

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
der Universität Tübingen**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth**

**Immunfluoreszenzmikroskopische  
Bakterienidentifikation und phänotypische Charakterisierung  
von *Burkholderia cepacia***

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Sonja Nonnenmacher**

**aus**

**Nürtingen**

**2004**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Döring

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Stern

# INHALTSVERZEICHNIS

|          |   |          |
|----------|---|----------|
| <b>1</b> | <b>EINLEITUNG.....</b>  | <b>1</b> |
| 1.1      | Zystische Fibrose.....  | 1        |
| 1.2      | Bakterielle Lungeninfektion bei CF .....  | 1        |
| 1.3      | <i>Burkholderia cepacia</i> .....   | 4        |
| 1.4      | Zielsetzung der Arbeit .....  | 7        |
| <b>2</b> | <b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>   | <b>8</b> |
| 2.1      | Verwendete Bakterien.....   | 8        |
| 2.2      | Bakterienanzucht .....  | 13       |
| 2.2.1    | Medien .....  | 13       |
| 2.2.1.1  | TSB/PBS + 1% Glucose.....   | 13       |
| 2.2.1.2  | S-Medium.....   | 13       |
| 2.2.2    | Aerobe und anaerobe Bakterienanzucht.....   | 14       |
| 2.2.3    | Einfrierkulturen .....  | 15       |
| 2.3      | Quantitativer Nachweis anaeroben Wachstums bei <i>B. cepacia</i> .....  | 15       |
| 2.4      | Immunchemische Methoden.....  | 17       |
| 2.4.1    | Bakterienidentifikation von <i>B. cepacia</i> mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie.....   | 17       |
| 2.4.1.1  | Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie mit dem BC408-Antiserum zur Bakterienidentifikation und phänotypischen Charakterisierung von <i>B. cepacia</i> unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen ..... | 17       |
| 2.4.1.2  | Bakterienidentifikation mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung .....  | 19       |
| 2.4.2    | Dot blot .....  | 21       |
| 2.4.2.1  | Spezifitätstestung des BC408-Antiserums mittels Dot blot.....   | 21       |
| 2.4.2.2  | Semiquantitative Untersuchung der Stärke der Reaktion des BC408-Antiserums mit <i>B. cepacia</i> mittels Dot blot .....   | 23       |
| 2.5      | Biochemische EPS-Quantifizierung .....  | 23       |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 2.6      | Statistik.....  | 26        |
| <b>3</b> | <b>ERGEBNISSE.....</b>  | <b>27</b> |
| 3.1      | Quantitativer Nachweis anaeroben Wachstums bei <i>B. cepacia</i> .....  | 27        |
| 3.2      | Spezifitätstestung des BC408-Antiserums mittels Dot blot .....  | 27        |
| 3.3      | Bakterienidentifikation mittels indirekter Immunfluoreszenz-<br>mikroskopie.....  | 29        |
| 3.3.1    | Bakterienidentifikation mit dem BC408-Antiserum.....  | 29        |
| 3.3.1.1  | <i>B. cepacia</i> -Stämme.....  | 29        |
| 3.3.1.2  | Kontrollexperimente.....  | 31        |
| 3.3.1.3  | <i>B. cepacia</i> -Sputum .....   | 32        |
| 3.3.2    | Bakterienidentifikation mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung .....  | 34        |
| 3.4      | Untersuchung der Stärke der Reaktion des BC408-Antiserums von<br>invasiven und nicht-invasiven <i>B. cepacia</i> -Stämmen mittels indirekter<br>Immunfluoreszenz..... | 34        |
| 3.5      | Quantitative EPS-Bestimmung.....  | 38        |
| 3.5.1    | Semiquantitative Untersuchung der Stärke der Reaktion des BC408-<br>Antiserums mit <i>B. cepacia</i> mittels Dot blot .....   | 38        |
| 3.5.2    | Biochemische EPS-Quantifizierung .....  | 39        |
| <b>4</b> | <b>DISKUSSION .....</b>   | <b>41</b> |
| <b>5</b> | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>  | <b>50</b> |
| <b>6</b> | <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>   | <b>51</b> |
| <b>7</b> | <b>ANHANG</b>   |           |

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Zystische Fibrose

Mit einer Inzidenz von 1: 2.500 Lebendgeburten ist die Zystische Fibrose (Cystic fibrosis, CF, Synonym: Mukoviszidose) die häufigste schwerwiegende autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselkrankheit der kaukasischen Bevölkerung [24]. 1989 wurde das die Krankheit verursachende Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 7 entdeckt und sein Proteinprodukt analysiert. Dabei handelt es sich um ein Transmembranprotein, das sogenannte „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ Protein (CFTR), das einen Chloridionenkanal bildet [93], der an der apikalen Seite von Epithel- und Drüsenzellen nachgewiesen werden kann [103]. Die mit 70% häufigste Mutation ist die Deletion eines einzelnen Codons ( $\Delta F_{508}$ ), welches für Phenylalanin codiert [24]. Durch diesen Defekt werden die Proteine während ihrer Bildung falsch gefaltet, deshalb von zellulären Strukturen als fremd erkannt und, anstatt an die Plasmamembran transportiert zu werden, abgebaut [127]. Die Folge ist ein pathologischer Ionenfluss [75], der dazu führt, dass alle exokrinen Drüsen im Körper ein dehydriertes und visköses Sekret absondern.

CF manifestiert sich hauptsächlich an Pankreas, Schweißdrüsen, Samenleitern und Lungen, wobei sich die Lungenbeteiligung lebenslimitierend auswirkt und 90% der Patienten verfrüht sterben [127]. Durch Sekret-Retention kommt es im Respirationstrakt zu chronisch-bakteriellen Infektionen und persistierenden Entzündungen, deren Folge ein zystisch-fibrotischer Umbau des Lungenparenchyms mit Bronchiektasen- und Atelektasenbildung ist. Die Lungenfunktion nimmt ab, und die meisten Patienten sterben schließlich an zunehmender Ateminsuffizienz [24].

## 1.2 Bakterielle Lungeninfektion bei CF

Zu den häufigsten und bekanntesten opportunistischen Erregern bei CF gehören die fakultativen Anaerobier *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* [31, 38], wobei mit zunehmendem Alter der Patienten chronische Lungeninfektionen mit *P. aeruginosa* dominieren [62]. Durch endemieartiges Auftreten und den in einigen

Fällen foudroyanten klinischen Verlauf gewinnt auch die Infektion mit *Burkholderia cepacia* in den letzten Jahrzehnten zunehmend an Bedeutung [54, 115]. Der Mechanismus, durch den der genetische Defekt im CFTR zur chronischen Lungeninfektion führt, konnte bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt werden. Verkman *et al.* [125] fasst in einem Übersichtsartikel die unterschiedlichen Hypothesen, die sich zum Teil ergänzen, aber auch kontrovers diskutiert werden, folgendermaßen zusammen: Nach Smith *et al.* führt eine erhöhte Kochsalzkonzentration des Flüssigkeitsfilms auf der Oberfläche der Luftwege (ASL, Airway Surface Liquid) in CF-Lungen zur Inaktivierung von endogenen antimikrobiellen Substanzen wie zum Beispiel Defensinen [108]. Aufgrund von neueren Untersuchungen in vivo [61], in Zellkulturmodellen [75] und in Tiermodellen [77] muss man jedoch davon ausgehen, dass sich die Kochsalzkonzentration der ASL bei CF-Patienten nicht von derjenigen bei Gesunden unterscheidet. In einer Hypothese von Coakley *et al.* wird behauptet, dass durch eine gestörte Bikarbonatabsorption der pH-Wert der ASL stark erniedrigt und dadurch die mukoziliäre Clearance vermindert wird [15]. Singh *et al.* postulieren einen Zusammenhang zwischen dem sauren pH in der ASL und einem verstärkten Bakterienwachstum mit der Ausbildung eines dichteren Biofilms, der die Funktion der Abwehrzellen beeinträchtigt [107]. Nach Matsui *et al.* führt der Defekt im CFTR zur Volumenreduktion der ASL [75], so dass das visköse Sekret wiederum die mukoziliäre Clearance behindert und Bakterienadhärenz erleichtert wird [8]. Im Gegensatz dazu erklärt Jayaraman *et al.* die Volumenabnahme und Viskositätssteigerung der ASL mit einer gestörten Flüssigkeitssekretion der submukösen Drüsen des Respirationsepithels [56]. Schließlich zeigten Worlitzsch *et al.* 2002, dass der Sauerstoffgehalt des ASL stark vermindert ist, wodurch im anaeroben Milieu die Bildung eines Biofilms von *P. aeruginosa* induziert und dadurch die Elimination der Bakterien verhindert wird [131].

Bakterien können sowohl in Form planktonischer Zellen als auch in Form des sogenannten Biofilms vorkommen [20, 84]. Der Biofilm ist definiert als ein bakterieller Zellverband, der strukturiert und von einer Matrix umgeben ist, die biochemisch vorwiegend aus Exopolysacchariden (EPS) besteht [20]. Er ermöglicht es den Bakterien, an Oberflächen zu adhären und dort zu wachsen [21]. Zusätzlich gewährt er Schutz vor antimikrobiellen Substanzen [3, 46, 112] und den körpereigenen

Abwehrmechanismen polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN) [45] und spielt damit als Virulenzfaktor eine entscheidende Rolle im Pathomechanismus chronischer Infektionen bei CF [35]. Sowohl bei *P. aeruginosa* [76] und *S. aureus* als auch bei *B. cepacia* [11, 13, 113] wird eine EPS-Bildung beschrieben. Das EPS von *P. aeruginosa* wurde als Alginat bekannt und besteht aus Polyuronsäurekomplexen [105]. Die EPS von *S. aureus* und *S. epidermidis*, deren Synthese vom *ica*-Genlocus (intercellular adhesion) gesteuert wird [22, 40], werden als PIA (polysaccharid intercellular adhesin;  $\beta$ -1,6-*N*-acetylglucosaminoglycan) bezeichnet [69, 79]. Bei *B. cepacia* wurde zunächst vermutet, dass die EPS-Produktion ein vereinzelt auftretendes Phänomen sei [35]. Erst kürzlich ergaben sich Hinweise darauf, dass der Großteil verschiedener *B. cepacia*-Stämme in der Lage ist, EPS auszubilden [91]. Cescutti *et al.* bestimmten die chemische EPS-Komposition des *B. cepacia*-Stammes IST 408 [13], einem starken EPS-Produzenten, der aus einem portugiesischen CF-Patienten isoliert wurde [91]. Beim Vergleich der chemischen Zusammensetzung des EPS des IST 408 mit den EPS-Kompositionen anderer klinischer *B. cepacia*-Isolate aus CF-Zentren in Portugal [13], Frankreich [12], Großbritannien [2] und den USA [94] stellte sich heraus, dass sie sich sehr ähnelten [13, 92].

Schon seit längerem ist bekannt, dass Bakterien unter ungünstigen Umweltbedingungen überleben können, indem sie über Regulatorgene ihr Virulenzverhalten und ihren Phänotyp ändern [81]. Daher wurde versucht, einen Zusammenhang zwischen lokalen Umweltbedingungen in CF-Lungen und dem phänotypischen Verhalten von *S. aureus* herauszufinden. Es zeigte sich, dass *S. aureus* das *in vitro* ausgebildete Kapselpolysaccharid CP5 in CF-Lungen nicht exprimiert und dass *in vitro* durch hohe CO<sub>2</sub>-Konzentrationen die CP5-Bildung negativ reguliert werden kann [43]. Kurze Zeit später wurde durch Mc Kenney *et al.* nachgewiesen, dass *S. aureus* in CF-Lungen vermehrt PIA bildet [79]. Crampton *et al.* untersuchten das Wachstum von *S. aureus* und *S. epidermidis* unter anaeroben Bedingungen *in vitro* und stellten fest, dass dadurch die Ausbildung von PIA induziert und auf genetischer Ebene die Transkription der *ica*-Gene durch Sauerstoff reguliert wird [23]. Auch *in vitro* Untersuchungen an *P. aeruginosa* zeigten, dass die Alginatproduktion durch unterschiedliche umweltbedingte Stressfaktoren wie Anaerobiosis [39], Temperatur [99], H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [74] oder Osmose [30] induziert werden kann. Für das Verständnis des Pathomechanismus der

chronischen Infektion bei CF konnte allerdings nachgewiesen werden, dass einige dieser Faktoren nur eine untergeordnete Rolle spielen, da zum Beispiel die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration in Atemkondensaten von CF-Patienten und von Gesunden keine signifikanten Unterschiede aufweist [130]. Daher kommt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als möglicher Faktor für die Ausbildung des mukoiden Phänotyps von *P. aeruginosa* in CF-Patienten nicht in Frage. Im Gegensatz dazu konnte durch Messungen mittels einer Sauerstoffsonde in vitro gezeigt werden, dass der Sauerstoffpartialdruck in der ASL der Atemwege von CF-Patienten stark reduziert ist [131]. Neuere Untersuchungen bestätigen elektronenmikroskopisch in vivo, was zuvor bereits an *S. aureus* demonstriert wurde [118]. Auch *P. aeruginosa* bindet sich vermehrt an Mucine und ordnet sich daher in den Mukusplaques der Atemwege in CF-Lungen in Form sogenannter Makrokolonien an [131] und wird nicht, wie zuvor angenommen, durch Rezeptoren [25, 53] an das Respirationsepithel gebunden. Aufgrund dieser Beobachtungen wird postuliert, dass fakultativ anaerobe Bakterien wie *P. aeruginosa* und *S. aureus* in die intraluminalen mukopurulenten Massen einwandern, dort durch die lokale Anaerobiosis ihren Phänotyp ändern, Biofilm bilden, somit vor den Abwehrmechanismen der PMNs und der Wirkung antimikrobieller Substanzen geschützt sind und so zur chronischen Lungeninfektion bei CF führen [131].

### **1.3 *Burkholderia cepacia***

Das gramnegative Stäbchenbakterium *B. cepacia* wurde 1950 zum ersten Mal von dem amerikanischen Mikrobiologen Walter Burkholder als Ursache einer Zwiebelhäule (Zwiebel lat.: *cepa*) beschrieben [9]. Ursprünglich zählte man diesen Organismus zur Familie der Pseudomonaden, bis Taxonomisten 1992 aufgrund geno- und phänotypischer Charakterisierungsstudien deutliche Unterschiede zu den *Pseudomonas spp.* feststellten und *P. cepacia* und andere Pseudomonaden in der neuen Familie *Burkholderia*, mit der Referenzspezies *B. cepacia*, zusammenfassten [32, 119, 132, 133]. Wegen ihrer genotypischen Vielfalt wird die Spezies *Burkholderia cepacia* heutzutage als ein aus verschiedenen sogenannten Genomovaren bestehender Komplex, der sogenannte *B. cepacia*-Komplex (*B. cepacia* complex, BCC) [120], betrachtet, der vereinfachend *B. cepacia* genannt wird. Bislang konnten zehn unterschiedliche Genomovare identifiziert werden [16, 17, 122, 123, 124, Genomovar X mündliche

Mitteilung von Prof. Dr. Peter Vandamme], wobei bei CF-Patienten am häufigsten Stämme der Genomovare II (*B. multivorans*) [123] und III (*B. cepacia*) [67] isoliert wurden.

Der überwiegend in feuchter und erdiger Umwelt lebende pflanzenpathogene Keim verbreitete in den letzten zwei Jahrzehnten unter CF-Patienten aus mehreren Gründen zunehmende Besorgnis [36]. So wurde erstmals in den achtziger Jahren von einigen CF-Zentren in Nordamerika ein endemieartiges Auftreten von *B. cepacia*-Infektionen berichtet [54, 116]. Im Gegensatz zu *P. aeruginosa* und *S. aureus* kommt es bei *B. cepacia* neben dem chronischen Infektionsverlauf, der entweder mit keiner oder mit einer langsamen Verschlechterung der Lungenfunktion einhergeht [34, 90, 106], in 20% der Fälle zu einer akut verlaufenden nekrotisierenden Pneumonie mit Sepsis (sogenanntes *B. cepacia*-Syndrom) [54]. Dabei scheint der Verlauf der Infektion zum einen durch die Virulenz des jeweiligen *B. cepacia*-Stammes und zum anderen von individuellen Faktoren des betroffenen CF-Patienten bestimmt zu sein [34]. Obwohl von zahlreichen klassischen Virulenzfaktoren, darunter Haemolysine [51], Proteasen [1], Lipasen [36], Katalasen [110], Endotoxine [49], Lipopolysaccharide (LPS) [134] und EPS [91], bei *B. cepacia* berichtet wurde, konnten die Mechanismen, durch die *B. cepacia* zur chronischen und akuten Lungeninfektion führt, bislang noch nicht eindeutig geklärt werden [101]. Anhand von Beobachtungen, dass *B. cepacia* in vitro Biofilm bildet, wurde vermutet, dass *B. cepacia* in der ASL in Form von Makrokolonien aggregiert und so zu einer chronischen Lungeninfektion führt [14, 48, 83]. Intraluminal lokalisierte *B. cepacia*-Makrokolonien konnten bislang in vivo noch nicht nachgewiesen werden, jedoch zeigten Schwab *et al.* durch in vitro Experimente, dass *B. cepacia* unter anaeroben Bedingungen in der ASL von CF-Patienten überleben kann [100]. Auf der anderen Seite wurde von verschiedenen Autoren vermutet, dass *B. cepacia* durch seine Fähigkeit, in das Respirationsepithel zu penetrieren und in Makrophagen zu überleben, in der Lage ist, eine Bakteriämie auszulösen [10, 59, 73, 95]. In immunhistologischen Untersuchungen an Lungengewebe von CF-Patienten, die an einem *B. cepacia*-Syndrom verstarben, konnte *B. cepacia* zwischen den Zellen des Respirationsepithels lokalisiert werden [96]. In einem weiteren in vitro Experiment an hochdifferenziertem humanen Respirationsepithel wurde im Gegensatz dazu gezeigt, dass sowohl Biofilm-bildende *B. cepacia*-Stämme als auch Stämme, die keinen Biofilm

ausbilden, in das Respirationsepithel penetrieren können, dabei jedoch unterschiedliche Wege benutzen [101]. Experimente, die den Einfluss von Anaerobiosis auf die EPS-Produktion bei *B. cepacia* untersuchen, wurden bislang noch nicht durchgeführt.

Das gehäufte Auftreten von Kontaktinfektionen mit *B. cepacia* zwischen CF-Patienten [34, 63, 86] oder zwischen CF-Patienten und Krankenhauspersonal [29, 114] war neben dem besonderen Infektionsverlauf ein weiterer Grund dafür, dass einige CF-Zentren *B. cepacia*-positive CF-Patienten isolierten [37, 126]. Darüber hinaus erwies sich *B. cepacia* als ein gegen Antibiotika multiresistenter Erreger [88, 106], der sogar in der Lage ist, Penicillin G zu metabolisieren [5] und in Desinfektionsmitteln zu überleben [109]. Aus den oben genannten Tatsachen wird deutlich, dass die Diagnose einer Infektion mit *B. cepacia* aufgrund der klinischen, sozialen und psychologischen Folgen für die betroffenen CF-Patienten rasch und zuverlässig gestellt werden sollte. Aufgrund seiner geno- und phänotypischen Vielfalt konnte bislang kein Verfahren entwickelt werden, das diese Kriterien erfüllt. Bei der Verwendung der üblichen kommerziellen Testverfahren [41, 60, 80, 104, 121] oder Selektivmedien [42] wurde in mehreren Fällen *B. cepacia* fälschlicherweise identifiziert oder übersehen [41, 60, 80, 104, 121]. Um eine eindeutige Zuordnung von Bakterien zu dem *B. cepacia*-Komplex und seinen verschiedenen Genomovaren zu garantieren, muss bislang auf eine aufwendige Kombination verschiedener molekulargenetischer Methoden zurückgegriffen werden [Übersichtsartikel siehe 19]: Dazu zählen Sodium-dodecyl-sulfate-polyacrylamide-Gel-Elektrophorese von Ganz-Zell-Proteinen (SDS-PAGE of whole-cell proteins) [123], Ganz-Zell-Fettsäure-Analyse (whole-cell fatty acid analysis) [124], Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction (PCR), Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Fingerabdruck (restriction fragment length polymorphism fingerprinting) von 16S rDNA oder von dem *recA* Gen [4, 72, 78] und Amplifizierter-Fragment-Längen-Polymorphismus-Fingerabdruck (AFLP) [18]. Aus diesen Gründen ist die Etablierung eines schnellen, klinisch anwendbaren und zu 100% verlässlichen Nachweisverfahrens wünschenswert.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Antiserum, das aus gereinigtem EPS des *B. cepacia*-Stammes IST 408 hergestellt wurde (BC408-Antiserum), auf seine Spezifität hin getestet, *B. cepacia* zu identifizieren. Hierzu wurden 102 *B. cepacia*-Stämme aus allen bisher identifizierten Genomovaren mittels immunfluoreszenzmikroskopischer Methoden auf ihre Reaktion mit dem BC408-Antiserum untersucht. Um neue Kenntnisse über den Einfluss von anaeroben Wachstumsbedingungen auf den Phänotyp von *B. cepacia* zu gewinnen, wurde die Stärke der Immunfluoreszenz bei in der Literatur als „invasiv“ und „nicht-invasiv“ beschriebenen *B. cepacia*-Stämmen mit Hilfe des BC408-Antiserums untersucht. Dabei sollte gleichzeitig geprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen den phänotypischen Veränderungen unter anaeroben Wachstumsbedingungen und der Invasivität von *B. cepacia* besteht.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Verwendete Bakterien

