

**Infektionen des diabetischen Fußsyndroms:
Umfassende Mikrobiom-Analyse mittels Bakterien-Kultur,
quantitativer Real-Time-PCR, PCR/DHPLC
und Evaluation der Biofilmbildung ausgewählter Bakterienisolate**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von Exner, Katharina
aus Steinfurt**

Gießen 2019

**Infektionen des diabetischen Fußsyndroms:
Umfassende Mikrobiom-Analyse mittels Bakterien-Kultur,
quantitativer Real-Time-PCR, PCR/DHPLC
und Evaluation der Biofilmbildung ausgewählter Bakterienisolate**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von Exner, Katharina
aus Steinfurt**

Gießen 2019

Aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie unter der Leitung
von Prof. Dr. Trinad Chakraborty des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Eugen Domann

Gutachter: Prof. Dr. Florian Wagenlehner

Tag der Disputation: 10. September 2020

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 DFS – Erläuterung der Erkrankung	1
1.1.1 Diabetes mellitus	1
1.1.2 Das diabetische Fußsyndrom (DFS)	3
1.2 Die mikrobiologische Besiedlung der Haut	25
1.2.1 Bakterien	26
1.2.2 Pilze, Viren, Archaea	28
1.2.3 Die mikrobiologische Besiedlung diabetischer FüÙe	29
1.3 Biofilm	32
1.4. Fazit und Fragestellung	38
2 Material und Methoden	39
2.1 Material	39
2.1.1 Verbrauchsmaterialien.....	39
2.1.2 Geräte	39
2.1.3 Software.....	41
2.1.4 Nährböden und Kulturmedien	41
2.1.5 Chemikalien	41
2.1.6 Kits.....	43
2.1.7 Verwendete Sonden und Primer.....	43
2.2 Methoden	45
2.2.1 Probengewinnung und Patientenkollektiv.....	45
2.2.2 Kultivierung.....	45
2.2.3 Koagulase Test.....	46
2.2.4 MALDI-TOF (Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung Time-of-Flight)	
.....	47
2.2.5 Sequenzierung.....	48
2.2.6 Real-Time-PCR	50
2.2.7 DHPLC-WAVE®-System	59
2.2.8 Biofilm	62
3 Ergebnisse	64
3.1 Patientenkollektiv	64
3.2 Probenkollektiv	64
3.3 Kulturell nachgewiesenes Erregerspektrum	65
3.4 Per Real-Time-PCR nachgewiesenes Erregerspektrum	68
3.5 Per DHPLC-WAVE®-System nachgewiesenes Erregerspektrum	69
3.6 Erregerspektrum aller drei Methoden zusammen	70
3.7 Methodenvergleich: Kultur vs. Real-Time-PCR	70
3.8 Methodenvergleich: Kultur vs. DHPLC-WAVE®-System	71
3.9 Kultur vs. Real-Time-PCR vs. DHPLC-WAVE®-System	72
3.10 Follow-up-Patienten	79
3.10.1 Auswertung Patient 1	79
3.10.2 Auswertung Patient 2	81

3.11 Biofilm.....	82
4 Diskussion	89
5 Zusammenfassung.....	99
6 Abkürzungsverzeichnis	101
7 Abbildungsverzeichnis	103
8 Tabellenverzeichnis	105
9 Literaturverzeichnis	106
10 Ehrenwörtliche Erklärung	120
11 Danksagung	121

1 Einleitung

1.1 DFS – Erläuterung der Erkrankung

1.1.1 Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselerkrankung, für welche ein erhöhter Blutglukose-Spiegel pathognomonisch ist (Tab. 1). Je nach Ursache dieser Hyperglykämie werden unterschiedliche Diabetes mellitus Formen nach den Leitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft 2009 (DDG 2009) in elf Kategorien zusammengefasst (Tab. 2). Ihnen allen ist eine verminderte bzw. fehlende Sekretion oder eine reduzierte Wirksamkeit des Proteohormons Insulin, dem im Kohlenhydratstoffwechsel eine entscheidende Regulationsfunktion zukommt, gemein. In der Praxis sind vor allem die Typen I und II von Bedeutung. So wird der Anteil des Typ II an allen Diabeteserkrankungen in Deutschland auf 90 % bis 95 % geschätzt (Häussler et al. 2010; Berger 2000). Insgesamt beläuft sich der Anteil an Diabetespunkten in der BRD nach aktuellen Hochrechnungen auf rund 8 % bis 11,5 % der Gesamtbevölkerung (Hauner et al. 2013; Aguirre et al. 2014). Genaue Aussagen zu Prävalenz und Inzidenz gestalten sich jedoch schwierig. Es ist davon auszugehen, dass ein nicht unerheblicher Teil der Diabeteserkrankungen in Deutschland gar nicht diagnostiziert wird (Häussler et al. 2010; Hauner et al. 2013). Je nach angewandten Krankheitskriterien variiert die Größe der Dunkelziffer erheblich (Hauner et al. 2013; Häussler et al. 2010). Außerdem unterliegt die Prävalenz in unterschiedlichen Alters-, ethnischen und sozialen Gruppen starken Schwankungen. Vor allem Menschen höheren Lebensalters sind betroffen; etwa jede vierte bis fünfte Person über 70 Jahren leidet an Diabetes mellitus (Berger 2000). Nicht zuletzt dürfte dieser Umstand der Tatsache geschuldet sein, dass einige der wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung dieser Stoffwechselstörung, wie etwa ein erhöhtes Körpergewicht und mangelnde körperliche Aktivität, mit dem Alter zunehmen (Berger 2000; Häussler et al. 2010). Führt man sich zusätzlich vor Augen, dass sich die Lebenserwartung in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich erhöht hat, verwundert es nicht, dass eine Zunahme der Prävalenz des Typ II Diabetes in der Vergangenheit beobachtet wurde und auch zukünftig weltweit erwartet wird (Berger 2000; Aguirre et al. 2014).

Folglich ist auch mit einer Zunahme der Komplikationen und Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus zu rechnen. Neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen, dem zerebralen Insult, der diabetischen Nephropathie, und der diabetischen Retinopathie, zählt zu diesen auch der diabetische Fuß.

Bezeichnung	Grenzwerte
Normal	Nüchtern < 110 mg/dl (< 6,1 mmol/l) und 2 h nach 75 g Glukose p. o. < 140 mg/dl (< 7,8 mmol/l)
Abnorme Nüchtern- glukose	Nüchtern \geq 110 - < 126 mg/dl (\geq 6,1 - < 7,0 mmol/l) und 2 h nach 75 g Glukose p. o. < 140 mg/dl (< 7,8 mmol/l)
Gestörte Glukose- toleranz	Nüchtern < 126 mg/dl (< 7,0 mmol/l) und 2 h nach 75 g Glukose p. o. \geq 140 - < 200 mg/dl (\geq 7,8 - < 11,1 mmol/l)
Diabetes mellitus	Nüchtern \geq 126 mg/dl (\geq 7,0 mmol/l) oder 2 h nach 75 g Glukose p. o. \geq 200 mg/dl (\geq 11,1 mmol/l)

Tabelle 1 WHO-Diagnosekriterien des Diabetes mellitus 2006 (WHO/IDF)

Ursache	Beispiele
Typ I	Immunologisch vermittelte Zerstörung der β -Zellen
Typ II	Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel
Erkrankungen des exokrinen Pankreas	Pankreatitis, zystische Fibrose, Hämochromatose
Endokrinopathien	Cushing-Syndrom, Phäochromozytom
Iatrogen oder aufgrund toxischer Substanzen	Glukokortikoide, Neuroleptika, Alpha-Interferon
Genetische Defekte der β -Zell-Funktion	MODY 1-3
Genetische Defekte der Insulinwirkung	Lipoatrophischer Diabetes mellitus
Infektionen	CMV, kongenitale Rubella-Infektionen
Seltene Formen von immunologisch bedingtem Diabetes mellitus	Anti-Insulin-AK
Verschiedene andere genetisch bedingte Syndrome	DIDMOAD-Syndrom
Gestations-Diabetes	

Tabelle 2 Formen des Diabetes mellitus nach DDG 2009

(Berger, 2000)

