Molekulare Analyse der Darmflora von Patienten mit hämatologischen Krebserkrankungen

vorgelegt von
Diplom-Ingenieur
Oliver Goldenberg
aus Leipzig

Von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Ingenieurwissenschaften
- Dr.-Ing. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dipl.-Ing. Dr. Ulf Stahl
Berichter: Prof. Dr. Roland Lauster
Berichter: Prof. Dr. Dr. Ulf B. Göbel

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 15.03.2007

Berlin 2007
D 83

I Zusammenfassung

Die selektive Darmdekontamination stellt eine Möglichkeit der Prävention gegenüber endogenen Infektionen dar, wohingegen bei einer akuten Infektion Breitspektrum-Antibiotika eingesetzt werden. Für die Studie wurden Stuhlproben von allogen und autolog transplantierten, sowie chemotherapierten Patienten auf ihre mikrobielle Zusammensetzung analysiert. Die Untersuchungen wurden größtenteils mit Hilfe molekularer Methoden durchgeführt, welche auf der Amplifikation ribosomaler Gene basierten. Neben bereits etablierten Verfahren wie der Denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE), konnten neue Methoden auf Basis der Denaturierenden High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) und der Echtzeit-PCR entwickelt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die neu entwickelten Methoden eine Verschiebung der Darmflora in Folge der Antibiotikabehandlung zuverlässig anzeigen. Weiterhin konnte mit Hilfe der neuen Verfahren die drastische Reduktion der bakteriellen Diversität nach Behandlung mit Breitspektrum-Antibiotika detektiert und die Rekonstitution der Darmflora, welche durch eine parenterale Ernährung verzögert wurde, reproduzierbar dargestellt werden. In den Proben mit reduzierter Artendiversität in der Darmflora konnten größtenteils Gram-(+) Bakterien identifiziert werden, wobei die Anreicherung der Spezies auf das Resistenzspektrum gegenüber den verwendeten Antibiotika zurückzuführen war. Bei allogen transplantierten Patienten mit reduzierter Diversität der Darmflora konnte zudem eine erhöhte Fallzahl von akuter Graft-versus-Host Disease (GvHD) beobachtet werden, was auf einen möglichen Einfluss der Darmflora bei der Entstehung dieser transplantationsassoziierten Folgeerkrankung hinweist.

II Abstract

Haematologic malignancies often necessitate the transplantation of graft-derived blood stem cells to the patients. Apart from therapy-induced side effects, endogenous and exogenous acquired infections come to the fore. Prophylactic administration of antibiotics for selective decontamination of the gastrointestinal tract reduces the frequency of endogenous infections, whereas signs of acute infection are treated empirically by broad-spectrum antibiotics. Although the impact of respective antibiotics on the composition of the intestinal microbiota is well studied, there are no reports about temporal changes during treatment of haematologic malignancies.

To address this issue in a pilot study, faecal samples were collected from allogeneic and autologous transplant patients as well as patients undergoing chemotherapy. In most instances, composition of the intestinal microbiota was determined by 16S rRNA based techniques. In addition to well-established methods (e.g. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) newly developed approaches (e.g. Denaturing High Performance Liquid Chromatography, DHPLC; Real-Time PCR) were adducted for analysis. Some of the data were verified using culture techniques.

The results showed a shift in the intestinal microbiota due to antibiotic prophylaxis. In contrast, treatment with broad-spectrum antibiotics resulted in explicit reduction of bacterial diversity in the faecal samples. Reconstitution was hampered by parenteral nutrition. Gram-positive bacteria proved to be the main colonizers in samples with reduced diversity, apparently due to their spectrum of antibiotic resistance. Moreover, cases of acute Graft-versus-Host Disease (GvHD) were observed more often in allogeneic transplant patients with reduced diversity, once again underlining the importance of the intestinal microbiota in the development of this transplantation-associated complication.

For the first time, temporal changes in the composition of the intestinal microbiota were documented during the treatment of haematologic malignancies. Results of this pilot study provide starting points for new pre-clinical projects, e.g. analysis of coherences between acute GvHD and bacterial species of the gastrointestinal tract. The newly developed techniques allow contemporary monitoring of changes in the intestinal microbiota, which might help to keep antibiotic-induced changes under surveillance. This attempt could lead to an individualised treatment of patients.

III Inhaltsverzeichnis

I	Zusammenfassung	2
II	Abstract	3
III	Inhaltsverzeichnis	4
IV	Abkürzungsverzeichnis	119
V	Anhang	121
VI	Publikationsliste	128
VII	Lebenslauf	130
VIII	Eidesstattliche Erklärung	131
IX	Danksagung	132

1	**Einleitung**	7
1.1	Hämatologie und Onkologie	7
1.1.1	Hämatopoese	7
1.1.1	Leukämie	7
1.1.1.1	Myeloische Leukämien	8
1.1.1.2	Lymphatische Leukämien	9
1.1.1.3	Maligne Erkrankungen des blutbildenden Systems	9
1.1.2	Die Therapie von Leukämien	10
1.1.2.1	Allogene Knochenmarktransplantation	10
1.1.2.1.1	Graft-versus-Host-Disease	11
1.1.2.2	Autologe Knochenmarktransplantation	12
1.1.2.3	Zytostatische Chemotherapie	13
1.2	Gastrointestinale Mikrobiologie und Hämatoonkologie	13
1.2.1	Selektive Darmdekontamination	14
1.2.2	Die Darmflora des Menschen	15
1.3	Molekulare Ökologie	18
1.3.1.1	Methoden zur Analyse der Darmflora	18
1.3.2	Die 16S rRNA Gene als molekularer Marker	19
1.3.2.1	Molekulare Methoden zur Analyse der Darmflora	21
1.3.2.1.1	Elektrophorese von 16S rRNA Genen in einem Gradienten	22
1.3.2.1.2	Denaturierende High Performance Liquid Chromatography	22
1.3.2.1.3	Terminaler Restriktionsfragment Längenpolymorphismus	23
1.3.2.1.4	Echtzeit-PCR	23
1.3.2.1.5	Sonden-basierte Techniken der molekularen Ökologie	23

2	**Fragestellungen und Ziele**	26
3	**Material und Methoden**	27
3.1	Puffer, Nährmedien und sonstige Lösungen	27
3.2	Oligonukleotide	29
3.3	Referenzstämme	29
3.4	Patientenstatistik	30
3.4.1	Patienten der Studie zur intestinalen GvHD	30
3.5	Probennahme und Präparation	31
3.5.1	Präparation der DNA aus den Stuhlproben	32
3.6	Methoden	33
3.6.1	Agarose Gelelektrophorese	33
3.6.2	Silika-Aufreinigung von PCR-Produkten	33
3.6.3	DGGE zur Analyse von 16S rRNA Fragmenten	34
3.6.4	Temperaturgradienten Gelelektrophorese (TGGE)	36
3.6.5	Sequenzierung von DNA-Fragmenten	37
3.6.6	Klonierung von DNA-Fragmenten	37
3.6.7	Terminaler Restriktionsfragment Längenpolymorphismus (T-RFLP)	38
3.6.8	DHPLC zur Analyse von 16S rRNA Genfragmenten	39
3.6.8.1	Rekonditionierung	41
3.6.9	DHPLC zur Analyse von ITS2 Fragmenten	41
3.6.10	Kulturelle Analyse der Darmflora	41
3.6.11	Echtzeit PCR	42
4	**Ergebnisse**	44
4.1	Molekulare Analyse der Darmflora	44
4.1.1	Klonierung und Sequenzierung von 16S rRNA Genen	44
4.1.2	Terminaler Restriktionsfragment Längenpolymorphismus	45
4.1.3	Denaturierende Gradientengelelektrophorese	47
4.1.3.1	Evaluierung der DGGE für die Analyse der Darmflora	49
4.1.4	Denaturierende High Performance Liquid Chromatography	51
4.1.4.1	Analyse der bakteriellen Flora mittels 16S-DHPLC	51
4.1.4.2	Analyse der Pilzflora mittels ITS2-DHPLC	58
4.1.5	Quantitative Analyse mittels Echtzeit-PCR	60

4.2	Analyse der Stuhlproben von Patienten mit hämatologischen Krebserkrankungen	61
4.2.1	Analyse der bakteriellen Flora	61
4.2.1.1	Der Einfluss von Antibiotika auf die Darmflora	63
4.2.1.1.1	Antibiotikaprophylaxe	63
4.2.1.1.2	Antibiotikatherapie	64
4.2.1.1.3	Kulturelle Analyse von Stuhlproben	67
4.2.1.2	Weitere Einflussfaktoren	72
4.2.1.2.1	Chemotherapie	72
4.2.1.2.2	Durchfälle	73
4.2.1.2.3	Parenterale Ernährung	74
4.2.1.2.4	Einfluss des angeborenen Immunsystems	75
4.2.1.2.5	Zusammensetzung der Darmflora während einer akuten GvHD	76
4.2.2	Analyse der Sprosspilzpopulation innerhalb der Darmflora	78
5	**Diskussion**	84
5.1	Auswahl und Evaluierung der Methoden für die globale Analyse der Stuhlproben	84
5.1.1	Klonierung und Sequenzierung von 16S rRNA Genen	84
5.1.2	Terminaler Restriktionsfragment Längenpolymorphismus	85
5.1.3	Denaturierende Gradientengelelektrophorese	86
5.1.4	Denaturierende High Performance Liquid Chromatography	88
5.2	Einflüsse auf die Zusammensetzung der Darmflora bei der Therapie von Patienten mit hämatologischen Krebserkrankungen	90
5.2.1	Der Einfluss der Antibiotikabehandlung	90
5.2.2	Weitere Einflussfaktoren	94
5.2.2.1	Der Einfluss des Immunsystems	96
5.2.3	Einfluss der Darmflora auf die akute GvHD	97
5.2.4	Veränderungen der Sprosspilzpopulation innerhalb der Darmflora	99
5.3	Schlussfolgerungen	105
6	**Referenzen**	107

1 Einleitung

1.1 Hämatologie und Onkologie

1.1.1 Hämatopoese

Das Blut besteht aus vielen verschiedenen Bestandteilen, deren richtige Zusammensetzung die Voraussetzung für das Wohlbefinden und die Gesundheit eines Menschen ist. Etwa die Hälfte des gesamten Blutes besteht aus Blutplasma, welches sich wiederum zu über neunzig Prozent aus Wasser und Eiweißkörpern zusammensetzt. Die andere Hälfte sind Zellen, die so genannten Blutkörperchen, von denen es drei Arten gibt: Erythrozyten (rote Blutkörperchen), Thrombozyten (Blutplättchen) und Leukozyten (weiße Blutkörperchen). Die Erythrozyten sind für den Transport des Sauerstoffs zuständig, die Leukozyten dienen der Abwehr und Bekämpfung von Infektionen und die Thrombozyten werden bei der Blutgerinnung benötigt (Die Blauen Ratgeber, Nr. 20).
Alle Zellen des Blutes und des Immunsystems stammen von hämatopoetischen (blutbildenden) Stammzellen ab (Abb. 1). Da die reifen Zellen im peripheren Blut und in den immunologischen Organen eine begrenzte Lebensspanne besitzen, müssen diese Zellpopulationen lebenslang kontinuierlich regeneriert werden (Rodewald, 2002).

1.1.1 Leukämie

Unter Leukämie versteht man pathogene Prozesse der blutbildenden Organe, in deren Verlauf Zellen des blutbildenden Systems entarten und drastisch proliferieren. Dazu gehören das Knochenmark und das Lymphsystem, welche für die Bildung der roten und weißen Blutkörperchen verantwortlich sind (Die Blauen Ratgeber, Nr. 20). Je nach Verlauf der Erkrankung unterscheidet man chronische und akute Leukämien. Chronische Formen zeichnen sich durch einen eher schleichenden, symptomlosen Beginn und langsames Fortschreiten aus, während sich akute Leukämien rasch entwickeln und in der Regel mit schweren Krankheitssymptomen

und Fieber einhergehen. Nach der Art der Zellen, aus denen die malignen Zellen hervorgegangen sind, werden die Erkrankungen außer in akut oder chronisch weiterhin in myeloische und lymphatische Formen eingeteilt (Die Blauen Ratgeber, Nr. 20).

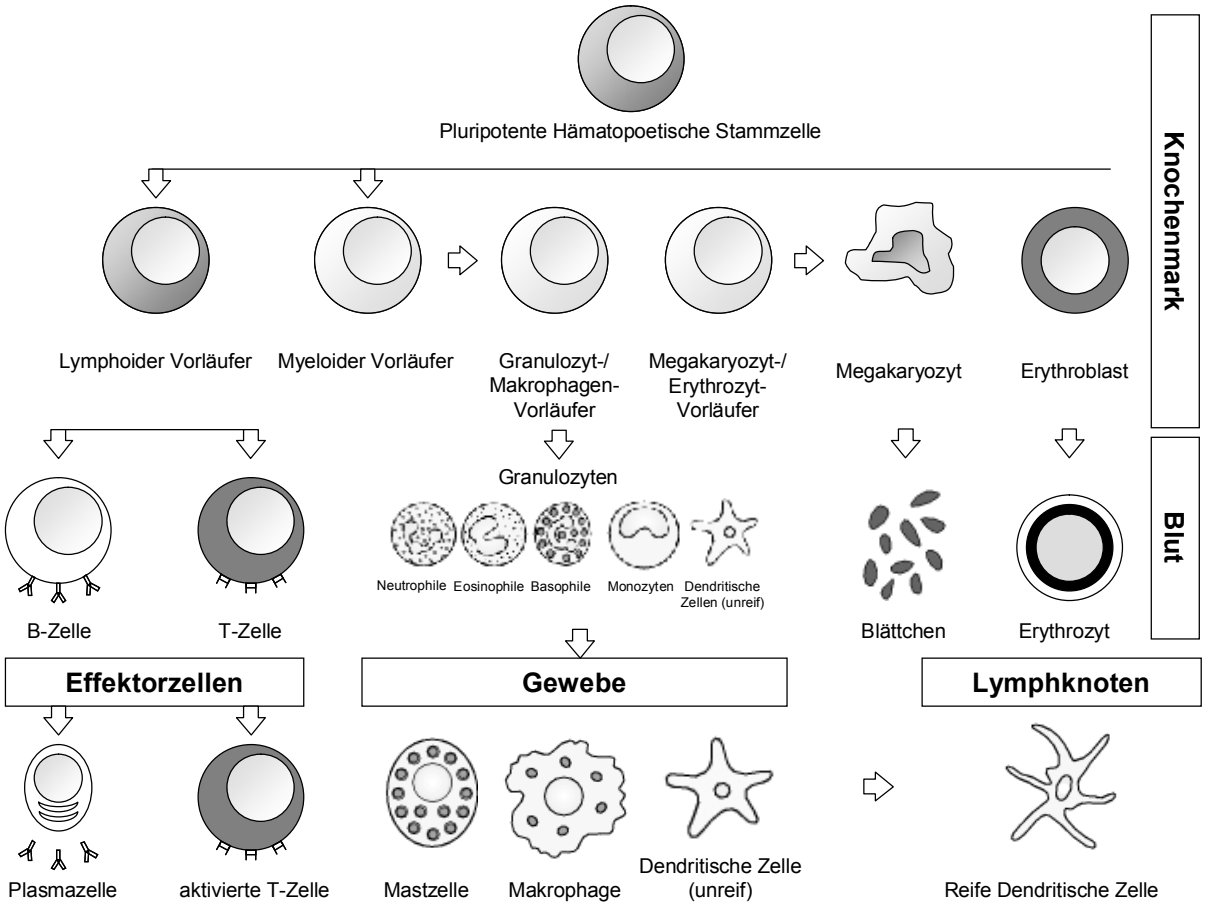


Abb. 1: Hämatopoese. Alle Blutzellen leiten sich von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Aus diesen Zellen entstehen im Verlauf der Hämatopoese lymphoide und myeloide Vorläuferzellen, welche sich weiter differenzieren können. Aus den lymphoiden Vorläuferzellen werden im Blut B- und T-Zellen gebildet, welche im weiteren Verlauf zu Plasmazellen und aktivierten T-Zellen ausreifen. Die myeloiden Vorläuferzellen differenzieren sich zu Granulozyten, Blutplättchen und Erythrozyten. Die Granulozyten werden in Neutrophile, Eosinophile, Basophile, Monozyten, Mastzellen und dendritische Zellen unterteilt. Wandern Monozyten aus dem Blut ins Gewebe, so reifen diese zu Makrophagen aus, wohingegen die dendritischen Zellen erst in den Lymphknoten ausreifen (Abb. mod. nach: Janeway, 2005).

1.1.1.1 Myeloische Leukämien

Myeloische Leukämien gehen von den myeloiden Vorläuferzellen aus (Abb. 1). Die entarteten Zellen teilen sich unkontrolliert und verdrängen und zerstören das gesunde Knochenmark. Die malignen Zellen treten in großer Zahl ins Blut über und

können auf diesem Wege alle anderen Körperorgane erreichen und sich dort ansiedeln. Die akute myeloische Leukämie (AML) ist die, bei Erwachsenen am häufigsten vorkommende akute Leukämieart (Die Blauen Ratgeber, Nr. 20).

1.1.1.2 Lymphatische Leukämien

Im Gegensatz zu den myeloischen Leukämien gehen die lymphatischen Leukämien von lymphoiden Vorläuferzellen aus (Abb. 1). Je nachdem auf welcher Stufe der Zellreifung die Entartung stattgefunden hat, ist entweder das Knochenmark oder das lymphatische System betroffen. Auch hier treten die Zellen ins Blut über und erreichen auf diesem Wege das Knochenmark, sowie andere Organe. Die akute lymphatische Leukämie (ALL) tritt überwiegend im Kindesalter auf.
Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) sind durch die Entartung und unkontrollierte Vermehrung von Lymphozyten gekennzeichnet. Die Lymphozyten befinden sich im Blut und in den lymphatischen Organen, wie z.B. in den Lymphknoten oder in der Milz. In diesen Organen findet auch die Ausbreitung der Tumorzellen, der so genannten Lymphomzellen, statt. Zu den Non-Hodgkin-Lymphomen zählen weiterhin follikuläre Lymphome, kutane Lymphome sowie die Haarzell-Leukämie.
Bei der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) kommt es zu einem unkontrollierten Wachstum von Lymphozyten - meist B-Lymphozyten - in Blut, Milz, Lymphknoten und Knochenmark. Die CLL wird daher zu den Non-Hodgkin-Lymphomen gezählt. Sie tritt im höheren Lebensalter auf und verläuft als niedrig malignes NHL schleichend und chronisch.
Das Plasmozytom wird auch als multiples Myelom oder Morbus Kahler bezeichnet. Diese Erkrankung geht von einer einzelnen entarteten Antikörper-produzierenden Plasmazelle aus (Die Blauen Ratgeber, Nr. 20).

1.1.1.3 Maligne Erkrankungen des blutbildenden Systems

Zu den malignen Erkrankungen des blutbildenden Systems gehören unter anderem die Myelodysplasie, das Hodgkin-Lymphom, die Osteomyelosklerose und der Systemische Lupus Erythematodes.

Die Myelodysplasie ist eine Erkrankung des Knochenmarks, genauer eine Rückenmarkfehlbildung, die ähnlich einer Leukämie zu einer abnormen Hämatopoese führt.
Das Hodgkin-Lymphom ist eine bösartig verlaufende Erkrankung des lymphatischen Gewebes. Im Verlauf der Krankheit verwandeln sich B-Zellen in große, abnorme Zellen.
Die Osteomyelosklerose ist gekennzeichnet durch eine Verödung des Knochenmarks, bei der das blutbildende Gewebe durch faserreiches Bindegewebe ersetzt wird. Mit zunehmender Verödung des Knochenmarks erfolgt die Blutbildung vermehrt in Leber und Milz. Diese Organe sind dadurch beträchtlich vergrößert.
Beim Systemischen Lupus Erythematodes ist das Immunsystem aus noch unbekannten Ursachen verändert und bekämpft in Folge dessen den eigenen Körper (Die Blauen Ratgeber, Nr. 20).

1.1.2 Die Therapie von Leukämien

Unter der so genannten Blutstammzelltransplantation, auch unter dem Begriff Knochenmarktransplantation (KMT) bekannt, versteht man die Übertragung von Blutstammzellen und Vorläuferzellen eines Spenders auf einen Empfänger. Die dauerhafte Ansiedlung dieser Zellen im Empfänger kann zum Neuaufbau des blutbildenden, sowie des immunologischen Systems führen (Forman, 1998). Die Transplantation der Stammzellen erfolgt durch intravenöse Infusion.
Sind Spender und Empfänger nicht identisch, so spricht man von einer allogenen Transplantation. Gewinnt man die Stammzellen aus einem Patienten vor der Behandlung, z.B. mit Chemotherapie und Bestrahlung, und gibt dem Patienten nach Behandlung seine eigenen, von Tumorzellen gereinigten Stammzellen wieder zurück, so handelt es sich um eine autologe Transplantation (Rodewald, 2002).

1.1.2.1 Allogene Knochenmarktransplantation

Die allogene KMT wird bei Patienten mit malignen systemischen hämatologischen Erkrankungen (z.B. akute oder chronische Leukämie; Lymphome) durchgeführt. Ob die transplantierten Zellen angenommen oder abgestoßen werden, hängt vor allem

von der Übereinstimmung der Humanen Leukozyten Antigene (HLA)-Haplotypen zwischen Spender und Empfänger ab. Man verwendet nach Möglichkeit Knochenmark von HLA-voll- bzw. teilkompatiblen Spendern, wie z.B. Geschwistern und Familienangehörigen. Im Vorfeld der Transplantation ist bei dem überwiegenden Teil der Patienten eine Konditionierung durch Chemotherapie erforderlich, um die Abstoßung des Transplantats zu verhindern und das maligne Knochenmark zu beseitigen. In einigen Fällen wird die Chemotherapie außerdem durch den Einsatz von Ganzkörperbestrahlung ergänzt. Durch das Konditionierungsprogramm wird neben dem hämatopoetischen System auch das körpereigene Immunsystem des Patienten zerstört. Die Rekonstitution des Immunsystems aus den Spenderzellen dauert wenigstens 4 bis 5 Monate. Während dieser Zeit besteht eine ausgeprägte Immundefizienz (Rodewald, 2002).

1.1.2.1.1 Graft-versus-Host-Disease

Neben der Abstoßung transplantierter Zellen durch das Immunsystem des Empfängers besteht die Möglichkeit einer, in umgekehrter Richtung verlaufenden, (vom Transplantat ausgehenden) immunologischen Reaktion; die so genannte Graft-versus-Host-Disease (GvHD). Die GvHD ist eine Reaktion von Spender-T-Zellen auf Antigene und Zellen des Empfängers und stellt eine der häufigsten Ursachen für die Morbidität und Mortalität von Patienten nach allogener KMT dar (Chao, 1999; Goker, 2001). Als Folge der GvHD treten Schädigungen des Gewebes auf, deren Ausmaß und Ort variabel ist (Chao, 1999; Goker, 2001; Sullivan, 1999). Bei der Entstehung einer GvHD müssen drei Faktoren erfüllt sein. I) Das gespendete Material muss eine ausreichende Anzahl von immunkompetenten Zellen enthalten. II) Der Empfänger muss in der Lage sein, die Zellen des Spenders über Alloantigene zu stimulieren, die den Spenderzellen unbekannt sind. III) Das Empfänger-Immunsystems kann keine effektive Immunantwort gegen die Zellen des Spenders initiieren (Billingham, 1966; Goker, 2001). In der Folge werden die Zellen des Empfängers von den T-Lymphozyten des Spenders als Fremd-Antigene erkannt, was in Zell- bzw. Organschäden resultiert, welche wegen der hohen Konzentration von Immunzellen im Darm auch Zellen der Darmmukosa einschliesst. Klinisch manifestiert sich die GvHD an der Haut, der Leber, im Gastrointestinaltrakt und/oder in lymphoiden Organen (Goker, 2001).

Man vermutet, dass die Entstehung einer intestinalen GvHD durch die Translokation von Bakterien durch das intestinale Epithel, die Prozessierung bakterieller Antigene durch körpereigene Antigen-präsentierende Zellen, sowie deren Präsentation zu Lymphozyten des Spenders vorangetrieben wird (Hill, 2000). Studien an allogen transplantierten Mäusen haben gezeigt, dass die Lethalität der GvHD unter gnotobiotischen Bedingungen verhindert werden kann (van Bekkum, 1974; Heit, 1973; Jones, 1971). Experimentelle Untersuchungen ergaben, dass vor allem Lipopolysaccharide (LPS) von Gram-(-) Bakterien der Darmflora entscheidend an der Entstehung einer akuten oder chronischen GvHD beteiligt sind (Cooke, 2001). Beelen und Mitarbeiter (1992 und 1999) konnten zudem zeigen, dass eine gezielte Dekontamination des Intestinaltraktes mit Metronidazol, gerichtet gegen die anaerobe Bakterienflora, zu einer Reduktion von akuter GvHD und einer höheren Überlebensrate beiträgt. Neuere Daten verweisen auf die Interaktion bakterieller Antigene mit Antigenen des Spenders während der initialen Phase der intestinalen GvHD. So berichten beispielsweise Holler und Mitarbeiter (2004) von Polymorphismen im NOD2/CARD15 Gen, welche mit einer signifikanten Erhöhung von schwerer GvHD und einer damit verbundenen Erhöhung der Mortalitätsrate einhergehen. NOD2/CARD15 wird in Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert und interagiert mit Muramidyl-Dipeptid, einem Bestandteil der bakteriellen Zellwand (Inohara, 2005).

Zur Behandlung bzw. Verhütung der GvHD werden immunsuppressiv wirksame Medikamente eingesetzt, vor allem Steroide, Cyclosporin A, Methotrexat und Anti-Lymphozytenserum, sowie monoklonale Antikörper (Rodewald, 2002).

Zu erwähnen ist allerdings, dass Spender-T-Zellen nicht nur GvHD auslösen können, sondern auch eine antileukämische Wirksamkeit besitzen (Graft-versus-Leukemia-Effekt), und dass dieser Effekt eine wesentliche Komponente der Wirksamkeit bei der Überwindung maligner Erkrankungen des blutbildenden Systems darstellt (Rodewald, 2002).

1.1.2.2 Autologe Knochenmarktransplantation

Bei der autologen KMT werden hämatopoetische Stammzellen, die dem Patienten vor einer Chemo- oder Strahlentherapie aus dem eigenen Knochenmark bzw. aus dem Blut entnommen wurden, retransfundiert. Diese Therapie wird vor allem bei

Patienten durchgeführt, deren Knochenmark nicht von der Erkrankung betroffen ist. Vor der Transplantation wird, analog zur allogenen KMT, eine zytotoxische Chemotherapie durchgeführt. Im Gegensatz zur allogenen KMT sind vor allem die Verfügbarkeit von Stammzellen, sowie das Fehlen immunologischer Abstoßungsreaktionen von Vorteil. Bei der autologen KMT besteht allerdings die Gefahr der Kontamination des Knochenmarks mit malignen Zellen und des damit verbundenen Rezidiv. Hinzu kommt das Fehlen des GvL-Effekts (s.o.).

1.1.2.3 Zytostatische Chemotherapie

Ziel der zytostatischen Chemotherapie ist die Zerstörung maligner Zellen, um das Blutsystem einerseits vor Überwucherung zu schützen und andererseits die entarteten Zellen zu eliminieren. Die zytostatische Wirkung vieler Medikamente beruht auf einer Beeinflussung von Enzymen oder Substraten der DNA- oder RNA-Synthese. Rasch proliferierende Zellen, zu denen auch die malignen Zellen gehören, sind daher gegenüber den verwendeten Zytostatika sensitiver als ruhende Zellen (Die Blauen Ratgeber, Nr. 20). Die Einteilung der Zytostatika in verschiedene Substanzklassen erfolgt aufgrund der biochemischen Aktivität oder Herkunft einer Verbindung. Alkylanzien (z.B. Cyclophosphamid) weisen in der Regel eine oder zwei Seitenketten auf, die eine hohe Bindungsaktivität zu elektronenreichen organischen Molekülen (z.B. DNA) besitzen. Die Klasse der Antimetabolite setzt sich aus Substanzen zusammen, die eine hohe Strukturähnlichkeit mit Intermediärprodukten des Stoffwechsels oder Vitaminen besitzen (z.B. Methotrextat; MTX). Tumorantibiotika sind Derivate natürlich vorkommender Verbindungen mit zytotoxischer Wirkung (Forth, 2001).

1.2 Gastrointestinale Mikrobiologie und Hämatoonkologie

Vor dem Hintergrund, dass allogen und autolog transplantierte Patienten, sowie Patienten unter Chemotherapie einem hohen Infektionsrisiko ausgesetzt sind, wird die Notwendigkeit der näheren Betrachtung mikrobiologischer Vorgänge während einer derartigen Therapie deutlich. So führt die Konditionierung zu einer massiven

Schädigung von Immunzellen. Hinzu kommt die immunsuppressive Prophylaxe zur Unterdrückung sekundärer Effekte, wie z.B. die Entstehung einer GvHD bei allogen transplantierten Patienten. Diese Faktoren führen in der Summe zu einer geschwächten Immunabwehr und somit zu einem erhöhten Risiko gegenüber Bakterien- und Pilz-Infektionen (Walter, 1995). Die Granulozytopenie bzw. Neutropenie stellt, bezogen auf das Infektionsrisiko, die gefährlichste Phase während einer Therapie von hämatologischen Krebserkrankungen dar. Sie markiert den Zeitpunkt des völligen Verlusts aller Granulozyten (Walter, 1995). Zusätzlich besteht die Möglichkeit der Entstehung von *Pneumocystis carinii* induzierten Pneumonien, welche durch die prophylaktische Gabe von Trimethoprim-Sulfamethoxazol weitgehend verhindert werden können. Sehr gefährlich sind außerdem durch Zytomegalie-Virus (CMV) hervorgerufenen Infektionen.

1.2.1 Selektive Darmdekontamination

Die hohe Infektionsgefahr von KMT-Patienten hat eine Reihe von Vorsichtsmaßnahmen zur Folge. Dazu zählen in erster Linie die Händedesinfektion, sowie die Dekontamination von Lebensmitteln durch Kochen, Pasteurisieren und/oder Autoklavieren. Zudem ist es üblich, KMT-Patienten in einem Einzelzimmer zu isolieren. Diese Maßnahmen allein, ohne eine zusätzliche antibiotische Prophylaxe, reichen jedoch nicht aus, um die Häufigkeit von Infektionen zu verringern. Granulozytopenische Patienten durchlaufen häufig, durch Gram-(-) Bakterien hervorgerufene Infektionen. Diese potentiell pathogenen Erreger stammen zu einem großen Teil aus dem körpereigenen Verdauungstrakt (Donnelly, 2000; Walter, 1995). Aus diesem Grund wurde die selektive Darmdekontamination (SDD) eingeführt. Diese Prophylaxe richtet sich hauptsächlich gegen potentiell pathogene aerobe Bakterien und hat die Beibehaltung der anaeroben Flora zum Ziel (Rozenberg-Arska, 1987). Die SDD wird heutzutage häufig mit Ciprofloxacin oder anderen Chinolonen durchgeführt.

Im Verlauf einer allogenen KMT stellen zudem Pilzinfektionen, hauptsächlich ausgelöst durch *Aspergillus*- oder *Candida*-Spezies, ein ernsthaftes Problem dar (Jantunen, 1997). Die Inzidenz von Pilzinfektionen bei dieser Patientengruppe liegt zwischen 10 und 25 Prozent (Bow, 2005; Jantunen, 1997), wobei ihr Auftreten häufig in Verbindung mit schwerwiegenden Komplikationen steht (Verfaillie, 1991).

Infektionen mit Fadenpilzen werden zumeist durch Konidiosporen ausgelöst, welche sich im Luftstrom befinden, in die Lungen gelangen und dort aufgrund der reduzierten Abwehrschwäche der Patienten auskeimen und sich vermehren können (Bow, 2005). Im Gegensatz dazu sind *Candida*-Infektionen zumeist auf Organismen der endogenen Gastrointestinal- oder Hautflora zurückzuführen (Sims, 2005). Die Einführung einer antimikrobiellen Prophylaxe führte bei Intensiv- (Rex, 2001) und Krebspatienten (Bow, 2002) zu einer Reduktion der Mortalität in Folge von Pilzinfektionen.

Viele Patienten durchlaufen während ihres stationären Aufenthalts, trotz selektiver Darmdekontamination, fiebrige Episoden. Die Ursache des Fiebers bleibt anfangs zumeist unbekannt, kann aber unter anderem als Zeichen für den Beginn einer Infektion interpretiert werden. Um eine schnelle Ausbreitung der infektiösen Keime im Körper des immunsupprimierten Patienten zu vermeiden, werden umgehend Antibiotika verabreicht, die ein möglichst breites Wirkungsspektrum besitzen. Eine Auswahl häufig verwendeter Antibiotika und Antimykotika ist in Tabelle 1 aufgelistet.

1.2.2 Die Darmflora des Menschen

Der Gastrointestinaltrakt eines Neugeborenen ist bei der Geburt keimfrei. Der erste Kontakt mit Mikroorganismen erfolgt während der Geburt durch Keime der vaginalen und intestinalen Flora der Mutter. Die weitere Entwicklung der Flora ist abhängig von der Ernährung mit Muttermilch (Bifidobakterien) oder Kuhmilch (Bifidobakterien, *Bacteroides*, *Enterobacteriaceae* und Streptokokken). Im Laufe des ersten Lebensjahres stabilisiert sich die intestinale Mikroflora und erreicht allmählich die Zusammensetzung der Erwachsenenflora. Mit zunehmendem Alter wird die Darmflora dann hauptsächlich durch individuelle Ernähungsgewohnheiten bestimmt (Bullen, 1977; Gibson, 1995; Hoogkamp-Korstanje, 1979). Die Zusammensetzung der Stuhlflora wird im Wesentlichen durch Keime des Dickdarms (Colon) determiniert, wobei berücksichtigt werden muss, dass sich sowohl das Artenspektrum, als auch die Bakteriendichte in den verschiedenen Colon-Abschnitten unterscheidet. Man nimmt an, dass etwa 50 Bakterien-Genera im Colon angesiedelt sind, welche sich wiederum aus mehreren hundert Spezies zusammensetzen können.

Tab. 1: Antibiotika. Übersicht der, in der vorliegenden Studie verwendeten Antibiotika. In den Spalten sind neben dem Wirkstoff das Wirkungsspektrum der jeweiligen Therapeutika dargestellt (Aus: Sullivan, 2001; modifiziert).

		Wirkung auf die intestinale Mikroflora			
Gruppe	Wirkstoff	Aerobe Gram-(+) Kokken	*Entero-bacteriaceae*	Anaerobier	Referenz
Penicilline	Penicillin	-	-	-	Adamsson (1997)
	Pipericillin/ Tazobactam	-	↓	↓	Nord (1993)
	Amoxicillin/ Clavulansäure	↑	↑	-	Lode (2001)
Cephalosporine	Ceftazidim	NE	NE	↓	Welling (1991)
Carbapeneme	Imipenem	↑	-	-	van der Leur (1993)
	Meropenem	↑	↓	↓	Bergan (1991)
Lincosamine	Clindamycin	↑	↑	↓↓	Orrhage (1994)
Makrolide	Clarithromycin	↓	↓	-	Brismar (1993)
Glycopeptide	Vancomycin	↓↑	-	↓	Edlund (1997)
	Teicoplanin	↓↑	↑	-	van der Auwera (1996)
Linezolid	Linezolid	↓	↑	↓↓	Lode (2001)
Folsäure-Antagonisten	Cotrimoxazol	-	↓↓	NE	Mavromanolakis (1997)
Chinolone	Ciprofloxacin	-	↓↓	NE	van der Leur (1997)
	Moxifloxacin	↓	↓↓	-	Edlund (2000)
Nitroimidazole	Metronidazol	-	-	-	Nord (1993)
Polyene	Amphotericin B	Hefen und Pilze			
	Nystatin	Hefen und Pilze			
Imidazole	Fluconazol	Hefen und Pilze			
	Voriconazol	Hefen und Pilze			
	Itraconazol	Hefen und Pilze			
Echinocandine	Caspofungin	Hefen und Pilze			

Legende: ↑: Anstieg während der Antibiotikabehandlung; ↓: Moderate Suppression (2-4 log10 KBE / g Feces; ↓↓: Starkte Suppression; ↓↑: Suppression, wobei einige Mikroorganismen dieser Gruppe ansteigen; -: keine signifikante Änderung; NE: nicht bestimmt.

Beim Erwachsenen liegt die Balkteriendichte im Colon bei 10^9 bis 10^{10} Bakterien pro Gramm Stuhl. Die Darmflora wird von Bakterien der Genera *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Clostridales* und *Lactobacillales* dominiert (Donskey, 2003; Gibson, 1995) (Abb. 2). Die Aktivität und Zusammensetzung der bakteriellen Flora wird durch die Verfügbarkeit an Substraten, dem Redoxpotential, dem pH-Wert und dem Sauerstoffpartialdruck bestimmt (Cummings, 1987). Die Mikroorganismen des proximalen Colons wachsen aufgrund des hohen Angebots an Substraten deutlich schneller als Bakterien im distalen Colon, welche mit wesentlich weniger Nährstoffen auskommen müssen.

Die intestinale Mukosa ist die größte Kontaktfläche unseres Immunsystems mit der Umwelt, so dass das lymphatische Gewebe des Verdauungstraktes die größte Anzahl an immunkompetenten Zellen des Körpers besitzt (Brandtzaeg, 1989).

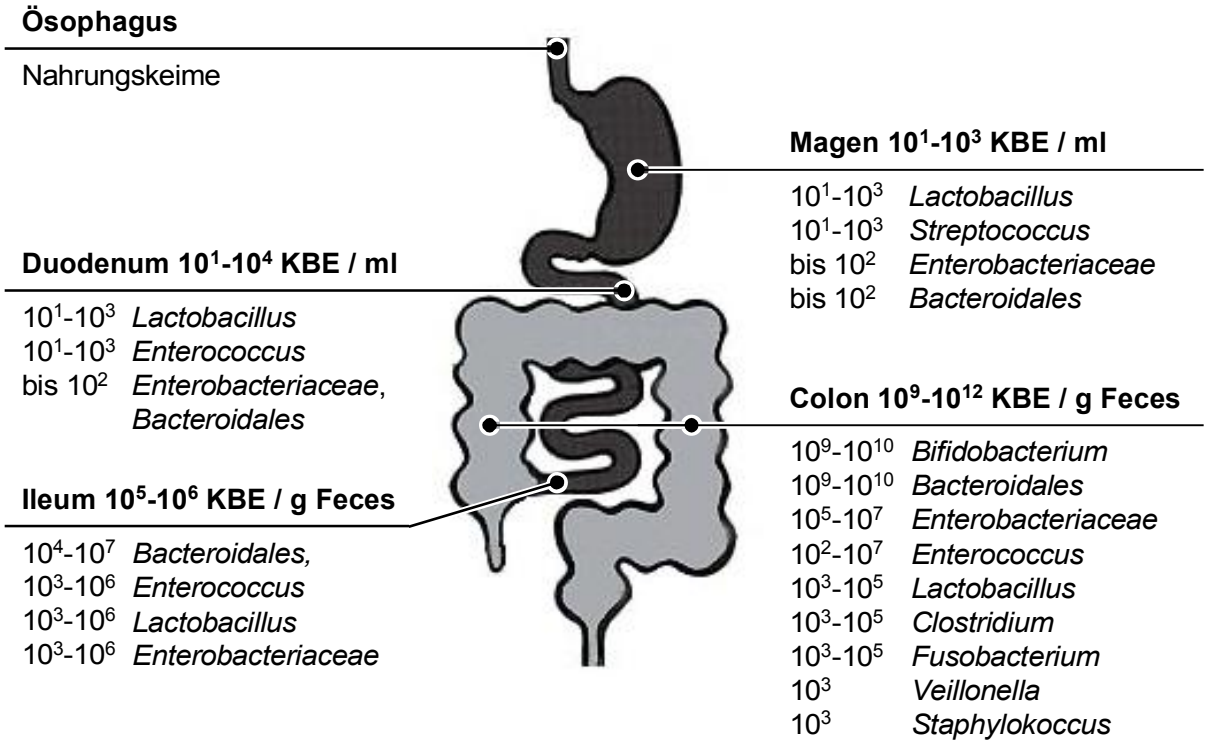


Abb. 2: Zusammensetzung der Flora im Gastrointestinaltrakt. Die Zusammensetzung und Dichte der Flora variiert in den unterschiedlichen Bereichen des Gastrointestinaltraktes. So findet man z.B. im sauren Milieu des Magens hauptsächlich Laktobazillen und Streptokokken (jeweils bis zu 10^3 koloniebildende Einheiten (KBE) pro ml Mageninhalt). Die Colonflora wird im Gegensatz dazu von einer Vielzahl bakterieller Gattungen und Spezies besiedelt, welche insgesamt etwa 10^9 bis 10^{12} KBE pro Gramm Feces ausmachen (Modifiziert nach: Finegold, 1983; Salfinger, 1980; Simon, 1984).

Der „Dialog“ zwischen dem Wirt und den Bakterien an der mukosalen Oberfläche scheint eine wichtige Rolle bei der Entwicklung eines kompetenten Immunsystems zu spielen (Guarner, 2003).Die Reaktionen auf Mikroorganismen basieren auf angeborenen und adaptiven Immunantworten. Angeborene Immunantworten werden zwar einerseits durch die Leukozyten vermittelt (z.B. Neutrophile und Makrophagen), aber auf der anderen Seite sind auch die Epithelzellen darin involviert, da sie die Antwort des Wirtes durch die Synthese von inflammatorischen Mediatoren und Übertragungssignalen koordinieren (Kagnoff, 1997). Doch wie kann das angeborene Immunsystem zwischen potentiell pathogenen Keimen und Bakterien der Normalflora unterscheiden? Die Zellen von Säugetieren exprimieren eine Reihe von Rezeptoren zur Erkennung von Mikroorganismen bzw. deren Bestandteilen und Stoffwechselprodukten, die so genannten Toll Like Rezeptoren (TLR). Dieses System erlaubt dem Organismus schnell auf das Vorhandensein von Bakterien zu reagieren und diese bei Bedarf zu bekämpfen (Medzhitov, 2001). Die genaue

Regulation der Immunantworten über TLRs, sowie die Mechanismen der Unterscheidung zwischen „guten“ und „bösen“ Bakterien, sind noch nicht ausreichend bekannt.

Zu Beginn der vorliegenden Studie gab es Hinweise darauf, dass der Genotyp des Wirtes einen Einfluss auf die bakterielle Zusammensetzung der Darmflora besitzt. Zu diesem Schluss kamen Zoetendal und Mitarbeiter (2001), indem sie die Darmflora von Zwillingen, deren Ehepartner, nicht verwandten Personen, sowie Primaten mittels 16S basierender Denaturierender Gradientengelelektrophorese (DGGE) miteinander verglichen und eine positive Regression zwischen der Ähnlichkeit von DGGE-Bandenprofilen, welche die Zusammensetzung der Darmflora repräsentieren, und der genetischen Verwandtschaft ermitteln konnten. Die Autoren konnten allerdings nicht ausschließen, dass die initiale Akkumulation der Darmflora in der frühen (gemeinsamen) Kindheit und die anschließende Kolonisationsresistenz gegenüber neuen Bakterien für die Ähnlichkeit der DGGE-Profile von Zwillingen verantwortlich waren. Als Indiz dafür kann die Beobachtung gewertet werden, dass die Proben von Ehepartnern, welche teilweise seit 15 Jahren in einem gemeinsamen Haushalt lebten und vergleichbare Ernährungsgewohnheiten besaßen, trotzdem nur geringe Ähnlichkeit aufwiesen (Zoetendal, 2001).

1.3 Molekulare Ökologie

1.3.1.1 Methoden zur Analyse der Darmflora

In der Vergangenheit war die Analyse der Darmflora hauptsächlich von der Entwicklung geeigneter Anreicherungsmethoden und Kultivierungsmedien für anaerobe Mikroorganismen abhängig. Die Isolierung und Charakterisierung der Spezies erfolgte durch den Vergleich phänotypischer und biochemischer Merkmale (Namsolleck, 2004). Die erste große Studie zur Bestimmung der bakteriellen Diversität der Darmflora des Menschen wurde von Moore und Holdeman im Jahre 1974 durchgeführt. Die Analyse der Stuhlproben von 20 japanischen Hawaiianern ergab, dass sich die Darmflora schätzungsweise aus 400 bis 500 verschiedenen

Spezies zusammensetzt, auch wenn zu diesem Zeitpunkt nur 113 Spezies identifiziert werden konnten.
In den vergangenen zehn Jahren stellte sich heraus, dass die taxonomische und phylogenetische Diversität der Darmflora unterschätzt wurde. So zeigten molekulare Analysen, dass der Grossteil der Darmbakterien nicht kultiviert werden kann, da sich viele strikt anaerobe Mikroorganismen durch kulturelles Wachstum *in vitro* nicht anreichern lassen. Der Aufwand der individuellen Isolierung einzelner Kolonien, sowie deren genaue phänotypische Identifizierung ist enorm und kann einige Wochen in Anspruch nehmen. Als Konsequenz daraus folgt, dass Studien zur Analyse der bakteriellen Diversität der Darmflora mit einer geringen Probenzahl auskommen müssen und dass die daraus resutlierenden statistischen Berechnungen nur eingeschränkte Aussagen zulassen. Trotzdem wird die kulturelle Analyse der Darmflora noch immer als „Gold-Standard“ angesehen, auf dessen Basis neu entwickelte Verfahren bewertet werden müssen (Vaughan, 2000).

1.3.2 Die 16S rRNA Gene als molekularer Marker

Die Entdeckung und Beschreibung des Gens für die ribosomale 16S Ribonukleinsäure (16S rRNA) durch Carl Woese und Kollegen (1980) ermöglichte einen neuen Ansatz zur Untersuchung mikrobieller Ökosysteme (Abb. 3). Die Analyse von 16S rRNA Genen hat die Identifizierung und taxonomische Klassifizierung von Mikroorganismen revolutioniert. Die Vorteile dieses Gens als molekularer Marker liegen in der ubiquitären Verbreitung der 16S rRNA in allen prokaryontischen Organismen und in ihren essentiellen Funktionen bei der Proteinbiosynthese, welche die DNA-Sequenz vor Mutationen schützen. Wichtige Sequenzbereiche der 16S rRNA sind demzufolge in allen Bakterienarten hoch konserviert. Mutationen innerhalb von nicht konservierten Sequenzbereichen entsprechen der evolutionären Divergenz der Organismen, was die Grundlage für den Einsatz der 16S rRNA als molekulares Markergen bildet (Vaughan, 2000). Die evolutionäre Verwandtschaft zwischen Mikroorganismen kann nunmehr objektiv durch den Vergleich der 16S Gensequenzen ermittelt werden. Unterschiede in der Sequenz können als Maß für die evolutionäre Distanz und die phylogenetischen Beziehungen herangezogen werden.