Es wurden 117 verschiedene *B. cepacia*-Stämme (Tabelle 1) und *B. cepacia*-positives Sputum untersucht. Das Sputum stammte von einem 14-jährigen männlichen CF-Patienten und wurde zur Durchführung der Experimente freundlicherweise von Prof. Dr. Ratjen, Kinderklinik der Universität Essen, überlassen. Die Kontrollexperimente wurden mit *S. aureus*-, *Streptococcus pneumoniae*- und *P. aeruginosa*-Stämmen durchgeführt (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Verwendete Bakterien-Stämme**

| Nr. | Spezies           | Stamm     | Genomovar | Virulenz      | Literatur |
|-----|-------------------|-----------|-----------|---------------|-----------|
| 1.  | <i>B. cepacia</i> | R-13060   | I         | -             | -         |
| 2.  | <i>B. cepacia</i> | R-15565   | I         | -             | -         |
| 3.  | <i>B. cepacia</i> | LMG 17993 | I         | -             | -         |
| 4.  | <i>B. cepacia</i> | R-1901    | I         | -             | -         |
| 5.  | <i>B. cepacia</i> | R-663     | I         | -             | -         |
| 6.  | <i>B. cepacia</i> | R-734     | I         | -             | -         |
| 7.  | <i>B. cepacia</i> | LMG 19589 | I         | -             | -         |
| 8.  | <i>B. cepacia</i> | LMG 18821 | I         | invasiv       | [72]      |
| 9.  | <i>B. cepacia</i> | R-13052   | II        | invasiv       | [26]      |
| 10. | <i>B. cepacia</i> | LMG 17567 | II        | nicht-invasiv | -         |
| 11. | <i>B. cepacia</i> | LMG 16775 | II        | nicht-invasiv | -         |
| 12. | <i>B. cepacia</i> | R-18189   | II        | nicht-invasiv | [58]      |
| 13. | <i>B. cepacia</i> | R-14500   | II        | invasiv       | [102]     |
| 14. | <i>B. cepacia</i> | R-12964   | II        | invasiv       | -         |
| 15. | <i>B. cepacia</i> | R-13075   | II        | invasiv       | [102]     |
| 16. | <i>B. cepacia</i> | LMG 16660 | II        | invasiv       | [72, 129] |
| 17. | <i>B. cepacia</i> | LMG 18825 | II        | invasiv       | [72, 82]  |
| 18. | <i>B. cepacia</i> | R-1446    | II        | nicht-invasiv | [111]     |
| 19. | <i>B. cepacia</i> | R-1451    | II        | nicht-invasiv | [111]     |
| 20. | <i>B. cepacia</i> | R-6292    | II        | nicht-invasiv | -         |

| Nr. | Spezies           | Stamm     | Genomovar | Virulenz      | Literatur     |
|-----|-------------------|-----------|-----------|---------------|---------------|
| 21. | <i>B. cepacia</i> | LMG 18822 | II        | nicht-invasiv | [72, 111]     |
| 22. | <i>B. cepacia</i> | R-731     | II        | nicht-invasiv | [111]         |
| 23. | <i>B. cepacia</i> | R-15925   | II        | nicht-invasiv | -             |
| 24. | <i>B. cepacia</i> | R-922     | III       | nicht-invasiv | [58]          |
| 25. | <i>B. cepacia</i> | R-10269   | III       | invasiv       | [26]          |
| 26. | <i>B. cepacia</i> | LMG 13013 | III       | invasiv       | [26]          |
| 27. | <i>B. cepacia</i> | R-13130   | III       | invasiv       | -             |
| 28. | <i>B. cepacia</i> | R-14086   | III       | invasiv       | -             |
| 29. | <i>B. cepacia</i> | LMG 18828 | III       | invasiv       | [71, 72, 111] |
| 30. | <i>B. cepacia</i> | R-1471    | III       | invasiv       | [71, 111]     |
| 31. | <i>B. cepacia</i> | R-15291   | III       | invasiv       | -             |
| 32. | <i>B. cepacia</i> | R-4194    | III       | invasiv       | -             |
| 33. | <i>B. cepacia</i> | LMG 18829 | III       | invasiv       | [66, 72]      |
| 34. | <i>B. cepacia</i> | LMG 18830 | III       | invasiv       | [71, 72]      |
| 35. | <i>B. cepacia</i> | R-9932    | III       | invasiv       | -             |
| 36. | <i>B. cepacia</i> | LMG 16656 | III       | invasiv       | [34, 72]      |
| 37. | <i>B. cepacia</i> | LMG 16659 | III       | invasiv       | [72, 106]     |
| 38. | <i>B. cepacia</i> | LMG 16658 | III       | invasiv       | -             |
| 39. | <i>B. cepacia</i> | LMG 16654 | III       | invasiv       | [33, 72]      |
| 40. | <i>B. cepacia</i> | R-10965   | III       | nicht-invasiv | [111]         |
| 41. | <i>B. cepacia</i> | R-1445    | III       | nicht-invasiv | [111]         |
| 42. | <i>B. cepacia</i> | R-1448    | III       | nicht-invasiv | [111]         |
| 43. | <i>B. cepacia</i> | R-1449    | III       | nicht-invasiv | [111]         |
| 44. | <i>B. cepacia</i> | R-6116    | III       | nicht-invasiv | [111]         |
| 45. | <i>B. cepacia</i> | R-655     | III       | nicht-invasiv | [111]         |
| 46. | <i>B. cepacia</i> | R-9504    | III       | nicht-invasiv | -             |
| 47. | <i>B. cepacia</i> | LMG 14939 | III       | nicht-invasiv | [26]          |
| 48. | <i>B. cepacia</i> | R-14483   | IV        | -             | -             |
| 49. | <i>B. cepacia</i> | R-14528   | IV        | -             | -             |
| 50. | <i>B. cepacia</i> | R-16919   | IV        | -             | -             |
| 51. | <i>B. cepacia</i> | R-3338    | IV        | -             | -             |
| 52. | <i>B. cepacia</i> | R-4024    | IV        | -             | -             |

| Nr. | Spezies           | Stamm     | Genomovar | Virulenz      | Literatur |
|-----|-------------------|-----------|-----------|---------------|-----------|
| 53. | <i>B. cepacia</i> | LMG 18140 | IV        | -             | -         |
| 54. | <i>B. cepacia</i> | LMG 18833 | IV        | -             | -         |
| 55. | <i>B. cepacia</i> | LMG 14294 | IV        | nicht-invasiv | [26]      |
| 56. | <i>B. cepacia</i> | R-10106   | V         | -             | -         |
| 57. | <i>B. cepacia</i> | R-15822   | V         | -             | -         |
| 58. | <i>B. cepacia</i> | R-16532   | V         | -             | -         |
| 59. | <i>B. cepacia</i> | R-18190   | V         | -             | -         |
| 60. | <i>B. cepacia</i> | R-723     | V         | -             | -         |
| 61. | <i>B. cepacia</i> | R-9903    | V         | -             | -         |
| 62. | <i>B. cepacia</i> | R-15274   | V         | invasiv       | -         |
| 63. | <i>B. cepacia</i> | R-5143    | V         | nicht-invasiv | -         |
| 64. | <i>B. cepacia</i> | R-10358   | VI        | -             | -         |
| 65. | <i>B. cepacia</i> | R-15304   | VI        | -             | -         |
| 66. | <i>B. cepacia</i> | LMG 21443 | VI        | -             | -         |
| 67. | <i>B. cepacia</i> | R-2879    | VI        | -             | -         |
| 68. | <i>B. cepacia</i> | R-4055    | VI        | -             | -         |
| 69. | <i>B. cepacia</i> | R-4227    | VI        | -             | -         |
| 70. | <i>B. cepacia</i> | LMG 19468 | VI        | -             | -         |
| 71. | <i>B. cepacia</i> | LMG 18944 | VI        | invasiv       | [65]      |
| 72. | <i>B. cepacia</i> | R-10028   | VII       | -             | -         |
| 73. | <i>B. cepacia</i> | LMG 19466 | VII       | -             | -         |
| 74. | <i>B. cepacia</i> | R-12629   | VII       | -             | -         |
| 75. | <i>B. cepacia</i> | R-13370   | VII       | -             | -         |
| 76. | <i>B. cepacia</i> | R-14258   | VII       | -             | -         |
| 77. | <i>B. cepacia</i> | R-14272   | VII       | -             | -         |
| 78. | <i>B. cepacia</i> | R-5140    | VII       | -             | -         |
| 79. | <i>B. cepacia</i> | R-6630    | VII       | -             | -         |
| 80. | <i>B. cepacia</i> | R-11753   | VIII      | -             | -         |
| 81. | <i>B. cepacia</i> | R-11758   | VIII      | -             | -         |
| 82. | <i>B. cepacia</i> | R-13393   | VIII      | -             | -         |
| 83. | <i>B. cepacia</i> | LMG 20980 | VIII      | -             | -         |
| 84. | <i>B. cepacia</i> | R-4190    | VIII      | -             | -         |

| Nr.  | Spezies           | Stamm      | Genomovar | Virulenz | Literatur |
|------|-------------------|------------|-----------|----------|-----------|
| 85.  | <i>B. cepacia</i> | LMG 20982  | VIII      | -        | -         |
| 86.  | <i>B. cepacia</i> | LMG 20983  | VIII      | -        | -         |
| 87.  | <i>B. cepacia</i> | R-9942     | VIII      | -        | -         |
| 88.  | <i>B. cepacia</i> | R-10724    | IX        | -        | -         |
| 89.  | <i>B. cepacia</i> | R-12639    | IX        | -        | -         |
| 90.  | <i>B. cepacia</i> | R-13061    | IX        | -        | -         |
| 91.  | <i>B. cepacia</i> | R-13540    | IX        | -        | -         |
| 92.  | <i>B. cepacia</i> | R-13543    | IX        | -        | -         |
| 93.  | <i>B. cepacia</i> | R-13544    | IX        | -        | -         |
| 94.  | <i>B. cepacia</i> | R-14497    | IX        | -        | -         |
| 95.  | <i>B. cepacia</i> | R-1904     | IX        | -        | -         |
| 96.  | <i>B. cepacia</i> | R-5630     | X         | -        | -         |
| 97.  | <i>B. cepacia</i> | R-5631     | X         | -        | -         |
| 98.  | <i>B. cepacia</i> | R-11767    | X         | -        | -         |
| 99.  | <i>B. cepacia</i> | R-11768    | X         | -        | -         |
| 100. | <i>B. cepacia</i> | R-17384    | X         | -        | -         |
| 101. | <i>B. cepacia</i> | R-17385    | X         | -        | -         |
| 102. | <i>B. cepacia</i> | LMG 20358  | X         | -        | -         |
| 103. | <i>B. cepacia</i> | IST 401    | -         | -        | -         |
| 104. | <i>B. cepacia</i> | IST 408    | -         | -        | [91]      |
| 105. | <i>B. cepacia</i> | IST 410    | -         | -        | -         |
| 106. | <i>B. cepacia</i> | IST 450    | -         | -        | -         |
| 107. | <i>B. cepacia</i> | ATCC 17759 | -         | -        | -         |
| 108. | <i>B. cepacia</i> | ATCC 17765 | -         | -        | -         |
| 109. | <i>B. cepacia</i> | ATCC 17616 | -         | -        | -         |
| 110. | <i>B. cepacia</i> | ATCC 25416 | -         | -        | -         |
| 111. | <i>B. cepacia</i> | P1         | -         | -        | -         |
| 112. | <i>B. cepacia</i> | P2         | -         | -        | -         |
| 113. | <i>B. cepacia</i> | P3         | -         | -        | -         |
| 114. | <i>B. cepacia</i> | P4         | -         | -        | -         |
| 115. | <i>B. cepacia</i> | P5         | -         | -        | -         |
| 116. | <i>B. cepacia</i> | P6         | -         | -        | -         |

| Nr.  | Spezies              | Stamm      | Genomovar | Virulenz | Literatur |
|------|----------------------|------------|-----------|----------|-----------|
| 117. | <i>B. cepacia</i>    | P7         | -         | -        | -         |
| 118. | <i>S. aureus</i>     | ATCC 35556 | -         | -        | -         |
| 119. | <i>S. aureus</i>     | Reynolds   | -         | -        | -         |
| 120. | <i>S. aureus</i>     | 8325-4     | -         | -        | -         |
| 121. | <i>S. aureus</i>     | DU1090     | -         | -        | -         |
| 122. | <i>S. aureus</i>     | MRSA1      | -         | -        | -         |
| 123. | <i>S. aureus</i>     | MRSA3      | -         | -        | -         |
| 124. | <i>S. aureus</i>     | MRSA5      | -         | -        | -         |
| 125. | <i>S. aureus</i>     | MRSA6      | -         | -        | -         |
| 126. | <i>S. aureus</i>     | GT2        | -         | -        | -         |
| 127. | <i>S. aureus</i>     | GT36       | -         | -        | -         |
| 128. | <i>S. aureus</i>     | GT54       | -         | -        | -         |
| 129. | <i>S. aureus</i>     | SA 2°      | -         | -        | -         |
| 130. | <i>S. aureus</i>     | SA 7       | -         | -        | -         |
| 131. | <i>S. aureus</i>     | SA 13      | -         | -        | -         |
| 132. | <i>S. aureus</i>     | SA 18      | -         | -        | -         |
| 133. | <i>S. pneumoniae</i> | ATCC 27336 | -         | -        | -         |
| 134. | <i>S. pneumoniae</i> | ATCC 6303  | -         | -        | -         |
| 135. | <i>P. aeruginosa</i> | PA 01      | -         | -        | [47]      |
| 136. | <i>P. aeruginosa</i> | PA 15      | -         | -        | -         |
| 137. | <i>P. aeruginosa</i> | PA 21      | -         | -        | -         |
| 138. | <i>P. aeruginosa</i> | PA 35      | -         | -        | -         |
| 139. | <i>P. aeruginosa</i> | PA 50      | -         | -        | -         |
| 140. | <i>P. aeruginosa</i> | PA 51      | -         | -        | -         |
| 141. | <i>P. aeruginosa</i> | PA 54      | -         | -        | -         |
| 142. | <i>P. aeruginosa</i> | PA 60      | -         | -        | -         |
| 143. | <i>P. aeruginosa</i> | PA 61      | -         | -        | -         |
| 144. | <i>P. aeruginosa</i> | PA 62      | -         | -        | -         |
| 145. | <i>P. aeruginosa</i> | PA 63      | -         | -        | -         |
| 146. | <i>P. aeruginosa</i> | PA 64      | -         | -        | -         |
| 147. | <i>P. aeruginosa</i> | PA 65      | -         | -        | -         |

Die mit „R“ bzw. „LMG“ (Laboratorium Microbiologie Ghent) gekennzeichneten *B. cepacia*-Stämme (Nr. 1-102) wurden zur Durchführung der Experimente freundlicherweise von Prof. Dr. Peter Vandamme

(Mikrobiologisches Institut der Universität Gent, Belgien) zur Verfügung gestellt. Die Stämme wurden sowohl aus Umweltproben als auch aus Patientensputum isoliert und von Prof. Dr. Peter Vandamme genotypisiert. Im Unterschied zu den R-Stämmen befinden sich die LMG-Stämme auch in der BCCM (Belgium Coordinated Collections of Microorganisms) und können, ebenso wie die *B. cepacia*-ATCC-Stämme (American Type Culture Collection, Manassas, Nr. 107-110), für wissenschaftliche Zwecke käuflich erworben werden. Die *B. cepacia*-IST-Stämme (Instituto Superior Técnico, Nr. 103-106 Patientenisolat) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Jorge H. Leitão (Instituto Superior Técnico, Lissabon, Portugal) und die *B. cepacia*-P-Stämme (Nr. 111-117 Patientenisolat) von Dr. Graziana Manno (CF-Zentrum, Genua, Italien) zur Verfügung gestellt. Mittels der Charakterisierung der Stämme in den Literaturangaben erfolgte die Einteilung in „invasive“ bzw. „nicht-invasive“ *B. cepacia*-Stämme. Die Kontrollexperimente wurden mit *S. aureus*-Stämmen (Nr. 118-121 Laborstämme, Nr. 122-132 Patientenisolat), *S. pneumoniae*-Stämmen (Nr. 133 und 134 Laborstämme) und *P. aeruginosa*-Stämmen (Nr. 135-147 Patientenisolat) durchgeführt und wurden vom Institut für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt. Keine Angaben (-).

## 2.2 Bakterienanzucht

### 2.2.1 Medien

#### 2.2.1.1 TSB/PBS + 1% Glucose

Zur Herstellung des Flüssigmediums wurden 15g TSB (Tryptone Soy Broth, Oxoid Ltd, Basingstoke, England) in 500 ml einfachem PBS (20-fache Stammlösung pH=7,4: 85 g NaCl (Natriumchlorid, MERCK, Darmstadt, Deutschland), 14,23 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 12 H<sub>2</sub>O (Di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat, MERCK) und 1,35 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Kalium-dihydrogenphosphat, MERCK) in 500 ml destilliertem Wasser (Aqua. dest.)) gelöst und anschließend bei 121°C autoklaviert (Autoklav, KSG, Olching, Deutschland). Danach wurden 5 g Glucose (D(+)-Glucose-Monohydrat, MERCK) in 15 ml Aqua. dest. gelöst und durch einen sterilen Filter (Millex-GS 0,22 µm, Millipore, Molsheim, Frankreich) zugegeben.

#### 2.2.1.2 S-Medium

Um die EPS-Produktion der Bakterien maximal zu stimulieren, wurde ein spezielles Nährmedium mit einem höheren Glucosegehalt eingesetzt. Es konnte sowohl in flüssiger als auch in Form von Nährböden zur Bakterienanzucht verwendet werden. Für die Herstellung der Nährböden (S-Platten) wurden in 1000 ml Aqua. dest. gelöst: 12,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•12H<sub>2</sub>O, 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Kaliumdihydrogenphosphat, MERCK), 1 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Potassium Sulfate, Sigma, St. Louis, USA), 1 g NaCl, 20g Bacto™ Agar (Becton Dickinson, Sparks, USA), 1 g Bacto™ Casamino Acids (Becton Dickinson) und 1 g

Bacto™ Yeast Extract (Becton Dickinson). Nach dem Autoklavieren wurden 5 ml aus einer steril filtrierten 100-fachen Stammlösung (20 g Mg SO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O (Magnesiumsulfat, MERCK), 1 g CaCl<sub>2</sub>•H<sub>2</sub>O (Calciumchlorid-2-hydrat, MERCK), 0,1 g FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O (Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat, MERCK) in 500 ml Aqua. dest. gelöst) zugefügt. Dann wurden 20 g Glucose in 60 ml Aqua. dest. gelöst, steril filtriert und ebenfalls zugegeben. Anschließend wurde zum Gießen der Nährböden das Medium in einem 60°C heißen Wasserbad (FRYKA THERM FT-800) warmgestellt. Pro sterile Gewebekulturschale (Greiner Labortechnik, Nürtingen, Deutschland) wurden mit einer sterilen Einmalpipette (Corning, New York, USA) 20 ml S-Medium entnommen und damit deren Boden bedeckt. Es war zu beachten, dass bei diesem Vorgang keine Blasen entstanden. Die zuletzt gegossene Platte einer Fraktion wurde eine Nacht bei 37°C bebrütet und diente als Wachstumskontrolle. Waren die S-Platten erkaltet, wurden sie beschriftet, in Plastikbeutel verpackt und konnten 2-3 Wochen im Kühlschrank (Bosch, Deutschland) bei 4°C bis zu ihrer Verwendung gelagert werden. Die Herstellung des flüssigen S-Mediums erfolgte nach dem gleichen Verfahren, jedoch ohne die Zugabe von 20 g Bacto™ Agar. Nach dem Autoklavieren war das flüssige Medium bis zu einem Monat in Glasflaschen haltbar.

### **2.2.2 Aerobe und anaerobe Bakterienanzucht**

Um aerobe Flüssigkulturen (Übernachtkulturen) zu erhalten, wurden die Bakterien entweder in TSB/PBS + 1% Glucose oder in flüssigem S-Medium angezüchtet. Hierzu wurden sterile Glasröhrchen (Vetter, Ammerbuch, Deutschland) mit 5 ml Medium befüllt und mit einer Einzelkolonie einer Blutagarplatte angeimpft. Die Glasröhrchen wurden mit einem luftdurchlässigen sterilen Wattepfropfen verschlossen und im Schüttelbrutschrank (INFORS AG, Bottmingen, Schweiz) bei 37°C und 230 RPM (Rüttelungen pro Minute) eine Nacht lang aerob bebrütet. Die aerobe Bakterienanzucht auf Nährböden erfolgte ebenfalls bei 37°C. Zur Beurteilung der Bakterienmorphologie und zur Gewinnung von Einzelkolonien, mit denen weitere Platten oder Flüssigmedien angeimpft werden konnten, wurden Blutagarkulturen hergestellt. Dazu wurden Blutagarplatten (Columbia-Blutagar, heipha, Heidelberg, Deutschland) fraktioniert beimpft und die Bakterien 1-2 Tage bebrütet. Die Bakterien auf Blutagarplatten konnten in Parafilm-Folie verpackt eine Woche im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden. Für

die Anzucht auf der zur Stimulation der EPS-Produktion hergestellten S-Platten wurden einzelne Kolonien der Blutagarplatten auf diese S-Platten überimpft und einen Tag lang bebrütet. Die anaerobe Bakterienanzucht erfolgte gleichermaßen in Anaerobiertöpfen. Das anaerobe (mikroaerophile) Milieu wurde durch Anaerocult®A (MERCK) erzeugt. Ein im Anaerobiertopf befestigter Teststreifen Anaerotest® (MERCK) diente als Kontrolle. Die anaeroben Ansätze wurden grundsätzlich fünf Tage bei 37°C bebrütet.