1.1.2 Das diabetische Fußsyndrom (DFS)

1.1.2.1 Einleitung

Das diabetische Fußsyndrom stellt eine Langzeitkomplikation der Grunderkrankung Diabetes mellitus dar. Kennzeichnend für dieses Syndrom sind schlecht abheilende Wunden an Füßen, Knöcheln und Unterschenkeln, die durch eine Reihe pathologischer Veränderungen der Nerven, der Gefäße, der Knochen und des Weichteilgewebes im Zusammenspiel mit äußeren Einflüssen verursacht werden (Sämman et al. 2008). Zu den Betroffenen zählen Patienten mit akut offenen Ulcera oder Gangränen ebenso wie Menschen mit daraus resultierenden Amputationen oder bereits abgeheilten diabetischen Läsionen (Sämman et al., 2008). Insgesamt entwickeln etwa 15 % aller Diabetiker im Laufe ihres Lebens diese Komplikation (Barshes et al., 2013; Reiber et al., 1998). Auf Deutschland bezogen leiden derzeit rund 250.000 Patienten am DFS und 1 Mio. Diabetiker weisen ein erhöhtes Risiko auf, eine Fußläsion zu entwickeln (Hauner et al., 2013; Stiegler, 2004). Neben den individuellen Risiken und Einschränkungen, die diese Erkrankung für alle Betroffenen mit sich bringt, stellt sie auch eine hohe Belastung für das Gesundheitssystem dar. So belaufen sich die gesamten Ausgaben, die für die Behandlung und die Folgen des Diabetischen Fußsyndroms in Deutschland aufgewandt werden müssen, auf rund 2,5 Mrd. Euro im Jahr (Hochlenert et al., 2014). Damit stellt das DFS den größten einzelnen mit Diabetes assoziierten Kostenfaktor dar (Barshes et al., 2013).

1.1.2.2 Pathogenese

Die Basis für die Entstehung eines DFS bildet das Ineinandergreifen komplexer pathologischer Mechanismen, wobei der peripheren sensiblen autonomen Polyneuropathie, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und verschiedenen Infektionen die größte Bedeutung zukommt (Berger, 2000).

Die Polyneuropathie ist auf verschiedene Arten an der Pathogenese des DFS beteiligt. Durch eine Beeinträchtigung des axoplasmatischen Transportes in den Neuronen kommt es zum Untergang distaler Axone (Ziegler, 1993), was das Auftreten früher symmetrisch ausgeprägter Symptome in weit peripher gelegenen Regionen erklärt (Berger, 2000). Anfangs fallen vor allem dünne marklose Typ C-Fasern aus, welche für die Schmerzleitung, das warme Temperaturempfinden und den Hitzeschmerz verantwortlich sind (Berger, 2000; Silbernagel & Despopoulos, 2012). Die reduzierte Wahrnehmung dieser Qualitäten macht betroffene Personen vulnerabel. Sie sind nicht mehr in der Lage, typische schädigende Einflüsse wie Druck durch falsches Schuhwerk oder übermäßige Hitze einer Wärmflasche als solche wahrzunehmen (Berger, 2000). Folglich bleiben schützende Handlungen zur Vermeidung von Traumata oder therapeutische

Maßnahmen zur Abheilung bereits bestehender Läsionen aus oder werden verzögert. Im weiteren Verlauf weisen auch dicke markhaltige Typ A-Fasern, die motorische Signale weiterleiten (Berger, 2000; Silbernagel & Despopoulos, 2012), diabetesbedingte Veränderungen auf (Hochlenert et al., 2014; Silbernagel & Despopoulos, 2012). Die daraus resultierenden Muskelatrophien führen zu Dysbalancen zwischen antagonistischen Muskelgruppen (Hochlenert et al., 2014; Stiegler, 2004). Zugkräfte werden in einem gestörten Verhältnis über die Sehnen auf das Fußskelett übertragen, sodass Fehlstellungen entstehen (Hochlenert et al., 2014). Diese Deformitäten verhindern eine physiologische Abrollbewegung beim Gehen, wobei vor allem die Zehen und der Vorfuß stärker belastet werden (Berger, 2000; Hochlenert et al., 2014; Stiegler, 2004). Ein Verlust an schützendem Fettgewebe, welcher zum Teil durch die Fehlbelastung selbst, aber auch durch die zugrundeliegende Polyneuropathie bedingt ist (Hochlenert et al., 2014), erhöht die Druckbelastung zusätzlich (Stiegler, 2004). Neben den Traumata und Druckulcera begünstigt die Polyneuropathie noch eine weitere Komponente, die zu diabetischen Läsionen führen kann: Durch die Schädigung von sympathisch-autonomen Nervenfasern (Berger, 2000; Silbernagel & Despopoulos, 2012) werden die Schweißdrüsen an den Füßen fehlgesteuert (Hochlenert et al., 2014). Es kommt zur Anhidrose mit Rhagadenbildung und Nagelveränderungen (Stiegler, 2004). Diese Schwachstellen der Hautbarriere dienen bakteriellen Erregern bevorzugt als Eintrittspforte (Stiegler, 2004). Die Entstehung und Ausbreitung von Infektionen wird durch die eingeschränkte Funktion des Immunsystems bei Diabetespatienten noch begünstigt (Berger, 2000; Stiegler, 2004). Sind auch Arterien von der bakteriellen Besiedlung betroffen, kommt es zu Verschlüssen der Blutgefäße mit konsekutiver Verschlechterung des Sauerstoffangebotes im Entzündungsgebiet (Berger, 2000). Gepaart mit einem erhöhten Sauerstoffverbrauch und extravaskulären Ödemen, die die Blutversorgung zusätzlich drosseln, entwickeln sich auch ohne angiopathische Veränderungen Nekrosen (Berger, 2000). Die Bedeutung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit darf dennoch nicht unterschätzt werden. Immerhin tritt sie bei Diabetikern zwei- bis sechsmal häufiger auf als bei Nichtdiabetikern (Berger, 2000; Stiegler, 2004), und verursacht gerade im Bereich der Ferse oft unheilbare Läsionen, die hohe Amputationen mit sich bringen (Bauer et al., 2010; Berger, 2000; Hochlenert et al., 2014).

1.1.2.3 Systematik der Ulcera

Je nachdem, welcher der beschriebenen pathologischen Faktoren überwiegt, wird zwischen neuropathisch-infizierter (34,5 % - 62 %), neuropathisch-ischämischer (25 % - 40,1 %) und rein ischämischer (25 % - 40,1 %) Genese des Diabetischen Fußsyndroms unterschieden (Bauer et al., 2010; Berger, 2000; Stiegler, 2004). Diese Parameter finden auch Einzug in die gebräuchlichen Klassifikationen der diabetischen Fußläsionen nach Wagner und Armstrong (Tab. 3) und die PEDIS-Einteilung (Tab. 4) (Hochlenert et al., 2014).

	Wagner 0	Wagner 1	Wagner 2	Wagner 3	Wagner 4	Wagner 6
Armstrong A	Risikofuß: prä- oder postulcerativ	Oberflächliche Ulzeration	Tiefes Ulcus mit Beteiligung von Sehnen oder Gelenkkapsel	Tiefes Ulcus mit Infektion von Knochen oder Gelenken	Begrenzte Nekrose auf Teile des Fußes	Nekrose des gesamten Fußes
Armstrong B	Mit Infektion	Mit Infektion	Mit Infektion	Mit Infektion	Mit Infektion	Mit Infektion
Armstrong C	Mit Ischämie	Mit Ischämie	Mit Ischämie	Mit Ischämie	Mit Ischämie	Mit Ischämie
Armstrong D	Mit Infektion und Ischämie	Mit Infektion und Ischämie	Mit Infektion und Ischämie	Mit Infektion und Ischämie	Mit Infektion und Ischämie	Mit Infektion und Ischämie

Tabelle 3 Klassifikation diabetischer Fußläsionen nach Wagner und Armstrong

(Bauer et al., 2010; Hochlenert et al., 2014)

	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4
Perfusion	Keine paVK	paVK ohne Ischämie	Ischämie	
Extent	Fläche in cm ²	Fläche in cm ²	Fläche in cm ²	Fläche in cm ²
Depth	Ulcus bis zur Dermis	Beteiligung von Subkutis, Faszien, Muskeln und Sehnen	Infiltration von Knochen und Gelenken	
Infection	Keine Symptome	Entzündung der Haut oder Subkutis	Infektion bis in tiefe Gewebeschichten reichend	SIRS (systemic inflammatory response syndrome)
Sensation	Kein Sensibilitätsverlust	Sensibilität eingeschränkt		

Tabelle 4 PEDIS Klassifikation diabetischer Fußläsionen

(Wiemeyer et al., 2012)

