

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

**Isolation und Identifikation obligat anaerober Bakterien aus dem
tiefen Respirationstrakt von Patienten mit Cystischer Fibrose durch
MALDI-TOF-Massenspektrometrie**

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

vorgelegt von
Martina Daniels
aus Hamburg

Kiel 2017

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. Hany Sahly

2. Berichterstatter:

PD Dr. Tobias Ankermann

Tag der mündlichen Prüfung:

10.12.2018

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

28.10.2018

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis	a
Abkürzungen	b
1 Einleitung	1
1.1 Cystische Fibrose	1
1.2 Bakterielle Besiedlung bei der Cystischen Fibrose	4
1.3 Obligate Anaerobier bei Patienten mit Cystischer Fibrose	7
1.4 Zielsetzung	9
2 Material und Methoden	10
2.1 Material	10
2.1.1 Patienten und Probengewinnung	10
2.1.2 Geräte	11
2.1.3 Software	12
2.1.4 Verbrauchsmaterialien	12
2.1.5 Chemikalien	13
2.1.6 Stammlösungen, Puffer und Gele	14
2.1.7 Primer-Oligonukleotide	16
2.2 Methoden	17
2.2.1 Kultureller Nachweis	17
2.2.2 Gram-Färbungen	18
2.2.3 Massenspektrometrie	18
2.2.4 Orientierende biochemische Schnell-Identifikation	21
2.2.5 Detaillierte biochemische Identifikation	24
2.2.6 Spezies-Bestimmung durch 16S-rDNA-Sequenzierung	27
2.2.7 Statistische Auswertung	33
3 Ergebnisse	34
3.1 Patienten der CF-Studiengruppe	34
3.2 Massenspektrometrische Identifikation obligat anaerober Bakterien	39
3.3 Biochemische Schnell-Identifikation obligat anaerober Bakterien	41
3.4 Detaillierte biochemische Identifikation obligat anaerober Bakterien	43
3.5 Identifikation obligat anaerober Bakterien durch Sequenzierung	45
3.6 Vergleich der Ergebnisse der Identifikations-Methoden	46
4 Diskussion	52
4.1 Strikt anaerobe Bakterien aus den Sputen von CF-Patienten	52
4.2 Lungenfunktion der CF-Patienten	55
4.3 Sputum als relevantes diagnostisches Material	55
4.4 Methodenvergleich zur Identifikation obligater Anaerobier	56
5 Zusammenfassung	64
6 Literaturverzeichnis	66
7 Anhang	72
Danksagung	91
Lebenslauf	92

Abkürzungen

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CF	Cystische Fibrose
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
D-Puffer	Digestions-Puffer
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FEV ₁	forcierte Einsekundenkapazität
HCCA	2-Cyano-3(4-hydroxyphenyl)-acrylsäure, α -Cyano-4-hydroxymethylsäure
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
m/z	Masse-/Ladungsverhältnis
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry</i> ; Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie
n	Anzahl
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
<i>sp.</i> , <i>spp.</i>	Spezies (Singular, Plural)
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Einleitung

1.1 Cystische Fibrose

Die Mukoviszidose wird international als Cystische Fibrose (*cystic fibrosis*, CF) bezeichnet und ist eine bisher unheilbare, autosomal-rezessiv erbliche Krankheit, die mit einer durchschnittlichen Inzidenz von 1:2500 Neugeborenen in der eurokaukasischen Bevölkerung als die häufigste angeborene Stoffwechselerkrankung gilt [Gibson et al., 2003; Ratjen & Döring, 2003]. Ursächlich ist eine Mutation des auf dem langen Arm des Chromosoms 7 an Position 7q31.2 lokalisierten Gens für den *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR), das im Jahr 1989 identifiziert wurde [Riordan et al., 1989]. Das CFTR-Gen umfasst 250 Kilobasen (kb) und besteht aus 27 Exons. CFTR ist ein aus 1480 Aminosäuren bestehendes Protein (Molekulargewicht 170 kDa; Abb.1), das als Chloridkanal in allen Schleim sezernierenden Epithelien zu finden ist [Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989]. Je nach Schwere der vorliegenden Mutation kommt es zu einem pathologisch veränderten Ionenfluss, der die Sekretion bzw. Sekretretention hochviskösen Schleims exokriner Drüsen verursacht [Matsui et al., 1998]. Dies führt zu zu einer Multiorganerkrankung mit Funktionsstörungen von Lunge, Pankreas, Leber, Schweißdrüsen und Ductuli deferentes [Gibson et al., 2003; Ratjen & Döring, 2003]. Das CFTR-Protein, ein zur Adenosintriphosphat-*binding-cassette*-Familie gehörender Ionen-Transporter, besteht aus zwei Transmembran-Domänen MSD1 und MSD2, die den Kanal bilden, zwei Nukleotid-Bindedomänen NBD1 und NBD2, die als Andockstellen für Adenosintriphosphat fungieren, sowie einer zentralen, regulatorischen Domäne (R domain). Die Öffnung des Chloridkanals erfolgt in drei Schritten: 1. Phosphorylierung der Regulator-domäne R mit Hilfe der Proteinkinase A oder C; 2. Bindung von Adenosin-triphosphat und 3. Hydrolysierung an NBD1. NBD2 leitet im Umkehrschluss die Unterbrechung des Ionenflusses ein [Gibson et al., 2003; Rieger et al., 1999].

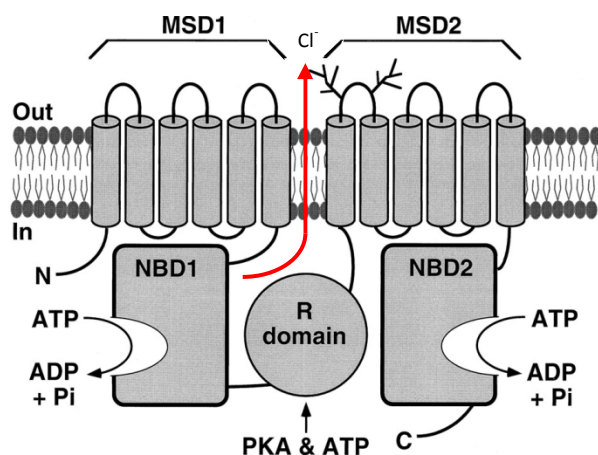


Abb. 1: Modell des *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*-Kanals (CFTR; Sheppard & Welsh, 1999). Adenosintriphosphat, ATP; C-Terminus, C; N-Terminus, N; Nukleotid-Bindedomäne, NBD; Proteinkinase A, PKA; regulatorische Domäne, R domain; Transmembrandomäne, MSD; anorganisches Phosphat, Pi.

Inzwischen wurden mehr als 2000 unterschiedliche Mutationen des *CFTR*-Gens gefunden [The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, Cystic Fibrosis Mutation Data base, <http://genetic.sickkids.on.ca/cftr/app>, letzter Zugriff im Februar 2016]. Wurden die verschiedenen *CFTR*-Mutationen im Jahr 2003 noch fünf Klassen zugeordnet [Gibson et al., 2003], erfolgt die Einteilung der einzelnen *CFTR*-Mutationen mittlerweile in sechs Klassen [Abb. 2, Boyle & de Boeck, 2013; Ratjen, 2009]:

- Klasse I Infolge einer Synthesestörung entsteht kein *CFTR*-Protein.
- Klasse II Wegen einer fehlerhaften genetischen Information kommt es zu einer Strukturveränderung (Fehlfaltung) des *CFTR*-Kanals, der daraufhin inaktiviert wird.
- Klasse III Der *CFTR*-Kanal öffnet sich nicht ausreichend (Gating-Mutation).
- Klasse IV Die herabgesetzte Ionen-Leitfähigkeit der *CFTR*-Kanäle führt zu reduzierter Transportkapazität.
- Klasse V Ein überwiegender Funktionsverlust der *CFTR*-Kanäle liegt vor.
- Klasse VI Die *CFTR*-Kanäle sind instabil und können schnell abgebaut werden.

Mutationen der Klassen I bis III kommen am häufigsten vor und nehmen in der Regel einen schwereren Verlauf, Mutationen der anderen Klassen verlaufen dagegen eher milde. Die weltweit mit Abstand häufigste Mutation (etwa 70%) ist die F508del-Mutation der Klasse II, bei der es an der Position 508 zu einer Deletion von Phenylalanin kommt [Ratjen & Döring, 2003]. Dabei ist ein deutliches Nord-Süd-Gefälle in Europa vorhanden [Murken et al., 2006].

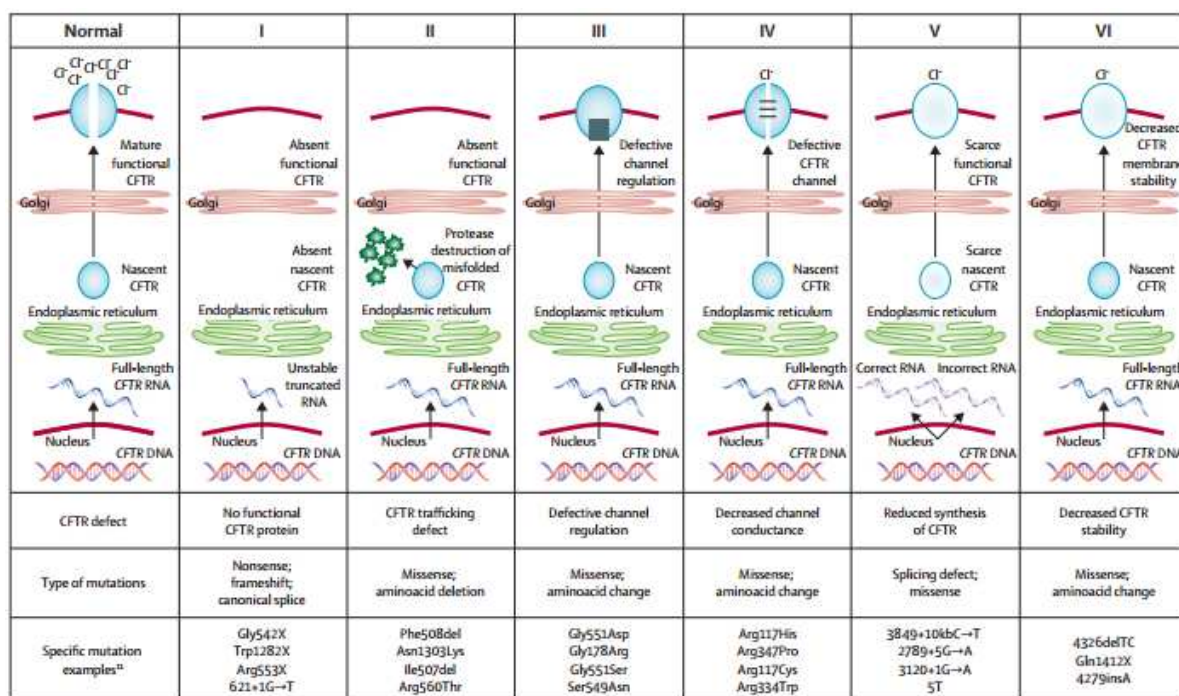


Abb. 2: Übersicht über die *CFTR*-Mutationsklassen [Boyle & de Boeck, 2013].

Aufgrund des enormen Fortschritts der medizinischen Versorgung hat sich die durchschnittliche Überlebenszeit der CF-Patienten in den letzten 30 Jahren deutlich verbessert (Abb. 3). Wurden CF-Kinder in den 1950er-Jahren in Deutschland nur wenige Monate alt, liegt die mediane Lebenserwartung mittlerweile bei 40,1 Jahren und der Anteil der CF-Patienten >18 Jahre stieg auf 51,3% [Sens & Stern, 2012].

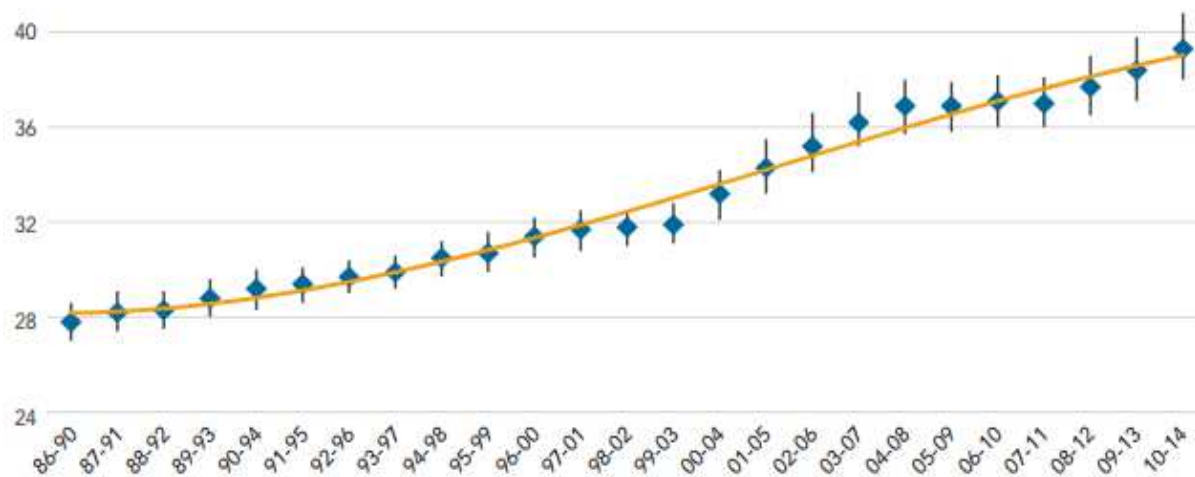


Abb. 3: Lebenserwartung von Patienten mit Cystischer Fibrose seit 1986; nach oben Alter in Jahren, nach rechts Zeitraum von 1986 bis 2014 (nach Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry, Annual Data Report 2014, 73).

Trotz der häufig schon im Säulingsalter auftretenden Symptome wie Ikterus prolongatus, Dystrophie, Minderwuchs, Mekoniumilium, Analprolaps, Blähungen, Bauchschmerzen, rezidivierende Infektionen der oberen und unteren Luftwege, Zeichen der exokrinen Pankreasinsuffizienz und Salzverlustsyndrom wird die CF-Diagnose in Deutschland nur zu 59% bereits im ersten Lebensjahr gestellt, zu 6,8% sogar erst im Alter von 18 Jahren oder später [Sens & Stern, 2012]. Dabei wäre eine frühe Diagnosestellung zur Einleitung einer frühzeitigen, adäquaten Therapie von entscheidender Bedeutung [Müller, 2003]. Verschiedene Studien belegen den Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt der Diagnosestellung und der Prognose im Hinblick auf den Krankheitsverlauf [Dodge et al., 2007; Döring & Høiby, 2004]. Langzeitstudien aus den USA und aus Australien belegen den klinischen Nutzen der frühzeitigen Diagnosestellung im Rahmen der Entwicklung einer adäquaten Körperlänge und Gewichtszunahme, einer gesteigerten Lungenfunktion und einer niedrigeren Anzahl von Infektionen mit *Pseudomonas* bei einer deutlichen Kostenersparnis im Vergleich zu anderen Diagnosestrategien [Farrell et al., 1997; Lindemann, 1991; Sims et al., 2007; Wilcken, 1998]. Auch Dijk et al. konnten belegen, dass die Detektion einer CF durch ein Neugeborenen-Screening die körperliche Entwicklung sowie die Lungenfunktion und das Überleben der betroffenen Patienten deutlich verbessert [Dijk et al., 2011].

In Deutschland wurde zum 01.09.2016 auf der Basis eines Beschlusses des Gemeinsamen Bundesausschusses im Rahmen der „Kinder-Richtlinien“ ein Neugeborenen-Screening für CF innerhalb der ersten vier Lebenswochen als Leistung der Gesetzlichen Krankenkassen eingeführt. Aus derselben Blutprobe, die als Standarduntersuchung bei Neugeborenen auf angeborene Stoffwechselerkrankungen und Endokrinopathien genommen wird, erfolgt nun auch eine Stufendiagnostik auf CF. Zuerst wird immunreaktives Trypsin und, bei erhöhten Werten, Pankreatitis-assoziiertes Protein bestimmt. Erst dann wird, im auffälligen Fall, die DNA-Mutationsanalyse durchgeführt. Somit wird der frühzeitige Therapiebeginn gesichert. Die therapeutischen Möglichkeiten zur Behandlung einer CF sind aber auch heute noch im Wesentlichen symptomatischer Natur: Inhalations- und Physiotherapie, gezielter Einsatz von Antiphlogistika und Antibiotika, Enzym-, Vitamin- und Elektrolytsubstitution, hochkalorische Ernährung mit der Gabe essentieller Fettsäuren, sowie die Behandlung pulmonaler Infektionen, besonders mit inhalativen Antibiotika und Mukolytika.

1.2 Bakterielle Besiedlung der Lunge bei der Cystischen Fibrose

Wie bereits erwähnt, kommt es je nach der Art der vorhandenen Mutation infolge des pathologisch veränderten Ionenflusses im CFTR-Kanal zu der Sekretion bzw. Sekretretention hochviskösen Schleims in allen betroffenen Organen [Matsui et al., 1998]. Daraus leitet sich im Deutschen auch die Bezeichnung „Mukoviszidose“ (lat. „mucus“ = Schleim, „viscidus“ = zäh, klebrig) ab. Besonders in der Lunge führt dieser hochvisköse Schleim zu chronischen, bakteriellen Infektionen und Entzündungen mit einem cystisch-fibrotischen Umbau des Lungenparenchyms mit chronischem Husten, Atemwegsobstruktion und Ateminsuffizienz [Gibson et al., 2003; Ratjen & Döring, 2003]. Schon im Kindesalter werden entsprechende Lungenparenchymveränderungen beobachtet [Wunsch & Wunsch, 2003]. Abb. 4 zeigt den jeweiligen Anteil der unterschiedlichen Bakterien-Spezies bei der Besiedlung der Lungen in den verschiedenen Altersgruppen.

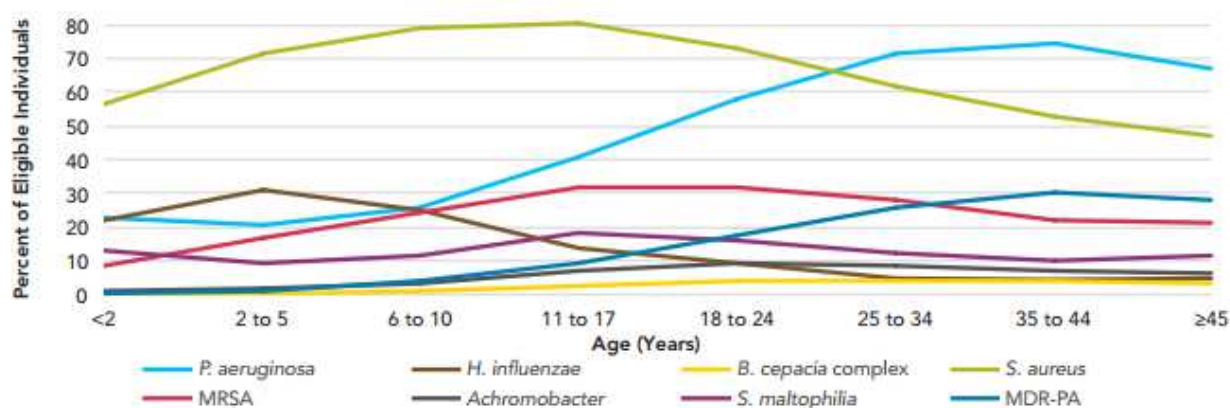


Abb 4: Prävalenz einzelner Bakterien-Spezies in der Lunge von CF-Patienten bezogen auf das Lebensalter [Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry, Annual Data Report 2014, 33].

Der wichtigste Grund für den häufigen vorzeitigen Tod bei CF sind die chronischen bakteriellen Infektionen der Lungen [Davis et al., 1996; Gibson et al., 2003; Ratjen & Döring, 2003; Rogers et al., 2005; Welsh & Ramsey, 1998], wobei *Pseudomonas aeruginosa* bis vor wenigen Jahren den häufigsten Erreger derartiger Infektionen darstellte [Govan & Deretic, 1996; Høiby & Koch, 1990].

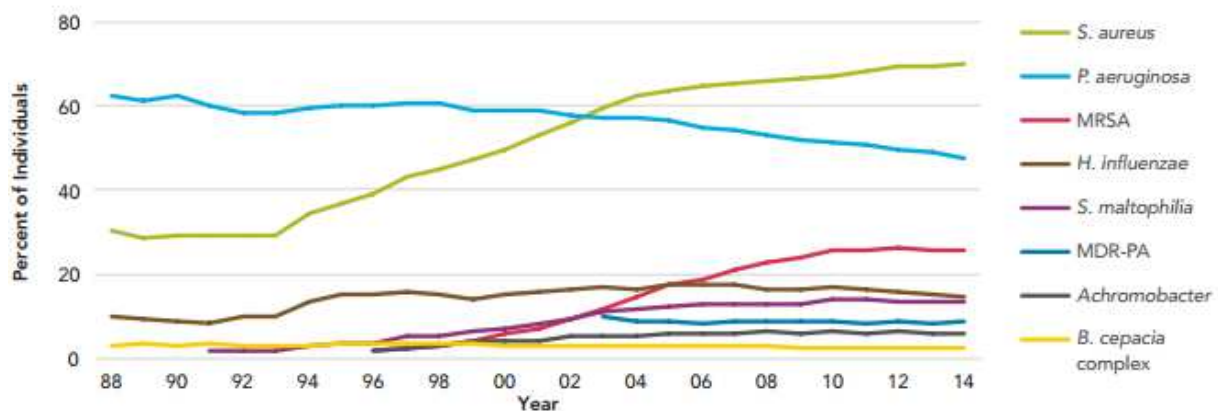


Abb. 5: Prävalenz einzelner Bakterien-Spezies in der Lunge von CF-Patienten seit 1988 [Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry, Annual Data Report 2014, 33].

Mittlerweile zeigt sich eine deutliche Zunahme der Häufigkeit des Nachweises von *Staphylococcus aureus*, wovon ein großer Teil (knapp 30%) bereits multiresistent ist (Abb. 5). In der Folge bilden sich eitrige Mukuspröpfe, die einzelne Bronchien verstopfen. Innerhalb des Mukus entsteht langsam ein Sauerstoffgradient mit teils anaeroben Verhältnissen. In diesen anaeroben Bereichen existieren *Pseudomonas aeruginosa* und andere fakultativ anaerobe Bakterien in Form von Mikrokolonien in einem strukturierten Biofilm, der aus einem bakteriellen Zellverband und einer gemeinsamen bakteriellen Exopolysaccharid-Matrix zusammengesetzt ist [Costerton & Levandowski, 1995; Høiby, 2002; Sauer et al., 2002]. In dem hypoxischen Milieu ist die Bakterienadhärenz sowie die chronische Kolonisation durch Bakterien, insbesondere durch *Pseudomonas aeruginosa* erleichtert [Boucher, 1999; Høiby, 2002; Worlitzsch et al., 2002] (Abb. 6). Infolge der Bildung von Biofilmen in der Lunge von CF-Patienten siedeln sich viele Bakterien, insbesondere *Pseudomonas aeruginosa*, dauerhaft an [Costerton, 2002; Govan & Deretic, 1996]. Durch Anpassung an diese hypoxische Umgebung zeigen bestimmte Formen eine hohe Widerstandsfähigkeit gegen das menschliche Immunsystem und eine gehäufte Resistenz gegen Antibiotika, wodurch die chronische Infektion stetig voranschreitet.

Bei einer bakteriellen Besiedlung der Lunge ist insbesondere die Frühbehandlung einer Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* enorm relevant [Döring & Høiby, 2004; Valerius et al., 1991]. Solange das Bakterium noch keine mukoiden Eigenschaften aufweist, lässt es sich

mit einer inhalativen Antibiose gut eradizieren. Hierbei kommen besonders Tobramycin, Colistin und Aztreonam zum Einsatz. Erst bei chronischem Befall mit *Pseudomonas aeruginosa* werden Antibiotika auch als orale oder intravenöse Kombinationstherapie eingesetzt. Dabei werden folgende Substanzen verwendet: Aztreonam, Carbapeneme, Chinolone, Cephalosporine, *Pseudomonas*-wirksame Penicilline, Aminoglykoside und Colistin [Schwarz, 2013].

Neben *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* finden sich bei CF-Patienten seit einigen Jahren gehäuft Infektionen mit nicht-tuberkulösen Mykobakterien, insbesondere *Mycobacterium abscessus*, die aufgrund ihrer Antibiotikaresistenzen schwer zu therapieren sind und zunehmend schwerste Lungenveränderungen hervorrufen. Nicht ganz neu ist dabei die Erkenntnis, dass diese Bakterien von Patient zu Patient übertragen werden können, selbst bei strikter Einhaltung der Hygienemaßnahmen innerhalb der CF-Einrichtungen. Ein mögliches Indiz für diese Form der Übertragung liefern dabei Resistenznachweise der Erreger gegen Langzeitmakrolide oder Aminoglykoside auch bei Patienten, welche diese Antibiotika zuvor nicht erhalten haben [Bryant et al., 2013].

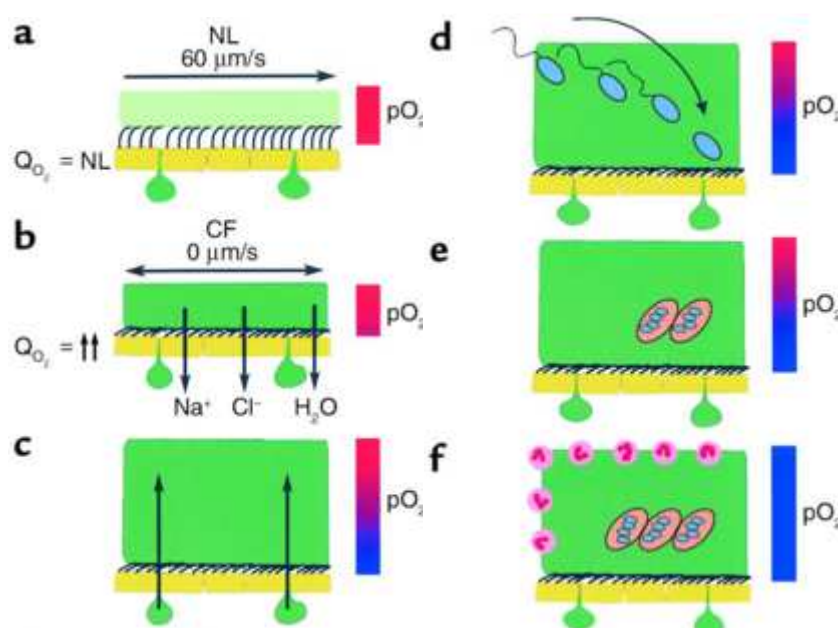


Abb. 6: Veränderungen des Lungenepithels mit Entwicklung eines dreidimensionalen Biofilms bei einer chronischen Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* in der Lunge mit Cystischer Fibrose (nach Worlitzsch et al., 2002). Normale Lunge (NL), Cystische Fibrose (CF), Sauerstoffpartialdruck (pO₂), Sauerstoffquotient (QO₂), Natrium-Ionen (Na⁺), Chloridionen (Cl⁻), Wasser (H₂O). **a)** Normales Lungenepithel mit einer dünnen Schleimschicht (airway surface liquid), die mit Hilfe der darunterliegenden Zilien einer ständigen Reinigung unterzogen wird; der hohe Sauerstoffpartialdruck ist normal. **b)** Infolge des Defekts im CFTR-Gen kommt es zu einem gestörten Chloridstrom Richtung Extrazellularraum, Na⁺ und H₂O werden konsekutiv in den Intrazellularraum gezogen, der Wassergehalt in der Schleimschicht nimmt dadurch ab und der Flüssigkeitsstrom kommt zum Erliegen, der Schleim wird viskös. **c)** Durch andauernde Mukussekrektion (Pfeile) kommt es zur Schleimretention, die vorher dünne Schleimschicht verdickt sich, der Sauerstoffpartialdruck nimmt ab. **d)** Nun können die anwesenden Bakterien (in diesem Fall *Pseudomonas aeruginosa*) in die entstandene Mukusschicht eindringen. **e)** In der immer dicker werdenden Mukusschicht baut sich langsam ein Sauerstoffgradient auf, dem sich die Mukuspfröpfe bildenden Bakterien anpassen. **f)** Der Mukus besteht nun aus einer dreidimensionalen, hypoxischen Schicht aus Bakterien und einer diesen Zellverband schützenden Exopolysaccharid-Hülle, dem sogenannten Biofilm, der das Anheften und Eindringen weiterer Bakterien ermöglicht.

1.3 Obligate Anaerobier bei Patienten mit Cystischer Fibrose

Die bisher vorgestellten Bakterien, die gehäuft bei CF-Patienten gefunden werden, gehören zu den fakultativen Anaerobiern, da sie in der Lage sind, sich der Umgebung anzupassen, und auch unter hypoxischen Bedingungen wachsen können. Dazu zählen insbesondere *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae*, die überwiegend in den Schleimhäuten der oberen Luftwege zu finden sind, sowie *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* und Formen aus dem *Burkholderia-cepacia*-Komplex, die ubiquitär im Wasser und in feuchten Böden vorkommen. Allen gemeinsam ist die erhöhte Pathogenität bei CF-Kranken, da sie durch hohe Anpassungsfähigkeit zur Biofilmbildung beitragen und durch Entwicklung von Antibiotika-Resistenzen zu chronischen und schwer beherrschbaren Lungeninfektionen führen können.

Seit Längerem ist bekannt, dass unter diesen anaeroben bzw. hypoxischen Bedingungen auch das Vorkommen obligat anaerober Bakterien begünstigt wird. Bereits 1983 entdeckten Brook und Fink mittels Trachealaspiration obligat anaerobe Bakterien bei CF-Kindern mit akuter Lungeninfektion. Darunter befanden sich Gram-positive und Gram-negative Bakterien wie *Lactobacillus species* (spp.), *Veillonella parvula*, *Bacteroides fragilis* und *Bacteroides melaninogenica* (heute: *Prevotella melaninogenica*) [Brook & Fink, 1983]. In einer Arbeit von Jewes und Spencer wurden im Sputum von CF-Patienten anaerobe Gram-positive Kokken sowie *Veillonella* spp. und verschiedene *Bacteroides*-Spezies nachgewiesen. Dabei fanden sich im provozierten Sputum mehr Bakterien als im spontan gewonnenen, was im ersten Fall für eine mögliche Kontamination aus der Mundhöhle sprechen könnte [Jewes & Spencer, 1990]. Rogers beschäftigte sich in mehreren Arbeitsgruppen mit obligat anaeroben Bakterien im Sputum von CF-Patienten. Er versuchte nicht nur den Nachweis dieser Bakterien zu belegen, sondern auch deren metabolische Aktivität zu messen, die maßgeblich für die Schwere einer Lungeninfektion verantwortlich erscheint. Dazu führte er Sequenzierungen der 16S-ribosomalen Desoxyribonukleinsäure (16S-rDNA) durch, welche für die ribosomale 16S-Ribonukleinsäure (rRNA) kodiert und nutzte dann die terminale Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus-Analyse bzw. terminale Reverse-Transkriptions-Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus-Analyse zum Vergleich einzelner Fragmente und ermittelte so deren Aktivität. In diesem Rahmen wurden auch obligat anaerobe Bakterien gefunden, die teilweise bei CF noch nicht nachgewiesen worden waren und auch nur unter streng anaeroben Bedingungen kultiviert werden können [Rogers et al., 2004, 2005].

In einer amerikanischen Arbeit von Harris und Kollegen (2007) wurden aus bronchioalveolären Lavage-Flüssigkeiten von 28 CF-Kindern 65 verschiedene obligat anaerobe Bakterien durch 16S-rDNA-Sequenzierung ermittelt. Damals war die Bronchiallavage der Goldstandard

bei der Diagnostik von Bakterien aus den tiefen Atemwegen [Harris et al., 2007]. Im Jahr 2008 wiesen Tunney und Mitarbeiter unterschiedliche Anaerobier wie *Prevotella* spp., *Veillonella* spp., *Propionibacterium* spp. und *Actinomyces* spp. aus bronchioalveolären Lavage-Flüssigkeiten von CF-Patienten nach. Zum Vergleich wurden auch Sputumproben untersucht, die eine noch größere bakterielle Vielfalt zeigten, was auch in diesem Fall auf eine orale Kontamination schließen ließ. Dabei vermutete man, dass eine parallele Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* das Vorhandensein der Anaerobier erleichtern könnte. Die bakterielle Vielfalt wurde bei Erwachsenen und Kindern gleichermaßen beobachtet [Tunney et al., 2008]. Im gleichen Jahr untersuchten Rintelen und Mitarbeiter 92 Sputumproben von 31 Erwachsenen und acht CF-Kindern auf das Vorhandensein obligater Anaerobier. Bei den Erwachsenen wurden in 93,5%, bei den Kindern in 75,0% der Fälle obligat anaerobe Bakterien nachgewiesen. Darunter befanden sich aus 139 Isolaten 15 verschiedene Bakterien-Gattungen mit insgesamt 35 Spezies, insbesondere *Peptostreptococcus* spp., *Staphylococcus saccharolyticus*, *Actinomyces* spp. und *Veillonella* spp., aber auch *Bacteroides* spp. und *Prevotella melaninogenica*. Diese Studiendaten wurden auch im Rahmen einer Dissertation veröffentlicht [Rintelen 2009; Rintelen et al., 2008]. Worlitzsch und Mitarbeiter screeneten 114 Sputumproben von 45 CF-Patienten und detektierten aus 93 Proben (91%) obligat anaerobe Bakterien (bei Erwachsenen 94%, bei Kindern unter 18 Jahren 82%). Dabei handelte es sich um 16 Bakterien-Gattungen und 35 Spezies, wobei insbesondere *Staphylococcus saccharolyticus*, *Peptostreptococcus* mit vier verschiedenen Spezies, *Actinomyces* mit fünf Spezies, *Veillonella* spp. und *Clostridium* mit acht Spezies gefunden wurden. Weitere obligate Anaerobier wurden aus den Gattungen *Bacteroides*, *Mobiluncus*, *Streptococcus*, *Capnocytophaga*, *Gemella*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* und *Wolinella* nachgewiesen [Worlitzsch et al., 2009].

Der kulturelle Nachweis obligater Anaerobier aus der Lunge von Patienten kann nur erbracht werden, wenn die Materialgewinnung korrekt abläuft und die speziellen Transport- und Kulturbedingungen dieser Proben eingehalten werden. Da viele der obligat anaeroben Bakterien in der Mundflora des Menschen gefunden werden, z.B. bei Karies, Parodontose oder Parodontitis, muss bei CF-Patienten, die teilweise unter schwersten Infektionen der unteren Luftwege leiden, darauf geachtet werden, dass die Untersuchungen auch wirklich aus Sputum erfolgen und mögliche Kontaminationen vermieden werden [Lambiase et al., 2010].

Unterschiedliche Methoden eignen sich zum Nachweis anaerober Bakterien. Den Goldstandard nimmt dabei die 16S-rDNA-Sequenzierung ein. Seit vielen Jahren kommen auch zunehmend massenspektrometrische Verfahren, wie die Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF) zum Einsatz, während biochemische Testmethoden immer mehr an Bedeutung verlieren. Wichtig bei der Auswahl des

geeigneten Verfahrens ist die klinisch-diagnostische Umsetzbarkeit. Neben dem Zeitfaktor und den Kosten kommt es in erster Linie aber auf die gesicherte Nachweisbarkeit der untersuchten Bakterien an.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass neben der möglichst frühen Diagnosestellung der CF nur zwei Möglichkeiten der Therapie verbleiben: die Verhinderung der Ausbildung des zähen Schleims mit der Möglichkeit der Dauerbesiedlung durch problematische Bakterien und die möglichst präzise Bestimmung der Bakterien-Spezies mit der dann entsprechend spezifisch einzuleitenden Therapie.