### **2.2.3 Einfrierkulturen**

Einfrierkulturen dienten dem längerfristigen Aufbewahren der Bakterien. Hierfür wurden 900 µl einer Übernachtskultur und 100 µl steriles Glycerin (MERCK) in ein 2 ml Kryo-Röhrchen (Greiner Labortechnik) gegeben. Die Kulturen wurden in einer Tiefkühltruhe (Colora UF85-460T) bei -74°C gelagert.

## **2.3 Quantitativer Nachweis anaeroben Wachstums bei *B. cepacia***

Mit dem im Folgenden dargestellten Versuch sollte gezeigt werden, dass *B. cepacia* in der Lage ist, unter anaeroben Umweltbedingungen wachsen zu können. Der quantitative Wachstumsnachweis erfolgte durch die Bestimmung der Zellzahl einer Flüssigkultur definierter Optischer Dichte (OD) mittels Verdünnungsreihen jeweils vor und nach anaerobem Bebrüten. Der Versuch wurde an folgenden Stämmen durchgeführt: IST 401, IST 408, IST 410, IST 450, ATCC 17759, ATCC 17765, ATCC 17616, ATCC 25416, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7. Zunächst wurde eine Übernachtskultur in TSB/PBS + 1% Glucose angesetzt. Zum Starten des anaeroben Wachstumsversuchs wurde die Übernachtskultur einheitlich auf eine OD von 0,05 eingestellt: Dazu war zuerst die optische Dichte der Übernachtskultur zu bestimmen, indem 1000 µl Kultur in eine Küvette (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt und dann die OD bei 600 nm Wellenlänge gegen den Leerwert TSB/PBS + 1% Glucose in einem Photometer (Ultrospec III, Pharmacia LBK Biochrom LDT, Cambridge, England) gemessen wurde. War die Übernachtskultur stark getrübt, so musste sie vor der Messung mit TSB/PBS + 1% Glucose im Verhältnis 1:10 verdünnt werden. Anschließend wurde mit folgender Formel die Menge (X) an Übernachtskultur berechnet, der 5 ml TSB/PBS + 1% Glucose zugegeben werden musste, um eine Flüssigkultur mit der OD von 0,05 zu erhalten:  $(1000 \mu\text{l} / \text{gemessene OD in } 1000 \mu\text{l}) \cdot 0,05 \cdot 5 = X$ .

Die entsprechend berechnete Menge wurde dann zu 5 ml TSB/PBS + 1% Glucose in ein steriles Glasröhrchen pipettiert. Um die Zahl an Bakterien zu bestimmen, die einer OD von 0,05 entsprechen, wurden, bevor das Glasröhrchen für den anaeroben Wachstumsversuch mit einem sterilen Wattepfropfen verschlossen wurde, 100 µl Bakteriensuspension entnommen, um damit eine Verdünnungsreihe in 10er Potenzen herzustellen. Hierzu wurden 100 µl Suspension in sterile Eppendorf cups (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt, 900 µl TSB/PBS + 1% Glucose steril zugegeben und gründlich gevortext (Vortex Genie 2<sup>TM</sup>, Bender und Hobein AG, Zürich, Schweiz). Dann wurde wiederum mit einer frischen sterilen Pipettenspitze 100 µl der ersten Verdünnungsstufe ( $10^{-1}$ ) entnommen, um diese mit 900 µl TSB/PBS + 1% Glucose erneut zu verdünnen. So wurde bis zu einer Verdünnungsstufe von  $10^{-8}$  fortgefahren. Danach wurden je Verdünnungsstufe zweimal 10 µl spots auf Blutagarplatten steril aufgebracht. Es wurde darauf geachtet, dass dabei nur gründlich gevortexte cups zum Gebrauch kamen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet und die gewachsenen Bakterienkolonien am nächsten Tag ausgezählt, um dann daraus die durchschnittliche Bakterienanzahl in 1 ml einer Bakteriensuspension mit der OD von 0,05 zu berechnen. Der anaerobe Ansatz im Glasröhrchen wurde in einem Anaerobiertopf, wie bereits in Kapitel 2.2.2 beschrieben, fünf Tage bei 37°C im Schüttelbrutschrank inkubiert. Nach dem Bebrüten wurde analog zum aeroben Ansatz verfahren, indem wieder mittels Verdünnungsreihen die Keimzahlen des anaeroben Ansatzes bestimmt wurden. Die Zellzahlen vor und nach Bebrüten wurden miteinander verglichen.

## **2.4 Immunchemische Methoden**

### **2.4.1 Bakterienidentifikation von *B. cepacia* mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie**

#### **2.4.1.1 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie mit dem BC408-Antiserum zur Bakterienidentifikation und phänotypischen Charakterisierung von *B. cepacia* unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen**

Die Methode basiert darauf, dass Antigene von Antikörpern spezifisch erkannt und gebunden werden. Der Antikörper enthält eine fluoreszierende Verbindung, die es ermöglicht, den Komplex fluoreszenzmikroskopisch zu erkennen (direkte Methode). Bei der indirekten Immunfluoreszenz wird ein in diesem Fall markierter 2. Antikörper gegen den 1. Antikörper gerichtet. Dadurch ergibt sich eine höhere Empfindlichkeit des Nachweises. Es wurde mit dieser Methode die Spezifität des 1. Antikörpers (BC408-Antiserum) geprüft, indem 102 *B. cepacia*-Stämme (Tabelle 1: Nr. 1-102) verschiedener Genomovare, darunter 24 invasive und 20 nicht-invasive Stämme, auf ihre Reaktion mit dem BC408-Antiserum getestet wurden. Die Einteilung der Stämme nach ihrer Invasivität wurde retrospektiv am Verlauf der Infektion bei einzelnen CF-Patienten getroffen, indem Stämme, die das sogenannte *B. cepacia*-Syndrom auslösten, als „invasiv“ und Stämme, deren Infektion durch einen stabilen klinischen Verlauf gekennzeichnet war, als „nicht-invasiv“ charakterisiert wurden (Literaturangaben in Tabelle 1). Des Weiteren wurde die Stärke der Reaktion des BC408-Antiserums mit den 24 invasiven und 20 nicht-invasiven *B. cepacia*-Stämmen unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen semiquantitativ untersucht, um eventuell Rückschlüsse auf die Virulenz der Bakterien ziehen zu können. Dieser Teil des Versuchs wurde geblindet durchgeführt, d.h. erst nachdem die Ergebnisse der Immunfluoreszenz vorlagen, wurde von Prof. Dr. Peter Vandamme die Information über die Pathogenität der Stämme mitgeteilt. Schließlich wurden mit dem BC408-Antiserum Bakterien im Sputum eines mit *B. cepacia* besiedelten CF-Patienten nachgewiesen.

Für die Herstellung des BC408-Antiserums wurde das EPS aus dem *B. cepacia*-Stamm IST 408 (EPS-BC408), einem bekanntermaßen starken EPS-Produzenten [91], von

Prof. Dr. Jorge Leitão am Institut für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene in Tübingen (Deutschland) gewonnen und aufgereinigt. Ein Limulus-Test (Limulus Amebocyte Lysate, Sigma) auf LPS nach der Aufreinigung des EPS-BC408 ergab keine Aktivität auf LPS. Dann wurde das EPS-BC408 dem Kaninchen geimpft (Eurogentech, Köln, Deutschland) und schließlich das gewonnene Kaninchen-Serum säulenchromatographisch aufgereinigt. Die Endkonzentration der gereinigten IgG betrug 0,5 mg/ml. Zur Herstellung der Objekte für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die *B. cepacia*-Stämme zunächst auf Blutagarplatten angezüchtet (1-2 Tage bei 37°C). Dann wurden Einzelkolonien mit einer ausgeglühten Öse entnommen und auf S-Medien überimpft. In zwei Ansätzen wurden die Platten, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, einen Tag aerob bei 37°C und fünf Tage anaerob bei 37°C bebrütet. Am Ende der jeweiligen Inkubationszeit wurde mit einer ausgeglühten Öse wenig Bakterienmaterial entnommen und dieses zur Fixierung direkt in 50 µl eiskaltes Aceton (MERCK) auf einen Objektträger (Lamgenbrinck, Emmendingen, Deutschland) eingerieben. Auf dem Objektträger befand sich für den aeroben und anaeroben Ansatz bereits je ein mit einem Silikonstift (Dakopen, Dako, Hamburg, Deutschland) aufgebrachter Kringel, der das steril pipettierte Aceton umfasste. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass der bakterielle Zucker durch Aceton präzipitiert und deshalb nicht gelöst wurde. Mit dem Patientensputum wurde in ähnlicher Weise verfahren, indem mit einer Pipette eine kleine Menge Sputum auf einen Objektträger überführte wurde. Danach wurde das angetrocknete Sputum mit dem Silikonstift umkringelt. Der Fixationsvorgang erfolgte dann ebenfalls mit eiskaltem Aceton. Die anschließende Immunfluoreszenzfärbung der Objekte erfolgte bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer auf einer Inkubationswippe (Edmund Bühler Labortechnik) mit 14 Wippbewegungen/min. Zuerst wurden die Objekte mit PBS/Tween (Lösung aus einfachem PBS und 0,1% Tween 20 (Sigma)) kurz gewaschen. Dann wurde Schweineserum (Dako) in PBS/Tween im Verhältnis 1:10 verdünnt und aufgetragen. Nach 30 min wurden die Objekte mit PBS/Tween dreimal für 5 min gewaschen. In der Zwischenzeit wurde der 1. Antikörper (BC408-Antiserum, c=[0,5 mg/ml]) aufgetaut, 1:20 mit PBS/Tween verdünnt und dann für 60 min aufgetragen. Es folgte wieder ein Waschschriff mit PBS/Tween (dreimal 5 min). Die nun folgenden Schritte wurden, um ein Ausbleichen des 2. Antikörpers zu verhindern, im Halbdunkeln durchgeführt. Der

2. Antikörper (CY3-konjugierter Antikörper gegen Kaninchen-IgG , Jackson, Dianova, Hamburg, Deutschland) wurde 1:500 mit PBS/Tween verdünnt und für 60 min auf die Objekte aufgetragen. Danach wurde erneut dreimal 5 min mit PBS/Tween gewaschen. Anschließend wurde eine Färbung mit DAPI (4,6-Diamino-2-Phenylindole, Sigma) durchgeführt, um die Bakterien-DNA zu markieren. Dazu wurden im Dunkeln pro spot 10 µl DAPI (Stammlösung c=[5 µg/ml] mit PBS/Tween zuvor 1:200 verdünnt) aufgebracht und 5 min bei RT inkubiert. Es schloss sich ein dreimal fünfminütiger Waschvorgang der Objekte mit Aqua. dest. an, bevor diese luftgetrocknet und in DAKO® Fluorescent Mounting Medium (Dako) eingebettet wurden. Die Objekte konnten bis zur Betrachtung unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan-Fluoreszenzmikroskop, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) vier Wochen im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt werden. Die Bildaufnahme und Bildbearbeitung erfolgte mit einer Digitalkamera (Axio Cam, Carl Zeiss Vision GmbH) und Axio Vision 3.0 (Carl Zeiss).

Zur Spezifitätstestung des BC408-Antiserums (1. Antikörper) wurden Kontrollexperimente mit verschiedenen *S. aureus*-, *S. pneumoniae*- und *P. aeruginosa*-Stämmen durchgeführt (siehe Tabelle 1: Nr. 118-147). Dabei wurde mit den *P. aeruginosa*-Stämmen gleich verfahren wie mit den *B. cepacia*-Stämmen. Da *S. pneumoniae* auf S-Medium nicht wuchs, wurden die *S. pneumoniae*-Stämme zur Durchführung der Immunfluoreszenzexperimente auf Blutagarplatten angezüchtet. *S. aureus* wurde anstatt mit Schweineserum mit humanem Immunglobulin (Sigma) in einer Konzentration von 100 µl/ml abgesättigt. Die Spezifität des 2. Antikörpers wurde mit dem *B. cepacia*-Stamm IST 408 getestet, indem das Objekt anstatt mit dem BC408-Antiserum (1. Antikörper) eine Stunde mit PBS/Tween inkubiert wurde.

#### **2.4.1.2 Bakterienidentifikation mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung**

Bei der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) handelt es sich ebenfalls um ein immunfluoreszenzmikroskopisches Verfahren, das es ermöglicht, in einer vom BC408-Antiserum unabhängigen Methode *B. cepacia* nachzuweisen. Die Bakterienidentifikation erfolgt auf DNA-Ebene, indem die durch Denaturierung gewonnenen Nukleotidsequenzen einer Bakterienprobe in vitro an gentechnisch hergestellte komplementäre Sequenzen (cDNA) binden. Diese cDNA-Sonden sind ihrerseits wiederum mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und können unter einem

Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Die Methode wurde an den *B. cepacia*-Stämmen IST 401, IST 408, ATCC 17765, ATCC 17616, ATCC 25416 und der *Pseudomonas*-Kontrolle PA 01 nach dem Protokoll von Bohnert *et al.* [7] durchgeführt. Zunächst wurde, um Bakterien-DNA zu gewinnen, eine Übernachtskultur angesetzt. Am nächsten Tag wurde die Flüssigkultur mit einer sterilen Pasteurpipette aus den Glasröhrchen in ein steriles 50 ml Probegefäß (Becton Dickinson) überführt und mit der Zentrifuge I bei 3750 Umdrehungen/min (U/min) 12 min lang zentrifugiert. Der folgende Waschvorgang des Pellets erfolgte durch Verwerfung des Überstandes, Resuspension in 15 ml sterilem PBS, Zentrifugierung und erneuter Verwerfung des Überstandes. Nach zwei solcher Waschvorgänge wurde zur Denaturierung der Bakterien-DNA dem Pellet 2 ml 3,7%-iges Formaldehyd (37%-iges Formaldehyd (MERCK) 1:10 verdünnt) zugegeben und gevortext. Die Suspension wurde eine Stunde bei 4°C inkubiert. Danach wurde erneut zentrifugiert (5 min bei 3750 U/min in Zentrifuge I) und mit sterilem PBS zweimal gewaschen. Das Pellet wurde dann in 10 ml eines Gemischs aus 96%-igem Alkohol und PBS (Volumenverhältnis 1:1) suspendiert. Daraus wurden 0,5 ml entnommen, in einen sterilen Eppendorf cup (1,5 ml) überführt und mit 0,5 ml des Alkohol/PBS-Gemischs im Verhältnis 1:1 verdünnt. Dem Eppendorf cup wurden 9 µl entnommen, mit denen ein mit 99%-igem Alkohol entfetteter teflonbeschichteter Objektträger (Roth GmbH, Nürnberg, Deutschland) bestückt wurde. Nachdem das Präparat luftgetrocknet war, wurde es hitzefixiert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (je 5 min in 50%-igem, 80%-igem, 96%-igem Alkohol). Für den eigentlichen Hybridisierungsschritt wurden nun 1 ml Hybridisierungspuffer (für 10%-ige Stringenz: 700 µl Aqua. dest., 100 µl Formamide (MERCK), 180 µl 5 M NaCl (292,2 g NaCl in Aqua. dest. gelöst, Lösung autoklaviert), 20 µl 1 M Trispuffer pH=08 (Trizma®Base, Sigma, mit HCl (MERCK) auf pH=8 eingestellt), 1 µl 10% SDS (10 g SDS (Sodium dodecyl sulfate, SERVA, Heidelberg, Deutschland) in 90 ml Aqua. dest. bei 70°C gelöst, Lösung autoklaviert) und pro Objektträger 50 ml Waschpuffer (für 10%-ige Stringenz: 5 ml 5 M NaCl, 1 ml 1 M Trispuffer pH=08, 50 µl 10% SDS, mit Aqua. dest. auf 50 ml Endvolumen aufgefüllt) vorbereitet. Es wurden pro spot 9 µl Hybridisierungspuffer mit 1 µl der 8 µM Oligonukleotidstammlösung Bce141 (Oligonukleotidsonde am 5'Ende mit CY3 markiert, MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland) angesetzt und auf den Objektträger

aufgebracht. Der Objektträger wurde in einem 50 ml Probegeräß auf ein feuchtes Papiertuch gelegt und 2 Stunden bei 46°C inkubiert. In einem nun folgenden raschen Schritt (sonst nimmt die Stringenz ab) wurde der Objektträger in den auf 46°C vorgewärmten Waschwasser gelegt und dort für 20 min bei 46°C belassen. Danach spülte man den Objektträger vorsichtig mit Aqua. dest. und ließ ihn lufttrocknen. Anschließend wurde eine unspezifische DNA-Markierung mit DAPI durchgeführt (vgl. Kapitel 2.4.1.1). Nach dem Waschvorgang wurden die Objekte zum Schluss in ein Antibleichmittel (5 ml 50%-iges Glycerin (100%-iges mit sterilem Aqua. dest. verdünnt), 5 ml PBS, 100g Ascorbinsäure (MERCK)) eingebettet. Die Auswertung erfolgte innerhalb einer Woche unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss).

## **2.4.2 Dot blot**

Im Unterschied zur indirekten Immunfluoreszenz werden beim Dot blot die nachzuweisenden Substanzen auf Nitrozellulosepapier aufgebracht. Sobald der 2. Antikörper an den 1. Antikörper (BC408-Antiserum) gebunden hat, setzt ein an den 2. Antikörper gekoppeltes Enzym (Peroxidase) ein zugegebenes Substrat (Detektionsreagenz) um. Die bei der Reaktion entstehende Lumineszenz stellt sich auf einem auf den blot aufgelegten hochempfindlichen Film durch Schwärzung dar. Diese Methode ermöglichte es, die Spezifität des BC408-Antiserums zu prüfen, indem verschiedene wasserlösliche Substanzen auf ihre Reaktion mit dem BC408-Antiserum getestet wurden. Außerdem wurde mit dieser weiteren Methode unter der Annahme, dass das BC408-Antiserum spezifisch mit *B. cepacia*-EPS reagiert, versucht, die EPS-Produktion unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen semiquantitativ zu ermitteln.

### **2.4.2.1 Spezifitätstestung des BC408-Antiserums mittels Dot blot**

Es wurden folgende Substanzen getestet: Albumin (Albumin, Bovine, Sigma), Alginate (Alginic Acid, Sigma), Glucose, PBS, EPS-BC408 (isoliertes EPS aus IST 408 von Prof. Dr. Jorge Leitão am Institut für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene, Tübingen, Deutschland) und weitere fünf *B. cepacia*-EPS (EPS-BTS3, EPS-BTS5, EPS-BTS7, EPS-BTS7 in der deacetylierten Form, EPS-BTS13). Die BTS-Zucker wurden von Cescutti *et al.* (Dipartimento di Biochimica, Biofisica e Chimica delle macromolecole, Universität Triest) aus den vier *B. cepacia*-Stämmen BTS3, BTS5,

BTS7 und BTS13 isoliert und zur Durchführung der Experimente freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Bei BTS7 und IST 408 handelt es sich genotypisch um denselben *B. cepacia*-Stamm, der aufgrund der unterschiedlichen Nomenklaturen innerhalb der Forschungsinstitute verschieden benannt wurde. EPS-BTS7 und EPS-BC408 wurden nach der gleichen Methode isoliert [13, 91]. Die untersuchten Substanzen wurden in PBS gelöst, so dass am Ende alle Lösungen in einer Konzentration von 20 µg/ml vorlagen. Dann wurden auf Nitrozellulosepapier (OPTITRAN BA-S 83, Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland) je Substanz 4 mal 5 µl Lösung aufgetragen. Dabei war zu beachten, dass vor jedem erneuten Auftragen die spots nahezu trocken sein mussten, da sie sich sonst vergrößert hätten und eventuell ineinandergeflossen wären. Nachdem die spots vollständig eingetrocknet waren, wurde das Nitrozellulosepapier in eine Schale gelegt. Zur Absättigung wurde das Nitrozellulosepapier mit 5%-iger Skim milk-Lösung (Skim milk (Becton Dickinson) in PBS/Tween gelöst) bedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Skim milk-Lösung abgekippt und dreimal 5 min mit PBS/Tween gewaschen. Die Markierung erfolgte wieder auf der Inkubationswippe bei Raumtemperatur. Dazu wurde der BC408-Antiserum im Verhältnis 1:100 mit PBS/Tween verdünnt und für 2 Stunden aufgetragen. Nach einem weiteren Waschschrift (dreimal 5 min) wurde der 2. Antikörper (HRS (Peroxidase) gegen Kaninchen-IgG, Dako) 1:4500 mit PBS/Tween verdünnt, 1 Stunde inkubiert und anschließend dreimal 5 min gewaschen. Nun wurde unter dem Abzug und im Halbdunkel das Detektionsreagenz (Lumigen<sup>TM</sup>PS-3 detection reagent, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, England) angesetzt, indem Lösung A und Lösung B im Verhältnis 40:1 gemischt wurden. Die Lösung wurde auf dem blot gleichmäßig verteilt. Nach 5 min Inkubation unter dem Abzug wurde das restliche Detektionsreagenz abgekippt und der blot in eine Photokassette (Siemens, Deutschland) gelegt. Die Bildaufnahme erfolgte auf einen hochempfindlichen Film (Hyperfilm<sup>TM</sup>ECL<sup>TM</sup>, Amersham Biosciences) in einer Belichtungszeit von 13 min. Nach der Entwicklung des Films (PhotoentwicklerXR 24-II, Dürr Dental) wurde der blot zur Weiterverarbeitung mit einer digitalen Kamera (Kodak EDAS 290) aufgenommen, bearbeitet (Kodak 1D Limited Edition v.3.5.4) und ausgewertet.

