

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
der Universität Tübingen  
Ärztlicher Direktor Professor Dr. I. B. Autenrieth

Nachweis von *Prevotella intermedia*  
und  
Antikörperbildung gegen *P. intermedia*  
bei Patienten mit Cystischer Fibrose

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Isabelle Marion Beer

aus

Stuttgart

2011

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Döring

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Stern



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen .....</b>	<b>7</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>9</b>
1.1. Krankheitsbild und Diagnostik der Cystischen Fibrose.....	9
1.2. Pathophysiologische Vorgänge und klinische Präsentation bei CF .....	14
1.3. Infektionen der Lunge bei Patienten mit CF .....	18
1.3.1. Infektionen mit anaeroben Bakterien bei Patienten mit CF.....	22
1.3.2. Das obligat anaerobe Bakterium <i>Prevotella intermedia</i> .....	24
1.4. Nachweis von <i>P. intermedia</i> .....	27
1.4.1. Anaerobier-Testsysteme .....	28
1.4.2. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung .....	30
1.4.3. MALDI-TOF-MS .....	32
1.5. Ziele.....	35
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>36</b>
2.1. Geräte und Materialien .....	36
2.2. Reagenzien und Chemikalien.....	38
2.3. Medien und Stammlösungen.....	39
2.4. Bakterienstämme .....	42
2.4.1. Kultivierung der Bakterien .....	43
2.5. Gefrierkonservierung von <i>P. intermedia</i> .....	44
2.6. Studiendesign und Patientenkollektiv .....	44
2.7. Etablierung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mittels PNA-Sonde zum Nachweis von <i>P. intermedia</i> .....	46
2.7.1. Spezifitätstestung der PNA-Sonde .....	49
2.8. Etablierung des Nachweises von <i>P. intermedia</i> in Sputum durch FISH mittels PNA-Sonde .....	50

2.8.1. Aufarbeitung des Sputums .....	50
2.8.2. Nachweis von <i>P. intermedia</i> in mit Bakterien gespicktem Sputum .....	51
2.9. Isolierung von <i>P. intermedia</i> aus Sputum von CF-Patienten .....	54
2.10. Identifizierung von <i>P. intermedia</i> mit Hilfe des Anaerobiertestsystems „Rapid ID 32 A“ .....	55
2.11. Identifizierung von <i>P. intermedia</i> durch MALDI-TOF-MS.....	58
2.12. Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen <i>Prevotella intermedia</i> in CF- Seren mittels ELISA .....	60
2.12.1. Reinigung des <i>P. intermedia</i> -Antigens .....	60
2.12.2. Etablierung des ELISA zur Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen <i>P. intermedia</i> .....	61
2.13. Resistenzbestimmung der isolierten Patientenstämme mittels Ellipsometertest (E-Test) .....	63
2.14. Statistische Analyse .....	67
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>68</b>
3.1. Nachweis von <i>P. intermedia</i> durch die PNA-Sonde „Prevotella Genus PNA“ .....	68
3.1.1. Spezifität der PNA-Sonde „Prevotella Genus PNA“ .....	69
3.2. Nachweis von <i>P. intermedia</i> mittels „Prevotella Genus PNA“ im Sputum von CF-Patienten.....	71
3.3. Identifizierung von <i>P. intermedia</i> mit Hilfe des Anaerobier-Testsystems „Rapid ID 32 A“ .....	72
3.4. Identifizierung von <i>P. intermedia</i> durch MALDI-TOF-MS.....	73
3.5. Untersuchung der Patientenseren auf IgG-Antikörper gegen <i>P. intermedia</i> mittels ELISA .....	77
3.6. MHK- und Resistenzbestimmung der isolierten Patientenstämme mittels E-Test.....	79
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>82</b>

<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>89</b>
<b>Literatur.....</b>	<b>91</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>106</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

## Abkürzungen

16S rRNA	16S rRibonucleic acid, 16S rRibonukleinsäure
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest.	einfach destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BH-Agar	Brain-Heart-Agar
BSA	Bovine Serum Albumine
CBAVD	congenital bilateral absence of vas deferens
CF	Cystische Fibrose
CFRD	Cystic Fibrosis-related Diabetes
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DIOS	Distales intestinales Obstruktionssyndrom
DNA	Desoxiribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FEV <sub>1</sub>	Forced Expiratory Volume in 1 Second, Einsekundenkapazität
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
IRT	Immunreaktives Trypsin
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry, Matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie
MHK	minimale Hemmkonzentration
NBD	Nukleotid-bindende Domäne

OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-buffered Saline, Phosphat-gepufferte Saline
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
PNA	Peptide nucleic acid, Peptid-Nukleinsäure
RD	Regulatorische Domäne
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TMD	Transmembrandomäne
TSB	Tryptone-Soya Broth
UpM	Umdrehungen pro Minute

## 1. Einleitung

### 1.1. Krankheitsbild und Diagnostik der Cystischen Fibrose

Die Cystische Fibrose (CF, Synonym: Mukoviszidose) ist eine komplexe, lebensbedrohliche Multisystemkrankheit, die ein breites Spektrum an Symptomen aufweist. Bei einer Inzidenz von etwa 1:2.500 Neugeborenen handelt es sich um die häufigste autosomal-rezessiv vererbte Krankheit der kaukasischen Bevölkerung (24, 81). Diesem Vererbungsmuster entsprechend manifestiert sich die Erkrankung nur bei homozygoten Merkmalsträgern. Ungefähr ein Viertel der weißen Bevölkerung sind heterozygote Merkmalsträger, welche im Gegensatz zu homozygoten Merkmalsträgern phänotypisch gesund sind (30, 81). Sowohl Homo- als auch Heterozygotenfrequenz sind in der asiatischen und afrikanischen Bevölkerung deutlich geringer (24, 30, 76, 81, 167).

Die vielfältigen Symptome der CF werden durch eine Chloridionen-Transportstörung hervorgerufen, die durch den Defekt eines epithelialen Chloridkanals bedingt ist (131). Diesem Defekt liegt die Mutation des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Gens (CFTR-Gen) zugrunde. Das Gen befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 7 an Position 7q31.2 (81, 155), umfasst 230 Kilobasenpaare und kodiert für das CFTR-Protein (70, 81, 120, 123). CFTR gehört zur Familie der ATP-binding-cassette-Transporter und besteht aus zwei Transmembrandomänen (TMD1 und 2) sowie drei zytosolischen Domänen, nämlich zwei nukleotid-bindenden (NBD1 und 2) und einer regulatorischen (RD). Der Ionenkanal wird von TMD1 und 2 gebildet, NBD1 und 2 fungieren als Bindungsstellen für ATP. Durch Phosphorylierung von RD durch die Proteinkinase A und anschließende ATP-Bindung sowie ATP-Hydrolyse an NBD1 wird ein Chloridionenfluss durch den Kanal möglich. Dieser wird durch ATP-Bindung sowie ATP-Hydrolyse an NBD2 und Dephosphorylierung von RD unterbrochen (24, 30, 81). Poulsen *et al.* konnten nachweisen, dass der Ionenkanal auch Bicarbonat transportiert (109). Außerdem ist bekannt,

dass CFTR andere Ionenkanäle, wie zum Beispiel den epithelialen Natriumkanal und den auswärtsgerichteten Chloridkanal beeinflusst (118).

Für das CFTR-Gen sind bisher über 1.600 Mutationen bekannt (23), darunter unter anderem Missense-Mutationen, Insertionen und Deletionen. Die Mutation  $\Delta F 508$ , bei der es aufgrund fehlender Kodierung für Phenylalanin an Position 508 zu Fehlfaltung und vorzeitigem Abbau des CFTR-Proteins kommt, ist mit Abstand die häufigste (24, 81). Dabei fällt ein deutliches Nord-Süd-Gefälle auf. Während  $\Delta F 508$  in Dänemark 82% der Mutationen bei CF ausmacht, wird sie in der Türkei nur in 32% der Fälle beobachtet (95). Die restlichen bis jetzt bekannten Mutationen kommen sehr selten vor, lediglich 10 davon treten mit einer Frequenz von  $>1\%$  auf (115). Homozygotie für seltene Mutationen ist ein Phänomen, das besonders bei Blutsverwandtschaft der Eltern beobachtet wird (81). Die verschiedenen Mutationen werden entsprechend der Beeinträchtigung des CFTR-Proteins, begonnen bei der ausbleibenden Synthese des Proteins über die gestörte Regulation und Leitfähigkeit des Ionenkanals bis hin zum gesteigerten Abbau des Proteins, in sechs Gruppen unterteilt. Die einzelnen Gruppen sind in unterschiedlichem Maße mit bestimmten Symptomen, wie etwa einer beeinträchtigten Pankreasfunktion assoziiert (115). Die Vielfalt an genetischen Veränderungen vermag nur teilweise die unterschiedlichen klinischen Verläufe zu erklären (24). Ein direkter Zusammenhang zwischen Geno- und Phänotyp wird nicht angenommen. Allerdings scheint die Manifestation der CF in den unterschiedlichen Organen vom vorhandenen Maß normaler CFTR-Funktion abzuhängen. Für die regelrechte Ausbildung und Funktion des Vas deferens ist der höchste Prozentsatz an normaler CFTR-Funktion ( $>10\%$ ) erforderlich. Schweißdrüsen, Atemwege sowie das Pankreas können auch bei niedrigeren Prozentsätzen an funktionsfähigem CFTR unbeeinträchtigt sein (24).

Wie bereits erwähnt, sind heterozygote Merkmalsträger phänotypisch gesund. Allerdings wurden Zusammenhänge zwischen Heterozygotie und chronischer Pankreatitis (18, 136) sowie Heterozygotie und Infertilität beim Mann (116) beobachtet. Der relativ hohe Anteil an heterozygoten Merkmalsträgern könnte unter

anderem durch einen Selektionsvorteil erklärt werden. *In vitro* konnte eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Cholera toxin (46) und dem hitzestabilen Enterotoxin von *E. coli* (52) gezeigt werden, was eine gewisse Widerstandsfähigkeit dieser Gruppe im Bezug auf Durchfallerkrankungen nahe legt (110). Des Weiteren wird bei Heterozygotie eine Resistenz gegenüber Asthma angenommen (24).

Der Krankheitsverlauf und damit die Lebenserwartung der Patienten sind entscheidend vom Zeitpunkt der Diagnosestellung abhängig. Je früher CF diagnostiziert wird, desto eher kann eine Therapie eingeleitet werden, die irreversible Organschäden hinauszögert. Verdeutlicht wird dies nicht zuletzt durch die kontinuierlich zunehmende Lebensqualität und Lebenserwartung der Betroffenen, die mittlerweile bei durchschnittlich 37,4 Jahren liegt (22). Während bis Ende der 60er Jahre der Großteil der CF-Patienten im Vorschulalter verstarb, waren 2004 dank adäquater Therapie und Betreuung fast die Hälfte aller Betroffenen über 18 Jahre alt (81). Bereits im 17. Jahrhundert, als über CF noch nichts bekannt war, wurde beobachtet, dass „salzig schmeckende Kinder“ vermehrt früh starben (30). Seitdem hat sich in der Diagnostik der Erkrankung viel getan. Mittlerweile kann bereits pränatal eine Mutation des CFTR-Gens nachgewiesen werden. Diese Methode ist, da sie für den Fetus Risiken birgt, bei bekannter Hetero- bzw. Homozygotie beider Eltern für eine CFTR-Mutation indiziert. Auch wenn ein Paar bereits ein an CF erkranktes Kind bekommen hat, ist eine pränatale Untersuchung auf CF sinnvoll. Nach vaginaler Chorionzottenbiopsie in der 10.-12. oder transabdomineller Amniozentese in der 16. Schwangerschaftswoche kann der Genotyp des zu untersuchenden Patienten durch direkte oder indirekte Genotypisierung aus den fetalen Zellen bestimmt werden. Der direkte Nachweis ist durch Restriktionsendonukleasenverdau, Sequenzierung oder synthetische Oligonukleotidsonden möglich. Indirekt kann der Nachweis durch Kopplungsanalysen erbracht werden, allerdings nicht mit derselben Sicherheit wie durch direkte Genotypisierung (154). Der molekulargenetische Nachweis des Gendefekts kann zusätzlich außerhalb der Pränatalperiode bei Patienten jeden Alters angewendet werden. (86, 124, 149, 154). Die Diagnose CF gilt als

gesichert, wenn auf beiden homologen Chromosomen 7 eine Mutation des CFTR-Gens nachgewiesen wurde. Findet man nur ein mutiertes Allel, liegt entweder Heterozygotenstatus oder eine Compound-Heterozygotie vor. Letztere erfordert eine weitere Abklärung des zweiten Allels. Da in der Routinediagnostik nicht alle bekannten CFTR-Mutationen geprüft werden können, wird auf die 70 häufigsten getestet. Dadurch werden die Mutationen bei über 90% der Betroffenen identifiziert (149).

Herausragende Bedeutung kommt auch der neonatalen Diagnostik zu. Den Gold-Standard bei der Diagnosestellung der CF stellt der Schweißtest nach Gibson und Cooke dar (51, 93). Dieser Test macht sich die um das 2- bis 3-fach erhöhten Natrium- und Chloridkonzentrationen im Nativschweiß der CF-Patienten zunutze (36, 140, 144). In exokrinen Drüsen wird entsprechend des Thaysen-Schwartz-Modells ein im Vergleich zur interstitiellen Flüssigkeit isotoner Primärschweiß sezerniert. Bei gesunden Individuen werden daraus in den Ausführungsgängen Natrium- und Chloridionen im Austausch gegen Wasser reabsorbiert (111). Aufgrund des CFTR-Defekts funktioniert diese Reabsorption bei CF-Patienten nicht, was zu den erhöhten Salzkonzentrationen im Schweiß im Vergleich zu Gesunden führt (36, 111, 131, 140). Beim Schweißtest erfolgt die Schweißstimulation durch Pilocarpin-Iontophorese an der Unterarminnen-seite, selten auch am Rücken (30). Der Test muss bei drei unterschiedlichen Schweißstimulationen Werte von  $>60$  mval/l ergeben, bevor die Diagnose CF als gesichert betrachtet werden kann (51). Einen weiteren, vor allem bei negativem Schweißtest wichtigen Test, stellt die Messung der transepithelialen Potentialdifferenz dar. Bei CF-Patienten entsteht durch die mangelnde Chloridsekretion bei übersteigertem Natriumeinstrom eine Potentialdifferenz, die sich am Nasenepithel besonders gut ableiten lässt. Bei gesunden Patienten liegt diese Differenz im Bereich von 8 bis 55 mV, während sie bei CF-Patienten Werte im Bereich von 15 bis 95 mV annimmt. Durch Gabe von Amilorid oder eines  $\beta$ -Sympathomimetikums kann auch im Überschneidungsbereich zwischen Gesunden und CF-Patienten unterschieden werden, da durch diese Präparate die Potentialdifferenz in der Regel bei Gesunden im Gegensatz zu CF-Patienten

ansteigt (149). Zusätzlich kann bei Neugeborenen das immunreaktive Trypsin (IRT) aus dem Fersenblut bestimmt werden, welches bei CF-Patienten typischerweise erhöht ist (21). Dieser Test hat sich als effektivste Methode zur CF-Früherkennung erwiesen und wird in 26 europäischen Ländern, darunter England und Frankreich, sowie in allen Bundesstaaten der USA in Kombination mit einer DNA-Analyse als gesetzliches Neugeborenen-Screening durchgeführt (15, 81, 132, 157). In Deutschland wird ein solches Neugeborenen-Screening von den Kostenträgern abgelehnt, da eine kausale Behandlung der Erkrankung bislang nicht möglich ist. Allerdings sind Krankheiten wie die Phenylketonurie oder die Ahornsirupkrankheit, bei denen eine kausale Behandlung bislang ebenfalls nicht möglich ist, Bestandteil des Neugeborenen-Screenings (48, 144). Die Inzidenzen der beiden Erkrankungen sind mit 1:8.000 und 1:250.000 Neugeborenen deutlich geringer als die der CF (144). Die CF ins Neugeborenen-Screening aufzunehmen, würde bei der Probenentnahme keinen zusätzlichen Aufwand bedeuten, da im Rahmen des Screenings ohnehin Fersenblut entnommen wird. Sims *et al.* konnten zeigen, dass in Großbritannien die Therapiekosten für Patienten, bei denen CF durch das Neugeborenen-Screening festgestellt wurde, geringer sind als für Patienten, bei denen die Erkrankung erst später diagnostiziert wurde (142). In Deutschland wird die Krankheit bei nur knapp über der Hälfte der CF-Patienten im ersten Lebensjahr diagnostiziert (81). Durch ein Neugeborenen-Screening auf CF könnte wertvolle Zeit für die rechtzeitige Behandlung der Patienten gewonnen werden. Verschiedene Studien zeigen, dass die möglichst frühe Diagnosestellung durch ein Neugeborenen-Screening mit einer reduzierten Morbidität und einem besseren gesundheitlichen Outcome für die CF-Patienten verbunden ist (37, 91, 141, 143, 146).

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Methoden kann bei Neugeborenen mit CF eine erhöhte Albuminkonzentration im Mekonium nachgewiesen werden. Dieser Test wird allerdings mittlerweile wegen falsch positiver Ergebnisse aufgrund von Blutbeimengungen nicht mehr empfohlen (75). Die zahlreichen diagnostischen Tests und die klinische Präsentation des Patienten gehören bei der Diagnosestellung und im Hinblick auf die Behandlung untrennbar zusammen.

Die bei jedem CF-Patienten unterschiedlich starke Ausprägung und Kombination der Symptome an Respirations- und Magen-Darm-Trakt, Pankreas, Leber, Gallenwegen und dem reproduktiven System ist neben verschiedenen genetischen Voraussetzungen durch eine Reihe exogener Einflüsse bedingt und muss individuell berücksichtigt werden (81).

## 1.2. Pathophysiologische Vorgänge und klinische Präsentation bei CF

Obwohl der genetische Defekt auf der DNA aller Körperzellen vorhanden ist, beeinträchtigt er nur Gewebe, die CFTR exprimieren. Dazu gehören exkretorische Organe wie Bronchialdrüsen der Lunge, Nasennebenhöhlen, Pankreas, Drüsen des Verdauungstrakts, Leber, Schweißdrüsen und Keimdrüsen des Mannes (75, 114, 144). Die dadurch in den einzelnen Organen hervorgerufenen Symptome sind durch denselben pathophysiologischen Mechanismus bedingt. Die Permeabilität der Epithelien für Chloridionen ist durch die eingeschränkte CFTR-Funktion reduziert, wodurch sich die Zusammensetzung der vom jeweiligen Organ produzierten Sekrete verändert (24). Die durch den CFTR-Defekt bedingt erniedrigten Chloridkonzentrationen im Lumen können weder durch calciumabhängige Chloridkanäle noch durch parazellulären Transport ausgeglichen werden. Zur Kompensation der dadurch bedingten Hypotonie des Sekrets wird dessen Wassergehalt vermindert. Für die Lunge konnte gezeigt werden, dass dadurch zwar ein isotones Sekret resultiert, dessen Menge jedoch durch den geminderten Wassereinstrom geringer ist als normal (17, 74, 90). Zusätzlich konnten Joo *et al.* nachweisen, dass die Bicarbonatkonzentration *in vitro* die Konsistenz der Sekrete der Trachealdrüsen von Schafen und Schweinen sowie menschlichen Tracheal- und Bronchialdrüsen beeinflusst (64). Da CFTR auch  $\text{HCO}_3^-$  transportiert, wird vermutet, dass dieser Mechanismus zur Viskositätserhöhung der Sekrete beiträgt (47). Von den hochviskösen Sekreten leitet sich auch der Name „Mukoviszidose“ (lat. *mucus* Schleim, *viscidus* zäh) ab.

Das zähe Sekret der mukösen und seromukösen Drüsen verlegt die Ausführungsgänge, es entwickelt sich eine Dyskrinie. Reaktive Entzündungen und fibrotischer Umbau des Gewebes sind die Folgen, was letztendlich zu einem zunehmenden Funktionsverlust des jeweiligen Organs mit typischen klinischen Symptomen führt. Im Gegensatz zu den übrigen Organen, an denen sich die CF manifestiert, wird von den Schweißdrüsen kein hochvisköses Sekret gebildet. Wie bereits erwähnt, sorgt der unzureichende Transport von Chloridionen über die apikalen und basalen epithelialen Chloridkanäle für eine reduzierte Rückresorption von Chlorid aus dem Primärfiltrat der Schweißdrüsen. Dadurch werden auch weniger Natriumionen rückresorbiert, was zu außerordentlich hohen Natrium- und Chlorid-Konzentration im Schweiß der Patienten führt (111). Das erklärt, warum im 17. Jahrhundert, als CF noch unbekannt war, von Kindern berichtet wurde, die „salzig schmeckten und früh starben“ (30). Durch den hohen NaCl-Verlust sind CF-Patienten, vor allem bei Fieber, Hitze oder starker körperlicher Anstrengung, anfällig für das Pseudo-Barter-Syndrom, eine hypochlorämische metabolische Alkalose (144).

Die ganz unterschiedlichen Veränderungen an Gastrointestinaltrakt, Pankreas und Leber beeinflussen und verstärken sich gegenseitig und nehmen Einfluss auf die Verdauung. Die Pankreassekrete enthalten zu wenig Wasser, zusätzlich ist der Bicarbonatgehalt vermindert. Stase des Sekrets führt zu Obstruktion und Dilatation der Azini und Ausführungsgänge. Die für die Verdauung wichtigen Pankreasenzyme Lipase und Amylase gelangen nicht mehr ausreichend ins Duodenum und werden zusätzlich in den Ausführungsgängen aktiviert. Dadurch werden Pankreatitiden und Autodigestion sowie fibrotischer Umbau und eine Zerstörung des Pankreasgewebes als Spätfolgen verursacht (75, 144). Außerdem wird der saure Speisebrei aus dem Magen durch den niedrigen Bicarbonatgehalt des Pankreassekrets nur unzureichend neutralisiert, wodurch die wenigen noch sezernierten Pankreasenzyme nicht im pH-Optimum arbeiten. Die Nahrungsbestandteile werden nur noch ungenügend in resorbierbare Bestandteile gespalten und durch den Mangel an Gallensäuren werden besonders Fette schlechter emulgiert und resorbiert. Die Folgen sind Maldigestion und Ma-

absorption mit Steatorrhoe sowie Mangelerscheinungen bestimmter Substanzen, wie zum Beispiel der fettlöslichen Vitamine A, D, E und K. Etwa 90% der CF-Patienten sind von exokriner Pankreasinsuffizienz betroffen (114). Die Langerhans-Zellen, die zum endokrinen Teil des Pankreas zählen, werden erst später im Verlauf von den fibrotischen Veränderungen betroffen. Selbst bei noch ausreichender Insulinfreisetzung entwickelt sich aufgrund einer peripheren Insulinresistenz eine Störung des Glukosestoffwechsels. Die Prävalenz eines CF-related Diabetes (CFRD) steigt mit zunehmendem Alter und liegt für Erwachsene zwischen 40 und 50% (94, 159).

Auch im Darm entspricht die Zusammensetzung der Sekrete der mukösen Drüsen bedingt durch die reduzierte Chloridpermeabilität des intestinalen Epithels und den dadurch geringeren Wassereinstrom ins Lumen nicht der von Gesunden. Auf dem gebildeten hochviskösen Mukus werden die Stuhlmassen schlechter durch den Darm transportiert. Zusätzlich ist die Stuhlbeschaffenheit aufgrund unzureichender Aufspaltung durch die Pankreasenzyme verändert und verschlimmert diesen Zustand zusätzlich. Etwa 10% der CF-Patienten werden mit Mekoniumileus geboren, das Äquivalent bei Kindern und Erwachsenen ist ein distales intestinales Obstruktionssyndrom (DIOS) (125). Außerdem wird vor allem bei Patienten mit unbehandelter Pankreasinsuffizienz vermehrt ein Rektumprolaps beobachtet. In der Leber staut sich das Sekret in den Gallenkanälchen, es entwickeln sich Leberverfettung und biliäre Zirrhose sowie Hypoproteinämie mit daraus resultierenden Ödemen (30).

95% der männlichen CF-Patienten sind aufgrund einer obstruktiven Azoospermie infertil, welche durch Atrophie oder Fibrosierung der Vasa deferentia bedingt ist (68). Auch bei klinisch sonst gesunden Männern kann es, wie bereits erwähnt, bei Heterozygotie für das mutierte CFTR-Gen zu Infertilität kommen. Diese ist durch ein beidseitiges Fehlen der Samenleiter bedingt und wird als *congenital bilateral absence of vas deferens* (CBAVD) bezeichnet (16).

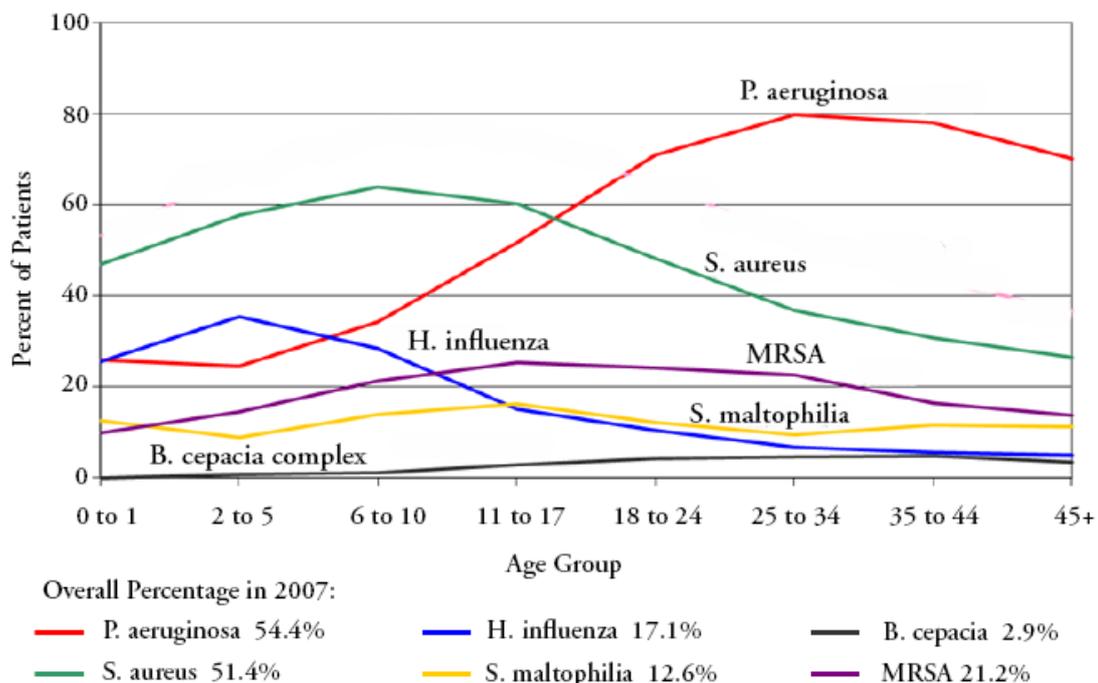
Das hochvisköse Bronchialsekret stellt den Ursprung für die den Respirationstrakt betreffende Symptomatik dar. Durch den reduzierten Wassergehalt und die erhöhte Viskosität des Sekrets wird die mukoziliäre Clearance, eine der wichtigsten Abwehrmechanismen des Respirationstrakts, ineffektiv (35). Dadurch können Mikroorganismen in der Lunge persistieren und Infektionen hervorrufen. Die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten im Rahmen der Infektabwehr bedingt eine weitere Eindickung des Sekrets, es entstehen erhebliche Sputummengen. Diese führen zu typischen Symptomen wie chronisch produktivem Husten sowie einer Verlegung der Atemwege. Zusätzlich leidet der Großteil der CF-Patienten an chronisch rezidivierenden Sinusitiden, 25% der Patienten weisen Nasenpolypen auf. Durch Verlegung der Ostien der Nasennebenhöhlen werden bakterielle Infektionen begünstigt, die in die unteren Atemwege absteigen können und dort weitere Entzündungen hervorrufen oder bereits bestehende Infektionen superinfizieren und verschlimmern (112). Eine Komplikation der Nasennebenhöhlenentzündung stellt die Mukozele dar, die sogar Deformitäten des Gesichtsschädels hervorrufen kann (137). Der ohnehin schon zähe Schleim wird durch langkettige DNA-Fragmente aus zu Grunde gegangenen Leukozyten und Zellen des Bronchialepithels weiter eingedickt. Es kommt zu Sekretretention und chronischer Obstruktion, was wiederum optimale Bedingungen für Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia* und *Stenotrophomonas maltophilia* (22), Viren und Pilze schafft (25). Die dadurch hervorgerufenen Infektionen werden von neutrophilen Granulozyten dominiert und laufen im Vergleich zu Gesunden verstärkt und verlängert ab (114). Sie gehen in chronische Entzündungsprozesse über, die letztendlich zur Zerstörung des Lungengewebes führen. Die Lungen-clearance, die sich aus mukoziliärer Clearance und Hustenclearance zusammensetzt, verliert an Effektivität, was schwerwiegende Folgen hat: Verschluss der kleinen und mittelgroßen Atemwege, Bronchiektasen, sinkende Stabilität der Bronchialwände mit eventuellem Bronchialkollaps, verstärkte Mukostase, rezidivierende und chronische Infektionen bedingen und beeinflussen sich gegenseitig, wodurch ein Circulus vitiosus aufrecht erhalten wird (81). Radiologisch sind beim Großteil der Patienten sowohl im Bereich der Sinus (112) als

auch der unteren Atemwege Veränderungen vorhanden (24). Im Röntgen-Thorax sind möglicherweise Atelektasen, Lungenemphyseme, Pneumothoraces und Abszesse sichtbar (24, 30). In Folge kann sich eine pulmonale Hypertension bis hin zum Cor pulmonale ausbilden (24). Im Gegensatz zu den übrigen betroffenen Organen scheinen die pathophysiologischen Vorgänge an der Lunge erst später einzusetzen, da diese bei der Geburt noch nicht oder kaum betroffen ist (25). Den pathophysiologischen Vorgängen in der Lunge kommt zusätzlich besondere Bedeutung zu, da zunehmende Ateminsuffizienz und dadurch bedingte Hypoxie letztendlich die lebensbegrenzenden Faktoren der CF sind. Die Einsekundenkapazität ( $FEV_1$ ) der Patienten verschlechtert sich im Krankheitsverlauf kontinuierlich und ist somit der beste Indikator für die Mortalität. Diese beträgt bei einem Absinken der  $FEV_1$  auf 30% des Ausgangswertes etwa 50% (71). Die Mortalität bei CF-Patienten ist in 80 bis 95% der Fälle durch Ateminsuffizienz aufgrund bakterieller Infektionen und Entzündungen bedingt (85).

