

Aus dem Institut für Infektionsmedizin
(Direktor: Prof. Dr. med. Helmut Fickenscher)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**SERUMRESISTENZEIGENSCHAFTEN VON *PSEUDOMONAS-AERUGINOSA*-
STÄMMEN AUS PNEUMONIE- UND AUS RESPIRATORISCHEN
KOLONISATIONSPROZESSEN**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

SONJA SCHEUß

aus Bremen

Kiel, 2009

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. H. Sahly, PhD

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. N. Weiler

Tag der mündlichen Prüfung:

16.04.2010

Zum Druck genehmigt:

Kiel, den 16.04.2010

gez.: Prof. Dr. Eberhardt Hildt

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Für meinen Vater
Hans-Jürgen Scheuß

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	4
2.1. MATERIAL	4
2.1.1. Geräte	4
2.1.2. Kleingeräte und Chemikalien	4
2.2. METHODEN	5
2.2.1. Bakterien	5
2.2.2. Stammhaltung	5
2.2.3. O-Typisierung	5
2.2.4. Serumgewinnung	5
2.2.5. Bestimmung der Serumempfindlichkeit	6
2.2.6. Statistische Auswertung	7
3. ERGEBNISSE	8
3.1. Serumresistenzverhalten	8
3.2. Häufigkeitsverteilung von O-Serogruppen in Beziehung zu Serumresistenz- eigenschaften	11
4. DISKUSSION	14
5. ZUSAMMENFASSUNG	17
6. LITERATURVERZEICHNIS	18
7. DANKSAGUNG	27
8. LEBENSLAUF	28

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BHI	Brain-Heart-Infusion
CBL	China-Blau-Laktose-Agar
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CFU	Colony-forming unit
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	Membrane-Attack-Complex

1. EINLEITUNG

Das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* ist ein gramnegatives, aerobes, nichtfermentierendes Stäbchenbakterium und gehört zu der Familie der *Pseudomonadaceae*. 1882 gelang Gessard die Züchtung von *Bacillus pyocyaneus* in Reinkultur (Gessard, 1882). Migula prägte 1894 den Begriff *Pseudomonas* (Migula, 1894).

P. aeruginosa ist ein opportunistisches Bakterium (Pollack, 1984; Lyczak et al., 2000), das als Nass- und Pfützenkeim ubiquitär in der Umwelt vorkommt (Green et al., 1974; Glazebrook et al., 1978). Kürzlich wurde auch die Präsenz von *P. aeruginosa* im offenen Meer bewiesen (Khan et al., 2007). Problematisch in nosokomialer Umgebung ist die Besiedlung von Bettgestellen, Waschbecken und die Übertragung direkt durch das Krankenhauspersonal (Lyczak et al., 2000).

Diese Ubiquität spiegelt sich auch in den verschiedenen Krankheitsbildern wider, die dieser humanpathogene Keim verursacht (Giamarellou, 2000). *P. aeruginosa* ist Auslöser von Endokarditiden (Morpeth et al., 2007), Otitis externa („swimmer`s ear“) (Cheffins et al., 2009), ulzerativer Keratitis bei Kontaktlinsenträgern und traumatischer Endophthalmitis (Green & Stapleton, 2008). Das Bakterium kolonisiert häufig abwehrgeschwächte und immunsupprimierte Personen, wie zum Beispiel Patienten mit Verbrennungen, zystischer Fibrose, akuter Leukämie und Organtransplantierte (Driscoll et al., 2007; Murray et al., 2007; Bodey et al., 1983).

P. aeruginosa gehört mit einer Rate von bis zu 28% zu den häufigsten Erregern nosokomialer Infektionen wie Pneumonie und Sepsis (Spencer, 1996; Gaynes & Edwards, 2005, Richards et al., 1999). In der EPIC-Studie (European Prevalence of Infection in Intensive Care Study) von Spencer konnte 1996 gezeigt werden, dass die häufigsten nosokomialen Infektionen auf Intensivstationen Pneumonien (46%) sind. Als Haupterreger aller nosokomialen Infektionen wurden *Staphylococcus aureus* (30%) und *P. aeruginosa* (28%) isoliert (Spencer, 1996; Gaynes & Edwards, 2005; Lizioli et al., 2003; Erbay et al., 2003). Solche Pneumonien sind besonders gefürchtet, da sie mit einer hohen Sterblichkeit behaftet sind, welche die Mortalität anderer nosokomialer Infektionen übersteigt (Torres et al., 1990). Es wird angenommen, dass Infektionen durch *P. aeruginosa* bei asymptomatischen Trägern im Rahmen eines schweren Grundleidens und während des Aufenthalts auf der Intensivstation begünstigt werden (Fagon & Chastre, 2003). Als Hauptrisiko für das Auftreten nosokomialer Pneumonien gelten die künstliche Beatmung (Richards et al., 2000; Chastre & Fagon, 2002) und die Länge der Beatmungszeit (Cook et al., 1998). Weitere Risikofaktoren sind unter anderen ein verminderter Allgemeinzustand, akute Erkrankungen, invasive Verfahren wie zentralvenöse Katheter, Antibiotikatherapie und

Immunsuppression (Vincent, 2003). Ein letaler Ausgang sowohl ambulant als auch nosokomial erworbener Pneumonien ist signifikant mit einem Alter über 70 Jahren und einer Besiedlung mit *P. aeruginosa* assoziiert (Almirall et al., 1995).

Ein weiteres Problem stellt das weltweite Auftreten von Multiresistenzen von *P. aeruginosa* gegen Antibiotika dar (Gaynes & Edwards, 2005). Zu den Mechanismen dieser Mehrfachresistenz gehören die Bildung einer relativ impermeablen äußeren Membran, das Wachstum als Biofilm und die Fähigkeit, bestimmte Antibiotika wieder aus der Zelle transportieren zu können (Hauser & Sriram, 2005). Kreuzübertragungen zwischen Patienten und Selektion bei ausbleibendem Erfolg einer Antibiotikatherapie wirken prädisponierend für die Entwicklung von Multiresistenzen und die Etablierung nosokomialer Erreger (Carmeli et al., 1999). Dies kann die hohe Prävalenz multiresistenter *P.-aeruginosa*-Stämme von bis zu 9,8% unter bestimmten Patientenkollektiven erklären (Galliene et al., 2007).

Die Entwicklung einer nosokomialen Infektion hängt im Wesentlichen von der Kolonisation mit pathogenen oder potentiell pathogenen Bakterien und von der Stärke des Immunsystems ab. Das pathogene Potential des kolonisierenden Bakteriums wird durch sein Vermögen bestimmt, verschiedene Virulenzfaktoren zu bilden.

Zu den Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* zählen unter anderem die Besiedlung des Wirtsorganismus ermöglichende verschiedene bakterielle Oberflächenstrukturen wie Pili und Flagellin (Sato et al., 1988). Flagellin besitzt eine duale Rolle in der Pathogenese von *P.-aeruginosa*-Infektionen, da einerseits Flagellin für die akute Phase der Infektion benötigt wird, aber andererseits wegen des hohen Antigenpotentials zwecks Maskierung vor dem Immunsystem in der chronischen Phase supprimiert wird (Wolfgang et al., 2004). Für die Zerstörung und Invasion von infiziertem Gewebe besitzt *P. aeruginosa* verschiedene extrazelluläre Enzyme, darunter die alkalische Protease (Engel et al., 1998), Elastase (Bejarano et al., 1989), Phospholipase C und Exotoxin A. Diese Enzyme sind an der systemischen Ausbreitung des Bakteriums beteiligt (Wieland et al., 2002). Das Typ-III-Sekretionssystem ermöglicht es dem Bakterium, bakterielle Effektorproteine direkt in die Wirtszelle zu schleusen (Hueck, 1998).