#### **2.4.2.2 Semiquantitative Untersuchung der Stärke der Reaktion des BC408-Antiserums mit *B. cepacia* mittels Dot blot**

Die Methode erlaubt es, neben qualitativen auch semiquantitative Aussagen zu treffen, indem durch mehrfaches Verdünnen von Substanzlösungen um den Faktor 10 eine Abschwächung der Schwärzung gemessen und dann zu den Verdünnungsstufen ins Verhältnis gesetzt werden kann. Da sich bakterielles EPS in Flüssigkeiten löst, konnte durch Zentrifugieren einer Flüssigkultur das EPS im Überstand gewonnen und für den Dot blot verwendet werden. Das Experiment wurde mit den Stämmen IST 408 und ATCC 17765 durchgeführt. Zunächst wurde eine Übernachtskultur in S-Medium auf eine OD von 0,05 eingestellt und diese aerob einen Tag und anaerob fünf Tage bei 37°C bebrütet. Nach dem Bebrüten wurden 100 µl Bouillon entnommen, um die Zellzahl der Kultur, wie in Kapitel 2.3 beschrieben, mittels einer Verdünnungsreihe zu bestimmen. Dann wurde die Bouillon aus den Glasröhrchen in sterile 50 ml Probegefäße überführt und zweimal 15 min bei 4000U/min in Zentrifuge I (GR 412 JOUAN GmbH) zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in ein steriles Probegefäß überführt. Dann wurde der Überstand im Verhältnis 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt und vom Überstand und seinen Verdünnungen je 4 mal 5 µl auf Nitrozellulosepapier aufgebracht. Um zu überprüfen, ob das BC408-Antiserum unspezifisch mit einem Bestandteil des Mediums reagiert, wurden gleichfalls 4 mal 5 µl S-Medium aufgetropft. Anschließend wurde der Dot blot, wie in Kapitel 2.4.2.1 beschrieben, durchgeführt. Die Belichtungszeit betrug in diesem Fall jedoch 20 min.

### **2.5 Biochemische EPS-Quantifizierung**

Die Methode nach Blumenkrantz *et al.* [6] erlaubt die biochemische Bestimmung von Uronsäuren und sauren Mucopolysacchariden in biologischem Material. Der Blumenkrantz-Test diente der exakten Quantifizierung von *B. cepacia*-EPS, da mittels der indirekten Immunfluoreszenz nur qualitative bzw. semiquantitative Aussagen über die Reaktion des BC408-Antiserums mit *B. cepacia* möglich sind. Der Test basiert auf einer mit dem Photometer messbaren spezifischen Farbreaktion, die entsteht, wenn Uronsäuren in konzentrierter Schwefelsäure auf 100°C erhitzt und das Reagenz 3-Hydroxybiphenyl zugegeben wird. Die von den Bakterien synthetisierte EPS-Menge wurde in Bezug zu ihrer Proteinmasse gesetzt, die mittels Pierce-Assay bestimmt

wurde. Das Experiment wurde an den Stämmen IST 401, IST 408, ATCC 17765, ATCC 17616, ATCC 25416 und dem *P. aeruginosa*-Kontrollstamm PA 01 durchgeführt.

Zunächst wurden Übernachtskulturen (in S-Medium) auf eine OD von 0,05 eingestellt (vgl. Kapitel 2.3). Daraus wurden sowohl für den aeroben als auch den anaeroben Ansatz 100 µl Suspension steril entnommen und auf S-Platten pipettiert. Dann wurde ein Drigalski-Glasspatel in 70%-igen Alkohol getaucht, abgeflammt und damit die Suspension gleichmäßig ausplattiert. Die Platten wurden aerob ein Tag und anaerob fünf Tage bei 37°C bebrütet. Um Plattenleerwerte zu erhalten, wurde mit fünf S-Platten gleich verfahren, indem 100 µl steriles S-Medium ausplattiert wurden. Zur EPS-Bestimmung mussten die Bakterien möglichst vollständig von der Agarplatte abgelöst werden. Dazu wurden 5 ml steriles Aqua. dest. auf die Platte aufpipettiert und mit einer sterilen 1000 µl Pipettenspitze der Bakterienbelag vorsichtig abgekratzt, ohne dabei den Agar zu verletzen. Die entstandene Suspension wurde abpipettiert und in 50 ml Zentrifugenröhrchen (OakRidge Centrifuge Tubes, Nalge Company, Rochester, NY, USA) überführt. Genauso verfuhr man mit den nicht beimpften Platten-Leerwerten. Die befüllten Zentrifugenröhrchen wurden in Zentrifuge II (J2-HS, Bechman, Palo Alto, California, USA) 30 min bei 10 000 U/min zentrifugiert. Die Überstände wurden abpipettiert und in sterile 15 ml Probegefäße (Greiner Labortechnik) überführt. Das Pellet wurde für die Proteinbestimmung in 1 ml einer 5%-igen Trichloracetat (MERCK) resuspendiert und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gestellt. Da beim Ablösen des Bakterienbelags auch die Glucose des Mediums in Lösung geht, wurden die Überstände dialysiert. Dazu wurden sie in Dialyseschläuche (Visking® dialysis tubing 20/32, diameter 16 mm, MWCO (molecular weight cut off) 12000-14000, pore diameter 25Å, SERVA), die tags zuvor abgekocht wurden, gefüllt. Die Schläuche wurden in 5 l Dialysegefäße gehängt und zuerst zwei Tage gegen eine 0,1 M NaCl-Lösung und dann zwei Tage gegen Aqua. dest. dialysiert. Die Flüssigkeiten wurden täglich zweimal gewechselt. Für die eigentliche EPS-Bestimmung wurden die Proben nach vier Tagen Dialyse entnommen und in 15 ml Probegefäße überführt. Dann stellte man die benötigten Eppendorf cups, die 0,5%-ige NaOH (1 g Natriumhydroxid-Plätzchen (MERCK) in 200 ml Aqua. dest. gelöst), die 0,15%-ige 3-Hydroxybiphenyl-Lösung (0,15 g 3-Hydroxybiphenol in 100 ml 0,5%-iger NaOH gelöst, ein Monat bei 4°C

haltbar) und die frisch angesetzte 0,0125 M Boraxlösung (0,3 g Borax (Sigma) in 62,5 ml konzentrierte  $H_2SO_4$  (Sigma) gelöst) auf Eis. Da Schwefelsäure bei  $100^\circ C$  unspezifisch mit Zuckern reagiert, musste für die spezifische Bestimmung der bakteriellen EPS, d.h. der sauren Mucopolysaccharide, zuerst die unspezifische Reaktion (Leerwert der Reaktion, USR) gemessen werden. In einem zweiten Schritt wurde die spezifische (SR) Reaktion durch Zugabe des Reagenz 3-Hydroxybiphenyl gemessen, von der dann die unspezifische Reaktion zu subtrahieren war. Hierzu wurden für die unspezifische und die spezifische Reaktion in Eppendorf cups je 200  $\mu l$  der Probe vorgelegt, 600  $\mu l$  konz.  $H_2SO_4$  zugefügt, gevortext und das Gemisch in einem  $100^\circ C$  heißen Heizblock (Ori Block® OB-1, Techne, Vetter) 5 min erhitzt. Danach wurden die cups auf Eis gekühlt. Zur Bestimmung der unspezifischen Reaktion erfolgte die Zugabe von 20  $\mu l$  0,5%-iger NaOH. Danach konnte die Absorption der gevortexten Lösung mit dem Photometer bei 520 nm Wellenlänge (als Referenz diente die Absorption einer leeren Küvette) gemessen werden. Zur Messung der spezifischen Reaktion wurde den Proben 20  $\mu l$  3-Hydroxybiphenyl zugegeben, um nach abermaligem Vortexen die Absorption gleichermaßen bestimmen zu können. Lagen die gemessenen Extinktionen über 1,2, musste man, um im linearen Messbereich zu bleiben, die Dialysate vor der EPS-Bestimmung zuerst im Verhältnis 1:10 mit Aqua. dest. verdünnen. Es wurden je Zucker-Probe vier und je Plattenleerwert zwei Messungen vorgenommen. Anhand der gemessenen Extinktionen [Blumenkrantz 1973], wurden mit einer Eichkurve, die durch Absorptionsmessung definierter Glucuronsäuremengen erstellt wurde, die entsprechenden EPS-Mengen in  $\mu l$  bestimmt.

Um eine Bezugsgröße für den bestimmten EPS-Gehalt der Proben zu bekommen, wurde die entsprechende Proteinmasse mit dem Pierce-Assay (BCA Protein Assay, Pierce, Rockford, Illinois, USA) bestimmt. Die in 5%-igem Trichloracetat gelösten Pellets wurden erneut 30 min bei 10 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, verworfen und das Pellet erneut in 1 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH=7 (61,5 ml einer 1M  $K_2HPO_4$  -Lösung (Dikaliumhydrogenphosphat, MERCK) mit 38,5 ml einer 1 M  $KH_2 PO_4$  -Lösung gemischt und mit 100 ml Aqua. dest. verdünnt) suspendiert. War die Suspension stark getrübt, wurde sie im Verhältnis 1:10 mit Kaliumphosphatpuffer verdünnt. Die Arbeitslösung für den Pierce-Assay (BCA Protein Assay, Pierce Rockford, Illinois, USA) wurde jedes Mal frisch angesetzt, indem

50 Teile des Reagenz A mit einem Teil des Reagenz B gemischt wurden. Für die eigentliche Messung wurden 50  $\mu\text{l}$  der Suspension und 950  $\mu\text{l}$  der Arbeitslösung in Küvetten gegeben und diese 30 min bei 37°C inkubiert. Die Absorption wurde bei 562 nm gegen den Leerwert (950  $\mu\text{l}$  Arbeitslösung mit 50  $\mu\text{l}$  Aqua. dest.) gemessen. Für alle Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Bestimmung der Eichkurve zur Ermittlung der entsprechenden Proteinmengen in  $\mu\text{g}$  erfolgte durch analoges Messen definierter Albuminkonzentrationen im Bereich von 50  $\mu\text{g/ml}$  bis 2000  $\mu\text{g/ml}$ .

## **2.6 Statistik**

Signifikanzen wurden unter Verwendung des Student's t-Testes (Excel, Microsoft Corporation, Redmont, Washington, USA) errechnet. Es wurden p-Werte kleiner als 0,05 als signifikant erachtet.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Quantitativer Nachweis anaeroben Wachstums bei *B. cepacia*

Um eine Information darüber zu erhalten, ob *B. cepacia* nicht nur in der Lage ist, unter anaeroben Umweltbedingungen zu überleben, sondern sich auch zu vermehren, wurde das Wachstum verschiedener *B. cepacia*-Stämme unter anaeroben Wachstumsbedingungen quantifiziert. Es konnte an verschiedenen *B. cepacia*-Stämmen (Tabelle 2) nachgewiesen werden, dass *B. cepacia* im Flüssigmedium (TSB/PBS + 1% Glucose) unter anaeroben Wachstumsbedingungen nur geringfügig wächst (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Quantifikation des anaeroben Wachstums bei verschiedenen *B. cepacia*-Stämmen**

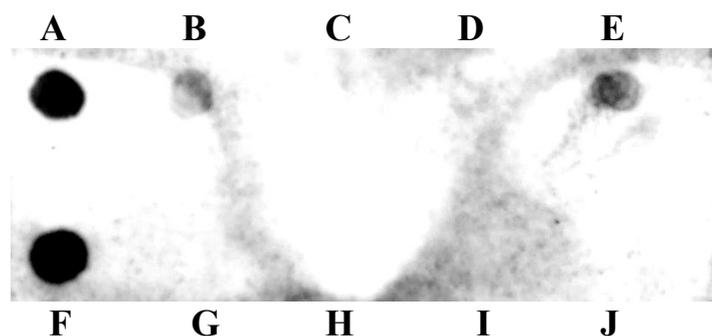
| Stamm      | Bakterienanzahl/ ml Flüssigkultur* |                   |
|------------|------------------------------------|-------------------|
|            | Start-OD von 0,05                  | 5 Tage anaerob    |
| IST 401    | $2,0 \times 10^7$                  | $7,2 \times 10^8$ |
| IST 408    | $4,1 \times 10^7$                  | $1,5 \times 10^8$ |
| IST 410    | $3,0 \times 10^7$                  | $1,7 \times 10^8$ |
| IST 450    | $4,4 \times 10^7$                  | $4,3 \times 10^8$ |
| ATCC 25416 | $4,2 \times 10^7$                  | $2,1 \times 10^8$ |
| ATCC 17759 | $4,6 \times 10^7$                  | $2,9 \times 10^8$ |
| ATCC 17765 | $6,8 \times 10^7$                  | $4,2 \times 10^8$ |
| ATCC 17616 | $2,7 \times 10^7$                  | $4,8 \times 10^7$ |
| P1         | $3,8 \times 10^7$                  | $4,7 \times 10^8$ |
| P2         | $8,2 \times 10^7$                  | $5,9 \times 10^8$ |
| P3         | $4,9 \times 10^7$                  | $2,8 \times 10^8$ |
| P4         | $5,0 \times 10^7$                  | $4,6 \times 10^8$ |
| P5         | $3,1 \times 10^7$                  | $5,0 \times 10^7$ |
| P6         | $4,7 \times 10^7$                  | $6,0 \times 10^7$ |
| P7         | $4,9 \times 10^7$                  | $2,7 \times 10^8$ |

***B. cepacia* wächst unter anaeroben Wachstumsbedingungen im Flüssigmedium TSB/PBS + 1% Glucose nur geringfügig.** (\*), Bakterienanzahl verschiedener *B. cepacia*-Stämme in 1 ml Flüssigkultur der Optischen Dichte von 0,05 (Start-OD von 0,05) und nach fünf Tagen anaerober Bebrütung bei 37°C.

#### 3.2 Spezifitätstestung des BC408-Antiserums mittels Dot blot

Zur Testung der Spezifität wurde die Reaktion des BC408-Antiserums mit EPS-BC408 (isoliertes und gereinigtes EPS aus IST 408 von Prof. Dr. Jorge Leitão am Institut für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene in Tübingen), Alginat, Glucose, Albumin, PBS und fünf weiteren *B. cepacia*-EPS (EPS-BTS3, EPS-BTS5, EPS-BTS7, EPS-BTS7deacet. und EPS-BTS13), die aus den *B. cepacia*-Stämmen BTS3, BTS5, BTS7 und BTS13 von Cescutti *et al.* (Dipartimento di Biochimica, Biofisica e Chimica

delle macromolecole, Universität Triest) isoliert wurden, im Dot blot getestet. Wie bereits in Kapitel 2.4.2.1 erläutert, handelt es sich bei BTS7 und IST 408 genotypisch um denselben *B. cepacia*-Stamm, der aufgrund der unterschiedlichen Nomenklaturen innerhalb der Forschungsinstitute verschieden benannt wurde. EPS-BTS7 und EPS-BC408 wurden nach der gleichen Methode isoliert [13, 91]. Bei EPS-BTS7deacet. handelt es sich um die deacetylierte Form des EPS-BTS7.



**Abbildung 1:** Das BC408-Antiserum reagierte mit den gereinigten *B. cepacia*-Zuckern EPS-BTS3 (A), EPS-BTS5 (B), EPS-BTS13 (E) und EPS-BC408 (F) positiv. Die Reaktionen mit EPS-BTS7 (C), EPS-BTS7deacet. (D), Glucose (G), Albumin (H), Alginat (I) und PBS (J) waren negativ.

Während das BC408-Antiserum mit EPS-BC408 (Abbildung 1F) und EPS-BTS3 (Abbildung 1A) stark und mit EPS-BTS5 (Abbildung 1B) und EPS-BTS13 (Abbildung 1E) schwach reagierte, wurde mit EPS-BTS7 (Abbildung 1C) und EPS-BTS7deacet. (Abbildung 1D) keine Reaktion beobachtet. Auch die Reaktionen des BC408-Antiserums mit Alginat (Abbildung 1I), Glucose (Abbildung 1G), Albumin (Abbildung 1H) und PBS (Abbildung 1J) waren negativ. Die Diskrepanz zwischen den Reaktionen von EPS-BTS7 bzw. EPS-BTS7deacet. und EPS-BC408, die im Dot blot gleich reagieren müssten, ist durch das BC408-Antiserum nicht erklärbar. Möglicherweise sind bei der EPS-Aufreinigung und EPS-Isolierung wichtige Epitope verloren gegangen, so dass das BC408-Antiserum EPS-BTS7 und EPS-BTS7deacet. nicht mehr erkennen konnte. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Versuche mit den EPS aus Triest durchgeführt. Das BC408-Antiserum reagierte im Dot blot sowohl mit EPS-BC408, dem *B. cepacia*-EPS, aus dem das BC408-Antiserum hergestellt wurde, als auch mit den isolierten und gereinigten EPS anderer *B. cepacia*-Stämme positiv. Die Reaktion auf Alginat, Albumin und Glucose war im Dot blot negativ. Diese

Tatsachen deuten auf eine spezifische Reaktion des BC408-Antiserums mit *B. cepacia*-EPS hin.

### **3.3 Bakterienidentifikation mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie**

#### **3.3.1 Bakterienidentifikation mit dem BC408-Antiserum**

##### **3.3.1.1 *B. cepacia*-Stämme**

Es wurden 102 genotypisierte *B. cepacia*-Stämme aus zehn verschiedenen Genomovaren, die unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen auf S-Medium angezüchtet wurden, auf ihre Reaktion mit dem BC408-Antiserum mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Es stellte sich heraus, dass 101 *B. cepacia*-Stämme mit dem BC408-Antiserum positiv reagierten (Tabelle 3, Abbildung 2A+B). Nur der Stamm R-14497 des Genomovars IX verhielt sich negativ und reagierte nicht mit dem BC408-Antiserum (Tabelle 3, Abbildung 2C+D). Es konnte auf diese Weise mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass das BC408-Antiserum in der Lage ist, *B. cepacia*-Stämme aller bekannten Genomovare (I-X) zu erkennen (Tabelle 3).

Parallel zur Bakterienidentifikation wurde die Stärke der Immunfluoreszenz unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen untersucht. Die untersuchten 102 *B. cepacia*-Stämme verhielten sich unter anaeroben Wachstumsbedingungen in der Stärke ihrer Immunfluoreszenz-Signale sehr unterschiedlich. Das Immunfluoreszenz-Signal von 29 der 102 *B. cepacia*-Stämme war anaerob stärker als aerob, bei 41 *B. cepacia*-Stämmen gleichstark wie aerob und bei 32 der untersuchten *B. cepacia*-Stämmen schwächer als aerob (Tabelle 4). Die Unterschiede zwischen den drei Gruppen waren jedoch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Falls das BC408-Antiserum spezifisch mit *B. cepacia*-EPS reagiert, deuten die Unterschiede der immunfluoreszenzmikroskopischen Signale darauf hin, dass genomovarunabhängig je nach *B. cepacia*-Stamm unter anaeroben Wachstumsbedingungen die EPS-Produktion nicht nur gesteigert, sondern auch vermindert oder nicht beeinflusst wird.

**Tabelle 3: Reaktion des BC408-Antiserums mit *B. cepacia*-Stämmen aller Genomovare**

| Genomovar | Anzahl der Stämme | Negative Stämme | Positive Stämme in % |
|-----------|-------------------|-----------------|----------------------|
| I         | 8                 | -               | 100                  |
| II        | 15                | -               | 100                  |
| III       | 24                | -               | 100                  |
| IV        | 8                 | -               | 100                  |
| V         | 8                 | -               | 100                  |
| VI        | 8                 | -               | 100                  |
| VII       | 8                 | -               | 100                  |
| VIII      | 8                 | -               | 100                  |
| IX        | 8                 | 1               | 87,5                 |
| X         | 7                 | -               | 100                  |
| Gesamt    | 102               | 1               | 99,0                 |

**Das BC408-Antiserum reagierte mit 101 *B. cepacia*-Stämmen positiv.** Stamm R-14497 aus Genomovar IX reagierte mit dem BC408-Antiserum negativ. Es wurden insgesamt 102 *B. cepacia*-Stämme aller bekannten Genomovare (I-X) mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht.

