 10^4$
	<i>Enterococcus faecium</i>	3×10^4	<i>Clostridium histolyticum</i>	$3,9 \times 10^4$

<u>Probe Nr.</u>	<u>Fakultative Anaerobier</u>	<u>Keimzahl</u>	<u>Obligate Anaerobier</u>	<u>Keimzahl</u>
	<i>Aerococcus urinae</i>	$1,1 \times 10^4$	<i>Streptococcus intermedius</i>	$8,2 \times 10^5$
9	<i>Streptococcus sanguis</i>	$7,6 \times 10^7$	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	$1,5 \times 10^5$
	<i>Lactococcus lactis</i> <i>spp. cremoris</i>	5×10^6	<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	$3,9 \times 10^5$
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2×10^6	<i>Gemella morbillorum</i>	1×10^6
	<i>Aerococcus urinae</i>	$8,8 \times 10^7$		
10	<i>Streptococcus sanguis</i>	$1,2 \times 10^7$	<i>Campylobacter gracilis</i>	4×10^5
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2×10^5		
	<i>Lactococcus lactis</i> <i>spp. cremoris</i>	$1,9 \times 10^8$		
	<i>Staphylococcus cohnii</i> <i>spp. cohnii</i>	1×10^8		
	<i>Enterococcus avium</i>	$20,6 \times 10^9$		
	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	$8,4 \times 10^7$		
11	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4×10^4	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	$6,3 \times 10^5$
	<i>Streptococcus equinus</i>	$1,3 \times 10^5$	<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	$2,6 \times 10^5$
	<i>Corynebacterium bovis</i>	$6,4 \times 10^5$	<i>Streptococcus intermedius</i>	$2,2 \times 10^5$
	<i>Lactococcus lactis</i> <i>spp. cremoris</i>	1×10^4	<i>Gemella morbillorum</i>	$3,8 \times 10^5$
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	$6,2 \times 10^5$		
	<i>Aerococcus urinae</i>	1×10^5		

<u>Probe Nr.</u>	<u>Fakultative Anaerobier</u>	<u>Keimzahl</u>	<u>Obligate Anaerobier</u>	<u>Keimzahl</u>
12	<i>Streptococcus parasanguis</i>	2,3x10 ⁶	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	2,5x10 ⁵
	<i>Corynebacterium renale</i>	1x10 ⁵		
	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	1x10 ⁴		
	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>cremoris</i>	1x10 ⁵		
	<i>Staphylococcus warnerii</i>	9,1x10 ⁶		
13	<i>Streptococcus sanguis</i>	1x10 ⁴	<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	8,8x10 ⁴
	<i>Streptococcus parasanguis</i>	1x10 ⁵	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1x10 ⁴
	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	2x10 ³	<i>Streptococcus constellatus</i>	6,8x10 ⁴
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2x10 ³	<i>Streptococcus intermedius</i>	4,9x10 ⁴
	<i>Aerococcus urinae</i>	7,5x10 ⁴		
	<i>Escherichia coli</i>	2x10 ⁵		
14	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6x10 ⁴	<i>Campylobacter gracilis</i>	6,4x10 ⁴
	<i>Corynebacterium genitalium</i>	2x10 ³	<i>Streptococcus intermedius</i>	3,7x10 ⁵
15	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>cremoris</i>	3x10 ⁵	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	2,2x10 ⁵
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1x10 ⁴	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	2x10 ⁵
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2x10 ⁵	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	6,5x10 ⁵
	<i>Aerococcus urinae</i>	3,4x10 ⁶		
	<i>Escherichia coli</i>	2,8x10 ⁵		

<u>Probe Nr.</u>	<u>Fakultative Anaerobier</u>	<u>Keimzahl</u>	<u>Obligate Anaerobier</u>	<u>Keimzahl</u>
16	<i>Streptococcus acidominimus</i>	4,1x10 ⁵	<i>Peptostreptococcus prevoti</i>	1x10 ⁶
	<i>Streptococcus parasanguis</i>	4,2x10 ⁶	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	6,5x10 ⁵
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1x10 ⁵	<i>Clostridium difficile</i>	1x10 ⁵
	<i>Corneybacterium diphtheriae</i>	1,8x10 ⁶	<i>Gemella morbillorum</i>	7x10 ⁵
	<i>Lactococcus lactis</i> spp. cremoris	5,4x10 ⁵		
	<i>Pediococcus pentasaceus</i>	3x10 ⁵		
	<i>Aerococcus urinae</i>	7,6x10 ⁶		
17	<i>Streptococcus sanguis</i>	1,2x10 ⁶	<i>Veillonella</i> spp.	4x10 ⁵
	<i>Streptococcus parasanguis</i>	2,2x10 ⁷	<i>Peptostreptococcus prevoti</i>	1,5x10 ⁷
	<i>Streptococcus mutans</i>	7x10 ⁶	<i>Clostridium difficile</i>	5x10 ⁶
	<i>Corynebacterium genitalium</i>	1x10 ⁶	<i>Streptococcus constellatus</i>	2,2x10 ⁷
	<i>Lactococcus lactis</i> spp. cremoris	3x10 ⁶	<i>Gemella morbillorum</i>	1x10 ⁶
	<i>Lactococcus lactis</i> spp. lactis	1x10 ⁶		
	<i>Enterococcus raffinosus</i>	4x10 ⁵		
18	<i>Streptococcus sanguis</i>	1,1x10 ⁶	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	1,1x10 ⁶
	<i>Streptococcus parasanguis</i>	9,5x10 ⁶	<i>Streptococcus intermedius</i>	5,3x10 ⁶
	<i>Corynebacterium renale</i> group	2,3x10 ⁶		