1.1.2.4 Komplikationen des diabetischen Fußsyndroms

Die Amputation ist eine der schwerwiegendsten Komplikationen des DFS. Die perioperative Mortalität liegt bei 22 % und ca. 50 % der Patienten versterben innerhalb von 3 Jahren nach Amputation (Stiegler, 2004). Diejenigen, die überleben, haben mit zahlreichen anderen Problemen zu kämpfen. Keine andere Folgeerkrankung des Diabetes mellitus wirkt sich negativer auf die Lebensqualität der Betroffenen aus (Barshes et al., 2013). Zum einen geht eine Amputation mit dem Verlust der Mobilität einher. So können über 50 % der Patienten nicht selbstständig gehen (Hochlenert et al., 2014), und bis zu 35 % sind dauerhaft auf die Pflege anderer angewiesen (Stiegler, 2004). Die Situation verschärft sich sogar noch, wenn zusätzlich Amputationen am anderen Bein vorgenommen werden müssen, was innerhalb von 4 Jahren in ca. der Hälfte der Fälle notwendig wird (Berger, 2000; Hauner et al., 2013; Stiegler, 2004). Zum anderen korreliert der Verlust einer Extremität stark mit Angstgefühlen und Depressionen der Patienten (Barshes et al., 2013). In Deutschland sind rund 60.000 Menschen jährlich von einer Amputation betroffen (Hauner et al., 2013; Häussler et al., 2010); 2/3 davon lassen sich auf Spätfolgen des Diabetes mellitus zurückführen (Berger, 2000; Stiegler, 2004). Bei ca. 30 % handelt es sich um Major-Eingriffe (Häussler et al., 2010), also Amputationen oberhalb des Knöchels, die mit einer besonders schlechten Prognose für die Patienten und hohen Kosten für das Gesundheitssystem verbunden sind (Boulton et al., 2005; Häussler et al., 2010). Infektionen von diabetischen Ulcera stellen wohl den wichtigsten Risikofaktor für Amputationen dar; immerhin gehen sie in 80 % der Fälle der nicht traumatischen Amputation der unteren Extremität voraus (Nelson et al., 2013).

1.1.2.5 Diagnostik

Um Läsionen eines Patienten mit Diabetischem Fußsyndrom vorzubeugen, oder bereits bestehende Ulcera richtig einteilen und adäquat therapieren zu können, bedarf es einer ausführlichen Diagnostik. Diese sollte nach den Nationalen Versorgungsleitlinien für Typ-2-Diabetiker in regelmäßigen Abständen erfolgen (Bauer et al., 2010). Am Anfang steht lege artis eine gründliche Anamnese, die auch spezifische Fragen nach regelmäßiger Selbstkontrolle der Füße und aktuellen Beschwerden, wie neu aufgetretene Läsionen, Claudicatio oder Neuropathiesymptome abdecken sollte. Letztere können mit Hilfe des Neuropathie-Symptom-Scores NSS (Bauer et al., 2010) konkretisiert werden. Ein Ergebnis von 7-10 Punkten in den Kategorien Symptome (Brennen, Taubheitsgefühl, Parästhesien, Schwächegefühl, Krämpfe, Schmerzen), Lokalisation (Füße, Unterschenkel, woanders), Exazerbation (nachts, tagsüber und nachts, tagsüber, Aufwachen durch Symptome) und Besserung (bei Gehen, Stehen, Sitzen oder Hinlegen) lässt hierbei auf schwere neuropathische Defizite schließen. Neben dem Ist-Zustand sollte zudem der

bisherige Krankheitsverlauf in Form einer Ulcus-, OP- und Amputationsanamnese dokumentiert werden (Bauer et al., 2010). Auf die Befragung des Patienten folgt die Inspektion der unteren Extremitäten. Bei dieser sollte bereits auf Anzeichen diabetischer Folgeschäden wie trockene Haut und reduzierte Schweißbildung, Muskelatrophien, Fußdeformitäten, Fußpilz und Hyperkeratosen geachtet werden (Bauer et al., 2010). Da diese Veränderungen diabetische Ulcera begünstigen und z. T. als mögliche Eintrittspforten für Infektionserreger dienen, können bei frühzeitiger Diagnose gezielt gegenregulatorische Maßnahmen zur Vermeidung eines manifesten Defekts angewandt werden. Auch der Blick auf das Schuhwerk kann wertvolle Informationen liefern. Denn durch eine stark herabgesetzte Sensibilität in den Füßen wird dieses bei falscher Größenauswahl nicht mehr als zu eng empfunden. Außerdem können Fremdkörper wie kleine Steinchen in den Schuhen oder im Extremfall sogar Nägel und Scherben, die von außen durch die Schuhsohle dringen, von den Patienten nicht mehr als schädigend wahrgenommen werden. Je nach Ergebnis der Anamnese und der Inspektion sollte das Ausmaß der anschließenden klinischen und apparativen Untersuchung des Patienten entsprechend angepasst, und nach Aufwand und Invasivität gestaffelt durchgeführt werden (Bauer et al., 2010). Die manuelle Überprüfung des Pulsstatus an der A. dorsalis pedis und A. tibialis posterior sowie deren Auskultation auf Strömungsgeräusche, bietet sich hierbei als möglicher erster Schritt zur Detektion angiopathischer Schäden an (Bauer et al., 2010). Im selben Zuge kann sich der Untersucher ein Bild über die Temperatur des Fußes machen, wobei eine kalte Extremität auf Durchblutungsstörungen und eine Überwärmung auf Infektionen hindeuten. Auch Hautturgor und Schweißbildung können parallel beurteilt werden, und erste Hinweise auf die Intaktheit des autonomen Nervensystems des Beines liefern (Bauer et al., 2010). Zusätzlich sollten die unteren Extremitäten zur Einschätzung der Muskel- und Gelenkfunktion sowohl aktiv als auch passiv durchbewegt werden. Sollten sich bei diesen allgemeinen Basisuntersuchungen Anzeichen einer beginnenden Reduktion der geprüften Qualitäten zeigen, müssen Hilfsmittel zur differenzierteren Beurteilung zum Einsatz kommen. Die Berührungs- und Drucksensibilität lässt sich mit dem Monofilament nach Semmes-Weinstein messen. Dieses wird nach dem Internationale Consensus on Diabetic Foot (ICDF) (Salter et al., 2014) jeweils dreimal an drei plantaren Punkten (Hallux, erster und fünfter Metatarsale) ohne Verhornung oder Narben aufgesetzt. Der Untersucher kann über dieses Instrument einen Druck von genau 10 g auf die Haut ausüben, welcher bei beginnender Biegung der kleinen Borste erreicht wird. Ist der Patient nur bei maximal einem von drei Durchgängen dazu in der Lage, die Berührung wahrzunehmen, kann von einem Verlust der schützenden Sensibilität ausgegangen werden (Salter et al., 2014). Zur Testung des Vibrationsempfindens und der Tiefensensibilität kann eine Stimmgabel nach Rydel-Seiffer zum Einsatz kommen (Bauer et al., 2010).