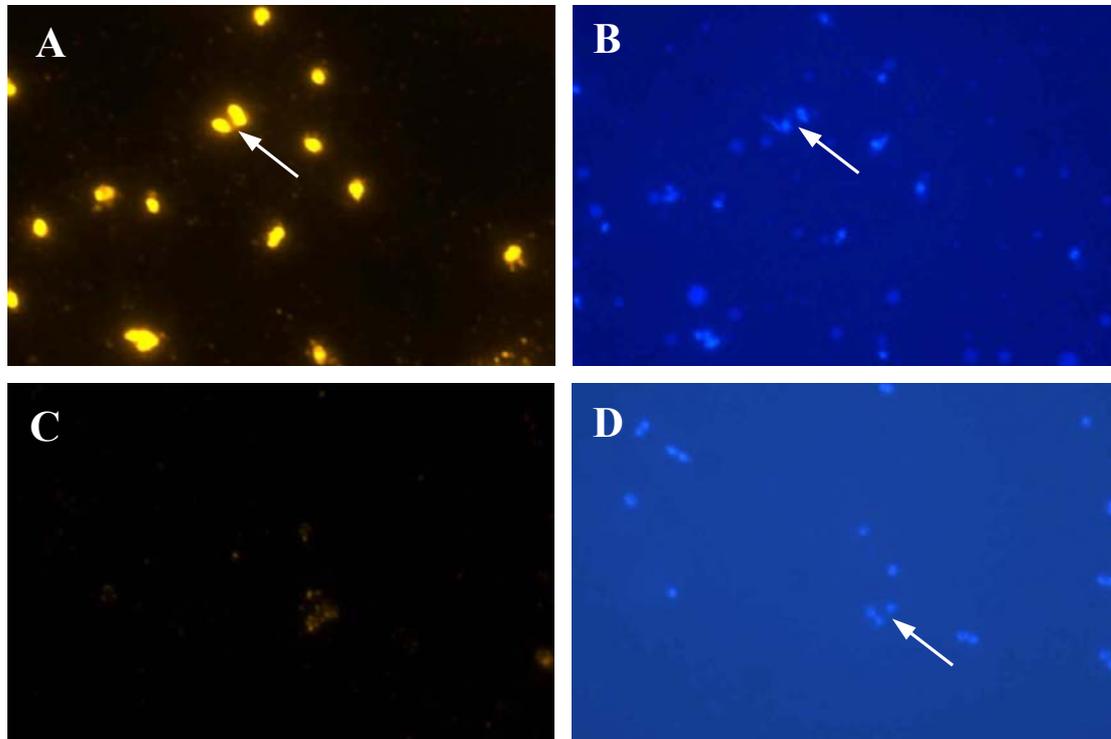
**Tabelle 4: Stärke der Immunfluoreszenz bei allen untersuchten 102 *B. cepacia*-Stämmen unter anaeroben und aeroben Wachstumsbedingungen im Vergleich**

| Stärke der Immunfluoreszenz | Anzahl der Stämme | Anzahl der Stämme in % |
|-----------------------------|-------------------|------------------------|
| AN>A                        | 29                | 28,4                   |
| AN=A                        | 41                | 40,2                   |
| AN<A                        | 32                | 31,4                   |

**Die untersuchten 102 *B. cepacia*-Stämme verhielten sich in der Stärke ihrer Immunfluoreszenz-Signale unter anaeroben Wachstumsbedingungen sehr unterschiedlich.** Die Immunfluoreszenz-Signale der verschiedenen *B. cepacia*-Stämme waren genomovaranabhängig anaerob entweder stärker oder gleichstark oder schwächer als aerob. Alle Unterschiede waren nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

Einen Zusammenhang zwischen der Stärke der Immunfluoreszenz und der Genomovarzugehörigkeit der untersuchten 102 *B. cepacia*-Stämme konnte nicht festgestellt werden. Unter dem Mikroskop war außerdem zu beobachten, dass im Blickfeld nicht grundsätzlich alle Bakterien mit dem BC408-Antiserum positiv reagierten. So waren in mehreren Fällen mit dem Filter für die DAPI-Färbung im Blickfeld 100% blau-fluoreszierende *B. cepacia*-Stäbchen, gleichzeitig aber unter dem CY3-Filter für die Markierung mit dem BC408-Antiserum und unveränderten Einstellungen am Mikroskop weniger als 100% entsprechend gelb-fluoreszierende *B. cepacia*-Stäbchen zu beobachten. Das bedeutet, dass je nach *B. cepacia*-Stamm nicht

alle *B. cepacia*-Bakterien einer Kolonie die für die Erkennung und Markierung durch das BC-408-Antiserum notwendigen Epitope auf ihrer Oberfläche tragen.

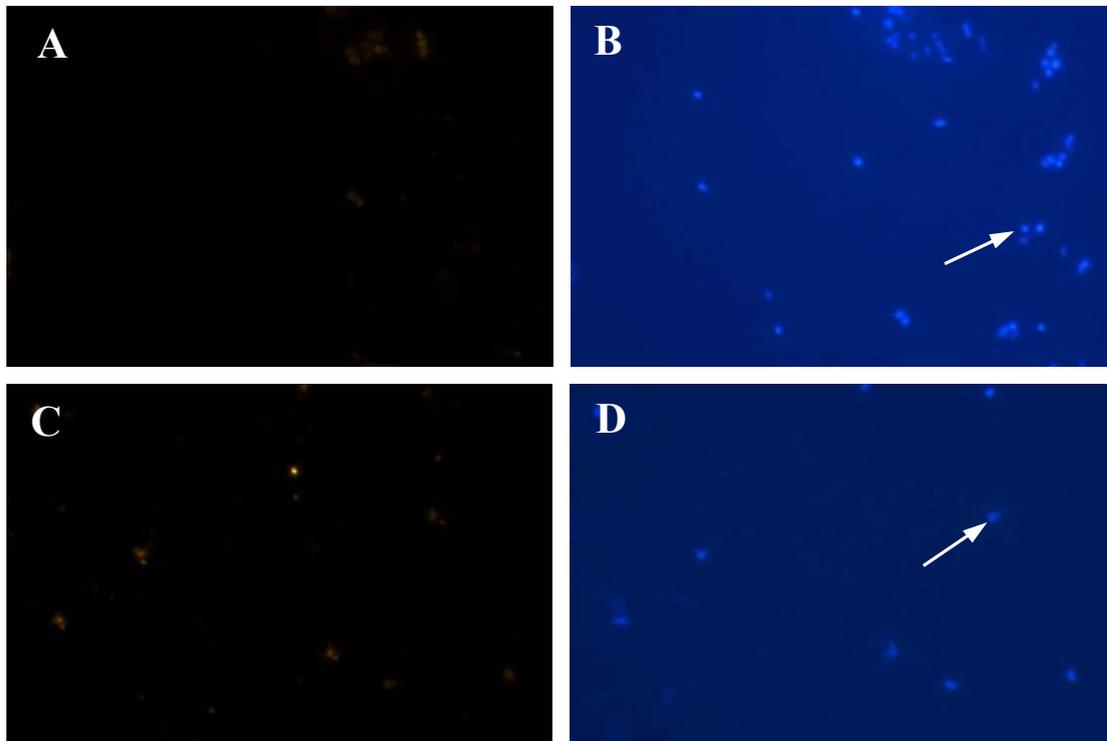


**Abbildung 2: Immunfluoreszenzmikroskopische Bilder von *B. cepacia*.** Es konnten 101 von 102 der untersuchten *B.cepacia*-Stämme mit dem BC408-Antiserum mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie identifiziert werden. Die Reaktion des BC408-Antiserums mit *B. cepacia* wurde mit einem fluoreszenzmarkierten spezifischen 2. Antikörper (CY3-konjugierter Antikörper gegen Kaninchen-IgG) nachgewiesen. Positive Reaktion des BC408-Antiserums mit *B. cepacia*-Stäbchen (A, weißer Pfeil), keine Reaktion des BC408-Antiserums mit *B. cepacia* Stäbchen des Stammes R 14497 (C). Zur Bakterienlokalisation wurde eine DNA-Färbung mit DAPI durchgeführt (B+D, weiße Pfeile).

### 3.3.1.2 Kontrollexperimente

Um zu zeigen, dass der 2. Antikörper (CY3-konjugierter Antikörper gegen Kaninchen-IgG) spezifisch an das BC408-Antiserum bindet, wurde in einem Kontrollversuch mit *B. cepacia*-Stamm IST 408 die indirekte Immunfluoreszenz ohne BC-408-Antiserum durchgeführt. Die Kontrolle verhielt sich immunfluoreszenzmikroskopisch negativ (Abbildung 3A+B). Damit hatte der 2. Antikörper spezifisch an das BC408-Antiserum gebunden. Darüber hinaus wurden, um zu testen, ob das BC408-Antiserums spezifisch *B. cepacia* identifiziert, verschiedene *S. aureus*-, *S. pneumoniae*- und *P. aeruginosa*-Stämme (siehe Tabelle 1: Nr.118-147) auf ihre Reaktion mit dem BC408-Antiserum

untersucht. Mittels indirekter Immunfluoreszenz konnte nachgewiesen werden, dass das BC408-Antiserum mit keinem der untersuchten Kontroll-Stämmen unspezifisch reagierte (Abbildung 3C+D).



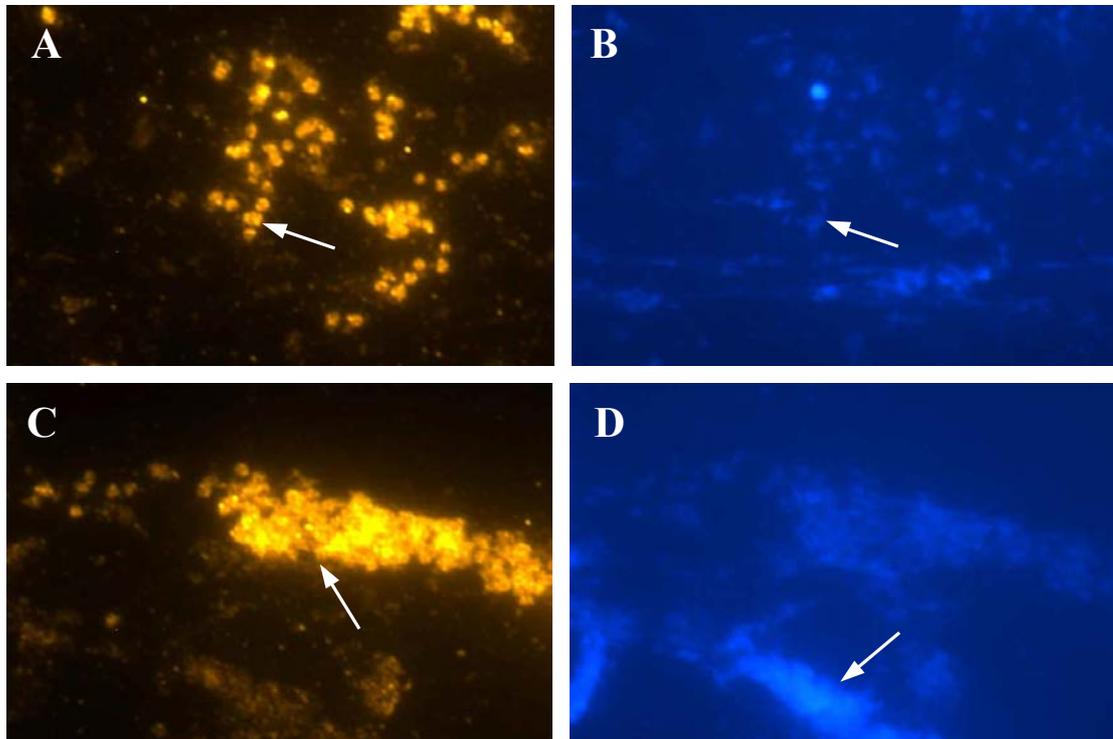
**Abbildung 3: Immunfluoreszenzmikroskopische Bilder der Kontrolleexperimente.** Der 2. Antikörper (CY3-Antikörper gegen Kaninchen-IgG) reagierte im Kontrollversuch ohne BC408-Antiserum mit *B. cepacia*-Stamm IST 408 nicht (A). Keine unspezifische Reaktion des BC408-Antiserums mit *P. aeruginosa*-Kontrolle PA 01 (C). Zur Lokalisation der Bakterien wurde mit DAPI markiert (B+D, weiße Pfeile).

Mit dem Nachweis, dass das BC408-Antiserum mit keinem der untersuchten *S. aureus*-, *S. pneumoniae*- und *P. aeruginosa*-Stämme reagierte, konnte ein weiterer Beweis dafür erbracht werden, dass das BC-408-Antiserum in der Lage ist, *B. cepacia* spezifisch zu identifizieren.

### 3.3.1.3 *B. cepacia*-Sputum

Um zu zeigen, dass es mit Hilfe des BC408-Antiserums möglich ist, *B. cepacia* im Sputum von CF-Patienten nachzuweisen, wurde das *B. cepacia*-positive Sputum eines 14-jährigen männlichen CF-Patienten untersucht. Mittels indirekter Immunfluoreszenz

konnten Mikrokolonien (Abbildung 4C) und einzelne *B. cepacia*-Stäbchen (Abbildung 4A) im Sputum markiert werden.



**Abbildung 4: Immunfluoreszenzmikroskopische Bilder von *B. cepacia* im Sputum eines CF-Patienten.** Durch das BC408-Antiserum wurden sowohl einzelne *B. cepacia*-Stäbchen (weißer Pfeil in A (CY3) und B (DAPI-Färbung)) als auch Mikrokolonien (Pfeil in C) von *B. cepacia* nachgewiesen. In der DAPI-Markierung waren, aufgrund der freigesetzten DNA aus zerstörten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, weite Bereiche positiv gefärbt (Pfeil in D), die durch das BC408-Antiserum jedoch nicht unspezifisch markiert wurden (C).

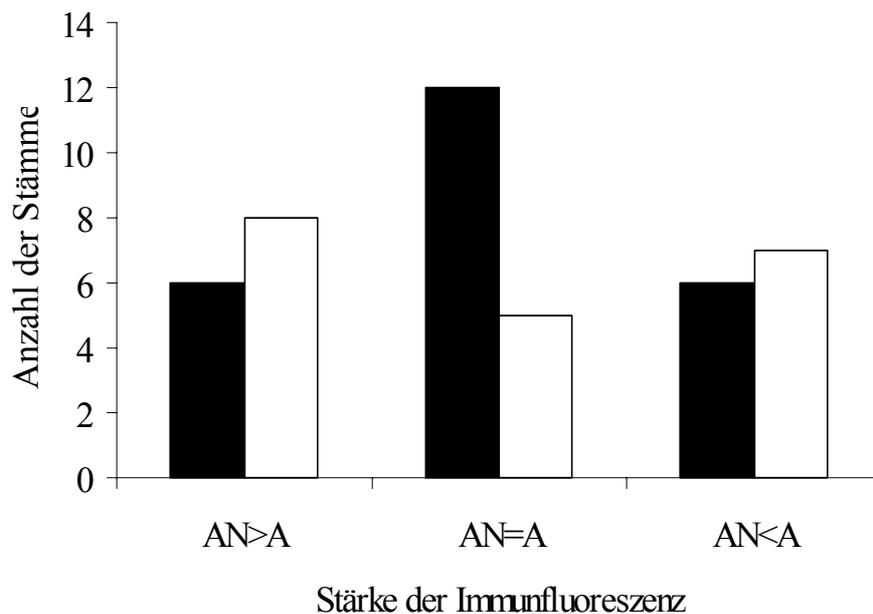
Während in der zur Kontrolle durchgeführten DAPI-Markierung das Sputum aufgrund der freigesetzten DNA aus den polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) komplett positiv reagierte (Abbildung 4D), waren unter der EPS-Markierung mit dem BC408-Antiserum nur Bakterien positiv gefärbt (Abbildung 4C, weißer Pfeil). Die geringen Hintergrundsignale der EPS-Markierung (Abbildung 4) weisen darauf hin, dass das BC408-Antiserum nahezu keine unspezifischen Bindungen mit den verschiedenen Bestandteilen des Sputums eingegangen war. Das BC408-Antiserum ist damit in der Lage, *B. cepacia* im Sputum eines CF-Patienten zu identifizieren.

### **3.3.2 Bakterienidentifikation mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung**

Die FISH-Methode ist ein immunfluoreszenzmikroskopisches Verfahren, das es ermöglicht, in einer vom BC408-Antiserum unabhängigen Methode *B. cepacia* nachzuweisen. Die untersuchten *B. cepacia*-Stämme (IST 401, IST 408, ATCC 17765, ATCC 17616 und ATCC 25416) reagierten in der indirekten Immunfluoreszenz mit der Oligonukleotidsonde Bce 141 schwach positiv. Die *Pseudomonas*-Kontrolle PA 01 wurde durch die Oligonukleotidsonde Bce 141 nicht markiert. Aufgrund der schwachen Immunfluoreszenz-Signale, die sich auf gedrucktem Papier nicht darstellen lassen, wurde auf die Abbildung der Immunfluoreszenz-Bilder in dieser Arbeit verzichtet. Da die Sonde mit allen untersuchten *B. cepacia*-Stämmen und nicht mit der Kontrolle PA 01 reagierte, scheint es möglich zu sein, *B. cepacia* mittels FISH zu identifizieren.

### **3.4 Untersuchung der Stärke der Reaktion des BC408-Antiserums von invasiven und nicht-invasiven *B. cepacia*-Stämmen mittels indirekter Immunfluoreszenz**

Es wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz die Stärke der Reaktion des BC408-Antiserums mit 24 invasiven und 20 nicht-invasiven *B. cepacia*-Stämmen untersucht (Tabelle 5). Beim Vergleich der Stärke der Immunfluoreszenz-Signale von aerob und anaerob gewachsenen Bakterien zeigte sich, dass sich diese insgesamt sehr heterogen und unabhängig der Genomvarzugehörigkeit der *B. cepacia*-Stämme verhielten (Tabelle 5). Bei 14 von 44 Stämmen (31,8%) waren anaerob im Vergleich zu aerob die Immunfluoreszenz-Signale stärker (Abbildung 6A+B), davon waren 6 invasiv (42,9%) und die restlichen 8 Stämme nicht-invasiv (57,1%) (Abbildung 5). 17 von 44 Stämmen (38,6%) wiesen optisch keinen Unterschied in der Stärke ihrer Immunfluoreszenz unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen auf (Abbildung 6C+D), wobei davon 12 invasiv (70,6) und 5 nicht-invasiv (29,4) waren (Abbildung 5). Schließlich wiesen 13 der 44 Stämme (29,5%) anaerob schwächere Immunfluoreszenz-Signale als aerob auf (Abbildung 6E+F), dabei waren 6 Stämme invasiv (46,2%) und 7 nicht-invasiv (53,8%) (Abbildungen 5). Alle Unterschiede waren jedoch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Damit besteht kein Zusammenhang zwischen der Stärke der Immunfluoreszenz-Signale und der Invasivität der *B. cepacia*-Stämme.



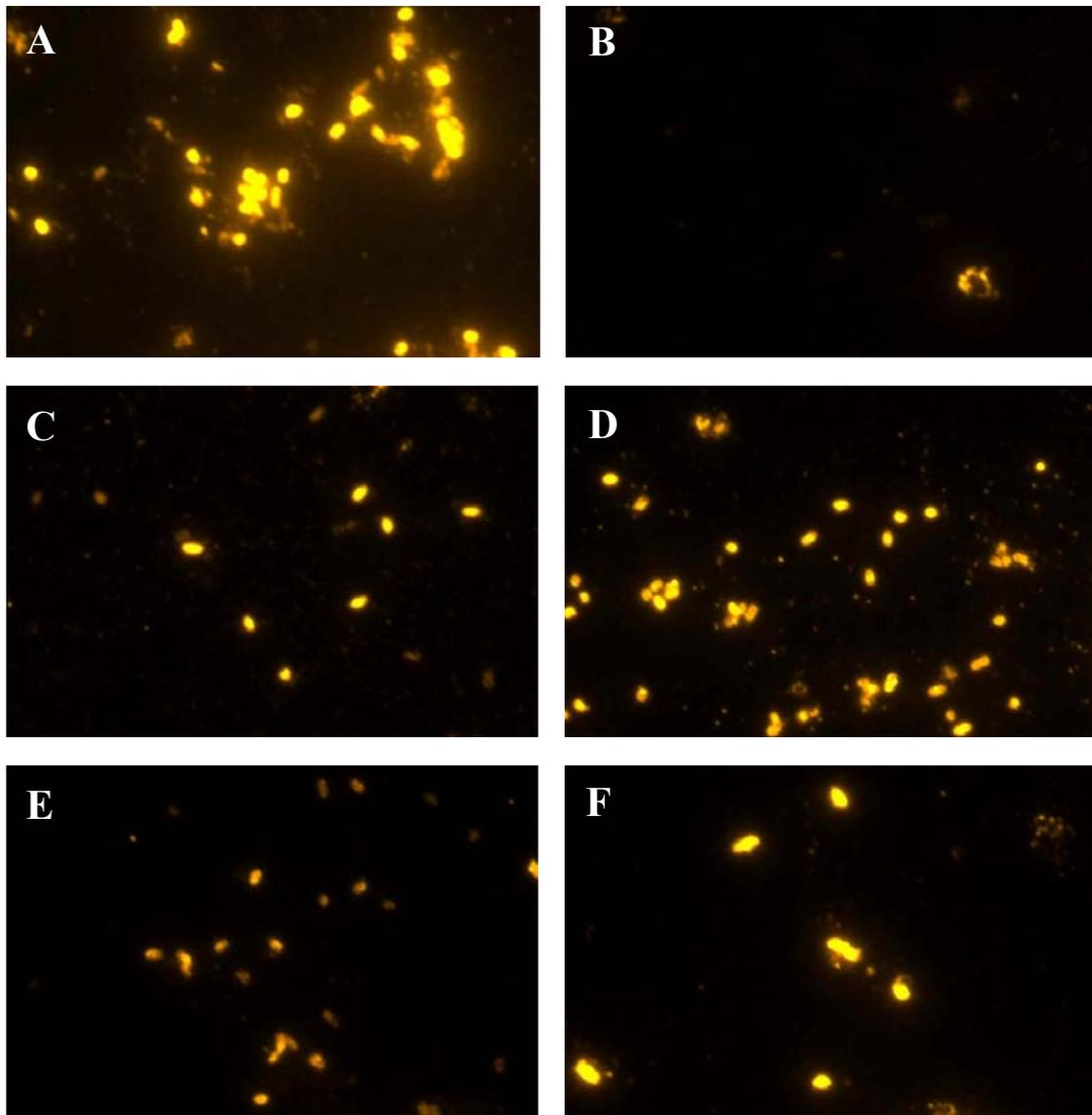
**Abbildung 5: Stärke der Immunfluoreszenz-Signale unter anaeroben (AN) und aeroben (A) Wachstumsbedingungen bei den 24 invasiven (schwarz) und 20 nicht-invasiven (weiß) *B. cepacia*-Stämmen.** Anaerob stärkeres Fluoreszenzsignal als aerob (AN>A), anaerob gleichstarkes Signal wie aerob (AN=A), anaerob schwächeres Signal als aerob (AN<A). Alle Unterschiede waren nicht signifikant ( $p>0,05$ ).