Die äußere Membran der gramnegativen Bakterien besteht größtenteils aus Lipopolysacchariden (LPS). Der distale Teil der LPS-Kette besteht aus repetitiven Zuckereinheiten, welche die sogenannte O-Seitenkette (O-Antigene) bilden. Aufgrund der Variabilität der O-Antigene wird *P. aeruginosa* serologisch in 14 verschiedene O-Serotypen eingeteilt. O-Seitenketten-bildende Stammvarianten erscheinen kulturell eher schleimig und werden als S-Formen (smooth LPS) bezeichnet. Die selteneren O-Antigen-armen oder -losen Varianten bilden raue Kolonien und sind als R-Formen (rough LPS) bekannt

(Rocchetta et al., 1999). Die O-Seitenkette des Lipopolysaccharids (LPS) besitzt große Bedeutung in der Pathogenität vieler gramnegativer Bakterien vor allem im Kontext von respiratorischen und ophthalmologischen Infektionen (Priebe et al., 2004; Rivera et al., 1988; Cryz et al. 1984). Angesichts der Beobachtung, dass LPS-defiziente *P.-aeruginosa*-Stämme serumempfindlicher waren als der Wildtyp (Dasgupta et al., 1994), geht man von einer Vermittlung der Serumresistenz durch die LPS aus (Dasgupta et al., 1994; Hancock et al., 1983). Auch die erfolgreiche intranasale Immunisierung mit *P.-aeruginosa*-O-Antigen weist auf eine enge Interaktion zwischen den O-Seitenketten und dem menschlichen Immunsystem hin. In einigen Fällen konnte auch eine bestehende Infektion durch die Impfung therapiert werden: Die Opsonierung und Abtötung der Bakterien war aber nur unter Anwesenheit von Komplement möglich (DiGiandomenico et al., 2007).

Das Komplementsystem des menschlichen Serums ist ein wichtiger Bestandteil des humoralen angeborenen Immunsystems. Es spielt eine große Rolle bei der Elimination bakterieller Invasoren, indem es die Mikroben opsoniert und lysieren kann. Es besteht aus proteolytischen, sich nacheinander kaskadenartig aktivierenden Enzymen. Am Ende der Kaskade bilden die letzten Spaltprodukte den „Membrane Attack Complex“ (MAC), der zur Perforation der Zellmembran und somit zur Lyse des Bakteriums führt (Rus et al., 2005). Das aktivierte Komplement-Protein C3a wirkt sowohl gegen grampositive als auch gramnegative Bakterien unter physiologischen Bedingungen bakterizid; so ist C3a allein für sich in der Lage, die Plasmamembran von *P. aeruginosa* zu zerstören (Nordahl et al., 2004). Dies findet vor allem im Zusammenspiel mit Antikörpern und Granulozyten statt (Cooper & Nemerow, 1989), so dass das Komplementsystem als Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem fungiert (Rus et al., 2005).

Nach gängiger Lehrmeinung stellt die Fähigkeit eines Bakteriums, der bakteriziden Wirkung des Serums zu widerstehen, ein Virulenzmerkmal dar. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob das Serumresistenzverhalten von *P.-aeruginosa*-Stämmen mit dem Auftreten von Pneumonien assoziiert ist. Hierzu wurden *P.-aeruginosa*-Stämme aus Pneumonien und aus asymptomatischen Kolonisationsprozessen hinsichtlich ihrer Serumresistenzigenschaften und ihrer Serogruppenzugehörigkeit miteinander verglichen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, folgende Fragestellungen zu untersuchen:

1. Sind aus Pneumonie gewonnene *P.-aeruginosa*-Stämme serumresistenter als *P.-aeruginosa*-Kolonisations-Isolate?
2. Unterscheidet sich das O-Serotyp-Verteilungsmuster der Pneumonie-Isolate von dem der Kolonisations-Isolate?
3. Korreliert Serumresistenz mit bestimmten O-Serotypen?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Geräte

- Brutschrank, Typ B 50 (Mettler, Schwabach)
- Photometer, 1101 M, (Eppendorf)
- Zentrifuge, Minifuge GL (Heraeus Christ, Hanau)
- Wasserschüttelbad (Julabo SW- 20C)

2.1.2. Kleingeräte und Chemikalien

- Chinablau-Laktose-Agar (CBL; Oxoid, Wesel)
- Hirn-Herz-Agar (BHI; Difco, Hamburg)
- Hirn-Herz-Infusion (BHI-Bouillon; Difco)
- Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,2:

8,0 g NaCl	(MG 58,44)	(Merck)
1,58 g $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$	(MG 174,2)	(Merck)
0,34 g K_2HPO_4	(MG 136,09)	(Merck)

in 1000 ml Aqua dest., 15 min. bei 121 °C autoklaviert
- NaCl-Lösung
- Eppendorf-Pipetten mit sterilen Aufsätzen (10-100 μl , 50-250 μl , 100-1000 μl)
(Eppendorf Gerätebau, Hamburg)
- Finnpipette 5 ml mit sterilen Aufsätzen (Thermo Labsystems)
- Mikrotiterplatten (Nunclon Surface, Nunc, Apogent)
- Plastikröhrchen 10 ml und 50 ml, konische Spitze (Greiner, Nürtingen)
- Absaugvorrichtung
- Reagenzgläser
- Erlenmeyerkolben 10 ml (Schott, Duran)
- Kolonienzähler (Eydam, Bio; Kobe, Japan)
- Impföse

2.2. Methoden

2.2.1. Bakterien

Die 220 verwendeten *P.-aeruginosa*-Isolate stammen von Patienten der Intensivstation der pulmonologischen Klinik des Universitätsklinikums Kaunas, Litauen. 171 der *P.-aeruginosa*-Stämme wurden aus Bronchoalveolärer Lavage (BAL) und Trachealsekreten von an nosokomialer Pneumonie erkrankten Patienten isoliert. Die Diagnosestellung der Pneumonie erfolgte anhand der Kriterien des „Center of Disease Control and Prevention“ (CDC). 49 der *P.-aeruginosa*-Stämme wurden von hospitalisierten Patienten gewonnen, die keine Infektionssymptomatik zeigten (Kolonisation). Um objektive Versuchsergebnisse zu gewährleisten, erfolgte eine Verblindung der Herkunft der einzelnen Stämme nach Pneumonie und Kolonisation. Die Biotypisierung der Stämme erfolgte mittels API-20NE-System (bioMérieux, Nürtingen). Vor jeder Prüfung der Serumempfindlichkeit wurden die Bakterienstämme über Nacht bei 37°C in 10 ml BHI-Bouillon inkubiert und als Vorkultur verwendet.

2.2.2. Stammhaltung

Die zu untersuchenden Stämme wurden in Brain-Heart-Infusion-Bouillon (BHI) kultiviert, mit Glycerin versetzt (30/70 vv) und bei –80°C aufbewahrt. Für die Versuche wurden die Stämme aufgetaut, auf China-Blau-Laktose-Agar (CBL) bei 37°C für mindestens 18 h über Nacht kultiviert und danach auf mikrobiologische Reinheit geprüft.

2.2.3. O-Typisierung

Die Bestimmung der Serogruppen wurde von Dr. Astra Vitkauskiene, Institute for Biomedical Research, Kaunas, Litauen vorgenommen. Die O-Typisierung der Bakterien wurden bestimmt durch Agglutination mittels 14 verschiedener O-Antigen-spezifischer Antisera (Denka Seiken, Tokyo, Japan). Die 14 nach der Einteilung des „Committee for the Japanese *P. aeruginosa* Society“ alphabetisch geordneten O-Serogruppen A-N entsprechen dem Lanyi-Bergan numeralen Schema (Homma, 1982).

2.2.4. Serumgewinnung

Das Blut von 70 gesunden Spendern wurde zwecks Gerinnung für eine Stunde bei Raumtemperatur aufbewahrt und danach zentrifugiert (1800 xg, 10min). Bei der weiteren Verarbeitung wurden die Seren dekantiert, gepoolt, steril filtriert (Membranfilter Porengröße 0,2 µm) und anschließend bei –80°C eingefroren.

2.2.5. Bestimmung der Serumempfindlichkeit

Für die Untersuchung der Serumempfindlichkeit der *P.-aeruginosa*-Stämme wurde die leicht modifizierte Methode nach Hughes et al. (Hughes et al., 1982) verwendet.

Von der am Vortag hergestellten Vorkultur (ca. 18 h bei 37°C) wurden 100 µl in 10 ml BHI Bouillon überimpft und im Schüttelbad bei 37°C bis zur frühlogarithmischen Phase inkubiert. Anschließend wurde zur Bestimmung der Keimzahl per Photometer die optische Dichte der Bouillon anhand der Extinktion bei 578 nm unter Zuhilfenahme einer zuvor erstellten Eichkurve gemessen. Danach erfolgte eine 1:10-Verdünnung in PBS-Lösung (pH 7,2) zum dreimaligem Waschen der Bakterien. Hierfür wurde die verdünnte Bakterienkultur jeweils 10 min bei 1800 xg zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, die Kultur erneut mit PBS-Lösung (pH 7,2) verdünnt und homogenisiert. Nach dem Waschen wurde die Keimzahl auf 2×10^6 / ml in 10 ml PBS eingestellt.