Diese wird angeschlagen und z. B. auf das Großzehengrundgelenk oder den medialen Fußknöchel aufgesetzt. Zu dem Zeitpunkt, zu welchem der Patient angibt keine Vibration mehr zu spüren, kann auf der von 0 bis 8 skalierten Gabel der entsprechende Wert abgelesen werden. Je nach Altersgruppe und zugrunde gelegter Literatur variiert der angegebene Normwert (Martina et al., 1998). In der Praxis werden i. d. R. Werte unter 6/8 als pathologisch angesehen. Das Temperaturempfinden kann mit Hilfe eines Tip-Therm kontrolliert werden (Viswanathan et al., 2002). Das eine Ende dieses Sticks besteht aus Kunststoff, das andere ist mit Metall beschichtet. Beide Seiten werden in unregelmäßiger Reihenfolge nacheinander auf die Haut des Patienten aufgesetzt (Viswanathan et al., 2002). Für einen gesunden Probanden fühlt sich das Metallende trotz gleicher Raumtemperatur auf Grund der unterschiedlichen Wärmeleitfähigkeit beider Materialien kühler an. Bemerkt der Patient keinen Unterschied, ist von einem gestörten Temperaturempfinden auszugehen. Abschließend sollten nach dem Neuropathie-Defizit-Score (NDS) noch die Achillessehnenreflexe getestet werden (Bauer et al., 2010). Erhärtet sich unter Zuhilfenahme dieser Instrumente der Verdacht auf angiopathische und/ oder neuropathische Defizite, steht am Schluss der Diagnostikpyramide die apparative Untersuchung der unteren Extremität. Bei einer Gefäßbeteiligung kann der arterielle Verschlussdruck der A. dorsalis pedis, der A. tibialis posterior und ggf. der A. fibularis gemessen, und anschließend der Knöchel-Arm-Index (ABI) berechnet werden (Lawall & Kiehm, 2009). Hierzu wird zunächst der systolische Blutdruck an den Aa. brachiales beider Arme nach Riva-Rocci bestimmt (Lawall & Kiehm, 2009). Im Anschluss wird eine dem Umfang des Unterschenkels angepasste Blutdruckmanschette über dem Knöchel angebracht und aufgepumpt. Der systolische Blutdruck der Fußarterien wird nacheinander für beide Beine mit einer über den Gefäßen positionierten Doppler Sonde (8.10MHz) unter kontinuierlicher Reduktion des Manschettendrucks akustisch ermittelt (Lawall & Kiehm, 2009). Dividiert der Untersucher nun den systolischen Druck am Knöchel durch den gemessenen Druck am Arm, erhält er den dimensionslosen ABI. Liegt dieser unterhalb von 0,9 gilt der Wert als beweisend für das Vorliegen einer paVK (Lawall & Kiehm, 2009). Allerdings ergeben sich gerade bei Diabetikern durch eine Mönckenberg-Mediasklerose oft falsch hohe Werte von $>1,5$ (Bauer et al., 2010). In solchen Fällen kann die hydrostatische Zehendruckmessung (Pole-Test) (Bauer et al., 2010) weiterhelfen. Bei dieser Messmethode wird die Großzehenarterie in Rückenlage mittels Dopplersignal aufgesucht. Anschließend wird das Bein langsam soweit angehoben, bis das systolische Drucksignal nicht mehr zu vernehmen ist. Die Höhe, auf welcher das Dopplersignal verschwindet, entspricht dem systolischen Druck in cm H₂O und kann in mm Hg-Angaben umgerechnet werden (13 cm H₂O = 10 mm Hg) (Paraskevas et al., 2006). Bei einem Zehendruck < 30 mm Hg kann von einer gestörten Wundheilung ausgegangen werden.

Die ermittelten Werte können somit als Hilfestellung zur Auswahl des richtigen Therapieverfahrens und zur prognostischen Einschätzung des Spontanverlaufes eines Ulcus dienen, und auch zur Verlaufskontrolle von gefäßmedizinischen Behandlungen eingesetzt werden (Lawall et al., 2013). Aufgrund anatomischer Gegebenheiten ist der Messbereich dieser Methode allerdings auf 70 mm Hg begrenzt (Sambraus, 1996). Hinzu kommt, dass Ulcerationen und Gangrän des ersten Strahls bei Diabetespatienten keine Seltenheit sind, was die Durchführung der Untersuchung oder die Interpretation der Ergebnisse z. T. erschwert oder gar unmöglich macht (Faglia et al., 2007). Alternativ bietet sich die transkutane Sauerstoffpartialdruckmessung zur Beurteilung der mikrovaskulären Zirkulation an (de Meijer et al., 2008). Hierzu werden beheizte Elektroden auf der Haut angebracht, die mittels Polarographie den Sauerstoff messen, der durch das Gewebe diffundiert (Dowd et al., 1983). Ergibt sich ein $tcPO_2 < 30$ mm Hg (Lawall et al., 2013), muss mit Wundheilungsstörungen gerechnet werden. Allerdings können die Raumtemperatur (Faglia et al., 2007), Verunreinigungen oder Erkrankungen der Haut (de Meijer et al., 2008; Faglia et al., 2007) sowie Beeinträchtigungen der allgemeinen Kreislauf- und Atemfunktion (de Meijer et al., 2008) Messungenauigkeiten hervorrufen. Aufgrund der zahlreichen Einschränkungen der bisher genannten Methoden zur Beurteilung der Zirkulation in den unteren Extremitäten ist es sinnvoll, sich zusätzlich unter duplexsonographischer Kontrolle ein Bild der Gefäßwände, des Gefäßvolumens und des umgebenden Gewebes zu machen (Bauer et al., 2010). Auf diese Weise lässt sich die Hämodynamik und die Morphologie v. a. der Oberschenkel- und Knieschlagadern schonend und kostengünstig einschätzen. Die Aussagekraft für Becken- und Unterschenkelgefäße ist hingegen begrenzt (Bauer et al., 2010). Hinzu kommt die Anfälligkeit der Duplexsonographie für Artefakte und eine hohe Untersucherabhängigkeit, womit sie der digitalen Subtraktionsangiographie (DAS), welche als Goldstandart zur Gefäßdarstellung zählt, hinsichtlich der Bildqualität unterlegen ist. Dies gilt jedoch nicht in Bezug auf Komplikationen und Nebenwirkungen. Hier ist zu bedenken, dass es sich bei der DAS um eine invasive Methode mit dem Risiko von Verletzungen und Nachblutungen handelt. Auch die Strahlenbelastung und mögliche Folgeschäden durch die Kontrastmittelgabe müssen bedacht werden (Bauer et al., 2010). Eine mögliche Alternative bietet hier die Magnetresonanz-Angiografie (MRA), welche zwar durch Überlagerungen und Artefakte nur eine eingeschränkte Beurteilbarkeit zulässt, jedoch mit weniger nephrotoxischem Kontrastmittel auskommt, und somit einen nicht außer Acht zu lassenden Vorteil bietet, wenn man bedenkt, dass auch die diabetische Nephropathie zu den Langzeitkomplikationen des Diabetes mellitus zählt (Bauer et al., 2010). Weitere bildgebende Maßnahmen kommen v. a. bei anderen Fragestellungen zum Einsatz. Das Nativ-Röntgen, die Magnetresonanztomographie (MRT) und die Szintigraphie können z. B. genutzt werden, um

den Verdacht auf eine diabetische Neuroosteoarthropathie (DNOAP) bzw. einen Charcot –Fuß zu erhärten (Lawall et al., 2013).

1.1.2.5.1 Spezifische Diagnostik bei infizierten DFUs und Osteomyelitis

Eine Infektion bezeichnet im Gegensatz zur einfachen Kolonisation die Invasion von Mikroorganismen ins Gewebe, wo sie sich vermehren, und eine Entzündung als Immunantwort hervorrufen, die oft mit einem Gewebeuntergang einhergeht (Lipsky et al., 2012a). Da insbesondere übersehene und nicht beherrschbare Infektionen diabetischer Läsionen die Prognose der Patienten entscheidend verschlechtern (Lawall et al., 2013), muss eine gründliche Untersuchung auf Entzündungszeichen und auf eine mikrobiologische Besiedlung diabetischer Ulcera Bestandteil der Diagnostik sein. Dabei orientiert sich die Diagnose einer Infektion an der klinischen Symptomatik des Patienten; die Kultur bleibt der Identifikation der verantwortlichen Erreger und der Erstellung eines Antibiotogramms vorbehalten (Lipsky et al., 2012a).

1.1.2.5.1.1 Klinische Examination

Als klinische Kardinalzeichen einer Entzündung galten bereits in der Antike calor (Hitze), rubor (Rötung), dolor (Schmerz), tumor (Schwellung), functio laesa (eingeschränkte Funktion) und eitriger Ausfluss (Glaudemans et al., 2015; Lipsky et al., 2012a). Infektionszeichen zweiten Grades können sich in Form von Nekrosen, verfärbtem und bröckeligem Granulationsgewebe, Blasenbildung, Krepitation, Lymphangitis und –adenitis, sowie serösem Exsudat, fötidem Geruch oder durch eine fehlende Wundheilung trotz adäquaten Wundmanagements manifestieren (Aragón-Sánchez, 2011; Cutting & White, 2004; Gardner & Frantz, 2008; Lipsky et al., 2004). Um auf eine Infektion durch Mikroorganismen schließen zu können, müssen zusätzlich andere Gründe für eine mögliche Entzündungsreaktion der Haut ausgeschlossen sein (Lipsky et al., 2012a). Ist nach Anlage dieser Maßstäbe von einer manifesten Infektion auszugehen gilt es diese entsprechend ihres Schweregrades zu klassifizieren. Eine mögliche Einteilung wurde von der IDSA (Infectious Diseases Society of America) und der IWGDF (the International Working Group on the Diabetic Foot) entwickelt (Tab. 5) (Lipsky et al., 2012a):