### **1.3. Infektionen der Lunge bei Patienten mit CF**

Während beim Gesunden der untere Respirationstrakt durch eine Reihe von Abwehrmechanismen steril gehalten wird, sind die Atemwege bei fast allen CF-Patienten mit pathogenen Mikroorganismen kolonisiert. Beim Großteil der Patienten handelt es sich dabei um *Pseudomonas aeruginosa*. Das Bakterium stellt den Leitkeim der CF dar (24) und wird als Hauptgrund für die Lungenfunktionsverschlechterung und somit die Morbidität und Mortalität gesehen (85). Weitere Keime, die im unteren Respirationstrakt der Patienten nachgewiesen werden, sind *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenza*, *Stenotrophomonas maltophilia* sowie *Burkholderia cepacia* (22). Das Keimspektrum der Patienten ist stark altersabhängig. Am deutlichsten zeigt sich dies für die Keime *P. aeruginosa* und *S. aureus* (Abb. 1): Im Kindesalter wird *S. aureus* bei etwa 50% der Patienten mit Abstand am häufigsten nachgewiesen (22). Beim Erwachsenen ist das Bakterium mit 30% viel seltener, während *P. aeruginosa* 80% der Infektio-

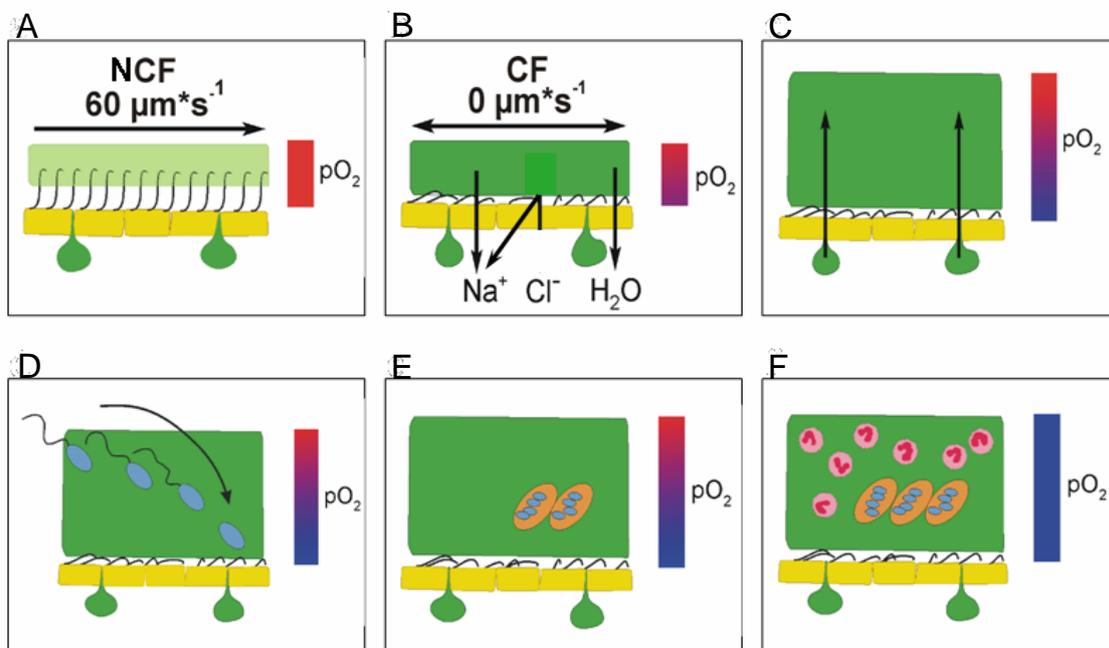
nen ausmacht (105). Es wird vermutet, dass durch Infektionen mit *S. aureus* und die damit verbundene Schädigung des Gewebes eine Ansiedlung von *P. aeruginosa* erleichtert wird. Neben der Aufnahme des Keims aus der Umwelt konnte eine Übertragung von Patient zu Patient z. B. in CF-Behandlungszentren gezeigt werden (105). Allerdings ist der Respirationstrakt der CF-Patienten nicht nur durch Bakterien besiedelt. Zusätzlich kommen Viren sowie, vor allem im späteren Verlauf, Pilze und atypische Mykobakterien vor (25). Petersen *et al.* konnten nachweisen, dass es sich dabei um *Respiratory Syncytial-Viren* (9%), *Parainfluenza-Viren* (5%), *Influenza-Viren* (3,6%), *Adenoviren* (2,4%), *Mykoplasmen* (0,6%) und *Chlamydien* (0,6%) handelt (107). Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch eine Schädigung der epithelialen Oberflächen durch das *Respiratory Syncytial-Virus* eine bakterielle Kolonisation und Infektion z. B. mit *P. aeruginosa* begünstigt (107). Zusätzlich zu den bisher genannten Bakterien konnten beträchtliche Mengen verschiedener Anaerobier-spezies im Großteil der Sputen der untersuchten CF-Patienten nachgewiesen werden (156).



**Abb. 1:** Prävalenz der wichtigsten Keime bei CF-Patienten (in %) in Abhängigkeit von deren Alter (aus: Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. Annual Data Report 2007 (22)).

Keine der Hypothesen, die zu erklären versuchen, weshalb beim CF-Patienten im Gegensatz zum Gesunden Bakterien aus dem oberen Respirationstrakt absteigen und in der Lunge persistieren, erfasst bis jetzt die Komplexität der Vorgänge ausreichend. Weder eine übermäßige Bindung von *P. aeruginosa* an die Oberfläche der respiratorischen Epithelien (26, 127), noch die durch den CFTR-Defekt beeinträchtigte Fähigkeit der Epithelzellen *P. aeruginosa* unschädlich zu machen (108) oder die Inaktivierung von Defensinen aufgrund veränderter Elektrolytkonzentrationen (163) können alle pathophysiologischen Vorgänge begründen (114). Am besten lassen sich diese durch den Flüssigkeitsmangel und die dadurch bedingten Veränderungen der Sekrete in der Lunge erklären (17, 32, 63, 90). Die aufgrund des mutierten CFTR verminderte epitheliale Permeabilität für Chloridionen sorgt osmotisch bedingt für einen geringeren Natrium- und Wasserstrom in Richtung Lumen. Dieser Zustand kann durch andere Ionenkanäle und parazellulären Transport nicht ausgeglichen werden, es resultiert ein zähes Sekret. Beim Gesunden wird der Mukus im bronchopulmonalen Respirationstrakt durch die mukoziliäre Clearance oralwärts transportiert und so zusammen mit darin befindlichen Fremdkörpern und Mikroorganismen aus der Lunge befördert. Damit stellt das mukoziliäre System eine der wichtigsten Abwehrmechanismen des Respirationstrakts dar (35). Es kann mit einem Zweischichten-Modell erklärt werden, das wie eine Rolltreppe funktioniert (30): Die obere Schicht wird vom Mukus gebildet, die untere von der periziliären Flüssigkeit. Diese trägt entscheidend zum effektiven Mukustransport bei, da durch adhäsive Kräfte der Zilienschlag koordiniert wird. (Abb. 2 A). Mukus, Zilienschlag und periziliäre Flüssigkeit stehen in einem empfindlichen Gleichgewicht und nur bei genauer Abstimmung der Komponenten funktioniert die mukoziliäre Clearance effektiv (145). Bedingt durch den Chloridionenkanaldefekt verlieren sowohl Mukus als auch periziliäre Flüssigkeit an Wasser (Abb. 2 B). Der koordinierte Schlag der Zilien vermag den zähen Mukus bei CF-Patienten nicht mehr weiterzutransportieren, wodurch dieser an den Epithelien haftet. Konstante Sekretion aus den submukösen Drüsen macht die Mukusschicht noch dicker und erschwert dadurch zusätzlich den Transport (Abb. 2 C). Der unbewegliche Mukus stellt ein optimales Milieu für Mikroorganismen dar. Aufgrund der unzu-

reichenden mukoziliären Clearance persistieren diese und vermehren sich (Abb. 2 D). Mit zunehmender Dicke und Stase der Mukusschicht entsteht darin ein Sauerstoffgradient. Dieser wird sowohl durch verstärkt ablaufende sauerstoffverbrauchende Stoffwechselvorgänge der Epithelien (104, 151), als auch durch die eingewanderten Mikroorganismen verstärkt (Abb. 2 E und F) (165). Durch die Hustenclearance versucht der Körper die unwirksam gewordene mukoziliäre Clearance zu kompensieren, was den quälenden chronischen Husten der CF-Patienten erklärt (30). Allerdings ist auch die Effektivität der Hustenclearance aufgrund des hartnäckigen, zähen Sekrets eingeschränkt (126).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der pathophysiologischen Vorgänge in der Lunge von CF-Patienten am Beispiel einer chronischen Infektion mit *P. aeruginosa*. (aus: Worlitzsch *et al.* Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway. *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients (165)). In der Lunge von Gesunden (A) liegen Mukusschicht (hellgrün) und periziliäre Flüssigkeit (weiß) dem Alveolarepithel (gelb) auf, der Sauerstoffpartialdruck im Mukus (roter Balken) ist hoch. Die mukoziliäre Clearance ist effektiv oralwärts gerichtet. In der CF-Lunge (B-F) wird durch verminderte Chloridsekretion sowie gesteigerte Natrium- und Wasserabsorption die daraus resultierende zähe Mukusschicht (dunkelgrün) nicht mehr weitertransportiert und haftet am Epithel (B). In der an Dicke zunehmenden Mukusschicht sinkt der Sauerstoffpartialdruck, es entsteht ein Sauerstoffgradient (C). Mit dem Einwandern und der Persistenz von Mikroorganismen wie *P. aeruginosa* nimmt der Sauerstoffpartialdruck weiter ab (D). An die zunehmend anaeroben Bedingungen passt sich das Bakterium durch

einen mukoiden Phänotyp sowie Wachstum in Alginat-umgebenen Makrokolonien an (E). Dadurch entzieht sich der Keim körperlichen Abwehrmechanismen wie z.B. neutrophilen Granulozyten und persistiert in der Lunge, was chronische Infektionen und weiter abnehmenden Sauerstoffpartialdruck (blauer Balken) zur Folge hat (F).

Worlitzsch *et al.* konnten zeigen, dass der steile Sauerstoffabfall im Mukus spezifisch für CF ist und nicht bei anderen genetischen Erkrankungen vorkommt, die den Respirationstrakt betreffen (165). Außerdem wurde nachgewiesen, dass *P. aeruginosa*, ein gramnegativer stäbchenförmiger Nonfermenter, aktiv in den hypoxischen Mukus eintaucht und unter den dort herrschenden anaeroben Verhältnissen persistiert. In dieser Umgebung wandelt sich der Keim vom nicht-mukoiden in einen mukoiden Phänotyp um. Dabei wird vermehrt Alginat, ein Polysaccharid, das zur Biofilmbildung beiträgt, gebildet (31, 165). Durch die Formierung von Alginat-umgebenen Makrokolonien schützt sich das Bakterium vor den körpereigenen und nicht-körpereigenen Abwehrmechanismen. Neutrophile Granulozyten sind beispielsweise nicht in der Lage, den Keim in Form einer Makrokolonie zu eradizieren, genau wie manche Antibiotika (103). Dadurch kann *P. aeruginosa* in den Lungen von CF-Patienten persistieren. Dasselbe gilt für *S. aureus* (20, 92).

### **1.3.1. Infektionen mit anaeroben Bakterien bei Patienten mit CF**

Der oben beschriebene hypoxische Mukus erklärt auch, warum gerade in der Lunge, dem Organ, das für den Gas- und damit Sauerstoffaustausch zuständig ist, anaerobe Bakterien vorkommen. Tunney *et al.* untersuchten in ihrer Studie CF-Sputen auf Anaerobier und konnten diese in 64% der untersuchten Sputen nachweisen. Es wurden 14 verschiedene Spezies isoliert, die meisten davon aus den Gattungen *Prevotella*, *Veillonella*, *Propionibacterium* und *Actinomyces* (156). Die Gruppe der Anaerobier zeichnet sich durch ein Wachstumsoptimum unter sauerstofffreien bzw. -armen Bedingungen aus. Die verschiedenen Spezies unterscheiden sich jedoch im Bezug auf ihre Sauerstofftoleranz: Man un-

terscheidet strikte, fakultative und mikroaerophile Anaerobier (82). Es konnte gezeigt werden, dass die Sauerstofftoleranz vom Enzymlevel der Superoxid-dismutase und der Fähigkeit, Sauerstoff zu reduzieren, abhängig ist (122, 153). Allerdings wird die Sauerstofftoleranz bei Anaerobiern durch weitere Faktoren beeinflusst und ist in ihrer Komplexität noch nicht vollständig verstanden. Strikte Anaerobier vermehren sich nur in sauerstofffreier Umgebung. Sie werden in Anwesenheit von Sauerstoff abgetötet. Da ihnen die Enzyme Superoxid-Dismutase und Katalase fehlen, werden Hydroperoxid-Radikale, Superoxidanionen und Singulett-Sauerstoff nicht abgebaut und entfalten ihre toxische Wirkung. Zu den strikten Anaerobiern gehören unter anderem Vertreter der Gattungen *Prevotella*, *Veillonella*, *Actinomyces*, *Bacteroides* und *Porphyromonas* (54). Fakultative Anaerobier gedeihen auch in sauerstoffhaltigem Milieu. Zu dieser Untergruppe zählen *H. influenzae* und Vertreter der Spezies *Streptococcus* und *Staphylococcus* (54). Mikroaerophile Anaerobier haben ihr Wachstumsop-timum bei geringer Sauerstoff- und erhöhter Kohlendioxidspannung. Als mikro-aerophil werden *Bartonella henselae*, *Campylobacter jejuni* und *Helicobacter pylori* bezeichnet (54). Gemeinsam mit einer Reihe von anderen Mikroorganis-men bilden Anaerobier die Normalflora der Haut, des Mund-Nasen-Rachen-Raums, des kompletten Gastrointestinaltrakts und der Vagina (54). Dabei sind sie den aeroben Bakterien zahlenmäßig um ein Vielfaches überlegen (129).

Bei Schädigung von Haut oder Schleimhaut können die Keime ins Gewebe ein-dringen und dort als opportunistische Krankheitserreger Infektionen hervorrufen. In der Mehrzahl der Fälle handelt es sich um endogene Infektionen (40). Prädisponierende Faktoren sind tiefe Wunden, Bissverletzungen, eingedrunge-ne Fremdkörper, Zustand nach Operationen, Nekrosen, Beeinträchtigung des Immunsystems durch bereits bestehende Infektionen, Tumorerkrankungen oder andere konsumierende Erkrankungen, Diabetes, immunsupprimierende Medi-kation, Antibiotikaeinnahme und Erkrankungen, bei denen die Durchblutung gestört und dadurch die Sauerstoffkonzentration im Gewebe erniedrigt ist (11, 40, 129). Infektionen mit Anaerobiern sind vorwiegend Mischinfektionen mit Be-teiligung aerober Bakterien (69). Es wird angenommen, dass letztgenannte den

vorhandenen Sauerstoff verbrauchen und so die Lebensbedingungen für Anaerobier verbessern. Die Symptome einer Infektion mit anaeroben Bakterien sind in erster Linie von der Lokalisation abhängig. Es handelt sich vor allem um abszedierende Entzündungen mit ausgedehnter Gewebszerstörung, eventuell auch Fieber. In über der Hälfte der Appendizitiden sowie Lungen- und Leberabszesse sind Anaerobier am Infektionsgeschehen beteiligt, bei Hirnabszessen, dentogenen Infektionen und Aspirationspneumonien können sie sogar in >90% der Fälle nachgewiesen werden (39, 129). Wie bereits erwähnt, besiedeln Anaerobier bei CF-Patienten auch die beim Gesunden in der Regel keimfreien Nasennebenhöhlen sowie die tiefen Atemwege und lösen dort Infektionen aus (135). Klinisch äußern sich diese mit thorakalen Schmerzen, produktivem Husten, Dyspnoe, Fieber und Gewichtsverlust. Da viele durch Anaerobier bedingte Infektionen außerordentlich schwer verlaufen, kommt der möglichst schnellen Diagnosestellung und Therapie besondere Bedeutung zu. Problematisch ist dabei das im Vergleich mit Aerobiern langsame und teilweise spärliche Wachstum der Anaerobier. Mit Bebrütungszeiten von 48 bis 72 h in anaerobem Milieu benötigen sie mehr als doppelt so lange wie aerobe Bakterien, um zu wachsen. Die Therapie umfasst chirurgische und antimikrobielle Maßnahmen sowie beides in Kombination. Chirurgisch kommen Abszessdrainage und Debridement von Nekrosen in Betracht. Für die Antibiotikatherapie steht eine Reihe von Substanzen zur Verfügung. Einschränkungen bestehen in der natürlichen Aminoglykosidresistenz der Anaerobier sowie zunehmenden Resistenzen durch  $\beta$ -Laktamasebildung (43).

### **1.3.2. Das obligat anaerobe Bakterium *Prevotella intermedia***

*Prevotella intermedia* ist ein obligat anaerobes, nicht sporenbildendes, gramnegatives Stäbchen, das zur Familie der *Bacteroidaceae* gehört (69). Phänotypisch fällt es, genau wie die Spezies *Prevotella melaninogenica* und *Prevotella nigrescens*, durch ein braunschwarzes Hämatinpigment auf (69). Neben der Pigmentbildung gibt es zahlreiche Übereinstimmungen zwischen *P. intermedia*

und *P. nigrescens*. Beispielsweise reagieren sie bei bestimmten enzymatischen Tests ähnlich oder bilden dieselben Stoffwechselprodukte. Dadurch kann man sie mithilfe kommerzieller Anaerobier-Testsysteme wie zum Beispiel „API Rapid 32 A“ nicht unterscheiden. Diese Gemeinsamkeiten erklären, warum beide Spezies lange gemeinsam als *Bacteroides intermedius* bezeichnet wurden. Erst 1992 grenzten Shah *et al.* sie als *P. intermedia* und *P. nigrescens* voneinander ab (134). Frandsen *et al.* bestätigten 1995 *P. intermedia* und *P. nigrescens* aufgrund von DNA-Analysen als eigenständige Spezies (44). Gemeinsam mit den anderen Vertretern der Gruppe der pigmentierten gramnegativen Anaerobier gehört *P. intermedia* zur normalen Flora von Schleimhäuten. Meist wird das Bakterium aus der Mundhöhle isoliert, wo sich die durch *P. intermedia* hervorgerufenen Infektionen hauptsächlich abspielen. (89). Infektionen entstehen meist endogen nach Schädigung der Schleimhaut. Die Keime dringen ins Gewebe ein und rufen dort Infektionen hervor. Meist handelt es sich dabei um Mischinfektionen mit Beteiligung aerober Bakterien (69). Finegold *et al.* konnten zeigen, dass der Infektionsverlauf sowohl durch Anzahl als auch Virulenzfaktoren der eingedrungenen Bakterien sowie durch Synergismen mit anderen Mikroorganismen beeinflusst wird (41). Bei den bis jetzt für *P. intermedia* identifizierten Virulenzfaktoren handelt es sich unter anderem um die Fähigkeit zur Hämagglutination, Hämolyse sowie zur Bindung von Hämoglobin (7, 8, 80, 100). Es wird vermutet, dass das Bakterium seinen Eisenbedarf über diese Mechanismen deckt. Weitere Virulenzfaktoren von *P. intermedia* stellen die Adhesine dar, die an unterschiedliche Komponenten der Zellen binden (53, 67). Sie ermöglichen dem Bakterium, trotz zahlreicher Abwehrmechanismen des Körpers wie dem Speichelfluss, Scherkräften durch die Zungenbewegungen und Desquamation der Mundschleimhaut, in der Mundhöhle zu persistieren (50). Shibata *et al.* konnten außerdem nachweisen, dass *P. intermedia* eine elastolytische Serinprotease produziert, die möglicherweise für die Gewebszerstörung im Rahmen einer Periodontitis verantwortlich ist (138). Der Nachweis dieser Serinprotease konnte jedoch bei eigenen Untersuchungen im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene Tübingen nicht bestätigt werden. Periodontitiden können außerdem von einer Vielzahl von Bakterien hervorgerufen wer-

den, sodass die Gewebszerstörung vermutlich nicht ausschließlich auf die Proteaseaktivität von *P. intermedia* zurückzuführen ist (45). Zusätzlich wäre ein größeres als das in der durchgeführten Studie untersuchte Patientenkollektiv notwendig, um verlässliche Aussagen treffen zu können. Yanagisawa *et al.* beobachteten bei einem größeren Kollektiv ebenfalls Serinproteaseaktivität bei verschiedenen Prevotella Spezies (168). Allerdings ist die Studienlage zu diesem Thema nicht besonders ergiebig.

*P. intermedia* bildet zusätzlich Strategien zur optimalen Anpassung an die Umwelt aus. Santos *et al.* beobachteten, dass das Bakterium unter oxidativem Stress eine gewisse Toleranz gegenüber Sauerstoff entwickelt (128). Die adaptierten Stämme waren morphologisch verändert und konnten in sauerstoffhaltiger Umgebung bis zu 96 h überleben. Zusätzlich wiesen die sauerstofftoleranten Stämme im gnotobiotischen Mausmodell eine deutlich höhere Virulenz auf als die Wildtypstämme (128). Die Infektionen, an denen *P. intermedia* beteiligt ist, sind vor allem in Mundhöhle, Kopf-Hals-Bereich, Gastrointestinaltrakt sowie Lunge und Pleura lokalisiert. Das Spektrum ist breit und reicht von oralen Infektionen über Aspirationspneumonien, Pleuraempyeme, Abszesse im HNO-Bereich, Lungenabszesse sowie intrakranielle Abszesse, nekrotisierende Fasziitiden, Peritonitiden, Endokarditiden bis hin zu Bakteriämien (41, 69). Trotz der Beteiligung des Bakteriums an Infektionen in den unterschiedlichsten Bereichen des Körpers beschränkt sich der Großteil der klinischen *P. intermedia*-Forschung auf periodontale und dentale Infektionen. In einigen Studien konnte nachgewiesen werden, dass *P. intermedia* und *P. nigrescens* ursächlich mit Periodontitiden assoziiert sind. Gemeinsam mit *Eikenella corrodens* stellen sie die dafür hauptsächlich verantwortlichen Mikroorganismen dar (49, 56, 84, 87, 88). Ferner konnte ein Zusammenhang mit endodontischen Infektionen, wie zum Beispiel Wurzelkanalinfektionen, gezeigt werden (4). Es wird außerdem vermutet, dass Patienten mit oralen *P. intermedia*-Infektionen ein höheres Risiko für systemische Infektionen mit dem Bakterium aufweisen (169). Haraszthy *et al.* konnten *P. intermedia* und weitere Periodontitis-assoziierte Bakterien auch in atherosklerotischen Plaques nachweisen (58). Es wird angenommen,

dass die Bakterien im Rahmen der chronischen Infektionen in die Blutbahn übertreten und dort zur Bildung und Zunahme von atheromatösen Plaques führen (58). Als obligater Anaerobier ist *P. intermedia* resistent gegen Aminoglykosidantibiotika. Zusätzlich wurden bei einigen Stämmen  $\beta$ -Laktamase-bedingte Resistenzen nachgewiesen (9, 11, 89). Dadurch lässt sich die zunehmende Resistenzbildung gegen Penicilline erklären. Außerdem steigt die Zahl der Resistenzen gegen Tetrazykline, wobei regionale Unterschiede zu bestehen scheinen (161, 162).

#### **1.4. Nachweis von *P. intermedia***

Um eine Infektion adäquat therapieren zu können, müssen die auslösenden oder daran beteiligten Bakterien nachgewiesen werden. Für den Nachweis von *P. intermedia* stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Zum einen besteht die Möglichkeit des Nachweises mit einem Detektionssystem für Anaerobier, das sich das typische Verhalten der einzelnen Bakterienspezies bei einer Kombination bestimmter Enzymreaktionen zu Nutze macht. Des Weiteren kann man eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) mit spezifischen Sonden durchführen und die Bakterien so unter dem Mikroskop detektieren. Der Nachweis ist mit unterschiedlichen Arten von Sonden möglich, es stehen DNA-, 16S-RNA- und PNA-Sonden zur Verfügung. Eine zusätzliche Möglichkeit stellt die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF-MS) dar, wobei die Bakterienspezies über ihr charakteristisches Masse-Ladungs-Verhältnis in Massenspektren ermittelt werden. Darüber hinaus gibt es die Möglichkeit des Nachweises durch Sequenzierung und unterschiedliche PCR-Varianten. Der Nachweis von *P. intermedia* in dieser Arbeit erfolgte mittels kulturellem Anaerobier-Nachweissystem, FISH mit einer PNA-Sonde und MALDI-TOF-MS.

### 1.4.1. Anaerobier-Testsysteme

Anaerobier-Testsysteme stellen eine Möglichkeit des Nachweises von *P. intermedia* dar. Sie basieren auf verschiedenen enzymatischen Tests, deren Ergebnisse für jedes dafür zugelassene Bakterium ein typisches Reaktionsprofil ergeben. Es ist möglich, die einzelnen Enzymreaktionen ohne vorgefertigtes Testkit durchzuführen, allerdings ist dies in der Praxis sehr aufwändig und zeitintensiv. Daher gibt es kommerzielle Testsysteme, bei denen sich die Substrate für die verschiedenen Reaktionen in getrocknetem Zustand in Nöpfchen einer Kunststoffplatte befinden. Diese Testsysteme kommen in der Routinediagnostik von Anaerobiern zur Anwendung (129).

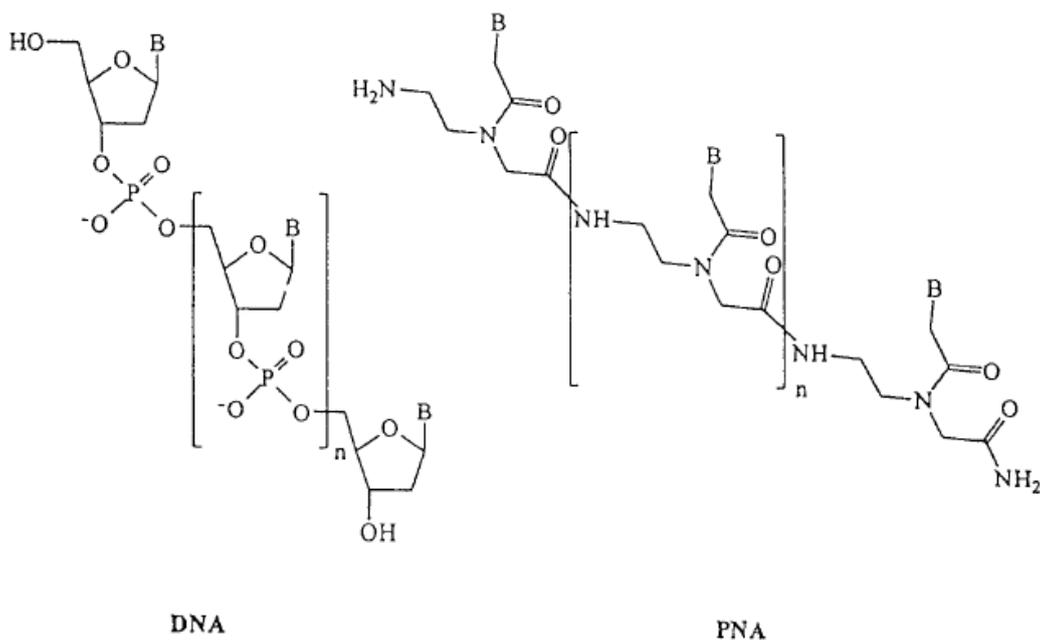
In der vorliegenden Arbeit wurde „Rapid ID 32 A“ verwendet, ein standardisiertes, miniaturisiertes Identifizierungssystem, das speziell auf Anaerobier zugeschnitten ist. Mithilfe von 29 Enzymreaktionen kann das betreffende Bakterium innerhalb von 4 h identifiziert werden. Die Ergebnisse der einzelnen Reaktionen werden anhand von Farbumschlägen der verschiedenen Nöpfchen visuell abgelesen und mithilfe von Zahlen ausgedrückt. Diese ergeben einen für jedes Bakterium charakteristischen Zahlencode, über den das Bakterium mithilfe des Computerprogramms „Apiweb“ identifiziert werden kann. Teilweise sind bei uneindeutigen Ergebnissen zusätzliche Tests wie etwa der Katalase- oder Oxidase-Test sowie eine Gram-Färbung nach dem Ablesen der Ergebnisse notwendig, um das betreffende Bakterium identifizieren zu können. Allerdings sind die Farbumschläge auch bei korrekt durchgeführter Bestückung der Kunststoffplatte des Testsystems nicht immer eindeutig, wodurch es bei der visuellen Auswertung ohne Computerprogramm zu Fehlinterpretationen und damit möglicherweise falscher Identifikation kommen kann. Vorteile der heute erhältlichen, kommerziellen Identifizierungssysteme sind eine einfache Handhabung sowie die relativ schnelle Durchführung. Früher verwendete API-Systeme, bei denen die Identifizierung der Bakterien über biochemische Reaktionen erfolgte, mussten bei der Testung von Anaerobiern 48 h inkubiert werden, da die Reaktionen nur während des Bakterienwachstums ablaufen. Diese Inkubationszeit entfällt

bei enzymatischen Tests, da sie weder Wachstum noch Vermehrung der zu testenden Bakterien erfordern. Die Zeit, in der die enzymatischen Reaktionen ablaufen, beträgt nur 4 h. Dadurch ergibt sich eine enorme Zeitersparnis. Allerdings müssen für die Identifizierung mittels Anaerobier-Testsystem Reinkulturen der zu überprüfenden Bakterien verwendet werden. Es ist also nicht möglich, von Patienten entnommenes Probenmaterial, wie beispielsweise Sputum oder Wundabstriche, direkt mit diesen Systemen zu untersuchen. Das stellt einen entscheidenden Nachteil der Methode dar. Eine Isolierung der zu untersuchenden Bakterien aus dem Patientenmaterial ist also notwendig. Dadurch erhält man das Ergebnis des Test frühestens nach 48 h Kultivierung der Bakterien und zusätzlichen 4 h Inkubationszeit des Identifizierungssystems. Außerdem können mit Hilfe des Testsystems „Rapid ID 32 A“ nur Spezies, die in der Datenbasis des Herstellers angegeben sind, ermittelt werden. Das schränkt die Methode weiter ein. Laut Angabe des Herstellers wurden 3013 zu den Spezies der Datenbasis gehörige Stämme mit „Rapid ID 32 A“ getestet. Dabei wurden 93,96% der Stämme mit oder ohne Zusatztests korrekt ermittelt, 4,22% der Stämme nicht und 1,83% falsch identifiziert. Mehreren Studien zur Evaluation des Testsystems kamen zu vergleichbaren Ergebnissen. Teilweise konnten die Bakterien jedoch nur bis auf Genus- und nicht bis auf Speziesebene ermittelt werden (3, 33, 73, 83). Ein weiteres Manko, das besonders bei der Verwendung des Testsystems in dieser Arbeit zum Tragen kam, ist das Unvermögen von „Rapid ID 32 A“, zwischen *P. intermedia* und *P. nigrescens* zu unterscheiden. Die Datenbasis des Herstellers beinhaltet nur *P. intermedia*, nicht aber *P. nigrescens*. In verschiedenen Studien wurde mittels „Rapid ID 32 A“ zwar eine Eingrenzung der zu testenden Bakterien auf *P. intermedia* und *P. nigrescens* vorgenommen, die endgültige Differenzierung zwischen den beiden Spezies erfolgte jedoch durch andere Methoden wie FISH mit spezifischen Sonden oder PCR (2, 19, 55, 139).