1.4 Zielsetzung

Ziel der Arbeit ist es, obligat anaerobe Bakterien aus dem Sputum von CF-Patienten unter Berücksichtigung geeigneter Abnahme- und Transportbedingungen nachzuweisen und das Potential unterschiedlicher bakterieller Identifikations-Verfahren zu vergleichen. Durch die Arbeit sollen folgende Fragen geklärt werden:

1. Sind obligat anaerobe Bakterien im Sputum von CF-Patienten nachzuweisen?
2. Dominieren bei CF-Patienten bestimmte bakterielle anaerobe Gattungen bzw. Spezies?
3. Unterscheiden sich biochemisch erzielte Identifikations-Ergebnisse von den durch Massenspektrometrie gewonnenen Resultaten? Das Identifikations-Potential beider Verfahren soll durch Sequenzierung bakterieller 16S-rRNA-Gene bewertet werden.
4. Können Empfehlungen zur Berücksichtigung von Anaerobiern im bakteriologisch-diagnostischen Prozess von CF-Patienten ausgesprochen werden?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patienten und Probengewinnung

An der vorliegenden prospektiven Studie nahmen 53 CF-Patienten aus einer Hamburger CF-Schwerpunktpraxis teil. Die Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg stimmte am 20.09.2012 dem Vorhaben zu (Aktenzeichen PV4142). Eine Kopie des Zustimmungsschreibens der Ethik-Kommission findet sich im Anhang dieser Arbeit. Die Patienten bzw. ihre rechtlichen Vertreter wurden im Vorwege über Zweck und Art der Durchführung der Studie schriftlich und mündlich informiert sowie aufgeklärt. Das Informationsschreiben für die Patienten und ein Vordruck für die Einverständniserklärung sind der Dissertation angehängt. Nach Unterzeichnung der Einverständniserklärung wurden die Patienten in die Studie aufgenommen. Die Patienten konnten jederzeit, auch ohne Angabe von Gründen, von der Teilnahme zurücktreten. Die freiwillige Probengewinnung wurde im Rahmen der regelmäßig stattfindenden Routineuntersuchungen durchgeführt und erfolgte für die Studie innerhalb von 28 Monaten im Zeitraum zwischen September 2012 und Januar 2015. Bei den Studienteilnehmern handelte es sich um 45 Erwachsene (23 Männer und 22 Frauen) und acht Kinder unter 18 Jahren (fünf Jungen und drei Mädchen). Bei nahezu allen Teilnehmern war die Art des genetischen Defekts im *CFTR*-Gen bekannt, lediglich bei zwei Patienten gab es dazu keine Angaben (Tab. A1 im Anhang). Vor Abgabe der Sputumprobe erfolgte zur Beurteilung der aktuellen Lungenfunktion stets eine Messung der forcierten Einsekundenkapazität (FEV_1), deren Ergebnisse ebenfalls in Tab. A1 im Anhang nachzulesen sind. Von den meisten Patienten wurde im Verlauf der Studie nur eine Sputumprobe gewonnen, bei vier Patienten wurden hingegen zwei, bei einem drei Proben berücksichtigt.

Für die Probengewinnung wurde den Patienten jeweils ein Port-A-CulTM-Röhrchen ausgehändigt, in welches das spontan erzeugte Sputum abgegeben wurde. Port-A-CulTM-Röhrchen enthalten ein Fertigmilieu mit reduzierenden Substanzen, die es erlauben, anaerobe Bakterien bis zu 72 h stabil zu lagern. Nach erfolgreicher Probenabgabe wurde dieses Röhrchen in einem bruch sicheren Transportgefäß unter Einhaltung der vorgegebenen Temperaturbedingungen (20-25°C) mit dem routinemäßig beauftragten Transportkurier in das Labor gebracht. Die schriftliche Einverständniserklärung sowie ein Erfassungsbogen mit den Patientendaten und der zusätzlichen Angabe über den Gendefekt (soweit vorhanden) und weiteren klinischen Vermerken inklusive der aktuellen FEV_1 -Messung lagen der Probe bei. Vor Bearbeitung der Sputumprobe wurden die Patientendaten und die beigefügten klinischen Angaben anonymisiert und mit einer laufenden Patienten-Codenummer versehen, die zeitgleich auch auf dem Probenröhrchen notiert wurde.

2.1.2 Geräte

ABI Prism™ 3130/3500 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Weiterstadt)

Anaerobier-Werkbänke: MAK5 MG 1000 (bis 01/2014), Whitley A55 (jeweils Meintrup DWS Laborgeräte GmbH, Lähden-Holte)

ATB™ elektronische Pipette, Modell MO 19229 (bioMérieux, Nürtingen)

Bunsenbrenner Gasprofi 1, Serien-Nr. 993541 (Wartewig Labor- und Dentaltechnik, Göttingen)

Densitometer Densimat, Serien-Nr. IDN008638 (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France)

Gefrierschränke: -80°C: Herafreeze Basic (Thermo Scientific, Braunschweig); -20°C: Liebherr 103890584 (Liebherr, Biberach an der Riss)

Gel Jet Imager 2000 (Intas, Göttingen)

Gelelektrophorese-Apparatur: Gel-Kammer Hybaid Elektro-4 (Thermo Scientific, Schwerte), Power Supply EPS 200 (Pharmacia Biotech, Dübendorf)

Gössner-Laborautoklav GVA 4.6/2, Serien-Nr. 89084 (Fritz Gössner GmbH, Hamburg)

Kühlschrank: Liebherr glassline KT 1930 (Liebherr, Biberach)

MALDI-Biotyper microflex™ LT, Serien-Nr. 269944.00138, ID 22728 (Bruker Daltonik, Bremen)

Mikroskop: Zeiss standard 25 (Carl Zeiss GmbH, Göttingen)

Mikrowellengerät HMT72M420 (Bosch, München)

mini API® 102921, Serien-Nr. INSOO 1602 (bioMérieux, Nürtingen)

Probenplatte (*target*): MSP 96 target polishes steel MicroScout Plate (Bruker Daltonik, Bremen)

Reagenzschüttler: REAX top, Serien-Nr. 541.10000.00 (Heidolph, Schwabach)

Thermocycler: Gene System 9700 (Perkin-Elmer, Rodau), 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Dreieich); T 3000 Thermocycler (Biometra, Göttingen)

Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)

Waage LA 230P (Sartorius AG, Göttingen)

Wärmeschrank Heraeus B 6760, Serien-Nr. 94109570 (Heraeus Instruments, Hanau)

Zentrifuge: MiniSpin® (Eppendorf, Hamburg)

2.1.3 Software

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST): <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Codon Code Aligner (CodonCode Corporation, Centerville, MA 02632, USA)

MALDI-Biotyper 2.2 und 2.3 (Bruker Daltonik, Bremen)

mini API, Version 3.2 bzw. 4.0 (bioMérieux, Nürtingen)

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Anaerobiertopf Genbox 7,0 l, rechteckig. 80370 (bioMérieux, Nürtingen)

api[®] 20 A-Testsystem, Referenz-Nr. 20300 (bioMérieux, Nürtingen)

Dry Anaerobic Indicator Strips BD BB2[™] (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)

Eppendorfggefäße, 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg)

Gazebeutel AnaeroGen[™] 2,5 l (Thermo Scientific, Schwerte)

Gelschlitten (Thermo Scientific, Schwerte)

Handschuhe: Peha-soft[®] nitrile (Hartmann, Heidenheim); Vasco Sensitive, Ref. 6067526 (Braun, Melsungen)

Holzstäbchen (Walter CMP, Hamburg)

Immersionsöl 518 N (Carl Zeiss GmbH, Jena)

Impfösen: 1 µl (Thermo Scientific, Roskilde, Denmark); 10 µl (Sarstedt, Nümbrecht)

Kamm mit 24 Zähnen (Thermo Scientific, Schwerte)

Kreppband (Tesa, Hamburg)

Kryoröhrchen Cryobank[™], Best. Nr. 291708 (Mast Diagnostik GmbH, Reinfeld)

MultiScreen-Platten MAHVN 4550 (Merck Chemicals GmbH, Darmstadt)

Objektträger 76x26x1,1 mm (Süsse Labortechnik, Gutenberg)

Parafilm (Bemis, Meckenheim)

Paraffinöl (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)

Pipettenspitzen filter tips: 10 µl, 100 µl, 1000 µl (nerbe plus, Winsen/Luhe)

Port-A-Cul[™]-Röhrchen (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)

rapid ID 32 A-Testsystem, Referenz-Nr. 32300 (bioMérieux, Nürtingen)

Röhrchen, 0,2 ml, RNase-/DNase-frei für Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bzw. Sequenzierung (Sarstedt, Nümbrecht)

Schaedler-Agarplatten (Best.-Nr. 254084, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg)

Schutzgefäß 126x30 mm mit Saugeinlage, Ref. 78.898, Schraubverschluss, neutral, Ref. 65.731 (Sarstedt, Nümbrecht)

Staphylococcus aureus, American Type Culture Collection 25923 (Doenitz ProLab, Augsburg)

Transferpipetten, 3,5 ml, Ref. 86.1172 (Sarstedt, Nümbrecht)

Wattetupfer, steril, Classiq Swabs, Ref. 165KS01 (Copan Flock Technologies srl, Brescia, Italien)

2.1.5 Chemikalien

Acetonitril (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)

Agarose (Biozym Scientific, Hessisch-Oldendorf)

Ameisensäure (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)

Ampuwa[®], pyrogenfreies destilliertes Wasser (dH₂O) (Fresenius Kabi, Bad Homburg)

Alkalische Phosphatase FastAP [1U/µl] (Thermo Scientific, Schwerte)

Aqua destillata (dH₂O) (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)

BBL[™] Gram Crystal Violet (Becton, Dickenson and Company, Heidelberg)

BBL[™] Gram Safranin (Becton, Dickenson and Company, Heidelberg)

BenchTop 100bp DNA Ladder G8291 300 µl (Promega, Madison, USA)

BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Dreieich)

BigDye[®] Terminator V.1.1, v3.1 5x Sequenzier-Puffer (Applied Biosystems, Dreieich)

Borsäure (Merck, Darmstadt)

Bromphenolblau (Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg)

Bruker Bacterial Test Standard (Bruker Daltonik, Bremen)

Catalase (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)

Desoxynukleotidphosphate, dNTP-Set 100 mM (Thermo Scientific, Schwerte)

Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA (Na₂-EDTA) (Merck, Darmstadt)

Ethanol 70% (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)

Ethanol 96% (Walter CMP, Hamburg)

Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)

Exonuclease I (#EN0581) (Thermo Scientific, Schwerte)

Ficoll® 400 (Serva, Heidelberg)

HCCA, 2-Cyano-3(4-hydroxyphenyl)-acrylsäure, α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (Bruker Daltonik, Bremen)

HCl, konzentriert (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)

H₂O₂ (Merck, Darmstadt)

Lugolsche Lösung: Jod-Kaliumjodid-Lösung (Merck, Darmstadt)

Methanol (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)

NaCl (0,45%) (bioMérieux, Nürtingen)

Natrium-Dodecylsulfat, SDS (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)

Proteinase K, 10 mg/ml (Boehringer, Mannheim)

Reagenzien für api® 20 A: BCP (Best.-Nr. 70510), EHR (Best. Nr. 70520), XYL (Best. Nr. 70530) (jeweils bioMérieux, Nürtingen)

Reagenzien für rapid ID 32 A: NIT1, NIT2 (Best. Nr. 70442), James (Best. Nr. 70542), FB (Best. Nr. 70562) (jeweils bioMérieux, Nürtingen)

Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)

Taq Buffer (10x) mit KCl und 15 mM MgCl₂ (Thermo Scientific, Schwerte)

Taq DNA Polymerase, rekombinant (#EP0402, 5u/μl) (Thermo Scientific, Schwerte)

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS, Merck, Darmstadt)

Xylencyanol FF (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)

2.1.6 Stammlösungen, Puffer und Gele

Stammlösungen

5% SDS (Masse/Volumen)

SDS	50 g
Ampuwa® (dH ₂ O) ad	10 ml

1 M TRIS-HCl, pH 8,5

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	12,1 g
Ampuwa® (dH ₂ O) ad	80 ml

mit konzentrierter HCl auf pH 8,5 einstellen

Ampuwa® (dH₂O) ad 100 ml, 15 min bei 121 °C autoklavieren

250 mM EDTA

Na ₂ -EDTA	4,652 g
Ampuwa [®] (dH ₂ O) ad	30 ml, auf pH 8,5 einstellen
Ampuwa [®] (dH ₂ O) ad	50 ml
15 min bei 121°C autoklavieren	

Desoxyribonukleinsäure-Triphosphate

	(dNTP, 10 mM)	
Desoxyadenosin-Triphosphat	(dATP, 100 mM)	20 ml
Desoxycytidin-Triphosphat	(dCTP, 100 mM)	20 ml
Desoxyguanosin-Triphosphat	(dGTP, 100 mM)	20 ml
Desoxythymidin-Triphosphat	(dTTP, 100 mM)	20 ml
Ampuwa [®] (dH ₂ O) ad	120 ml	

Ethidiumbromid (10 mg/ml)

Ethidiumbromid	10 mg
Ampuwa [®] (dH ₂ O) ad	1 ml

1 ml Basis-Lösungsmittel (*organic solvent*)

Acetonitril (AN)	500 µl
dH ₂ O ad	475 µl
Trifluoressigsäure (TFA) 100%	25 µl

Puffer:

Digestions-Puffer (D-Puffer)

	Verdünnung	Stammlösung
50 mM TRIS-HCl, pH 8,8	= 1/20	von 1 M TRIS-HCl, pH 8,5
1 mM EDTA	= 1/250	von 250 mM EDTA
0,5% SDS	= 1/10	von 5% SDS
0,2 mg/ml Proteinase K	= 1/50	von 10 mg/ml Proteinase K

Beispiel:	250 µl	50 mM TRIS-HCl, pH 8,5
	20 µl	1 mM EDTA
	500 µl	0,5% SDS
	100 µl	10 mg/ml Proteinase K
	4130 µl	Ampuwa [®] (dH ₂ O)

DNA-Ladepuffer (6x)

Bromphenolblau	0,25%
Xylencyanol FF	0,25%
Ficoll [®] 400	15%

TRIS-Borat-EDTA-Puffer (10x TBE)

TRIS	108 g
Borsäure	55 g
Ampuwa [®] (dH ₂ O) ad	700 ml
0,5 M EDTA, pH 8,0	40 ml
Ampuwa [®] (dH ₂ O) ad	1 l

TBE-Puffer (0,5x)

TBE-Puffer (10x)	50 ml
Ampuwa [®] (dH ₂ O) ad	950 ml

Matrixlösung: 250 µl Basislösung (*organic solvent*) in vorportionierte Matrix (2-Cyano-3-(4-hydroxyphenyl)-acrylsäure, HCCA) überführen und solange vortexen, bis alle Kristalle gelöst sind (nach Herstellerangaben); fertige Matrix bei RT lichtgeschützt 14 Tage lang haltbar

Bruker Bacterial Test Standard: lyophilisierten Bakterienextrakt in 50 ml *organic solvent* lösen, anschließend jeweils 10 µl in Eppendorfgefäße portionieren; Lagerung bei -20°C

Gele:

1% Agarosegel mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml)

Agarose	1,5 g
TBE-Puffer (0,5x)	150 ml
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	7,5 µl
vollständig aufkochen	

2.1.7 Primer-Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	rDNA-Position	Schmelztemperatur (°C)	Molekulargewicht (g/mol)	Nukleinsäure (nmol)	Masse (µg)	TBE (µl) für 100 mM
F339	5'-CTC CTA CGG GAG GCA GCA G-3'	339-357	59,6	5839	42,02	245,38	420,25
TpU1*	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AC-3'	6-27	54,2	6161	21,91	134,99	219,13
Bak533r**	5'-TTA CCG CGG CTG CTG GCA C-3'	533-515	61,9	5781	32,84	189,87	328,45
PC3mod**	5'-GGA CTA CHA GGG TAT CTA AT-3'	806-787	48,4	6154	21,03	129,42	210,29
RtU8*	5'-AAG GAG GTG ATC CAK CCR CA-3'	1522-1541	56,7	6156	25,28	155,62	252,82

Tab. 1: Verwendete Primer-Oligonukleotide mit Angabe von Sequenz, rDNA-Position (*Escherichia coli*), Schmelztemperatur und mit Herstellerangaben (Biologio BV). H = A; C oder T (nicht G); K = T oder G; M = C oder A; R = A oder G; *aus von Wintzingerode et al., 1999; **aus Goldenberger et al., 1997. In der letzten Spalte ist das Volumen (µl) an 0,5x TBE-Puffer angegeben, das für eine 100 µM-Primer-Stammlösung benötigt wird.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultureller Nachweis

Nach der Erfassung der Proben wurden Schaedler-Agarplatten (BD Schaedler Agar mit 5% Schafblut und Vitamin K) auf Raumtemperatur gebracht und mit dem jeweiligen Patienten-code und dem Datum beschriftet. Schaedler-Agar enthält neben 5% defibriniertem Schafblut und 0,01 g Vitamin K pro Liter destillierten Wassers weitere Inhaltsstoffe: 8,5 g pankreatisch abgebautes Casein, 2,5 g peptisch abgebautes Tiergewebe, 1,0 g papainisch abgebautes Sojamehl, 5,8 g Glukose, 5,0 g Hefeextrakt, 1,7 g Natriumchlorid, 0,8 g Dikaliumphosphat, 0,4 g L-Cystin, 0,01 g Hämin, 3,0 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan und 13,5 g Agar. Dieser Schaedler-Agar ist durch das Häm und das Schafblut, das Vitamin K sowie sein nährstoffreiches Medium besonders für das Wachstum von obligaten Anaerobiern geeignet [Gibbons & MacDonald, 1960].



Abb. 7: Anaerobier-Werkbank (Whitley A55, Meintrup).

Zur Einhaltung anaerober Verhältnisse wurden die folgenden Arbeiten unter einer Anaerobier-Werkbank (Abb. 7) durchgeführt. Mit Hilfe einer sterilen Impfschlinge (10 µl) wurde eine kleine Menge der nativen Sputumsuspension mittels der sogenannten „Dreiösen-Ausstrich“-Methode auf der Kulturplatte ausgestrichen. Dafür wurde zunächst eine Hälfte der Agarplatte dicht bestrichen, eine neue Impföse in diesem Bereich dann neu angesetzt und der Ausstrich in einem Teil der zweiten Hälfte der Platte fortgesetzt, ohne die erste Hälfte wieder zu berühren; dieses Mal jedoch nicht so dicht wie zuvor. Im letzten Schritt wurde eine sterile Öse in dem zuletzt ausgestrichenen Feld ebenfalls neu angesetzt und in dem nun übrig gebliebenen Bereich mit großem Abstand der Bahnen ausgestrichen. Danach wurden die Proben bei 37°C unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Nach 24 h erfolgte die erste visuelle

Begutachtung und eine Fortsetzung der Inkubierung für weitere 24 h. Während die aerob wachsenden Bakterien in der Regel meist schon nach kurzer Zeit ein Wachstum zeigen, benötigen speziell die obligaten Anaerobier einen deutlich längeren Zeitraum, in der Regel 48 oder sogar 72 h. Nach erfolgreichem Wachstum einzelner oder mehrerer Bakterienkolonien wurde mit einer feinen, sterilen Impföse (1 µl) jeweils eine einzelne Kolonie abgenommen und wie oben beschrieben auf einer neuen Schaedler-Platte ausgestrichen. Dieses Verfahren wurde so lange fortgesetzt, bis eine Reinkultur vorlag. Die Kulturen wurden phänotypisch beurteilt und die Ergebnisse notiert.

2.2.2 Gram-Färbungen

Die Bakterien sollten nun nach ihrer Morphologie und ihrem Färbeverhalten untersucht werden. Dafür wurde eine Gram-Färbung angefertigt. Mit einer feinen Impföse wurde eine Kolonie oder eine kleine Menge des Bakterien-Rasens auf einem Objektträger in einem vorher auf diesen aufgetragenen NaCl-Tropfen verrieben. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Kulturplatten zurück in die Anaerobier-Werkbank gestellt, da diese Bakterien extrem sauerstoffempfindlich sind und sonst innerhalb von etwa 20 min absterben würden. Nach Lufttrocknung erfolgte eine Hitzefixierung durch das dreimalige Ziehen des Objektträgers mit der Schichtseite nach oben durch die Flamme eines Bunsenbrenners. Das weitere Vorgehen sieht folgendermaßen aus: Färbung mit Kristallviolett für 1 min, Spülung mit Leitungswasser, Stabilisierung mit Lugolscher Lösung (Jod-Kaliumjodid-Lösung) für 1 min, Abspülen mit Leitungswasser, Entfärbung mit 96%igem Alkohol für 5-10 s, erneutes Abspülen mit Wasser, Gegenfärbung mit Safranin und abschließendes Abspülen mit Wasser. Nach Lufttrocknung ist eine mikroskopische Beurteilung möglich.

Die Bakterien werden nach ihrem Färbeverhalten in Gram-positiv und Gram-negativ unterschieden. Die Beurteilung des Farbverhaltens der Bakterien erfolgte lichtmikroskopisch bei 100-facher Vergrößerung und Ölimmersion. Bei den obligat anaeroben Bakterien lassen sich in der Regel Gram-positive und/oder Gram-negative Stäbchen sowie Gram-positive und/oder Gram-negative Kokken unterscheiden. Die Ergebnisse wurden auch in diesem Fall schriftlich dokumentiert.

2.2.3 Massenspektrometrie

MALDI-TOF MS ist ein massenspektrometrisches Analyseverfahren zur Identifizierung klinisch relevanter Mikroorganismen. Eine auf einen metallenen Objektträger in eine Matrix eingebettete kleine Bakterienmenge wird in einem Hochvakuum einem Laserbeschuss ausgesetzt, wodurch die Bestandteile des Mikroorganismus explosionsartig verdampft (Desorption) und ionisiert werden [Schubert & Wieser, 2011]. Nach Beschleunigung der ionisierten Teilchen in einem elektrischen Feld werden diese nach ihrem Masse-/Ladungsverhältnis (m/z)

aufgetrennt und anhand der unterschiedlichen Flugzeiten in Massenspektren umgewandelt, mittels eines Detektors identifiziert und mit in der Datenbank aufgeführten Referenzspektren verglichen (Abb. 8).

Durch die Weiterentwicklung der massenspektrometrischen Analysetechnik Mitte der 1980er-Jahre durch Karas und Hillenkamp wurden Massenspektrometer im klinischen Alltag etabliert, die neben Detektierung kleinerer Moleküle < 1 kDa (z.B. Peptide) auch den Nachweis größerer Moleküle und Proteine zwischen 20 und 30 kDa (z.B. Membranproteine) ermöglichen ohne eine Fraktionierung der Bakterienbestandteile, wodurch eine Identifizierung von Mikroorganismen in der Regel bis in den Spezies-Bereich erreicht werden kann [Karas et al., 1987]. Dieses Verfahren hat sich seitdem zu einer schnellen und kostengünstigen Methode für die Identifizierung von Bakterien entwickelt.

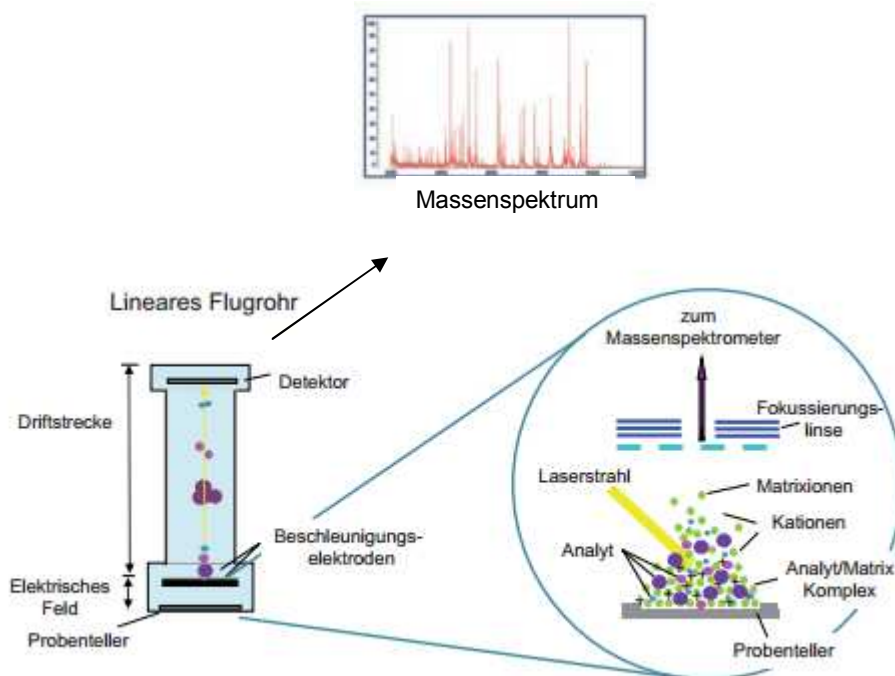


Abb. 8: Ablauf einer MALDI-TOF Massenspektrometrie (nach Burak & Gehrt, 2010; Schubert & Wieser, 2011).

Vor dem Start der massenspektrometrischen Analysen musste eine Kalibrierung des MALDI-Gerätes (Abb. 9) sichergestellt sein. Diese wurde regelmäßig mit dem *Bruker Bacterial Test Standard* (Bruker Daltonik) durchgeführt, einem Extrakt des Stamms *Escherichia coli* DH5 α , das charakteristische Spektren aufweist und einen Massenbereich zwischen 3,6 und 17 kDa abdeckt. Als nächstes musste die Probenplatte (*target*) gereinigt werden. Dafür wurde diese mehrfach mit 70%iger Ethanollösung beschichtet und zwischendurch unter fließendem, heißem Leitungswasser abgespült. Danach wurde die Probenplatte mit 80%iger, wässriger Tri-fluoressigsäure überschichtet und abschließend mit destilliertem Wasser abgespült und getrocknet.

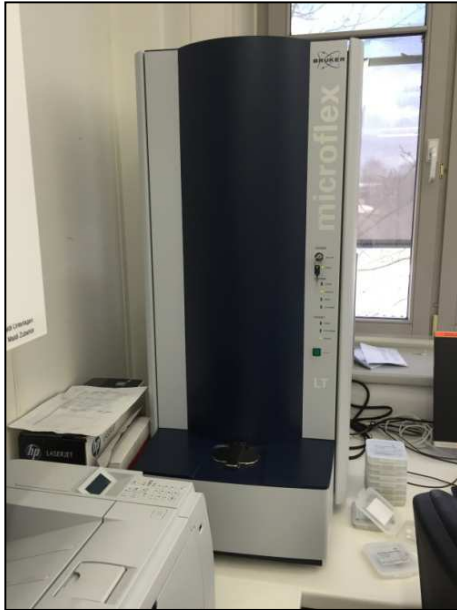


Abb. 9: MALDI-Biotyper microflex™ LT, Bruker Daltonik.

Für die Identifikation der nachgewiesenen Bakterien wurde im nächsten Schritt zunächst mit Hilfe eines Holzstäbchens eine kleine Menge einer Bakterienkolonie von der Kulturplatte auf vier (von 96 möglichen) Feldern der Probenplatte ausgestrichen, wovon zwei Felder zusätzlich mit 1,0 µl einer 70%igen Ameisensäure überschichtet wurden. Hiermit sollen die Bakterienzellwände aufgebrochen und die zytoplasmatischen Proteine leichter freigesetzt werden. Nach Lufttrocknung wurde jeweils 1,0 µl einer geeigneten Matrixlösung (2-Cyano-3-(4-hydroxyphenyl)-acrylsäure, HCCA) aufgetragen. Die Matrixlösung hat dabei mehrere Aufgaben: sie ist verantwortlich für die Unversehrtheit der Bakterienproteine (Fraktionierung wird verhindert) und Ionisation der Analytmoleküle, soll im Energiebereich des verwendeten Lasers Energie absorbieren und außerdem eine Auskristallisation mit der Bakterienprobe erreichen. Unter Verwendung geeigneter Software (Flex Control und MALDI-Biotyper 2.2) konnte das MALDI-Gerät nun bedient und gesteuert werden.

Nach Einbringen der Probenplatte in den MALDI-TOF Massenspektrometer wurde als Erstes ein Hochvakuum aufgebaut, das vom Flex Control kontrolliert wird. Erst jetzt wurde mit Hilfe des MALDI-Biotyper 2.2 der eigentliche Messvorgang gestartet. Jeweils sechs Messpunkte eines jeden Feldes wurden mit je 40 Laserschüssen automatisch beschossen, wodurch es zur Verdampfung und Ionisierung der Bakterienbestandteile kommt. Durch Aufbau einer Spannung von 10-30 kV wurden die Ionen nun beschleunigt und flogen abhängig von Ionisierungsgrad und Ionenmasse in Richtung Detektor. Die jeweilige Flugzeit wurde exakt gemessen und massenspektrometrisch verwertet. Dabei wurden die ermittelten Einzelspektren zu einem Gesamtspektrum zusammengefasst. Sollten die automatischen Messpunkte keine ausreichenden Peaks ergeben, könnten die Messpunkte auch von Hand nachjustiert werden.

Stets erfolgte eine Doppelmessung jeweils zwei mit und zwei ohne Vorbehandlung mit Ameisensäure. Anhand der aktualisierbaren Datenbank wurde mit Hilfe der Software eine automatische Auswertung der Spektren vorgenommen und die Bakterien wurden mit einer sich daraus ergebenden Bewertungszahl (Score, Tab. 2) versehen. Die ermittelten Ergebnisse wurden tabellarisch festgehalten.

Wertebereich	Beschreibung	Symbole	Farbe
2.300-3.000	sehr wahrscheinliche Spezies-Identifikation	+++	grün
2.000-2.299	sichere Gattungswahrscheinlichkeit, wahrscheinliche Spezies-Identifikation	++	grün
1.700-1.999	wahrscheinliche Gattungs-Identifikation	+	gelb
0.000-1.699	unzuverlässige Identifikation	-	rot

Tab. 2: Werte zur Bewertung der MALDI-TOF-MS-Ergebnisse (nach MALDI Biotyper 2.2 Benutzerhandbuch, Revision 1, Mai 2011, 7-26).

Noch bevor die Kulturen weiteren Untersuchungsmethoden unterzogen wurden, wurde jeweils eine kleine Menge einer Bakterienkolonie in Reinkultur zur weiteren Aufbewahrung konserviert und tiefgefroren. Dafür wurden 2-ml-Kunststoffröhrchen mit 1 ml hypertotonischer Kryo-Konservierungslösung und 25 chemisch behandelten Glasperlen zur Adhäsion von Mikroorganismen (Cryobank) beschriftet. In der Anaerobier-Werkbank wurden die Bakterienkolonien jeweils mit Hilfe einer sterilen Impföse aufgenommen, in das entsprechende Röhrchen eingegeben und gut durchmischt. Danach wurden die Röhrchen fest verschlossen und bei -80°C eingefroren. Für die folgenden Arbeiten wurden nun frisch kultivierte Bakterienkolonien in ausreichender Menge benötigt und teilweise mehrere Kulturplatten angelegt.

2.2.4 Orientierende biochemische Schnell-Identifikation

Der rapid ID 32 A ist seit vielen Jahren ein standardisiertes und gängiges Identifizierungssystem für anaerobe Bakterien (Abb. 10). Innerhalb von 4 h lassen sich anaerobe Bakterien in Reinkultur durch die Überprüfung von 29 möglichen biochemischen Leistungsmerkmalen (Tab. 3) mit Hilfe einer Datenbank identifizieren. Der Versuchsaufbau sieht folgendermaßen aus: Die Teststreifen mit insgesamt 32 Vertiefungen werden auf Raumtemperatur gebracht und eindeutig beschriftet. Mit einem sterilen Wattetupfer wird eine ausreichende Menge eines Kulturrasens in ein Röhrchen mit 3 ml dH_2O gegeben, wobei darauf geachtet werden muss, dass bei diesem Vorgehen keine Luft mit eingebracht wird. Die Suspension soll dabei auf einen Trübungsstandard von McFarland 4 mit Hilfe eines Densitometers eingestellt werden. Die Beimpfung des Teststreifens folgt sofort. Unter Verwendung einer elektronischen Pipette werden exakt 55 μl Suspension in jede Vertiefung pipettiert, wobei die Vertiefung, die als aktiven Bestandteil Harnstoff (mit URE bezeichnet) enthält, abschließend noch mit zwei Tropfen Paraffinöl verschlossen wird. Der Teststreifen wird mit dem mitgelieferten Deckel abgedeckt und in aerober Atmosphäre in einem Wärmeschrank bei $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ für 4-4,5 h inku-

biert. Vor Ablesung des Streifens müssen teilweise noch weitere Reagenzien nach Herstellerangaben in die Vertiefungen des Teststreifens eingebracht werden. Dabei wurden folgende Reagenzien verwendet: NIT1- und NIT2-, James- sowie FB-Reagenz (Tab. 4). Eine automatisierte oder visuelle Ablesung muss dann innerhalb von 5-10 min erfolgen.

Vertiefung	Test	Substrate	Reaktionen/Enzyme
1.0	URE	Harnstoff	Urease
1.1	ADH	L-Arginin	Arginin-Dihydrolase
0.0	NIT	Kaliumnitrat	Nitratreduktion
0.1	IND	L-Tryptophan	Indolproduktion
0.2	PAL	N-Naphtylphosphat	Alkalische Phosphatase
1.C	GDC	L-Glutaminsäure	Glutaminsäure-Decarboxylase
			<u>Kohlenhydrat-Abbauenzyme</u>
1.2	α GAL	4-Nitrophenyl- α D-Galaktopyranosid	α -Galaktosidase
1.3	β GAL	4-Nitrophenyl- β D-Galaktopyranosid	β -Galaktosidase
1.4	β GP	4-Nitrophenyl- β D-Galaktopyranosid-6-Phosphat-2CHA	β -Galaktosidase-6-Phosphat
1.5	α GLU	4-Nitrophenyl- α D-Glukopyranosid	α -Glukosidase
1.6	β GLU	4-Nitrophenyl- β D-Glukopyranosid	β -Glukosidase
1.7	α ARA	4-Nitrophenyl- α L-Arabinofuropyranosid	α -Arabinosidase
1.8	β GUR	4-Nitrophenyl- β D-Glukuronid	β -Glukuronidase
1.9	β NAG	4-Nitrophenyl-N-Acetyl- β D-Glukosaminid	β -N-Acetyl-b-Glukosamin
1.D	α FUC	4-Nitrophenyl- α L-Fukopyranosid	α -Fukosidase
			<u>Kohlenhydrat-Fermentationsenzyme</u>
1.A	MNE	D-Mannose	Mannose-Fermentation
1.B	RAF	D-Raffinose	Raffinose-Fermentation
			<u>Aminosäure-Arylamidasen</u>
0.3	ArgA	L-Arginin- β -Naphthylamid	Arginin-Arylamidase
0.4	ProA	L-Prolin- β -Naphthylamid	Prolin-Arylamidase
0.5	LGA	L-Leucyl-L-Glycin- β -Naphthylamid	Leucyl-Glycin-Arylamidase
0.6	PheA	L-Phenylalanin- β -Naphthylamid	Phenylalanin-Arylamidase
0.7	LeuA	L-Leucin- β -Naphthylamid	Leucin-Arylamidase
0.8	PyrA	L-Pyroglytaminsäure- β -Naphthylamid	Pyroglytaminsäure-Arylamidase
0.9	TyrA	L-Tyrosin- β -Naphthylamid	Tyrosin-Arylamidase
0.A	AlaA	L-Alanyl-L-Alanin- β -Naphthylamid	Alanin-Arylamidase
0.B	GlyA	L-Glycin- β -Naphthylamid	Glycin-Arylamidase
0.C	HisA	L-Histidin- β -Naphthylamid	Histidin-Arylamidase
0.D	GGA	L-Glutamyl-L-Glutaminsäure- β -Naphthylamid	Glutamyl-Glutaminsäure-Arylamidase
0.E	SerA	L-Serin- β -Naphthylamid	Serin-Arylamidase

Tab. 3: Auflistung der beim rapid ID 32 A Testsystem verwendeten Substrate und der möglichen biochemischen Reaktionen zur Identifikation von Anaerobiern, teilweise unter Verwendung zusätzlicher Reagenzien (nach Testbeschreibung rapid ID 32 A, REF 32300, bioMérieux).

Reagenz	Inhaltsstoffe	Menge
NIT 1	Sulfanilsäure	0,4 g
	Essigsäure	30 g
	H ₂ O	70 ml
NIT 2	N,N-Dimethyl-1-Naphtylamin	0,6 g
	Essigsäure	30 g
	H ₂ O	70 ml
JAMES	R1: HCl 1N	100 ml
	R2: Verbindung J 2183 (vertraulich)	0,66 g
FB	R1: Natriumlaurylsulfat	7,5 g
	Metanol	30 ml
	Dimethylsulfoxid	70 ml
	R2: Fast Blue BB (aktive Substanz)	0,14 g

Tab. 4: Zusammensetzung der verwendeten Reagenzien für das rapid ID32 A-Testsystem (nach Herstellerangaben, bioMérieux, 15460H 2015/03 und 14574C 2016/03).