Anschließend wurden 50 µl Bakteriensuspension der jeweiligen Stämme mit 150 µl Poolserum auf Mikrotiterplatten pipettiert, vermischt und bei 37°C gehalten. Für die weitere Untersuchung wurden nun jeweils 50 µl des Gemischs sofort (t0) auf BHI-Agarplatten ausgestrichen. Nach der ersten, zweiten und dritten folgenden Stunde (t1, t2, t3) wurden jeweils 25 µl Bakteriensuspension unverdünnt und je 100 µl in einer Verdünnung von 1:100 und 1:1000 erneut auf BHI-Agarplatten aufgetragen. Alle Stämme wurden pro Versuch doppelt getestet. Nach Bebrütung der Platten über Nacht bei 37°C erfolgte die Ermittlung der Anzahl der Kolonien als Maß für die im Serum gewachsenen Bakterien. Die Überlebensrate der Bakterien in Anwesenheit von Serum wurde nach Hughes et al. in sechs Grade eingeteilt (Abbildung 1):

Grad 1: CFU nach 1 und 2 h < 10%, nach 3 h < 0,1% des Inokulums

Grad 2: CFU nach 1 und 2 h < 100%, nach 3 h < 10% des Inokulums

Grad 3: CFU nach 1 h > 100%, nach 2 und 3 h < 100% des Inokulums

Grad 4: CFU nach 1 und 2 h > 100%, nach 3 h < 100% des Inokulums

Grad 5: CFU nach 1, 2 und 3 h > 100% (jedoch Abnahme der CFU einmal innerhalb dieser Stunden)

Grad 6: CFU nach 3 h > 100% (stetiger Anstieg der CFU-Anzahl)

Gemäß dieser Einteilung wurden Grad 1 und 2 als serumempfindlich, Grad 3 und 4 als mäßig serumresistent und die Grade 5 und 6 als serumresistent eingestuft.

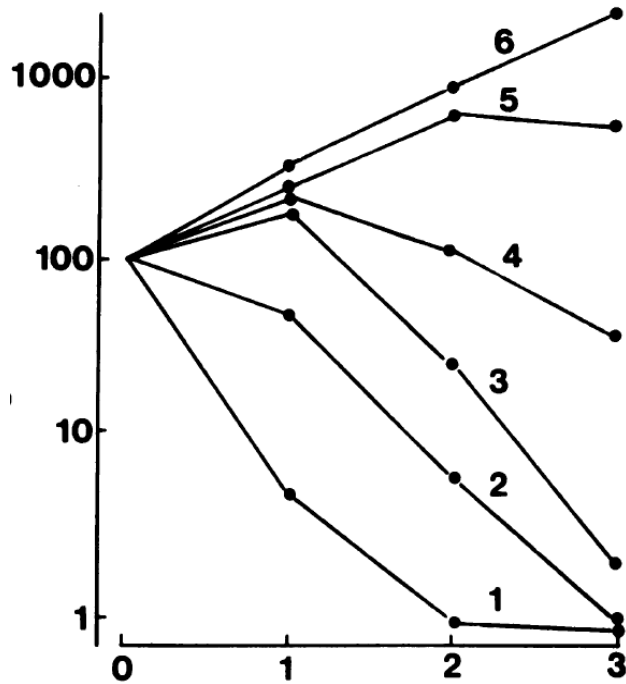


Abbildung 1: Gradeinteilung der Serumempfindlichkeit (nach Hughes et al., 1982)

In einer weiteren Analyse des Serumresistenzverhaltens wurden lediglich die Grad-1-Stämme, die nach 2 h eine 1-2 \log_{10} Wachstumsreduktion zeigten, als serumempfindlich bewertet, während alle andere Stämme als serumresistent galten.

Als Kontrollstämmen dienten jeweils ein serumempfindlicher (Grad 1) und ein serumresistenter (Grad 6) *Klebsiella pneumoniae*-Stamm.

2.2.6. Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse zur Berechnung der Signifikanz zwischen den einzelnen Untersuchungskollektiven wurde Yates' korrigierter Chi-Quadrat-Test für Zweifeldertafeln benutzt, bei Besetzung von Feldern mit <5 Beobachtungen wurde Fisher's exakter Test angewandt. Hierbei galten p-Werte <0,05 als statistisch signifikant. Als Maß für die Assoziation wurden 95% Konfidenzintervall (CI) und odds ratio (OD) bestimmt.

3. ERGEBNISSE

Insgesamt wurden 171 *P-aeruginosa*-Isolate aus Pneumonieprozessen und 49 aus dem Respirationstrakt asymptomatischer Patienten untersucht. Die Ergebnisse des Serumresistenzverhaltens der Isolate und die Verteilungsmuster der O-Serogruppen sind im Folgenden dargelegt.

3.1. Serumresistenzverhalten

Das Serumresistenzverhalten der Isolate wurde in zwei Stufen analysiert. Nach der ersten Analyse-Stufe wurden die Stämme, welche die Serumresistenzgrade 1 & 2 nach Hughes aufwiesen als serumempfindlich bewertet. Isolate, welche die Serumresistenzgrade 3 & 4 aufwiesen, wurden als mäßig serumresistent, die der Grade 5 & 6 als serumresistent bewertet.

Ausgehend von der Annahme, dass bereits eine gering ausgeprägte in vitro messbare Serumresistenz \geq Grad 2 nach Hughes et al. (Hughes et al., 1982) in vivo klinisch relevant sein kann, wurden die untersuchten Isolate in der zweiten Analyse-Stufe nur in zwei Gruppen unterteilt. Die serumempfindliche Gruppe umfasste sämtliche Isolate mit dem Grad 1 der Serumresistenzenteilung nach Hughes et al. (Hughes et al., 1982), Stämme mit den Serumresistenzgraden 2-6 wurden als serumresistent bewertet. Entsprechend dieser Analyse zeigte sich folgendes Bild:

Nach der ersten Analysestufe zeigte sich, dass sich unter beiden Stammkollektiven mehr serumempfindliche (56,1%, n= 96/171; 73,46%, n= 36/49) als mäßig serumresistente (30,4%, n=52/171; 14,28%, n=7/49) und serumresistente (13,45%, n=23/171; 10,2%, n=5/49) Stämme befanden (Tabelle1). Zudem war der Anteil der serumempfindlichen Stämme unter den Pneumonie-Isolaten (56,1%, n=96/171) geringer als unter den Kolonisations-Isolaten (73,46%, n=36/49) (Tabelle1, Abbildung 2). Die statistische Analyse ergab eine odds ratio von 2,163, bei einem 95%-Konfidenzintervall von 1,072-4,368. Diese Werte weisen darauf hin, dass die Kolonisationsisolate im Vergleich zu den Pneumonieisolaten eine durchschnittlich 2,163 höhere Chance haben, serumempfindlich zu sein. Diese Ergebnisse sind signifikant ($p=0,03$).

Bei der Bewertung der Stämme als serumempfindlich (Grad 1) und der übrigen Stämme als serumresistent (Grad 2-6), ergab sich eine signifikant höhere Anzahl serumempfindlicher Stämme unter den Kolonisations-Isolaten (38,8%, n=19/49) als bei den Stämmen aus Pneumonieprozessen (22,8%, n=39/171) ($p=0,0289$; OR=2,144; 95% CI=1,089-4,368) (Tabelle 2, Abbildung 3). Entsprechend der Ergebnisse der statistischen Analyse ist davon

auszugehen, dass die Kolonisationsisolate mit einer durchschnittlichen signifikant höheren Chance von 2,144 serumempfindlicher sind als die Pneumonieisolate ($p=0,0289$).

