

Aus der medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele

**Veränderungen im intestinalen Mikrobiom bei Patienten mit akuter Leukämie im
longitudinalen Verlauf**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Mareike Aichholzer
aus Rosenheim

Würzburg, August 2019



Referent: Prof. Dr. Andreas Geier
Koreferent: Prof. Dr. Oliver Kurzai
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Januar 2020

Die Promovendin ist Ärztin

Inhalt

1. Einleitung.....	1
Akute Leukämie.....	1
Akute myeloische Leukämie	1
Therapie der akuten myeloischen Leukämie	2
Akute lymphatische Leukämie	4
Therapie der akuten lymphatischen Leukämie	5
Infektiöse Komplikationen bei Patienten mit akuter Leukämie	6
Das Mikrobiom.....	7
Funktion des Darmmikrobioms	8
Zusammensetzung des Darmmikrobioms	8
Die Dysbiose des Mikrobioms als Reservoir für multiresistente Erreger	9
Ziel der Arbeit.....	10
2. Material und Methoden	12
Studiendesign.....	12
Studiengruppen	12
Herangehensweisen an die Mikrobiomanalyse	13
Rektalabstriche.....	13
Klinische Datenerhebung	14
Ablauf der Stuhlprobensammlung	15
Laboranalyse der Stuhlproben	16
16s rDNA Sequenzierung durchgeführt von IMGM Laboratories	16
DNA Isolierung.....	16
16S-Amplifikation.....	17
Datenbank Generierung.....	21
Generierung des Clusters.....	22

Sequenzierung	23
Qualitätskontrolle	23
Datenanalyse	26
Operational taxonomic units	27
Diversitätsanalyse.....	27
Quantitative Polymerasekettenreaktion durchgeführt von IMG/M Laboratories	28
Herangehensweise an die Auswertungen der gewonnenen Daten und die statistische Analyse.....	29
3. Ergebnisse.....	32
Demografische Daten der Studiengruppen.....	32
Geschlecht.....	32
Alter, Größe, Gewicht & Body Mass Index	33
Besiedlung mit multiresistenten Keimen.....	35
Antiinfektive Behandlung zum Zeitpunkt der Stuhlprobenabgabe.....	36
Überblick über die Stuhlprobensammlung, die Besiedlung mit multiresistenten Keimen und den Therapieverlaufs der LEU-Patienten	37
Überblick über die antibiotische Therapie der LEU-Patienten	40
Vergleich der bakteriellen Diversität anhand der OTUs zwischen den Probandengruppen	42
Vergleich der bakteriellen Diversität anhand des Shannon Index zwischen den Probandengruppen	44
Entwicklung der bakteriellen Diversität anhand der OTUs im Therapieverlauf ausgewählter LEU-Patienten	45
Vergleich der Bakterienmenge zwischen den Probandengruppen	47
Entwicklung der Bakterienmenge im Therapieverlauf der LEU-Patienten	48
Vergleich des prozentualen Anteils potenziell pathogener Bakterien am Mikrobiom zwischen der LEU-, IOT- und Kontrollgruppe.....	50

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	50
Enterococcaceae.....	51
<i>Escherichia-Shigella spp.</i>	51
Vergleich des prozentualen Anteils potenziell protektiver Bakterien am Mikrobiom zwischen der LEU-, IOT- und Kontrollgruppe.....	52
<i>Prevotella spp.</i>	52
<i>Blautia spp.</i>	53
Lachnospiraceae.....	53
Ruminococcaceae.....	53
Kultivierte Bakterien als Auslöser von klinischen Infektionen und deren Vorhandensein im Mikrobiom vor der Infektion.....	55
Vier repräsentative LEU-Patienten mit erheblichen Veränderungen des Mikrobioms im Therapieverlauf.....	57
Patient 1	57
Patient 2.....	60
Patient 7	63
Patient 8.....	66
4. Diskussion.....	69
Veränderungen der bakteriellen Diversität im Mikrobiom und der Bakterienmenge im Vergleich zwischen den drei Probandengruppen.....	69
Longitudinale Veränderungen der bakteriellen Diversität und der Bakterienmenge im Stuhl der der LEU Patienten	70
Veränderungen der Immunreaktion durch das Mikrobiom	71
Veränderungen des Mikrobioms als erhöhte Infektionsgefahr bei Patienten mit akuter Leukämie	71
Dominanz des Mikrobioms durch einige wenige Bakterien als Risikofaktor für infektiöse Komplikationen	72

Pathogene oder protektive Bakterien als Einflussfaktoren auf das Outcome der Patienten	73
Nachweisbarkeit pathogener Bakterien im Stuhlmikrobiom vor dem Auftreten von systemischen Blutstrominfektionen mit denselben Bakterien.....	77
Methodische Limitationen.....	78
Ausblick.....	81
5. Zusammenfassung	82
6. Tabellenverzeichnis.....	83
7. Abbildungsverzeichnis	84
8. Literaturverzeichnis.....	87
9. Veröffentlichung der Ergebnisse der Arbeit	94

1. Einleitung

Akute Leukämie

Die akute Leukämie ist eine maligne Neoplasie der lymphatischen oder myeloischen Vorläuferzelle. Es kommt zu einer ungehinderten Freisetzung von Blasten (unreife, nicht funktionierende Vorläuferzellen) aus dem Knochenmark in das Blut. Man unterscheidet zwei Arten von akuter Leukämie, die akute lymphatische und die akute myeloische Leukämie. Die massive Produktion von Blasten verhindert die Bildung von Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten. Durch die Panzytopenie kann es zu einer vermehrten Infektanfälligkeit, einer erhöhten Blutungsneigung und Abgeschlagenheit kommen. Die akuten Leukämien werden nach der WHO¹-Klassifikation eingeteilt (Arber et al., 2016).

Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (im Folgenden als „AML“ bezeichnet) ist ein sehr heterogenes Krankheitsbild. Sie tritt mit einer Inzidenz von 3,7 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr auf (Röllig et al., 2017). Die Inzidenz steigt mit dem Alter an (Röllig et al., 2017). Die akute myeloische Leukämie wird anhand der WHO-Klassifikation in weitere Unterformen unterteilt (Arber et al., 2016). Die relevanten Parameter sind mikroskopischer, zytogenetischer und molekulargenetischer Art. Die FAB-Klassifikation (Bennett et al., 1976) könnte für AML-Patienten, welche mit einer alloSZT² behandelt wurden, als prognostischer Marker hilfreich sein (Canaani et al., 2017). Das Risiko, an einer AML zu erkranken, steigt bei einer Exposition gegenüber Benzol und ionisierender Strahlung. Patienten, die bereits hämatoonkologische Vorerkrankungen haben, wie das Myelodysplastische Syndrom, sind einem deutlich höherem Risiko einer AML Erkrankung ausgesetzt (Döhner et al., 2015). Eine intensive chemotherapeutische Behandlung erhöht ebenfalls das Risiko an einer AML zu erkranken. Zusätzlich zu den oben genannten Symptomen, bedingt durch die Verdrängung der physiologischen Produktion von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten, können die Patienten an leukämischen Infiltrationen, wie Hautinfiltraten, Hepato- und Splenomegalie leiden. Häufig werden unspezifische Grippesymptome

¹ World Health Organization

² Allogene Stammzelltransplantation

beobachtet. Nach ausführlicher Anamnese und körperlicher Untersuchung werden Laborparameter bestimmt, insbesondere Blutbild und Differentialblutbild. Die Knochenmarkspunktion stellt einen weiteren wichtigen Eckpfeiler in der Diagnosestellung der AML dar. Unter dem Mikroskop wird der prozentuale Anteil an Blasten festgestellt. Ein Anteil von >20% Blasten im Knochenmarkspunktat spricht für eine akute Leukämie. Mit dem Material aus der Knochenmarksbiopsie findet außerdem eine Immunophänotypisierung statt, in welcher verschiedene Oberflächenmarker bestimmt werden. Die zytogenetische und molekulargenetische Untersuchung erfassen genetische Alterationen (Döhner et al., 2016). Außerdem müssen die Marker für die minimale Resterkrankung bestimmt werden, mit deren Hilfe kann das Ansprechen auf die Therapie evaluiert werden.

Therapie der akuten myeloischen Leukämie

Bevor in den fünfziger Jahren adäquate Therapien etabliert waren, führte die AML innerhalb von 5 Monaten bei 50% der untersuchten Patienten zum Tod (Southam et al., 1951). Erst nachdem die Therapie aus einer Kombination von Cytosinarabinosid und Daunorubicin eingeführt wurde, wurden Remissionsraten von 60% erreicht (Crowther et al., 1970). Über die Jahre entwickelten sich die Therapieregime weiter und so werden heutzutage, abhängig vom Subtyp der AML, bei jüngeren Patienten mit Daunorubicin und Cytarabin Remissionsraten von 84% erreicht (Burnett et al., 2013). Insbesondere der personalisierte Therapieansatz gewinnt zunehmend an Bedeutung (Sallman and Lancet, 2016). Die Therapie wird in die Abschnitte der Induktions- und Konsolidierungstherapie unterteilt. Vor Therapiebeginn einer neu diagnostizierten AML, wird geprüft, ob der Patient für eine Hochdosisinduktionstherapie geeignet ist. Hierzu werden Komorbiditäten, Fitness des Patienten, Leber-/Nierenfunktion und das Alter evaluiert. Insbesondere bei älteren Patienten ist die Mortalität durch die Therapie selbst relativ hoch. Bei Patientin ≥ 65 Jahren beträgt die Mortalität während der Induktionstherapie 29% (Kantarjian et al., 2006). Alter sollte jedoch nicht als einziger Faktor für diese Entscheidung herangezogen werden. Es wird empfohlen auf geriatrische Testungen zurückzugreifen (Klepin et al., 2013). Wenn der Patient für eine intensive Chemotherapie geeignet ist, wird mit der Hochdosischemotherapie begonnen. Diese besteht aus, in der Regel, drei Therapietagen Anthracyclinen und sieben Therapietagen Cytarabin (Döhner et al., 2016).

Nachdem eine Remission³ erreicht wurde, wird mit der Konsolidierungstherapie fortgefahren. Dabei gibt es die Möglichkeit der konventionellen Konsolidierungstherapie und der Konsolidierungstherapie mit autologer Stammzelltransplantation (Döhner et al., 2016). Die autologe Stammzelltransplantation wird in Deutschland bei AML-Patienten jedoch kaum noch durchgeführt. Bei der konventionellen Konsolidierungstherapie wird in der Regel mit einer Hochdosis Cytarabin oder einer Kombinations-Chemotherapie therapiert. Dabei ist man sich über die Dosis des Cytarabin noch uneins, diskutiert wird, ob eine hochdosierte Cytarabingabe von 3000mg/m² nötig ist (Burnett et al., 2013). Bei Patienten zwischen 65 und 70 Jahren scheint eine Hochdosischemotherapie im Anschluss an die Hochdosisinduktionstherapie keinen Vorteil zu haben (Itzykson et al., 2011). Es ist noch unklar, wie viele Zyklen an Konsolidierungstherapie gegeben werden sollen. Usus sind momentan zwei bis vier Zyklen. Findet eine autologe Stammzelltransplantation statt, wird davor nur ein Zyklus Hochdosischemotherapie durchgeführt. Vellenga et al. (2011) zeigten, dass die autologe Stammzelltransplantation bei Patienten in kompletter Remission nach zwei Zyklen Induktionstherapie einen Vorteil bezüglich der Rezidivrate hat. Es besteht jedoch bezüglich der Überlebensrate kein Vorteil im Vergleich zur konventionellen Konsolidierungstherapie. Als weitere Therapieoption kann die allogene Stammzelltransplantation angesehen werden. Die Indikation dafür ist streng zu stellen, Nutzen und Risiko für den einzelnen Patienten müssen sorgfältig abgewogen werden (Cornelissen et al., 2012). Die allogene Stammzelltransplantation wird empfohlen für Patienten mit einem Rezidivrisiko von über 35-40%, wenn die allogene Stammzelltransplantation nicht durchgeführt wird. Für Patienten mit genetischen Risikokonstellationen empfiehlt man, die Transplantation durchzuführen sobald die komplette Remission erreicht wird (Döhner et al., 2016). Spricht der Patient nicht auf die Induktionstherapie an oder bei einem Rezidiv, gibt es die Möglichkeit einer Salvage-Therapie. Allerdings muss bei diesen Patienten sorgfältig das Nutzen-Risiko-Verhältnis dieser Therapie abgewogen werden. Es besteht keine klare Empfehlung für eine bestimmte Salvage-Therapie (Ramos et al., 2015). Invasive mykotische Infektionen stellen eine große Komplikation bei der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie dar. Aus diesem Grund sollte sowohl während der

³ Sowohl klinisch, als auch radiologisch sind keine Nachweise der Erkrankung über einen bestimmten Zeitraum möglich (HEROLD, G. 2016. *Innere Medizin*, Herold, Gerd.)

Induktionstherapie als auch bei einer Graft versus Host Disease nach einer allogenen Stammzelltransplantation eine prophylaktische Behandlung mit Posaconazol durchgeführt werden (Döhner et al., 2016). Die 5-Jahres-Überlebensrate der AML liegt in Deutschland bei 22.8%, mit steigendem Lebensalter sinkt die Überlebensrate, wobei sie erst ab einem Alter von über 75 Jahren deutlich niedriger wird mit 5.3% (Pulte et al., 2016). Die 1-Jahres-Überlebensraten der AML-Patienten sind seit 1973 in Schweden kontinuierlich jedes Jahr in allen Altersklassen angestiegen. Bei den 5- und 10-Jahres-Überlebensraten zeigte sich auch eine Verbesserung in den meisten Altersgruppen mit Ausnahme der Altersgruppe ≥ 80 Jahre. Der Grund dafür sind vielleicht optimierte Therapiekonzepte und das Anwenden der allogenen Stammzelltransplantation. Bei Patienten, die vor der AML an einem multiplen dysplastischen Syndrom erkrankt waren, zeigte sich kein Aufwärtstrend in den Überlebensraten (Derolf et al., 2009).

Akute lymphatische Leukämie

Die akute lymphatische Leukämie (im Folgenden als ALL bezeichnet) ist ebenfalls ein sehr heterogenes, seltenes Krankheitsbild. Die Gesamtinzidenz beträgt 1.4 pro 100 000 Einwohner pro Jahr (Wartenberg et al., 2008). Es gibt zwei Häufigkeitsgipfel, der erste in den Lebensjahren 2-5, der zweite ab dem Lebensalter 60 (Wartenberg et al., 2008). Es existiert momentan keine eindeutige Therapieempfehlung außerhalb von Studien. Patienten sollten daher klinischen Studien zugeführt werden oder anhand der Gökbuget-Therapieempfehlungen therapiert werden. Die ALL wird durch die WHO klassifiziert. Die WHO ordnet die ALL als Precursor Lymphoid Neoplasm, welches vom B-Zell- oder T-Zell-Typ sein kann, ein. Die auslösenden Faktoren einer akuten lymphatischen Leukämie können meist nicht identifiziert werden. Die genauen Pathomechanismen sind noch nicht bekannt. Intrinsische Ursachen können genetische Alterationen (Trisomie 21, Defekte in DNA-Reparaturmechanismen) sein. Durch eine externe Schädigung des Knochenmarks, wie zum Beispiel radioaktive Strahlung oder myelotoxische Chemotherapeutika, kann es ebenfalls zu einer ALL kommen (Gökbuget et al., 2012). Die Patienten leiden oft an unspezifischen Grippe-symptomen. Durch die Trizytopenie kommt es zu oben bereits genannten Symptomen. Die Krankheitssymptomatik aggraviert meist innerhalb weniger Tage. Zur Diagnosestellung sind folgende Untersuchungen üblich: Blutbild, mikroskopische Untersuchung des Blutausstriches, Knochenmarksuntersuchung und Liquordiagnostik (zum Ausschluss einer Meningeosis

leucaemica). Mit dem Material aus der Knochenmarkspunktion wird spezielle Diagnostik, wie die Immunphänotypisierung, molekulargenetische und zytogenetische Untersuchung, durchgeführt. Zum Staging sind außerdem eine Bildgebung (Röntgenthorax, abdominelle Sonografie), ein EKG, eine Echokardiografie und infektiologische Untersuchungen (zum Ausschluss Hepatitis B/C, HIV) erforderlich. Es gibt verschiedene Faktoren, die den Therapieverlauf beeinflussen. Patienten über 55 Jahre scheinen eine ungünstigere Prognose zu haben im Vergleich zu Patienten unter 25 Jahren, außerdem ist eine hohe Leukozytenzahl zu Beginn der Therapie als negativer Prognosefaktor bekannt (Bassan and Hoelzer, 2011). Der Immunphänotyp, die Zytogenetik und Molekulargenetik haben ebenso einen Einfluss auf die Prognose des Patienten (Bassan and Hoelzer, 2011). Eine hohe Leukozytenzahl von über 30.000 Leukozyten/ μ l bei einer B-Vorläufer-ALL stellen genauso wie der Subtyp einer pro B-, early T- und einer reifen T-ALL ungünstige Prognosefaktoren dar. Zudem können zytogenetische und molekulare Aberrationen und das Vorhandensein einer minimalen Resterkrankung, wie ein hohes minimales Resterkrankungsniveau nach der Frühkonsolidation bzw. der Anstieg der minimalen Resterkrankung unter der Therapie, auf eine ungünstige Prognose hinweisen (Gökbuget et al., 2012). Laut den GMALL-Therapieempfehlungen werden Patienten in eine Hochrisikogruppe und eine Standardgruppe eingeteilt. Diese Einteilung ist wichtig für die spätere Therapieentscheidung.

Therapie der akuten lymphatischen Leukämie

Die Therapie unterteilt sich in folgende Abschnitte: Induktions-, Konsolidierungs-, Erhaltungstherapie und die ZNS-Rezidivprophylaxe. Die komplexe Therapie findet unter Verwendung von verschiedenen Kombinationen der Substanzen Dexamethason, Cyclophosphamid, Vincristin, Anthrazyklinen, Mercaptopurin, Cytarabin, Methotrexat, Asparaginase statt. Bei älteren Patienten und Patienten mit bcr-abl positiver ALL, muss die Therapie angepasst werden. Die allogene Stammzelltransplantation ist eine Therapieoption nach Erreichen der Remission. Die Risiken einer Transplantation (Mortalität bis zu 30% (Bassan and Hoelzer, 2011)) müssen gegen den Nutzen abgewogen werden. Die GMALL-Studiengruppe empfiehlt bei Hochrisikopatienten in Erstremission eine allogene Stammzelltransplantation durchzuführen. Bei Patienten in der Standardrisikogruppe wird die Entscheidung anhand des Vorhandenseins eines

molekularen Rezidivs (minimale Resterkrankung $\geq 10^{-4}$) gefällt. Bei Patienten in Zweitremission wird empfohlen, möglichst schnell eine Transplantation durchzuführen. Vor einer Transplantation sollten sich die Patienten, wenn möglich, in einer Remission befinden. Da die Gefahr eines ZNS-Befalls bei der ALL hoch ist, müssen die Patienten prophylaktisch behandelt werden. Die besten Ergebnisse erzielt eine Kombination aus intrathekaler Methotrexatgabe, einer Hochdosisgabe Methotrexat und Cytarabin sowie einer Radiatio des Schädels (24 Gy) (Gökbuget et al., 2012). Obwohl die Induktionstherapie der ALL sehr gute Ergebnisse bezüglich des Erreichens einer kompletten Remission erzielt (91% (Rowe et al., 2005)), liegen die 5-Jahres-Überlebensraten der ALL aller Altersstufen zusammen bei 62.9% (Wartenberg et al., 2008).

Infektiöse Komplikationen bei Patienten mit akuter Leukämie

Patienten mit akuter Leukämie sind besonders infektionsgefährdet. Die Patienten sind häufig aufgrund der Verdrängung der physiologischen Leukopoese und der intensiven Chemotherapie immunsupprimiert. Infektionen stellen somit einen großen Anteil der therapieassoziierten Mortalität und Morbidität dar. Besonders im Rahmen der allogenen Stammzelltransplantation steigt das Risiko für infektiöse Komplikationen. Risikofaktoren für das Entstehen von Infektionen bei stammzelltransplantierten Patienten sind vor allem die Dauer und Schwere einer Neutropenie, das Ausmaß der Schädigung der gastrointestinalen Schleimhaut durch die Hochdosischemotherapie, lokale mykotische und virale Infektionen und Reaktivierungen von Infektionen in der Phase der Immunsuppression (Einsele et al., 2003). In der unmittelbaren Zeit nach der Transplantation sind 90% der identifizierten Pathogene Bakterien. Gram-positive Bakterien (z.B. koagulase-negative *Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium spp.* und alpha-hämolyisierende *Streptococcus spp.*) sind häufiger Auslöser der Infektionen, allerdings gehen Infektionen mit gram-negativen Bakterien mit einer höheren Mortalität und Morbidität einher (Einsele et al., 2003). Infektionen mit gram-positiven Bakterien gelangen meist über die Infektion des zentralen Venenkatheters in den Blutkreislauf oder treten bei Patienten mit schwerer Mukositis auf. Es wird vermutet, dass gram-negative Bakterien durch die beschädigte Mukosa des Gastrointestinaltrakts in die Blutbahn eintreten (Einsele et al., 2003).

Beispiele für infektiöse Komplikationen sind Infekte des Respirationstrakts, Mukositis, Diarrhoe, neutropenes Fieber und eine Infektion des Blutkreislaufes. Neutropenes Fieber ist definiert als eine oral gemessene Temperatur über 38.5°C oder eine zweimalig im Abstand gemessene Temperatur von über 38.0°C. Dabei muss die absolute Neutrophilenanzahl unter 0.5×10^9 /Liter betragen (de Naurois et al., 2010). So müssen die meisten Patienten im Laufe ihrer Behandlung mit antiinfektiven Medikamenten (Antibiotika, Virustatika, Antimykotika) behandelt werden, um schwere Komplikationen zu verhindern. Insbesondere bei Patienten mit AML ist eine Prophylaxe mit Antimykotika, wie Posaconazol, etabliert (Cornely et al., 2007). In den frühen neunziger Jahren waren gram-negative Bakterien die Hauptauslöser von Bakteriämien im Rahmen von neutropenem Fieber. Diese wurden vor allem mit einem Cephalosporin der ersten Generation plus einem Aminoglykosid behandelt. Die antibiotische Therapie fokussierte sich über die Jahre weiterhin auf gram-negative Bakterien, vor allem auf Pseudomonaden und Enterobacteriaceae. Während der letzten Jahre stieg die Anzahl von multiresistenten gram-negativen Bakterien und auch der Anteil von gram-negativen Auslösern von Bakteriämie bei neutropenem Fieber an (Blennow and Ljungman, 2016). Zu den multiresistenten Bakterien zählen unter anderen die multiresistenten gram-negativen Bakterien (3 MRGN⁴, 4 MRGN⁵, ESBL⁶ produzierende Bakterien), die Methicillin resistenten Staphylokokken (MRSA) und die Vancomycin-resistenten Enterokokken. Die multiresistenten gram-negativen Bakterien sind ein Risikofaktor für eine höhere Mortalität bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien (Marín et al., 2015). Gudiol et al. (2011) zeigten, dass Patienten mit multiresistenten gram-negativen Keimen initial oft eine falsche empirische antibiotische Therapie bekommen haben.

Das Mikrobiom

Das Mikrobiom setzt sich aus allen Mikroorganismen zusammen, die in und auf dem Menschen leben. Im menschlichen Darm befinden sich bis zu 10^{14} Bakterien. Die meisten Bakterien gehören zu den vier Phyla der Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria und Bacteroidetes (Costello et al., 2009). Die Diversität des Mikrobioms kann unter anderem

⁴ Resistent gegenüber 3 der 4 Leitsubstanzen (Acylureidopenicilline, Cephalosporine der Generation 3 und 4, Fluorchinolone, Carbapeneme)

⁵ Resistent gegenüber allen 4 Leitsubstanzen

⁶ Extendend spectrum betalactamase

mittels der alpha- und der beta-Diversität beschrieben werden. Die alpha-Diversität beschreibt die Anzahl verschiedener Spezies innerhalb einer einzigen Probe, während die beta-Diversität die Anzahl verschiedener Spezies zwischen mehreren Proben vergleicht (Whittaker, 1972).

Funktion des Darmmikrobioms

Die Mikroorganismen leben in einer Symbiose mit den menschlichen Zellen. So beeinflussen die Mikroorganismen zum Beispiel das lokale Immunsystem des Darms. Die Bakterien werden von Peyer Plaques und dendritischen Zellen aufgenommen. Anschließend wird die Produktion von IgA, ein protektives Immunglobulin der Darmmukosa, gesteigert. Somit adaptiert sich das lokale Immunsystem der Mukosa an die Bakterien des Mikrobioms im Darm. Das selektiv produzierte IgA schützt die Mukosa vor dem Eindringen der kommensalen Bakterien (Macpherson and Uhr, 2004). Da die dendritischen Zellen nicht mobil sind und die Bakterien somit nicht in den restlichen Körper gelangen, wird nur das lokale Immunsystem und nicht das systemische Immunsystem aktiviert. So wird eine überschießende systemische Immunantwort verhindert (Macpherson et al., 2005). Van der Waaij et al. (1971) etablierte den Begriff der „colonization resistance“. Dieser bedeutet, dass die Darmmukosa gegen die Kolonisation bestimmter Bakterien immun ist. 1971 postulierte seine Arbeitsgruppe, dass kommensale Bakterien direkt pathogene Bakterien antagonisieren. Im Laufe der Jahre wurde nachgewiesen, dass kommensale Bakterien das lokale Immunsystem des Darms aktivieren und somit auch indirekt ein Eindringen pathogener Bakterien in den systemischen Kreislauf verhindern. Die genauen Bakterien, welche die „colonization resistance“ auslösen, sind nicht bekannt (Buffie and Pamer, 2013).

Zusammensetzung des Darmmikrobioms

Die Zusammensetzung des Mikrobioms variiert deutlich zwischen Individuen, außerdem kann sich das Darmmikrobiom eines Menschen innerhalb weniger Tage verändern. So konnten David et al. (2014) zeigen, dass sich die beta-Diversität innerhalb eines Tages nach dem Essen von fleischhaltiger Kost signifikant verändert. Diese schnelle Veränderbarkeit des Mikrobioms macht es besonders schwierig, die Einflussfaktoren auf das Mikrobiom zu identifizieren. Die Unterschiede in der Zusammensetzung des Mikrobioms zwischen Individuen sind größer als in einem Individuum im longitudinalen Verlauf (Eckburg et al., 2005). So verändert sich das Mikrobiom zwar stetig während es

Lebens (Dominguez-Bello et al., 2011), das einzelne Individuum hat aber anscheinend sein eigenes distinktes Mikrobiom. Ding and Schloss (2014) stellten fest, dass man die verschiedenen Mikrobiome der Menschen trotz der großen intra- und interindividuellen Veränderungen in unterschiedliche Gruppen einteilen kann. Die Zusammensetzung der Gruppen ist das Ergebnis des lebenslangen Zusammenspiels mehrerer Einflussfaktoren. Das Mikrobiom wird durch sehr viele verschiedene Faktoren beeinflusst, wie zum Beispiel die Ernährung, das Geschlecht und das Bildungsniveau, um nur einige Wenige zu nennen. Aber auch Medikamente, wie die häufig verabreichten Protonenpumpeninhibitoren, beeinflussen das Mikrobiom (Imhann et al., 2016). Das Mikrobiom wird nicht nur von extern beeinflusst, sondern hat selbst einen großen Einfluss auf den menschlichen Körper. Es wird im Zusammenhang mit mehreren Krankheiten, wie zum Beispiel Adipositas, Diabetes mellitus, Depression und nicht-alkoholische Fettlebererkrankung untersucht. Im Rahmen von Krankheiten wird das Gleichgewicht des Mikrobioms gestört und es entsteht eine Dysbiose. Da die Zusammensetzung des Mikrobioms große interindividuelle Unterschiede aufweist, ist es schwer ein „normales“ oder „physiologisches“ Mikrobiom zu definieren. Turnbaugh et al. (2009) postulieren, dass es ein „Kern-Mikrobiom“ auf dem Level der Gene gibt. Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 tritt beispielsweise eine Dysbiose des Mikrobioms auf. Im Vergleich zu gesunden Patienten war der Anteil an Firmicutes bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 deutlich reduziert (Larsen et al., 2010). So ist es interessant, den Einfluss des Body-Mass-Index auf das Mikrobiom zu untersuchen.

Die Dysbiose des Mikrobioms als Reservoir für multiresistente Erreger

Das Mikrobiom könnte auch im Zusammenhang mit der Besiedlung von multiresistenten Keimen eine große Rolle spielen. Da die Anzahl der Infektionen mit multiresistenten Keimen in den letzten Jahren rapide ansteigt, werden sie im klinischen Alltag immer mehr zum Problem. Infektionen mit multiresistenten Keimen beginnen meist auf der intestinalen Schleimhaut und werden durch ein intaktes Mikrobiom verhindert (Vollaard and Clasener, 1994). Hämatologische Patienten haben ein sehr hohes Risiko für Infektionen und die Kolonisation mit multiresistenten Keimen. Bei Patienten mit allogener Stammzelltransplantation, die im Verlauf eine Infektion mit VRE bekamen, wurde bereits vor der Bakteriämie im Mikrobiom der Patienten eine Dominanz von VRE gefunden (Ubeda et al., 2010). Taur et al. (2012) untersuchten das Mikrobiom von 94

Patienten vor und nach einer allogenen Stammzelltransplantation. Die Diversität des Mikrobioms nahm ab und es dominierten einzelne Bakterien, wie zum Beispiel aus den Genera *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.* und *Proteobacterium spp.*, das Mikrobiom. Diese Bakterien waren wiederum mit Bakteriämien assoziiert. Galloway-Pena et al. (2016) untersuchten die Rolle des Mikrobioms bei infektiösen Komplikationen von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie während der Induktionsphase. Sie konnten zeigen, dass eine geringe alpha-Diversität des Stuhlmikrobioms zu Beginn der Therapie mit der Entstehung von Infektionen zusammenhängt. Diese Arbeitsgruppe untersuchte allerdings nur Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie und auch nur während der Induktionsphase der Chemotherapie. Zudem ließ die Methodik, welche ausschließlich aus der 16s rDNA Sequenzierung bestand, keine Aussagen zu einer möglichen Resistenzentwicklung zu.

Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Studie haben wir Stuhlproben von Patienten mit der Erstdiagnose einer akuten Leukämie (ALL und AML) im longitudinalen Verlauf analysiert, um eine umfassende Aussage über die Veränderungen im Stuhlmikrobiom machen zu können. Da die meisten Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung „Antibiotika-naiv“ sind, konnten wir den Einfluss antiinfektiver Therapie auf das Mikrobiom genauer untersuchen. Neben der 16s rDNA Sequenzierung wurden auch Kultivierungsmethoden genutzt, um mögliche Antibiotikaresistenzen zu bestimmen.

Folgende Hypothesen wurden bearbeitet: Patienten mit akuter Leukämie haben eine veränderte Immunität. Sie sind damit besonders infektionsgefährdet und weisen schon bei der Erstdiagnose Veränderungen im Mikrobiom auf. Des Weiteren verändert sich das Mikrobiom im Therapieverlauf erheblich. Eine Chemotherapie-assoziierte Mukositis, eine antiinfektive Prophylaxe und vor allem die oft notwendige Therapie mit Antibiotika beeinflussen das Mikrobiom. Das Mikrobiom wird von einigen wenigen Bakterien dominiert. Diese Veränderungen stehen in Zusammenhang mit infektiösen Komplikationen und mögen diese sogar begünstigen. Im Vergleich zu Gesunden sind deutlich weniger potenziell protektive Bakterien und vermehrt potenziell pathogene Bakterien im Mikrobiom nachweisbar. Pathogene Bakterien, die während einer

systemischen Infektion in einer Blutkultur identifiziert werden, sind vor dem Auftreten im Blutkreislauf im Stuhlmikrobiom des Patienten nachweisbar.