**Tabelle 5: Stärke der Immunfluoreszenz unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen von 24 invasiven und 20 nicht-invasiven *B. cepacia*-Stämmen unter Berücksichtigung der Genomovare**

| Nr. | Stamm     | Genomovar | Invasivität/<br>Literaturreferenz | Stärke der Immunfluoreszenz |
|-----|-----------|-----------|-----------------------------------|-----------------------------|
| 1.  | LMG 18821 | I         | invasiv [72]                      | AN < A                      |
| 2.  | LMG 17567 | II        | nicht-invasiv                     | AN < A                      |
| 3.  | R-18189   | II        | nicht-invasiv [58]                | AN < A                      |
| 4.  | LMG 16660 | II        | invasiv [72, 129]                 | AN < A                      |
| 5.  | LMG 18825 | II        | invasiv [72, 82]                  | AN < A                      |
| 6.  | LMG 18822 | II        | nicht-invasiv [72, 111]           | AN < A                      |
| 7.  | R-15925   | II        | nicht-invasiv                     | AN < A                      |
| 8.  | R-13130   | III       | invasiv                           | AN < A                      |
| 9.  | LMG 18829 | III       | invasiv [66, 72]                  | AN < A                      |
| 10. | LMG 16659 | III       | invasiv [72, 106]                 | AN < A                      |
| 11. | R-10965   | III       | nicht-invasiv [111]               | AN < A                      |
| 12. | R-6116    | III       | nicht-invasiv [111]               | AN < A                      |

| Nr. | Stamm     | Genomovar | Invasivität/<br>Literaturreferenz | Stärke der Immunfluoreszenz |
|-----|-----------|-----------|-----------------------------------|-----------------------------|
| 13. | R-5143    | V         | nicht-invasiv                     | AN < A                      |
| 14. | R-14500   | II        | invasiv [102]                     | AN = A                      |
| 15. | R-12964   | II        | invasiv                           | AN = A                      |
| 16. | R-13075   | II        | invasiv [102]                     | AN = A                      |
| 17. | R-1451    | II        | nicht-invasiv [111]               | AN = A                      |
| 18. | R-10269   | III       | invasiv [26]                      | AN = A                      |
| 19. | LMG 13013 | III       | invasiv [26]                      | AN = A                      |
| 20. | R-14086   | III       | invasiv                           | AN = A                      |
| 21. | LMG 18828 | III       | invasiv [71, 72, 111]             | AN = A                      |
| 22. | LMG 18830 | III       | invasiv [71, 72]                  | AN = A                      |
| 23. | LMG 16658 | III       | invasiv                           | AN = A                      |
| 24. | LMG 16654 | III       | invasiv [33, 72]                  | AN = A                      |
| 25. | R-1445    | III       | nicht-invasiv [111]               | AN = A                      |
| 26. | R-1449    | III       | nicht-invasiv[111]                | AN = A                      |
| 27. | LMG 16656 | III       | invasiv [34, 72]                  | AN = A                      |
| 28. | LMG 14939 | III       | nicht-invasiv [26]                | AN = A                      |
| 29. | LMG 14294 | IV        | nicht-invasiv [26]                | AN = A                      |
| 30. | LMG 18944 | VI        | invasiv [65]                      | AN = A                      |
| 31. | R-13052   | II        | invasiv [26]                      | AN > A                      |
| 32. | LMG 16775 | II        | nicht-invasiv                     | AN > A                      |
| 33. | R-1446    | II        | nicht-invasiv [111]               | AN > A                      |
| 34. | R-6292    | II        | nicht-invasiv                     | AN > A                      |
| 35. | R-731     | II        | nicht-invasiv [111]               | AN > A                      |
| 36. | R-922     | III       | nicht-invasiv [58]                | AN > A                      |
| 37. | R-1471    | III       | invasiv [71, 111]                 | AN > A                      |
| 38. | R-15291   | III       | invasiv                           | AN > A                      |
| 39. | R-4194    | III       | invasiv                           | AN > A                      |
| 40. | R-9932    | III       | invasiv                           | AN > A                      |
| 41. | R-1448    | III       | nicht-invasiv [111]               | AN > A                      |
| 42. | R-655     | III       | nicht-invasiv [111]               | AN > A                      |
| 43. | R-9504    | III       | nicht-invasiv                     | AN > A                      |
| 44. | R-15274   | V         | invasiv                           | AN > A                      |

**Die untersuchten 44 invasiven und nicht-invasiven *B. cepacia*-Stämme verhielten sich unter anaeroben Wachstumsbedingungen in der Stärke ihrer Immunfluoreszenz-Signale sehr unterschiedlich.** Die Immunfluoreszenz-Signale der verschiedenen *B. cepacia*-Stämme waren anaerob entweder stärker (AN>A) oder gleichstark (AN=A) oder schwächer (AN<A) als aerob.

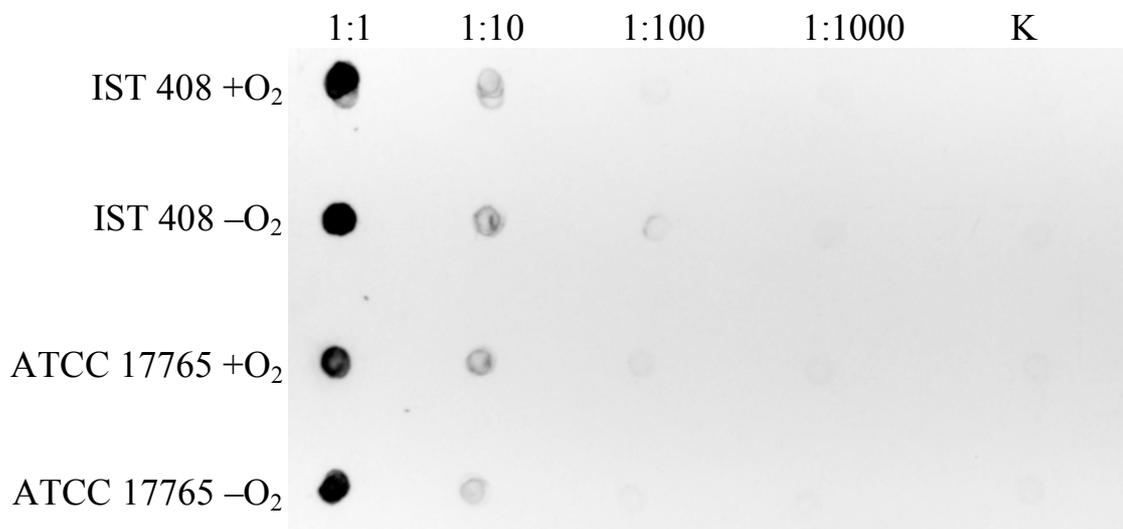


**Abbildung 6: Immunfluoreszenzmikroskopische Bilder von *B. cepacia*.** Einfluss von anaeroben (links) und aeroben (rechts) Wachstumsbedingungen auf die Reaktion des BC408-Antiserums mit *B. cepacia*. Die untersuchten Stämme verhielten sich in der Stärke ihrer Immunfluoreszenz-Signale sehr heterogen: anaerob stärkeres Fluoreszenzsignal als aerob (A+B), anaerob gleichstarkes Signal wie aerob (C+D), anaerob schwächeres Signal als aerob (E+F). Es war kein Zusammenhang zwischen der Stärke der Immunfluoreszenz-Signale und dem Invasionsverhalten der *B. cepacia*-Stämme nachweisbar ( $p > 0,05$ ).

### 3.5 Quantitative EPS-Bestimmung

#### 3.5.1 Semiquantitative Untersuchung der Stärke der Reaktion des BC408-Antiserums mit *B. cepacia* mittels Dot blot

Unter der Annahme, dass das BC408-Antiserum spezifisch mit *B. cepacia*-EPS reagiert, wurde versucht, die EPS-Produktion unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen semiquantitativ zu ermitteln. Der Versuch wurde mit den Stämmen IST 408 und ATCC 17765 durchgeführt.



**Abbildung 7: Dot blot zur semiquantitativen EPS-Bestimmung.** Reaktion des BC408-Antiserums mit den Überständen anaerober und aerober Flüssigkulturen verschiedener *B. cepacia*-Stämme zur semiquantitativen Bestimmung der enthaltenen EPS-Mengen. Die Stämme IST 408 und ATCC 17765 wurden anaerob (-O<sub>2</sub>) 5 Tage und aerob (+O<sub>2</sub>) einen Tag in S-Medium angezüchtet. Nach Zentrifugation der Flüssigkulturen wurden die unverdünnten Überstände (1:1) und Verdünnungen im Verhältnis von 1:10, 1:100 und 1:1000 auf den blot aufgetragen. Aufgrund der geringen Intensitätsunterschiede der Signale zwischen anaerobem und aerobem Ansatz konnte keine semiquantitative Aussage über die EPS-Menge gemacht werden. Die Kontrolle (K) mit S-Medium reagierte negativ.

Es zeigte sich eine starke Reaktion des BC408-Antiserums mit den unverdünnten Überständen der Flüssigkulturen der beiden Stämme. Beim optischen Vergleich der Schwärzung zwischen aerobem und anaerobem Ansatz konnte bei IST 408 kein Unterschied festgestellt werden. Der aerobe Ansatz bei ATCC 17765 zeigte eine geringfügig schwächere Schwärzung als der anaerobe Ansatz. Beim ersten Verdünnungsschritt des Überstandes im Verhältnis von 1:10 konnte im Gegensatz zum

unverdünnten Ansatz bei beiden Stämmen sowohl aerob als auch anaerob ein deutlich schwächeres Signal nachgewiesen werden. Die schwachen Schwärzungen des ersten Verdünnungsschrittes unterschieden sich sowohl bei IST 408 als auch bei ATCC 17765 im aeroben und anaeroben Ansatz nicht in ihrer Intensität. Bei allen weiteren Verdünnungsstufen (im Verhältnis von 1:100 und 1:1000) waren keine Schwärzungen mehr nachweisbar. Der Kontrollspot mit S-Medium reagierte mit dem BC408-Antiserum nicht (Abbildung 7). Die Methode scheint nur bedingt zur Quantifikation der EPS geeignet zu sein. Durch die Verdünnungsschritte konnten nur Unterschiede in der EPS-Produktion detektiert werden, die das 10-, 100- oder 1000-fache des unverdünnten Ansatzes betragen. Da schon bei einer Verdünnung im Verhältnis von 1:10 kaum mehr ein Signal sichtbar war, konnte davon ausgegangen werden, dass die Unterschiede in der EPS-Produktion zwischen aerobem und anaerobem Wachstum unter dem 10-fachen lagen.

### **3.5.2 Biochemische EPS-Quantifizierung**

Da es weder mit der indirekten Immunfluoreszenz noch mit dem Dot blot möglich war, die EPS-Produktion unter anaeroben Wachstumsbedingungen von *B. cepacia* exakt zu quantifizieren, wurde mit der biochemischen Methode nach Blumenkrantz *et al.* versucht, die EPS-Menge zu bestimmen. Die photometrischen Messungen ergaben jedoch bei den untersuchten *B. cepacia*-Stämmen (IST 401, IST 408, ATCC 17765, ATCC 17616 und ATCC 25416) trotz Mehrfachbestimmungen keine realistischen Werte, da die gemessenen Plattenleerwerte höhere Extinktionen als die bewachsenen Platten aufwiesen. Die mehrfachbestimmten Werte verhielten sich innerhalb einer Messreihe konstant, so dass der Test an sich stabil zu sein schien. Um unspezifische Reaktionen des Blumenkrantz-Tests mit den Bestandteilen des S-Mediums auszuschließen, wurden die einzelnen Bestandteile des S-Mediums mit dem Blumenkrantz-Test getestet. Es stellte sich heraus, dass nicht nur Glucose, die im Versuch durch Dialyse aus den Proben entfernt wurde, sondern auch das Bacto™ Yeast Extract positiv im Blumenkrantz-Test reagierten. Da die Substanzen nicht mit Sicherheit aus den Proben zu eliminieren waren, wurden keine weiteren Versuche mit dem Blumenkrantz-Test durchgeführt. Auf eine Darstellung der Messergebnisse wurde

verzichtet. Die Ergebnisse des Pierce-Assays zu Proteinbestimmung waren somit auch bedeutungslos und sind nicht abgebildet.

## 4 DISKUSSION

Neben *P. aeruginosa* und *S. aureus* ist *B. cepacia* ein weiterer wichtiger pathogener Erreger, der durch den genetisch bedingten Defekt bei CF zur chronischen Lungeninfektion mit Zerstörung des Lungenparenchyms führt [24, 68]. Die Infektion mit diesem multiresistenten Organismus [88] stellt für CF-Patienten eine ernstzunehmende Bedrohung dar, da es neben einem chronischen Infektionsverlauf in 20% der Fälle zu einer akuten Infektion mit Sepsis (*B. cepacia*-Syndrom) kommt, an der die Patienten innerhalb kurzer Zeit versterben [54]. Aufgrund des endemieartigen Auftretens vor allem in Nordamerika und Großbritannien mit Infektionsraten von mehr als 40% [57] zogen einige CF-Zentren daraus die Konsequenz, *B. cepacia*-positive Patienten zu isolieren. Obwohl aus diesen schwerwiegenden Tatsachen eine zuverlässige und klinisch schnell zu stellende Diagnose für die betroffenen CF-Patienten unabdingbar erscheint, konnte *B. cepacia* durch seine geno- und phänotypische Vielfalt bisher nur mittels umfangreicher molekulargenetischer Methoden sicher identifiziert und phylogenetisch seinen Genomovaren zugeordnet werden.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit ein Antiserum, das aus gereinigtem EPS des *B. cepacia*-Stammes IST 408 hergestellt wurde (BC408-Antiserum), auf seine Spezifität hin getestet, *B. cepacia* zu identifizieren. Aufgrund neuerer Untersuchungen, die zeigten, dass *P. aeruginosa* und *S. aureus* auf das anaerobe Milieu im ASL von CF-Lungen mit einer erhöhten Alginate [131] bzw. PIA-Produktion reagieren [23] und damit zur chronischen Lungeninfektion bei CF führen, wurde darüber hinaus die Stärke der Reaktion des BC408-Antiserums mittels indirekter Immunfluoreszenz bei 24 invasiven und 20 nicht-invasiven *B. cepacia*-Stämmen unter anaeroben und aeroben Wachstumsbedingungen untersucht. Dabei wurde gleichzeitig der Zusammenhang zwischen den phänotypischen Veränderungen der *B. cepacia*-Stämme unter anaeroben Wachstumsbedingungen *in vitro* und ihrem Invasionsverhalten, das aufgrund von Literaturangaben definiert wurde, überprüft.

Obwohl zahlreiche Methoden existieren, um *B. cepacia* zu identifizieren, gibt es bislang kein geeignetes Verfahren, um in mikrobiologischen Routinelabors eine *B. cepacia*-

Infektion klinisch schnell und zuverlässig zu stellen [19]. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass es bei phänotypischen Bestimmungsverfahren wie Selektivmedien, biochemischen Analyseverfahren oder kommerziellen Testverfahren häufig zu Missidentifikationen kommt [41, 60, 80, 104, 121]. Obwohl deshalb eine Vielzahl von molekulargenetischen Methoden entwickelt wurde, ist es bisher notwendig, die unterschiedlichen Verfahren zu kombinieren [19], um andere zur *Burkholderia spp.* gehörende Bakterien, wie zum Beispiel *B. gladioli*, von den Mitgliedern des *B. cepacia* Komplexes eindeutig unterscheiden zu können. Sogar eine Methode wie der AFLP-Fingerabdruck, der auf eine Vielzahl von Organismen angewendet werden kann und der ein hohes Differenzierungsvermögen und eine hohe Reproduzierbarkeit besitzt [52, 55, 89, 98], kann nicht alle Mitglieder des *B. cepacia*-Komplexes eindeutig identifizieren [16, 17, 18] und stellt zudem ein äußerst zeitaufwendiges und kostenintensives Verfahren dar [85]. Andere auf PCR basierende Methoden, die auf einer Sequenzanalyse der 16S oder 23S DNA bzw. der 16S RNA beruhen [4, 64, 128], sind verhältnismäßig einfacher in der Durchführung, verlangen aber einiges an Erfahrungspotential bei der Auswertung der Ergebnisse und können aufgrund der geringen Variation im rRNA-Operon nicht alle Mitglieder des *B. cepacia*-Komplexes voneinander unterscheiden. Deshalb wurde von Mahenthalingam *et al.* ein Identifikationsverfahren entwickelt, das auf der Sequenzanalyse des *recA*-Gens beruht und damit ein höheres Differenzierungsvermögen besitzt. Viele dieser Nachweisverfahren mittels PCR wurden jedoch vor der Entdeckung der Vielfältigkeit des *B. cepacia*-Komplexes etabliert, so dass manche PCR-Primer nicht zu Verfügung stehen [19, 72]. Andere Verfahren, die über unterschiedliche Protein- oder Fettsäureprofile in der Gelelektrophorese versuchen, *B. cepacia* zu charakterisieren, sind einfach in der Durchführung und können auf eine Vielzahl von Organismen angewendet werden. Es wurden jedoch auch hier Missidentifikationen beschrieben [123, 124].

Aufgrund der bereits genannten gesellschaftlichen Konsequenzen [37, 126] und des individuellen Risikos einer *B. cepacia*-Infektion für CF-Patienten [54] ist es erwünschenswert, ein günstiges und schnelles Nachweisverfahren für *B. cepacia* zu entwickeln. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz gezeigt, dass das BC408-Antiserum in der Lage war, 101 von 102 untersuchten *B. cepacia*-Stämmen, die sich aus einer repräsentativen Anzahl von Vertretern aller

bisher identifizierten Genomovare (I-X, X mündliche Information von Prof. Dr. Peter Vandamme) zusammensetzen, nachzuweisen. Nur ein einzelner Stamm des Genomovars IX (R-14497) konnte vom BC408-Antiserum nicht markiert werden. Da jedoch alle weiteren sieben untersuchten Stämme des Genomovars IX mit dem BC408-Antiserum reagierten, liegt der Verdacht nahe, dass es sich bei dem Stamm R-14497 eventuell nicht um ein Mitglied des *B. cepacia*-Komplexes handelt. Diese Vermutung sollte mit Hilfe molekulargenetischer Methoden erneut überprüft werden. Mit den Ergebnissen der Kontrollexperimente, die an verschiedenen *S. aureus*-, *S. pneumoniae*- und *P. aeruginosa*-Stämmen durchgeführt wurden und in denen das BC-408-Antiserum mit keinem dieser Stämme positiv reagierte, konnte demonstriert werden, dass das BC408-Antiserum in der Lage ist, *B. cepacia* von diesen Spezies zu differenzieren. Die Beobachtung, dass bei der Untersuchung der 102 Stämme mittels indirekter Immunfluoreszenz häufig nicht alle im Blickfeld unter DAPI markierten Bakterien auch durch das BC408-Antiserum dargestellt werden konnten, ist ein Hinweis dafür, dass das BC408-Antiserum spezifisch *B. cepacia*-Stäbchen markiert. Ein weiterer Beweis für die Spezifität des BC408-Antiserums für *B. cepacia* wurde durch die immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung des *B. cepacia*-Sputums eines CF-Patienten erbracht, bei dem einzelne *B. cepacia*-Stäbchen und *B. cepacia*-Mikrokolonien dargestellt wurden, ohne dass dabei das BC408-Antiserum mit anderen zahlreich vorhandene Strukturen im Sputum reagierte. Um allerdings sicher zu beweisen, dass es sich bei den markierten Bakterien um *B. cepacia* handelt, müsste neben der Markierung durch das BC408-Antiserum in einer Doppelfärbung eine zweite unabhängige Färbung von *B. cepacia*-DNA, zum Beispiel mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) [44], erfolgen.

Es wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit fünf molekulargenetisch typisierte *B. cepacia*-Stämme mittels FISH untersucht. Die positiven Fluoreszenz-Signale der hybridisierten *B. cepacia*-Bakterien waren allgemein relativ schwach. Der Kontrollversuch mit *P. aeruginosa* PA 01 war deutlich negativ. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die fünf untersuchten *B. cepacia*-Stämme mittels FISH identifiziert werden konnten. Auf die Abbildung der Ergebnisse wurde allerdings verzichtet, da sich die schwachen Fluoreszenz-Signale auf einem Papierausdruck nicht darstellen ließen. Die Ergebnisse der FISH entsprechen denen einer Studie von Hogardt *et al.*, in der

*B. cepacia* mittels FISH in CF-Sputa identifiziert, jedoch von schwachen Fluoreszenz-Signalen der hybridisierten Bakterien berichtet wurde [44]. Allerdings wurden die Ergebnisse von Hogardt *et al.* nicht mittels molekulargenetischer Methoden weiter verifiziert. Darüber hinaus berichten Hogardt *et al.*, dass es aufgrund der hohen Viskosität der Sputa und der Bildung von dichten Bakterien-Clustern nicht möglich war, die im Sputum vorhandene Zellzahl von *B. cepacia*-Bakterien mit FISH genau zu bestimmen [44]. Da FISH auf der Hybridisierung von Bakterien-DNA mit spezifischen Oligonukleotid-Sonden basiert, könnte sich für die Bakterienidentifikation mittels FISH ein zum Nachweisverfahren von *B. cepacia* mittels PCR analoges Problem ergeben [19], da aufgrund neuerer phylogenetischer Erkenntnisse über den *B. cepacia*-Komplex die Sonden entweder veraltet oder für kürzlich entdeckte *B. cepacia* noch nicht zu Verfügung stehen.