Tabelle 1: Häufigkeitsverteilung von Serumresistenzigenschaften von *P.-aeruginosa*-Stämmen aus Pneumonieprozessen und asymptomatischen Kolonisationen

Quelle	n	<u>% der getesteten Stämme (n)</u>		
		serum-empfindlich (Grad 1-2)	mäßig serum-resistent (Grad 3-4)	serum-resistent (Grad 5-6)
Pneumonie	171	56,1 (96)*	30,4 (52)	13,45 (23)
Kolonisation	49	73,46 (36)	14,28 (7)	10,2 (5)

*Signifikant geringerer Anteil serumempfindlicher Stämme unter Pneumoniestämmen verglichen mit Stämmen aus Kolonisationsprozessen ($p=0,03$; OR=2,163; 95% CI=1,072–4,368)

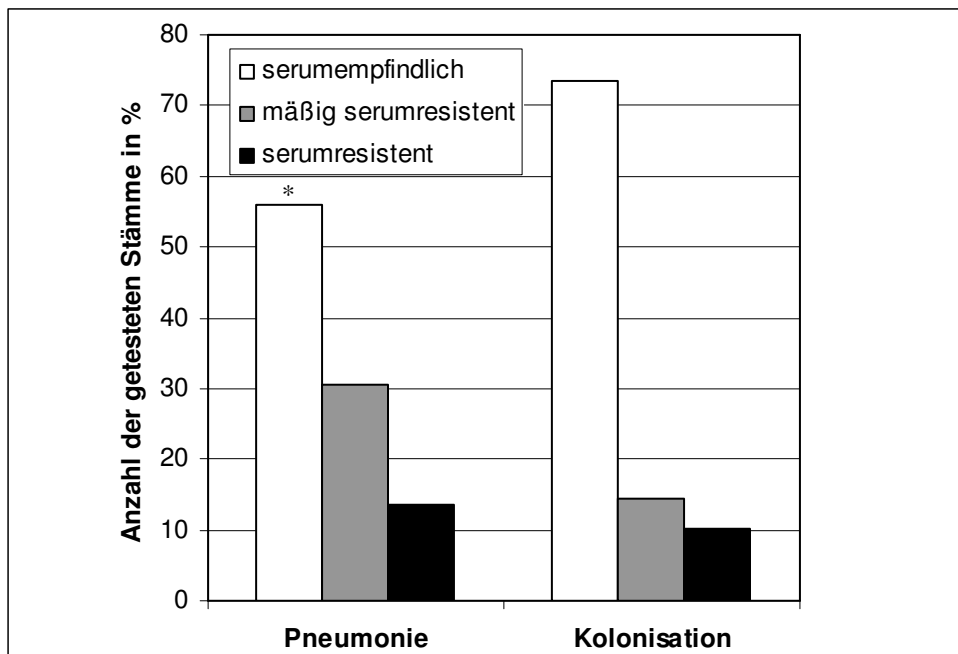


Abbildung 2: Häufigkeitsverteilung von Serumresistenzigenschaften von *P.-aeruginosa*-Stämmen aus Pneumonieprozessen und asymptomatischen Kolonisationen

*Signifikant geringere Häufigkeit serumempfindlicher Stämme bei den Pneumonie-Isolaten als bei den Isolaten aus Kolonisationsprozessen ($p=0,03$; OR=2,163; 95% CI=1,072–4,368)

Tabelle 2: Serumresistenzverhalten von *P. aeruginosa*: Vergleich von Kolonisations-Isolaten und Stämmen aus Pneumonieprozessen

Quelle	n	% der getesteten Stämme (n)	
		serumempfindlich ^a	serumresistent
Pneumonie	171	22,8 (39)*	77,2 (132)
Kolonisation	49	38,8 (19)	61,2 (30)

^a Stämme, die nach 2h eine Reduktion der CFU um 1 bis 2 log₁₀ zeigten

* Signifikant geringere Häufigkeit von serumempfindlichen Stämmen unter den Pneumonie-Stämmen als unter den Stämmen aus Kolonisationsprozessen (p=0,0289; OR=2,144; 95% CI=1,089–4,368)

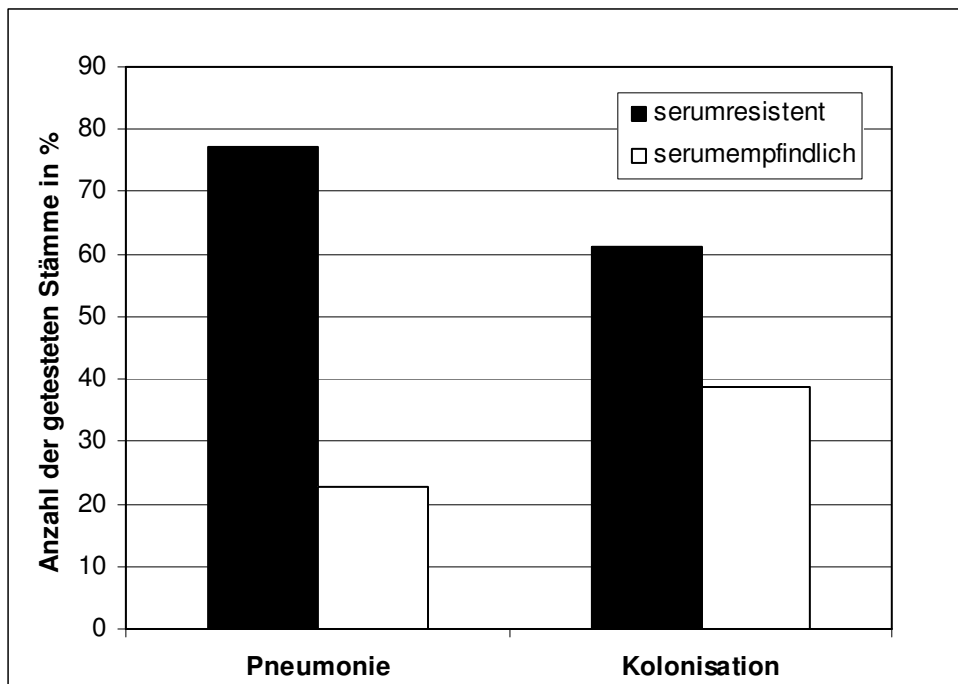


Abbildung 3: Häufigkeitsverteilung von Serumresistenzigenschaften bei Pneumonie- und Kolonisations-Isolaten

Als serumempfindlich wurden Stämme bewertet, die nach 2h eine Reduktion der CFU um 1 bis 2 log₁₀ zeigten

3.2. Häufigkeitsverteilung von O-Serogruppen in Beziehung zu Serumresistenz-eigenschaften

Unter der Annahme, dass die O-Antigene gramnegativer Bakterien eine Rolle bei der Ausprägung der Serumresistenz-eigenschaften spielen, und dass die verschiedenen O-Antigene diese Eigenschaften unterschiedlich stark beeinflussen, wurden die O-Antigen-Gruppen (Serogruppen) bei den untersuchten Stämmen bestimmt, und deren Verteilungsmuster in Assoziation mit den Serumresistenz-eigenschaften der beiden untersuchten Stammkollektiven analysiert.

Die Untersuchung der O-Serogruppen ergab eine Häufung von vier Serogruppen sowohl im Pneumonie-Kollektiv als auch im Kolonisations-Kollektiv: Hierzu zählten die Serogruppe A (11,7%, 20/171; 16,3%, n=8/49), Serogruppe B (21%, 36/171; 14,3%, n=7/49), Serogruppe E (24,6%, 42/171; 26,5%, n=13/49) und Serogruppe I (28%, n=48/171; 28,6%, n=14/49). Obwohl diese Unterschiede nicht in allen Fällen hoch signifikant waren ($p=0.05$), weisen die Ergebnisse auf eine mögliche Dominanz dieser Serogruppen hin. Die übrigen Serogruppen waren, außer der Serogruppe G, die 7,6% der Pneumoniestämme ausmachte, mit weniger als 4% vertreten (Tabelle 3, Abbildung 4).

Die Analyse einer möglichen Assoziation zwischen den Serumresistenz-eigenschaften und O-Serogruppen wurde mit den vier häufigsten Serogruppen A, B, E und I vorgenommen, da die Häufigkeit der anderen Serogruppen für die statistische Analyse zu gering war. Diese Analyse ergab, dass unter den Serogruppen A und B der Anteil serumempfindlicher Stämme signifikant niedriger war (13/28 und 13/45) als unter den Serogruppen E und I (44/62 und 39/55) (Tabelle 4, Abbildung 5). Diese Ergebnisse waren signifikant ($p<0.045$). Die Werte der odds ratio lagen zwischen 0,17 und 0,35, die 95% Konfidenzintervalle zwischen 0,072 und 0,91 und zeigen somit eine reduzierte Chance für die Serogruppe E und I, Serumresistenz zu vermitteln.