2. Material und Methoden

Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine prospektive Kohortenstudie. Das Studienprotokoll wurde von der zuständigen Ethikkommission unter dem Aktenzeichen 314/12 bewilligt. Der Studienzeitraum begann mit dem Einschluss des ersten Probanden am 16.01.2014 und endete am 09.11.2015. Als abhängige Variable wurde das Stuhlmikrobiom der Teilnehmer festgelegt, welches bei einer Studiengruppe im longitudinalen Verlauf, bei den zwei anderen Studiengruppen im Querschnitt erhoben wurde. Als unabhängige Variable gelten die Grunderkrankung der Probanden (akute Leukämie, solider Tumor in Kombination mit der Besiedlung eines multiresistenten Keims), die damit verbundene antiinfektive Therapie und eine eventuelle Besiedelung des Darms mit multiresistenten Keimen.

Studiengruppen

Die Stichprobenanzahl betrug $N = 66$, wobei sich die Probanden auf drei Gruppen verteilten. Die erste Gruppe ($N = 14$) mit Patienten, die an akuter Leukämie erkrankt waren, wird im Folgenden als „LEU“ bezeichnet. In diese Gruppe wurden Personen eingeschlossen, die auf Grund einer primären akuten Leukämie in der Universitätsklinik Würzburg aufgenommen und behandelt wurden. Als primäre akute Leukämien galten die akute lymphatische und die akute myeloische Leukämie. Ausschlusskriterium war eine stattgefundene Antibiotikatherapie sechs Monate vor Einschluss in die Studie. In der zweiten Gruppe befinden sich Patienten mit malignen Erkrankungen, die in der interdisziplinären onkologischen Tagesklinik der Universitätsklinik Würzburg betreut und nachgesorgt wurden, im Folgenden als IOT-Probanden bezeichnet. Als Einschlusskriterium galt eine Besiedlung mit einem multiresistenten Keim. Zu den nachweisbaren multiresistenten Keimen zählten die Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) und die dreifach oder vierfach multiresistenten gramnegativen Bakterien (3/4 MRGN). Die Keime wurden im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg durch einen Rektalabstrich festgestellt. Die dritte Gruppe ($N = 26$) war die Kontrollgruppe. In diese Gruppe wurden gesunde Probanden eingeschlossen.

Eine Antibiotikatherapie innerhalb der letzten sechs Monate vor Abgabe der Proben galt als Ausschlusskriterium.

Die Teilnahme aller Probanden erfolgte freiwillig und ohne Vergütung. Vor Einschluss wurden die Probanden ausführlich durch einen Arzt über die Studie aufgeklärt. Die Patienten wurden darüber aufgeklärt, dass das Mikrobiom der abgegebenen Stuhlproben bestimmt werden sowie klinische Daten gemäß der gängigen Datenschutzbestimmungen erhoben und gespeichert werden. Die Probanden willigten schriftlich in die Teilnahme der Studie ein. Die Probanden konnten die Zustimmung ohne Angaben von Gründen jederzeit widerrufen ohne dass ihnen Nachteile entstanden wären.

Herangehensweisen an die Mikrobiomanalyse

Um einen möglichst umfassenden Eindruck von den Einflussfaktoren auf das Mikrobiom zu bekommen sowie das Mikrobiom von verschiedenen Seiten zu beleuchten zu können, erfolgte eine Herangehensweise auf vier verschiedenen Ebenen. Neben einer klinischen Datenerhebung, erfolgten Rektalabstriche der LEU-Gruppe und der IOT Gruppe sowie die Sammlung von Stuhlproben. Aus den Stuhlproben erfolgte eine Bestimmung der enthaltenen Bakterien mittels 16s rDNA Sequenzierung. Die Menge der Bakterien wurde mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion bestimmt. Die Details der oben genannten Erhebungen werden im Nachfolgenden genauer erläutert.

Rektalabstriche

Bei den IOT- und LEU-Probanden wurden im Laufe der Behandlung Abstriche im Rahmen der Routinediagnostik der Medizinischen Klinik II entsprechend den Hygiene-Richtlinien des Universitätsklinikums Würzburg (Patienten mit Verdacht auf eine Infektion oder Besiedelung mit MRGN-Keimen, Patienten mit Kontakt zu ausländischen Gesundheitseinrichtungen, Patienten im Hochrisikobereich im Rahmen des Aufnahme- und Entlassscreenings) entnommen. Dazu wurde der Rektalbereich der Probanden mehrmals mit dem Watteende des Tupfers abgestrichen. Es wurden Abstrichtupfer mit einem Amies-Transportmedium, welches sich in einem beiliegenden Röhrchen befand, benutzt. Die Tupfer hatten einen Kopf aus Rayon sowie einen Kunststoffschaft. Die Abstriche wurden anschließend in das Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg transportiert und dort bearbeitet. Dauerte die Zeit bis zur Abholung

der Proben durch den Transportdienst weniger als zwei Stunden wurden die Proben bei Raumluft gelagert. Wenn die Zeit bis zur Abholung länger als zwei Stunden betrug, wurden die Proben für maximal 24 Stunden bei 4°C gelagert. Von den entsprechenden Mitarbeitern des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie wurde zunächst, um Cephalosporin-resistente gramnegative Stäbchen nachzuweisen, eine Kultur auf einem Selektivagar angelegt. Danach wurde der Phänotyp, durch eine Keimdifferenzierung und die Anfertigung spezifischer AntibioGramme anhand der Messung der minimalen Hemmkonzentration, bestätigt. Der Phänotyp konnte zusätzlich durch ein Etest-Verfahren geprüft werden. Der Resistenzgenotyp konnte ggf. durch eine PCR aus Kulturen bestimmt (Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg, 2018).

Die Probanden der Kontrollgruppe wiesen keine Risikofaktoren für eine Besiedelung mit multiresistenten Keimen auf. Sie wurden bzgl. einer Besiedelung mit multiresistenten Keimen befragt. Abstriche wurden von der Kontrollgruppe aufgrund der fehlenden Risikofaktoren für eine Besiedelung mit multiresistenten Keimen sowie dem dafür fehlenden Ethikvotum nicht entnommen.

Klinische Datenerhebung

Bei Erstaufnahme der Patienten aus der LEU-Gruppe wurden klinische Daten erhoben, wie Größe, Gewicht und Geburtsdatum. Es erfolgte eine ausführliche Anamnese bezüglich der Vorerkrankungen der Probanden. Während des Klinikaufenthalts wurden die genaue medikamentöse Behandlung der Grunderkrankung sowie die Behandlung eventueller Komplikationen mittels Antiinfektiva (Antibiotika, Antimykotika, Virustatika) dokumentiert. Die Komplikationen einer chemotherapeutischen Therapie wurden ebenfalls in ihrem Verlauf dokumentiert. Als Komplikationen gelten eine Mukositis, Fieber (Körpertemperatur über 38,3°C), Lungeninfiltrate (im Röntgenbild des Thorax), Diarrhoe, Hypotonie (arterieller Mitteldruck unter 100 mmHg), Tachykardie (Herzfrequenz über 100 Schläge/Minute) oder ein Anstieg des C-reaktiven Proteins über 0.5 mg/dl. In zweiwöchentlichen, alternierenden Abständen sowie bei Aufnahme und Entlassung des Patienten, erfolgte ein mikrobiologisches Routine-Screening. Jede zweite Woche erfolgten ein Abstrich des Anus und eine mikrobiologische mikroskopische Untersuchung des Abstriches auf multiresistente Keime. Jede andere zweite Woche

wurde das Serum des Vollbluts auf Aspergillen-Antigen mittels Enzyme-linked immunosorbent Assay untersucht.

Bei den IOT-Probanden wurden ebenfalls die Größe, das Gewicht, der Body Mass Index, sowie das Alter bestimmt. Es wurden alle mikrobiologischen Untersuchungen, die Ergebnisse der Routineuntersuchung des Rektalabstriches sowie das Datum der Erstdiagnose des multiresistenten Keimes notiert. Außerdem wurde erhoben, wann zuletzt welche antibiotische Therapie erfolgt war.

Von Probanden aus der Kontrollgruppe wurde ebenfalls Gewicht, Größe, Alter und BMI notiert. Zudem wurde abgefragt, ob eine dauerhafte Medikation bestand, ob Risikofaktoren für die Besiedelung mit multiresistenten Keimen bestanden, ob eine Besiedelung mit multiresistenten Keimen bekannt war und ob innerhalb der letzten sechs Monate vor der Stuhlprobenabgabe eine antibiotische Therapie stattgefunden hat.

Ablauf der Stuhlprobensammlung

Ziel dieser Studie ist, das Stuhlmikrobiom der Probanden, welche an akuter Leukämie erkrankt sind, über einen longitudinalen Verlauf zu beobachten. Dafür wurden zu festgesetzten Zeitpunkten Stuhlproben der Probanden gesammelt. Alle Patienten der Gruppe LEU gaben vor Beginn der Chemotherapie eine Stuhlprobe ab. So konnte der „native“ Stuhl vor jeglicher Intervention untersucht werden. Patientin mit einer AML gaben an Tag 14 und Tag 28 der Induktionstherapie eine Stuhlprobe ab. Patienten mit einer ALL gaben einmal pro Monat eine Stuhlprobe ab. Des Weiteren wurden immer bei Auftreten von oben genannten Komplikationen Stuhlproben gesammelt. Am Tag der Stuhlprobenabgabe wurde die genaue antiinfektive Therapie notiert. Der Stuhl von Teilnehmern aus der Kontroll- sowie der IOT-Gruppe wurde einmalig eingesammelt. Den IOT-Probanden wurden das Röhrchen sowie die Studienaufklärung auf dem Postweg nach Hause geschickt. Das Röhrchen hatten sie höchstens 24 Stunden vor ihrem nächsten Termin in der IOT befüllt und anschließend in der IOT abgegeben. Die Probanden aus der Kontrollgruppe gaben ihre Stuhlprobe, welche nicht älter als 24 Stunden war, ebenfalls ab. Der Stuhl aller Probanden wurde nach Abgabe innerhalb von 24 Stunden auf -80°C eingefroren.

Laboranalyse der Stuhlproben

Die Stuhlproben (insgesamt $N = 110$) wurden extern von der Firma „IMG M Laboratories GmbH“ analysiert. Sie wurden auf Trockeneis verschickt und dort bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Es erfolgte eine quantitative Auswertung der Bakterienmenge mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (im Folgenden als qPCR bezeichnet) und eine qualitative Auswertung bezüglich der Zuordnung der Bakterien zu ihrer phylogenetischen Klassifikation mittels 16s rDNA Sequenzierung.

16s rDNA Sequenzierung durchgeführt von IMG M Laboratories

Im Folgenden wird dargestellt, wie die Proben von dem externen Labor (IMG M Laboratories) aufgearbeitet und sequenziert worden sind. Zunächst wurden die Proben für die 16s rDNA Sequenzierung vorbereitet. Dazu wurde die DNA aus den Proben mit Hilfe eines festgelegten Protokolls isoliert. Die Qualität der isolierten DNA wurde überprüft. Anschließend fand die Erstellung eines Clusters statt. Jede zuvor isolierte und fragmentierte DNA wird amplifiziert. Die amplifizierten Sequenzen wurden ebenfalls bezüglich ihrer Qualität überprüft, gereinigt und in das Cluster eingeordnet. Dann fand die Sequenzierung statt, an welche sich die Datenanalyse anschloß.

DNA Isolierung

Genomische DNA wurde mit Hilfe des QIAamp Fast DNA Mini Kit (Quiagen) isoliert. Eine A260/A280 Ratio von ≥ 1.8 gab an, dass keine kontaminierenden Proteine in der isolierten genomischen DNA vorhanden waren. Eine A260/A230 Ratio von ≥ 2.0 (oder ≤ 0.0) zeigte, dass die genomische DNA nicht durch andere organische Bestandteile wie Guanidium isocyanate, Alkohol, Phenol, Kohlenhydrate verunreinigt war. Diese Grenzwerte konnten nur auf gepufferte Lösungen mit einer definierten Ionenstärke angewendet werden. Nach der Isolation der DNA wurde die Reinheit und Konzentration der DNA mittels einer Gel-Elektrophorese überprüft. 110.0 ng bis 81.1 μg gDNA wurden aus den Stuhlproben, welche 50 bis 200ng schwer waren, gewonnen. Die Reinheit der DNA variierte von Probe zu Probe. Intakte genomische DNA stellte sich als klar kompakter weißer Streifen auf dem Agarosegel dar. Für die ersten zwölf isolierten gDNA Proben wurde exemplarisch eine elektrophoretische Auftrennung auf 1% Agarosegel durchgeführt, wie in **Abbildung 1** zu sehen ist. Im Bereich der niedrigen Molekulargewichte zeigte sich ein leichter Abbau der gDNA, allerdings hatte dies

wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Amplifikation von DNA Fragmenten mit weniger als 500 Basenpaaren.

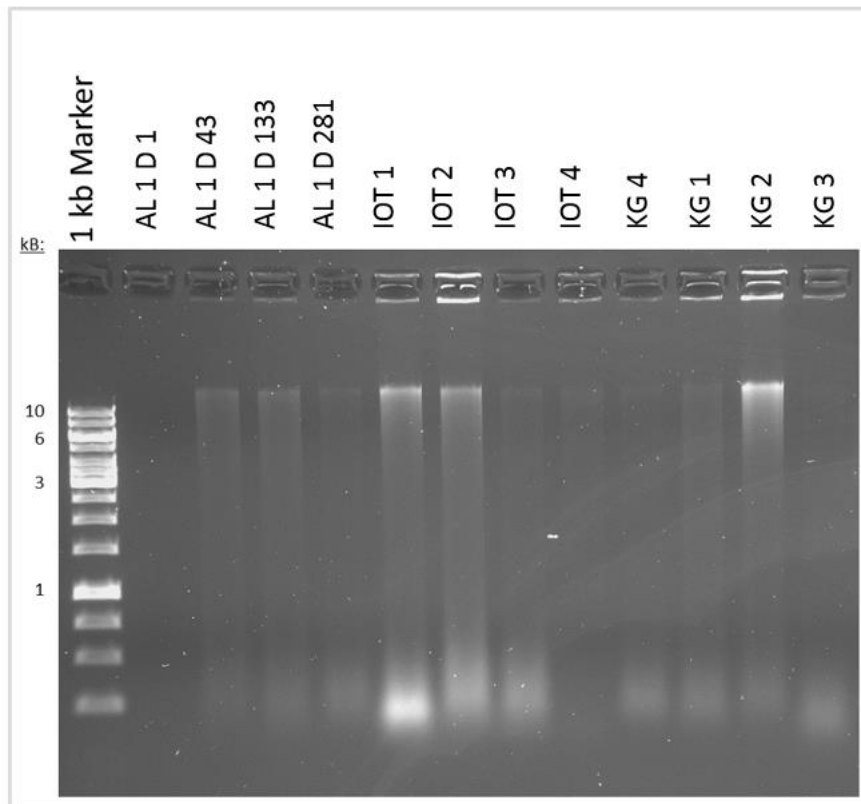


Abbildung 1. 'Agarose gel image for isolated gDNA' nach IMGM Laboratories

16S-Amplifikation

Die Strategie der 16S Amplifikation umfasste die Herstellung der Amplikons selbst und die Vorbereitungen der Amplikon-Bibliothek für das Next Generation Sequencing. Es gab ein inneres und ein äußeres Index Primer Paar. Das innere Primer Paar band in einem ersten PCR-Zyklus direkt an einen Zielbereich auf der DNA oder an ein, mittels PCR amplifiziertes, DNA Produkt. Dieser Primer beinhaltete eine Sequenz, welche in einem zweiten PCR-Zyklus an die teilweise komplementäre Sequenz des äußeren Primer Paares band. Das äußere Index Primer Paar enthielt außerdem Adapter (in **Abbildung 2** blau und gelb), welche für die später stattfindende bridge amplification gebraucht wurde. Indem Proben-spezifisch Index Primer kombiniert wurden, konnten alle singleplex PCR Produkte gemultiplexed werden und somit in einem einzigen Sequenzierungsdurchgang sequenziert werden.

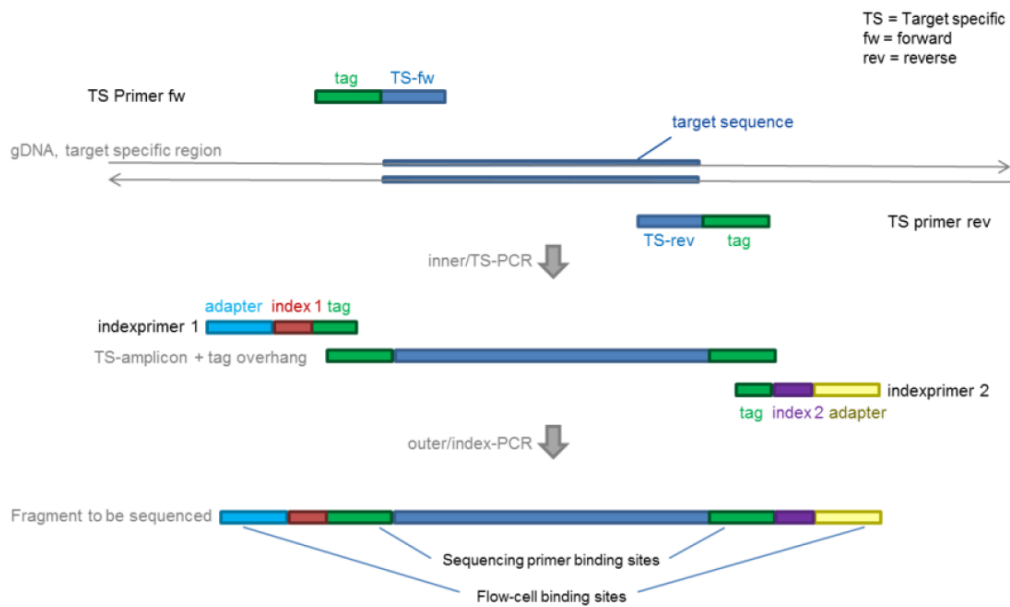


Abbildung 2. 'Scheme of the 16S amplification strategy' nach IMGM Laboratories

Das Primer Paar 314F und 805R wurde ausgewählt, um die Regionen 3 und 4 des 16S Gens zu umfassen. Die Amplikongröße umfasste 465 base pairs. Genaue Informationen über die Primer können der unten stehenden **Abbildung 3** entnommen werden.

Primer name	Primer sequence (5' -> 3')	Primer Length (bp)	Reference	Amplicon size
341F	CCTACGGGRSGCAGCAG	17	(1)	465 bp
805R	GACTACHVGGGTATCTAATCC	21	(1)	

Abbildung 3. '16S rRNA primer information' nach IMGM Laboratories

Nach der Amplifikation, mit einem Zielbereich-spezifischem Primer und den Index-Primern, wurden alle PCR Produkte auf die Reinheit und ihre Größe auf einem 2% Agarosegel geprüft. Die entsprechenden PCR Produkte sind in **Abbildung 4** und **5** einzusehen.

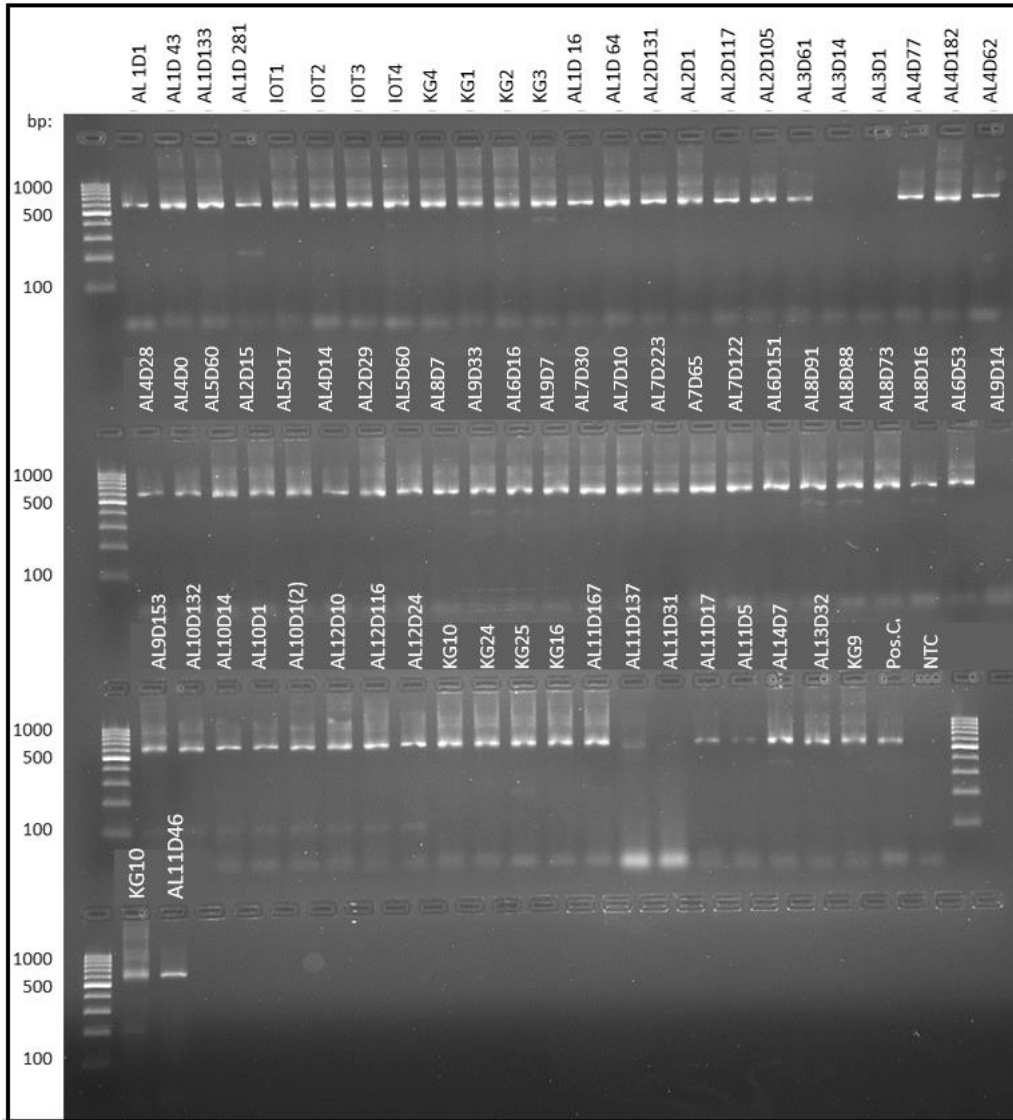


Abbildung 4. 'Agarose gel image for the initial PCR reactions of the samples 1' nach IMGM Laboratories

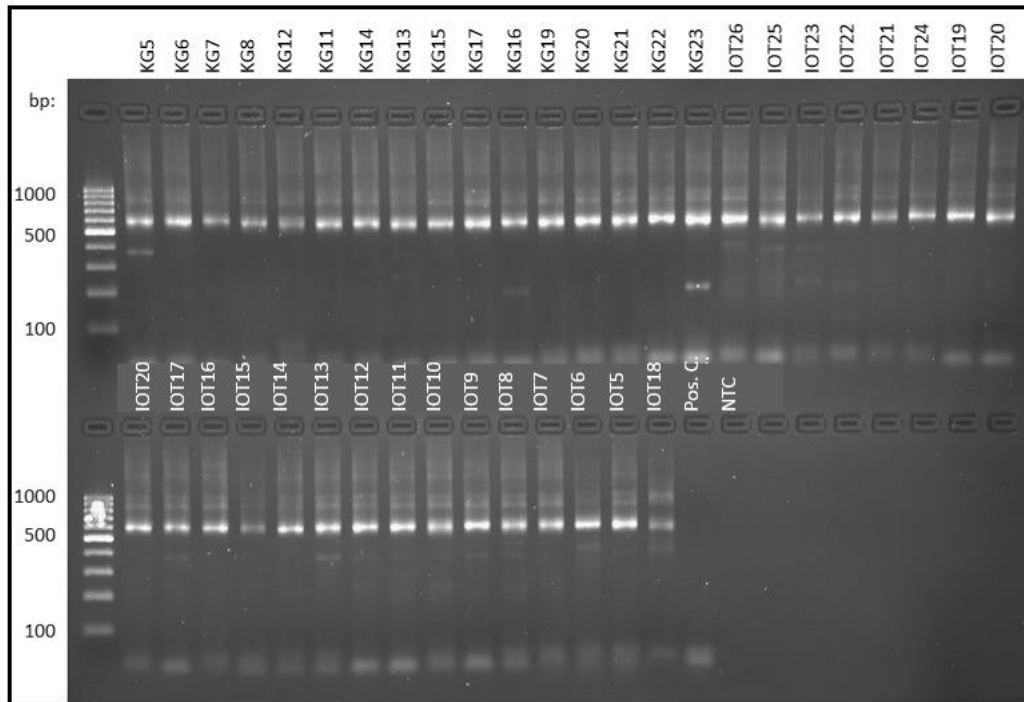


Abbildung 5. 'Agarose gel image for the initial PCR reactions of the samples 2' nach IMG M Laboratories

Die meisten Amplikons zeigten eine gute Qualität und wurden in die Amplikonbibliothek aufgenommen. Lediglich 7 Proben (AL 3 D 14, AL 3 D 1, AL 9 D 14, AL 11 D 137, AL 11 D 31, AL 11 D 17, AL 11 D 5) zeigten keine oder nur sehr leichte Banden in der Gelelektrophorese. Die Amplifikation dieser Proben wurde unter Verwendung höherer DNA-Konzentrationen wiederholt. Vier der wiederholten Proben zeigten ausreichend gute PCR-Produkte, wie in **Abbildung 6** zu sehen ist.

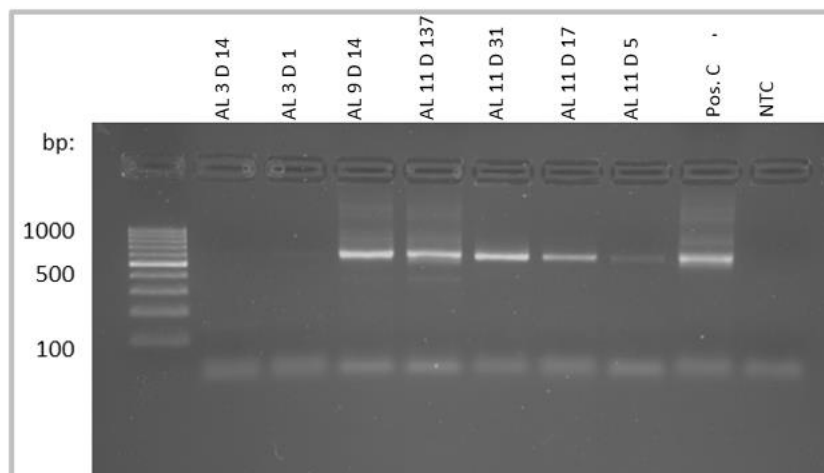


Abbildung 6. 'Agarose gel image for the repeated PCR reactions of the 7 failed samples' nach IMG M Laboratories

Für die drei anderen Proben, deren Amplikons keine ausreichende Qualität hatten, wurde die PCR nochmals mit höheren DNA Konzentrationen wiederholt, wie in **Abbildung 7** zu sehen ist. Die Proben AL 3 D 14 und AL 3 D 1 zeigten wieder keine ausreichenden PCR-Produkte.

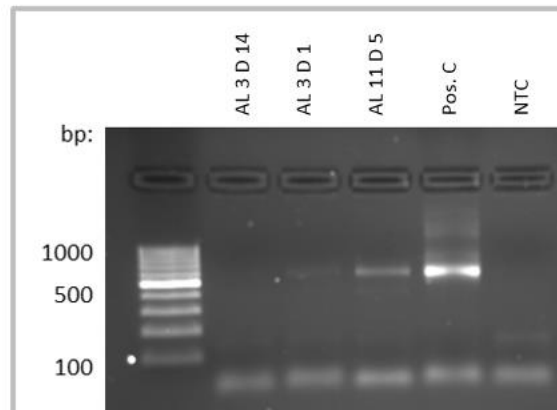


Abbildung 7. 'Agarose gel image for the repeated PCR reaction of twice failed samples' nach IMGGM Laboratories

Die amplifizierte DNA wurde dennoch zur Generierung der Datenbank verwendet. Allerdings war die Wahrscheinlichkeit gering, dass gute Reads während der Sequenzierung generiert werden konnten.

Datenbank Generierung

Die Amplikons wurden zunächst gereinigt. Dies geschieht mit der „solid phase reversible immobilisation paramagnetic bead-based“ Technologie. Die gereinigte Amplikons wurden mit Hilfe des SequelPrep Normalization Plate Kit auf eine equimolare Konzentration gebracht. Dafür wurden mindestens 250 ng DNA benötigt. Bei den Proben, die in der Gel-Elektrophorese nur ein blasses Band zeigen, konnte dieses Kriterium nicht voll erfüllt werden und dadurch wurden beim Next Generation Sequencing weniger Reads aus diesen Proben erwartet. Anschließend wurde eine Datenbank aus allen Proben erstellt. Die Proben wurden in gleichen Mengen zu der Datenbank hinzugefügt. Die Datenbank bestand aus single stranded DNA Fragmenten mit Adaptern für die Sequenzierung und den Index Primern. Der Pool wurde dann wieder gereinigt und auf eine equimolare Konzentration gebracht. Vor und nach der Aufreinigung der Amplikons wurde die Integrität und die Spitzenwertverteilung der PCR Produkte mittels „the High Sensitivity DNA LabChip Kit“ ermittelt. Um die Stuhlkonzentration jeder Probe in ng/ μ l

zu bestimmen, wurde das hoch sensitive fluoreszierende Qubit sDNA HS Assay Kit benutzt. 1 µl jeder Probe wurde mit einem gewissen Standard aus dem Kit verglichen und so die Konzentration bestimmt. Die DNA Konzentration wurde anhand folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Konzentration [nM]} = \left(\text{Konz. [ng/}\mu\text{l]} \times 10^6 / \left(660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times \text{Anzahl der base pairs} \right) \right)$$

Da für die Sequenzierung single stranded DNA benötigt wurde, wurde der gesamte Pool mit NaOH denaturiert. Die Sequenzierung fand schließlich bei einer Konzentration von 5 pM und mit einer „10% PhiX v3 control library spike-in“ von Illumina Inc. statt.

Generierung des Clusters

Für die Generierung des Clusters sowie für die Sequenzierung wurde die MiSeq Control Software v2.5.0.5. benutzt. Zuerst erfolgte die Herstellung der Cluster. Cluster entsprechen Arealen auf den MiSeq flow cells (Glasobjektträger), an denen die amplifizierte ssDNA aus dem Pool gebunden war, wie in **Abbildung 8** zu sehen. Die Herstellung der Cluster erfolgte durch bridge amplification. Dabei wurden die ssDNA Fragmente auf der flow cell gebunden. Dies geschah durch jeweils einen Adapter an beiden Enden der ssDNA, welcher bei der Amplifikation hinzugefügt wurde. In mehreren Zyklen wurden die ssDNA Fragmente amplifiziert. Anschließend fand die Sequenzierung statt.