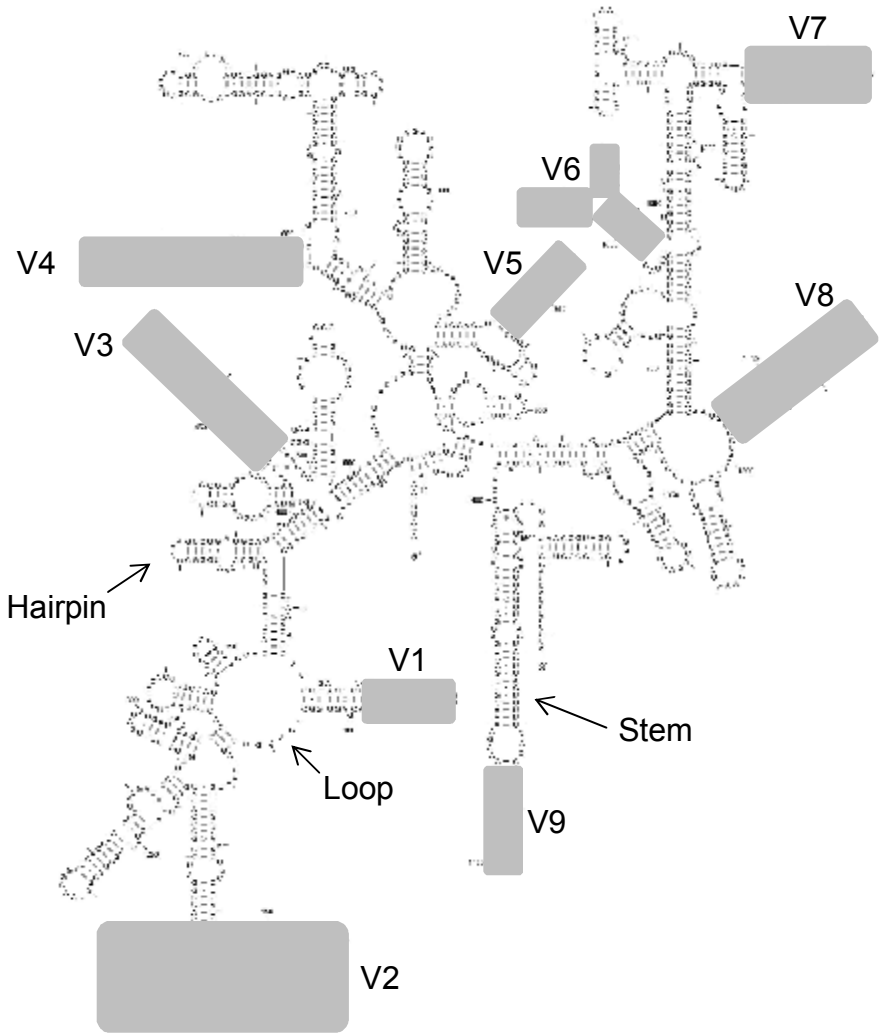


Abb. 3: Sekundärstruktur der 16S rRNA. Das 16S rRNA Gen umfasst, abhängig von der Spezies, 1450 bis 1550 Nukleotide. Nach der Transkription lagert sich das RNA-Molekül in bestimmten Bereichen zusammen und bildet eine Sekundärstruktur, wie sie hier am Beispiel von *E. coli* dargestellt ist. Charakteristisch für die Sekundärstruktur der 16S rRNA ist die Ausbildung von Loop-, Stem- und Hairpin-Strukturen. Die grau hinterlegten Sequenzabschnitte markieren die Bereiche mit speziesspezifischen Sequenzvariabilitäten (V1 bis V9) (Modifiziert nach: Gutell (1985) und Woese (1980); http://www.rna.icmb.utexas.edu).

Aufgrund der Variabilität einzelner Sequenzbereiche ist es möglich, Organismen auf verschiedenen Ebenen phylogenetisch einzuordnen (von der Gattungs- bis zur Speziesebene). Die molekulare Analyse von mikrobiellen Ökosystemen mit Hilfe des 16S rRNA Gens hat einen weiteren entscheidenden Vorteil gegenüber kulturellen Methoden: die Erfassung nicht kultivierbarer Mikroorganismen. Mit Hilfe der Anwendung von 16S rRNA-basierenden Methoden ist es prinzipiell möglich, alle Organismen eines Ökosystems, und somit auch der Darmflora, zu erfassen. Zudem ist die molekulare im Vergleich zur kulturellen Analyse mit wesentlich weniger Aufwand verbunden, was einen deutlich höheren Probendurchsatz pro Zeiteinheit

ermöglicht. Selbstverständlich sind aber auch molekulare Methoden mit Fehlern behaftet (von Wintzingerode, 1997), wie z.B. eine präferentielle Amplifikation oder die Vervielfältigung von 16S rRNA Genen bereits abgestorbener Mikroorganismen. Durch den Einsatz spezifischer Methoden kann dieses Problem reduziert (z.B. Peptide Nucleic Acids (PNAs); von Wintzingerode, 2000) bzw. umgangen werden (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH); Moter, 2000).

1.3.2.1 Molekulare Methoden zur Analyse der Darmflora

Wie im vorhergehenden Kapitel dargelegt wurde, kann die phylogenetische Verwandtschaften von Bakterien anhand der vergleichenden Sequenzanalyse von 16S rRNA Genen ermittelt werden. Üblicherweise werden die Gene zu diesem Zweck aus geeigneten Proben amplifiziert, in Vektoren kloniert und anschließend sequenziert. Diese Technik liefert die detailliertesten Ergebnisse zur Zusammensetzung von mikrobiellen Habitaten. Allerdings ist diese Art der Analyse mit einem erheblichen Aufwand verbunden und wird daher nur für spezifische Fragestellungen angewandt (z.B. Eckburg, 2005; Hold, 2002; Suau, 1999). Die besonderen Eigenschaften der 16S rRNA in Bezug auf konservierte und variable Sequenzbereiche (Abb. 3) haben zur Entwicklung einer Reihe von Methoden geführt, welche sich in zwei Gruppen unterteilen lassen. Zum einen besteht die Möglichkeit der Entwicklung sequenzspezifischer DNA-Sonden für die Detektion von Mikroorganismen *in situ* (FISH; Moter, 2000) oder *ex vivo* (Dot-Blot; Manz, 1996). Diese Methoden sind jedoch abhängig von der Kenntnis der zu untersuchenden Sequenzen. Zum anderen nutzt man für die Analyse komplexer unbekannter Habitate offene Systeme, basierend auf der Amplifikation definierter Bereiche der 16S rRNA Gene. Die Amplifikationsprimer binden in der Regel an konservierte Sequenzabschnitte und vervielfältigen so einen oder mehrere variable Bereiche der 16S rRNA. Die Trennung der amplifizierten Fragmente erfolgt anschließend durch direkte Analyse (z.B. DGGE, Temperatur Gradientengelelektrophorese (TGGE), DHPLC oder Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)) oder weiterführende Experimente (z.B. Terminaler Restriktionsfragment Längenpolymorphismus (T-RFLP)).

1.3.2.1.1 Elektrophorese von 16S rRNA Genen in einem Gradienten

Bereits im Jahr 1993 wurde von Muyzer und Kollegen eine Methode zur elektrophoretischen Trennung von 16S rRNA Genen in einem chemischen Gradienten, die DGGE, vorgestellt. Die amplifizierten 16S rRNA Gene besitzen alle eine ähnliche Länge, so dass deren Trennung im Polyacrylamidgel sequenzspezifisch erfolgt. So resultieren Sequenzvariabilitäten innerhalb der Amplifikate in unterschiedlichen Schmelzeigenschaften der DNA-Moleküle, die für die Auftrennung in einem denaturierenden Gradienten aus Harnstoff und Formamid in der Trennmatrix (Polyacrylamid-Gel) genutzt werden. Schnell schmelzende Moleküle mit einem niedrigen GC-Gehalt und einer entsprechend hohen Anzahl von Schmelzdomänen bleiben schon frühzeitig im Gel hängen, während Moleküle mit wenigen Schmelzdomänen (hoher GC-Gehalt) bis zum unteren Rand des Gels laufen können.
Bei der TGGE, einer der DGGE verwandten Methode, wird die sequenzspezifische Trennung der Amplifikate mittels eines Temperaturgradienten erreicht.

1.3.2.1.2 Denaturierende High Performance Liquid Chromatography

Das Trennprinzip der DHPLC ist dem der DGGE und TGGE ähnlich. Die Trennung der Amplifikate erfolgt allerdings nicht durch elektrophoretische Kräfte in einem chemischen oder temperaturabhängigen Gradienten, sondern durch sequenzabhängige Bindungseigenschaften der teilweise denaturierten DNA an das Säulenmaterial.
Da die DHPLC erst kürzlich für die Analyse von bakteriellen 16S rRNA Genen verwendet wurde, existieren im Vergleich zur DGGE nur wenige Daten. Erste Versuche von William Hurtle (2002 und 2003) und Eugen Domann (2003) beschränkten sich noch auf die Trennung weniger Stämme. Darauf folgende Publikationen zeigten, dass diese Methode als Ergänzung zu den etablierten Methoden für molekulare Analysen von Mikroorganismen an Popularität gewinnt (Barlaan, 2005; Goldenberg, 2005b).

1.3.2.1.3 Terminaler Restriktionsfragment Längenpolymorphismus

Ebenso wie die DGGE und TGGE wurde auch die T-RFLP häufig zur Untersuchung von mikrobiellen Habitaten verwendet (Clement, 1998; Liu, 1997; Marsh, 1999). Bei der T-RFLP wird das terminale Restriktionsfragment, in der Regel das 5'-Ende des PCR-Produkts, mit einem Fluorophor markiert. Die markierten Fragmente werden nach einem enzymatischen Restriktionsverdau in einer Kapillarelektrophorese-Apparatur detektiert, sowie deren Größe determiniert. Anhand der Größenangaben kann man Rückschlüsse auf den bakteriellen Ursprung des 16S rRNA Gens schließen. Bei diesem Verfahren handelt es sich um ein geschlossenes System, da die Auswertung von einer entsprechenden Datenbank abhängig ist.

1.3.2.1.4 Echtzeit-PCR

Die bisher vorgestellten Analysemethoden lassen ausschließlich qualitative Aussagen über die Zusammensetzung von mikrobiellen Habitaten zu. Eine der populärsten molekularen Methode für die quantitative Analyse ist die Echtzeit PCR. Mit Hilfe von DNA-Lösungen bekannter Konzentration können Rückschlüsse auf DNA-Konzentrationen in Probelösungen gezogen werden. Durch vergleichende Analysen kann man so den Anteil eines spezifischen PCR-Produkts, z.B. einer bakteriellen Gattung, am Gesamtprodukt, z.B. aller bakterieller Spezies, bestimmen (Goldenberg, 2005a). Es beseht daher die Möglichkeit, mittels spezifischer PCR-Reaktionen einzelne bakterielle Gattungen zu quantifizieren und diese einer eubakteriellen PCR-Reaktion gegenüber zu stellen.

1.3.2.1.5 Sonden-basierte Techniken der molekularen Ökologie

Die FISH ist wohl die bekannteste Sonden-basierte Methode in der mikrobiellen Ökologie (Moter, 2000). Mit dieser Methode ist man in der Lage, die Lokalisierung von Bakterien im Gewebe, sowie im Verbund zu visualisieren. Zudem detektiert man ausschließlich lebende Organismen bzw. jene, die zum Zeitpunkt der Probenahme noch am Leben waren. Bei der Methode handelt es sich um ein geschlossenes System, was die Analyse von komplexen Floren mit unbekannten Spezies schwierig

macht, da die Etablierung neuer Sonden immer abhängig von der vorhandenen Sequenzinformation ist. Die Automatisierung und somit der hohe Durchsatz von Proben erfordert aber einen erheblichen technischen Aufwand. Mit steigender Komplexität der zu untersuchenden Proben steigt auch die Anzahl benötigter Sonden, was den Umfang der Analyse erweitert. Eine Möglichkeit zur Steigerung des Durchsatzes ist die Verwendung eines Durchflußzytometers (Namsollek, 2004).

Tab. 2: Methoden zur mikrobiellen Analyse unbekannter Habitate. In dieser Tabelle sind die wichtigsten Methoden zur mikrobiellen Analyse unbekannter Habitate, sowie deren Anwendungsbereiche und Nachteile, aufgelistet (Tab. mod. nach: Zoetendal, 2004).

Methode	Anwendung	Nachteile
Kultivierung	Isolierung von Mikroorganismen	Nicht repräsentativ
	"Gold-Standard"	Langsam und sehr aufwendig
Sequenzierung	Phylogenetische Identifizierung	Sehr aufwendig
		Bias in der PCR
DGGE/TGGE/DHPLC	Molekularer Fingerabdruck des Ökosystems	Bias in der PCR
	Monitoring des Ökosystems	Semi-quantitativ
		Aufwendige Identifizierung
T-RFLP	Molekularer Fingerabdruck des Ökosystems	Bias in der PCR
	Monitoring des Ökosystems	Semi-quantitativ
	Für Hochdurchsatz geeignet	Bedingte Identifizierung
		Geschlossenes System
SSCP	Molekularer Fingerabdruck des Ökosystems	Bias in der PCR
	Monitoring des Ökosystems	Semi-quantitativ
		Aufwendige Identifizierung
FISH	Detektion und Quantifizierung	Bedingte Identifizierung
		Geschlossenes System
Dot-Blot	Detektion	Geschlossenes System
		Sehr aufwendig
		Bias in der PCR
Echtzeit-PCR	Detektion und Quantifizierung	Geschlossenes System
		Bias in der PCR
Microarrays	Detektion	Geschlossenes System
	Für Hochdurchsatz geeignet	Bias in der PCR

Eine weitere Sonden-basierte Methode ist die Dot-Blot Hybridisierung, bei der 16S rRNA Amplikons auf einer Membran fixiert und mit entsprechenden Sonden detektiert werden (Manz, 1996). Je nach Umfang der aufgetragenen Sequenzen kann man auf diese Weise semi-quantitative Aussagen treffen. Um den Durchsatz zu erhöhen, verwendet man heutzutage DNA-Microchips bzw. Microarrays, welche auf dem Prinzip der Dot-Blots beruhen (Wang, 2002). Wie bereits für die FISH geschildert,

liegen die Nachteile dieser Methode in der Auswahl geeigneter Sonden und der Kenntnis der zu untersuchenden Sequenzen.

Zusätzlich zu den oben aufgelisteten Methoden gibt es noch weiterere molekulare Verfahren, wie z.B. die Methode zur Untersuchung von Einzelstrang-Konformations-Polymorphismen (SSCP; Hori, 2005; Widjojoatmodjo, 1994) sowie die MALDI-TOF Analyse (Matrix assisted laser desorption/ionisation time-of-flight Massenspektrometer; Taranenko, 2002; von Wintzingerode, 2002). Die Verwendung von molekularen oder kulturellen Verfahren, sowie die Wahl der geeigneten Methode, ist letztendlich immer von der Fragestellung und dem zu erreichenden Ziel abhängig. Mögliche Anwendungen und Vor- bzw. Nachteile der genannten Analyseverfahren sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

2 Fragestellungen und Ziele

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die globale Analyse und Beschreibung der bakteriellen Flora in Stuhlproben von Patienten mit hämatologischen Krebserkrankungen. Zur Beantwortung dieser Fragestellung sollten neue molekularbiologische Verfahren entwickelt bzw. adaptiert, und mit bereits etablierten Methoden verglichen werden. Das gewählte Verfahren musste vor allem der hohen Probenanzahl gerecht werden und in der Lage sein, Veränderungen innerhalb der bakteriellen Flora reproduzierbar anzuzeigen, um folgende klinische Fragestellungen beantworten zu können:

I) Wie verändert sich die Darmflora in Abhängigkeit von der Therapie, insbesondere während der Gabe von Antibiotika?

II) Wie wirkt sich die Gabe von Antibiotika auf die Resistenzsituation innerhalb der Darmflora aus?

III) Welchen Einfluss hat die Zusammensetzung der Darmflora auf klinische Parameter und *vice versa*?

3 Material und Methoden

3.1 Puffer, Nährmedien und sonstige Lösungen

Elutionspuffer (DGGE-Banden): 10 mM Tris (pH8,0; Roth, Karlsruhe; gepuffert mit Salzsäure; Roth, Karlsruhe), 50 mM Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt), 15 mM Magnesiumchlorid (Merck, Darmstadt), 0,1 % Triton X-100 (Serva, Heidelberg), mit Aqua dest auf ein Endvolumen von 50 mL.

Entwickler (Silberfärbung): 67,4 g Natriumcarbonat-Decahydrat (Roth, Karlsruhe), 1 mL 2 % Natriumthiosulfat (w/v; Roth, Karlsruhe), 3,5 mL 37 % Formaldehyd (Roth, Karlsruhe), mit Aqua dest auf ein Endvolumen von 1000 mL.

Färbelösung (Silberfärbung): 1 g Silbernitrat (Roth, Karlsruhe), 3,5 mL 37 % Formaldehyd (Roth, Karlsruhe), mit Aqua dest auf ein Endvolumen von 1000 mL.

FISH-Lösung: 1 mL PBS (s.u.), 1 mL Ethanol (absolut; Roth, Karlsruhe), 200 µL 37% Formaldehyd (Roth, Karlsruhe).

LB-Agar: 10 g Trypton (Difco, Detroit, USA), 5 g Hefeextrakt (Roth, Karlsruhe), 10 g Natriumchlorid (Merck, Darmstadt), 15 g Agar-Agar (Roth, Karlsruhe), mit Aqua dest auf ein Endvolumen von 1000 mL. Nach dem Autoklavieren auf ca. 50 °C abkühlen lassen; dann Zugabe von 1000 µL Ampicillin (50 mg / mL; Sigma-Aldrich, Steinheim), 200 µL 1M Isopropyl-beta-Thiogalactopyranosid (IPTG; Sigma-Aldrich, Steinheim) und 1000 µL X-Gal (Sigma-Aldrich, Steinheim; 100 mg / mL X-Gal in Dimethylsulfoxid; Merck, Darmstadt).

LB-Glycerin-Flüssigmedium: 10 g Trypton (Difco, Detroit, USA), 5 g Hefeextrakt (Roth, Karlsruhe), 10 g Natriumchlorid (Merck, Darmstadt), 700 mL Glycerin (Fluka, Neu-Ulm), mit Aqua dest auf ein Endvolumen von 1000 mL.

Lysis-Puffer: 10 mM Tris (pH8,0; Roth, Karlsruhe; gepuffert mit Salzsäure; Roth, Karlsruhe), 150 mM Natriumchlorid (Merck, Darmstadt), 20 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA; pH8,0; Sigma-Aldrich, Steinheim), 0,5 % Sodiumdodecylsulfat (SDS; Bio-Rad, München), mit Aqua dest auf ein Endvolumen von 100 mL.

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS; pH7,4): 8 g Natriumchlorid (Merck, Darmstadt), 0,2 g Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt), 1,44 g Natriumhydrogenphosphat, mit Aqua dest auf ein Endvolumen von 1000 mL.

Probenpuffer für die Agarose-Gelelektrophorese: 1,5 g Ficoll (Sigma-Aldrich, Steinheim), 25 mg Bromphenolblau (Bio-Rad, München), 25 mg Xylencyanol (Bio-Rad, München), mit Aqua dest auf ein Endvolumen von 10 mL.

Probenpuffer für die DGGE: 250 µL Bromphenolblau (2 %; Bio-Rad, München), 250 µL Xylene Canole (2 %; Bio-Rad, München), 7 mL Glycerin (Fluka, Neu-Ulm), mit Aqua dest auf ein Endvolumen von 2,5 mL.

Probenpuffer für die TGGE: 2x TAE-Puffer (s.u.), 0,1 % Triton X-100 (v/v; Serva, Heidelberg), 0,01 % Bromphenolblau (w/v; Bio-Rad, München), 0,01 % Xylene Cyanole FF (w/v; Bio-Rad, München), 2 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim).

Puffer A (Transgenomic, Omaha, NE): 0,1 M Triethylammoniumacetat (TEAA).

Puffer B (Transgenomic, Omaha, NE): 0,1 M TEAA, 25 % Acetonitril (v/v).

Silika-Suspension: 2,5 g Silika (Sigma-Aldrich, Steinheim), 6 M Natriumjodid (Roth, Karlsruhe), mit Aqua dest auf ein Endvolumen von 25 mL.

Silika-Waschpuffer (pH7,5): 50 mM Natriumchlorid (Merck, Darmstadt), 10 mM Tris (Roth, Karlsruhe), 2,5 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim), 50 % Ethanol (v/v; Roth, Karlsruhe).

Stammlösung I (0 %) für DGGE: 50 mL RapidGel XL (40 %; USB, Cleveland, USA), 2,5 mL 50x TAE (s.u.), 5 mL Glycerin (Fluka, Neu-Ulm), mit Aqua dest auf ein Endvolumen von 250 mL.

Stammlösung II (100 %) für DGGE: 105,4 g Harnstoff (Roth, Karlsruhe), 100 mL Formamid (Amresco, Solon, USA), 50 mL RapidGel XL (40 %; USB, Cleveland, USA), 2,5 mL 50x TAE (s.u.), 5 mL Glycerin (Fluka, Neu-Ulm), mit Aqua dest auf ein Endvolumen von 250 mL.

TAE-Puffer (50x; pH8,0): 242 g Tris (Roth, Karlsruhe), 57,1 mL Essigsäure (Roth, Karlsruhe), 100 mL 0,5 M EDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim), mit Aqua dest auf ein Endvolumen von 1000 mL.

TBE-Puffer (10x; pH8,0): 108 g Tris (Roth, Karlsruhe), 55 g Borsäure (Roth, Karlsruhe), 6,42 g EDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim), mit Aqua dest auf ein Endvolumen von 1000 mL.

TE-Puffer (pH8,0): 0,01 M Tris (pH8,0; Roth, Karlsruhe), 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim).

3.2 Oligonukleotide

Tab. 3: Oligonukleotid-Sequenzen. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in 5‘-3‘ Richtung angegeben. Die GC-Klammern der Oligonukleotide F-968 und F-968-30GCT sind durch eckige Klammern gekennzeichnet.

Oligonukleotid	Sequenz (5´→ 3´)
Bac784r	ACTACYRGGGTATCTAATCC
CGH-f	GCATCGATGAAGAACGCAGC
CGH-r	TCCTCCGCTTATTGATATGC
F-968	AACGCGAAGAACCTTAC
F-968-30GCT	[CGCCCGCCGCCGCCCGCCGCCCGTCCCGCC] AACGCGAAGAACCTTAC
F-968-GC	[CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG] AACGCGAAGAACCTTAC
M13-(20)	TGTAAAACGACGGCCAGT
M13-rev	AACAGCTATGACCATG
RTU2	TGCCTCCCGTAGGAGTYTGG
RTU3	GWATTACCGCGGCKGCTG
RTU5	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT
RTU6	ATTGTAGCACGTGTGTMGCCC
RTU7	ACAAGRCCCGGGAACGTATT
RTU8	AAGGAGGTGATCCANCCRCA
rP2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT
R-1378	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG
TPU1	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
TPU1Dy4	wie TPU1; D4-Markierung am 5'-Ende (Proligo, Hamburg)
TPU2	CCARACTCCTACGGGAGGCA
TPU3	CAGCKGCCGCGGTAATWC
TPU4	GGATTAGATACCCTGGTAGTCC
TPU5	AAACTYAAAKGAATTGACGG
TPU6	GGGCMACACACGTGCTACAAT

Wobble-Nukleotide: K=G/T, M=A/C, N=A/C/G/T, R=A/G, W=A/T, Y=C/T

3.3 Referenzstämme

Tab. 4: Liste der Referenzstämme

Stamm	Stammsammlung / Nummer
Bakterien	
Bacteroides fragilis	ATCC 25285
Bacteroides thetaiotaomicron	ATCC 29741
Bifidobacterium longum	DSMZ 20219
Clostridium histolyticum	DSMZ 627
Clostridium perfringens	ATCC 125
Clostridium sporogenes	ATCC 19409
Clostridium xylanolyticum	DSMZ 6555
Enterococcus casseliflavus	ATCC 25788
Enterococcus faecalis	ATCC 29212

Tab. 4 (Fortsetzung)

Stamm	Stammsammlung / Nummer
Bakterien	
Enterococcus faecium	BM 4147
Enterococcus gallinarum	BA 4174
Escherichia coli TOP10F'	Invitrogen, Paisley, UK
Prevotella bivia	ATCC 29303
Sprosspilze	
Candida membranaefaciens	ATCC 201377
Candida tropicalis	DSMZ 5991
Candida parapsilosis	ATCC 90018
Candida magnoliae	ATCC 201379
Candida lusitaniae	DSMZ 70102
Candida dubliniensis	CBS 7987
Candida albicans	ATCC 90028
Candida inconspicua	DSMZ 70631
Candida krusei	ATCC 6258
Cryptococcus neoformans	ATCC 90112
Candida kefyr	DSMZ 11954
Candida glabrata	ATCC 90030
Trichosporon mucoides	ATCC 201383
Candida norvegensis	DSMZ 70760
Saccharomyces cerevisiae	ATCC 9763

3.4 Patientenstatistik

Die Stuhlproben zur Durchführung der vorliegenden Studie wurden in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie am Campus Virchow Klinikum (CVK) der Charité – Universitätsmedizin Berlin, gesammelt. In die Studie wurden 45 Patienten eingeschlossen und entsprechend ihrer Therapie in drei Hauptgruppen unterteilt. Die Gruppe der allogen transplantierten Personen beinhaltete 20, die der autolog transplantierten 12 und die der chemotherapierten 13 Patienten. In den Tabellen 5A und 5B sind die charakteristischen Patientendaten, wie z.B. Art der Erkrankung und Anzahl der Proben, aufgelistet.

3.4.1 Patienten der Studie zur intestinalen GvHD

Zur Untersuchung des Einflusses der bakteriellen Flora auf die Entwicklung einer akuten intestinalen GvHD wurden 85 Stuhlproben von 34 Patienten (Institut für Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin am Campus Benjamin Franklin; Charité - Universitätsmedizin Berlin) analysiert. Die Proben wurden vor

Transplantation, während des Engraftments und 10-30 bzw. 31-50 Tage nach Transplantation, sowie während einer histologisch abgesicherten intestinalen GvHD bzw. zum equivalenten Zeitpunkt (Patienten ohne GvHD) gesammelt. Die Dekontamination wurde entweder mit Levofloxacin (n=26) oder Ciprofloxacin (n=8) durchgeführt. Zusätzlich erhielten alle Patienten eine Prophylaxe mit Cotrimoxazol gegen *P. carinii* Pneumonien (6 bis 2 Tage vor Transplantation). Die intestinale GvHD wurde nach histopathologischen Kriterien diagnostiziert (Sale, 1979).

Tab. 5: Patientenstatistik CVK

A

	Therapie			Gesamt
	Allogen	Autolog	Chemo	
Anzahl der Patienten	20	12	13	45
Durchschnittsalter	40,4	48,1	43,3	
Geschlecht				
Männlich	10	8	5	23
Weiblich	10	4	8	22
Art der Erkrankung				
AML	6	0	9	15
ALL	7	0	3	10
CML	5	0	0	5
Plasmozytom	0	6	0	6
Andere (Tab. 5B)	2	6	1	9
Proben				
Stuhl	165	56	77	298

B

	Therapie		
	Allogen	Autolog	Chemo
Myelodysplasie	1	0	0
Osteomyelosclerosis	1	0	0
Non-Hodgkin Lymphom	4	0	1
Hodgkin-Lymphom	0	1	0
Systemischer Lupus Erythematodes	0	1	0

3.5 Probennahme und Präparation

Die Stuhlproben (CVK) wurden bei Aufnahme, Transplantation, in der Neutropenie, zum Zeitpunkt des Takes, während des Engraftments, bei Entlassung und ca. 100 Tage nach Entlassung eingesammelt. Die frischen Proben, durchschnittlich 2 bis 3 g, wurden noch am gleichen Tag für die verschiedenen Analysen präpariert und

aufgeteilt. Für die DNA-Präparation wurde ein Aliquot der Probe (ca. 1 g) in 10 mL Lysis-Puffer überführt und bei -20 °C eingefroren. Ein weiterer Teil (ca. 1 g) wurde für retrospektive kulturelle Analysen in 1,5 mL LB-Glycerin-Flüssigmedium bei -80 °C konserviert. Das dritte Aliquot (ca. 1 g) wurde für die FISH in 1,5 mL FISH-Lösung überführt und bei -20 °C eingefroren.
Die Proben für die Durchführung der Studie zur akuten intestinalen GvHD (s. o.) wurden im nativen Zustand bei -20 °C eingefroren. Nach dem Transfer wurden die Stuhlproben aufgetaut, 1 g Feces abgewogen und in 10 mL Lysis-Puffer überführt.

Alle klinischen Parameter (z.B. Antibiotikabehandlung, Durchfälle oder Fieber) wurden von einer Mitarbeiterin auf der Station erfasst und dokumentiert.

3.5.1 Präparation der DNA aus den Stuhlproben

Die DNA wurde aus 1 mL homogenisiertem Feces/Lysis-Puffer - Gemisch präpariert. Nach Zugabe von 10 µL Proteinase K (10 U / mL; Sigma-Aldrich, Steinheim) und anschließender einstündiger Inkubation bei 56 °C wurde das Gemisch mit 150 µL Phenol (Roth, Karlsruhe) und 0,2 g Zirkonium-Perlen (Biospec, Bartlesville, USA) versetzt und, mit dem Ziel der mechanischen Zerstörung bakterieller Zellwandbestandteile, dreimal 30 s auf Stufe 5,5 in der FastPrep FP120 (Bio101) geschüttelt. Die Zelltrümmer wurden nach der Zugabe von 150 µL Chloroform:Isoamylalkohol (24:1; v/v; Merck, Darmstadt) für 5 min bei 16000 x *g* abzentrifugiert und die wässrige DNA-haltige Phase in ein frisches Gefäß überführt. Die Extraktion mit Chloroform:Isoamylalkohol wurde einmal wiederholt. Zur weiteren Aufreinigung und Konzentration wurde die DNA aus der wässrigen Phase mit Hilfe von 0,1 Volumenteilen 3 M Natriumacetat (Sigma-Aldrich, Steinheim) und 2,5 Volumenteilen Ethanol (absolut; Roth, Karlsruhe) auf Eis für 1 h ausgefällt. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 16000 x *g* wurde das DNA-Pellet zweimal mit 70 % Ethanol (v/v; Roth, Karlsruhe) gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge VR-1 (Heraeus Instruments, Hanau) getrocknet und anschließend in 100 µL TE-Puffer resuspendiert. Als Negativkontrolle der Präparation wurde parallel Lysis-Puffer ohne Probenmaterial aufgearbeitet. Mit dieser Kontrolle konnte eine Kontamination während der Aufarbeitung ausgeschlossen werden.

3.6 Methoden

3.6.1 Agarose Gelelektrophorese

Alle DNA-Fragmente wurden nach der PCR-Reaktion, beziehungsweise nach Aufreinigung mit Silika oder QIAquick (s.u.), in einem Agarose-Gel überprüft. Die Menge der Agarose (Roth, Karlsruhe) zur Herstellung der Gele war abhängig von der Länge des zu erwartenden Fragments. Kurze Amplifikate mit weniger als 1000 Basenpaaren (bp) wurden in 2%igen (w/v) Gelen, längere Amplifikate in 1%igen (w/v) Gelen aufgetrennt. Die Agarose wurde in 1x TBE Puffer bis zur völligen Schmelze erhitzt, das Gemisch anschließend mit 10 µg / mL Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt) versetzt und auf einen geeigneten Träger gegossen, wo das Gel aushärtete. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer vermischt und auf das Agarose-Gel aufgetragen. Die Trennung der Proben erfolgte über einem Zeitraum von 30 min in 1x TBE Puffer bei einer angelegten Spannung von 130 V. Mit Hilfe des Ethidiumbromids im Gel konnten die DNA-Fragmente nach dem Lauf im UV-Licht als Banden sichtbar gemacht und dokumentiert werden (GeneGenius, SynGene, Cambridge, UK).

3.6.2 Silika-Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Menge der verwendeten Reagenzien für die Silika-Aufreinigung (Boyle, 1995) wurde proportional an das Volumen des PCR-Reaktionsgemischs angepasst. Die im folgenden aufgeführten Volumenangaben beziehen sich auf ein Standard-PCR-Volumen von 50 µL. Dem PCR-Reaktionsgemisch wurden 90 µL 6 M Natriumjodidlösung und 7 µL Silika-Suspension zugegeben und der Mix 10 min bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Der Überstand wurde nach einminütiger Zentrifugation bei 16000 x *g* verworfen und das Pellet zweimal mit Silika-Waschpuffer gewaschen. Die DNA-Fragmente wurden anschließend mit Hilfe von 50 µL TE-Puffer bei einer Temperatur von 50 °C von den Silika-Partikeln eluiert. Nach 10 Minuten Inkubationszeit wurden die Partikel von der wässrigen DNA-haltigen Phase mittels Zentrifugation für 1 min bei 16000 x *g* getrennt. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden anschließend in einem Agarose-Gel überprüft.

3.6.3 DGGE zur Analyse von 16S rRNA Fragmenten

Im Vorfeld der Analyse von Proben mittels DGGE wurde eine PCR-Amplifikation von 16S rRNA Genfragmenten durchgeführt. Die Oligonukleotide F-968-GC und R-1378 (Tab. 3) banden an konservierte Sequenzabschnitte der 16S rRNA und amplifizierten die variablen Regionen 6 bis 8 (Abb. 3). Die Amplifikation der etwa 400 bp langen Fragmente erfolgte in Ansätzen von 50 µL mit folgender Zusammensetzung: 20-100 ng DNA als Vorlage, 0,3 µM der jeweiligen Oligonukleotide, 1x PCR-Puffer (Applied Biosystems, Foster City, USA), 2,5 mM Magnesiumchlorid (Applied Biosystems, Foster City, USA), 200 µM dNTPs (Roche, Mannheim), 400 ng BSA (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) und 5 U AmpliTaq DNA-Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, USA). Die PCR wurde in einem T3-Thermocycler (Biometra, Göttingen) mit folgenden Parametern durchgeführt: initiale Denaturierung für 7 min bei 95 °C, gefolgt von 30 Zyklen mit jeweiliger Denaturierung für 30 s bei 93 °C, Bindung der Oligonukleotide für 1 min bei 60 °C und Strangverlängerung für 1 min bei 72 °C, sowie einer zusätzlichen finalen Strangverlängerung für 30 min bei 72 °C. Die Amplifikation wurde mit Hilfe von Wasser (Negativkontrolle) und einer aus *E. coli* aufgearbeiteten Kontroll-DNA (Positivkontrolle) überprüft. Die amplifizierten 16S rRNA Genfragmente wurden anschließend in einem 2%igen Agarose-Gel (w/v) unter Verwendung eines Standards (GeneRuler 50 bp DNA ladder; MBI Fermentas, St. Leon-Rot) kontrolliert. Vor dem Auftragen auf das DGGE-Gel wurden die PCR-Produkte mit Hilfe der Silika-Methode aufgereinigt und anschließend mit DGGE-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 gemischt.

Die Präparation der DGGE-Gele erfolgte nach Angaben des Herstellers (Bio-Rad, München). Der denaturierende chemische Gradient aus Harnstoff und Formamid wurde unter Verwendung eines Gradientenmischers (Model 475 Gradient Delivery System, Bio-Rad, München) aufgebaut. Die 30 und 50%ige Gebrauchslösung für die Analyse von 16S rRNA Fragmenten wurde aus den Stammlösungen I (0 %) und II (100 %) hergestellt. Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von 30 µL 10 % Ammoniumperoxysulfat (w/v) (APS; Roth, Karlsruhe) und 13 µL N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED; Roth, Karlsruhe) eingeleitet. Die Fragmente wurden in dem 8%igen Polyacrylamidgel für 16 h bei 80 V und 60 °C in 0,5x TAE Puffer aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte entweder in der DCode oder in der

DGene Apparatur (beide Bio-Rad, München), was allerdings keinen Einfuß auf das Resultat hatte.

Nach der Elektrophorese wurden die Fragmente durch eine Silberfärbung als Banden im Gel sichtbar gemacht. Im ersten Schritt wurde die DNA im Gel durch Inkubation mit 30 % Ethanol (v/v; Roth, Karlsruhe) und 10 % Essigsäure (v/v; Roth, Karlsruhe) für 30 min im Gel fixiert. Nach zweimaliger, halbstündiger Sensitivierung mit 30 % Ethanol (v/v; Roth, Karlsruhe) wurde das Gel fünfmal 10 min mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit Färbelösung für 30 min gefärbt. Das Gel wurde ein weiteres Mal gewaschen und anschließend mit Entwickler behandelt. Die Entwicklungsreaktion konnte mit 10 % Essigsäure (v/v; Roth, Karlsruhe) abgebrochen werden. Das Gel wurde abschließend digitalisiert und elektronisch dokumentiert.

Die Auswertung der Gele erfolgte automatisch mit Hilfe der Bionumerics-Software (AppliedMaths, Belgien). Die Anzahl der ausgezählten Banden stellte ein Maß für die Diversität von amplifizierten 16S rRNA Genfragmenten einer Probe dar. Mehr als 20 Banden wurde als Wert für eine hohe Diversität, mehr als 5 und weniger 20 Banden als Wert für eine reduzierte Diversität und weniger als 5 Banden als Wert für eine geringe Diversität festgelegt. Als Maß für die Ähnlichkeit zweier Proben wurde der Sörensen/Dice-Index (I_S; Magurran, 1988; Murray, 1996) ermittelt. Der Index ist ein Quotient aus der doppelten Anzahl gemeinsamer Banden und der Summe der Banden der jeweiligen Proben (Diversität):

$$I_S \text{ x } 100\,(\%) = \frac{2 \text{ x Anzahl gemeinsamer Banden}}{\text{Diversität Probe } 1 + \text{Diversität Probe } 2}$$

Für ausgewählte Beispiele wurde eine 16S rRNA-Sequenzanalyse von DGGE-Banden durchgeführt. Die Elution von DNA aus DGGE-Gelen, welche zuvor mit Silbernitrat gefärbt wurden, war in den meisten Fällen schwierig und führte oft zu negativen Ergebnissen bei der darauf folgenden Reamplifikation. Aus diesem Grund wurden die Gele stattdessen für 20 min mit 10 µg / mL Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt) gefärbt. Unter UV-Licht konnten die Banden sichtbar gemacht und mit Hilfe eines sterilen Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten werden. Die Gelstücke wurden in 100 µL Elutionspuffer überführt und darin für 20 min bei 95 °C inkubiert, wobei ein Teil der DNA-Fragmente aus dem Gel in den Puffer übergingen. Die eluierte DNA diente als Vorlage für die Reamplifikation mit den Oligonukleotiden F-

968 und R-1378 (Tab. 3), wie oben beschrieben. Die etwa 400 bp langen PCR-Produkte wurden in einem 2%igen Agarose-Gel unter Verwendung eines DNA-Standards (GeneRuler 50 bp DNA ladder; MBI Fermentas, St. Leon-Rot) überprüft und anschließend mit der Silika-Methode aufgereinigt. Alle aufgearbeiteten 16S rRNA Genfragmente wurden zunächst mit dem Oligonukleotid F-968 (Tab. 3) sequenziert (Kap. 3.6.5). Aufgrund ähnlicher Laufeigenschaften verschiedener 16S rRNA Fragmente im DGGE-Gel konnte es zu Überlagerungen von Sequenzen kommen. In diesem Fall war eine Auswertung nach der Sequenzierreaktion nicht möglich, was eine Zwischenklonierung der Reamplifikate erforderlich machte (Kap. 3.6.6). Aufgearbeitete Plasmide wurden mit dem Oligonukleotid M13-(20) (Tab. 3) sequenziert.

3.6.4 Temperaturgradienten Gelelektrophorese (TGGE)

Das für die TGGE verwendete Polyacrylamidgel bestand aus folgenden Komponenten: 7,5 mL RapidGel XL (40%; USB, Cleveland, USA), 24 g Harnstoff (Roth, Karlsruhe), 1 mL 50x TAE-Puffer, 2,5 mL Glycerin (Fluka, Neu-Ulm) und 10 mL Formamid (Amresco, Solon, USA). Das Endvolumen von 50 mL wurde durch die Zugabe von destilliertem Wasser eingestellt. Die Gelapparatur wurde nach Angaben des Herstellers (Biometra, Göttingen) zusammengesetzt, die Gellösung steril filtriert (0,25 µm Sterilfilter) und nach dem Start der Polymerisationsreaktion mit 80 µL 10 % APS (w/v; Roth, Karlsruhe) und 110 µL TEMED (Roth, Karlsruhe) in die Gelapparatur gegossen. Nach dem Aushärten wurde das Gel auf die Heizplatte der TGGE-Apparatur gelegt. Der Kontakt zwischen dem Gel und der Heizplatte wurde durch 1 mL 0,1 % Tween 20 (v/v; Merck, Darmstadt) hergestellt.
Die Vorbereitung der Proben entsprach den Bedingungen der DGGE (Kap. 3.6.3). Ein Volumen von 6 µL der aufgereinigten Amplifikate wurde mit 2 µL TGGE-Probenpuffer gemischt und auf die TGGE aufgetragen. Der TGGE-Lauf erfolgte in 1x TAE-Puffer unter folgenden Bedingungen: 10 min bei 300 V und 30 °C, anschließend 10 min bei 0 V und einem Gradienten von 45 - 80 °C, und abschließend 3 h bei 350 V und einem Gradienten von 45 - 80 °C. Die TGGE-Gele wurden mit Hilfe des DNA Silver Staining Kits ‚Plus One' gefärbt (Amersham, Piscataway, USA), anschließend digitalisiert und elektronisch dokumentiert.

3.6.5 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierreaktion mit dem DTCS-Sequenzier-Kit (BeckmanCoulter, Fullerton, USA) wurde in einem T3-Thermocycler (Biometra, Göttingen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das modifizierte Reaktionsgemisch (20 µL Endvolumen) setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: 4 µL DTCS Quick Start Master Mix (BeckmanCoulter, Fullerton, USA), 2 µL Sequenzierprimer (1,6 µM), 50-100 fmol DNA als Vorlage und destilliertes Wasser. Die Sequenzierprodukte wurden anschließend mittels Ethanolfällung aufgereinigt und für die Analyse im CEQ8000 Kapillarsequenzierer (BeckmanCoulter, Fullerton, USA) nach Protokollen des Herstellers präpariert. Für die Analyse der Sequenzierprodukte, sowie die Auswertung der Rohdaten kam die geräteeigene CEQ8000-Software (Version 8.0.52; BeckmanCoulter, Fullerton, USA) zum Einsatz. Die Sequenzierprodukte wurden unter folgenden Bedingungen analysiert: 50 °C Kapillartemperatur; 120 s Denaturierung bei 90 °C; Injektion bei 2,0 kV für 15 s; Trennung für 110 min bei 4,0 kV. Die ermittelten Sequenzen wurden mit, in öffentlichen Datenbanken hinterlegten, Sequenzen unter Verwendung des BlastN-Algorithmus (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) verglichen.

3.6.6 Klonierung von DNA-Fragmenten

Die Klonierung wurde mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits (Version Q; Invitrogen, Paisley, UK) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA-Fragmente wurden in den Vektor pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen, Paisley, UK) integriert und die resultierenden Konstrukte in chemisch kompetente TOP10F' *E. coli* Zellen transformiert. Die Selektion von Transformanten erfolgte auf LB-Agar mit X-Gal und IPTG nach der so genannten „Blau-Weiß-Screening" Methode. Bei erfolgreicher Integration von DNA in den Vektor bleiben die transformierten Zellen auf dem LB-Agar weiß, wohingegen Zellen mit leerem Vektor eine blaue Pigmentierung aufweisen. Weiße Kolonien wurden selektiert, auf frischen LB-Agar transferiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien in 100 µL TE-Puffer überführt und für 10 min aufgekocht. Dieser Schritt führte zur teilweisen Zerstörung der Zellen und der Freisetzung von DNA, welche anschließend als

Vorlage für eine Kontroll-PCR diente. Die in den Vektor integrierte DNA wurde mit Hilfe der Oligonukleotide M13-(20) und M13-rev (Tab. 3) amplifiziert. Die Amplifikation der etwa 1500 bp langen Fragmente erfolgte in Ansätzen von 25 µL mit folgender Zusammensetzung: 0,5 µL DNA, 0,3 µM der jeweiligen Primer, 1x PCR-Puffer (Applied Biosystems, Foster City, USA), 2,5 mM Magnesiumchlorid (Applied Biosystems, Foster City, USA), 200 µM dNTPs (Roche, Mannheim), 400 ng BSA (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) und 5 U AmpliTaq DNA-Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, USA). Die PCR wurde in einem T3-Thermocycler (Biometra, Göttingen) mit folgenden Parametern durchgeführt: initiale Denaturierung für 3 min bei 95 °C, gefolgt von 30 Zyklen mit jeweiliger Denaturierung für 45 s bei 95 °C, Bindung der Oligonukleotide für 45 s bei 56 °C und Strangverlängerung für 45 s bei 72 °C, sowie einer zusätzlichen finalen Strangverlängerung für 5 min bei 72 °C. Die Amplifikation wurde mit Hilfe von Wasser (Negativkontrolle) und einem Kontrollplasmid (Positivkontrolle) überprüft. Die amplifizierten Fragmente wurden anschließend in einem 1%igen Agarose-Gel (w/v) unter Verwendung eines Standards (GeneRuler 100 bp DNA ladder; MBI Fermentas, St. Leon-Rot) kontrolliert.

3.6.7 Terminaler Restriktionsfragment Längenpolymorphismus (T-RFLP)

Zur Detektion der Restriktionsfragmente wurde das 5'-Ende des PCR-Produktes mit Hilfe eines entsprechend synthetisierten Oligonukleotids (TPU1Dy4) markiert. Die Amplifikation der knapp 800 bp langen Fragmente erfolgte in einem 100 µL Reaktionsgemisch bestehend aus: 1 µL DNA (s.o.), jeweils 0,5 µM der Oligonukleotide TPU1Dy4 und Bac784r (Tab. 3), 1x PCR-Puffer (Applied Biosystems, Foster City, USA), 2,5 mM Magnesiumchlorid (Applied Biosystems, Foster City, USA), 400 ng BSA (MBI Fermentas, St. Leon-Rot), 200 µM dNTPs (Roche, Mannheim) und 5 U AmpliTaq DNA-Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, USA). Die PCR wurde in einem T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen) mit folgenden Parametern durchgeführt: initiale Denaturierung für 3 min bei 95 °C, gefolgt von 25 Zyklen mit jeweiliger Denaturierung für 45 s bei 95 °C, Bindung der Oligonukleotide für 45 s bei 53 °C und Strangverlängerung für 90 s bei 72 °C sowie einer zusätzlichen finalen Strangverlängerung für 5 min bei 72 °C. Die Amplifikation wurde auf einem 1%igen Agarose-Gel (w/v) unter Verwendung eines Standards

(GeneRuler 1 kb DNA ladder; MBI Fermentas, St. Leon-Rot) kontrolliert. Die PCR-Produkte wurden mittels Silika-Reinigung (Kap. 3.6.2) aufgearbeitet und von 100 µL auf 50 µL aufkonzentriert.
Anschließend erfolgte die Restriktion der PCR-Produkte für 2 h bei einer Temperatur von 37 °C. Für die Restriktion wurden die Enzyme *HaeIII* (GG'CC; MBI Fermentas, St. Leon-Rot), *HhaI* (G'CGC; MBI Fermentas, St. Leon-Rot), *MspI* (C'CGG; MBI Fermentas, St. Leon-Rot) oder *RsaI* (GT'AC; MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Das Reaktionsgemisch (20 µL) bestand aus jeweils 10 µL PCR-Produkt (s.o.), 10 U Enzym und 1x Restriktionspuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Jeweils 1 µL des Restriktionsproduktes wurde mit 1 µL Size Standard (Beckman Coulter, Fullerton, USA; 1:100 mit Sample Loading Solution (SLS; BeckmanCoulter, Fullerton, USA) verdünnt) und 28 µL SLS (BeckmanCoulter, Fullerton, USA) vermischt und auf die Kapillarelektrophorese (CEQ8000, Beckman Coulter) aufgetragen. Die Analyse der Rohdaten erfolgte durch die geräteinterne CEQ8000-Software (Version 8.0.52; BeckmanCoulter, Fullerton, USA). Die Restriktionsprodukte wurden unter folgenden Bedingungen analysiert: 35 °C Kapillartemperatur; 120 s Denaturierung bei 90 °C; Injektion bei 2,0 kV für 30 s; Trennung für 35 min bei 7,5 kV. Die so ermittelten Restriktionsfragmentdaten wurden mit Hilfe der TAP-Software (http://rdp8.cme.msu.edu/html/TAP-trflp.html#program) ausgewertet.