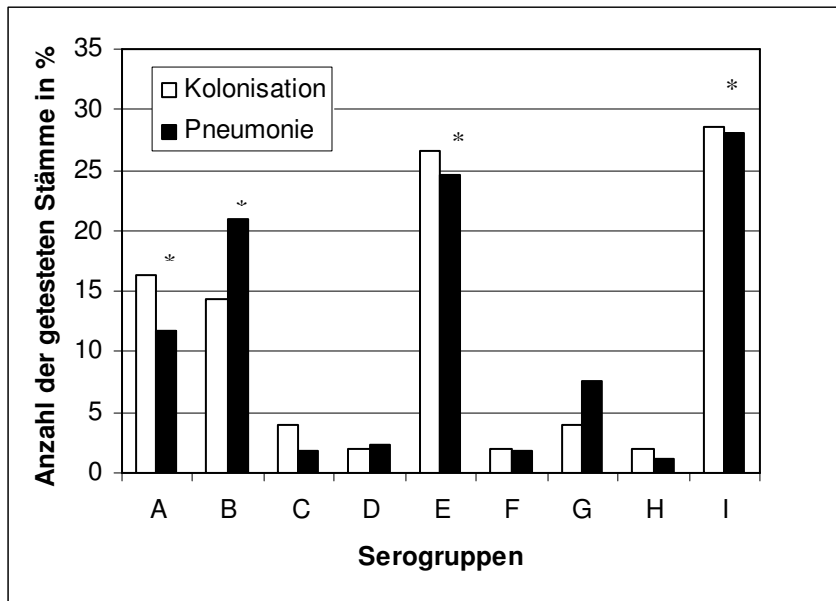


Abbildung 4: Häufigkeitsverteilung der Serogruppen unter Pneumonie- und Kolonisations-Isolaten. * höhere Anteile der Serogruppen in beiden Bakterienkollektiven

Tabelle 3: Häufigkeitsverteilung der O-Serogruppen bei Pneumonie- und Kolonisations-Isolaten

O-Serogruppe ^a	<u>% der getesteten Stämme (n)</u>	
	Kolonisation	Pneumonie
A*	16,3 (8/49)	11,7 (20/171)
B*	14,3 (7/49)	21,0 (36/171)
C	4,0 (2/49)	1,75 (3/171)
D	2,0 (1/49)	2,3 (4/171)
E*	26,5 (13/49)	24,6 (42/171)
F	2,0 (1/49)	1,75 (3/171)
G	4,0 (2/49)	7,6 (13/171)
H	2,0 (1/49)	1,2 (2/171)
I*	28,6 (14/49)	28,0 (48/171)

^aDie O-Serogruppen nach Homma (1982) korrespondierten wie folgt mit den Serogruppen nach Lanyi-Bergan: O:A (O:3); O:B (O:2); O:C (O:6); O:D (O:9); O:E (O:11); O:F (O:4); O:G (O:7); O:H (O:10); O:I (O:1)

*höhere Anteile der Serogruppen bei Pneumonie- und Kolonisations-Isolaten

Tabelle 4: Häufigkeit der O-Serogruppen bei serumempfindlichen und serumresistenten Stämmen

O-Serogruppe ^a	n	<u>Anzahl der getesteten Stämme (n)</u>		
		serum-empfindlich (Grad 1-2)	mäßig serum-resistent (Grad 3-4)	serum-resistent (Grad 5-6)
A	28	13*	10	5
B	44	13*	16	15
C	5	3	1	1
D	5	3	1	1
E	55	39	14	2
F	4	3	1	0
G	15	9	6	0
H	3	3	0	0
I	62	44	13	5

* Signifikant niedrigerer Anteil serumempfindlicher Stämme in den Serogruppen A und B als in die Serogruppen E und I ($p < 0,045$; OR zwischen 0,17 und 0,35; die 95% CI zwischen 0,072 und 0,91).

^a Die O-Serogruppen nach Homma (1982) korrespondierten wie folgt mit Serogruppen nach Lanyi-Bergan: O:A (O:3); O:B (O:2); O:C (O:6); O:D (O:9); O:E (O:11); O:F (O:4); O:G (O:7); O:H (O:10); O:I (O:1)

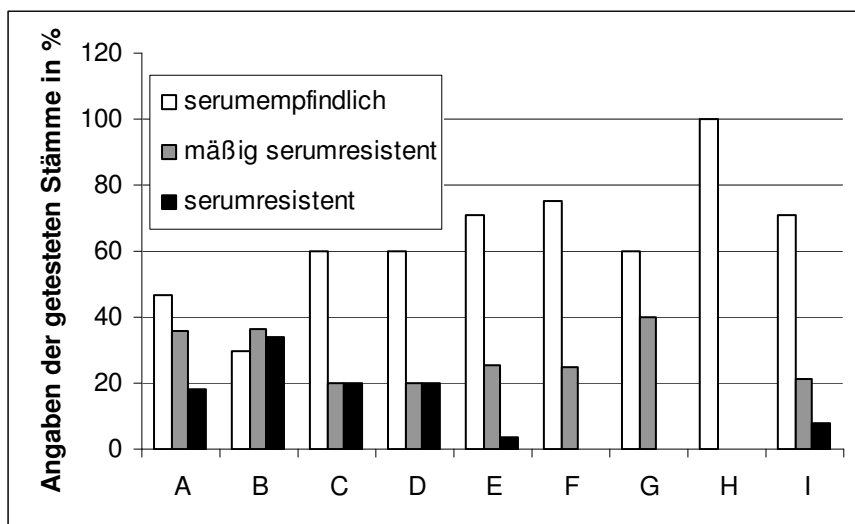


Abbildung 5: Häufigkeitsverteilung der Serogruppen bei serumempfindlichen und serumresistenten Stämmen

4. DISKUSSION

Als wichtiger Schritt im Infektionsprozess gilt die Fähigkeit der Bakterien, nach Überwindung der Mukosabarriere und dem Eintritt in die Blutbahn die bakterizide Wirkung des Serums zu umgehen. Die bakterizide Aktivität des menschlichen Serums wird in erster Linie durch die Proteine des Komplementsystems vermittelt und gehört zu den wichtigsten Faktoren des angeborenen Immunsystems. Kommensale Mikroorganismen sind in der Regel empfindlicher gegenüber dem menschlichen Serum als nosokomial vorkommende Erreger (Olling, 1977; Schoolnik et al., 1976; Simberkoff et al., 1976).

Die der Serumresistenz zugrunde liegenden Mechanismen sind noch nicht ausreichend geklärt. LPS-Moleküle der Bakterien scheinen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Serumresistenzeigenschaften zu spielen. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass *P.-aeruginosa*-Stämme mit intakten O-Seitenketten (smooth LPS) serumresistenter waren als Stämme mit rauen Seitenketten (rough LPS) (Rocchetta et al., 1999; Young & Armstrong, 1972; Schiller & Joiner, 1986). Sowohl serumresistente Bakterien als auch serumempfindliche Stämme aktivieren das Komplementsystem. Erstere scheinen aber im Gegensatz zu den serumempfindlichen Varianten in der Lage, das Anlagern des C5B-C9-Komplexes zu verhindern. Auf diesem Weg entgehen diese Stämme der Lyse durch den MAC des Komplementsystems (Schiller & Joiner, 1986). Murine In-vivo-Experimente zeigten, dass intakte O-Seitenketten von *P. aeruginosa* eine wichtige Rolle bei Korneainfektionen spielen (Preston et al., 1995; Tang et al., 1996). Diese Befunde lieferten die Grundlage für die Entwicklung eines 8-kovalenten O-Polysaccharid-Konjugat-Impfstoffs (Campbell et al., 1996).

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob das Serumresistenzverhalten von *P.-aeruginosa*-Stämmen mit dem Auftreten von Pneumonien assoziiert ist. Zu diesem Zweck wurde die Serumresistenzeigenschaft von *P.-aeruginosa*-Stämmen aus Pneumonie- und Kolonisationsprozessen von Intensivpatienten verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Häufigkeit von serumempfindlichen Stämmen bei den Kolonisations-Isolaten deutlich höher war als unter Pneumonie verursachenden Stämmen. Zudem zeigte die O-Serogruppierung der Stämme, dass in beiden Kollektiven die Serogruppen A, B, E und I am häufigsten vertreten waren. Unter den Serogruppen A und B war die Anzahl von serumempfindlichen Stämmen geringer als unter den untersuchten Stämmen der anderen Serogruppen.

Unter der Annahme, dass die Serumresistenzeigenschaft und die Expression von LPS mit intakten Seitenketten (smooth LPS) wichtige Virulenzfaktoren sind, weisen die hier vorgelegten Ergebnisse daraufhin, dass

- (1) Stämme aus Pneumonie-Prozessen über höheres pathogenes Potential, hier Serumresistenz, verfügen als Kolonisations-Isolate,

(2) Stämme der Serogruppen A und B serumresistenter als Stämme der anderen untersuchten Serogruppen (C-I) sind.