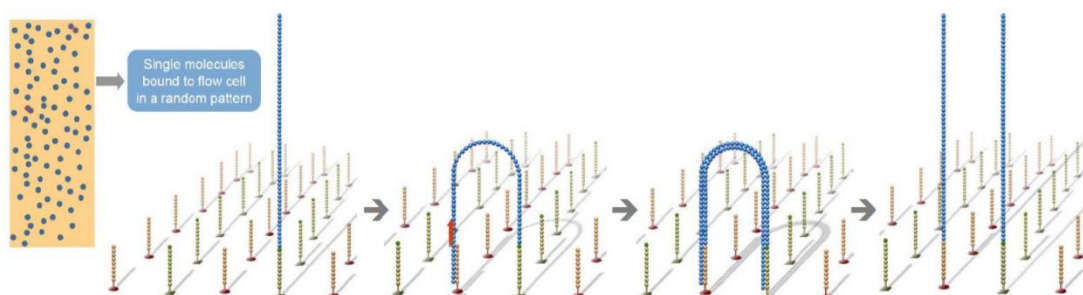


Abbildung 8. Schema der bridge amplification nach IMG M Laboratories

Die Cluster Dichte betrug 754 ± 116 k/mm². Dieser Wert war höher, als die optimale Clusterdichte, welche von Illumina Inc. empfohlen wurde. Allerdings konnte die Dichte

des Clusters aufgrund unterschiedlicher Probeneigenschaften variieren. Diese Clusterdichte war trotzdem noch in einem Bereich, in welchem hoch qualitativen Reads erwartet werden konnten.

Sequenzierung

Primer banden an die Adaptersequenzen der amplifizierten DNA Fragmente. Die Sequenzierung fand mittels Synthese (sequencing by synthesis) statt. In jedem Sequenzierungszyklus wurden Nukleotide (A, T, G, C) auf die flow cells gespült. Diese Nukleotide waren mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Pro Zyklus band ein passendes Nukleotid mit Hilfe der DNA Polymerase an den wachsenden DNA Strang. Nach jedem Zyklus wurden die überschüssigen Nukleotide weggespült und die eingebauten Nukleotide wurden durch ihre fluoreszierende Markierung identifiziert. Die Sequenzierung fand in jedem Zyklus bidirektional statt, so dass an beiden komplementären DNA Strängen Nukleotide gebunden wurden. Es entstanden neue Fragmente (Read 1 am Sense DNA-Strang und Read 2 an der antisens DNA) mit einer Länge von 250 Basenpaaren. Da die Sequenzierung in zwei Richtungen stattfand, resultieren jeweils zwei Fragmente mit je 250 Basenpaaren.

Qualitätskontrolle

Durch die SAV Software wurden technische Qualitätsparameter, wie der prozentuale Anteil der Q 30 Basen, die optimale Clusterdichte, der Ertrag der Sequenzierung und die Anzahl der Reads, die am Ende der Sequenzierung für die endgültige Datenanalyse zur Verfügung stehen, überprüft. Die Normwerte dieser Parameter sind in **Abbildung 9** einzusehen.

Parameter	Q 30 bases	Optimal cluster density	Sequence yield	Filter passed clusters
Illumina Specification	> 75%	467-583 K/ mm ²	7.5 – 8.5 Gb 12-15 Mio. reads	< 12-15 Mio. (< 100%)

Abbildung 9. MiSeq technische Qualitätsparameter nach Illumina Inc.

Der wichtigste qualitative Parameter war der prozentuale Anteil der Q30 Basen, dieser sollte über 75% liegen. Jede Base hat einen Phred Score (Q). Dieser berechnete sich wie folgt: $Q = -10 \log_{10} P$. Wobei „P“ die Fehlerwahrscheinlichkeit einer falsch eingebauten Base darstellte. Beispielsweise hatte eine Base mit einem Phred Score von

30 die Wahrscheinlichkeit von 1 zu 1000, dass sie fehlerhaft in den wachsenden DNA Strang eingebaut wird. Die optimale Clusterdichte war ebenfalls ein wichtiger Parameter bezüglich der Qualität der Sequenzierung. Sie sollte zwischen 467 und 583 K/mm² betragen. War das Cluster zu licht, ist das Outcome der Sequenzierung geringer. War das Cluster zu dicht, gingen zu viele Sequenzen verloren, da sie wegen vermischter Cluster Amplifikationen aussortiert wurden. Des Weiteren beeinflussten die Eigenschaften der Proben die Clusterdichte. Der Ertrag des Sequenzierungsprozesses war abhängig von der Clusterdichte und damit wiederum von den Eigenschaften der DNA Proben und der Ausstattung der flow cells. Der Zielbereich des Ertrags, der zwischen 12 bis 15 Millionen Reads lag, wurde anhand einer Sequenzierung unter Gebrauch der MiSeq v2 Reagenzien, einer optimalen Probe und optimalen Clusterdichte festgelegt. Proben mit verschiedenen Eigenschaften könnten allerdings zu zu hohen oder niedrigen Clusterdichten führen und damit in einer niedrigeren Read-Anzahl der Sequenzierung resultieren. Die Anzahl an Reads, die am Ende der Sequenzierung für die endgültige Datenanalyse zur Verfügung standen, wurden „Filter passed clusters“ genannt. Dieser sollte bei unter 100% liegen. Dieser Parameter war wiederum auch von der Clusterdichte abhängig, welche selbst durch die Eigenschaften der Proben beeinflusst wurde.

In **Abbildung 10** sind die Werte der Qualitätsparameter für die Proben der vorliegenden Studie einzusehen.

Parameter	Q30 bases	Cluster density	Sequencing yield	Filter-passed clusters
Obtained value	75.7%	754 +/- 116 k/mm ²	17.6 Gb	15 Mio (85.5%)

Abbildung 10. Qualitätsparameter der Sequenzierung der vorliegenden Studie nach IMG M Laboratories
 Der Prozentanteil von Q30 Basen, wurde mit 75.7% erfüllt. Die Clusterdichte lag, wie oben beschrieben, über dem empfohlenen Wert. Der Ertrag der Sequenzierung lag bei 17.6 Gb, und damit auf einem sehr hohen Wert. Die Anzahl an Reads, die am Ende der Sequenzierung für die endgültige Datenanalyse zur Verfügung standen, war mit einer absoluten Anzahl von 15 Millionen und einem Prozentanteil von 85.5% ausreichend. Diese Anzahl an „filter-passed clusters“ führte zu 540 bis 217533 Reads pro Probe. Nur die Proben AL 3 D 14 mit 540 Reads und AL 3 D 21 mit 2101 Reads, hatten zu wenig Reads und wurden aus der Auswertung herausgenommen. Somit betrug die niedrigste

Anzahl an Reads 19671 für die Probe IOT 27 und alle anderen Proben wiesen genügend Reads auf.

Um die Qualität der Reads zu evaluieren, wurde der durchschnittliche Phred-Score berechnet. Dieser wurde grafisch vor (wie in **Abbildung 11** zu sehen) und nach dem Zusammenführen (wie in **Abbildung 12** zu sehen) und Kürzen der Basen gegen den prozentualen Anteil an Sequenzen aufgetragen. Es zeigte sich, dass ein großer Anteil der Basen einen hoch qualitativen Phred-Score besitzen.

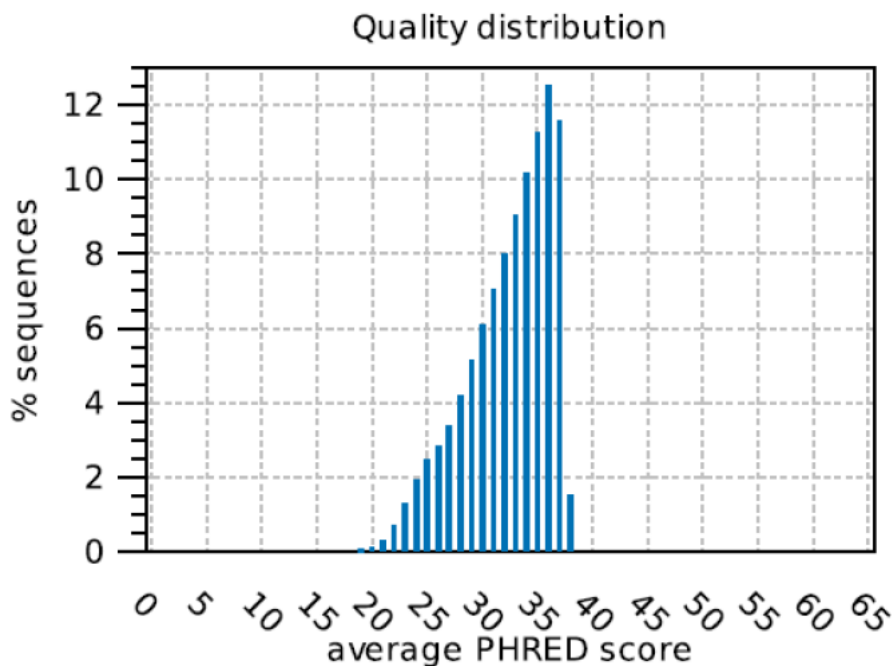


Abbildung 11. 'Mean PHRED Score distribution before merging and trimming of reads' nach IMG Laboratory

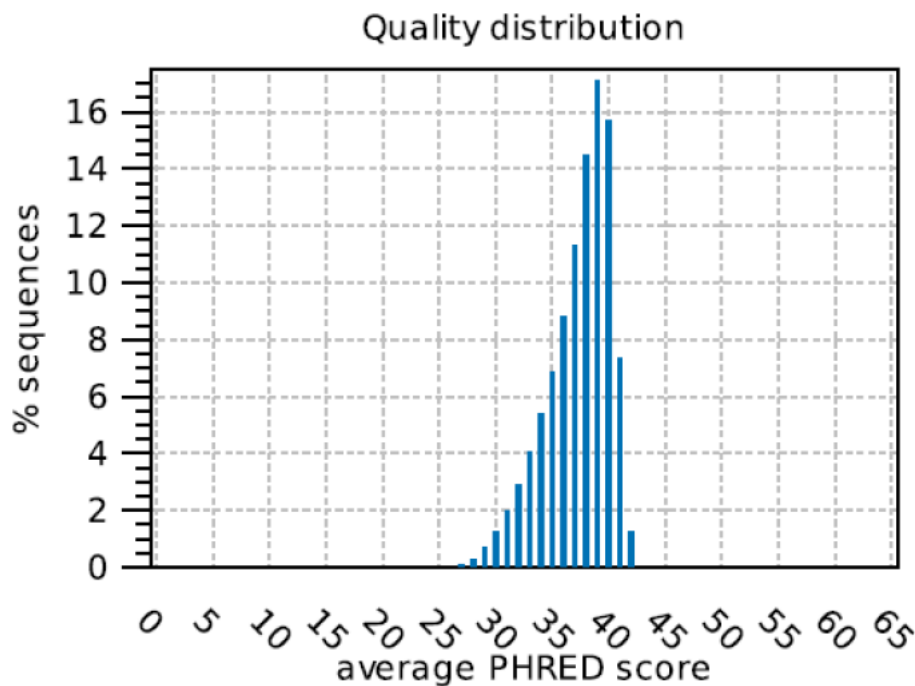


Abbildung 12. 'Mean PHRED Score distribution after merging and trimming of reads' nach IMG/M Laboratories

Datenanalyse

Für die Darstellung und die Evaluation des Sequenzierungsvorgangs wurde die Illumina Software MiSeq Reporter (MSR) v 2.5.1.3 sowie der Illumina Sequence Analysis Viewer (SAV) v 1.9.1 genutzt. Die grobe Datenanalyse sowie die Qualitätskontrollen fanden mit Hilfe der MSR software statt. Es wird der „FastQ only processing pipeline“ benutzt. Damit wurden die Adaptersequenzen der 3'-DNA-Enden entfernt. Sämtliche Reads, welche für die endgültige Datenanalyse eine entsprechende Qualität besaßen, werden demultiplexed. Die Rohdaten (Read 1 und Read 2 jeder Probe) wurden in die CLC Genomics Workbench v 8.0.2 importiert. Reads, welche nicht entsprechende Qualitätsparameter besaßen, wurden durch das Programm aussortiert. Die tiefere Datenanalyse fand ebenfalls mit der CLC Genomics Workbench v 8.0.2 und dem darin beinhalteten Modul „microbial genomics“ statt. Read 1 und Read 2 jeder Probe wurden zusammengefügt, indem sich überlappende Sequenzen benutzt wurden. Außerdem wurden die minimale Länge der sich überlappenden Sequenzen und die Wahrscheinlichkeit potenziell falsch sequenzierten Basenpaare bestimmt. Unter Berücksichtigung der Qualität der Basen, der Read-Länge und Target-spezifischen Primersequenzen fand eine Kürzung der Reads statt. Sequenzen mit einer Länge von unter

400 Basenpaaren wurden aussortiert. Sequenzen mit einer Länge von über 400 Basenpaaren wurden auf diese Länge gekürzt.

Operational taxonomic units

Die übrig gebliebenen, hoch qualitativen Sequenzen wurden mit einem 99% „identity threshold“ „operational taxonomic units“ (im Folgenden OTU) zugeordnet. Dies geschah auf der Grundlage der SILVA 16S rRNA Datenbank. Chimäre Sequenzen und Artefakte wurden dabei aussortiert. Die phylogenetische Klassifizierung fand anhand des OTU Clusterings statt. Insgesamt wurden 13460 verschiedene OTUs identifiziert. Der Prozentsatz, der die verschiedenen OTUs definiert, war mit einem Minimum von 0.1% und einem Maximum von 2.5% pro Probe relativ gering. Das wies auf eine hohe Anzahl an replizierten Reads hin, welche die Anzahl an minimal notwendigen Replikationen weit überschreitet. Daraus ließ sich schließen, dass die Anzahl an analysierten Reads die gesamte Population gut repräsentierte.

Diversitätsanalyse

Die alpha-Diversität konnte mit verschiedenen Methoden bestimmt werden. Zum einen wurde die Rarefaction-Methode eingesetzt. Mit dieser Methode, konnten Diversitäten verschieden großer Proben verglichen werden (Simberloff, 1972). Die Diversitäten wurden mit Artensättigungskurven dargestellt. Die Anzahl der OTUs (y-Achse) wurde gegen die Anzahl an Reads (x-Achse), die pro Probe sequenziert wurden, aufgetragen. Wurde die Kurve bei einer steigenden Anzahl an Reads flacher, war die Wahrscheinlichkeit, dass bei einer ausführlicheren Sequenzierung mehr OTUs identifiziert werden, sehr gering.

In **Abbildung 13** sind die Artensättigungskurven der analysierten Proben dargestellt. Die meisten Kurven wurden mit steigender Anzahl an OTUs flacher. Mit einer weitergehenden Analyse von einer höheren Anzahl an Reads würden somit relativ wenig neue OTUs identifiziert werden.

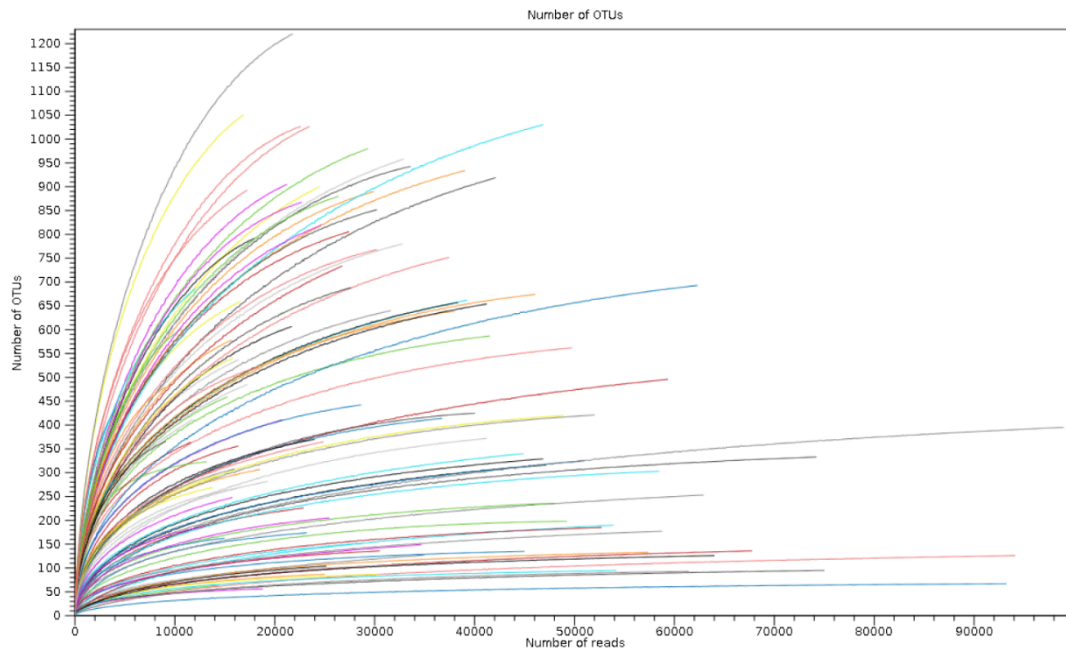


Abbildung 13. Artensättigungskurve nach IMG/M Laboratories

Mittels der Shannon entropy (H) wurde die Unsicherheit in der richtigen Bestimmung einer Spezies berechnet, wenn diese wahllos aus der Probe herausgenommen wurde (Shannon, 1948). Die Ergebnisse der oben genannten Berechnungen wurden sowohl grafisch als auch in Tabellenform angegeben.

Quantitative Polymerasekettenreaktion durchgeführt von IMG/M Laboratories

Die qPCR wurde zur Quantifizierung der Bakterienkonzentration im Stuhl pro Probe (ng Bakterien/mg Stuhl) durchgeführt. Die genomische DNA wurde auf 0.01 bis 10.00 ng pro Reaktion verdünnt. Sie wurde anschließend in dreifacher Ausführung der absoluten Quantifizierung mittels dem Femto Bacterial DNA Quantification Kit zugeführt. Mit dieser Methode konnte bakterielle DNA vor dem Hintergrund von mykotischer, menschlicher oder viraler DNA selektiv quantifiziert werden. Dazu wurden Primer, welche für den Zielbereich des 16s RNA Gens spezifisch waren, angewendet. Die absolute qPCR Quantifizierung wurde im Vergleich zur Standardkurve der *Escherichia coli* DNA durchgeführt. Dazu wurde eine lineare Trendkurve erstellt und die Gleichung

der linearen Regression angewendet. Diese Berechnungen fanden mit Hilfe der Viiia 7 RUO software v1.2.3 statt. Außerdem wurde der CT-Wert berechnet. Die Abkürzung stand für „cycle-threshold“. Dieser Wert gab an, ab welchem Punkt eine Kurve exponentiell zu wachsen begann (Bunse et al., 2005). Im Allgemeinen sollten CT-Werte über 32 mit Vorsicht behandelt werden, da diese oft eine falsch hohe Amplifikation bedeuten. Die Proben der AL-Patienten wurden vier Zeitpunkten zugeordnet: Leukemia initial diagnosis (alle Proben, die vor dem Beginn einer Chemotherapie abgegeben wurden), Leukemia treatment (alle Proben, die während einer Chemotherapie abgegeben wurden), Leukemia end of treatment (alle Proben, die nach einer Chemotherapie abgegeben wurden), Leukemia after allo SZT (alle Proben, die nach einer allogenen Stammzelltransplantation abgegeben wurden). Als lower limit of quantification (LLOQ) wurde bei der Durchführung der qPCR 20pg festgelegt. Folgende Proben zeigen nach der qPCR zu hohe durchschnittliche CT-Werte (jeweils in Klammern hinter dem Probennamen angegeben). Entweder betragen sie >30 oder sind höher als der LLOQ-Standard: AL 3 D 19 (30.2), AL 3 D1 (32.1), AL 3 D 14 (31.9), AL 11 D 18 (29.3), AL 11 D 6 (30.3). Die Probe KG 25 zeigte eine sehr hohe Standardabweichung. Die qPCR der Proben AL 3 D 19, AL 3 D 1, AL 3 D 14, AL 11 D 18, AL 11 D 6 und KG 25 wurde wiederholt. Nach der wiederholten qPCR zeigten die Proben AL 3 D 14, AL 3 D 1, AL 11 D 6 immer noch zu hohe CT-Werte, so dass keine oder nur eine vernachlässigte Menge an DNA nachgewiesen werden kann. In allen Proben, welche einen ausreichenden CT-Wert vorwiesen, betrug der minimale durchschnittliche CT-Wert 17.9 und der maximale durchschnittliche CT-Wert 34.9. Die minimale Bakterienmenge (ng/mg Stuhl) betrug 0.000 und die maximale Menge 165.062. Die minimale Standardabweichung war 0.00 und die maximale 24.415.

Herangehensweise an die Auswertungen der gewonnenen Daten und die statistische Analyse

Die statistischen Berechnungen wurden mit SPSS v23, Excel Microsoft 2013 und Graph Pad Prism Version 6 vorgenommen. Für die demografischen Daten der Probanden (Alter, Größe, Gewicht, BMI⁷) wurde jeweils der Mittelwert, die Standardabweichung sowie der zweiseitige Mann-Whitney U-Test berechnet. Der Mittelwert und die

⁷ Body Mass Index

Standardabweichung wurden ebenfalls in Bezug auf die Anzahl der antibiotischen, antiviralen und antimykotischen Medikamente, welche die Probanden eingenommen haben, berechnet. Es erfolgte eine tabellarische Darstellung der Verteilung der Besiedlung mit multiresistenten Keimen über die drei Gruppen. Es wurde eine grafische und tabellarische Darstellung über die Probensammlung, die Besiedlung mit multiresistenten Keimen und des Therapieverlaufs der LEU-Patienten angefertigt. Des Weiteren wurden die Anzahl und die Wirkstoffe der Antibiotika, die den LEU-Patienten verabreicht wurden, anhand von Diagrammen veranschaulicht. Es wurde die Anzahl der operational taxonomic units (OTU) durch Bestimmung des Mittelwerts, der Standardabweichung, sowie des zweiseitigen Mann-Whitney U-Tests zwischen den drei Probandengruppen (IOT, Kontrolle, LEU-Patienten) verglichen. Es erfolgte eine Analyse der alpha-Diversität. Die alpha-Diversität wurde mittels des Shannon Index beschrieben. Der Shannon-Index wurde mittels Mittelwert, Standardabweichung und des zweiseitigen Mann-Whitney U-Tests zwischen den Gruppe IOT, Kontrolle und LEU-Patienten verglichen. Anhand der LEU-Patienten 1, 2, 4, 7, 8, 9, 10 und 11 wurde beispielhaft der Verlauf der bakteriellen Diversität anhand der OTUs während des Therapieverlaufs grafisch dargestellt. Das Selektionskriterium dieser Patienten war, dass mindestens vier Stuhlproben im Verlauf abgegeben wurden um einen adäquaten longitudinalen Verlauf darstellen zu können. Die Menge an Bakterien in ng/mg Stuhl wurde durch Bestimmung des Mittelwerts, der Standardabweichung sowie mittels des zweiseitigen Mann-Whitney U-Test zwischen den drei verschiedenen Probandengruppen verglichen. Die Bakterienkonzentration (ng Bakterien/mg Stuhl) in den Stuhlproben der LEU-Patienten wurde im longitudinalen Verlauf verglichen. Die Zeitpunkte waren vor Beginn der Chemotherapie, im frühen Stadium der Chemotherapie, im fortgeschrittenen Stadium der Chemotherapie sowie ggf. nach der allogenen Stammzelltransplantation. Dafür wurden der Mittelwert der Bakterienmenge (ng/mg Stuhl), die Standardabweichung und der zweiseitige Mann-Whitney U-Test berechnet. Außerdem wurden Vergleiche zwischen dem prozentualen Anteil bestimmter Bakterien am Mikrobiom der drei Probandengruppen angestellt. Es wurde der Anteil am Mikrobiom potenziell pathogener und benigner Bakterien zwischen den Patienten mit akuter Leukämie, der Kontrollgruppe und der IOT-Patienten verglichen. In einer Tabelle wurden die auslösenden Bakterien klinischer Infektionen aufgelistet. Darin wurde außerdem gezeigt, wie viele der

infektionsauslösenden Bakterien schon vor dem Auftreten der klinischen Symptomatik und dem mikrobiologischen Nachweis in der Kultur im Mikrobiom vorhanden waren. Die Zusammensetzung des Mikrobioms und seine Veränderungen im Therapieverlauf wurden deskriptiv bei vier Patienten (AL Patienten 1, 2, 7 und 8) mit akuter Leukämie beleuchtet. Der Verlauf dieser Patienten wurde beleuchtet, da bei ihnen ein adäquater longitudinaler Verlauf anhand mindestens fünf abgegebener Stuhlproben dargestellt werden konnte.

3. Ergebnisse

Demografische Daten der Studiengruppen

Die Stichprobe bestand aus einer Anzahl von insgesamt $N = 66$ Probanden. In der Gruppe der Probanden mit akuter Leukämie („LEU-Gruppe“) befanden sich $n = 14$ Probanden. Es befanden sich $n = 26$ Probanden in der „IOT-Gruppe“. Diese Probanden wurden in der interdisziplinären onkologischen Tagesklinik behandelt und waren nachweislich mit einem Problemkeim besiedelt. In der gesunden Kontrollgruppe „KG Gruppe“ befanden sich $n = 26$ Probanden.

Geschlecht

Insgesamt 33 Probanden waren männlich und 33 Probanden weiblich. In der LEU-Gruppe waren 10 weibliche und 4 männliche Teilnehmer/-innen. In der IOT-Gruppe waren 11 weibliche und 15 männliche Probanden. In der Kontrollgruppe waren 12 weibliche und 14 männliche Probanden. Die Geschlechterverteilung über die drei Gruppen wird in **Tabelle 1** dargestellt.

Tabelle 1.
Geschlechterverteilung über die drei Gruppen

		Geschlecht		Gesamt
		Männer	Frauen	
Gruppe	LEU	4	10	14
	IOT	15	11	26
	KG	14	12	26
	Gesamt	33	33	66

Anmerkung. LEU = Akute Leukämie; IOT = Patienten aus der interdisziplinären onkologischen Tagesklinik; KG = Kontrollgruppe

Alter, Größe, Gewicht & Body Mass Index

Tabelle 2.

Mittlere Altersverteilung (in Jahren), Größenverteilung (in cm), Gewichtsverteilung (in kg) und Verteilung des Body Mass Index (in kg/m²) (\pm die jeweilige Standardabweichung) über die Gruppenzugehörigkeit

	Gruppe			Gesamt
	LEU	IOT	KG	
Alter (in Jahren)	50.1 \pm 15.8	68.0 \pm 10.1	27.0 \pm 4.6	48.1 \pm 20.8
Größe (in cm)	166.9 \pm 10.1	171.2 \pm 10.3	177.7 \pm 10.1	172.8 \pm 10.9
Gewicht (in kg)	71.7 \pm 17.7	80.1 \pm 16.3	70.9 \pm 10.7	74.7 \pm 15.1
BMI (in kg/m ²)	25.4 \pm 4.2	27.2 \pm 4.2	22.4 \pm 2.0	24.9 \pm 4.1

Anmerkung. LEU = Akute Leukämie; IOT = Patienten aus der interdisziplinären onkologischen Tagesklinik; KG = Kontrollgruppe; cm = Zentimeter; kg = Kilogramm; BMI = Body Mass Index

Alter. Wie in **Tabelle 2** zu sehen, betrug der Mittelwert der gesamten Stichprobe 48.1 Jahre mit einer Standardabweichung von 20.8. In der LEU Gruppe lag der Mittelwert des Alters bei 50.1 Jahren mit einer Standardabweichung von 15.8 Jahren. Der Altersmittelwert in der IOT Gruppe betrug 68.0 Jahre, die Standardabweichung 10.1 Jahren. Während in der KG der Mittelwert des Alters bei 27.0 Jahren mit einer Standardabweichung von 4.6 Jahren betrug. Zwischen der LEU und der IOT Gruppe existierte ein signifikanter Unterschied mit $z = -3.36$, $p = .001$, wobei die Probanden in der IOT-Gruppe signifikant älter waren ($M = 68.0$, $SD = 10.1$) als die Probanden aus der LEU-Gruppe ($M = 50.1$, $SD = 15.8$). Für den Vergleich zwischen den Gruppen LEU und KG ergab sich ein signifikanter Unterschied mit $z = -4.21$, $p < .001$. Die KG Probanden waren signifikant jünger ($M = 27.0$, $SD = 4.6$) als die Probanden aus der LEU-Gruppe ($M = 50.1$, $SD = 15.8$). Zwischen der IOT und der KG Gruppe wurde ebenfalls ein signifikanter Unterschied festgestellt mit $z = -6.19$, $p < .001$. Die Probanden aus der IOT-Gruppe waren signifikant älter ($M = 68.0$, $SD = 10.1$) als die der Kontrollgruppe ($M = 27.0$, $SD = 4.6$).

Größe. Wie in **Tabelle 2** zu sehen, betrug der Mittelwert der Größe der gesamten Stichprobe 172.8cm mit einer Standardabweichung von 10.9cm. In der LEU Gruppe betrug der Mittelwert 166.9cm, die Standardabweichung 10.1cm. In der IOT Gruppe lag der Größenmittelwert bei 171.2cm und die dazugehörige Standardabweichung 10.3cm.

In der KG betrug der Mittelwert der Größe 177.7cm mit einer Standardabweichung von 10.1cm. Vergleich man die LEU- und IOT-Gruppe bezüglich der Größe der Probanden, so ergab dieser keinen signifikanten Unterschied mit $z = -1.44$, $p = .15$. Es wurde die Größe der LEU-Gruppe und der Kontrollgruppe verglichen, dabei ergab sich ein signifikanter Unterschied mit $z = -2.01$, $p < .05$, wobei die Probanden aus der Kontrollgruppe ($M = 177.7$, $SD = 10.1$) signifikant größer waren als die aus der LEU-Gruppe ($M = 166.9$, $SD = 10.1$). Zwischen der IOT und der Kontrollgruppe bestand ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($z = -2.30$, $p < .05$). Die Patienten aus der Kontrollgruppe ($M = 177.7$, $SD = 10.1$) waren größer als die Probanden aus der IOT-Gruppe ($M = 171.2$, $SD = 10.3$).

Gewicht. Der Mittelwert des Gewichts der gesamten Stichprobe betrug 74.7 kg mit einer Standardabweichung von 15.1 kg, wie in **Tabelle 2** einzusehen. Der Mittelwert des Gewichts in der LEU Gruppe betrug 71.7 kg und die Standardabweichung 17.7 kg. In der IOT Gruppe war der Mittelwert bei 80.1 kg mit einer Standardabweichung von 16.3 kg. Wobei in der KG der Mittelwert des Gewichts bei 70.9 kg lag und die Standardabweichung 10.7 kg betrug. Wenn man das Gewicht der Probanden aus der LEU- und der IOT-Gruppe vergleicht, ergab sich kein signifikanter Unterschied mit $z = -.65$, $p = .054$. Außerdem bestand auch zwischen der LEU- und der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied ($z = -.65$, $p = .51$), während zwischen der IOT- und der Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied mit $z = -2.01$, $p < .05$ festgestellt wurde. Die Probanden aus der IOT-Gruppe waren dabei signifikant schwerer ($M = 80.1$, $SD = 16.3$) als die Probanden aus der Kontrollgruppe ($M = 70.9$, $SD = 10.7$).