3.6.8 DHPLC zur Analyse von 16S rRNA Genfragmenten

Im Vorfeld der DHPLC-Analyse wurde eine PCR-Amplifikation von 16S rRNA Genen durchgeführt, analog zur DGGE (Kap. 3.6.3). Das für die DHPLC verwendete Oligonukleotid F-968-30GCT (Tab. 3) hatte eine modifizierte GC-Klammer, amplifizierte aber den gleichen Sequenzabschnitt wie das Oligonukleotid F-968-GC (Tab. 3), welches bei der DGGE verwendet wurde. Die PCR-Produkte wurden anschließend in einem 2%igen Agarose-Gel (w/v) unter Verwendung eines Standards (GeneRuler 50 bp DNA ladder; MBI Fermentas, St. Leon-Rot) kontrolliert und mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die DHPLC-Analyse wurde im WAVE® Microbial Analysis System (Transgenomic, Omaha, USA) durchgeführt. Eine Menge von 5 bis 20 µL aufgereinigten Amplifikats wurde mittels eines Autosamplers auf die DNASep® HT Säule (Transgenomic, Omaha, USA) injiziert. Die Trennung erfolgte bei einer Temperatur von 63,1 °C und einer Flussrate

von 0,9 mL/min. Der Gradient (Tab. 6) wurde mittels Puffer A und B (WAVE Optimized Buffer; Transgenomic, Omaha, USA) hergestellt. Nach der Trennung wurden die 16S rRNA Genfragmente im System mit einer Fluoreszenzlösung (WAVE Optimized HS staining solution I; Transgenomic, Omaha, USA) vermischt und im HSX-3500 Fluoreszenzdetektor (Transgenomic, Omaha, USA) detektiert. Die Darstellung und Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der gerätespezifischen Navigator™ Software (Version 1.5.4; Build 23).

Tab. 6: DHPLC-Programm zur Trennung von 16S rRNA Fragmenten. Die Trennung erfolgte unter den angegebenen Parametern bei einer Temperatur von 63,1 °C und einer Flußrate von 0,9 mL / min.

Schritt	Zeit (min)	Puffer A (%)	Puffer B (%)
Laden	0	51	49
100 bp (3,6 min)	0,5	46	54
267 bp (7,1 min)	6,5	40	60
434 bp (10,1 min)	12,5	30	70
601 bp (13,2 min)	14,5	20	80
Start Reinigung	15,5	0	100
Stop Reinigung	16,5	0	100
Start Equilibrieren	17,5	51	49
Stop Equilibrieren	18,5	51	49

Puffer A: 0,1 M TEAA; Puffer B: 0,1 M TEAA in 25 % Acetonitril

Ausgewählte Peaks wurden unter der Verwendung des FCW 200 Fragmentsammlers (Transgenomic, Omaha, USA) aufgefangen. Die in den gesammelten Fraktionen enthaltene DNA diente als Vorlage für eine Reamplifikation mit den Oligonukleotiden F-968 und R-1378 (Tab. 3), wie oben beschrieben. Die etwa 400 bp langen PCR-Produkte wurden in einem 2%igen Agarose-Gel unter Verwendung eines DNA-Standards (GeneRuler 50 bp DNA ladder; MBI Fermentas, St. Leon-Rot) überprüft und anschließend mit der Silika-Methode aufgereinigt. Alle aufgearbeiteten 16S rRNA Genfragmente wurden zunächst mit dem Oligonukleotid F-968 (Tab. 3) sequenziert (Kap. 3.6.5). Aufgrund ähnlicher Laufeigenschaften verschiedener 16S rRNA Genfragmente in der DHPLC konnte es zu Überlagerungen von Sequenzen kommen. In diesem Fall war eine Auswertung nach der Sequenzierreaktion nicht möglich, was eine Zwischenklonierung der Reamplifikate erforderlich machte (Kap. 3.6.6). Aufgearbeitete Plasmide wurden mit dem Oligonukleotid M13-(20) (Tab. 3) sequenziert.

3.6.8.1 Rekonditionierung

Als Vorlage für die Rekonditionierung diente 1 µL des zuvor generierten PCR-Produkts. Das Reaktionsgemisch wurde wie üblich vorbereitet (s. Kap. 3.6.3). Die Amplifikation wurde nach 5 Zyklen abgebrochen.

3.6.9 DHPLC zur Analyse von ITS2 Fragmenten

Die ITS2-DHPLC wurde gemäß publizierten Protokollen durchgeführt (Goldenberg, 2005b).

3.6.10 Kulturelle Analyse der Darmflora

Die in LB-Glycerin-Flüssigmedium asservierte Stuhlprobe (Kap. 3.5) wurde in Anteilen von jeweils 100 µL auf Agarplatten ausgestrichen. Die Kultivierung der intestinalen Mikroorganismen erfolgte mit Hilfe der in Tab. 7 aufgelisteten Medien bei einer konstanten Temperatur von 37 bzw. 30 °C (Saboraud-Agar) in einem Zeitraum

Tab. 7: Kultivierung von Mikroorganismen aus Stuhlproben. Aufgelistet sind die Medien (Agar: fest; Bouillon: flüssig) für die Kultivierung der, in der Spalte ‚Wachstum' angegebenen, Mikroorganismen. Die Medien wurden aerob und/oder anaerob bei einer Temperatur von 37 °C bebrütet, mit Ausnahme des Saboraud - Agars, der bei 30°C bebrütet wurde.

Medium	Kultivierungsbedingungen		Wachstum
	aerob / anaerob	Temperatur	
Columbia Schafblut - Agar	+ / +	37 °C	Alle
Columbia CNA - Agar	+ / +	37 °C	Staphylokokken, Streptokokken
MacConkey - Agar	+ / +	37 °C	*Enterobateriaceae*
Enterokokken - Agar	+ / -	37 °C	Enterokokken
Columbia Anaerob - Agar	- / +	37 °C	Anaerobier
XLD - Agar	+ / -	37 °C	Gram-(-) Bakterien
Rogosa - Agar	- / +	37°C	Milchsäurebakterian
Saboraud - Agar	+ / -	30 °C	Pilze und Hefen
Thioglykolat - Bouillon	+ / +	37 °C	Anreicherung

[+] bebrütet; [-] nicht bebrütet

von 48 (aerob) bzw. 72 Stunden (anaerob). Anaerobe Kulturen wurden in luftdichten Anaerobiertöpfen inkubiert. Der Sauerstoff wurde in diesen Gefäßen durch die Zugabe von AnaeroGen®-Päckchen (Oxoid, Basingstoke, UK) reduziert. Die nach der Inkubation gewachsenen Kolonien wurden unter morphologischen Gesichtspunkten miteinander verglichen. Beurteilt wurde der Phänotyp auf dem Medium und die Gram-Färbung.

Kolonien unterschiedlicher Morphologie wurden mittels standardisierter biochemischer Methoden, den so genannten VITEC® und API® Testsystemen (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) identifiziert. Aufgrund der Tatsache, dass das Spektrum der Tests auf klinisch relevante Mikroorganismen beschränkt war, konnten nicht alle Isolate identifiziert werden. In diesen Fällen wurde die Identifizierung mit Hilfe der Sequenzanalyse von 16S rRNA durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Kolonien in 500 µL Lysis-Puffer überführt und, wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, aufgearbeitet. Die präparierte DNA diente als Vorlage für die Sequenzierung mit den Oligonukleotiden TPU1 und RTU8 (Tab. 3; Kap. 3.6.5).

Staphylokokken- und Enterokokken-Isolate wurden auf ihre Empfindlichkeit gegenüber den Antibiotika Ampicillin, Flucloxacillin, Linezolid, Penicillin, Gentamicin, Ciprofloxacin, Moxifloxacin, Trimethoprim/Sulfonamid, Erythromycin, Clindamycin, Teicoplanin, Vancomycin, Fosfomycin, Rifampicin und Mupirocin getestet. Die minimalen bakteriostatischen Hemmkonzentrationen (MHK) sind in Tabelle 8 angegeben.

Isolate der Gattung *Enterobacteriaceae* wurden auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Ampicillin, Ampicillin/Sulbactam, Cefotiam, Piperacillin, Piperacillin/Tazobactam, Meropenem, Cefuroxim, Cefotaxim, Ceftazidim, Gentamicin, Tobramycin, Amikazin, Ciprofloxacin, Moxifloxacin, Cotrimoxazol und Piperacillin/Sulbactam getestet. Die MHK-Werte sind in Tabelle 9 angegeben.

Zusätzlich wurden alle Isolate mit Hilfe eines E-Tests (Biotisk, Solna, Schweden) auf Empfindlichkeit gegenüber Imipenem untersucht.

3.6.11 Echtzeit PCR

Die Echtzeit PCR wurde gemäß publizierten Protokollen durchgeführt (Goldenberg, 2005a).

Tab. 8: Minimale bakteriostatische Hemmkonzentrationen für Staphylokokken und Enterokokken. Die MHK-Werte sind in mg / mL angegeben und basieren auf DIN 58940.

Antibiotikum	Sensibel	Intermediär	Resistent
Ampicillin	0,5 - 2	4 - 8	16
Flucloxacillin	0,25 - 1		2 - 8
Linezolid	0,5 - 4		8 - 16
Penicillin	0,015 - 0,125		0,25 - 0,5
Gentamicin	0,25 - 1	2 - 4	8
Gentamicin Hochresistenz			500 - 1000
Ciprofloxacin	0,125 - 1	2	4
Moxifloxacin	0,125 - 1	2	4
Trimethoprim/Sulfonamid	8 - 16	32 - 64	128
Erythromycin	0,25 - 1	2 - 4	8
Clindamycin	0,25 - 1	2 - 4	8
Teicoplanin	1 - 8	16	32
Vancomycin	1 - 4	8	16 - 32
Fosfomycin	4 - 32		64 - 128
Rifampicin	0,125 - 1	2	4
Mupirocin	2 - 256		512

Tab. 9: Minimale bakteriostatische Hemmkonzentrationen für *Enterobacteriaceae*. Die MHK-Werte sind in mg / mL angegeben und basieren auf DIN 58940.

Antibiotikum	Sensibel	Intermediär	Resistent
Ampicillin	0,5 - 2	4 - 8	16
Ampicillin/Sulbactam	0,5 - 2	4 - 8	16
Cefotiam	0,5 - 4	8	16
Piperacillin	2 - 4	8 - 32	64
Piperacillin/Tazobactam	2 - 4	8 - 32	64
Meropenem	1 - 2	4 - 8	16 - 32
Cefuroxim	0,5 - 4	8	16
Cefotaxim	0,5 - 2	4 - 8	16
Ceftazidim	1 - 4	8 - 16	32
Gentamicin	0,25 - 1	2 - 4	8
Tobramycin	0,25 - 1	2 - 4	8
Amikazin	1 - 4	8 - 16	32
Ciprofloxacin	0,125 - 1	2	4
Moxifloxacin	0,125 - 1	2	4
Cotrimoxazol	4 - 16	32 - 64	128
Piperacillin/Sulbactam	4	8 - 32	64

4 Ergebnisse

4.1 Molekulare Analyse der Darmflora

4.1.1 Klonierung und Sequenzierung von 16S rRNA Genen

Da die detailliertesten Informationen zur bakteriellen Zusammensetzung und Diversität einer Probe mittels Klonierung und anschließender Sequenzierung von 16S rRNA Genen erhalten werden können (Wilson, 1996; Suau, 1999; Barcenilla, 2000; Daly, 2001; Hayashi, 2003; Eckburg, 2005), wurden zu Beginn der Studie exemplarisch drei Klonbibliotheken von Stuhlproben eines allogen transplantierten Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Therapie angelegt. Die erste Probe wurde vier Tage vor der Transplantation eingesammelt. Zwei Tage vor Probenahme begann die Antibiotikaprophylaxe mit Cotrimoxazol und, einen Tag darauf, mit Levofloxacin. Die nächste Probe wurde zwei Wochen nach Transplantation eingesammelt. Der Patient erhielt zu diesem Zeitpunkt, zusätzlich zur Prophylaxe mit Levofloxacin, eine Antibiotikatherapie mit Vancomycin und Meropenem. Die Prophylaxe mit Cotrimoxazol war zwei Tage nach Transplantation abgesetzt worden. Der Patient erhielt zudem fünf Tage nach Transplantation eine viertägige Antibiotikabehandlung mit Gentamicin und Tazobactam. Die dritte Probe wurde 6 Monate nach Transplantation eingesammelt. Der Patient hielt sich zu diesem Zeitpunkt wieder in seiner häuslichen Umgebung auf und nahm keine Antibiotika mehr ein.

Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Tabelle A1 (Anhang) aufgelistet und in Abbildung 4 zusammenfassend dargestellt. Auffällig war die Dominanz von 16S rRNA Genen des Phylums *Firmicutes* (Probe 1: 40/41 Klonen; Probe 3: 29/48 Klonen). Dieses Phylum beinhaltet unter anderem die Gattungen *Mollicutes* und *Clostridia* . Vier von 40 *Firmicutes*-Klonen der Probe 1 konnten der Gattung *Mollicutes* (inkl. *Erysipelothrix* und *Mycoplasmatales*), alle übrigen der Gattung *Clostridales* zugeordnet werden. Die Klone der Gattung *Clostridales* verteilten sich auf die Klassen *Clostridiaceae* (inkl. *Clostridium*, *Dorea* und *Sporobacter*), *Lachnospiraceae* (inkl. *Ruminococcus*), *Eubacteriaceae* (inkl. *Eubacterium*) und *Peptococcaceae* (inkl. *Dehalobacter*) .

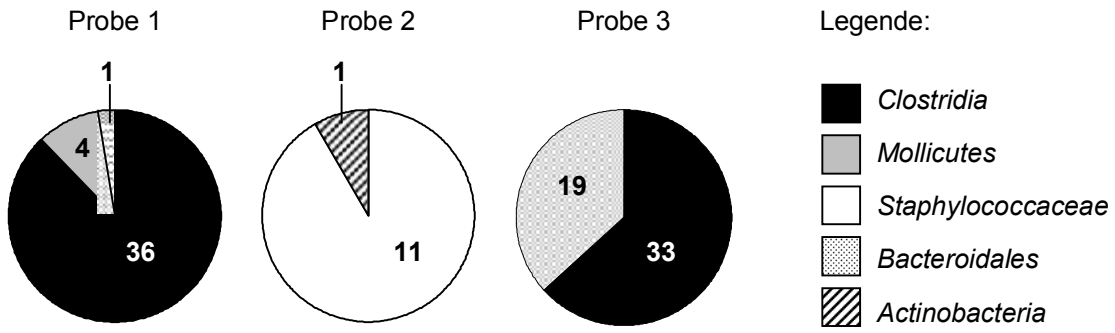


Abb. 4: Zusammenfassung der Klonierung von 16S rRNA Genen aus Stuhlproben eines allogen transplantierten Patienten. Dargestellt ist die absolute Anzahl von Klonen einer Bakteriengattung (siehe Legende) aus der entsprechenden Probe (vgl. Tab. A1).

Die einzige Sequenz aus Probe 1, welche nicht dem Phylum *Firmicutes* zugeordnet werden konnte, entstammte der Gattung *Bacteroidales* (Tab. A1; Anhang). Die *Firmicutes*-Sequenzen der Probe 3 konnten alle der Gattung *Clostridales* und ihren oben genannten Klassen zugeordnet werden. Alle übrigen klonierten 16S rRNA Gene (19/48) wurden der Gattung *Bacteroidales* zugeordnet. In keiner der beiden Klonbibliotheken konnten Sequenzen der anderen weit verbreiteten bakteriellen Gattungen innerhalb der Darmflora, wie z.B. *Lactobacillales* (inkl. *Enterococcus*, *Streptococcus* und *Lactobacillus*), *Enterobacteriaceae* (inkl. *Escherichia*), *Fusobacteria* oder *Actinobacteria* (inkl. *Eggerthella*, *Atopobium* und *Bifidobacterium*), identifiziert werden (Tab. A1; Anhang). Die Probe 2 beinhaltete fast ausschließlich 16S rRNA Gene der Spezies *Staphylococcus epidermidis* (11/12 Klonen). Eine Sequenz wurde der Spezies *Pseudonocardia chlorethenivorans* zugeordnet (Tab. A1; Anhang).

4.1.2 Terminaler Restriktionsfragment Längenpolymorphismus

Die Analyse von bakteriellen Floren mit Hilfe der T-RFLP gewinnt, seit ihrer Einführung durch Liu und Mitarbeiter (1997), mehr und mehr an Bedeutung. Zu Beginn der vorliegenden Studie erschienen die ersten Publikationen zur Untersuchung der Darmflora mittels T-RFLP (Sakamoto, 2003; Nagashima, 2003; Hayashi, 2003).

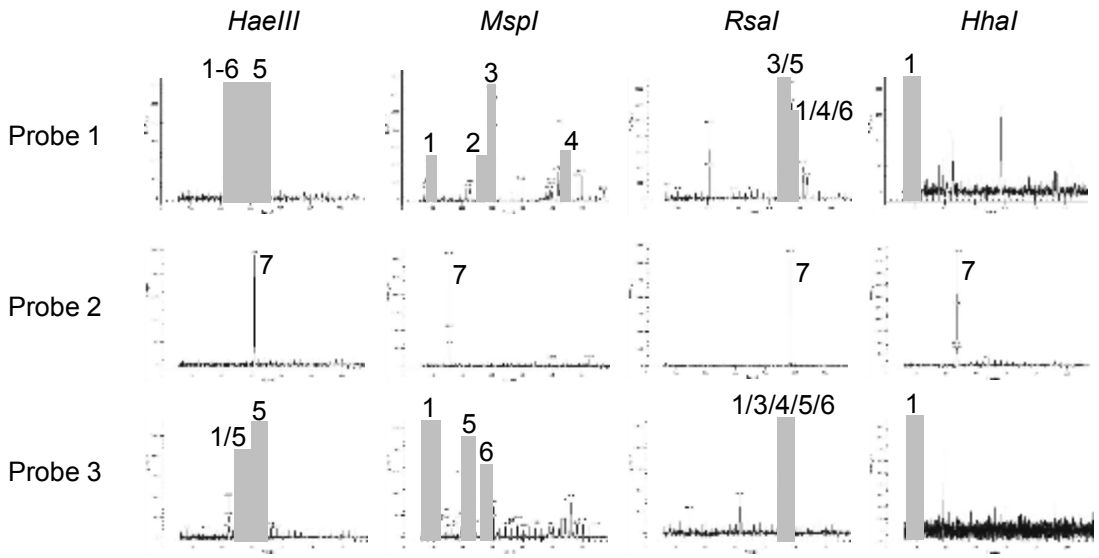


Abb. 5: T-RFLP Profile von drei ausgewählten Proben. Die amplifizierten 16S rRNA Gene der drei Proben wurden mit jeweils 4 Restriktionsenzymen (*HaeIII*, *MspI*, *RsaI* und *HhaI*) verdaut. Grau hinterlegte Peaks konnten insgesamt sieben bakteriellen Gattungen zugeordnet werden: *Bacteroidales* (1), *Helicobacter* (2), *Ruminococcus* (3), *Mycoplasmatales* (4), *Clostridales / Eubacterium* (5), *Bifidobacterium* (6) und *Staphylococcus* (7).

Es lag daher auf der Hand, den Nutzen dieser Methode für die Analyse der Stuhlproben zu testen. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden dieselben Proben wie für die Erstellung der Klonbibliotheken analysiert (s. Kap. 4.1.1). Die amplifizierten 16S rRNA Gene wurden, in Anlehnung an Angaben aus der Literatur (Liu, 1997; Clement, 1998), mit Hilfe der Restriktionsenzyme *HaeIII*, *MspI*, *RsaI* und *HhaI* in getrennten Reaktionen fragmentiert. Die Ergebnisse der anschließenden Trennung und Detektion der terminalen Restriktionsfragmente im Kapillarsequenzierer sind in Abbildung 5 dargestellt. Die Größe der Fragmente wurde durch die Verwendung eines Standards automatisch von der Gerätesoftware ermittelt. Mit Hilfe der Fragmentlängen und einer Datenbank (TAP-Software) konnten die Signale bakteriellen Gattungen zugeordnet werden (Abb. 5). Beim Vergleich der Restriktionsmuster der verschiedenen Enzyme waren deutliche Unterschiede zu erkennen. Nach dem Verdau mit *HaeIII* oder *RsaI* lagen die Signale der terminalen Restriktionsfragmente sehr eng beieinander (Abb. 5, Proben 1 und 3). Die Restriktion mit *RsaI* oder *HhaI* ergab insgesamt nur wenige Signale (Abb. 5, Proben 1 und 3). Die besten Ergebnisse wurden durch den Verdau mit *MspI* erzielt (Abb. 5, Proben 1 und 3).

Die Analyse wurde dadurch erschwert, dass sich die überwiegende Zahl der Fragmente nicht einer, sondern mindestens zwei Gattungen zuordnen lies. Die Auswertung konnte durch die Verwendung mehrerer Enzyme (s.o.) und die

Kombination der Ergebnisse der Einzelreaktionen verbessert werden. Die Bestimmung einer definierten bakteriellen Spezies war nur selten möglich, wie z.B. *Bacteroides vulgatus* (Probe 1: *HaeIII*/263 nt, *RsaI*/478 nt, *MspI*/96 nt und *HhaI*/101 nt). In den meisten Fällen konnten die Signale nur bakteriellen Gattungen zugeordnet werden (in Abb. 5 grau hinterlegt).

Die Restriktionsfragmente der Probe 1 konnten den Gattungen *Bacteroidales*, *Helicobacter*, *Ruminococcus*, *Mycoplasmatales*, *Eubacterium* und *Bifidobacterium* zugeordnet werden. Die Auswertung der Fragmentdaten ergab, dass nicht alle Gattungen mit allen Enzymen nachweisbar waren. So konnten z.B. Signale der Restiriktionsfragmente, die auf die Gattung *Bifidobacterium* (Nummer 6 in Abb. 5) hindeuteten, nur mit den Enzymen *HaeIII* und *RsaI* nachgewiesen werden. Gleiches galt auch für die Gattungen *Eubacterium* und *Helicobacter* (*HaeIII* und *MspI*). Wie bereits oben beschrieben, konnten die Fragmente des Restriktionsverdaus mit *HhaI* nur bedingt zur Auswertung herangezogen werden.

Die Auswertung der Fragmentmuster von Probe 3 führte zu einem ähnlichen Ergebnis. Die Restriktionsprodukte der Gattung *Bacteroidales* (Nummer 1 in Abb. 5) konnten in allen vier Profilen detektiert werden. Die übrigen Peaks wurden den Gattungen *Eubacterium* (*HaeIII*, *MspI* und *RsaI*) und *Bifidobacterium* (*MspI* und *RsaI*) zugeordnet. Signale der Gattungen *Ruminococcus* und *Mycoplasmatales* wurden nur in einem Profil (*RsaI*) detektiert (Abb. 5).

Die Restriktion der Amplifikate aus Probe 2 ergab jeweils einen Peak, welche alle der Gattung *Staphylococcus* zugeordnet werden konnten (Nummer 7 in Abb. 5).

4.1.3 Denaturierende Gradientengelelektrophorese

Die denaturierende Gradientengelelektrophorese wird zur Trennung von DNA-Fragmenten gleicher Länge, aber unterschiedlicher Sequenz, angewandt (Muyzer; 1998). In Abhängigkeit vom Gradienten spricht man entweder von einer TGGE (Temperaturgradient) oder DGGE (chemischer Gradient).

Zu Beginn der vorliegenden Studie existierten bereits Publikationen, die die Nützlichkeit der beiden Methoden für die Untersuchung der Darmflora dokumentierten (z.B. Millar, 1996; Zoetendal, 1998).

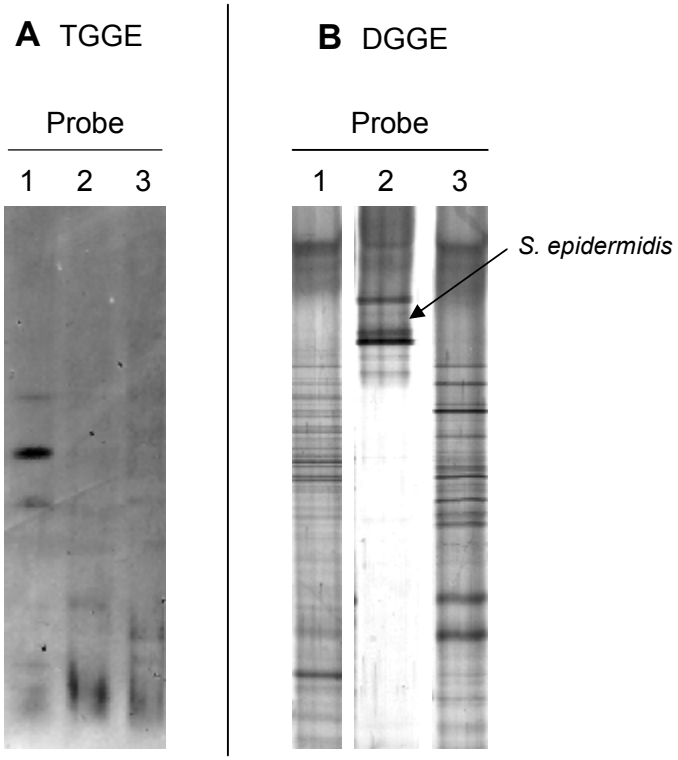


Abb. 6: TGGE (A) und DGGE Profile (B) von drei Proben eines allogen transplantierten Patienten. Die amplifizierten 16S rRNA Gene aus den Proben wurden auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und in einem Temperaturgradienten (TGGE) bzw. chemischen Gradienten (DGGE) getrennt. Die mit einem Pfeil markierte DGGE-Bande aus Probe 2 wurde ausgeschnitten und sequenziert und konnte der Spezies *S. epidermidis* zugeordnet werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass man mit Hilfe von denaturierenden Gradientengelen einen Fingerabdruck der Flora erhält, den man mit Fingerabdrücken anderer Proben einfach und schnell vergleichen kann. Aus diesem Grund wurden beide Methoden anhand der, mittels Sequenzierung von Klonbibliotheken und T-RFLP analysierten, Proben eines allogen transplantierten Patienten (s. Kap. 4.1.1 und 4.1.2) evaluiert und miteinander verglichen. Die größte technische Schwierigkeit bei der Durchführung der TGGE lag in der Vermittlung des Temperaturgradienten zwischen dem Heizelement und dem Polyacrylamid-Gel. Laut Angaben des Herstellers (Biometra, Göttingen) sollte dieser Kontakt mittels Tween 20 hergestellt werden, was allerdings nicht zu dem gewünschten Ergebnis führte. Ohne die vollständige Übertragung des Gradienten auf das Gel war eine sequenzspezifische Trennung von DNA-Fragmenten aber nicht möglich. Die Versuche wurden abgebrochen, nachdem eine Demonstration der Durchführung einer TGGE durch die Firma Biometra ergebnislos verlief. Das beste TGGE-Gel, welches im Versuchszeitraum angefertigt werden konnte, ist in Abbildung 6A dargestellt. Vereinzelt sind Banden in den Spuren

zu erkennen, die sich jedoch kaum vom Hintergrund abheben. Aufgrund bereits vorliegender Daten (s. Kap. 4.1.1 und 4.1.2) wurde allerdings mit einer höheren Diversität, sprich einer Mehrzahl an Banden gerechnet.
Nachdem sich die TGGE Methode als nicht durchführbar erwiesen hatte, wurden die Experimente mittels DGGE wiederholt. Die DGGE-Gele wiesen, im Vergleich zur TGGE, von Beginn an eine bessere Qualität auf. Nach Optimierung des chemischen Gradienten entsprachen die Gele bezüglich Qualität und Darstellung den Erwartungen (Abb. 6B). Die Amplifikate der Proben 1 und 3 wiesen eine hohe Anzahl an Banden auf, was als hohe Diversität interpretiert werden konnte. Im Gegensatz dazu konnten in der Probe 2 nach Amplifikation und Trennung im DGGE-Gel nur wenige Banden beobachtet werden. Diese Ergebnisse bestätigten die zuvor gewonnenen Daten (Kap. 4.1.1 und 4.1.2).
Im Gegensatz zur Klonbibliothek und zur T-RFLP ist bei der DGGE die Zuordnung der Banden zu bakteriellen Spezies und/oder Gattungen nicht direkt möglich. Aufschluss über deren Ursprung lieferte erst die Sequenzierung zuvor ausgeschnittener und extrahierter DGGE-Banden. Die markanteste Bande in der Spur der Probe 2 (Pfeil in Abb. 6B) konnte mit Hilfe dieses Verfahrens der Spezies *Staphylococcus epidermidis* zugeordnet werden.

4.1.3.1 Evaluierung der DGGE für die Analyse der Darmflora

Da das DGGE-Protokoll zur Analyse der Darmflora geeignet erschien, wurde mit Hilfe ausgewählter Referenzstämme die Methode weiter evaluiert. Die Stämme repräsentierten die abundanten bakteriellen Gattungen innerhalb der Darmflora (Abb. 7). Aus Abbildung 8 wird ersichtlich, dass alle getesteten Stämme innerhalb des Gradienten detektiert werden konnten. Die bakteriellen Gattungen ließen sich nur bedingt anhand ihres Retentionsverhaltens einem bestimmten Gelabschnitt zuordnen. So wurden die Banden des Genus *Bacteroidales* und der Spezies *E. coli* im mittleren Teil des Gels detektiert. Kurz darauf folgten die Banden des Genus *Lactobacillales* und schließlich des Genus *Actinobacteria* und der Spezies *B. vulgatus*. Die Banden des Genus *Clostridia* waren über das ganze Gel verteilt, wenngleich die Spezies der jeweiligen Untergruppen bestimmten Gelbereichen zuzuordnen waren, wie z.B. *Clostridiaceae* und *Mollicutes* im oberen Drittel des Gels.

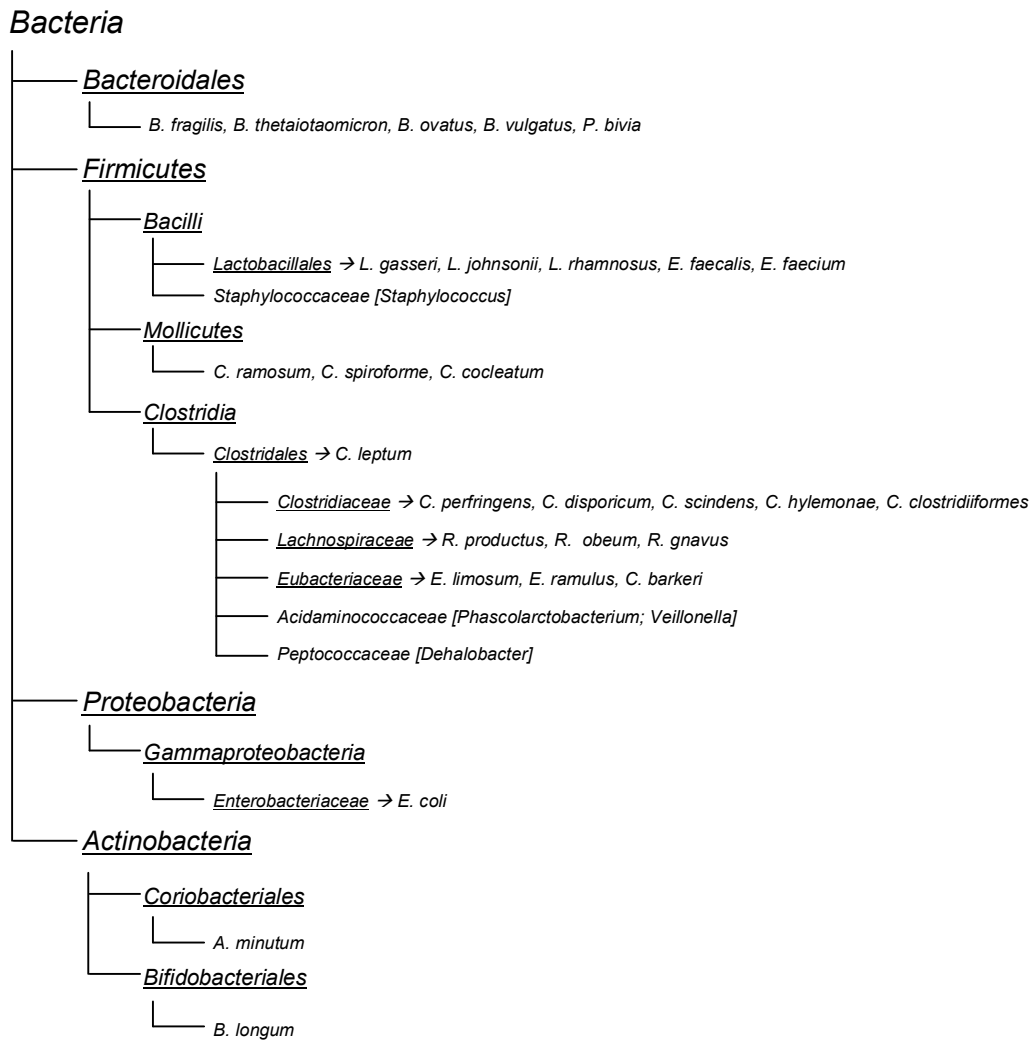


Abb. 7: Referenzstämme zur Optimierung der molekularen Methoden. Die Referenzstämme wurden den abundanten bakteriellen Genera der Darmflora zugeordnet.

Außerdem war offensichtlich, dass definierte bakterielle Spezies nicht zwangsläufig eine definierte Bande im Gel aufwiesen, sondern dass einige Stämme zwei (z.B. *R. obeum*) oder mehrere Banden (z.B. *C. scindens*) zeigten. Die Verwendung der Referenzstämme als Marker für die Zuordnung unbekannter Banden zu bekannten bakteriellen Genera und/oder Spezies war daher nicht möglich.

Die Reproduzierbarkeit der Bandenmuster wurde anhand der Analyse von PCR-Produkten einer ausgewählten Probe, welche an verschiedenen Tagen amplifiziert und mittels DGGE analysiert wurde, überprüft. Die Ähnlichkeit der DGGE-Profile betrug 92,3±1,6 %. Wurde das PCR-Produkt einer Probe mehrfach auf ein und dasselbe Gel aufgetragen, betrug die Reproduzierbarkeit 92,6±4,2 %.

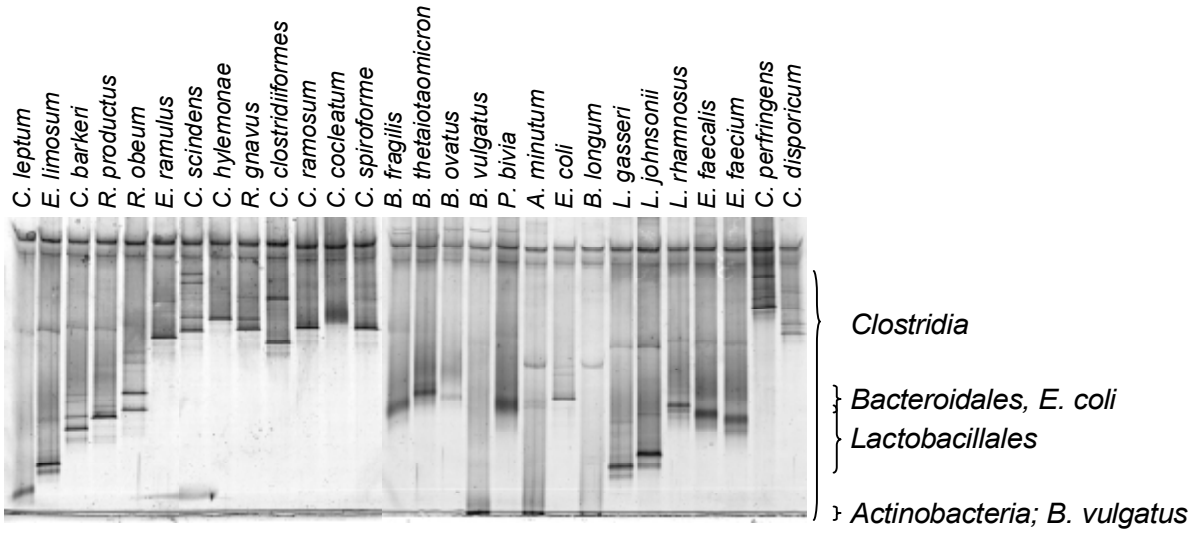


Abb. 8: Trennung amplifizierter 16S rRNA Gene von ausgewählten Referenzstämmen in einem DGGE-Gel.

Unterschiede in den Mustern waren hauptsächlich auf die An- bzw. Abwesenheit von dünnen Banden zurückzuführen, wohingegen die prominenten Banden des Profils in allen untersuchten Fällen reproduzierbar detektiert werden konnten.

4.1.4 Denaturierende High Performance Liquid Chromatography

4.1.4.1 Analyse der bakteriellen Flora mittels 16S-DHPLC

Die Anwendbarkeit dieser Methode auf die Untersuchung der Darmflora konnte erstmals im Rahmen der vorliegenden Studie gezeigt werden. Analog zur DGGE wurde die DHPLC mit Hilfe der bereits vorgestellten Referenzstämme etabliert und evaluiert (siehe Kap. 4.1.3.1; Abb. 7 und 8). Die überwiegende Zahl der getesteten Stämme (25 von 28) zeichnete sich durch das Auftreten mehrerer Peaks aus (Abb. 9A). Dieses Phänomen konnte durch die Einführung einer Rekonditionierungsreaktion, bei der Heteroduplex-Stränge getrennt und durch die Verwendung frischer PCR-Reagenzien zu Homoduplex-Strängen aufgefüllt wurden, erfolgreich reduziert werden (Thompson, 2002) (Abb. 9B). Die Trennleistung des entwickelten DHPLC-Protokolls wurde am Beispiel der zuvor rekonditionierten 16S rRNA Amplifikate aus Referenzstämmen dargestellt (Abb. 10).

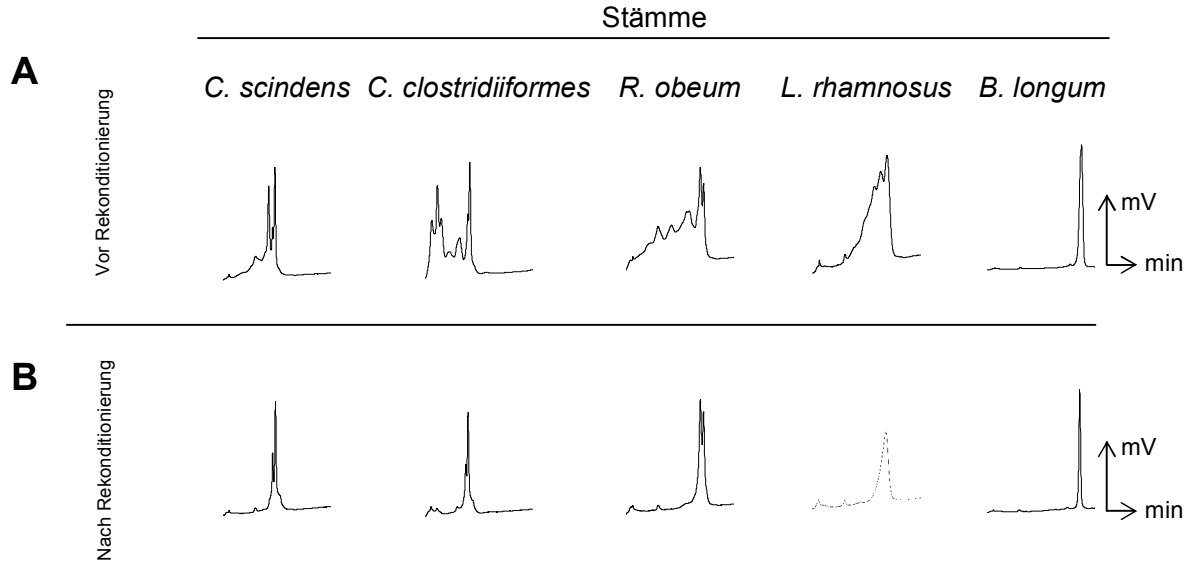
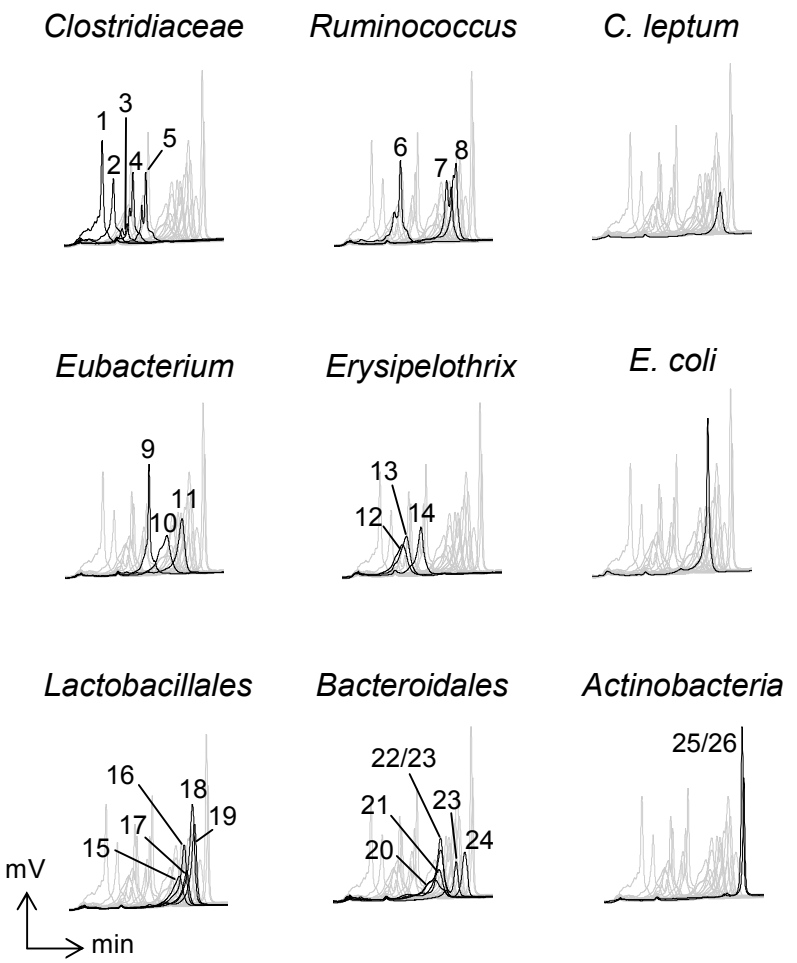


Abb. 9: Referenzstämme vor (A) und nach Rekonditionierung (B). Anhand von fünf ausgewählten Referenzstämmen wird die Auswirkung der Rekonditionierung auf das Auftreten multipler Peaks pro Spezies demonstriert werden. Die Rekonditionierung führte im Vergleich zum Zustand ohne Rekonditionierung zu einer deutlichen Reduktion der Peaks. Nur drei von 28 Spezies (*B. longum*, *C. leptum* und *A. minutum*) wiesen schon vor der Rekonditionierung nur einen Peak auf.

Die Trennung der Amplifikate erfolgte zwischen 4 (*C. perfringens*) und 11 Minuten (*B. longum* und *A. minutum*) nach Injektion. Die Amplikons der Gattung *Clostridiaceae* eluierten zuerst, gefolgt von den Amplikons der übrigen Gattungen (Abb. 10). In einigen Fällen kam es zur Überlagerungen von Peaks einzelner Spezies (z.B. *C. scindens* und *E. ramulus*) oder auch Gattungen (z.B. *Ruminococcus* und *Bacteroidales*), so dass eine Zuordnung von Retentionszeiten zu bekannten Spezies bzw. Gattungen nur sehr eingeschränkt möglich war. Ähnliches konnte bereits für die Zuordnung von DGGE-Banden zu Banden bekannter bakterieller Spezies beobachtet werden (Kap. 4.1.3.1).

Im nächsten Schritt wurde das evaluierte DHPLC-Protokoll auf die Analyse der Darmflora angewandt (Abb. 11). Die analysierten Proben stammten von einem beispielhaft ausgewählten Patienten, welcher im Zuge seiner Chemotherapie Antibiotika erhielt. Die erste Probe (Abb. 11A) wurde bei Aufnahme eingesammelt. Zu diesem Zeitpunkt begann die orale Prophylaxe mit Ciprofloxacin und Cotrimoxazol. Nach einer Woche folgte die zweite Probenahme (Abb. 11B). In der Zwischenzeit hatte der Patient, zusätzlich zur Prophylaxe, eine Antibiotikatherapie mit Amoxicillin/Clavulansäure erhalten. Drei Wochen nach Aufnahme erfolgte die dritte Probenahme (Abb. 11C).



Peak	Spezies
1	*C. perfringens*
2	*C. hylemonae*
3	*C. disporicum*
4	*C. clostridiiformes*
5	*C. scindens*
6	*R. gnavus*
7	*R. obeum*
8	*R. productus*
9	*E. ramulus*
10	*C. barkeri*
11	*E. limosum*
12	*C. ramosum*
13	*C. cocleatum*
14	*C. spiroforme*
15	*L. rhamnosus*
16	*E. faecalis*
17	*E. faecium*
18	*L. johnsonii*
19	*L. gasseri*
20	*B. thetaiotaomicron*
21	*P. bivia*
22	*B. ovatus*
23	*B. fragilis*
24	*B. vulgatus*
25	*A. minutum*
26	*B. longum*

Abb. 10: DHPLC-Profile von Referenzstämmen. Die Peaks der Referenzstämme der jeweilig dargestellten bakteriellen Gattung sind schwarz gezeichnet und nummeriert (siehe Legende). Die Peaks der übrigen Stämme, welche nicht zur genannten Gattung gehören, sind grau gezeichnet. Aus der *C. leptum* Gruppe und der Gattung *Enterobacteriaceae* wurde jeweils nur ein Stamm getestet (*C. leptum* und *E. coli*).

Zuvor wurde der Patient mit Cotrimoxazol und Piperacillin/Tazobactam behandelt. Zum Zeitpunkt der Probenahme erfolgte zusätzlich eine Therapie mit Vancomycin und Meropenem. Probe 4 (Abb. 11D) wurde 236 Tage nach der letzten Antibiotikabehandlung eingesammelt. Die vier DHPLC-Profile in Abbildung 11 zeigen deutliche Unterschiede. Die Gabe der verschiedenen Antibiotika führte zu einer Verschiebung der DHPLC-Profile. Insbesondere die Gabe von Breitspektrum-Antibiotika führte zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl an Peaks (Abb. 11C). Nach Absetzen der Antibiotika konnte in dem entsprechenden DHPLC-Profil (Abb. 11D) eine ähnlich hohe Anzahl an Peaks (n=20) wie zu Beginn der Untersuchung (n=17) beobachtet werden (Abb. 11A). Um zu klären, welche 16S rRNA Genfragmente sich hinter den jeweiligen Peaks verbargen, wurden die in Abbildung 11 nummerierten Peaks gesammelt, reamplifiziert und sequenziert.