In der Lunge befindet sich jedoch nur wenig Komplement. Unter diesem Aspekt wäre die Serumresistenz eines Bakterienstammes für das Hervorrufen einer Pneumonie nur von sekundärer Bedeutung (z.B. während einer Sepsis). Tatsächlich war der Hauptteil der Stämme aus beiden Kollektiven, also auch aus den Pneumonie-Isolaten, serumempfindlich. Zudem waren 25% der Stämme aus Kolonisationsprozessen entweder intermediär resistent oder hoch serumresistent. Dies unterstützt die Hypothese, dass eventuell andere Virulenzfaktoren, z.B. Elastase, eine größere Rolle bei der Manifestation einer Infektion spielen. In der Tat wurde gezeigt, dass Elastase sowohl das sich in der Lunge und im Serum befindliche sekretorische Immunglobulin A (Heck et al., 1990; Hann & Holsclaw, 1976; Mestecky, 1987) als auch die Komplementproteine spaltet (Schultz & Miller, 1974). Es ist denkbar, dass bestimmte O-Antigengruppen neben der Serumresistenz auch Resistenzeigenschaften gegenüber anderen direkten und indirekten bakteriziden Komponenten vermitteln. Des Weiteren könnten auch serumempfindliche Stämme weitere Antigene exprimieren, die dem Bakterium Resistenzeigenschaften gegenüber anderen den Infektionsprozess beeinflussenden Komponenten des angeborenen Immunsystems verleihen. Die wichtigsten derartigen Komponenten des angeborenen Immunsystems der Lunge sind die C-Type-Lektine. Hierzu gehören der Mannose-Rezeptor von Makrophagen, die Surfactant Proteine A und D und das Mannose-bindende Lektin, das die Erkennung von opsonierten Mikroorganismen durch Granulozyten verstärkt (Sahly et al., 2008).

Dieses Gleichgewicht zwischen einerseits dem antibakteriellen Potential der humoralen und zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems und andererseits der Fähigkeit von Mikroorganismen, diese Komponenten zu umgehen, eine Infektion zu etablieren und aufrechtzuerhalten, wurde anhand von *Klebsiella-pneumoniae*-Serogruppen bereits intensiv untersucht: Es konnte gezeigt werden, dass die Expression bestimmter O-Antigen-Seitenketten die Interaktion des Bakteriums mit verschiedenen C-Typ-Lektinen (z.B. Mannose-Rezeptor der Makrophagen und Surfactant-Proteine A und D) beeinflusst sowie die Umgehung der Serumbakterizidie und der phagozytotischen Aktivität der polymorphkernigen Granulozyten vermittelt. So waren O1-*Klebsiella-pneumoniae*-Serotypen signifikant serumresistenter als andere O-Serotypen, z.B. O3 und O5 (Sahly et al., 2004). Diese Ergebnisse waren analog zu Ergebnissen anderer Experimente, in denen gezeigt wurde, dass der Kapselserotyp K2 deutlich weniger als andere K-Serotypen von Granulozyten und Makrophagen erkannt und phagozytiert wurde (Athamna et al., 1991; Podschun et al., 1992; Sahly et al., 2004).

Von besonderem Interesse in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass die repetitiven Zuckereinheiten der O1- bzw. K2-Seitenketten keine Mannose beinhalten, die durch die C-

Typ-Lektine erkannt werden. Es wurde gezeigt, dass Surfactantprotein A an mannosehaltige Kapselpolysaccharide von *K. pneumoniae* bindet und deren Phagozytose durch Alveolarmakrophagen ermöglicht (Kabha et al., 1997). Surfactantprotein D bindet vorzugsweise an das LPS mannosehaltiger O-Antigene unbekapselter Bakterien und augmentiert deren Phagozytose und Abtötung durch Makrophagen. Ausserdem führt Surfactantprotein D zu einer Agglutination der Keime und behindert deren Adhärenz an respiratorischen Epithelzellen (Keisari et al., 2001; Ofek et al., 2001; Sahly et al., 2002).

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Surfactant-Proteine A und D auch die Phagozytose von *P. aeruginosa* durch Alveolarmakrophagen verstärken (Mariencheck et al., 1999; Restrepo et al., 1999). In einer weiteren Studie fand sich, dass insbesondere die Interaktion zwischen rauhen *P.-aeruginosa*-Stämmen und Surfactantprotein D zu einem signifikanten Anstieg der Phagozytoseaktivität der Makrophagen und zu einer erhöhten Zytokinproduktion führt (Bufler et al., 2003). Die experimentelle Beobachtung, dass im Bronchialsekret von Patienten mit zystischer Fibrose geringere Mengen an Surfactantprotein A und D enthalten sind als bei Gesunden, legt die besondere Bedeutung von Surfactantprotein A und D in der Infektabwehr von *P. aeruginosa* nahe (Meyer et al., 2000). Diese Hypothese wird durch eine kürzlich veröffentlichte Arbeit unterstützt, in der festgestellt wurde, dass die Elimination von *P. aeruginosa* aus der Tränenflüssigkeit durch Surfactantprotein D begünstigt wird, und dass die Degradation von Surfactantprotein D durch *P.-aeruginosa*-Proteasen somit ein bakterielles Virulenzmerkmal darstellt (Munn et al., 2009). Erkenntnisse über einen Zusammenhang zwischen der molekularen Beschaffenheit der *P.-aeruginosa*-LPS und Bindung an Surfactantprotein D in Analogie zu den oben genannten Studien mit *Klebsiella pneumoniae* bestehen zum jetzigen Zeitpunkt nicht. Weitere Untersuchungen diesbezüglich sind notwendig.

In dieser Arbeit sollte die Serumresistenz als Virulenzfaktor in Pneumonie-Prozessen durch *P. aeruginosa* untersucht werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die Anzahl serumempfindlicher *P.-aeruginosa*-Stämme signifikant geringer unter den Pneumonie-Isolaten verglichen mit den Kolonisations-Isolaten war. Dies weist daraufhin, dass Serumresistenz als wichtiger Virulenzfaktor fungiert.

Hieran anknüpfend sind weitere Studien nötig, um die Beziehungen zwischen O-Serogruppen, Serumresistenz und Virulenz von *P. aeruginosa* genauer zu untersuchen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* ist einer der häufigsten Verursacher von nosokomialen Infektionen vor allem bei immunsupprimierten und beatmeten Patienten auf der Intensivstation. Dieser Keim wird im Respirationstrakt vieler Patienten nachgewiesen, ohne dass ein kausaler Zusammenhang zu einer Infektion des Respirationstrakts vorliegt. Von besonderer Bedeutung ist daher die Frage, ob sich das pathogene Potential von Stämmen aus asymptomatischen Besiedlungsprozessen von dem Potential der Stämme aus manifesten Infektionen des Respirationstrakts unterscheidet.

Die Fähigkeit der Mikroorganismen, die bakterizide Wirkung des Serums zu umgehen, gilt als ein wichtiger Schritt im Infektionsprozess. Um die Frage zu klären, ob sich Stämme aus asymptomatischen Kolonisationsprozessen von Pneumoniestämmen hinsichtlich ihres pathogenen Potentials unterscheiden, wurden in der hier vorliegenden Arbeit die Serumresistenzeigenschaften eines Bakterienkollektivs aus Kolonisationsprozessen mit den Serumresistenzeigenschaften eines Bakterienkollektivs aus Pneumonien verglichen. Unter der Annahme, dass die Serumresistenzeigenschaft unter anderem durch O-Antigene vermittelt wird, wurden die Bakterienstämme serotypisiert, die Häufigkeitsverteilung der Serogruppen und die Assoziation bestimmter Serogruppen mit den Serumresistenzeigenschaften verglichen.

Der Anteil serumempfindlicher Stämme war bei den Kolonisationsstämmen (73,46%, n=36/49) signifikant höher als bei den Pneumoniestämmen (56,1%, n=96/171) ($p=0,03$; OR=2,163; 95%; CI= 1,072-4,368). In beiden Kollektiven war eine Häufung von Bakterien der Serogruppen A, B, E und I festzustellen. Die Häufigkeitsverteilungen der Serogruppen unterschieden sich in beiden Stammkollektiven nicht. Der Anteil serumempfindlicher Stämme unter den Serogruppen A und B war signifikant niedriger (13/28 und 13/44) als unter den Serogruppen E und I (39/55 und 44/62). Diese Ergebnisse waren signifikant ($p<0,045$). Die Werte der odds ratio lagen zwischen 0,17 und 0,35, die 95%-Konfidenzintervalle zwischen 0,072 und 0,91, und zeigen somit eine reduzierte Chance für die Serogruppe E und I, Serumresistenz zu vermitteln.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das Merkmal Serumresistenz zur Etablierung einer Infektion beiträgt und somit als wichtiger Virulenzfaktor fungiert. Die Serogruppen A und B scheinen serumresistenter zu sein als Stämme der anderen untersuchten Serogruppen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Almirall, J., Mesalles, E., Klamburg, J., Parra, O., Agudo, A. (1995): Prognostic factors of pneumonia requiring admission to the Intensive Care Unit. *Chest*, 107, 511-516