Die automatisierte Bewertung wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des mini API[®] und der mini API-Identifizierungssoftware (Database Version 3.2) vorgenommen. Die etwaigen Farbreaktionen der jeweiligen Vertiefungen wurden dabei abgelesen und an den Datenprozessor übermittelt. Bei der visuellen Ablesung wurden die chemischen Reaktionen anhand definierter Farbumschläge beurteilt und mittels eines numerischen Profils auf einem Ergebnisblatt notiert.

Die einzelnen Ergebnisse erhielten dabei die Zahlenwerte „1“, „2“ oder „4“ (je nach positiver Reaktion und Position auf dem Teststreifen). Diese wurden in vorgegebenen Dreiergruppen addiert und ergaben somit zehn verschiedene Zahlenwerte zwischen „0“ (keine Reaktion) und „7“ (alle Reaktionen positiv). Lediglich der Zahlenwert an der 9. Stelle besteht ausschließlich aus der Addition von zwei Zahlenwerten, da hier nur zwei Vertiefungen befüllt werden, das dritte Nöpfchen bleibt leer. Dieser Zahlenwert kann daher höchstens „3“ ergeben.

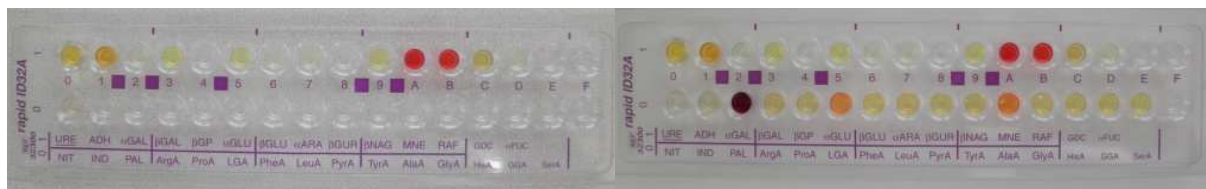


Abb. 10: Beurteilung eines rapid ID32 A-Teststreifens nach Inkubation, vor (links) und nach (rechts) Zugabe der zusätzlichen Reagenzien.

Die ermittelte Zahlenkombination kann nun manuell eingegeben und von der mini API-Software ausgewertet werden. Man erhält auch in diesem Fall ein Ergebnisprotokoll mit der Identifizierungswahrscheinlichkeit in Prozent auf Spezies- oder Gattungsebene (Tab. 5). Die Ergebnisse wurden schriftlich festgehalten.

Identifizierungs-Wahrscheinlichkeit	Anzahl Spezies-Nennungen
> 99%	1
91-99%	1
81-90%	1
≤ 80%	≥ 2
keine Angabe möglich	1 oder mehrere
Identifizierungs-Wahrscheinlichkeit	Erkennung Bakterien-Gattung
variabel	ja (mehrere Spezies-Nennungen möglich)
variabel	fraglich (≥ 2 Gattungen), Zusatztests erforderlich

Tab. 5: Auswertungskriterien des rapid ID 32 A: Ergebnisse auf Spezies- und Gattungsebene.

2.2.5 Detaillierte biochemische Identifikation

Ein weiteres chemisches Testverfahren für die Identifikation von Anaerobiern ist api[®] 20 A (Abb. 11). Dabei werden 21 biochemische Reaktionen in 20 Probenröhrchen beurteilt, wobei zusätzliche Merkmale, wie Gram-Färbeverhalten, Sporenbildung, Morphologie der Anaerobier und eine mögliche Katalasereaktion Berücksichtigung finden (Tab. 6). Im Unterschied zu dem vorher beschriebenen System des rapid ID 32 A muss die Inkubation der vorher beimpften Teststreifen erneut in anaerober Atmosphäre erfolgen. Zudem benötigt der Test eine Inkubationszeit von mindestens 24, in einigen Fällen sogar 48 h.

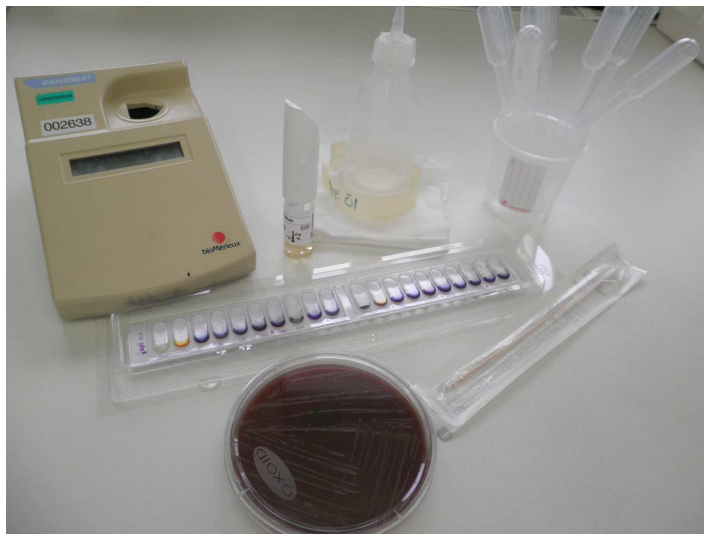


Abb. 11: Testaufbau api[®] 20 A (bioMérieux).

Die Teststreifen werden aus ihrer Verpackung genommen, beschriftet und in eine Plastikwanne gelegt, die mit dH₂O ein wenig angefeuchtet wird. Für die Herstellung einer geeigneten Bakterien-Suspension benötigt man 4 ml eines speziellen api[®] 20 A-Mediums. Dieses enthält 5 g Tryptocase, 5 g Hefeextrakt, 2,5 g Natriumchlorid, 0,2 g L-Tryptophan, 0,4 g L-Cystein, 0,005 g Hämin (Schwein), 0,01 g Vitamin K, 0,1 g Natriumsulfit sowie demineralisiertes Wasser ad 1000 ml, eingestellt auf einen pH-Wert von 6,9-7,3. Mit Hilfe eines sterilen Watteträgers wird auch in diesem Fall eine ausreichende Menge von unter anaeroben Bedingungen kultivierten Kolonien in Reinkultur aufgenommen und vorsichtig und ohne Luftzugabe in das api[®]-20A-Medium eingebracht. Dafür wird der Wattetupfer einmalig in die Suspension eingeführt und durch mehrfaches Drehen an der aufrecht gehaltenen Ampullenwand ausgestrichen. Da besonders junge Kulturen (18-24 h) bevorzugt verwendet werden sollten, ist es teilweise nötig, dafür mehrere Blutagarplatten zu beimpfen, da einige Bakterien, darunter insbesondere Veillonellen, in kleinen, zarten Kolonien wachsen und deren Bakterienmenge daher auch nur gering ausfällt. Die Trübung der Suspension sollte mindestens einen McFarland-Standard 3 erreichen, die stets mit Hilfe eines Densitometers überprüft wird. Für die gleichmäßige Durchmischung der Suspensionslösung wird ein Reagenzschüttler verwendet.

Test	Substrate	Reaktionen/Enzyme	Reagenzien, Lösung
IND	L-Tryptophan	Indolproduktion	XYL/EHR
URE	Harnstoff	Urease	
		Säurebildung	
GLU	D-Glukose	Glukose	BCP
MAN	D-Mannit	Mannit	BCP
LAC	D-Laktose (Rind)	Laktose	BCP
SAC	D-Saccharose	Saccharose	BCP
MAL	D-Maltose	Maltose	BCP
SAC	Salicin	Salizin	BCP
XYL	D-Xylose	Xylose	BCP
ARA	L-Arabinose	Arabinose	BCP
GLY	Glycerin	Glycerin	BCP
CEL	D-Cellobiose	Cellobiose	BCP
MNE	D-Mannose	Mannose	BCP
MLZ	D-Melecitose	Melecitose	BCP
RAF	D-Raffinose	Raffinose	BCP
SOR	D.Sorbit	Sorbit	BCP
RHA	L-Rhamnose	Rhamnose	BCP
TRE	D-Trehalose	Trehalose	BCP
		Hydrolyse	
GEL	Gelatine (Rind)	(Protease) Gelatine	
ESC	Äsculin (Eisencitrat)	(β -Glukosidase) Esculin	
CAT		Catalase	H ₂ O ₂
SPOR		Sporen	
GRAM		Gramfärbung	
COCC		Morphologie	

Tabelle 6: Auflistung der im api[®] 20 A Testsystem enthaltenen biochemischen Substrate und der möglichen Reaktionen zur Identifikation von Anaerobiern (nach Testbeschreibung api[®] 20 A, REF 20300, bioMérieux).

Reagenz	Inhaltsstoffe	Menge
XYL	Xylen	
EHR	Paradimethylaminobenzaldehyd	0,9 g
	HCl	6,67 g
	Ethanol	82 ml
	H ₂ O	11,3 ml
BCP	Bromkresolpurpur	0,02 g
	H ₂ O	100 ml

Tab. 7: Zusammensetzung der verwendeten Reagenzien für das api[®] 20 A Testsystem (nach Herstellerangaben, bioMérieux, 15460H 2015/03 und 14574C 2016/03).

Nun werden die Becher der Mikroröhrchen unverzüglich mit der hergestellten Bakterien-Suspension beimpft. Dafür wird der in der Wanne liegende Teststreifen leicht angehoben und ein Teil des Pipetteninhaltes langsam und möglichst am Rand des Röhrchens eingebracht, damit eine Blasenbildung vermieden wird. Dabei werden die Röhrchen nur zur Hälfte gefüllt. Danach wird der Teststreifen wieder abgelegt und das elfte Röhrchenvollständig befüllt, in dem sich Gelatine befindet. Zum Abschluss wird das Röhrchen Nr. 1, das mit L-Tryptophan benetzt ist, mit Paraffinöl überschichtet, sodass ein Entweichen des gebildeten Indols vermieden werden kann. Für die Inkubation wird nun eine spezielle Anaerobierbox verwendet, in die neben dem Teststreifen auch eine ausreichende Anzahl von Gaze-Beuteln zur Erzeugung einer anaeroben Atmosphäre eingebracht werden sowie ein Indikatorstreifen zur Überprüfung der anaeroben Verhältnisse. Der Indikatorstreifen entfärbt sich unter Sauerstoffabschluss. Danach erfolgt eine Inkubation bei $36\pm 2^\circ\text{C}$ für zunächst 24 ± 2 h. Viele anaerobe Bakterien zeigen jetzt schon deutliche Reaktionen, manche benötigen jedoch längere Reak-

tionszeiten. In diesem Fall kann die Inkubationszeit auch verdoppelt und die Ablesung nach 48 h vorgenommen werden.

Zunächst werden die Spontanreaktionen mit Hilfe einer Tabelle abgelesen. Eine Schwarzfärbung des Gelatine-Tests durch Diffusion der enthaltenen schwarzen Tusche zeigt dabei ein positives Testergebnis an. Auch die Eisen-Citrat-(Esculin)-Reaktion wird anhand der Braun-Schwarz-Färbung sichtbar (Abb. 12). Der Urease-Test in dem zweiten Röhrchen würde durch eine Rotfärbung ebenfalls ein positives Ergebnis aufzeigen. Die Ergebnisse werden auf einem Ergebnisbogen notiert.



Abb. 12: Esculin-Test, links negativ, rechts positiv, Pfeile beachten.

Nachfolgend werden die Testergebnisse nach Reagenzzugabe überprüft. Die Teströhrchen mit Kohlenhydraten, deren Spaltung durch gewisse Anaerobier zu Säurebildung führt, können durch Zugabe von jeweils einem Tropfen BCP-Reagenz entfärbt werden und der Röhrcheninhalt erscheint bei positiver Reaktion gelb bis gelb-grün. Auf das Paraffinöl des 1. Röhrchens wird im Verlauf zuerst ein Tropfen der Xylen- und nach 2-3 min vorsichtig ein Tropfen der EHR-Reagenz gegeben, ohne dass sich dabei die Reagenzien vermischen. Eine rote Verfärbung innerhalb von 5 min würde in diesem Fall ein positives Ergebnis anzeigen. Nachdem der Teststreifen 30 min der Raumluft ausgesetzt war, wird noch ein Katalase-Test durchgeführt. Dafür werden zwei Tropfen H_2O_2 in ein positives Röhrchen gegeben und eine mögliche Blasenbildung wird abgewartet (Tab. 7, Abb. 13).

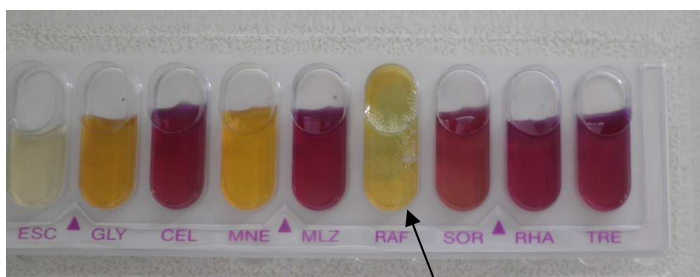


Abb. 13: Positiver Katalase-Test durch Nachweis von Bläschen in dem Röhrchen mit Säurebildung durch Raffinose (Pfeil).

Die Interpretation der Testergebnisse erfolgt nun wie beim rapid ID 32 A anhand eines numerischen Profils. Auch hier erhält jedes Teströhrchen einen Zahlenwert, abhängig von sei-

nem Ergebnis und seiner Position innerhalb einer Dreiergruppe, in der die Einzel-Zahlenwerte addiert werden. Als 21. chemische Reaktion wird ein positives Katalase-Ergebnis dabei mit dem Zahlenwert „4“ verzeichnet. Eine Sporenbildung erhält zudem den Zahlenwert „1“, eine positive Gram-Färbung den Zahlenwert „2“ und nachgewiesene Kokken (COCC) den Zahlenwert „4“. Am Ende erhält man eine achtstellige Zahlenkombination, die mit Hilfe der Tastatur des mini API® (bioMérieux) unter Verwendung der mini API-Software Datenbank (Version 4.0) eingegeben und identifiziert werden kann. Das Ergebnisprotokoll ergibt die Identifizierungswahrscheinlichkeit (in %) des ermittelten Bakteriums (Abb. 14, Tab. 8). Alle Ergebnisse werden schriftlich festgehalten.



Abb. 14: api® 20 A-Teststreifen, Reaktionen mit anschließender Bakterien-Identifikation.

Auswertungsbeurteilung	%Identifikation	Anzahl Spezies/Gattungen
gute Identifizierung	> 90	1 Spezies
akzeptierbare Identifizierung	< 90	1 Spezies
gute Identifizierung auf Genus-Ebene	< 90	1 Gattung, mehrere Spezies
geringe Selektivität	variabel	2-3 Gattungen
Identifizierung unzuverlässig/zweifelhaftes Profil	kA	> 3 Gattungen

Tab. 8: Beurteilungskriterien von api® 20 A-Ergebnissen, kA = keine Angabe.

2.2.6 Spezies-Bestimmung durch 16S-rDNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung bakterieller 16S-rRNA-Gene hat sich in den letzten Jahrzehnten zum sogenannten Goldstandard unter den gängigen Identifizierungs-Methoden für Bakterien entwickelt [Clarridge et al., 2004]. Besonders bei schwer kultivierbaren Bakterien oder wenn Probleme bei der phänotypischen Isolierung entstehen, werden Sequenzierungsanalysen zur endgültigen Identifizierung der Bakterien herangezogen. Das Testprinzip beruht auf mehre-

ren Arbeitsschritten: 1. Extraktion bakterieller DNA, 2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eines geeigneten Gen-Abschnitts, 3. Nachweis des entstandenen PCR-Produkts durch Gelelektrophorese, 4. Reinigung des PCR-Produkts, 5. Sequenzierungs-PCR, 6. Reinigung des Sequenzierungsprodukts, 7. Sequenzierung und 8. abschließende Auswertung der Sequenzdaten durch Vergleich mit Referenzsequenzen anerkannter internationaler Datenbanken.

Die ribosomale Ribonukleinsäure (rRNA) besteht aus einem linearen Polymer von Ribonukleotiden und wird von der genomischen rDNA kodiert. Sie kommt in allen lebenden Zellen vor und ist als RNA-Molekül zusammen mit den ribosomalen Proteinen für die Proteinbiosynthese verantwortlich. Sie hat in allen Organismen die gleiche Funktion und ihre Gene haben sich entwicklungsgeschichtlich kaum verändert [Janda et al., 2007]. Die 16S-rRNA bildet mit den Proteinen den Hauptteil der kleineren 30S-Untereinheit der prokaryonten Ribosome. Die Einheit S (nach Svedberg) gibt dabei als Sedimentationskoeffizient die Schwere bzw. Größe der rRNA bei der Ultrazentrifugation an. Die 16S-rRNA besteht aus etwa 1500 Nukleotiden und eignet sich daher besonders zur molekularen Analyse von Bakterien.

Innerhalb der 16S-rRNA-Gene liegen die meisten Bereiche konserviert vor, d.h. die Abfolgen der Sequenzabschnitte sind einheitlich und man findet sie bei fast allen Bakterien gleichermaßen vor. Sie sind für die Funktion der ribosomalen Ribonukleinsäuren und somit für die korrekte Proteinbiosynthese verantwortlich. Zwischen diesen Bereichen liegen jedoch auch variable Regionen mit unterschiedlichen Sequenzen bei unterschiedlichen Bakterien. Durch die Sequenzierung dieser variablen Bereiche lassen sich durch Verwendung geeigneter Primer-Oligonukleotide Bakterienisolate nicht nur auf Genus- sondern auch auf Spezies-Ebene vergleichen und identifizieren [Clarridge et al., 2004].

Für die 16S-rRNA-Genanalyse der vorliegenden Arbeit mussten zunächst die tiefgefrorenen Bakterien-Isolate wieder aufgetaut und rekultiviert werden. Dafür wurde das Kryoröhrchen aus dem Gefrierschrank entnommen und mit Hilfe einer sterilen Impfschlinge jeweils ein Kryokügelchen herausgeholt, ohne dass dabei das gesamte Material aufgetaut worden wäre. Danach wurde das Röhrchen wieder verschlossen und für eventuelle Rückstellungen weiter im Gefrierschrank verwahrt. Das Kügelchen wurde auf einer vorher beschrifteten Kulturplatte mit Schaedler-Agar ausgestrichen (vgl. 2.2.1) und anschließend mittig platziert. Somit wurde das Bakterienisolat unter den oben beschriebenen, anaeroben Bedingungen rekultiviert.

Die erste visuelle Begutachtung erfolgte am nächsten Tag, in den meisten Fällen musste jedoch erneut 48-72 h abgewartet werden, bis ein ausreichendes Wachstum zu verzeichnen war. Jetzt konnten die Kulturplatten aus der Anaerobier-Werkbank herausgenommen und weiterverarbeitet werden. Dabei kam es nun nicht mehr darauf an, dass es sich um lebende Kulturen handelte. Mit Hilfe einer sterilen Impföse wurde eine kleine Menge einer Bakterien-

kolonie in ein Röhrchen mit 20 µl Digestions-Puffer (D-Puffer, vgl. 2.1.6) eingebracht. Darauf folgte die Inkubation in einem Thermomixer bei 55°C für 3-4 h. Zwischendurch wurden die Röhrchen per Hand geschüttelt, damit sich ihr Inhalt besser vermischen konnte. Danach wurde die Temperatur für 15 min auf 95°C erhöht, sodass die Proteinase K inaktiviert wurde. Anschließend wurde das Lysat für 10 min bei 11337 x g zentrifugiert und zuletzt bei -20°C tiefgefroren. Vor Beginn der Testserie wurden zudem mehrere Positivkontrollen aus einem bekannten *Staphylococcus-aureus*-Stamm (American Type Culture Collection 25923) angefertigt, die ebenfalls im D-Puffer lysiert und zusammen mit den Studienproben eingefroren wurden.

Für den PCR-Ansatz wurden jeweils bis zu sechs Lysate und eine der Positivkontrollen aufgetaut und anschließend erneut bei 11337 x g für 10 min zentrifugiert. Inzwischen wurden alle weiteren Reagenzien des Mastermix-Ansatzes inklusive Ampuwa® (dH₂O) und die benötigten Primer aufgetaut (Tpu1 als *forward*-Primer und Rtu8 als *reverse*-Primer), Eppendorf-Gefäße und Mini-Röhrchen beschriftet und verschiedene Pipetten (Größen für 10 µl, 100 µl, 1000 µl) mit den entsprechenden, sterilen Pipettenspitzen mit RNA-/DNA-Filter bereitgelegt.

Zuerst wurde eine Verdünnung der als Matrize dienenden Bakterienlysate der Patientenproben sowie der Positivkontrolle im Verhältnis 1:20 mit Ampuwa® (dH₂O) angefertigt. Danach wurde der Mastermix-Ansatz in zweifacher Ausführung vorbereitet, als Mastermix „1“ mit 45 µl Reaktionsgemisch für 5 µl Lysat und als Mastermix „2“ mit 40 µl Reaktionsgemisch für 10 µl Lysat (Tab. 9). Dieses zusätzliche Reaktionsgemisch wurde immer angesetzt, damit optimale Reaktionsbedingungen leichter gefunden werden konnten.

Reagenz	Mastermix 1*	Mastermix 2**
Ampuwa® (dH ₂ O)	n+1 x 38 µl	n+1 x 33 µl
Taq-Puffer	n+1 x 5 µl	n+1 x 5 µl
dNTP	n+1 x 1 µl	n+1 x 1 µl
Primer TpU1	n+1 x 0,5 µl	n+1 x 0,5 µl
Primer RtU8	n+1 x 0,5 µl	n+1 x 0,5 µl
Gesamtmenge	n+1 x 45 µl	n+1 x 40 µl

Tab. 9: Mastermix-Ansatz für unterschiedliche Verdünnungen (* für 5 µl, ** für 10 µl Lysat).

Nun wurde der Mastermix jeweils anteilig in die vorher beschrifteten Röhrchen pipettiert und anschließend wurden entweder 5 µl oder 10 µl des jeweiligen Lysats hinzugegeben. Die Negativprobe erhielt dH₂O (Ampuwa®) statt Lysat. Jeder Reaktionsansatz hatte nun ein Gesamtvolumen von 50 µl. Erst jetzt wurde die Taq DNA Polymerase aus dem Tiefkühlschrank genommen und jeweils exakt 0,2 µl zügig in jedes Röhrchen pipettiert. Danach wurden die Röhrchen in einem Thermocycler positioniert und der PCR-Amplifikationsvorgang (Tab. 10)

wurde gestartet. Dabei war es wichtig, dass die für die ausgewählten Primer optimalen Temperaturen und die richtige Zeiteinstellung für den jeweiligen PCR-Schritt eingehalten wurden. Die Hybridisierungs-Temperatur sollte etwa 5°C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer gewählt werden.

Phase	Funktion	Temperatur	Zeit
initial	Aktivierung der <i>Taq</i> Polymerase	95°C	4 min
40 Zyklen	Denaturierung	95°C	1 min
	Hybridisierung	51°C	1 min
	Elongation	72°C	2 min
terminal	letzte Elongation	72°C	7 min
	Kühlung	4°C	unbegrenzt

Tab. 10: Bedingungen der PCR-Amplifikation.

In der Zwischenzeit wurde das Gel für die Gelelektrophorese aus 1%iger Agarose mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) vorbereitet (vgl. 2.1.6). Da Ethidiumbromid als karzinogen angesehen wird, wurden Nitrilhandschuhe getragen. Das zugesetzte Ethidiumbromid interkaliert während des Elektrophoresevorgangs in die DNA, sodass nach ultravioletter Bestrahlung eine Fluoreszenz detektiert werden kann. Die Flasche mit der Gellösung wurde leicht geöffnet und in der Mikrowelle für 5 min aufgeköcht, bis sich das Gel aufgelöst hatte und alle Schlieren der Agarose verschwunden waren. Dafür wurde die Flasche mehrfach aus der Mikrowelle genommen und vorsichtig geschwenkt. In der Zwischenzeit wurde der Gelschlitten mit Kreppband abgedichtet und ein Kamm mit 24 Zähnen aufgesetzt. Nach leichtem Abkühlen wurde nun das Gel gegossen. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich das Gel gleichmäßig verteilte und die Zähne des Kamms etwa 2-3 mm in dem Gel steckten, damit die Taschen später auch tief genug waren. Das Gel ließ man nun für etwa 30 min abkühlen. Feine Risse auf der Oberfläche zeigten eine ausreichende Festigkeit an. Nun konnten das Kreppband und der Kamm vorsichtig entfernt werden. Zwischenzeitlich wurden der Ladepuffer und der DNA-Größenmarker (mit Farbmaler und Ladepuffer) aufgetaut und eine Pipette mit Pipettenspitzen (bis 10 µl) mit DNA-Sperre sowie Parafilmstreifen bereitgelegt.

Nach Beendigung des PCR-Vorgangs wurden zunächst jeweils 4 µl PCR-Produkt (Ansätze bzw. Negativkontrolle) mit 1 µl Ladepuffer auf einem Parafilmstreifen vorsichtig vermischt. Die Beschickung der Geltaschen erfolgte dann in der Reihenfolge: Negativkontrolle, Größenmarker (5 µl), PCR-Produkt-Ladepuffermischungen (Probe 1, Verdünnungen 1 und 2; Probe 2, Verdünnungen 1 und 2; usw.), Größenmarker (5 µl), Positivkontrolle (Verdünnungen 1 und 2). Nun war das Gel für den Elektrophoresevorgang fertig vorbereitet. Das Gel wurde behutsam in die mit 0,5x TBE-Puffer befüllte Gel-Kammer eingebracht, wobei die Geltaschen in Richtung Kathode (negativer Pol) zeigen mussten, da die DNA im Gel zur Anode (positiver

Pol) wandert. Jetzt wurde der Deckel verschlossen, die Kabel entsprechend der Ladung mit dem Spannungsgeber verbunden und die Elektrophorese gestartet. Dafür wurden als Standardeinstellung 150 V, 200 mA und 40 min gewählt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel vorsichtig aus der Gelkammer gehoben und auf einem Tisch mit ultraviolettem Licht (Renner) in eine gut ausgerichtete Position gebracht. Mit Hilfe des ultravioletten Lichts konnten nun im Idealfall DNA-Banden auf Höhe der vom Größenmarker vorgegebenen 1500-bp-Leiterstufe sichtbar gemacht werden, die dann abfotografiert und ausgedruckt werden konnten (Gel Jet Imager 2000, Abb. 15). War die DNA-Bande in beiden Verdünnungsstufen zu schwach oder wurde gar keine DNA-Bande dargestellt, wurde die ganze Prozedur in einem neuen Ansatz wiederholt.

Für die folgende Reinigung der PCR-Produkte wurde jeweils eine der Verdünnungsproben ausgewählt, deren DNA-Bande am deutlichsten sichtbar war. Restliche freie Nukleotide wurden durch eine thermosensitive alkalische Phosphatase (FastAP, 1 μ l) dephosphoryliert und die restlichen Primer und nicht brauchbaren einzelsträngigen DNA-Bruchstücke durch Exonuclease I (0,5 μ l) entfernt. Der eigentliche Reinigungsvorgang erfolgte erneut durch einen der bereits verwendeten Thermocycler. Für die Aktivierung wurden die Proben auf 37°C erwärmt. 5 min wurden für die Aktivierung der Enzyme angesetzt, weitere 15 min für den Abbau der Nukleotide bzw. Entfernung der Primer- und DNA-Reste. Bei 85°C über 15 min wurde dann eine Inaktivierung der Enzyme eingeleitet, für die Aufbewahrung bis zur Weiterverarbeitung der Proben die Temperatur dann auf 15°C gesenkt.

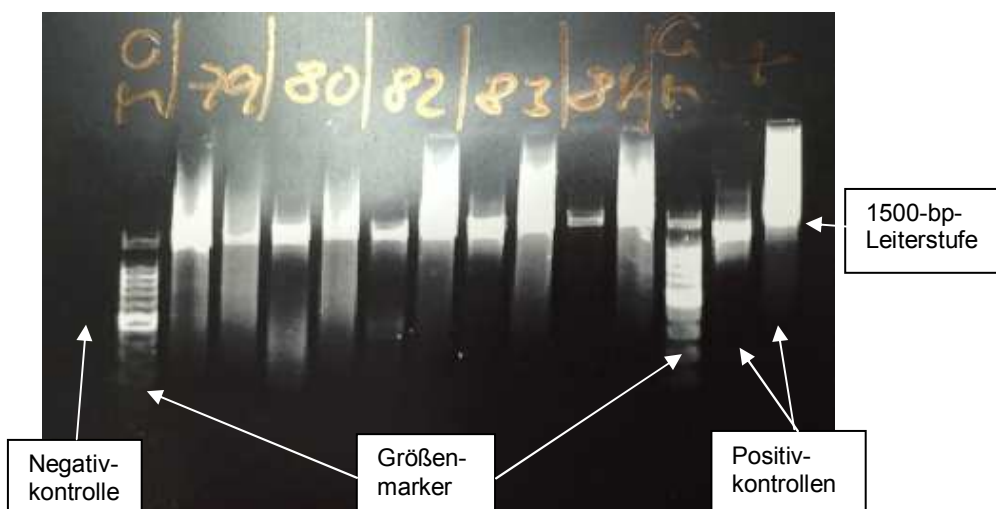


Abb. 15: Dokumentation von DNA-Banden und Größenmarker mit Gel-Jet-Imager 2000.

Nun wurden die Sequenzierungs-PCR-Ansätze vorbereitet. Dafür kamen das BigDye®-Terminator-Cycle-Sequencing-Kit (Applied Biosystems) und drei verschiedene Primer zum Einsatz (Tab. 11). Mit der Auswahl der Primer [Goldenberger et al., 1997] sollte eine möglichst

lange Sequenz des 1500 bp umfassenden 16S-rRNA-Gens abgedeckt werden. Folgende vom rDNA-Gen von *Escherichia coli* abgeleitete Primer wurden in dieser Arbeit verwendet: F339 (*forward*, 5'-3', rDNA-Position 339-357), Bak533r (*reverse*, 3'-5', rDNA-Position 533-515) sowie Pc3mod (*reverse*, 3'-5', rDNA-Position 806-787). Die Sequenzierungs-PCR wurde ebenfalls in einem Thermocycler durchgeführt (Tab. 12).

Reagenz	Volumen
Ampuwa® (dH ₂ O)	9,5 µl
Puffer	4,0 µl
Primer: F339 oder Bak533r oder Pc3mod	0,5 µl
BigDye® Ready Reaction Mix	2,0 µl
Gereinigtes Amplifikat	4,0 µl
Gesamt	20 µl

Tab. 11: Pipettierschema für die Sequenzierungs-PCR.

Phase	Funktion	Temperatur	Zeit
initial	Aktivierung der <i>Taq</i> Polymerase	96°C	1 min
25 Zyklen	Denaturierung	96°C	10 s
	Hybridisierung	50°C	5 s
	Elongation	60°C	4 min
terminal	letzte Elongation	60°C	2 min
	Kühlung	4°C	unbegrenzt

Tab. 12: Bedingungen der Sequenzier-PCR.

Die nachfolgende Aufreinigung der entstandenen Sequenzierungsprodukte mithilfe von Multi-Screen-Platten und Sephadex G-50 sowie die anschließende automatische Auftrennung mittels Kapillarelektrophorese im Sequenziergerät ABI Prism 3500 oder 3130 Genetic Analyzer wurde von den Mitarbeitern der Abteilung für Molekularbiologie des Labors Lademannbogen unter der Leitung von Herrn Lothar Kochan durchgeführt. Der praktische Teil der 16S-rDNA-Sequenzierung war hiermit abgeschlossen.

Die nun vorliegenden Nukleotidsequenz-Chromatogramme wurden ausgedruckt und zuerst visuell begutachtet. Durch den Sequenzer nicht automatisch bestimmbare Nukleotid-Positionen wurden per Hand eingetragen oder korrigiert. Zudem wurde das Startnukleotid gekennzeichnet, ab welchem eine saubere Nukleotidfolge zu beurteilen war. Die manuelle Bearbeitung nicht eindeutig erfasster Nukleotide erfolgte mit Hilfe der durch dnabaser.com zur Verfügung gestellten Software [http://www.dnabaser.com/articles/IUPAC_ambiguity_codes] sowie das Festlegen des jeweiligen Start- und Stoppnukleotids unter Verwendung der Software Codon Code Aligner. Die nun definierten Sequenzen wurden mit den Referenzsequenzen des *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) der internationalen Genbank des *National Center for Biotechnology Information* (Bethesda, MD, USA) verglichen und zusammen mit

den dazugehörigen Ergebnissen und unter Angabe des verwendeten Primers in einer Datei abgespeichert. Die Ergebnisse wurden unter Verwendung der Beurteilungskriterien zur Identifizierung von Bakterien im Rahmen einer 16S-rDNA-Sequenzierung nach Drancourt und Kollegen interpretiert (Tab. 13). Die Referenzsequenz-Einträge werden fortlaufend ergänzt. Die Ergebnisse dieser Arbeit beziehen sich daher auf die Datenlage zwischen Oktober 2015 und Januar 2016, dem Zeitraum der durchgeführten 16S-rDNA-Analysen.

Übereinstimmung der Sequenzen (%)	Beurteilungskriterien
> 99	Identifikation der Bakterien-Spezies oder Bakterien-Gattung
97 – 99	Identifikation der Bakterien-Gattung
< 97	keine Identifikation möglich

Tab. 13: Beurteilungskriterien zur Identifizierung der 16S-rDNA-Sequenzen (nach Drancourt et al., 2000).

2.2.7 Statistische Auswertung

Für den Vergleich der Häufigkeitsunterschiede von Anaerobiern in den Proben der verschiedenen Altersgruppen der untersuchten Patienten wurde Yate's korrigierter Chi-Quadrat-Test für Zweifeldertafeln benutzt, bei Besetzung von Feldern mit weniger als fünf Beobachtungen Fischer's Exakter Test angewandt. Hierbei galten p-Werte < 0,05 als statistisch signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Patienten der CF-Studiengruppe

In der vorliegenden Arbeit wurden Sputen von 53 CF-Patienten auf obligat anaerobe Bakterien untersucht. Dabei handelte es sich um 45 Erwachsene und acht Kinder unter 18 Jahren. Der jüngste Patient war 11, der älteste 59 Jahre alt. In der Altersgruppe von 21 bis 30 Jahren befanden sich die meisten Patienten (Anzahl, n=19; 35,9%), gefolgt von der Gruppe der Kinder und Jugendlichen, wobei sich in der zuletzt genannten Gruppe mehr Mädchen, in der Gruppe der jungen Erwachsenen mehr männliche Patienten befanden. Sogar im höheren Erwachsenenalter > 50 Jahre wurden vier Patienten gezählt (Abb. 16, 17).

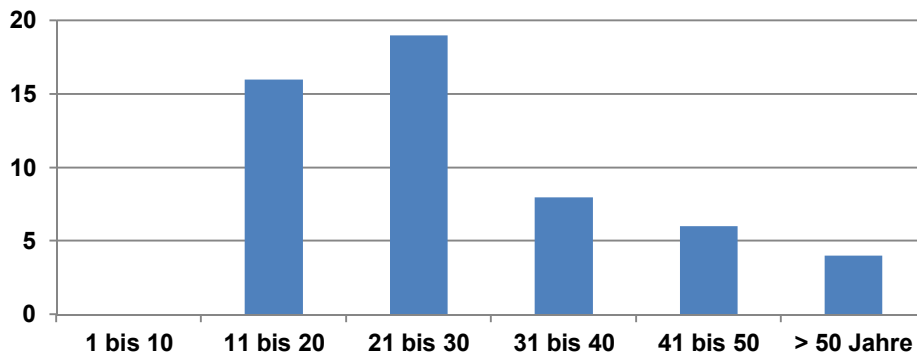


Abb. 16: Altersverteilung der CF-Patienten (Anzahlen).