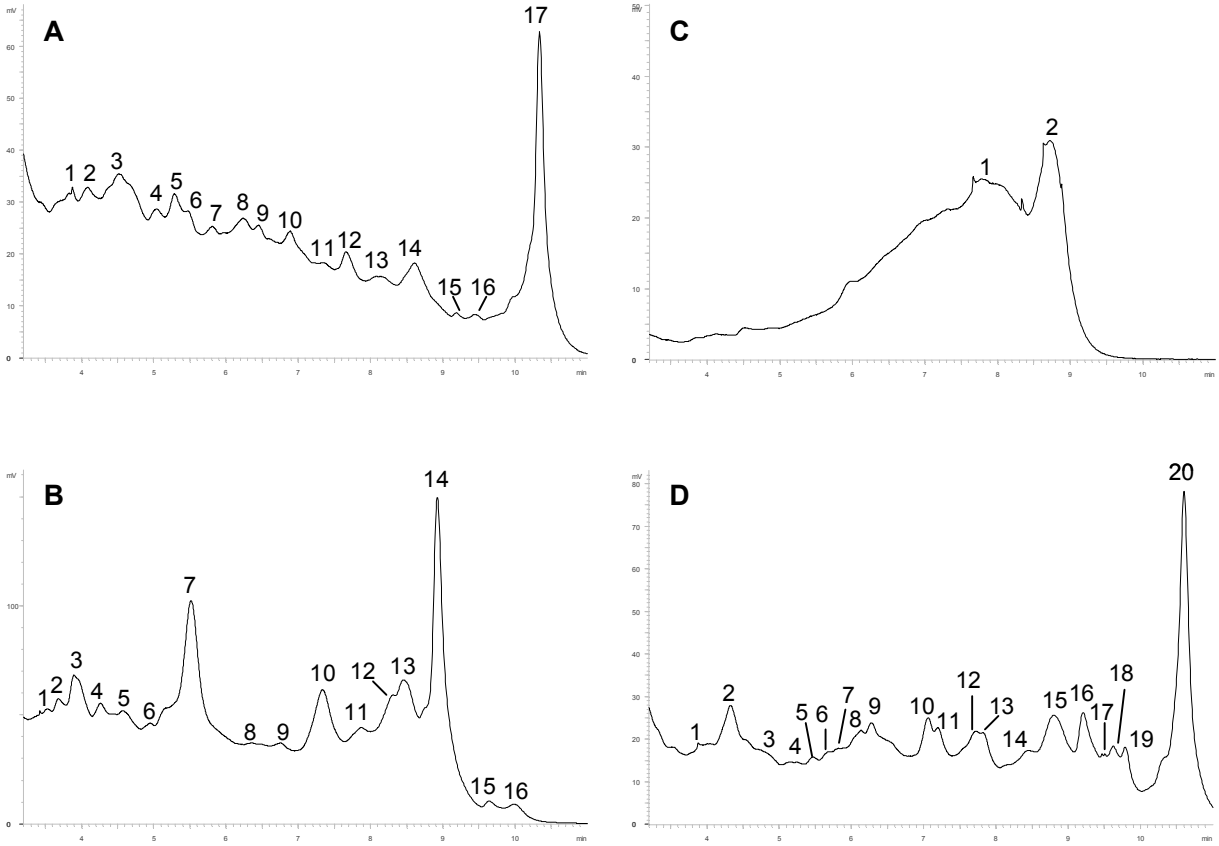
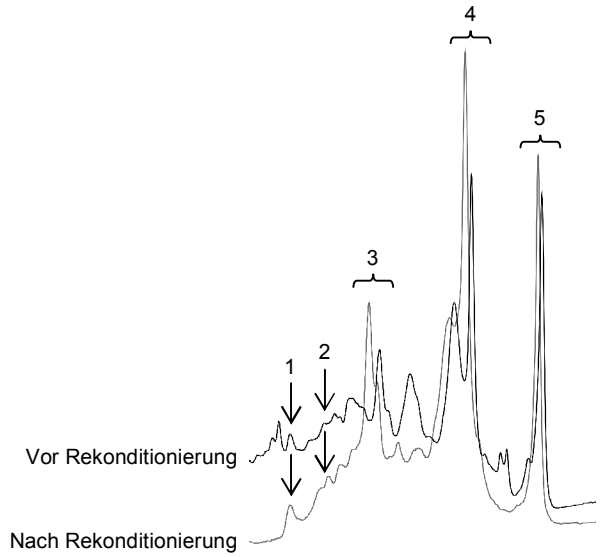


Abb. 11: DHPLC-Profile von amplifizierten 16S rRNA Genen aus Stuhlproben. Die Abbildungen A-D repräsentieren die DHPLC-Profile der Darmflora eines ausgewählten Patienten unter Antibiotikatherapie (siehe Text). Die nummerierten Peaks wurden gesammelt, reamplifiziert und sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Tab. A2 (Anhang) aufgelistet.

Von insgesamt 53 untersuchten Peaks konnten 14 direkt nach der Reamplifizierung sequenziert werden. Die übrigen 39 Reamplifikate beinhalteten mehr als ein 16S rRNA Genfragment (überlagerte Sequenzen) und mussten vor der Sequenzierung kloniert werden. Die Ergebnisse der Sequenzierungen sind in Tabelle A2 (Anhang) zusammengefasst. Die sequenzierten 16S rRNA Gene konnten den Gattungen *Clostridiales*, *Lactobacillales*, *Verrucomicrobia*, *Proteobacteria*, *Bacteroidales*, *Actinobacteria* und *Fusobacteria*, sowie deren Unterklassen *Lachnospiraceae* (*Ruminococcus*), *Clostridiaceae* (*Dorea* und *Sporobacter*), *Eubacteriaceae* (*Eubacterium*), *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Akkermansia*, *Acidaminococcaceae* (*Phascolarctobacterium* und *Veillonella*), *Enterobacteriaceae* (*Shigella*, *Escherichia*, *Klebsiella* und *Salmonella*), *Bifidobacterium* und *Eggerthella* zugeordnet werden. Als Nebeneffekt der Rekonditionierung (s.o.) konnte die Rate der direkten Sequenzierung von Peaks, bei denen eine Klonierung nicht notwendig war, von 25 % (n=55) auf 48 % (n=27) erhöht werden.



Peaks	Vor Rekonditionierung	Nach Rekonditionierung
1	*Clostridiales*	*Clostridiales*
	Enterobacteriaceae	-
2	*Clostridiales*	*Clostridiales*
	Enterobacteriaceae	-
	Actinobacteria	-
3	*Klebsiella sp.*	*Klebsiella sp.*
4	*Enterobacteriaceae*	*Shigella sp.*
	Clostridiales	-
	Actinobacteria	-
5	*Bifidobacterium sp.*	*Bifidobacterium sp.*

Abb. 12: Einfluss der Rekonditionierung auf die Zusammensetzung der DHPLC-Profile. Die Rekonditionierung (graue Linie) führte im Vergleich zur Ausgangsprobe (schwarze Linie) zu einer Reduktion der Anzahl an Peaks, was sich auch im Vergleich der Ergebnisse einer Sequenzanalyse von Peaks aus den rekonditionierten bzw. nicht rekonditionierten Proben widerspiegelt (Legende).

Zum einen könnte dies auf die Reduktion von Heteroduplex-Peaks zurückzuführen sein, welche mit den ‚echten' Peaks interferieren (Abb. 12). Auf der anderen Seite könnte der Effekt auch mit der Reduktion interferierender einzelsträngiger DNA erklärt werden (s. Kap. 5.1.3) (Zhang, 2005).

Der Vergleich von 16S rRNA-Sequenzen aus DHPLC-Peaks, welche vor und nach Rekonditionierung gesammelt und analysiert wurden unterstrich diese Annahmen (Abb. 12). So konnten beispielsweise vor der Rekonditionierung in den Peaks 2, 4 und 5 Sequenzen von *Bifidobacterium sp.* (*Actinobacteria*) ermittelt werden. Nach der Rekonditionierung konnte die 16S rRNA-Sequenz dieser Spezies nur in Peak 5 identifiziert werden (Abb. 12). Im Vergleich zum Profil des Referenzstamms (*B. longum*; Abb. 10, Peak 26) kann davon ausgegangen werden, dass Peak 5 in Abbildung 12 das Hauptsignal der identifizierten Spezies darstellte und dass die Sequenzen in Peak 2 und 4 (vor Rekonditionierung) vermutlich auf die Präsenz von Heteroduplex-DNA in den nicht rekonditionierten Proben zurückzuführen waren.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das neu entwickelte DHPLC-Protokoll in der Lage war, 16S rRNA Gene von repräsentativen Vertretern der Darmflora zu trennen, und dass sich die bakteriellen Gattungen der Darmflora in den Peaks von Patientenproben wiederfinden, wurde abschließend die Reproduzierbarkeit der Profile untersucht (Abb. 13).

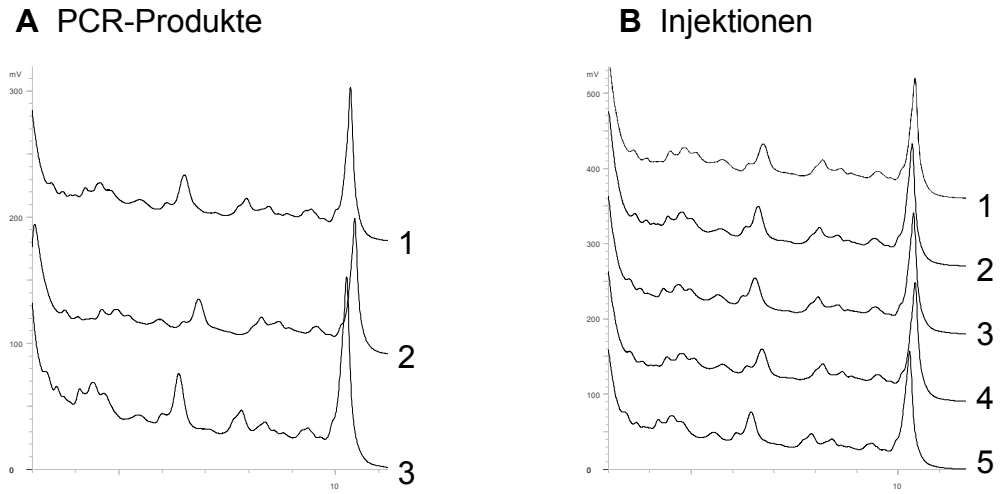


Abb. 13: Reproduzierbarkeit der DHPLC-Profile. (A) DHPLC-Profile dreier PCR-Produkte, welche an drei verschiedenen Tagen aus der jeweils gleichen Probe amplifiziert wurden. (B) Fünf aufeinander folgende Injektionen eines einzigen PCR-Produkts.

Zum einen wurden drei PCR-Reaktionen an drei verschiedenen Tagen durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden anschließend auf die DHPLC aufgetragen und die Profile miteinander verglichen (Ähnlichkeit: 79,5±6,2%) (Abb. 13A).

Abweichungen gab es vor allem in der Höhe einzelner Peaks, was gelegentlich zum Verschwinden von niedrigen Peaks führte. Deutliche Unterschiede wurden beim Vergleich der Retentionszeiten festgestellt. Diese Unterschiede bezogen sich jedoch auf alle Peaks im DHPLC-Profil, d.h. die Abstände der Peaks innerhalb eines Profils blieben konstant. Um zu ermitteln, ob die Verschiebungen der Retentionszeiten abhängig vom Zeitpunkt der Injektion waren, wurde das PCR-Produkt einer ausgewählten Probe fünfmal hintereinander injiziert (Abb. 13B).

Dieses Experiment zeigte, dass sowohl die Retentionszeiten, als auch die DHPLC-Profile über vier aufeinander folgende Injektionen konstant blieben (Ähnlichkeit: 84,7±8,2%). Erst bei der fünften Injektion kam es zu einer leichten Verschiebung der Retentionszeiten (Abb. 13B). Die DHPLC-Profile konnten demzufolge als reproduzierbar angesehen werden. Der direkte Vergleich von zwei unterschiedlichen Proben war allerdings nur dann möglich, wenn die PCR-Produkte beider Proben innerhalb kurzer Zeit auf die DHPLC aufgetragen wurden. Weiterhin wurde ein Vergleich der molekularen Fingerabdrücke von Stuhlproben eines Patienten durchgeführt (Patient 20; Kap. 4.2.1.1.2), welche zum einen mittels DHPLC und zum anderen mittels DGGE erstellt wurden (Abb. 14).

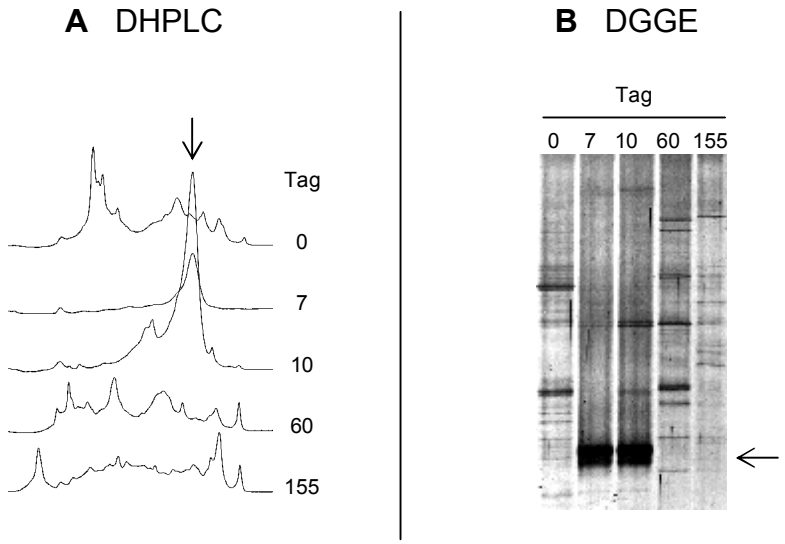


Abb. 14: Vergleich der DHPLC- und DGGE-Profile von Stuhlproben eines Patienten. Die Proben wurden nach Amplifikation der 16S rRNA Genen mittels DHPLC (A) und DGGE (B) analysiert. Die mit einem Pfeil markierten Peaks bzw. Banden wurden eluiert und Sequenzierung der Spezies *E. faecium* zugeordnet.

Aufgrund der Unterschiede im Trennprinzip beider Methoden konnten die Profile nicht direkt (Peak-zu-Bande) miteinander verglichen werden. Allerdings konnte in den Profilen der Stuhlprobe, welche am Tag 7 entnommen wurde, übereinstimmend die 16S rRNA Sequenz von *E. faecium* im Hauptpeak bzw. in der Hauptbande ermittelt werden (markiert durch einen Pfeil in Abb. 14), ein Befund, welcher sich gleichzeitig mit der kulturellen Analyse dieser Probe deckte (Kap. 4.2.1.1.3). In dem gezeigten Beispiel entspricht die Anzahl an detektierten DHPLC-Peaks annäherungsweise der Anzahl an DGGE-Banden (Abb. 14).

Die DHPLC-Daten konnten nach der Programmierung eines geeigneten Import-Scripts in das BioNumerics-Programm (AppliedMaths, Belgien) integriert und entsprechend den DGGE-Daten ausgewertet und verglichen werden. Die ermittelten Ähnlichkeiten (Sörensen/Dice-Index) der, in Abbildung 14 dargestellten Profile sind in Abbildung 15 aufgelistet. Der Vergleich der Standardabweichungen zeigt (Abb. 15, unten rechts), dass es in zwei Fällen (Tag 7/10 und Tag 10/60) zu deutlichen Abweichungen der, mittels DGGE bzw. DHPLC ermittelten, Ähnlichkeiten kam. Diese Unterschiede ergaben sich durch die Anfälligkeit der Berechnungsformel gegenüber niedrigen Werten – in dem vorliegenden Fall die Anzahl der Banden bzw. Peaks. Bei der Berechnung von Ähnlichkeitsindices aus Proben mit geringer Diversität muss demzufolge mit einem größeren Fehler gerechnet werden als beim Vergleich von Proben mit hoher Diversität.

DGGE

Tag	0	7	10	60	155
0	100				
7	31	100			
10	38	67	100		
60	54	15	15	100	
155	39	27	18	38	100

DHPLC

Tag	0	7	10	60	155
0	100				
7	14	100			
10	27	33	100		
60	32	27	61	100	
155	50	22	38	41	100

Mittelwert DGGE/DHPLC

Tag	0	7	10	60	155
0	100				
7	23	100			
10	33	50	100		
60	43	21	38	100	
155	44	25	28	40	100

Standardabweichung

Tag	0	7	10	60	155
0	0				
7	12	0			
10	8	**24**	0		
60	15	8	**33**	0	
155	8	4	14	3	0

Abb. 15: Vergleich von Ähnlichkeitsindices (Sörensen/Dice; in Prozent), welche mittels DGGE (oben links) und DHPLC (oben rechts) auf Grundlage der in Abb. 14 dargestellten Profile der Stuhlproben eines Patienten bestimmt wurden. Die Mittelwerte (unten links) und Standardabweichungen (unten rechts) wurden aus den, mittels BioNumerics (AppliedMaths, Belgien) berechneten, Ähnlichkeitsindices der DGGE und DHPLC Analyse ermittelt.

Der visuelle Vergleich der DHPLC- und DGGE-Profile führte dagegen zu einem vergleichbaren Ergebnis (Abb. 14), so dass sich beide Methoden zur Darstellung von Veränderungen innerhalb der Darmflora eignen.

4.1.4.2 Analyse der Pilzflora mittels ITS2-DHPLC

Eine Methode zur Analyse komplexer Pilzfloren, vergleichbar mit der 16S-DGGE bzw. DHPLC, war anfangs nicht verfügbar, konnte allerdings im Laufe der vorliegenden Studie entwickelt werden. Die neu entwickelte Methode beruht auf der Amplifikation von ITS2-Sequenzen und anschließender Trennung der Amplifikate mittels DHPLC.

Das DHPLC-Protokoll wurde mit Hilfe der Stämme *Candida membranaefaciens*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. magnoliae*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. albicans*, *C. inconspicua*, *C. krusei*, *Cryptococcus neoformans*, *C. kefyr* und *C. glabrata* etabliert und evaluiert. Das Amplifikat jedes Stammes zeigt einen individuellen Peak in der DHPLC. Das Gemisch der Amplifikate wurde im folgenden als Marker verwendet (Abb. 16). Die Reproduzierbarkeit konnte anhand von klinischen Isolaten der Spezies

C. albicans (25 Isolate), *C. glabrata* (22 Isolate), *C. tropicalis* (9 Isolate), *C. kefyr* (7 Isolate), *C. krusei* (7 Isolate), *C. parapsilosis* (7 Isolate) und *C. dubliniensis* (12 Isolate) gezeigt werden (Goldenberg, 2005b). Die Methode wurde zunächst auf die Untersuchung von Blutkulturen angewandt. Dazu wurden 14 selbst beimpfte und 66 klinische Blutkulturen mittels DHPLC untersucht und mit den Ergebnissen der kulturellen Analyse verglichen. Mit Ausnahme einer Probe, in der anhand einer kulturellen Analyse *Trichosporon asahii* identifiziert wurde, konnten alle Pilze mit Hilfe der DHPLC korrekt bestimmt werden. Der Peak von *T. asahii* konnte zwar detektiert, aber nicht identifiziert werden, da der entsprechende Peak nicht im Marker (Abb. 16) vorhanden war (Goldenberg, 2005b). Die Anwendbarkeit der Methode auf die Analyse der Pilzflora in Stuhlproben wurde anhand von vier zufällig ausgewählten Proben untersucht.

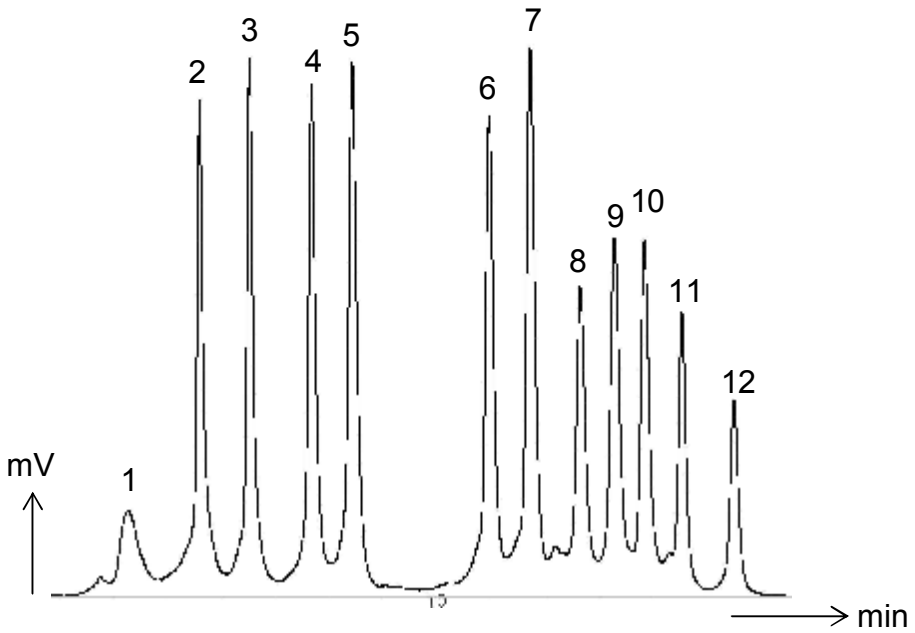


Abb. 16: *Candida*-Marker. Die Amplifikate der Stämme *C. membranaefaciens* (1), *C. tropicalis* (2), *C. parapsilosis* (3), *C. magnoliae* (4), *C. lusitaniae* (5), *C. dubliniensis* (6), *C. albicans* (7), *C. inconspicua* (8), *C. krusei* (9), *Cryptococcus neoformans* (10), *C. kefyr* (11) und *C. glabrata* (12) wurden gemischt und auf der DHPLC getrennt. Jede Spezies wurde durch einen diskreten Peak repräsentiert.

Die Ergebnisse der DHPLC wurden auch hier durch kulturelle und biochemische Analysen überprüft. In zwei Proben konnte, in Übereinstimmung mit der Kultur, *C. glabrata*, sowie in einer Probe *C. albicans* und *C. kefyr* nachgewiesen werden. Die kulturell und molekular ermittelten Ergebnisse der vierten Probe wichen voneinander ab. Die Präsenz von *C. albicans* konnte mit beiden Methoden gezeigt werden,

wohingegen das Vorhandensein von *C. glabrata* nur durch einen entsprechenden DHPLC-Peak angezeigt wurde. Auf der anderen Seite konnte die Besiedlung mit *Geotrichum candidum* nur kulturell, nicht aber molekular gezeigt werden (Goldenberg, 2005b).
Aufgrund der Möglichkeit, mehrere Pilze gleichzeitig detektieren zu können, wurde die neu entwickelte Methode für die Analyse der Pilzflora aus Stuhlproben von Patienten mit hämatologischen Krebserkrankungen eingesetzt (s. Kap. 4.2.2).

4.1.5 Quantitative Analyse mittels Echtzeit-PCR

Für eine spezifische Quantifizierung wurde die Gattung *Bacteroidales* ausgewählt, da die Spezies dieser Gruppe den größten Anteil an der Darmflora ausmachen (Donskey, 2003; Goker, 1995). Die Sonden für die Detektion der gruppenspezifischen Sequenzen wurden mit Hilfe der ARB-Software (frei zugänglich unter www.arb-home.de) konzipiert. Auf dem amplifizierten 16S rRNA Genabschnitt befand sich zudem eine konservierte Sequenz, die als Zielsequenz für die eubakteriellen Sonden diente. Es stellte sich heraus, dass diese Zielsequenz zu kurz für die Bindung von zwei Sonden mit jeweils 20 bp Länge war. Eine Verkürzung der Sonden war aber unmöglich, da dies die Bindungstemperatur der Sonden und somit die Spezifität der PCR-Reaktion herabgesetzt hätte. Um dennoch eine Verkürzung der Sonden unter Beibehalt der Bindungstemperatur zu gewährleisten, wurden erstmals LNA Moleküle in FRET-Sonden (Fluoreszenz Resonanz Elektronen Transfer) eingebaut und verwendet. Dadurch konnte die Länge der einzelnen Sonden auf 11 bzw. 8 bp reduziert werden. Die Quantifizierung wurde durch die neuartigen Moleküle nicht beeinträchtigt, was durch den Vergleich mit einer SybrGreen-Quantifizierung gezeigt werden konnte (Goldenberg, 2005a). Darüber hinaus war es möglich, die Sondenpaare für die eubakterielle und *Bacteroidales*-spezifische Quantifizierung in einer Reaktion zu verwenden und gleichzeitig zu detektieren. Aufgrund der zeitaufwendigen Etablierung geeigneter Gruppen-spezifischer Sonden konnte diese Methode nicht für die Analyse der Stuhlproben von Patienten mit hämatologischen Krebserkrankungen herangezogen werden.

4.2 Analyse der Stuhlproben von Patienten mit hämatologischen Krebserkrankungen

In einem Zeitraum von 20 Monaten (Mai 2003 – Dezember 2004) wurden 298 Stuhlproben von insgesamt 45 Patienten mit hämatologischen Krebserkrankungen eingesammelt (Tab. 5A und 5B). Die in den Proben enthaltene DNA wurde extrahiert und aufgereinigt. Sie diente als Ausgangsmaterial für eine Reihe von Untersuchungen, deren Ergebnisse in den folgenden Kapiteln dargestellt werden sollen.

4.2.1 Analyse der bakteriellen Flora

Die bakterielle Zusammensetzung der Darmflora vor, während und nach der Therapie einer hämatologischen Krebserkrankung wurde mittels DGGE untersucht. Die DGGE-Gele wurden unter zwei Gesichtspunkten ausgewertet. Auf der einen Seite wurden Veränderungen innerhalb der Darmflora durch den Vergleich der Bandenmuster der einzelnen Proben und die Bestimmung eines Ähnlichkeitskoeffizienten (Sörensen/Dice-Index; Kap. 3.6.3) dargestellt. Zusätzlich erfolgte eine Bewertung der Diversität durch Auszählen der DGGE-Banden. Ein Beispiel für die Auswertung eines DGGE-Gels ist in Abbildung 17 dargestellt.
Die Proben von Patient 1 wurden in chronologischer Reihenfolge auf das Gel aufgetragen. Während der ersten 14 Tage blieb die Diversität der Darmflora erhalten (Proben A1 bis B9). Während dieser Zeit erhielt der Patient eine Antibiotikaprophylaxe mit Ciprofloxacin und Cotrimoxazol. Die Ähnlichkeit der Bandenmuster nahm, bezogen auf die Ausgangsprobe (A1), kontinuierlich ab und betrug nach 14 Tagen nur noch 40,7 Prozent (B9). Ausgelöst durch die Gabe von Breitspektrum-Antibiotika konnte eine deutliche Abnahme der Diversität beobachtet werden. So erhielt der Patient vor und während der Probenahme B10 (Tag 20) eine Antibiotikatherapie mit Vancomycin und Ceftazidim, unter Beibehaltung der Prophylaxe mit Cotrimoxazol. Die Gabe von Ciprofloxacin war kurz vor Probenahme B9 eingestellt worden.

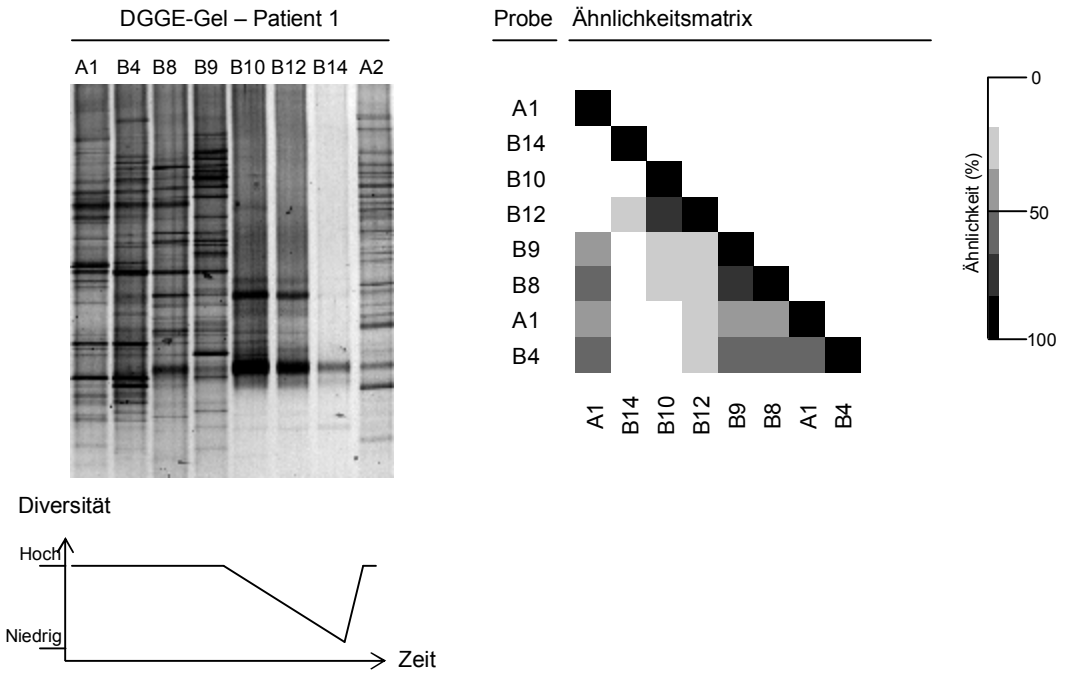


Abb. 17: Auswertung eines DGGE-Gels am Beispiel eines allogen transplantierten Patienten. Die amplifizierten 16S rRNA Genfragmente aus den Stuhlproben wurden in chronologischer Reihenfolge auf das DGGE-Gel aufgetragen und getrennt (links). Im Anschluss wurden die Bandenprofile mit Hilfe der Bionumerics-Software miteinander verglichen und ein Ähnlichkeitsindex (Sörensen/Dice) berechnet. Die Ausgabe der Ergebnisse erfolgte graphisch (Ähnlichkeitsmatrix) oder numerisch. Die Anzahl der Banden wurde als Maß für die Diversität in den Stuhlproben herangezogen (unter dem Gel) (siehe Text).

Die Antibiotikatherapie wurde nach sechs Tagen auf Clindamycin umgestellt, sowie durch die erneute Gabe von Ciprofloxacin ergänzt. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Probe B12 eingesammelt (Tag 24). Die nächste Probenahme erfolgte am Tag 32 (Probe B14), sechs Tage nach Absetzen von Clindamycin und noch immer unter dem Einfluss von Ciprofloxacin und Cotrimoxazol. Im Vergleich zum Bandenmuster der Ausgangsprobe (A1) betrug die Ähnlichkeit der Proben B10, B12 und B14 weniger als 20 Prozent, wohingegen sich die Proben B10 und B12 zu 72,7 % ähnlich waren. In der Spur der Probe B14 konnten nur noch drei Banden beobachtet werden. Diese Probe unterschied sich am deutlichsten von allen anderen und hatte die größte Ähnlichkeit mit der Probe B12 (26,7 %), welche 8 Tage zuvor eingesammelt worden war. Die letzte Probe (A2) wurde 52 Tage nach Aufnahme und 20 Tage nach Probe B14 eingesammelt. Zu diesem Zeitpunk wurde dem Patienten nur noch Cotrimoxazol als Antibiotikaprophylaxe verabreicht, wohingegen die Prophylaxe mit Ciprofloxacin 16 Tage zuvor eingestellt worden war. Die Anzahl der Banden war deutlich höher als zuvor und vergleichbar mit dem Zustand vor der Behandlung mit Breitspektrum-

Antibiotika (B9). Das Muster der Banden entsprach zu etwa 50 % den Proben B4, B8 und B9. Die Ähnlichkeit zur Ausgangsprobe (A1) betrug dagegen nur 35,7 Prozent.
Auf diese Art und Weise wurden alle Proben der Patienten untersucht und unter verschiedenen Gesichtspunkten miteinander verglichen.

4.2.1.1 Der Einfluss von Antibiotika auf die Darmflora

Die Behandlung der Patienten mit Antibiotika hatte viele Ursachen, ließ sich allerdings in zwei übergeordnete Anwendungen unterteilen. Zum einen diente die Gabe von Antibiotika der Prophylaxe endogen erworbenen Infektionen (s. Kap. 1.2.1). Auf der anderen Seite wurden Antibiotika als Therapie gegen Infektionen, bzw. als Reaktion auf Fieber mit unbekanntem Ursprung, eingesetzt. Unter diesen beiden Gesichtspunkten wurden die entsprechenden Proben der Patienten bezüglich Diversität und Ähnlichkeit miteinander verglichen.

4.2.1.1.1 Antibiotikaprophylaxe

Knapp zwei Drittel aller Patienten (28 von 45) erhielten bereits vor der ersten Probenahme Antibiotika, so dass der Einfluss der Prophylaxe auf die Zusammensetzung der Normalflora nur in 17 Fällen untersucht werden konnte. Aus dieser Gruppe erhielten 13 Patienten eine Prophylaxe mit Ciprofloxacin. Die Diversität der DGGE-Banden nahm in Folge dessen im Mittel von 18,3 (± 4,0) auf 12,5 (± 4,6) ab. Die Ähnlichkeit der Proben vor und nach Behandlung betrug durchschnittlich 42,6 % (± 17,0 %). Die übrigen vier Patienten der Gruppe erhielten alle unterschiedliche Antibiotikabehandlungen, so dass sie nicht zu einer weiteren Untergruppe zusammengeschlossen werden konnten. Vier weitere Patienten wurden ebenfalls mit Ciprofloxacin behandelt, mit dem Unterschied, dass die Ciprofloxacin-Prophylaxe bereits 1-3 Tage vor der ersten Probenahme begonnen hatte. Bei dem Vergleich dieser Proben konnte ein Rückgang der Diversität von durchschnittlich 20,8 (± 4,4) auf 14,0 (± 7,7) DGGE-Banden beobachtet werden. Die Abnahme der Diversität entsprach demnach 67,3 % und war vergleichbar mit dem Wert der Proben ohne vorherige Antibiotikabehandlung (68,3 %; s.o.). Die Ähnlichkeit der Proben lag im Mittel bei 35,4 % (± 25,2 %), wobei die hohe Standardabweichung durch eine

starke Streuung der Werte (von 0 bis 47,1 %) sowie eine geringe Anzahl an Patienten zustande kam. Eine dritte Gruppe von Patienten (n=7) erhielt eine Antibiotikaprophylaxe mit Cotrimoxazol und Ciprofloxacin. Wie oben bereits erwähnt, standen auch hier die ersten Proben unter dem Einfluss der Prophylaxe. Die Reduktion der Diversität der DGGE-Banden fiel verhältnismäßig gering aus (von 21,0 ± 6,5 auf 18,4 ± 7,7). Die Ähnlichkeit betrug durchschnittlich 57,4 % (± 8,9 %).

4.2.1.1.2 Antibiotikatherapie

Neben der Prophylaxe wurde, bei Bedarf (z.B. Fieber), eine Therapie mit Antibiotika durchgeführt. Zu Beginn der Antibiotikatherapie war der Ursprung des Fiebers zumeist unklar, so dass von einer beginnenden Infektion mit einem unbekannten Keim ausgegangen werden musste, was den empirischen Einsatz von Breitspektrum-Antibiotika erforderlich machte. Die Auswahl der verwendeten Antibiotika konnte sich von Patient zu Patient unterscheiden. Eine globale Auswertung der Wirkung von Breitspektrum-Antibiotika auf die Darmflora war daher nicht möglich. Zudem konnte der Einfluss der prophylaktisch und therapeutisch verabreichten Antibiotika in einigen Fällen nicht voneinander getrennt werden, da beide Behandlungen ineinander übergingen. Aus diesem Grund soll an dieser Stelle nur exemplarisch auf die Wirkung von Breitspektrum-Antibiotika auf die Darmflora eingegangen werden.

In Abbildung 18 sind die DGGE-Profile der Stuhlproben zweier Patienten im zeitlichen Verlauf dargestellt. Patient 20 (Abb. 18A) erhielt bereits vor der ersten Probenahme eine Antibiotikaprophylaxe mit Ciprofloxacin und Cotrimoxazol. Das DGGE-Profil dieser Probe wies 18 Banden auf, ein Zeichen für eine reduzierte, aber noch vorhandene Diversität. Die nächste Probe wurde eine Woche später eingesammelt. Zu diesem Zeitpunkt erhielt der Patient bereits den sechsten Tag Imipenem/Cilastin, wohingegen die Prophylaxe mit Ciprofloxacin direkt nach der ersten Probenahme eingestellt wurde. Das DGGE-Profil unterschied sich sehr deutlich vom vorhergehenden Profil. Im unteren Viertel des Gels konnten zwei sehr prominente Banden detektiert werden, die vor der Gabe von Imipenem/Cilastin nicht vorhanden waren. Die Diversität des Profils reduzierte sich auf 6 Banden. Das Profil der folgenden Probe, welche nur drei Tage später eingesammelt wurde, war nahezu identisch. Die Gabe der Antibiotika wurde zu diesem Zeitpunkt aufrechterhalten.

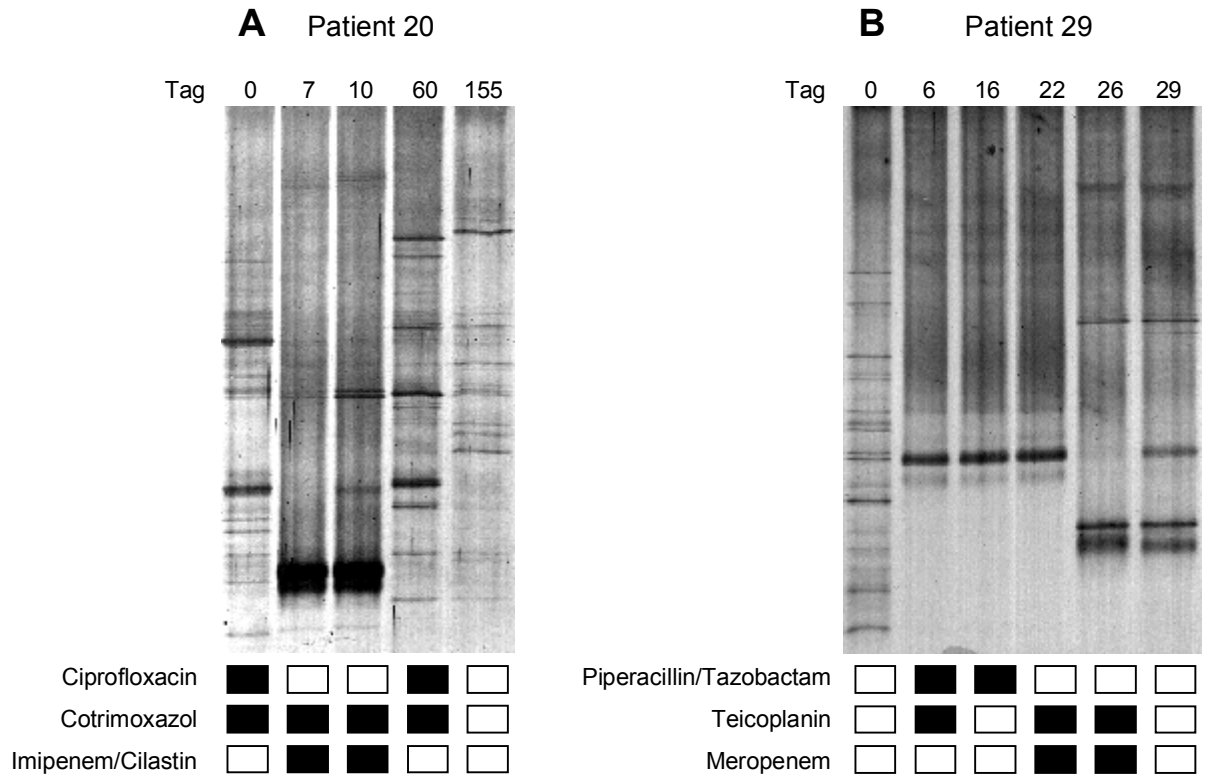


Abb. 18: Einfluss von Breitspektrum-Antibiotika auf die Zusammensetzung der Darmflora. Die Gabe der jeweiligen Antibiotika ist durch schwarze Kästchen unterhalb der DGGE Gele angedeutet. Patient 20 (A) erhielt, zusätzlich zur Prophylaxe, eine Therapie mit Imipenem/Cilastin (Tage 7 und 10). Diese Behandlung führte zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl and Banden in den DGGE-Profilen, was als Indiz für eine Reduktion der bakteriellen Diversität in den Proben gewertet wurde. Ähnliche Beobachtungen konnten auch für die Gabe anderer Breitspektrum-Antibiotika gemacht werden. Als Beispiel ist hier der Einfluss von Piperacillin/Tazobactam, Teicoplanin und Meropenem dargestellt (B; Patient 29).

Die Therapie mit Imipenem/Cilastin wurde erst 17 Tage nach dieser und 33 Tage vor der nächsten Probenahme eingestellt. Die Prophylaxe mit Cotrimoxazol wurde aufrechterhalten und ab Tag 26 durch Ciprofloxacin ergänzt. Das DGGE-Profil der Stuhlprobe am Tag 60 wies, im Vergleich zur vorhergehenden Probe, eine deutlich höhere Diversität (20 Banden) auf. Vereinzelt konnten Banden detektiert werden, die bereits zu Beginn (Tag 0) im DGGE-Profil vorhanden waren. Die Ähnlichkeit der beiden Proben betrug 42,1 Prozent. Die letzte Probe wurde fast 100 Tage später eingesammelt und stand nicht mehr unter dem Einfluss von Antibiotika. Die Diversität der DGGE-Banden dieser Probe war annähernd so hoch (16 Banden) wie die der Proben am Tag 0 und 60. Das Profil war mit 44,4 % ähnlicher zu Tag 60 als zu Tag 0 (35,5 %).

Im zweiten Teil der Abbildung (18B) sind die DGGE-Profile der Proben von Patient 29 dargestellt, welcher nur kurzzeitig eine Prophylaxe mit Ciprofloxacin (unmittelbar nach der ersten Probenahme für insgesamt drei Tage) erhielt. Die erste Probe von

Tag 0 stellte den unbehandelten Ausgangszustand der Darmflora dar. Das DGGE-Profil dieser Probe zeigte eine hohe Diversität (20 Banden). Zwei Tage später wurde, als Reaktion auf das Entstehen von Fieber, eine Therapie mit Piperacillin/Tazobactam und Teicoplanin begonnen. Die Probe von Tag 6 verdeutlichte die Wirkung dieser Breitspektrum-Antibiotika auf die Darmflora. Die Diversität war fast vollständig verschwunden. Stattdessen wurde eine prominente Bande detektiert, welche zuvor noch nicht in diesem Maße vorhanden war. Das Profil war auch an den Tagen 16 und 22 noch unverändert, obwohl in diesem Zeitraum die Antibiotikatherapie mehrfach umgestellt worden war (Absetzen von Teicoplanin; später Absetzen von Piperacillin/Tazobactam und Therapie mit Teicoplanin und Meropenem). Erst am Tag 26 konnte eine Veränderung des Bandenmusters beobachtet werden, wenngleich die Diversität niedrig blieb. Die Ähnlichkeit mit der vorhergehenden Probe betrug nur noch 23,5 Prozent. Die Veränderung des Profils konnte allerdings nicht in Zusammenhang mit einer Änderung der Antibiotikatherapie gebracht werden, da sowohl am Tag 22 als auch am Tag 26 eine Therapie mit Teicoplanin und Meropenem durchgeführt wurde. Wiederum drei Tage später wurde eine letzte Probe eingesammelt und mittels DGGE untersucht. Zu diesem Zeitpunkt erhielt der Patient keine Antibiotika mehr, allerdings lag das Absetzen von Teicoplanin und Meropenem nur drei bzw. zwei Tage zurück. Das DGGE-Profil war dem der zuvor untersuchten Probe sehr ähnlich. Eine signifikante Zunahme der Diversität konnte zu diesem Untersuchungszeitpunkt noch nicht festgestellt werden.

Die oben exemplarisch beschriebenen Veränderungen bezüglich Reduktion der Diversität konnten auch beim Vergleich weiterer Patientenproben beobachtet werden. Abbildung 19 zeigt kumulierte Diversitätswerte, sortiert nach Art der Therapie (allogene oder autologe KMT; Chemotherapie), dem aktuellen Zeitpunkt der Behandlung (z.B. Aufnahme, Neutropenie oder Rekonstitution) und der Gabe von Breitspektrum-Anitibiotika. Der prozentuale Anteil der Proben mit hoher (schwarz), reduzierter (grau) und niedriger Diversität (weiß) ist auf der X-Achse dargestellt. Bei Betrachtung der Abbildung wird zum einen deutlich, dass die Mehrzahl der Patienten (37 von 45) Breitspektrum-Antibiotika erhielten, so dass die Werte der Patienten ohne eine entsprechende Behandlung aufgrund der niedrigen Fallzahlen nur als Orientierung dienen. Der Vergleich zeigt jedoch, dass die Behandlung mit Breitspektrum-Antibiotika (Abb. 19; Mitte) zu einem deutlichen Rückgang der Diversität führte ($p<0,05$).

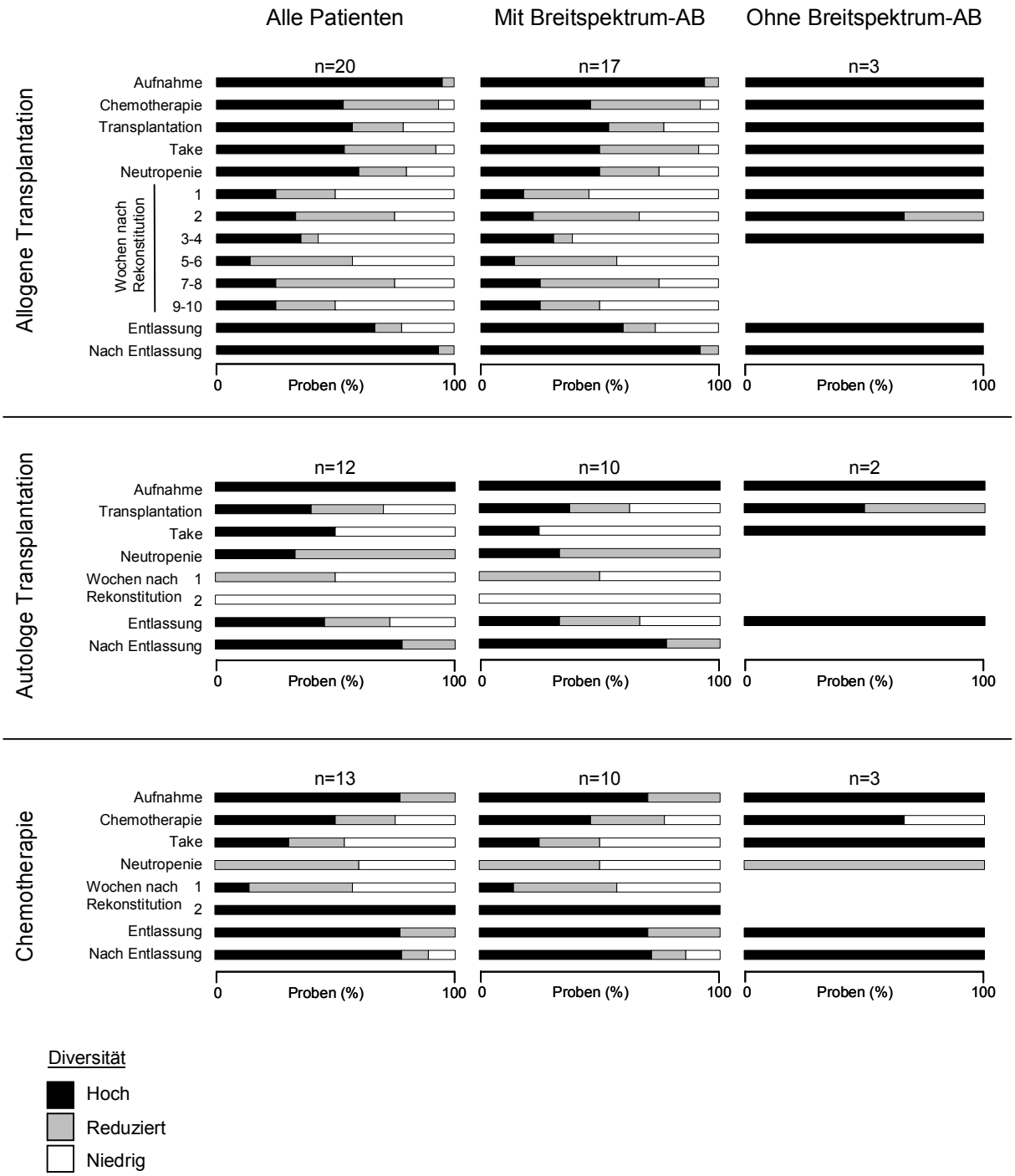


Abb. 19: Veränderungen der Diversität in den DGGE-Profilen von allogen transplantierten (Oben), autolog transplantierten (Mitte) und chemotherapierten Patienten (Unten) in Abhängigkeit von der Behandlung mit Breitspektrum-Antibiotika. Siehe Text.