### 1.4.2. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Eine weitere Detektionsmöglichkeit für Bakterien mit sequenziertem Genom, und damit auch für *P. intermedia* (102), ist der Nachweis mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung durch spezifische Sonden. Dabei handelt es sich um meist 15-30 Basenpaare lange Oligonukleotide aus DNA, 16S rRNA oder neuerdings auch PNA, die an bestimmte Abschnitte der DNA oder RNA von Bakterien binden. Um diese dann sichtbar zu machen, sind die Sonden in der Regel am 5'-Ende mit Fluorochromen wie Fluorescein, Rhodamin oder Texas Red gekoppelt, welche unter dem Fluoreszenzmikroskop zum Leuchten angeregt werden (106, 130). Die Bakterien werden somit mikroskopisch über ein Lichtsignal detektiert, dessen Farbe vom an die Sonde gekoppelten Farbstoff abhängig ist. Die Fluoreszenz lässt allerdings bei Wärme- und Lichtexposition rasch nach, weshalb sowohl Sonden als auch Präparate lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt werden sollten.

PNA-, DNA- und RNA-Moleküle besitzen große Ähnlichkeit, unterscheiden sich jedoch in einigen wesentlichen Punkten. Während DNA und RNA durch ein negativ geladenes Zucker-Phosphat-Rückgrat mit Phosphodiesterbindungen stabilisiert werden, besitzt PNA ein Pseudopeptid aus repetitiven durch Amidbindungen miteinander verbundenen N-(2-Aminoethyl)-Glycin-Einheiten als Rückgrat. Dieses ist ungeladen, achiral und azyklisch (97, 98, 99). Im Gegensatz zur DNA enthält PNA außerdem weder Phosphatgruppen noch Zucker (97). Entsprechend der Struktur der DNA sind auch bei der PNA die verschiedenen Nukleobasen über Methyl-Carbonyl-Bindungen am Rückgrat befestigt. Es handelt sich also bei PNA um ein DNA-Analogon, das synthetisch hergestellt werden kann (106). Teilweise wird die Grundstruktur der PNA modifiziert, um die Wasserlöslichkeit zu erhöhen oder die Aufnahme in die Zelle zu verbessern (106).



**Abb. 3:** Chemische Struktur von DNA und PNA. „B“ kann durch eine der Nukleotidbasen Adenosin, Cytosin, Guanin oder Thymin ersetzt werden (aus: Stender *et al.* Fluorescence in situ hybridization assay using peptide acid probes for differentiation between tuberculous and nontuberculous mycobacterium species in smears of mycobacterium cultures (148).

Trotz dieser wesentlichen strukturellen Unterschiede ähnelt das Verhalten von PNA-Oligomeren stark dem von DNA. Durch die über Methyl-Carbonyl-Bindungen am Rückgrat befestigten Nukleinbasen können PNA-Oligomere nach den Watson-Crick-Regeln über Wasserstoffbrücken an komplementäre DNA- oder RNA-Sequenzen binden (97, 99, 113, 148). Im Gegensatz zu DNA ist dies bei PNA sowohl parallel als auch bevorzugt antiparallel möglich (97, 113, 148). Die Bindungen sind stärker als die von DNA-Oligomeren an komplementäre DNA- oder RNA-Sequenzen, da durch das ungeladene Rückgrat der PNA keine elektrostatische Abstoßung stattfindet (34, 106). Daraus ergibt sich zusätzlich eine größere Bindungsstabilität, die auch bei höheren Temperaturen und niedrigen NaCl-Konzentrationen erhalten bleibt (34, 62, 98). Weitere Vorteile stellen sowohl die höhere Affinität als auch Spezifität der PNA-Oligomere zu den entsprechenden DNA- bzw. RNA-Stücken im Vergleich zu DNA- oder RNA-Oligomeren dar, was vor allem durch das neutrale Polyamid-Rückgrat bedingt ist (62, 97, 106). Durch die hohe Spezifität der PNA ist es

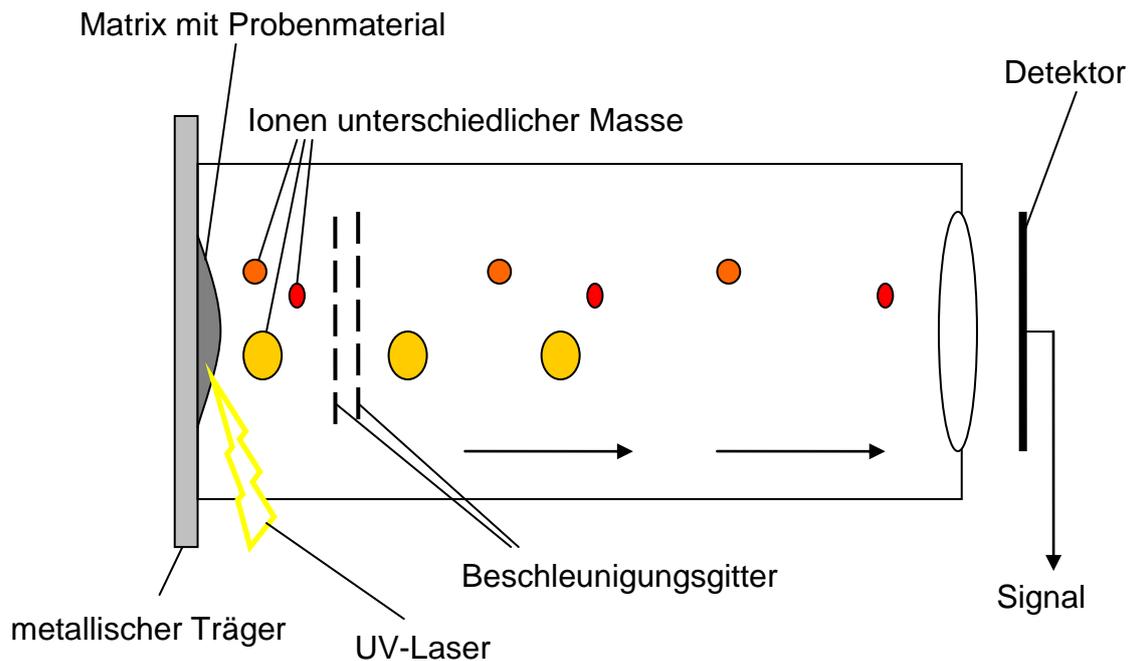
möglich, verglichen mit DNA kürzere Oligomere zu verwenden. So werden höhere Diffusionsraten und ein schnellerer Hybridisierungsvorgang erreicht (106). Auch bei der Durchführung der FISH sind die Vorzüge der PNA-Sonden offenkundig: Durch die günstigen Eigenschaften sind die Hybridisierungszeiten im Vergleich zur Verwendung von DNA- und RNA-Sonden verkürzt, teilweise bis um das Zehnfache (99). Außerdem wurde beobachtet, dass PNA-Sonden in der Fluoreszenzmikroskopie stärkere Signale zeigen als die entsprechenden Oligonukleotide (97) und ein niedriges Hintergrundsignal aufweisen (164), was vermutlich durch die hohe Bindungsspezifität bedingt ist (106). Ein weiterer Vorteil gegenüber DNA- oder RNA-Sonden ist, dass PNA bedingt durch das unnatürliche Rückgrat weder durch Proteasen noch durch Nukleasen abgebaut wird (28, 117). Das unnatürliche Rückgrat der PNA ist allerdings nicht nur von Vorteil, da PNA-Oligomere dadurch nicht von Polymerasen erkannt und deshalb nicht als Primer verwendet werden können (106). Da PNA im Vergleich zu DNA relativ hydrophob ist, scheint sie leichter durch die Bakterienzellwand zu dringen (147). Im Gegensatz zum bereits beschriebenen Nachweis von *P. intermedia* durch Anaerobieridentifizierungssysteme können Bakterien und andere Mikroorganismen über FISH mit PNA-Sonden direkt im Patientenmaterial detektiert und lokalisiert werden (72, 101, 119). Da die Kultivierung der Bakterien, die für anaerobe Bakterien wie *P. intermedia* 48 h dauert, entfällt, sind die Ergebnisse um einiges schneller verfügbar als bei den Anaerobiersystemen. Die Kosten für die PNA-Sonden sind zwar verhältnismäßig hoch, allerdings werden nur kleine Mengen benötigt. Zusätzlich sind die Sonden, wie alle für die PNA-FISH benötigten Chemikalien, besonders stabil und dadurch sehr lange haltbar.

### **1.4.3. MALDI-TOF-MS**

Eine weitere, relativ neue Methode zur Bestimmung und Unterscheidung von Bakterien stellt MALDI-TOF-MS dar. Dabei werden die Masse-Ladungsverhältnisse ( $m/z$ ) von Proteinen der einzelnen Bakterienspezies bestimmt. Für jedes Bakterium ergibt sich ein Spektrum mit charakteristischen Peaks, anhand

dessen man es durch Abgleich mit Referenz-Superspektren identifizieren kann (29, 38, 59, 158). Die Superspektren sind eine Überlagerung der Messergebnisse aller untersuchten Stämme derselben Spezies. Je höher die Zahl der darin enthaltenen Einzelspektren ist, desto genauer und zuverlässiger ist die Identifikation unbekannter Stämme. Soll zum Beispiel überprüft werden, ob es sich bei pigmentierten Kolonien tatsächlich um *P. intermedia* handelt, kann eine MALDI-TOF-MS-Messung durchgeführt und das Ergebnis mit einem vorhandenen Superspektrum von *P. intermedia*-Referenzstämmen aus der Datenbasis abgeglichen werden.

Das grundlegende Prinzip von MALDI-TOF-MS ist die Detektion von Ionen, die zuvor durch Laserbeschuss des zu untersuchenden Materials erzeugt wurden. Neben Infrarotlasern werden dafür hauptsächlich UV-Laser mit Wellenlängen von 266 oder 337 nm verwendet, die Energien von  $1 \times 10^7$  bis  $5 \times 10^7$  W/cm<sup>2</sup> erzeugen (66, 158). Diese sorgen für eine Aufspaltung und Ionisation des vorab mit einer organischen Matrix kokristallisierten Materials (66, 158). Als Matrices werden meist Zimtsäurederivate wie  $\alpha$ -Cyano-Hydroxy-Zimtsäure oder Benzoesäurederivate wie Diaminobenzoesäure verwendet (5, 6). Die Matrix wird zusammen mit dem zu testenden Material auf eine Trägerplatte aus Stahl aufgebracht und dort auskristallisiert (158). Im elektrischen Feld werden die Ionen in Richtung eines Detektors beschleunigt, welchen sie entsprechend ihrer Masse innerhalb unterschiedlicher Zeiten erreichen (Abb. 4). Dadurch kann man sie anhand ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses unterscheiden (42, 66).



**Abb. 4:** Schematischer Aufbau und Funktionsweise eines MALDI-TOF-Massenspektrometers. Das auf dem metallischen Träger mit der Matrix cokrystallisierte Probenmaterial wird durch einen UV-Laser beschossen. Dadurch werden Ionen unterschiedlicher Masse (gelbe, orange und rote Kugeln) erzeugt. Sie werden durch ein Gitter in Richtung Detektor beschleunigt (Pfeile) und erreichen diesen entsprechend ihrer Masse unterschiedlich schnell. Die Ionen werden beim Auftreffen auf den Detektor in elektrische Signale umgewandelt, aus welchen dann die charakteristischen Massenspektren erstellt werden.

Bei der Identifikation von Bakterien mittels MALDI-TOF-MS müssen Reinkulturen verwendet werden. Die direkte Analyse aus Patientenmaterial ist nicht möglich, da die zusätzlich darin enthaltenen Zellen die Messung beeinflussen und der zuverlässige Abgleich mit einem Massenspektrum dann nicht mehr möglich ist. Ansonsten ist MALDI-TOF-MS, wenn Massenspektren einer möglichst großen Datenbasis vorliegen, verglichen mit anderen Methoden sehr genau, schnell und kosteneffektiv (27, 59, 96, 133). Die Ergebnisse sind reproduzierbar, wenn beim Herstellen der Präparate nach einem standardisierten Schema vorgegangen wird. Auch die Identifikation phänotypisch sehr ähnlicher Spezies, die durch biochemische und enzymatische Tests wie zum Beispiel Anaerobiersysteme nicht unterschieden werden können, ist zuverlässig möglich (96, 150).

## 1.5. Ziele

Wie bereits erwähnt, stellen pulmonale Infektionen und damit verbundene Komplikationen die für den Großteil der CF-Patienten lebensbegrenzenden Faktoren dar. Daher kommt der Erforschung der pathophysiologischen Vorgänge und Infektionen der CF-Lunge besondere Bedeutung zu. Lange lag das Hauptaugenmerk dabei in erster Linie auf Infektionen, die durch *S. aureus* und *P. aeruginosa* hervorgerufen werden. Seit bekannt ist, dass im Sputum von CF-Patienten anaerobe Verhältnisse herrschen und Anaerobier im Allgemeinen, sowie *P. intermedia* im Speziellen in hohen Zahlen darin vorkommen, sind auch sie Gegenstand intensiver Forschung geworden. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Hauptziele formuliert:

1. Etablieren einer neuen Methode zum Nachweis von *P. intermedia* in Sputum von CF-Patienten.

Die bisher zum Nachweis angewandten Methoden sind mit einer Reihe von Einschränkungen verbunden. Da Reinkulturen der Bakterien benötigt werden, ist ein direkter Nachweis in Patientenmaterial nicht möglich. Hinzu kommt die zeitaufwändige Kultivierung der Bakterien. Außerdem ist ein spezifischer Nachweis nicht durch alle Methoden möglich. Eine Methode mit genau diesen Vorteilen gegenüber den bisher verwendeten würde den Nachweis des Bakteriums deutlich erleichtern.

2. Nachweis von Antikörpern gegen *P. intermedia* im Serum von CF-Patienten.

Bei Patienten mit Periodontitiden, Abszessen oder Bronchitiden mit *P. intermedia*-Beteiligung konnten im Blut erhöhte Antikörpertiter gegen das Bakterium nachgewiesen werden. Ob dies auch für CF-Patienten gilt, in deren Sputumprobe *P. intermedia* gefunden wurde, sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden. Antikörper könnten im Rahmen einer Immunkomplexbildung Einfluss auf die Pathogenese der Erkrankung nehmen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Geräte und Materialien

Anaerobier-Topf Anaerocult<sup>®</sup> 2,5 l (Merck KGaA, Darmstadt)

Autoklav (KSG Sterilisatoren, Olching)

Bunsenbrenner Fireboy S1000 (TecNoMara, Wallisellen, Schweiz)

Deckgläser 24 x 60 mm, Glasdicke 0,13 - 0,16 mm (R. Langenbrinck, Emmendingen)

Drigalski-Spatel aus Glas (NeoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg)

E-Tests Piperacillin/Tazobactam, Ampicillin, Clindamycin, Ceftazidim, Meropenem und Metronidazol (Bio Mérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)

Einkanal-Pipetten Reference, 0,5-10 µl, 10-100µl und 200-1000 µl (Eppendorf AG, Hamburg)

ELISA-Inkubator EB115 (Jouan GmbH, Unterhaching)

ELISA-Platten Cellstar, 96 Well (Greiner Bio-One, Frickenhausen)

ELISA-Reader (SLT-Labinstruments, Crailsheim)

ELISA-Software (Tecan, Grödig, Österreich)

ELISA-Wascher M8/4R Columbus plus (Tecan, Grödig, Österreich)

Eppendorf-Cups, 1,5 ml und 2 ml Volumen (Eppendorf AG, Hamburg)

Falcon-Tubes, 50 ml Volumen, konisch, mit Schraubverschluss (Beckton Dickinson Labware, Le Pont de Claix, Frankreich)

Filter Millex GS 22 µm (Millipore, Bedford, MA, USA)

French Press (Heinemann, Schwäbisch Gmünd)

Gelfiltrationssäule Sephacryl S-300 High Resolution (GE Healthcare, Freiburg)

Glasflaschen, verschiedene Volumina (Schott Duran, Mainz)

Handschuhe Dermaclean (Ansell Ltd., Tamworth, England)

Heiz- und Rührplatte Ikamag RCT (Ika Labortechnik, Staufen im Breisgau)

Inkubator Memmert 700 (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach)

Kryoröhrchen Cellstar, 2 ml Volumen (Greiner Bio-One, Frickenhausen)

Kühlschrank Kirsch (Bosch, Jungingen)

Kühltruhe (Bosch, Jungingen)

Kühltruhe Heraeus (Thermo Fisher Scientific Thermo Elektron LED GmbH, Osterode)

Küvetten 1,5 ml Volumen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)

Labortücher Kimtech, fusselfrei (Kimberly-Clark, Survey, England)

MALDI-TOF Datenbasis SARAMIS (AnagnosTec GmbH, Potsdam)

Massenspektrometer AXIMA@SARAMIS (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg)

Mehrkanalpipette Research, 8 Kanäle, 30-300 µl (Eppendorf AG, Hamburg)

Metallösen (Roland Vetter Laborbedarf, Ammerbuch)

Metallträger FlexiMass (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg)

Mikroskop Axioplan (Zeiss, Oberkochen)

Mikroskop-Kamera AxioCam (Zeiss, Oberkochen)

Mikroskop-Software Axiovision Rel. 4.6 (Zeiss, Oberkochen)

Monovetten, 9 ml Volumen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)

Objektträger 76x26 mm (R. Langenbrinck, Teningen)

Objektträger für den Immunfluoreszenztest, markiert, 6 Felder (Hölzel GmbH, Dorfen)

Objektträger für den Immunfluoreszenztest, markiert, 6 Felder (Medeco, München)

pH-Meter 654 (Deutsche Metrohm GmbH & Co, Filderstadt)

Photometer Pharmacia Ultrospec III (LKB Biochrom Ltd., Cambridge, England)

Pinzette (Oswald Kohl Laborbedarf, Ritterhude)

Pipetten Costar Stripette, 5 ml, 10 ml und 25 ml Volumen (Corning Inc., Corning, NY, USA)

Pipettenspitzen 100 µl (Greiner Bio-One, Frickenhausen)

Pipettenspitzen Kristall-E, 0,5 – 10 µl (Ratiolab GmbH, Dreieich)

Pipettenspitzen Ultratip, 250 – 1000 µl (Greiner Bio-One, Frickenhausen)

Pipettierhilfe Pipetboy Plus (TecNoMara AG, Wallisellen, Schweiz)

Reagenzgläser (Schott Duran, Mainz)

Reagenzienmischung Anaerogen™ (Oxoid Ltd., Hampshire, England)

Röhrchen Cellstar, 15 ml Volumen, konisch, mit Schraubverschluss (Greiner Bio-One, Frickenhausen)

Spritzen Injekt, 10 ml Volumen (Braun Melsungen AG, Melsungen)

Sterilbank LaminAir® HBB 2448 (Heraeus Instruments, Osterode)  
Teststreifen Anaerotest® (Merck KGaA, Darmstadt)  
Thermometer Precision (Amarell GmbH & Co. KG, Kreuzwertheim)  
Vortex Genie 2 (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz)  
Waage PE 628 (Bosch, Jungingen)  
Wasserbad 3042 (Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze/Hänigsen)  
Wattetupfer, steril verpackt (Bio Mérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)  
Wippe (Edmund-Bühler GmbH, Hechingen)  
Zentrifuge 3K10 (Sigma, Osterode)  
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3 SR+ (Thermo Fisher Scientific Thermo Elektron  
LED GmbH, Osterode)

## **2.2. Reagenzien und Chemikalien**

3,3',5'5-Tetramethylbenzidine (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MI, USA)  
4',6-Diamidino-2-Phenylindol (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim)  
Ampuwa (Fresenius Kabi, Bad Homburg)  
API Suspension Medium 2 ml (Bio Mérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)  
BacUni-TXR PNA Lösung (AdvanDx, Woburn, MA, USA)  
Carbolfuchsin (Merck KGaA, Darmstadt)  
Carbolgentianaviolett (Merck KGaA, Darmstadt)  
DakoCytomation Stift für Immunhistochemie (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)  
Dithiothreitol (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim)  
Eindeckmedium Fluorescent Mounting Medium (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)  
Ethanol 99% (Merck KGaA, Darmstadt)  
FB 5 ml (Bio Mérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)  
Gentamicin Sulfat (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)  
Hybridisierungspuffer (AdvanDx, Woburn, MA, USA)  
Immersionsöl 100 ml (NeoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg)

James Reagenz (Bio Mérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)  
Lugolsche Lösung (Merck KGaA, Darmstadt)  
Methanol 50% (Merck KGaA, Darmstadt)  
NIT 1 und 2, je 5 ml (Bio Mérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)  
Paraffinöl 125 ml (Bio Mérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)  
PBS (Sigma, Deisenhofen)  
PBS-Tween 20 (Sigma, Deisenhofen)  
PNA-Sonde Prevotella Genus PNA, 10 ml (AdvanDx, Woburn, MA, USA)  
Rabbit-Anti-Human-Antikörper konjugiert mit Horseradish-Peroxidase  
Rapid ID 32 A Identifizierungssystem für Anaerobier (Bio Mérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)  
Waschlösung 60x, Tris gepufferte Saline mit Detergens, 50 ml (AdvanDx, Woburn, MA, USA)

### **2.3. Medien und Stammlösungen**

#### PBS ohne Azid (Phosphat-buffered Saline, 20-fache Stammlösung):

85,00 g NaCl  
14,23 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O  
1,35 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1,00 g NaN<sub>3</sub>

In 500 ml Aqua dest. auflösen, gut mischen und anschließend autoklavieren. Zur Herstellung von 2 l Gebrauchslösung 100 ml der Stammlösung und 1900 ml Aqua dest. gut mischen, Lösung autoklavieren. Die Lösung kann bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden.

#### PBS-Tween-20 (0,2%ig):

2 ml Tween-20 zu 1 l der PBS-Gebrauchslösung (einfach) geben, gut mischen und autoklavieren. Die Lösung kann bei Zimmertemperatur gelagert werden.

PBS-Tween-20 (0,05%ig) mit 1% BSA (Bovines Serum Albumin):

0,5 ml Tween-20 zu 1 l der PBS-Gebrauchslösung (einfach) geben und gut mischen. Dann 10 g BSA darin lösen, gut mischen und anschließend autoklavieren. Die Lösung kann bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden.

TSB-Lösung (Tryptone Soya Broth):

30 g TSB in 1 l Aqua dest. auflösen, gut mischen und autoklavieren. Die Lösung kann bei Zimmertemperatur gelagert werden.

Anaerobier-Basalmedium:

Das Anaerobier-Basalmedium besteht aus vier verschiedenen Lösungen, die erst unmittelbar vor Gebrauch gemischt werden. Für 100 ml Basalmedium werden 97 ml der Lösung 1, 1 ml der Lösung 2, 1 ml der Lösung 3 und 1 ml der Lösung 4 gut gemischt.

Lösung 1: 5 g Tryptone Soya Broth  
5 g Proteose Peptone  
2,5 g Hefe Extrakt L21  
2,5 g Natrium Chlorid  
490 ml destilliertes Wasser

Komponenten gut mischen, pH-Wert auf 7,4 einstellen und Lösung autoklavieren. Die Lösung kann bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden.

Lösung 2: 4 g NaHCO<sub>3</sub>  
100 ml destilliertes Wasser (steril filtrieren)

Komponenten gut mischen. Die Lösung muss bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Lösung 3: 0,5 g Cystein Hydrochlorid  
10 ml destilliertes Wasser

Komponenten gut mischen und Lösung in 1 ml Aliquots bei -20°C einfrieren.

Lösung 4: 50 mg Haeminchlorid  
1,74 g  $K_2HPO_4$   
0,40 g NaOH  
99 ml destilliertes Wasser  
1 ml Medianon-Stammlösung (100 mg Medianon Vitamin K (Sigma M5625), 20 ml Ethanol)

Komponenten gut mischen. Die Lösung muss bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden.

Gentamicin Stammlösung (Konzentration 10 mg/ml):

0,1 g Gentamicin in 10 ml Aqua dest. lösen, aliquotieren und bei -20°C lagern.

Dithiothreitol Stammlösung (DTT, Konzentration 1 mg/ml):

0,1 g DTT in 100 ml Aqua dest. lösen, aliquotieren und bei -20°C lagern.

DAPI Stammlösung (Konzentration 1 mg/ml)

10 mg DAPI in 10 ml PBS-Tween-20 auflösen und gut mischen. Lösung aliquotieren und bei -20°C lagern.

Für die DAPI Gebrauchslösung (Konzentration 2  $\mu$ g/ml) DAPI-Stammlösung auf 1:500 in PBS-Tween-20 verdünnen und gut mischen.

Blutagar:

39 g Columbia-Agar (Oxoid, Hampshire, GB) in Aqua bidest. lösen, autoklavieren und nach Abkühlen auf 73°C 5% defibriniertes Schafsblut (Acila, Walldorf) zugeben.

Brain-Heart-Infusion-Agar (BH-Agar):

7,5 g Kalbshirn-Infus  
10 g Pepton

5 g Natriumchlorid  
10 g Rinderherz-Infus  
2,5 g Dikaliumphosphat  
2 g Glucose  
15 g Agar

Komponenten in 1 l Aqua bidest. auflösen, gut mischen und auf pH 7,4 einstellen.

#### **2.4. Bakterienstämme**

Für die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden verschiedene Bakterienstämme verwendet. *Actinomyces odontolyticus* (R 2), *P. nigrescens* (R 138), *P. oralis* (AN 1243) und *P. oris* (AN 1037) wurden freundlicherweise von Frau Dr. Ulrike Schumacher aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Tübingen zur Verfügung gestellt. *P. aeruginosa* (PaO1) und *S. aureus* (Sa 113) sind Laborstämme, die in Tübingen isoliert wurden. Die Isolate *P. baroniae* (651 und 1033), *P. bivia* (1050 und 1071), *P. buccae* (578 und 674), *P. denticola* (583 und 608), *P. disiens* (1059 und 1074), *P. intermedia* (1045), *P. melaninogenica* (1029 und 1049), *P. multiformis* (507 und 524) und *P. nigrescens* (582, 621, 634, 655, 658, 672, 1006, 1024, 1032, 1044, 1048 und 1057) stammen aus der Stammsammlung des Instituts für medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Tübingen. *P. intermedia* (ATCC 25611), *P. intermedia* (20706), *P. nigrescens* (13386), *P. oralis* (20702), *P. paludivivens* (17968) und *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen.

### 2.4.1. Kultivierung der Bakterien

*P. aeruginosa* konnte als Flüssig- oder Plattenkultur angezüchtet werden. Zur Herstellung einer Flüssigkultur wurden entweder eine Kolonie von einer Plattenkultur oder 100 µl einer Flüssigkultur bzw. einer eingefrorenen Bakterienkultur in 10 ml TSB eingebracht und unter aeroben Bedingungen 24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Für eine Plattenkultur wurde auf Columbia-Blutagar ein Drei-Ösen-Ausstrich mit einer Kolonie von einer Plattenkultur oder 10 µl Flüssig- bzw. Gefrierkultur angefertigt und unter aeroben Bedingungen 24 h bei 37°C inkubiert. Die Kultivierung von *S. aureus* erfolgte nach demselben Prinzip.