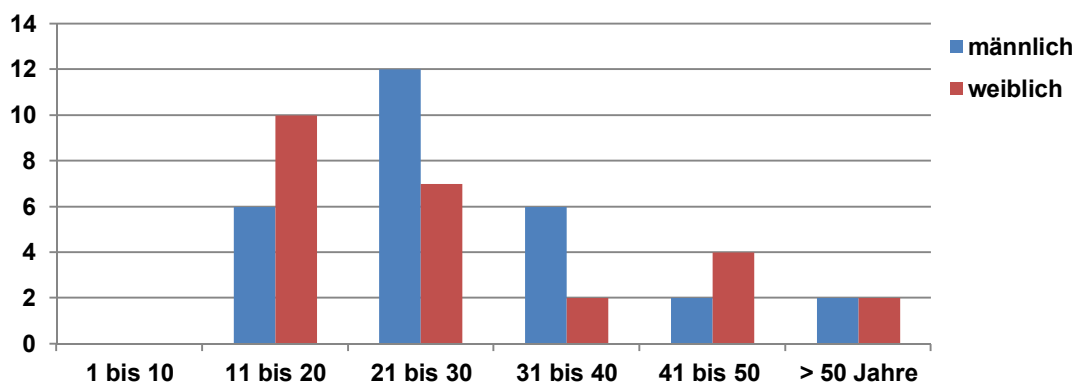


Abb. 17: Altersgruppen-spezifische Geschlechtsverteilung der CF-Patienten (Anzahlen).

Beinahe die Hälfte der Patienten (n=25) besaß die homozygote F508-Deletion, die andere Hälfte hatte den heterozygoten Genotyp. Bei einem Patienten handelte es sich um eine andere Mutation, in zwei Fällen war die Mutation nicht bekannt (Tab. A1 im Anhang). Die Auswertungen der vor Abgabe der Sputumprobe gemessenen FEV₁-Werte wurden nach den Leitlinien der Deutschen Atemwegsliga [Vogelmeier et al., 2007] vorgenommen: Danach hatten zwei junge Patienten (bis 30 Jahre) eine normale Lungenfunktion (FEV₁ >100%, Sollwert

= 100%), während acht aus der gleichen Altersgruppe und eine Patientin > 50 Jahre mit einer $FEV_1 \geq 80\%$ eine leicht eingeschränkte Lungenfunktion aufwiesen (Stadium I). Eine mittelschwere Einschränkung (Stadium II, $FEV_1 50 - < 80\%$) wurde bei 17 Patienten aus der Altersgruppe bis 30 Jahre sowie jeweils bei einem Patienten aus der Gruppe bis 40 Jahre und einer 56-jährigen Patientin dokumentiert. Von einer schweren Einschränkung der Lungenfunktion (Stadium III, $FEV_1 30 - \leq 50\%$) waren besonders die 21- bis 50-Jährigen betroffen ($n=17$) sowie zwei Jugendliche (Alter = 19 Jahre). Bereits 7,5% der Patienten ($n=4$) hatten eine stark herabgesetzte Lungenfunktion ($FEV_1 < 30\%$, Stadium IV), darunter befanden sich zwei der vier Patienten über 50 Jahre (Tab. 14 und Tab. A1 im Anhang). Bereits junge CF-Patienten zeigten in der Regel eine leichte bis mittelschwere Einschränkung ihrer Lungenfunktion. Diese Einschränkung verstärkte sich im Laufe der Zeit. Besonders ab dem mittleren und höheren Lebensalter entwickelte sich in den meisten Fällen eine schwere Funktionseinschränkung. Dies konnte auch durch den Vergleich der FEV1-Stadien (I/II sowie III/IV) in Bezug auf die verschiedenen Alterklassen (Kinder/Jugendliche bzw. Erwachsene) bestätigt werden ($p=0,0048$; Abb. 18, Tab. A2).

Alter (Jahre)	normale FeV1 (n)	Stadium I (n)	Stadium II (n)	Stadium III (n)	Stadium IV (n)	Gesamt
11-20	1	4	9	2	0	16
21-30	1	4	8	5	1	19
31-40	0	0	1	7	0	8
41-50	0	0	0	5	1	6
> 50	0	1	1	0	2	4
gesamt	2	9	19	19	4	53

Tab. 14: Stadieneinteilung der erhobenen FEV_1 -Werte bei CF-Patienten ($n=53$).

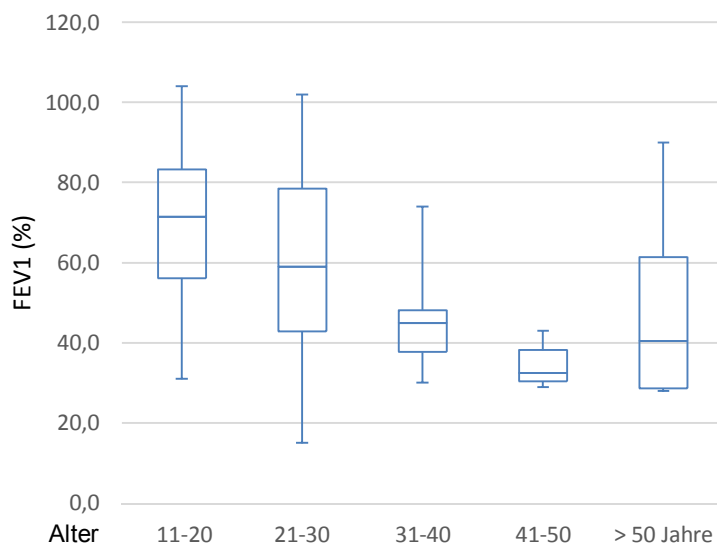


Abb. 18: Altersspezifische FEV_1 -Werte in Prozent bei CF-Patienten ($n=53$) <http://www.sixsigmablackbelt.de/boxplot/>, Zugriff im September 2016 (Statistische Auswertung im Anhang).

Bei 41 der 53 Patienten (77,4%) wurden obligate Anaerobier im Sputum detektiert, während dieser Nachweis bei zwölf Patienten nicht gelang. Beim Vergleich der einzelnen Altersgruppen zeigte sich, dass in der größten Patienten-Gruppe bis 30 Jahre in 89,5% (n=17) der Fälle obligat anaerobe Bakterien nachgewiesen wurden, gefolgt von der Gruppe bis 40 Jahre (87,5%; n=7). Bei den Patienten > 50 Jahre wurden bei 75% (n=3) obligate Anaerobier gefunden und bei den Kindern und Jugendlichen lag der Nachweis bei 68,8% (n=11). In der Gruppe bis 50 Jahre waren drei der sechs Sputumproben positiv. Bezogen auf die Geschlechtsverteilung waren bei den männlichen Patienten im Alter zwischen 21 und 40 Jahren die Sputumproben zu 94,4% (n=17) und in den anderen Altersgruppen zu 50% (n=5) mit obligaten Anaerobiern kolonisiert. Bei den weiblichen Patienten wurden in der Gruppe bis 40 Jahre und in der höchsten Altersklasse (> 50 Jahre) in allen Isolaten (100%, jeweils n=2) obligate Anaerobier nachgewiesen, gefolgt von der Gruppe der Kinder/Jugendlichen (80%, n=8). Bei den übrigen Altersklassen der weiblichen Probanden gelang ein entsprechender Nachweis zu 71% (n=5, bis 30 Jahre) und zu 50% (n=2, bis 50 Jahre) (Abb. 19, Tab. 15).

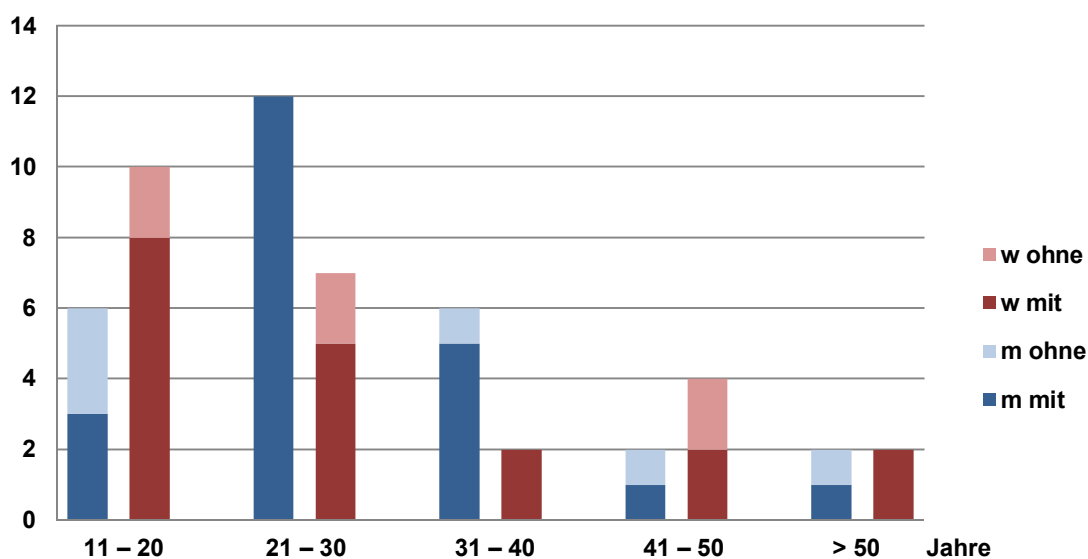


Abb. 19: Alters- und geschlechtsspezifischer Nachweis obligat anaerober Bakterien bei 53 CF-Patienten, nach oben Anzahlen, nach rechts Alter in Jahren, w = weiblich, m = männlich, ohne = kein Nachweis, mit = mit Nachweis.

Bei den gesamten CF-Patienten waren obligat anaerobe Bakterien nicht nur im höheren Lebensalter, sondern bereits bei Kindern und Jugendlichen in erheblichem Ausmaß nachzuweisen. Auch die statistischen Analysen ergaben, dass das Lebensalter keinen Einfluss auf die Prävalenz von Anaerobiern bei CF-Patienten erkennen lässt ($p=0,4755$). Der Vergleich zwischen der Altersgruppe mit den meisten nachgewiesenen Anaerobiern (21-30 Jahre) und allen anderen Altersgruppen ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ($p=0,174$).

Alter (Jahre)	bis 20	21-30	31-40	41-50	> 50	gesamt
normale FEV ₁ mit (n) / ohne (n) Anaerobier	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	2/0
Stadium I mit (n) / ohne (n) Anaerobier	2/2	4/0	0/0	0/0	1/0	7/2
Stadium II mit (n) / ohne (n) Anaerobier	6/3	6/2	1/0	0/0	1/0	14/5
Stadium III mit (n) / ohne (n) Anaerobier	2/0	5/0	6/1	2/3	0/0	15/4
Stadium IV mit (n) / ohne (n) Anaerobier	0/0	1/0	0/0	1/0	1/1	3/1
gesamt (n/n)	11/5	17/2	7/1	3/3	3/1	41/12

Tab. 15: Stadieneinteilung auf der Basis der FEV₁-Werte mit und ohne Anaerobier-Nachweis bei 53 CF-Patienten, n = Anzahl.

In Bezug auf die vorher betrachteten FEV₁-Werte wurde zusätzlich ein Vergleich der Patienten mit und ohne Nachweis von Anaerobiern hergestellt. Dabei wurden zunächst erneut die Altersklassen Kinder/Jugendliche und Erwachsene berücksichtigt. Bei neun bzw. 14 Patienten mit nachgewiesenen Anaerobiern lag die FEV₁ größer, bei zwei bzw. 16 kleiner als 50% ($p=0.0753$). Wurden in der ersten Gruppe auch die Patienten bis 30 Jahre mit einbezogen und mit denen über 30 Jahre verglichen, konnte man erkennen, dass die jüngeren Patienten mit Anaerobiern in der Regel noch eine bessere Lungenfunktion ($FEV_1 > 50\%$) zeigten, während die älteren Patienten eher eine $FEV_1 < 50\%$ aufwiesen ($p=0,0063$). Dieses Verhältnis wurde aber auch bei den Patienten ohne Nachweis von Anaerobiern gefunden ($p=0,0013$). Somit konnte nachgewiesen werden, dass die Lungenfunktion der CF-Patienten in unserem Kollektiv mit ansteigendem Lebensalter nachlässt, diese jedoch keinen Einfluss auf das Auftreten von Anaerobiern hat (Tab. 16).

Alter (Jahre)	Patienten mit Anaerobiern bei FEV ₁ < 50% (Anzahl/gesamt)	FEV ₁ < 50% Patienten mit Anaerobiern (Anzahl/gesamt)
bis 20	2/11 (18%)	2/2 (100%)
21-30	6/17 (35%)	6/6 (100%)
31-40	6/7 (86%)	6/7 (86%)
41-50	3/3 (100%)	3/6 (50%)
> 50	1/3 (33%)	1/2 (50%)

Tab. 16: CF-Patienten mit Nachweis von Anaerobiern bei höhergradig eingeschränkter Lungenfunktion ($FEV_1 < 50\%$) bezogen auf die Gesamtzahl der betroffenen Patienten der jeweiligen Altersgruppen bzw. eingeschränkte Lungenfunktion bei CF-Patienten mit Anaerobiern bezüglich aller Patienten mit eingeschränkter Lungenfunktion der unterschiedlichen Altersgruppen.

Die jeweilige Mutation des *CFTR*-Gens hatte ebenfalls keine Relevanz im Hinblick auf die Häufigkeit des Auftretens von Anaerobiern. Bei Patienten mit gesicherter Homozygotie für F508del konnten in gleichem Maße Anaerobier nachgewiesen werden wie bei Patienten mit Heterozygotie oder einer abweichenden Mutation ($p=0,823$). Der Genotyp hatte auch auf die Altersverteilung keinen Einfluss.

Vier Gruppen obligater Anaerobier werden unterschieden: Gram-positive und Gram-negative Stäbchen sowie Gram-positive und Gram-negative Kokken. In dieser Arbeit gelang der Nachweis Gram-negativer Bakterien (Stäbchen und Kokken). In einer einzigen Sputumprobe wurde *Actinomyces odontolyticus* isoliert, ein Gram-positives Stäbchen, welches jedoch zu den mikroaerophilen Bakterien gezählt wird, da es zwar unter obligat anaeroben Bedingungen wachsen, eine minimale Sauerstoffzufuhr aber ebenfalls tolerieren kann. In den meisten Fällen (73,2%) handelte es sich um den Nachweis nur einer Anaerobiergruppe je Sputumprobe. Bei den anderen Patienten wurden zwei, bei einem Patienten sogar drei verschiedene obligate Anaerobier-Gattungen gefunden. Die mit Abstand am häufigsten nachgewiesenen Bakterien betrafen die Gattung *Prevotella*, ein Gram-negatives Stäbchen, das zu der Ordnung der Bacteroidales gehört und nach dem französischen Mikrobiologen André-Romain Prévot (1894-1982) benannt ist [Shah & Collins, 1981]. An zweiter Stelle standen Gram-negative Kokken der Gattung *Veillonella*. Insgesamt zweimal gelang der Nachweis weiterer Gram-negativer Stäbchen (*Fusobacterium* spp.). In über 70% der Fälle wurde nur eine Bakteriengruppe isoliert, dabei in fast der Hälfte (48,8%) nur *Prevotella* spp. und in 22,0% *Veillonella* spp.. In den Sputumproben mit zwei verschiedenen Bakterien (26,8%) waren immer *Prevotella* spp. nachweisbar, zu 22,0% zusammen mit *Veillonella* spp. und jeweils einmal (2,4%) in Verbindung mit *Fusobacterium* spp. oder *Actinomyces odontolyticus*. Der Patient mit insgesamt drei verschiedenen obligaten Anaerobiern zeigte eine Kombination aus *Prevotella* spp., *Veillonella* spp. und *Fusobacterium nucleatum* (Abb. 20).

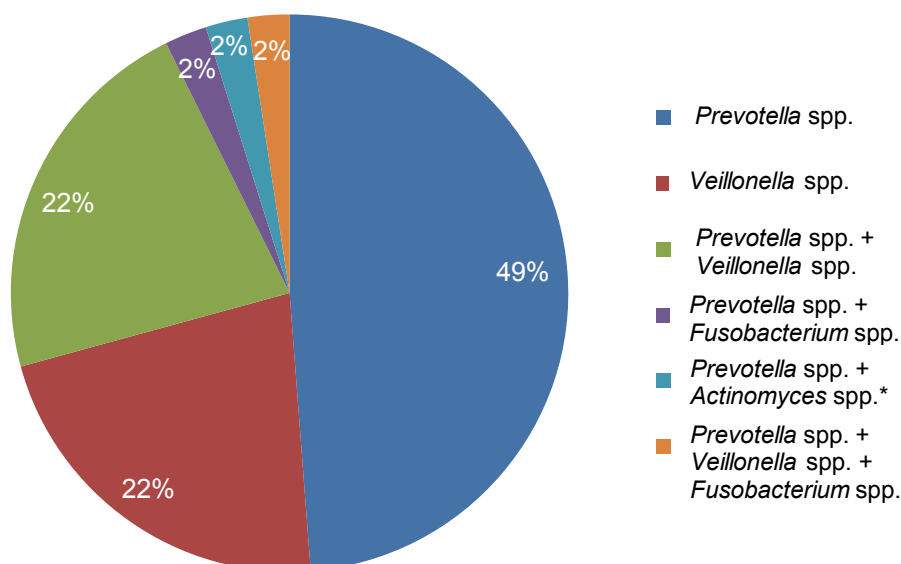


Abb. 20: Häufigkeits-Verteilung der nachgewiesenen obligat anaeroben Bakterien im Sputum von CF-Patienten, * *Actinomyces odontolyticus* = mikroaerophil.

Phänotypisch lassen sich diese Anaerobier nicht immer leicht unterscheiden. Prevotellen und andere obligat anaerobe Stäbchen wachsen auf Blutagar in deutlich abgrenzbaren grau-weißen Kolonien, wobei einige Arten Pigment ausbilden können. Allerdings kann es bis zu zwei Wochen dauern, bis sich eine entsprechende Färbung entwickelt [Downes et al., 2008]. Bei den Kulturen der Isolate dieser Studie lagen keine Pigmentierungen vor. Veillonellen lassen sich dagegen von den oben genannten Anaerobiern gut abgrenzen. Sie wachsen wesentlich langsamer und zeigen sich in zarten, kleinen, hellgrauen Kolonien (Abb. 21).

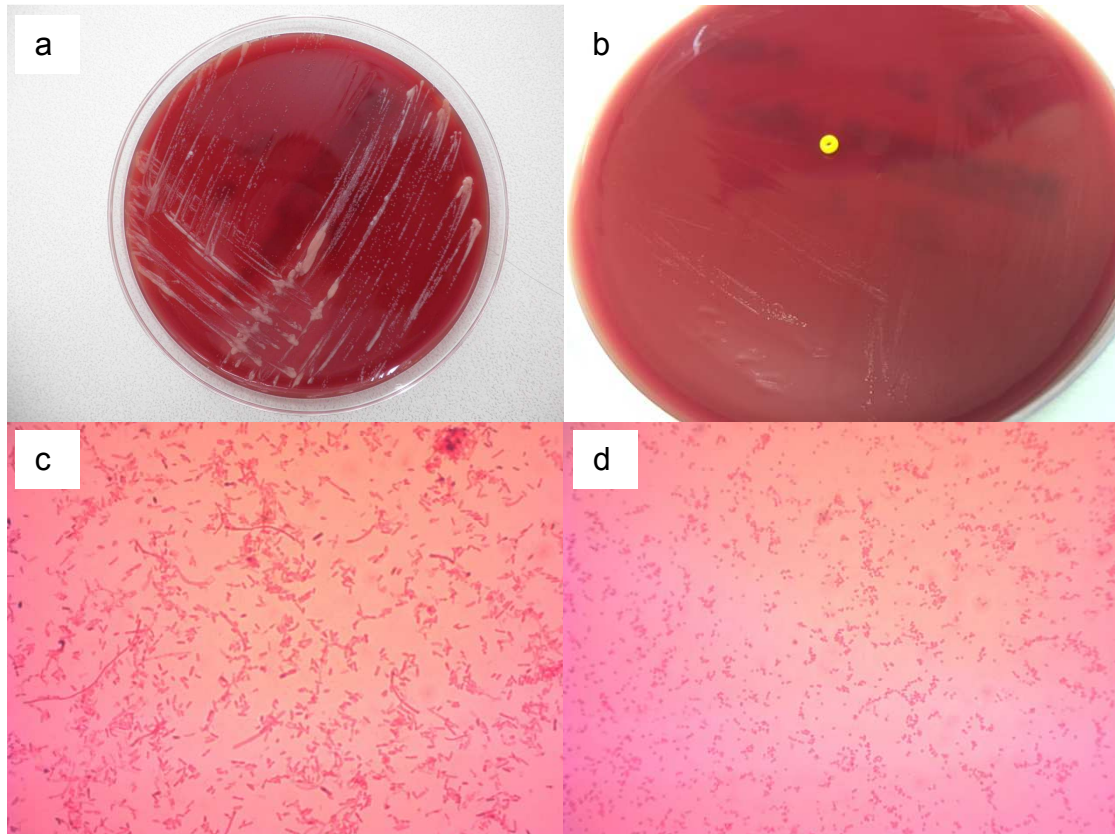


Abb. 21: Kulturelles (a+b) und mikroskopisches (c+d) Bild obligat anaerober Bakterien: *Prevotella* spp. (a+c, links) und *Veillonella* spp. (b+d, rechts).

3.2 Massenspektrometrische Identifikation obligat anaerober Bakterien

Nach Kultivierung unter strikt anaeroben Verhältnissen und erster phänotypischer Begutachtung konnte aus 41 der 53 Proben ein Koloniewachstum beobachtet und somit der Verdacht auf das Vorhandensein obligat anaerober Bakterien ausgesprochen werden. Eine Subkultivierung erfolgte bis zum Erhalt einer Reinkultur. Zu etwa gleichen Teilen wurde so zwischen einem einzigen Bakterium und bis zu vier verschiedenen Bakterien-Spezies unterschieden. In einer Probe fanden sich bei der phänotypischen Begutachtung fünf verschiedene Bakterien-Spezies. So ergaben sich insgesamt 84 Isolate anaerober Bakterien, bei denen die Spezies-Identifikation erbracht werden sollte.

Die innovative MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurde als erste Methode verwendet (vgl. 2.2.3). 81 der 84 Isolate wurden als obligat anaerobe Bakterien identifiziert, ein Isolat als mikroaerophiles Bakterium. In zwei Fällen wurde kein Ergebnis ermittelt. Unter Zuhilfenahme der Wertezahlen (Score) zur massenspektrometrischen Bewertung (Tab. 2) wurde bei zehn Isolaten (11,9%) eine sehr wahrscheinliche Spezies-Identifikation und bei 42 Isolaten (50%) eine sichere Gattungs- und wahrscheinliche Spezies-Identifikation erzielt. Bei 26 Isolaten (31%) wurde eine noch sichere Gattungs-Identifikation erreicht, während bei vier Isolaten (4,8%) die Identifikation als unzuverlässig beurteilt wurde. Nach Durchsicht der Ergebnislisten zeigte sich, dass in vielen Fällen die gleiche Bakteriengruppe und teilweise sogar dieselbe Bakterien-Spezies nachgewiesen wurde, was letztendlich durch die nicht eindeutige phänotypische Unterscheidungsmöglichkeit zu erklären war. So ergaben sich am Ende nur noch 61 verschiedene obligat anaerobe Bakterien-Isolate sowie ein mikroaerophiles Isolat (Abb. 22).

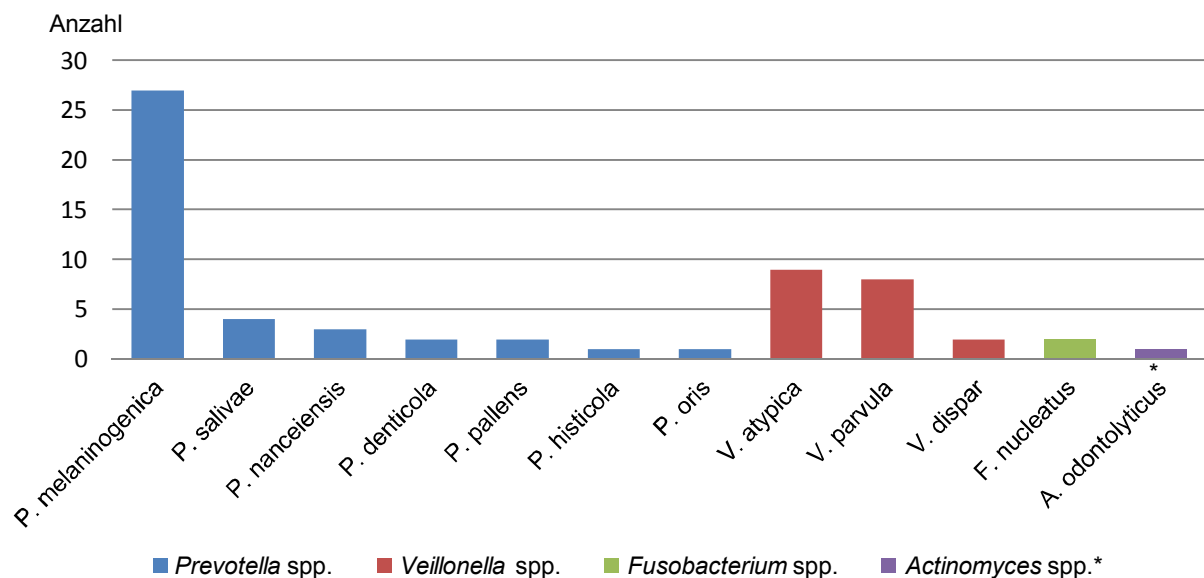


Abb. 22: Verteilung der durch Massenspektrometrie identifizierten obligat anaeroben und mikroaerophilen* Bakterien-Isolate (n=62) aus 84 Untersuchungsproben auf die einzelnen Spezies, *P.* = *Prevotella*, *V.* = *Veillonella*, *F.* = *Fusobacterium*, *A.* = *Actinomyces*, * = mikroaerophil.

Die berücksichtigten MALDI-TOF-MS-Ergebnisse wurden im Zeitraum von September 2012 bis Januar 2015 mit Hilfe der Software MALDI-Biotyper 2.2 erzielt. Im Januar 2016 wurde die Software auf eine neue Version MALDI-Biotyper 2.3 mit entsprechend erweiterter Datenbank aktualisiert. Da diese Software während der laufenden Studie eingeführt wurde, wurden die folgenden Untersuchungen zusätzlich und somit vergleichend durchgeführt.

Die vorher ermittelten Ergebnisse, die nur eine Identifikation auf Gattungsebene, eine unzuverlässige Identifikation oder gar kein Ergebnis erbrachten, wurden mit der neuen Methodik wiederholt und mit den vorher erhobenen Daten verglichen. Für die Auswertung und den nachfolgenden Vergleich mit den anderen Methoden wurden jedoch nur die MALDI-TOF-MS-Er-

gebnisse des MALDI-Biotyper 2.2 (alte Version) herangezogen. Die Wiederholung der Untersuchungen ergab, dass die beiden Isolate, die in den Voruntersuchungen kein Ergebnis erbracht hatten, auch dieses Mal nicht zur Bakterien-Identifizierung führten. Zwei der vorher vier unzuverlässigen Ergebnisse erbrachten nun eine Identifikation auf Gattungsebene, ein Isolat wurde nun sicher auf Gattungsebene, wahrscheinlich sogar auf Spezies-Ebene erkannt. Ein Ergebnis blieb unzuverlässig. Von den 26 vorher nur wahrscheinlich auf Gattungsebene identifizierten Bakterien wurden nun 14 mit der neuen Datenbank sicher auf Gattungsebene erkannt, einer davon sogar mit sicherer Spezies-Identifikation. Die verbliebenen zwölf Isolate wurden auch in der Wiederholung nicht eindeutiger erkannt, darunter auch *Actinomyces odontolyticus* und eines der Fusobakterien. Insgesamt konnte also unter Verwendung der aktualisierten Datenbank die Identifikationswahrscheinlichkeit der Bakterien-Isolate deutlich erhöht werden (Abb. 23). Kein oder ein nicht zuverlässiges Ergebnis wurde jetzt bei nur noch 3,6% (vorher 7,1%) und 16,7% (vorher 31%) erzielt. Jedoch konnten 67 der 84 Isolate (79,8%) mit der neuen Datenbank nun gut bzw. sehr gut bis in die Spezies-Ebene identifiziert werden im Vergleich zur alten Version (n=52; 61,9%).

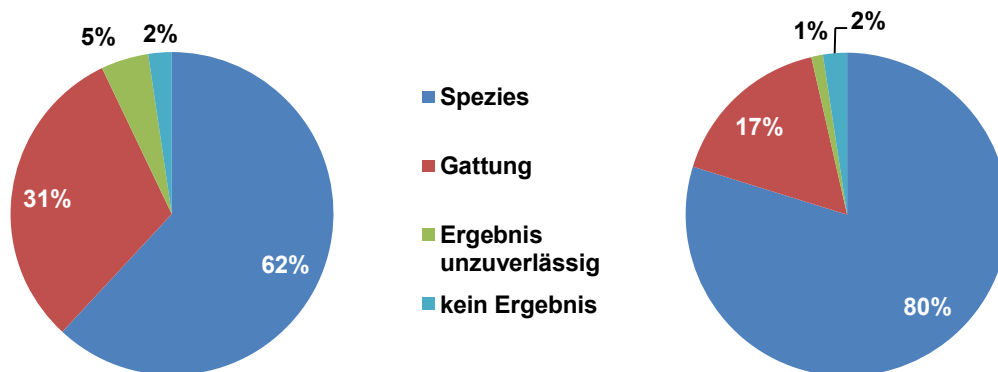


Abb. 23: Massenspektrometrische Ergebnisse, a) Bestimmungen in den Jahren 2012-2015, b) im Jahr 2016.

3.3 Biochemische Schnell-Identifikation obligat anaerober Bakterien

Für die schnelle Identifikation anaerober Bakterien-Isolate ist das biochemische Testverfahren rapid ID 32 A eine gängige Methode (vgl. 2.2.4). Mit diesem Verfahren wurden zunächst 83 Bakterien-Isolate als obligat anaerob erkannt, ein Isolat zeigte sich auch mit diesem Testsystem als mikroaerophil (*Actinomyces odontolyticus*). Die Identifikation gelang entweder mit der visuellen oder automatisierten Begutachtung, in den meisten Fällen mit beiden Auswertungsmethoden. Bei etwa zwei Drittel der Ergebnisse konnte eine Übereinstimmung auf Spezies-Ebene erreicht werden, auch wenn die Bewertung nicht immer identisch ausfiel. Bei diskrepanten Ergebnissen wurde jeweils das Resultat mit der höchsten Identifikationswahrscheinlichkeit berücksichtigt. Je nach der Identifikationswahrscheinlichkeit wurde bis in den Spezies-Bereich oder nur nach Gattungsebene unterschieden. Von den Isolaten wurden 14

(16,7%) sehr gut (> 99% Identifikationswahrscheinlichkeit) oder gut (91-99% Identifikationswahrscheinlichkeit) bis in den Spezies-Bereich identifiziert. Weitere 14 Isolate erzielten eine akzeptable Speziesidentifikation (81-90% Identifikationswahrscheinlichkeit). 45% der Identifikationen (38 Isolate) entfielen auf eine sehr gute oder gute Genus-Erkennung. Darunter befanden sich, trotz hoher Identifikationswahrscheinlichkeit, acht Zuordnungen zu *Veillonella* spp., da der Test eine genauere Differenzierung nicht zuließ. Weitere 18 Isolate (22%) konnten nicht zuverlässig identifiziert werden.

Bei 15 Isolaten wurde nur eine geringe Selektivität erreicht, sodass zunächst keine exakte Bakterien-Identifikation möglich war. Darunter befanden sich zwölf Gram-negative Kokken-Isolate, die vom rapid ID 32 A entweder als *Clostridium tyrobutyricum*, einem Gram-positiven, meist sporenbildenden Stäbchenbakterium oder als *Veillonella* spp. identifiziert wurden. Die Schwierigkeit der Unterscheidung zwischen einem *Clostridium* und einer *Veillonella* konnte mit der positiven Nitratreduktion sowie dem positiven Pyroglutaminsäure-Arylamidase-Test erklärt werden, was fast ausschließlich bei diesen beiden Bakterien vorkommen kann. Die vorher durchgeführte Gram-Färbung erbrachte schließlich doch noch die Identifikation auf Gattungsebene. Die verbliebenen drei Isolate konnten nach Prüfung der Gram-Färbung am Ende sogar einer Spezies-Identifikation zugeordnet werden: *Actinomyces odontolyticus*, *Fusobacterium nucleatum*, und *Fusobacterium necrophorum*. Zwei Ergebnisse waren unzuverlässig (*Prevotella buccae*) und konnten nur als Gram-negatives Stäbchen identifiziert werden. Somit erreichten 31 Isolate (36,9%) mithilfe des rapid ID 32 A eine Spezies-Identifikation, 51 (60,7%) wurden auf Gattungsebene erkannt und bei zwei Isolaten blieb die Identifikation aber unzuverlässig (Abb. 24).

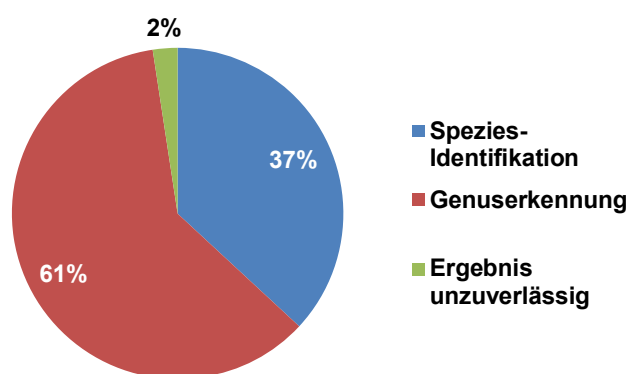


Abb. 24: Identifikations-Ergebnisse mittels rapid ID 32 A in %.

Diese Ergebnisse wurden nun mit den MALDI-TOF-MS-Ergebnissen verglichen. Von den 52 durch MALDI-TOF MS als sehr wahrscheinlich oder wahrscheinlich auf Spezies-Ebene identifizierten Isolate wurden 22 auch durch rapid ID 32 A in identischer Weise erkannt (42,3%). Da die Gram-negativen Kokken durch den rapid ID 32 A-Test nur als *Veillonella* spp. identifi-

ziert wurden, konnten sie beim Vergleich mit den MALDI-TOF-MS-Ergebnissen im Spezies-Bereich keine Berücksichtigung finden. Zwölf der 26 durch MALDI-TOF MS nur auf Genus-Ebene identifizierten Isolate fanden sich mit derselben Angabe der Spezies auch bei dem biochemischen Testverfahren, zwei der vier bei MALDI-TOF MS unakzeptablen Ergebnisse zeigten sich ebenfalls identisch bei dem rapid ID 32 A-System. Somit gab es bei fast 43% Übereinstimmungen bis in die Spezies-Ebene zwischen dem massenspektrometrischen und dem schnellen biochemischen Testverfahren.

3.4 Detaillierte biochemische Identifikation obligat anaerober Bakterien

Die Identifizierung der obligat anaeroben Bakterien gestaltete sich mit dem zweiten, detaillierteren biochemischen Testverfahren deutlich schwieriger (vgl. 2.2.5). Hier musste während der Testdurchführung das anaerobe Milieu weiter aufrechterhalten werden, damit ein vorzeitiges Absterben der Bakterien verhindert werden konnte. Wurde unter Einhaltung aller erforderlichen Maßnahmen kein oder kein eindeutiges Ergebnis erzielt, wurde dieser Test einmalig wiederholt. Bei erneut negativem Testergebnis galt das Bakterium als nicht identifiziert.

Bei 65 der 84 Isolate (77,4%) wurde ein positives Testergebnis erzielt und bei 19 Isolaten (22,6%) blieb das Testergebnis endgültig negativ. Mehr als ein Viertel der Isolate (n=24) erreichte eine gute oder sehr gute Identifikation. Dazu zählten 20 Isolate von *Prevotella melaninogenica/oralis* und eine *Prevotella intermedia/disiens*. Allerdings war hier, durch das Testverfahren bedingt, eine genauere Unterscheidung nicht möglich. Schließlich wurden zweimal *Fusobacterium varium* und einmal *Propionibacterium propionicum/lavidum* identifiziert, ein eher aerotolerantes Bakterium. Letzteres musste auch unter Berücksichtigung der Gram-Färbung als falsches Ergebnis gewertet werden. Eine Identifikation als *Prevotella bivia* war als ein noch akzeptables Ergebnis zu werten. Zunächst zeigten 39 Isolate eine geringe Selektivität oder unsichere Identifikation. Darunter befanden sich 15 Prevotellen, drei Fusobakterien und ein weiteres Bakterium der Bacteroides-Gruppe: *Bacteroides vulgatus*. Weil auch dieses biochemische Testverfahren eine weitere Differenzierung nicht zuließ, konnten die 20 Isolate Gram-negativer Kokken ausschließlich nur unter Berücksichtigung der Gram-Färbung als *Veillonella parvula* identifiziert und der Gattung der Veillonellen eindeutig zugeordnet werden. Die Identifikation eines zweiten *Propionibacterium propionicum/lavidum* wurde nach den Testregeln als unakzeptabel eingestuft und musste daher ebenfalls als falsches Ergebnis beurteilt werden. Somit konnten 24 Isolate bis in den Spezies-Bereich identifiziert werden, 20 Isolate erzielten eine Genus-Erkennung, 19 Ergebnisse blieben unzuverlässig und zwei Identifikationen wurden als inkorrekt beurteilt (Abb. 25).