4.2.1.1.3 Kulturelle Analyse von Stuhlproben

Wie bereits im vorhergehenden Kapitel angedeutet, kam es durch die Behandlung der Patienten mit Breitspektrum-Antibiotika zu einer Reduktion der Darmflora.

Anhand der DGGE-Profile wurden Proben ausgewählt, die nur eine geringe Anzahl an Banden aufwiesen. Die noch lebensfähigen Bakterien in diesen Proben wurden durch kulturelle Verfahren angezüchtet, sowie deren Identität durch kulturelle, biochemische und/oder molekulare Methoden bestimmt. Zudem wurde eine Testung des Resistenzspektrums der Isolate durchgeführt. Insgesamt konnten aus 52 Proben von 30 Patienten 168 Bakterienstämme isoliert werden. Durch die Analyse mehrerer Proben des gleichen Patienten wurden insgesamt 37 Stämme mehrfach isoliert, so dass tatsächlich 131 verschiedene Isolate vorlagen. Das entsprach einer durchschnittlichen Anzahl von 2,5 Isolaten pro Probe, wobei diese Zahl zwischen 1 und 8 variierte. Mehr als 80 % der Isolate konnten als Gram-(+) Bakterien identifiziert werden (Abb. 20).

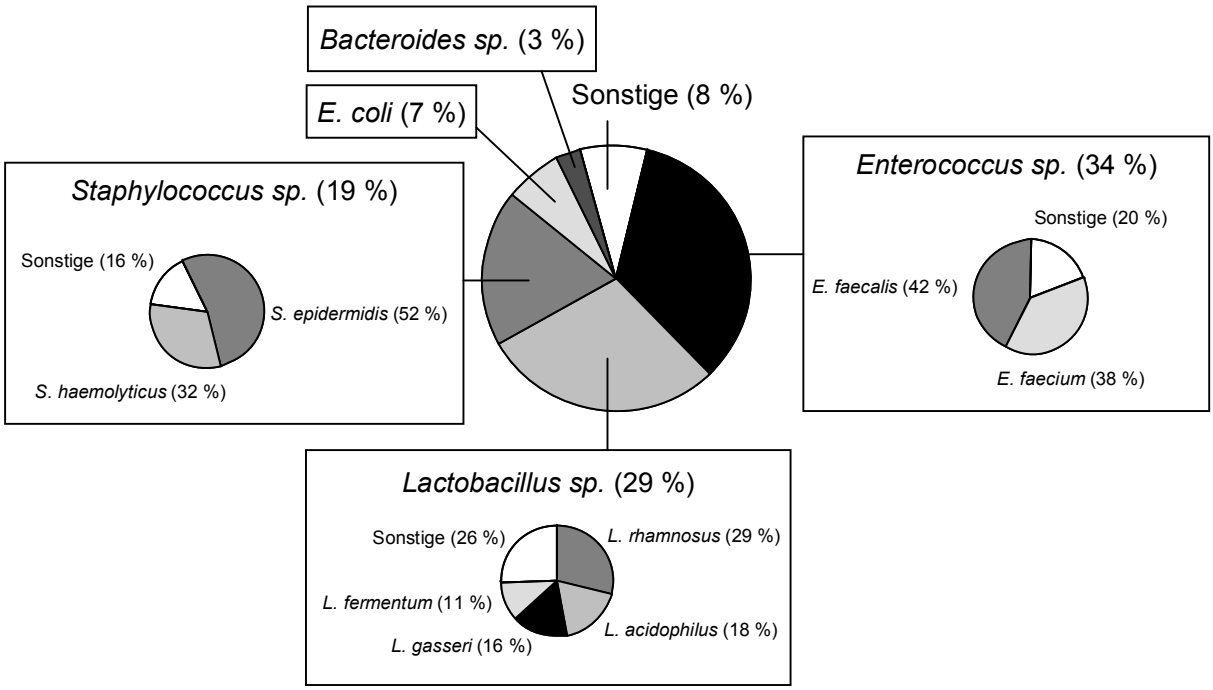


Abb. 20: Anteil kultivierter Bakterienstämme aus Stuhlproben, welche unter Therapie mit Breitspektrum-Antibiotika gesammelt wurden. Die Angaben bezüglich der bakteriellen Arten (z.B. *Enterococcus* sp.) beziehen sich auf eine Anzahl von insgesamt 131 Isolaten. Der Anteil der einzelnen Spezies (z.B. *E.* faecalis) bezieht sich auf die Anzahl der Isolate der jeweiligen Art.

Zu dieser Gruppe gehörten *Enterococcus sp.* (34 %), *Lactobacillus sp.* (29 %) und *Staphylococcus sp.* (19 %), als auch weniger abundante Spezies wie *Pediococcus pentosaceus* (3 %) und *Lactococcus lactis* (1 %). Der Gesamtanteil an Isolaten aus der Gruppe der Gram-(-) Bakterien betrug nur etwa 10 % und beinhaltete Isolate von *Escherichia coli* (7 %) und *Bacteroides* Spezies (3 %) (Abb. 20). Des weiteren konnten, neben den bereits oben genannten Bakterien, noch *Clostridium* Spezies (2

%), *Corynebacterium sp.* (1 %), *Stenotrophomonas maltophila* (1 %) und *Enterobacter sp.* (1 %) isoliert werden. Die Gruppe der *Enterococcus* Spezies setzte sich zu großen Teilen aus *E. faecalis* (42 %) und *E. faecium* (38 %) Isolaten zusammen. *L. rhamnosus* (29 %), *L. acidophilus* (18 %), *L. gasseri* (16 %) und *L. fermentum* (11%) waren die häufigsten Vertreter der *Lactobacillus* Gruppe. Mehr als die Hälfte aller Isolate der Staphylokokken konnte als *S. epidermidis* (52 %) identifiziert werden. Ein weiterer prominenter Vertreter innerhalb dieser Gruppe war *S. haemolyticus* (32%). Zudem konnte in drei Proben *C. albicans* und in vier Proben *C. glabrata* nachgewiesen werden.

Für alle isolierten bakteriellen Spezies wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) gegenüber verschiedenen Antibiotika bestimmt. Die Ergebnisse der Resistenztestung für die am häufigsten isolierten Spezies (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. coli* und *S. epidermidis*) sind in Abbildung 21 dargestellt. Die linke und mittlere Spalte zeigen jeweils die Werte für die Antibiotika Ciprofloxacin und Cotrimoxazol, welche als Prophylaxe verabreicht wurden. In der rechten Spalte der Abbildung 21 sind Ergebnisse für ausgewählte Breitspektrum-Antibiotika dargestellt. Die Auswahl erfolgte aufgrund der Relevanz dieser Antibiotika während der Therapie. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie wurden denen der Paul-Ehrlich-Gesellschaft (PEG) von 2001 gegenüber gestellt (http://www.p-e-g.org). Allerdings muss darauf verwiesen werden, dass die Anzahl der dort getesteten Stämme die der vorliegenden Studie deutlich überstieg, so dass der Vergleich nur als Orientierung und Einordnung der erhobenen Daten diente. So ist bei Betrachtung von Abbildung 21 festzustellen, dass die Resistenzwerte der dargestellten Spezies fast durchgehend über denen der Referenzwerte lagen (mit Ausnahme von Cotrimoxazol / *E. faecium*). So waren z.B. 78 % aller getesteten *E. coli* Stämme (n=9) resistent gegenüber Ciprofloxacin, wohingegen der Anteil bei der PEG-Studie nur bei 12 % lag. Die analysierten *E. coli* Stämme wiesen zudem, im Vergleich zur PEG-Studie, erhöhte Resistenzwerte gegenüber Cotrimoxazol und Piperacillin/Tazobactam auf. Bei den getesteten Patientenisolaten von *E. faecium* (n=17) konnte dagegen kaum ein Unterschied im Resistenzverhalten gegenüber Ciprofloxacin und Cotrimoxazol festgestellt werden. Es war jedoch auffällig, dass fast alle Stämme (94 %) eine Resistenz gegenüber Imipenem/Cilastin aufwiesen, gut 50 % mehr als bei der Referenzstudie. Dagegen waren alle getesteten *E. faecalis* Stämme (n=18) sensibel gegenüber Imipenem/Cilastin.

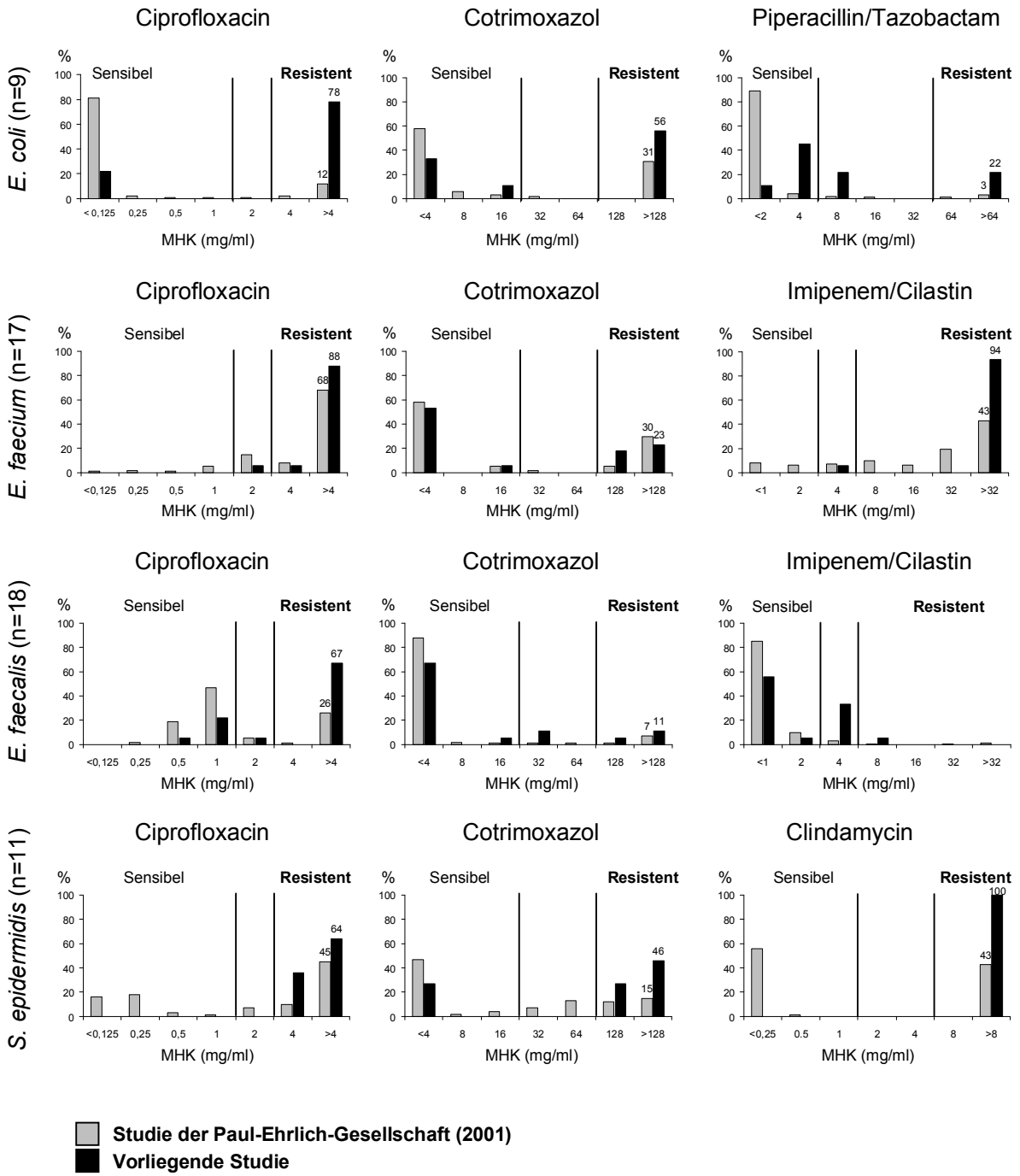


Abb. 21: Verteilung der MHK-Werte bezogen auf den Anteil der getesteten bakteriellen Spezies. Die Daten der vorliegenden Studie (schwarz) wurden denen der Paul-Ehrlich-Gesellschaft von 2001 (grau) gegenübergestellt.

Dafür zeigten diese wiederum eine höhere Resistenz gegenüber Ciprofloxacin (67 %). Eine erhöhte Cotrimoxazol-Resistenz konnte nicht festgestellt werden.

Die isolierten *S. epidermidis* Stämme (n=11) fielen in erster Linie dadurch auf, dass sie alle resistent gegenüber Clindamycin waren, wohingegen der Anteil bei der PEG-Studie nur 43 % betrug. Auch die Resistenz dieser Isolate gegenüber Cotrimoxazol (45 %) war im Vergleich zur PEG-Studie dreimal so hoch. Für die Auswertung der

Resistenzspektren von Isolaten aus der Gruppe der Milchsäurebakterien (Laktobazillen und Pediokokken; n=19) standen aufgrund der geringen klinischen Relevanz dieser Bakterien keine Vergleichswerte anderer Institute zur Verfügung.

Tab. 10: Anzahl resistenter Milchsäurebakterien (Laktobazillen und Pediokokken).

Antibiotikum	Resistente Isolate (%)
Ciprofloxacin	52,6
Cotrimoxazol	52,6
Vancomycin	73,7
Teicoplanin	68,4
Meropenem	52,7

In Tabelle 10 ist der Anteil von Milchsäurebakterien mit einer Resistenz gegenüber den Antibiotika Ciprofloxacin und Cotrimoxazol sowie gegenüber den Breitspektrum-Antibiotika Vancomycin, Teicoplanin und Meropenem aufgelistet.

Zu Beginn des Kapitels wurde darauf hingewiesen, dass die Auswahl der zu kultivierenden Proben aufgrund der geringen Anzahl an Banden in der DGGE getroffen wurde. Die daraufhin erhobenen Daten zeigten eine Dominanz von resistenten Isolaten, welche zum größten Teil der Gruppe der Gram-(+) Bakterien zugeordnet werden konnten. Im Umkehrschluss musste nun gezeigt werden, dass diese Isolate den in der DGGE beobachteten Banden entsprachen. Zu diesem Zweck wurden die amplifizierten 16S rRNA Gene der Isolate parallel zu ihren Ursprungsproben auf ein DGGE-Gel aufgetragen. Mit Hilfe dieses Vergleichs konnten einzelne DGGE-Banden bestimmten Bakterien zugeordnet werden, wie Abbildung 22 dargestellt. Die DGGE-Gele der beiden Patienten sowie deren Antibiotikabehandlung wurden bereits im Kapitel 4.2.1.1.2 vorgestellt (vgl. Abb. 18). Durch die kulturelle Analyse der Stuhlprobe des Patienten 20 von Tag 10 konnten zwei Bakterien isoliert und identifiziert werden. Die parallele Auftragung der Stämme und der Probe auf ein DGGE ergab, dass das erste Isolat (*S. epidermidis*) für die Bande im oberen Drittel des Gels verantwortlich war (Abb. 22A; Tag 10). Die prädominante Bande in der gleichen Spur konnte hingegen *E. faecium* zugeordnet werden (Abb. 22A; Tag 10). Im zweiten Beispiel (Abb. 22B; Patient 29) wurde die Stuhlprobe von Tag 6 kulturell untersucht. Das Isolat (*L. rhamnosus*) konnte der prädominanten Bande in der entsprechenden DGGE-Spur zugeordnet werden (Abb. 22B). In Abbildung 22 sind weiterhin die Resistenzen der isolierten Bakterien

gegenüber den verwendeten Antibiotika aufgelistet. Die Beispiele zeigen exemplarisch, dass das Auftreten resistenter Bakterienstämme in vielen Fällen mit der vorherigen Gabe von entsprechenden Antibiotika korrelierte. So war z.B. das *S. epidermidis* Isolat von Patient 20 (Abb. 22A) resistent gegenüber jenen Antibiotika (Ciprofloxacin, Cotrimoxazol und Imipenem/Cilastin), welche wenige Tage zuvor verabreicht worden waren.

Neben den hier vorgestellten Studien wurden bei Verdacht auf eine Infektion routinemäßig Blutkulturen von Patientenproben angelegt. Insgesamt 13 dieser Proben wurden positiv auf bakterielles Wachstum getestet. In acht Fällen handelte es sich bei den Isolaten um *S. epidermidis*. Zweimal wurde *E. faecalis*, sowie jeweils einmal *S. marcescens* und *S. warneri* detektiert. In einem weiteren Fall konnten zwei Isolate (*S. epidermidis* und *E. coli*) gleichzeitig identifiziert werden. Eine Korrelation dieser Daten zu den molekularen und kulturellen Ergebnissen der vorliegenden Studie konnte nicht festgestellt werden.

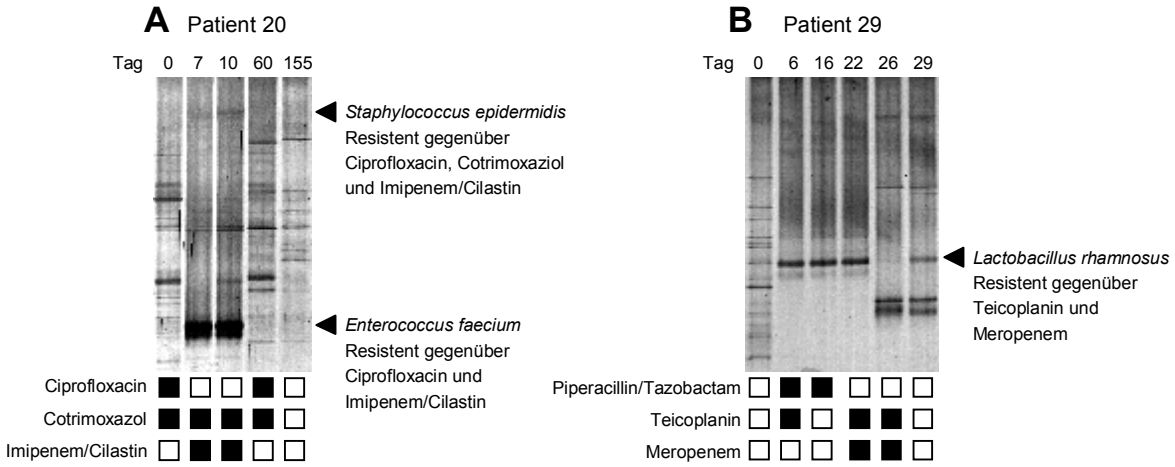


Abb. 22: Gegenüberstellung der molekular und kulturell erhobenen Daten. Die prominenten DGGE-Banden konnten den, aus diesen Proben isolierten Spezies *S. epidermidis* (A; Tag 10), *E. faecium* (A; Tag 10) und *L. rhamnosus* (B; Tag 6) zugeordnet werden. Die ermittelten Resistenzen der Isolate korrelierten mit den jeweils verabreichten Antibiotika (schwarze Kästchen unter den DGGE-Gelen).

4.2.1.2 Weitere Einflussfaktoren

4.2.1.2.1 Chemotherapie

Die Therapie mit zytostatischen Medikamenten wurde bei allen Patienten durchgeführt, unabhängig von der Art der anschließenden Transplantation bzw.

Behandlung. Die Chemotherapie wurde bei 17 Patienten (16 autolog und ein allogen transplantierter Patient) durch eine zusätzliche Ganzkörperbestrahlung ergänzt. In allen Fällen war die Chemotherapie nicht von der Antibiotikaprophylaxe zu trennen, da diese vorher oder gleichzeitig begonnen wurde. Die Effekte der Chemotherapie auf die Zusammensetzung der Darmflora waren daher nicht vom Einfluss der Antibiotika zu trennen.

4.2.1.2.2 Durchfälle

Das Auftreten von Durchfällen während der Therapie von hämatologischen Krebserkrankungen kann eine Reihe von Ursachen haben. Es stellte sich daher zum einen die Frage, ob die beobachteten Durchfallerkrankungen der Studienpatienten einem besonderen klinischen Parameter zugeordnet werden konnten. Auf der anderen Seite sollte untersucht werden, inwieweit die Zusammensetzung der Darmflora mit dem Auftreten von Durchfällen korrelierte.
Insgesamt konnten bei 20 Patienten Durchfälle während ihres stationären Aufenthalts festgestellt werden. Bei den allogen transplantierten Patienten (n=13; 17 Episoden) traten die Durchfälle häufig in Zusammenhang mit einer GvHD, parenteraler Ernährung (PE), Fieber und/oder CMV-Kolitis auf (Tab. 11). In einem Fall konnte der Durchfall mit einer *C. difficile* Infektion (Nachweis von Toxin A) in Zusammenhang gebracht werden. Bei einem weiteren Patienten dieser Gruppe konnte ebenfalls Toxin A nachgewiesen werden, allerdings ohne gleichzeitigen Durchfall. Zwei Durchfall-Episoden konnten keiner klinischen Symptomatik zugeordnet werden. Bei zwei von drei autolog transplantierten Patienten wurde während des Durchfalls Fieber dokumentiert, wobei einer dieser Patienten gleichzeitig parenteral ernährt wurde. Ein weiterer Patient dieser Gruppe zeigte keine klinische Symptomatik. Die Symptomatik der chemotherapierten und autolog transplantierten Patienten mit Durchfall war vergleichbar. Das Auftreten von Durchfällen konnte nicht mit einem bestimmten Zustand der Darmflora in Zusammenhang gebracht werden. So betrug die Diversität der DGGE-Profile zu diesem Zeitpunkt durchschnittlich 8,7 Banden, wobei die Standardabweichung mit 7,6 Banden sehr hoch ausfiel, was der großen Streuung der Werte (von 1 bis 26 Banden) zuzurechnen war.

Tab. 11: Dokumentierte Durchfallerkrankungen und deren Ursachen.

Art der Therapie	Patienten mit Durchfall	Episoden	Klinik zum Zeitpunkt des Durchfalls					
			GvHD	CMV	Fieber	PE	Toxin A	Keine
Allogene Tx	13	17	10	3	8	11	1	2
Autologe Tx	3	3		0	2	1	0	1
Chemotherapie	4	4		0	2	1	0	2

Gleichzeitig konnten keine definierten Banden oder Profile identifiziert werden, die in Zusammenhang mit dem Auftreten von Durchfällen zu bringen waren.

4.2.1.2.3 Parenterale Ernährung

Es besteht kein Zweifel, dass die Ernährung die Zusammensetzung der Darmflora maßgeblich beeinflusst (s. Kap. 1.2.2). Zum einen liefern die in der Nahrung enthaltenen Stoffe die Grundlage für das Wachstum von Mikroorganismen, zum anderen werden über die Nahrung selbst Mikroorganismen aufgenommen. Letzteres ist allerdings bei den KMT-Patienten unter Therapie unerwünscht, da exogen zugeführte Keime potentielle Pathogene darstellen könnten. Aus diesem Grund erhielten die Patienten vom Beginn der Chemotherapie bis zur Rekonstitution des Immunsystems nur autoklavierte Nahrungsmittel. In diesem Zeitraum verzichteten zudem 21 Patienten auf die orale Nahrungsaufnahme, so dass die lebensnotwendigen Nährstoffe parenteral zugeführt werden mussten. Wie bereits in den vorhergehenden Kapiteln dargelegt wurde, konnte der Einfluss der parenteralen Ernährung nicht von der Antibiotikabehandlung getrennt werden. So erhielten sieben Patienten vor, 17 während und sieben Patienten nach der parenteralen Ernährung Breitspektrum-Antibiotika. Der Vergleich der DGGE-Profile dieser Proben ergab dennoch einen signifikanten Zusammenhang zwischen parenteraler Ernährung und einem stark reduzierten DGGE-Bandenprofil ($p=0,021$) nach Absetzen der Breitspektrum-Antibiotika. Das heißt, dass eine Rekonstitution der Diversität von DGGE-Banden (im Vergleich zum Ausgangszustand) erst nach Ende der parenteralen Ernährung und Antibiotikatherapie beobachtet werden konnte.

4.2.1.2.4 Einfluss des angeborenen Immunsystems

Der Einfluss des angeborenen Immunsystems auf die Zusammensetzung der Darmflora sollte anhand des Vergleichs von DGGE-Profilen ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden die, bei stationärer Aufnahme gesammelten, Proben mit Proben verglichen, welche ca. 100 Tage nach Entlassung aus der Klinik von den Patienten eingesandt wurden.

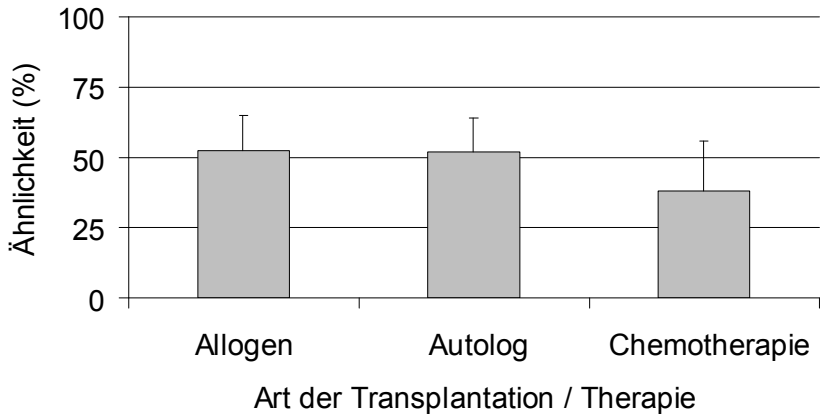


Abb. 23: Mittlere Ähnlichkeitswerte der DGGE-Profile von Stuhlproben, welche bei Aufnahme und 100 Tage nach stationärer Entlassung eingesammelt wurden.

Von den ursprünglich 45 Patienten konnten 32 in die Auswertung der Profile einbezogen werden (9 chemotherapierte, 9 autolog und 14 allogen transplantierte Patienten). Die übrigen 13 Patienten hatten entweder der Zusendung der Stuhlproben nicht zugestimmt oder waren zwischenzeitlich verstorben. Die Mittelwerte der Ähnlichkeitsindices der DGGE-Profile sind in Abbildung 23 dargestellt. Zwischen den Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die mittleren Ähnlichkeitswerte der allogen transplantierten (52,6±12,3 %) waren denen der autolog transplantierten Patienten (51,9±12,2 %) nahezu identisch. Die Profile der chemotherapierten Patienten ähneln sich dagegen nur um 38,0±18,0 Prozent. Einschränkend muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass nur sechs von 32 Patienten zum Zeitpunkt der Probenahme(n) keine Antibiotika erhielten. Diese Patienten gehörten alle zur Gruppe der autolog transplantierten Patienten. Die Ähnlichkeit der Profile betrug nach Ausschluss der drei, durch die Gabe von Antibiotika beeinflussten, Vergleiche nunmehr 55,6±10,1 %

(vorher: 51,9±12,2 %). Alle übrigen Vergleiche bildeten dagegen nur die Wirkung der Antibiotika auf die Darmflora ab, wie sie bereits zuvor beschrieben wurde (siehe Kap. 4.2.1.1.1 und 4.2.1.1.2).

4.2.1.2.5 Zusammensetzung der Darmflora während einer akuten GvHD

Ein Vergleich der molekularen Fingerabdrücke der intestinalen Bakterienflora von allogen transplantierten Patienten ohne (n=7; Abb. 24A) und mit akuter GvHD (n=13; Abb. 24B) offenbarte einen deutlichen Unterschied in Bezug auf die Diversität der DGGE-Banden in den Profilen. In der afferenten Phase der akuten GvHD (Konditionierung und Transplantation; Goker, 2001) war die durchschnittliche Diversität in den Stuhlproben der Patienten mit akuter GvHD signifikant niedriger als bei Patienten ohne akute GvHD (p=0,046).

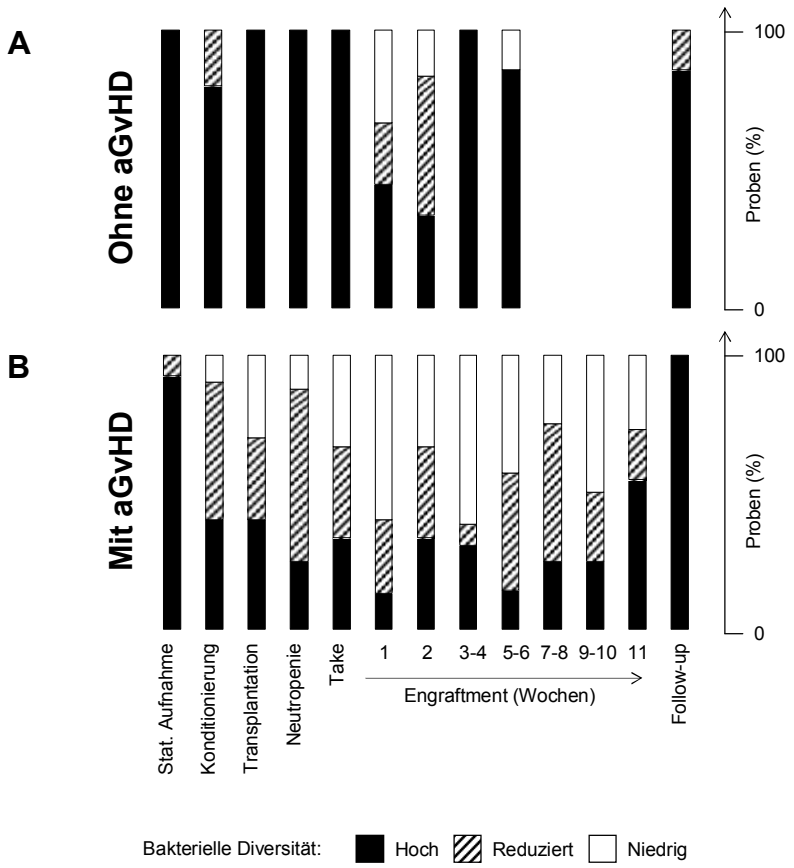


Abb. 24: Diversität der DGGE-Banden von allogen transplantierten Patienten ohne (A) oder mit akuter GvHD (aGvHD) (B). Auf der Y-Achse ist der Anteil der Proben mit hoher (schwarz), reduzierter (schraffiert) und niedriger Diversität (weiß) zum jeweiligen Zeitpunkt der Therapie (X-Achse) aufgetragen.

Im darauf folgenden Zeitraum (Neutropenie und Take) setzte sich dieser Trend fort (p=0,010). Die Neutropenie und der Take werden als kritische Zeitpunkte bei der Entstehung einer GvHD angesehen, da in dieser Phase die Spender-T-Zellen fremde Antigene des Empfängers erkennen, was zur Aktivierung, Stimulation und Proliferation der Spender-T-Zellen führt (Goker, 2001). Die klinischen Merkmale der akuten GvHD zeigten sich bei den Studien-Patienten in der ersten Woche des Engraftments. Zu diesem Zeitpunkt konnte die niedrigste Diversität in den DGGE-Profilen der Stuhlproben registriert werden (Abb. 24). Die kulturelle Analyse dieser Proben ergab eine Dominanz von Gram-(+) Isolaten (84,4 %; vgl. Kap. 4.2.1.1.3).

In einem Kooperationsprojekt mit Kollegen vom Institut für Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin am Campus Benjamin Franklin (Charité – Universitätsmedizin Berlin) wurde die Rolle der Darmflora bei der Entstehung einer histologisch gesicherten akuten intestinalen GvHD untersucht. Analog zu den oben vorgestellten Ergebnissen konnte auch hier eine Reduktion der Diversität von DGGE-Banden aus Proben von Patienten mit akuter intestinaler GvHD (n=13) festgestellt werden (Median: 4 DGGE-Banden; Abb. 25).

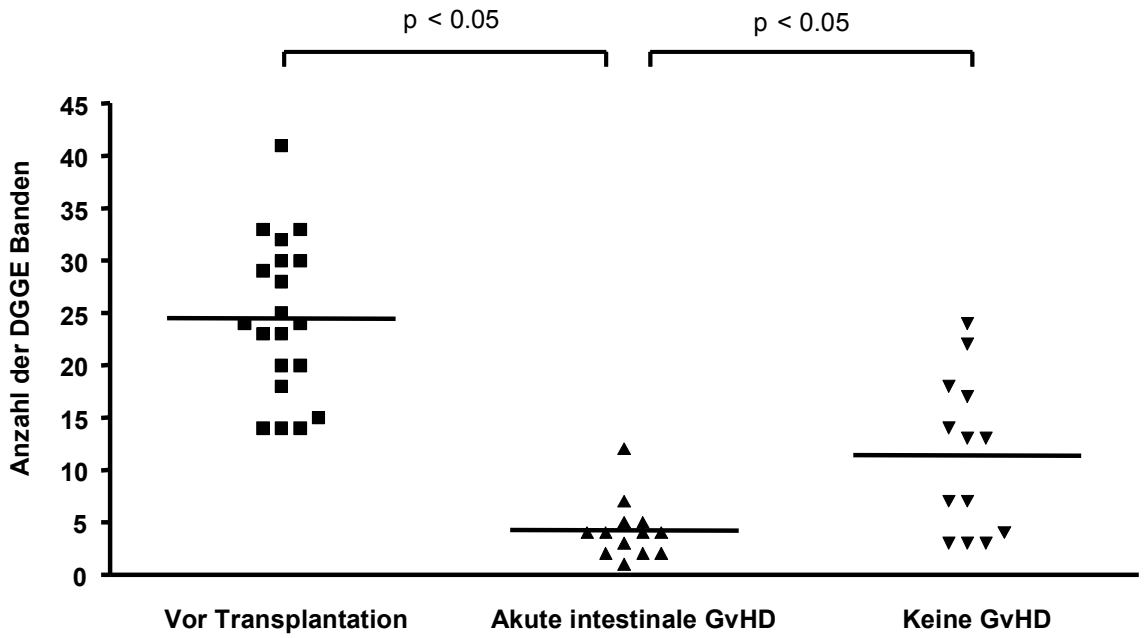


Abb. 25: Anzahl der DGGE-Banden von allogen transplantierten Patienten ohne oder mit akuter intestinaler GvHD. Die Abbildung gibt den Vergleich dreier Zeitpunkte wieder: Vor Transplantation (n=20), zu Beginn einer histologisch abgesicherten intestinalen akuten GvHD (20-50 Tage nach Transplantation; n=13) und Proben von Patienten ohne GvHD (20-50 Tage nach Transplantation; n=13).

Im gleichen Zeitraum fiel die Reduktion der DGGE-Banden in den Proben von Patienten ohne Anzeichen einer GvHD (n=13) geringer aus (Median: 13 DGGE-Banden; Abb. 25). Sequenzierungen von DGGE-Banden (n=2) und kulturelle Analysen (n=4) führten zur Identifizierung von Gram-(+) Bakterien (hauptsächlich Koagulase-negative Staphylokokken, *E. faecalis*, *S. viridans* und Milchsäurebakterien) in Proben von Patienten, die während einer akuten intestinalen GvHD entnommen wurden.

4.2.2 Analyse der Sprosspilzpopulation innerhalb der Darmflora

Die Analyse von Pilzen in komplexen Habitaten erfolgte bislang durch aufwendige kulturelle Verfahren. Zwar existierten zu Beginn der Studie bereits Protokolle zur molekularen Identifizierung von Pilzen, diese beschränkten sich aber zumeist auf die Untersuchung von Proben mit geringer Diversität. Erst durch die Einführung der ITS2-DHPLC zur Analyse von komplexen Proben mit hoher Diversität ergab sich die Möglichkeit, die Stuhlproben der Patienten auch auf Veränderungen der Sprosspilzpopulation innerhalb der Darmflora während des stationären Aufenthalts zu untersuchen (Goldenberg, 2005b).

Zu diesem Zweck wurden 280 Proben von 45 Patienten mittels PCR amplifiziert. Trotz Optimierung der DNA-Konzentration durch Verdünnung oder Aufkonzentrierung konnte aus 70 Proben kein PCR-Produkt generiert werden. Die Proben enthielten entweder keine ITS-Sequenzen oder diese lagen unter der Nachweisgrenze. Alle übrigen Proben (n=210) wurden mittels ITS2-DHPLC analysiert und die resultierenden Peaks mit Hilfe eines Markers (Abb. 16) identifiziert (Abb. 26). Exemplarisch wurden die Peaks einiger Proben gesammelt, reamplifiziert und sequenziert. Auf diese Weise konnte zum einen die Identität bekannter Peaks verifiziert und zum anderen die der unbekannten Peaks aufgedeckt werden. Abbildung 26 zeigt die ITS2-DHPLC-Profile von drei Proben eines Patienten im zeitlichen Verlauf. Für Probe 1 konnten die Peaks mit Hilfe des Markers den Spezies *C. lusitaniae*, *C. inconspicua* und *C. krusei*, und für Probe 2 den Spezies *C. albicans* und *C. krusei* zugeordnet werden. Die Identität von *C. albicans* wurde durch die kulturellen Ergebnisse der Routinediagnostik einer, zum gleichen Zeitpunkt entnommenen und analysierten, Stuhlprobe bestätigt.

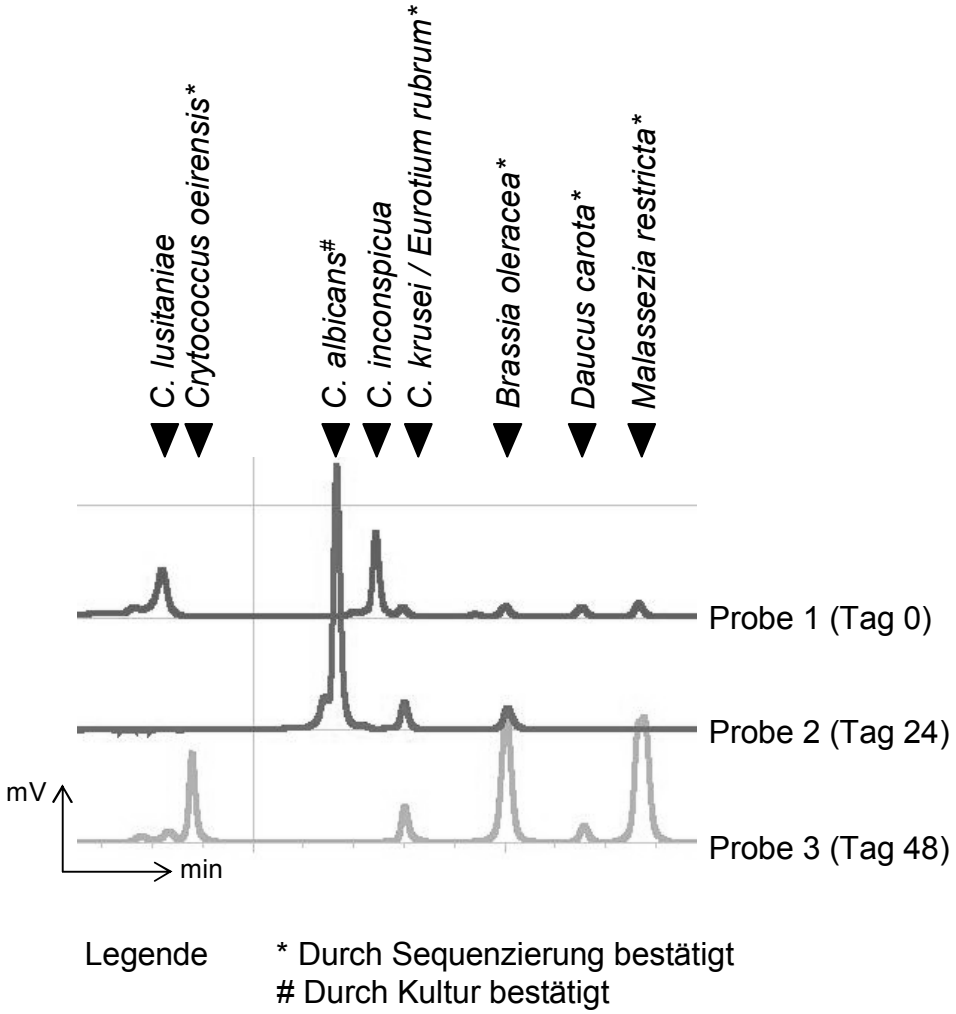


Abb. 26: Monitoring der Sprosspilzpopulation innerhalb der Darmflora eines repräsentativen Patienten. Die DHPLC-Peaks wurden mit Hilfe eines Markers (Abb. 16) und/oder per Sequenzanalyse (Probe 3) identifiziert. Der Hauptpeak aus Probe 2 konnte mittels kultureller Analysen bestätigt werden *(C. albicans*).

Die Peaks der Probe 3 wurden, wie oben beschrieben, durch Sequenzierungen bestimmt. Auf diese Art konnten die unbekannten Peaks den Spezies *Cryptococcus oeirensis*, *Daucus carota*, *Brassia oleracea* und *Malassezia restricta* zugeordnet werden. Der anhand des Markers zugeordnete Peak von *C. krusei* konnten hingegen nicht durch die Sequenzierung bestätigt werden. Die Sequenz dieses Peaks entsprach stattdessen *Eurotium rubrum*. Die Analyse von *C. krusei* Peaks aus acht weiteren Proben ergab das gleiche Ergebnis. Überschneidungen gab es auch bei den Peaks von *C. lusitaniae* und *S. cerevisiae*. Alle übrigen getesteten Peaks, welche mit Hilfe des Markers identifiziert wurden, konnten durch die Sequenzierung bestätigt werden. Mit Hilfe der Sequenzierung unbekannter Peaks konnten zudem Sequenzen von *Itersonilia perplexans*, *Malassezia pachydermatis*, *Aureobasidium*

pullulans, *Cladophialophora sp.*, *Ganoderma sp.*, *Malassezia globosa*, *Aspergillus penicillioides*, *Malassezia sloofiae*, *Entyloma microsporum*, *Didymella ligulicola*, *Phlebia uda*, *Cladosporium herbarum*, *Geotrichum candidum* und *Penicillium camembertii* identifiziert werden. Die mögliche Herkunft und Bedeutung dieser Peaks wird in Kapitel 5.2.4 diskutiert (Tab. 15). Wie oben bereits angedeutet, wurden die Peaks der Proben anhand eines Markers identifiziert, wobei die Peaks außerhalb des Markers im folgenden vernachlässigt wurden. Die Ergebnisse der Zuordnung sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tab. 12: Häufigkeit der mittels ITS2-DHPLC identifizierten Pilze in den Stuhlproben von Patienten mit hämatologischen Krebserkrankungen. Die Ergebnisse wurden zum einen auf die Detektion der jeweiligen Pilzspezies pro Patient und zum anderen auf den Anteil der Spezies an der Anzahl der untersuchten Proben bezogen.

Spezies	Patienten		Proben	
	%	Absolut	%	Absolut
C. membranaefaciens	2,2	1	0,5	1
C. tropicalis	24,2	11	7,1	15
C. parapsilosis	17,8	8	4,8	10
C. magnoliae	13,3	6	3,3	7
C. lusitaniae	84,4	38	34,3	72
C. norvegensis	0.0	0	0.0	0
C. dubliniensis	24,4	11	6,2	13
C. albicans	55,6	25	22,4	47
C. inconspicua	37,8	17	11,4	24
C. krusei	57,8	26	17,6	37
C. neoformans	17,8	8	4,3	9
C. kefyr	17,8	8	4,3	9
C. glabrata	53,3	24	21.0	44

Der Peak von *C. lusitaniae* konnte demnach am häufigsten in den Amplifikaten der Stuhlproben detektiert werden. Durch die bereits erwähnte Überschneidung mit dem Peak von *S. cerevisiae* dürfte die tatsächliche Häufigkeit allerdings geringer sein. Ähnliches galt auch für die Häufigkeit von *C. krusei*, wo in neun Fällen *E. rubrum* anstelle von *C. krusei* identifiziert werden konnte (s.o.). Neben den bereits erwähnten Spezies konnten zudem in den Stuhlproben von mehr als der Hälfte aller Patienten *C. albicans* und *C. glabrata* Peaks detektiert werden. Auch Peaks von *C. inconspicua*, *C. tropicalis* und *C. dubliniensis* wurden häufig ermittelt (Tab. 12). Ein

Teil der Ergebnisse konnte durch kulturelle Daten gestützt werden, welche selbst oder durch die Routine-Diagnostik erhoben wurden (Tab. 13).

Der Vergleich zeigt, dass die DHPLC und die Kultur (Labor) in sechs von acht Fällen das gleiche Ergebnis erzielte. In einem Fall (Probe 5-X1) konnte kein PCR-Produkt generiert werden, so dass das Ergebnis der Kultur (Labor) nicht bestätigt werden konnte. In dem anderen Fall (Probe 42-B10) konnten zwar einerseits Überschneidungen zwischen DHPLC und Kultur (*C. albicans* und *G. candidum*), auf der anderen Seite aber auch Abweichungen festgestellt werden (*C. guillermondii* nur in Kultur und *C. glabrata* nur mit DHPLC; Tab. 13). In Spalte fünf der Tabelle 13 sind zudem die Ergebnisse der Routine-Diagnostik aufgelistet.

Tab. 13: Vergleich der Ergebnisse von Methoden zur Identifizierung von Pilzspezies. Erfolgreich identifizierte Spezies sind mit einem Kreuz gekennzeichnet. Die Daten wurden mittels DHPLC oder kulturellen Verfahren erhoben. Die Kulturen wurden selbst (Labor) oder durch die Routinediagnostik (Routine) im Zuge des stationären Aufenthalts der Patienten angelegt.

Probe	Spezies	Identifiziert durch			Material
		DHPLC	Labor	Routine	
5-D1	C. albicans	x	x	x	Stuhl
5-X1	C. albicans		x		Stuhl
				x	Bronchiallavage
12-B8	C. glabrata	x	x		Stuhl
				x	Sputum
	C. albicans			x	Sputum
15-A2	C. glabrata	x	x		Stuhl
16-B6	C. glabrata	x	x	x	Stuhl
	S. cerevisiae			x	Stuhl
29-B6	C. albicans	x	x		Stuhl
				x	Rachenabstrich
42-B8	C. albicans	x	x		Stuhl
42-B10	C. albicans	x	x		Stuhl
	G. candidum	x	x		Stuhl
	C. guillermondii		x		Stuhl
	C. glabrata	x			Stuhl

Diese Daten wurden unabhängig von der Studie im Rahmen des klinischen Aufenthaltes der Patienten erhoben, weshalb nicht zu allen Zeitpunkten der Studie Referenzwerte vorlagen. Außerdem wurden neben Stuhlproben auch Bronchiallavage, Sputum und Rachenabstrich untersucht.