Athamna, A., Ofek, I., Keisari, Y., Markowitz, S., Dutton, G.G.S., Sharon, N. (1991): Lectinophagocytosis of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* mediated by surface lectins of guinea pig alveolar macrophages and human monocyte-derived macrophages. *Infect Immun*, 59, 1673-1682

Bejarano, P.A., Langeveld, J.P., Hudson, B.G., Noelken, M.E. (1989): Degradation of basement membranes by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Infect Immun*, 57, 3783- 3787

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

Bufler, P., Schmidt, B., Schikor, D., Bauernfeind, A., Crouch, E.C., Griese, M. (2003): Surfactant protein A and D differently regulate the immune response to nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* and its lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, 28: 249-256

Campbell, W.N., Hendrix, E., Cryz, S. Jr, Cross, A.S. (1996): Immunogenicity of a 24-valent *Klebsiella* capsular polysaccharide vaccine and an eight-valent *Pseudomonas* O-polysaccharide conjugate vaccine administered to victims of acute trauma. *Clin Infect Dis*, 23, 179-181

Carmeli, Y., Troillet, N., Eliopoulos, G.M., Samore, M.H. (1999): Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(6), 1379-1382

Chastre, J., Fagon, J.Y. (2002): Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 165, 867-903

Cheffins, T., Heal, C., Rudolphy, S. (2009): Acute otitis externa-Management by GPs in North Queensland. *Aust Fam Physician*, 38(4), 262-266

Cook, D.J., Walter, S.D., Cook, R.J., Griffith, L.E., Guyatt, G.H., Leasa, D., Jaeschke, R.Z., Brun-Buisson, C. (1998): Incidence of and risk factors for ventilator-associated pneumonia in critically ill patients. *Ann Intern Med*, 129, 433-440

Cooper, N.R., Nemerow, G.R. (1989): Complement and Infectious agents: a tale of disguise and deception. *Complement Inflamm*, 6, 249-258

Cryz, S. Jr, Pitt, T.L., Fürer, E., Germanier, R. (1984): Role of Lipopolysaccharide in Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 44, 508-513

Dasgupta, T., deKievit, T.R., Masoud, H., Altman, E., Richards, J.C., Sadovskaya, I., Speert, D.P., Lam, J.S. (1994): Characterization of Lipopolysaccharide-Deficient Mutants of *Pseudomonas aeruginosa* Derived from Serotypes O3, O5, O6. *Infection and Immunity*, 62, 809-817

DiGiandomenico, A., Rao, J., Harcher, K., Zaidi, T.S., Gardner, J., Neely, A.N., Pier, G.B., Goldberg, J.B. (2007): Intranasal immunization with heterologously expressed polysaccharide protects against multiple *Pseudomonas aeruginosa* infections. *PNAS*, 104, 4624-4629

Driscoll, J.A., Brody, S.L., Kollef, M.H. (2007): The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, 67, 351-368

Erbay, H., Yalcin, A.N., Serin, S., Turgut, H., Tomatir, E., Cetin, B., Zencir, M. (2003): Nosocomial infections in intensive care unit in a Turkish university hospital: a 2-year survey. *Intensive Care Med*, 29,1482-1488

Engel, L.S., Hill, J.M., Caballero, A.R., Green, L.C., O`Callaghan, R.J. (1998): Protease IV, a Unique Extracellular Protease and Virulence Factor from *Pseudomonas aeruginosa*. The Journal of Biological Chemistry, 273, 16792-16797

Fagon, J.Y., Chastre, J. (2003): Diagnosis and treatment of nosocomial pneumonia in ALI/ARDS patients. Eur Respir J Suppl, 42, 77-83

Gailiene, G., Pavilionis, A., Kareiviene, V. (2007): The peculiarities of *Pseudomonas aeruginosa* resistance to antibiotics and prevalence of serogroups. Medicina (Kaunas), 43, 36-42

Gaynes, R., Edwards, J.R. (2005): Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. Clin Infect Dis, 41, 848-854

Gessard, C. (1882): De la pyocyanine et de son microbe, colorations qui en dépendant dans les liquides organiques (pus et sérosité, sueur, liquides de culture), applications clinique. Thèse de Paris, 248, 68

Giamarellou, H. (2000): Therapeutic Guidelines for *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Antimic Ag, 16, 103-106

Glazebrook, J.S., Campbell, R.S., Hutchinson, G.W., Stallman, N.D. (1978): Rodent zoonoses in North Queensland: the occurrence and distribution of zoonotic infections in North Queensland rodents. Aust J Exp Biol Med Sci, 56, 147-156

Green, S.K., Schroth, M.N., Cho, J.J., Kominos, S.D., Vitanza-Jack, V.B. (1974): Agricultural Plants and Soil as a Reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. Applied Microbiology, 28, 987-991

Green, M., Apel, A., Stapleton, F. (2008): Risk factors and causative organisms in microbial keratitis. Cornea, 27, 22-27

Hancock, R.E.W., Mutharia, L.M., Chan, L., Darveau, R.P., Speert, D.P., Pier, G.B. (1983): *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis: A class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infect Immun*, 42, 170-177

Hann, S., Holsclaw, D.S. (1976): Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with immunoglobulins and complement in sputum. *Infect Immun*, 14, 114-117

Hauser, A.R., Sriram, P. (2005): Severe *Pseudomonas aeruginosa* infections: Tackling the conundrum of drug resistance. *Postgraduate Medicine*, 117, 41- 48

Heck, L.W., Alarcon, P.G., Kulhavy, R.M., Morihara, K., Russell, M.W., Mestecky, J.F. (1990): Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* Elastase. *J Immunol*, 144, 2253-2257

Homma, J.Y. (1982): Designation of the thirteen O-group antigens of *Pseudomonas aeruginosa*; an amendment for the tentative proposal in 1976. *Jpn J Exp Med*, 52, 317-320

Hueck, C.J. (1998): Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 379-433

Hughes, C., Phillips, R., Roberts, A.P. (1982): Serum resistance among *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in relation to O type and the carriage of hemolysin, colicin, and antibiotic resistance determinants. *Infect Immun*, 35, 270-275

Kabha, K., Schmegner, J., Keisari, Y., Parolis, H., Schlepper-Schaeffer, J., Ofek, I. (1997): SP-A enhances phagocytosis of *Klebsiella* by interaction with capsular polysaccharides and alveolar macrophages. *Am J Physiol*, 272, 344-352

Khan, N.H., Ishii, Y., Kimata-Kino, N., Esaki, H., Nishino, T., Nishimura, M., Kogure, K. (2007): Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from open ocean and comparison with freshwater, clinical, and animal isolates. *Microb Ecol*, 53, 173-186

Keisari, Y., Wang, H., Mesika, A., Matatov, R., Nissimov, L., Crouch, E., Ofek, I. (2001): Surfactant protein D-coated *Klebsiella pneumoniae* stimulates cytokine production in mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol*, 70, 135-141

Lizioli, A., Privitera, A., Alliata, E., Antonietta Banfi, E.M., Boselli, L., Panceri, M.L., Perna, M.C., Porretta, A.D., Santini, M.G., Carreri, V. (2003): Prevalence of nosocomial infections in Italy: result from the Lombardy survey in 2000. *J Hosp Infect*, 54, 141-148

Lyczak, J. B., Cannon, C.L., Pier, G.B. (2000): Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lesson of a versatile opportunist. *Microbes and infection*, 2, 1051-1060

Mariencheck, W.I., Savov, J., Dong, Q., Tino, M.J., Wright, J.R. (1999): Surfactant Protein A enhances alveolar macrophage phagocytosis of a live, mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol*, 277, 777-786

Mestecky, J. (1987): The common mucosal Immune System and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J Clin Immunol*, 7, 265-276

Meyer, K.C., Sharma, A., Brown, R., Weatherly, M., Moya, F.R., Lewandoski, J., Zimmermann, J.J. (2000): Function and composition of pulmonary surfactant and surfactant-derived fatty acid profiles are altered in young adults with cystic fibrosis. *Chest*, 118, 164-174

Migula, W. (1894): Über ein neues System der Bakterien. *Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe*, 1, 235-238

Morpeth, S., Murdoch, D., Cabell, C.H., Karchmer, A.W., Pappas, P., Levine, D., Nacinovich, F., Tattevin, P., Fernández-Hidalgo, N., Dickermann, S., Bouza, E., del Río, A., Lejko-Zupanc, T., de Oliveira Ramos, A., Larussi, D., Klein, J., Chirouze, C., Bedimo, R., Corey, G.R., Fowler, V.G. Jr; International Collaboration on Endocarditis Prospective Cohort Study (ICE-PCS) Investigators (2007): Non-HACEK gram-negative bacillus pneumonia. *Ann Intern Med*, 147, 829-835

Mun, J.J., Tam, C., Kowbel, D., Hawgood, S., Barnett, M.J., Evans, D.J., Fleiszig, S.M. (2009): Clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from a Healthy Ocular Surface Involves Surfactant Protein-D and is Compromised by Bacterial Elastase in a Murine "Null-Infection" Model. *Infect Immun*, Epub ahead of print

Murray, T.S., Egan, M., Kazmierczak, B.I. (2007): *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. *Curr Opin Pediatr*, 19, 83-88.