Zusammenfassend ist das untersuchte BC408-Antiserum in der Lage, zahlreiche molekulargenetisch typisierte und in Reinkultur vorliegende *B. cepacia*-Stämme aller bisher bekannten Genomovare zu identifizieren. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse darauf hin, dass das BC408-Antiserum *B. cepacia* auch im Sputum von CF-Patienten detektieren kann. Um jedoch das BC408-Antiserum als ein schnelles und sicheres Verfahren zur Detektion von *B. cepacia* zu etablieren, sind noch eine Anzahl von Versuchen notwendig. So müssen weitere Bakterienfamilien und Vertreter der *Burkholderia spp.* auf unspezifische Reaktionen mit dem BC408-Antiserum getestet werden. Außerdem muss bei einer Reihe von *B. cepacia*-Sputa nachgewiesen werden, dass das BC408-Antiserum unter verschiedenen Voraussetzungen, wie zum Beispiel einer geringen Anzahl von *B. cepacia*-Bakterien im Sputum, einer hohen Viskosität des Sputums oder der Mehrfachbesiedelungen des Sputums durch andere pathogene Bakterien, in der Lage ist, *B. cepacia* sicher nachzuweisen.

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich aufgrund der Erkenntnisse über die Entstehung der chronischen Lungeninfektion bei CF durch *P. aeruginosa* [131] mit dem Einfluss von anaeroben Umweltbedingungen auf den Phänotyp von *B. cepacia*. Studien an *P. aeruginosa* zeigten, dass bewegliche *P. aeruginosa* nicht, wie zuvor angenommen, an das Respirationsepithel in CF-Lungen adhäreren [25], sondern sich an die Mucine der ASL anlagern, um dann in die ASL einzuwandern. Weiterhin wurde nachgewiesen,

dass aufgrund des nahezu anaeroben Milieus in der ASL von CF-Lungen *P. aeruginosa* seine phänotypische Erscheinung ändert, indem diese Bakterien auf den Stressfaktor Anaerobiosis mit einer stark erhöhten Alginateproduktion reagieren [131]. Auf diese Weise bilden sich in der ASL von CF-Lungen stationäre *P. aeruginosa* Makrokolonien, die durch den sie umgebenden EPS-Mantel vor der Wirkung der PMN und vor Antibiotika geschützt sind und zu einer chronischen Lungeninfektion bei CF führen [131]. Neben *P. aeruginosa* wurde auch bei *S. aureus* und *S. epidermidis* eine Induktion der PIA-Produktion unter anaeroben Wachstumsbedingungen beschrieben [23]. Da ebenso bei *B. cepacia* von einer EPS-Bildung [91] und Biofilmformation in vitro [14, 27, 48, 83] berichtet wird, vermutet man hierin einen Grund für persistierende *B. cepacia*-Lungeninfektionen.

Der Einfluss von anaeroben Wachstumsbedingungen auf die EPS-Produktion von *B. cepacia* wurde bislang noch nicht untersucht. Über welchen Mechanismus CF-Patienten im Falle einer Infektion mit *B. cepacia* nicht nur an chronischen, sondern auch an akuten Lungeninfektionen mit Bakteriämie erkranken [50], konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden [101]. Allerdings setzt eine akut ablaufende Lungeninfektion mit Bakteriämie ein invasives Verhalten von beweglichen Bakterien voraus. Es wurde in vitro nachgewiesen, dass verschiedene *B. cepacia*-Stämme über die Fähigkeit verfügen, menschliche Epithelzellen und Makrophagen zu penetrieren und in ihnen zu überleben [10, 59, 73, 95, 96]. Welchen Stellenwert dabei die einzelnen Virulenzfaktoren von *B. cepacia* besitzen, wurde bislang noch nicht eindeutig geklärt. Tomich *et al.* zeigten, dass die durch Flagella vermittelte Motilität einen Faktor darstellt, der dazu beiträgt, dass *B. cepacia* in das Respirationsepithel eindringen kann [117]. Da CF-Patienten von *B. cepacia*-Stämmen der Genomovare II [102] und III [67] besiedelt werden, wurde vor allem innerhalb dieser Genomovare nach spezifischen Virulenzeigenschaften, die das invasive Verhalten erklären sollten, gesucht. Allerdings konnte die Hypothese, dass Oberflächenpili, die nur bei Genomovar-III-Stämmen der ET12 Linie (Edinburgh-Toronto) exprimiert werden, für die Invasivität verantwortlich seien [97], widerlegt werden, indem Keig *et al.* in einer Studie an Respirationsepithel demonstrierten, dass Stämme der Genomovare II und III zwar insgesamt invasiver als Stämme der Genomovare I, IV, V sind, dieser Unterschied aber nicht an das Vorhandensein von Oberflächenpili gebunden ist [59]. Ein weiterer empirischer Grund,

der ebenfalls gegen die Hypothese der Oberflächenpili spricht, ist die Tatsache, dass eine Infektion durch *B. cepacia*-Stämme anderer Genomovare, die nicht über Oberflächenpili verfügen, auch zum *B. cepacia*-Syndrom führen kann [65]. Da jedoch eine Infektion mit einem hochvirulenten *B. cepacia*-Stamm nicht grundsätzlich mit einer Bakteriämie einhergeht, scheint der Verlauf einer *B. cepacia*-Infektion nicht nur von den Virulenzeigenschaften der Bakterien, sondern auch von der Immunkompetenz des jeweilig betroffenen Individuums abhängig zu sein [34, 123]. Schwab *et al.* untersuchten *in vitro* an hochdifferenziertem humanen Respirationsepithel den Zusammenhang von Invasionsverhalten verschiedener *B. cepacia*-Stämmen der Genomovare II, III, IV und ihrer Biofilmbildung [101]. Dabei stellten sie fest, dass alle Stämme in der Lage waren, das Respirationsepithel zu penetrieren, dabei aber unterschiedliche Wege, nämlich einen Biofilm-abhängigen und einen Biofilm-unabhängigen Weg, benutzten. So gelangte der *B. cepacia*-Stamm des Genomovars III in das Respirationsepithel, indem er durch den gebildeten Biofilm die oberflächliche Epithelschicht zerstörte. Im Gegensatz dazu wurde der Genomovar IV-Stamm, der keinen Biofilm ausbildete, zwischen und in den Zellen des Respirationsepithels gefunden, ohne dass er dabei die Integrität des Epithels beschädigte. Bei dem Stamm des Genomovars II konnten beide Invasionswege, der Biofilm-abhängige und der Biofilm-unabhängige, nachgewiesen werden [101]. Leider wurden diese Versuche jedoch nur an einem Vertreter des jeweiligen Genomovars und an Zellkulturen durchgeführt, so dass verallgemeinernde Aussagen über das Invasionsverhalten innerhalb eines Genomovars hier nur schwer getroffen werden können. Außerdem blieb der Einfluss von anaeroben Wachstumsbedingungen auf die Biofilmbildung unbeachtet.

Um neue Erkenntnisse über das phänotypische Verhalten von *B. cepacia* unter anaeroben Wachstumsbedingungen zu gewinnen, wurden in der vorliegenden Arbeit 24 invasive und 20 nicht-invasive *B. cepacia*-Stämme mit dem BC408-Antiserum, das aus gereinigtem EPS des *B. cepacia*-Stammes IST 408 hergestellt wurde, untersucht. Dabei sollte gleichzeitig geprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen den phänotypischen Veränderungen unter anaeroben Wachstumsbedingungen und der Invasivität von *B. cepacia* besteht. Die Einteilung der Stämme nach ihrer Invasivität wurde retrospektiv am Verlauf der Infektion bei einzelnen CF-Patienten getroffen, indem Stämme, die das sogenannte *B. cepacia*-Syndrom auslösten, als „invasiv“ und Stämme, deren Infektion

durch einen stabilen klinischen Verlauf gekennzeichnet war, als „nicht-invasiv“ charakterisiert wurden (Literaturangaben in Tabelle 1). Der Versuch wurde geblindet durchgeführt, das heißt erst nach Erhebung der Ergebnisse in der Immunfluoreszenz wurden die Angaben über die Invasivität der *B. cepacia*-Stämme von Prof. Dr. Peter Vandamme mitgeteilt. Unter der Annahme, dass das BC408-Antiserum spezifisch mit *B. cepacia*-EPS reagiert, sollte einerseits untersucht werden, ob bei nicht-invasiven *B. cepacia*-Stämmen die EPS-Produktion unter anaeroben Bedingungen analog zu *P. aeruginosa* [131] gesteigert wird, was ein Hinweis darauf wäre, dass diese Bakterien vermehrt in der Lage sind, Biofilm zu bilden und somit eine chronische Infektion zu unterhalten. Andererseits sollte überprüft werden, ob invasive *B. cepacia*-Stämme kein oder weniger EPS produzieren und damit auf diesem Weg eventuell eine akute *B. cepacia*-Infektion auslösen könnten, da die Bakterienmotilität in diesem Fall nicht durch EPS eingeschränkt wäre.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung konnte kein Zusammenhang zwischen der Stärke der Reaktion des BC408-Antiserums und der Invasivität der untersuchten *B. cepacia*-Stämmen festgestellt werden. Nur 8 der 20 nicht-invasiven Stämme wiesen unter anaeroben Wachstumsbedingungen ein stärkeres Immunfluoreszenz-Signal als aerob auf, wohingegen die Fluoreszenz-Signale der restlichen 16 nicht-invasiven *B. cepacia*-Stämme anaerob entweder gleichstark wie die aeroben oder aber schwächer waren. Ähnlich verhielt es sich mit den invasiven *B. cepacia*-Stämmen. So wurden bei allen invasiven *B. cepacia*-Stämmen sowohl im aeroben als auch im anaeroben Ansatz Fluoreszenz-Signale nachgewiesen. Dabei wurde bei 6 der insgesamt 24 invasiven *B. cepacia*-Stämme anaerob eine stärkeres Fluoreszenz-Signal als aerob festgestellt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Stärke der Reaktion des BC408-Antiserums unabhängig von der Genomvarzugehörigkeit der untersuchten *B. cepacia*-Stämme war. Unter der Annahme, dass das BC408-Antiserum spezifisch mit *B. cepacia*-EPS reagiert, würde das bedeuten, dass die EPS-Produktion bei nicht-invasiven *B. cepacia*-Stämmen im anaeroben Milieu nicht grundsätzlich induziert ist und sowohl invasive als auch nicht-invasive *B. cepacia*-Stämme unter anaeroben Wachstumsbedingungen in gleichem Maße EPS produzieren können.

Um die Spezifität des BC408-Antiserums gegen *B. cepacia*-EPS weiter zu verifizieren, wurden mittels Dot blot zahlreiche Substanzen auf ihre Reaktion mit dem BC408-Antiserum getestet. Es reagierten Alginate, Glucose, Albumin und PBS negativ, wohingegen eine Reihe von isolierten und gereinigten *B. cepacia*-EPS (EPS-BC408, EPS-BTS3, EPS-BTS5 und EPS-BTS13) mit dem BC408-Antiserum positiv reagierten. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass das BC408-Antiserum 101 *B. cepacia*-Stämme immunfluoreszenzmikroskopisch identifizierte, jedoch mit keinen der untersuchten *S. aureus*-, *S. pneumoniae*- und *P. aeruginosa*-Stämmen unspezifisch markierte. Ein weiterer Beweis dafür, dass das BC408-Antiserum spezifisch an Oberflächenepitope von *B. cepacia*-Stäbchen bindet, ist die Tatsache, dass sich in der indirekten Immunfluoreszenz nicht grundsätzlich alle Bakterien mit dem BC408-Antiserum positiv darstellten, so dass in mehreren Fällen mit dem Filter für die DAPI-Färbung im Blickfeld 100% blau-fluoreszierende *B. cepacia*-Stäbchen, gleichzeitig aber unter dem CY3-Filter für die Markierung mit dem BC408-Antiserum und unveränderten Einstellungen am Mikroskop weniger als 100% entsprechend gelb-fluoreszierende *B. cepacia*-Stäbchen zu beobachten waren. Im Rahmen der Herstellung des BC408-Antiserums (Prof. Dr. Jorge Leitão am Institut für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene in Tübingen, Deutschland) wurde nach der Aufreinigung des EPS-BC408 ein Limulus-Test auf LPS durchgeführt. Dieser ergab keine Aktivität für LPS. Obwohl damit zahlreiche Fakten für die Spezifität des BC408-Antiserums gegen *B. cepacia*-EPS sprechen, können unspezifische Reaktionen des BC408-Antiserums mit letzter Sicherheit nicht ausgeschlossen werden. Es ist bekannt, dass sich LPS stärker immunogen als EPS verhalten [134]. Daher könnten geringe Mengen von LPS unterhalb der Nachweisgrenze des Limulus-Tests durchaus zu Verunreinigungen des BC408-Antiserums geführt haben. Deshalb ist es notwendig, die Spezifität des BC408-Antiserums für EPS in Untersuchungen weiter zu überprüfen.

Da die Methode der indirekten Immunfluoreszenz keine exakten quantitativen Aussagen über die EPS-Synthese zulässt und nur semiquantitative Angaben über die optische Stärke der Fluoreszenz-Signale wie „schwächer“, „stärker“ oder „gleichstark“ gemacht werden konnten, wurde mit dem Blumenkranz-Test [6], einer vom BC408-Antiserum unabhängigen biochemischen Methode zur EPS-Quantifikation, versucht, die EPS-Produktion zu messen. Aufgrund von unspezifischen Reaktionen des Tests war es

jedoch nicht möglich, mit der Methode nach Blumenkrantz *et al.* die EPS-Menge zu quantifizieren. Auch der Dot blot erwies sich für die semiquantitative EPS-Bestimmung von *B. cepacia* als unzureichend sensitiv. Daher scheinen weitere Untersuchungen auch auf diesem Gebiet notwendig zu sein.

Der Einfluss anaerober Wachstumsbedingungen auf die Invasivität von *B. cepacia* konnte mit Hilfe des BC408-Antiserums nicht geklärt werden. Die Hypothese, dass eine verringerte EPS-Produktion von *B. cepacia* mit einer vermehrten Invasivität korreliert, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht verifiziert werden. Andere Faktoren, wie Defensine [88] oder Serinproteasen [28], können zusätzlich in das komplexe pathogenetische Geschehen eingebunden sein. Der Einfluss der Biofilmproduktion auf die Pathogenese der chronischen wie auch der akuten *B. cepacia*-Lungeninfektion bedarf weiterer Untersuchungen. Es wurde jedoch gezeigt, dass das BC408-Antiserum in der Lage ist, 101 *B. cepacia*-Stämme als auch *B. cepacia*-Bakterien in CF-Sputum zu identifizieren. Für die Etablierung des BC408-Antiserums als ein schnelles und kostengünstiges Nachweisverfahren für *B. cepacia* ist es unerlässlich, weitere Untersuchungen bezüglich seiner Spezifität durchzuführen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Der äußerst heterogene Organismus *Burkholderia cepacia* ist trotz zahlreicher zur Verfügung stehender Bestimmungsmethoden schwierig zu identifizieren. Bei Patienten mit Zystischer Fibrose (CF) führt *B. cepacia* neben einer chronischen auch zu einer akuten Lungeninfektion mit Bakteriämie. Es ist noch nicht geklärt, welchen Einfluss die Biofilmbildung bei *B. cepacia* im anaeroben Milieu des Oberflächenflüssigkeitsfilms in CF-Lungen auf den unterschiedlichen Infektionsverlauf bei CF-Patienten besitzt. Vor diesem Hintergrund wurden 102 *B. cepacia*-Stämme aller zehn Genomovare, darunter 20 nicht-invasive und 24 invasive *B. cepacia*-Stämme, unter anaeroben und aeroben Wachstumsbedingungen mit Hilfe eines aus *B. cepacia*-Exopolysaccharid gewonnenen Antiserums (BC408-Antiserum) immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Darüber hinaus wurde überprüft, ob das BC408-Antiserum in der Lage ist, *B. cepacia* im Sputum eines CF-Patienten zu detektieren. Das BC408-Antiserum konnte 101 der 102 *B. cepacia*-Stämme sowie Mikrokolonien im Sputum des CF-Patienten identifizieren. In analogen Untersuchungen mit *Staphylococcus aureus*-, *Streptococcus pneumoniae*- und *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen reagierte das BC408-Antiserum mit keinem der untersuchten Stämme. Bei 25% der invasiven *B. cepacia*-Stämme und bei 40% der nicht-invasiven *B. cepacia*-Stämme waren die Immunfluoreszenz-Signale anaerob stärker als aerob. Die heterogenen Ergebnisse der phänotypischen Untersuchung von invasiven und nicht-invasiven *B. cepacia*-Stämmen spiegeln somit die genotypische Vielfalt des *B. cepacia*-Komplexes wider. Aufgrund der hohen Spezifität des BC408-Antiserums stellt die indirekte Immunfluoreszenz ein schnelles und kostengünstiges Nachweisverfahren von *B. cepacia* dar.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abe M, Nakazawa T. The dsbB gene product is required for protease production by *Burkholderia cepacia*. *Infect Immun* 1996; 64: 4378-4380.
2. Allison DG, Goldsbrough MJ. Polysaccharide production in *Pseudomonas cepacia*. *J Basic Microbiol* 1994; 34: 3-10.
3. Anwar H, Strap JL, Costerton JW. Establishment of aging biofilms possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1347-1351.
4. Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Roller C. Discrimination of *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia vietnamiensis* from *Burkholderia cepacia* genomovars I, III, and IV by PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1335-1339.
5. Beckman W, Lessie TG. Response of *Pseudomonas cepacia* to  $\beta$ -lactam antibiotics: utilization of penicillin G as the carbon source. *J Bacteriol* 1979; 140: 1126-1128.
6. Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* 1973; 54: 484-489.
7. Bohnert J, Hübner B, Botzenhart K. Rapid identification of Enterobacteriaceae using a novel 23S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Int J Hyg Environ Health* 2000; 203: 77-82.
8. Boucher RC. Molecular insights into the physiology of the "thin film" of airway surface liquid. *J Physiol* 1999; 516: 631-638.
9. Burkholder WH. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopath* 1950; 40: 115-117.
10. Burns JL, Jonas M, Chi EY, Clark DK, Berger A, Griffith A. Invasion of respiratory epithelial cells by *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia*. *Infect Immun* 1996; 64: 4054-4059.
11. Cérantola S, Bournery J, Segonds C, Marty N, Montrozier H. Exopolysaccharide production by mucoid and non-mucoid strains of *Burkholderia cepacia*. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 185(2): 243-246.
12. Cérantola S, Lemassu-Jacquier A, Montrozier H. Structural elucidation of a novel exopolysaccharide produced by a mucoid clinical isolate of *Burkholderia cepacia*. Characterization of trisubstituted glucuronic acid in a heptasaccharide repeating unit. *Eur J Biochem* 1999; 260: 373-383.

13. Cescutti P, Bosco M, Picotti F, Impallomeni G, Leitão JH, Richau JA, Sá-Correia I. Structural study of the exopolysaccharide produced by a clinical isolate of *Burkholderia cepacia*. *Biochem Biophys Res Comm* 2000; 273: 1088-1094.
14. Chung JW, Altman E, Beveridge TJ, Speert DP. Colonial morphology of *Burkholderia cepacia* complex genomovar III: implications in exopolysaccharide production, pilus expression, and persistence in the mouse. *Infect Immun* 2003; 71: 904-909.
15. Coakley RD, Boucher RC. Regulation and functional significance of airway surface liquid pH. *JOP* 2001; 2: 294-300.
16. Coenye T, LiPuma JJ, Henry D, Hoste B, Vandemeulebroucke K, Gillis M, Speert DP, Vandamme P. *Burkholderia cepacia* genomovar VI, a new member of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 271-279.
17. Coenye T, Mahenthiralingam E, Henry D, LiPuma JJ, Laevens S, Gillis M, Speert DP, Vandamme P. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 1481-1490.
18. Coenye T, Schouls LM, Govan JRW, Kersters K, Vandamme P. Identification of *Burkholderia* species and genomovars from cystic fibrosis patients by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49: 1657-1666.
19. Coenye T, Vandamme P, Govan JRW, LiPuma JJ. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3427-3436.
20. Costerton JW, Lewandowski Z. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 711-745.
21. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-1322.
22. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* 1999; 67: 5427-5433.
23. Cramton SE, Ulrich M, Götz F, Döring G. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 2001; 69: 4079-4085.
24. Davis PB, Drumm M, Konstan MW. Cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1229-1256.
25. de Bentzmann S, Plotkowski C, Puchelle E. Receptors in the *Pseudomonas aeruginosa* adherence to injured and repairing airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 155-162.

26. De Boeck K, Malfroot A, Lauwers S, Van Schil L, Ursi J-P, Proesmans M, Van Eldere J, Lebecque P, Gigi J, Knoop C, Struelens M, Franckx H, Doherty C, Govan JRW, Doherty C, Laevens S, Vandamme P. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex colonization in Belgian cystic fibrosis patients largely differs from that in North-American patients. *J Cystic Fibrosis* (Submitted 05/02).
27. Desai M, Buhler T, Weller PH, Brown MR. Increasing resistance of planktonic and biofilm cultures of *Burkholderia cepacia* to ciprofloxacin and ceftazidime during exponential growth. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 153-160.
28. Döring G, Bellon G, Knight R. Immunology of cystic fibrosis. In: Hodson ME, Geddes D (eds). *Cystic fibrosis*. p 109-140, London: Arnold 2000.
29. Döring G, Jansen S, Noll H, Grupp H, Frank K, Botzenhart K, Magdorf K, Wahn U. Distribution and transmission of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in a hospital ward. *Pediatr Pulmonol* 1996; 21: 90-100.
30. Firoved AM, Boucher JC, Deretic V. Global genomic analysis of AlgU ( $\sigma^E$ )-dependent promoters (Sigmulon) in *Pseudomonas aeruginosa* and implications for inflammatory processes in cystic fibrosis. *J Bacteriol* 2002; 184: 1057-1064.
31. FitzSimmons SC. The changing epidemiology of cystic fibrosis. *J Pediatr* 1993; 122: 1-9.
32. Gillis M, Van TV, Bardin R, Goor M, Hebbar P, Willems A, Segers P, Kersters K, Heulin T, Fernandez MP. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int J Syst Bacteriol* 1995; 45: 274-289.
33. Glass S, Govan JRW. *Pseudomonas cepacia* - fatal pulmonary infection in a patient with cystic fibrosis. *J Infect* 1986; 13: 157-158.
34. Govan JRW, Brown PH, Maddison J, Doherty CJ, Nelson JW, Dodd M, Greening AP, Webb AK. Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet* 1993; 342: 15-19.
35. Govan JRW, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 1996; 60: 539-574.
36. Govan JRW, Hughes JE, Vandamme P. *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. *J Med Microbiol* 1996; 45: 395-407.
37. Govan JRW, Nelson JW. Microbiology of cystic fibrosis lung infections: themes and issues. *J R Soc Med* 1993; 86: 11-18.
38. Govan JRW, Nelson JW. Microbiology of lung infection in cystic fibrosis. *British Medical Bulletin* 1992; 48: 912-930.