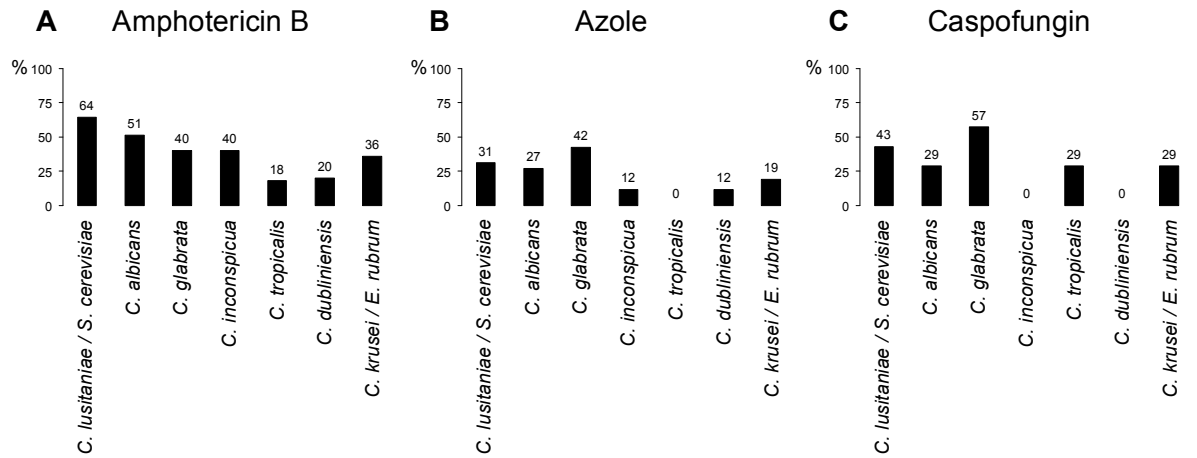


Abb. 27: Gegenüberstellung der mittels ITS2-DHPLC identifizierten Peaks und den, zu diesem Zeitpunkt verabreichten Antimykotika. Die Daten beziehen sich auf den prozentualen Anteil an Patienten mit speziesspezifischen Signalen unter der jeweiligen Therapie mit Amphotericin B (A), Azolen (B) und/oder Caspofungin (C).

Die Daten der Routine-Diagnostik bestätigten die Präsenz von *C. albicans* in Probe 5-D1 und *C. glabrata* in Probe 16-B6 (Tab. 13), wobei in der letztgenannten Probe zusätzlich *S. cerevisiae* durch die Routine-Diagnostik nachgewiesen wurde. Alle übrigen Ergebnisse stammten nicht aus der Analyse von Stuhlproben, wiesen aber trotzdem Überschneidungen auf. So wurde z.B. *C. glabrata* mittels DHPLC und Kultur (Labor) in der Probe 12-B8 im Stuhl und durch die Routine-Diagnostik zum gleichen Zeitpunkt im Sputum des Patienten nachgewiesen (Tab. 13).

Wie eingangs erwähnt, wurde neben der antibakteriellen auch eine antimykotische Prophylaxe zur Prävention von endogenen Infektionen durchgeführt (s. Kap. 1.2.1). Zu diesem Zweck wurden alle Patienten mit Amphotericin B (Polyen) behandelt. Mehr als die Hälfte aller Patienten (58 %) erhielten zudem eine Behandlung mit Antimykotika aus der Gruppe der Azole (Fluconazol, Itraconatol, Voriconazol und/oder Imidazol). Darüber hinaus wurden sieben Patienten (16 %) mit Caspofungin behandelt. Analog zur Analyse der bakteriellen Flora stellte sich daher auch hier die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der Verwendung von antimykotisch wirkenden Medikamenten und den, mittels ITS2-DHPLC identifizierten, Peaks der Pilzspezies in den Stuhlproben bestand. Im Gegensatz zur Analyse der bakteriellen Resistenz gegenüber Antibiotika konnten in diesem Fall keine Isolate auf ihre Empfindlichkeit getestet werden, da die Untersuchung der Pilzflora ausschließlich molekular durchgeführt wurde. Die folgenden Ergebnisse stellen demzufolge keine Resistenz bzw. Empfindlichkeit gegenüber einem Medikament dar. Vielmehr wurden

die verwendeten Antimykotika den, zu diesem Zeitpunkt identifizierten, DHPLC-Peaks gegenüber gestellt (Abb. 27). Um Überschneidungen zu vermeiden, wurden mehrfach identifizierte Peaks in Proben von ein und demselben Patienten nur einmal in die Auswertung eingeschlossen. So konnte in den Proben von 25 Patienten der Peak von *C. albicans* identifiziert werden, wovon in 23 Fällen zu diesem Zeitpunkt eine Behandlung mit Amphotericin B stattgefunden hatte. Da alle Patienten (n=45) diese Prophylaxe durchliefen, konnte folglich in 51 % aller Fälle *C. albicans* während der Gabe von Amphotericin B festgestellt werden (Abb. 27A). Zudem wurde während der Gabe von Azolen (n=26) in 27 % (n=7), und während der Gabe von Caspofungin (n=7) in 29 % (n=2) aller Fälle *C. albicans* nachgewiesen. Aufgrund ihrer Häufigkeit (s. Tab. 12) und klinischen Relevanz wurden darüber hinaus die Daten von *C. lusitaniae* / *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. inconspicua*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* und *C. krusei* / *E. rubrum* ermittelt und in einem Diagramm dargestellt (Abb. 27).

5 Diskussion

5.1 Auswahl und Evaluierung der Methoden für die globale Analyse der Stuhlproben

Die Analyse von Stuhlproben stellte aufgrund der zu erwartenden Diversität und Komplexität der Darmflora eine anspruchsvolle Aufgabe dar. Eine umfassende kulturelle Analyse der Proben wurde von Beginn an ausgeschlossen, da den oben genannten Kriterien (Diversität und Komplexität) mit diesem Verfahren nicht Rechnung getragen werden konnte (Wilson, 1996; Zoetendal, 2004). So sind die Wachstumsbedingungen einer Vielzahl von Bakterien (z.B. Anaerobier) bislang unbekannt bzw. konnten bis zum heutigen Zeitpunkt nicht im Labor nachempfunden werden.
Als Alternative standen molekulare Methoden zur Verfügung, welche auf der direkten oder indirekten Analyse von bakteriellen 16S rRNA Genen basieren (Clement, 1998; Daly, 2001; Franks, 1998; Huijsdens, 2002; Hurtle, 2002; Liu, 1997; Moter, 2000; Muyzer, 1998; Simpson, 1999; Suau, 1999; Tannock, 2001; Vaughan, 2000; Wilson, 1996; Zoetendal, 1998 & 2002).

5.1.1 Klonierung und Sequenzierung von 16S rRNA Genen

Die Klonierung und Sequenzierung von amplifizierten 16S rRNA Genen aus insgesamt drei Stuhlproben eines allogen transplantierten Patienten lieferte sehr detaillierte Ergebnisse (Tab. A1; Anhang). Elf von zwölf klonierten 16S rRNA Sequenzen aus Probe 2 konnten *S. epidermidis* zugeordnet werden, was vermutlich auf eine Anreicherung dieser Spezies in Folge der Gabe von Breitspektrum-Antibiotika (Vancomycin, Meropenem, Gentamicin und Tazobactam) zurückzuführen war (vgl. Kap. 5.2.1). Die übrigen Sequenzen aus Probe 1 (41 Sequenzen) und Probe 3 (48 Sequenzen) stammten von Bakterien der Genera *Firmicutes* (78 %) oder *Bacteroidales* (22 %), wobei die Mehrzahl der *Bacteroidales*-Sequenzen (19 von 20) der Probe 3 zugeordnet werden konnten. Da die erste Probe bereits unter dem Einfluss der Antibiotikaprophylaxe mit Levofloxacin entnommen wurde (u.a. wirksam

gegen Bakterien der Gruppe *Bacteroidales*) könnte dies eine Erklärung für die relativ geringe Abundanz von *Bacteroidales*-Klonen in Probe 1 sein.
Insgesamt war die Anzahl der analysierten Sequenzen im Vergleich zu anderen Studien gering, was hauptsächlich auf den hohen finanziellen Aufwand, der mit solch einer Methode verbunden ist, zurückzuführen war (~ 6 € pro Sequenzierung). Basierend auf den Daten von Eckburg und Mitarbeitern (2005) müssten mindestens 500 Klone einer Probe untersucht werden, um die Diversität der bakteriellen Gattungen innerhalb der Probe zu erfassen. Angesichts der knapp 300 zu untersuchenden Stuhlproben kam eine Erstellung und Sequenzierung von Klonbibliotheken daher nicht in Frage.

5.1.2 Terminaler Restriktionsfragment Längenpolymorphismus

Für die Analyse der Stuhlproben wurden vier Enzyme (*HaeIII*, *MspI*, *RsaI* und *HhaI*) verwendet, welche allesamt vier Nukleotide als Erkennungssequenz benötigen (s. Kap. 3.6.7). Diese Enzyme wurden bereits von Liu und Kollegen (1997) vorgeschlagen, da sie auf Grundlage von 1102 getesteten 16S rRNA Sequenzen *in silico* die größte Anzahl unterschiedlicher Fragmente lieferten. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten, dass die theoretisch ermittelten Werte nicht in jedem Fall in die Praxis übertragbar waren. So konnte durch die Restriktion mit *MspI* eine hohe Anzahl an Peaks generiert werden. Die Verwendung des Enzyms *HhaI* für die Restriktion der gleichen Proben lieferte dagegen nur sehr wenige Signale. Dies deutete darauf hin, dass sich einige Amplifikate mit unterschiedlicher Effizienz enzymatisch verdauen ließen, so dass die Auswahl der Enzyme von entscheidender Bedeutung ist, da die Ergebnisse beispielsweise im Hinblick auf die bakterielle Diversität einer Probe ansonsten falsch interpretiert werden könnten. Hinzu kam die Beobachtung, dass nicht alle bakteriellen Gattungen bzw. Spezies in jedem Restriktionsprofil vertreten waren (z.B. *Helicobacter* oder *Bifidobacterium*; Abb. 5). Ein weiterer Nachteil der Analyse war der limitierte Inhalt der Referenzdatenbank (TAP-Software), so dass eine Vielzahl von Peaks nicht zugeordnet werden konnte und ein Teil der Informationen verloren ging.
Im Vergleich zu den Ergebnissen der Sequenzierung von Klonbibliotheken konnten Gemeinsamkeiten und Unterschiede festgestellt werden. So wurden mit beiden Methoden die Gattungen *Bacteroidales* und *Firmicutes* (*Ruminococcus*;

Mycoplasmatales; *Clostridiales* / *Eubacterium*) nachgewiesen (Tab. A1; Anhang) (Abb. 5). Die Gattungen *Helicobacter* und *Bifidobacterium* tauchten dagegen nur in jenen Proben auf, welche mittels T-RFLP untersucht wurden. Eine Identifizierung bakterieller Spezies war im Unterschied zur Sequenzierung nicht möglich, da die Zuordnung der T-RFLP-Signale lediglich Rückschlüsse auf Bakteriengattungen zuließ.

Die Vorteile der T-RFLP lagen in der einfachen und schnellen Durchführung der Methode, weshalb sie für die Analyse von großen Probenserien geeignet erschien. Veränderungen innerhalb der Darmflora, induziert durch die Gabe von Breitspektrum-Antibiotika (Abb. 5; Probe 2), konnten bildlich durch eine Reduktion der Anzahl an Signalen dargestellt werden, was allerdings maßgeblich an die Verwendung eines geeigneten Enzyms gekoppelt war. Diese Vorteile konnten die oben aufgeführten Nachteile allerdings nicht ausgleichen, so dass die T-RFLP für die Durchführung der vorliegenden Studie nicht in Frage kam.

5.1.3 Denaturierende Gradientengelelektrophorese

Im Gegensatz zur TGGE liess sich die bakterielle Flora mit Hilfe der DGGE als reproduzierbares Bandenmuster darstellen (Abb. 6B), wobei die Qualität der Gele mit Beispielen aus der Literatur vergleichbar war (Simpson, 1999; Zoetendal, 2001). Die prominente Bande in Probe 2 (markiert durch einen Pfeil in Abb. 6B) konnte nach Elution, Re-amplifikation und Sequenzierung der Spezies *S. epidermidis* zugeordnet werden, analog zu den bereits beschriebenen Ergebnissen der Klonbibliotheken und der T-RFLP (s. Kap. 5.1.1 und 5.1.2). Anhand der Analyse von Referenzstämmen konnte gezeigt werden, dass sich ausgewählte Vertreter der Darmflora im gewählten DGGE-Gradienten darstellen ließen (Abb. 8). Die Unterschiede im Migrationsverhalten der Amplifikate reichten allerdings nicht aus, um die Retentionsstrecke der Banden definierten Spezies und/oder Gattungen zuordnen zu können.

Ein Nachteil der DGGE ist die aufwendige Identifizierung der Banden. Zoetendal und Mitarbeiter (1998) wählten die Verwendung von Referenzstämmen bzw. Klonen, welche sie zuvor aus den Proben isoliert hatten, als indirekte Methode der Identifizierung von TGGE-Banden. Diese Art der Zuordnung konnte sich allerdings nicht durchsetzen, da sich hinter den Banden zumeist Sequenzen verschiedener

Spezies verbergen und eine genaue Identifizierung daher nicht möglich ist (Kowalchuk, 1997; Vallaeys, 1997; Sekiguchi, 2001; Zhang, 2005). Dieses, als Komigration bekannte, Phänomen spiegelte sich auch in den Ergebnissen der vorliegenden Studie wieder (Kisland, 2003; Zhang, 2005). So zeigten z.B. die Amplifikate der Stämme *C. scindens*, *R. gnavus*, *C. ramosum* und *C. spiroforme* ein identisches Migrationsverhalten im DGGE-Gel (Abb. 8), obwohl sie unterschiedlichen bakteriellen Arten angehören (Abb. 7). Die Sequenzierung anderer ausgewählter Banden führte zum gleichen Ergebnis (Daten nicht gezeigt).
Neben der Komigration ist ein weiteres Phänomen für das Auftreten unterschiedlicher Sequenzen in einer Bande verantwortlich: einzelsträngige DNA. Die ssDNA entsteht in den späten Zyklen der PCR, wenn das Verhältnis von Oligonukleotiden zu Template immer weiter sinkt und die Bindung von Primern an die Template-DNA nicht mehr so effektiv ist wie zu Beginn der Reaktion (Jensen, 1993). In der Arbeit von Zhang und Mitarbeitern (2005) konnte gezeigt werden, dass die Eliminierung der ssDNA vor dem Auftragen auf die TGGE zu einer deutlichen Reduktion der Heterogenität von DNA-Sequenzen in den Banden führte, wobei das Mirationsverhalten der Banden unverändert blieb. Zusätzlich zur ssDNA entstehen in der letzten Phase der PCR auch Heteroduplex-Moleküle, welche für das Auftreten artifizieller Banden verantwortlich gemacht werden (Ferris, 1997; Speksnijder, 2001). Eine effektive Methode zur Eliminierung von Heteroduplices und ssDNA ist die Rekonditionierung von PCR-Produkten (Thompson, 2002). Dieser Ansatz kehrt das Missverhältnis zwischen Oligonukleotiden und Template-DNA um und führt so zur Bildung von Homoduplices. Im Gegensatz zur DHPLC (s. Kap. 5.1.4) blieb das DGGE-Bandenmuster auch nach der Rekonditionierung unverändert. Zhang und Mitarbeiter (2005) konnten in ihren TGGE-Profilen die gleiche Beobachtung machen und schlossen daraus, dass der Anteil an Heteroduplex-DNA in ihren Amplifikaten zu gering war, um sich in den Bandenmustern niederzuschlagen.

Moore und Holdeman (1974) schätzten die Diversität im Stuhl auf etwa 400 bakterielle Spezies. In der jüngst erschienenen Arbeit von Eckburg und Mitarbeitern (2005) konnte diese Annahme mittels Analyse von Klonbibliotheken bestätigt werden. Die insgesamt 13355 bakteriellen Sequenzen ließen sich nach statistischer Auswertung 395 Phylotypen zuordnen. Die Diskrepanz zwischen der bakteriellen Diversität *in vivo* und der Anzahl an DGGE-Banden in den Profilen der Stuhlproben

lässt sich durch die Dominanz von ca. 30-40 bakteriellen Spezies erklären, welche zusammen etwa 99% der Gesamtmenge an Bakterien in der Probe ausmachen (Drasar, 1985). Die Banden spiegeln daher die prominenten Vertreter der Darmflora wieder (Muyzer, 1993; Murray, 1996), weshalb die DGGE-Profile eher die Struktur der Flora denn deren phylogenetische Diversität darstellen (Muyzer, 1998; Fromin, 2002). Veränderungen in den DGGE-Profilen, z.B. induziert durch die Gabe von Antibiotika, wurden als Veränderung der bakteriellen Struktur und somit der Zusammensetzung der Darmflora interpretiert. Dieses Vorgehen war insofern zulässig, als dass die Zusammensetzung der Darmflora über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten als konstant angesehen werden kann (Zoetendal, 1998). Bei der Auswertung der Bandenmuster wurde auf die Einbeziehung der Bandenstärke als quantitatives Maß verzichtet (z.B. Shannon-Weaver-Index oder Pearson-Korrelation; Formin, 2002; Nübel, 1999; Smalla, 2001), da bereits durch die Prozesse der Probenaufbereitung, DNA-Extraktion und PCR-Amplifikation ein Bias in die Analyse eingeführt wurde, der eine korrekte Quantifizierung von DGGE-Banden ausschloss (von Wintzingerode, 1997). Stattdessen wurden die Profile durch den Präsenz/Absenz-Vergleich von DGGE-Banden ausgewertet (Dice/Sorenson-Index; Magurran, 1988; Murray, 1996).

5.1.4 Denaturierende High Performance Liquid Chromatography

Die DHPLC stellt, im Gegensatz zu den oben diskutierten Methoden, eine neue Möglichkeit zur Analyse von 16S rRNA Genfragmenten dar. William Hurtle und Mitarbeiter (2002) überführten die DHPLC aus der Mutationsanalyse (Überblick in: Frueh, 2003; Xiao, 2001) in die mikrobielle Ökologie. Anfänglich für die Identifizierung einzelner Spezies vorgesehen (Hurtle, 2002 und 2003; Domann, 2003), konnten Barlaan und Mitarbeiter (2005) kürzlich die Anwendbarkeit der DHPLC für die Analyse mikrobieller Populationen in marinen Proben zeigen. Im Laufe der vorliegenden Studie konnte das Spektrum der Anwendungen auf die bakterielle Analyse von Stuhlproben, sowie für die Identifizierung von *Candida*-Spezies in Blutkulturen und Feces (Goldenberg, 2005b) erweitert werden. Eine DHPLC-Methode zur Identifizierung von *Mycobacterium* Spezies ist noch in Arbeit (Publikation wird vorbereitet).

Das von Eugen Domann und Mitarbeitern (2003) publizierte Protokoll eignete sich aufgrund der schlechten Auflösung nicht für die Analyse komplexer Floren wie z.B. der Darmflora (Daten nicht gezeigt). Stattdessen musste ein neues Protokoll entwickelt werden, welches anhand des Vergleichs mit der bereits etablierten 16S-DGGE evaluiert wurde. Analog zur DGGE konnte mit Hilfe von Referenzstämmen die Trennleistung der DHPLC dokumentiert werden (Abb. 10; vgl. Abb. 8). Das Auftreten multipler Peaks bei der Analyse von amplifizierten 16S rRNA Genen einer Spezies konnte durch die Einführung der Rekonditionierung (Thompson, 2002) deutlich reduziert werden (Abb. 9). Mögliche Ursachen für dieses Phänomen, wie z.B. die Bildung von Heteroduplices und/oder ssDNA (Ferris, 1997; Jensen, 1993; Speksnijder, 2001; Zhang, 2005), wurden bereits im Kapitel 5.1.3 diskutiert.

Im Gegensatz zur DGGE führte die Rekonditionierung bei der 16S-DHPLC zu einer Reduktion der Anzahl an detektierbaren Signalen (Abb. 9 u. 12). Als möglicher Grund für diesen Unterschied könnten die unterschiedlichen Trennprinzipien der beiden Methoden in Frage kommen. Bei der DGGE werden die DNA-Fragmente in einem Gradienten denaturiert, wodurch die Migrationsgeschwindigkeit beeinflusst wird, wohingegen die Trennung der Fragmente in der DHPLC durch die differentielle Bindung der partiell denaturierten DNA an das Säulenmaterial erreicht wird. Durch diesen technischen Unterschied könnte die DHPLC möglicherweise sensitiver gegenüber der Detektion von Heteroduplices sein als die DGGE.

Die Trennleistung der DHPLC konnte anhand von Referenzstämmen, welche die wichtigen Hauptgruppen der Darmflora repräsentierten, optimiert werden (Abb. 10). Die Unterschiede im Migrationsverhalten der amplifizierten 16S rRNA Fragmente reichten allerdings nicht aus, um die Retentionszeiten definierten Stämmen und/oder Gattungen zuzuordnen. Eine Analyse der gleichen Stämme mittels DGGE hatte zu einem ähnlichen Ergebnis geführt (Kap. 4.1.3.1; Abb. 8). Das Phänomen wurde der Komigration von DNA-Fragmenten zugeschrieben (Kisland, 2003; Zhang, 2005).

Mit Hilfe des neu entwickelten DHPLC-Protokolls konnte die bakterielle Flora des Darms reproduzierbar als Peak-Profil dargestellt werden, was weiterhin durch die Sequenzierung ausgewählter Peaks bestätigt werden konnte (Abb. 11). Im Allgemeinen konnten jedoch in den DGGE-Profilen diverser Proben mehr Banden als in den DHPLC-Profilen Peaks beobachtet werden (Abb. 14). Als mögliche Ursachen für diese Beobachtung kommen eine bessere Auflösung und/oder eine höhere Sensitivität der DGGE in Frage. Auf der anderen Seite könnten aber auch Artefakte

dafür verantwortlich sein, welche in der DGGE als feine Bande sichtbar werden, aber in der DHPLC nicht detektierbar sind (Ferris, 1997; Speksnijder, 2001).
Die Ergebnisse belegen, dass sich sowohl die DGGE als auch die DHPLC für die Darstellung der Darmflora, sowie für das Monitoring von Veränderungen innerhalb dieses komplexen Ökosystems eignen. Der Vorteil der DGGE liegt in der höheren Sensitivität und der damit verbundenen Anzahl an Signalen (Banden). Im Gegensatz dazu ist die DHPLC schneller und effektiver zu bedienen, was einen höheren Probendurchsatz ermöglicht. Ein weiterer Vorteil der DHPLC ist das einfache Sammeln von Peaks für die Identifizierung bakterieller 16S rRNA Genfragmente. Für die Analyse von amplifizierten 16S rRNA Gene aus komplexen Proben stellt die DHPLC daher eine Ergänzung zur etablierten DGGE-Methode dar.

Neben der 16S-DHPLC konnte ein weiteres DHPLC-Protokoll etabliert werden, welches sich für die Analyse von amplifizierten ITS2-Fragmenten aus *Candida*-Spezies eignet (Goldenberg, 2005b). Neben der klinischen Anwendung für die Analyse positiver Blutkulturen konnte die Anwendbarkeit des Protokolls für das Monitoring von Pilzspezies in Stuhlproben demonstriert werden. Die Diskussion der Ergebnisse dieser Untersuchung ist in Kapitel 5.2.4 nachzulesen.

5.2 Einflüsse auf die Zusammensetzung der Darmflora bei der Therapie von Patienten mit hämatologischen Krebserkrankungen

5.2.1 Der Einfluss der Antibiotikabehandlung

Im gesunden Zustand existiert ein Gleichgewicht zwischen dem Wirt und denjenigen Mikroorganismen, welche die mukosalen Oberflächen und die Haut besiedeln, wobei jeder Mensch eine individuelle Flora aufweist. Diese Normalflora stellt ein komplexes Ökosystem dar und schützt uns vor der Kolonisation bzw. Überwucherung mit potentiell pathogenen Erregern (Sullivan, 2001; Vollaard, 1994). Insbesondere die Gabe von Antibiotika führt zu einer Verschiebung des ökologischen Gleichgewichts, wobei das Ausmaß vom Spektrum, der Dosis, sowie anderen Faktoren (z.B. Art der Verabreichung, Pharmakokinetik oder Aktivität *in vivo*) abhängig ist (Sullivan, 2001).

Das Wissen über die Auswirkungen von Antibiotika auf die Zusammensetzung der Darmflora ist daher von großem klinischem Interesse. In einer Übersichtsarbeit von Åsa Sullivan, Charlotta Edlund und Carl Erik Nord (2001) wurden die Ergebnisse zahlreicher Studien, die sich diesem Thema widmen, zusammengefasst. Die überwiegende Mehrzahl der Studien wurde mit Hilfe von Kultivierungstechniken durchgeführt. Erst in jüngerer Zeit hat man damit begonnen, derartige Untersuchungen auch mittels molekularer Techniken durchzuführen (Bartosch, 2004; Donskey, 2003; de la Cochetière, 2005). In der vorliegenden Studie konnte zum ersten Mal der Einfluss von Antibiotikaprophylaxe und -therapie bei der Behandlung von Patienten mit hämatologischen Krebserkrankungen mittels molekulargenetischer Methoden dargestellt werden.

Auch wenn die genaue Ursache hier nicht benannt werden konnte, so führten die therapeutischen Maßnahmen (Antibiotikaprophylaxe; Zytostatikatherapie) zu Beginn des stationären Aufenthalts der Patienten zu einer Veränderung innerhalb der bakteriellen Darmflora, was sich anhand der Ähnlichkeitsindices der Anfangsproben verdeutlichen ließ. Zudem konnte eine Abnahme der Diversität der DGGE-Bandenmuster um durchschnittlich ein Drittel im Vergleich zur Anfangsprobe beobachtet werden. Die Beobachtungen waren unabhängig von der anschließenden Therapie der Patienten (allogene oder autologe KMT; Chemotherapie).

Neben der prophylaktischen Gabe von Ciprofloxacin und Cotrimoxazol wurden auch die Auswirkungenen der Therapie mit Breitspektrum-Antibiotika auf die Zusammensetzung der Darmflora untersucht. Die antimikrobielle Behandlung von Patienten mit hämatologischen Krebserkrankungen während einer immunsuppressiven Therapie richtete sich zumeist gegen unbekannte Erreger. Um das Risiko einer Bakteriämie zu minimieren wurden oftmals mehrere Breitspektrum-Antibiotika verabreicht, so dass ein Antibiotikum-spezifischer Einfluss auf die Zusammensetzung der Darmflora nicht ermittelt werden konnte. Im Allgemeinen führte die Gabe von Breitspektrum-Antibiotika aber zu einer signifikanten Abnahme der Diversität an DGGE-Banden ($p<0,05$) (Abb. 18 u. 19), was im Umkehrschluss auf eine Reduktion der bakteriellen Diversität in den Stuhlproben hinwies. Diese Vermutung konnte durch die Kultivierung von Mikroorganismen aus den entsprechenden Stuhlproben gestützt werden. Trotz Verwendung unspezifischer Medien konnten dabei nur maximal acht verschiedene Bakterienspezies in einer Probe identifiziert werden (Durchschnitt: 2,5 Bakterienisolate pro Probe), wobei die

Gram-(+) aeroben Kokken (*Enterococcus sp.*, *Staphylococcus sp.* und Milchsäurebakterien wie z.B. *Lactobacillus sp.*) den größten Anteil der Isolate ausmachten (82 %) (Abb. 20). Auch andere Arbeitsgruppen beobachteten nach Gabe von Ciprofloxacin (Borzio, 1997), Imipenem (van der Leur, 1993) oder Clindamycin (Orrhage, 1994) einen Anstieg an Gram-(+) aeroben Kokken (Tab. 14). Das verstärkte Auftreten dieser Gruppe von Bakterien lässt sich durch unterschiedliche Aspekte erklären. Als Hauptgrund kann die Empfindlichkeit dieser Mikroorganismen gegenüber den verwendeten Antibiotika in Betracht gezogen werden. So wirken beispielsweise Ciprofloxacin und Piperacillin/Tazobactam nicht gegen Gram-(+) Kokken. Des weiteren ist eine Reihe von *Lactobacillus* Spezies (z.B. *L. rhamnosus*, *L. casei* und *L. plantarum*) natürlich resistent gegenüber Vancomycin (Holliman, 1988; Swenson, 1990).

Zur besseren Übersicht wurden in Tabelle 14 die Daten zur Resistenzsituation der isolierten Bakterien noch einmal den Wirkungsspektren der Antibiotika gegenübergestellt, wie sie von verschiedenen Arbeitsgruppen dokumentiert worden sind. Auffällig war vor allem die vergleichsweise hohe Anzahl Ciprofloxacin resistenter Isolate von *E. coli* (eigene Studie: 78 %; PEG-Studie: 12 %).

Tab. 14: Resistenzspektrum der isolierten Bakterien im Vergleich zum Wirkungsspektrum der verabreichten Antibiotika. (Mod. nach: Sullivan, 2001). Die Zahlen in den Spalten geben den prozentualen Anteil resistenter Organismen in der vorliegenden Studie (vor dem Schrägstrich) im Vergleich zur Studie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft (hinter dem Schrägstrich) wieder.

		Resistenz					Auswirkungen der Antibiotika			
Antibiotikum	n	*E. coli*	*E. faecium*	*E. faecalis*	LAB	*S. epidermidis*	Aerobe Gram-(+) Kokken	*Entero-bacteria-ceae*	An-aerobier	Referenz
Ciprofloxacin	43	78 / 12		67 / 26	53 / -	100 / 64	-	↓↓	NE	van der Leur (1997); Wiström (1992); Borzio (1997); Krueger (1997)
Cotrimoxazol	31	56 / 31				46 / 15	-	↓↓	NE	Mavromanolakis (1997)
Piperacillin/ Tazobactam	34	22 / 3					-	↓	↓	Nord (1993)
Vancomycin	18				74 / -		↓↑	-	↓	Edlund (1997); Lund (2000)
Imipenem	15		94 / 43				↑	-	-	van der Leur (1993)
Clindamycin	9					100 / 43	↑	↑	↓↓	Orrhage (1994)
Andere	37									

Legende: n: Anzahl Patienten unter jeweiliger Antibiotikabehandlung; ↑: Anstieg während der Antibiotikabehandlung; ↓: Moderate Suppression (2-4 log10 KBE / g Feces; ↓↓: Starke Suppression; ↓↑: Suppression, wobei einige Mikroorganismen dieser Gruppe ansteigen; -: keine signifikante Änderung; NE: nicht bestimmt.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch von anderen Transplantationsstationen berichtet, bei denen eine Fluorochinolontherapie als Prophylaxe gegen Infektionen der endogenen Gram-(-) Bakterienflora durchgeführt wurde (Engels, 1999; van Kraaij, 1998; Mitchell, 2004; Yeh, 1999).

Das Spektrum der Infektionserreger bei KMT-Patienten hat sich in den vergangenen Jahren von Gram-(-) hin zu Gram-(+) Bakterien verschoben. Insbesondere die routinemäßige Verwendung von Venenkathetern hat zu einem Anstieg der Infektionen mit Koagulase-negativen Staphylokokken geführt (Arns da Cunha, 1998). Im Fall der vorliegenden Studie konnten in 8 von 13 positiven Blutkulturen *S. epidermidis* Isolate nachgewiesen werden. Da es sich bei dieser Spezies um einen typischen Vertreter der Hautflora handelt, ist dieses Ergebnis vermutlich entweder auf Katheter-assoziierte Infektionen oder Kontamination bei der Probenahme zurückzuführen. Die gleiche Spezies konnte allerdings auch in Stuhlproben der Patienten identifiziert werden. In Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei *S. epidermidis* nicht um einen typischen Vertreter der Darmflora handelt (s.o), kann davon ausgegangen werden, dass diese Isolate z.B. durch Verschlucken in den Magen-Darm-Trakt der Patienten gelangten und sich aufgrund des Fehlens einer konkurrierenden Flora kurzzeitig dort ansiedeln konnten. Im Vergleich zu den Laktobazillen und Enterokokken konnte aber keine längerfristige Besiedelung festgestellt werden.

Aus zwei von 13 positiven Blutkulturen konnte *E. faecalis* isoliert werden. Aufgrund ihres natürlichen Vorkommens ist es wahrscheinlich, dass diese Spezies ursprünglich Bestandteil der Darmflora waren. Ein direkter Bezug zwischen der Infektion und den molekularen und kulturellen Ergebnissen der vorliegenden Studie konnte allerdings nicht hergestellt werden. Gleiches galt für das *E. coli*-Isolat in einer der Blutkulturen.

Die Laktobazillen gehören ebenfalls zur Standortflora des Gastrointestinaltraktes und gelten darüber hinaus gemeinhin als unbedenklich. Einige Vertreter werden sogar als probiotische Mikroorganismen eingesetzt (Delgado, 2005). Trotzdem existieren Berichte von Infektionen mit *Lactobacillus*-Spezies in immunsupprimierten Patienten (Aguirre, 1993; Fruchart, 1997; Kalima, 1996). Im Fall der vorliegenden Studie konnten derartige Zusammenhänge allerdings nicht beobachtet werden.

Einige Autoren weisen in ihren Arbeiten auf das Problem von Schaden und Nutzen einer Prophylaxe mit Fluorochinolonen hin und fordern eine Neubewertung dieser Vorgehensweise bei der Konditionierung von Patienten mit hämatologischen Erkrankungen (Engels, 1999; van Kraaij, 1998, Mitchell, 2004; Sepkowitz, 2002; Yeh, 1999). Den Pro-Argumenten wie z.B. eine Reduktion von Bakteriämien mit Gram-(-) Erregern, möglicherweise weniger Fieberepisoden und kürzere stationäre Aufenthalte stehen Gegenargumente wie z.B. unveränderte Mortalitätsraten, Auftreten untypischer Pathogene und der Verlust von Chinolonen als Antibiotika aufgrund der steigenden Anzahl resistenter Organismen gegenüber (Engels, 1999; Sepkowitz, 2002; Yuen, 1998). Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie lassen sich keine neuen Für- oder Wider-Argumente bezüglich der Prophylaxe mit Ciprofloxacin gewinnen. Allerdings erscheint ein Monitoring der Darmflora unter Prophylaxe sinnvoll, um den Verlauf der Dekontamination zu dokumentieren und die Dauer der Antibiotikabehandlung darauf abzustimmen. Auf diese Weise könnte auch die Akkumulation möglicherweise resistenter Mikroorganismen (z.B. *E. coli*) frühzeitig erkannt und die Behandlung entsprechend umgestellt werden. Aufgrund ihrer Schnelligkeit bietet sich die 16S-DHPLC als Methode für ein derartiges Monitoring an.

Im Gegensatz zur Prophylaxe ist die empirische Antibiotikatherapie ein obligates Mittel bei der Bekämpfung von Fieber, welches auf eine akute Infektion hinweist. Als Ergebnis der Therapie konnten hauptsächlich Gram-(+) Bakterien im Stuhl der Patienten nachgewiesen werden. Ein möglicherweise sekundärer Effekt dieses Befundes wird in Kapitel 5.2.3 diskutiert.

5.2.2 Weitere Einflussfaktoren

Durchfälle können durch eine Vielzahl von Faktoren ausgelöst werden, insbesondere während der Therapie von hämatologischen Krebserkrankungen. In Frage kommen z.B. eine CMV-Kolitis, Durchfälle als Reaktion auf eine akute GvHD, eine Infektion mit *C. difficile* oder Antibiotika-assoziierte Durchfälle (AAD). Bei den allogen transplantierten Patienten konnten die Durchfälle hauptsächlich im Verlauf einer akuten GvHD oder CMV-Kolitis dokumentiert werden (Tab. 11). In einem Fall wurde Toxin A, ein Enterotoxin von *C. difficile*, nachgewiesen.

Wie unter anderem auch in der vorliegenden Studie gezeigt werden konnte, führte die Gabe von Breitspektrum-Antibiotika zu einer signifikanten Störung des komplexen mikrobiellen Ökosystems im Gastrointestinaltrakt (s. Kap. 5.2.1). Damit assoziierte Durchfälle werden zum einen mit einer Überwucherung von *C. difficile* in Verbindung gebracht (15-25 % aller Fälle; Barlett, 2002). Die überwiegende Mehrzahl der AAD-Fälle (75-85 %) kann jedoch nicht mit einem spezifischen Erreger erklärt werden. Man vermutet daher, dass der Verlust von Bakterien, insbesondere von Anaerobiern, zu einer Reduktion der metabolischen Aktivität im Darm führt (z.B. Produktion von kurzkettigen Fettsäuren), was wiederum mit einer Funktionsstörung der intestinalen Mukosa in Verbindung steht (Cummings, 1987; Topping, 2001; Young, 2004). Sieben von 8 autolog transplantierten oder chemotherapierten Patienten erhielten zum Zeitpunkt ihrer Durchfall-Episoden Anaerobier-wirksame Breitspektrum-Antibiotika, so dass diese Fälle vermutlich auf die Gabe der Antibiotika zurückzuführen waren. Im gleichen Zeitraum konnten in den Proben fast ausschließlich Gram-(+) Kokken der Gattungen *Lactobacillus*, *Enterococcus* und *Staphylococcus* identifiziert werden, ein Umstand, der auf das Spektrum der verabreichten Antibiotika zurückzuführen sein dürfte (s. Kap. 5.2.1) und vermutlich nicht als direkte Ursache für die Durchfälle in Frage kam.

Die Umstellung von enteraler auf parenterale Ernährung erfolgte zur Aufrechterhaltung der Nährstoffzufuhr von Patienten mit Problemen bei der oralen Nahrungsaufnahme, hervorgerufen z.B. durch eine Mukositis. Seit Weisdorf und Mitarbeiter (1987) einen Anstieg der Überlebensrate von Patienten mit parenteraler Ernährung beobachteten, wird diese Behandlung teilweise sogar als Prophylaxe eingesetzt. Andere Gruppen registrierten allerdings in Folge dessen einen Anstieg von Katheder-assoziierten Infektionen, Sepsen oder Thrombosen (Buzby, 1988; Moore, 1989; Szeluga, 1987). Kurkchubasche und Mitarbeiter (1992) vermuten, dass die Sepsen durch Translokation von Bakterien des Gastrointestinaltraktes hervorgerufen werden, als Folge des Verlusts der epithelialen Integrität (Alverdy, 1988; Haskel, 1993). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie ließen keine Rückschlüsse auf einen derartigen Zusammenhang zu. Zudem konnte der Einfluss der parenteralen Ernährung auf die Zusammensetzung der Darmflora nicht von dem der Antibiotikagabe getrennt werden. Signifikant war hingegen die Tatsache, dass die Aufrechterhaltung einer parenteralen Ernährung nach Absetzen der Antibiotika die Rekonstitution der Darmflora verzögerte. Erst nach erneuter oraler Zufuhr von

Nahrungsmitteln konnte ein Anstieg der bakteriellen Diversität verzeichnet werden. Dieser Anstieg beruhte vermutlich sowohl auf der gleichzeitigen oralen Zufuhr von Mikroorganismen, als auch am deutlich höheren Nähr- und Ballaststoff-Angebot im Darm.

5.2.2.1 Der Einfluss des Immunsystems

Die Fragestellung, ob und inwieweit der Genotyp des Wirtes und das Immunsystem die Zusammensetzung der Darmflora beeinflussen können, wurde in der vorliegenden Studie untersucht. Die Gruppe der allogen transplantierten Patienten erhielt durch die Transplantation von Knochenmark bzw. Blutstammzellen eines Spenders neue, körperfremde Immunzellen. Als Konsequenz aus dieser Umstellung müsste sich, der Arbeitshypothese zufolge, die Zusammensetzung der Darmflora ändern. Als Kontrollgruppen wurden autolog transplantierte und chemotherapierte Patienten ausgewählt, da diese ihren Immunstatus behalten und sich die Zusammensetzung ihrer Darmflora im Vergleich zum Ausgangszustand nicht ändern dürfte bzw. nach der Therapie in ihren Ausgangszustand zurückfinden müsste.
In allen untersuchten Fällen konnte, unabhängig von der jeweiligen Patientengruppe, kein signifikanter Unterschied in der Ähnlichkeit der 16S-DGGE-Profile vor und nach Transplantation bzw. Chemotherapie festgestellt werden (Abb. 23). Als Grund für diese Beobachtung kommen mehrere Faktoren in Frage, die die Ergebnisse beeinflusst haben könnten. So standen die ersten Proben, welche bei der Analyse als Anfangsproben für den Vergleich herangezogen wurden, in den meisten Fällen bereits unter dem Einfluss von Antibiotika und bildeten demzufolge nicht den Ausgangszustand der Darmflora ab. Die erste Probenahme hätte daher schon vor der stationären Aufnahme erfolgen müssen, was z.B. im Fall einer akuten Leukämie unmöglich wäre. Die Mehrzahl der Patienten erhielt während des stationären Aufenthalts zudem eine Behandlung mit Breitspektrum-Antibiotika, was zu einer starken Reduktion der bakteriellen Diversität innerhalb der Darmflora führte (s. Kap. 5.2.1). Die Rekonstitution der Darmflora hing vermutlich, ähnlich wie bei einem Neugeborenem, nicht nur von den Immunzellen, sondern auch von der Art der Ernährung in der Rekonstitutionsphase ab (s. Kap. 1.2.2). Es war zudem nicht bekannt, wie lange die Darmflora benötigt, um in einen stabilen Zustand zurückzukehren, wie er z.B. von Zoetendal und Mitarbeitern (1998) beschrieben

wurde. Der gewählte Zeitpunkt für die zweite Probenahme (ca. 100 Tage nach Entlassung aus dem Krankenhaus) könnte daher eventuell nur einen Zwischenzustand und nicht die endgültig rekonstituierte Darmflora darstellen. Auf eine dritte Probenahme (z.B. 500 Tage nach Entlassung aus dem Krankenhaus) wurde aus ethischen Gründen verzichtet.
Die Frage nach dem Einfluss der Immunität auf die Zusammensetzung der Darmflora lässt sich im Humanmodell nur äußerst schwierig beantworten. Mittels der hier gewählten Vorgehensweise konnten keine neuen Erkenntnisse hinzugewonnen werden. Aufgrund der oben genannten Faktoren, die eine solche Untersuchung beeinflussen können, erscheint eine Modifikation des Protokolls für die Beantwortung der Frage derzeit nicht sinnvoll. Zuvor müsste beispielsweise in einem Tierexperiment geklärt werden, ob sich die bakterielle Zusammensetzung der Darmflora nach Gabe von Breitspektrum-Antibiotika überhaupt in ihren Ausgangszustand zurücksetzen lässt und, wenn ja, wie lange dies dauert und von welchen Faktoren (z.B. Ernährung) eine Rekonstitution abhängig ist.

5.2.3 Einfluss der Darmflora auf die akute GvHD

Die alten Daten von van Bekkum und Mitarbeitern (1974) sowie die neueren Ergebnisse (Beelen, 1992 und 1999; Holler, 2004) verdeutlichen die Rolle der intestinalen bakteriellen Flora bei der Entstehung einer GvHD in Folge einer allogenen Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation. Trotzdem diese Zusammenhänge bekannt sind, gab es bislang keine Untersuchungen zur Zusammensetzung der Darmflora vor und während einer akuten GvHD. Die hier vorgestellten Ergebnisse liefern zum ersten Mal eine Beschreibung der Veränderungen und des Zustands der intestinalen Bakterienflora von Patienten mit akuter GvHD. Die Veränderungen waren in erster Linie den verabreichten Breitspektrum-Antibiotika zuzurechnen (vgl. Kap. 5.2.1). Das Resultat, eine Anreicherung von Gram-(+) Bakterien zum Zeitpunkt einer akuten bzw. intestinalen GvHD, konnte unabhängig voneinander in Stuhlproben aus zwei Kliniken dokumentiert werden (Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum und Campus Benjamin Franklin). Ausgehend von der Hypothese, dass eine Dekontamination bzw. Verschiebung innerhalb der intestinalen Bakterienflora das Risiko der Entstehung einer akuten GvHD reduziert (Beelen, 1992 und 1999; van

Bekkum, 1974; Kofteridis, 2004), stehen die hier beschriebenen Ergebnisse auf den ersten Blick im Kontrast zu dieser Annahme. Demnach hätte bei Patienten mit einer stark reduzierten bakteriellen Diversität, insbesondere in der frühen kritischen Phase nach Transplantation, im Vergleich zu den übrigen Patienten ein Schutz gegenüber einer akuten GvHD beobachtet werden müssen. Tatsächlich konnte aber das Gegenteil festgestellt werden. Das Prinzip von Ursache und Wirkung konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht entschlüsselt werden. Grundsätzlich kommen aber zwei Möglichkeiten in Betracht. Es wäre zum einen vorstellbar, dass die Bakterien der Darmflora in Folge einer induzierten Störung der mukosalen Integrität (z.B. Chemotherapie oder Bestrahlung) dichter an die Epithelzellen und deren Bakterienrezeptoren (z.B. TLR2 und TLR4) herankommen bzw. durch die Epithelzellen hindurch treten und somit eine Reaktion des Immunsystems auslösen, welche wiederum zur Entstehung und dem Schweregrad einer GvHD beiträgt. Auf der anderen Seite könnte aber auch die Präsenz einer bakteriellen Flora an sich die Immunreaktion und daraufhin eine Schädigung des Gewebes auslösen, welche wiederum den Grad einer GvHD beeinflussten könnte. Der tatsächliche Beitrag einzelner bakterieller Spezies oder Gattungen bleibt bis heute Spekulation. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie könnten jedoch darauf hinweisen, dass eine signifikante Störung des intestinalen Ökosystems einen negativen Einfluss auf die Entwicklung einer GvHD besitzt, da alle Patienten ohne GvHD gleichzeitig eine höhere Diversität in den untersuchten Stuhlproben aufwiesen.

Die hier beschriebenen Veränderungen der Darmflora als Folge der Behandlung mit Breitspektrum-Antibiotika und deren möglicher Einfluss bei der Entwicklung einer akuten GvHD geben Anlass zu neuen Anstrengungen auf diesem Gebiet. Auch wenn das gewählte Human-Modell aufgrund der multiplen Einfluss- und Störfaktoren im Nachhinein für die klare Beantwortung der Frage nach Ursache und Wirkung der Darmflora auf die Entwicklung einer akuten GvHD nicht geeignet war, so stellen die oben diskutierten Ergebnisse dennoch eine Grundlage bei der Suche nach neuen Antworten dar. Ein mittlerweile bewilligter Antrag wird sich beispielsweise mit dem „Einfluss der Interaktion von intestinaler Mikroflora und angeborenem Immunsystem auf Graft-versus-Host Disease und tumorspezifische Immunantworten nach allogener Stammzelltransplantation“ im Maus-Modell beschäftigen (Thyssen Stiftung; Prof. Dr. Dr. U. B. Göbel und Prof. Dr. L. Uharek). Neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet

könnten in Zukunft die Fälle akuter GvHD sowie deren Morbidität und Mortalität reduzieren und die Chancen einer erfolgreich verlaufenden allogenen Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation erhöhen.

5.2.4 Veränderungen der Sprosspilzpopulation innerhalb der Darmflora

Die Patienten der vorliegenden Studie wurden einer Prophylaxe mit Amphotericin B unterzogen, dessen Einsatz das Infektionsrisiko bekanntlich um 50 bis 80 % und die Mortalitätsrate um 23 bis 45 % reduziert (Boogaerts, 2001). Im Fall der vorliegenden Studie konnten keine invasiven Pilzinfektionen dokumentiert werden. Zwei Patienten hatten zu einem Zeitpunkt Antigene von *Aspergillus* im Serum bzw. in der Bronchiallavage. Bei einem weiteren Patienten konnte *C. albicans* aus dem Sputum und der Bronchiallavage isoliert werden. Ein vierter Patient hatte bei Aufnahme *C. albicans* im Rachenabstrich und im Stuhl. Bei der Kultivierung von Pilzen kann man allerdings nicht zwischen einer Besiedelung und einer Infektion unterscheiden, auch wenn eine starke Kolonisation als Risikofaktor interpretiert wird (Sims, 2005). Indirekte Methoden, z.B. Detektion von serologischen Markern oder Genen sind aufgrund ihrer Limitationen momentan noch nicht in der klinischen Anwendung (Sims, 2005). Die hier eingeführte ITS2-DHPLC bietet eine neue Möglichkeit der schnellen und einfachen Detektion von Pilzen, auch in schwer zugänglichen Materialien wie z.B. Stuhl (Goldenberg, 2005b). Außerdem eignet sich die Methode zur gleichzeitigen Identifizierung mehrerer Pilze in einer Probe. Die einfache Identifizierung von DHPLC-Peaks mittels eines geeigneten Markers (Abb. 16. und 24) bzw. der Sequenzierung unbekannter Peaks, sowie der schnelle Durchsatz von Proben ermöglichen den Einsatz der Methode in der klinischen Diagnostik. In der vorliegenden Studie konnte mit Hilfe der ITS2-DHPLC erstmals ein Monitoring der intestinalen Pilzflora von Patienten mit hämatologischen Krebserkrankungen unter Therapie durchgeführt werden. Stichprobenartige Vergleiche von molekularen und kulturellen Ergebnissen konnten die Daten der DHPLC-Analyse größtenteils verifizieren (Tab. 13). Die Unterschiede waren vermutlich auf Probleme bei der Kultivierung (z.B. Überwucherung durch andere Pilze) und der Amplifikation von ITS2-Sequenzen (z.B. präferentielle Amplifikation; Nachweisgrenze) zurückzuführen,

Tab. 15: Identifizierung von ITS2-Sequenzen aus eluierten DHPLC-Peaks.