Nordahl, E.A., Rydengard, V., Nyberg P., Nitsche, D.P., Mörgelin, M., Malmsten, M., Björck, L., Schmidtchen, A. (2004): Activation of complement system generates antibacterial peptides. *PNAS*, 101, 16879-16884

Ofek, I., Mesika, A., Kalina, M., Keisari, Y., Podschun, R., Sahly, H., Chang, D., McGregor, D., Crouch, E. (2001): Surfactant Protein D enhances phagocytosis and killing of unencapsulated phase variants of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*, 69, 24-33

Olling, S. (1977): Sensitivity of gram-negative bacilli to the serum bactericidal activity: a marker of the host parasite relationship in acute and persisting infections. *Scand J Infect Dis*, 10, 1-40

Podschun, R., Penner, I., Ullmann, U. (1992): Interaction of *Klebsiella* capsule type 7 with human polymorphonuclear leucocytes. *Microb Pathog*, 13, 371-379

Pollack, M. (1984): The virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis*, 6, 617- 626

Preston, M.J., Fleiszig, S.M.J., Zaidi, T.S., Goldberg, J.B., Shortridge, V.D., Vasil, M.L., Pier, G.B. (1995): Rapid and sensitive method for evaluating *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors during corneal infections in mice. *Infect Immun*, 63, 3497-3501

Priebe, G.P., Dean, C.R., Zaidi, T., Meluleni, G.J., Coleman, F.T., Coutinho, Y.S., Noto, M.J., Urban, T.A., Pier, G.B., Goldberg, J.B. (2004): The galU Gene of *P. aeruginosa* is required for corneal infection and efficient systemic spread following pneumonia but not for infection confined to the lung. *Infect Immun*, 72, 4224-4232

Restrepo, C.I., Dong, Q., Savov, J., Mariencheck, W.I., Wright, J.R. (1999): Surfactant Protein D stimulates phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 21, 576-585

Richards, M.J., Edwards, J.R., Culver, D.H., Gaynes, R.P. (1999): Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. *Crit Care Med*, 27, 887-892

Richards, M.J., Edwards, J.R., Culver, D.H., Gaynes, R.P. (2000): Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care unit in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 21, 510-515

Rivera, M., Bryan, L.E., Hancock, R.E., McGroarty, E.J. (1988): Heterogeneity of lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*: Analysis of polysaccharide chain length. *J Bacteriol*, 170, 512-521

Rocchetta, H.L., Burrows, L.L., Lam, J.S. (1999): Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63, 523-553

Rus, H., Cudrici, C., Niculescu, F. (2005): The role of the complement system in innate immunity. *Immunol Res*, 33, 103-112

Sahly, H., Ofek, I., Podschun, R., Brade, H., He, Y., Crouch, E. (2002): Surfactant protein D binds selectively to *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharides containing mannose-rich antigens. *J Immunol*, 196, 3267-3274

Sahly, H., Aucken, H., Benedí V.J., Forestier, C., Fussing, V., Hansen, D.S., Ofek, I., Podschun, R., Sirot, D., Tomàs, J.M., Sandvang, D., Ullmann, U. (2004): Increased serum-resistance properties in *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 3477-3482

Sahly, H., Keisari, Y., Crouch, E., Sharon, N., Ofek, I. (2008): Recognition of bacterial surface polysaccharides by lectins of the innate immune system and its contribution to defense against infection: the case of pulmonary pathogens. *Infect Immun*, 76, 1322-1332

Sahly, H., Aucken, H., Benedi, V.J., Forestier, C., Fussing, V., Hansen, D.S., Ofek, I., Podschun, R., Sirot, D., Sandvang, D., Tomás, J.M., Ullmann, U. (2004): Impairment of respiratory burst in polymorphonuclear leukocytes by extended-spectrum beta-lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 23, 20-26

Sato, H., Okinaga, K., Saito, H. (1988): Role of pili in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn infection. *Microbiol Immunol*, 32, 131-139

Schiller, N.L., Joiner, K.A. (1986): Interaction of complement with serum-sensitive and serum-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 54, 689-694

Schoolnik, G.K., Buchanan, T.M., Holmes, K.K. (1976): *Gonococci* causing disseminated gonococcal infection are resistant to the bactericidal action of normal human sera. *J Clin Invest*, 58, 1163-1173

Schultz, D.R., Miller, K.D. (1974): Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of complement components and complement-derived chemotactic and phagocytic factors. *Infect Immun*, 10, 128-135

Simberkoff, M.S., Ricupero, I., Rahal, J.J. Jr (1976): Host resistance to *Serratia marcescens* infection: serum bactericidal activity and phagocytosis by normal blood leucocytes. *J Lab Clin Med*, 87, 206-217

Spencer, R.C. (1996): Predominant pathogens found in the European Prevalence of Infection in Intensive Care Study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 15, 281-285

Tang, H.B., DiMango, E., Bryan, R., Gambello, M., Iglewski, B.H., Goldberg, J.B., Prince, A. (1996): Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect Immun*, 64, 37-43

Torres, A., Aznar, R., Gatell, J.M., Jiménez, P., González, J., Ferrer, A., Celis, R., Rodríguez-Roisin, R. (1990): Incidence, risk and prognosis factors of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients. *Am Rev Resp Dis*, 142, 523-528

Vincent, J.-L. (2003): Nosocomial infections in adult intensive-care units. *The Lancet*, 361, 2068- 2077

Wieland, C.W., Siegmund, B., Senaldi, G., Vasil, M.L., Dinarello, C.A., Fantuzzi, G. (2002): Pulmonary Inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide, Phospholipase C, and Exotoxin A: Role of Interferon Regulatory Factor 1. *Infect Immun*, 70, 1352-1358

Wolfgang, M.C., Jyot, J., Goodman, A.L., Ramphal, R., Lory, S. (2004): *Pseudomonas aeruginosa* regulates flagellin expression as part of global response to airway fluid from cystic fibrosis patients. *PNAS*, 101, 6664-6668

Yetkin, G., Otlu, B., Cicek, A., Kuzucu, C., Durmaz, R. (2006): Clinical, microbiologic, and epidemiologic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a University Hospital, Malatya, Turkey. *Am J Infect Control*, 34, 188-192

Young, L.S., Armstrong, D. (1972): Human immunity to *Pseudomonas aeruginosa*. In-vitro interaction of bacteria, polymorphonuclear leucocytes, and serum factors. *J Infect Dis*, 126, 257-276

7. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. H. Sahly, PhD für die Überlassung des Themas, seine wissenschaftliche Betreuung und seine immer freundliche und wertvolle Unterstützung während der gesamten Entstehungszeit dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. U. Ullmann, ehemaliger Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Virologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, und Herrn Prof. Dr. med. H. Fickenscher danke ich herzlich für die Möglichkeit der Durchführung der Arbeit und für ihre Unterstützung.

Zudem möchte ich Andrea Hölzgen und Frank Stender sowie allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Infektionsmedizin der Universität Kiel für ihre große Hilfe und Herzlichkeit während der Laborarbeit danken.

Für die Durchsicht des Manuskripts und die konstruktive Kritik bin ich Martin Brzank und meinen Geschwistern Katja und Volker Scheuß zu Dank verpflichtet.

8. LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name: Sonja Scheuß
Geburtsdatum: 11.08.1980
Geburtsort: Bremen-Vegesack
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung

1987-1991: Grundschule St.-Magnus, Bremen
1991-1993: Schulverbund Lesum, Bremen (Orientierungsstufe)
1993-2000: Gymnasium Vegesack, Bremen

Studium

2000-2007: Studium der Humanmedizin an der CAU Kiel
2002: Ärztliche Vorprüfung
2007: Ärztliche Prüfung

Beruflicher Werdegang

Seit 2008: Weiterbildung zur Fachärztin für Gynäkologie/Geburtshilfe am Klinikum Nordfriesland, Klinik Husum