39. Hassett DJ. Anaerobic production of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*: alginate restricts diffusion of oxygen. *J Bacteriol* 1996; 178: 7322-7325.
40. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Götz F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* 1996; 20: 1083-1091.
41. Henry DA, Mahenthiralingam E, Vandamme P, Coenye T, Speert DP. Biochemical and molecular approaches for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1073-1078.
42. Henry D, Campbell M, McGimpsey C, Clarke A, Loudon L, Burns JL, Roe MH, Vandamme P, Speert D. Comparison of isolation media for recovery of *Burkholderia cepacia* complex from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1004-1007.
43. Herbert S, Worlitzsch D, Dassy B, Boutonnier A, Fournier J-M, Bellon G, Dalhoff A, Döring G. Regulation of *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide type 5: CO<sub>2</sub> inhibition in vitro and in vivo. *J Infect Dis* 1997; 176: 431-438.
44. Hogardt M, Trebesius K, Geiger AM, Hornef M, Rosenecker J, Heesemann J. Specific and rapid detection by fluorescent in situ hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 818-825.
45. Høiby N, Fomsgaard A, Jensen E et al. The immune response to bacterial biofilms. In: Lappin-Scott HM, Costerton JW (eds). *An Introduction to Bacterial Biofilms*. p 233-250, Cambridge: Cambridge University Press 1995.
46. Høiby N. Understanding bacterial biofilms in patients with cystic fibrosis: current and innovative approaches to potential therapies. *J Cystic Fibrosis* 2002; 1: 249-254.
47. Holloway BW, Krishnapillai V, Morgan AF. Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol Rev* 1979; 43: 1118-1124.
48. Huber B, Riedel K, Hentzer M, Heydorn A, Gotschlich A, Givskov A, Molin S, Eberl L. The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* HIII controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* 2001; 147: 2517-2528.
49. Hughes JE, Stewart J, Barclay GR, Govan JRW. Priming of neutrophil respiratory burst activity by lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. *Infect Immun* 1997; 65: 4281-4287.
50. Hutchison ML, Govan JRW. Pathogenicity of microbes associated with cystic fibrosis. *Microbes Infect* 1999; 1: 1005-1014.

51. Hutchison ML, Poxton IR, Gowan JRW. *Burkholderia cepacia* produces a hemolysin that is capable of inducing degranulation and apoptosis of mammalian phagocytes. *Infect Immun* 1998; 66: 2033-2039.
52. Huys G, Coopman R, Janssen P, Kersters K. High-resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol* 1996; 46: 572-580.
53. Imundo L, Barasch J, Prince A, Al-Awqali Q. Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3019-3023.
54. Isles A, Maclusky I, Corey M, Gold R, Prober C, Fleming P, Levison H. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J Pediatr* 1984; 104: 206-210.
55. Janssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, Vos P, Zabeau M, Kersters K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* 1996; 142: 1881-1893.
56. Jayaraman S, Joo NS, Reitz B, Wine JJ, Verkman AS. Submucosal gland secretions in airways from cystic fibrosis patients have normal  $[Na^+]$  and pH but elevated viscosity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 8119-8123.
57. Johansen HK, Kovesi TA, Koch C, Corey M, Høiby N, Levison H. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* infection in cystic fibrosis patients treated in Toronto and Copenhagen. *Pediatr Pulmonol* 1998; 26: 89-96.
58. Karpati F, Giedraitis V, Thore M, Lindman R, Monstein HJ, Hjelte L, Jonasson J. Arbitrarily primed PCR and sequencing of 16S rDNA for epidemiological typing and species identification of *Burkholderia cepacia* isolates from Swedish patients with cystic fibrosis reveal genetic heterogeneity. *APMIS* 2001; 109: 389-400.
59. Keig PM, Ingham E, Kerr KG. Invasion of human type II pneumocytes by *Burkholderia cepacia*. *Microb Pathog* 2001; 30: 167-170.
60. Kiska DL, Kerr A, Jones MC, Caracciolo JA, Eskridge B, Jordan M, Miller S, Hughes D, King N, Gilligan P. Accuracy of four commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* and other gram-negative, nonfermenting bacilli recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 886-891.
61. Knowles MR, Robinson JM, Wood RE, Pue CA, Mentz WM, Wager GC, Gatzky JT, Boucher RC. Ion composition of airway surface liquid of patients with cystic fibrosis as compared with normal and disease-control subjects. *J Clin Invest* 1997; 100: 2588-2595.
62. Koch C, Høiby N. Pathogenesis of cystic fibrosis. 1993 *Lancet*; 341: 1065-1069.

63. LiPuma JJ, Dasen SE, Nielson DW, Stern RC, Stull TL. Person-to-person transmission of *Pseudomonas cepacia* between patients with cystic fibrosis. *Lancet* 1990; 336: 1094-1096.
64. LiPuma JJ, Dulaney BJ, McMenamin DJ, Whitby PW, Stull TL, Coenye T, Vandamme P. Development of rRNA-based PCR assays for identification of *Burkholderia cepacia* complex isolates recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3167-3170.
65. LiPuma JJ, Marks-Austin KA, Holsclaw DS, Winnie GB, Gilligan PH, Stull TS. Inapparent transmission of *Pseudomonas* (*Burkholderia*) *cepacia* among patients with cystic fibrosis. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13: 716-719.
66. LiPuma JJ, Mortensen JE, Dasen SE, Edlind TD, Schidlow DV, Burns JL, Stull TL. Ribotype analysis of *Pseudomonas cepacia* from cystic fibrosis treatment centres. *J Pediatr* 1988; 113: 859-862.
67. LiPuma JJ, Spilker T, Gill LH, Campbell PW, Liu L, Mahenthiralingam E. Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 92-96.
68. LiPuma JJ. *Burkholderia cepacia*. Management issues and new insights. *Clin Chest Med* 1998; 19: 473-486.
69. Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, Laufs R. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear  $\beta$ -1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* 1996; 178: 175-183.
70. Mahenthiralingam E, Bischof J, Byrne SK, Radomski C, Davies JE, Av-Gay Y, Vandamme P. DNA-based diagnostic approaches for the identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovar I and III. *J Clin Microbiol* 2001; 38: 3165-3173.
71. Mahenthiralingam E, Campbell ME, Henry DA, Speert DP. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* in patients with cystic fibrosis: analysis by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2914-2920.
72. Mahenthiralingam E, Coenye T, Chung JW, Speert DP, Govan JRW, Taylor P, Vandamme P. Diagnostically and experimentally useful panel of strains from the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 910-913.
73. Martin DW, Mohr CD. Invasion and intracellular survival of *Burkholderia cepacia*. *Infect Immun* 2000; 68: 24-29.

74. Mathee K, Ciofu O, Sternberg C, Lindum PW, Campbell JIA, Jensen P, Johnsen AH, Givskov M, Ohman DE, Molin S, Høiby N, Kharazmi A. Mucoid conversion *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 1999;145: 1349-1357.
75. Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzky JT, Davis CW, Boucher RC. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 1998; 95: 1005-1015.
76. May TB, Chakrabarty AM. Isolation and assay of *Pseudomonas alginate*. *Methods in Enzymology* 1994; 235: 295-304.
77. McCray PB Jr, Zabner J, Jia HP, Welsh MJ, Thorne PS. Efficient killing of inhaled bacteria in deltaF508 mice: role of airway surface liquid composition. *Am J Physiol* 1999; 277: L183-L190.
78. McDowell A, Mahenthiralingam E, Moore JE, Dunbar KEA, Webb AK, Dodd ME, Martin SL, Millar BC, Scott CJ, Crowe M, Elborn JS. PCR-based detection and identification of *Burkholderia cepacia* complex pathogens in sputum from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4247-4255.
79. McKenney D, Pouliot KL, Wang Y, Murthy V, Ulrich M, Döring G, Lee JC, Goldmann DA, Pier GB. Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science* 1999; 284: 1523-1527.
80. McMenamin JD, Zacccone TM, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. Misidentification of *Burkholderia cepacia* in U.S. cystic fibrosis treatment centers: an analysis of 1051 recent sputum isolates. *Chest* 2000; 117: 1661-1665.
81. Mekalanos JJ. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* 1992; 174: 1-7.
82. Millar-Jones L, Ryley HC, Paull A, Goodchild MC. Transmission and prevalence of *Burkholderia cepacia* in Welsh cystic fibrosis patients. *Resp Med* 1998; 92: 178-183.
83. Nielsen AT, Toker-Nielsen T, Barken KB, Molin S. Role of commensal relationships on the spatial structure of a surface-attached microbial consortium. *Environ Microbiol* 2000; 2: 59-68.
84. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 49-79.
85. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1661-1669.

86. Pegues DA, Carson LA, Tablan OC, FitzSimmons SC, Roman SB, Miller JM, Jarvis WR and the Summer Camp Study Group. Acquisition of *Pseudomonas cepacia* at summer camps for patients with cystic fibrosis. *J Pediatr* 1994; 124: 694-702.
87. Peschel A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol* 2002; 10: 179-186.
88. Pitt TL, Kaufmann ME, Patel PS, Bengel LCA, Gaskin S, Livermore DM. Type characterization and antibiotic susceptibility of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis in the United Kingdom and the Republic of Ireland. *J Med Microbiol* 1996; 44: 203-210.
89. Rademaker JLW, Hoste B, Louws FJ, Kersters K, Swings J, Vauterin L, Vauterin P, de Bruijn FJ. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000; 50: 665-677.
90. Revets H, Vandamme P, Van Zeebroeck A, De Boeck K, Struelens MJ, Verhaegen J, Ursi JP, Verschraegen G, Franckx H, Malfroot A, Dab I, Lauwers S. *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* and cystic fibrosis: the epidemiology in Belgium. *Acta Clin Belg* 1996; 51: 222-230.
91. Richau JA, Leitão JH, Correia M, Lito L, Salgado MJ, Barreto C, Cescutti P, Sá-Correia I. Molecular typing and exopolysaccharide biosynthesis of *Burkholderia cepacia* isolates from a portugese cystic fibrosis center. *J Clin Microbiol* 2000; 1651-1655.
92. Richau JA, Leitão JH, Sá-Correia I. Enzymes leading to the nucleotide sugar precursors for exopolysaccharide synthesis in *Burkholderia cepacia*. *Biochem Biophys Res Comm* 2000; 276: 71-76.
93. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B-S, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou J-L, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui L-C. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-1073.
94. Sage A, Linker A, Evans LR, Lessie TG. Hexose phosphate metabolism and exopolysaccharide formation in *Pseudomonas cepacia*. *Curr Microbiol* 1990; 20: 191-198.
95. Saini LS, Glasworthy SB, John MA, Valvano MA. Intracellular survival of *Burkholderia cepacia* complex isolates in the presence of macrophage cell activation. *Microbiology* 1999; 145: 3465-3475.
96. Sajjan U, Corey M, Humar A, Tullis E, Cutz E, Ackerley C, Forstner J. Immunolocalisation of *Burkholderia cepacia* in the lungs of cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol* 2001; 50: 535-546.

97. Sajjan US, Corey M, Karmali MA, Forstner JF. Binding of *Pseudomonas cepacia* to normal human intestinal mucin and respiratory mucin from patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1992; 89: 648-656.
98. Savelkoul PHM, Aarts JJM, De Haas J, Dijkshoorn L, Duim B, Otsen M, Rademaker JLW, Schouls LM, Lenstra JA. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of the art. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3083-3091.
99. Schurr MJ, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: co-ordinate regulation of heat-shock response and conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 1997; 24: 411-420.
100. Schwab U, Boucher R. Growth of *Burkholderia cepacia* in airway surface liquid. Abstract International *Burkholderia cepacia* working group 7<sup>th</sup> annual meeting 2002, San Antonio, TX, USA.
101. Schwab U, Leigh M, Ribeiro C, Yankaskas J, Burns K, Gilligan P, Sokol P, Boucher R. Patterns of epithelial cell invasion by different species of the *Burkholderia cepacia* complex in well-differentiated human airway epithelia. *Infect Immun* 2002; 70: 4547-4555.
102. Segonds C, Heulin T, Marthy N, Chabanon G. Differentiation of *Burkholderia* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene and application to cystic fibrosis isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2201-2208.
103. Sehgal A, Presente A, Engelhardt JF. Developmental expression patterns of CFTR in ferret tracheal surface airway and submucosal gland epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 15: 122-131.
104. Shelly DB, Spilker T, Gracely EJ, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. Utility of commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis sputum culture. *J Clin Microbiol*; 38: 3112-3115.
105. Sherrock-Cox V, Russel NJ, Gacesca P. The purification and chemical characterization of the alginate present in the extracellular material produced by mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Carbohydr Res* 1984; 135: 147-154.
106. Simpson IN, Finlay J, Winstanley DJ, Dewhurst N, Nelson JW, Butler SL, Govan JRW. Multi-resistance isolates possessing characteristics of both *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* and *Burkholderia gladioli* from patients with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 1994; 34: 353-361.
107. Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* 2002; 417: 552-555.
108. Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 1996; 85: 229-236.

109. Sobel JD, Hashman N, Reinherz G, Merzbach D. Nosocomial *Pseudomonas cepacia* infection associated with chlorhexidine contamination. *Am J Med* 1982; 73: 183-186.
110. Speert DP, Bond M, Woodman RC, Curnutte JT. Infection with *Pseudomonas cepacia* in chronic granulomatous disease – role of non-oxidative killing by neutrophils in host defense. *J Infect Dis* 1994; 170: 1524-1531.
111. Speert DP, Henry D, Vandamme P, Corey M, Mahenthiralingam E. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis. *Canada Emerg Infect Dis* 2002; 8: 181-187.
112. Stewart PS. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial films. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2517-2522.
113. Straus DC, Lonon MK, Woods DE, Garner CW. Production of an extracellular toxic complex by various strains of *Pseudomonas cepacia*. *J Med Microbiol* 1989; 30: 17-22.
114. Tablan O. Nosocomially acquired *Pseudomonas cepacia* infection in patients with cystic fibrosis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1993; 11: 124-126.
115. Tablan OC, Chorba TL, Schidlow DV, White JW, Hardy KA, Gilligan PH, Morgan WM, Carson LA, Martone WJ, Jason JM, et al. *Pseudomonas cepacia* colonization in patients with cystic fibrosis: risk, factors and clinical outcome. *J Pediatr* 1985; 107: 382-387.
116. Thomassen MJ, Demko CA, Klinger JD, Stern RC. *Pseudomonas cepacia* colonization among patients with cystic fibrosis. A new opportunist. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131: 791-796.
117. Tomich M, Herfst CA, Golden JW, Mohr CD. Role of flagella in host cell invasion by *Burkholderia cepacia*. *Infect Immun* 2002; 70: 1799-1806.
118. Ulrich M, Herbert S, Berger J, Bellon G, Louis D, Munker G, Döring G. Localization of *Staphylococcus aureus* in infected airways of patients with cystic fibrosis and in a cell culture model of *S. aureus* adherence. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 83-91.
119. Urakami T, Ito-Yoshida C, Araki H, Kijima T, Suzuki K-I, Komagata K. Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* spp. and description of *Burkholderia vandii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1994; 44: 235-245.
120. Ursing JB, Rosselló-Mora RA, García-Valdés E, Lalucat J. Taxonomic note: a pragmatic approach to the nomenclature of phenotypically similar genomic groups. *Int J Syst Bacteriol* 1995; 45: 604.

121. Van Pelt C, Verduin CM, Goessens WHF, Vos MC, Tümmler B, Segonds C, Reubsæet F, Verbrugh H, van Belkum A. Identification of *Burkholderia* spp in the clinical microbiology laboratory: comparison of conventional and molecular methods. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2158-2164.
122. Vandamme P, Henry D, Coenye T, Nzula S, Vancanneyt M, LiPuma JJ, Speert DP, Govan JRW, Mahenthiralingam E. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. *FEMS Immunol Med Microbiol* Juni 2002; 33: 143-149.
123. Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M, Coenye T, Coopman R, Revets H, Lauwers S, Gillis M, Kersters K, Govan JRW. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47: 1188-1200.
124. Vandamme P, Mahenthiralingam E, Holmes B, Coenye T, Hoste B, De Vos P, Henry D, Speert DP. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* IV). *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1042-1047.
125. Verkman AS, Song Y, Thiagarajah JR. Role of airway surface liquid and submucosal glands in cystic fibrosis lung disease. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284: C2-C15.
126. Walters S, Smith EG. *Pseudomonas cepacia* in cystic fibrosis: transmissibility and implications. *Lancet* 1993; 342: 3-4.
127. Welsh MJ, Ramsey BW. Research on Cystic Fibrosis. A Journey from the Heart House. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 148-154.
128. Whitby PW, Pope LC, Carter KB, LiPuma JJ, Stull TL. Species-specific PCR as a tool for the identification of *Burkholderia gladioli*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 282-285.
129. Whiteford ML, Wilkinson JD, McColl JH, Conlon FM, Michie JR, Evans TJ, Paton JY. Outcome of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* colonization in children with cystic fibrosis following a hospital outbreak. *Thorax* 1995; 50: 1194-1198.
130. Worlitzsch D, Herberth G, Ulrich M, Döring G. Catalase, myeloperoxidase and hydrogen peroxide in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 1998; 11: 377-383.
131. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Çekici A, Meyer KC, Birrer P, Bellon G, Berger J, Weiss T, Botzenhart K, Yankaskas JR, Randell S, Boucher RC, Döring G. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 2002; 109: 317-325.

132. Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M. Proposal of Burkholderia gen. nov. and transfer of seven species of the genus Pseudomonas homology group II to the new genus, with the type species Burkholderia cepacia (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. Microbiol Immunol 1992; 36: 1251-1275.
133. Zhao N, Qu C, Wang E, Chen W. Phylogenetic evidence for the transfer of Pseudomonas cocovenenans (van Damme et al. 1960) to the genus Burkholderia as Burkholderia cocovenenans (van Damme et al. 1960) comb. nov. Int J Syst Bacteriol 1995; 45: 600-603.
134. Zughailer SM, Ryley HC, Jackson SK. Lipopolysaccharide (LPS) from Burkholderia cepacia is more active than LPS from Pseudomonas aeruginosa and Stenotrophomonas maltophilia in stimulating tumor necrosis factor alpha from human monocytes. Infect Immune 1999; 67: 1505-1507.

## 7 ANHANG

**Danksagen möchte ich all denen, die mich beim Erstellen dieser  
Doktorarbeit unterstützt haben.**

Besonderer Dank geht an:

Professor Dr. Gerd Döring, Dr. Dieter Worlitzsch und Dr. Martina Ulrich für die gute  
Zusammenarbeit und Betreuung.

Frau Neu, Frau Merk und Herrn Kern für ihre Hilfsbereitschaft bei den alltäglichen  
labortechnischen Widrigkeiten.

Meine Eltern, meinen Bruder und meine Freunde.

## LEBENS LAUF

**Name:** Nonnenmacher

**Vorname:** Sonja

**Geboren:** 14. Juli 1976 in Nürtingen

**Schulbildung:** 1983 – 1987 Grundschule, Aichtal-Grötzingen  
1987 – 1996 Max-Planck-Gymnasium, Nürtingen

**Pflegepraktikum:** 01. August 1996 – 31. Oktober 1996 Filderklinik, Filderstadt

**Studium:** 1997 – 2004 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
30. März 1999 Ärztliche Vorprüfung  
23. März 2000 Erstes Staatsexamen  
15. August 2003 Zweites Staatsexamen  
09. November 2004 Drittes Staatsexamen

**Famulaturen:** 09. August 1999 – 05. September 1999 niedergelassener Arzt für Pädiatrie, Pulmologie, Allergologie, Göppingen  
  
07. August 2000 – 05. September 2000 Abteilung für Innere Medizin des St. Hildegardis-Krankenhauses, Mainz  
  
27. September 2000 – 11. Oktober 2000 Radiologische Abteilung der Universitätsklinik Tübingen  
  
16. Februar 2002 – 02. März 2002 in der Universitäts-Hautklinik Tübingen  
  
04. März 2002 – 02. April 2002 Psychiatrische Dienste des Kantons Solothurn

**Auslandsaufenthalt:** Januar 2001 – Juni 2001 Auslandsaufenthalt in Valencia, Spanien. Erlernen der spanischen Sprache und Mitarbeit bei „Domus pacis“ (medizinische und psychosoziale Einrichtung zur Betreuung und Reintegration AIDS-Kranker und drogenabhängiger Menschen)

**Promotion:** März 2002 – Dezember 2004 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Ärztlicher Direktor I. B. Autenrieth

**Praktisches Jahr:** Oktober 2003 – September 2004: Dermatologie, Universitäts-Hautklinik Tübingen; Innere Medizin und Chirurgie, Paracelsus-Krankenhaus Ruit