Alle durch api[®] 20 A als *Prevotella* identifizierte Isolate (n=37) wurden auch durch rapid ID 32 A als solche erkannt. Nahezu vergleichbar waren die massenspektrometrischen Ergebnisse, mit Ausnahme von zwei Isolaten. Dabei konnte beobachtet werden, dass eine Hälfte der durch api[®] 20 A als *Prevotella melaninogenica/oralis* erkannten Bakterien (16/32) sowohl durch MALDI-TOF als auch durch rapid ID 32 A als *P. melaninogenica* erkannt wurden, während die andere Hälfte von den anderen Systemen mit abweichenden Spezies-Angaben identifiziert wurden: bei MALDI-TOF MS als *P. denticola*, *P. histicola*, *P. nanceiensis*, *P. pallens* oder *P. salivae* und durch rapid ID 32 A als *P. buccae*, *P. denticola*, *Pr. intermedia* oder *P. oralis*. Diese Bakterien-Spezies, die alle im Mundraum vorkommen, sind sehr eng miteinander verwandt.

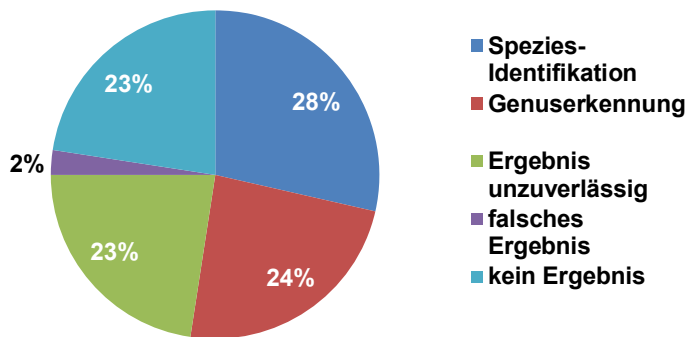


Abb. 25: Identifikations-Ergebnisse mithilfe des api[®] 20 A in %.

Die 20 Isolate Gram-negativer Kokken, die als *Veillonella parvula* identifiziert wurden, wurden in Übereinstimmung mit den beiden anderen Methoden derselben Gattung zugeordnet. Fünfmal wurden Fusobakterien festgestellt, je zweimal *Fusobacterium varium* und *F. necrophorum/nucleatum* und einmalig *F. mortiferum*. Dabei stimmte jedoch nur die Gattung überein (*F. varium*) im Vergleich zu den Ergebnissen durch MALDI-TOF (*F. naviforme*) und rapid ID 32 A (*F. necrophorum*). Alle weiteren Identifikationen durch api[®] 20 A als Fusobakterien oder als *Bacteroides vulgatus* wurden in den anderen Testverfahren den Prevotellen zugeordnet. Durch api[®] 20 A konnte ein Fusobakterium-Isolat gar nicht erkannt werden. Die beiden durch api[®] 20 A als *Propionibacterium propionicum/avidum* identifizierten Bakterien-Isolate wurden von den anderen Testverfahren jeweils als *Prevotella spp.* erkannt. Insgesamt bestand also bei 58 von 65 positiven Testergebnissen (89%) die Übereinstimmung auf Genus-Ebene mit den Testverfahren MALDI-TOF MS und rapid ID 32 A. Unter Berücksichtigung der durch api[®] 20 A nicht identifizierbaren 19 Isolate, verblieb schließlich eine 69%ige Übereinstimmung auf Genus-Ebene.

3.5 Identifikation obligat anaerober Bakterien durch Sequenzierung

Zwei der vorher tiefgefrorenen Isolate ließen sich nicht rekultivieren und konnten bei der 16S-rDNA-Sequenzierung nicht mehr berücksichtigt werden. Alle anderen 82 Isolate wurden erfolgreich rekultiviert und durch 16S-rDNA-Sequenzierung identifiziert (Tab. A3). Ein Isolat wurde auch mit dieser Methode als mikroaerophiles Bakterium identifiziert und die Ergebnisse der vorher verwendeten massenspektrometrischen und biochemischen Systeme damit bestätigt (*Actinomyces odontolyticus*). Bei 63 Sequenzen (76,8%) konnte eine 99- bis 100%ige Übereinstimmung mit den Daten der Genbank erzielt werden, was nach den Beurteilungskriterien nach Drancourt und Kollegen [Drancourt et al., 2000] (Tab. 2) eine sichere Identifikation bis in den Spezies-Bereich bedeutete (Abb. 26). Bei den verbliebenen 19 Sequenzen (23,2%) konnte nur die Bakterien-Gattung eindeutig erkannt werden, obwohl auch hier eine sehr hohe (99-100%ige) Übereinstimmung der Teilsequenzen im Vergleich mit der Genbank vorlag. Darunter waren acht Prevotellen und elf Veillonellen (Tab. 17). Wie auch schon bei den massenspektrometrischen und biochemischen Methoden fanden sich auch hier insbesondere *P. melaninogenica* (40,2%).

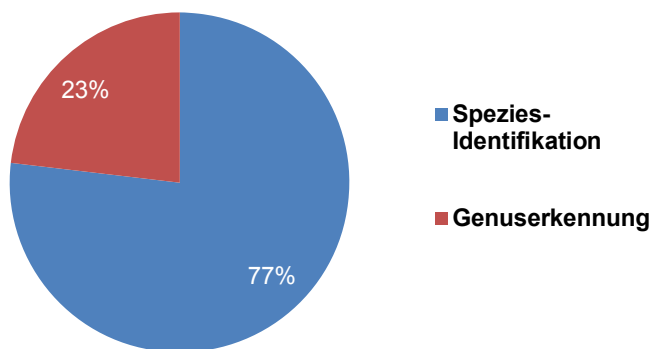


Abb. 26: Identifikations-Ergebnisse durch 16S-rDNA-Sequenzierung in Prozent.

Durch die Verwendung dreier verschiedener Primer wurde ein möglichst großes Teilstück des jeweiligen rRNA-Gens erfasst. Eine Spezies wurde als eindeutig erkannt, wenn mindestens zwei Primer dasselbe Ergebnis zeigten, sonst konnte nur die Identifizierung auf Gattungsebene erbracht werden. Die Eingruppierung in *Prevotella species* (sp.) ergab sich aus identischen Teilsequenzierungen verschiedener Spezies. In fünf Fällen konnte nicht zwischen *P. melaninogenica* und *P. jejuni* unterschieden werden, jeweils einmal bestand die Kombination aus *P. melaninogenica/histicola/veroralis* oder *P. melaninogenica/jejuni/scopos*. Nur einmal wurde *P. melaninogenica* nicht erfasst, hier lautete die Kombination *P. histicola/veroralis/jejuni*. Bei den Veillonellen wurden teilweise identische Sequenzierungen für *Veillonella dispar*, *V. atypica* und/oder *V. parvula* gefunden, sodass dadurch schließlich bei elf Ergebnissen nur *Veillonella* spp. angegeben werden konnte. Zu 100% wurden *Prevotella denticola*, *P. nanceiensis*, *P. oris*, *P. pallens* und *P. salivae* identifiziert ebenso wie die drei

Veillonella dispar, beide *Fusobacterium nucleatum* und einmal *Actinomyces odontolyticus* (Abb. 27, Tab. A7).

Gattung	Anzahl	Spezies	Anzahl
<i>Prevotella</i> spp.	59	<i>Prevotella melaninogenica</i>	33
		<i>Prevotella salivae</i>	5
		<i>Prevotella denticola</i>	3
		<i>Prevotella histicola</i>	3
		<i>Prevotella nanceiensis</i>	3
		<i>Prevotella pallens</i>	3
		<i>Prevotella oris</i>	1
		<i>Prevotella</i> sp.	8
<i>Veillonella</i> spp.	20	<i>Veillonella parvula</i>	6
		<i>Veillonella dispar</i>	3
		<i>Veillonella</i> sp.	11
<i>Fusobacterium</i> spp.	2	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	2
<i>Actinomyces</i> spp.	1	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1
gesamt	82		82

Tab. 17: Ergebnisse durch 16S-rDNA-Sequenzierung.

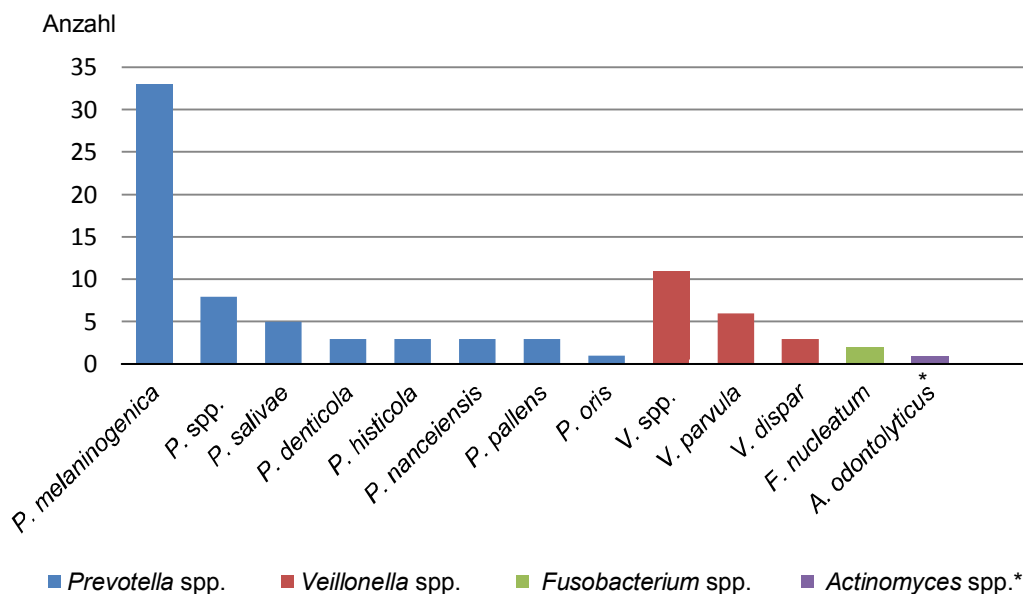


Abb. 27: Identifizierungsergebnisse durch 16S-rDNA-Sequenzierung (n=82), * = mikroaerophil.

3.5 Vergleich der Ergebnisse der Identifikationsmethoden

Von 84 Isolaten wurden zwölf (14,3%) mit allen durchgeführten Methoden bis in den Spezies-Bereich mit übereinstimmenden Ergebnissen identifiziert. Dabei handelte es sich bei allen Isolaten um *Prevotella melaninogenica*. Beim Vergleich der massenspektrometrischen

Ergebnisse mit denen der beiden biochemischen Methoden und der Sequenzanalyse fanden sich bei insgesamt 68 Isolaten (81%) deckungsgleiche Identifikationen bis in den Spezies-Bereich mit mindestens einer weiteren Methode. Bei der 16S-rDNA-Sequenzierung kam man bei Gegenüberstellung der jeweiligen Ergebnisse auf 69,5% Übereinstimmungen bis in den Spezies-Bereich, wobei man hier von 82 Isolaten ausgehen musste, da zwei Isolate nicht rekultiviert werden konnten. Da bei insgesamt 19 Isolaten durch die Sequenzierung nur eine Identifizierung auf Gattungsebene erzielt werden konnte (Tab. 17) und in diesen Fällen identische Sequenzabschnitte mehrerer Spezies keine genauere Identifizierung zuließen, konnte eine höhere prozentuale Übereinstimmung im Vergleich zu den jeweils anderen Methoden ebenfalls nicht erzielt werden. Bei Betrachtung der Ergebnisse des rapid ID 32 A konnten bei 41,7% der Isolate identische Spezies-Erkennungen registriert werden, bei den Ergebnissen des api[®]-20 A-Tests waren es noch knapp 40%. Nur in einem Fall gab es eine alleinige Übereinstimmung zwischen dem biochemischen Test rapid ID 32 A und der Sequenzierung (*Fusobacterium nucleatum*). Bei 14 Isolaten (16,7%) konnte keine Übereinstimmung mit mindestens einer anderen Methode erreicht werden (Abb. 28).

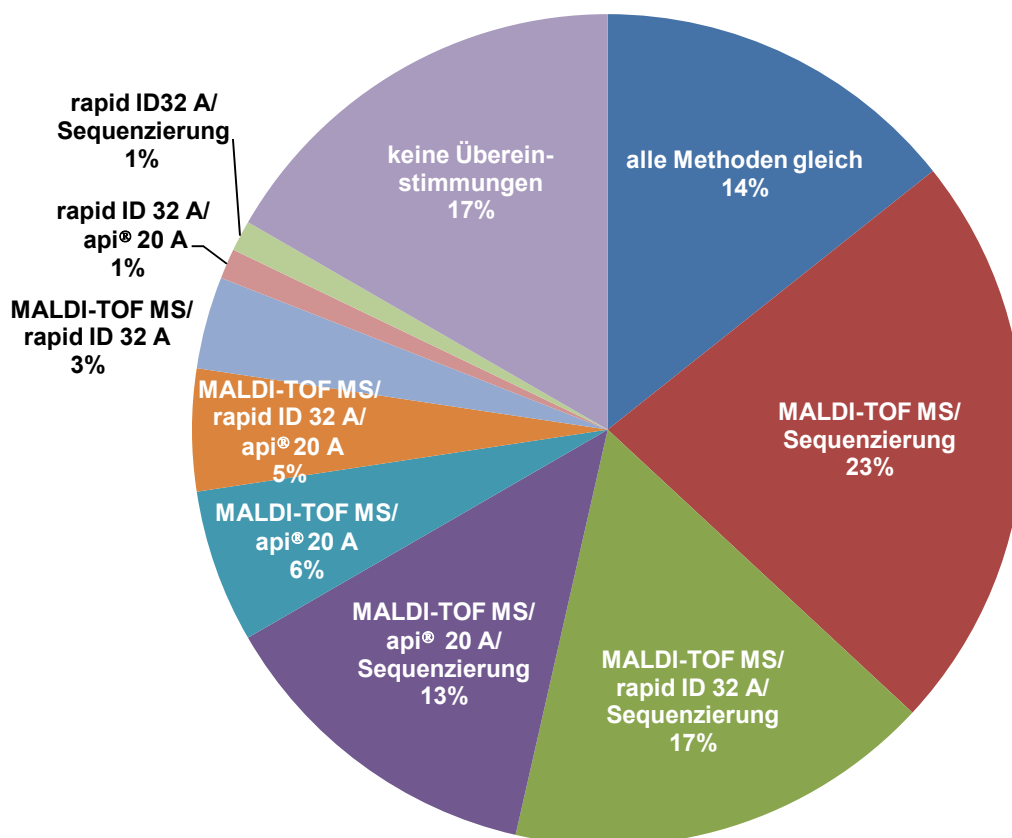


Abb. 28: Verteilung der Ergebnisse im Vergleich der verschiedenen Methoden, bei Übereinstimmung bis in die Spezies-Identifikation.

Die nur in einem Isolat identifizierten Gram-positiven Stäbchen, *Actinomyces odontolyticus*, wurden ausschließlich durch Sequenzierung mit Übereinstimmungen der Sequenzen > 99% eindeutig erfasst, während durch MALDI-TOF MS und rapid ID 32 A diese Spezies zwar ebenfalls erkannt wurde, das Ergebnis aber als unsicher eingestuft wurde und die Identifikation nur mit wahrscheinlicher Gattungs-Identifikation bzw. geringer Selektivität möglich war. Der api® 20 A erbrachte kein Ergebnis. Ähnlich schwierig gestaltete sich die Identifikation der beiden *Fusobakterien* (Gram-negative Stäbchen). Auch hier konnte die sichere Identifikation auf Spezies-Ebene nur durch die Sequenzierung erzielt werden (*Fusobacterium nucleatum*, zu jeweils 100%). Die Ergebnisse der Massenspektrometrie und der biochemischen Methoden waren unzuverlässig oder mit der Angabe einer anderen Spezies (*Fusobacterium necrophorum*, *F. varium*) oder es wurde kein Ergebnis erzielt (Tab. A4 im Anhang).

Alle durch Sequenzierung nur als *Prevotella* sp. erkannten Isolate wurden durch MALDI-TOF MS als *P. melaninogenica* erkannt, jedoch nur einmal mit wahrscheinlich sicherer Spezies-Identifikation, in sechs Fällen lediglich mit wahrscheinlicher Gattungs-Identifikation. Ein einziges Ergebnis bei MALDI-TOF MS war in dieser Frage unzuverlässig. Mit beiden Methoden ließ sich hierbei kein eindeutigeres Ergebnis erzielen.

Sequenzierung	MALDI-TOF MS	rapid ID 32 A	api® 20 A	Anzahl Isolate
<i>Prevotella</i> spp.	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella melaninogenica/oralis</i>	3
	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella intermedia/disiens</i>	1
	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Fusobacterium necrophorum/nucleatum</i>	1
	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella oralis</i>	<i>Fusobacterium mortiferum</i>	1
	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella oralis</i>	<i>Prevotella melaninogenica/oralis</i>	1
	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella denticola</i>	kein Ergebnis	1
<i>Veillonella</i> spp.	<i>Veillonella atypica</i>	<i>Veillonella</i> spp.	<i>Veillonella parvula</i>	6
	<i>Veillonella atypica</i>	<i>Clostridium tyrobutyricum/Veillonella</i> spp.	<i>Veillonella parvula</i>	3
	<i>Veillonella parvula</i>	<i>Clostridium tyrobutyricum/Veillonella</i> spp.	<i>Veillonella parvula</i>	1
	<i>Veillonella dispar</i>	<i>Clostridium tyrobutyricum/Veillonella</i> spp.	<i>Veillonella parvula</i>	1

Tab. 18: Ergebnisse der durch Sequenzierung nur auf Gattungsebene identifizierten Isolate im Vergleich zu denen der massenspektrometrischen und biochemischen Systeme.

Neun der durch Sequenzierung nur als *Veillonella* spp. identifizierten Isolate wurden durch MALDI-TOF MS jeweils als *Veillonella atypica* erkannt, und zwar mit guter (fünf Isolate) bis sehr guter Spezies-Identifikation (vier Isolate). Bei der Auswertung der Ergebnisse der unter-

schiedlichen Primer wurde dabei diese Veillonellen-Spezies durch Bak533r in jedem Fall gelistet. Durch die beiden anderen Primer war jedoch nur eine Identifikation auf Gattungsebene möglich. Die beiden anderen Veillonellengattungen wurden durch MALDI-TOF MS als *Veillonella parvula* bzw. *V. dispar* erkannt, jedoch nur mit sicherer Gattungswahrscheinlichkeit. Beim Vergleich der verwendeten Primer wurden diese Spezies-Angaben jeweils mit aufgeführt, die endgültige Identifizierung gelang jedoch nur auf Gattungsebene (Tab. 18). In den Fällen, in denen die Sequenzierung keine eindeutige Spezies-Erkennung zuließ, wurde dies durch MALDI-TOF ebenfalls nicht erreicht. Unter den 13 Isolaten, die mit keiner Methode übereinstimmend identifiziert werden konnten, befanden sich vier Prevotellen und neun Veillonellen.

Sequenzierung	MALDI-TOF MS	rapid ID 32 A	api® 20 A
<i>Prevotella salivae</i>	<i>Prevotella salivae</i>	<i>Prevotella buccae</i>	kein Ergebnis
	<i>Prevotella salivae</i>	<i>Prevotella buccae</i>	kein Ergebnis
	<i>Prevotella salivae</i>	<i>Prevotella buccae</i>	<i>Prevotella melaninogenica/oralis</i>
	<i>Prevotella salivae</i>	<i>Prevotella oralis</i>	kein Ergebnis
	kein Ergebnis	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Prevotella melaninogenica/oralis</i>
<i>Prevotella denticola</i>	<i>Prevotella denticola</i>	<i>Prevotella denticola</i>	kein Ergebnis
	<i>Prevotella denticola</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella melaninogenica/oralis</i>
	<i>Prevotella denticola</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella melaninogenica/oralis</i>
<i>Prevotella pallens</i>	<i>Prevotella pallens</i>	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Prevotella melaninogenica/oralis</i>
	<i>Prevotella pallens</i>	<i>Prevotella oralis</i>	<i>Propionibacterium propionicum/avidum</i>
	<i>Prevotella melaninogenica*</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Propionibacterium propionicum/avidum</i>
<i>Prevotella histicola</i>	<i>Prevotella histicola</i>	<i>Prevotella denticola</i>	<i>Prevotella intermedia/disiens</i>
	<i>Prevotella histicola</i>	<i>Prevotella denticola</i>	<i>Prevotella melaninogenica/oralis</i>
	kein Ergebnis	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella melaninogenica/oralis</i>
<i>Prevotella nanceiensis</i>	<i>Prevotella nanceiensis</i>	<i>Prevotella denticola</i>	<i>Prevotella melaninogenica/oralis</i>
	<i>Prevotella nanceiensis</i>	<i>Prevotella denticola</i>	<i>Prevotella melaninogenica/oralis</i>
	<i>Prevotella nanceiensis</i>	<i>Prevotella denticola</i>	kein Ergebnis
<i>Prevotella oris</i>	<i>Prevotella oris</i>	<i>Prevotella oralis</i>	kein Ergebnis

Tab. 19: Prevotella-Spezies-Ergebnisse im Vergleich der einzelnen Methoden. * wurde mit Hilfe des Biotyper 2.3 als *Prevotella pallens* identifiziert.

Eine *Prevotella melaninogenica* wurde durch MALDI-TOF auch in der Wiederholung mit dem Ergebnis „unzuverlässige Identifikation“ angegeben. Im rapid ID 32 A wurde sie als *Prevotella denticola* erkannt und im api® 20 A-Test gab es kein Ergebnis. Die Sequenzierung zeigte identische Teilsequenzabschnitte des 16S-RNA-Gens von *Prevotella melaninogenica*, *P. histicola* und *P. veroralis* und konnte so nur als *Prevotella* sp. auf Gattungsebene eindeutig identifiziert werden. Eine weitere *Prevotella* erreichte durch MALDI-TOF eine wahrscheinliche Gattungs-Identifikation und in der Wiederholung sogar eine wahrscheinliche Spezies-Identifikation, die durch rapid ID 32 A als *Prevotella oralis* und durch api® 20 A falsch erkannt

wurde. Auch hier fanden sich bei der Sequenzierung identische Sequenzen für verschiedene *Prevotella* spp. (*Prevotella melaninogenica* und *P. jejuni*) und konnte daher nur als *Prevotella* sp. identifiziert werden. Eine *Prevotella salivae* wurde durch MALDI-TOF MS auch in der Wiederholung nicht erkannt, rapid ID 32 A identifizierte sie als *Prevotella intermedia* und api® 20 A als *Prevotella melaninogenica/oralis*. Erst die Sequenzierung erbrachte das eindeutige Ergebnis mit 100%iger Identifikationswahrscheinlichkeit bis in den Spezies-Bereich.

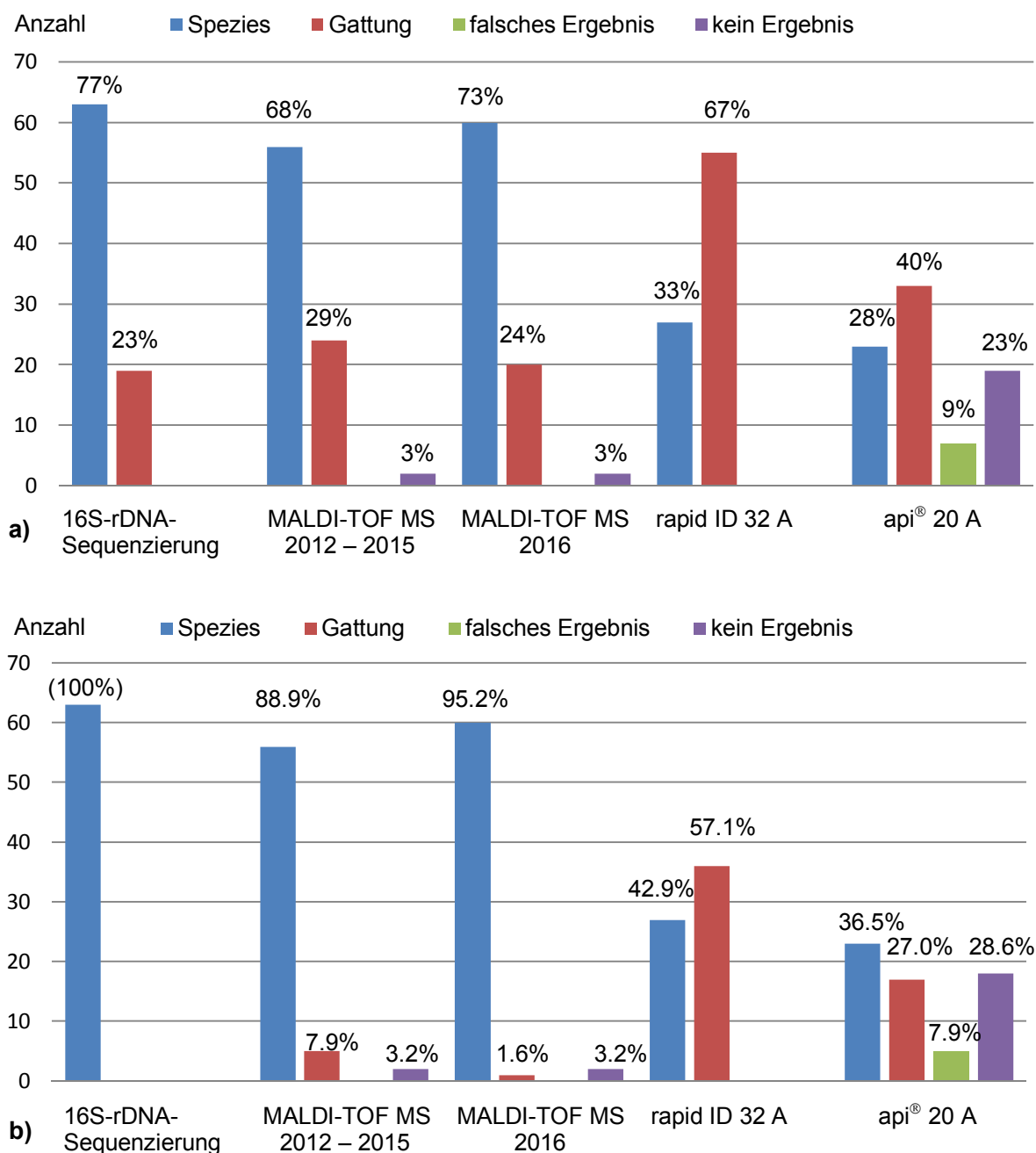


Abb. 29: Identifizierungsergebnisse der 16S-rDNA-Sequenzierung (a) bei 82 Isolat und (b) bei eindeutigen Speziesidentifikationen (n=63; 100%) und der mittels Sequenzierung abgeglichenen Ergebnisse der massenspektrometrischen und der biochemischen Methoden mit zusätzlicher Angabe in Prozent.

Eine *Veillonella dispar* erreichte bei den unterschiedlichen Methoden folgende Ergebnisse: bei MALDI-TOF MS eine wahrscheinliche Gattungs-Wahrscheinlichkeit, aber in der Kontrolle mit der erweiterten Datenbank eine sichere Spezies-Identifikation; bei rapid ID 32 A mit *Clostridium tyrobuturicum*/*Veillonella* spp. eine geringe Selektivität und erst nach Überprüfung der Gram-Färbung ein richtiges Ergebnis auf Gattungsebene und bei api[®] 20 A *Veillonella parvula*. Bei der Sequenzanalyse zeigten sich übereinstimmende Teilsequenzen von *Veillonella dispar* und *V. parvula* und ergaben schließlich *Veillonella* sp.. Acht durch MALDI-TOF MS als *Veillonella atypica* identifizierte Isolate wurden durch rapid ID 32 A bei fünf Isolaten als *Veillonella* spp. erkannt und in drei Proben unzuverlässig als *Clostridium tyobutyricum*/*Veillonella* spp. angegeben, während api[®] 20 A jeweils *Veillonella parvula* und die Sequenzierung infolge identischer Teilsequenzen von *Veillonella parvula*, *V. atypica* und *V. dispar* nur *Veillonella* sp. identifizieren konnte.

Von 59 Isolaten, die durch die Sequenzierung als ein obligat anaerobes Bakterium aus der Gruppe der Prevotellen eindeutig identifiziert wurden, befanden sich neben *Prevotella melaninogenica* (33 Isolate) sechs weitere Spezies (Tab. 19). Von diesen insgesamt 18 Isolaten wurden massenspektrometrisch 15 ebenfalls mit identischen Ergebnissen erkannt. Mittels Biochemie durch rapid ID 32 A gelangen Übereinstimmungen nur in zwei Fällen.

Der Vergleich zwischen den durch Sequenzierung bis in den Spezies-Bereich eindeutig identifizierten Isolaten (n=63) und den durch MALDI-TOF MS erzielten Ergebnissen erbrachte in 56 der Proben (88,9%) ein identisches Resultat (Abb. 29). Dabei spielte die Bewertungszahl der MALDI-TOF-MS-Ergebnisse keine Rolle. Fügt man die Wiederholungsuntersuchungen von 2016 in diesen Vergleich mit ein, ergab sich eine eindeutige Spezies-Übereinstimmung von 95,2% (60 Isolate). Lediglich eine Veillonellen-Spezies wurde mittels MALDI-Biotyper 2.2 mit einer Bewertungszahl von 2.085 als *Veillonella parvula* identifiziert und daher mit der neuen Software und Datenbank nicht kontrolliert, während die Sequenzierung das Bakterium eindeutig als *Veillonella dispar* erkannte. Zwei Isolate blieben durch MALDI-TOF MS weiterhin ohne Ergebnis. Die biochemischen Methoden kamen vergleichsweise auf eine 43 bzw. knapp 37%ige Übereinstimmung (Abb. 29). Insgesamt zeigt sich also, dass die weitestgehend eindeutige Spezies-Bestimmung dieser schwierig bestimmbar Anaerobier nur durch die Kombination der unterschiedlichen Methoden möglich ist.

4 Diskussion

4.1 Strikt anaerobe Bakterien aus den Sputen von CF-Patienten

Einzelne Berichte über das Vorkommen obligat anaerober Bakterien in den unteren Atemwegen der CF-Patienten liegen seit einiger Zeit vor [Brook & Fink, 1983; Harris et al., 2007; Jewes & Spencer, 1990; Lambiase et al., 2010; Rintelen, 2009; Rintelen et al., 2008; Rogers et al., 2004, 2005; Tunney et al., 2008; Worlitzsch et al., 2009]. Auf der Basis des dreidimensionalen Biofilms, der sich infolge der ständigen Produktion zähen Schleims in der Lunge dieser Patienten bildet und ein hypoxisches Milieu darstellt, können sich besonders fakultativ anaerobe Bakterien diesen anaeroben Verhältnissen anpassen und zu chronischen Infektionen führen. Unter diesen Bedingungen ist jedoch auch das Auftreten obligater Anaerobier anzunehmen. Die in der täglichen Routine zu untersuchenden Sputumproben erreichen das zuständige Labor in der Regel in einem gewöhnlichen Transportgefäß unter Sauerstoff-Atmosphäre in einem Zeitrahmen, der das Überleben obligater Anaerobier nicht sicher gewährleisten kann. Die nachfolgende Kultivierung der Bakterien erfolgt gewöhnlich ebenfalls nicht unter strikt anaeroben Verhältnissen und beschränkt so den möglichen Nachweis von Anaerobiern. Die vorliegende Arbeit sollte klären, ob obligat anaerobe Bakterien im Sputum von CF-Patienten nachzuweisen sind und sollte hierfür die Wertigkeit der Massenspektrometrie im Vergleich zu zwei biochemischen Methoden und zu der 16S-rDNA-Sequenzierung untersuchen.

Die Studiengruppe unserer Patienten stammte aus einer Hamburger Schwerpunktpraxis. Im Zeitraum von September 2012 bis Januar 2015 wurden 53 CF-Patienten im Alter von 11 bis 59 Jahren zufällig ausgewählt und das von ihnen produzierte Sputum auf die Anwesenheit obligat anaerober Bakterien getestet. Unter Verwendung spezieller Transportgefäße mit einem für obligate Anaerobier besonders geeigneten Medium (Port-A-CulTM) sollte ein sicherer Materialtransport in das Labor und somit das Überleben möglicherweise vorhandener obligat anaerober Bakterien gewährleistet werden. Der kulturelle Anzuchsversuch erfolgte unter strikt anaeroben Verhältnissen auf Schaedler-Blutagarplatten, die ein nährstoffreiches, speziell auf Anaerobier ausgerichtetes Medium darstellen. Bei 41 der 53 Patienten (77%) gelang mit insgesamt 84 Isolaten die Anzucht von Anaerobiern, wobei zu diesem Zeitpunkt noch nicht eindeutig zwischen obligat und fakultativ anaeroben Bakterien unterschieden werden konnte. Kommende Arbeiten zur Detektion von Anaerobiern bei CF-Kranken sollten eine größere Patientenzahl einbeziehen, um die hier zusammengestellten Erkenntnisse noch besser belegen zu können.

Massenspektrometrisch wurden 81 der 84 Isolate als obligate Anaerobier identifiziert, ein Isolat erwies sich als mikroaerophil. Zu 62% gelang eine sichere oder wahrscheinliche Identi-

fikation bis in den Spezies-Bereich und zu 31% sicher auf Gattungs-Ebene; 5% der Identifikationen waren unzuverlässig und zwei Bakterien-Isolate ließen sich nicht identifizieren. Diese Ergebnisse wurden durch 16S-rDNA-Sequenzierung überprüft und 68% der Identifikationen auf Spezies- und 29% auf Gattungs-Ebene wurden bestätigt. Durch Wiederholungs-Untersuchungen bei unzuverlässigen Ergebnissen oder Isolaten ohne Identifikation konnten mit Hilfe einer aktualisierten massenspektrometrischen Datenbank Übereinstimmungen von 73% auf Spezies- und 24% auf Gattungs-Ebene erzielt werden. Die vorher nicht identifizierten Isolate blieben auch bei der Wiederholung ohne Ergebnis. Aus der Verwendung der erweiterten massenspektrometrischen Datenbank ergab sich eine Steigerung der Spezies-Identifikationen von fast 5%.

Durch biochemische Methoden ließen sich unter Verwendung des rapid ID 32 A alle 84 Isolate als anaerobe Bakterien identifizieren, 83 als obligate Anaerobier, ein Isolat als mikroaerophil, davon 33% mit einem richtigen Ergebnis auf Spezies- und 67% auf Gattungsebene. Vom Hersteller durchgeführte Vergleichsmessungen mit über 3000 Isolaten unterschiedlicher Herkunft erbrachten gleichermaßen fast 94% korrekte Identifikationen der Stämme, während etwa 4% jedoch nicht und knapp 2% falsch identifiziert wurden (Testbeschreibung rapid ID 32 A, Referenz-Nr. 32300, bioMérieux, Mai 2006). Dabei muss berücksichtigt werden, dass bei rapid ID 32 A eine Identifizierung von Veillonellen generell nur auf Gattungsebene erreicht werden konnte, da die Datenbank keine weitere Unterscheidung zuließ und der Anteil richtig identifizierter Bakterien-Spezies somit per se nicht höher ausfallen konnte. Die Resultate des aufwändigeren, zweiten biochemischen Testverfahrens api[®] 20 A ergaben im Vergleich zur Sequenzierung übereinstimmende Spezies-Identifikationen in 28% der Fälle, aber nur weitere Gattungs-Identifizierungen bei 40%. Bei 9% der Isolate zeigte das System ein falsches, bei 23% gar kein Ergebnis an. Auch bei diesem Testverfahren wurden vom Hersteller in Kontrollmessungen von fast 3000 Isolaten unterschiedlicher Herkunft 89% der Stämme korrekt, knapp 6% nicht und etwa 5% falsch identifiziert (Testbeschreibung api[®] 20 A, Referenz-Nr. 20300, bioMérieux, Oktober 2011). Im Vergleich zu den Kontroll-Ergebnissen des Herstellers mit Hilfe des rapid ID 32 A waren bei api[®] 20 A demnach bereits schlechtere Ergebnisse zu erwarten. Diese Voraussage konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. In der Auswertung der Spezies-Identifikationen wurde von uns dabei auch die Erkennung als *P. melaninogenica/oralis* als richtige Spezies anerkannt, da die Datenbank in diesem Fall keine weitere Unterscheidung vorsah. Eine *Veillonella* wurde stets als *Veillonella parvula* identifiziert, wenn auch nur mit „geringer Selektivität“ (Tab. 4), was jedoch nur bei fünf von 20 Isolaten im Vergleich mit den Ergebnissen der anderen Methoden zu Übereinstimmungen führte. Den verbliebenen 15 Isolaten konnte somit nur eine korrekte Gattungs-Identifizierung bescheinigt werden. Erschwerend kam die während der Testdurchführung

notwendige Einhaltung strikt anaerober Verhältnisse hinzu. Trotz aller Sorgfalt konnte bei den Untersuchungen dieser Arbeit in fast einem Viertel der Fälle mit dieser biochemischen Methode kein Resultat erzielt werden. Für eine valide Beurteilung der bakteriellen Identifikation sind diese Ergebnisse insgesamt nicht aussagekräftig genug.