Grad der Infektion *	Definition
Grad 1: keine Infektion	<ul style="list-style-type: none"> • Ohne systemische oder lokale Symptome einer Infektion
Grad 2: milde Infektion	<ul style="list-style-type: none"> • Infektion betrifft nur die Haut oder das subkutane Gewebe • Rötung < 2 cm um die Wunde herum • keine Anzeichen einer systemischen Infektion
Grad 3: moderate Infektion	<ul style="list-style-type: none"> • Die Infektion betrifft tiefer gelegene Strukturen (unterhalb von Haut und subkutanem Gewebe) • Rötung > 2 cm um die Wunde herum • Keine Anzeichen einer systemischen Infektion
Grad 4: schwere Infektion	Mindestens 2 der folgenden Zeichen einer systemischen Infektion liegen vor: <ul style="list-style-type: none"> • Temperatur < 36 °C oder >38 °C • Herzfrequenz > 90/ min • Atemfrequenz > 20/ min oder PaCO₂ < 32 mm Hg • Leukozyten < 4.000 cu/ mm oder > 12.000 cu/ mm oder mind. 10 % unreife Zellen
* Infektion = mindestens zwei der folgenden Kriterien sind erfüllt: <ul style="list-style-type: none"> • Lokale Schwellung oder Verhärtung • Erythem > 0,5 cm² um das Ulcus herum • lokales Spannungsgefühl oder lokale Schmerzen • lokale Überwärmung • eitriger Ausfluss • Andere Gründe für eine mögliche Entzündungsreaktion der Haut müssen ausgeschlossen sein 	

Tabelle 5 IDSA und IWGDF Klassifikation der Schwere einer Infektion

(Lipsky et al., 2012a)

Je nach Schweregrad entscheidet sich auch, wie das weitere diagnostische und therapeutische Vorgehen ausfallen sollte. Dabei sind die Detektion und die richtige Einschätzung der Schwere einer Infektion in der Praxis nicht immer einfach. Zum einen sind Diabetespatienten mit peripherer Polyneuropathie ggf. nicht dazu in der Lage, Schmerzen, die durch eine entzündete Wunde bei gesunden Personen entstehen würden, ausreichend wahrzunehmen, und zeigen bei der körperlichen Untersuchung somit keine adäquate Reaktion (Aragón-Sánchez, 2011). Zum anderen kann die Durchblutung der unteren Extremitäten bei einer diabetesbedingten Gefäßerkrankung derart reduziert sein, dass die klinischen Kardinalzeichen Erythem, Überwärmung und Schwellung in ihrer Ausprägung stark abgemildert sind (Uzun & Mutluoglu, 2011). Mit der eingeschränkten arteriellen Versorgung geht zugleich ein lokales Defizit an Immunzellen einher (Peters, 2016). Diese sind am Ort des Geschehens somit nicht nur in ihrer Anzahl vermindert, sondern können durch hyperglykämische Zustände zusätzlich funktionell (Reduzierte Superoxid-Produktion) beeinträchtigt sein (Perner et al., 2003), was eine schwache

lokale Entzündungsmanifestation erklären kann. Auch systemische Reaktionen des Immunsystems sind bei Diabetespatienten verändert. Symptome wie Fieber, Hypotension, Leukozytose oder Delirium sind eher selten zu erwarten, und sprechen – wenn sie denn vorliegen – für schwere Infektionen, die unter Umständen sogar Extremitäten- oder lebensgefährdend sein können (Lipsky et al., 2012b). Eine besondere Herausforderung bei der Aufdeckung von Infektionen bildet die Osteomyelitis. Bei dieser Komplikation des DFS können sich tiefer gelegene Infektionen oberflächlich verhältnismäßig milde präsentieren (Aragón-Sánchez, 2011), oder sogar ganz ohne lokale Entzündungszeichen vorliegen (Newman et al., 1991). Diese Problematik wird durch die besondere Anatomie des Fußes, welcher sich in einzelne miteinander in Verbindung stehende Kompartimente untergliedert, noch begünstigt. So können sich Mikroorganismen leicht an bestehenden Strukturen wie Sehnen und Faszien entlang ausbreiten und in tiefer gelegenen Bereichen Muskeln, Knochen und Gelenke befallen (Lipsky et al., 2012a). Misstrauisch sollte man vor allem bei tiefen, chronischen Ulcera über Knochenvorsprüngen (Lavery et al., 2006; Lipsky et al., 2012a) oder bei „Wurstzehen“ (Glaudemans et al., 2015; Lipsky et al., 2012a; Uçkay et al., 2015) werden. Auch Wunden $> 2 \text{ cm}^2$ sind deutlich öfter mit darunterliegenden Knochendefekten vergesellschaftet als kleinere Läsionen (Butalia et al., 2008; Dinh et al., 2008). Das einzige wirklich pathognomonische klinische Zeichen für eine Osteomyelitis sind Knochenfragmente, die aus einem suspekten Ulcus geborgen werden können (Glaudemans et al., 2015; Uçkay et al., 2015). Ist dies nicht der Fall, lässt sich ein entsprechender Verdacht durch einige Tests erhärten. Beispielsweise macht eine Erythrozytensedimentationsrate $> 60 - 70 \text{ mm/h}$ das Vorliegen einer knöchernen Beteiligung wahrscheinlich (Butalia et al., 2008; Fleischer et al., 2009). Zusätzlich kann der Probe-to-Bone Test eingesetzt werden (Lipsky et al., 2012a). Bei dieser Methode wird eine sterile, stumpfe Metallsonde durch das Ulcus hindurch bis auf den Knochen vorgeschoben. Im Falle einer Osteomyelitis lässt sich dieser verändert zu gesundem Knochengewebe palpieren (Caputo et al., 1994; Reiber et al., 1998). Je nach untersuchter Population liegt die Sensitivität des Probe-to-Bone Tests zur Detektion einer Osteomyelitis bei 60 % - 87 %, die Spezifität bei 85 % - 91 %, der positiv prädiktive Wert bei 87 % - 90 %, und der negativ prädiktive Wert nur bei 56 % - 62 % (Glaudemans et al., 2015; Lavery et al., 2007).

1.1.2.5.1.2 Bildgebung

Daher wird bei unklarer Sachlage oftmals die Bildgebung als weitere diagnostische Maßnahme hinzugezogen. Sie kann nicht nur dabei helfen, die Diagnose einer Infektion zu untermauern oder auszuschließen, sondern hilft auch dabei das Ausmaß der Entzündung einzuschätzen, zwischen Knochen- und Weichteilmanifestation zu unterscheiden, und ggf. die Differentialdiagnose einer Neuroosteoarthropathie zu stellen (Glaudemans et al., 2015). Generell wird das einfach Röntgenbild in mindestens zwei verschiedenen Projektionen für den ersten Überblick empfohlen (Uçkay et al., 2015), da es relativ günstig und weit verbreitet ist, und auffällige Knochenveränderungen (z. B. lokale Aufhellungen, Verlust an Trabekelwerk oder kortikale Destruktionen, später auch Periostreaktionen/ Periostabhebungen, Sklerosierungen und Knochenneubildungen) (Lipsky et al., 2012a; Teh et al., 2009) sowie Weichteilemphyseme und Fremdkörper dargestellt werden können (Glaudemans et al., 2015). Für viele Patienten, bei denen die Wahrscheinlichkeit einer Osteomyelitis entweder sehr hoch oder sehr niedrig ist, kann das Ergebnis einer Röntgenuntersuchung bereits ausreichend sein, um den klinischen Verdacht zu bestätigen (Glaudemans et al., 2015). Jedoch dauert es mehrere Wochen bis Knochenläsionen eine röntgenologisch sichtbare Demineralisation von > 30 % - 50 % aufweisen (Caballero & Frykberg, 1998; Glaudemans et al., 2015; Uçkay et al., 2015), weshalb eine infektiöse Manifestation im Knochengewebe gerade in frühen Stadien leicht übersehen werden kann. Diese Tatsache begründet auch die verhältnismäßig niedrige Sensitivität von nur 28 % - 75 % des Röntgens zur Detektion einer Osteomyelitis (Lipsky et al., 2012a). Diese Einschränkungen lassen sich zwar z. T. durch die Aufnahme von Röntgenserien umgehen, in denen typische Veränderungen innerhalb von zwei Wochen für das Vorliegen einer Osteomyelitis sprechen (Lipsky et al., 2012), jedoch kann auch mit diesen Aufnahmen keine eindeutige Aussage über eine mögliche Beteiligung des Weichteilgewebes gemacht werden. Für diese Zwecke sollte dann ein MRT der betroffenen Extremität angefertigt werden (Caballero & Frykberg, 1998; Glaudemans et al., 2015; Lipsky et al., 2012a). Dieses ist nicht nur der bildgebende Goldstandard zur Beurteilung der Dimensionen einer Osteomyelitis, sondern kann mit Hilfe spezieller Sequenzen (z. B. arterielle Spinmarkierung (ASL), dynamische Kontrastmittel-Perfusionsbildgebung) auch zur Beurteilung der Durchblutungssituation eingesetzt werden (Donovan & Schweitzer, 2008; Morrison et al., 1995). Auch die Differenzierung von Bindegewebsentzündungen und nicht infektiösen Ödemen (Sanverdi et al., 2012) und die Evaluation von Abszessen, Fistelgängen und tiefen Gewebsnekrosen lässt sich durch den Einsatz von Kontrastmittel im MRT erleichtern (Glaudemans et al., 2015; Morrison et al., 1995; Sanverdi et al., 2012). Allerdings sollte diese Indikation gerade bei Diabetikern, die häufig eine eingeschränkte Nierenfunktion aufweisen, im Hinblick auf die Kontraindikation