Body Mass Index. Wie in **Tabelle 2** zu sehen ist, betrug der Mittelwert des Body Mass Index in kg/m^2 der gesamten Stichprobe 24.9 mit einer Standardabweichung von 4.1. Der Mittelwert des BMIs in kg/m^2 für die LEU Gruppe betrug 25.4 und die Standardabweichung 4.2. In der IOT Gruppe lag der Mittelwert des BMIs bei 27.2 mit einer Standardabweichung von 4.2. Während in der KG der Mittelwert des BMIs in kg/m^2 bei 22.4 lag mit einer Standardabweichung von 2.0. Der Mann-Whitney U-Test ergab für den Vergleich des BMIs zwischen der LEU- und der IOT-Gruppe keinen signifikanten Unterschied mit $z = -1.23$, $p = .22$. Der gleiche Test ergab für den Vergleich zwischen der LEU- und der Kontrollgruppe einen signifikanten Unterschied mit $z = -2.41$, $p < .05$. Die Probanden aus der LEU-Gruppe waren schwerer ($M = 25.4$, $SD = 4.2$) als die Teilnehmer in der Kontrollgruppe ($M = 22.4$, $SD = 2.0$). Wird der BMI der Patienten aus der IOT-

Gruppe mit dem BMI der Patienten aus der Kontrollgruppe verglichen, ergab sich ein signifikanter Unterschied mit $z = -4.36$, $p < .001$. Die Patienten aus der IOT-Gruppe waren signifikant schwerer ($M = 27.2$, $SD = 4.2$) als die aus der Kontrollgruppe ($M = 22.4$, $SD = 2.0$).

Besiedlung mit multiresistenten Keimen

Insgesamt wurde bei 16 Probanden durch das Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg die Besiedlung mit einem 3 MRGN *E. coli* nachgewiesen. Wobei ein Proband aus der LEU Gruppe und 15 Probanden aus der IOT Gruppe mit einem 3 MRGN *E. coli* besiedelt waren. Zwei Probanden waren mit einem 3 MRGN *Klebsiella pneumoniae* besiedelt, wobei sich beide Probanden in der IOT Gruppe befanden. Ein Proband war mit 4 MRGN *E. aerogenes* besiedelt. Dieser Proband befand sich in der LEU Gruppe. Insgesamt waren 10 Probanden mit einem VRE besiedelt, 3 aus der LEU und 7 aus der IOT Gruppe. Bei insgesamt 38 Probanden wurde keine Besiedelung mit multiresistenten Keimen nachgewiesen. 10 dieser Probanden befanden sich in der LEU Gruppe, 26 in der Kontrollgruppe und 2 in der IOT-Gruppe. Diese zwei Probanden aus der IOT Gruppe gaben zwar anamnestisch an mit einem der genannten multiresistenten Keime besiedelt zu sein, es lag jedoch kein schriftlicher Befund vor, so dass diese Probanden in die Gruppe ‚Keine‘ eingruppiert wurde. Da der LEU-Proband #2 mit zwei verschiedenen multiresistenten Keimen besiedelt war, ist die Gesamtmenge größer als die Stichprobenanzahl $N = 66$. Die o.g. Details sind in der nachfolgenden **Tabelle 3** einzusehen.

Tabelle 3.

Verteilung der Besiedlung mit multiresistenten Keimen über die drei Gruppen

		Resistente Keime					Gesamt
		Keine	3 MRGN <i>E. coli</i>	3 MRGN <i>Klebsiella pneumoniae</i>	4 MRGN <i>E. aerogenes</i>	VRE	
Gruppe	LEU	10	1	0	1	3	15
	IOT	2	15	2	0	7	26
	KG	26	0	0	0	0	26
Gesamt		38	16	2	1	10	67

Anmerkung. LEU = Akute Leukämie; IOT = Patienten aus der interdisziplinären onkologischen Tagesklinik; KG = Kontrollgruppe; MRGN = multiresistente Gram negative Keime; VRE = Vancomycin resistente Enterokokken

Antiinfektive Behandlung zum Zeitpunkt der Stuhlprobenabgabe

Zum Zeitpunkt der Stuhlprobenabgabe wurden im Durchschnitt (\pm Standardabweichung) 6.4 ± 2.5 Patienten der LEU-Gruppe mit einem Antibiotikum behandelt, 1.4 ± 0.8 mit einem Antimykotikum und 0.9 ± 1.4 mit einem Virustatikum. Wobei mindestens sechs Monate vor Eintritt des jeweiligen Patienten in die Studie bzw. vor Abgabe der ersten Stuhlprobe keine antibiotische Therapie erfolgt war. Im Durchschnitt (\pm Standardabweichung) erhielten 0.2 ± 0.4 Patienten der IOT-Gruppe eine antibiotische Behandlung zum Zeitpunkt der Stuhlprobenabgabe. Keiner der Probanden aus der Kontrollgruppe erhielt eine antiinfektive Therapie zum Zeitpunkt der Stuhlprobenabgabe.

Überblick über die Stuhlprobensammlung, die Besiedlung mit multiresistenten Keimen und den Therapieverlauf der LEU-Patienten

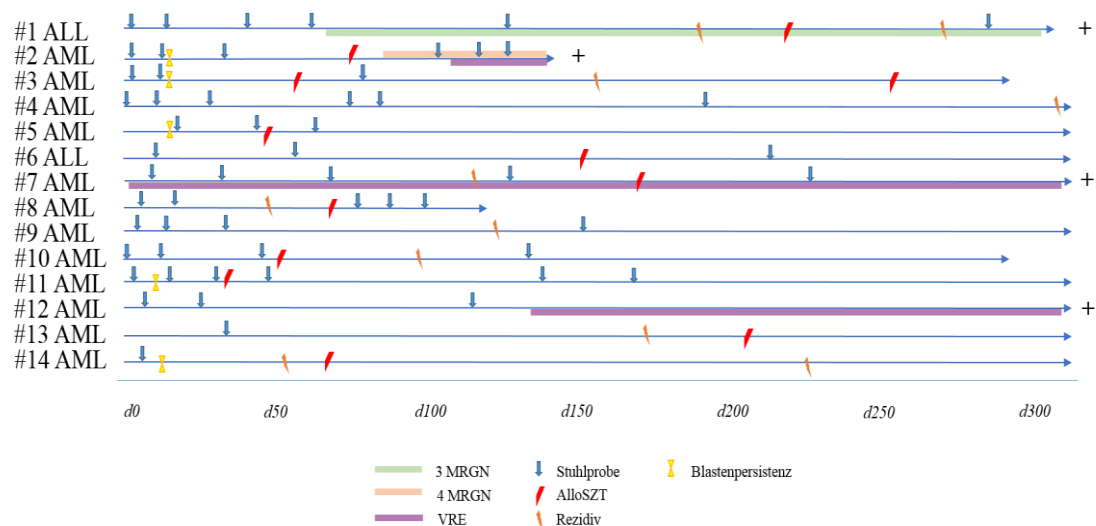


Abbildung 14. Zeitpunkte der Stuhlprobenabgaben, das Vorhandensein einer Besiedlung mit multiresistenten Keimen und der Therapieverlauf bezüglich einer Blastenpersistenz, eines Rezidivs und einer alloSZT bei den Patienten mit akuter Leukämie. ALL = akute lymphatische Leukämie; AML = akute myeloische Leukämie; MRGN = multiresistente gram negative Keime; alloSZT = allogene Stammzelltransplantation

Die Probanden 1 und 6 litten an einer ALL. Die Probanden 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 und 14 litten an einer AML. In **Abbildung 14** werden die Zeitpunkte der Stuhlprobensammlung mit einem blauen Pfeil dargestellt, wobei als Tag 1 der erste Tag des jeweiligen Therapiebeginns definiert ist. Proband 1 gab an den Tagen 1, 16, 43, 64, 133 und 281 Stuhlproben ab. Proband 2 gab an Tag 1, 15, 29, 105, 117 sowie 131 jeweils eine Stuhlprobe ab. Proband 3 gab insgesamt drei Stuhlproben jeweils an den Tagen 1, 14 und 68 ab. Proband 4 gab an den Tagen 0, 14, 28, 62, 77 und 182 jeweils eine Stuhlprobe ab. Proband 5 gab an den Tagen 17, 46 sowie 60 eine Stuhlprobe ab. An den Tagen 13, 53 und 151 gab Proband 6 jeweils eine Stuhlprobe ab. Proband 7 gab an den Tagen 10, 30, 65, 122 und 223 eine Stuhlprobe ab. Während Proband 8 an den Tagen 7, 16, 73, 88 und 91 jeweils eine Stuhlprobe abgab. Proband 9 gab an den Tagen 7, 14, 33 und 153 eine Stuhlprobe ab. An den Tagen 1, 13, 44 und 132 gab Proband 10 jeweils eine Stuhlprobe ab. Proband 11 gab an den Tagen 5, 17, 31, 46, 137 und 167 eine Stuhlprobe ab. Proband 12 gab an den Tagen 10, 24 und 116 Stuhlproben ab. Proband 13 gab nur an Tag 32 eine Stuhlprobe ab und Proband 14 gab an Tag 7 eine Stuhlprobe ab.

In **Tabelle 4** ist der Therapieverlauf der Patienten mit akuter Leukämie dargestellt. Ein Patient wurde in der Induktionsphase mit dem GMALL Protokoll 07/2003 ohne Doxorubicin, 2 Patienten wurde mit Doxorubicin behandelt. Elf Patienten wurde mit Daunorubicin und Cytarabin behandelt. Fünf Probanden hatten im Verlauf der Induktionstherapie eine Blastenpersistenz. Acht Probanden (1, 3, 7, 8, 9, 10, 13, 14) litten im Verlauf an einem Rezidiv, so dass erneut Blasten im Blut oder im Knochenmark nachgewiesen werden konnten. Bei elf Probanden (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14) wurde aufgrund eines Rezidivs oder eines Risikoprofils eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt. Bei Proband 1 wurde ein 3 MRGN *E. coli* nachgewiesen. Bei den Probanden 2, 7 und 12 wurde ein VRE nachgewiesen, während bei nur einem Probanden, Proband 2, ein 4 MRGN *E. aerogenes* nachgewiesen wurden. Die vier Probanden 1, 2, 7, und 12, verstarben während der Studie. Bei fünf Probanden konnte via Blutkultur eine Infektion und deren Auslöser gefunden werden. Des Weiteren hatten fünf Probanden eine Infektion des zentralen Venenkatheters. Drei Probanden hatten einen Harnwegsinfekt. Zwölf Probanden hatten Fieber in der Aplasiezeit und neun Probanden hatten Fieber zum Zeitpunkt der Stuhlprobenabgabe.

Tabelle 4.

Therapieverlauf der Patienten mit akuter Leukämie

Merkmale der LEU-Patienten	Anzahl Patienten (%)
Induktionstherapie	
GMALL Protokoll 07/2003 (ohne Doxorubicin)	1 (7)
GMALL Protokoll 07/2003	2 (14)
Daunorubicin/Cytarabin	11 (64)
Weiterer Therapieverlauf	
Blastenpersistenz an Tag 15 der Induktionstherapie	5 (36)
Rezidiv der akuten Leukämie	8 (57)
Allogene Stammzelltransplantation	11 (79)
Klinische Infektionen	
Infektionen in der Blutkultur nachgewiesen	5 (36)
Positiver Rektalabstrich	5 (36)
3 MRGN	1 (7)
4 MRGN	1 (7)
VRE	3 (21)
Infektion des zentralen Venenkatheters	5 (36)
Harnwegsinfekt	3 (21)
Fieber in Aplasie	12 (86)
Fieber zum Zeitpunkt der Stuhlprobenabgabe	9 (64)

Anmerkung. LEU = Akute Leukämie; MRGN = multiresistente Gram negative Keime; VRE = Vancomycin resistente Enterokokken

Überblick über die antibiotische Therapie der LEU-Patienten

Im Durchschnitt bekam jeder LEU-Patient 6.4 ± 2.5 verschiedene Antibiotika. Die Anzahl der verschiedenen Antibiotika pro LEU Patient werden in **Abbildung 15** dargestellt. Der Proband 2 bekam mit zwölf verschiedenen antibiotischen Medikamenten die höchste Anzahl. Die Probanden 7, 11 und 13 bekamen mit drei verschiedenen Antibiotika die geringste Anzahl. Die Probanden 6 und 12 wurden mit fünf verschiedenen Antibiotika behandelt. Sechs verschiedene Antibiotika erhielten die Probanden 1 und 5. Die Probanden 3, 10 und 14 bekamen sieben unterschiedliche Antibiotika, während die Probanden 4 und 9 mit acht verschiedenen Antibiotika behandelt wurden. Der Proband 8 erhielt neun verschiedene Antibiotika und Proband 2 erhielt 12 verschiedene Antibiotika.

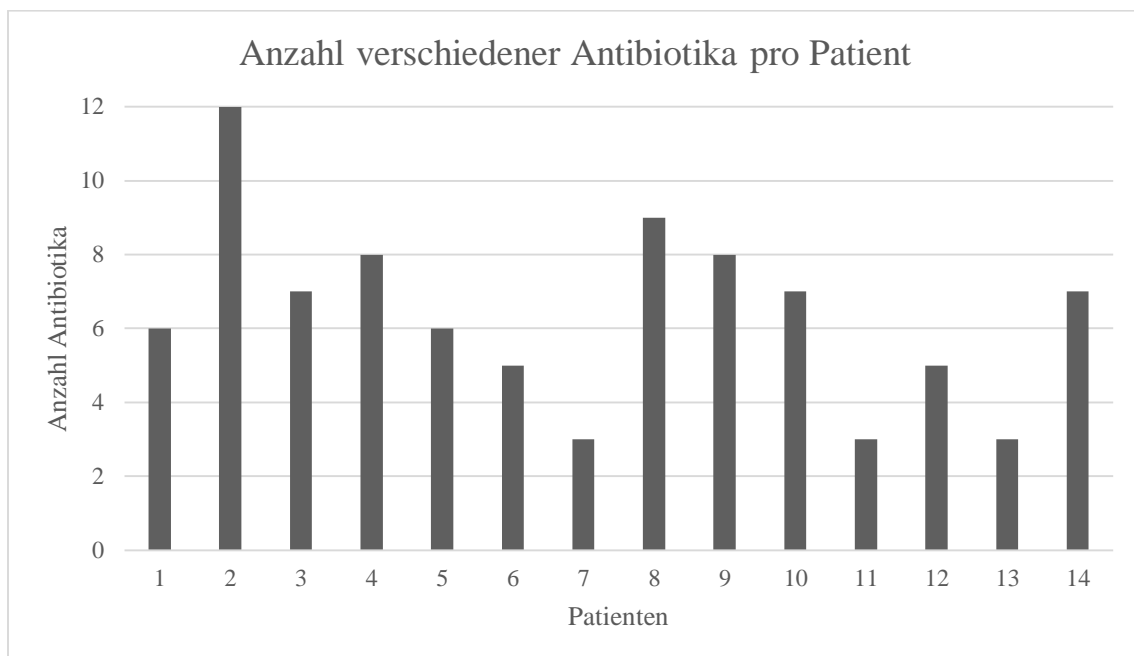


Abbildung 15. Anzahl verschiedener Antibiotika pro LEU-Patient

Insgesamt wurden 15 verschiedene Wirkstoffe zur Behandlung verwendet. In **Abbildung 16** sind die verschiedenen Antibiotika, die die Patienten bekommen haben, und die Anzahl der Patienten, die diese erhalten haben vermerkt. Alle 14 Patienten bekamen Acylaminopenicillin, wobei nur ein Patient Glycylcycline bekam. Insgesamt 13 Patienten erhielten Fluorchinolon, 12 Patienten Carbapenem, 8 Patienten Sulfonamid, 7 Patienten Glykopeptid, 6 Patienten Aminoglykosid, 5 Patienten erhielten Nitroimidazol und 5 Patienten Cephalosporin, jeweils 3 Patienten erhielten Monobactam, Oxazolidinon, Linkosamid und Aminopenicillin, jeweils 2 Patienten erhielten Makrolid und Fosfomycin.

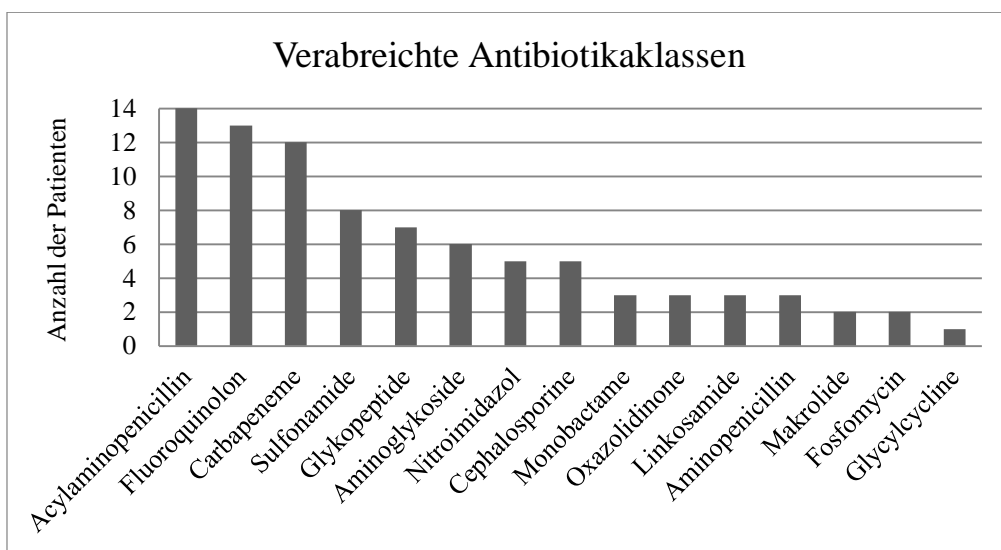


Abbildung 16. Verabreichte Antibiotikaklassen

Vergleich der bakteriellen Diversität anhand der OTUs zwischen den Probandengruppen

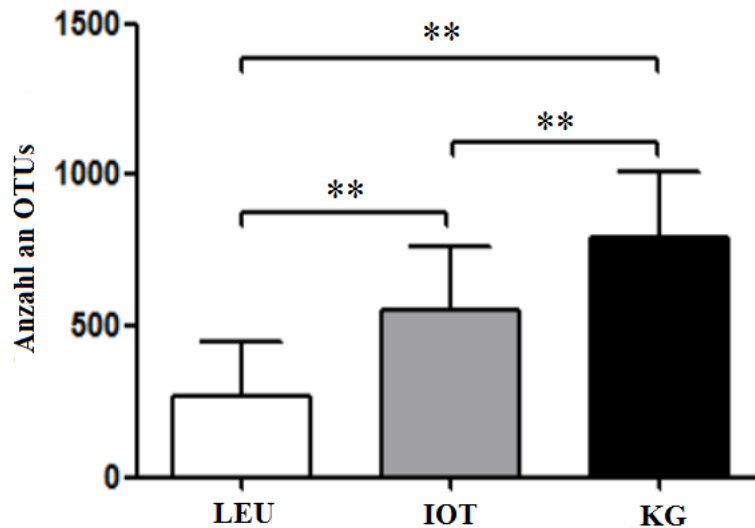


Abbildung 17. Vergleich der bakteriellen Diversität in OTUs in den drei Gruppen LEU, IOT und KG. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert. LEU = akute Leukämie; IOT = Patienten aus der interdisziplinären onkologischen Tagesklinik; KG = Kontrollgruppe; ** = $p < .001$; OTU = operational taxonomic unit

Insgesamt wurden in allen sequenzierten Proben 49351 verschiedene OTUs⁸ identifiziert. Die Proben wurden drei Gruppen zugeordnet, der Gruppe der LEU-Patienten, der IOT-Patienten und der Kontrollgruppe. In der LEU-Gruppe wurden 54 Stuhlproben, in der IOT und Kontrollgruppe jeweils 26 Stuhlproben sequenziert. Die Summe der OTUs in der LEU-Gruppe betrug 14485, in der IOT-Gruppe 14347 und in der Kontrollgruppe 20519. In **Abbildung 17** wird der jeweilige Mittelwert der LEU-Gruppe, der IOT-Gruppe und der KG dargestellt. Der Mittelwert der OTUs der LEU-Gruppe betrug 268.2 mit einer Standardabweichung von 178.9 OTUs, während der Mittelwert der IOT-Gruppe 551.8 OTUs und die Standardabweichung 209.7 OTUs betrug. In der KG betrug der Mittelwert der OTUs 789.2 mit einer Standardabweichung von 217.5 OTUs. Zwischen der LEU und der IOT Gruppe ergab sich ein signifikanten Unterschied ($z = -5.22$, $p < .001$), dabei waren signifikant mehr OTUs in der IOT Gruppe ($M = 551.8$, $SD = 209.7$) vorhanden als in der LEU Gruppe ($M = 268.2$, $SD = 178.9$). Werden die LEU- und die KG-Gruppe

⁸ Operational taxonomic units

miteinander verglichen, so ergab sich ein signifikanter Unterschied mit $z = -6.55$, $p < .001$. In der Kontrollgruppe ($M = 789.2$, $SD = 217.5$) waren signifikant mehr OTUs vorhanden als in der LEU-Gruppe ($M = 268.2$, $SD = 178.9$). Außerdem wurde ein signifikanter Unterschied von $z = -3.57$, $p < .001$ zwischen der IOT und der KG Gruppe festgestellt, dabei waren in der Kontrollgruppe ($M = 789.2$, $SD = 217.5$) signifikant mehr OTUs vorhanden als in der IOT Gruppe ($M = 551.8$, $SD = 209.7$). Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Diversität gemessen anhand der OTUs zwischen den drei Gruppen signifikant unterschiedlich war.

Vergleich der bakteriellen Diversität anhand des Shannon Index zwischen den Probandengruppen

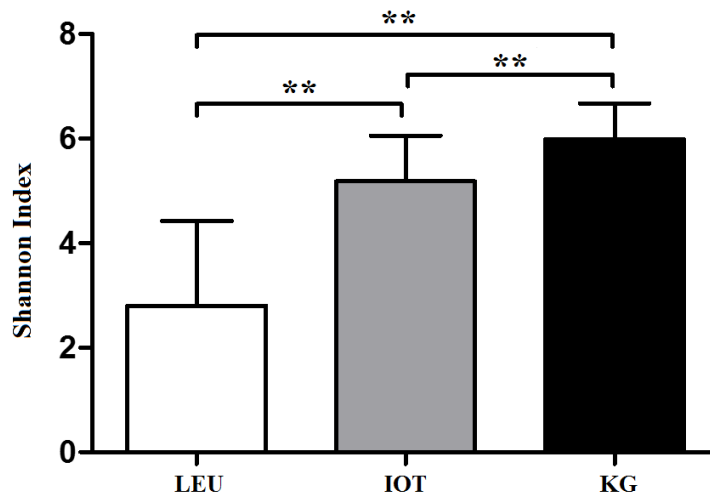


Abbildung 18. Vergleich der bakteriellen Diversität anhand des Shannon Index in den drei Gruppen LEU, IOT und KG. LEU = akute Leukämie; IOT = Patienten aus der interdisziplinären onkologischen Tagesklinik; KG = Kongrollgruppe; ** = $p < .001$;

Wie oben beschreiben wurden 54 Proben der LEU-Gruppe sowie jeweils 26 Proben der IOT und Kontrollgruppe sequenziert. Es erfolgte die Berechnung des Shannon Index für jede Probe. Der Summe des Shannon Index in der KG Gruppe betrug 155.6, in der IOT Gruppe 134.8 und in der LEU Gruppe 151.2. In **Abbildung 18** wurden die Mittelwerte inklusive Standardabweichung des Shannon Index der LEU-Gruppe, IOT-Gruppe und der Kontrollgruppe dargestellt. Der Mittelwert des Shannon Index der LEU-Gruppe betrug 2.8 mit einer Standardabweichung von 1.6. In der IOT-Gruppe betrug der Mittelwert des Shannon Index 5.2 mit einer Standardabweichung von 0.9. In der Kontrollgruppe betrug der Mittelwert des Shannon Index 6.0 mit einer Standardabweichung von 0.8. Zusätzlich wird der signifikante Unterschied zwischen den drei Gruppen in **Abbildung 18** dargestellt. Zwischen der LEU und der IOT Gruppe ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p < .001$), wobei der Shannon Index in der IOT Gruppe ($M = 5.2, SD = 0.9$) signifikant höher war als in der LEU Gruppe ($M = 2.8, SD = 1.6$). Werden die IOT und die Kontrollgruppe miteinander verglichen ergab sich ein signifikanter Unterschied mit $p < .001$. Der Shannon Index war in der Kontrollgruppe ($M = 6.0, SD = 0.8$) signifikant höher als in der IOT Gruppe ($M = 5.2, SD = 0.9$). Ebenso ergab sich im Vergleich zwischen LEU und Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied

von $p < .001$. In der Kontrollgruppe ($M = 6.0$, $SD = 0.8$) war der Shannon-Index signifikant höher als in der LEU Gruppe ($M = 2.8$, $SD = 1.6$). Es lässt sich zusammenfassen, dass die alpha-Diversität gemessen anhand des Shannon Index zwischen den drei Gruppe signifikant unterschiedlich war.

*Entwicklung der bakteriellen Diversität anhand der OTUs im Therapieverlauf
ausgewählter LEU-Patienten*

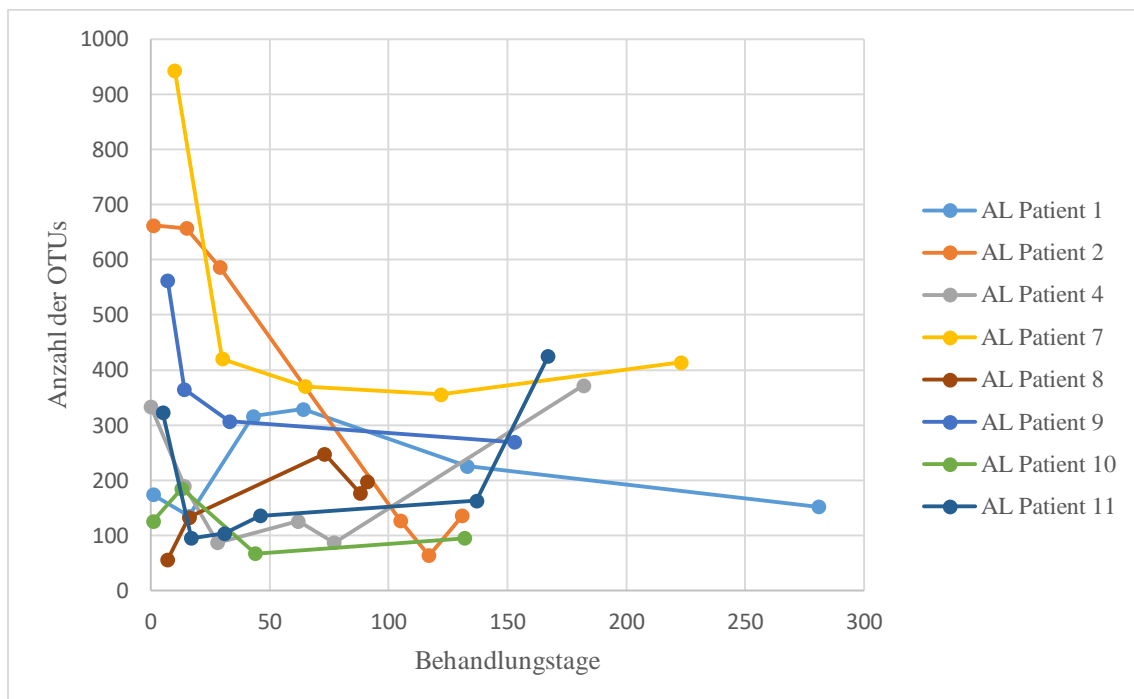


Abbildung 19. Die Entwicklung der bakteriellen Diversität, dargestellt anhand der Anzahl der OTUs im Therapieverlauf (in Behandlungstagen) bei acht ausgewählten LEU-Patienten. OTU = operational taxonomic unit

In **Abbildung 19** wird der Verlauf der bakteriellen Diversität mittels der OTUs für acht LEU-Patienten exemplarisch dargestellt. Die maximale Anzahl an identifizierten OTUs im Stuhlmikrobiom hatte der LEU-Patient 7 an Tag 10 der Behandlung mit 943 OTUs. Die kleinste Anzahl an nachgewiesenen OTUs befand sich im Stuhlmikrobiom des LEU-Patienten 2 117 Tag nach dem Behandlungsbeginn.

Bei LEU-Patient 1 ist die minimale OTU Anzahl 174 an Tag 1 zu Beginn der chemotherapeutischen Behandlung. Die OTUs verminderten sich bis zum Tag 16 der Induktionstherapie auf 135, stiegen bis auf 329 an Tag 64 an, um dann 281 Tag nach

Therapiebeginn auf 152 OTUs abzufallen. Bei LEU-Patient 2 sind an Tag 1 der chemotherapeutischen Behandlung 662 OTUs identifiziert worden. An Tag 15 fiel die Anzahl der OTUs auf 657, an Tag 29 auf 587 und an Tag 105 auf 127. 117 Tage nach Therapiebeginn sind die OTUs auf 64 abgefallen. Sie stiegen auf 136 OTUs nach 131 Tagen an.

Der LEU-Patient 4 startete vor Beginn der Therapie mit 333 OTUs. Diese fielen auf einen Wert von 190 OTUs 14 Tage nach Therapiebeginn ab. Sie sanken bis auf 87 OTUs 28 Tage nach Therapiebeginn. Sie stiegen kurzfristig auf 126 OTUs am 62. Tag nach Beginn der Therapie, um dann 15 Tage später wieder auf 87 OTUs abzufallen. 182 Tage nach Therapiebeginn wurden 372 OTUs identifiziert.

Der LEU-Patient 7 hatte 10 Tage nach Therapiebeginn 943 identifizierte OTUs im Stuhlmikrobiom. 30 Tage nach Therapiebeginn fiel die Anzahl der OTUs auf 420. 65 Tage nach Therapiebeginn betrug die Anzahl der OTUs 370. Die Anzahl der OTUs fiel bis zum Tag 122 weiter auf 356 OTUs. An Tag 223 stiegen sie wieder auf 414 OTUs an.

Der LEU-Patient 8 hatte bereits an Tag 7 der chemotherapeutischen Behandlung nur noch 56 OTUs. An Tag 16 betrug die Anzahl der OTUs 133. Diese stiegen bis zum Tag 73 auf 248 OTUs an. 15 Tage später sind die OTUs jedoch wieder auf eine Anzahl von 177 abgefallen. Sie stiegen erneut bis auf 198 OTUs an Tag 91 nach Therapiebeginn wieder an.

Der LEU-Patient 9 hatte an Tag 7 der chemotherapeutischen Therapie 562 OTUs im Stuhlmikrobiom. Die Anzahl der OTUs betrug an Tag 14 nach Therapiebeginn 365 und an Tag 33 307 OTUs. Die Anzahl der OTUs fiel bis zum Tag 153 kontinuierlich auf 269 OTUs ab.

Der LEU-Patient 10 hatte zu Beginn der Behandlung 126 nachgewiesene OTUs im Stuhlmikrobiom. Die Anzahl der OTUs stieg bis zum Tag 13 auf 185 an. Innerhalb von 31 Tagen fielen sie jedoch wieder auf 67 OTUs ab. An Tag 132 der Behandlung wurden 95 OTUs nachgewiesen.

Bei LEU-Patient 11 waren an Tag 5 323 OTUs im Mikrobiom. Innerhalb von 12 Tagen waren nur noch 95 OTUs nachweisbar. Der Wert stieg an Tag 31 auf 104 OTUs an. Im

Anschluss darin stieg die Anzahl der OTUs in der Stuhlprobe an. An Tag 46 waren es 136 OTUs, an Tag 137 163 OTUs und an Tag 167 425 OTUs.