Mit Hilfe der 16S-rDNA-Sequenzierung, dem bisherigen Goldstandard unter den Untersuchungs-Methoden zur Identifizierung strikt anaerober Bakterien, wurden 77% der Isolate sicher bis in den Spezies-Bereich identifiziert, bei den übrigen 23% konnte, durch identische Sequenzabschnitte genetisch eng verwandter Bakterien-Spezies, lediglich eine endgültige Identifikation auf Gattungs-Ebene erbracht werden.

Somit konnte die Frage, ob obligat anaerobe Bakterien im Sputum von CF-Patienten nachweisbar sind, eindeutig beantwortet und bestätigt werden. Das Alter der Patienten unseres Kollektivs war dabei unerheblich: Schon bei den jüngsten Patienten wurden zu über 50% Anaerobier nachgewiesen, bei den jungen, männlichen Erwachsenen sogar zu 100% und auch bei Patienten > 50 Jahre konnten in 75 % der Fälle Anaerobier isoliert werden. Trotz dieser deutlichen Zahlen ergaben die statistischen Analysen keine signifikanten Unterschiede im Nachweis von Anaerobiern bezogen auf das Lebensalter der Patienten.

Insbesondere die Gruppe der strikt anaeroben Gram-negativen Stäbchen dominierte. Bei 77% der Sputumproben fanden sich *Prevotella* spp.; bei fast der Hälfte der Patienten war dies sogar die einzige nachzuweisende obligat anaerobe Bakterien-Gattung. Bei der anderen Hälfte der Patienten stand mit *Veillonella* spp. ein anderes Gram-negatives Bakterium im Vordergrund. Zu 22% wurde dies bei den CF-Patienten ausschließlich, in weiteren 24% in Verbindung mit anderen obligat anaeroben Bakterien, v.a. *Prevotella* spp., nachgewiesen. In nur zwei Fällen gelang der Nachweis eines weiteren Gram-negativen Stäbchens (*Fusobacterium* spp.) sowie einmalig eines mikroaerophilen, Gram-positiven Stäbchens (*Actinomyces odontolyticus*).

Zusammengenommen ergaben sich in drei Viertel der Fälle Einzel- und bei den übrigen Patienten Mischbesiedlungen mit zwei verschiedenen Bakteriengattungen, in einem Fall sogar mit einer Dreifach-Besiedlung. Diese Erkenntnis könnte die Frage aufwerfen, ob Patienten mit Mehrfach-Besiedlung durch obligate Anaerobier schwerer erkranken als diejenigen, bei denen nur ein Isolat aus der Gruppe der obligat anaeroben Bakterien gefunden wird. Diese Frage könnte in einer weiterführenden Arbeit aufgegriffen werden. In der mikrobiologisch-bakteriologischen Diagnostik sollten daher routinemäßig neben den aeroben und fakultativ anaeroben Bakterien auch obligate Anaerobier berücksichtigt werden.

4.2 Lungenfunktion der CF-Patienten

Die zeitgleich erhobenen Lungenfunktionsmessungen konnten eindeutig belegen, dass die durchschnittliche Lungenfunktion mit ansteigendem Alter der CF-Patienten stetig nachlässt, diese Beobachtung aber nicht für das Auftreten obligater Anaerobier verantwortlich sein muss. Bei Kindern und Jugendlichen wie bei Erwachsenen mit CF traten Anaerobier unabhängig vom Ausmaß der Lungenfunktionseinschränkung auf. Die gute Lungenfunktion dieser Patienten muss möglichst lang erhalten werden, da sie für das Überleben der Patienten von entscheidender Bedeutung ist.

Eine Besonderheit bildeten die Patienten der höchsten Altersgruppe (> 50 Jahre). Hier lagen die durchschnittlichen FEV₁-Werte höher als bei den 31-40-Jährigen. Bei drei dieser vier Patienten waren Anaerobier nachweisbar. Eine Erklärung für das überdurchschnittliche Lebensalter trotz eingeschränkter Lungenfunktion könnte der möglicherweise gute allgemeine gesundheitliche Zustand dieser Patienten sein durch jahrelange besondere Pflege und adäquate Therapie inklusive physikalischer Maßnahmen und eines gehobenen Ernährungsstandards, der diesen Patienten ein längeres Leben ermöglicht als durchschnittlichen CF-Patienten. Außerdem könnten mildere Krankheitsformen bei besonderen CFTR-Mutationen vorkommen. Dies lag aber bei unseren älteren Patienten nicht vor, da in allen Fällen eine zumindest heterozygote F508del-Mutation beschrieben wurde.

4.3 Sputum als relevantes diagnostisches Material

Da die in unserer Studie detektierten Bakterien zur physiologischen Normalflora der Schleimhäute, insbesondere im Mund-, Peridontal- und Kiefer-, aber auch im Darm- und Urogenitalbereich, gehören, könnte man annehmen, dass die Sputumproben unserer Patienten erst durch Speichelbeimischungen mit diesen obligat anaeroben Bakterien kontaminiert wurden. Eine gründliche Mundspülung mit Leitungswasser vor Erzeugung der Sputumprobe sollte eine etwaige Vermischung möglichst gering halten, konnte sie jedoch nicht sicher ausschließen. Diese Tatsache ist ein generelles Problem und lässt sich im bakteriologisch-diagnostischen Routinealltag nicht zufriedenstellend lösen. In der Arbeit von Rintelen zur Detektion von Anaerobiern wurden die Spezies und Häufigkeiten der Isolate aus gleichzeitig gewonnenen Sputumproben und Rachenabstrichen bestimmt und verglichen. Während in den Rachenabstrichen neben *Pseudomonas aeruginosa* teilweise auch Anaerobier nachgewiesen wurden, lagen diese Zahlen jedoch mehr als drei Zehnerpotenzen niedriger als in den Sputumproben. Rintelen nutzte dies als Argument, dass bei den Sputumproben eine relevante Kontamination aus dem Mundraum ausgeschlossen sei [Rintelen, 2009].

Der Vorgang der Produktion von Sputum wird von jüngeren Kindern im Regelfall nicht beherrscht. Dieses könnte eine Erklärung dafür sein, warum in diesem Patientenkollektiv die jüngsten Kinder bereits elf Jahre waren. Für eine entsprechende Diagnostik bei wesentlich jüngeren CF-Patienten müsste eher eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt werden. Hierbei wäre die Kontamination mit oralen Bakterien nahezu vollständig zu vermeiden.

In dieser Studie wurde auf eine möglichst leicht anwendbare, praktikable und routinetaugliche Prozedur Wert gelegt. Direkte Messungen der bakteriellen Last oder die Herstellung vergleichbarer Verdünnungsstufen wären methodisch aufwändig. Die Isolierung der Bakterien wurde zunächst solange fortgesetzt, bis eine Reinkultur vorlag. Bereits diese Aufgabe erfordert ein in der mikrobiologischen Diagnostik gut ausgebildetes Personal. Während zu Beginn unserer Arbeit in einigen Fällen Mischkulturen vermutet und daher weitere Isolierungen vorgenommen wurden, die sich im Rahmen der Identifizierung dann doch als dieselbe Bakterien-Spezies zeigten, konnten die bei der anfänglichen phänotypischen Betrachtung vermeintlichen Unterschiede im Laufe der Zeit besser beurteilt und eher als identische Kolonie-Morphologie erkannt werden. In allen Kulturen wurde reichliches bakterielles Wachstum verzeichnet, sodass der Verdacht auf das Vorhandensein von Anaerobiern im Sputum schon in diesem Stadium offensichtlich war.

4.4 Methodenvergleich zur Identifikation obligater Anaerobier

Der Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Methoden zeigte, dass die 16S-rDNA-Sequenzierung mit der höchsten Sicherheit die Identifikation der Isolate bis in den Spezies-Bereich erlaubte. Dieses entspricht auch den Erfahrungen der zu dieser Arbeit herangezogenen Literatur, weshalb diese Art der Bakterien-Identifizierung weiterhin als Goldstandard bezeichnet wird [Benagli et al., 2011; Cherkaoui et al., 2010; Clarridge, 2004; Martiny et al., 2012; van Veen et al., 2010; Woo et al. 2003]. Einige aktuelle Studien beschäftigen sich mit dem Methodenvergleich bei der Detektion und Identifikation bakterieller Isolate. Dabei liegt der Schwerpunkt meistens bei aeroben und aerotoleranten Bakterien und nur selten bei den strikten Anaerobiern.

So untersuchten Engelmann et al. klinische Isolate, insbesondere Mikrokokken, Staphylokokken und aerobe Sporenbildner, mit Hilfe der VITEK-Massenspektrometrie (bioMérieux, Shimadzu) und einer biochemischen Methode (VITEK 2, bioMérieux) und verglichen die Ergebnisse mit denen der 16S-rDNA-Sequenzierung. Dabei konnten 92,7% der Bakterien massenspektrometrisch eindeutig identifiziert werden. Durch Sequenzierung lag diese Rate mit 97,2% noch höher. Selbst bei dem biochemischen System lag die Identifizierung der Bakterien-Spezies bei 93,5% [Engelmann et al., 2015]. Da in der vorliegenden Arbeit durch Se-

quenzierung eine eindeutige Spezies-Identifikation bei nur 77% der Isolate erreicht wurde, war ohnehin nicht zu erwarten, dass die Identifikations-Raten auf Spezies-Ebene durch MALDI-TOF MS höher ausfallen würden (68%). Eine ähnliche Vergleichsstudie wurde von Guo et al. durchgeführt. Hier wurden neben aeroben auch teilweise fakultativ anaerobe Bakterien wie *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Klebsiella pneumoniae* isoliert und massenspektrometrisch sowie mit dem VITEK2-Verfahren biochemisch identifiziert. Durch MALDI-TOF MS (VITEK MS, bioMérieux, Shimadzu) wurden 93,4% der Isolate bei über 99%iger Genus-Erkennung bis in den Spezies-Bereich richtig erkannt und in 92,6% stimmte dies mit der biochemischen Testmethode überein. Diskrepante Ergebnisse wurden durch Sequenzierung abgeglichen. Die Fehlerrate im Spezies-Bereich war bei beiden Routineverfahren mit rund 6% fast identisch [Guo et al., 2014]. In einer Arbeit von Shin et al. konnten mit dem MALDI-TOF MS (Biotyper 2.0, Bruker Daltonics) 92% der Isolate fakultativ anaerober Proteobakterien (*Aeromonas* spp.) bis auf die Spezies-Ebene bestimmt werden, während ein konventionelles biochemisches Testverfahren nur eine gute Genus-Erkennung erreichte. Selbst durch Sequenzierung wurde kein besseres Ergebnis erzielt [Shin et al., 2015]. Schröttner et al. untersuchten Myroides-Isolate, die zu den obligat aeroben Flavobakterien gehören, und identifizierten sie mit MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) mit mehr als 97% Übereinstimmung auf Spezies-Ebene im Vergleich zu der 16S-rDNA-Sequenzierung. Auch hier wurde ein guter biochemischer Nachweis nur auf Gattungsebene erbracht [Schröttner et al., 2014].

Wurden Anaerobier bei den Studien mit einbezogen, lagen die Identifikations-Ergebnisse in der Regel schlechter. Wybo et al. überprüften im Jahr 2012 102 Isolate, die durch Sequenzierung bereits als obligat anaerobe Prevotellen identifiziert worden waren. Davon wurden 62,7% der Isolate massenspektrometrisch bis in den Spezies-Bereich erkannt und unter Verwendung der erweiterten Datenbank zu 83,3%. Daraus wurde geschlossen, dass die Massenspektrometrie eine gute und schnelle sowie mit einer winzigen Bakterienmenge auskommende Methode zur Identifikation klinisch relevanter Mikroorganismen sei, aber die Datenbank zur Steigerung der Identifikationsraten stetig aktualisiert werden müsse [Wybo et al., 2012]. Im gleichen Jahr verglichen Nagy et al. Gram-positive und Gram-negative Anaerobier, in der Mehrzahl obligate Anaerobier wie *Bacterioides* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp. und *Clostridium* spp., mit der MALDI-TOF MS (Microflex LT, Biotyper 3.0, Bruker Daltonics) und verschiedenen biochemischen Methoden, darunter rapid ID 32 A. Auf Spezies-Ebene wurden 77% der Isolate massenspektrometrisch identifiziert, 10,95% auf Gattungsebene und 12% der Ergebnisse waren unzuverlässig. Die im Vergleich zu den biochemischen Verfahren diskrepanten Ergebnisse (15,5%) wurden durch 16S-rDNA-Sequenzierung überprüft und ergaben im Vergleich zur MS > 93% Übereinstimmung im Spezies-Bereich,

während die biochemischen Methoden nur im Gattungs-Bereich Übereinstimmungen verzeichnen konnten (68%) und die verbliebenen Resultate als falsches Ergebnis gewertet wurden [Nagy et al., 2012]. La Scola et al. untersuchten im Jahr 2011 Anaerobier und erreichten mit der Massenspektrometrie 61% Identifikationen aus Spezies-Ebene. Dabei wurden *Prevotella* spp. in 64%, *Veillonella* spp. in 50% und Fusobakterien in 61% der Fälle eindeutig identifiziert [La Scola et al., 2011]. Zur gleichen Zeit erschien eine Arbeit von Benagli et al., bei der 1019 klinisch relevante Bakterien aus der Routinediagnostik, Aerobier und fakultative Anaerobier, massenspektrometrisch (MALDI-TOF MS Axima™, Shimadzu, Japan) und biochemisch identifiziert wurden, wobei 95% der Isolate als identisch erkannt wurden. In den Fällen, in denen keine Übereinstimmung gefunden wurde, konnte die 16S-rDNA-Sequenzierung 63% der MS-Identifikationen bestätigen, aber nur 17% Ergebnisse der biochemischen Methoden (API®) [Benagli et al., 2011]. Cherkaoui et al. verglichen die Ergebnisse klinischer Isolate, in der Mehrzahl aerobe Bakterien, die mit zwei verschiedenen Massenspektrometern (Bruker Daltonics und Shimadzu) und mehreren konventionellen, biochemischen Testsystemen erzielt wurden. Dabei waren die Ergebnisse der verschiedenen Massenspektrometer nahezu identisch. Diskrepante Ergebnisse wurden auch hier mit der 16S-rDNA-Sequenzierung abgeglichen. Während die richtige Spezies-Identifikation aller aerober und anaerober Isolate bei den MALDI-TOF-MS-Systemen bei etwa 91-95% lagen, wurden die Gram-positiven und Gram-negativen Anaerobier nur zu 39% bzw. 23% richtig identifiziert [Cherkaoui et al., 2010].

Dass auch andere, schwierig zu identifizierende, klinische Isolate durch MALDI-TOF MS nicht immer eindeutig erkannt werden, zeigte eine Arbeit von Bizzini et al. (2010) unter Verwendung einer früheren MALDI-Biotyper-Version (2.0). Nur etwa 50% der Isolate, vornehmlich Aerobier, wurden massenspektrometrisch bis in den Spezies-Bereich identifiziert. Die Ergebnisse waren dabei zu 92% identisch mit denen der 16S-rDNA-Sequenzierung. Die erweiterte Datenbank des Massenspektrometers Biotyper 3.1 konnte zu einem späteren Zeitpunkt die richtige Identifikation der diskrepanten Ergebnisse in einem Viertel der Fälle steigern [Bizzini et al., 2010]. Die Ergebnisse aus anderen Arbeiten lassen sich nur dann genauer vergleichen, wenn bei der Identifikation von Isolaten ähnliche Bakterienarten (Aerobier, fakultative und/oder obligate Anaerobier) mit gleichen Untersuchungsmethoden (z.B. Massenspektrometer eines Herstellers, identische Version einer Software) verwendet werden. Die verschiedenen Studien zeigen, dass es insbesondere auf die Aktualität der Datenbank ankommt, da mit jeder Neuauflage die Zahl der hinterlegten bakteriellen Massenspektren wächst.

Unsere kultivierten Isolate wurden durch Sequenzierung zu rund Dreiviertel auf Speziesebene erkannt. Bei einem Viertel war lediglich eine Zuordnung zur Gattung möglich. So zeigt

ten einige *Prevotella*-Stämme Sequenz-Übereinstimmungen von *Prevotella jejuni* und *P. melaninogenica* und/oder *P. veroralis* und *P. scopos* mit Identifizierungswahrscheinlichkeiten von 99 bis 100%, die, nach den Drancourt-Beurteilungskriterien aus dem Jahr 2000, eine Bakterien-Identifikation auf Spezies- und/oder Gattungsebene bescheinigt. Auch einige Gram-negative Kokken aus der Gruppe der Veillonellen ergaben exakt gleiche Sequenzabschnitte, sodass teilweise eine *Veillonella parvula* nicht von einer *V. dispar* und/oder einer *V. atypica* unterschieden und somit eine Identifizierung nur auf Gattungsebene sicher angegeben werden konnte.

Durch MALDI-TOF MS ließen sich 52 von 84 Isolaten (62%) bis in den Spezies-Bereich identifizieren. Im Gegensatz zur Sequenzierung, bei der alle Proben zumindest auf Gattungsebene erkannt wurden, erbrachte die Massenspektrometrie in zwei Fällen auch mit Wiederholungsuntersuchungen kein Ergebnis. Dabei handelte es sich um *Prevotellen*, deren Spezies-Identifikationen (*Prevotella histicola* bzw. *P. salivae*) in anderen Isolaten von MALDI-TOF MS sicher erkannt worden waren, in der Datenbank also bereits geführt wurden, weshalb ein Nichterkennen nicht eindeutig erklärbar war. Stets wird die Verwendung möglichst frischer Kolonien empfohlen, da sonst ein Protein-Abbau bereits einsetzen könnte [Schubert et al., 2011]. In unserem Fall waren die Kulturen mindestens 48 h alt, da obligate Anaerobier wesentlich langsamer wachsen als viele andere Bakterienarten.

Die teilweise erst durch die Sequenzierung bestimmbareren *Prevotella*-Spezies, wie *Prevotella veroralis*, *P. jejuni* und *P. scopos*, konnten weder durch MALDI-TOF MS noch durch biochemische Verfahren identifiziert werden, da diese Spezies in der jeweiligen Datenbank nicht enthalten waren. Da sie selbst durch eine Sequenzierung nicht eindeutig ermittelt werden konnten, ist davon auszugehen, dass ihre genetischen Eigenschaften so ähnlich sind, dass eine Unterscheidung kaum möglich ist. Jedoch ist anzunehmen, dass sich die Ergebnisse durch massenspektrometrische Methoden durch eine kontinuierliche Erweiterung der Datenbank noch weiter verbessern lassen. Interessant waren besonders die MALDI-TOF-MS-Ergebnisse, bei denen die Sequenzierungen kein eindeutiges Resultat auf Spezies-Ebene erbrachten. Von acht *Prevotellen*, die durch die Sequenzierung nur als *Prevotella* spp. erkannt wurden, identifizierte MALDI-TOF MS alle als *Prevotella melaninogenica*, größtenteils (6/8) jedoch nur mit wahrscheinlicher Identifikation. Diese Betrachtungen zeigen, dass beide Untersuchungsmethoden bei der Identifizierung dieser speziellen Isolate bis in den Spezies-Bereich an ihre Grenzen gelangen können und daher nur eine sichere Gattungs-Erkennung möglich ist.

Anders sah der Vergleich der Ergebnisse bei der Identifizierung von Veillonellen aus. Mehr als die Hälfte der Isolate (11/20) wurde durch die Sequenzierung nur auf Gattungsebene

eindeutig identifiziert. In diesen Fällen erkannte MALDI-TOF MS neun Isolate davon als *Veillonella atypica* mit sicherer bzw. wahrscheinlicher Spezies-Identifikation. Jeweils ein Isolat wurde mit dem MALDI-Biotyper 2.2 als *Veillonella dispar* bzw. *V. parvula* beschrieben, jedoch nur mit wahrscheinlicher Gattungs-Identifikation, in der Version MALDI-Biotyper 2.3 dann sogar mit sicherer bzw. wahrscheinlicher Spezies-Identifikation. Bei der Auswertung der einzelnen Primersequenzen fiel auf, dass besonders bei den reverse-Primern Bak533r und Pc3mod identische Sequenzfolgen von *V. atypica* vorlagen und eine endgültige Identifizierung dennoch nur auf Gattungs-Ebene erbracht werden konnte. *V. atypica*, ein zu den Gram-negativen Kokken gehörender obligater Anaerobier, wurde von Drancourt et al. erstmalig in einer Blutkultur eines Patienten mit einem Lungenkarzinom identifiziert [Drancourt et al., 2004]. Andere Arbeitsgruppen, die sich mit verschiedenen Spezies der Gattung *Veillonella*, u.a. *V. atypica*, *V. dispar* und *V. parvula*, beschäftigt haben, fanden viele Übereinstimmungen zwischen den einzelnen Spezies, die eine Unterscheidung erheblich erschweren [Sato et al., 1997; Marchandin et al., 2003]. Dies erklärt auch die eingeschränkte Übereinstimmungsrate bei der Identifikation der *Veillonella* spp. in der vorliegenden Arbeit.

Nimmt man nur die Sequenzierungs-Ergebnisse heran, die eine eindeutige Identifizierungswahrscheinlichkeit auf Spezies-Ebene erbracht hatten, und vergleicht diese mit den MALDI-TOF-MS-Ergebnissen, ohne dabei die Identifikations-Qualität (Bewertungsziffern) zu betrachten, kommt man auf eine Übereinstimmung der Bakterien-Spezies von knapp 89%. Unter Berücksichtigung der Wiederholungsuntersuchungen mit Hilfe der Biotyper-Version 2.3 aus dem Jahr 2016 steigt die Zahl der Übereinstimmungen auf Spezies-Ebene sogar auf über 95%. Diese Prozentzahl findet sich auch in den Angaben aus der Literatur [Bizzini et al., 2010; Cherkaoui et al., 2010; Eigner et al., 2009; Engelmann et al., 2015; Guo et al., 2014; Schröttner et al., 2014; Seng et al., 2009; Shin et al., 2015].

Bemerkenswert war auch die Betrachtung der Prevotellen, die nicht als *P. melaninogenica* identifiziert wurden. Dazu gehörten sechs verschiedene Spezies, die nur durch die Sequenzierung eindeutig ermittelt werden konnten: *P. oris/oralis* und *P. denticola*, seit langem bekannte Spezies, die früher der Gattung *Bacteroides* zugeordnet waren [Loesche et al., 1964; Shah & Collins, 1981], sowie die jüngeren Spezies-Beschreibungen *P. pallens*, *salivae*, *nanceiensis* und *histicola*, die vor einigen Jahren erstmalig im Mundraum isoliert wurden [Alauzet et al., 2007; Downes et al., 2008; Kökönen et al., 1998; Sakamoto et al., 2004]. Ein Drittel der Bakterien-Isolate, die durch api[®] 20 A kein Ergebnis zeigten, fielen auf diese 18 Prevotellen, zwei wurden falsch, zehn noch auf Gattungs-Ebene richtig erkannt. Zwei rapid ID 32 A-Ergebnisse (*P. denticola*, *P. oralis*) zeigten die richtige Spezies. Alle anderen gaben nur noch die richtige Gattung an. In diesen speziellen Prevotellen-Gruppen fanden sich die beiden Isolate, die durch MALDI-TOF MS auch in der Wiederholung mit der aktualisierten Daten-

bank kein Ergebnis erbrachten. Eine noch durch die alte Version nur auf Gattungsebene erkannte *P. melaninogenica* konnte nach der Umstellung nun sicher und richtig als *P. pallens* erkannt werden. Alle anderen *Prevotella* spp. wurden massenspektrometrisch übereinstimmend mit der Sequenzierung identifiziert.

Insgesamt waren die verwendeten biochemischen Methoden dazu geeignet, obligat anaerobe Bakterien auf Gattungsebene zu identifizieren. Eine richtige Spezies-Erkennung wurde nur in einem Drittel der Fälle erreicht, halb so viel wie durch die massenspektrometrische Methode. Beide biochemischen Tests verfügten über eine eingeschränkte Datenbank und ließen daher eine genauere Differenzierung nicht zu. Außerdem sind beide Testverfahren gleichermaßen für Fehler anfällig. Bei api[®] 20 A wird darüber hinaus zu häufig kein Ergebnis erzielt. Durch MALDI-TOF MS wird die Mehrzahl der Isolate bis in den Spezies-Bereich richtig erkannt. Selbst die Ergebnisse, die nur eine eingeschränkte Gattungs-Identifikationswahrscheinlichkeit erbrachten, wurden überwiegend mit der richtigen Spezies-Angabe erkannt, drei Isolate davon erst nach der Datenbank-Umstellung. Die durch Sequenzierung nur auf Gattungsebene identifizierten Isolate ließen eine eindeutige Beurteilung der MALDI-TOF-MS-Ergebnisse ebenfalls nicht zu, doch überzeugten die übereinstimmenden Resultate auf Spezies-Ebene bei den durch die Sequenzierung eindeutigen Spezies-Erkennungen. Fast 90% Übereinstimmungen wurde mit der alten und über 95% mit der neuen Software und Datenbank erzielt. Vergleichbare Zahlen finden sich auch in den oben vorgestellten Arbeiten. Somit sind die erzielten MALDI-TOF-MS-Ergebnisse mit sicherer Spezies-Erkennung obligat anaerober Bakterien als hoch zuverlässig einzustufen.

Weitere Aspekte der Bakterien-Detektion sind die Zeit- und Kostenfaktoren. Die für diese Arbeit initial erforderliche Kultivierung der Sputumproben beanspruchte 48-72 h oder sogar mehr, da insbesondere die Veillonellen sehr langsam wachsen. Für die Untersuchung mit MALDI-TOF MS reichte dann insgesamt eine winzige Menge einer vitalen Kolonie aus. Ein Einzelergebnis lag nach dem Programmstart nach etwa 5 min vor. Da aber üblicherweise bis zu 96 Proben gleichzeitig bearbeitet wurden, verlängerte sich diese Zeit entsprechend der Anzahl, bis alle Ergebnisse vorlagen. Unter Vernachlässigung der hohen Anschaffungskosten, sind die Materialkosten für die einzelne Bestimmung gering. Bei den biochemischen Methoden waren die Ergebnisse nach etwa 4-4,5 h (rapid ID 32 A) bzw. nach 24-48 h (api[®] 20 A) fertiggestellt. Zur Gewährleistung des Überlebens der Isolate bis zur Beendigung des Testansatzes konnten jeweils in der Regel nur bis zu fünf Isolate auf einmal verarbeitet werden. Die Kosten für jeden einzelnen Test lagen dabei wesentlich höher als bei der Massenspektrometrie, da neben den Teststreifen auch jedes Mal verschiedene Chemikalien benötigt wurden. Zudem ist die Anzahl an Kolonien, die für Herstellung einer Bakterien-Suspension

benötigt wird, in diesem Fall deutlich größer und verbraucht daher weitere Materialien für die Anzucht.

Seng et al. stellten im Jahr 2009 Berechnungen auf, bei denen die durch massenspektrometrische Analysen entstehenden Kosten nur etwa ein Viertel derjenigen der biochemischen Methoden betragen. Dabei wurden Zeit-, Material- und Personalkosten eingerechnet [Seng et al., 2009]. Bizzini et al. kamen auf ähnliche Ergebnisse [Bizzini et al., 2010]. Die Sequenziermethode ist im Vergleich zu den konventionellen Systemen besonders kosten- und zeitintensiv [Cherkaoui et al., 2010; Fontana et al., 2005; Woo et al., 2003]. Die Verbrauchskosten u.a. für Chemikalien, Primer und Gele liegen hierbei wesentlich höher als bei den anderen Methoden. Im Gegensatz zu den anderen Systemen ist der fehlende Anspruch auf Vitalität der Isolate vorteilhaft, der ansonsten notwendig wäre. Das Sequenzierergebnis lag bei der vorliegenden Arbeit am dritten Tag vor, die Auswertung nahm dann auch noch einige Zeit in Anspruch. Unter Umgehung einer vorherigen Kultivierung könnte der direkte Bakterien-Nachweis durch PCR aus der Sputumprobe einen wesentlichen Zeitvorteil bedeuten, wie er in einigen Arbeiten auch beschrieben wurde [Cohen et al., 1998; Harris et al., 2007; Rogers et al., 2004; Yang et al., 2005]. In diesem Fall würde jedoch der Blick nicht nur auf obligat anaerobe Bakterien, sondern auf ein erweitertes Bakterien-Spektrum zu richten sein, was aber kein Ziel dieser Arbeit war. Das Hauptaugenmerk sollte aber neben dem Kosten- und Zeitfaktor auf der Ergebnis-Sicherheit liegen. Insofern wurden hier die Resultate der massenspektrometrischen und biochemischen Methoden gegenübergestellt und mit der Sequenzierung abgeglichen.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit ist MALDI-TOF MS eine schnelle, kostengünstige und routinetaugliche Methode, mit der obligate Anaerobier reproduzierbar und mit hoher Sicherheit identifiziert werden können. Die 16S-rDNA-Sequenzierung bescheinigt der Massenspektrometrie eine etwa 90%ige Übereinstimmung bis in den Spezies-Bereich. Nur bei den Isolaten ohne eindeutige Identifizierung durch Sequenzierung war ein valider Vergleich nicht möglich. Im Gegensatz dazu waren die verwendeten biochemischen Systeme deutlich langsamer, teurer und teilweise stärker für Fehler anfällig. Dabei neigte api[®] 20 A dazu, kein Ergebnis zu erzeugen. Die Unsicherheit der Ergebnisse auf Spezies-Niveau liegt einerseits an der zu schmalen Datenbank der Software, aber auch an der Handhabung und Sensitivität der jeweiligen Testverfahren. Die molekulargenetische Sequenziermethode war auch in dieser Arbeit die sicherste Methode, klinische obligat anaerobe Isolate zu identifizieren, jedoch die mit Abstand teuerste Methode, verbunden mit dem höchsten Zeitaufwand. Als Schwachstelle waren aber rund 23% der Isolate anzusehen, die nur auf Gattungs-Ebene identifiziert werden konnten, da durch identische Sequenzabschnitte keine genauere Unterscheidung möglich

war. Dadurch ließen sich die Ergebnisse der jeweils anderen Methoden nicht endgültig überprüfen.

Im Sinn einer abschließenden Empfehlung ist das massenspektrometrische MALDI-TOF dazu geeignet, in der täglichen Routine eingesetzt zu werden. Nur in den Fällen, in denen kein Ergebnis erzielt werden kann, sollte die Sequenzierung erfolgen, obwohl hier nicht in jedem Fall die Identifikation der Bakterien-Spezies zu erwarten wäre. Selbst die Bewertung durch die MALDI-Biotyper-Software konnte in einigen Fällen nur eine wahrscheinliche Identifikation auf Gattungs-Ebene erreichen. Zum überwiegenden Teil (> 75%) waren die massenspektrometrischen Ergebnisse im Spezies-Bereich identisch mit den Sequenzierergebnissen. Die biochemischen Testverfahren waren dagegen nur geeignet, eine relativ sichere Bakterien-Gattung zu identifizieren, wobei der api[®] 20 A in der Rangfolge der Methoden insgesamt am schlechtesten abschnitt. Die Massenspektrometrie hat sich hierfür zur Methode der Wahl entwickelt.

5 Zusammenfassung

Chronische Lungeninfektionen sind die häufigste Todesursache bei Patienten mit Cystischer Fibrose (CF). Infolge einer Mutation in dem für diese Krankheit verantwortlichen Gen kommt es zu einem veränderten Ionenfluss und zur Sekretion zähen Schleims, der in der Lunge zur Ausbildung eines hypoxischen Biofilms führt und die Grundlage chronischer bakterieller Infektionen bildet. Neben fakultativ anaeroben Bakterien wird seit einigen Jahren das Vorkommen obligater Anaerobier in den Lungen von CF-Patienten angenommen. In der diagnostischen Routine finden diese Bakterien jedoch bisher kaum Beachtung. In dieser Studie wurden die Sputen von 53 CF-Patienten auf obligat anaerobe Bakterien untersucht. Unter Verwendung eines spezifischen Transportsystems gelang dieser Nachweis bei 41 von 53 Patienten mit insgesamt 84 Isolaten. Zu 71% handelte es sich dabei um eine Einzel-Kolonisierung mit Prevotellen, insbesondere mit *Prevotella melaninogenica*. Die zweite relevante Gattung betraf die Veillonellen. Alle Alters- und Geschlechtsgruppen waren gleichermaßen betroffen. Die Lungenfunktion nahm im Lauf der Jahre eindeutig ab, hatte aber keinen Einfluss auf das Auftreten obligater Anaerobier. Unter Verwendung aktueller Massenspektrometrie, biochemischer Systeme und der 16S-rDNA-Sequenzierung sollten die Ergebnisse miteinander verglichen und auf ihre Routinetauglichkeit im Hinblick auf die Identifikationswahrscheinlichkeit, den Kosten- und den Zeitfaktor überprüft werden. Die 16S-rDNA-Sequenzierung hatte die höchste Sicherheit in der Identifikation auf Spezies-Ebene, jedoch auch den größten Kosten- und Zeitaufwand. Durch Massenspektrometrie wurden 62% der Isolate auf Spezies-, 31% auf Gattungsebene und 5% unzuverlässig identifiziert, 2% verblieben ohne Ergebnis. Im Vergleich mit der Spezies-Identifikation durch Sequenzierung wurden Übereinstimmungen mit der Massenspektrometrie zu fast 89% erzielt und nach Umstellung auf eine erweiterte Datenbank in über 95%. Die biochemischen Methoden waren hingegen kostspieliger und zeitaufwändiger und die Identifikation war häufig nur auf Gattungsebene möglich. Die Massenspektrometrie erwies sich damit als ein für die mikrobiologische Routine-Diagnostik geeignetes, schnelles und kostengünstiges Untersuchungsverfahren für obligat anaerobe Bakterien. Da der Nachweis obligater Anaerobier zur Anpassung der antimikrobiellen Therapie führen würde, wäre die regelmäßige Verwendung von zwei Sputumproben empfehlenswert. Dabei sollte ein Röhrchen für die aeroben bzw. fakultativ anaeroben Mikroorganismen genutzt und ein zweites Gefäß mit einem speziell für Anaerobier geeigneten Transportsystem verwendet werden, damit die Vitalität dieser Bakterien bis zur Kulturanlage im Labor gewährleistet bleibt. Die Kultivierung dieser Anaerobier muss dann aber unter streng anaeroben Bedingungen erfolgen. Auf der Basis dieser konsequenten Routinediagnostik wäre eine weitere Verbesserung der Überlebensrate von CF-Patienten zu erwarten.