von Gadolinium bei relativer Niereninsuffizienz, mit Bedacht gestellt werden (Glaudemans et al., 2015). Weitere Nachteile des MRT sind seine eingeschränkte Verfügbarkeit, hohe Kosten, und die anspruchsvolle Befundung, welche oftmals nur von einem erfahrenen Radiologen geleistet werden kann (Glaudemans et al., 2015). Besonders schwierig gestaltet sich die Unterscheidung von Neuroosteoarthropathie und Infektion, gerade dann, wenn infektiöse Prozesse einen Charcot-Fuß betreffen oder der Patient kürzlich am betroffenen Fuß operiert wurde (Glaudemans et al., 2015). Zwar sprechen subchondrale Zysten, intraartikuläre Knochenfragmente und die Beteiligung mehrerer Gelenke eher für eine Neuroosteoarthropathie, während eine diffuse Signalsteigerung im gesamten Knochen, Veränderungen des angrenzenden Fettgewebes und simultan vorliegende Hautulcera oder Fistelgänge eher auf eine Osteomyelitis schließen lassen (Glaudemans et al., 2015; Tan & Teh, 2007), trotzdem bleiben sowohl die Sensitivität (77 % - 100 %) als auch die Spezifität (40 % - 100 %) des MRTs zur Untersuchung eines diabetischen Fußes auf das Vorliegen einer Osteomyelitis eingeschränkt (Lipsky et al., 2012a; Unger et al., 1988). Auch andere bildgebende Maßnahmen (z. B. die 3-Phasen-Knochen-Szintigraphie oder die Leukozytenszintigraphie), die gerade dann zum Einsatz kommen, wenn das MRT kontraindiziert ist (z. B. bei orthopädischen Metallteilen, Schrittmachern oder bei Klaustrophobie) (Glaudemans et al., 2015), eignen sich nicht uneingeschränkt zur Differenzierung zwischen Osteomyelitis und anderen Ursachen für eine vermehrte Aufnahme radioaktiv markierter Tracer (z. B. kürzlich stattgefundene Operationen, Frakturen, maligne Prozesse, metabolische Knochenerkrankungen, Prothesenlockerungen, Osteoarthropathie) (Capriotti et al., 2006; Glaudemans et al., 2015; Keenan et al., 1989).

1.1.2.5.1.3 Knochenkultur

Daher bleibt der kulturelle Keimnachweis in Kombination mit der histopathologischen Untersuchung einer Knochenprobe die sicherste Methode zur Diagnose einer Osteomyelitis (Berendt et al., 2008; Glaudemans et al., 2015; Lipsky et al., 2012a). Er bildet somit eine Ausnahme des Grundsatzes, dass Infektionen des diabetischen Fußes anhand der Klinik zu diagnostizieren sind, und die Kultur lediglich der weiteren Bestimmung der verantwortlichen Mikroorganismen vorbehalten ist. Trotzdem sollte eine Untersuchung von Knochenproben nur dann in Erwägung gezogen werden, wenn die Diagnose einer Osteomyelitis nach Auswertung von Klinik und bildgebenden Verfahren unsicher bleibt, oder eine knöcherne Infektion nicht auf eine empirische Antibiotikatherapie anspricht (Berendt et al., 2008; Jeffcoate & Lipsky, 2004; Lipsky et al., 2012a; Lipsky, 1997). Denn die Gewinnung des knöchernen Materials ist u. U. mit erheblichen Risiken verbunden. Auch wenn sie bei fachmännischer Ausführung generell als sichere Methode gilt

(Jeffcoate & Lipsky, 2004; Lipsky, 1997), besteht bei der transkutanen Knochenbiopsie die Befürchtung, dass Keime in das Knochengewebe verschleppt werden, oder die Knochen frakturieren können (Lipsky et al., 2012a; Senneville et al., 2006). Außerdem wird bei dieser Technik eine zusätzliche Wunde geschaffen, die bei Patienten mit kritischem Gefäßstatus und schwerer Neuropathie ggf. nur verzögert verheilt (Lesens et al., 2011), und somit eine neu geschaffene Eintrittspforte für Infektionserreger darstellt. Auch ist diese Prozedur relativ teuer (Lipsky, 1997), erfordert ein gewisses Maß an Erfahrung und technischen Fertigkeiten, und die Ergebnisse stehen erst nach einigen Tagen zur Verfügung (Jeffcoate & Lipsky, 2004). Lässt sich eine Biopsie nach Abwägung dieser Risiken nicht vermeiden, sollte sie bevorzugt unter Durchleuchtung oder CT-gesteuert und nach gründlicher Desinfektion durch klinisch unauffällige Haut durchgeführt werden (Jeffcoate & Lipsky, 2004; Lipsky et al., 2012a). Auf diese Weise lässt sich die Wahrscheinlichkeit von falsch positiven Kulturen reduzieren (Glaudemans et al., 2015; Lipsky et al., 2012a). Damit aber auch das Gegenteil, nämlich falsch negative Kulturergebnisse vermieden werden, sollten die Patienten nach Möglichkeit zwei Wochen vor der Probenentnahme keine Antibiotika einnehmen (Lipsky et al., 2012a; Senneville et al., 2006). Weil eine lange Verzögerung bei einigen Patienten jedoch nicht vertretbar ist (obwohl es sich bei der Osteomyelitis nur um eine langsam progrediente Erkrankung handelt) (Lipsky et al., 2012a), die bakterielle Belastung von Sequestern und nekrotischem Gewebe in der Regel hoch und die antibiotische Penetration eines solchen Knochens schlecht ist, kann auch ein verkürztes antibiotikafreies Intervall ausreichend sein (Lesens et al., 2011). Neben einer antibiotischen Anbehandlung können zudem Fehler bei der Probenentnahme oder die falsche Kultivierung besonders anspruchsvoller Organismen zu falsch negativen Ergebnissen führen (Lipsky et al., 2012a). Diese Fehlerquellen sind zwar bekannt, können aber nicht immer sicher ausgeschlossen werden. Darum macht es Sinn zusätzlich zur mikrobiologischen Kultur eine histopathologische Untersuchung der Probe durchzuführen (Glaudemans et al., 2015; Lipsky et al., 2012a), welche routinemäßig die makroskopische und mikroskopische Betrachtung sowie eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung beinhaltet (Chantelau et al., 2007). Hier sprechen eine Infiltration von Entzündungszellen in das Knochenmark (Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten), Eiteransammlungen, narbiges, destruiertes Knochengewebe und Nekrosen, sowie unter dem Mikroskop sichtbare Mikroorganismen für das Vorliegen einer Osteomyelitis (Chantelau et al., 2007; Glaudemans et al., 2015). Jedoch können die Ergebnisse auch bei dieser Untersuchungsmethode falsch negativ oder falsch positiv interpretiert werden. Existiert z. B. eine chronische Infektion anderer Genese, kann dies mit einer Osteomyelitis verwechselt werden (Glaudemans et al., 2015). Wird die infizierte Region jedoch bei der Probenentnahme nicht richtig getroffen, oder wird sie durch einen unerfahrenen