Vergleich der Bakterienmenge zwischen den Probandengruppen

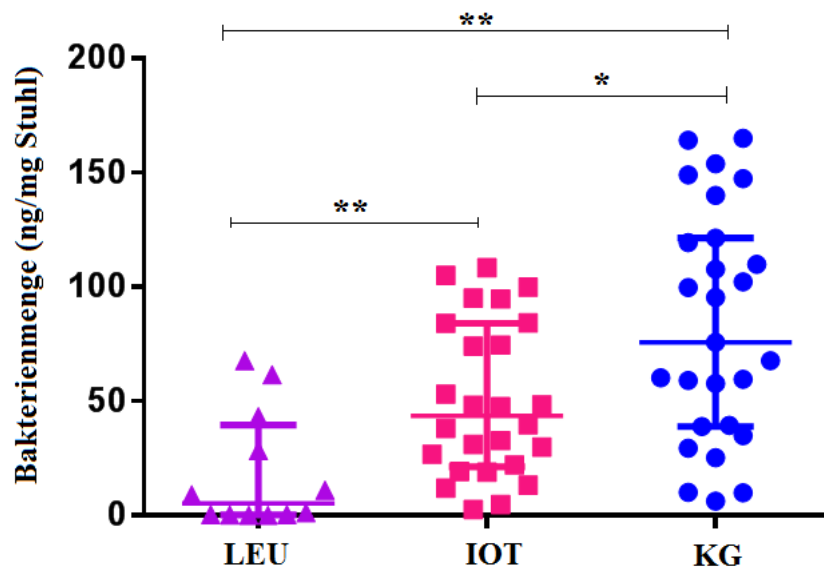


Abbildung 20. Bakterienmenge in ng/mg Stuhl der drei Gruppen im Vergleich. LEU = Akute Leukämie; IOT = Patienten aus der interdisziplinären onkologischen Tagesklinik; KG = Kontrollgruppe; * = $p < .05$; ** = $p < .001$

Durch die quantitative Polymerase-Kettenreaktion wurde die Menge an Bakterien in ng pro mg Stuhl ermittelt. In der LEU-Gruppe wurden 56 Proben, in der IOT-Gruppe 26 und in der Kontrollgruppe ebenfalls 26 Stuhlproben ausgewertet. In **Abbildung 20** sind die jeweiligen Bakterienmengen in ng/mg Stuhl der drei Gruppen im Vergleich dargestellt. Die maximale Bakterienmenge in der LEU-Gruppe war 92.1 ng/mg Stuhl und die minimale Bakterienmenge betrug 0.0 ng/mg Stuhl. In der IOT-Gruppe betrug die maximale Bakterienmenge 108.4 ng/mg Stuhl und die minimale Menge an Bakterien waren 2.5 ng/mg Stuhl, während in der Kontrollgruppe 165.1 ng/mg Stuhl die maximale Bakterienmenge darstellte. Die minimale Bakterienmenge in der Kontrollgruppe waren 6.3 ng/mg Stuhl. Zwischen den Gruppen LEU und IOT wurde ein signifikanter Unterschied mit $z = -4.77$, $p < .001$ festgestellt, dabei war eine signifikant größere Bakterienmenge in der IOT- Gruppe ($M = 50.3$, $SD = 33.6$) als in der LEU-Gruppe ($M = 15.7$, $SD = 22.4$). Außerdem wurden die LEU- und KG- Gruppe verglichen, wobei ein signifikanter Unterschied mit $z = -5.91$, $p < .001$ bestand. In der KG- Gruppe ($M = 83.3$,

$SD = 50.6$) war eine höhere Menge an Bakterien vorhanden als in der LEU -Gruppe ($M = 15.7, SD = 22.4$). Zwischen der IOT- ($M = 50.3, SD = 33.6$) und der KG- Gruppe ($M = 83.3, SD = 50.6$) wurde ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($z = -2.43, p < .05$) festgestellt.

Entwicklung der Bakterienmenge im Therapieverlauf der LEU-Patienten

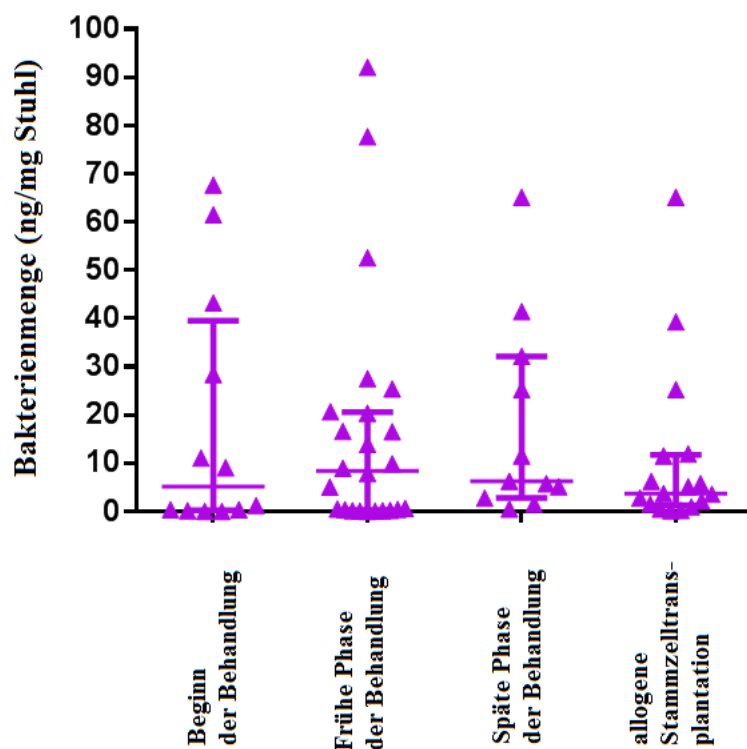


Abbildung 21. Veränderungen der Bakterienmenge (ng/mg Stuhl) im Verlauf zu den Zeitpunkten des Behandlungsbeginns, der frühen und späten Phase der Behandlung und nach der allogenen Stammzelltransplantation.

Die Stuhlgruppen der LEU-Patienten wurde in vier verschiedene Gruppen eingeteilt: Beginn der Behandlung (12 Proben), frühe Phase der Behandlung (24 Proben), späte Phase der Behandlung (11 Proben), nach der allogenen Stammzelltransplantation (17 Proben). In **Abbildung 21** sind die Veränderungen der Bakterienmenge in ng/mg Stuhl im Verlauf (Behandlungsbeginn, frühe Phase, späte Phase, allogene Stammzelltransplantation) dargestellt. Der Mittelwert der Bakterienmenge zu Beginn der Behandlung betrug 18.6 ± 0.7 ng/mg Stuhl. Dieser Wert fiel in der frühen Behandlungsphase auf 16.6 ± 0.7 ng/mg Stuhl ab. In der späten Phase lag der Mittelwert

bei 18.0 ± 0.8 ng/mg Stuhl. Nach einer allogenen Stammzelltransplantation betrug der Mittelwert 11.0 ± 0.3 ng/mg Stuhl. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied mit $z = -.07$, $p = .95$ zwischen den beiden Gruppen Beginn der Behandlung und frühe Phase der Behandlung. Für den Vergleich der Gruppen des Beginns und der späten Phase ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied mit $z = -.86$, $p = .39$. Zwischen den Gruppen der Diagnose und der allogenen Stammzelltransplantation mit $z = -.22$, $p = .83$ bestand ebenfalls kein signifikanter Unterschied. Genauso bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der frühen und der der späten Behandlung mit $z = -.96$, $p = .34$. Vergleicht man die Gruppe der frühen Phase der Behandlung mit der Gruppe nach der allogenen Stammzelltransplantation ergab sich kein signifikanter Unterschied mit $z = -.05$, $p = .96$. Außerdem bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der späten Phase der Behandlung und der Gruppe der allogenen Stammzelltransplantation mit $z = .22$, $p = .23$.

Vergleich des prozentualen Anteils potenziell pathogener Bakterien am Mikrobiom
zwischen der LEU-, IOT- und Kontrollgruppe

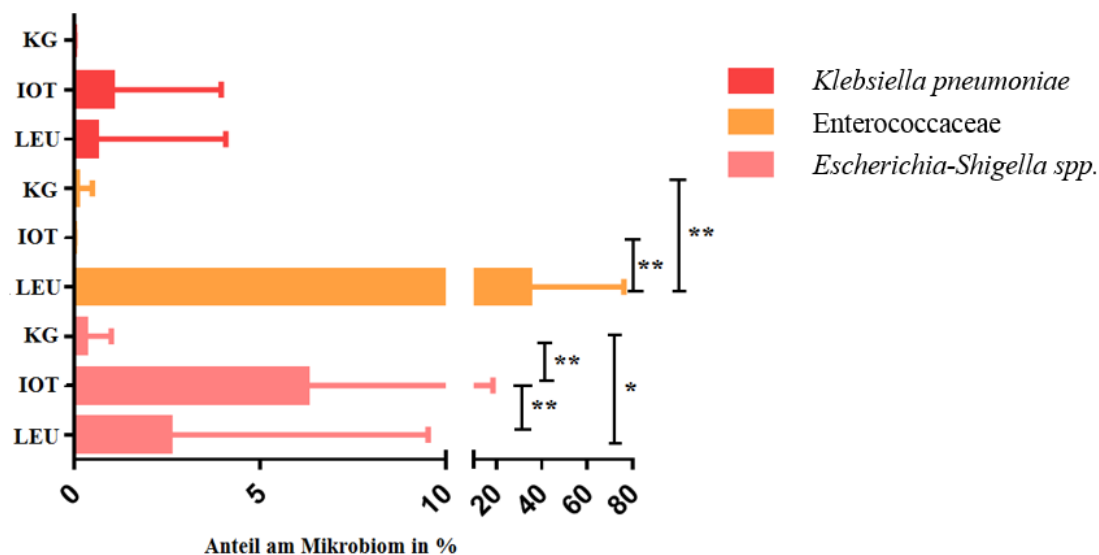


Abbildung 22 Mittelwert des prozentualen Anteils der Bakterien *Klebsiella pneumoniae*, Enterococcaceae und *Escherichia-Shigella spp.* am Mikrobiom der Probanden aus den drei Gruppen LEU, KG und IOT. LEU = Akute Leukämie; IOT = Patienten aus der interdisziplinären onkologischen Tagesklinik; KG = Kontrollgruppe; * = $p < .05$; ** = $p < .001$

Der prozentuale Anteil der Bakterien *Klebsiella pneumoniae*, Enterococcaceae und *Escherichia-Shigella spp.* am gesamten Mikrobiom wurde pro Stuhlprobe ermittelt. In **Abbildung 22** sind die Mittelwerte der prozentualen Anteile der Bakterien *Klebsiella pneumoniae*, Enterococcaceae sowie *Escherichia-Shigella spp.* am Mikrobiom der Probanden aus den drei Gruppen LEU, IOT und Kontrollegruppe dargestellt.

Klebsiella pneumoniae

Im Durchschnitt war $0.5 \pm 6.1\%$ *Klebsiella pneumoniae* pro Probe im Stuhl der LEU-Gruppe, $1.01 \pm 2.94\%$ im Stuhl der IOT-Gruppe und $0.0 \pm 0.0\%$ im Stuhl der Kontrollgruppe nachweisbar. Zwischen den Gruppen LEU und IOT mit $z = -1.05$, $p > .05$ bestand kein signifikanter Unterschied. Außerdem konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen LEU und KG mit $z = -1.07$, $p > .05$ festgestellt werden. Des Weiteren bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der IOT und der KG Gruppe mit $z = .08$, $p > .05$.

Enterococcaceae

Im Durchschnitt waren $34.4 \pm 41.7\%$ Enterococcaceae pro Probe im Stuhl der LEU-Gruppe, 0.0% pro Probe im Stuhl der IOT-Gruppe und $0.1 \pm 0.4\%$ pro Probe im Stuhl der Kontrollgruppe nachzuweisen. Zwischen der LEU und der IOT Gruppe bestand ein signifikanter Unterschied mit $z = -6.17$, $p < .001$, wobei der prozentuale Anteil von Enterococcaceae in der LEU Gruppe ($M = 34.4$, $SD = 41.7$) signifikant höher war als in der IOT Gruppe ($M = 0.0$, $SD = 0.0$). Für den Vergleich der LEU- und der KG-Gruppe ergaben die Berechnungen einen signifikanten Unterschied mit $z = -5.77$, $p < .001$. In der LEU- Gruppe ($M = 34.4$, $SD = 41.7$) waren signifikant mehr Prozent an Enterococcaceae im Stuhl nachweisbar als in der Kontrollgruppe ($M = 0.1$, $SD = 0.4$). Zwischen der IOT und der KG Gruppe bestand kein signifikanter Unterschied mit $z = -0.42$, $p > .05$.

Escherichia-Shigella spp.

Im Durchschnitt waren $2.6 \pm 7.0\%$ *Escherichia-Shigella spp.* pro Probe im Stuhl der LEU-Gruppe, $6.3 \pm 12.3\%$ pro Probe im Stuhl der IOT-Gruppe und 0.3 ± 0.7 im Stuhl der Kontrollgruppe. Für die Vergleiche der prozentualen Anteile von *Escherichia-Shigella spp.* am Stuhlmikrobiom der drei verschiedenen Gruppen wurde ebenfalls die Signifikanz der Unterschiede berechnet. Zwischen der LEU- und der IOT- Gruppe ergab sich ein signifikanter Unterschied mit $z = -5.02$. In der IOT- Gruppe ($M = 6.3$, $SD = 12.3$) war der prozentuale Anteil von *Escherichia-Shigella spp.* signifikant höher als in der LEU- Gruppe ($M = 2.6$, $SD = 7.0$). Des Weiteren bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der LEU und der KG-Gruppe mit $z = -2.53$, $p < .05$, wobei in der LEU- Gruppe ($M = 2.6$, $SD = 7.0$) signifikant mehr *Escherichia-Shigella spp.* in Prozent vorhanden waren als in der KG Gruppe ($M = 0.3$, $SD = 0.7$). Außerdem bestand auch zwischen der IOT- und der KG -Gruppe ein signifikanter Unterschied. In der IOT- Gruppe ($M = 6.3$, $SD = 12.3$) war der prozentuale Anteil von *Escherichia-Shigella* signifikant höher als in der KG- Gruppe ($M = 0.3$, $SD = 0.7$).

Vergleich des prozentualen Anteils potenziell protektiver Bakterien am Mikrobiom
zwischen der LEU-, IOT- und Kontrollgruppe

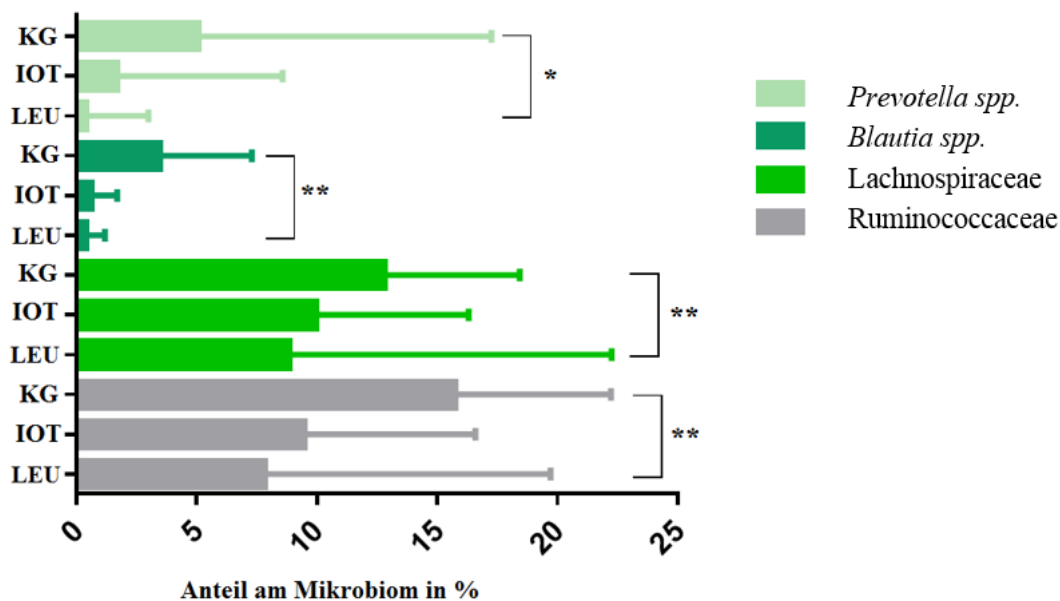


Abbildung 23 Prozentualer Anteil der Bakterien *Prevotella spp.*, *Blautia spp.*, Lachnospiraceae und Ruminococcaceae am Mikrobiom der drei Gruppen LEU, IOT und KG; LEU = Akute Leukämie; IOT = Patienten aus der interdisziplinären onkologischen Tagesklinik; KG = Kontrollgruppe; * = $p < .05$; ** = $p < .001$

Aus den Ergebnissen der 16s rDNA Sequenzierung wurde der prozentuale Anteil am gesamten Mikrobiom pro Stuhlprobe der vier verschiedenen potentiell protektiven Bakterien ermittelt (*Prevotella spp.*, *Blautia spp.*, Lachnospiraceae und Ruminococcaceae). In **Abbildung 23** werden die o.g. prozentualen Anteile der Bakterien *Prevotella spp.*, *Blautia spp.*, Lachnospiraceae und Ruminococcaceae am gesamten Mikrobiom pro Stuhlprobe zwischen den drei Gruppen (LEU, IOT und Kontrollgruppe) verglichen.

Prevotella spp.

Im Durchschnitt waren $0.4 \pm 2.6\%$ *Prevotella spp.* pro Probe im Stuhl der LEU-Gruppe, $1.7 \pm 6.89\%$ pro Probe im Stuhl der IOT-Gruppe und 5.1 ± 12.1 im Stuhl der Kontrollgruppe. Es bestand kein signifikanter Unterschied mit $z = -.12$, $p > .05$ zwischen dem prozentualen Anteil von *Prevotella spp.* in der LEU- ($M = 0.4$, $SD = 2.6$) und der IOT- Gruppe ($M = 1.7$, $SD = 6.89$). Außerdem existierte kein signifikanter Unterschied zwischen der IOT- ($M = 1.69$, $SD = 6.9$) und der KG -Gruppe ($M = 5.1$, $SD = 12.1$) mit $z = -1.77$, $p > .05$. Allerdings wurde ein signifikanter Unterschied mit $z = -2.19$, $p < .05$

zwischen der LEU- und der KG -Gruppe festgestellt, dabei war in der KG -Gruppe ($M = 5.1$, $SD = 12.1$) signifikant mehr *Prevotella spp.* in Prozent vorhanden.

Blautia spp.

Im Durchschnitt waren $0.5 \pm 0.7\%$ *Blautia spp.* pro Probe im Stuhl der LEU-Gruppe, $0.7 \pm 1.1\%$ pro Probe im Stuhl der IOT-Gruppe und 3.5 ± 3.8 im Stuhl der Kontrollgruppe. Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen dem prozentualen Anteil an *Blautia spp.* in der LEU- Gruppe und der IOT- Gruppe mit $z = - 2.22$, $p < .05$ berechnet. In der IOT-Gruppe ($M = 0.7$, $SD = 1.1$) war der Anteil an *Blautia spp.* signifikant höher als in der LEU -Gruppe ($M = 0.5$, $SD = 0.7$). Außerdem ergab sich ein signifikanter Unterschied mit $z = - 6.02$, $p < .001$ zwischen der LEU- und KG- Gruppe, dabei war der Anteil in der KG- Gruppe ($M = 3.5$, $SD = 3.8$) signifikant höher als in der LEU- Gruppe ($M = 0.5$, $SD = 0.7$). Auch zwischen der IOT- und KG-Gruppe ließ sich ein signifikanter Unterschied von $z = - 4.75$, $p < .001$ feststellen. In der KG -Gruppe ($M = 3.5$, $SD = 3.8$) war der prozentuale Anteil von *Blautia spp.* signifikant höher als in der IOT- Gruppe ($M = 0.7$, $SD = 1.1$).

Lachnospiraceae

Im Durchschnitt waren $8.9 \pm 13.4\%$ Lachnospiraceae pro Probe im Stuhl der LEU-Gruppe, $10.0 \pm 6.4\%$ pro Probe im Stuhl der IOT-Gruppe und 12.9 ± 5.6 im Stuhl der Kontrollgruppe. Zwischen der LEU- ($M = 8.9$, $SD = 13.4$) und der IOT- Gruppe ($M = 10.0$, $SD = 6.4$) existierte ein signifikanter Unterschied mit $z = - 2.52$, $p < .05$. Es bestand auch zwischen der LEU- ($M = 8.9$, $SD = 13.4$) und der KG- Gruppe ($M = 12.9$, $SD = 5.6$) ein signifikanter Unterschied mit $z = - 3.43$, $p = .001$. Für den Vergleich zwischen der IOT -($M = 10.0$, $SD = 6.4$) und der KG- Gruppe ($M = 12.9$, $SD = 5.6$) ergaben die Berechnungen ebenfalls einen signifikanten Unterschied mit $z = - 2.09$, $p < .05$.

Ruminococcaceae

Im Durchschnitt waren $7.9 \pm 11.8\%$ Ruminococcaceae. pro Probe im Stuhl der LEU-Gruppe, $9.5 \pm 11.8\%$ pro Probe im Stuhl der IOT-Gruppe und 15.8 ± 6.5 im Stuhl der Kontrollgruppe. Der Mann-Whitney U-Test ergab für den Vergleich des prozentualen Anteils der Ruminococcaceae der Gruppen LEU und IOT einen signifikanten Unterschied mit $z = - 2.43$, $p < .05$, dabei war der prozentuale Anteil der IOT- Gruppe ($M = 9.5$, $SD = 11.9$) signifikant höher als der der LEU-Gruppe ($M = 7.9$, $SD = 11.8$). Des Weiteren ergab

der Vergleich zwischen der LEU- ($M = 7.9$, $SD = 11.8$) und der KG -Gruppe ($M = 15.8$, $SD = 6.5$) einen signifikanten Unterscheid mit $z = - 4.06$, $p < .001$. Auch zwischen der IOT- ($M = 9.5$, $SD = 11.8$) und der KG- Gruppe ($M = 15.8$, $SD = 6.5$) bestand ein signifikanter Unterschied mit $z = - 3.15$, $p < .05$.

Kultivierte Bakterien als Auslöser von klinischen Infektionen und deren Vorhandensein im Mikrobiom vor der Infektion

Tabelle 5.

Kultivierte Bakterien in den mikrobiologischen Proben als Auslöser von klinischen Infektionen und deren Vorhandensein im Mikrobiom (als 16s rDNA) allgemein und vor dem Auftreten der klinischen Symptomatik.

Mikrobiologische Probe	Kultivierte Bakterien	Im Mikrobiom?	Vor der klinischen Symptomatik?
Blutkultur	<i>Propriobacterium</i>	Nein	Nein
Blutkultur	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Nein	Nein
Blutkultur	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Nein	Nein
Blutkultur	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Ja	Nein
Blutkultur	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ja	Ja
Blutkultur	<i>E. coli</i> , später 3 MRGN	Ja	Ja
Blutkultur	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Ja	Ja
Blutkultur	<i>E. coli</i> 3 MRGN	Ja	Ja
Blutkultur	<i>E. coli</i>	Ja	Ja
Blutkultur	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Ja	Ja
ZVK	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Ja	Ja
ZVK	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Ja	Ja

Anmerkung. ZVK = zentraler Venenkatheter; *E. coli* = *Escherichia coli*; MRGN = multiresistente gram negative Bakterien

Insgesamt wurden im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg in zwölf verschiedenen mikrobiologischen Proben der LEU-Patienten (10 periphere Blutkulturen und 2 Blutkulturen aus dem zentralen Venenkatheter) Bakterien kultiviert und somit als Auslöser für infektiöse Komplikationen nachgewiesen. Es wurde *Propionibacterium*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* 3 MRGN, zwei Mal *E. coli* und vier Mal *Staphylococcus epidermidis* nachgewiesen. Diese werden in **Tabelle 5** aufgelistet. Die Proben stammen von elf verschiedenen LEU-Patienten. Bei einem LEU-Patienten wurde sowohl in der peripheren Blutkultur, als auch in der Blutkultur aus dem zentralen Venenkatheter *Staphylococcus epidermidis* kultiviert. Von neun der zwölf Bakterienkulturen war entsprechende 16s rDNA bereits im Mikrobiom vorhanden, davon war bei acht die 16s rDNA der Bakterienspezies der Kultur vor einer klinischen Symptomatik und damit auch vor dem Nachweis der mikrobiologischen Diagnostik im Mikrobiom nachweisbar. In drei Fällen war die 16s rDNA der Bakterienspezies nicht im Mikrobiom vorhanden. In einem Fall war zwar die 16s rDNA im Mikrobiom vorhanden, jedoch nicht vor dem Auftreten einer klinischen Symptomatik.

Vier repräsentative LEU-Patienten mit erheblichen Veränderungen des Mikrobioms im
Therapieverlauf

Patient 1

Abbildung 24 Veränderungen der relativen Häufigkeiten (in %) der verschiedenen Familien des intestinalen Mikrobioms des akuten Leukämie -Patienten 1 über den Zeitverlauf der Behandlung (Tag 1 = Tag 1 des ersten Chemotherapiezyklus)

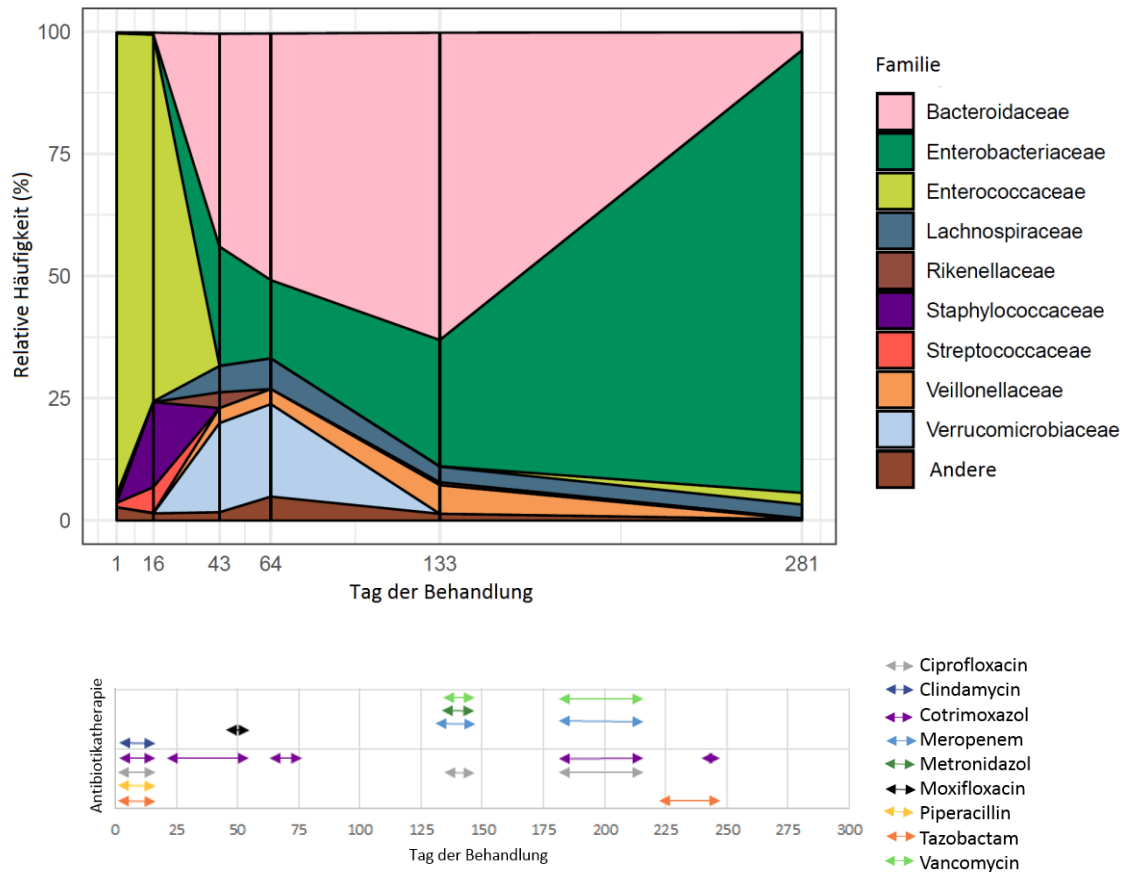


Abbildung 25. Graphische Darstellung der verschiedenen Antibiotikatherapien (in den jeweiligen farblichen Darstellungen) des akuten Leukämie-Patienten 1 über den Zeitverlauf der Behandlung (Tag 1 = Tag 1 des ersten Chemotherapiezyklus).

Der Patient 1 litt an einer bcr-abl positiven cALL. Die Vorphase und Induktionstherapie wurde nach dem GMALL-Protokoll verabreicht. Die jeweilige Zusammensetzung des Mikrobioms zu den Zeitpunkten der Stuhlprobenabgaben kann in **Abbildung 24** eingesehen werden. Zusätzlich ist die antibiotische Therapie im Verlauf der Behandlung (bis zum Tag 300) in **Abbildung 25** einzusehen. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und der ersten Stuhlprobenabgabe hatte der Patient bereits bis zu 38,5°C Fieber am wahrscheinlichsten auf Grund eines Panaritiums am rechten Daumen. Er wurde daraufhin

mit Tazobactam, Piperacillin, Cotrimoxazol, Clindamycin und Ciprofloxacin behandelt. Cotrimoxazol wurde mit kurzen Unterbrechungen bis zum 75. Tag der Behandlung weiter geführt. In der Aplasiaphase bestanden keine weiteren Komplikationen. Bereits zu Beginn bestanden 94% seines Stuhlmikrobioms aus *Enterococcus faecium*. Bei der 3. Stuhlprobe hat sich der Enterokokkengehalt auf 0.04% vermindert. Er stieg bis zum Ende auf 2% an. In der 3. Stuhlprobe betrug der Anteil an Bacteroidetes 47%. Dieser stieg in der 4. und 5. Probe von 54% auf 63% weiter an. In der Probe nach der allogenen Stammzelltransplantation fiel der Wert auf 4%. Auffallend ist, dass der Prozentanteil der Enterobacteriaceae in der 6. Probe 91% betrug. In der 3. Probe waren 24%, in der 4. Probe waren 16% und in der 5. Probe waren 26% Enterobacteriaceae. Sechs Tage nach der 3. Stuhlprobenabgabe hatte der Patient einen deutlichen Fieberanstieg und wurde mit Moxifloxacin therapiert. Eine Lokalisation des Infektfokus war nicht möglich. Fünf Tage nach der 4. Stuhlprobe war der Anus-Abstrich im Rahmen des Routinescreenings positiv. Es wurde ein 3 MRGN *E. coli* nachgewiesen. Zwei Tage nach der vorletzten Stuhlprobenabgabe wurde in den Blutkulturen aus der Peripherie *Klebsiella oxytoca* nachgewiesen. Außerdem wurden Blutkulturen aus dem zentralen Venenkatheter abgenommen, darin wurden *Staph. epidermidis* und *Klebsiella oxytoca* nachgewiesen. Der Patient befand sich in diesem Zeitraum in einer protrahierten Aplasiaphase und hatte Fieber. Als Infektfokus wurden der ZVK und die Mukositis 4. Grades festgelegt. Der Patient wurde antibiotisch mit Ciprofloxacin, Cotrimoxazol, Meropenem und Vancomycin behandelt. Im Verlauf erlitt der Patient ein Rezidiv der cALL mit Blastenausschwemmung. Es fand eine Salvagetherapie nach dem FLAG-IDA-Protokoll statt. In der darauffolgenden Aplasiaphase hatte der Patient Diarrhoen. Die Verdachtsdiagnose war eine Mukositis mit bakterieller Durchwanderung des Darms. Unter einer antibiotischen Therapie mit Cotrimoxazol und Tazobactam besserte sich der Zustand rasch. Im Verlauf hatte der Patient immer wieder Fieberspitzen bis 38,6°. Wegen des Verdachts auf eine Katheterinfektion wurde der ZVK gewechselt und die antibiotische Therapie auf Meropenem umgestellt. Im neuen ZVK wurde im Verlauf ein *E. coli* mittels Blutkulturen nachgewiesen. Aufgrund einer positiven minimalen Resterkrankung wurde die allogene Stammzelltransplantation durchgeführt. Bei der stationären Aufnahme zeigten sich noduläre Veränderungen in der Lunge und der Leber. Es wurde die Verdachtsdiagnose einer hepatolienalen Candidiasis mit zusätzlich

entzündlichen Veränderungen der Lunge gestellt und eine Behandlung mit Tazobactam und Caspofungin begonnen. Die Konditionierungstherapie für die allogene Stammzelltransplantation bestand aus Fludarabin und Busulfan. Die allogene Stammzelltransplantation konnte daraufhin komplikationslos durchgeführt werden. Es erfolgten eine stabile Regeneration der Neutrophilen und ein unsubstituierter Anstieg der Thrombozyten. Vor Entlassung stiegen die CMV-Kopien im EDTA-Blut an. Dieser Anstieg wurde mit Ganciclovir behandelt. Der Patient bekam erneut ein Rezidiv der c-ALL mit Blastenausschwemmung. Es erfolgte eine erneute Behandlung mit einer Vorphasetherapie bestehend aus Cyclophosphamid, Dexamethason und Dasatinib. Im Rahmen dieses stationären Aufenthalts wurde die letzte Stuhlprobe für diese Studie abgegeben. In der Aplasiephase fieberte der Patient wieder auf, in der Diagnostik ließ sich kein Infektfokus finden. In der Remissionskontrolle zeigte sich eine komplette Remission. Der Patient litt zunehmend unter Husten. Im low-dose CT-Thorax sah man Infiltrate, die am ehesten mit einer atypischen Pilzpneumonie vereinbar waren. Der Patient bekam zudem eine Graft versus Host Disease der Haut Grad II°. Aufgrund der schlechten respiratorischen Situation wurde er auf die Intensivstation verlegt und verstarb aufgrund einer pneumogenen Sepsis im Rahmen einer CMV-Pneumonie.