Die obligat anaeroben Bakterien wie die *Prevotella spp.* konnten ebenfalls in Flüssigmedium oder auf Platte kultiviert werden. Für die Flüssigkultur wurden entweder eine Kolonie von einer Plattenkultur oder 100 µl einer Flüssigkultur bzw. einer eingefrorenen Bakterienkultur in 10 ml Anaerobier-Basalmedium eingebracht und unter anaeroben Bedingungen 48 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Kultivierung auf Platte wurde auf Brain-Heart-Agar ein Drei-Ösen-Ausstrich mit einer Bakterienkolonie von einer Kulturplatte oder 10 µl einer Flüssig- bzw. Gefrierkultur angefertigt und unter anaeroben Bedingungen 48 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anaerobe Bedingungen wurden durch Anaerocult Anaerobier-Töpfe mit 2,5 l Volumen geschaffen, die nach Zugabe eines Anaerogen-Päckchens und eines Anaerotest-Indikatorstreifens mit dem passenden Deckel luftdicht verschlossen wurden. Durch das Reagenziengemisch im Anaerogen-Päckchen wurde durch Reduktion des atmosphärischen Sauerstoffs chemisch ein anaerobes Milieu erzeugt. Dies wurde visuell durch die Anaerotest-Indikatorstreifen überprüft. Unter anaeroben Bedingungen schlägt der blaue Farbstoff Methylenblau, mit dem die Teststreifen beschichtet sind, in das farblose Leuko-Methylenblau um. Diese Reaktion läuft in Anwesenheit von Sauerstoff auch umgekehrt ab, sodass man auch nach erfolgtem Farbumschlag von blau zu weiß feststellen kann, ob im Anaerobiertopf tatsächlich anaerobe Verhältnisse herrschen.

## 2.5. Gefrierkonservierung von *P. intermedia*

Um Gefrierkulturen von *P. intermedia* herzustellen, wurde zunächst wie in 2.4.1. beschrieben eine Flüssigkultur hergestellt. Davon wurden je 1 ml Aliquots in 1,5 ml Eppendorf-Cups pipettiert und bei -80°C eingefroren. Bei Bedarf wurde ein Aliquot aufgetaut, der Inhalt in 10 ml Anaerobier-Basalmedium gegeben bzw. 10 µl auf einer Brain-Heart-Agarplatte ausgestrichen und unter anaeroben Bedingungen 48 h bei 37°C inkubiert.

## 2.6. Studiendesign und Patientenkollektiv

Die durchgeführte prospektive monozentrische Screening-Studie sollte zur Aufklärung der Beteiligung obligater Anaerobier an der Pathogenese der Lungenerkrankung bei CF beitragen. Ziel der Studie war es, Antikörpertiter gegen *P. intermedia* im Blut von CF-Patienten und gesunden Kontrollpersonen zu bestimmen. *P. intermedia* wurde stellvertretend für das Kollektiv der obligaten Anaerobier untersucht, da bekannt ist, dass dieses Bakterium im Sputum von CF-Patienten vorkommt (121, 156). Außerdem wurde es im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene Tübingen bereits aus einer Vielzahl von CF-Sputumproben isoliert (78). Zusätzlich ist das Genom von *P. intermedia* sequenziert (102), was für weitere Untersuchungen von Vorteil ist.

Die Patienten, die an der Studie teilnahmen, wurden drei Gruppen zugeordnet. Die Gruppe 1 umfasste 20 CF-Patienten mit chronischer pulmonaler *P. aeruginosa*-Besiedlung. Hier wurde ein hoher Prozentsatz an *P. intermedia*-positiven Sputen erwartet, da zwischen der Infektion mit *P. aeruginosa* und *P. intermedia* ein Zusammenhang bestehen kann (156, 165). Die Probanden der Gruppe 1 waren zwischen 11 und 40 Jahre alt. Für Gruppe 2 waren 20 CF-Patienten mit anderweitiger chronischer bakterieller Besiedelung, jedoch ohne *P. aeruginosa*-Besiedlung der Lunge vorgesehen. Allerdings gestaltete sich die Rekrutierung schwierig, sodass diese Gruppe letztendlich nur 13 Patienten umfasste. Diese

waren zwischen 9 und 30 Jahre alt. Gruppe 3, die als Kontrollgruppe diente, wurde von 31 gesunden Personen ohne bakterielle Infektion der Lunge gebildet. Sie waren zwischen 6 und 55 Jahre alt. Die Probanden der Gruppen 1 und 2 wurden aus dem Patientenkollektiv der Mukoviszidose-Ambulanz der Kinderklinik Tübingen ausgewählt. Bei den Probanden der Kontrollgruppe handelte es sich um Mitarbeiter der Kinderklinik Tübingen sowie des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene Tübingen. Patienten, die in den vergangenen vier Wochen vor Studienteilnahme eine intravenös-antibiotische Therapie erhalten hatten, denen im Rahmen einer pulmonalen Exazerbation Blut abgenommen wurde sowie Patienten mit akutem Asthmaanfall wurden von der Studienteilnahme ausgeschlossen.

Nachdem die Probanden bzw. deren Eltern ausführlich über die Studie informiert und aufgeklärt worden waren und der Teilnahme daran schriftlich zugestimmt hatten, wurden die erforderlichen Serum- und Sputumproben geleistet. Allen Patienten, die an der Studie teilnahmen, wurde venöses Blut entnommen. Bei Patienten unter 6 Jahren wurden 2 ml, bei Patienten von 6-12 Jahren 3 ml und bei Patienten über 12 Jahren 5 ml venöses Blut abgenommen. Zusätzlich husteten alle CF-Patienten, die dazu in der Lage waren, eine Sputumprobe ab, deren Menge mindestens 1 ml betrug. Bei den CF-Patienten der ersten und zweiten Gruppe, die spontan kein Sputum expektorieren konnten, wurde einmalig versucht, das Abhusten des Sputums durch Inhalation von 5,85% Natriumchloridlösung zu induzieren. Davor wurde inhalativ ein  $\beta$ -Sympathomimetikum verabreicht, um gefährliche Bronchospasmen zu vermeiden. Bei den Probanden der Kontrollgruppe wurde ein solcher Induktionsversuch nicht unternommen.

Mit der Probengewinnung wurde am 21.11.2008 begonnen, die letzte Probe wurde am 06.07.2009 geleistet. Das Patientenblut und -sputum wurde durch die Ärzte der Mukoviszidose-Ambulanz der Kinderklinik Tübingen entweder im Rahmen einer Routinekontrolle oder bei einem außerplanmäßigen Termin entnommen. Das Sputum wurde direkt nach dem Abhusten in eine sterile Einmal-

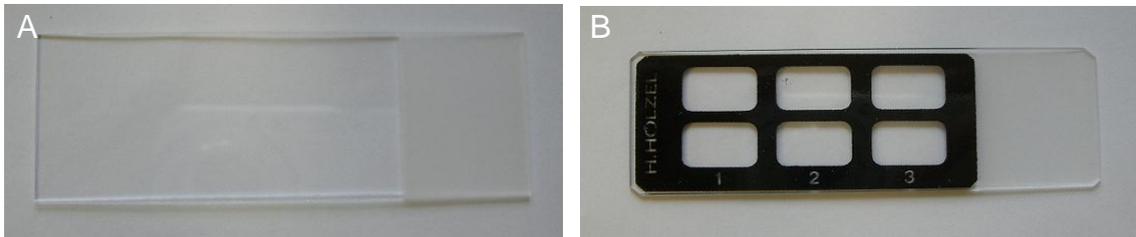
spritze überführt. Nach dem Transport ins Labor wurden die Sputum- und Serumproben innerhalb von 2 h weiterverarbeitet, um die Lagerungszeit möglichst kurz zu halten. Besonders im Bezug auf das Sputum war eine schnelle Verarbeitung wichtig, da die anaeroben Bakterien, die darin nachgewiesen werden sollten, sich für die Versuche in vitalem Zustand befinden mussten. Das ist auch der Grund, weshalb die Sputumproben nicht gefrierkonserviert werden konnten. Die Blutproben wurden 10 min bei 2.000 UpM zentrifugiert. Anschließend wurde der Serumüberstand abpipettiert und in ein steriles Röhrchen überführt. Dieses wurde mit Patientendaten und Abnahmedatum versehen und mit einem Schraubverschluss fest verschlossen. So wurden die Serumproben bei -20 °C gelagert, bis sie für die Versuche benötigt wurden.

## **2.7. Etablierung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mittels PNA-Sonde zum Nachweis von *P. intermedia***

*P. intermedia* sollte durch FISH mithilfe der synthetisch hergestellten PNA-Sonde „Prevotella Genus PNA“ nachgewiesen werden. Diese wurde von der amerikanischen Firma AdvanDx entwickelt. Bevor die Sonde für die Tests verwendet werden konnte, musste für die Herstellung der Präparate und den Hybridisierungsvorgang ein standardisiertes Protokoll erarbeitet werden.

Zunächst wurden, wie in 2.4.1. beschrieben, Flüssigkulturen des *P. intermedia*-Stammes ATCC 25611 hergestellt. Davon wurden je 10 µl auf ein Objektträgerfeld eines mit 99% Ethanol gewaschenen markierten Objektträgers gegeben. Es ist wichtig, markierte Objektträger für Immunfluoreszenztests anstelle von gewöhnlichen Objektträgern zu verwenden, da der Nachweis nur mit diesen gelingt. Auf den markierten Objektträgern befinden sich definierte Felder, auf die die Proben aufgetragen werden (Abb. 5). Dadurch müssen die Proben im Gegensatz zu herkömmlichen Objektträgern nicht mit einem Dako-Pen umrandet werden. Zum einen haftet die Markierung mit dem Dako-Pen nicht so gut

wie die der markierten Objektträger, außerdem werden durch sie unspezifische Fluoreszenz-Signale der PNA-Sonde hervorgerufen.



**Abb. 5:** Herkömmliche Objektträger (A) und markierte Objektträger für die PNA-FISH (B).

Nach dem Auftragen der Bakterien wurden die Präparate getrocknet und fixiert. Für die Fixierung standen zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Erstens die Methanolfixierung, bei der zusätzlich zur Bakteriensuspension 10  $\mu$ l Methanol auf jedes Objektträgerfeld gegeben und die Präparate anschließend getrocknet wurden. Zweitens die Hitzefixierung, bei der man die Bakteriensuspension auf den Objektträgern trocknen ließ, die Präparate dann mit Hilfe einer Pinzette dreimal kurz durch die Bunsenbrennerflamme zog und anschließend abkühlen ließ. In Bezug auf die Qualität der Präparate und das Fluoreszenzsignal der PNA-Sonde bestand zwischen beiden Fixierungsmethoden kein Unterschied. Da die Hitzefixierung einfacher und schneller durchzuführen ist, wurden die Präparate in den folgenden Versuchen auf diese Weise fixiert. Die fixierten Präparate konnten bis zur Durchführung der PNA-FISH lichtgeschützt mehrere Tage bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt werden. Anschließend wurden 10  $\mu$ l PNA-Sonde auf jedes Objektträgerfeld der fixierten Präparate pipettiert. Beim Vergleich verschiedener Sondenkonzentrationen zeigte sich, dass das Fluoreszenzsignal im Fall der mit Hybridisierungspuffer 1:100 und 1:10 verdünnten Sonde nicht zufriedenstellend stark bis kaum sichtbar war, während sowohl die einfach als auch die fünffach konzentriert eingesetzte Sonde deutliche Signale zeigte. Da diese bei beiden Konzentrationen vergleichbar stark waren, wurde für die weiteren Versuche die einfach konzentrierte PNA-Sonde verwendet. Beim Auftragen der Sonde war es besonders wichtig, dass keine Luftbläschen

entstanden, da manche Bereiche des Präparates sonst nicht ausreichend durch die Sonde überdeckt waren. Außerdem musste die Sonde in lichtgeschützter Umgebung aufgetragen werden, da direkter Lichteinfall die Fluoreszenz negativ beeinflusst. Ausreichender Lichtschutz war auch bei den folgenden Schritten unbedingt nötig. Nach dem Auftragen der PNA-Sonde wurden die Präparate 90 min bei 55°C im Brutschrank inkubiert, um die Stränge der Bakterien-DNA zu trennen und eine Bindung der PNA-Sonde zu ermöglichen. Für den Hybridisierungsvorgang gab es mehrere Vorgehensweisen, die miteinander verglichen wurden. Zum einen war es möglich, ein Deckglas auf jeden Objektträger zu legen und diesen dann in einer lichtundurchlässigen, vorgewärmten Metallbox, die als Hybridisierungskammer diente, in den Inkubator zu stellen. Die andere Möglichkeit stellte die Hybridisierung in einer feuchten Kammer ohne Deckglas dar. Dabei wurden keine Deckgläser aufgelegt, sondern jeder Objektträger zusammen mit einem in Hybridisierungspuffer getränkten Filterpapierstreifen in ein Falcon-Tube gegeben. Der Filterpapierstreifen musste sich dabei unter dem Objektträger befinden, um den Kontakt zur mit Bakteriensuspension und PNA-Sonde bestückten Oberfläche zu vermeiden. Auch die Falcon-Tubes wurden in die lichtundurchlässige, vorgewärmte Hybridisierungskammer gegeben und anschließend im Brutschrank inkubiert. Beide Methoden unterschieden sich in Bezug auf das Fluoreszenzsignal und die Qualität der Präparate nicht, weshalb daraufhin die materialsparendere Variante mit Deckglas zur Anwendung kam. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte ein Waschschrift, um ungebundene PNA-Sonde von den Objektträgern zu entfernen. Die Präparate wurden aus den Falcon-Tubes herausgenommen bzw. die Deckgläser mit einer Pinzette vorsichtig von den Präparaten entfernt und die Objektträger in 90 ml Waschlösung gestellt, die im Wasserbad auf 55°C erhitzt worden war. Diese Lösung wurde aus der oben genannten 60-fach konzentrierten Waschlösung durch eine 1:60 Verdünnung mit Ampuwa hergestellt. Die Präparate wurden 30 min bei 55°C in der Waschlösung belassen. Nach dem Herausnehmen wurde überschüssige Flüssigkeit vorsichtig abgesaugt und die Objektträger getrocknet. Zuletzt wurden die Präparate mit je einem Streifen Fluorescent Mounting Medium eingedeckt. Auch dabei mussten Bläschen unbedingt vermieden werden, da diese

beim Mikroskopieren stören und Bereiche des Präparats verdecken. Danach mussten die Präparate 15 min trocknen und wurden anschließend bis zur Untersuchung unter dem Fluoreszenzmikroskop in Präparatekästen bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Mikroskopiert wurde frühestens 24 h später mithilfe des Mikroskops Zeiss Axioplan. Für die Dokumentation wurden die Mikroskop-Kamera AxioCam und die Software Axiovision Rel. 4.6. verwendet.

Um sicherzugehen, dass die PNA-Sonde tatsächlich Bakterien bzw. deren DNA markiert, wurden die Präparate zusätzlich durch DAPI bzw. die PNA-Sonde „BacUni“ angefärbt. Auch bei diesen beiden Färbungen musste auf ausreichenden Lichtschutz geachtet werden, um die Fluoreszenz zu schonen. Bei Markierung mit „BacUni“ wurden direkt nach dem Auftragen der PNA-Sonde „Prevotella Genus PNA“ zusätzlich 5 µl „BacUni“-Lösung auf jedes Objektträgerfeld gegeben und der Hybridisierungsvorgang dann wie oben beschrieben durchgeführt. Für die DAPI-Färbung wurden nach dem Waschschrift 20 µl der DAPI-Stammlösung auf jedes Objektträgerfeld gegeben. Die Präparate wurden während der Einwirkzeit von 5 min auf eine Wippe gestellt, um die DAPI-Lösung gleichmäßig darauf zu verteilen. Anschließend wurden die Präparate dreimal mit Ampuwa abgespült um überschüssige DAPI-Lösung zu entfernen und die Flüssigkeit dann vorsichtig abgesaugt. Nachdem die Präparate getrocknet waren, wurde sie wie bereits oben beschrieben eingedeckt. Beide Färbungen wiesen zuverlässig die auf den Präparaten vorhandenen Bakterien nach und konnten daher gleichermaßen zur Kontrolle der PNA-Sonde „Prevotella Genus PNA“ benutzt werden. Da die DAPI-gefärbten Präparate leichter zu mikroskopieren waren und die Färbung weniger empfindlich ist als die Färbung mit „BacUni“, wurde für die Kontrollfärbung der Präparate hauptsächlich DAPI verwendet.

### **2.7.1. Spezifitätstestung der PNA-Sonde**

Um zu überprüfen, ob die PNA-Sonde *P. intermedia* spezifisch nachweist, wurden Versuche mit einigen repräsentativen Bakterienstämmen durchgeführt. *P.*

*aeruginosa* (PaO1), *S. aureus* (Sa 113) und *Actinomyces odontolyticus* (R 2) wurden getestet, da sie häufig in den Lungen und Sputen von CF-Patienten vorkommen (156). *S. aureus* besitzt zusätzlich durch das Protein A auf seiner Oberfläche eine hohe Affinität zu jeglicher Art von Sonden. Auch eine Anzahl verschiedener *Prevotella* spp. (2 Stämme *P. oralis* (20702 und AN 1243), *P. oris* (AN 1037), *P. paludivivens* (17968), 2 Isolate *P. baroniae* (651 und 1033), 2 Isolate *P. bivia* (1050 und 1071), 2 Isolate *P. buccae* (578 und 674), 2 Isolate *P. denticola* (583 und 608), 2 Isolate *P. disiens* (1059 und 1074), 2 Isolate *P. melaninogenica* (1029 und 1049), 2 Isolate *P. multiformis* (507 und 524), und 14 verschiedene Isolate *P. nigrescens* (582, 621, 634, 655, 658, 672, 1006, 1024, 1032, 1044, 1048, 1057, 13386 und R 138) wurden untersucht, da diese zur selben Gattung gehören wie *P. intermedia* und möglicherweise durch genomische Ähnlichkeiten ebenfalls durch die PNA-Sonde nachgewiesen werden. Außerdem wurden drei verschiedene *P. intermedia*-Stämme (1045, 20706 und ATCC 25611) getestet, um zu klären, ob die Sonde unterschiedliche Stämme derselben Bakterienspezies zuverlässig nachweist. Die Versuche wurden mit den genannten Bakterienstämmen nach allen oben beschriebenen Hybridisierungsmöglichkeiten je dreimal durchgeführt.

## **2.8. Etablierung des Nachweises von *P. intermedia* in Sputum durch FISH mittels PNA-Sonde**

### **2.8.1. Aufarbeitung des Sputums**

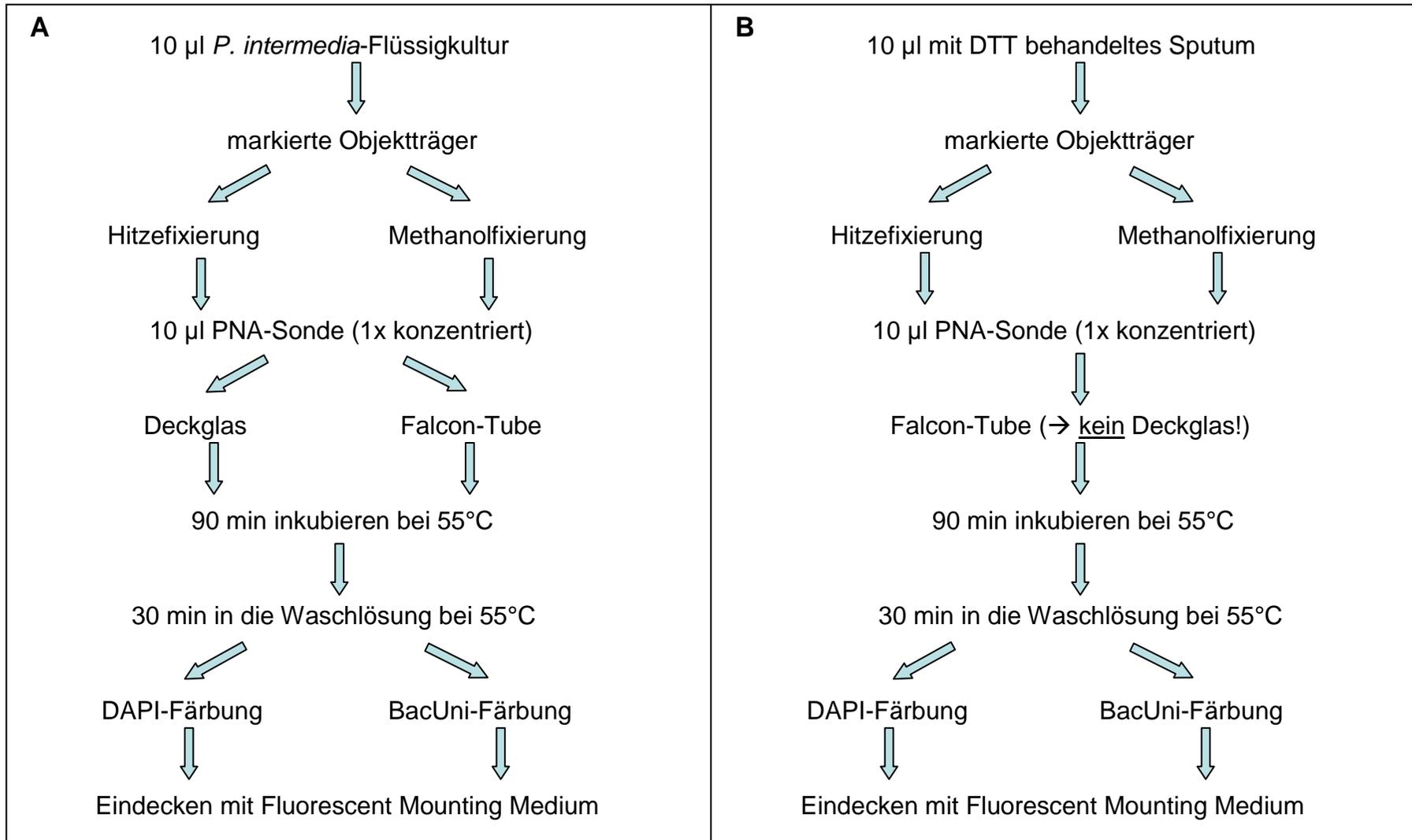
Die gewonnenen Sputumproben wurden teilweise nativ und teilweise vorbehandelt weiterverarbeitet. Die Vorbehandlung erfolgte mit Dithiothreitol-Lösung (DTT-Lösung) der Konzentration 1 mg/ml. DTT reduziert die Disulfidbrücken der im Sputum vorhandenen Proteine und macht das teilweise sehr zähe Sputum dadurch flüssiger. Es wurde immer doppelt so viel DTT-Lösung wie Sputum verwendet, also 2 ml DTT-Lösung zu 1 ml Sputum gegeben. Beide Komponenten wurden gut gemischt und anschließend 10 min bei Raumtemperatur inkubi-

biert. Auch währenddessen wurde mehrmals gemischt, um das zähe Sputum möglichst gut mit der DTT-Lösung zu vermischen. Anschließend wurde das Sputum-DTT-Gemisch nach dem Prinzip des „fraktionierten Zentrifugierens“ weiterbehandelt. Zunächst wurde das Gemisch 10 min bei 1.000 UpM zentrifugiert. In diesem Schritt sollten Zellen und andere gröbere Bestandteile aus dem Sputum entfernt werden, welche sich durch das Zentrifugieren als Pellet am Boden des Eppendorf-Cups absetzten. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Eppendorf-Cup überführt, das entstandene Pellet wurde verworfen. Der gewonnene Überstand wurde nun weitere 10 min bei 5.000 UpM zentrifugiert. Dadurch sollten die im Sputum enthaltenen Bakterien von der Flüssigkeit getrennt werden. Diesmal wurde der Überstand abgenommen und verworfen, während das abzentrifugierte Bakterienpellet in 1 ml PBS suspendiert wurde. Je 10 µl dieser Suspension konnten nun zur weiteren Verarbeitung auf die Felder der mit 99% Ethanol gewaschenen, markierten Objektträger aufgetragen werden. Die Fixierung wurde wie in 2.7. beschrieben durchgeführt.

### **2.8.2. Nachweis von *P. intermedia* in mit Bakterien gespicktem Sputum**

Um zu zeigen, dass die PNA-Sonde *P. intermedia* nicht nur in Reinkulturen, sondern auch direkt in Sputumproben nachweist, wurde zunächst mit *P. intermedia* gespicktes Sputum getestet. So wurde sichergestellt, dass das Bakterium auch tatsächlich darin vorhanden war. 2 ml einer *P. intermedia*-Flüssigkultur der Konzentrationen  $10^8$  KBE/ml wurden 5 min bei 5.000 UpM und 8°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 50 µl PBS aufgelöst. Diese Suspension wurde in 500 µl Sputum eingebracht. Die Hälfte des so gespickten Sputums wurde wie in 2.8.1. beschrieben mit DTT aufgearbeitet, der Rest unverändert verwendet. Je 10 µl des unbehandelten bzw. mit DTT behandelten Sputums wurden auf die Felder der markierten Objektträger aufgetragen und hitzefixiert. Die folgenden Schritte wurden wie beim Vorgehen mit Flüssigkulturen in 2.7. durchgeführt. Allerdings ist ausschließlich die Hybridisierung im Falcon-Tube ohne Deckglas möglich, welche bereits in 2.7. beschrieben wurde

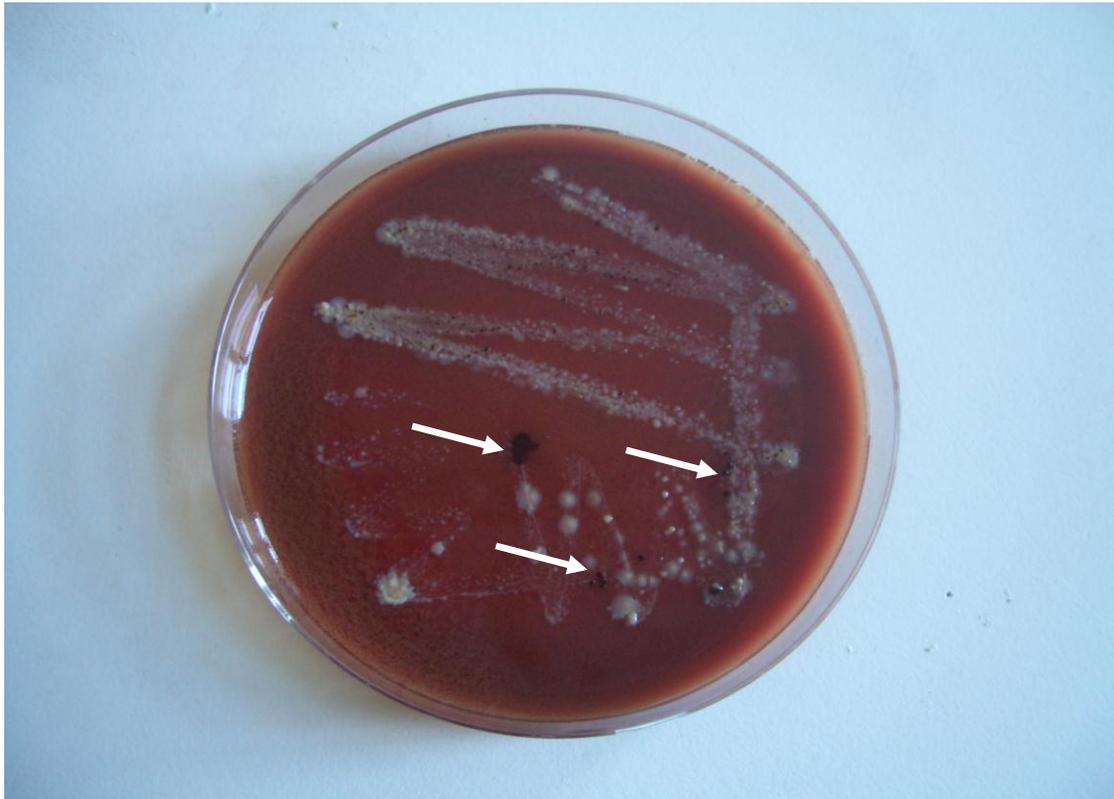
(Abb. 6). Bei Verwendung von Deckgläsern wird die aufgetragene Sputumprobe nach dem Waschschrift zusammen mit dem Deckglas vom Objektträger entfernt.



**Abb. 6:** Hybridisierung mit der PNA-Sonde „Prevotella Genus PNA“ beim Verwenden von Flüssigkulturen (A) und Sputum (B).

## 2.9. Isolierung von *P. intermedia* aus Sputum von CF-Patienten

Da die *P. intermedia*-Stämme aus den Sputen der CF-Patienten zusätzlich zur PNA-Sonde durch zwei weitere Methoden identifiziert und außerdem als Gefrierkulturen konserviert werden sollten, mussten Reinkulturen aus den Patientensputen isoliert werden. 100 µl jeder Sputumprobe wurden mit Hilfe eines Drigalski-Spatels auf einer BH-Agarplatte ausplattiert und unter anaeroben Verhältnissen 48 h bei 37°C inkubiert. Da *P. intermedia*-Stämme, wie bereits erwähnt, ein dunkelbraunes Pigment bilden, kann man sie mit bloßem Auge von nicht- oder anderweitig pigmentierten Bakterien unterscheiden (Abb. 7). Allerdings ähnelt der Phänotyp von Bakterien wie *P. nigrescens* oder *P. melaninogenica* dem von *P. intermedia* sehr stark, weshalb das Pigment nur eine grobe Eingrenzung erlaubt und das Bakterium mit weiteren Methoden abgeklärt werden muss. Die dunkelbraun pigmentierten Kolonien im Bakterienrasen wurden mit einer abgeflamnten Metallöse aufgepickt, mithilfe eines Drei-Ösen-Ausstrichs auf eine BH-Platte aufgebracht und unter anaeroben Verhältnissen 48 h bei 37°C inkubiert. Von den gewachsenen Kulturen wurden so lange Drei-Ösen-Ausstriche angefertigt, bis morphologisch Reinkulturen vorlagen. War dies nicht der Fall, wurden 200 µl Gentamicin-Lösung der Konzentration 10 mg/ml mit einem Drigalski-Spatel auf einer BH-Agarplatte ausplattiert und auf dieser ein weiterer Drei-Ösen-Ausstrich angefertigt. Das Aminoglykosid-Antibiotikum Gentamicin wirkt vor allem gegen gram-negative Erreger, unter anderem auch gegen *P. aeruginosa*. Dieser Keim ist häufig im Patientensputum vorhanden und wächst dann in den Drei-Ösen-Ausstrichen zusammen mit *P. intermedia* auf den BH-Platten. Da die Aufnahme von Aminoglykosiden in die Bakterienzelle sauerstoffabhängig ist, wirkt Gentamicin nicht gegen *P. intermedia*. Das Bakterium wird dadurch herausselektiert und wächst dann in Reinkultur auf der BH-Platte. Die so isolierten Bakterienstämme wurden erneut mit der PNA-Sonde und zusätzlich mit den im Folgenden beschriebenen Methoden getestet. Bei positivem Ergebnis wurde das Isolat wie in 2.5. beschrieben als Gefrierkultur konserviert.