Pathologen ausgewertet, kann eine Osteomyelitis übersehen werden (Glaudemans et al., 2015). Und selbst wenn der Pathologe langjährige Erfahrung auf diesem Gebiet vorweisen kann, so herrscht doch immer noch Uneinigkeit über die genauen Diagnosekriterien; denn ein einheitliches Klassifikationssystem zur Diagnose der Osteomyelitis in diabetischen Füßen ist bisher noch nicht flächendeckend etabliert (Cecilia-Matilla et al., 2013; Glaudemans et al., 2015). Eine mögliche histopathologische Einteilung liefern Cecilia-Matilla et al., die zwischen vier verschiedenen Gruppen unterscheiden (akute Osteomyelitis, chronische Osteomyelitis, akute chronische Osteomyelitis und Fibrose) (Cecilia-Matilla et al., 2013). Da sich insgesamt positive mikrobiologische und negative histologische Befunde im gleichen Ausmaß wie negative mikrobiologische und positive histologische Ergebnisse finden lassen, bleibt die Kombination beider Methoden der empfohlene Goldstandard (Glaudemans et al., 2015; Hochlenert et al., 2014; Lipsky et al., 2012b; Lipsky et al., 2016). Die alternative Verwendung von Probenmaterial, das durch Nadelaspiration des Knochen oder des benachbarten Weichteilgewebes gewonnen wurde (Senneville et al., 2009), ist ebenso wie nicht-invasive Maßnahmen (z. B. Wundabstriche) (Elamurugan et al., 2011) keinesfalls genau genug, und sollte deshalb zur Diagnose einer Osteomyelitis gemieden werden, wenn die Möglichkeit einer Knochenbiopsie gegeben ist (Bernard et al., 2011).

1.1.2.5.2 Identifikation der Infektionserreger

Der Nachweis von Mikroorganismen in einer Wunde ist bis auf wenige Ausnahmen nur dann zu empfehlen, wenn nach Anlage der klinischen Maßstäbe und Abarbeitung der oben erläuterten Diagnostikpyramide eine Infektion des diabetischen Fußes vorliegt. Bei klinisch nicht infizierten Ulcera sind diese Maßnahmen ggf. sinnvoll, wenn sie im Rahmen von Nachsorgeuntersuchungen von zuvor infizierten Wunden durchgeführt werden (Lipsky et al., 2004). Je nach Art und Ausprägung der Entzündung sollte die Auswahl von Probenmaterial zur Erregerdiagnostik entsprechend angepasst werden. Beispielsweise müssen bei schweren systemischen Infektionen zusätzlich Blutproben auf Mikroorganismen untersucht werden (Lipsky et al., 2012a). Liegt der Verdacht auf eine Osteomyelitis nahe, kann hingegen die Auswertung von Knochensubstanz sinnvoll sein (Lipsky et al., 2012a). Bei der Mehrzahl der infizierten diabetischen Fußulcera ist aber eine lokale Probenentnahme ausreichend. In jedem Falle sollte diese unter Einhaltung bestimmter Vorkehrungen zur Qualitätsoptimierung vorgenommen werden. Zu diesen zählen eine fachmännische Wundreinigung und ein gründliches Wunddebridement vor der Probengewinnung (Lipsky et al., 2004) ebenso wie eine eindeutige Beschriftung des Materials und dessen schneller Laborversandt in geeigneten Transportbehältnissen (Glaudemans et al., 2015; Lipsky et al., 2012a; Lipsky et al., 2004; Peters, 2016).

Theoretisch sind die Curettage mit einem Spatel oder Skalpell vom Ulcusgrund, eine Stanzbiopsie oder die Nadelaspiration von purulentem Sekret bei Infektionen von Haut und Bindegewebe des diabetischen Fußes die bevorzugten Methoden zum Nachweis von Pathogenen (Lipsky et al., 2004, Lipsky et al., 2016). Im Vergleich zu diesen Vorgehensweisen liefern oberflächlich angewandte Abstrichtupfer Ergebnisse, die weniger sensitiv und nicht so spezifisch sind (Backhouse et al., 2015; Lawall et al., 2013; Nelson et al., 2013). Sie enthalten oftmals neben den wahren Infektionserregern auch kolonisierende Mikroorganismen (Caballero & Frykberg, 1998; Peters, 2016) und sind vor allem zum Nachweis anaerober Keime weniger geeignet (Pellizzer et al., 2001). Trotzdem wird das Abstreichen von Fußulcera in der Praxis häufig genutzt, da es relativ günstig, schnell einsetzbar und leicht durchzuführen ist (Nelson et al., 2013; Peters, 2016). Handelt es sich um die einzige zur Verfügung stehende Option, so sollten Tupfer genutzt werden, die sowohl zur Kultivierung von aeroben als auch von anaeroben Organismen geeignet sind (Lipsky et al., 2004). Für die Analyse der entnommenen Proben stehen unterschiedliche Verfahren zur Verfügung.

1.1.2.5.2.1 Kultureller Erregernachweis

In der Routinediagnostik von Probenmaterial nimmt der kulturelle Erregernachweis eine wichtige Rolle ein. Die Organismen werden auf selektiven Nährböden angezüchtet und mit Hilfe des MALDI-TOF-MS (Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung Time-of-Flight, siehe auch 2.2.4) beurteilt (Peters, 2016). Diese Art der Diagnostik ist verhältnismäßig simpel in der Handhabung, kostengünstig, weit verbreitet und bietet die Möglichkeit der simultanen Resistenztestung gegenüber verschiedenen Antibiotika (Peters, 2016). Allerdings dauert es 2-3 Tage bis die Kulturen ausgewertet und die Sensitivitätsmuster der Mikroorganismen detektiert werden können (Glaudemans et al., 2015; Peters, 2016). Bei akuten und schwerwiegenden Infektionen ist es jedoch oftmals nicht möglich auf diese Ergebnisse zu warten um gezielt antibiotisch therapieren zu können, sodass den Patienten empirische Antibiotikaregime verabreicht werden müssen (Nelson et al., 2013; Peters, 2016), die in fast einem Viertel der Fälle inadäquat sind, und weniger häufige Keime nicht immer mit abdecken (Lipsky et al., 2014a). Angesichts der zunehmenden Resistenzlage vieler Pathogene ist davon auszugehen, dass sich dieses Problem zukünftig noch verschärfen und klinische sowie finanzielle Konsequenzen nach sich ziehen wird (Lipsky et al., 2014b). Neben diesem Manko weist die Kultur als Mittel zur Identifikation von Infektionserregern eine Reihe von Fehlerquellen und Missständen auf, die sich durch die Tatsache ergeben, dass nur vitale und sich vermehrende Organismen detektiert werden können. Für antibiotisch anbehandelte Patienten, bei denen Keime durch die Medikamente bereits abgetötet oder in ihrem Wachstum gehemmt sind,

können sich falsch negative Resultate ergeben (Glaudemans et al., 2015; Peters, 2016; Uçkay et al., 2015). Ebenso zeigen Bakterien als Bestandteil von Biofilmen - bedingt durch eine im Vergleich zu planktonischen Vertretern modifizierte Genexpression - oftmals einen langsameren Metabolismus und eine niedrigere Replikationsrate, was sie schwieriger zu kultivieren macht (Oliver, 2005; Pasquaroli et al., 2013; Percival et al., 2014; Peters, 2016). Selbiges gilt für Bakterien, die äußerst empfindlich auf Veränderungen ihrer Umgebung reagieren, und bereits auf dem Transport oder während der Anzucht absterben (Uçkay et al., 2015). Zudem können nur Mikroorganismen kultiviert werden, deren Wachstumsbedingungen bekannt sind (Glaudemans et al., 2015). Dementsprechend ist die Auswahl der Nährmedien abhängig von einer gewissen Erwartungshaltung der Untersucher und unter Umständen nicht für unbekannt oder seltene Pathogene ausgelegt. Mischinfektionen mit unterschiedlichen Bakterien, die verschiedene oder sogar gegensätzliche Ansprüche an das Nährstoffangebot, die Temperatur oder atmosphärische Bedingungen haben, stellen eine besondere Herausforderung dar (Wagner, 2012). Und selbst wenn Mikroorganismen erfolgreich angezüchtet werden können, lassen sich durch ihre nachgewiesene Präsenz im Wundgebiet noch keine kausalen Rückschlüsse auf ihre Rolle als Infektionserreger ziehen. Gerade dann, wenn viele verschiedene Organismen isoliert wurden, kann es sich schwierig gestalten, zwischen wahren Pathogenen und kolonisierenden Keimen zu unterscheiden (Glaudemans et al., 2015; Lipsky et al., 2012a). Zwar handelt es sich bei der dominierenden Spezies in der Regel um den auslösenden Erreger (Lipsky et al., 2012a), jedoch können die Mengenverhältnisse unter Laborbedingungen von denen im Wundmilieu abweichen (Wagner, 2012). Hinzu kommt, dass eine quantitative Analyse außerhalb der Forschung nur selten Anwendung findet, da dieser komplexe und teure Service von vielen klinischen Laboren gar nicht angeboten wird, und das Konzept einer hohen Keimbelastung weder zur Diagnose einer Infektion noch zur Identifikation des auslösenden Erregers herangezogen werden kann (Glaudemans et al., 2015; Lipsky et al., 2012a; Peters, 2016). Aufgrund der genannten Limitationen sind die Kulturergebnisse durchaus kritisch zu hinterfragen und sollten ggf. durch weitere Methoden der Erregerdiagnostik ergänzt werden.