Spezies	Vorkommen	Eigenschaften / Funktion	Sonstiges	Referenz
Aspergillus penicillioides	Gebäude (z.B. Lüftung)	Schimmelpilz		
Aureobasidium pullulans	Boden, Pflanzen, Abwasser,	Abbau von Cellulose	"Schwarze Hefe"	http://schimmel-schimmelpilze.de
	Früchte, Baummaterialien	Produzent von Pullulan (Verdickungsmittel)		
Brassia oleracea			Spitzkohl	
Cladosporium herbarum	Sumpfgebiete, verfaulte Planzen und Laub	Häufigste Pilzart auf abgestorbenem pflanzlichen Material		http://schimmel-schimmelpilze.de
Cladophialophora spp.	Boden, verfaulte Pflanzen	Potentielle Krankheitserreger		Sutton, 1998
Cryptococcus oeirensis	Unbekannt			
Daucus carota			Karotte	
Didymella ligulicola	Pflanzen (bes. Schnittblumen)	Pflanzenpathogen		http://www.eppo.org/
Entyloma microsporum	Unbekannt	Mit *Itersonilia* verwandt		Sowell, 1960
Eurotium rubrum	Getreide	Bei Lagerung von getrockneten Lebensmitteln		Cooley, 2005
Ganoderma sp.	An Bäumen	Heilpilz (*G. lucidum* alias Reishi oder Ling Zhi)	u.a. begleitende Krebstherapie	http://www.vitalpilze.de/reishi.php
		Erhältlich als Pulver oder Extrakt		
Geotrichum candidum	Boden, Wasser, Pflanzen und auf sauren Lebensmitteln (z.B. Käse, oder Sauerkraut)	Erreger der Geotrichose (chronische Entzündung der Haut, Mundschleimhaut und Bronchien)	Milchschimmel	Buchta, 1988
Itersonilia perplexans	Pflanzen	Pflanzenpathogen		Sowell, 1960
Malassezia spp.	Haut (talgdrüsenreiche Areale)			Gueho, 1996
M. globosa	Mensch	Pityriasis versicolor (Kleienpilzflechte)		
M. pachydermatis	Vornehmlich Tiere			
M. restricta	Im Bereich des behaarten Kopfes			
M. sloofiae	Schwein, gelegentlich Mensch			
Penicillium camembertii	Lebensmittel	Herstellung von Camembert und Roquefort-Käse		
Phlebia uda	Baumstumpf	Stumpffäule		Suhara, 2002

so dass mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht alle Pilze in den untersuchten Proben detektiert werden konnten. Zudem wurden in vielen Proben Peaks außerhalb des Marker-Spektrums beobachtet, welche somit nicht direkt identifiziert werden konnten. Die Sequenzierung von ITS2-Genfragmenten aus ausgewählten DHPLC-Peaks führte zur Identifikation von Pilzen, welche offensichtlich nicht zur individuellen Darmflora gehörten (Tab. 15). Der Ursprung eines Teils der Sequenzen konnte direkt oder indirekt durch die orale Nahrungsaufnahme erklärt werden. So ist z.B. *P. camembertii* als Edelschimmel bei der Herstellung von Käse bekannt. Pilze wie beispielsweise *A. pullulans* oder *I. perplexans* befinden sich im Boden oder an Pflanzenteilen und wurden vermutlich durch Nahrung aufgenommen, welche möglicherweise vor dem Verzehr nicht ordentlich abgespült wurde. *A. penicillioides* wurde eventuell über die Luft aufgenommen. *Ganoderma sp.* alias Reishi ist als Heilpilz in der begleitenden Krebstherapie bekannt und wurde von dem Patienten wahrscheinlich während seines stationären Aufenthalts eingenommen. Über die Aktivität der oben genannten Spezies im Darm ist nichts bekannt. Aufgrund der Tatsache, dass die DNA bereits abgestorbener Organismen noch als Vorlage für eine PCR-Amplifikation dienen kann, besteht die Möglichkeit, dass die detektierten Signale in der DHPLC auch von nicht vitalen oder transienten Pilzen stammten. Zudem konnten Peaks von *B. oleracea* (Spitzkohl) und *D. carota* (Karotte) identifiziert werden, was das universelle eukaryontische Spektrum der verwendeten Oligonukleotide unterstreicht. Bei der Anwendung der Methode für die Analyse komplexer Floren können demzufolge auch vereinzelt Peaks detektiert werden, die keinen Ursprung im Reich der Pilze besitzen. In einigen Fällen konnten DHPLC-Peaks von potentiell pathogenen Organismen identifiziert werden (Tab. 15). So ist z.B. *G. candidum* ein Umweltkeim, gilt aber gleichzeitig auch als Erreger der Geotrichose (Buchta, 1988). Die Signale der *Malassezia* Spezies waren im Gegensatz zu den bereits erwähnten Pilzen oftmals in aufeinander folgenden Proben detektierbar, was zumindest für eine zeitweise Kolonisation dieser Organismen im Darm sprichen könnte, obwohl *Malassezia* Hefen normalerweise zur Hautflora gehören (Gueho, 1996).

Alle übrigen Peaks wurden mit Hilfe des Markers (Abb. 16) den bekannten *Candida* Spezies zugeordnet und in Abbildung 27 den verabreichten Antimykotika gegenübergestellt. Obwohl diese Darstellungsweise kein Nachweis für eine Resistenz gegenüber dem jeweiligen Antimykotikum ist, gibt sie dennoch eine

Tendenz bezüglich der Inzidenz von *Candida*-Spezies unter einer derartigen Behandlung wieder. In der Literatur gibt es, im Vergleich zu der Situation bei den Bakterien, nur wenige Berichte über einen Zusammenhang zwischen der Gabe von Antimykotika, der Isolation resistenter Organismen und daraus resultierenden klinischen Folgen (Groll, 1998; Pfaller, 2002).

Mit Ausnahme von *C. lusitaniae* sind *Candida*-Spezies empfindlich gegenüber Amphotericin B (Groll, 1998; Sims, 2005). Bei immunsupprimierten Patienten konnte allerdings ein verstärktes Auftreten resistenter Pilze in Folge einer Langzeitbehandlung mit Amphotericin B festgestellt werden (Groll, 1998). Eine Übertragung der Amphotericin B Resistenz auf andere Stämme oder Spezies ist bislang nicht bekannt bzw. konnte nicht bestätigt werden (Kuriyama, 2005). Die im Verlauf der vorliegenden Studie beobachteten Tendenzen bezüglich des molekularen Nachweis' von Pilzen unter Behandlung von Amphotericin B (Abb. 27A) spiegeln vermutlich eine Verschiebung des Pilzspektrums sowie eine gewisse Anreicherung resistenter bzw. weniger empfindlicher Pilze in der Darmflora wieder. Zu einem gewissen Teil könnte diese Beobachtung auch auf die Verschiebung innerhalb der bakteriellen Flora als Folge der Antibiotikaprophylaxe zurückzuführen sein (Kap. 5.2.1), welche möglicherweise das Wachstum opportunistischer Mikroorganismen begünstigte.

In Übereinstimmung zur Therapie von Fieber unbekannten Ursprungs als mögliche Reaktion auf eine bakterielle Infektion, wurde bei Verdacht eine empirische Behandlung mit Azolen (z.B. Fluconazol) und/oder Caspofungin als Prävention gegenüber invasiven Pilzinfektionen durchgeführt. In der Literatur werden einige Fälle von Infektionen aufgrund der Kolonisation opportunistischer Hefen wie *C. glabrata* oder *C. krusei* in Folge einer Prophylaxe mit Fluconazol beschrieben (Bow, 2005; Laverdiere, 2000; Sims, 2005). Verschiedene Studien konnten zudem zeigen, dass *C. glabrata* im Vergleich zu anderen getesteten Spezies eine höhere Resistenz gegenüber Fluconazol aufweist (Kuriyama, 2005; Pfaller, 2002). Auch in der vorliegenden Studie konnten häufig DHPLC-Peaks von *C. glabrata* in Proben detektiert werden, welche während einer Behandlung mit Azolen eingesammelt worden waren. Diese Beobachtung lässt sich vermutlich auf eine Akkumulation dieser Pilzspezies aufgrund einer vergleichsweise hohen natürlichen Resistenz gegenüber Azolen zurückführen. Möglicherweise wurde die Anreicherung auch durch

die Reduktion der bakteriellen Diversität unter Breitspektrum-Antibiotika begünstigt (Trenschel, 2000; Tab. 16).

Tab. 16: Gegenüberstellung der, mittels ITS2-DHPLC identifizierten Pilzspezies, in Stuhlproben von Patienten mit hämatologischen Krebserkrankungen und klinischen Parametern (Risikofaktoren) zum Zeitpunkt der Probenahme. Die Angaben verstehen sich in Prozent und geben den Anteil der Patienten mit speziesspezifischen Peaks zum Zeitpunkt des, als Risikofaktor bezeichneten, klinischen Zustands wieder. In Klammern sind die absoluten Werte angegeben.

Stamm	Risikofaktor				
	Neutropenie (n=45)	Chemotherapie (n=45)	Breitspektrum-AB (n=34)	akute GvHD (n=13)	PE (n=22)
C. lusitaniae / *S. cerevisiae*	18 (8)	18 (8)	50 (17)	23 (3)	23 (5)
C. albicans	13 (6)	22 (10)	41 (14)	15 (2)	27 (6)
C. glabrata	9 (4)	9 (4)	35 (12)	62 (8)	36 (8)
C. inconspicua	11(5)	11 (5)	29 (10)	23 (3)	18 (4)
C. tropicalis	0 (0)	4 (2)	6 (2)	8 (1)	0 (0)
C. dubliniensis	2 (1)	7 (3)	15 (5)	8 (1)	9 (2)
C. krusei / *E. rubrum*	7 (3)	11 (5)	21 (7)	39 (5)	18 (4)

Trenschel und Mitarbeiter (2000) fanden allerdings keinen klinischen Zusammenhang zwischen der Akkumulation von Pilzen und dem Auftreten invasiver Infektionen, was sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie deckt.

Caspofungin gehört zu einer neuen Klasse der Antimykotika (Echinocandine). Bislang existieren nach Kenntnis des Autors keine klinischen Studien über den Einfluss einer Therapie mit Caspofungin auf das Wachstum von *Candida*-Spezies. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen auf eine Anreicherung von *C. glabrata* und *C. lusitaniae* / *S. cerevisiae* in der Darmflora unter der Gabe von Caspofungin hin (Abb. 27C). Die oben bereits diskutierte Gabe von Breitspektrum-Antibiotika könnte diesen Effekt möglicherweise begünstigt haben.

Die bislang beschriebenen Beobachtungen wurden vor dem Hintergrund einer Verabreichung von antimykotisch wirkenden Medikamenten diskutiert. Verschiebungen oder Anreicherungen von *Candida*-Spezies in der Darmflora führen aber nicht zwangsläufig zu Konsequenzen für die betroffene Person. Das Risiko einer *Candida* Infektion hängt maßgeblich von der Art der zugrunde liegenden Krankheit und vom gegenwärtigen Zustand des Patienten ab (Sims, 2005). Bei den KMT-Patienten stellen vor allem die Verwendung von Venenkathetern sowie die Immunsuppression Risikofaktoren dar. Hinzu kommen die Gabe von Breitspektrum-Antibiotika, lange intensivmedizinische Betreuung, die Länge der Neutropenie, eine Schädigung der Mukosa in Folge von Chemo- und Radiotherapie, sowie eine parenterale Ernährung (Jantunen, 1997; Sims, 2005; Verfaillie, 1991). Bei den

allogen transplantierten Patienten stellt zudem die GvHD (akute GvHD Grad II bis IV; chronische GvHD) bzw. deren Behandlung einen Risikofaktor dar (Jantunen, 1997; Bow, 2005). In Tabelle 16 wurden die, mittels ITS2-DHPLC häufig detektierten, Pilzspezies den, zu diesem Zeitpunkt vorliegenden, Risikofaktoren gegenübergestellt. Die Auswertung der Daten ergab eine Häufung von *C. lusitaniae* / *S. cerevisiae* und *C. albicans* während einer Behandlung mit bakteriell wirkenden Breitspektrum-Antibiotika, sowie von C. glabrata und *C. krusei* / *E. rubrum* zum Zeitpunkt einer akuten GvHD (Tab. 16). Ein Zusammenhang mit einer invasiven Infektion konnte nicht festgestellt werden. Die Daten zeigen dennoch, dass die Prophylaxe und Therapie mit antifungalen und antibakteriellen Medikamenten zu einer Verschiebung innerhalb der Pilzflora führt und dass die Akkumulation bestimmter Spezies (z.B. *C. albicans* oder *C. glabrata*) ein potentielles Risiko für die KMT-Patienten darstellen könnte.

Mit Hilfe der ITS2-DHPLC konnte erstmals ein molekulares Monitoring von Pilz-Spezies in der Darmflora durchgeführt werden. Die verwendete Methode ist nicht nur schnell, flexibel und einfach durchzuführen, sie erlaubt auch die Identifizierung von unbekannten Spezies mittels Sequenzierung von Peaks. Der hier vorgestellte Marker (Abb. 16) lässt sich ohne weiteres ergänzen bzw. modifizieren und somit an andere Anwendungen anpassen. Diese Faktoren sprechen für einen Einsatz der Methode in der Routine-Diagnostik von Blutkulturen oder Stuhlproben (Goldenberg, 2005b). Auch andere Materialien wie beispielsweise Bronchiallavage, Urin oder Rachenabstriche dürften für die Anwendung der ITS2-DHPLC geeignet sein. Da die kulturelle Analyse von Pilzen teilweise sehr zeitaufwendig ist, bietet die ITS2-DHPLC eine viel versprechende Alternative, um auf Grundlage der Ergebnisse eine möglichst zeitnahe und angemessene Therapie einzuleiten und den Patienten vor invasiven Pilzinfektionen zu schützen. Aus wissenschaftlicher Sicht könnte der Einsatz dieser Methode neue Erkenntnisse über die Ökologie von Pilzen im Gastrointestinaltrakt, der Haut (z.B. *Malassezia spp.*) oder in der Umwelt liefern.

5.3 Schlussfolgerungen

Trotz ihrer Komplexität stellt die bakterielle Darmflora ein zeitlich konstantes Ökosystem dar, welches insbesondere durch seine metabolischen Aktivitäten für den Menschen von Nutzen ist. Während der Therapie von Leukämien oder anderen Krebserkrankungen des blutbildenden Systems kam es, unabhängig von der Therapieform, zu einer teils dramatischen Veränderung der Darmflora und, in Folge dessen, zu einer signifikanten Störung des ökologischen Gleichgewichts (Abb. 28).

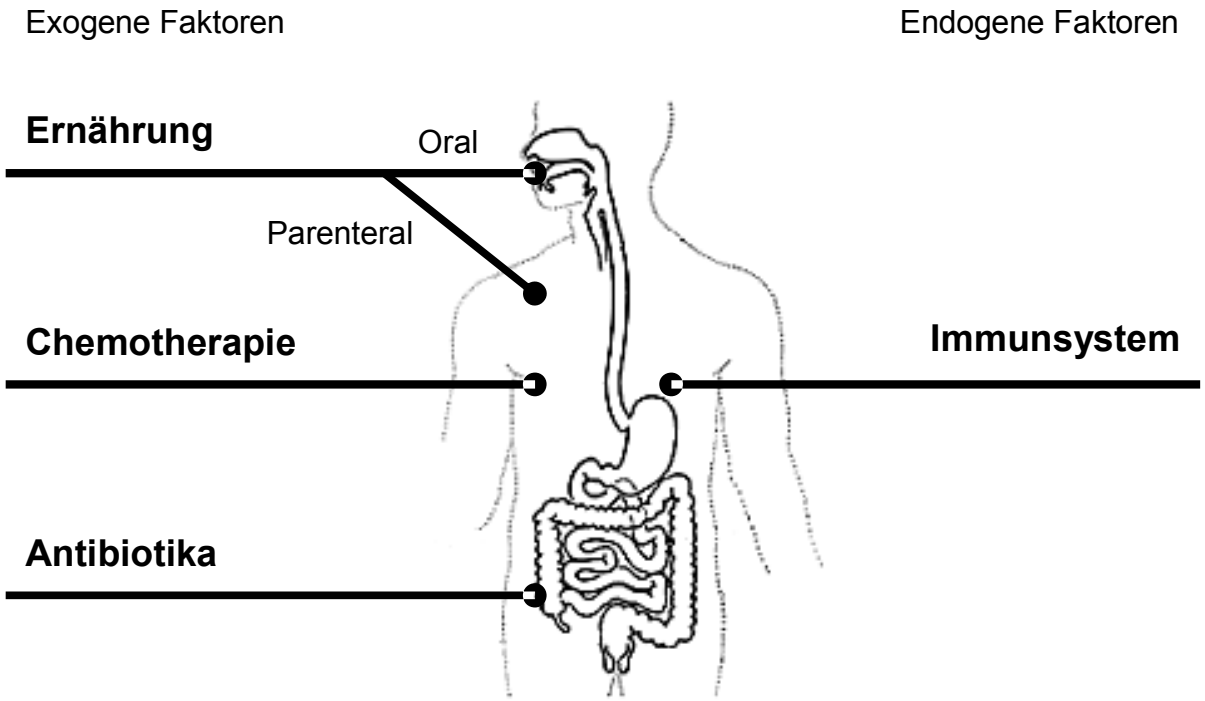


Abb. 28: Endogene und Exogene Faktoren, die die Zusammensetzung der Darmflora von Patienten mit hämatologischen Krebserkrankungen während der Therapie beeinflussen können.

Als initialer Faktor für eine solche Störung konnte die Antibiotikaprophylaxe ermittelt werden. Die indirekten Folgen der Chemotherapie (z.B. Schädigung des epithelialen Gewebes) führten möglicherweise ebenfalls zu einer Verschiebung der bakteriellen Zusammensetzung im Darm. Maßgebliche Veränderungen konnten nach bzw. während der Gabe von Breitspektrum-Antibiotika beobachtet werden, welche durch eine gleichzeitige parenterale Ernährung zusätzlich konserviert wurden. Parallel zur Reduktion der Darmflora konnte eine Anreicherung von Bakterien mit Resistenzen gegenüber den verabreichten Antibiotika beobachtet werden. Nach Absetzen der

Antibiotika und mit Beginn der oralen Zufuhr von Nahrungsmitteln kam es zu einer Rekonstitution der Darmflora, allerdings mit einer anderen Zusammensetzung als zu Beginn der Studie, was möglicherweise dem Einfluss der Antibiotikaprophylaxe auf die Zusammensetzung der Ausgangsproben zuzurechnen war. Die Daten lieferten zudem neue Hinweise bezüglich der Rolle der Darmflora bei der Entstehung einer akuten (intestinalen) GvHD.

Die Behandlung der Patienten mit Antibiotika ist und bleibt ein wichtiges Mittel der Prophylaxe und Therapie gegen endogen und exogen erworbene Infektionen. Auf Grundlage der hier gezeigten Ergebnisse scheint ein Monitoring der Veränderungen innerhalb der Darmflora sinnvoll, um den Erfolg oder Misserfolg der Behandlung zu dokumentieren und die Therapie gegebenenfalls zu modifizieren. Als Methode für die Durchführung einer derartigen Überwachung kommt die DHPLC in Frage, deren Einsatz für die Darstellung von Bakterien und Pilzen in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden konnte.

6 Referenzen

Abd-El-Haleem D., H. Moawad, E. A. Zaki and S. Zaki. 2002. Molecular characterization of phenol-degrading bacteria isolated from different Egyptian ecosystems. Microb. Ecol. 43: 217-224.

Adamsson I., C. Edlund, S. Sjörstedt and C. E. Nord. 1997. Comparative effects of cefadroxil and phenoxymethylpenicillin on the normal oropharyngeal and intestinal microflora. Infection 25: 154-158.

Aguirre M. and M. D. Collins. 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. J. Appl. Bacteriol. 75: 95-107.

Alverdy J. C., E. Aoys and G. S. Moss. 1988. Total parenteral nutrition promotes bacterial translocation from the gut. Surgery 104: 185-190.

Arns da Cunha C., D. Weisdorf, X. O. Shu, T. DeFor, J. D. Pastor III and J. R. Johnson. 1998. Early gram-positive bacteremia in BMT recipients: impact of three different approaches to antimicrobial prophylaxis. Bone Marrow Transplantation 21: 173-180.

van der Auwera P., N. Pensart, V. Korten, B. E. Murray and R. Leclercq. 1996. Influence of oral glycopeptides on the fecal flora of human volunteers: selection of highly glycopeptide-resistant enterococci. J. Infect. Dis. 173: 1129-1136.

Backhed F., H. Ding, T. Wang, L. V. Hooper, G. Y. Koh, A. Nagy, C. F. Semenkovich and J. I. Gordon. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 101: 15718-15723.

Barcenilla A., S. E. Pryde, J. C. Martin, S. H. Duncan, C. S. Stewart, C. Henderson and H. J. Flint. 2000. Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1654-1661.

Barlaan E. A., M. Sugimori, S. Furukawa and K. Takeuchi. 2005. Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography. J. Microbiol. Methods 61: 399-412.

Barlett J. G. 2002. Clinical practice. Antibiotic associated diarrhea. N. Engl. J. Med. 346: 334-339.

Bartosch S., A. Fite, G. T. Macfarlane and M. E. T. McMurdo. 2004. Characterization of Bacterial Communities in Feces from Healthy Elderly Volunteers and Hospitalized Elderly Patients by Using Real-Time PCR and Effects of Antibiotic Treatment on the Fecal Microbiota. Appl. Environ. Microbiol. 70: 3575-3581.

Beelen D. W., E. Haralambie, H. Brandt, G. Linzenmeier, K. D. Müller, K. Quabeck, H. G. Sayer, U. Graeven, H. K. Mahmoud and U. W. Schäfer. 1992. Evidence, that sustained growth suppression of intestinal anaerobic bacteria reduces the risk of acute graft-versus-host disease after sibling marrow transplantation. Blood 80: 2668-2676.

Beelen D. W., A. Elmaagad, K. D. Müller, H. Hirche and U. Schäfer. 1999. Influence of intestinal bacterial decontamination using metronidazole and ciprofloxacin or ciprofloxacin alone on the development of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation in patients with haematologic malignancies: Final results and long-term follow-up of an open-label prospective randomized trial. Blood 93: 3267-3275.

van Bekkum D. W., J. Roodenburg, P. J. Heidt and D. van der Waaij. 1974. Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora. J. Nat. Cancer Inst. 52: 401-406.

Bergan T., C. E. Nord and S. B. Thorsteinsson. 1991. Effect of meropenem on the intestinal microflora. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 10: 524-527.

Billingham R. E. 1966. The biology of graft-vs-host reactions. In The Harvey lectures. New York: Academic Press, 62: 21.

Boogaerts M., D. J. Winston, E. J. Bow, G. Garber, A. C. Reboli, A. B. Schwarer, N. Novitzky, A. Boehme, E. Chwetzoff and K. De Beule. 2001. Intravenous and oral itraconazole versus intravenous amphotericin B deoxycholate as empirical antifungal therapy for persistent fever in neutropenic patients with cancer who are receiving broad-spectrum antibacterial therapy. Ann. Intern. Med. 135: 412-422.

Borzio M., F. Salerno, M. Sbudelli, D. Galvagno, L. Piantoni and L. Fragiacomo. 1997. Efficacy of oral ciprofloxacin as selective intestinal decontaminant in cirrhosis. Ital. J. Gastroenterol. Hepatol. 29: 262-266.

Bow E. J., M. Laverdiere, N. Lussier, C. Rotstein, M. S. Cheang and S. Ioannou. 2002. Antifungal prophylaxis for severely neutropenic chemotherapy recipients: a meta analysis of randomized-controlled clinical trials. Cancer 94: 3230-3246.

Bow E. J. 2005. Long-term antifungal prophylaxis in high-risk hematopoietic stem cell transplant recipients. Medical Mycology Suppl. I 43: 5277-5287.

Boyle J. S. and A. M. Lew. 1995. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. Trends Genet. 11: 8.

Brandtzaeg P., T. S. Halstensen, K. Kett, P. Krajci, D. Kvale, T. O. Rognum, H. Scott and L. M. Sollid. 1989. Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. Gastroenterology 97: 1562-1584.

Brismar B., C. Edlund and C. E. Nord. 1993. Impact of cefpodoxime proxetil and amoxicillin on the normal oral and intestinal microflora. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12: 714-719.

Brock Mikrobiologie. 2000. Spektrum Verlag.

Buchta V. and M. Otcenasek. 1988. *Geotrichum candidum* – an opportunistic agent of mycotic diseases. Mycoses 31: 363-370.

Bullen C. L., P. V. Tearle and M. G. Stewart. 1977. The effect of “humanised” milks and supplemented breastfeeding on the faecal flora of infants. J. Med. Microbiol. 10: 403-413.

Buzby G. P., L. S. Knox, L. O. Crosby, J. 1999. Graft-vs-host disease (2nd edition). Austin: R. G. Landes Co.M. Eisenberg, C. M. Haakenson, G. E. McNeal, C. P. Page, O. L. Peterson, G. F. Reinhardt and W. O. Williford. 1988. Study protocol: A randomized clinical trial of total parenteral nutrition in malnourished surgical patients. Am. J. Clin. Nutr. 47: 366-381.

Chao N. J. 1999. Graft-vs-host disease (2nd edition). Austin: R. G. Landes Co.

Clement B. G., L. E. Kehl, K. L. DeBord and C. L. Kitts. 1998. Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. J. Microbiol. Methods 31: 135-142.

de la Cochetiere M. F., T. Durand, P. Lepage, A. Bourreille, J. F. Gamiche and J. Dore. 2005. Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. J. Clin. Microbiol. 43: 5588-5592.

Cooke K. R., A. Gerbitz, J. M. Crawford, T. Teshima, G. R. Hill, A. Tesolin, D. P. Rossignol and J. L. M. Ferrara. 2001. LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. J. Clin. Invest. 107: 1581-1589.

Cooley C., B. H. Bluhm, B. L. Reuhs and C. P. Rossignol and J. L. M. Ferrara. 2001. LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. J. Clin. Invest. 107: 1581-1589.Woloshuk. 2005. Glass-fiber disks

provide suitable medium to study polyol production and gene expression in *Eurotium rubrum*. Mycologia 97: 743-750.

Cummings J. H., E. W. Pomare, W. J. Branch, C. P. Naylor and G. T. Macfarlane. 1987. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. Gut 28: 1221-1227.

Daly K., C. S. Steward, H. J. Flint and S. P. Shirazi-Beechey. 2001. Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. FEMS Microbiol. Ecol. 38: 141-151.

Delgado S., A. B. Florez and B. Mayo. 2005. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. Curr. Microbiol. 50: 202-207.

Derrien M., D. Adawi, S. Ahrne, B. Jeppsson, G. Molin, N. Osman, J. Stsepetova, E. E. Vaughan, W. M. de Vos and A. C. Ouwehand. 2004. The intestinal mucosa as a habitat of the gut microbiota and a rational target for probiotic functionality and safety. Microbial Ecology in Health and Disease 16: 137-144.

Die Blauen Ratgeber Nr. 20: Leukämie bei Erwachsenen. Deutsche Krebshilfe e.V. Ausgabe 6/2005.

Domann E., G. Hong, C. Imirzalioglu, S. Turschner, J. Kühle, C. Watzel, T. Hain, H. Hossain and T. Chakraborty. 2003. Culture-Independent Identification of Pathogenic Bacteria and Polymicrobial Infections in the Genitourinary Tract of Renal Transplant Recipients. J. Clin. Microbiol. 41: 5500-5510.

Donnelly J. P. 2000. Infection in the neutropenic and haematopoietic stem cell transplant recipient. Curr. Opin. Infect. Dis. 13: 337-342.

Donskey C. J., A. M. Hujer, S. M. Das, N. J. Pultz, R. A. Bonomo and L. B. Rice. 2003. Use of denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the stool microbiota of hospitalized patients. J. Microbiol. Methods 54: 249-256.

Drasar B. S. and P. A. Barrow. 1985. Intestinal Microbiology. American Society of Microbiology, Washington, D.C.

Dubos R., R. W. Schaedler, R. Costello and P. Hoet. 1965. Indigenous, normal, and autochthonous flora of the gastrointestinal tract. J. Exp. Med. 122: 67-76.

Eckburg P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson and D. A. Relman. 2005. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. Science. 308: 1635-1638.

Edlund C., L. Barkholt, B. Olsson-Liljequist and C. E. Nord. 1997. Effect of vancomycin on intestinal flora of patients who previously received antimicrobial therapy. Clin. Infect. Dis. 25: 729-732.

Edlund C., G. Beyer, M. Hiemer-Bau, S. Ziege, H. Lode and C. E. Nord. 2000. Comparative effects of moxifloxacin and clarithromycin on the normal intestinal microflora. Scand. J. Infect. Dis. 32: 81-85.

Engels E. A., C. A. Ellis, S. E. Supran, C. H. Schmid, M. Barza, D. P. Schenkein, Y. Koc, K. B. Miller and J. B. Wongl. 1999. Early infection in bone marrow transplantation: Quantitative Study of clinical factors that affect risk. Clin. Infect. Dis. 28: 256-266.

Ferris M. J. and D. M. Ward. 1997. Seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol 63: 1375-1381.

Finegold S. M., H. R. Attebery and V. L. Sutter. 1974. Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets. Am. J. Clin. Nutr. 27: 1456-1469.

Finegold S. M. and R. D. Rolfe. 1983. Susceptibility testing of anaerobic bacteria. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1: 33-40.

Forman S. J., K. G. Blume and E. D. Thomas. 1998. Hemopoietic Cell Transplantation. 2nd ed. Blackwell Scientific London.

Forth W., D. Henschler and W. Rummel. 2001. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 8. Aufl., Urban & Fischer Verlag.

Franks A. H., H. J. M. Harmsen, G. C. Raangs, G. J. Hansen, F. Schut and G. W. Welling. 1998. Variations of Bacterial Populations in Human Feces Measured by Fluorescent In Situ Hybridization with Group-Specific 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes. Appl. Envisron. Microbiol. 64: 3336-3345.

Fromin N. , J. Hamelin, S. Tarnawski, D. Roesti, K. Jourdain-Miserez, N. Forestier, S. Teyssier-Cuvelle, F. Gillet, M. Aragno and P. Rossi. 2002. Statistical analysis of denaturing gradient electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. Environ. Microbiol. 4: 634-643.

Fruchart C., A. Salah, C. Gray, E. Martin, A. Stamatoullas, G. Bonmarchand, J. F. Lemeland and H. Tilly. 1997. *Lactobacillus* species as emerging pathogens in neutropenic patients. Eur. J. Clin Microbiol. Infect. Dis. 16: 681-684.

Frueh F. W. and M. Noyer-Weidner. 2003. The use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of genetic variations: impact for diagnostics and pharmacogenetics. Clin. Chem. Lab. Med. 41: 452-461.

Gibson G. R. and M. B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J. Nutr. 125: 1401-1412.

Gionchetti P., F. Rizzello, A. Venturi and M. Campieri. 2000.l Probiotics in infective diarrhoea and inflammatory bowel diseases. J. Gastroenterol. Hepatol. 15: 489-493.

Goker H., I. C. Haznedaroglu and N. J. Chao. 2001. Acute graft-vs-host disease: Pathobiology and management. Exp. Hematol. 29: 259-277.

Goldenberg O., O. Landt, R. R. Schumann, U. B. Göbel and L. Hamann. 2005a. Use of locked nucleic acid nucleotides as hybridization/FRET probes for quantification of 16S rDNA by real-time PCR. Biotechniques 38: 29-32.

Goldenberg O., S. Herrmann, T. Adam, G. Marjoram, G. Hong, U. B. Göbel and B. Graf. Use of Denaturing High-Performance Liquid Chromatography for Rapid Detection and Identification of Seven *Candida* Species. 2005b. J. Clin. Microbiol. 43: 5912-5915.

Groll A. H., S. C. Piscitelli and T. J. Walsh. 1998. Clinical pharmacology of systemic antifungal agents: A comprehensive review of agents in clinical use, current investigational compounds, and putative targets for antifungal drug development. Adv. Pharmacol. 44: 343-500.

Guarner F. and J. R. Malagelada. 2003. Gut flora in health and disease. Lancet 361: 512-519.

Gueho E., G .Midgley and J. Guillot. 1996. The genus malassezia with description of four new species. Antonie van Leeuwenhoek 69: 337-355.

Guiot H. F. and R. van Furth. 1992. Selective decontamination in bone marrow transplant recipients. Epidemiol. Infect. 109: 349-360.

Gupta A., H. Vlamakis, N. Shoemaker and A. A. Salyers. 2003. A new Bacteroides conjugative transposon that carries an ermB gene. Appl. Environ. Microbiol. 69: 6455-6463.

Gutell R. R., B. Weiser, C. R. Woese and H. F. Noller. 1985. Comparative anatomy of 16-S-like ribosomal RNA. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 32: 155-216.

Haskel Y., D. Xu, Q. Lu and E. A. Deitch. 1993. The modulary role of gut hormones in elemental diet and intravenous total parenteral nutrition-induced bacterial translocation in rats. J. Parent. Enter. Nutr. 18: 159-166.

Hayashi H., M. Sakamoto and Y. Benno. 2002. Fecal microbial diversity in a strict vegetarian as determined by molecular analysis and cultivation. Microbiol. Immunol. 46: 819-831.

Hayashi H., M. Sakamoto, M. Kitahara and Y. Benno. 2003. Molecular Analysis of Fecal Microbiota in Elderly Individuals Using 16S rDNA Library and T-RFLP. Microbiol. Immunol. 47: 557-570.

Heit H., R. Wilson and T. M. Fliedner. 1973. Mortality of secondary disease in antibiotic treated mouse radiation chimeras. In Heneghan J. B. (ed.): Germfree Research: Biological Effects of Gnotobiotic Environments. New York Academic: 477-483.

Helgeland L., J. T. Vaage, B. Rolstad, T. Midtvedt and P. Brandtzaeg. 1996. Microbial colonization influences composition and T-cell receptor V beta repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine. Immunology 89: 494-501.

Hill G. R: and L. M. Ferrara. 2000. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rational for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. Blood 95: 2754-2759).

Hold G. L., S. E. Pryde, V. J. Russell, E. Furrie and H. J. Flint. 2002. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. FEMS Microbiol. Ecol. 39: 33-39

Holler E., G. Rogler, H. Herfarth, J. Brenmoehl, P. J. Wild, J. Hahn, G. Eissner, J. Scholmerich and R. Andreesen. 2004. Both, donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. Blood 104: 889-894.

Holliman R.E. and G.P. Bone. 1988. Vancomycin resistance of clinical isolates of lactobacilli. J. Infect. 16: 279-283.

Hoogkamp-Korstanje J. A. A., J. G. E. M. Lindner, J. H. Marcelis, H. Den Daas-Slagt and N. M. De Vos. 1979. Composition and ecology of the human intestinal flora. Antonie van Leeuwenhoek 45: 35-40.

Hori T., S. Haruta, Y. Ueno, M. Ishii M and Y. Igarashi. 2005. Direct comparison of single-strand conformation polymorphism (SSCP) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to characterize a microbial community on the basis of 16S rRNA gene fragments. J. Microbiol. Methods [in press]

Huijsdens X. W., R. K. Linskens, M. Mak, S. G. M. Meuwissen, C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls and P. H. M. Savelkoul. 2002. Quantification of Bacteria Adherent to Gastrointestinal Mucosa by Real-Time PCR. J. Clin. Microbiol. 40: 4423-4427.

Hurtle W., D. Shoemaker, E. Henchal and D. Nordwood. 2002. Denaturing HPLC for Identifying Bacteria. Biotechniques 33: 386-391.

Hurtle W., L. Lindler, W. Fan, D. Shoemaker, E. Henchal and D. Norwood. 2003. Detection and identification of ciprofloxacin-resistant *Yersinia pestis* by denaturing high-performance liquid chromatography. J. Clin. Microbiol. 41: 3273-3283.

Hyma K. E., D. W. Lacher, A. M. Nelson, A. C. Bumbaugh, J. M. Janda, N. A. Strockbine, V. B. Young and T. S. Whittam. 2005. Evolutionary genetics of a new pathogenic Escherichia species: Escherichia albertii and related Shigella boydii strains. J. Bacteriol. 187: 619-628.

Hyman R. W., M. Fukushima, L. Diamond, J. Kumm, L. C. Giudice and R. W. Davis. 2005. Microbes on the human vaginal epithelium. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 102: 7952-7957.

Idris R., R. Trifonova, M. Puschenreiter, W. W. Wenzel and A. Sessitsch. 2004. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator Thlaspi goesingense. Appl. Environ. Microbiol. 70: 2667-2677.

Inohara N., M. Chamaillard, C. McDonald and G. Nunez. 2005. NOD-LRR proteins: Role in host-microbial interactions and inflammatory disease. Annu. Rev. Biochem. 74: 355-383.

Janeway C. A. Jr., P. Travers, M. Walport and M. J. Shlomchik. 2005. Immunobiology. 6th ed. Garland Science Publishing.

Jantunen E., P. Ruutu, L. Niskanen, L. Volin, T. Parkkali, P. Koukila-Kähkölä and T. Ruutu. 1997. Incidence and risk factors for invasive fungal infections in allogeneic BMT receipients. Bone Marrow Transplant. 19: 801-808.

Jensen M. A. and N. Straus. 1993. Effect of PCR conditions on the formation of heteroduplex and single-stranded DNA products in the amplification of bacterial ribosomal DNA spacer regions. PCR Methods App. 3: 186-194.

Jones J. M., R. Wilson and P. M. Bealmear. 1971. Mortality and gross pathology of secondary disease in germ free mouse radiation chimeras. Radiation Research 45: 577-588.

Kagnoff M. F. and L. Eckmann. 1997. Epithelial cells as sensors for microbial infection. J. Clin. Invest. 100: 6-10.

Kalima P., R. G. Masterton, P. H. Roddie and A. E. Thomas. 1996. *Lactobacillus rhamnosus* infection in a child following bone marrow transplant. J. Infect. 32: 165-167.

Kamlage, B., B. Gruhl, and M. Blaut. 1997. Isolation and characterization of two new homoacetogenic hydrogen-utilizing bacteria from the human intestinal tract that are closely related to Clostridium coccoides. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1732-1738.

Kisland V. and J. Wikner. 2003. Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences. J. Microbiol. Methods 54: 183-191.

Kofteridis D. P., S. Maraki, I. Mixaki, E. Mantadakis and G. Samonis. 2004. Impact of prolonged treatment with trimethoprim-sulfamethoxazole on the human gut flora. Scand. J. Infect. Dis. 36: 771-772.

Konstantinov S. R., W.-Y. Zhu, B. A. Williams, S. Tamminga, W. M. deVos and A. D. L. Akkermans. 2003. Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA. FEMS Microbiol. Ecol. 43: 225-235.

Kowalchuk G. A., J. R. Stephen, W. De Boer, J. I. Prosser, T. M. Embley and J. W. Woldendorp. 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1489-1497.

van Kraaij M. G. J., A. W. Dekker, E. Peters, A. Fluit, L. F. Verndonck and M. Rozenberg-Arska. 1998. Emergence and infectious complications of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in haematological cancer patients. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 17: 591-599.

Krueger W. A., G. Ruckdeschel and K. Unertl. 1997. Influence of intravenously administered ciprofloxacin on aerobic intestinal microflora and faecal drug levels when administered simultaneously with sucralfate. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 1725-1730.

Kruis W., E. Schutz, P. Fric, B. Fixa, G. Judmaier and M. Stolte. 1997. Double-blind comparison of an oral Escherichia coli preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. Aliment. Pharmacol. Ther. 11: 853-858.

Kuriyama T., D. W. Williams, J. Bagg, W. A. Coulter, D. Ready and M. A. O. Lewis. 2005. *In vitro* susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. Oral Microb. Immunol. 20: 349-353.

Kurkchubasche A. G., S. D. Smith and M. I. Rowe. Catheter sepsis in short-bowel syndrome. 1992. Arch. Surg. 127: 21-25.

Larue R., Z. Yu, V. A. Parisi, A. R. Egan and M. Morrison. 2005. Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing. Environ. Microbiol. 7: 530-543.

Laverdiere M., C. Rotstein, E. J. Bow, R. S. Roberts, S. Ioannou, D. Carr and N. Moghaddam. 2000. Impact of fluconazole prophylaxis on fungal colonization and infection rates in neutropenic patients. The Canadian fluconazole study. J. Antimicrob. Chemother. 46: 1001-1008.

Leser T. D., J. Z. Amenuvor, T. K. Jensen, R. H. Lindecrona, M. Boye and K. Moller. 2002. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. Appl. Environ. Microbiol. 68: 673-690.

van der Leur J. J. J. P. M., P. L. M. Thunnissen, H. A. L. Clasener, N. F. Mueller and A. S. M. Dofferhoff. 1993. Effects of Imipenem, Cefotaxime and Cotrimoxazole on Aerobic Microbial Colonization of the Digestive Tract. Scand. J. Infect. Dis. 25: 479-485.

van der Leur J. J. J. P. M., E. J. Vollaard, A. J. H. M. Janssen and A. S. M. Dofferhoff. 1997. Influence of low dose ciprofloxacin on microbial colonization of the digestive tract in healthy volunteers during normal and during impaired colonization resistance. Scand. J. Infect. Dis. 29: 297-300.

Ley R. E., F. Backhed, P. Turnbaugh, C. A. Lozupone, R. D. Knight and J. I. Gordon. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 102: 11070-11075.

Liu W.-T., T. L. Marsh, H. Cheng and L. J. Forney. 1997. Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism of Genes Encoding 16S rRNA. Appl. Environ.Microbiol. 63: 4516-4522.

Lode H., N. von der Höh, S. Ziege, K. Borner and C. E. Nord. 2001. Ecological effects of linezolid versus amoxycillin/clavulanic acid an the normal intestinal microflora. Scand. J. Infect. Dis. 33: 899-903.

Louis P., S. H. Duncan, S. I. McCrae, J. Millar, M. S. Jackson and H. J. Flint. 2004. Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon. J. Bacteriol. 186: 2099-2106.

Lu J., U. Idris, B. Harmon, C. Hofacre, J. J. Maurer and M. D. Lee. 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. Appl. Environ. Microbiol. 69: 6816-6824.

Lund B., C. Edlund, L. Barkholt, C. E. Nord, M. Tvede and R. L. Poulsen. 2000. Impact on human intestinal microflora of an *Enterococcus faecium* probiotics and vancomycin. Scand. J. Infect. Dis. 32: 627-632.

Macpherson A., U. Y. Khoo, I. Forgacs, J. Philpott-Howard and I. Bjarnason. 1996. Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. Gut 38: 365-375.

Magurran A. 1988. Diversity indices and species abundance models. In: Ecological Diversity and Its Measurement, Princeton University Press, Princeton, NJ. p95.

Mangin I., R. Bonnet, P. Seksik, L. Rigottier-Gois, M. Sutren, Y. Bouhnik, C. Neut, M. D. Collins, J. F. Colombel, P. Marteau and J. Dore. 2004. Molecular inventory of faecal microflora in patients with Crohn's disease. FEMS Microbiology Ecology 50: 25-36.

Manz W., R. Amann, W. Ludwig, M. Vancanneyt and K. H. Schleifer. 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. Microbiology 142: 1097-1106.

Marsh T. L. 1999. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. Curr. Opin. Microbiol. 2: 323-327.

Mavromanolakis E., S. Maraki, G. Samonis, Y. Tselentis and A. Cranidis. 1997. Effect of norfloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole and nitrofurantoin on fecal flora of women with recurrent urinary tract infections. J. Chemother. 9: 203-207.

Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. Nature Rev. Immunol. 1: 135-145.

Millar M. R., C. J. Linton, A. Cade, D. Glancy, M. Hall and H. Jajal. 1996. Application of 16S rRNA gene PCR to study bowel flora of preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. J. Clin. Microbiol. 34: 2506-2510.

Mitchell A. E., P. Derrington, P. Turner, L. P. Hunt, A. Oakhill and D. I. Marks. 2004. Gram-negative bacteraemia (GNB) after 428 unrelated donor bone marrow transplants (UD-BMT): risk factors, prophylaxis, therapy and outcome. Bone Marrow Transplantation 33: 303-310.

Moore F., E. Moore and T. Jones. 1989. TEN vs. TPN following major abdominal trauma: Reduced septic morbidity. J. Trauma. 29: 916-923.

Moore W. E. C. and L. V. Holdeman. 1974. Special problems associated with the isolation and identification of intestinal bacteria in fecal flora studies. Am. J. Clin. Nutr. 27: 1450-1455.

Moore W. E. and L. V. Holdeman. 1974b. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. Appl. Microbiol. 27: 961-979.

Moter A. and U. B. Göbel. 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. J. Microbiol. Methods 41: 85-112.

Murray A. E., J. T. Hollibaugh and C. Orrego. 1996. Phylogenic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. Appl. Environm. Microbiol. 62: 2676-2680.

Muyzer A., E. C. de Waal and A. G. Uitterllinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol 59: 695-700.

Muyzer G and K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek 73: 127-141.

Nagashima K., T. Hisada, M. Sato and J. Mochizuki. 2003. Application of New Primer-Enzyme Combinations to Terminal Restriction Fragment Polymorphism Profiling of Bacterial Populations in Human Feces. Appl. Environ. Microbiol 69: 1251-1262.

Namsolleck P., R. Thiel, P. Lawson, K. Holmstrom, M. Rajilic, E. E. Vaughan, L. Rigottier-Gois, M. D. Collins, W. M. de Vos and M. Blaut. 2004. Molecular Methods for the Analysis of Gut Microbiota. Microbial Ecology in Health and Disease 16: 71-85.

Nelson K. E., S. H. Zinder, I. Hance, P. Burr, D. Odongo, D. Wasawo, A. Odenyo and R. Bishop. 2003. Phylogenetic analysis of the microbial populations in the wild herbivore gastrointestinal tract: insights into an unexplored niche. Environ. Microbiol. 5: 1212-1220.

Nord C. E., B. Brismar, B. Kasholm-Tengve and G. Tunevall. 1993. Effect of piperacillin/tazobactam treatment on human bowel microflora. J. Antimicrob. Chemother. 31(suppl A): 61-65.

Nübel U., F. Garcia-Pichel, M. Kühl and G. Muyzer. 1999. Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoides of oxygenic phototrophs in microbial mats. Appl. Environ. Microbiol. 65: 422-430.

Orrhage K., B. Brismar and C. E. Nord. 1994. Effect of supplements with *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal microbiota during administratin of clindamycin. Microbiol. Ecol. in Health Dis. 7: 17-25.

Pirzer U., A. Schonhaar, B. Fleischer, E. Hermann and K. H. Meyer zum Buschenfelde. 1991. Reactivity of infiltrating T lymphocytes with microbial antigens in Crohn's disease. Reactivity of infiltrating T lymphocytes with microbial antigens in Crohn's disease. Lancet 338: 1238-1239.