**Abb. 7:** Pigmentierte *P. intermedia*-Kolonien (Pfeile), sowie nicht-pigmentierte Bakterien im Drei-Ösen-Ausstrich auf einer Brain-Heart-Agarplatte. Zunächst wurden 100 µl einer CF-Sputumprobe auf einer Brain-Heart-Agarplatte ausplattiert und unter anaeroben Bedingungen 48 h bei 37°C inkubiert. Der abgebildete Drei-Ösen-Ausstrich wurde von einer pigmentierten Kolonie aus dem gewachsenen Bakterienrasen durchgeführt.

#### **2.10. Identifizierung von *P. intermedia* mit Hilfe des Anaerobiertestsystems „Rapid ID 32 A“**

Zur Kontrolle der Ergebnisse der PNA-FISH wurde die Identifizierung durch das Anaerobiertestsystem „Rapid ID 32 A“ angewandt. Mit dem standardisierten, miniaturisierten Testsystem wurden die aus den Patientensputen isolierten Bakterienstämme anhand von 29 Enzymreaktionen identifiziert. Die Ergebnisse der einzelnen Reaktionen wurden mithilfe von Zahlen ausgedrückt und ergaben so einen für jedes Bakterium charakteristischen numerischen Code.

Um die Isolate durch „Rapid ID 32 A“ identifizieren zu können, musste es sich bei den zu testenden Bakterien definitiv um Anaerobier handeln, die in der Datenbasis des Herstellers enthalten sind. Der Test ist nur auf diese zugeschnitten und kann über andere Keime keine zuverlässigen Aussagen treffen. Außerdem mussten alle erforderlichen Reagenzien mit Ausnahme des Paraffinöls sowie die Teststreifen im Kühlschrank aufbewahrt werden. Für eine Identifizierung mittels „Rapid ID 32 A“ wurde das zu testende Bakterium zunächst wie in 2.9. beschrieben aus den Patientensputen isoliert und wie in 2.4.1. beschrieben auf BH-Agar kultiviert. Dies war erforderlich, da beim Verwenden von Mischkulturen ungültige Zahlencodes entstehen und die Bakterienstämme somit nicht korrekt identifiziert werden. Die Bakterienkulturen wurden direkt nach der Inkubationszeit von 48 h getestet, da die an die Enzymreaktionen gekoppelten Farbreaktionen bei Verwendung von jüngeren Kolonien deutlicher ausfallen und dadurch leichter abgelesen werden können. Außerdem ist es im Gegensatz zu älteren, trockeneren Kolonien einfacher, daraus eine Suspension herzustellen. Zunächst wurde eine Suspension des zu testenden Isolats hergestellt. Mithilfe eines sterilen Wattetupfers wurden einzelne Kolonien von der BH-Platte abgenommen und in eine Ampulle mit 2 ml API Suspension Medium eingebracht. Dies wurde so lange wiederholt, bis der Trübungsgrad der Suspension dem Trübungsstandard McFarland 4 entsprach. War dies der Fall, wurde die Suspension gut homogenisiert und umgehend weiterverarbeitet. Nachdem man einen „Rapid ID 32 A“-Teststreifen geöffnet und beschriftet hatte, wurden 55 µl der hergestellten Bakteriensuspension in jede der 32 Vertiefungen pipettiert. Die Vertiefung 1.0 (URE-Test) wurde zusätzlich mit zwei Tropfen Paraffinöl überschichtet. Anschließend wurde zum Schutz ein Deckel aufgelegt und der Teststreifen 4 h bei 37°C in aerober Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit mussten in einige der Vertiefungen des Streifens weitere Reagenzien gegeben werden, bevor das Ergebnis abgelesen werden konnte. In die Vertiefung 0.0 (NIT-Test) wurde je ein Tropfen NIT 1- und NIT 2-Reagenz sowie in die Vertiefung 0.1 (IND-Test) ein Tropfen JAMES-Reagenz eingebracht. In die Vertiefungen 0.2 bis 0.E (PAL- bis SerA-Test) wurde je ein Tropfen FB-Reagenz gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 5 min bei Raum-

temperatur konnte der Teststreifen abgelesen werden (Abb. 8). Der Ablesevorgang musste innerhalb von weiteren 5 min beendet sein, da sich die Farbreaktionen später noch weiter verändern und das Ablesen des korrekten Zahlencodes unmöglich machen. Die Enzymreaktionen wurden schließlich anhand der Ablesetabelle des Herstellers ausgewertet und in das Ergebnisblatt eingetragen.



**Abb. 8:** „Rapid ID 32 A“-Teststreifen mit abgelaufenen Enzym- und Farbreaktionen nach 4-stündiger aerober Inkubation bei 37°C.

Anschließend wurde der endgültige Zahlencode berechnet. Dazu wurden die Ergebnisse der Reaktionen in Dreiergruppen eingeteilt und erhielten je nach Position des Tests in der Dreiergruppe verschiedene Zahlenwerte. Bei positivem Test erhielt die Reaktion an erster Stelle der Dreiergruppe den Wert 1, die an zweiter Stelle den Wert 2 und die an dritter den Wert 4. Bei negativem Test war der Wert unabhängig von der Position immer 0. Die einzelnen Werte der Tests innerhalb der Dreiergruppen wurden addiert und ergaben so ein 10-stelliges Profil. Dieses konnte in das Computerprogramm „Apiweb“ eingegeben werden, welches den Zahlencode dem entsprechenden Bakterium zuordnete. Teilweise ermittelte das Programm mehrere Bakterienspezies. In diesem Fall wurde auch eine Prozentangabe angegeben, mit welcher Wahrscheinlichkeit es sich dabei um das richtige Ergebnis handelte. Zusätzlich erhielt man Vorschläge für weitere Tests, wie Gram-Färbung, Oxidase- und Katalase-Test, um das vorliegende Bakterium sicher identifizieren zu können.

## 2.11. Identifizierung von *P. intermedia* durch MALDI-TOF-MS

Zusätzlich wurde das Ergebnis der PNA-FISH durch MALDI-TOF-MS überprüft. Für die Messungen wurden wie in 2.4.1. beschrieben Plattenkulturen der *P. intermedia*-Isolate aus den Patientensputen hergestellt. Einzelne Kolonien wurden dann mit einer abgeflammt Öse aufgenommen und auf ein Feld eines FlexiMass-Metallträgers (Abb. 9) aufgebracht. Auf jedes Feld wurde zusätzlich 1 µl α-Cyano-4-Hydroxymizinsäure als Matrix gegeben. Anschließend wurden Probenmaterial und Matrix mithilfe der Öse auf dem Träger gut vermischt. Um die Ergebnisse durch Mehrfachbestimmungen abzusichern, wurden anstelle von einem gleich vier Felder des Trägermaterials mit Proben desselben Bakterienstammes bestückt. Die aufgetragenen Kolonien wurden dann zusammen mit der Matrix bei Zimmertemperatur getrocknet, wodurch das Gemisch auskristallisierte. Dieser Vorgang durfte auf keinen Fall durch Erhitzen beschleunigt werden, da sich dies negativ auf die Qualität der Präparate auswirkt. Die getrockneten, auskristallisierten Präparate konnten lichtgeschützt bei Raumtemperatur einige Tage bis zur Messung aufbewahrt werden.



**Abb. 9:** FlexiMass-Metallträger für MALDI-TOF-MS-Messungen. Probenmaterial und Matrix werden auf die markierten Felder des Trägermaterials aufgetragen und kokristallisiert (aus: <http://www.shimadzu.eu>).

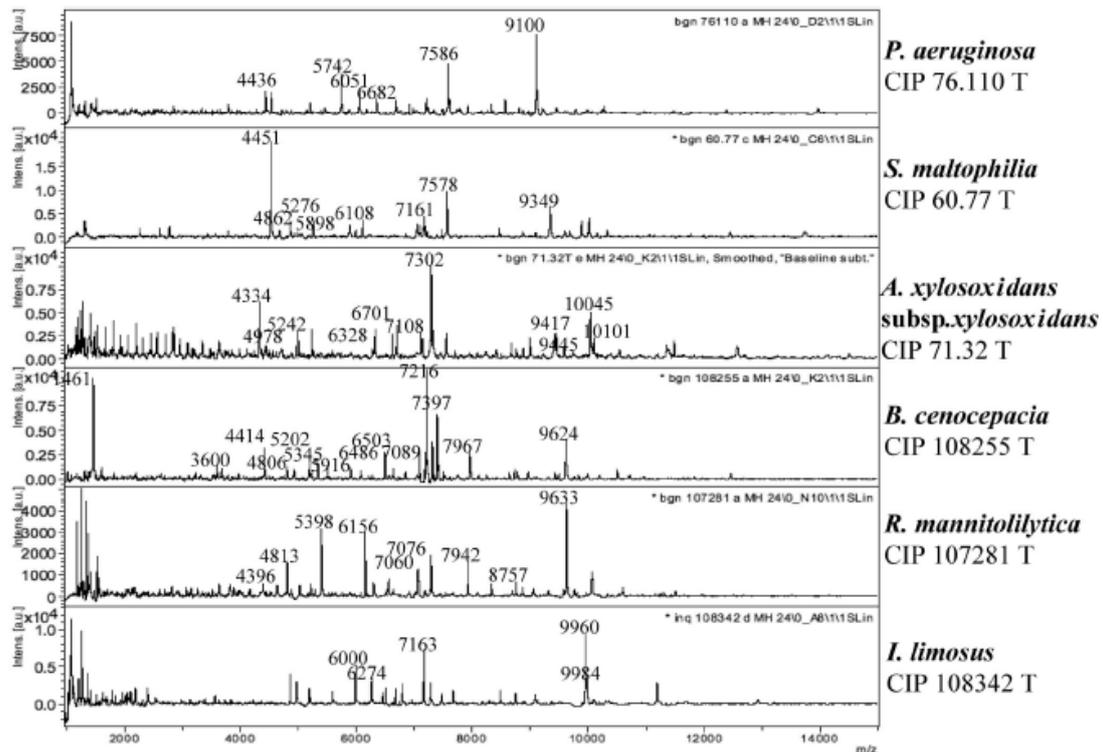
Für Qualität und Vergleichbarkeit des Ergebnisses war es wichtig, beim Anfertigen der Präparate standardisiert vorzugehen. Entscheidend waren unter anderem die Qualität des zu testenden Materials, die Auswahl der Matrixsubstanz und das Verhältnis von Analyt zu Matrix. Da die Testergebnisse deutlicher ausfallen und das Material leichter mit der Matrix homogenisierbar ist, wurden die Bakterienkulturen direkt nach der Inkubationszeit von 48 h verwendet.



**Abb. 10:** Massenspektrometer AXIMA Assurance. Der rote Pfeil markiert die Halterung für die Metallträger (aus: <http://www.shimadzu.eu>).

Für den Messvorgang wurden die Präparate in die dafür vorgesehene Halterung im Massenspektrometer gestellt (Abb. 10). Die anschließende Messung lief automatisiert ab. Nach mehrmaligem Laserbeschuss des Probenmaterials auf den Metallträgern erfolgte die Detektion der erzeugten Ionen. Daraus ergab sich ein Massenspektrum mit charakteristischen Peaks (Abb. 11), welches mithilfe der SARAMIS-Software gegen ein Superspektrum abgeglichen wurde. Dieses Superspektrum war zuvor aus 27 sequenzierten *P. intermedia*-Stämmen erstellt worden und diente als Referenz für die Identifizierung der zu testenden Bakterienstämme. Bei mangelnder Übereinstimmung mit dem *P. intermedia*-Superspektrum wurde der betreffende Stamm mit anderen Referenzspektren,

wie z. B. einem *P. nigrescens*- oder *P. melaninogenica*-Superspektrum abgeglichen. Die MALDI-TOF-Messungen der Isolate aus den Patientensputen sowie der Abgleich mit den von ihm erstellten Superspektren wurden freundlicherweise von Peter Braitmaier durchgeführt.



**Abb. 11:** Beispiel von MALDI-TOF-Spektren 6 verschiedener Bakterienstämme (aus: Degand *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients (27)).

## 2.12. Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen *P. intermedia* in CF-Seren mittels ELISA

### 2.12.1. Reinigung des *P. intermedia*-Antigens

Zur Gewinnung von *P. intermedia*-Antigen für den ELISA wurden, wie in 2.4.1. beschrieben, *P. intermedia*-Plattenkulturen auf BH-Agar hergestellt. Die Kulturen wurden abgeerntet und zum Zellaufschluss in der French Press bearbeitet.

Die dabei entstandene Suspension wurde 15 min bei 4°C und 1500 g zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand 1 h bei 4°C und 40000 UpM erneut zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Pellet in einer Waschlösung (125 mM Tris HCL, 18,8 g N-Lauroylsarcosinat, pH 7,6) gelöst. Die Suspension wurde anschließend 10 min bei 4°C und 5000 UpM zentrifugiert, das Pellet verworfen und der Überstand 1 h bei 22°C und 40000 UpM zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in Aqua dest. aufgelöst und anschließend 10 min bei 4°C und 5000 UpM zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

### **2.12.2. Etablierung des ELISA zur Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen *P. intermedia***

Die eingefrorenen Patientenserum wurden für den ELISA-Test zunächst aufgetaut. Dann wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit je 100 µl *P. intermedia*-Antigen der Konzentration 10 µg/ml, das wie in 2.12.1. beschrieben aufgereinigt worden war, pro Näpfchen beschichtet. Die Verdünnung auf die gewünschte Antigen-Konzentration erfolgte mit einem Carbonatpuffer mit pH-Wert 9,6. Die Platte wurde bei 4°C über Nacht inkubiert und im ELISA-Wascher dreimal mit PBS-Tween 0,05% gewaschen. Dadurch wurden Antigene von der Platte entfernt, die nicht an den Boden der Näpfchen gebunden hatten und in den nächsten Schritten möglicherweise zu unspezifischen Bindungen geführt hätten. Als nächstes wurden 100 µl einer Lösung von 1% BSA in PBS-Tween 0,05% und Fc-Fragment von humanen IgG-Antikörpern der Konzentration 17 µg/ml in jedes Näpfchen pipettiert und die Platte wieder bei 4°C über Nacht inkubiert. Das BSA wurde verwendet, um die frei gebliebenen Bindungsstellen am Boden der Näpfchen abzusättigen und so unspezifische Bindungen zu verhindern. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte im ELISA-Wascher dreimal in Folge mit PBS-Tween 0,05% gewaschen. Durch den Waschvorgang wurde überschüssiges BSA entfernt. Auf die so vorbereitete Platte konnten nun das Patientense-

rum aufgetragen werden. Dazu wurden die Serumproben mit einer Lösung von 1% BSA in PBS-Tween 0,05% in den Verhältnissen 1:10, 1:100, 1:1.000 und 1:10.000 verdünnt. Von jeder dieser Verdünnungsstufen wurden 100 µl in ein Nöpfchen pipettiert. Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, zusätzlich wurden für die spätere Interpretation der Ergebnisse eine Leerwertbestimmung und eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Leerwert diente die Lösung zur Absättigung freier Bindungsstellen (1% BSA in PBS-Tween 0,05%). Dadurch konnte beurteilt werden, ob durch den Puffer selbst unspezifische Bindungen oder Reaktionen hervorgerufen werden, die gegebenenfalls bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen. Als Negativkontrolle wurde ein Serumpool bestehend aus Seren von mehreren CF-Patienten im Kindesalter verwendet, die nicht mit *P. aeruginosa* infiziert waren. Obwohl auch bei diesem Patientenkollektiv eine Infektion mit *P. intermedia* und die damit verbundene Antikörperbildung nicht auszuschließen war, wurde sie dennoch als relativ unwahrscheinlich betrachtet. Dieser Pool wurde deshalb als Referenz für die negativen Patientenserum mitgeführt. Da man eine Positivkontrolle in diesem Fall nicht käuflich erwerben konnte und in unserem Labor auch keine vorlag, wurde eine solche nicht mitgeführt. Die mit den verschiedenen Serumverdünnungen, Leerwert und Negativkontrolle bestückte Platte wurde bei 4°C über Nacht inkubiert und anschließend dreimal mit PBS-Tween 0,05% gewaschen. Dadurch wurden nicht gebundene Serum-Antikörper entfernt, die sonst möglicherweise in den folgenden Schritten für unspezifische Bindungen gesorgt hätten. Als Nächstes wurden mit Horseradish-Peroxidase konjugierte Rabbit-Anti-Human-Antikörper gegen IgG-Antikörper im Verhältnis 1:1.500 mit der Lösung aus 1% BSA in PBS-Tween 0,05% verdünnt und 100 µl davon in jedes Nöpfchen gegeben. Diese Antikörper fungierten als Detektionsantikörper der IgG-Antikörper in den Patientenserum. Durch Bindung an die Fc-Fragmente der IgG-Antikörper aus dem Patientenserum wurden diese markiert. Die so beschichtete Platte wurde 2 h bei 37°C inkubiert, es folgten drei Waschgänge mit PBS-Tween 0,05% im ELISA-Wascher. Dadurch wurden überschüssige Detektionsantikörper entfernt. Danach wurden 100 µl des Substrats 3,3',5'5-Tetramethylbenzidine in jedes Nöpfchen pipettiert und die Platte

20 min im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Der Lichtschutz war aufgrund der Lichtempfindlichkeit von 3,3',5'5-Tetramethylbenzidine notwendig, da die unten beschriebene Farbreaktion sonst nicht zuverlässig funktioniert hätte. Durch Bindung an die im vorigen Schritt gebundenen Detektionsantikörper wurde das Substrat hydrolysiert, wobei ein blaues Reaktionsprodukt entstand. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion mit je 100 µl 0,2 M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pro Näpfchen angehalten, wodurch sich das blaue Reaktionsprodukt gelb verfärbte. Ohne Reaktionsstopp wäre das Substrat weiter umgesetzt worden und hätte nicht mehr den Zustand nach genau 20 min Inkubation dargestellt. Dadurch wären die Ergebnisse nicht nur verfälscht worden, sondern die Ergebnisse der verschiedenen Messungen wären zusätzlich nicht vergleichbar gewesen. Da die Farbentwicklung beim Reaktionsstopp direkt proportional zur gesuchten Antikörperkonzentration ist, konnte sie photometrisch bestimmt werden. Mit Hilfe des ELISA-Readers wurde eine Extinktionsmessung bei 450 nm Wellenlänge durchgeführt, um die Antikörper im Patientenserum zu quantifizieren. Mit Hilfe des ELISA-Computerprogramms TECAN konnten zusätzlich dazu die Titer-Konzentrationen angegeben werden.

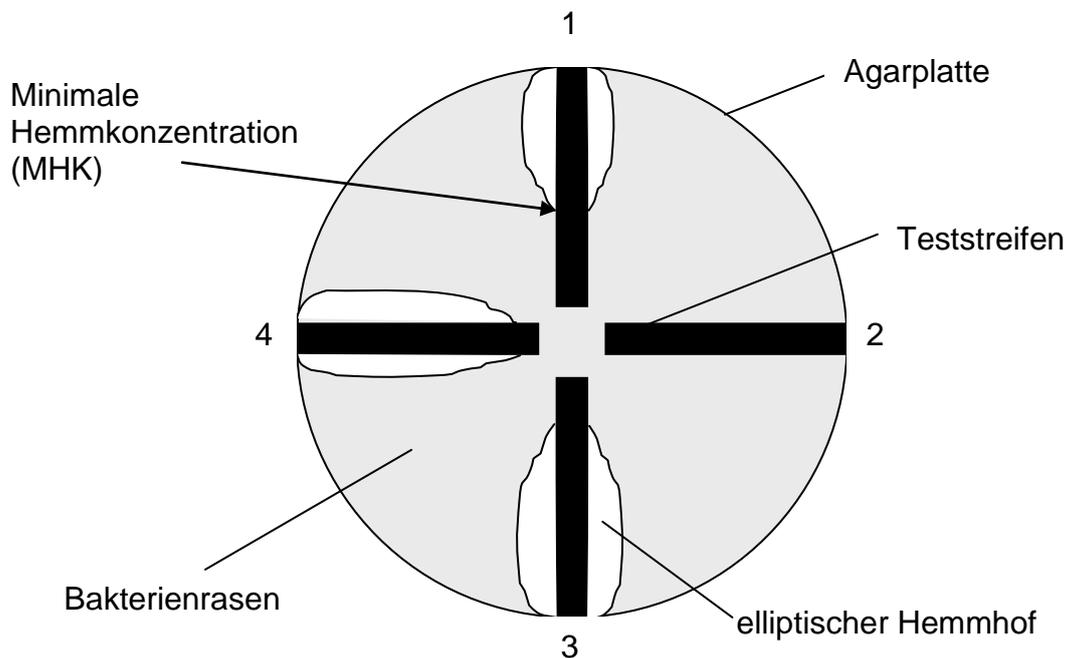
### **2.13. Resistenzbestimmung der isolierten Patientenstämme mittels Ellipsometertest (E-Test)**

Die *P. intermedia*-Isolate aus den Patientensputen wurden mit Hilfe eines Ellipsometer-Tests auf Antibiotikaresistenzen überprüft. Der Test ist relativ einfach und schnell durchführbar. Bei sachgemäßer Anwendung ist er sehr genau und erkennt auch niedrige Resistenzlevel zuverlässig. Für die Versuche werden Antibiotika-beschichtete Teststreifen benötigt, die man käuflich erwerben kann. Auf einer Seite der verwendeten E-Test-Kunststoffstreifen ist das zu testende Antibiotikum in 15 Konzentrationen, die jeweils um den Faktor 2 ansteigen, aufgebracht. Für die meisten Antibiotika liegen diese Konzentrationen in einem Bereich von 0,016 - 256 µg/ml, wobei der Bereich bei manchen Substanzen etwas nach oben oder unten abweicht. Die jeweilige Antibiotikakonzentration ist auf

der anderen Seite des Streifens zum späteren Ablesen der minimalen Hemmkonzentration (MHK) aufgedruckt. Bei der MHK handelt es sich um die kleinstmögliche Konzentration des jeweiligen Antibiotikums, bei der das Bakterium im Wachstum gehemmt bzw. abgetötet wird.

Für den Test wurden die *P. intermedia*-Stämme zunächst wie in 2.9. beschrieben aus den CF-Sputen isoliert. Von der Plattenkultur wurden mit einer abgeflamnten Metallöse so lange einzelne Kolonien entnommen und in 0,85%iger Kochsalzlösung oder Anaerobier-Flüssigmedium suspendiert, bis der Trübungsgrad der Suspension einem Trübungsstandard McFarland 1 entsprach. In diese Suspension wurde nun ein steriler Wattetupfer getaucht und mit diesem in Drehungen über die BH-Agarplatte gestrichen. Unter Entnahme neuen Materials wurde dieser Vorgang zweimal nach Drehung der Platte um jeweils 90° wiederholt. Die so beimpfte Platte wurde anschließend bei Raumtemperatur 15 min getrocknet. Währenddessen wurden die mit den unterschiedlichen Antibiotika beschichteten Teststreifen aus dem Kühlschrank genommen und einzeln auf den Rand einer Petrischale gelegt, da sie für die Versuche Raumtemperatur haben mussten. Für jedes isolierte und als *P. intermedia* identifizierte Bakterium wurden die Substanzen Piperacillin/Tazobactam, Ampicillin, Clindamycin, Ceftazidim, Meropenem und Metronidazol getestet. Nachdem die beimpfte BH-Platte getrocknet war, wurden die Teststreifen mithilfe einer Pinzette mit dem aufgetragenen Antibiotikagradienten nach unten und der aufgedruckten MHK-Skala nach oben vorsichtig auf die Agarplatte aufgelegt. Dabei war es wichtig, den Streifen nach Kontakt mit der Agarplatte nicht mehr zu verschieben, da die aufgedruckten MHK-Werte sonst nicht mehr den Antibiotikakonzentrationen an den entsprechenden Stellen auf dem Agar entsprochen hätten. Auf eine Platte konnten mehrere Teststreifen mit verschiedenen Antibiotika aufgelegt werden, allerdings mussten sie ausreichenden Abstand zueinander haben (Abb. 12). Anderenfalls hätten sich die Hemmhöfe möglicherweise überschritten, was ein korrektes Ablesen des Tests erschwert oder unmöglich gemacht hätte. Nach dem Auflegen der Streifen diffundierte der Wirkstoff innerhalb kurzer Zeit von den Teststreifen in den Agar und erzeugte dort stabile Antibiotikakonzentrationen.

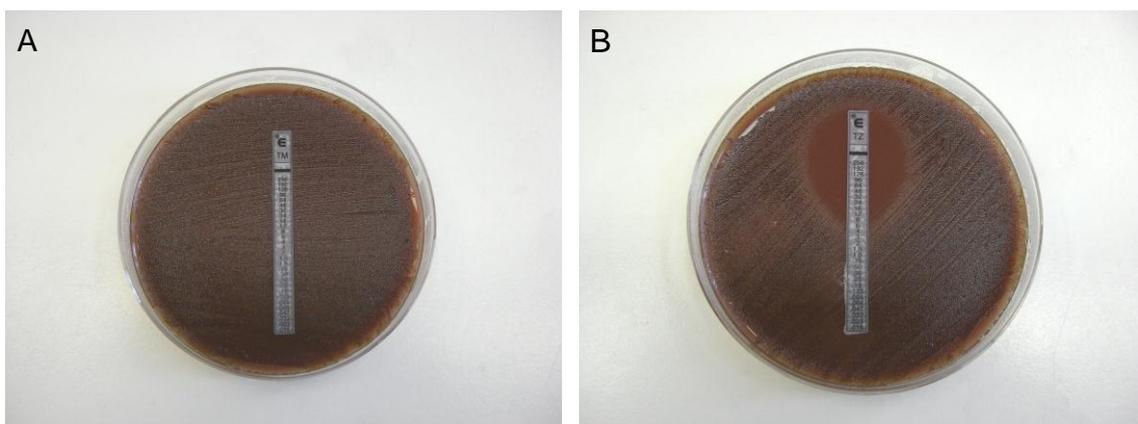
nen, die dann auf die aufgetragenen Bakterien einwirkten. Die so bestückte Platte wurde anschließend unter anaeroben Bedingungen 48 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Waren nach Ablauf dieser Zeit ausreichendes Wachstum und ein deutlicher Hemmhof erkennbar, konnte der Test abgelesen werden (Abb. 12). Das Neigen und Kippen der Platte zur Seite war dabei hilfreich, um auch sehr kleine Kolonien nicht zu übersehen.



**Abb. 12:** Schema des Ellipsometer-Tests. Teststreifen mit unterschiedlich großen Hemmhöfen (Streifen 1, 3 und 4) sowie ohne Hemmhof (Streifen 2) im Bakterienrasen.

Bei sichtbarem Hemmhof waren in diesem Bereich aufgrund der Antibiotikawirkung keine Bakterien gewachsen. Der Schnittpunkt der Hemmhofellipse mit der MHK-Skala des Teststreifens entsprach der kleinstmöglichen Konzentration, bei der das Antibiotikum auf das jeweilige Bakterium gewirkt hatte (Abb. 13). Allerdings konnte dies nicht mit einer Sensibilität des Bakteriums gegenüber dem entsprechenden Antibiotikum gleichgesetzt werden. In manchen Fällen wird das Bakterium zwar von bestimmten Konzentrationen der betreffenden Substanz

abgetötet oder im Wachstum gehemmt, allerdings sind diese viel zu hoch, um Patienten damit zu behandeln. Für jedes zum E-Test zugelassene Bakterium, gibt es Tabellen, in denen die Grenzwerte der jeweiligen Antibiotika nachgeschlagen wurden. Erst dann konnten Aussagen darüber getroffen werden, ob das Bakterium sensibel, mäßiggradig sensibel oder resistent gegenüber dem entsprechenden Antibiotikum ist. War kein Hemmhof zu sehen, hatte das Antibiotikum keine Wirkung gezeigt, das betreffende Bakterium war in diesem Fall resistent dagegen (Abb. 13). Beim Ablesen musste beachtet werden, dass bakterizide Antibiotika, also solche, die Bakterien abtöten, sich durch eine komplette Hemmung auszeichnen und die MHK wie bereits erwähnt am Schnittpunkt des Hemmhofs mit der MHK-Skala abgelesen wird. Für bakteriostatische Antibiotika, die lediglich das Wachstum der Bakterien unterbinden, musste die MHK bei 80%iger Inhibition abgelesen werden.



**Abb. 13:** Ergebnis des Ellipsometer-Tests eines *P. intermedia*-Isolates. (A): Dichter Bakterienrasen ohne Hemmhof. Das Bakterium ist wie alle Anaerobier resistent gegen Tobramycin (TM). (B): Deutlicher elliptischer Hemmhof bei der Testung von Ceftazidim (TZ).