Summary

Chronic lung infections are the most frequent cause of death in patients with cystic fibrosis (CF). Due to a mutation in the gene responsible for this disease, the ion flow is increased and a viscous mucus is secreted which leads to the generation of a hypoxic biofilm and forms the basis for chronic bacterial colonizations and infections. Besides facultative anaerobic bacteria, the occurrence of fastidious anaerobic bacteria has been assumed in the lungs of CF patients for several years. However, these bacteria do not yet receive attention upon the diagnostic routine. In this study, the sputum samples of 53 CF patients were tested for obligatory anaerobic bacteria. The samples were recovered in a specific transport system and the detection was successful in 41 of 53 patients yielding 84 isolates totally. In 71%, a colonization with only *Prevotella*, specifically *Prevotella melaninogenica* was detected. The second relevant genus was *Veillonella*. There were no differences concerning age and gender. Lung function definitely decreased over the years but did not influence the detection rates of fastidious anaerobes. Using current mass spectrometry, biochemical systems, and 16S sequencing, the results should be compared with each other and checked for their suitability for routine diagnostics with respect of the probability for identification, the test costs, and the time requirements. The 16S-rDNA sequencing was the most reliable method for the identification on species level but also caused the highest costs and took most time. By mass spectrometry, 52 isolates (62%) were identified on species level, 26 (31%) on genus level, 4 (5%) were unreliable, and 2 (2%) without result. In comparison with the species identification by sequencing, mass spectrometry yielded congruent results in almost 89% and after the change to the extended database even in 95%. However, the biochemical methods were more expensive, needed more time, and the identification was frequently only possible at genus level. Thus, mass spectrometry was shown to be a rapid, cheap, and suitable method for the microbiological routine diagnostics of obligate anaerobes. Since the detection of fastidious anaerobes leads to the modification the antimicrobial therapy, the regular use of two sputum samples should be recommended. One tube should be used for aerobes and facultative anaerobes and the second tube should be sampled into a transport system for anaerobes in order to maintain viability of these bacteria until set-up of the cultures in the laboratory. The cultivation of these anaerobes needs to be done under strict anaerobic conditions. On the basis of this stringent type of routine diagnostics a further improvement of the survival rates of CF patients should be expected.

6 Literaturverzeichnis

Alauzet C, Mory F, Carlier JP, Marchandin H, Jumas-Bilak E, Lozniewski A (2007) *Prevotella nanceiensis* sp. nov., isolated from human clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 2216-2220.

Benagli C, Rossi V, Doina M, Tonolla M, Petrini O (2011) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS ONE* 6, 1-7.

Bizzini A, Jatton K, Romo D, Bille J, Prod'hom G, Greub G (2010) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *J Clin Microbiol* 49, 693-606.

Boucher RC (1999) Molecular insights into the physiology of the 'thin film' of airway surface liquid. *J Physiol* 516, 631-638.

Boyle MP, de Boeck K (2013) A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. *Lancet Resp Med* 1, 158-163.

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

Bryant JM, Grogono DM, Greaves D, Foweraker J, Roddick I, Inns T, Reacher M, Haworth CS, Curran MD, Harris SR, Peacock SJ, Parkhill J, Floto RA (2013) Whole-genome sequencing to identify transmission of *Mycobacterium abscessus* between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet* 381, 1551-1560.

Burak S, Gehrt A (2010) Verkürzte Analysezeit bei höherer Genauigkeit, MALDI-TOF Massenspektrometrie zur Identifizierung klinisch relevanter Mikroorganismen. *A. Wien klin Mag* 13, 22-26.

Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, Schrenzel J (2010) Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol* 48, 1169-1175.

Clarridge JE (2004) Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 17, 840-862.

Cohen RA, Muzaffar S, Schwartz D, Bashir S, Luke S, McGartland LP, Kaul K (1998) Diagnosis of pulmonary tuberculosis using PCR assays on sputum collected within 24 hours of hospital admission. *Am J Respir Crit Care Med* 157, 156-161.

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

Costerton JW, Lewandowski Z (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49, 711-745.

Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry Annual Data Report (2014), 33, 73.
https://www.cff.org/2014_CFF_Annual_Data_Report_to_the_Center_Directors.pdf.

Davis PB, Drumm M, Konstan MW (1996) Cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 154, 1229-1256.

- Dijk FN, McKay K, Barzi F, Gaskin KJ, Fitzgerald DA (2011) Improved survival in cystic fibrosis patients diagnosed by newborn screening compared to a historical cohort from the same centre. *Arch Dis Child* 96, 1118-1123.
- Dodge JA, Lewis PA, Stanton M, Wilsher J (2007) Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947-2003. *Eur Respir J* 29, 522-526.
- Döring G, Høiby N (2004) Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros* 3, 67-91.
- Downes J, Hooper SJ, Wilson MJ, Wade WG (2008) *Prevotella histicola* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 1788-1791.
- Drancourt M, Berger P, Raoult D (2004) Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans. *J Clin Microbiol* 42, 2197-2202.
- Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D (2000) 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* 38, 3623-3630.
- Eigner U, Holfelder M, Oberdorfer K, Betz-Wild U, Bertsch D, Fahr AM (2009) Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. *Clin Lab* 55, 289-296.
- Engelmann E, Bayer S, Kugler F (2015) Identifizierungsmethoden von Mikroorganismen im Vergleich. *Pharm Ind* 77, 550-561.
- Farrell PM, Kosorok MR, Laxova A, Shen G, Kosciak RE, Bruns WT, Splaingard M, Mischler EH (1997) Nutritional benefits of neonatal screening for cystic fibrosis. Wisconsin cystic fibrosis neonatal screening study group. *N Engl J Med* 337, 963-969.
- Fontana C, Favaro M, Pelliccioni M, Pistoia ES, Favalli C (2005) Use of the microseq 500 16S rRNA gene-based sequencing for identification of bacterial isolates that commercial automated systems failed to identify correctly. *J Clin Microbiol* 43, 615-619.
- Gibbons RJ, MacDonald JB (1960) Hemin and vitamin K compounds as required factors for the cultivation of certain strains of *Bacteroides melaninogenicus*. *J Bacteriol* 80, 164-170.
- Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW (2003) Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168, 918-951.
- Goldenberger D, Künzli A, Vogt P, Zbinden R, Altwegg M (1997) Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing. *J Clin Microbiol* 35, 2733-2739.
- Govan JR, Deretic V (1996) Microbial pathogenetics in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 60, 539-574.
- Guo L, Ye L, Zhao Q, Ma Y, Yang J, Luo Y (2014) Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. *J Thorac Dis* 6, 534-538.
- Harris JK, de Groote MA, Sagel SD, Zemanick ET, Kapsner R, Penvari C, Kaess H, Detering RR, Accurso FJ, Pace NR (2007) Molecular identification of bacteria in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 20529-20533.

- Høiby N (2002) Understanding bacterial biofilms in patients with cystic fibrosis: current and innovative approaches to potential therapies. *J Cystic Fibrosis* 1, 249-254.
- Høiby N, Koch C (1990) *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis and its management. *Thorax* 45, 881-884.
- Janda JM, Abbott SL (2007) 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* 45, 2761-2764.
- Jewes LA, Spencer RC (1990) The incidence of anaerobes in the sputum of patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 31, 271-274.
- Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F (1987) Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int J Mass Spec Ion Proc*, 53-68.
- Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245, 1073-1080.
- Kökönen E, Eerola E, Frandsen EVG, Jalava J, Mättö J, Salmenlinna S, Jousimies-Somer H (1998) Phylogenetic characterization and proposal of a new pigmented species to the genus *Prevotella*: *Prevotella pallens* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 48, 47-51.
- Lambiase A, Catania MR, Rossano F (2010) Anaerobic bacteria infection in cystic fibrosis airway disease. *New Microbiol* 33, 185-194.
- La Scola B, Fournier PE, Raoult D (2011) Burden of emerging anaerobes in the MALDI-TOF and 16S rRNA gene sequencing era. *Anaerobe* 17, 106-112.
- Lindemann H (1991) Neue Ansätze in der Mukoviszidose-Therapie, Fortschritte in der Forschung an der Uni-Kinderklinik. *Spiegel der Forschung*, S. 2-5.
- Loesche WJ, Socransky SS, Gibbons RJ (1964) *Bacteroides oralis*, proposed new species isolated from the oral cavity of man. *J Bacteriol* 88, 1329-1337.
- Marchandin H, Teyssier C, De Buochberg MS, Jean-Pierre H, Carriere C, Jumas-Bilak E (2003): Intra-chromosomal heterogeneity between the four 16S rRNA gene copies in the genus *Veillonella*: implications for phylogeny and taxonomy. *Microbiology* 149, 1493-1501.
- Martiny D, Busson L, Wybo I, El Haj RA, Dediste A, Vandenberg O (2012) Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 50, 1313-1325.
- Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzky JT, Davis CW, Boucher RC (1998) Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 95, 1005-1015.
- Müller FM (2003) Mukoviszidose - frühe Diagnose verlängert das Leben. www.klinikum.uni-heidelberg.de.
- Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E (2006) in: Taschenlehrbuch Humangenetik, 7. Auflage, Thieme Verlag, S. 286.
- Nagy E, Becker S, Kostrzewa M, Barta N, Urbán E (2012) The value of MALDI-TOF MS for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria in routine laboratories. *J Med Microbiol* 61, 1393-1440.

Ratjen F (2009) Cystic fibrosis: pathogenetics and future treatment strategies. *Resp Care* 54, 595-605.

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

Rieger C, von der Hardt H, Sennhäuser FH, Wahn U, Zach M (2004): Pädiatrische Pneumologie, 2. Auflage, Springer-Verlag Wien.

Rintelen C (2009) Obligat anaerobe Bakterien in den Lungen von Patienten mit Cystischer Fibrose. Elektronische Hochschulschriften, Halle, Universität, Medizinische Fakultät, Dissertation, <http://digital.bibliothek.uni-halle.de/hs/content/titleinfo/364934#>

Rintelen C, Borneff-Lipp M, Worlitzsch D (2008) Strictly anaerobic bacteria in sputum of cystic fibrosis children. *Hyg Med* 33, 456-462.

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

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

Rogers GB, Carroll MP, Serisier DJ, Hockey PM, Kehagia V, Jones GR, Bruce KD (2005) Bacterial activity in cystic fibrosis lung infections. *Respir Res* 6, 49.

Sakamoto M, Suzuki M, Huang Y, Umea M, Ishikawa I, Benno Y (2004) *Prevotella shahii* sp. nov. and *Prevotella salivae* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 877-883.

Sato T, Sato M, Matsuyama J, Hoshino E (1997) PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes coding for 16S rRNA in *Veillonella* spp. *Int J Syst Bacteriol* 47, 1268-1270.

Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 184, 1140-1154.

Schröttner P, Rudolph WW, Eing BR, Bertram S, Gunzer F (2014) Comparison of VITEK2, MALDI-TOF MS, and 16S rDNA sequencing for identification of *Myroides odoratus* and *Myroides odoratimimus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 79, 155-159.

Schubert S, Wieser A (2011) Einsatz der Matrix-Assisted Laser Desorption/ionisation-Time of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) in der mikrobiologischen Routinediagnostik. *J Lab Med* 35, 195-203.

Schwarz C (2013) Arzneimitteltherapie der zystischen Fibrose (Mukoviszidose). *AMT Arzneimitteltherapie* 31, 80-88.

Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D (2009) Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 49, 543-551.

Sens B, Stern M (2012) Qualitätssicherung Mukoviszidose 2011, Berichtsband Hippocampus Verlag Bad Honnef.

Shah HN, Collins MD (1981) *Bacteroides buccalis*, sp. nov., *Bacteroides denticola*, sp. nov., and *Bacteroides pentosaceus*, sp. nov., new species of the genus *Bacteroides* from the oral cavity. Zentralbl Bakteriell Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 1 Orig Reihe C 2, 235-241.

Shah HN, Collins MD (1990) *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. Int J Syst Bacteriol 40, 205-208.

Sheppard DN, Welsh MJ (1999) Structure and function of the CFTR chloride channel. Physiol Rev 79, 23-45.

Shin HB, Yoon J, Lee Y, Kim MS, Lee K (2015) Comparison of MALDI-TOF MS, housekeeping gene sequencing, and 16S rRNA gene sequencing for identification of *Aeromonas clinical* isolates. Yonsei Med J 56, 550-555.

Sims EJ, Mugford M, Clark A, Aitken D, McCormick J, Mehta G, Mehta A, UK cystic fibrosis database steering committee (2007) Economic implications of newborn screening for cystic fibrosis: a cost for illness retrospective cohort study. Lancet 369, 1146-1147.

Tunney MM, Field TR, Moriarty TF, Patrick S, Doering G, Muhlebach M, Wolfgang MC, Boucher R, Gilpin DF, McDowell A, Elborn JS (2008) Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 177, 995-1001.

Valerius NH, Koch C, Høiby N (1991) Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in cystic fibrosis by early treatment. Lancet 338, 1276-1287.

Van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ (2010) High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. J Clin Microbiol 48, 900-907.

Vogelmeier C, Buhl R, Criée P, Gillissen A, Kardos P, Köhler D, Magnussen H, Morr H, Nowak D, Pfeiffer-Kascha D, Petro W, Rabe K, Schultz K, Sittler H, Trescher H, Welte T, Wetengel R, Worth H (2007) Leitlinie der Deutschen Atemwegsliga und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis und Lungenemphysem (COPD). Pneumologie 61, e1-e40, Thieme Verlag, Stuttgart New York

von Wintzingerode F, Selent B, Hegemann W, Göbel UB (1999) Phylogenetic analysis of an anaerobic, trichlorobenzene-transforming microbial consortium. Appl Environ Microbiol 65, 283-286.

Welsh MJ, Ramsey BW (1998) Research on cystic fibrosis - a journey from the heart house. Am J Respir Crit Care Med 157, 148-154.

Wilcken B (1998) Neonatal screening for cystic fibrosis: It is time. Pediatr Pulmonol 26, 219-221.

Woo PC, Lau SK, Fung AM, Chiu SK, Yung RW, Yuen KY (2003) *Gemella* bacteraemia characterized by 16S ribosomal RNA gene sequencing. J Clin Pathol 56, 690-693.

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

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

Wunsch R, Wunsch C (2003) Thorakale Veränderungen bei zystischer Fibrose im Kindesalter. *Radiologe* 43, 1103-1108.

Wybo I, Soetens O, de Bel A, Echahidin F, Vancutsem E, Vandoorslaer K, Piérard D (2012) Species identification of clinical *Prevotella* isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 50, 1415-1418.

Yang S, Lin S, Khalil A, Gaydos C, Nuemberger E, Juan G, Hardick J, Barlett JG, Auwaerter PG, Rothman RE (2005) Quantitative PCR assay using sputum samples for rapid diagnosis of *Pneumococcus pneumoniae* in adult emergency department patients. *J Clin Microbiol* 43, 3221-3226.

7 Anhang

Zustimmungsschreiben der Ethik-Kommission Hamburg vom 20.09.2012 (1).

Ärztchammer Hamburg · Postfach 76 01 09 · 22051 Hamburg

Frau
Prof. Dr. med. Hany Sahly
Institut für Infektionsmedizin
Labor Lademannbogen
Lademannbogen 61-63
22339 Hamburg



20.09.2012

Bearb.-Nr.: PV4142 (Bitte stets angeben!)
Studientitel: Untersuchung zum Nachweis von obligat anaeroben Bakterien aus dem tiefen Respirationstrakt von Patienten mit Cystischer Fibrose und deren Identifikation mittels Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight-Technologie

Sehr geehrte Frau Professor Sahly,

den Eingang Ihres Schreibens vom 17.08.2012 mit Ihrer Stellungnahme und den darin enthaltenen revidierten Studienunterlagen bestätigen wir hiermit.

Die Auflagen der Ethik-Kommission sind nunmehr erfüllt, ein zustimmendes Votum kann somit erteilt werden (Anlage).

Da Sie beabsichtigen, evtl. Proben der Mukoviszidoseambulanz des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein zu entnehmen, sollte der Antrag ggf. der Ethik-Kommission Schleswig-Holstein vorgelegt werden.

Mit freundlichen Grüßen


i.A. Antje Diene
(Sachbearbeitung)

Bankverbindung:
Deutsche Apoth. u. Ärztekammer, BLZ 300 606 01, Konto-Nr. 000 1346 113
BIC: DAAEEDDD, IBAN: DE71 3006 0601 0001 3461 13

Humboldtstraße 67a · 22083 Hamburg
Telefon 040 / 20 22 99 - 240 · Fax 040 / 20 22 99 - 410
ethik@aekhh.de · www.aerztekammer-hamburg.de
Geschäftsführung: Dr. Silke Schrum

Zustimmungsschreiben der Ethik-Kommission Hamburg vom 20.09.2012 (2, Seite 1).



ETHIK-KOMMISSION DER
ÄRZTEKAMMER
HAMBURG
Körperschaft des öffentlichen Rechts

Ärzttekammer Hamburg · Postfach 76 01 09 · 22051 Hamburg

Herr
Prof. Dr. med. Hany Sahly
Institut für Infektionsmedizin
Labor Lademannbogen
Lademannbogen 61-63
22339 Hamburg

20.09.2012

Bearb.-Nr.: PV4142 (Bitte stets angeben!)

Studientitel: Untersuchung zum Nachweis von obligat anaeroben Bakterien aus dem tiefen Respirationstrakt von Patienten mit Cystischer Fibrose und deren Identifikation mittels Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight- Technologie

Sehr geehrte Herr Kollege Sahly,

über Ihr oben bezeichnetes, zur Primärberatung vorgelegtes Projekt hat die Ethik-Kommission ausführlich beraten.

Das Vorhaben entspricht den berufsrechtlichen bzw. gesetzlichen Anforderungen. Die Ethik-Kommission stimmt dem Vorhaben zu.

Die Kommission weist darauf hin, dass die Verantwortung des Versuchsleiters für das Forschungsvorhaben und seine Durchführung durch das obige Votum der Kommission nicht berührt wird.

Für den Fall der Durchführung der Studie in Zentren anderer Kammerbereiche geht die Kommission von der Einbindung der lokal zuständigen Ethik-Kommission aus.

Sie werden gebeten, die Ethik-Kommission über alle schwerwiegenden oder unerwarteten Ereignisse, die während der Studie auftreten und die die Sicherheit der Studienteilnehmer gefährden, in Verbindung mit Ihrer Stellungnahme zu unterrichten.

Die Kommission geht davon aus, dass die personenbezogenen Daten der Probanden / Patienten den datenschutzrechtlichen Vorschriften entsprechend behandelt werden.

...2

Bankverbindung:
Deutsche Apoth. u. Ärztekammer, BLZ 300 606 01, Konto-Nr. 000 1346 113
BIC: DAAEDED, IBAN: DE71 3006 0601 0001 3461 13

Humboldtstraße 67a · 22083 Hamburg
Telefon 040/20 22 99-240 · Fax 040/20 22 99-410
ethik@aekhh.de · www.aerztekammer-hamburg.de
Geschäftsführung: Dr. Silke Schrum

Zustimmungsschreiben der Ethik-Kommission Hamburg vom 20.09.2012 (2, Seite 2).

Bearb.-Nr.: PV4142 (Bitte stets angeben!)
Studententitel: Untersuchung zum Nachweis von obligat anaeroben Bakterien aus dem tiefen
Respirationstrakt von Patienten mit Cystischer Fibrose und deren Identifikation mittels Matrix
Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight- Technologie

- 2 -

Die Ethik-Kommission erwartet, dass ihr nach Abschluss des Projektes unaufgefordert ein Abschluss-Bericht übersandt wird (unter Angabe der Bearb.-Nr.), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Mit verbindlicher Empfehlung
Im Auftrage der Kommission:

Prof. Dr. med. Th. Weber
- Vorsitzender -

P.S. Die Ethik-Kommission arbeitet auf der Grundlage deutschen Rechts und Berufsrechts sowie in Anlehnung an die ICH-GCP.

Information für den Patienten.

Kinder- und Jugendärztliche
Gemeinschaftspraxis Friesenweg
Ambulanz des CF-Zentrums Altona
Friesenweg 2
22763 Hamburg

Labor Lademannbogen MVZ GmbH
Lademannbogen 61
22339 Hamburg
Kontakt: Prof. Dr. H. Sahly, M. Daniels
Telefon: 040 538050

Studie: Information für den Patienten

Liebe Patientin, lieber Patient!

Die Studie „*Untersuchung zum Nachweis von obligat anaeroben Bakterien aus dem tiefen Respirationstrakt von Patienten mit Cystischer Fibrose und deren Identifikation mittels Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight-Technologie*“ hat das Ziel, Bakterien im Sputum nachzuweisen, die ausschließlich in Abwesenheit von Sauerstoff wachsen können (obligat anaerobe Bakterien) und dabei verschiedene Untersuchungsmethoden zu vergleichen.

In dieser Studie wird zu Grunde gelegt, dass in der Lungenschleimhaut von Patienten mit cystischer Fibrose (CF) teils sauerstoffarme (hypoxische) bzw. sauerstofffreie (anaerobe) Bedingungen herrschen. Wegen dieser besonderen Verhältnisse in der Lunge von CF-Patienten sind neben den Bakterien, die sowohl unter Sauerstoffabschluss als auch in dessen Gegenwart lebensfähig sind (fakultativ anaerobe Bakterien) auch Bakterien, die ausschließlich in Abwesenheit von Sauerstoff wachsen können (obligat anaerobe Bakterien) als Verursacher chronischer Infektionen der Lunge zu vermuten.

Ist zu klären, ob Empfehlungen zur Berücksichtigung von obligat anaeroben Bakterien im bakteriologisch-diagnostischen Die Sputum-Probe wird im Rahmen einer Routine-Kontrolle in Ihrer gewohnten Praxis gewonnen und zum Transport in das Labor in ein Gefäß speziell für anaerob wachsende Bakterien gegeben. Ihr Sputum wird im Labor Lademannbogen in Hamburg untersucht, dort auch bis zum Abschluss der Untersuchungen (ca. 18 Monate) aufbewahrt und danach verworfen. Eine genetische Untersuchung Ihrer Sputum-Probe ist nicht vorgesehen. Bereits bekannte Ergebnisse werden separat dokumentiert und bei der Auswertung der Daten berücksichtigt. Ziel der Untersuchung Prozess von CF-Patienten ausgesprochen werden sollen.

Bei dieser Studie werden die gesetzlichen Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz genau eingehalten. Alle Angaben zur Person sowie Ergebnisse der Untersuchungen werden vertraulich behandelt und verschlüsselt gespeichert und ausgewertet (siehe „Hinweise zum Datenschutz“). Wenn Sie Fragen zur Studie oder den Ergebnissen der Untersuchungen haben, können Sie sich jederzeit an den Studienleiter oder seine Vertreterin wenden (s.o.).

Für die Teilnahme an der Studie, die völlig freiwillig ist, wird Ihre schriftliche Einverständniserklärung benötigt. Diese kann zu jeder Zeit ohne Angaben von Gründen widerrufen werden. In diesem Fall werden noch nicht anonymisierte Proben oder Daten zu Ihrer Person gelöscht.

Hinweise zum Datenschutz:

Die im Rahmen der Studie nach Einverständniserklärung des Studienteilnehmers erhobenen persönlichen Daten, insbesondere Befunde, unterliegen der Schweigepflicht und den datenschutzgesetzlichen Bestimmungen.

Sie werden in Papierform und auf Datenträgern im Labor Lademannbogen in Hamburg aufgezeichnet und pseudonymisiert, d. h. verschlüsselt (der Name und andere Identifizierungsmerkmale werden durch ein mehrstelliges Kennzeichen ersetzt, das die Identifizierung des Studienteilnehmers wesentlich erschwert) für die Dauer von zehn Jahren gespeichert.

Zugang zu dem „Schlüssel“, der eine persönliche Zuordnung der Daten des Studienteilnehmers ermöglicht, hat neben dem Studienleiter Prof. Dr. med. H. Sahly nur noch seine Stellvertreterin Frau Martina Daniels (Facharzt bzw. Assistenzärztin im Labor Lademannbogen).

Die Auswertung und Nutzung der Daten durch den Studienleiter und seiner Mitarbeiter erfolgt in pseudonymisierter Form. Eine Weitergabe der erhobenen Daten im Rahmen der Studie erfolgt nur in anonymisierter Form, d. h. personenbezogene Daten werden derart verändert, dass die Einzelangaben über persönliche oder sachliche Verhältnisse nicht mehr oder nur mit einem unverhältnismäßig großen Aufwand an Zeit, Kosten und Arbeitskraft einer bestimmten oder bestimmbarer natürlichen Person zugeordnet werden können.

Im Falle von Veröffentlichungen von Studienergebnissen bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten gewährleistet.

Die Studienteilnehmer haben das Recht, über die von ihnen erhobenen personenbezogenen Daten Auskunft zu verlangen und über möglicherweise anfallende personenbezogene Ergebnisse der Studie ggf. informiert zu werden.

Diese Studie ist durch die zuständige Ethik-Kommission beraten worden. Der zuständigen Landesbehörde kann ggf. Einsichtnahme in die Studienunterlagen gewährt werden.

Sobald der Forschungszweck es zulässt, wird der Schlüssel gelöscht und die damit erhobenen Daten damit anonymisiert.

Im Falle des Widerrufs der Einverständniserklärung werden die bereits erhobenen Daten ebenfalls gelöscht. Ein Widerruf bereits anonymisierter Daten ist nicht möglich.

Information für den Patienten (Version 00 vom 06.08.2012)

Einverständniserklärung des Patienten.

Kinder- und Jugendärztliche
Gemeinschaftspraxis Friesenweg
Ambulanz des CF-Zentrums Altona
Friesenweg 2
22763 Hamburg

Labor Lademannbogen MVZ GmbH
Lademannbogen 61
22339 Hamburg
Kontakt: Prof. Dr. H. Sahly, M. Daniels
Telefon: 040 538050

Name der Patientin / des Patienten

Studie: Einverständniserklärung des Patienten

Studie: „Untersuchung zum Nachweis von obligat anaeroben Bakterien aus dem tiefen Respirationstrakt von Patienten mit Cystischer Fibrose und deren Identifikation mittels Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight-Technologie“

Ich bin damit einverstanden, dass aus meinen Sputum-Proben, die zu diagnostischen Zwecken entnommen werden, zusätzlich auch wissenschaftliche Untersuchungen durchgeführt werden.

Hierbei handelt es sich um den Nachweis von Bakterien, die ausschließlich in Abwesenheit von Sauerstoff wachsen können (obligat anaerobe Bakterien). Mit meinen Sputum-Proben werden im Rahmen der Studie keine genetischen Untersuchungen durchgeführt. Bereits bekannte Ergebnisse werden separat dokumentiert. Die wissenschaftlichen Untersuchungen dienen der Erforschung von Krankheiten und werden zum Wohle der Patienten durchgeführt. Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Ich habe die Möglichkeit, Fragen zu stellen und wenn gewünscht, werden mir die Ergebnisse dieser Untersuchungen jederzeit mitgeteilt. Die Proben werden für die Gesamtdauer der Untersuchung (ca. 18 Monate) im Labor Lademannbogen aufbewahrt und danach verworfen.

Ich wurde über dieses Vorgehen von einer Ärztin/einem Arzt informiert und aufgeklärt. Das Einverständnis zur Teilnahme an der Studie erfolgt freiwillig. Ich habe keine Nachteile, wenn ich es nicht abgebe. Es kann jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen werden. In diesem Fall werden noch nicht anonymisierte Proben oder Daten zu meiner Person gelöscht.

Mit meiner Unterschrift bestätige ich den Erhalt der Informationsschrift für den Patienten.

Hinweise zum Datenschutz:

Die im Rahmen der Studie nach Einverständniserklärung des Studienteilnehmers erhobenen persönlichen Daten, insbesondere Befunde, unterliegen der Schweigepflicht und den datenschutzgesetzlichen Bestimmungen.

Sie werden in Papierform und auf Datenträgern im Labor Lademannbogen in Hamburg aufgezeichnet und pseudonymisiert, d. h. verschlüsselt (der Name und andere Identifizierungsmerkmale werden durch ein mehrstelliges Kennzeichen ersetzt, das die Identifizierung des Studienteilnehmers wesentlich erschwert) für die Dauer von zehn Jahren gespeichert.

Zugang zu dem „Schlüssel“, der eine persönliche Zuordnung der Daten des Studienteilnehmers ermöglicht, hat neben dem Studienleiter Prof. Dr. med. H. Sahly nur noch seine Stellvertreterin Frau Martina Daniels (Facharzt bzw. Assistenzärztin im Labor Lademannbogen).

Die Auswertung und Nutzung der Daten durch den Studienleiter und seiner Mitarbeiter erfolgt in pseudonymisierter Form. Eine Weitergabe der erhobenen Daten im Rahmen der Studie erfolgt nur in anonymisierter Form, d. h. personenbezogene Daten werden derart verändert, dass die Einzelangaben über persönliche oder sachliche Verhältnisse nicht mehr oder nur mit einem unverhältnismäßig großen Aufwand an Zeit, Kosten und Arbeitskraft einer bestimmten oder bestimmaren natürlichen Person zugeordnet werden können.

Im Falle von Veröffentlichungen von Studienergebnissen bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten gewährleistet.

Die Studienteilnehmer haben das Recht, über die von ihnen erhobenen personenbezogenen Daten Auskunft zu verlangen und über möglicherweise anfallende personenbezogene Ergebnisse der Studie ggf. informiert zu werden.

Diese Studie ist durch die zuständige Ethik-Kommission beraten worden. Der zuständigen Landesbehörde kann ggf. Einsichtnahme in die Studienunterlagen gewährt werden.

Sobald der Forschungszweck es zulässt, wird der Schlüssel gelöscht und die damit erhobenen Daten damit anonymisiert.

Im Falle des Widerrufs der Einverständniserklärung werden die bereits erhobenen Daten ebenfalls gelöscht.

Ein Widerruf bereits anonymisierter Daten ist nicht möglich.

Hamburg, den _____

Unterschrift Patient/in
(ggf. gesetzlicher Vertreter)

Unterschrift Ärztin/Arzt

Einverständniserklärung (Version 00 vom 06.08.2012)

Tab. A1: Auflistung aller CF-Patienten (n=53) mit Angabe von Alter, Geschlecht, FEV₁, Art der Genmutation und Anzahl der detektierten Anaerobier.

Patient (n)	Alter (Jahre)	Geschlecht (m/w)	FEV ₁ %	Genmutation	Anaerobier (n)
1	11	m	79	F508del homozygot	2
2	11	m	54	F508del/2184 ins A	0
3	12	m	50	F508del/CFTR dele 2,3 (21kb)	0
4	13	m	104	F508del homozygot	2
5	14	w	69	F508del/2183 AA>G	3
6	14	m	87	F508del homozygot	0
7	16	w	75	R 347P/?	3
8	17	w	88	F508del/?	2
9	18	w	82	F508del/3659 del C	1
10	18	w	71	F508del/3302 T>A	1
11	18	w	91	F508del homozygot	0
12	19	w	72	F508del homozygot	1
13	19	m	32	F508del/?	1
14	19	m	31	F508del homozygot	1
15	19	w	57	F508del/N1313K	0
16	20	w	59	F508del homozygot	3
17	21	m	102	F508del/2789+5 G>A	1
18	21	w	59	?	0
19	23	w	39	F508del/?	1
20	23	w	56	F508del homozygot	1
21	23	m	57	F508del homozygot	1
22	24	w	55	F508del homozygot	4
23	24	m	68	F508del homozygot	1
24	24	m	82	F508del/?	2
25	25	w	99	F508del homozygot	2
26	25	m	68	F508del/?	2
27	26	w	75	F508del/10kb C>T	4
28	26	w	15	F508del homozygot	1
29	26	m	93	F508del/3849 + 10kb C>T	3
30	26	m	69	F508del homozygot	0
31	27	m	44	F508del/1078delT	1
32	27	m	39	F508del/G551D	2
33	27	m	41	F508del homozygot	1
34	28	m	42	F508del homozygot	1
35	28	m	84	F508del homozygot	1
36	31	w	31	F508del/2789+5 G>A	3
37	31	m	43	F508del/dele2,3 (21kb)	1
38	33	m	47	F508del/?	2
39	34	m	74	F508del/R1162X	1
40	35	w	48	F508del/N1313K	1

Patient (n)	Alter (Jahre)	Geschlecht (m/w)	FEV1 %	Genmutation	Anaerobier (n)
41	36	m	30	F508del homozygot	1
42	36	m	40	F508del homozygot	1
43	37	w	49	?	0
44	43	w	30	F508del homozygot	0
45	44	w	29	F508del homozygot	2
46	45	m	43	F508del homozygot	2
47	45	m	40	F508del/3272-26A>G	1
48	45	w	32	F508del homozygot	0
49	45	m	33	F508del homozygot	0
50	52	w	90	F508del homozygot	2
51	53	m	28	F508del/3300-3014del	3
52	56	w	52	F508del/?	1
53	59	m	29	F508del/c708del	0

Tab. A2: Statistische Auswertung für FEV₁-Werte bei CF-Patienten innerhalb verschiedener Altersgruppen (zu der Boxplot-Auswertung).

Alter (Jahre)	bis 20	21-30	31-40	41-50	> 50
Umfang der Stichprobe	16,00	19,00	8,00	6,00	4,00
Mittelwert	68,81	62,47	45,25	34,50	49,75
Standardabweichung	20,58	23,15	13,73	5,68	29,03
1. Quartil	56,25	43,00	37,75	30,50	28,75
Median z	71,50	59,00	45,00	32,50	40,50
3. Quartil	83,25	78,50	48,25	38,25	61,50
Spannweite	73,00	87,00	44,00	14,00	62,00
Minimum	31,00	15,00	30,00	29,00	28,00
Maximum	104,00	102,00	74,00	43,00	90,00

Tab. A3: Auflistung aller Patienten (n=41) mit nachgewiesenen obligat anaeroben Bakterien und deren Identifikation durch 16S-rDNA-Sequenzierung, ^mIsolat nicht rekultivierbar, Identifikation durch MALDI-TOF MS, *mikroaerophil.

Nr.	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 3	Isolat 4	Isolat 5
1	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella denticola</i>			
2	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella</i> spp.			
3	<i>Prevotella melaninogenica</i>				
4	<i>Veillonella parvula</i>				
5	<i>Veillonella parvula</i>				
6	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella salivae</i>	<i>Prevotella</i> spp.	<i>Veillonella</i> spp.	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
7	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella pallens</i>			
8	<i>Prevotella melaninogenica</i>				
9	<i>Prevotella melaninogenica</i>				
10	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella histicola</i>	<i>Prevotella</i> spp.		
11	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella histicola</i>	<i>Prevotella</i> spp.		
12	<i>Prevotella melaninogenica</i>				
13	<i>Prevotella pallens</i>	<i>Prevotella salivae</i>	<i>Veillonella dispar</i>		
14	<i>Prevotella melaninogenica</i>				
15	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella</i> spp.	<i>Veillonella</i> spp.		
16	<i>Veillonella</i> sp.				
17	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella salivae</i>	<i>Prevotella</i> spp.	<i>Veillonella dispar</i>	
18	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella pallens</i>			
19	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella</i> spp.	<i>Veillonella dispar</i>		
20	<i>Prevotella melaninogenica</i> ^m	<i>Veillonella</i> spp.			
21	<i>Prevotella melaninogenica</i>				
22	<i>Prevotella nanceiensis</i>				
23	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Veillonella parvula</i>			
24	<i>Veillonella parvula</i>				
25	<i>Prevotella melaninogenica</i> ^m	<i>Prevotella</i> spp.			
26	<i>Veillonella parvula</i>				
27	<i>Prevotella nanceiensis</i>				

Nr.	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 3	Isolat 4	Isolat 5
28	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella salivae</i>	<i>Veillonella</i> spp.		
29	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Veillonella</i> spp.			
30	<i>Actinomyces odontolyticus*</i>	<i>Prevotella nan- ceiensis</i>			
31	<i>Prevotella melaninogenica</i>				
32	<i>Prevotella denticola</i>				
33	<i>Veillonella</i> spp.				
34	<i>Prevotella melaninogenica</i>				
35	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella oris</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>		
36	<i>Prevotella salivae</i>	<i>Veillonella</i> spp.			
37	<i>Prevotella melaninogenica</i>				
38	<i>Veillonella</i> spp.				
39	<i>Veillonella</i> spp.				
40	<i>Prevotella melaninogenica</i>				
41	<i>Veillonella</i> spp.				

Tab. A4: Ergebnisliste und Vergleich der einzelnen Methoden von 84 positiv getesteten Isolaten; ¹MALDI-Biotyper 2.2, Bewertungs-Index (Wert); ²Identifizierungswahrscheinlichkeit nur auf Gattungsebene; ³geringe Selektivität oder unzuverlässige Identifizierung; ⁴Übereinstimmungen der Sequenzen in Prozent.