Patient 2

Abbildung 26 Veränderungen der relativen Häufigkeiten (in %) der verschiedenen Familien des intestinalen Mikrobioms des akuten Leukämie- Patienten 2 über den Zeitverlauf der Behandlung (Tag 1 = Tag 1 des ersten Chemotherapiezyklus)

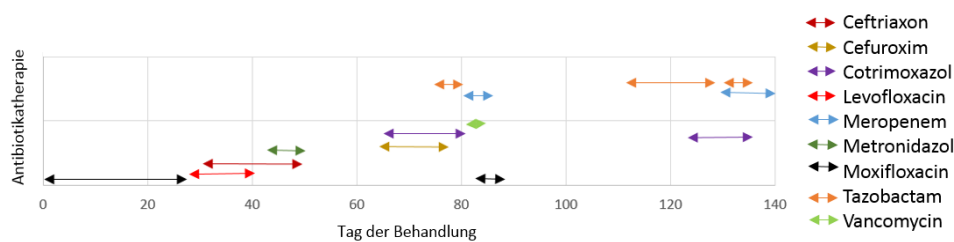
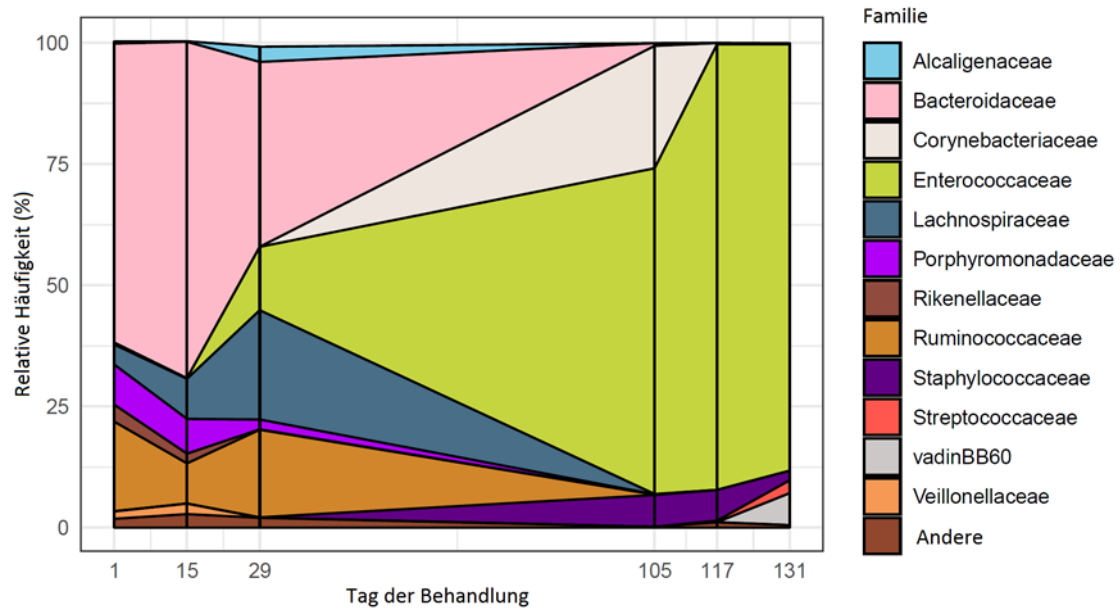


Abbildung 27. Graphische Darstellung der verschiedenen Antibiotikatherapien (in den jeweiligen farblichen Darstellungen) des akuten Leukämie-Patienten 2 über den Zeitverlauf der Behandlung (Tag 1 = Tag 1 des ersten Chemotherapiezyklus).

Der Patient 2 litt an einer AML M4. In **Abbildung 26** ist die Zusammensetzung des Mikrobioms auf der Familienebene im Verlauf dargestellt. Parallel dazu ist in **Abbildung 27** die antibiotische Therapie bis zum Tag 140 der Behandlung dargestellt. Die erste Stuhlprobe wurde an Tag 1 der Induktionstherapie nach dem DA-Protokoll abgegeben. In dieser zeigten sich 73% Bacteroidetes, in der 2. Stuhlprobe, 15 Tage später, stieg der Wert auf 79% an. Gleichzeitig wurden in der zweiten Probe 8% Lachnospiraceae nachgewiesen, in der ersten Probe waren es nur 4% Lachnospiraceae. Der Gehalt von Ruminococcaceae fiel von 18% auf 8% ab. Der Patient fieberte an Tag 1 der Induktionstherapie auf und wurde mit Moxifloxacin antibiotisch behandelt. 18 Tage nach

dem Beginn der Chemotherapie, begann die Induktionsphase II. Der Patient fieberte auf bis 39°C und wurde zunächst nur mit Levofloxacin behandelt. Die klinischen Stuhlproben waren positiv für das Noro-Virus. Auf dem Boden dieser Infektion entwickelte sich eine Pankolitis. Der Patient bekam eine antibiotische Therapie bestehend aus Ceftriaxon, Levofloxacin und Metronidazol. Unter dieser Therapie fielen die Infektparameter ab. Während dieser Therapie wurde die dritte Stuhlprobe abgegeben. In dieser zeigten sich erstmals Enterococcaceae mit 12%, der Anteil von Ruminococcaceae stieg auf 18% und der Anteil von Lachnospiraceae auf 23%. Im weiteren Verlauf wurde die Patientin laparoskopisch cholezystektomiert aufgrund einer akuten Cholezystitis. Ein Erreger wurde nicht isoliert. Wegen der Blastenpersistenz entschied man sich für eine allogene Stammzelltransplantation. Elf Tage nach der Stammzelltransplantation war das Rektalabstrich-Routinescreening positiv für einen 4 MRGN *Enterobacter aerogenes*. Die respiratorische Situation verschlechterte sich rapide. Im low-dose CT-Thorax waren bilateral atypische Infiltrate zu sehen. Es wurde zunächst eine antibiotische Therapie mit Cefuroxim und Cotrimoxazol begonnen. Die Antibiose wurde im Verlauf zunächst auf Tazobactam, anschließend auf Meropenem und schließlich auf Vancomycin und Moxifloxacin umgestellt. Die immunsuppressive Therapie wurde durch hochdosierte Steroidgaben abgelöst. Es erfolgte die Verlegung auf die Intensivstation und eine invasive Beatmung wurde nötig. Im Trachealsekret wurde *Enterococcus faecium* nachgewiesen. Während der Behandlung auf der Intensivstation wurde die vierte Stuhlprobe abgegeben. Darin sah man einen deutlichen Anstieg des Enterococcaceae-Anteils auf 67%, außerdem betrug der Anteil der Corynebacteriaceae 25%. Die Patientin konnte extubiert und auf die Normalstation zurückverlegt werden. Im Abstrich des Tracheostoma fand man *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium*. In der Stuhlprobe wurde das Clostridium difficile Toxin nachgewiesen. Auf der Normalstation wurde die 5. Stuhlprobe abgegeben, in welcher man einen weiteren Anstieg des Enterococcaceae-Anteils auf 92% sieht. Vier Tage nach der Stuhlprobenabgabe wurde *Enterococcus faecium* auch im Dauerkatheterurin nachgewiesen. Es wurde eine sechste Stuhlprobe abgegeben, in der 88% Enterococcaceae und 7% Clostridiales vorhanden waren. Während der letzten drei Stuhlprobenabgaben wurde die Patientin aufgrund o.g. Befunde zunächst mit Tazobactam und im weiteren Verlauf mit Meropenem sowie Cotrimoxazol antibiotisch behandelt. Die Patientin verschlechterte sich respiratorisch erneut, so dass

eine invasive Beatmung notwendig wurde. Es erfolgte eine breite antiinfektive Therapie, jedoch ohne maßgeblichen Erfolg. Die Patientin verstarb mit beidseitigen Infiltraten an Lungenversagen, am ehesten infektiös differenzialdiagnostisch toxisch bedingt.

Patient 7

Abbildung 28 Veränderungen der relativen Häufigkeiten (in %) der verschiedenen Familien des intestinalen Mikrobioms des akuten Leukämie- Patienten 7 über den Zeitverlauf der Behandlung (Tag 1 = Tag 1 des ersten Chemotherapiezyklus)

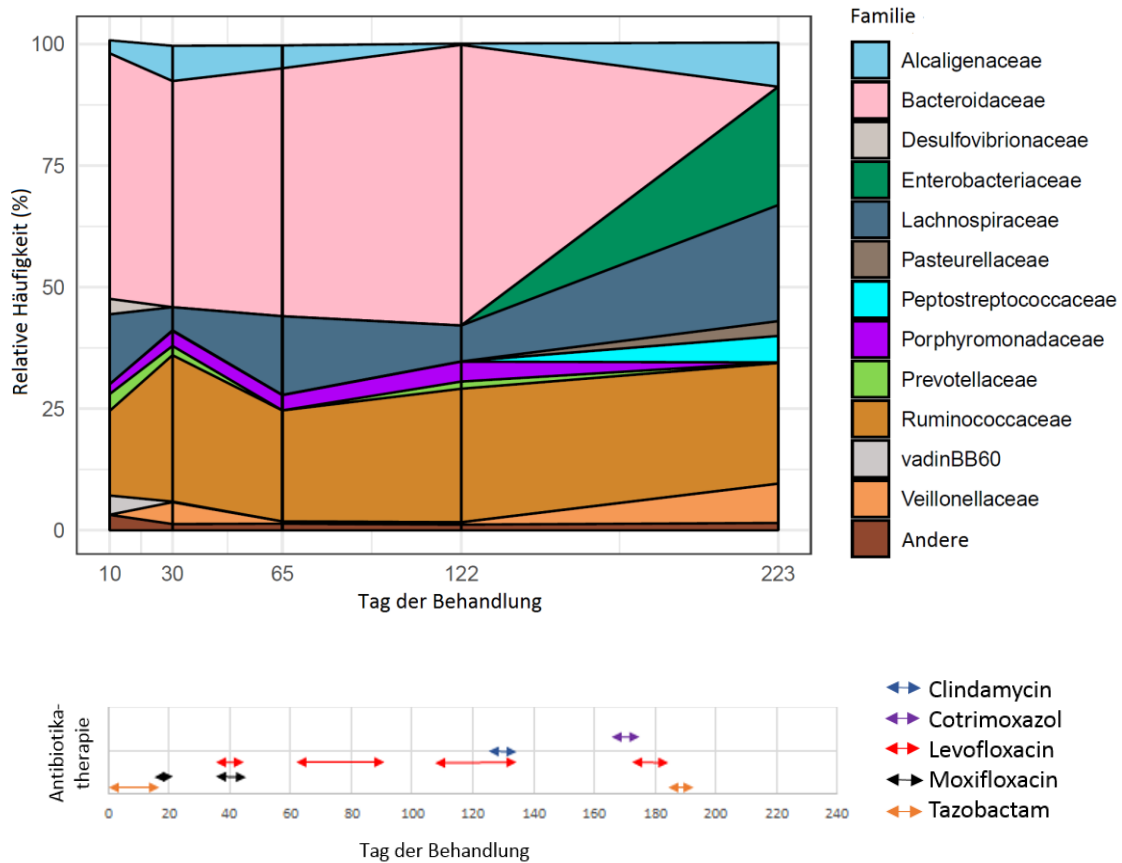


Abbildung 29. Graphische Darstellung der verschiedenen Antibiotikatherapien (in den jeweiligen farblichen Darstellungen) des akuten Leukämie-Patienten 7 über den Zeitverlauf der Behandlung (Tag 1 = Tag 1 des ersten Chemotherapiezyklus).

Der Patient 7 litt an einer AML M4/5. **Abbildung 28** ist die Zusammensetzung des Mikrobioms auf der Familienebene im Verlauf dargestellt. Parallel dazu ist in **Abbildung 29** die antibiotische Therapie bis zum Tag 240 der Behandlung dargestellt. Bereits das erste Rektalabstrich-Routinescreening (an Tag 3 der Induktionschemotherapie) war positiv für VRE. Die Patientin wurde antibiotisch mit Tazobactam behandelt. Die erste Probe wurde an Tag 10 der Induktionschemotherapie abgegeben. Darin zeigten sich 56% Bacteroidales, 14% Lachnospiraceae und 17% Ruminococcaceae. An Tag 15 zeigte sich eine komplette Remission. An Tag 18 entwickelte der Patient eine Sepsis in Aplasie, am ehesten aufgrund des infizierten zentralen Venenkatheters. Unter einer antibiotischen Therapie mit Tazobactam, welche im Verlauf mit Moxifloxacin oralisiert werden konnte,

gingen die Infektparameter deutlich zurück. Während des zweiten Zyklus der Induktionschemotherapie stiegen das Fieber und das CRP in der Aplasiephase wieder an. Erneut sprach der Patient klinisch gut auf Moxifloxacin an, zusätzlich wurde der Patientin Levofloxacin oral gegeben. Ein Keimnachweis gelang nicht. Während dieser Zeit wurde die zweite Stuhlprobe abgegeben. Im Vergleich zur ersten Stuhlprobe nahmen die Bacteroidales auf 52% und die Lachnospiraceae auf 5% ab, während der Prozentanteil der Ruminococcaceae auf 30% anstieg. Die Chemotherapie wurde mit der Konsolidierungstherapie I fortgeführt. Während dieses Zyklus wurde die dritte Stuhlprobe abgegeben. Darin war zu sehen, dass die Bacteroidales auf 54% und die Lachnospiraceae wieder auf 16% anstiegen, während die Menge an Ruminococcaceae auf 23% abfiel. Erneut befand sich der Patient in einer langen Aplasiephase. Unter einer antibiotischen Prophylaxe mit Levofloxacin zeigten sich keinerlei Infektzeichen. An Tag 15 der Konsolidierungstherapie II waren die MRD – Marker positiv. In dieser Zeit wurde die vierte Stuhlprobe abgegeben. Auffällig darin war, dass der Prozentanteil der Bacteroidales auf 63% anstieg. Außerdem nahm der Anteil der Ruminococcaceae 27% zu, während der Anteil der Lachnospiraceae auf 7% abfiel. Aufgrund der primär therapierefraktären Erkrankung entschied man sich für eine allogene Stammzelltransplantation. Vor Beginn der Konditionierungstherapie wurde *Klebsiella pneumoniae* im Mittelstrahlurin festgestellt. *Klebsiella pneumoniae* war vor dem Nachweis im Mittelstrahlurin nicht im Mikrobiom nachweisbar. Die Patientin wurde kurzzeitig mit Clindamycin und im Anschluss daran mit Cotrimoxazol antibiotisch behandelt. Die allogene Stammzelltransplantation wurde komplikationslos durchgeführt. An Tag 10 bekam der Patient Fieber, jedoch keinen signifikanten Anstieg der Entzündungsparameter. Das Fieber wurde mit Levofloxacin und im Verlauf Tazobactam behandelt. Am Tag 10 wurden bei der mikrobiologischen Diagnostik *Staph. epidermidis* an der Venenkatheterspitze festgestellt. Ab Tag 15 zeigte sich eine Regeneration der Neutrophilen. 34 Tage nach der alloSZT bekam der Patient eine Graft versus Host Disease der Haut. Diese war unter topischer Steroidgabe rückläufig. An Tag 51 nach der Transplantation wurde die letzte Stuhlprobe abgegeben. Darin sah man erstmalig ein Vorkommen von Enterobacteriaceae mit einem Anteil von 24% am gesamten Mikrobiom der Probe. Allerdings waren mit 0,2% kaum mehr Bacteroidales vorhanden. Stattdessen stieg der Anteil von Lachnospiraceae im Vergleich zur vierten Stuhlprobe wieder auf 24%

an, während der Anteil von Ruminococcaceae im Vergleich zur vorherigen Probe auf leicht von 27% auf 25% abfiel. Acht Tage später bekam der Patient eine Graft versus Host Disease des Darms, welche sich unter Steroidtherapie rückläufig zeigte. Im Anschluss darauf erfolgte die komplikationslose Nachsorge in der Knochenmarkstransplantations-Ambulanz.

Patient 8

Abbildung 30 Veränderungen der relativen Häufigkeiten (in %) der verschiedenen Familien des intestinalen Mikrobioms des akuten Leukämie- Patienten 8 über den Zeitverlauf der Behandlung (Tag 1 = Tag 1 des ersten Chemotherapiezyklus)

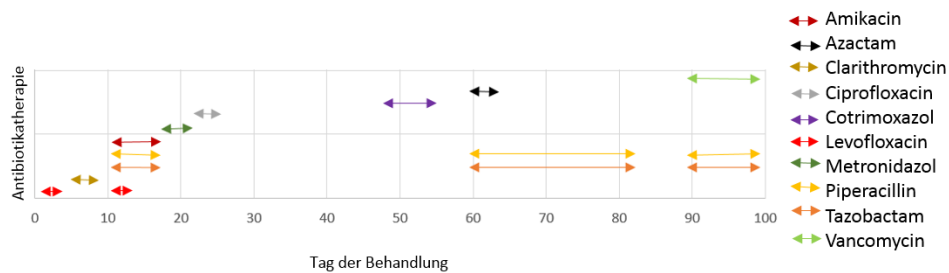
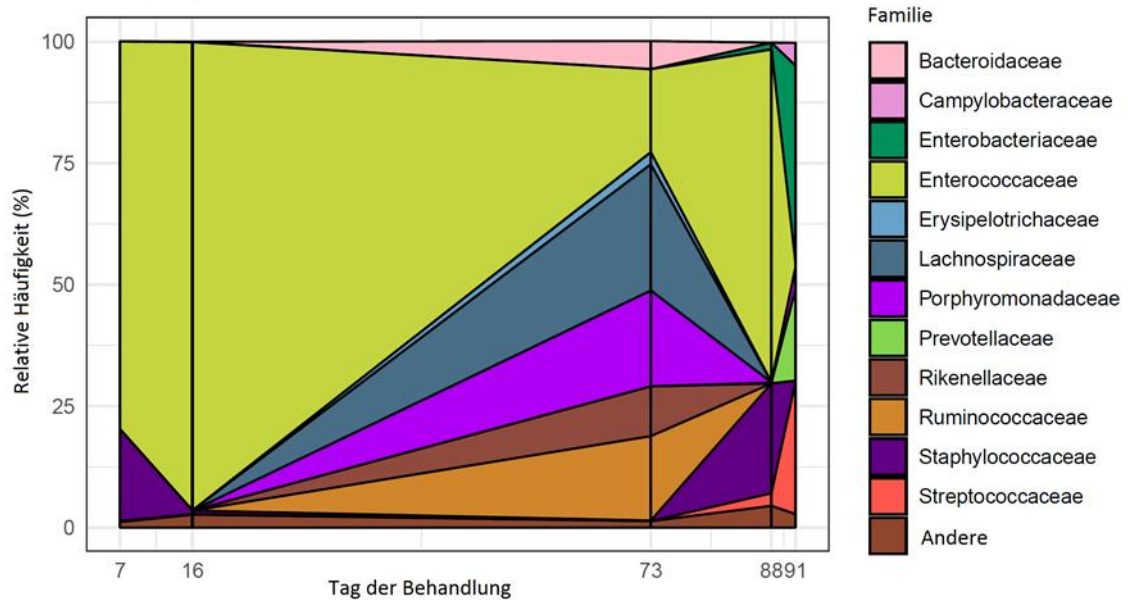


Abbildung 31. Graphische Darstellung der verschiedenen Antibiotikatherapien (in den jeweiligen farblichen Darstellungen) des akuten Leukämie-Patienten 8 über den Zeitverlauf der Behandlung (Tag 1 = Tag 1 des ersten Chemotherapiezyklus).

Der Patient 8 hatte eine längere hämato-onkologische Vorgeschichte. Im Dezember 2012 wurde eine unklare Neoplasie festgestellt, diese wurde mit einer Vorphasetherapie behandelt. Im April 2014 wurde eine AML M4/5 diagnostiziert. **Abbildung 30** ist die Zusammensetzung des Mikrobioms auf der Familienebene im Verlauf dargestellt. Parallel dazu ist in **Abbildung 31** die antibiotische Therapie bis zum Tag 100 der Behandlung dargestellt. Zum Zeitpunkt der Diagnose hatte der Patient eindruckliche leukämische Infiltrate in der Haut (sog. Chlorome). Es wurde eine Vorphasetherapie und Induktionschemotherapie nach dem GMALL-Protokoll begonnen. Kurz darauf fieberte der Patient bis auf 39,8° C auf. Im low-dose CT-Thorax zeigte sich eine interstitielle

Zeichnungsvermehrung. Der Patient bekam Levofloxacin, darunter zeigte sich allerdings keine Besserung des klinischen Zustands. Die antibiotische Therapie wurde auf Clarithromycin eskaliert. Die Infektparameter waren darunter rückläufig und die antibiotische Therapie wurde auf Levofloxacin umgestellt. An Tag 7 der Chemotherapie wurde die erste Stuhlprobe abgegeben. Darin waren hauptsächlich Enterococcaceae mit 80% und Staphylococcaceae mit 19% zu sehen. An Tag 10 der Chemotherapie fieberte der Patient erneut auf. Es erfolgte eine Therapie mit Piperacillin, Tazobactam und Amikacin. Neun Tage nach der ersten Stuhlprobenabgabe wurde die zweite Stuhlprobe abgegeben. Der Anteil der Enterococcaceae betrug darin 96%. Zu diesem Zeitpunkt hatte der Patient starke Diarrhoen, diese wurden mit Metronidazol behandelt. Anschließend wurde der Patient mit Ciprofloxacin behandelt. Die Entzündungswerte fielen ab. Wegen der extramedullären kutanen Manifestation bestand die Indikation zur allogenen Stammzelltransplantation. Aufgrund erneuter Hautherde und Lymphknotenvergrößerungen wurde eine kombinierte Rezidiv- und Konditionierungskemotherapie durchgeführt. Drei Tage vor der Transplantation bekam der Patient Fieber und die Entzündungsparameter stiegen an. Allerdings zeigten sich in der Diagnostik keine Hinweise auf einen Infektfokus. Der Patient wurde mit Tazobactam, Piperacillin, Azactam und Caspofungin behandelt. Am Tag der allogenen Stammzelltransplantation fielen die Entzündungswerte ab. Es erfolgte die komplikationslose Stammzelltransplantation. Vierzehn Tage danach wurde die dritte Stuhlprobe abgegeben. Man sah einen deutlichen Abfall des Enterococcaceae-Anteils auf 17%. Erstmalig waren Lachnospiraceae (26%) und Ruminococcaceae (17%) zu sehen. An Tag 15 nach der Transplantation fieberte der Patient auf 39°C auf und an der Spitze des zentralen Venenkatheters wurde *Staphylococcus epidermidis* isoliert. Der Patient bekam Tazobactam und Piperacillin sowie Azactam. Im Verlauf wurde Azactam bei persistierendem Fieber beendet und die antibiotische Therapie auf Tazobactam, Piperacillin und Vancomycin umgestellt. Das Fieber persistierte jedoch weiterhin. An Tag 18 nach der Stammzelltransplantation zeigten sich Graft-versus-Host-Disease typische Hautveränderungen an 25% der Körperoberfläche. Diese sprachen gut auf eine topische Steroidtherapie an. Da die infektiologische Fokussuche erfolglos verlief, wurde das Fieber mit der GvHD-Reaktion erklärt. Die antibiotische Therapie wurde schrittweise abgesetzt. An Tag +25 nach der Stammzelltransplantation bekam der Patient wässrige

Diarrhoen. Die mikrobiologische Diagnostik des Stuhls blieb ohne Nachweis eines auslösenden Keims. In einer Koloskopie wurde eine GvHD des Darms Grad IV bestätigt. Zwei Tage später wurde die vierte Stuhlprobe abgegeben. Der Prozentanteil der Enterokokken nahm wieder deutlich auf 69% des gesamten Mikrobioms zu. Außerdem waren wieder Staphylococcaceae mit 23% nachweisbar. Um die GvHD symptomatisch zu behandeln, wurde die immunsuppressive Therapie erweitert. An Tag +29 verschlechterte sich der Allgemeinzustand des Patienten massiv. Ein Tag danach wurde die fünfte Stuhlprobe gesammelt. Darin sah man eine deutliche Abnahme der Enterococcaceae auf 0,8%, wobei 41% *Klebsiella spp.* und 27% Staphylococcaceae nachgewiesen wurden. Im weiteren Verlauf bekam der Patient eine GvHD der Leber mit einem hepatorenenalen Syndrom. Der Patient verstarb an einem Multiorganversagen durch eine akute GvHD nach allogener Stammzelltransplantation.

4. Diskussion

Veränderungen der bakteriellen Diversität im Mikrobiom und der Bakterienmenge im Vergleich zwischen den drei Probandengruppen

In der vorliegenden Studie wurde ein signifikanter Verlust der bakteriellen Diversität anhand der OTUs und des Shannon Index bei Patienten mit akuter Leukämie im Vergleich zur IOT- und Kontrollgruppe festgestellt. Dies zeigt, dass die Veränderungen im Mikrobiom der LEU-Patienten erheblich sind. Holler et al. (2014) zeigten, dass bei Patienten während und nach einer allogenen Stammzelltransplantation eine erhebliche Veränderung in der Diversität des Mikrobioms zu beobachten ist. Die Patienten in der Studie von Holler et al. (2014) wiesen auch schon in der Konditionierungstherapie vor der Transplantation große Veränderungen im Mikrobiom auf, dies passt zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie. Des Weiteren konnten auch Taur et al. (2012) nachweisen, dass die Diversität während einer allogenen Stammzelltransplantation abnimmt. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass auch andere Behandlungen hämatologischer Erkrankungen, wie die akuten Leukämien, oder die Erkrankungen selbst signifikante Veränderungen im Mikrobiom hervorrufen. Eine Schwäche der Studie ist, dass alle longitudinal gesammelten Stuhlproben der LEU-Patienten mit den einmalig gesammelten Stuhlproben der IOT- und Kontrollgruppe verglichen werden. Die Stärke des Projekts ist jedoch der Vergleich zu anderen Probandengruppen. Da es schwer ist ein „physiologisches“ Mikrobiom zu definieren, entschieden wir uns für den Vergleich mit dem Stuhl einer gesunden, nicht vorerkrankten, nicht medikamentös therapierten Kontrollgruppe. Interessanterweise sieht man auch zwischen der IOT- und der Kontrollgruppe einen signifikanten Unterschied in der Diversität. Man könnte festhalten, dass sich die Diversität des Mikrobioms der IOT-Probanden mit einem multiresistenten Keim nicht komplett restituiert. Es konnte auch ein signifikanter Verlust der Bakterienmenge der Stuhlproben der LEU-Patienten im Vergleich zu den beiden anderen Probandengruppen festgestellt werden. Holler et al. (2014) konnten auch einen Verlust der Bakterienmenge im Zusammenhang mit einem Verlust der bakteriellen Diversität beobachten. Diese Arbeitsgruppe quantifizierte die Bakterienmenge allerdings nur indirekt. Durch die quantitative PCR benutzten wir eine direkte Methode, um das Mikrobiom nicht nur qualitativ mittels 16s rDNA, sondern auch

quantitativ zu analysieren. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass, wie bei der bakteriellen Diversität auch, ein signifikanter Verlust der Bakterienmenge zwischen der IOT- und der Kontrollgruppe besteht. So könnte man annehmen, dass bei IOT-Probanden, entweder durch ihre vorhergehende Therapie oder durch die Tumorerkrankungen selbst, eine gewisse Narbe im Mikrobiom zurück bleibt. Die Limitationen, wie sie oben in Bezug auf die verminderte Diversität beschrieben werden, müssen auch im Kontext der veränderten Bakterienmenge beachtet werden.

Longitudinale Veränderungen der bakteriellen Diversität und der Bakterienmenge im Stuhl der LEU Patienten

Die bakterielle Diversität der LEU-Patienten veränderte sich auch im Therapieverlauf. So startete ein Teil der Patienten mit sehr geringen Anzahlen an OTUs in die Chemotherapie. Da die Probenanzahl der LEU-Patienten im Verlauf relativ gering ist, ist es nicht möglich statistische Aussagen zur Signifikanz der Veränderungen der Diversität zu treffen. Vergleicht man die Bakterienmenge der LEU-Patienten im Therapieverlauf, so zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Während die Arbeitsgruppe Galloway-Pena et al. (2016) zwar nachweisen konnte, dass sich die alpha-Diversität im Verlauf der Induktionstherapie signifikant verminderte, äußerten sie sich nicht zu dem weiteren Verlauf der Diversität des Mikrobioms der Patienten mit AML. Berücksichtigt man die Erkenntnisse, dass eine antiinfektive Therapie sowie die zytoreduktiven Chemotherapeutika einen großen Einfluss auf das Mikrobiom haben, so muss man sagen, dass ein Teil der Hypothese „Patienten mit akuter Leukämie zeigen während des Therapieverlaufs erhebliche Veränderungen im Mikrobiom auf“ durch die vorliegenden Ergebnisse statistisch nicht bestätigt werden kann. Durch unsere Studie kann der Zeitpunkt der Veränderung des Mikrobioms nicht festgelegt werden. Allerdings konnte, wie oben beschrieben, nachgewiesen werden, dass sich das Mikrobiom in seiner Bakterienmenge und Bakterien-Diversität bei LEU-Patienten signifikant von dem anderer Probanden unterscheidet.