Verfälschungen der Ergebnisse können durch verschiedenste Faktoren hervorgerufen werden. Zum einen mussten unbedingt Reinkulturen verwendet werden, da man beim Testen von Mischkulturen falsche oder uneindeutige Ergebnisse erhält. Außerdem muss ein ausreichendes Bakterienwachstum gegeben sein, da man bei zu geringer Keimeinsaat möglicherweise zu niedrige minimale

Hemmkonzentrationen erhält. Zusätzlich ist auf die Zusammensetzung des Nährmediums zu achten, da auch dieses die Wirkung der Antibiotika sowie das Wachstum der Bakterien beeinflusst. Zur Überprüfung der Testqualität wurde daher ein repräsentativer Bakterienstamm, in diesem Fall *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), auf demselben Nährmedium mitgetestet. Auch beim Auflegen der Teststreifen können Fehler passieren, die sich negativ auf das Ergebnis auswirken. Werden die Streifen nach dem Auflegen auf die Agarplatte noch bewegt, entsprechen die auf der gegenüberliegenden Seite aufgedruckten Antibiotikakonzentrationen nicht mehr der tatsächlichen Wirkstoffkonzentration auf der Agarplatte und die MHK wird trotz korrekten Ablesens zu hoch oder zu niedrig bestimmt. Außerdem ist es wichtig, die E-Tests bei 4°C im Kühlschrank zu lagern und vor der Anwendung auf Raumtemperatur zu erwärmen. Bei nicht sachgemäßer Lagerung kann der Wirkstoff auf den Streifen Schaden nehmen, was dann zu falschen Ergebnissen führt.

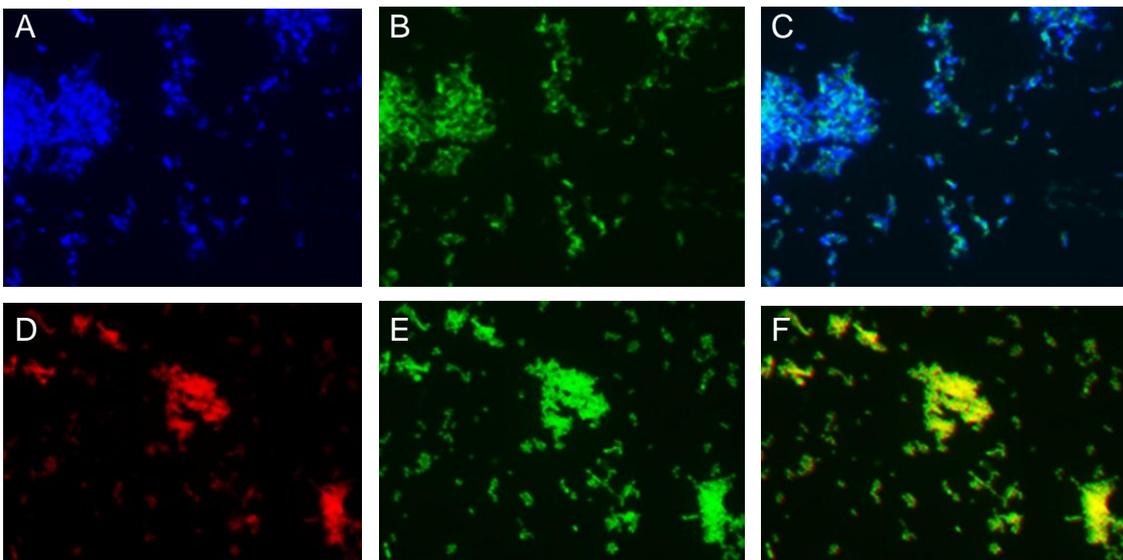
#### **2.14. Statistische Analyse**

Die durchgeführten Experimente wurden zur Bestätigung mindestens dreimal wiederholt. Wenn möglich, wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Zur Bestimmung des Signifikanzniveaus wurde der Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Als signifikant wurden p-Werte < 0,05 bezeichnet.

### 3. Ergebnisse

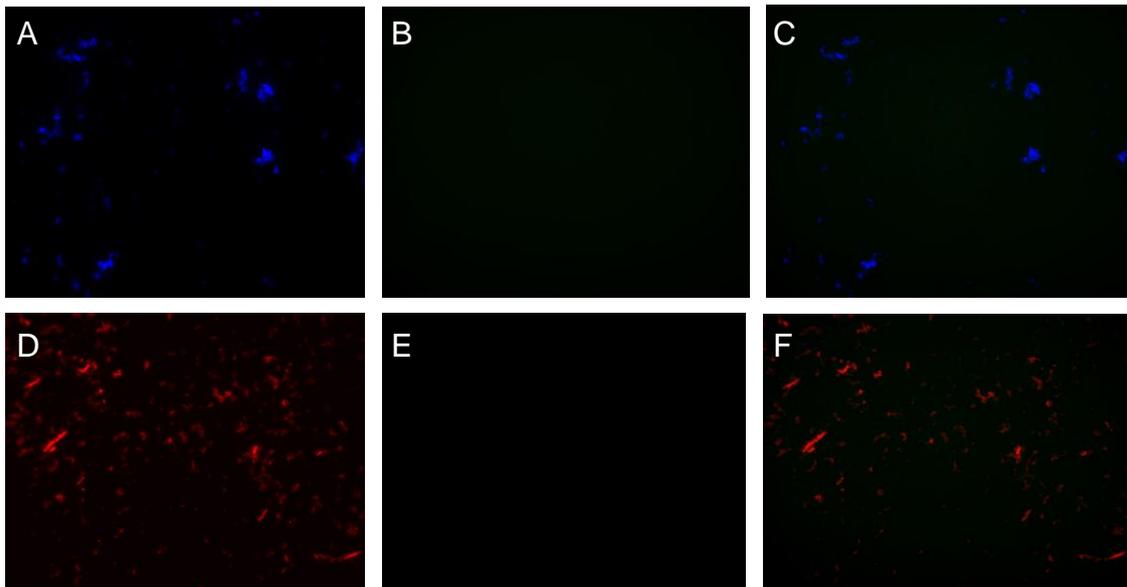
#### 3.1. Nachweis von *P. intermedia* durch die PNA-Sonde „Prevotella Genus PNA“

Um zu überprüfen, ob die PNA-Sonde „Prevotella Genus PNA“ *P. intermedia* zuverlässig nachweist, wurden mehrere *P. intermedia*-Stämme damit getestet. Die Versuche wurden nach dem in 2.9. beschriebenen, neu etablierten Schema je drei Mal pro Stamm durchgeführt. Positive Proben waren unter dem Fluoreszenz-Mikroskop durch ein grünes Fluoreszenzsignal erkennbar. War beim Mikroskopieren ein deutliches Signal zu erkennen, das sich zusätzlich mit der DAPI- bzw. BacUni-Kontrollfärbung deckte, wurde das Ergebnis als positiv beschrieben (Abb. 14). Bei sehr schwachem, nicht mit der Kontrollfärbung deckungsgleichem oder fehlendem Fluoreszenzsignal wurde das Ergebnis als negativ gewertet (Abb. 15). Die drei getesteten *P. intermedia*-Stämme (1045, 20706 und ATCC 25611) zeigten in der Fluoreszenz-Mikroskopie positive Ergebnisse und wurden somit durch „Prevotella Genus PNA“ detektiert (Abb. 13, Tab. 1).



**Abb. 14:** *P. intermedia* wird durch die PNA-Sonde „Prevotella Genus PNA“ nachgewiesen. Reinkulturen von *P. intermedia* (ATCC 25611) wurden mit der PNA-Sonde hybridisiert und unter dem Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. (A)

zeigt die Bakterien in der DAPI-Färbung, in (B) werden sie durch das positive Signal der PNA-Sonde „Prevotella Genus PNA“ markiert. Durch die Überlagerung beider Bilder (C) wird deutlich, dass sowohl durch DAPI als auch durch die PNA-Sonde dieselben Strukturen nachgewiesen werden. Auch die Bilder der Bakterien in der BacUni- (D) und der „Prevotella Genus PNA“-Färbung (E) sind bei Überlagerung (F) genau deckungsgleich.



**Abb. 15:** *P. oralis* wird durch die PNA-Sonde „Prevotella Genus PNA“ nicht detektiert. Reinkulturen von *P. oralis* (20702) wurden mit der PNA-Sonde hybridisiert und unter dem Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. (A) stellt die Bakterien in der DAPI-Färbung dar. In (B) sind keine Bakterien sichtbar, das Signal der PNA-Sonde „Prevotella Genus PNA“ ist negativ. (C) ist die Überlagerung von (A) und (B). (D) zeigt die Bakterien in der BacUni-Färbung. Bei Färbung mit „Prevotella Genus PNA“ sind keine Bakterien sichtbar (E). (F) ist die Überlagerung von (D) und (E).

### 3.1.1. Spezifität der PNA-Sonde „Prevotella Genus PNA“

Da überprüft werden sollte, ob „Prevotella Genus PNA“ *P. intermedia* spezifisch nachweist, wurden Präparate von 36 weiteren Bakterienstämmen angefertigt und nach dem in 2.9. beschriebenen Schema je drei Mal getestet. Die Ergebnisse wurden anhand der in 3.1. beschriebenen Kriterien als positiv oder negativ beurteilt. Bei der Auswertung der Präparate unter dem Fluoreszenz-Mikroskop wurden alle 14 getesteten *P. nigrescens*-Stämme durch „Prevotella

Genus PNA“ detektiert (Tab. 1). Für die übrigen Bakterienstämme war bei positiver Kontrollfärbung kein Fluoreszenzsignal sichtbar, sie wurden somit nicht durch die Sonde nachgewiesen (Tab. 1).

**Tab. 1:** Der Nachweis von *P. intermedia* durch die PNA-Sonde „Prevotella Genus PNA“ ist nicht spezifisch.

Bakterienstamm	Prevotella Genus PNA
<i>Actinomyces odontolyticus</i> (R 2)	negativ
<i>Bacteroides fragilis</i> (ATCC 25285)	negativ
<i>Prevotella baroniae</i> (651)	negativ
<i>Prevotella baroniae</i> (1033)	negativ
<i>Prevotella bivia</i> (1050)	negativ
<i>Prevotella bivia</i> (1071)	negativ
<i>Prevotella buccae</i> (578)	negativ
<i>Prevotella buccae</i> (674)	negativ
<i>Prevotella denticola</i> (583)	negativ
<i>Prevotella denticola</i> (608)	negativ
<i>Prevotella disiens</i> (1059)	negativ
<i>Prevotella disiens</i> (1074)	negativ
<i>Prevotella intermedia</i> (1045)	positiv
<i>Prevotella intermedia</i> (20706)	positiv
<i>Prevotella intermedia</i> (ATCC 25611)	positiv
<i>Prevotella melaninogenica</i> (1029)	negativ
<i>Prevotella melaninogenica</i> (1049)	negativ
<i>Prevotella multiformis</i> (507)	negativ
<i>Prevotella multiformis</i> (524)	negativ
<i>Prevotella nigrescens</i> (582)	positiv
<i>Prevotella nigrescens</i> (621)	positiv
<i>Prevotella nigrescens</i> (634)	positiv
<i>Prevotella nigrescens</i> (655)	positiv
<i>Prevotella nigrescens</i> (658)	positiv

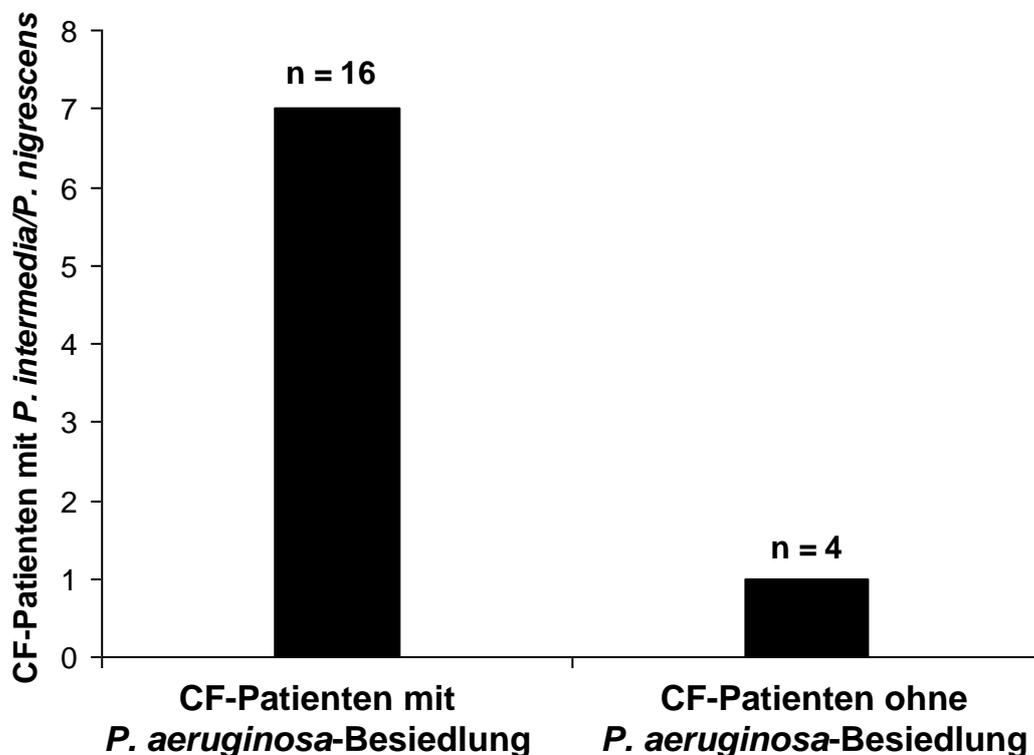
<i>Prevotella nigrescens</i> (672)	positiv
<i>Prevotella nigrescens</i> (1006)	positiv
<i>Prevotella nigrescens</i> (1024)	positiv
<i>Prevotella nigrescens</i> (1032)	positiv
<i>Prevotella nigrescens</i> (1044)	positiv
<i>Prevotella nigrescens</i> (1048)	positiv
<i>Prevotella nigrescens</i> (1057)	positiv
<i>Prevotella nigrescens</i> (13386)	positiv
<i>Prevotella nigrescens</i> (R 138)	positiv
<i>Prevotella oralis</i> (20702)	negativ
<i>Prevotella oralis</i> (AN 1243)	negativ
<i>Prevotella oris</i> (AN 1037)	negativ
<i>Prevotella paludivivens</i> (17968)	negativ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pao-1)	negativ
<i>Staphylococcus aureus</i> (Sa 113)	negativ

---

### 3.2. Nachweis von *P. intermedia* mittels „Prevotella Genus PNA“ im Sputum von CF-Patienten

Die Sputumproben der CF-Patienten wurden mithilfe von „Prevotella Genus PNA“ auf das Vorkommen von *P. intermedia* untersucht. Da die Sonde das Bakterium, wie bereits in 3.1.1. erwähnt, nicht spezifisch nachweist, konnte durch diese Methode nur eine Eingrenzung auf *P. intermedia* bzw. *P. nigrescens* vorgenommen werden. Insgesamt wurden 20 Sputumproben untersucht, da nur von 16 der 20 CF-Patienten mit pulmonaler *P. aeruginosa*-Besiedlung und von 4 der 13 CF-Patienten ohne pulmonale *P. aeruginosa*-Besiedlung eine Sputumprobe gewonnen werden konnte (Tab. 2). In 8 der 20 getesteten Sputumproben zeigte die PNA-Sonde positive Ergebnisse. Dabei handelte es sich um 7 Sputumproben von CF-Patienten mit pulmonaler *P. aeruginosa*-Besiedlung und um 1 Sputumprobe eines Patienten ohne pulmonale *P. aeruginosa*-Besiedlung (Tab. 2, Abb. 16). Somit wurden durch „Prevotella

Genus PNA“ in insgesamt 40% der Patientensputen *P. intermedia* bzw. *P. nigrescens* detektiert.



**Abb. 16:** Nachweis von *P. intermedia*/*P. nigrescens* in Sputumproben von CF-Patienten mittels PNA-FISH. 16 Sputumproben von CF-Patienten mit *P. aeruginosa*-Besiedlung und 4 Sputumproben von CF-Patienten ohne *P. aeruginosa*-Besiedlung wurden mit der PNA-Sonde „Prevotella Genus PNA“ hybridisiert und unter dem Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. In 8 Sputumproben wurde *P. intermedia*/*P. nigrescens* durch die PNA-Sonde nachgewiesen. 7 der positiven Proben stammten von CF-Patienten mit *P. aeruginosa*-Besiedlung.

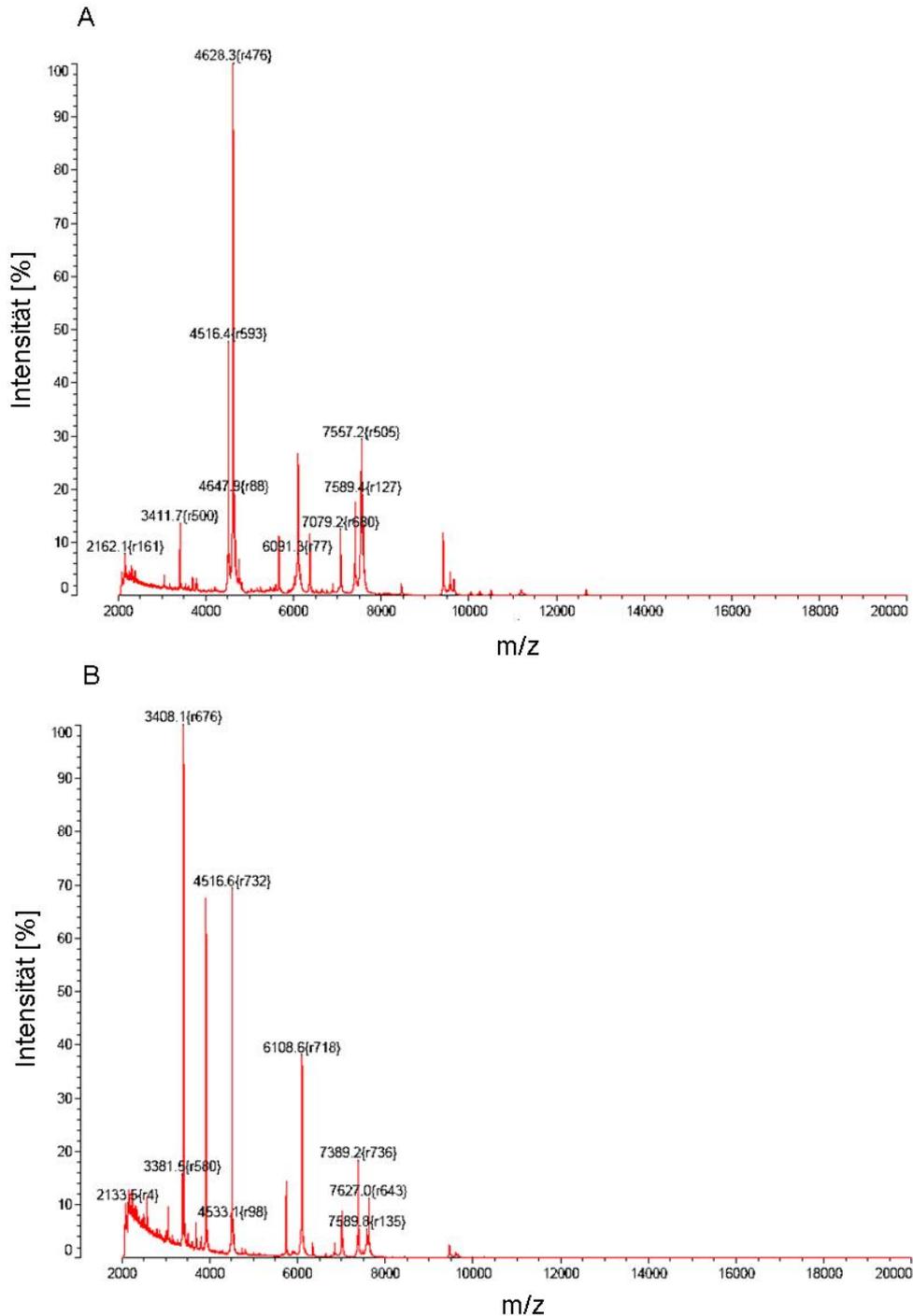
### 3.3. Identifizierung von *P. intermedia* mit Hilfe des Anaerobier-Testsystems „Rapid ID 32 A“

Um zu überprüfen, ob es sich bei den durch die PNA-Sonde positiv getesteten Bakterien in den CF-Sputen tatsächlich um *P. intermedia* bzw. *P. nigrescens* handelte, wurde mit dem Anaerobier-Testsystem „Rapid ID 32 A“ zusätzlich ein kultureller Nachweis erbracht. Da für solche Testsysteme, wie bereits in 1.4.1.

erwähnt, Reinkulturen benötigt werden, mussten die entsprechenden Bakterien zunächst aus den Patientensputen isoliert werden. Dies erfolgte nach dem Prinzip, das in 2.11. erläutert wurde. Da sich die Kultivierung von anaeroben Bakterien nicht immer einfach gestaltet, gelang die Isolierung aus den Patientensputen nicht in allen Fällen. Letztendlich konnten aus 4 der 8 durch die PNA-Sonde positiv getesteten Sputen Reinkulturen der entsprechenden Bakterienstämme isoliert werden. Diese 4 Bakterienstämme wurden zwar durch „Rapid ID 32 A“ ohne zusätzliche Tests alle als *P. intermedia* identifiziert (Tab. 2), allerdings muss auch hier von *P. intermedia/P. nigrescens* ausgegangen werden, da „Rapid ID 32 A“ die beiden Spezies nicht differenzieren kann.

### **3.4. Identifizierung von *P. intermedia* durch MALDI-TOF-MS**

Da weder durch die PNA-Sonde noch durch den kulturellen Nachweis zwischen *P. intermedia* und *P. nigrescens* unterschieden werden konnte, kam mit MALDI-TOF-MS eine dritte Methode zur Identifikation der Bakterien zur Anwendung. Dabei wird die Bakterienspezies über charakteristische Massenspektren ermittelt, sodass zuverlässig zwischen *P. intermedia* und *P. nigrescens* unterschieden werden kann (Abb. 17). Da auch für diese Methode Reinkulturen der Bakterienstämme benötigt wurden, konnten wie in 3.3. nur die 4 aus den Patientensputen isolierten Bakterienstämme untersucht werden. 2 der 4 getesteten Stämme wurden als *P. intermedia* identifiziert. Bei den beiden anderen Bakterienstämmen handelte es sich um einen Stamm *P. nigrescens* und einen Stamm *P. melaninogenica*. Die MALDI-TOF-MS-Messungen wurden durch Sequenzierung der 4 Isolate bestätigt. Diesen Ergebnissen zufolge enthielten 2 der 8 durch die PNA-Sonde positiv getesteten Patientensputen sicher *P. intermedia*. Für die 4 Stämme, bei denen eine Isolierung nicht möglich war, konnte durch die angewandten Methoden nicht geklärt werden, ob darin *P. intermedia* oder *P. nigrescens* enthalten war (Tab. 2).



**Abb. 17:** Charakteristische MALDI-TOF-MS-Massenspektren des *P. intermedia*-Isolates 1-13 (A) und des *P. nigrescens*-Isolates 2-4 (B). Reinkulturen der Bakterienstämme wurden mit organischer Matrix kokristallisiert und im Massenspektrometer durch UV-Laserbeschuss in Ionen unterschiedlicher Masse aufgespalten. Die Kombination der einzelnen Peaks der MALDI-TOF-Spektren kann den verschiedenen Bakterienpezies zugeordnet werden und entspricht einer Art „Fingerabdruck“ des jeweiligen Bakteriums. Während in (B) bei 3408,1 m/z ein 100%-Peak vorhanden ist, liegt dieser in (A) bei 4628,3 m/z.

**Tab. 2:** Korrelation der an den Patientensputen durchgeführten Tests.

	<b>Phänotyp (braun pigmentiert)</b>	<b>Prevotella Genus PNA</b>	<b>Rapid ID 32 A</b>	<b>MALDI-TOF-MS</b>
<b>1-1</b>	ja	positiv	Isolierung erfolglos	Isolierung erfolglos
<b>1-2</b>	nein	negativ	-	-
<b>1-3</b>	ja	positiv	Isolierung erfolglos	Isolierung erfolglos
<b>1-4</b>	nein	negativ	-	-
<b>1-5</b>	nein	negativ	-	-
<b>1-6</b>	nein	negativ	-	-
<b>1-7</b>	nein	negativ	-	-
<b>1-8</b>	ja	positiv	<i>P. intermedia</i>	<i>P. melaninogenica</i>
<b>1-9</b>	nein	negativ	-	-
<b>1-10</b>	ja	positiv	Isolierung erfolglos	Isolierung erfolglos
<b>1-11</b>	ja	positiv	<i>P. intermedia</i>	<i>P. intermedia</i>
<b>1-12</b>	ja	positiv	Isolierung erfolglos	Isolierung erfolglos
<b>1-13</b>	ja	positiv	<i>P. intermedia</i>	<i>P. intermedia</i>
<b>1-14</b>	keine Sputumprobe	-	-	-
<b>1-15</b>	nein	negativ	-	-
<b>1-16</b>	keine Sputumprobe	-	-	-
<b>1-17</b>	nein	negativ	-	-

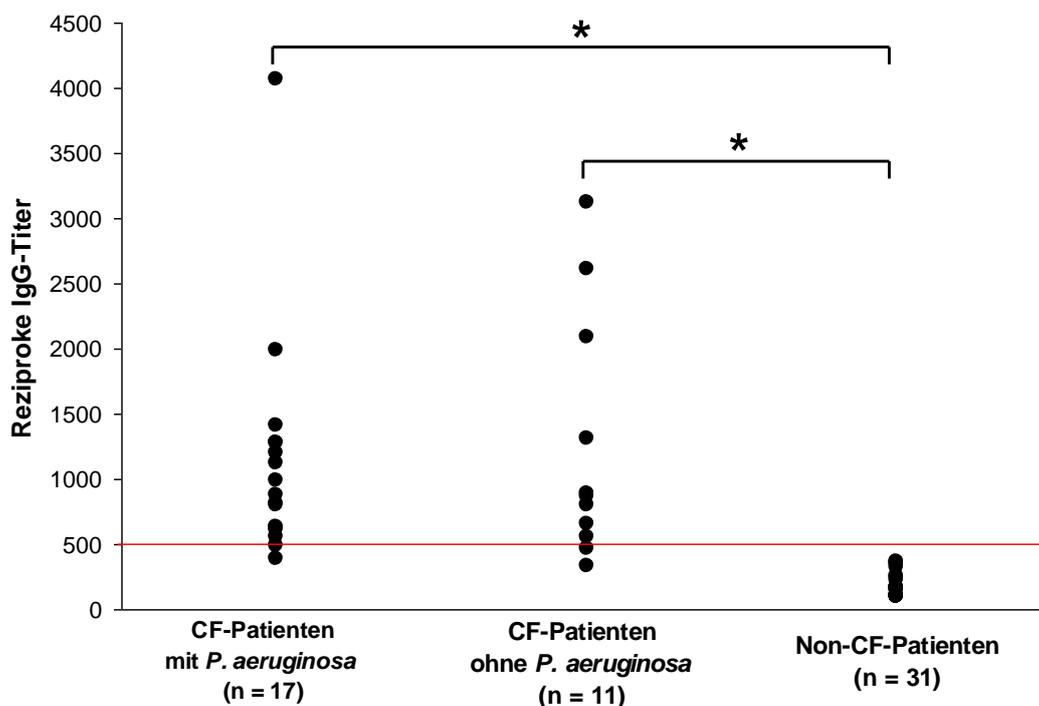
	Phänotyp (braun pigmentiert)	Prevotella Genus PNA	Rapid ID 32 A	MALDI-TOF-MS
<b>1-18</b>	keine Sputumprobe	-	-	-
<b>1-19</b>	keine Sputumprobe	-	-	-
<b>1-20</b>	nein	negativ	-	-
<b>2-1</b>	keine Sputumprobe	-	-	-
<b>2-2</b>	keine Sputumprobe	-	-	-
<b>2-3</b>	nein	negativ	-	-
<b>2-4</b>	ja	positiv	<i>P. intermedia</i>	<i>P. nigrescens</i>
<b>2-5</b>	nein	negativ	-	-
<b>2-6</b>	keine Sputumprobe	-	-	-
<b>2-7</b>	keine Sputumprobe	-	-	-
<b>2-8</b>	keine Sputumprobe	-	-	-
<b>2-9</b>	keine Sputumprobe	-	-	-
<b>2-10</b>	keine Sputumprobe	-	-	-
<b>2-11</b>	keine Sputumprobe	-	-	-
<b>2-12</b>	keine Sputumprobe	-	-	-
<b>2-13</b>	nein	negativ	-	-

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl *P. intermedia* als auch *P. nigrescens* durch die PNA-Sonde „Prevotella Genus PNA“ nachgewiesen werden. Bei deutlich positivem Fluoreszenzsignal wurden alle getesteten *P. intermedia*- und *P. nigrescens*-Stämme durch die PNA-Sonde zuverlässig detektiert. Die Sonde weist *P. intermedia* also nicht spezifisch nach. Dadurch kann mit „Prevotella Genus PNA“ nur eine Eingrenzung auf *P. intermedia*/*P. nigrescens* vorgenommen werden. Eine Differenzierung der beiden Spezies durch das Anaerobier-Identifizierungssystem „Rapid ID 32 A“ ist ebenfalls nicht möglich. Von den angewandten Methoden war lediglich MALDI-TOF-MS in der Lage, *P. intermedia* und *P. nigrescens* zu unterscheiden. Durch Kombination von „Prevotella Genus PNA“, „Rapid ID 32 A“ und MALDI-TOF-MS konnte in 2 Sputumproben sicher *P. intermedia* identifiziert werden.