MALDI-TOF MS ¹	Wert ¹	rapid ID 32 A	api [®] 20A	16S-rDNA	% ⁴
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1.851	<i>A. odontolyticus</i> ³	keine Identifikation	<i>A. odontolyticus</i>	99
<i>Fusobacterium</i> sp.	1.550	<i>F. nucleatum</i> ³	keine Identifikation	<i>F. nucleatum</i>	100
<i>Fusobacterium naviforme</i>	1.748	<i>F. necrophorum</i> ³	<i>F. varium</i>	<i>F. nucleatum</i>	100
<i>Prevotella denticola</i>	2.306	<i>P. denticola</i> ²	keine Identifikation	<i>P. denticola</i>	100
<i>Prevotella denticola</i>	2.287	<i>P. melaninogenica</i> ²	<i>P. melaninog./oralis</i>	<i>P. denticola</i>	100
<i>Prevotella denticola</i>	2.369	<i>P. melaninogenica</i>	<i>P. melaninog./oralis</i>	<i>P. denticola</i>	100
<i>Prevotella histicola</i>	2.372	<i>P. denticola</i> ²	<i>P. intermedia/disiens</i> ³	<i>P. histicola</i>	100
<i>Prevotella histicola</i>	2.390	<i>P. denticola</i> ²	<i>P. melaninog./oralis</i> ³	<i>P. histicola</i>	100
keine Identifikation	1.190	<i>P. melaninogenica</i> ²	<i>P. melaninog./oralis</i> ³	<i>P. histicola</i>	100
<i>Prevotella nanceiensis</i>	2.138	<i>P. denticola</i> ²	<i>P. melaninog./oralis</i>	<i>P. nanceiensis</i>	100
<i>Prevotella nanceiensis</i>	2.241	<i>P. denticola</i>	keine Identifikation	<i>P. nanceiensis</i>	100
<i>Prevotella nanceiensis</i>	2.099	<i>P. denticola</i> ²	<i>P. melaninog./oralis</i> ³	<i>P. nanceiensis</i>	100
<i>Prevotella oris</i>	2.346	<i>P. oralis</i>	keine Identifikation	<i>P. oris</i>	100
<i>Prevotella pallens</i>	1.935	<i>P. intermedia</i>	<i>P. melaninog./oralis</i>	<i>P. pallens</i>	99
<i>Prevotella pallens</i>	1.979	<i>P. oralis</i>	<i>Propionibacterium propionicum/avidum</i> ³	<i>P. pallens</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.857	<i>P. melaninogenica</i> ³	<i>Propionibacterium propionicum/avidum</i> ³	<i>P. pallens</i>	100
<i>Prevotella salivae</i>	1.881	<i>P. buccae</i> ³	keine Identifikation	<i>P. salivae</i>	100
<i>Prevotella salivae</i>	1.848	<i>P. buccae</i> ³	keine Identifikation	<i>P. salivae</i>	100
<i>Prevotella salivae</i>	1.742	<i>P. buccae</i>	<i>P. melaninog./oralis</i> ³	<i>P. salivae</i>	100
<i>Prevotella salivae</i>	1.993	<i>P. oralis</i>	keine Identifikation	<i>P. salivae</i>	100
keine Identifikation	1.630	<i>P. intermedia</i>	<i>P. melaninog./oralis</i> ³	<i>P. salivae</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.348	<i>P. melaninogenica</i> ²	keine Identifikation	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.266	<i>P. melaninogenica</i>	keine Identifikation	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.284	<i>P. melaninogenica</i>	keine Identifikation	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.257	<i>P. oralis</i>	<i>P. melaninog./oralis</i>	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.196	<i>P. melaninogenica</i>	<i>P. melaninog./oralis</i>	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.220	<i>P. melaninogenica</i>	<i>F. varium</i> ³	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.219	<i>P. melaninogenica</i>	<i>P. melaninog./oralis</i> ³	<i>P. melaninogenica</i>	99
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.123	<i>P. bivia</i>	<i>P. intermedia/disiens</i> ³	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.283	<i>P. intermedia</i>	keine Identifikation	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.696	<i>P. denticola</i> ²	<i>P. melaninog./oralis</i>	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.110	<i>P. melaninogenica</i> ²	<i>P. melaninog./oralis</i>	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.087	<i>P. melaninogenica</i>	<i>P. melaninog./oralis</i>	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.812	<i>P. melaninogenica</i> ²	<i>P. intermedia/ disiens</i>	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.696	<i>P. melaninogenica</i>	keine Identifikation	<i>P. melaninogenica</i>	99
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.191	<i>P. melaninogenica</i> ²	<i>P. melaninog./oralis</i> ³	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.840	<i>P. melaninogenica</i> ²	<i>P. melaninog./oralis</i>	<i>P. melaninogenica</i>	99
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.173	<i>P. melaninogenica</i>	<i>P. melaninog./oralis</i>	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.038	<i>P. melaninogenica</i> ²	<i>P. melaninog./oralis</i>	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.161	<i>P. melaninogenica</i> ²	<i>Bacteroides vulgatus</i> ³	<i>P. melaninogenica</i>	100

MALDI-TOF MS ¹	Wert ¹	rapid ID 32 A	api® 20A	16S-rDNA	% ⁴
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.802	<i>P. melaninogenica</i> ²	keine Identifikation	<i>P. melaninogenica</i>	99
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.243	<i>P. denticola</i> ²	<i>F. necrophorum/nucleatum</i> ³	<i>P. melaninogenica</i>	99
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.182	<i>P. melaninogenica</i>	keine Identifikation	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.994	<i>P. melaninogenica</i>	<i>P. melaninog./oralis</i> ³	<i>P. melaninogenica</i>	99
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.866	<i>P. melaninogenica</i> ²	<i>P. melaninog./oralis</i>	<i>P. melaninogenica</i>	99
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.121	<i>P. melaninogenica</i> ²	keine Identifikation	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.110	<i>P. melaninogenica</i>	<i>P. melaninog./oralis</i>	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.013	<i>P. denticola</i> ²	<i>P. melaninog./oralis</i>	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.290	<i>P. oralis</i>	keine Identifikation	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.235	<i>P. melaninogenica</i>	keine Identifikation	<i>P. melaninogenica</i>	99
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.248	<i>P. oralis</i>	<i>P. bivia</i>	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.209	<i>P. oralis</i>	<i>P. melaninog./oralis</i>	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.845	<i>P. melaninogenica</i> ²	<i>P. melaninog./oralis</i> ³	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.208	<i>P. oralis</i>	<i>P. melaninog./oralis</i>	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.426	<i>P. denticola</i> ²	keine Identifikation	<i>P. spp.</i>	99
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.862	<i>P. melaninogenica</i> ²	<i>P. melaninog./oralis</i>	<i>P. spp.</i>	99
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.814	<i>P. melaninogenica</i> ²	<i>F. necrophorum/nucleatum</i> ³	<i>P. spp.</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.786	<i>P. oralis</i> ²	<i>F. mortiferum</i> ³	<i>P. spp.</i>	99
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.879	<i>P. melaninogenica</i> ²	<i>P. intermedia/disiens</i> ³	<i>P. spp.</i>	99
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.766	<i>P. melaninogenica</i> ²	<i>P. melaninog./oralis</i>	<i>P. spp.</i>	99
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.886	<i>P. melaninogenica</i> ²	<i>P. melaninog./oralis</i> ³	<i>P. spp.</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.083	<i>P. oralis</i>	<i>P. melaninog./oralis</i>	<i>P. spp.</i>	99
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.153	<i>P. melaninogenica</i> ²	<i>P. melaninog./oralis</i>	nicht rekultivierbar	
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.058	<i>P. oralis</i>	<i>P. melaninog./oralis</i>	nicht rekultivierbar	
<i>Veillonella parvula</i>	2.100	<i>V. spp.</i>	<i>V. parvula</i> ³	<i>V. parvula</i>	100
<i>Veillonella parvula</i>	1.971	<i>V. spp.</i>	<i>V. parvula</i> ³	<i>V. parvula</i>	100
<i>Veillonella parvula</i>	2.194	<i>V. spp.</i>	<i>V. parvula</i> ³	<i>V. parvula</i>	100
<i>Veillonella parvula</i>	2.160	<i>V. spp.</i>	<i>V. parvula</i> ³	<i>V. parvula</i>	100
<i>Veillonella parvula</i>	1.999	<i>V. spp.</i> ³	<i>V. parvula</i> ³	<i>V. parvula</i>	100
<i>Veillonella parvula</i>	2.057	<i>V. spp.</i>	<i>V. parvula</i> ³	<i>V. parvula</i>	100
<i>Veillonella dispar</i>	2.146	<i>V. spp.</i>	<i>V. parvula</i> ³	<i>V. dispar</i>	100
<i>Veillonella parvula</i>	1.759	<i>Clostridium tyrobutyricum/V. spp.</i> ³	<i>V. parvula</i> ³	<i>V. dispar</i>	100
<i>Veillonella parvula</i>	2.085	<i>V. spp.</i>	<i>V. parvula</i> ³	<i>V. dispar</i>	100
<i>Veillonella parvula</i>	1.766	<i>Clostridium tyrobutyricum/V. spp.</i> ³	<i>V. parvula</i> ³	<i>V. spp.</i>	100
<i>Veillonella dispar</i>	1.983	<i>Clostridium tyrobutyricum/V. spp.</i> ³	<i>V. parvula</i> ³	<i>V. spp.</i>	99
<i>Veillonella atypica</i>	2.381	<i>V. spp.</i> ³	<i>V. parvula</i> ³	<i>V. spp.</i>	100
<i>Veillonella atypica</i>	2.177	<i>Clostridium tyrobutyricum/V. spp.</i> ³	<i>V. parvula</i> ³	<i>V. spp.</i>	100
<i>Veillonella atypica</i>	2.435	<i>Clostridium tyrobutyricum/V. spp.</i> ³	<i>V. parvula</i> ³	<i>V. spp.</i>	100
<i>Veillonella atypica</i>	2.295	<i>Clostridium tyrobutyricum/V. spp.</i> ³	<i>V. parvula</i> ³	<i>V. spp.</i>	99

MALDI-TOF MS ¹	Wert ¹	rapid ID 32 A	api [®] 20A	16S-rDNA	% ⁴
<i>Veillonella atypica</i>	2.286	V. spp. ³	<i>V. parvula</i> ³	V. spp.	100
<i>Veillonella atypica</i>	2.370	V. spp.	<i>V. parvula</i> ³	V. spp.	100
<i>Veillonella atypica</i>	2.289	V. spp. ³	<i>V. parvula</i> ³	V. spp.	99
<i>Veillonella atypica</i>	2.401	V. spp. ³	<i>V. parvula</i> ³	V. spp.	99
<i>Veillonella atypica</i>	2.226	V. spp. ³	<i>V. parvula</i> ³	V. spp.	100

Tab. A5: Prozenttabelle und Farbumschlag bei positiven biochemischen Reaktionen mittels rapid ID 32 A nach Herstellerangaben (Version 3.2) und erzielte Ergebnisse bei obligat anaeroben Bakterien; V., Vertiefung; ¹nach Zugabe von NIT1- und NIT2-Reagenz, ²nach Zugabe von James-Reagenz, ³nach Zugabe von FB-Reagenz (siehe 2.2.4), ⁱAnzahl Isolate; +, positive Reaktion; -, negative Reaktion; a) und b) *Prevotella* spp., c) *Veillonella* spp., *Cladosporium* spp., *Fusobacterium* spp.

a)			<i>Prevotella melaninogenica</i>										<i>Prevotella bivia</i>		<i>Prevotella buccae</i>			
V.	Test	Farbumschlag	%	6 ⁱ	9 ⁱ	1 ⁱ	1 ⁱ	3 ⁱ	2 ⁱ	3 ⁱ	7 ⁱ	1 ⁱ	%	1 ⁱ	%	1 ⁱ	1 ⁱ	1 ⁱ
1.0	URE	rot	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	0	-	-	-
1.1	ADH	rot	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	0	-	-	-
1.2	αGAL	gelb	99	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	-	100	+	+	+
1.3	βGAL	gelb	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	100	+	+	+
1.4	βGP	gelb	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	96	+	67	-	+	+
1.5	αGLU	gelb	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	99	+	89	+	+	+
1.6	βGLU	gelb	19	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1	-	89	+	+	+
1.7	αARA	gelb	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	99	+	+	+
1.8	βGUR	gelb	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	0	-	-	-
1.9	βNAG	gelb	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	+	3	+	+	-
1.A	MNE	gelb-orange	76	-	-	-	+	-	-	+	+	+	92	-	67	-	-	+
1.B	RAF	gelb-orange	81	-	-	-	-	+	+	+	+	+	15	-	67	-	-	+
1.C	GCD	blau	10	-	-	+	-	-	-	-	-	-	46	-	0	-	-	-
1.D	αFUC	gelb	94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	98	-	5	-	-	-
0.0	NIT	blau ¹	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+
0.1	IND	rosa ²	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	-	-	-
0.2	PAL	purpur ³	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	100	-	-	-
0.3	ArgA	orange ³	90	+	+	+	+	+	+	+	+	+	46	+	0	+	+	+
0.4	ProA	orange ³	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	+	0	-	-	-
0.5	LGA	orange ³	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	+	100	-	-	-
0.6	PheA	orange ³	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	0	-	-	-
0.7	LeuA	orange ³	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31	-	0	-	-	-
0.8	PyrA	orange ³	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+
0.9	TyrA	orange ³	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	0	-	-	-
0.A	AlaA	orange ³	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	100	-	-	-
0.B	GlyA	orange ³	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	96	+	0	+	+	+
0.C	HisA	orange ³	24	-	-	-	-	-	+	-	-	-	46	+	0	-	-	-
0.D	GGA	orange ³	90	-	+	+	+	+	+	-	+	+	98	+	56	-	-	+
0.E	SerA	orange ³	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	0	-	-	-

b)			<i>Prevotella dentalis</i>				<i>Prevotella intermedia</i>				<i>Prevotella oralis</i>								
V.	Test	Farb- umschlag	%	8 ⁱ	1 ⁱ	1 ⁱ	%	1 ⁱ	1 ⁱ	1 ⁱ	%	2 ⁱ	1 ⁱ	1 ⁱ	2 ⁱ	1 ⁱ	2 ⁱ	1 ⁱ	1 ⁱ
1.0	URE	rot	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-
1.1	ADH	rot	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-
1.2	αGAL	gelb	89	+	+	+	17	-	-	+	66	-	-	-	-	-	-	-	+
1.3	βGAL	gelb	100	+	+	+	0	-	-	-	95	+	+	+	+	+	+	+	-
1.4	βGP	gelb	100	+	+	+	0	-	-	-	77	-	-	+	+	+	+	+	-
1.5	αGLU	gelb	100	+	+	+	100	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+
1.6	βGLU	gelb	36	-	-	-	0	-	-	-	77	-	-	-	-	-	-	-	-
1.7	αARA	gelb	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-
1.8	βGUR	gelb	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-
1.9	βNAG	gelb	100	+	+	+	0	-	-	-	95	+	+	-	-	+	+	+	+
1.A	MNE	gelb-orange	72	-	-	+	31	+	+	+	86	-	-	-	-	-	-	-	+
1.B	RAF	gelb-orange	63	-	-	+	69	+	+	+	44	-	-	-	-	-	-	-	-
1.C	GCD	blau	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-
1.D	αFUC	gelb	90	-	-	-	92	-	+	+	48	-	-	-	-	-	-	-	-
0.0	NIT	rot ¹	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+
0.1	IND	rosa ²	0	-	-	-	97	+	+	+	0	-	+	-	+	-	+	+	+
0.2	PAL	purpur ³	100	-	-	-	92	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-
0.3	ArgA	orange ³	17	+	+	+	62	+	+	+	44	+	+	+	+	+	+	+	+
0.4	ProA	orange ³	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5	LGA	orange ³	100	-	-	-	99	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-
0.6	PheA	orange ³	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-
0.7	LeuA	orange ³	30	-	-	-	8	-	-	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-
0.8	PyrA	orange ³	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+
0.9	TyrA	orange ³	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-
0.A	AlaA	orange ³	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-
0.B	GlyA	orange ³	0	+	+	+	0	-	+	+	3	-	-	+	-	+	-	-	+
0.C	HisA	orange ³	10	-	-	-	15	+	-	-	33	-	-	-	+	-	-	+	-
0.D	GGA	orange ³	85	-	+	-	82	+	+	+	62	-	-	-	+	-	-	+	-
0.E	SerA	orange ³	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-

c)			<i>Veillonella spp.</i>					<i>Cladosporium tyrobutyricum</i>		<i>Fusobacterium nucleatum</i>		<i>Fusobacterium necrophorum</i>		<i>Actinomyces odontolyticus</i>	
V.	Test	Farb- umschlag	%	5 ⁱ	1 ⁱ	4 ⁱ	4 ⁱ	%	6 ⁱ	%	1 ⁱ	%	1 ⁱ	%	1 ⁱ
1.0	URE	rot	1	-	-	-	-	0	-	0	-	0	-	0	-
1.1	ADH	rot	69	-	-	+	+	0	-	0	-	0	-	28	-
1.2	αGAL	gelb	0	-	-	-	-	0	-	0	-	0	-	0	-
1.3	βGAL	gelb	1	-	-	-	-	1	-	0	-	0	-	78	+
1.4	βGP	gelb	0	-	-	-	-	0	-	0	-	0	-	35	-
1.5	αGLU	gelb	0	-	-	-	-	0	-	0	-	0	-	92	+
1.6	βGLU	gelb	3	-	-	-	-	0	-	0	-	0	-	64	+
1.7	αARA	gelb	0	-	-	-	-	0	-	0	-	0	-	0	-
1.8	βGUR	gelb	0	-	-	-	-	0	-	0	-	25	-	0	-
1.9	βNAG	gelb	0	-	-	-	-	0	-	0	-	0	-	0	-
1.A	MNE	gelb-orange	0	-	-	-	-	50	-	0	-	0	-	0	-
1.B	RAF	gelb-orange	0	-	-	-	-	0	-	0	-	0	-	0	-
1.C	GCD	blau	0	+	+	+	+	0	+	40	-	25	-	100	-
1.D	αFUC	gelb	1	-	-	-	-	0	-	17	+	1	+	0	-
0.0	NIT	rot ¹	100	-	+	-	-	85		0	-	0	+	0	-
0.1	IND	rosa ²	0	-	-	-	-	0	-	100	-	100	-	100	+
0.2	PAL	purpur ³	6	-	-	-	-	0	-	0	-	95	-	92	+
0.3	ArgA	orange ³	0	-	-	-	-	0		1	-	0	-	71	+
0.4	ProA	orange ³	0	+	-	-	-	0	-	0	-	0	-	100	+
0.5	LGA	orange ³	0	-	-	-	-	0		0	-	0	-	100	+
0.6	PheA	orange ³	0	+	-	-	+	0	-	0	-	0	-	0	-
0.7	LeuA	orange ³	6	-	-	-	-	0	-	1	-	0	-	100	+
0.8	PyrA	orange ³	63	-	-	-	-	32	-	0	-	25	-	92	+
0.9	TyrA	orange ³	0	-	-	-	-	0	-	0	-	0	-	85	+
0.A	AlaA	orange ³	0	-	-	-	-	0	-	0	-	1	-	0	-
0.B	GlyA	orange ³	0	-	-	-	-	5	-	0	-	0	-	0	-
0.C	HisA	orange ³	1	-	-	-	-	0	-	0	-	0	-	100	+
0.D	GGA	orange ³	0	-	-	-	-	0	-	0	-	0	-	21	-
0.E	SerA	orange ³	1	-	-	-	-	0	-	0	-	0	-	78	+

Tab. A6: Prozenttabelle und Farbumschlag bei positiven biochemischen Reaktionen mittels api® 20 A nach Herstellerangaben (Version 4.0) und erzielte Ergebnisse bei obligat anaeroben Bakterien; *nach Zugabe von XYL- und EHR-Reagenz, **nach Zugabe von BCP-Reagenz (siehe 2.2.5), ⁱAnzahl Isolate; +, positive Reaktion; -, negative Reaktion; a) *Prevotella* spp., b) *Veillonella* spp., *Fusobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Propionibacterium* spp..

a)		<i>Prevotella bivia</i>		<i>Prevotella intermedia/disiens</i>					<i>Prevotella melaninogenica/oralis</i>								
Test	Farbumschlag	%	1 ⁱ	%	1 ⁱ	1 ⁱ	1 ⁱ	1 ⁱ	%	1 ⁱ	2 ⁱ	5 ⁱ	1 ⁱ	20 ⁱ	1 ⁱ	1 ⁱ	1 ⁱ
IND	rot*	1	-	32	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	rot	0	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	gelb/grün-gelb**	99	+	99	-	+	+	+	97	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	gelb/grün-gelb**	1	-	0	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
LAC	gelb/grün-gelb**	99	+	0	-	-	-	-	97	+	+	+	+	+	+	+	+
SAC	gelb/grün-gelb**	0	-	35	-	-	+	+	83	+	+	+	+	+	+	+	+
MAL	gelb/grün-gelb**	99	+	98	+	+	+	+	97	-	-	+	+	+	+	-	+
SAL	gelb/grün-gelb**	1	-	0	-	-	-	-	31	-	-	-	-	-	-	+	+
XYL	gelb/grün-gelb**	1	-	0	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	+
ARA	gelb/grün-gelb**	1	-	0	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
GEL	Diffusion der schwarzen Tusche	50	-	70	-	-	-	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-
ESC	braun-schwarz	0	-	1	-	-	-	-	51	-	-	-	-	-	-	-	+
GLY	gelb/grün-gelb**	80	-	4	-	-	-	-	18	-	-	-	-	-	+	-	+
CEL	gelb/grün-gelb**	0	-	1	-	-	-	-	53	+	-	-	-	-	+	-	+
MNE	gelb/grün-gelb**	99	-	85	-	-	-	+	97	-	+	-	+	+	+	+	+
MLZ	gelb/grün-gelb**	0	-	0	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
RAF	gelb/grün-gelb**	0	-	19	-	+	+	-	89	-	-	+	-	+	+	-	+
SOR	gelb/grün-gelb**	0	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA	gelb/grün-gelb**	1	-	1	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-
TRE	gelb/grün-gelb**	0	-	1	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-
CAT	Blasenbildung	0	-	1	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-
SPOR	Anwesenheit	0	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-
GRAM	violett	0	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-
COCC	Kokken	1?	-	3?	-	-	-	-	1?	-	-	-	-	-	-	-	-

b)		<i>Veillonella</i> spp.		<i>Fusobacte-</i> <i>rium varium</i>		<i>Fusobacterium</i> <i>necrophorum/</i> <i>nucleatum</i>		<i>Fusobacte-</i> <i>rium morti-</i> <i>ferum</i>		<i>Bacteroi-</i> <i>des</i> <i>vulgatus</i>		<i>Propionibacterium</i> <i>propionicum/</i> <i>avidum</i>		
Test	Farbumschlag	%	20 ⁱ	%	2 ⁱ	%	1 ⁱ 1 ⁱ	%	1 ⁱ	%	1 ⁱ	%	1 ⁱ	1 ⁱ
IND	rot*	0	-	70	-	94	- -	0	-	0	-	0	+	-
URE	röt	0	-	0	-	0	- -	0	-	0	-	0	-	+
GLU	gelb/grün-gelb**	1	-	81	-	1	- -	99	+	99	+	92	+	+
MAN	gelb/grün-gelb**	0	-	0	-	0	- -	0	-	0	-	50	+	-
LAC	gelb/grün-gelb**	1	-	0	-	0	- +	0	-	99	+	50	+	+
SAC	gelb/grün-gelb**	1	-	0	-	0	- -	70	+	98	+	73	+	+
MAL	gelb/grün-gelb**	1	-	0	-	0	- -	15	-	98	+	80	+	+
SAL	gelb/grün-gelb**	1	-	0	-	0	- -	75	-	0	-	0	-	-
XYL	gelb/grün-gelb**	0	-	4	-	0	- -	5	-	99	+	0	-	-
ARA	gelb/grün-gelb**	0	-	0	-	0	- -	0	-	92	-	5	-	-
GEL	Diffusion der schwarzen Tusche	1	-	0	-	2	- -	5	-	5	-	40	+	+
ESC	braun-schwarz	1	-	0	-	0	- -	25	-	23	-	0	-	-
GLY	gelb/grün-gelb**	0	-	0	-	0	- -	25	-	0	-	45	-	+
CEL	gelb/grün-gelb**	1	-	0	-	0	- -	25	-	8	-	0	-	-
MNE	gelb/grün-gelb**	1	-	75	+	0	- -	75	-	99	+	50	-	-
MLZ	gelb/grün-gelb**	0	-	0	-	0	- -	0	-	0	-	2	-	-
RAF	gelb/grün-gelb**	1	-	0	-	0	+ -	75	-	94	+	75	+	+
SOR	gelb/grün-gelb**	0	-	0	-	0	- -	0	-	0	-	0	-	-
RHA	gelb/grün-gelb**	1	-	0	-	0	- -	0	-	77	-	1	-	-
TRE	gelb/grün-gelb**	0	-	0	-	0	- -	23	-	3	-	30	-	-
CAT	Blasenbildung	50	-	0	-	0	- -	3	-	2	-	30	-	+
SPOR	Anwesenheit	0	-	0	-	0	- -	0	-	0	-	0	-	-
GRAM	violett	1?	-	0	-	0	- -	0	-	0	-	82	-	-
COCC	Kokken	100	+	0	-	0	- -	0	-	1?	-	0	-	-

F339	%	Bak533r	%	Pc3mod	%
<i>Prevotella jejuni/melaninogenica/sp.</i>	100	<i>P. melaninogenica</i>	99	<i>P. melaninogenica</i>	99
<i>Prevotella melaninogenica</i>	100	<i>P. melaninogenica/sp.</i>	99	<i>P. melaninogenica</i>	99
<i>Prevotella melaninogenica/sp.</i>	100	<i>P. melaninogenica</i>	100	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	100	<i>P. melaninogenica/sp.</i>	99	<i>P. melaninogenica</i>	99
<i>Prevotella melaninogenica</i>	100	<i>P. melaninogenica/sp.</i>	99	<i>P. melaninogenica</i>	99
<i>Prevotella melaninogenica/sp.</i>	100	<i>P. melaninogenica</i>	100	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica/sp.</i>	100	<i>P. melaninogenica</i>	100	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	100	<i>P. melaninogenica</i>	100	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	100	<i>P. melaninogenica</i>	100	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	99	<i>P. melaninogenica</i>	100	<i>P. melaninogenica</i>	99
<i>Prevotella melaninogenica</i>	100	<i>P. melaninogenica</i>	99	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	100	<i>P. melaninogenica</i>	100	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	100	<i>P. melaninogenica</i>	99	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	100	<i>P. melaninogenica</i>	100	<i>P. melaninogenica</i>	100
<i>Prevotella histicola/melaninogenica/veroralis/sp.</i>	99	<i>P. sp.</i>	99	<i>P. sp.</i>	99
<i>Prevotella jejuni/melaninogenica/scopos/sp.</i>	99	<i>P. jejuni/melaninog./sp.</i>	99	<i>P.jejuni/melaninogenica/scopos/sp.</i>	99
<i>Prevotella jejuni/melaninogenica/sp.</i>	100	<i>P. jejuni/melaninog./sp.</i>	99	<i>P. jejuni/melaninog./sp.</i>	100
<i>Prevotella jejuni/melaninogenica/sp.</i>	100	<i>P. jejuni/melaninog./sp.</i>	99	<i>P. jejuni/melaninog./sp.</i>	99
<i>Prevotella jejuni/melaninogenica/sp.</i>	100	<i>P. jejuni/melaninog./sp.</i>	99	<i>P. jejuni/melaninog./sp.</i>	99
<i>Prevotella jejuni/melaninogenica/sp.</i>	100	<i>P. jejuni/melaninog./sp.</i>	99	<i>P. jejuni/melaninog./sp.</i>	99
<i>Prevotella jejuni/melaninogenica/spp.</i>	100	<i>P. jejuni/melaninog./sp.</i>	100	<i>P. jejuni/melaninog./sp.</i>	100
<i>Prevotella histicola/jejuni/veroralis/sp.</i>	99	<i>P. sp.</i>	99	<i>P. veroralis/sp.</i>	99
<i>Veillonella parvula</i>	100	<i>V. parvula</i>	99	<i>V. parvula</i>	100
<i>Veillonella parvula</i>	100	<i>V. parvula</i>	100	<i>V. parvula</i>	100
<i>Veillonella parvula</i>	100	<i>V. parvula</i>	100	<i>V. parvula/sp.</i>	100
<i>Veillonella parvula</i>	100	<i>V. parvula</i>	100	<i>V. parvula</i>	100
<i>Veillonella parvula</i>	100	<i>V. parvula</i>	99	<i>V. parvula</i>	100
<i>Veillonella parvula</i>	100	<i>V. parvula</i>	100	<i>V. parvula</i>	100
<i>Veillonella dispar</i>	100	<i>V. dispar</i>	100	<i>V. dispar</i>	100
<i>Veillonella dispar</i>	100	<i>V. dispar</i>	100	<i>V. dispar</i>	100
<i>Veillonella dispar</i>	100	<i>V. dispar</i>	100	<i>V. dispar</i>	100
<i>Veillonella sp.</i>	100	<i>V. atypica/sp.</i>	100	<i>V. sp.</i>	100
<i>Veillonella atypica/dispar/parvula/sp.</i>	99	<i>V. atypica/sp.</i>	100	<i>V. atypica/parvula/sp.</i>	99
<i>Veillonella parvula/sp.</i>	100	<i>V. atypica/sp.</i>	100	<i>V. atypica/parvula/sp.</i>	100
<i>Veillonella dispar/sp.</i>	100	<i>V. dispar/parvula/sp.</i>	99	<i>V. dispar/parvula/sp.</i>	100
<i>Veillonella dispar/sp.</i>	100	<i>V. dispar/parvula</i>	100	<i>V. dispar/sp.</i>	100
<i>Veillonella sp.</i>	99	<i>V. atypica/sp.</i>	99	<i>V. atypica/sp.</i>	100
<i>Veillonella dispar/sp.</i>	100	<i>V. dispar/parvula/sp.</i>	100	<i>V. dispar/parvula/sp.</i>	100
<i>Veillonella sp.</i>	100	<i>V. atypica/sp.</i>	99	<i>V. sp.</i>	100
<i>Veillonella sp.</i>	99	<i>V. atypica/sp.</i>	99	<i>V. sp.</i>	100
<i>Veillonella atypica/dispar/sp.</i>	99	<i>V. atypica/sp.</i>	100	<i>V. parvula/sp.</i>	99
<i>Veillonella sp.</i>	100	<i>V. atypica</i>	100	<i>V. sp.</i>	100

Tab. A8: Ergebnisse der durch MALDI-Biotyper 2.2 identifizierten Isolate mit einer initialen Bewertungszahl \leq 1.999 und deren Kontrolle mit Hilfe des MALDI-Biotyper 2.3.

MALDI-TOF MS 2012-2015	Bewertungs- Zahl	MALDI-TOF MS 2016	Bewertungs- Zahl
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1.851	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1.820
<i>Fusobacterium</i> sp.	1.550	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1.860
<i>Fusobacterium naviforme</i>	1.748	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1.740
keine Identifikation	1.190	keine Identifikation	1.340
keine Identifikation	1.630	keine Identifikation	1.440
<i>Prevotella pallens</i>	1.935	<i>Prevotella pallens</i>	2.270
<i>Prevotella pallens</i>	1.979	<i>Prevotella pallens</i>	2.100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.857	<i>Prevotella pallens</i>	2.170
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.696	<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.200
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.812	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.840
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.606	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.830
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.840	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.940
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.802	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.730
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.994	<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.140
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.866	<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.030
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.845	<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.120
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.426	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.330
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.862	<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.010
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.814	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.930
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.786	<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.090
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.879	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.860
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.766	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.700
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.886	<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.080
<i>Veillonella parvula</i>	1.971	<i>Veillonella parvula</i>	1.900
<i>Veillonella parvula</i>	1.999	<i>Veillonella parvula</i>	2.120
<i>Veillonella parvula</i>	1.759	<i>Veillonella dispar</i>	2.250
<i>Veillonella parvula</i>	1.766	<i>Veillonella dispar</i>	2.290
<i>Veillonella dispar</i>	1.983	<i>Veillonella dispar</i>	2.310

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Dr. Hany Sahly, meinen Doktorvater, für die freundliche Bereitstellung des interessanten Themas, die stets mit effektiven und weiterbringenden Ratschlägen versehene Begleitung während der gesamten Studiendauer, die fruchtbaren Diskussionen und den zu jeder Zeit möglichen Austausch über den Fortschritt und das Gelingen der Arbeit.

Weiter möchte ich mich bedanken bei Dr. Wolfgang Hönerlage und Regine Neumann aus der Abteilung für Mikrobiologie im Labor Lademannbogen, Hamburg, für die Einführung in die einzelnen Test-Methoden und die geduldige Betreuung während der praktischen Studienphase. Dr. Hönerlage war mir zudem mit seiner Erfahrung und seinem außergewöhnlichen Sinn für Feinheiten eine besondere Hilfe, für die ich ihm ebenfalls danken möchte.

Stellvertretend für alle anderen Mitarbeiter/innen der Abteilung für Mikrobiologie im Labor Lademannbogen, möchte ich mich bei Karen Albrecht, Jaqueline Bruns, Corinna Grell, Andrea Krüger, Carola Liesem, Birgit Lüdtke, Milena Meier, Agnes Schmidt und Florian Wendland bedanken für ihre ständige Hilfe und Ihren Einsatz im Laboralltag.

Danken möchte ich auch Herrn Lothar Kochan und seinen Mitarbeiterinnen aus der molekulargenetischen Abteilung im Labor Lademannbogen für die Durchführung der Sequenzierungen und die stetige Hilfsbereitschaft.

Dem Labor Lademannbogen in Hamburg danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der nötigen Arbeitsmaterialien zur Durchführung der praktischen Aufgaben.

Einen weiteren Dank möchte ich den Mitarbeitern der Kinder- und Jugendärztlichen Gemeinschaftspraxis Friesenweg, Ambulanz des CF-Zentrums in Hamburg Altona, aussprechen für ihre Mithilfe an dieser Arbeit. Insbesondere Schwester Carola hat dazu beigetragen, dass das Sputum der Patienten gewonnen wurde und ordnungsgerecht das Labor erreichen konnte.

Den Patienten (und ihren Eltern) danke ich sehr für die Teilnahme an dieser Studie. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Lebenslauf

Martina Daniels, geborene Mencke
geboren am 03.10.1960 in Hamburg
verheiratet, fünf Kinder

Schule	1967-1971	Grundschule Arnkielstraße, Hamburg
	1971-1980	Gymnasium Othmarschen, Hamburg
	Juni 1980	Abitur
Studium	1980-1987	Humanmedizin, Universität Hamburg
	1986	Praktisches Jahr, Terial Chirurgie, Duke University, Durham, North Carolina, USA
	14.05.1987	Ärztliche Approbation
Beruf	1988-1990	Assistenzärztin in der Anästhesie bei Dr. P. Berkovič im Kreiskrankenhaus Norden
	09/2003-01/2013	Assistenzärztin im Labor Lademannbogen in Hamburg, vormals Labor Prof. Arndt und Partner
	seit 05/2011	Ärztliche Leitung für Gerinnungsselbstkontroll-Schulungen
	01/2013-01/2014	Assistenzärztin in der inneren und kardiologischen Abteilung bei Prof. Dr. Richardt in den Segeberger Kliniken, Bad Segeberg
	seit 01/2014	Assistenzärztin im Labor Lademannbogen in Hamburg
	seit 01/2016	Ärztliche Leitung für Abstinenzkontrollprogramme
	seit 07/2016	Ärztliche Leitung Abteilung für Autoimmunologie und Allergologie

Veröffentlichungen

Daniels M, Held I, Runge C, Sextro W, Sahly H (2016) Isolation of obligate anaerobic bacteria from lower respiratory tract of patients with cystic fibrosis and the identification potential of „Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Technology“, IJMM, 306, Suppl 1, 322/DVP, Präsentation am 12.09.2016.

Daniels M, Held I, Runge C, Sextro W, Sahly H (2017) Prevalence of anaerobic bacteria in the lower respiratory tract of cystic fibrosis patients and the identification potential of MALDI-TOF MS, ESCMID 2017, Vienna, Austria, ePoster, EV0243, Präsentation am 22.04.2017. https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/.