Veränderungen der Immunreaktion durch das Mikrobiom

Das Mikrobiom im Darm beeinflusst maßgeblich die lokalen Immunreaktionen der Darmmukosa. Schon vor 40 Jahren zeigte Van Bekkum et al. (1974), dass die gastrointestinale Mikroflora Antworten des Immunsystems induziert, keimfreie Tiere zeigten damals keine Graft-versus-Host-Disease. Ebenso beschrieben Littman and Pamer (2011), dass Veränderungen im Ökosystem des Mikrobioms in einer Dysbiose, welche Krankheiten auslöst, resultieren können. Als konkretes Beispiel, inwiefern Bakterien des Darms das Immunsystem beeinflussen können, dient die Arbeit von Round and Mazmanian (2009). In dieser Arbeit wird beschrieben, wie das von *Bacteroides fragilis* produzierte Polysaccharid A die Konversion von CD 4+ T-Zellen in regulatorische T-Zellen begünstigt. Durch die reduzierte Diversität und Bakterienmenge des Mikrobioms der LEU-Patienten kommt es zu Veränderungen im Mikrobiom, die man als Dysbiose des Mikrobioms bezeichnen könnte. So könnte geschlussfolgert werden, dass bei Patienten mit einer geringeren Diversität und Bakterienmenge auch ein verändertes lokales Immunsystem der Mukosa vorherrscht. Damit wird ein Teil der Hypothese bezüglich der veränderten Immunität bei Patienten mit akuter Leukämie, unter Berücksichtigung der methodischen Limitationen, bestätigt.

Veränderungen des Mikrobioms als erhöhte Infektionsgefahr bei Patienten mit akuter Leukämie

Es werden verschiedene Gründe für die erhöhte Infektionsgefahr von Patienten mit akuter Leukämie diskutiert. Zum einen wird das Immunsystem der Patienten durch die intensive Chemotherapie komprimiert, des Weiteren stellen febrile Episoden und Infektionen eine große Gefahr für diese Patienten dar (Lech-Maranda et al., 2010). Zum anderen kann die Trizytopenie, welche meist bei Erstdiagnose der akuten Leukämie besteht, die Infektionsgefahr erhöhen. Veränderungen im Mikrobiom können aber auch Infektionen begünstigen. Taur et al. (2012) beobachteten Veränderung im Mikrobiom bei allogentstammzelltransplantierten Patienten, welche in Zusammenhang mit Bakteriämien gebracht werden konnten. Holler et al. (2014) fanden heraus, dass ein Verlust an bakterieller Diversität inflammatorische Prozesse begünstigen könnte. Einige LEU-Patienten zeigten bereits in den ersten Tagen der Chemotherapie erhebliche infektiöse Komplikationen. Auf Grund der geringen Probandenanzahl ist es nicht möglich, die

Infektionen mit einer bestimmten Ursache zu assoziieren. Das Mikrobiom wird durch viele Einflussfaktoren alteriert und somit lässt sich nicht sagen, bis zu welchem Grad allein die Veränderung des Mikrobioms für eine erhöhte Infektionsgefahr verantwortlich ist. Oben genannte Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen zeigen jedoch, dass man den Einfluss des Mikrobioms auf infektiöse Geschehen nicht unterschätzen darf.

Dominanz des Mikrobioms durch einige wenige Bakterien als Risikofaktor für infektiöse Komplikationen

In den Ergebnissen wurden die Veränderungen im Mikrobiom von vier LEU-Patienten im Verlauf der Therapie detailliert erläutert. Bei jedem der vier Patienten zeigte sich von Anfang ein bakterielles Taxon, das das Mikrobiom dominiert hat. Ist der prozentuale Anteil eines bakteriellen Taxons am Mikrobiom $> 30\%$, kann von einer intestinalen Dominanz gesprochen werden (Taur et al., 2012). Die Art des Taxons änderte sich zwar bei den jeweiligen Patienten im Therapieverlauf, es blieb jedoch immer eine Dominanz eines Taxons bestehen. Während ihrer Therapie litten die Patienten an vielen infektiösen Komplikationen. Auf Grund der geringen LEU-Probandenanzahl und der relativ geringen Stuhlprobenanzahl, kann die Dominanz eines Bakteriums statistisch nicht als eindeutige bzw. alleinige Ursache der infektiösen Komplikation identifiziert werden. Allerdings unterstützen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Taur et al. (2012) die Vermutung, dass eine intestinale Dominanz eines Bakteriums infektiöse Komplikationen begünstigt. In der Studie von Taur et al. (2012) konnte die intestinale Dominanz mit einer erhöhtem Vorkommen von Bakteriämien bei Patienten mit allogener Stammzelltransplantation korreliert werden. Montassier et al. (2016) untersuchten das Vorkommen von Bakteriämien bei Patienten mit einem Non-Hodgkin Lymphom in Korrelation mit der Diversität des Mikrobioms vor dem Beginn einer Therapie. Sie zeigten, dass Patienten mit einer erniedrigten Diversität vor Therapiebeginn im späteren Therapieverlauf mit einer höheren Wahrscheinlichkeit an einer Bakteriämie erkrankten. Da unsere Patienten von Anfang an durch die Dominanz eines bakteriellen Taxons eine verminderte Diversität aufwiesen, unterstützen die Arbeit von Montassier et al. (2016) und die vorliegenden Ergebnisse die Hypothese, dass die Dominanz eines Bakteriums mit infektiösen Komplikationen vergesellschaftet ist.

Pathogene oder protektive Bakterien als Einflussfaktoren auf das Outcome der Patienten

Wie im vorhergehenden Abschnitt erläutert, begünstigt die Dominanz eines Bakteriums das Auftreten von Infektionen. Bisher ist es allerdings nicht in größerem Ausmaß gelungen, bestimmte Bakterien Taxa eindeutig einem negativen oder auch positiven Einfluss auf das Therapieergebnis von Patienten zu zuschreiben. Auf Grund der Vielfalt des Mikrobioms und der sehr individuellen klinischen Verläufe ist es schwierig, bestimmte Bakterien statistisch eindeutig mit einem verbesserten oder verschlechterten Outcome zu verknüpfen. In der vorliegenden Studie wurde versucht, Bakterien zu identifizieren, die im Mikrobiom der IOT- und Kontrollgruppe mehr vorhanden sind als im Mikrobiom der LEU-Gruppe. Diese Bakterien könnten einen protektiven Effekt auf das Milieu des Darms haben und so infektiöse Komplikationen vermindern. Außerdem wurde versucht, Bakterien zu identifizieren, die vermehrt im Mikrobiom der LEU-Patienten vorhanden sind, dabei könnten diese Bakterien wiederum einen negativen Einfluss auf den Verlauf der Patienten haben. Da *Klebsiella spp.*, insbesondere *Klebsiella pneumoniae*, viele nosokomiale Infektionen hervorrufen, ist es von Interesse, den Anteil von *Klebsiella spp.* am Mikrobiom genauer zu analysieren. Unter normalen Umständen haben *Klebsiella spp.* nur einen geringen Anteil am Mikrobiom des Darms (Caballero et al., 2015). Die Kolonisation an sich hat keinen Krankheitswert, aber sobald die Barriere der Darmmukosa beeinträchtigt ist, können Klebsiellen eine systemische Infektion und Reaktion auslösen (Donskey, 2004). Die Arbeitsgruppen Ubeda et al. (2010) und Taur et al. (2012) zeigten, dass einer Sepsis mit zum Beispiel *Klebsiella pneumoniae* eine Kolonisation des Darms mit diesem Bakterium vorausgeht. Der Verlust der „colonization resistance“ sowie die reduzierte bakterielle Dichte scheinen das Eindringen der Bakterien zu begünstigen. Diese wissenschaftlichen Erkenntnisse sprechen dafür, dass bei Patienten mit einer geschädigten Darmmukosa, was auf die LEU-Patienten dieser Studie zutrifft, vermehrt *Klebsiella spp.* im Darm zu finden sind. In der vorliegenden Studie konnte kein statistisch signifikanter Unterschied im prozentualen Anteil von *Klebsiella spp.* am Mikrobiom der Gruppen LEU, IOT und KG festgestellt werden. Es ist jedoch hervorzuheben, dass in der KG keine Besiedlung mit *Klebsiella spp.* nachzuweisen war. Im Gegensatz dazu war sowohl in der LEU-, als auch in der IOT- Gruppe eine Besiedlung nachzuweisen. Ein Grund für den fehlenden signifikanten Unterschied könnte sein, dass

die Anzahl an Stuhlproben relativ gering ist und somit keine statistische Relevanz der Unterschiede erreicht wurde. Außerdem wurde nicht nur die Spezies *Klebsiella pneumoniae* berücksichtigt, sondern alle Spezies des Genus *Klebsiella*. Des Weiteren zeigten Perez et al. (2011) im Mausmodell, dass die Besiedlung von *Klebsiella spp.* vor allem durch Antibiotika, welche gegen Anaerobier und Bacteroides wirken (z.B. Clindamycin, Piperacillin-Tazobactam), begünstigt wird. Obwohl die LEU-Patienten unter anderem auch diese Antibiotika eingenommen haben, könnte es sein, dass sie zu den Zeiten der Stuhlprobenabgabe nicht damit therapiert worden sind und somit die Besiedlung mit *Klebsiella spp.* in dem Moment nicht begünstigt war. Nicht zu vergessen ist, dass es bisher keine Untersuchung zur Besiedlung mit *Klebsiella spp.* bei Patienten mit akuten Leukämie gab. Es könnte somit sein, dass im Falle einer akuten Leukämie oben genannte Erkenntnisse bezüglich der Besiedlung mit *Klebsiella spp.* nicht zutreffen. Normalerweise machen Enterococcaceae nur einen kleinen Teil des Darmmikrobioms aus (Eckburg et al., 2005). Eine übermäßige Besiedlung des Darms mit Enterococcaceae wird normalerweise durch kommensale Bakterien verhindert. Die Kommensalen induzieren antimikrobielle Peptide, wie zum Beispiel Reg3alpha. Reg3alpha ist das Hauptpeptid, welches eine Überwucherung mit *Enterococcus spp.* verhindert. Durch eine Antibiotikatherapie vermindert sich die Induktion der antimikrobiellen Peptide (Kinnebrew et al., 2010). Die LEU-Patienten in der vorliegenden Studie bekamen viele verschiedene und eine hohe Anzahl an Antibiotika. Die Verwendung von Antibiotika führt zu Veränderungen der Zusammensetzung kommensaler Bakterien im Darm. So wird zum Beispiel durch die Behandlung mit Antibiotika gegen Anaerobier die Besiedlung von Enterococcaceae begünstigt (Donskey et al., 2000). Die Dominanz von Vancomycin resistenten Enterokokken geht einer Infektion des Blutstroms bei Patienten nach einer allogenen Stammzelltransplantation voraus (Ubeda et al., 2010). Um herauszufinden, ob auch bei Patienten mit akuter Leukämie vermehrt *Enterococcus spp.* im Mikrobiom zu finden sind, wurde der prozentuale Anteil der *Enterococcus spp.* zwischen der LEU-, IOT- und Kontrollgruppe verglichen. In der LEU-Gruppe fanden sich deutlich mehr Enterococcaceae im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe und der IOT-Gruppe. Dieses Ergebnis zeigt, dass auch Patienten mit akuten Leukämien zu einem sehr hohen Anteil mit Enterococcaceae besiedelt sind und bestätigt die Hypothese, dass im Mikrobiom der LEU-Patienten vermehrt potenziell pathogene Keime zu finden sind.

Wie in oben genannten Veröffentlichungen gezeigt wurde, birgt eine übermäßige Kolonisation mit *Enterococcus spp.* ein hohes pathogenes Potenzial sowie eine große Gefährdung für immunsupprimierte Patienten.

Genauso wie *Klebsiella spp.* können auch andere gram-negative Enterobacteriaceae des Mikrobioms wie *Escherichia spp.* nach der Therapie mit Antibiotika zu einer Bakteriämie führen (Buffie and Pamer, 2013). Ganji et al. (2016) wiesen erhöhte Anteile von Enterobacteriaceae in Patienten mit Gastroenteritis nach. Auch bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurden vermehrt *Escherichia-Shigella spp.* gefunden (Chen et al., 2014). Daher ist es interessant herauszufinden, ob der Anteil an *Escherichia-Shigella spp.* auch bei Patienten mit akuter Leukämie im Vergleich zur IOT- und Kontrollgruppe erhöht ist. Vergleicht man den Anteil von *Escherichia-Shigella spp.* zwischen der LEU-, IOT- und der Kontrollgruppe so zeigen sich signifikante Unterschiede in den prozentualen Anteilen am Mikrobiom. Bei den Probanden aus der IOT-Gruppe war der Anteil am höchsten. Diese Patienten wurden lange wegen ihrer malignen Erkrankung therapiert und sind mit einem multiresistenten Keim besiedelt, dabei könnte das Mikrobiom langfristig geschädigt worden sein, so dass eine Besiedlung mit *Escherichia-Shigella spp.* persistiert. Diese signifikanten Unterschieden zwischen der IOT- und LEU-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe unterstützen die Hypothese, dass bei Patienten mit akuter Leukämie vermehrt potenziell pathogene Bakterien vorhanden sind.

Galloway-Pena et al. (2016) beobachteten bei Patienten mit AML in der Induktionstherapie einen signifikanten Verlust von anaeroben Bakterien, wie zum Beispiel *Prevotella spp.* und *Blautia spp.*. In der vorliegenden Studienkohorte konnte ebenfalls ein signifikanter Verlust der Spezies im Mikrobiom der LEU-Patienten im Vergleich zu dem der Kontrollgruppe festgestellt werden. Da *Blautia spp.* und *Prevotella spp.* vermehrt in gesunden Probanden vorkommen und sich in der Studie von Galloway-Pena et al. (2016) während der Induktionschemotherapie vermindern, könnte geschlussfolgert werden, dass diese Spezies einen protektiven Effekt für den Probanden darstellen. Um eine Korrelation zwischen dem Verlust der Bakterien und dem Verlauf von Patienten mit akuter Leukämie feststellen zu können, ist die vorliegende Studienkohorte zu klein, und es müsste eine deutlich größere Anzahl an LEU-Patienten bezüglich ihres Mikrobioms untersucht werden. Eine weitere Limitation ist, dass

Prevotella spp. vermehrt bei Menschen vorkommt, die nicht von der westlichen industrialisierten Lebensweise beeinflusst werden (Martinez et al., 2015, De Filippo et al., 2010). Außerdem scheint der Anteil von *Prevotella spp.* am Mikrobiom durch eine kohlenhydratreiche Ernährung erhöht zu werden (Wu et al., 2010). Die Unterschiede am prozentualen Anteil von *Prevotella* im Mikrobiom könnten daher auch durch individuelle Lebensarten und Ernährungsgewohnheiten der LEU- und Kontrollgruppe hervorgerufen werden. Jenq et al. (2015) wiesen nach, dass eine erhöhte Menge an *Blautia spp.* im Mikrobiom die Letalität einer Graft-versus-Host-Disease bei stammzelltransplantierten Patienten reduzierte. Auch in unserer Studienpopulation stellten wir einen signifikanten Unterschied zwischen dem prozentualen Gehalt an *Blautia spp.* im Mikrobiom der LEU- und der Kontrollgruppe fest. Bei LEU-Patienten war der Anteil von *Blautia spp.* deutlich geringer. Dies unterstützt die Hypothese, dass bei Patienten mit einer akuten Leukämie weniger potenziell protektive Bakterien vorhanden sind. Als Limitation ist wieder die zu geringe Stuhlprobenanzahl zu sehen, mit der es nicht möglich ist, eine statistische Korrelation zwischen dem Outcome und dem Gehalt an *Blautia spp.* festzustellen. Des Weiteren zeigten die LEU-Patienten einen zu unterschiedlichen Therapieverlauf und die vielfältigen Einflussfaktoren auf das Mikrobiom lassen sich so nicht eindeutig identifizieren.

Bakterien des Darms, die kurzkettige Fettsäuren produzieren, wie zum Beispiel Butyrat, fördern ein gesundes Umfeld im gastrointestinalen Trakt (Montassier et al., 2016) und haben einen protektiven Effekt im distalen Kolon (Wong et al., 2006). Bisher ist von *Faecalibacterium prauznitii* und bestimmten *Clostridia spp.* Clustern bekannt, dass sie Butyrat produzieren können und damit einen antiinflammatorischen Effekt auf den Darm haben (van Vliet et al., 2010b). Diese Bakterien sind Teil der Klasse der *Clostridia spp.*. Bei Patienten mit einer chronischen entzündlichen Darmerkrankung ist die Menge an *Clostridia spp.* im Mikrobiom vermindert. Lachnospiraceae und Ruminococcaceae sind Familien der Klasse Clostridia und ebenfalls, neben anderen Genera, im entzündeten Darm bei Patienten mit Morbus Crohn vermindert (Gevers et al., 2014). Da diese Familien bei gesunden Probanden vermehrt vorkommen, haben sie eventuell einen protektiven Effekt. Meehan and Beiko (2014) beobachteten, dass Mitglieder der Familie Lachnospiraceae mit einem Schutz vor kolorektalem Karzinom einhergehen. Um einen eventuell protektiven Effekt bei Patienten mit akuter Leukämie nachzuweisen, wurde der

prozentuale Anteil von Lachnospiraceae und Ruminococcaceae zwischen der gesunden Kontrollgruppe und den LEU-Patienten vergleichen. In der gesunden Kontrollgruppe waren signifikant mehr dieser Familien vorhanden, während sie im Mikrobiom der LEU-Gruppe vermindert waren. Dieses Ergebnis unterstützt die Ergebnisse der oben erläuterten wissenschaftlichen Arbeiten, dass die Familien durch ihre mögliche Produktion von Butyrat einen protektiven Einfluss auf das Mikrobiom und damit das Umfeld des Darms haben. Diese Schlussfolgerung kann nur unter Berücksichtigung der methodischen Limitationen dieser Studie gezogen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass signifikante Unterschiede in den prozentualen Anteilen bestimmter Bakterien am Mikrobiom der LEU- und der Kontrollgruppe bestehen. Durch verschiedene wissenschaftliche Erkenntnisse gestützt, kann vermutet werden, dass manche Bakterien protektive und andere pathogene Eigenschaften aufweisen. Durch die relativ geringe Stuhlprobenanzahl und die individuellen Therapieverläufe, kann allerdings statistisch keine Korrelation zwischen der Menge an Bakterien und einem besseren oder schlechteren Überleben der LEU-Patienten festgestellt werden. Die aufgestellten Vermutungen bieten Anlass, in einer größer angelegten Studie untersucht zu werden.

Nachweisbarkeit pathogener Bakterien im Stuhlmikrobiom vor dem Auftreten von systemischen Blutstrominfektionen mit denselben Bakterien

Bei Patienten, die mit einer allogenen Stammzelltransplantation therapiert wurden, ist die Dominanz des Mikrobioms durch ein Bakterium mit nachfolgenden Bakteriämien desselben Bakteriums assoziiert (Ubeda et al., 2010). Patienten mit akuter Leukämie, die vor einer allogenen Stammzelltransplantation mit einem VRE kolonisiert sind, haben ein erhöhtes Risiko an einer systemischen Infektion des Blutstroms zu erkranken (Ford et al., 2017). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Erreger einer Bakteriämie durch die beschädigte Darmmukosa in den Kreislauf gelangen könnten. In der vorliegenden Studie wurden mikrobiologisch Erreger einer Bakteriämie kultiviert. Von diesen Erregern wurde ein großer Teil im Mikrobiom der Patienten nachgewiesen bevor eine klinische Symptomatik der Infektion auftrat. Obwohl dieses Ergebnis die Hypothese unterstützt und vermuten lässt, dass viele Erreger durch die Darmmukosa in den Blutkreislauf gelangen, muss beachtet werden, dass unterschiedliche Methoden des Nachweises,

nämlich die mikrobiologische Kultivierung und die 16s rDNA Sequenzierung miteinander verglichen werden. Um nachzuweisen, dass es sich um exakt dieselben Bakterien handelt, wäre ein gleiches Nachweisverfahren zu bevorzugen. Trotzdem eröffnet diese Erkenntnis neue Möglichkeiten, das Risiko eines Patienten mit akuter Leukämie an einer Bakteriämie zu erkranken einzuschätzen.

Methodische Limitationen

Das Studiendesign beabsichtigte, bei AML-Patienten an Tag 14 und Tag 28 der Induktionschemotherapie sowie jeweils zur Aufnahme und Entlassung eines jeden Chemotherapie Zyklus eine Stuhlprobe zu sammeln. Außerdem sollten bei jeder infektiösen Komplikation eine Stuhlprobe abgegeben werden. Galloway-Pena et al. (2016) konnten zeigen, dass es von Vorteil sein könnte, kontinuierlich alle 96 Stunden Stuhlproben zu sammeln, um kurzfristige Änderungen im Mikrobiom noch umfassender zu monitorieren. So ist der Abstand der Stuhlprobensammlung von 14 Tagen relativ lang und als potentielle Limitation zu sehen. Die Stuhlproben wurden nach der Befüllung des Röhrchens im Badezimmer des Patienten belassen und sobald als möglich abgeholt und bei -80°C eingefroren. Wu et al. (2010) sahen ein unmittelbares Einfrieren der Proben auf -80°C als Goldstandard an. Diese Arbeitsgruppe zeigte aber ebenfalls, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Zusammensetzung des Mikrobioms gibt, wenn die Proben für 24 Stunden auf Eis gelagert wurden, bevor sie auf -80°C eingefroren werden, oder wenn sie sofort in eine bestimmte Pufferlösung (PSP Invitek Puffer) gelegt wurden. Eine kurzfristige Lagerung bei Raumtemperatur könnte die Zusammensetzung des Mikrobioms beeinflussen. In zukünftigen Projekten sollten die Proben beispielsweise auf Eis gelagert werden, wenn der klinische Ablauf keine sofortige Lagerung bei -80°C gewährleisten kann.

Eine Stärke der vorliegenden Studie ist, dass neben der Stuhlprobensammlung auch eine detaillierte Analyse bezüglich einer möglichen Besiedlung mit multiresistenten Keimen in den LEU- und IOT- Gruppen erfolgte. So wurden diese Patienten mittels Abstrich des Analkanals engmaschig monitoriert. Als Nachteil ist zu vermerken, dass von den gesunden Probanden der Kontrollgruppe kein Abstrich des Analkanals erfolgte, sondern dieser Parameter nur anamnestisch erhoben wurde.

Des Weiteren erfolgte in dieser Studie eine quantitative Auswertung der Bakterienmenge mittels qPCR. In der Arbeit von Galloway-Pena et al. (2016) wurden die Stuhlproben nur mittels 16s rDNA Sequenzierung analysiert und somit keine Aussagen zu quantitativen Veränderungen des Stuhlmikrobioms gemacht.

Bezüglich der demografischen Daten der gesamten Studiengruppe lassen sich einige Limitationen feststellen. So ist zum Beispiel die Probandenanzahl der verschiedenen Gruppen unterschiedlich und die Gesamtzahl mit $N = 66$ gering. Dies ist zurückzuführen auf die relativ geringe Anzahl an Erstdiagnosen der akuten Leukämie. Das Einschlusskriterium, dass mindestens sechs Monate vor Aufnahme in die Studie keine antibiotische Therapie erfolgt war, schränkt die Anzahl der einzuschließenden Patienten weiter ein. Um zuverlässigere Aussagen bezüglich der Veränderungen des Mikrobioms und des Einflusses verschiedener Faktoren machen zu können, wäre eine größere Studienpopulation anzustreben. Die Geschlechtsverteilung ist vor allem in der LEU-Gruppe nicht ausgeglichen. Die Altersverteilung ist in allen drei Gruppen signifikant unterschiedlich. Dass die Patienten aus der IOT Gruppe älter sind als die anderen beiden Gruppen könnte daher rühren, dass diese Patienten bereits zum Teil langjährig bezüglich ihres Tumorleidens nachgesorgt werden. Das Mikrobiom verändert sich während des Lebens auf Grund der individuellen Lebensweise der Menschen sehr unterschiedlich (Dominguez-Bello et al., 2011) und so wäre es für zukünftige Projekte von Vorteil, wenn der Altersdurchschnitt in den verschiedenen Studiengruppen keinen signifikanten Unterschied vorweist. Auch in der Größenverteilung zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen der LEU- und Kontrollgruppe sowie der IOT- und der Kontrollgruppe. Die Größe ist vor allem im Zusammenhang mit dem Gewicht und dem daraus errechenbaren BMI wichtig. Das Gewicht scheint einen Einfluss auf die Zusammensetzung des Mikrobioms zu haben (Cardinelli et al., 2015). Es ist wichtig, dass sich Körpergewicht in den verschiedenen Gruppen nicht signifikant unterscheidet, damit die Mikrobiomanalyse ohne die Störgröße des Gewichts vorgenommen werden kann. In der vorliegenden Studienkohorte besteht ein signifikanter Gewichtsunterschied zwischen der IOT- und der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied muss als Limitation berücksichtigt werden.

Eine weitere Limitation dieser Studie ist, dass die Anzahl der LEU- Patienten mit Besiedlung durch multiresistente Keime gering war ($N=4$). Im Folgenden werden der

Zeitpunkt der Besiedlung und die betroffenen Patienten näher beschrieben. Bei LEU-Proband 1 war nach ca. 10 Wochen der Behandlung ein multiresistenter Keim nachzuweisen. Auffällig ist, dass bereits zu Beginn der Therapie das Stuhlmikrobiom von Enterococcaceae dominiert wurde. Außerdem bekam der Patient von Anfang an eine antibiotische Therapie. Bei LEU-Proband 2 zeigte sich schon früh eine Dominanz eines Bakteriums. In diesem Falle waren es die gram-negativen Bacteroidaceae. Auch dieser Patient wurde bereits in den ersten Tagen der Therapie antibiotisch behandelt. Die multiresistente Besiedlung fand erst nach der allogenen Stammzelltransplantation statt, wobei der Patient bereits zu Beginn an einer ausgeprägten Mukositis litt. Berücksichtigt man die Erkenntnisse von van Vliet et al. (2010a) dann lässt sich vermuten, dass eine Veränderung im Mikrobiom die Entstehung einer Mukositis begünstigt. Bei LEU-Proband 12 wurde ebenfalls in der ersten Aplasiephase der Induktionschemotherapie, eine antibiotische Behandlung notwendig. Vor der Infektion mit VRE dominierten in einer Stuhlprobe deutlich die Enterococcaceae. In der Arbeit von Ubeda et al. (2010) wurde ein vergleichbarer Fall geschildert, bei dem auch vor der Infektion mit VRE eine Dominanz von Enterococcaceae des Mikrobioms bestand.

Ubeda et al. (2010) zeigten im Mausmodell, dass eine antibiotische Behandlung das Gleichgewicht der kommensalen Bakterien im Mikrobiom stört und es zu einer Dominanz eines Bakteriums kommen kann. In ihrer Studie waren die Enterococcaceae dominant. Die frühen antibiotischen Behandlungen der oben genannten LEU-Patienten könnten die Besiedlung mit multiresistenten Keimen und die Dominanz des Mikrobioms durch bestimmte Bakterien begünstigt haben. Es lässt sich festhalten, dass in den beispielhaften Verläufen der Besiedlung mit multiresistenten Keimen die Dominanz eines Bakteriums im Mikrobiom vorangeht.

Durch das unterschiedlichen Ansprechen der einzelnen LEU-Patienten auf diverse Therapien (GMALL, GMALL ohne Doxorubicin, Daunorubicin/Cytarabin) ergaben sich sehr individuelle Therapieverläufe. Als Stärke der vorliegenden Studie kann die zum Teil lange Beobachtungszeit der Mikrobiomanalyse gesehen werden. So wurde das Mikrobiom nicht nur während der Induktionschemotherapie beobachtet, sondern es konnte eine langfristige Beurteilung der Veränderungen erfolgen. Des Weiteren bekamen fast alle LEU-Patienten Fieber in der Phase der Aplasie, was als Gemeinsamkeit, trotz der unterschiedlichen Therapien, gesehen werden kann.

Ausblick

Die vorliegende Arbeit bietet einen Einblick in die Veränderungen des Mikrobioms bei Patienten mit akuter Leukämie im Therapieverlauf. Da die aktuelle Forschung bezüglich des Mikrobioms im Zusammenhang mit akuten Leukämie noch nicht weit fortgeschritten ist und die vorliegende Arbeit nur eine relativ geringe Probandenanzahl umfasst, ist es von großem Interesse die gewonnenen Ergebnisse und Daten an einer größeren Studienpopulation zu validieren. So könnte herausgefunden werden, ob das Mikrobiom in seiner Diversität und bakteriellen Zusammensetzung das Outcome von Patienten mit akuter Leukämie beeinflusst. Wenn bestimmte Eigenschaften des Mikrobioms, die den Verlauf der Patienten beeinflussen, identifiziert worden sind, wäre es möglich vor dem Beginn einer Therapie Risikopatienten für infektiöse Komplikationen zu identifizieren. Es könnte außerdem versucht werden, das Mikrobiom zu beeinflussen, um das Risiko für Infektionen zu senken. Denkbare Möglichkeiten wären zum Beispiel Stuhltransplantationen oder veränderte antiinfektive Therapieregime.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurden Veränderungen des Darmmikrobioms anhand von Stuhlproben von Patienten mit akuter Leukämie longitudinal untersucht. Die Patienten wurden mit intensiver Chemotherapie behandelt. Die Therapie als auch die Erkrankung selbst führte zu einer erheblichen Immunsuppression der Patienten. Prophylaktisch und therapeutisch wurden intensive Antibiotikatherapien bei allen Patienten durchgeführt.

Das Mikrobiom wurde quantitativ und qualitativ analysiert. Die Bakterienmenge der Stuhlproben wurde mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion und die Diversität des Mikrobioms mittels 16s rDNA Sequenzierung aufgezeigt. Zusätzlich dazu fand eine mikrobiologische Kultivierung von Bakterien in Rektalabstrichen statt, um multiresistente Keime nachzuweisen. Ebenso wurde der klinische Verlauf der Patienten dokumentiert.

Insgesamt wurde das Mikrobiom von drei verschiedenen Studiengruppen untersucht: Patienten mit akuter Leukämie, Patienten, die mit multiresistenten Keimen besiedelt waren und sich in der Nachsorge der Würzburger interdisziplinären onkologischen Tagesklinik befanden sowie gesunde Probanden.

Im Mikrobiom der Patienten mit akuter Leukämie war eine deutlich geringere Diversität sowie eine deutlich geringere Bakterienmenge im Vergleich zu beiden anderen Studiengruppen festzustellen. Das Mikrobiom änderte sich während des Therapieverlaufs erheblich und am Beispiel von einigen Patienten konnte gezeigt werden, dass einzelne Bakterien das Mikrobiom dominierten. Des Weiteren waren im Mikrobiom der Patienten mit akuter Leukämie mehr potenziell pathogene sowie weniger potenziell protektive Bakterien im Vergleich zur Kontrollgruppe vorhanden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich das Mikrobiom der Patienten mit akuter Leukämie deutlich von dem der anderen Studiengruppen unterscheidet. Um die Daten zu validieren und einen eventuellen Einfluss des Mikrobioms auf das Überleben der Patienten zu identifizieren, sollten die Untersuchungen an einer deutlich größeren Studienpopulation wiederholt werden.

6. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1.</i> Geschlechterverteilung über die drei Gruppen.....	32
<i>Tabelle 2.</i> Mittlere Altersverteilung (in Jahren), Größenverteilung (in cm), Gewichtsverteilung (in kg) und Verteilung des Body Mass Index (in kg/m ²) (\pm die jeweilige Standardabweichung) über die Gruppenzugehörigkeit.....	33
<i>Tabelle 3.</i> Verteilung der Besiedlung mit multiresistenten Keimen über die drei Gruppen	36
<i>Tabelle 4.</i> Therapieverlauf der Patienten mit akuter Leukämie	39
<i>Tabelle 5.</i> Kultivierte Bakterien in den mikrobiologischen Proben als Auslöser von klinischen Infektionen und deren Vorhandensein im Mikrobiom (als 16s rDNA) allgemein und vor dem Auftreten der klinischen Symptomatik.....	55

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. ‘Agarose gel image for isolated gDNA‘ nach IMGGM Laboratories.....	17
Abbildung 2. ‘Scheme of the 16S amplification strategy‘ nach IMGGM Laboratories	18
Abbildung 3. ‘16S rRNA primer information‘ nach IMGGM Laboratories.....	18
Abbildung 4. ‘Agarose gel image for the initial PCR reactions of the samples 1‘ nach IMGGM Laboratories	19
Abbildung 5. ‘Agarose gel image for the initial PCR reactions of the samples 2‘ nach IMGGM Laboratories	20
Abbildung 6. ‘Agarose gel image for the repeated PCR reactions of the 7 failed samples‘ nach IMGGM Laboratories.....	20
Abbildung 7. ‘Agarose gel image for the repeated PCR reaction of twice failed samples‘ nach IMGGM Laboratories.....	21
Abbildung 8. Schema der bridge amplification nach IMGGM Laboratories	22
Abbildung 9. MiSeq technische Qualitätsparameter nach Illumina Inc.	23
Abbildung 10. Qualitätsparameter der Sequenzierung der vorliegenden Studie nach IMGGM Laboratories	24
Abbildung 11. ‘Mean PHRED Score distribution before merging and trimming of reads‘ nach IMGGM Laboratories.....	25
Abbildung 12. ‘Mean PHRED Score distribution after merging and trimming of reads‘ nach IMGGM Laboratories.....	26
Abbildung 13. Artensättigungskurve nach IMGGM Laboratories	28
Abbildung 14. Zeitpunkte der Stuhlprobenabgaben, das Vorhandensein einer Besiedlung mit multiresistenten Keimen und der Therapieverlauf bezüglich einer Blastenpersistenz, eines Rezidivs und einer alloSZT bei den Patienten mit akuter Leukämie. ALL = akute lymphatische Leukämie; AML = akute myeloische Leukämie; MRGN = multiresistente gram negative Keime; alloSZT = allogene Stammzelltransplantation	37
Abbildung 15. Anzahl verschiedener Antibiotika pro LEU-Patient	40
Abbildung 16. Verabreichte Antibiotikaklassen	41
Abbildung 17. Vergleich der bakteriellen Diversität in OTUs in den drei Gruppen LEU, IOT und KG. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert. LEU = akute Leukämie; IOT = Patienten aus der interdisziplinären onkologischen Tagesklinik; KG = Kongrollgruppe; ** = $p < .001$; OTU = operational taxonomic unit	42

<i>Abbildung 18.</i> Vergleich der bakteriellen Diversität anhand des Shannon Index in den drei Gruppen LEU, IOT und KG. LEU = akute Leukämie; IOT = Patienten aus der interdisziplinären onkologischen Tagesklinik; KG = Kongrollgruppe; ** = $p < .001$;	44
<i>Abbildung 19.</i> Die Entwicklung der bakteriellen Diversität, dargestellt anhand der Anzahl der OTUs im Therapieverlauf (in Behandlungstagen) bei acht ausgewählten LEU-Patienten. OTU = operational taxonomic unit	45
<i>Abbildung 20.</i> Bakterienmenge in ng/mg Stuhl der drei Gruppen im Vergleich. LEU = Akute Leukämie; IOT = Patienten aus der interdisziplinären onkologischen Tagesklinik; KG = Kontrollgruppe; * = $p < .05$; ** = $p < .001$	47
<i>Abbildung 21.</i> Veränderungen der Bakterienmenge (ng/mg Stuhl) im Verlauf zu den Zeitpunkten des Behandlungsbeginns, der frühen und späten Phase der Behandlung und nach der allogenen Stammzelltransplantation.	48
<i>Abbildung 22.</i> Mittelwert des prozentualen Anteils der Bakterien <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcaceae</i> und <i>Escherichia-Shigella</i> spp. am Mikrobiom der Probanden aus den drei Gruppen LEU, KG und IOT. LEU = Akute Leukämie; IOT = Patienten aus der interdisziplinären onkologischen Tagesklinik; KG = Kontrollgruppe; * = $p < .05$; ** = $p < .001$	50
<i>Abbildung 23.</i> Prozentualer Anteil der Bakterien <i>Prevotella</i> spp., <i>Blautia</i> spp., <i>Lachnospiraceae</i> und <i>Ruminococcaceae</i> am Mikrobiom der drei Gruppen LEU, IOT und KG; LEU = Akute Leukämie; IOT = Patienten aus der interdisziplinären onkologischen Tagesklinik; KG = Kontrollgruppe; * = $p < .05$; ** = $p < .001$	52
<i>Abbildung 24.</i> Veränderungen der relativen Häufigkeiten (in %) der verschiedenen Familien des intestinalen Mikrobioms des akuten Leukämie -Patienten 1 über den Zeitverlauf der Behandlung (Tag 1 = Tag 1 des ersten Chemotherapiezyklus	57
<i>Abbildung 25.</i> Graphische Darstellung der verschiedenen Antibiotikatherapien (in den jeweiligen farblichen Darstellungen) des akuten Leukämie-Patienten 1 über den Zeitverlauf der Behandlung (Tag 1 = Tag 1 des ersten Chemoterapiezyklus).	57
<i>Abbildung 26.</i> Veränderungen der relativen Häufigkeiten (in %) der verschiedenen Familien des intestinalen Mikrobioms des akuten Leukämie- Patienten 2 über den Zeitverlauf der Behandlung (Tag 1 = Tag 1 des ersten Chemotherapiezyklus)	60

<i>Abbildung 27.</i> Graphische Darstellung der verschiedenen Antibiotikatherapien (in den jeweiligen farblichen Darstellungen) des akuten Leukämie-Patienten 2 über den Zeitverlauf der Behandlung (Tag 1 = Tag 1 des ersten Chemotherapiezyklus).....	60
<i>Abbildung 28.</i> Veränderungen der relativen Häufigkeiten (in %) der verschiedenen Familien des intestinalen Mikrobioms des akuten Leukämie- Patienten 7 über den Zeitverlauf der Behandlung (Tag 1 = Tag 1 des ersten Chemotherapiezyklus).....	63
<i>Abbildung 29.</i> Graphische Darstellung der verschiedenen Antibiotikatherapien (in den jeweiligen farblichen Darstellungen) des akuten Leukämie-Patienten 7 über den Zeitverlauf der Behandlung (Tag 1 = Tag 1 des ersten Chemotherapiezyklus).....	63
<i>Abbildung 30.</i> Veränderungen der relativen Häufigkeiten (in %) der verschiedenen Familien des intestinalen Mikrobioms des akuten Leukämie- Patienten 8 über den Zeitverlauf der Behandlung (Tag 1 = Tag 1 des ersten Chemotherapiezyklus).....	66
<i>Abbildung 31.</i> Graphische Darstellung der verschiedenen Antibiotikatherapien (in den jeweiligen farblichen Darstellungen) des akuten Leukämie-Patienten 8 über den Zeitverlauf der Behandlung (Tag 1 = Tag 1 des ersten Chemotherapiezyklus).....	66

8. Literaturverzeichnis

- ARBER, D. A., ORAZI, A., HASSERJIAN, R., THIELE, J., BOROWITZ, M. J., LE BEAU, M. M., BLOOMFIELD, C. D., CAZZOLA, M. & VARDIMAN, J. W. 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127, 2391-405.
- BASSAN, R. & HOELZER, D. 2011. Modern Therapy of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 29, 532-543.
- BENNETT, J. M., CATOVSKY, D., DANIEL, M. T., FLANDRIN, G., GALTON, D. A., GRALNICK, H. R. & SULTAN, C. 1976. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*, 33, 451-8.
- BLENNOW, O. & LJUNGMAN, P. 2016. The challenge of antibiotic resistance in haematology patients. *Br J Haematol*, 172, 497-511.
- BUFFIE, C. G. & PAMER, E. G. 2013. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat Rev Immunol*, 13, 790-801.
- BUNSE, A., HOLLÄNDER-CZYTKO, H., KLÄMBT, C., KUBIGSTELTIG, I., KÜCK, U., MEINHARDT, F., NICKELSEN, J., NOWROUSIAN, M., PÖGGELER, S., POLLMANN, S., WEILER, E. & WOLFF, G. 2005. PCR-Analytik. In: KÜCK, U. (ed.) *Praktikum der Molekulargenetik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- BURNETT, A. K., RUSSELL, N. H., HILLS, R. K., HUNTER, A. E., KJELDSSEN, L., YIN, J., GIBSON, B. E., WHEATLEY, K. & MILLIGAN, D. 2013. Optimization of chemotherapy for younger patients with acute myeloid leukemia: results of the medical research council AML15 trial. *J Clin Oncol*, 31, 3360-8.
- CABALLERO, S., CARTER, R., KE, X., SUSAC, B., LEINER, I. M., KIM, G. J., MILLER, L., LING, L., MANOVA, K. & PAMER, E. G. 2015. Distinct but Spatially Overlapping Intestinal Niches for Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* and Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS Pathog*, 11, e1005132.
- CANAANI, J., BEOHOU, E., LABOPIN, M., SOCIE, G., HUYNH, A., VOLIN, L., CORNELISSEN, J., MILPIED, N., GEDDE-DAHL, T., DECONINCK, E., FEGUEUX, N., BLAISE, D., MOHTY, M. & NAGLER, A. 2017. Impact of FAB Classification on Predicting Outcome in Acute Myeloid Leukemia, Not Otherwise Specified, Patients Undergoing Allogeneic Stem Cell Transplantation in CR1: An Analysis of 1690 Patients from the Acute Leukemia Working Party of EBMT. *Am J Hematol*.
- CARDINELLI, C. S., SALA, P. C., ALVES, C. C., TORRINHAS, R. S. & WAITZBERG, D. L. 2015. Influence of intestinal microbiota on body weight gain: a narrative review of the literature. *Obes Surg*, 25, 346-53.
- CHEN, L., WANG, W., ZHOU, R., NG, S. C., LI, J., HUANG, M., ZHOU, F., WANG, X., SHEN, B., M, A. K., WU, K. & XIA, B. 2014. Characteristics of fecal and mucosa-associated microbiota in Chinese patients with inflammatory bowel disease. *Medicine (Baltimore)*, 93, e51.
- CORNELISSEN, J. J., GRATWOHL, A., SCHLENK, R. F., SIERRA, J., BORNHAUSER, M., JULIUSSON, G., RACIL, Z., ROWE, J. M., RUSSELL, N., MOHTY, M., LOWENBERG, B., SOCIE, G., NIEDERWIESER, D. & OSSENKOPPELE, G. J. 2012. The European LeukemiaNet AML Working Party consensus statement on allogeneic HSCT for patients with AML in remission: an integrated-risk adapted approach. *Nat Rev Clin Oncol*, 9, 579-590.

- CORNELY, O. A., MAERTENS, J., WINSTON, D. J., PERFECT, J., ULLMANN, A. J., WALSH, T. J., HELFGOTT, D., HOLOWIECKI, J., STOCKELBERG, D., GOH, Y. T., PETRINI, M., HARDALO, C., SURESH, R. & ANGULO-GONZALEZ, D. 2007. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Engl J Med*, 356, 348-59.
- COSTELLO, E. K., LAUBER, C. L., HAMADY, M., FIERER, N., GORDON, J. I. & KNIGHT, R. 2009. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, 326, 1694-7.
- CROWTHER, D., BATEMAN, C. J., VARTAN, C. P., WHITEHOUSE, J. M., MALPAS, J. S., FAIRLEY, G. H. & SCOTT, R. B. 1970. Combination chemotherapy using L-asparaginase, daunorubicin, and cytosine arabinoside in adults with acute myelogenous leukaemia. *Br Med J*, 4, 513-7.
- DAVID, L. A., MAURICE, C. F., CARMODY, R. N., GOOTENBERG, D. B., BUTTON, J. E., WOLFE, B. E., LING, A. V., DEVLIN, A. S., VARMA, Y., FISCHBACH, M. A., BIDDINGER, S. B., DUTTON, R. J. & TURNBAUGH, P. J. 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505, 559-63.
- DE FILIPPO, C., CAVALIERI, D., DI PAOLA, M., RAMAZZOTTI, M., POULLET, J. B., MASSART, S., COLLINI, S., PIERACCINI, G. & LIONETTI, P. 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 14691-6.
- DE NAUROIS, J., NOVITZKY-BASSO, I., GILL, M. J., MARTI, F. M., CULLEN, M. H. & ROILA, F. 2010. Management of febrile neutropenia: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol*, 21 Suppl 5, v252-6.
- DEROLF, A. R., KRISTINSSON, S. Y., ANDERSSON, T. M., LANDGREN, O., DICKMAN, P. W. & BJORKHOLM, M. 2009. Improved patient survival for acute myeloid leukemia: a population-based study of 9729 patients diagnosed in Sweden between 1973 and 2005. *Blood*, 113, 3666-72.
- DING, T. & SCHLOSS, P. D. 2014. Dynamics and associations of microbial community types across the human body. *Nature*, 509, 357-60.
- DÖHNER, H., ESTEY, E., GRIMWADE, D., AMADORI, S., APPELBAUM, F. R., BÜCHNER, T., DOMBRET, H., EBERT, B. L., FENAUX, P., LARSON, R. A., LEVINE, R. L., LO-COCO, F., NAOE, T., NIEDERWIESER, D., OSSENKOPPELE, G. J., SANZ, M., SIERRA, J., TALLMAN, M. S., TIEN, H.-F., WEI, A. H., LÖWENBERG, B. & BLOOMFIELD, C. D. 2016. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*.
- DÖHNER, H., WEISDORF, D. J. & BLOOMFIELD, C. D. 2015. Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 373, 1136-1152.
- DOMINGUEZ-BELLO, M. G., BLASER, M. J., LEY, R. E. & KNIGHT, R. 2011. Development of the Human Gastrointestinal Microbiota and Insights From High-Throughput Sequencing. *Gastroenterology*, 140, 1713-1719.
- DONSKEY, C. J. 2004. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. *Clin Infect Dis*, 39, 219-26.
- ECKBURG, P. B., BIK, E. M., BERNSTEIN, C. N., PURDOM, E., DETHLEFSEN, L., SARGENT, M., GILL, S. R., NELSON, K. E. & RELMAN, D. A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308, 1635-8.

- EINSELE, H., BERTZ, H., BEYER, J., KIEHL, M. G., RUNDE, V., KOLB, H. J., HOLLER, E., BECK, R., SCHWERDFEGER, R., SCHUMACHER, U., HEBART, H., MARTIN, H., KIENAST, J., ULLMANN, A. J., MASCHMEYER, G., KRUGER, W., NIEDERWIESER, D., LINK, H., SCHMIDT, C. A., OETTLE, H. & KLINGEBIEL, T. 2003. Infectious complications after allogeneic stem cell transplantation: epidemiology and interventional therapy strategies--guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). *Ann Hematol*, 82 Suppl 2, S175-85.
- FORD, C. D., GAZDIK, M. A., LOPANSRI, B. K., WEBB, B., MITCHELL, B., COOMBS, J., HODA, D. & PETERSEN, F. B. 2017. Vancomycin-Resistant Enterococcus Colonization and Bacteremia and Hematopoietic Stem Cell Transplantation Outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant*, 23, 340-346.
- GALLOWAY-PENA, J. R., SMITH, D. P., SAHASRABHOJANE, P., AJAMI, N. J., WADSWORTH, W. D., DAVER, N. G., CHEMALY, R. F., MARSH, L., GHANTOJI, S. S., PEMMARAJU, N., GARCIA-MANERO, G., REZVANI, K., ALOUSI, A. M., WARGO, J. A., SHPALL, E. J., FUTREAL, P. A., GUINDANI, M., PETROSINO, J. F., KONTOYIANNIS, D. P. & SHELBURNE, S. A. 2016. The role of the gastrointestinal microbiome in infectious complications during induction chemotherapy for acute myeloid leukemia. *Cancer*, 122, 2186-96.
- GANJI, L., ALEBOUYEH, M., SHIRAZI, M. H., ESHRAGHI, S. S., MIRSHAFIEY, A., EBRAHIMI DARYANI, N. & ZALI, M. R. 2016. Dysbiosis of fecal microbiota and high frequency of *Citrobacter*, *Klebsiella* spp., and *Actinomyces* in patients with irritable bowel syndrome and gastroenteritis. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 9, 325-330.
- GEVERS, D., KUGATHASAN, S., DENSON, L. A., VAZQUEZ-BAEZA, Y., VAN TREUREN, W., REN, B., SCHWAGER, E., KNIGHTS, D., SONG, S. J., YASSOUR, M., MORGAN, X. C., KOSTIC, A. D., LUO, C., GONZALEZ, A., MCDONALD, D., HABERMAN, Y., WALTERS, T., BAKER, S., ROSH, J., STEPHENS, M., HEYMAN, M., MARKOWITZ, J., BALDASSANO, R., GRIFFITHS, A., SYLVESTER, F., MACK, D., KIM, S., CRANDALL, W., HYAMS, J., HUTTENHOWER, C., KNIGHT, R. & XAVIER, R. J. 2014. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe*, 15, 382-92.
- GÖKBUGET, N., HAUSWIRTH, A., KNEBA, M., OTTMANN, O. G. & SCHANZ, U. 2012. *Akute Lymphatische Leukämie (ALL)* [Online]. Available: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-lymphatische-leukaemie-all/@@view/html/index.html#IDOERAAC> [Accessed 25.01.2017].
- GUDIOL, C., TUBAU, F., CALATAYUD, L., GARCIA-VIDAL, C., CISNAL, M., SANCHEZ-ORTEGA, I., DUARTE, R., CALVO, M. & CARRATALA, J. 2011. Bacteraemia due to multidrug-resistant Gram-negative bacilli in cancer patients: risk factors, antibiotic therapy and outcomes. *J Antimicrob Chemother*, 66, 657-63.
- HEROLD, G. 2016. *Innere Medizin*, Herold, Gerd.
- HOLLER, E., BUTZHAMMER, P., SCHMID, K., HUNDSRUCKER, C., KOESTLER, J., PETER, K., ZHU, W., SPORRER, D., HEHLGANS, T., KREUTZ, M., HOLLER, B., WOLFF, D., EDINGER, M., ANDREESSEN, R., LEVINE, J. E., FERRARA, J. L., GESSNER, A., SPANG, R. & OEFNER, P. J. 2014. Metagenomic analysis of the stool microbiome in

- patients receiving allogeneic stem cell transplantation: loss of diversity is associated with use of systemic antibiotics and more pronounced in gastrointestinal graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 20, 640-5.
- IMHANN, F., BONDER, M. J., VICH VILA, A., FU, J., MUJAGIC, Z., VORK, L., TIGCHELAAR, E. F., JANKIPERSADSING, S. A., CENIT, M. C., HARMSSEN, H. J., DIJKSTRA, G., FRANKE, L., XAVIER, R. J., JONKERS, D., WIJMENGA, C., WEERSMA, R. K. & ZHERNAKOVA, A. 2016. Proton pump inhibitors affect the gut microbiome. *Gut*, 65, 740-8.
- INSTITUT FÜR HYGIENE UND MIKROBIOLOGIE DER UNIVERSITÄT WÜRZBURG. 2018. Leistungskatalog Bakteriologie, Stand 01.02.2018. Available: <https://www.hygiene.uni-wuerzburg.de/diag-mikrobiologie/leistungskatalog/>[Accessed 23.03.2019].
- ITZYKSON, R., GARDIN, C., PAUTAS, C., THOMAS, X., TURLURE, P., RAFFOUX, E., TERRE, C., FENAUX, P., CASTAIGNE, S., DOMBRET, H. & BOISSEL, N. 2011. Impact of post-remission therapy in patients aged 65-70 years with de novo acute myeloid leukemia: a comparison of two concomitant randomized ALFA trials with overlapping age inclusion criteria. *Haematologica*, 96, 837-44.
- JENQ, R. R., TAUR, Y., DEVLIN, S. M., PONCE, D. M., GOLDBERG, J. D., AHR, K. F., LITTMANN, E. R., LING, L., GOBOURNE, A. C., MILLER, L. C., DOCAMPO, M. D., PELED, J. U., ARPAIA, N., CROSS, J. R., PEETS, T. K., LUMISH, M. A., SHONO, Y., DUDAKOV, J. A., POECK, H., HANASH, A. M., BARKER, J. N., PERALES, M. A., GIRALT, S. A., PAMER, E. G. & VAN DEN BRINK, M. R. 2015. Intestinal *Blautia* Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 21, 1373-83.
- KANTARJIAN, H., O'BRIEN, S., CORTES, J., GILES, F., FADERL, S., JABBOUR, E., GARCIA-MANERO, G., WIERDA, W., PIERCE, S., SHAN, J. & ESTEY, E. 2006. Results of intensive chemotherapy in 998 patients age 65 years or older with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: predictive prognostic models for outcome. *Cancer*, 106, 1090-8.
- KINNEBREW, M. A., UBEDA, C., ZENEWICZ, L. A., SMITH, N., FLAVELL, R. A. & PAMER, E. G. 2010. Bacterial flagellin stimulates Toll-like receptor 5-dependent defense against vancomycin-resistant *Enterococcus* infection. *J Infect Dis*, 201, 534-43.
- KLEPIN, H. D., GEIGER, A. M., TOOZE, J. A., KRITCHEVSKY, S. B., WILLIAMSON, J. D., PARDEE, T. S., ELLIS, L. R. & POWELL, B. L. 2013. Geriatric assessment predicts survival for older adults receiving induction chemotherapy for acute myelogenous leukemia. *Blood*, 121, 4287-4294.
- LARSEN, N., VOGENSEN, F. K., VAN DEN BERG, F. W., NIELSEN, D. S., ANDREASEN, A. S., PEDERSEN, B. K., AL-SOUD, W. A., SORENSEN, S. J., HANSEN, L. H. & JAKOBSEN, M. 2010. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One*, 5, e9085.
- LECH-MARANDA, E., SEWERYN, M., GIEBEL, S., HOLOWIECKI, J., PIATKOWSKA-JAKUBAS, B., WEGRZYN, J., SKOTNICKI, A., KIELBINSKI, M., KULICZKOWSKI, K., PALUSZEWSKA, M., JEDRZEJCZAK, W. W., DUTKA, M., HELLMANN, A., FLONT, M., ZDZIARSKA, B., PALYNYCZKO, G., KONOPKA, L., SZPILA, T., GAWRONSKI, K., SULEK, K., SOKOLOWSKI, J., KLOCZKO, J., WARZOCHA, K. & ROBAK, T. 2010.

- Infectious complications in patients with acute myeloid leukemia treated according to the protocol with daunorubicin and cytarabine with or without addition of cladribine. A multicenter study by the Polish Adult Leukemia Group (PALG). *Int J Infect Dis*, 14, e132-40.
- LITTMAN, D. R. & PAMER, E. G. 2011. Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. *Cell Host Microbe*, 10, 311-23.
- MACPHERSON, A. J., GEUKING, M. B. & MCCOY, K. D. 2005. Immune responses that adapt the intestinal mucosa to commensal intestinal bacteria. *Immunology*, 115, 153-62.
- MACPHERSON, A. J. & UHR, T. 2004. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*, 303, 1662-5.
- MARÍN, M., GUDIOL, C., ARDANUY, C., GARCIA-VIDAL, C., JIMENEZ, L., DOMINGO-DOMENECH, E., PÉREZ, F. J. & CARRATALÀ, J. 2015. Factors influencing mortality in neutropenic patients with haematologic malignancies or solid tumours with bloodstream infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 21, 583-590.
- MARTINEZ, I., STEGEN, J. C., MALDONADO-GOMEZ, M. X., EREN, A. M., SIBA, P. M., GREENHILL, A. R. & WALTER, J. 2015. The gut microbiota of rural papua new guineans: composition, diversity patterns, and ecological processes. *Cell Rep*, 11, 527-38.
- MEEHAN, C. J. & BEIKO, R. G. 2014. A phylogenomic view of ecological specialization in the Lachnospiraceae, a family of digestive tract-associated bacteria. *Genome Biol Evol*, 6, 703-13.
- MONTASSIER, E., AL-GHALITH, G. A., WARD, T., CORVEC, S., GASTINNE, T., POTEL, G., MOREAU, P., DE LA COCHETIERE, M. F., BATARD, E. & KNIGHTS, D. 2016. Pretreatment gut microbiome predicts chemotherapy-related bloodstream infection. *Genome Med*, 8, 49.
- PEREZ, F., PULTZ, M. J., ENDIMIANI, A., BONOMO, R. A. & DONSKEY, C. J. 2011. Effect of antibiotic treatment on establishment and elimination of intestinal colonization by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 2585-9.
- PULTE, D., JANSEN, L., CASTRO, F. A., KRILAVICIUTE, A., KATALINIC, A., BARNES, B., RESSING, M., HOLLECZEK, B., LUTTMANN, S. & BRENNER, H. 2016. Survival in patients with acute myeloblastic leukemia in Germany and the United States: Major differences in survival in young adults. *Int J Cancer*, 139, 1289-96.
- RAMOS, N. R., MO, C. C., KARP, J. E. & HOURIGAN, C. S. 2015. Current Approaches in the Treatment of Relapsed and Refractory Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med*, 4, 665-95.
- RÖLLIG, C., BEELEN, D. W., BRAESS, J., GREIL, R., NIEDERWIESER, D., PASSWEG, J., REINHARDT, D. & SCHLENK, R. F. 2017. *Akute Myeloische Leukämie* [Online]. Available: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/@@view/html/index.html> [Accessed 25.01.2017 2017].
- ROUND, J. L. & MAZMANIAN, S. K. 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*, 9, 313-23.

- ROWE, J. M., BUCK, G., BURNETT, A. K., CHOPRA, R., WIERNIK, P. H., RICHARDS, S. M., LAZARUS, H. M., FRANKLIN, I. M., LITZOW, M. R., CIOBANU, N., PRENTICE, H. G., DURRANT, J., TALLMAN, M. S. & GOLDSTONE, A. H. 2005. Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood*, 106, 3760-3767.
- SALLMAN, D. A. & LANCET, J. E. 2016. What are the most promising new agents in acute myeloid leukemia? *Curr Opin Hematol*.
- SHANNON, C. E. 1948. A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal*, 27, 379-423.
- SIMBERLOFF, D. 1972. Properties of the Rarefaction Diversity Measurement. *The American Naturalist*, 106, 414-418.
- SOUTHAM, C. M., CRAVER, L. F., DARGEON, H. W. & BURCHENAL, J. H. 1951. A study of the natural history of acute leukemia with special reference to the duration of the disease and the occurrence of remissions. *Cancer*, 4, 39-59.
- TAUR, Y., XAVIER, J. B., LIPUMA, L., UBEDA, C., GOLDBERG, J., GOBOURNE, A., LEE, Y. J., DUBIN, K. A., SOCCI, N. D., VIALE, A., PERALES, M. A., JENQ, R. R., VAN DEN BRINK, M. R. & PAMER, E. G. 2012. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*, 55, 905-14.
- TURNBAUGH, P. J., HAMADY, M., YATSUNENKO, T., CANTAREL, B. L., DUNCAN, A., LEY, R. E., SOGIN, M. L., JONES, W. J., ROE, B. A., AFFOURTIT, J. P., EGHOLM, M., HENRISSAT, B., HEATH, A. C., KNIGHT, R. & GORDON, J. I. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457, 480-4.
- UBEDA, C., TAUR, Y., JENQ, R. R., EQUINDA, M. J., SON, T., SAMSTEIN, M., VIALE, A., SOCCI, N. D., VAN DEN BRINK, M. R., KAMBOJ, M. & PAMER, E. G. 2010. Vancomycin-resistant Enterococcus domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J Clin Invest*, 120, 4332-41.
- VAN BEKKUM, D. W., ROODENBURG, J., HEIDT, P. J. & VAN DER WAAIJ, D. 1974. Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora. *Journal of the National Cancer Institute*, 52, 401-404.
- VAN DER WAAIJ, D., BERGHUIS-DE VRIES, J. M. & LEKKERKERK, L.-V. 1971. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J Hyg (Lond)*, 69, 405-11.
- VAN VLIET, M. J., HARMSSEN, H. J., DE BONT, E. S. & TISSING, W. J. 2010a. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. *PLoS Pathog*, 6, e1000879.
- VAN VLIET, M. J., HARMSSEN, H. J. M., DE BONT, E. S. J. M. & TISSING, W. J. E. 2010b. The Role of Intestinal Microbiota in the Development and Severity of Chemotherapy-Induced Mucositis. *PLOS Pathogens*, 6, e1000879.
- VELLENGA, E., VAN PUTTEN, W., OSSENKOPPELE, G. J., VERDONCK, L. F., THEOBALD, M., CORNELISSEN, J. J., HUIJGENS, P. C., MAERTENS, J., GRATWOHL, A., SCHAAFSMA, R., SCHANZ, U., GRAUX, C., SCHOUTEN, H. C., FERRANT, A., BARGETZI, M., FEY,

- M. F. & LÖWENBERG, B. 2011. Autologous peripheral blood stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Blood*, 118, 6037-6042.
- VOLLAARD, E. J. & CLASENER, H. A. 1994. Colonization resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 38, 409-14.
- WARTENBERG, D., GROVES, F. D. & ADELMAN, A. S. 2008. Acute Lymphoblastic Leukemia: Epidemiology and Etiology. *Acute Leukemias*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- WHITTAKER, R. H. 1972. Evolution and Measurement of Species Diversity. *Taxon*, 21, 213-251.
- WONG, J. M., DE SOUZA, R., KENDALL, C. W., EMAM, A. & JENKINS, D. J. 2006. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol*, 40, 235-43.
- WU, G. D., LEWIS, J. D., HOFFMANN, C., CHEN, Y. Y., KNIGHT, R., BITTINGER, K., HWANG, J., CHEN, J., BERKOWSKY, R., NESSEL, L., LI, H. & BUSHMAN, F. D. 2010. Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags. *BMC Microbiol*, 10, 206.

9. Veröffentlichung der Ergebnisse der Arbeit

Die Arbeit wurde im Rahmen einer Posterpräsentation auf dem 21. Kongress der European Hematology Association in Kopenhagen unter folgendem Namen ‚Comprehensive monitoring of gut microbiota during therapy of acute leukemia.‘ veröffentlicht. Das Poster kann auf der folgenden Seite eingesehen werden.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. A. Geier, für die Überlassung des hochinteressanten Themas und die hervorragende Unterstützung. Desweiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Kurzai für die Übernahme des Koreferats und die äußerst hilfreichen Korrekturhinweise bedanken.

Von ganzem Herzen bedanken möchte ich mich bei Leo Rasche und Monika Rau, für ihren Rat, ihre fortwährende Hilfe und Ideen, insbesondere während der Planungs- und Durchführungsphase des Projekts, und die konstruktiven Vorschläge zur Verfassung der Arbeit. Zudem möchte ich den Beiden danken, dass sie mein Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten geweckt haben.

Den Mitarbeiterinnen des hepatologischen Labors möchte ich außerdem herzlich danken für die Annahme, Aufbewahrung und anschließendem Versenden der gesammelten Proben.

Zu allerletzt gilt mein Dank meinen Eltern, die mich während der Entstehung der Doktorarbeit sowie des gesamten Studiums bedingungslos unterstützt haben.