<u>Probe Nr.</u>	<u>Fakultative Anaerobier</u>	<u>Keimzahl</u>	<u>Obligate Anaerobier</u>	<u>Keimzahl</u>
	<i>Corynebacterium bovis</i>	$2,1 \times 10^6$		
	<i>Lactococcus lactis</i> spp. cremoris	2×10^6		
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	8×10^5		
	<i>Staphylococcus cohnii</i> spp. cohnii	3×10^6		
	<i>Aerococcus urinae</i>	$7,1 \times 10^6$		
19	<i>Streptococcus sanguis</i>	1×10^8	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	5×10^6
	<i>Streptococcus parasanguis</i>	$1,1 \times 10^8$	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	3×10^6
20	<i>Streptococcus anginosus</i>	2×10^7	<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	$1,5 \times 10^8$
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	$1,3 \times 10^7$	<i>Campylobacter gracilis</i>	$1,9 \times 10^7$
	<i>Corynebacterium renale</i> group	8×10^7	<i>Streptococcus intermedius</i>	$2,1 \times 10^8$
	<i>Lactococcus lactis</i> spp. cremoris	1×10^8		
	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	$4,2 \times 10^7$		
	<i>Pediococcus pentasaceus</i>	1×10^7		
	<i>Staphylococcus warneii</i>	2×10^6		
21	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	8×10^4	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	2×10^4

Lebenslauf

Name: Juliane Künzel
Anschrift: Thaerplatz 22, 06112 Halle/Saale
Geburtsdatum: 03.06.1983
Geburtsort: Weißenfels
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1990-1994 Herder-Grundschule Weißenfels
1994-2003 Goethe-Gymnasium Weißenfels
Juni 2003 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Beruflicher Werdegang:

Sept. 2003 - Juni 2004 Freiwilliges Soziales Jahr; Kinder- und Jugendhilfe e.V. Weißenfels
Okt. 2004 - Sept. 2007 Ausbildung zur Gesundheits- und Krankenpflegerin im Krankenhaus Martha-Maria Halle-Dörlau mit Erhalt der Berufsbezeichnung Gesundheits- und Krankenpflegerin
Okt. 2007 - Sept. 2008 Angestelltenverhältnis im Krankenhaus Martha-Maria Halle-Dörlau auf der internistischen Intensivstation
Okt. 2008 Beginn Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
13. Dezember 2014 Erhalt der Approbation als Ärztin
01. April 2015 Beginn Facharztweiterbildung für Urologie im Krankenhaus Martha-Maria Halle-Dörlau

Halle, 01. Juli 2015

Selbstständigkeitserklärung

Ich, **Juliane Künzel**, geboren am **03.06.1983** in **Weißenfels** 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.

Halle, 01. Juli 2015

Juliane Künzel

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, **Juliane Künzel**, geboren am **03.06.1983** in **Weißenfels**, dass die Arbeit bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Halle, 01. Juli 2015

Juliane Künzel

Danksagung

Mein Dank geht an:

Alle COPD-Patienten, des Krankenhauses Martha-Maria Halle-Dörlau und des Universitätsklinikums Halle (Saale), die sich freiwillig für den Einschluss in diese Studie bereit erklärt und diese Arbeit ermöglicht haben.

Frau Prof. Dr. Marianne Borneff-Lipp, der Direktorin des ehemaligen Institutes für Hygiene der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die ausgezeichnete Betreuung und die Möglichkeit der Durchführung des mikrobiologischen Arbeitens in den Laboratorien des Institutes.

Herrn OA Dr. Thomas Blankenburg, Krankenhaus Martha-Maria Halle-Dörlau, für die klinische Betreuung und Unterstützung bei der Auswahl geeigneter COPD-Patienten.

Frau OÄ Dr. Bettina Wollschläger, Department für Innere Medizin, Universitätsklinikum Halle (Saale), für die klinische Betreuung und Unterstützung bei der Auswahl geeigneter COPD-Patienten.

Herrn Prof. Dr. Andreas Wienke, dem stellv. Direktor des Institutes für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Medizinische Informatik der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, für die freundliche Unterstützung bei den statistischen Auswertungen.

Herrn Sascha Schmidt, Stabsstelle Krankenhaushygiene des Universitätsklinikums Halle (Saale), für die unermüdliche Unterstützung zur Behebung meiner Computerprobleme.

Mein besonderer Dank geht an:

Herrn Chefarzt PD Dr. Dieter Worlitzsch, für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung, die Geduld, die stete Bereitschaft meine Fragen zu beantworten, sich meinen Problemen zu stellen und meine Unklarheiten zu beheben.

Meine Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben, für das entgegengebrachte Vertrauen und für die seelische Unterstützung, die man manchmal als Studentin nötig hat.

Daniel, für ALLES.