### **3.5. Untersuchung der Patientenserum auf IgG-Antikörper gegen *P. intermedia* mittels ELISA**

Um zu klären, ob CF-Patienten auf pulmonale *P. intermedia*-Besiedelung eine systemische Immunreaktion zeigen, wurden die Patientenserum mit einem ELISA auf IgG-Antikörper gegen *P. intermedia*-Antigen untersucht. Es wurden Serumproben von 17 der 20 CF-Patienten mit pulmonaler *P. aeruginosa*-Besiedelung und Serumproben von 11 der 13 CF-Patienten ohne pulmonale *P. aeruginosa*-Besiedelung getestet. Zusätzlich wurde der ELISA mit Seren von 31 gesunden Kontrollpersonen durchgeführt. Für die IgG-Antikörpertiter der CF-Patienten mit pulmonaler *P. aeruginosa*-Besiedelung ergab sich ein Mittelwert von 1125, für die CF-Patienten ohne pulmonale *P. aeruginosa*-Besiedelung lag er bei 1246 und für die Non-CF-Patienten der Kontrollgruppe bei 170. Um zwischen positiven und negativen IgG-Titern unterscheiden zu können, wurde ein Cut-off festgelegt. Der Zahlenwert ergab sich aus dem 3-fachen Mittelwert der IgG-Titerwerte der Kontrollgruppe und lag somit bei  $170 \times 3 = 510$ . Werte oberhalb des Cut-off wurden als positiv, Werte darunter als negativ bezeichnet. 15

der 17 Seren (89%) der CF-Patienten mit *P. aeruginosa*-Besiedlung lagen oberhalb des Cut-off, die beiden übrigen Serumproben nur knapp darunter. 9 der 11 Seren (82%) der CF-Patienten ohne *P. aeruginosa*-Besiedlung lagen oberhalb des Cut-off. Die IgG-Titer aller Seren der Kontrollgruppe lagen deutlich unterhalb des festgelegten Cut-off (Abb. 18). Zusätzlich zeigten alle Patienten, bei denen *P. intermedia* in der Sputumprobe nachgewiesen worden war, positive IgG-Titer, die deutlich über dem Cut-off lagen. Die IgG-Antikörpertiter der CF-Patienten mit pulmonaler *P. aeruginosa*-Besiedlung sowie der CF-Patienten ohne pulmonale *P. aeruginosa*-Besiedlung waren im Vergleich zur den gesunden Probanden der Kontrollgruppe signifikant erhöht ( $p < 0,001$ , Abb. 18).



**Abb. 18:** IgG-Antikörpertiter gegen *P. intermedia* im Serum von CF-Patienten. Die rote Linie markiert den Cut-off (510), ab dem der IgG-Titerwert in der Serumproben als positiv betrachtet wird. Der Cut-off ergab sich aus dem 3-fachen Mittelwert der IgG-Titerwerte der Kontrollgruppe. \* bezeichnet die Signifikanz der IgG-Titererhöhung der CF-Patienten mit bzw. ohne *P. aeruginosa*-Besiedlung im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,001$ ).

Die IgG-Serumtitrier der CF-Patienten sowohl mit als auch ohne pulmonaler *P. aeruginosa*-Besiedlung waren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Bei 100% der Patienten mit *P. intermedia*-positiven Sputumproben wurden positive IgG-Titer deutlich oberhalb des Cut-off gemessen.

### 3.6. MHK- und Resistenzbestimmung der isolierten Patientenstämme mittels E-Test

Die, wie in 2.11. beschrieben, aus den Patientensputen isolierten Bakterienstämme wurden mit Hilfe eines E-Tests auf Antibiotikaresistenzen untersucht. Die 4 Isolate bildeten bei den getesteten Substanzen Piperacillin/Tazobactam, Ampicillin, Clindamycin, Ceftazidim, Meropenem und Metronidazol deutliche Hemmhöfe aus. Allerdings hängt es vom jeweiligen Antibiotikum ab, bis zu welchen MHK-Werten das Bakterium als sensibel bezeichnet wird. Für Piperacillin/Tazobactam gelten Bakterienstämme mit einer MHK  $\leq 32 \mu\text{g/ml}$  als sensibel, bei MHK  $64 \mu\text{g/ml}$  als intermediär und bei MHK  $\geq 128 \mu\text{g/ml}$  als resistent. Alle getesteten Isolate zeigten sich sensibel gegenüber Piperacillin/Tazobactam, da die MHK-Werte deutlich unter  $32 \mu\text{g/ml}$  lagen (Tab. 3). Für Ampicillin gelten Bakterien mit einer MHK  $\leq 8 \mu\text{g/ml}$  als sensibel, bei MHK  $16 \mu\text{g/ml}$  als intermediär und bei MHK  $\geq 32 \mu\text{g/ml}$  als resistent. Demnach waren die 4 getesteten Isolate sensibel gegenüber Ampicillin (Tab. 3). Für Clindamycin gelten Bakterien mit MHK  $\leq 2 \mu\text{g/ml}$  als sensibel, mit MHK  $4 \mu\text{g/ml}$  als intermediär und mit einer MHK  $\geq 8 \mu\text{g/ml}$  als resistent. Die getesteten Bakterienstämme waren auch gegenüber Clindamycin sensibel, da die MHK-Werte deutlich unter  $8 \mu\text{g/ml}$  lagen (Tab. 3). Für Ceftazidim werden Bakterien mit einer MHK  $\leq 8 \mu\text{g/ml}$  als sensibel, mit MHK  $16 \mu\text{g/ml}$  als intermediär und mit einer MHK  $\geq 32 \mu\text{g/ml}$  als resistent bezeichnet. Somit ist einer der getesteten Stämme (1-11) als intermediär zu bezeichnen, während die übrigen sensibel waren (Tab. 3). Für Meropenem gilt ein Bakterium mit einer MHK  $\leq 4 \mu\text{g/ml}$  als sensibel, mit MHK  $8 \mu\text{g/ml}$  als intermediär und mit einer MHK  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$  als resistent. Alle Isolate zeigten sich mit MHK-Konzentrationen deutlich unterhalb von  $8 \mu\text{g/ml}$  als sensibel ge-

geüber Meropenem (Tab. 3). Für Metronidazol gelten Bakterien mit einer MHK  $\leq 8 \mu\text{g/ml}$  sensibel, mit MHK  $16 \mu\text{g/ml}$  intermediär und mit einer MHK  $\geq 32 \mu\text{g/ml}$  resistent. Da die MHK-Werte aller Isolate unter  $8 \mu\text{g/ml}$  lagen, wird eine Sensibilität gegenüber Metronidazol angenommen. (Tab. 3)

**Den Ergebnissen zufolge waren die 4 Isolate bis auf eine Ausnahme (1-11, Ceftazidim) gegenüber allen getesteten Substanzen sensibel.**

**Tab. 3:** Mittels E-Test bestimmte MHK-Werte [ $\mu\text{g/ml}$ ] der Bakterienstämme für die verschiedenen Antibiotika.

<b>Antibiotikum</b>	<b><i>P. melaninogenica</i> (1-8)</b>	<b><i>P. intermedia</i> (1-11)</b>	<b><i>P. intermedia</i> (1-13)</b>	<b><i>P. nigrescens</i> (2-4)</b>
<b>Piperacillin/Tazobactam</b>	0,016	12	0,016	2
<b>Ampicillin</b>	2	1	8	0,25
<b>Clindamycin</b>	0,016	0,016	0,016	0,016
<b>Ceftazidim</b>	0,5	12	6	2
<b>Meropenem</b>	0,016	0,75	0,016	0,19
<b>Metronidazol</b>	0,25	4	0,023	6

#### 4. Diskussion

Anaerobe Bakterien besiedeln neben Keimen wie *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *H. influenzae* häufig die Lungen von CF-Patienten (22, 24, 156). Tunney *et al.* konnten in 64% der in ihrer Studie untersuchten CF-Sputumproben anaerobe Bakterien, darunter vor allem *Prevotella spp.*, *Veillonella spp.*, *Propionibacterium spp.* und *Actinomyces spp.*, nachweisen (156). Trotz ihrer hohen Prävalenz werden Anaerobier durch die mikrobiologische Routinediagnostik bis jetzt nicht ausreichend erfasst. Der Nachweis von anaeroben Bakterien wie *P. intermedia* erfolgt in der mikrobiologischen Diagnostik routinemäßig nach wie vor über Anaerobiernachweissysteme, welche die verschiedenen Bakterienspezies über eine Reihe von enzymatischen Reaktionen identifizieren (129). Manche Bakterien können durch diese Systeme nur bis auf Genusebene identifiziert oder nicht von ähnlichen Spezies abgegrenzt werden (3, 33, 73, 83). Dies ist auch im Bezug auf *P. intermedia* und *P. nigrescens* der Fall (2, 19, 55, 139).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Methode zum Nachweis von *P. intermedia* etabliert. Das Bakterium wurde durch FISH mit der PNA-Sonde „Prevotella Genus PNA“ direkt im Sputum von CF-Patienten detektiert. *P. intermedia* wurde sowohl in Bakteriensuspensionen als auch in Sputumproben durch „Prevotella Genus PNA“ zuverlässig, aber nicht spezifisch nachgewiesen. Zusätzlich wurde das Bakterium *P. nigrescens* detektiert, sodass mit der PNA-Sonde eine Eingrenzung auf diese beiden Bakterienspezies möglich ist. PNA-Oligomere binden in der Regel mit höherer Spezifität an komplementäre DNA- bzw. RNA-Sequenzen als entsprechende DNA- oder RNA-Oligomere (34, 62, 97, 106). Dennoch ist mangelnde Spezifität von PNA-Sonden im Bezug auf *P. intermedia* und weitere Bakterienstämme ein bekanntes Phänomen, das bereits von Sunde *et al.* beschrieben wurde (152). In diesem Zusammenhang muss die klinische Relevanz einer Unterscheidung zwischen *P. intermedia* und *P. nigrescens* ins Feld geführt werden. Die beiden Spezies, die bis 1992 gemeinsam als *Bacteroides intermedius* bezeichnet wurden (134), weisen eine Reihe von Gemeinsamkeiten auf. Dazu gehören auch die Substanzen, mit denen sie the-

rapiert werden (129). Trotz des Unvermögens zwischen *P. intermedia* und *P. nigrescens* zu unterscheiden, ist „Prevotella Genus PNA“ den Verfahren der mikrobiologischen Routinediagnostik überlegen. Im Gegensatz zur Identifikation durch kulturelle Anaerobiernachweissysteme ist keine Kultivierung der zu untersuchenden Bakterien nötig, welche bei Anaerobiern 48 h dauert (72, 101). Die Möglichkeit der Detektion direkt im Patientenmaterial bedeutet deshalb eine enorme Zeitersparnis. Die Sputumproben mussten vor der Durchführung der PNA-FISH ausschließlich mit DTT verflüssigt werden, damit der Nachweis der Bakterien gelang. Durch die Zugabe von DTT und das mehrmalige Mischen der mit DTT versetzten Sputumprobe wurde zwar die Struktur des Sputums verändert, allerdings sollte *P. intermedia* in der vorliegenden Arbeit lediglich qualitativ nachgewiesen und nicht lokalisiert werden. Durch „Prevotella Genus PNA“ wurden in 40% der getesteten CF-Sputumproben (8/20) *P. intermedia* bzw. *P. nigrescens* detektiert. Es ist möglich, dass der Prozentsatz sogar höher liegt, da jeweils nur Teile jeder Sputumprobe untersucht wurden. Außerdem kann es sein, dass trotz sorgfältiger visueller Untersuchung der Präparate unter dem Mikroskop markierte Bakterien übersehen wurden. Das Ergebnis ist vergleichbar mit den Ergebnissen von Tunney *et al.*, die in 64% der untersuchten Sputumproben anaerobe Bakterien, darunter am häufigsten *Prevotella spp.*, nachweisen konnten (156). Ansonsten existieren nur wenige Studien, die sich mit anaeroben Bakterien, vor allem *P. intermedia*, im Sputum von CF-Patienten beschäftigen und zum Vergleich herangezogen werden könnten. Grund dafür ist vermutlich, dass anaerobe Bakterien durch die mikrobiologische Routinediagnostik normalerweise nicht erfasst werden und ihre Kultivierung schwierig ist.

Von großem Vorteil für den Nachweis von *P. intermedia* direkt in Patientenmaterial wäre die Entwicklung einer PNA-Sonde, die das Bakterium spezifisch nachweist. Dadurch könnte auf zusätzliche Tests zur Abgrenzung von anderen Bakterienspezies verzichtet werden und die Zeitersparnis durch den direkten Nachweis im Patientenmaterial käme deutlich zum Tragen. An dieser Stelle sollte die Möglichkeit des molekulargenetischen Nachweises von Bakterien

nicht unerwähnt bleiben. Dafür ist zwar eine Kultivierung der Bakterien erforderlich, jedoch ist eine genaue Identifizierung bis auf Speziesebene möglich.

90% der CF-Patienten (7/8), in deren Sputumprobe *P. intermedia* bzw. *P. nigrescens* durch „Prevotella Genus PNA“ detektiert wurde, wiesen zusätzlich eine pulmonale *P. aeruginosa* Besiedlung auf. Diese Tatsache legt nahe, dass zwischen der Besiedlung mit *P. intermedia* bzw. *P. nigrescens* und *P. aeruginosa* ein Zusammenhang besteht. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtungen von Tunney *et al.*, die zeigen konnten, dass eine pulmonale *P. aeruginosa*-Besiedlung die Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen anaerober Bakterien signifikant erhöht (156). *P. aeruginosa* ruft unter anderem durch Vermehrung und Persistenz anaerobe Verhältnisse im pulmonalen Mukus der CF-Patienten hervor und trägt somit zu optimalen Lebensbedingungen für anaerobe Bakterien bei (165). Dadurch kann erklärt werden, weshalb fast ausschließlich bei CF-Patienten mit pulmonaler *P. aeruginosa*-Besiedlung *P. intermedia* bzw. *P. nigrescens* im Sputum gefunden wurde. Im Gegensatz dazu stellten Worlitzsch *et al.* fest, dass eine pulmonale *P. aeruginosa*-Besiedlung die Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen von anaeroben Bakterien in der Lunge nicht erhöht (166). Es wäre sinnvoll, in Folgestudien ein größeres Patientenkollektiv zu untersuchen, um die Rolle von *P. aeruginosa* im Bezug auf eine Besiedlung mit Anaerobiern bei CF-Patienten zu klären.

Die Ergebnisse der PNA-FISH wurden zusätzlich durch das Anaerobiernachweissystem „Rapid ID 32 A“, das in der mikrobiologischen Routinediagnostik verwendet wird, und MALDI-TOF-MS bestätigt. Da es sich dabei wie bereits erwähnt um kulturelle Nachweise handelt, konnten nur die aus den 8 positiven Patientensputen isolierbaren Bakterienstämme untersucht werden. Die 4 Stämme, bei denen eine Isolierung gelang, wurden durch „Rapid ID 32 A“ eindeutig als *P. intermedia* identifiziert. Da das Anaerobiernachweissystem jedoch nicht zu einer Differenzierung zwischen *P. intermedia* und *P. nigrescens* in der Lage ist, konnte auch damit lediglich eine Eingrenzung auf diese beiden Spezies vorgenommen werden. In bisher durchgeführten Studien zur Unterschei-

dung von *P. intermedia* und *P. nigrescens* kam „Rapid ID 32 A“ ebenfalls nur zur Eingrenzung der beiden Spezies zum Einsatz, die Differenzierung erfolgte durch andere Methoden wie DNA- oder 16S rRNA-basierte PCR oder FISH durch spezifische Sonden (2, 19, 55, 139). In der vorliegenden Arbeit wurde die endgültige Differenzierung durch MALDI-TOF-MS vorgenommen. 2 der Isolate wurden als *P. intermedia* und die beiden übrigen als *P. nigrescens* und *P. melaninogenica* identifiziert. Die Ergebnisse der MALDI-TOF-MS wurden durch DNA-Sequenzierungsanalysen der Isolate überprüft und bestätigt. Auffallend ist die Identifizierung eines der 4 Isolate als *P. melaninogenica*. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Spezifitätsprüfung ergab, dass *P. melaninogenica* nicht durch „Prevotella Genus PNA“ detektiert wird. Es könnte sich in diesem Fall um eine unspezifische Bindungsreaktion der Sonde an Proteine oder freie DNA sowie eine Oligomerisierung mehrerer Sondenmoleküle handeln. Ferner ist es möglich, dass die isolierten Bakterien nicht den durch „Prevotella Genus PNA“ im Sputum detektierten Bakterien entsprachen. Da es nicht möglich war, aus den übrigen 4 PNA-positiven Sputen Isolate zu gewinnen, konnte nicht geklärt werden, ob darin tatsächlich *P. intermedia* enthalten war.

Die Notwendigkeit von Reinkulturen ist der entscheidende Nachteil beim Nachweis von Bakterien durch MALDI-TOF-MS. Dies wird vor allem in der Anaerobiendiagnostik deutlich: Die Kultivierung anaerober Bakterien ist mit einem doppelt so hohen Zeitaufwand verbunden wie die von aeroben Bakterien, in manchen Fällen gelingt eine Kultivierung aus Patientenmaterial nicht. Obwohl ein direkter Nachweis von Bakterien in Patientenmaterial nicht möglich ist, sind die Vorteile der Methode nicht von der Hand zu weisen. MALDI-TOF-MS ist verglichen mit anderen Methoden einfach und schnell durchführbar, genau und kosteneffektiv. Dadurch eignet sich die Methode zur Routinediagnostik von Bakterien (27, 59, 96, 133). Zusätzlich können durch MALDI-TOF-MS auch Spezies wie *P. intermedia* und *P. nigrescens*, die durch andere kulturelle Methoden nicht differenziert werden können, zuverlässig unterschieden werden (150).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass im Serum von CF-Patienten die IgG-Antikörpertiter gegen *P. intermedia* im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen signifikant erhöht sind. Eine systemische Immunreaktion auf *P. intermedia* in Form von erhöhten Antikörpertitern gegen das Bakterium wurde bereits bei anderen Erkrankungen beobachtet. Albandar *et al.* stellten bei Patienten mit Parodontitis im Vergleich zu Gesunden im Serum signifikant erhöhte IgA-Titer gegen *P. intermedia* fest (1). Sowohl bei Patienten mit nicht-streptokokkenbedingter Tonsillitis als auch bei Patienten mit peritonsillären Abszessen mit *P. intermedia*-Beteiligung wurden erhöhte IgG-Titer gegen *P. intermedia* im Serum gefunden (10, 12). Brook *et al.* wiesen signifikant erhöhte IgA-Titer gegen *P. intermedia* im Sputum von Patienten mit akuter Exazerbation einer chronischen Bronchitis nach (14). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass *P. intermedia* humane B-Lymphozyten *in vitro* zur Bildung von IgA- und IgG-Antikörpern anregt (60). In der vorliegenden Arbeit wiesen alle CF-Patienten, bei denen *P. intermedia* in der Sputumprobe detektiert wurde, im Vergleich zu den gesunden Probanden der Kontrollgruppe deutlich erhöhte IgG-Serumantikörpertiter gegen *P. intermedia* auf. Zusätzlich wurden auch bei CF-Patienten ohne nachgewiesene pulmonale *P. intermedia*-Besiedlung deutlich erhöhte IgG-Antikörpertiter gegen das Bakterium gemessen. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass bei den CF-Patienten mit erhöhtem IgG-Titer ohne nachgewiesene pulmonale *P. intermedia*-Besiedlung der Nachweis des Bakteriums im Sputum nicht gelang. Des Weiteren kann es sein, dass die betreffenden Patienten aufgrund anderweitiger bakterieller Besiedlung der Lunge mit Antibiotika therapiert worden waren, die auch *P. intermedia* abdeckten. Das würde erklären, weshalb *P. intermedia* im Sputum nicht mehr nachweisbar war, die Antikörper jedoch noch im Blut zirkulierten. Allerdings ist bekannt, dass durch eine intravenöse Antibiotikatherapie gegen *P. aeruginosa* bei CF-Patienten mit akuter Exazerbation die Zahl der obligaten Anaerobier nicht verringert wird (166). Ob und mit welchen Substanzen die CF-Patienten in der vorliegenden Arbeit behandelt wurden, ist nicht bekannt, sodass eine antibiotische Reduktion bzw. Eradikation von *P. intermedia* bei persistierend hohen Antikörpertitern dennoch in Betracht gezogen werden muss. Dieses Phänomen ist aus der Zahnheilkun-

de bekannt. In einer Studie von Hafström *et al.* war nach Behandlung von Patienten mit periodontalen Abszessen zwar die bakterielle Besiedlung mit *P. intermedia* signifikant reduziert, die IgG-Serumtitrier blieben jedoch konstant (57). Im Gegensatz dazu wiesen Horibe *et al.* bei Patienten mit Parodontitis nach Behandlung einen Rückgang der *P. intermedia*-Besiedlung sowie der entsprechenden IgG-Antikörpertiter im Serum nach (61). Auch bei Patienten mit chronischer Sinusitis maxillaris mit *P. intermedia*-Beteiligung nahmen die IgG-Antikörpertiter nach erfolgreicher antibiotischer Therapie signifikant ab (13). Zusätzlich sollte die Beteiligung von *P. intermedia* an Parodontitiden, oralen Infektionen und Abszessen im HNO-Bereich in diesem Zusammenhang beachtet werden (41, 69). Wie bereits erwähnt, konnten im Blut von Patienten mit diesen Erkrankungen ebenfalls Antikörper gegen das Bakterium nachgewiesen werden (1, 10, 12). Der Status der in der vorliegenden Arbeit untersuchten CF-Patienten im Bezug auf die oben genannten Erkrankungen ist nicht bekannt. Demzufolge könnte eine IgG-Antikörperbildung gegen *P. intermedia* bei fehlendem Nachweis des Bakteriums in der Sputumprobe auch durch eine anderweitige Besiedlung oder Infektion der CF-Patienten mit *P. intermedia* bedingt sein. Die Untersuchung der IgG-Antikörperbildung gegen *P. intermedia* bei einer größeren Gruppe von CF-Patienten wäre für die Aufklärung des Sachverhalts hilfreich. Kenntnis über die bei den Patienten in der Antikiotikatherapie bisher verwendeten Substanzen ist dabei ebenso von Interesse wie das Vorliegen von Parodontose oder anderen Erkrankungen mit *P. intermedia*-Beteiligung.

Die 4 Isolate aus den Patientensputen wiesen bis auf eine Ausnahme keine Resistenzen gegenüber den getesteten Antibiotika Piperacillin/Tazobactam, Ampicillin, Clindamycin, Ceftazidim, Meropenem und Metronidazol auf. Ein *P. intermedia*-Isolat war lediglich intermediär sensibel gegenüber Ceftazidim. Wie bereits erwähnt, ist nicht bekannt, ob die genannten Substanzen bei den CF-Patienten, aus deren Sputen die getesteten Bakterienstämme isoliert wurden, bereits angewandt wurden. Worlitzsch *et al.* stellten fest, dass bei CF-Patienten mit akuter Exazerbation 58% der im Sputum nachgewiesenen obligaten Anaerobier Resistenzen gegenüber Piperacillin/Tazobactam, Clindamycin,

Ceftazidim, Meropenem und Metronidazol aufwiesen. Die Resistenzprofile der einzelnen Isolate unterschieden sich dabei erheblich (166). Bei MHK-Bestimmungen oraler und extraoraler *P. intermedia*-Isolate wies nur eines von 64 Isolaten eine Resistenz gegenüber Ampicillin und eines von 76 Isolaten eine Resistenz gegenüber Piperacillin/Tazobactam auf. Gegenüber Clindamycin und Metronidazol waren alle getesteten Isolate sensibel (129). Im Bereich der Zahnheilkunde wurden von Kulik *et al.* bei Patienten mit Periodontitis nur bei wenigen *P. intermedia*-Stämmen Resistenzen gegenüber Clindamycin, Phenoxymethylpenicillin und Tetracyclin festgestellt. Eine Zunahme mit der Zeit wurde dabei nicht beobachtet (77). Van Winkelhoff *et al.* stellten im Bezug auf die Resistenzlage von *P. intermedia*-Isolaten aus periodontitischen Läsionen regionale Unterschiede fest (161). Diese Unterschiede wurden von Mättö *et al.* nicht beschrieben (89). *P. intermedia*-Isolate von Patienten mit Periodontitis wiesen im Vergleich mit 50 anaeroben periodontitischen Bakterien die höchsten Resistenzraten im Bezug auf Penicilline auf. Auch hier wurden deutliche interindividuelle Unterschiede festgestellt (79). Penicillin-Resistenzen bei *P. intermedia* sind auf eine  $\beta$ -Lactamase-Produktion zurückzuführen, welche in einer Reihe von bisher veröffentlichten Studien nachgewiesen werden konnte (9, 65, 89, 160). Allerdings scheinen sich oral sowie extraoral isolierte *P. intermedia*-Stämme im Bezug auf die  $\beta$ -Laktamase-Bildung nicht zu unterscheiden (89). Da in der vorliegenden Arbeit nur relativ wenige Patientenstämme untersucht wurden, sollten sich Tests mit einer größeren Zahl von *P. intermedia*-Isolaten von CF-Patienten anschließen, um ein repräsentatives Bild der momentanen Resistenzlage zu erhalten.

## 5. Zusammenfassung

Bei der Cystischen Fibrose, der häufigsten autosomal-rezessiv vererbten Krankheit der kaukasischen Bevölkerung, kommt den pathophysiologischen Vorgängen in der Lunge besondere Bedeutung zu. 80-95% der Patienten versterben aufgrund von Ateminsuffizienz, welche durch pulmonale bakterielle Infektionen bedingt ist. Neben *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenza*, *Burkholderia cepacia* und *Stenotrophomonas maltophilia* infizieren anaerobe Bakterien wie *P. intermedia* die Lungen von CF-Patienten. In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Methode zum Nachweis von *P. intermedia* in Sputum von CF-Patienten etabliert. Zusätzlich wurden Antikörper gegen das Bakterium im Serum der Patienten bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass *P. intermedia* durch FISH mit der PNA-Sonde „Prevotella Genus PNA“ direkt in Sputumproben von CF-Patienten detektiert werden kann. Der Nachweis durch die PNA-Sonde ist nicht spezifisch, da auch das Bakterium *P. nigrescens* detektiert wird. Durch „Prevotella Genus PNA“ wurden in 40% der Sputumproben *P. intermedia*/*P. nigrescens* nachgewiesen. Nach erfolgreicher Isolation von 4 Stämmen wurde das Ergebnis durch das Anaerobiernachweissystem „Rapid ID 32 A“ bestätigt. Die Differenzierung zwischen *P. intermedia* und *P. nigrescens* erfolgte durch MALDI-TOF-MS und DNA-Sequenzierungsanalysen. Dabei wurden 2 Isolate als *P. intermedia* und die beiden übrigen als *P. nigrescens* und *P. melaninogenica* identifiziert. Bei der Resistenzbestimmung gegenüber Ampicillin, Clindamycin, Piperacillin/Tazobactam, Ceftazidim, Meropenem und Metronidazol wiesen die Isolate bis auf eine Ausnahme keine Resistenzen auf. Lediglich ein *P. intermedia*-Isolat zeigte sich intermediär sensibel gegenüber Ceftazidim. In den Serumproben der CF-Patienten wurden mittels ELISA im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöhte IgG-Antikörpertiter gegen *P. intermedia* festgestellt. Dabei waren sowohl die IgG-Serumtiter der CF-Patienten mit als auch ohne pulmonale *P. aeruginosa*-Besiedlung im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Alle CF-Patienten, in deren Sputumprobe *P. intermedia* gefunden wurde, wiesen deutlich erhöhte IgG-Titer gegen das Bakterium auf.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass *P. intermedia* durch die PNA-Sonde „Prevotella Genus PNA“ direkt im Sputum von CF-Patienten nachweisbar ist, was für die Diagnostik von entscheidendem Vorteil ist. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sich das Immunsystem der Patienten in Form einer IgG-Antikörperbildung aktiv mit dem Bakterium auseinandersetzt, was einen wichtigen Aspekt für das Verständnis des Verlaufs der Pathogenese der Lungenerkrankung bei CF darstellt.

## Literatur

1. **Albandar JM, DeNardin AM, Adesanya MR, Diehl SR, Winn DM.** Associations between serum antibody levels to periodontal pathogens and early-onset periodontitis. *J Periodontol.* 2001;72(11):1463-9.
2. **Andrés MT, Chung WO, Roberts MC, Fierro JF.** Antimicrobial susceptibilities of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* spp. isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(11):3022-3.
3. **Arzese A, Minisini R, Botta GA.** Evaluation of an automated system for identification of anaerobic bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1994;13(2):135-41.
4. **Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS, Xia T.** Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J Endod.* 1999;25(6):413-5.
5. **Beavis RC, Chait BT.** Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1989;3(12):432-5.
6. **Beavis RC, Chaudhary T, Chait BT.** Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry of proteins. *Org Mass Spectrom.* 1992;27:156-8.
7. **Beem JE, Nesbitt WE, Leung KP.** Identification of hemolytic activity in *Prevotella intermedia*. *Oral Microbiol Immunol.* 1998;13(2):97-105.
8. **Beem JE, Nesbitt WE, Leung KP.** Cloning of *Prevotella intermedia* loci demonstrating multiple hemolytic domains. *Oral Microbiol Immunol.* 1999;14(3):143-52.
9. **Bernal LA, Guillot E, Paquet C, Mouton C.** Beta-lactamase-producing strains in the species *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol.* 1998;13(1):36-40.
10. **Brook I, Foote PA Jr, Slots J, Jackson W.** Immune response to *Prevotella intermedia* in patients with recurrent nonstreptococcal tonsillitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1993;102(2):113-6.
11. **Brook I.** *Prevotella* and *Porphyromonas* infections in children. *J Med Microbiol.* 1995;42(5):340-7.
12. **Brook I, Foote PA Jr, Slots J.** Immune response to anaerobic bacteria in patients with peritonsillar cellulitis and abscess. *Acta Otolaryngol.* 1996;116(6):888-91.