Pfaller M. A. and D. J. Diekema. 2002. Role of sentinel surveillance of candidemia: Trends in species distribution and antifungal susceptibility. J. Clin. Microbiol. 40: 3551-3557.

Pryde S. E., A. J. Richardson, C. S. Stewart and H. J. Flint. 1999. Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen, and cecal lumen of a pig. Appl. Environ. Microbiol. 65: 5372-5377.

Rex J. H. and J. D. Sobel. 2001. Prophylactic antifungal therapy in the intensive care unit. Clin. Infect. Dis. 32: 1191-2000.

Rodewald H.-R. and W. Friedrich. 2002. Blutstammzelltransplantation – Ein Beispiel praktizierter Stammzelltherapie. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 45: 85-91.

Rote Liste (ISBN: 3-87193-306-6).

Rozenberg-Arska M. and A. W. Dekker. 1987. Ciprofloxacin for infection prevention in patients with acute leukaemia. Pharm. Weekbl. Sci. 9 Suppl.: S45-47.

Sakamoto M., M. Umeda, I. Ishikawa and Y. Benno. 2000. Comparison of the oral bacterial flora in saliva from a healthy subject and two periodontitis patients by sequence analysis of 16S rDNA libraries. Microbiol. Immunol. 44: 643-652.

Sakamoto M., H. Hayashi and Y. Benno. 2003. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Human Fecal Microbiota and Its Application for Analysis of Complex Bifidobacterial Communities. Microbiol. Immunol. 47: 133-142.

Sale G. E., H. M. Shulman, G. B. McDonald and E. D. Thomas. 1979. Gastrointestinal graft-versus-host-disease in man. A clinicopathologic study of the rectal biopsy. Am. J. Surg. Pathol. 3: 291-299.

Salfinger M. 1980. Possibilities and limits of the proof by culture of intestinal bacterial infections. Ther. Umsch. 37: 181-186.

Savage D. C. 1972. Associations and physiological interactions of indigenous microorganisms and gastrointestinal epithelia. Am. J. Clin. Nutr. 25: 1372-1379.

Sekiguchi H. N. Tomioka, T. Nakahara and H. Uchiyama. 2001. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. Biotechnology Lett. 23: 1205-1208.

Sepkowitz K. A. 2002. Antibiotic prophylaxis in patients receiving hematopoetic stem cell transplant. Bone Marrow Transplantation 29: 367-371.

Shanahan F. 2001. Probiotics in inflamatory bowel disease. Gut 48: 609.

Simpson J. M., V. J. McCracken, B. A. White, R. H. Gaskins and R. I. Mackie. 1999. Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. J. Microbiol. Methods 36: 167-179.

Simon G. L. and S. L. Gorbach. 1984. Intestinal flora in health and disease. Gastroenterology 86: 174-193.

Sims C. R., L. Ostrosky-Zeichner and J. H. Rex. 2005. Invasive candidiasis in immunocompromised hospitalized patients. Arch. Med. Res. 36: 660-671.

Smalla K., G. Wieland, A. Buchner, A. Zock, J. Parzy, S. Kaiser, N. Roskot, H. Heuer and G. Berg. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. Appl. Environ. Microbiol. 67: 4742-4751.

Speksnijder A. G., G. A. Kowalchuk, S. De Jong, E. Kline, J. R. Stephen and H. J. Laanbroek. 2001. Microvariation artifacts introduced by PCR and cloning of closely related 16S rRNA gene sequences. Appl. Environ. Microbiol. 67: 469-472.

Sowell G. and R. P. Korf. 1960. An emendation of the genus Itersonilia based on studies of morphology and pathogenicity. Mycologia 52: 934-945.

Suau A., R. Bonnet, M. Sutren, J.-J. Godon, G. R. Gibson, M. D. Collins and J. Doré. 1999. Direct Analysis of Genes Encoding 16S rRNA from Complex Communities Reveals Many Novel Molecular Species within the Human Gut. Appl. Environ. Microbiol. 65: 4799-4807.

Suhara H., N. Maekawa, T. Kubayashi, K. Sakai and R. Kondo. 2002. Identification of the basidiomycetous fungus isolated from butt rot of the Japanese cypress. Mycoscience 43: 477-481.

Sullivan K. M. 1999 Graft vs host disease. In ED Thomas, K. B. Blume, S. J. Forman (eds): Hematopoietic cell transplantation (2nd edition). Oxford: Blackwell Scientific Publications: p. 515

Sullivan A., C. Edlund and C. E. Nord. 2001. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. Lancet Infectious Dis. 1: 101-114.

Sutton D. A., A. W. Fothergill and M. G. Rinaldi. 1998. Guide to clinically significant fungi, 1st ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

Swenson J. M., R. R. Facklam and C. Thornsberry. 1990. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Lactobacillus* species. Antimicrob. Agents 34: 543-547.

Szeluga D. J., R. K. Stuart, R. Brookmeyer, V. Utermohlen and G. W. Santos. 1987. Nutritional support of bone marrow transplant recipients: a prospective, randomized clinical trial comparing total parenteral nutrition to an enteral feeding program. Cancer Res. 47: 3309-3216.

Tajima K., S. Arai, K. Ogata, T. Nagamine, H. Matsui, M. Namakura, R. I. Aminov and Y. Benno. 2000. Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. Anaerobe 6: 273-284.

Tannock G. W. 2001. Molecular assessment of the intestinal microflora. Am. J. Nutr. 73(suppl): 410S-414S.

Taranenko N. I., R. Hurt, J. Z. Zhou, N. R. Isola, H. Huang, S. H. Lee and C. H. Chen. 2002. Laser desorption mass spectrometry for microbial DNA analysis. J. Microbiol. Methods 48: 101-106.

Thompson J. R., L. A. Marcelino and M. F. Polz. 2002. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. Nucleic Acids Res. 30: 2083-2088.

Topping D. L. and P. M. Clifton. 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. Physiol. Rev. 81: 1031-1064.

Trenschel R., R. Peceny, V. Runde, A. Elmaagacli, H. Dermoumi, E. Heintschel von Heinegg, K. D. Muller, U. W. Schaefern and D. W. Beelen. 2000. Fungal colonization and invasive fungal infections following allogeneic BMT using metronidazole, ciprofloxacin and fluconazole or ciprofloxacin and fluconazole as intestinal decontamination. Bone Marrow Transplant. 26: 993-997.

Umesaki Y., H. Setoyama, S. Matsumoto and Y. Okada. 1993. Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. Immunology 79: 32-37.

Vallaeys T., E. Topp, G. Muyzer, V. Macheret, G. Laguerre, A. Rigaud and G. Soulas. 1997. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhiziobia and methanotrophs. FEMS Microbiol. Ecol. 24: 279-285.

Vaughan E. E., F. Schut, H. G. H. J. Heilig, E. G. Zoetendal, W. M. de Vos and A. D. L. Akkermans. 2000. A Molecular View of the Intestinal Ecosystem. Curr. Issues Intest. Microbiol. 1: 1-12.

Verfaillie C., D. Weisdorf, R. Haake, M. Hostetter, N. K. C. Ramsay and P. McGlave. 1991. *Candida* infections in bone marrow transplant recipients. Bone Marrow Transplant. 8: 177-184.

Vollaard E. J. and H. A. L. Clasener. 1994. Colonization Resistance. Antimicrob. Agents and Chemother. 38: 409-414.

van der Waaij D., J. M. Berghuis-de Vries and L. v.-Lekkerkerk. 1971. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. J. Hyg. (Lond) 69: 405-411.

Walter E. A. and R. A. Bowden. 1995. Infection in the bone marrow transplant recipient. Infect. Dis. Clin. North. Am. 9: 823-847.

Wang R. F., M. L. Beggs, L. H. Robertson and C. E. Cerniglia. 2002. Design and evaluation of oligonucleotide-microarray method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples. FEMS Microbiol. Lett. 213: 175-182.

Weisdorf S. A., J. Lysne, D. Wind, R. J. Haake, H. L. Sharp, A. Goldman, K. Schissel, P. B. McGlave, N. K. Ramsay and J. H. Kersey. 1987. Positive effect of total parenteral nutrition on long-term outcome of bone marrow transplantation. Transplantation. 43: 833-838.

Welling G. W., G. J. Meijer-Severs, G. Helmus, E. van Santen, R. H. Tonk, H. G. de Vries-Hospers and D. van der Waaij. 1991. The effect of ceftriaxone on the anaerobic bacterial flora and the bacterial enzymatic activity in the intestinal tract. Infection 19: 313-316.

Widjojoatmodjo M. N., A. C. Fluit and J. Verhoef. 1994. Rapid identification of bacteria by PCR-single-strand conformation polymorphism. J. Clin. Microbiol. 32: 3002-3007.

Wilson K. H. and R. B. Blitchington. 1996. Human Colonic Biota Studied by Ribosomal DNA Sequence Analysis. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2273-2278.

von Wintzingerode F., U. B. Göbel and E. Stackebrandt. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiol. Rev. 21: 213-229.

von Wintzingerode F., O. Landt, A. Ehrlich and U. B. Göbel. 2000. Peptide nucleic acid-mediated PCR clamping as a useful supplement in the determination of microbial diversity. Appl. Environ. Microbiol. 66: 549-557.

von Wintzingerode F., S. Bocker, C. Schlötelburg, N. H. Chiu, N. Storm, C. Jurinke, C. R. Cantor, U. B. Göbel and D. van den Boom. 2002. Base-specific fragmentation of amplified 16S rRNA genes analyzed by mass spectrometry: a tool for rapid bacterial identification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 7039-7044.

Wiström J., L. O. Gentry, A. C. Palmgren, M. Price, C. E. Nord, A. Ljungh and S. R. Norrby. 1992. Ecological effects of short-term ciprofloxacin treatment of travellers' diarrhoea. J. Antimicrob. Chemother. 30: 693-706.

Woese C. R., L. J. Magrum, R. Gupta, R. B. Siegel, D. A. Stahl, J. Kop, N. Crawford, J. Brosius, R. Gutell, J. J. Hogan and H. F. Noller. 1980. Secondary structure model for bacterial 16S ribosomal RNA: phylogenetic, enzymatic and chemical evidence. Nucleic Acids Res. 8: 2275-2293.

Xiao W. and P. J. Oefner. 2001. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. Hum. Mutat. 17: 439-474.

Yeh S.-P., E.-J. Hsueh, M.-S. Yu, H. Wu and Y.-C. Wang. 1999. Oral ciprofloxacin as antibacterial prophylaxis after allogeneic bone marrow transplantation: a reappraisal. Bone Marrow Transplantation 24: 1207-1211.

Young V. B. and T. M. Schmidt. 2004. Antibiotic-associated diarrhea accompanied by large-scale alterations in the composition of the fecal microbiota. J. Clin. Microbiol. 42: 1203-1206.

Yuen K. Y., P. C. Y. Woo, C. H. Hui, W. K. Luk, F. E. Chen, A. K. W. Lie and R. Liang. 1998. Unique risk factors for bacteraemia in allogeneic bone marrow transplant recipients before and after engraftment. Bone Marrow transplantation 21: 1137-1143.

Zhang X., X. Yan, P. Gao, L. Wang, Z. Zhou and L. Zhao. 2005. Optimized sequence retrieval from single bands of temperature gradient gel electrophoresis profiles of the amplified 16S rDNA fragments from an activated sludge system. J. Microbiol. Methods 60: 1-11.

Zhu X. Y., T. Zhong, Y. Pandya and R. D. Joerger. 2002. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. Appl. Environ. Microbiol. 68: 124-137.

Zengler K., G. Toledo, M. Rappe, J. Elkins, E. J. Mathur, J. M. Short and M. Keller. 2002. Cultivating the uncultured. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 99: 15681-15686.

Zoetendal E. G., A. D. L. Akkermans and W. M. de Vos. 1998. Temperature Gradient Gel Electrophoresis Analysis of 16S rRNA from Human Fecal Samples Reveals Stable and Host-Specific Communities of Active Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3854-3859.

Zoetendal E.G., A. D. L. Akkermans, W. M. Akkermans-van Vliet, J. A. G. M. de Visser and W. M. de Vos. 2001. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. Microb. Ecol. Health Dis. 13: 129-134.

Zoetendal E. G., K. Ben-Amor, H. J. M. Harmsen, F. Schut, A. D. L. Akkermans and W. M. de Vos. 2002. Quantification of Uncultured *Ruminococcus obeum*-Like Bacteria in Human Fecal Samples by Fluorescent In Situ Hybridization and Flow Cytometry Using 16S rRNA-Targeted Probes. Appl. Environ. Microbiol. 68: 4225-4232.

Zoetendal E. G., C.T. Collier, S. Koike, R. I. Mackie and H. R. Gaskins. 2004. Molecular Ecological Analysis of the Gastrointestinal Microbiota: J Nutr. [Supplement: Symposium/Molecular Ecology of the Gastrointestinal Microbiota]: 465-472.

IV Abkürzungsverzeichnis

AAD	Antibiotika-assoziierte Durchfälle
AB	Antibiotika
Abb.	Abbildung
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest	Destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
CBF	Charité Campus Benjamin Franklin
CCM	Charité Campus Charité Mitte
CDCE	Constant Denaturing Capillary Electrophoresis
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
CML	Chronische Myeloische Leukämie
CMV	Zytomegalie-Virus
CNA	Colistin Nalidixic Acid (Colistin Nalidixinsäure)
CVK	Campus Virchow Klinikum
DGGE	Denaturierende Gradientengelelektrophorese
DHPLC	Denaturierende High Peformance Liquid Chromatography
DIN	Deutsche Industrienorm
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphat-Mix
DSMZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	Englisch
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FRET	Fluoreszenz Resonanz Elektronen Transfer
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
GvL	Graft-versus-Leukämie
h	Stunde
HLA	Human Leukozyten Antigene
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-beta-Thiogalactopyranosid
I_S	Sörensen/Dice-Index
Kap.	Kapitel
KBE	Koloniebildende Einheiten
KMT	Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation
L	Liter
LB	L-broth
LGG	*Lactobacillus rhamnosus* GG
LNA	Locked Nucleic Acid
M	Molar
m	Milli
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MHK	Minimale bakteriostatische Hemmkonzentration
min	Minute
Mod	Modifiziert
MTX	Methotrextat
µ	Mikro
n	nano

n	Stichprobenanzahl
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
nt	Nukleotide
n. pub.	Nicht publiziert
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PE	Parenterale Ernährung
PNA	Peptide Nucleic Acid
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SDD	Selektive Darmdekontamination
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sp.	Spezies
ssDNA	Einzelsträngige DNA
SSCP	Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat
TBE	Tris-Borat-Ethylendiamintetraacetat
TE	Tris-Ethylendiamintetraacetat
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGGE	Temperaturgradienten Gelelektrophorese
TLR	Toll-like Rezeptor
Tof	Time-of-flight (Detektor)
T-RFLP	Terminaler Restriktionsfragment Längenpolymorphismus
U	Unit
UK	United Kingdom
USA	United States of America
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
X-Gal	5-Chloro-4-bromo-3-indolyl-beta-D-galaktopyranosid
XLD	Xylose-Lysin-Deoxycholat

V Anhang

Tab. A1: Klonierung und Sequenzierung von 16S rRNA Genfragmenten aus Stuhlproben eines allogen transplantierten Patienten. Die Klone wurden nach ihrer Zugehörigkeit zu einer bakteriellen Gattung sortiert. In der Tabelle sind die ausgewertete Anzahl an Nukleotiden (nt) sowie deren prozentuale Ähnlichkeit zur nächsten verwandten Sequenz angegeben.

Gattung:	*Firmicutes* / *Clostridia* (*Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Eubacteriaceae* und *Peptococcaceae*)				
Probe	Klon	nt	%	Nächste verwandte Sequenz	Referenz
1	K1	1331	91	Uncultured rumen bacterium 5C0d-16	Tajima, 2000
	K9	1211	95	Uncultured bacterium clone p-2913-6C5	Leser, 2002
	K14	651	99	Uncultured bacterium clone Eldhufec306	Nicht publiziert (n. pub.)
	K26	984	95	Butyrate-producing bacterium A1-86	Barcenilla, 2000
	K27	1484	98	Uncultured bacterium A19	Zoetendal, 1998
	K29	1497	98	Uncultured bacterium A54	Zoetendal, 1998
	K48	753	92	Uncultured bacterium clone p-1528-b5	Leser, 2002
	K79	1396	97	Uncultured bacterium clone p-595-a5	Leser, 2002
	K83	1414	99	Uncultured bacterium clone p-1940-962-3	Leser, 2002
	K101	1432	98	Uncultured bacterium HuCB29	Hold, 2002
	K102	829	96	*Eubacterium formicigenerans*	
	K103	716	94	Uncultured bacterium adhufec295	Suau, 1999
	K105	426	99	Uncultured bacterium clone p-2484-18B5	Leser, 2002
	K106	734	97	Uncultured bacterium clone UASB_brew_B8	n. pub.
	K107	628	95	Uncultured bacterium clone p-31-a5	Leser, 2002
	K109	481	98	Uncultured bacterium clone p-2617-9F5	Leser, 2002
	K110	1034	98	Uncultured bacterium clone HuCB12	Hold, 2002
	K111	700	97	Uncultured bacterium adhufec52	Suau, 1999
	K112	582	96	Uncultured bacterium clone p-5014-2Wa5	Leser, 2002
	K114	765	98	Uncultured bacterium clone p-478-o2	Leser, 2002
	K115	347	97	clone HuCA11	Hold, 2002
	K116	767	95	Uncultured bacterium adhufec295	Suau, 1999
	K117	543	98	Butyrate-producing bacterium A2-165	Barcenilla, 2000
	K123	509	96	Uncultured bacterium clone HuCA6	Hold, 2002
	K124	617	99	Uncultured bacterium adhufec311	Suau, 1999
	K126	515	94	Uncultured bacterium clone p-444-o3	Leser, 2002
	K128	623	100	Uncultured bacterium clone p-2484-18B5	Leser, 2002
	K129	610	98	Uncultured bacterium adhufec269	Suau , 1999
	K131	702	97	*Eubacterium rectale*	
	K132	717	98	Butyrate-producing bacterium A1-86	Barcenilla, 2000
	K133	829	97	Butyrate-producing bacterium A1-87	Barcenilla, 2000
	K134	458	99	Uncultured bacterium clone p-2785-24E5	Leser, 2002
	K135	189	87	Uncultured bacterium adhufec295	Suau, 1999
	K138	664	99	Butyrate-producing bacterium A2-231	Barcenilla, 2000
	K139	732	96	*Eubacterium formicigenerans*	
	K140	749	98	Uncultured bacterium clone HuCB7	Hold, 2002
3	K1	568	99	uncultured bacterium clone C-76	Nagashima, 2003
	K2	624	99	Uncultured bacterium clone HuCA40	Hold, 2002
	K3	1172	98	Uncultured bacterium clone p-2117-s959-2	Leser, 2002
	K4	681	99	Uncultured bacterium clone HuCB2	Hold, 2002
	K6	683	98	Uncultured bacterium clone C-24	Nagashima, 2003
	K10	594	98	Uncultured bacterium clone p-2840-6C5	Leser, 2002
	K11	754	97	Butyrate-producing bacterium A2-165	Barcenilla, 2000
	K13	474	96	uncultured bacterium clone HuCB10	Hold, 2002

Gattung:	*Firmicutes* / *Clostridia* (*Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Eubacteriaceae* und *Peptococcaceae*)				
Probe	Klon	nt	%	Nächste verwandte Sequenz	Referenz
3	K23	531	97	Lachnospiraceae bacterium 19gly4	n. pub.
	K35	430	91	Uncultured bacterium clone 8-15F5	Young, 2004
	K37	341	97	*Pseudoramibacter sp.* oral clone BP1-8	Sakamoto, 2000
	K38	552	98	Uncultured bacterium clone p-2168-959-3	Leser, 2002
	K40	470	96	Uncultured human intestinal bacterium clone:JW1C1	Hayashi, 2002
	K41	586	99	Butyrate-producing bacterium A2-165	Barcenilla, 2000
	K43	533	99	Uncultured bacterium clone p-5459-2Wb5	Leser, 2002
	K41	586	99	Butyrate-producing bacterium A2-165	Barcenilla, 2000
	K43	533	99	Uncultured bacterium clone p-5459-2Wb5	Leser, 2002
	K41	586	99	Butyrate-producing bacterium A2-165	Barcenilla, 2000
	K43	533	99	Uncultured bacterium clone p-5459-2Wb5	Leser, 2002
	K46	460	97	uncultured bacterium clone: J66	n. pub.
	K47	345	92	Uncultured bacterium clone p-1590-c5	Leser, 2002
	K48	427	98	Uncultured bacterium clone p-1617-c5	Leser, 2002
	K49	506	98	Uncultured bacterium clone HuCA40	Hold, 2002
	K52	419	98	Uncultured bacterium A9	Konstantinov, 2003
	K53	539	98	Uncultured bacterium clone HuCB2	Hold, 2002
	K54	303	96	Uncultured bacterium clone p-2840-6C5	Leser, 2002
	K55	412	98	Uncultured bacterium clone ABLCf5	n. pub.
	K56	303	98	Uncultured bacterium clone 68	Lu 2003
	K57	515	99	Butyrate-producing bacterium A2-165	Barcenilla, 2000
	K59	631	99	Uncultured bacterium clone HuCB2	Hold, 2002
	K61	552	93	*Ruminococcus hydrogenotrophicus*	
	K62	456	99	Uncultured bacterium clone HuCA13	Hold, 2002
	K64	567	96	Uncultured bacterium clone HuCA40	Hold, 2002
Gattung:	*Firmicutes* / *Mollicutes*				
Probe	Klon	nt	%	Nächste verwandte Sequenz	Referenz
1	K4	1334	96	Uncultured bacterium clone p-3870-23G5	Leser, 2002
	K6	1394	94	Unidentified rumen bacterium RF39	Tajima, 1999
	K50	1333	92	Uncultured bacterium clone p-3870-23G5	Leser, 2002
	K51	1271	90	Uncultured bacterium clone p-1735-b3	Leser, 2002
Gattung:	*Firmicutes* / *Staphylococcaceae*				
Probe	Klon	nt	%	Nächste verwandte Sequenz	Referenz
2	K5	477	99	*Staphylococcus sp.*	
	K6	752	97	*Staphylococcus epidermidis*	
	K7	767	98	*Staphylococcus epidermidis*	
	K8	735	98	*Staphylococcus epidermidis*	
	K9	556	97	*Staphylococcus epidermidis*	
	K10	473	98	*Staphylococcus epidermidis*	
	K11	439	98	*Staphylococcus epidermidis*	
	K14	418	97	*Staphylococcus epidermidis*	
	K15	314	100	*Staphylococcus epidermidis*	
	K17	438	98	*Staphylococcus epidermidis*	
	K19	617	98	*Staphylococcus epidermidis*	
Gattung:	*Bacteroidales*				
Probe	Klon	nt	%	Nächste verwandte Sequenz	Referenz
1	K49	595	97	*Bacteroides merdae*	
3	K5	795	96	*Bacteroides uniformis*	
	K7	797	96	*Bacteroides uniformis*	
	K8	693	99	*Bacteroides sp.* AR20	n. pub.
	K9	670	99	*Bacteroides sp.* AR20	n. pub.
	K12	1370	99	*Bacteroides sp.* AR20	n. pub.

Gattung:	*Bacteroidales*				
Probe	Klon	nt	%	Nächste verwandte Sequenz	Referenz
3	K15	846	96	*Bacteroides sp.* AR20	n. pub.
	K19	505	97	*Bacteroides sp.* AR20	n. pub.
	K21	439	97	*Bacteroides distasonis*	
	K26	218	98	*Bacteroides sp.* AR20	n. pub.
	K29	547	96	*Bacteroides ovatus*	
	K33	567	99	*Bacteroides sp.* AR20	n. pub.
	K42	563	96	*Bacteroides sp.* AR20	n. pub.
	K44	294	96	*Bacteroides sp.* ASF519	n. pub.
	K50	424	98	*Bacteroides eggerthii* NCTC 11185	
	K58	819	97	*Bacteroides eggerthii* NCTC 11185	
	K60	535	98	*Bacteroides sp.* AR20	n. pub.
	K63	351	97	*Bacteroides sp.* AR20	n. pub.
	K65	469	98	*Bacteroides sp.* AR20	n. pub.
	K68	471	99	*Bacteroides sp.* AR20	n. pub.
Gattung:	*Actiniobacteria*				
Probe	Klon	nt	%	Nächste verwandte Sequenz	Referenz
2	K1	690	95	*Pseudonocardia chlorethenivorans*	

Tab. A2: Ergebnisse der Sequenzierung von DHPLC-Peaks aus Stuhlproben (s. Abb. 11). Die Klone wurden nach ihrer Zugehörigkeit zu einer bakteriellen Gattung sortiert. In der Tabelle sind die ausgewertete Anzahl an Nukleotiden (nt) sowie deren prozentuale Ähnlichkeit zur nächsten verwandten Sequenz angegeben.

Probe	Peak	Klon	nt	%	Nächste verwandte Sequenz	Referenz
A	1	1	376	96.3	Uncultured bacterium ckncm049-C2.8	Zhu, 2002
		2	431	93.3	Uncultured bacterium 77k03	n. pub
		3	439	97.9	Uncultured bacterium cadhufec010h7	Mangin, 2004
		4	359	98.1	*Akkermansia muciniphila*	
	2	1	439	90.7	Uncultured bacterium clone:C-24	Nagashima, 2003
		3	429	99.3	Uncultured bacterium p-1791-c3	Leser, 2002
		4	361	97.8	Uncultured bacterium Eldhufec143	
		5	367	99.5	Uncultured bacterium KZ29	Eckburg, 2005
	3	1	263	97.3	Uncultured bacterium cadhufec19d09yvb	Mangin, 2004
		2	356	95.2	Uncultured bacterium cadhufec18c07sav	Mangin, 2004
		5	437	94.5	Uncultured bacterium ELAND_90	Nelson, 2003
		6	431	98.1	Uncultured bacterium cadhufec17g06sav	Mangin, 2004
	4	1	435	95.9	Uncultured bacterium p-2226-s959-3	Leser, 2002
		3	431	96.3	Uncultured bacterium Eldhufec215	n. pub
		4	431	95.8	Uncultured bacterium Ad-C1-21	Larue, 2005
		6	434	99.3	Uncultured bacterium Eldhufec128	n. pub
	5	1	435	97.5	Uncultured bacterium Muc3-9	Derrien, 2004
		2	429	93.0	Uncultured bacterium Muc3-1	Derrien, 2004
		3	438	94.7	Uncultured bacterium Muc3-9	Derrien, 2004
		4	274	99.6	*Akkermansia muciniphila*	
	6	1	437	99.5	Uncultured bacterium Eldhufec143	n. pub
		2	337	98.7	Uncultured bacterium Eldhufec128	n. pub
		3	434	99.5	*Akkermansia muciniphila*	
		4	437	98.4	Uncultured bacterium cadhufec010h7	Mangin, 2004
	7	1	421	96.9	Uncultured bacterium ckncm192-F4M.1A12	Zhu, 2002
		3	367	99.5	Uncultured bacterium cadhufec17g06sav	Mangin, 2004
		5	436	94.0	Uncultured bacterium cc129	n. pub
		6	434	99.1	Uncultured bacterium cadhufec17g06sav	Mangin, 2004
	8	1	421	99.3	Uncultured bacterium D171	Eckburg, 2005
		3	436	98.9	Uncultured bacterium Eldhufec143	n. pub
		4	420	96.0	Uncultured bacterium A041	Eckburg, 2005
		5	265	95.1	Uncultured bacterium Eldhufec170	n. pub
	9	1	427	95.6	Uncultured bacterium Eldhufec143	n. pub
		2	375	98.4	Butyrate-producing bacterium SL6/1/1	Louis, 2004
		3	309	99.7	Uncultured bacterium M3_a07_3	Ley, 2005
		4	435	96.1	Uncultured bacterium Eldhufec174	n. pub
	10	1	356	98.9	Uncultured bacterium Eldhufec297	n. pub
		2	434	99.8	*Eubacterium rectale* strain S2Ss2/7	n. pub
		3	439	93.6	Uncultured bacterium Eldhufec102	n. pub
		5	434	99.8	*Eubacterium rectale* strain S2Ss2/7	n. pub
	11	1	360	97.5	Uncultured bacterium Eldhufec296	n. pub
		3	359	99.7	Uncultured clone 115	Lu, 2003
		4	433	95.6	Uncultured bacterium J5-28	n. pub
		5	435	99.8	Uncultured bacterium Muc3-9	Derrien, 2004
	12	1	434	98.8	Uncultured bacterium Eldhufec173	n. pub
		2	434	99.3	Uncultured bacterium Eldhufec164	n. pub
		3	415	99.3	Uncultured bacterium Eldhufec164	n. pub
		4	291	96.6	Uncultured bacterium Eldhufec164	n. pub
	13	1	434	97.0	Uncultured bacterium p-2617-9F5	Leser, 2002

Probe	Peak	Klon	nt	%	Nächste verwandte Sequenz	Referenz
A		2	413	99.0	Uncultured *Streptococcaceae* bacterium Sto1-3	n. pub
		3	433	99.3	*Streptococcus thermophilus*	
		4	435	99.1	Uncultured bacterium Eldhufec173	n. pub
	14	1	433	99.5	*Streptococcus thermophilus*	
		2	408	97.3	Uncultured bacterium p-2053-s959-5	Leser, 2002
		3	352	98.6	Uncultured bacterium p-4177-6Wa5	Leser, 2002
		4	349	98.9	Uncultured bacterium B069	Eckburg, 2005
	15	1	443	94.6	Butyrate-producing bacterium SL6/1/1	Louis, 2004
		2	226	96.5	Uncultured bacterium ckncm192-F4M.1A12	Zengler, 2002
		3	436	99.1	Butyrate-producing bacterium SL6/1/1	Louis, 2004
		4	435	98.2	Butyrate-producing bacterium SL6/1/1	Louis, 2004
	16	1	351	100.0	Uncultured bacterium Eldhufec272	n. pub
		2	435	99.1	Butyrate-producing bacterium SL6/1/1	Louis, 2004
		3	434	99.5	Uncultured bacterium Eldhufec170	n. pub
		4	428	98.8	Uncultured bacterium clone 116	Lu, 2003
	17	direct	393	98.0	*Akkermansia muciniphila*	
B	1	1	435	97.5	Uncultured bacterium Eldhufec104	n. pub
		2	361	98.6	Uncultured bacterium HuCB25	
		3	360	95.0	*Clostridium symbiosum*	
		4	430	99.3	*Clostridium sp.* strain DR6A	n. pub
	2	1	435	99.3	*Clostridium sp.* strain DR6A	n. pub
		2	359	98.9	Uncultured bacterium rRNA347	Hyman, 2005
		3	434	97.5	Uncultured bacterium Eldhufec159	n. pub
		4	430	99.3	*Clostridium sp.* strain DR6A	n. pub
	3	1	435	98.6	*Clostridium sp.* strain DR6A	n. pub
		2	420	96.2	Uncultured bacterium C764	Eckburg, 2005
		3	435	98.6	*Clostridium sp.* strain DR6A	n. pub
		4	359	92.8	Uncultured bacterium abc56g11.x1	Backhed, 2004
	4	1	435	95.2	Uncultured bacterium HuCB25	Hold, 2002
		2	435	99.8	*Ruminococcus hydrogenotrophicus*	
		3	353	96.9	Uncultured bacterium M1_g01_1	Ley, 2005
		4	435	98.2	*Clostridium sp.* strain DR6A	n. pub
	5	1	420	96.9	Uncultured bacterium C764	Eckburg, 2005
		2	362	96.7	Uncultured bacterium Eldhufec104	n. pub
		3	435	97.2	*Shigella boydii* strain K-1	Hyma, 2005
		4	435	97.7	*Shigella boydii* strain K-1	Hyma, 2005
	6	1	420	97.4	Uncultured bacterium NM03	Eckburg, 2005
		2	434	100.0	*Enterobacteriaceae* Spezies	
		3	434	96.3	Uncultured bacterium clone:C-76	Nagashima, 2003
		4	380	93.4	Uncultured bacterium rRNA347	Hyman, 2005
	7	1	436	99.3	*Clostridium sp.* strain DR6A	n. pub
		2	362	99.7	*Clostridium sp.* strain DR6A	n. pub
		3	435	99.3	*Clostridium sp.* strain DR6A	n. pub
		4	435	98.4	*Clostridium sp.* strain DR6A	n. pub
	8	1	434	99.5	Uncultured bacterium clone:G-26	Nagashima, 2003
		2	434	99.8	*Enterobacteriaceae* Spezies	
		3	434	100.0	*Enterobacteriaceae* Spezies	
		4	360	99.2	Uncultured bacterium Eldhufec092	n. pub
	9	direct	374	98.1	*Escherichia coli* rrnE/C gene	
	10	direct	378	100.0	*Enterobacteriaceae* Spezies	
	11	direct	377	100.0	*Enterobacteriaceae* Spezies	
	12	direct	387	99.7	*Enterobacteriaceae* Spezies	
	13	direct	387	100.0	*Enterobacteriaceae* Spezies	
	14	direct	386	99.7	*Enterobacteriaceae* Spezies	

Probe	Peak	Klon	nt	%	Nächste verwandte Sequenz	Referenz
B	15	1	437	96.6	*Clostridium sp.* Lip1	n. pub
		2	435	99.3	Uncultured bacterium Eldhufec104	n. pub
		3	433	99.1	Uncultured bacterium cadhufec17d09sav	Mangin, 2004
		4	360	98.9	Uncultured bacterium Eldhufec092	n. pub
	16	1	360	98.6	Uncultured bacterium Eldhufec092	n. pub
		2	357	91.9	Uncultured bacterium clone 31	Lu, 2003
		3	388	94.1	Uncultured gamma proteobacterium cEV50	Idris, 2004
		4	397	97.7	*Enterobacteriaceae* Spezies	
C	1	direct	382	100.0	Lactobacillus sp. rennanqilfy16	n. pub
	2	direct	388	100.0	Lactobacillus sp. rennanqilfy16	n. pub
D	1	1	435	98.9	*Clostridium sp.* strain DR6A	n. pub
		2	436	99.5	*Clostridium sp.* strain DR6A	n. pub
		3	434	98.6	*Klebsiella pneumoniae*	
		4	362	99.7	*Clostridium sp.* strain DR6A	n. pub
	2	1	363	91.7	*Klebsiella sp. / Citrobacter sp.*	
		2	434	99.5	*Klebsiella pneumoniae*	
		3	435	96.3	*Clostridium sp.* N8 strain N6	n. pub
		4	363	97.8	Uncultured bacterium Eldhufec104	n. pub
	3	1	423	99.1	Uncultured bacterium L7-20	n. pub
		2	436	97.0	*Bifidobacterium saeculare / Bifidobacterium subtile*	
		3	375	99.2	*Klebsiella oxytoca / Citrobacter freundii*	
		4	434	99.5	*Enterobacteriaceae* Spezies	
	4	1	362	98.3	Uncultured bacterium ZEBRA_19	Nelson, 2003
		2	434	99.5	*Enterobacteriaceae* Spezies	
		3	434	100.0	*Enterobacteriaceae* Spezies	
		4	437	97.0	*Clostridium orbiscindens* strain NML 01-A-077	n. pub
	5	2	236	96.2	*Klebsiella pneumoniae / Citrobacter freundii*	
		3	434	100.0	*Enterobacteriaceae* Spezies	
		4	434	99.5	*Enterobacteriaceae* Spezies	
		5	435	98.4	*Bifidobacterium longum* strain BG3	
	6	1	434	98.8	*Enterobacter sp.* 6B_8	n. pub
		2	434	99.3	*Enterobacter gergoviae*	
		3	434	98.8	*Salmonella typhimurium* LT2	
		4	440	97.5	*Fusobacterium varium*	
	7	1	435	96.6	*Clostridium sp.* Lip1	n. pub
		3	275	99.3	*Veillonella parvula strain* ATCC17745	
		4	437	93.6	Uncultured bacterium Eldhufec106	n. pub
		5	359	98.3	Uncultured bacterium clone Col23	Pryde, 1999
	8	1	435	99.5	*Clostridium sp.* strain DR6A	n. pub
		2	430	94.2	*Eggerthella lenta*	
		3	369	99.5	Uncultured bacterium clone 91	Lu, 2003
		4	435	99.1	*K. oxytoca / S. kloosii / C. braakii / E. gergoviae*	
	9	2	434	98.6	*Klebsiella planticola*	
		3	359	99.4	*Salmonella sp.*	
		4	434	99.8	*Klebsiella oxytoca* strain W-6	Abd-El-Haleem, 2002
		5	389	97.9	Uncultured bacterium D1-74	n. pub
	10	direct	*381*	*98.7*	*Klebsiella oxytoca / Citrobacter sp.*	
	11	direct	384	97.1	*Escherichia coli* strain HPC780	n. pub
	12	direct	257	98.1	*Enterobacteriaceae* Spezies	
	13	2	434	100.0	*Enterobacteriaceae* Spezies	
		3	428	100.0	Uncultured bacterium clone 91	Lu, 2003
		4	433	99.8	*Streptococcus sp.*	
		5	437	92.2	*Shigella boydii* strain 3552-77	Hyma, 2005
	14	2	430	90.7	Uncultured bacterium p-2622-9F5	Leser, 2002

Probe	Peak	Klon	nt	%	Nächste verwandte Sequenz	Referenz
D		3	434	100.0	*Enterobacteriaceae* Spezies	
		4	434	98.8	*Enterobacteriaceae* Spezies	
		6	373	93.0	*Clostridium sp.* DSM 6877	
	15	1	435	99.1	*Clostridium sp.*	Kamlage, 1997
		3	434	99.8	*Enterobacteriaceae* Spezies	
		4	433	99.5	*Clostridium orbiscindens* strain NML 01-A-077	n. pub
		7	386	99.5	Uncultured bacterium clone 91	Lu, 2003
	16	3	432	97.2	*Bifidobacterium breve* strain JCM 7019	n. pub
		4	357	92.2	Uncultured bacterium clone 91	Lu, 2003
		5	436	99.3	*Enterobacteriaceae* Spezies	
		6	434	99.8	*Enterobacteriaceae* Spezies	
	17	1	435	99.3	*Clostridium sp.*	Kamlage, 1997
		4	437	98.4	*Clostridium sp.*	Kamlage, 1997
		7	263	95.4	Uncultured bacterium ZEBRA_19	Nelson, 2003
		8	432	99.3	*Bacteroides uniformis* isolate WH207	Gupta, 2003
	18	direct	260	99.2	*Bifidobacterium sp.*	
	19	2	469	90.0	*Bifidobacterium pullorum*	
		3	305	96.1	*Bifidobacterium sp.*	
		4	431	99.5	*Bacteroides uniformis* isolate WH207	Gupta, 2003
		6	431	99.5	*Bacteroides uniformis* isolate WH207	Gupta, 2003
	20	direct	377	97.1	*Bifidobacterium sp.*	

VI Publikationsliste

Publikationen in Fachzeitschriften

Goldenberg O., O. Landt, R. R. Schumann, U. B. Goebel, and L. Hamann. (2005) Use of locked nucleic acid oligonucleotides as hybridization/FRET probes for quantification of 16S rDNA by real-time PCR. Biotechniques 38:29-32

Goldenberg O., S. Herrmann, T. Adam, G. Marjoram, G. Hong, U. B. Goebel, and B. Graf. (2005) Rapid Detection and Identification of 7 *Candida* Species using Denaturing High Performance Liquid Chromatography. Journal of Clinical Microbiology 43(12):5912-5915

Goldenberg O., S. Herrmann, G. Marjoram, M. Noyer-Weidner, G. Hong, S. Bereswill, and U. B. Goebel. (2007) Molecular Monitoring of the Intestinal Flora by Denaturing High Performance Liquid Chromatography. Journal of Microbiological Methods 68: 94-105

Goldenberg O., G. Marjoram, S. Bereswill, M. Heimesaat, A. Fischer, E. Thiel , T. Schneider, G. Maschmeyer, R. Arnold, L. Uharek, U. B. Goebel, and K. Rieger. The diversity of the intestinal bacterial microflora is reduced in patients with intestinal Graft-versus-Host disease. (In Vorbereitung)

Kongressbeiträge

Goldenberg O., A. Fischer, K. Rieger, W. Knauf, U. B. Goebel. 14th European Students Conference (2003). Analysis of the Intestinal Microflora of Bone Marrow Transplant Patients.

Goldenberg O. Beckman Coulter Genetic Analysis Seminar Series (2003). Sequenzierung von bakterieller 16S rDNA.

Rieger K., O. Goldenberg, A. Fischer, T. Fietz, E. Thiel, U. B. Goebel, L. Uharek; Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (2004). Relationship between GvHD, antibiotic treatment and changes in the composition of the gastrointestinal microflora in patients undergoing allogenic stem cell transplantation.

Goldenberg O., A. Fischer, K. Rieger, W. Knauf, and U. B. Göbel. 15th European Students Conference (2004). Changes in the Intestinal Microflora of Hemato-oncological Patients during Transplantation and Therapy.

Rieger K., O. Goldenberg, A. Fischer, H. Troeger, J.D. Schulzke, T. Fietz, A. Muessig, C. Gentilini, D. Sommer, K. Freyberg, E. Thiel, U. B. Goebel, L. Uharek; EBMT-Tagung (2005). Patients with GvHD demonstrate an impaired epithelial barrier function and a significant reduction in the bacterial diversity suggesting a role of the intestinal microflora in the pathogenesis of the disease.

Goldenberg O., B. Graf, S. Herrmann, T. Adam, G. Marjoram, A. Fischer, G. Hong, S. Bereswill, U. B. Goebel. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (2005). Rapid molecular detection of clinically relevant yeasts by PCR-based denaturing high performance liquid chromatography.

Goldenberg O., G. Marjoram, S. Herrmann, A. Fischer, M. Noyer-Weidner, S. Bereswill, and U. B. Göbel. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (2005). Rapid culture-independent monitoring of gastrointestinal flora changes by PCR-based denaturing HPLC.

Heimesaat M. M., A. Fischer , D. Fuchs , O. Goldenberg, H. Jahn, I. Dunay , R. Schumann, A. Moter, D. Gescher, H. Hahn, U. B: Goebel, S. Bereswill, O. Liesenfeld. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease (2005). A shift to Gram-negative bacteria in the intestinal microflora contributes to immunopathology of acute ileitis in the Toxoplasma gondii-driven mouse model of small intestinal inflammation.

Goldenberg O., S. Herrmann, G. Hong, U. B. Goebel; BioPerspectives (2005). Introducing denaturing high performance liquid chromatography as a novel molecular tool in microbial ecology.

Goldenberg O., S. Herrmann, G. Marjoram, A. Fischer, H.-K. Jahn, S. Bereswill, G. Hong, T. Adam, B. Graf, and U. B. Goebel. 9. Symposium “Infektion und Immunabwehr” (2005). Monitoring of bacterial and fungal communities in the human gastrointestinal flora by PCR-based denaturing HPLC.

Fischer A., H.-K. Jahn, M. M. Heimesaat, M. Freudenberg, O. Goldenberg, S. Herrmann, O. Liesenfeld, U. B. Göbel, R. R. Schumann, and S. Bereswill. 9. Symposium “Infektion und Immunabwehr” (2005). The role of innate immunity in gut flora development.

Goldenberg O. Meeresbiologisches Kolloquium am Alfred Wegener-Institut, Biologische Anstalt Helgoland (2005). Molekulare Analyse der Darmfora von Patienten mit hämatologischen Krebserkrankungen.

Goldenberg O., S. Herrmann, T. Adam, G. Marjoram, G. Hong, U. B. Goebel, and B. Graf. TIMM (2005). Rapid detection, identification and monitoring of yeast species by analysis of PCR products with denaturing high performance liquid chromatography.

Goldenberg O., G. Marjoram, S. Bereswill, R. Arnold, G. Maschmeyer, and U. B. Goebel. 2. Gemeinsamer Kongress der DGHM und VAAM (2005). Consequences of Antibiotic Therapy on the Intestinal Microbiota of Haematologic Patients.

Goldenberg O., S. Herrmann, T. Adam, G. Marjoram, G. Hong, U. B. Goebel, and B. Graf; 2. Gemeinsamer Kongress der DGHM und VAAM (2005). Rapid Detection and Identification of Clinically Relevant Yeast Species using Denaturing High Performance Liquid Chromatography.

Goldenberg O., S. Herrmann, G. Hong, S. Bereswill, and U. B. Göbel. 2. Gemeinsamer Kongress der DGHM und VAAM (2005). Application of Denaturing High Performance Liquid Chromatography to Monitor Changes within Intestinal Bacterial Communities.

VII Lebenslauf

Dipl.-Ing. Oliver Goldenberg
geboren am 02. Mai 1977 in Leipzig

Mai 2005 – April 2006	Promotionsstipendium der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Februar 2005	Graduierung als ‚Master of Bioengineering' an der Dongseo Universität in Pusan (Südkorea)
Nov 2002 – April 2004	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mikrobiologie und Hygiene, CCM, Charité – Universitätsmedizin Berlin
September 2002	Studienabschluss als Diplomingenieur
Juli - August 2002	Forschungsaufenthalt an der Dongseo Universität in Pusan (Südkorea) in der Arbeitsgruppe von Prof. Cho Man-gi
April - Oktober 2002	Studentische Hilfskraft am Institut für Mikrobiologie und Hygiene, CCM, Charité – Universitätsmedizin Berlin in der Arbeitsgruppe von Prof Dr. Dr. Ulf B. Göbel
Sep 2001 – März 2002	Diplomarbeit „Genbank-Screening mitochondrialer Spleißfaktoren in *Saccharomyces cerevisiae*"
Jan 2000 - Dez 2001	Studentische Hilfskraft am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Technischen Universität Berlin in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Udo Schmidt
April – Sep 1999	Erasmus–Stipendium für die Durchführung einer Studienarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. John F. Peberdy an der University of Nottingham (UK): „The influence of stress factors on glycosylation and protein folding in *Aspergillus niger*"
September 1996	Immatrikulation an der Technischen Universität Berlin im Fach „Allgemeine Biotechnologie"
Aug 1995 – Aug 1996	Zivildienst im Parkkrankenhaus Leipzig-Dösen
Juni 1995	Friedrich-List-Gymnasium Leipzig, Abitur

VIII Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet worden sind.

IX Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Ulf B. Göbel für die Bereitstellung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung der Dissertation und die anregenden Diskussionen bedanken, welche die vorliegende Arbeit maßgeblich vorangetrieben haben. Bei Herrn Prof. Dr. Roland Lauster bedanke ich mich herzlich für die Begutachtung der Dissertation.

Mein ausdrücklicher Dank gilt weiterhin Gina Marjoram und Gernot Reifenberger für deren exzellente Zusammenarbeit bei der Durchführung der Studie. Des weiteren bedanke ich mich bei den klinischen Projektpartnern Dr. Kathrin Rieger, Prof. Dr. Georg Maschmeyer und Prof. Dr. Renate Arnold. Bei der Firma Transgenomic, insbesondere bei Dr. Mario Noyer-Weidner und Dr. George Hong, bedanke ich mich für die Bereitstellung des WAVE Microbial Analysis System, sowie die fachliche Betreuung.

Stellvertretend für die vielen diskussions- und hilfsbereiten Mitarbeiter des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene möchte ich mich insbesondere bei PD Dr. Stefan Bereswill, PD Dr. Thomas Adam, Dr. Lutz Hamann, Dr. Barbara Graf, Dr. Annette Moter, Dr. Britta Schweickert, André Fischer, Stefanie Herrmann, Beatrice Leip, Annette Petrich. Bei Prof. Dr. Michael Blaut (Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Potsdam) bedanke ich mich für die Bereitstellung der Referenzstämme und bei Olfert Landt (TIB Molbiol, Berlin) für die Zusammenarbeit bei der Etablierung der LNA-FRET-Sonden.

Annika Wulf-Goldenberg, meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die moralische Unterstützung.