13. **Brook I, Yocum P.** Immune response to *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella intermedia* in patients with chronic maxillary sinusitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1999;108(3):293-5.
14. **Brook I, Frazier EH.** Immune response to *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella intermedia* in the sputum of patients with acute exacerbation of chronic bronchitis. *Chest.* 2003;124(3):832-3.
15. **Castellani C, Southern KW, Brownlee K, Dankert-Roelse J, Duff A, Farrell M, Mehta A, Munck A, Pollitt R, Sermet-Gaudelus I, Wilcken B, Ballmann M, Corbetta C, de Monestrol I, Farrell P, Feilcke M, Férec C, Gartner S, Gaskin K, Hammermann J, Kashirskaya N, Loeber G, Macek M Jr, Mehta G, Reiman A, Rizzotti P, Sammon A, Sands D, Smyth A, Sommerburg O, Torresani T, Travert G, Vernooij A, Elborn S.** European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. *J Cyst Fibros.* 2009;8(3):153-73.
16. **Chillón M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, Romey MC, Ruiz-Romero J, Verlingue C, Clausters M, Nunes V, Férec C, Estivill X.** Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med.* 1995;332(22):1475-80.
17. **Clunes MT, Boucher RC.** Cystic Fibrosis: The mechanisms of pathogenesis of an inherited lung disorder. *Drug Discov Today Dis Mech.* 2007;4(2):63-72.
18. **Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS.** Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Engl J Med.* 1998;339(10):653-8.
19. **Conrads G, Pelz K, Hughes B, Seyfarth I, Devine DA.** Optimized oligonucleotides for the differentiation of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol.* 1997;12(2):117-20.
20. **Cramton SE, Ulrich M, Götz F, Döring G.** Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesion in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 2001;69(6):4079-85.
21. **Crossley JR, Elliott RB, Smith PA.** Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. *Lancet.* 1979;1(8114):472-4.
22. **Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry.** Annual Data Report 2007. <http://www.cff.org/UploadedFiles/research/ClinicalResearch/2007-Patient-Registry-Report.pdf> (besucht am 11.09.2009).
23. **Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium.** Cystic Fibrosis Mutation Database. <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html> (besucht am 07.09.2009).

24. **Davis PB, Drumm M, Konstan MW.** Cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154(5):1229-56.
25. **Davis PB.** Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(5):475-82.
26. **de Bentzmann S, Plotkowski C, Puchelle E.** Receptors in the *Pseudomonas aeruginosa* adherence to injured and repairing airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154(4 Pt 2):155-62.
27. **Degand N, Carbonnelle E, Dauphin B, Beretti JL, Le Bourgeois M, Sermet-Gaudelus I, Segonds C, Berche P, Nassif X, Ferroni A.** Matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2008;46(10):3361-7.
28. **Demidov V, Frank-Kamenetskii MD, Egholm M, Buchardt O, Nielsen PE.** Sequence selective double strand DNA cleavage by peptide nucleic acid (PNA) targeting using nuclease S1. *Nucl Acids Res.* 1993;21(9):2103-7.
29. **Demirev PA, Ho YP, Ryzhov V, Fenselau C.** Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. *Anal Chem.* 1999;71(14):2732-8.
30. **Dockter G, Lindemann H.** Mukoviszidose. *Thieme*, Stuttgart 2000.
31. **Doering G, Knight R, Bellon G.** Immunology of cystic fibrosis. In: **Hodson ME, Geddes DM.** Cystic fibrosis. *Arnold*, London 2000:109-40.
32. **Donaldson SH, Boucher RC.** Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Curr Opin Pulm Med.* 2003;9(6):486-91.
33. **Downes J, King A, Hardie J, Phillips I.** Evaluation of the Rapid ID 32A system for identification of anaerobic gram-negative bacilli, excluding the *Bacteroides fragilis* group. *Clin Microbiol Infect.* 1999;5(6):319-26.
34. **Egholm M, Buchardt O, Christensen L, Behrens C, Freier SM, Driver DA, Berg RH, Kim SK, Norden B, Nielsen PE.** PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature.* 1993;365(6446):566-8.
35. **Eliezer N, Sadé J, Silberberg A, Nevo AC.** The role of mucus in transport by cilia. *Am Rev Respir Dis.* 1970;102(1):48-52.
36. **Emrich HM, Stoll E, Friolet B, Colombo JP, Richterich R, Rossi E.** Sweat composition in relation to rate of sweating in patients with cystic fibrosis of the pancreas. *Pediatr Res.* 1968;2(6):464-78.

- 37. Farrell PM, Kosorok MR, Rock MJ, Laxova A, Zeng L, Lai HC, Hoffman G, Laessig RH, Splaingard ML.** Early diagnosis of cystic fibrosis through neonatal screening prevents severe malnutrition and improves long-term growth. Wisconsin Cystic Fibrosis Neonatal Screening Study Group. *Pediatrics*. 2001;107(1):1-13.
- 38. Fenselau C, Demirev PA.** Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 2001;20:157-71.
- 39. Finegold SM.** The role of anaerobes in human infections. *Scand J Infect Dis Suppl*. 1981;26:9-13.
- 40. Finegold SM.** Pathogenic anaerobes. *Arch Intern Med*. 1982;142(11):1988-92.
- 41. Finegold SM, Strong CA, McTeague M, Marina M.** The importance of black-pigmented gram-negative anaerobes in human infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1993;6(2-3):77-82.
- 42. Fitzgerald MC, Smith LM.** Mass spectrometry of nucleic acids: the promise of matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI) mass spectrometry. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1995;24:117-40.
- 43. Fosse T, Madinier I, Hitzig C, Charbit Y.** Prevalence of beta-lactamase-producing strains among 149 anaerobic gram-negative rods isolated from periodontal pockets. *Oral Microbiol Immunol*. 1999;14(6):352-7.
- 44. Frandsen EV, Poulsen K, Kilian M.** Confirmation of the species *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Int J Syst Bacteriol*. 1995;45(3):429-35.
- 45. Fujii R, Saito Y, Tokura Y, Nakagawa KI, Okuda K, Ishihara K.** Characterization of bacterial flora in persistent apical periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;24(6):502-5.
- 46. Gabriel SE, Brigman KN, Koller BH, Boucher RC, Stutts MJ.** Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in cystic fibrosis mouse model. *Science*. 1994;266(5182):107-9.
- 47. Garcia MA, Yang N, Quinton PM.** Normal mouse intestinal mucus release requires cystic fibrosis transmembrane regulator-dependent bicarbonate secretion. *J Clin Invest*. 2009;119(9):2613-22.
- 48. Gemeinsamer Bundesausschuss.** Richtlinien über die Früherkennung von Krankheiten bei Kindern bis zur Vollendung des 6. Lebensjahres („Kinder-Richtlinien“). [http://www.g-ba.de/downloads/62-492-379/RL\\_Kinder\\_2009-06-18\\_2.pdf](http://www.g-ba.de/downloads/62-492-379/RL_Kinder_2009-06-18_2.pdf) (besucht am 20.05.2010).

- 49. Gharbia SE, Haapasalo M, Shah HN, Kotiranta A, Lounatmaa K, Pearce MA, Devine DA.** Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates from periodontic and endodontic infections. *J Periodontol.* 1994;65(1):56-61.
- 50. Gibbons RJ.** Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res.* 1989;68(5):750-60.
- 51. Gibson LE, Cooke RE.** A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics.* 1959;23(3):545-9.
- 52. Goldstein JL, Sahi J, Bhuvu M, Layden TJ, Rao MC.** Escherichia coli heat-stable enterotoxin-mediated colonic Cl<sup>-</sup> secretion is absent in cystic fibrosis. *Gastroenterology.* 1994;107(4):950-6.
- 53. Grenier D.** Collagen-binding activity of *Prevotella intermedia* measured by a microtitre plate adherence assay. *Microbiology.* 1996;142(Pt 6):1537-41.
- 54. Groß U.** Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. *Thieme, Stuttgart* 2006.
- 55. Guillot E, Mouton C.** PCR-DNA probe assays for identification and detection of *Prevotella intermedia* sensu stricto and *Prevotella nigrescens*. *J Clin Microbiol.* 1997;35(7):1876-82.
- 56. Haffajee AD, Socransky SS.** Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 1994;5:78-111.
- 57. Hafström CA, Wikström MB, Renvert SN, Dahlén GG.** Effect of treatment on some periodontopathogens and their antibody levels in periodontal abscesses. *J Periodontol.* 1994;65(11):1022-8.
- 58. Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ.** Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol.* 2000;71(10):1554-60.
- 59. Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, Lay JO Jr.** Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1996;10(10):1227-32.
- 60. Homayounfar A, Bergström J, Hammarström L.** Activation of human B-lymphocytes by *Prevotella intermedia*. *Swed Dent J.* 1999;23(1):11-5.
- 61. Horibe M, Watanabe H, Ishikawa I.** Effect of periodontal treatments on serum IgG antibody titers against periodontopathic bacteria. *J Clin Periodontol.* 1995;22(7):510-5.

- 62. Jensen KK, Orum H, Nielsen PE, Nordén B.** Hybridization kinetics of Peptide Nucleic Acids (PNA) with DNA and RNA studied with BIAcore Technique. *Biochemistry*. 1997;36(16):5072-7.
- 63. Jiang C, Finkbeiner WE, Widdicombe JH, McCray PB Jr, Miller SS.** Altered fluid transport across airway epithelium in cystic fibrosis. *Science*. 1993;262(5132):424-7.
- 64. Joo NS, Krouse ME, Wu JV, Saenz Y, Jayaraman S, Verkman AS, Wine JJ.** HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport in relation to mucus secretion from submucosal glands. *JOP*. 2001;2 Suppl 4:S280-4.
- 65. Jousimies-Somer H, Savolainen S, Mäkitie A, Ylikoski J.** Bacteriologic findings in peritonsillar abscesses in young adults. *Clin Infect Dis*. 1993;16 Suppl 4:S292-8.
- 66. Jurinke C, Oeth P, van den Boom D.** MALDI-TOF mass spectrometry: a versatile tool for high-performance DNA analysis. *Mol Biotechnol*. 2004;26(2):147-64.
- 67. Kalfas S, Tigyi Z, Wikström M, Naidu AS.** Laminin binding to *Prevotella intermedia*. *Oral Microbiol Immunol*. 1992;7(4):235-9.
- 68. Kaplan E, Shwachman H, Perlmutter AD, Rule A, Khaw KT, Holsclaw DS.** Reproductive failure in males with cystic fibrosis. *N Eng J Med*. 1968;279(2):65-9.
- 69. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM.** Medizinische Mikrobiologie. *Thieme*, Stuttgart 2001.
- 70. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC.** Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 1989;245(4922):1073-80.
- 71. Kerem E, Reisman J, Corey M, Canny GJ, Levison H.** Prediction of mortality in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 1992;326(18):1187-91.
- 72. Kirketrep-Møller K, Jensen PØ, Fazli M, Pedersen J, Moser C, Tolker-Nielsen T, Høiby N, Givskov M, Bjarnsholt T.** Distribution, organization and ecology of bacteria in chronic wounds. *J Clin Microbiol*. 2008;46(8):2717-22.
- 73. Kitch TT, Appelbaum PC.** Accuracy and reproducibility of the 4-hour ATB 32A method for anaerobe identification. *J Clin Microbiol*. 1989;27(11):2509-13.
- 74. Knowles MR, Robinson JM, Wood RE, Pue CA, Mentz WM, Wagner CC, Gatzky JT, Boucher RC.** Ion composition of airway surface liquid of patients

with cystic fibrosis as compared with normal and disease-control subjects. *J Clin Invest.* 1997;100(10):2588-95.

**75. Koletzko B (Hrsg.).** Kinderheilkunde und Jugendmedizin. *Springer*, Berlin 2004.

**76. Kulczycki LL, Schauf V.** Cystic Fibrosis in blacks in Washington, DC: incidence and characteristics. *Am J Dis Child.* 1974;127(1):64-7.

**77. Kulik EM, Lenkeit K, Chenaux S, Meyer J.** Antimicrobial susceptibility of periodontopathogenic bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(5):1087-91.

**78. Kummer F.** Identifizierung von strikt anaeroben Bakterien im Sputum von CF-Patienten und Pathogenität von *Prevotella intermedia* und *Pseudomonas aeruginosa* in einem Mauslungeninfektionsmodell. [Dissertation]. Tübingen: Eberhard Karls Universität Tübingen; 2009.

**79. Lakhssassi N, Elhajoui N, Lodter JP, Pineill JL, Sixou M.** Antimicrobial susceptibility variation of 50 anaerobic periopathogens in aggressive periodontitis: an interindividual variability study. *Oral Microbiol Immunol.* 2005;20(4):244-52.

**80. Leung KP, Subramaniam PS, Okamoto M, Fukushima H, Lai CH.** The binding and utilization of hemoglobin by *Prevotella intermedia*. *FEMS Microbiol Lett.* 1998;162(2):227-33.

**81. Lindemann H, Tümmler B, Dockter G.** Mukoviszidose – Zystische Fibrose. *Thieme*, Stuttgart 2004.

**82. Loesche WJ.** Oxygen sensitivity of various anaerobic bacteria. *Appl Microbiol.* 1969;18(5):723-7.

**83. Looney WJ, Gallusser AJ, Modde HK.** Evaluation of the ATB 32A system for identification of anaerobic bacteria isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1990;28(7):1519-24.

**84. López NJ.** Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in progressive adult periodontitis. *J Periodontol.* 2000;71(6):948-54.

**85. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB.** Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2):194-222.

**86. Macek M Jr, Macek M, Stuhmann M, Kulovaný M, Dolanská M, Koukolík F, Boehm I, Hronková J, Jezková Z, Paulová M.** The direct early diagnosis of cystic fibrosis by the detection of the delta F508 CFTR gene mutation in a prematurely delivered boy. *Clin Genet.* 1991;39(3):219-22.

- 87. Mättö J, Saarela M, von Troil-Lindén B, Könönen E, Jousimies-Somer H, Torkko H, Alaluusua S, Asikainen S.** Distribution and genetic analysis of oral *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11(2):96-102.
- 88. Mättö J, Asikainen S, Väisänen ML, Rautio M, Saarela M, Summanen P, Finegold S, Jousimies-Somer H.** Role of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in extraoral and some odontogenic infections. *Clin Infect Dis*. 1997;25 Suppl 2:S194-8.
- 89. Mättö J, Asikainen S, Väisänen ML, von Troil-Lindén B, Könönen E, Saarela M, Salminen K, Finegold SM, Jousimies-Somer H.** Beta-lactamase production in *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Prevotella pallens* genotypes and in vitro susceptibilities to selected antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(10):2383-8.
- 90. Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzky JT, Davis CW, Boucher RC.** Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell*. 1998;95(7):1005-15.
- 91. McKay K, Wilcken B.** Newborn screening for cystic fibrosis offers an advantage over symptomatic diagnosis for the long term benefit of patients: the motion for. *Paediatr Respir Rev*. 2008;9(4):290-4.
- 92. McKennedy D, Pouliot KL, Wang Y, Murthy V, Ulrich M, Döring G, Lee JC, Goldmann DA, Pier GB.** Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science*. 1999;284(5419):1523-7.
- 93. Mishra A, Greaves R, Massie J.** The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. *Clin Biochem Rev*. 2005;26:135-53.
- 94. Moran A, Dunitz J, Nathan B, Saeed A, Holme B, Thomas W.** Cystic fibrosis-related diabetes: current trends in prevalence, incidence and mortality. *Diabetes Care*. 2009;32(9):1626-31.
- 95. Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Giménez T, Reis A, Varon-Mateeva R, Macek M Jr, Kalaydjieva L.** The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat Genet*. 1994;7:169-75.
- 96. Nagy E, Maier T, Urban E, Terhes G, Kostrzewa M; ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria.** Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(8):796-802.

- 97. Nielsen PE, Egholm M.** An introduction to peptide nucleic acid. *Curr Issues Mol Biol.* 1999;1(1-2):89-104.
- 98. Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O.** Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science.* 1991;254(5037):1497-500.
- 99. Nielsen PE, Egholm M.** Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications. *Horizon Scientific Press* 1999, Wymondham.
- 100. Okamoto M, Maeda N, Kondo K, Leung KP.** Hemolytic and hemagglutinating activities of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;178(2):299-304.
- 101. Oliveira K, Procop GW, Wilson D, Coull J, Stender H.** Rapid identification of *Staphylococcus aureus* directly from blood cultures by fluorescence in situ hybridization using PNA probes. *J Clin Microbiol.* 2002;40(1):247-51.
- 102. Oral Pathogen Sequence Databases.** Los Alamos National Laboratory. <http://oralgen.lanl.gov/oralgen/bacteria/pintnew/index.html> (besucht am 11.09.2009)
- 103. Park MK, Myers RA, Marzella L.** Oxygen tensions and infections: modulation of microbial growth, activity of antimicrobial agents, and immunologic responses. *Clin Infect Dis.* 1992;14(3):720-40.
- 104. Peckham D, Holland E, Range S, Knox AJ.** Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in lower airway epithelium from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis lung. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;232(2):464-8.
- 105. Pedersen SS, Jensen T, Pressler T, Høiby N, Rosendal K.** Does centralized treatment of cystic fibrosis increase the risk of *Pseudomonas aeruginosa* infection? *Acta Paediatr Scand.* 1986;75(5):840-5.
- 106. Pellestor F, Paulasova P.** The peptide nucleic acids (PNAs), powerful tools for molecular genetics and cytogenetics. *Eur J Hum Genet.* 2004;12(9):694-700.
- 107. Petersen NT, Høiby N, Mordhorst CH, Lind K, Flensburg EW, Bruun B.** Respiratory infections in cystic fibrosis patients caused by virus, chlamydia and mycoplasma – possible synergism with *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Paediatr Scand.* 1981;70(5):623-8.
- 108. Pier GB, Zaidi TS, Olsen JC, Johnson LG, Yankaskas JR, Goldberg JB.** Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science.* 1996;271(5245):64-7.

- 109. Poulsen JH, Fischer H, Illek B, Machen TE.** Bicarbonate conductance and pH regulatory capability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(12):5340-4.
- 110. Quinton PM.** Human genetics. What is good about cystic fibrosis? *Curr Biol*. 1994;4:742-3.
- 111. Quinton PM.** Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland. *Physiology*. 2007;22:212-25.
- 112. Ramsey B, Richardson MA.** Impact of sinusitis in cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol*. 1992;90(3 Pt 2):547-52.
- 113. Rasmussen H, Kastrup JS, Nielsen JN, Nielsen JM, Nielsen PE.** Crystal structure of a peptide nucleic acid (PNA) duplex at 1.7 Å resolution. *Nat Struct Biol*. 1997;4(2):98-101.
- 114. Ratjen F, Döring G.** Cystic Fibrosis. *Lancet*. 2003;361:681-9.
- 115. Ratjen FA.** Cystic fibrosis: pathogenesis and future treatment strategies. *Respir Care*. 2009;54(5):595-605.
- 116. Rave-Harel N, Madgar I, Goshen R, Nissim-Rafinia M, Ziadni A, Rahat A, Chiba O, Kalman YM, Brautbar C, Levinson D, Augarten A, Kerem E, Kerem B.** CFTR haplotype analysis reveals genetic heterogeneity in the etiology of congenital bilateral aplasia of the vas deferens. *Am J Hum Genet*. 1995;56(6):1359-66.
- 117. Ray A, Nordén B.** Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *FASEB J*. 2000;14(9):1041-60.
- 118. Reddy MM, Light MJ, Quinton PM.** Activation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) requires CFTR Cl<sup>-</sup> channel function. *Nature*. 1999;402(6759):301-4.
- 119. Rigby S, Procop GW, Haase G, Wilson D, Hall G, Kurtzman C, Oliveira K, von Oy S, Hyldig-Nielsen JJ, Coull J, Stender H.** Fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for rapid identification of *Candida albicans* directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol*. 2002;40(6):2182-6.
- 120. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC.** Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989;245(4922):1066-73.
- 121. Rogers GB, Carroll MP, Serisier DJ, Hockey PM, Jones G, Bruce KD.** 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*. 2004;42(11):5176-83.

- 122. Rolfe RD, Hentges DJ, Campbell BJ, Barrett JT.** Factors related to the oxygen tolerance of anaerobic bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1978;36(2):306-13.
- 123. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui LC, Collins FS.** Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science.* 1989;245(4922):1059-65.
- 124. Rommens JM, Burns J, Melmer G, Riordan JR, Buchwald M.** Identification of sequences of chromosome 7 that are expressed in sweat gland epithelial cells. *Hum Genet.* 1990;85(2):151-6.
- 125. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ.** Cystic Fibrosis. *N Engl J Med.* 2005;352(19):1992-2001.
- 126. Rubin BK.** Mucus, phlegm and sputum in cystic fibrosis. *Respir Care.* 2009;54(6):726-32.
- 127. Saiman L, Prince A.** *Pseudomonas aeruginosa* pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *J Clin Invest.* 1993;92(4):1875-80.
- 128. Santos SG, Diniz CG, Silva VL, Martins WA, Cara DC, Souza NC, Serufo JC, Nicoli JR, Carvalho MA, Farias LM.** Effects of oxidative stress on the virulence profile of *Prevotella intermedia* during experimental infection in gnotobiotic mice. *J Med Microbiol.* 2007;56(Pt 3):289-97.
- 129. Schaumann R, Rodloff AC.** Diagnostik, Identifizierung und Empfindlichkeitsprüfung von obligaten Anaerobiern. *Chemoter J.* 2007;16:75-87.
- 130. Schweickert B, Moter A, Lefmann M, Göbel UB.** Let them fly or light them up: matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry and fluorescence in situ hybridization (FISH). *APMIS.* 2004;112(11-12):856-85.
- 131. Schwiebert EM, Morales MM, Devidas S, Egan ME, Guggino WB.** Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(5):2674-9.
- 132. Scotet V, de Braekeleer M, Roussey M, Rault G, Parent P, Dagome M, Journal H, Lemiogne A, Codet JP, Catheline M, David V, Chaventré A, Duguépéroux I, Verlingue C, Quéré I, Mercier B, Audrézet MP, Férenc C.** Neonatal screening for cystic fibrosis in Brittany, France: assessment of 10 years' experience and impact on prenatal diagnosis. *Lancet.* 2000;356(9232):789-94.

- 133. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D.** Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. *Clin Inf Dis.* 2009;49:543-51.
- 134. Shah HN, Gharbia SE.** Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1992;42(4):542-6.
- 135. Shapiro GD, Milmoe GJ, Wald ER, Rodman JB, Bowen A.** Bacteriology of the maxillary sinuses in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 1982;146:589-93.
- 136. Sharer N, Schwarz M, Malone G, Howarth A, Painter J, Super M, Braganza J.** Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *N Engl J Med.* 1998;339(10):645-52.
- 137. Sharma GD, Doershuk CF, Stern RC.** Erosion of the wall of the frontal sinus caused by mucopyocele in cystic fibrosis. *J Pediatr.* 1994;124(5 Pt 1):745-7.
- 138. Shibata Y, Fujimura S, Nakamura T.** Purification and partial characterization of an elastolytic serine protease of *Prevotella intermedia*. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59(7):2107-11.
- 139. Shin YK, Jeong SU, Yoo SY, Kim MK, Kim HS, Kim BO, Kim DK, Hwang HK, Kook JK.** Pi30 DNA probe may be useful for the identification of *Prevotella intermedia* at the species strain level. *Microbiol Immunol.* 2004;48(12):931-6.
- 140. Shwachman H, Mahmoodian A.** Pilocarpine iontophoresis sweat testing results of seven years' experience. *Bibl Pediatr.* 1967;86:158-82.
- 141. Sims EJ, McCormick J, Mehta G, Mehta A.** Neonatal screening for cystic fibrosis is beneficial even in the context of modern treatment. *J Pediatr.* 2005;147 Suppl 3:S42-6.
- 142. Sims EJ, Mugford M, Clark A, Aitken D, McCormick J, Mehta G.** Economic implications of newborn screening for cystic fibrosis: a cost of illness retrospective cohort study. *Lancet.* 2007;369:1187-95.
- 143. Siret D, Bretaudeau G, Branger B, Dabadie A, Dagonne M, David V, de Braekeleer M, Moisan-Petit V, Picherot G, Rault G, Storni V, Roussey M.** Comparing the clinical evolution of cystic fibrosis screened neonatally to that of cystic fibrosis diagnosed from clinical symptoms: a 10-year retrospective study in a French region (Brittany). *Pediatr Pulmonol.* 2003;35(5):342-9.

- 144. Sitzmann FK.** Pädiatrie. *Thieme*, Stuttgart 2002.
- 145. Sleigh MA, Blake JR, Liron N.** The propulsion of mucus by cilia. *Am Rev Respir Dis.* 1988;137(3):726-41.
- 146. Southern KW, Mérelle MM, Dankert-Roelse JE, Nagelkerke AD.** Newborn screening for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009;21(1):CD001402.
- 147. Stender H, Mollerup TA, Lund K, Petersen KH, Hongmanee P, Godtfredsen SE.** Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* in smear-positive sputum samples by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using peptide nucleic acid (PNA) probes. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1999;3(9):830-7.
- 148. Stender H, Lund K, Petersen KH, Rasmussen OF, Hongmanee P, Miørner H, Godtfredsen SE.** Fluorescence *in situ* hybridization assay using peptide acid probes for differentiation between tuberculous and nontuberculous mycobacterium species in smears of mycobacterium cultures. *J Clin Microbiol.* 1999;37(9):2760-5.
- 149. Stern RC.** The diagnosis of cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 1997;336(7):487-91.
- 150. Stîngu CS, Rodloff AC, Jentsch H, Schaumann R, Eschrich K.** Rapid identification of oral anaerobic bacteria cultivated from subgingival biofilm by MALDI-TOF-MS. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23(5):372-6.
- 151. Stutts MJ, Knowles MR, Gatzky JT, Boucher RC.** Oxygen consumption and ouabain binding sites in cystic fibrosis nasal epithelium. *Pediatr Res.* 1986;20(12):1316-20.
- 152. Sunde PT, Olsen I, Göbel UB, Theegarten D, Winter S, Debelian GJ, Tronstad L, Moter A.** Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of bacteria in periapical lesions of asymptomatic root-filled teeth. *Microbiology.* 2003;149(Pt 5):1095-102.
- 153. Tally FP, Goldin BR, Jacobus NV, Gorbach SL.** Superoxide dismutase in anaerobic bacteria of clinical significance. *Infect Immun.* 1977;16(1):20-5.
- 154. Tariverdian G, Buselmaier W.** Humangenetik. *Springer*, Berlin 2004.
- 155. Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton RR, Schumm JW, Eiberg H, Mohr J, Kennedy D, Plavsic N, Zsiga M, Markiewicz D, Akots G, Brown V, Helms C, Gravins T, Parker T, Rediker K, Donis-Keller H.** Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science.* 1985;230(4729):1054-7.

- 156. Tunney MM, Field TR, Moriarty TF, Patrick S, Doering G, Muhlebach MS, Wolfgang MC, Boucher R, Gilpin DF, McDowell A, Elborn JS.** Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis. *Am Resp J Crit Care Med.* 2008;177(9):995-1001.
- 157. US National Newborn Screening and Genetics Resource Centre.** National newborn screening status report. <http://genes-r-us.uthscsa.edu/nbsdisorders.htm> (besucht am 22.05.2010)
- 158. van Baar BL.** Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray mass spectrometry. *FEMS Microbiol Rev.* 2000;24(2):193-219.
- 159. van den Berg JM, Kouwenberg JM, Heijerman HG.** Demographics of glucose metabolism in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2009;8(4):276-9.
- 160. van Winkelhoff AJ, Winkel EG, Barendregt D, Dellemijn-Kippuw N, Stijne A, van der Velden U.** Beta-Lactamase producing bacteria in adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1997;24(8):536-43.
- 161. van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M.** Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol.* 2005;32(8):893-8.
- 162. Walker CB.** The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal microflora. *Periodontol 2000.* 1996;10:79-88.
- 163. Welsh MJ, Smith AE.** Cystic fibrosis. *Sci Am.* 1995;273(6):52-9.
- 164. Williams B, Stender H, Coull JM.** PNA fluorescent *in situ* hybridization for rapid microbiology and cytogenetic analysis. *Methods Mol Biol.* 2002;208:181-93.
- 165. 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.** Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway. Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest.* 2002;109(3):317-25.
- 166. Worlitzsch D, Rintelen C, Böhm K, Wollschläger B, Merkel N, Borneff-Lipp M, Döring G.** Antibiotic-resistant obligate anaerobes during exacerbations of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15(5):454-60.
- 167. Wright SW, Morton NE.** Genetic Studies on cystic fibrosis in Hawaii. *Am J Hum Genet.* 1968;20(2):157-69.

**168. Yanagisawa M, Kuriyama T, Williams DW, Nakagawa K, Karasawa T.** Proteinase activity of *Prevotella* species associated with oral purulent infection. *Curr Microbiol.* 2006;52(5):375-8.

**169. Yu F, Iyer D, Anaya C, Lewis JP.** Identification and characterization of a cell surface protein of *Prevotella intermedia* 17 with broad-spectrum binding activity for extracellular matrix proteins. *Proteomics.* 2006;6(22):6023-32.

## **Danksagung**

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Gerd Döring für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung und sein ständiges Interesse an meiner Arbeit.

Frau Dr. Martina Ulrich, die mir von den Anfängen dieser Arbeit bis zum Schluss mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat, mich immer unterstützt und sich für mich eingesetzt hat, danke ich für die gute Betreuung.

Frau Maria Haug danke ich für die Einführung in die Laborarbeit, die Durchführung der ELISA-Tests und ihre Hilfsbereitschaft.

Frau Dr. Ulrike Schumacher danke ich für die Überlassung der zahlreichen Bakterienstämme aus der Stammsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene Tübingen.

Bei Herrn Peter Braitmaier bedanke ich mich für die Durchführung der MALDI-TOF-Messungen.

Außerdem danke ich dem gesamten Team des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene Tübingen in der Wilhelmstr. 31 für die gute Zusammenarbeit.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich nicht nur während meines Studiums und der Dissertation unterstützt hat. Besonderer Dank gilt dabei meinen Eltern und meinem Freund Philipp.