1.1.2.5.2.2 Molekularbiologischer Erregernachweis

Mit molekularbiologischen Methoden werden die Bakterien einer Probe auf ihren Genotyp hin untersucht. Die meisten dieser Techniken basieren auf der Amplifikation vom 16S rRNA Gen, welches im Genom aller Prokaryoten vorkommt, jedoch durch das Vorhandensein hypervariabler Regionen zur Identifizierung verschiedener Spezies genutzt werden kann (Lavigne et al., 2015; Wagner, 2012). Erste Ergebnisse stehen z. T. schon nach Stunden zur Verfügung und erlauben im Gegensatz zum kulturellen Erregernachweis den Einsatz eines frühzeitigen gezielten Antibiotikaregimes (Peters, 2016). Abgesehen vom zeitlichen Aspekt liegt ein weiterer Vorteil der molekularbiologischen Untersuchungen darin, dass die Organismen für diese Verfahren nicht mehr kultivierbar sein müssen. Somit ist es möglich auch Bakterien zu detektieren, die sich in einem VBNC-Stadium (viable but nonculturable) befinden, durch eine vor der Probenentnahme eingeleitete Antibiotikatherapie bereits abgetötet wurden, oder hohe Ansprüche an ihre Umgebung haben, und unter suboptimalen Bedingungen schon vor der Probenanalyse abgestorben sind (Peters, 2016). Dieser Umstand macht genotypische Methoden im Vergleich zur Kultur deutlich sensitiver (Glaudemans et al., 2015), und erlaubt überdies die Identifikation eines weitaus breiteren Spektrums an möglichen Infektionserregern - insbesondere von Anaerobiern (Glaudemans et al., 2015; Lavigne et al., 2015).

Wer genotypische Analysen in der Klinik anwendet, sollte jedoch auch mit den Schwachstellen dieser Techniken vertraut sein. Mikrobiologische Populationen wie Viren oder Archaea, die durchaus für pathologische Bedingungen verantwortlich sein können, werden durch Methoden, die auf der Amplifikation des 16S rRNA Gens beruhen, nicht erfasst (Lavigne et al., 2015). Und auch bei der Bestimmung von Bakterien können sich Probleme ergeben. Nahe verwandte Stämme ähneln sich in den hypervariablen Regionen des 16S rRNA Gens z. T. so stark, dass es nötig wird, diese mit verschiedenen Primer-Sets zu untersuchen (Malone et al., 2016; Spichler et al., 2015). Zudem bleibt bisher unklar, ob alle detektierten Bakterien auch einen klinischen Stellenwert haben (Lipsky et al., 2013). Denn die bloße Anwesenheit von Genen ermöglicht noch keine Aussage über den metabolischen Aktivitätszustand eines Organismus in vivo (Lavigne et al., 2015; Sorek & Cossart, 2010). Ebenso werden Bakterien nachgewiesen, die unter Umständen gar keine Pathogene sind, und deren medikamentöse Abdeckung das gewählte Antibiotikaspektrum unnötig breit ausfallen lässt (Peters, 2016). Diese Ausführungen machen deutlich, dass bei der Ergebnisinterpretation noch Unsicherheit herrscht, und sowohl für die Anwendung als auch die Auswertung der Genotypisierung ein gewisses Maß an Erfahrung benötigt wird (Glaudemans et al., 2015; Peters, 2016). Daher kommen sie noch nicht routinemäßig zum Einsatz, sondern dienen dem Nachweis untypischer

Organismen, oder bleiben schweren Infektionen vorbehalten, die nicht auf Antibiotika reagieren, oder sich rapide verschlechtern (Glaudemans et al., 2015).

Neuerungen auf dem Gebiet der Metagenomik könnten einige der genannten Limitationen jedoch aufheben und die Beantwortung weitergehender Fragen ermöglichen (Lavigne et al., 2015). Das Whole Genome Sequencing (WGS) beispielsweise identifiziert auch die DNA von Pilzen, Archaea und Viren (Malone et al., 2016; Spichler et al., 2015), und liefert nicht nur taxonomische Informationen, sondern gibt überdies Aufschluss über Gene, aus denen biologische Funktionen des Organismus abgeleitet werden könnten (z. B. Virulenzfaktoren, Antibiotikaresistenzen oder deren Metabolismus) (Lavigne et al., 2015; Malone et al., 2016; Spichler et al., 2015). Da jedoch mit dem WGS allein nicht zwischen exprimierten und nicht exprimierten Genen unterschieden werden kann, müsste es mit anderen molekularen Methoden aus der Transkriptomik, Proteomik und Metabolomik kombiniert werden (Hettich et al., 2013). Die Einschränkung der 16S rRNA Amplifikation, welche keine Antibiotogrammtestung ermöglicht, sondern den zusätzlichen Einsatz einer Kultur für eindeutige Aussagen zur individuellen Resistenzlage der nachgewiesenen Erreger nötig macht, könnte somit zukünftig umgangen werden (Glaudemans et al., 2015; Peters, 2016). Ebenso ließe sich zwischen Kolonisation und Infektion differenzieren, und sogar die Entwicklung von komplexen Mikrobiota, die Rollen der einzelnen Organismen und die Entstehung von Wundinfektionen erforschen (Lavigne et al., 2015). Allerdings werden durch diese Verfahren riesige Datenmengen generiert, deren Analyse für den klinischen Routineeinsatz noch zu zeitaufwändig ist (Lavigne et al., 2015; Malone et al., 2016). Die Entwicklung von Bioinformatik und Software spielt für die Zukunft dieser Methoden eine wichtige Rolle, und wenngleich sie aktuell noch verhältnismäßig teuer und nicht überall verfügbar sind, ist der Fortschritt doch mit Spannung zu verfolgen (Glaudemans et al., 2015; Malone et al., 2016; Peters, 2016).

1.1.2.6 Therapie des diabetischen Fußsyndroms

Die Therapie des diabetischen Fußsyndroms variiert nach Ausprägung und Klinik der Erkrankung und verfolgt dementsprechend mehrere Ziele. Bei Patienten mit abgeheilten Läsionen gilt es der Entstehung neuer Ulcera vorzubeugen und Personen mit erhöhtem Risiko zu identifizieren (Bauer et al., 2010). Liegen bereits, immer noch, oder wieder offene Wunden vor, so müssen diese ohne Zeitverzögerung behandelt werden (Bauer et al., 2010). Nur so lassen sich langwierige Verläufe und schwerwiegende Komplikationen wie Infektionen und Amputationen abwenden. Als langfristige Ziele gelten der Erhalt und die Gebrauchsfähigkeit der Extremität ebenso wie eine Steigerung von Lebenserwartung und Lebensqualität der Patienten (Bauer et al., 2010).

Um diesen Ansprüchen gerecht zu werden, sollte die Therapie in jedem Falle individuell auf den Patienten und das Ulcus abgestimmt sein, und vorzugsweise durch ein interdisziplinäres Team, bestehend aus Diabetologen, Mikrobiologen, Podologen, Chirurgen und Orthetikern, durchgeführt und überwacht werden (Markakis et al., 2016). Die eingesetzten Methoden sind hierbei vielfältig und werden stetig weiterentwickelt. Trotzdem haben sich drei Grundsätze in der Behandlung diabetischer Fußulcera bewährt.

1.1.2.6.1 Behandlung diabetischer Fußulcera

Erstens müssen die Wunden regelmäßig gesäubert werden (Lipsky et al., 2012a). Dazu gehört ein gründliches Wunddebridement (Markakis et al., 2016). Anschließend werden schützende Verbände angelegt, die je nach Wundmilieu unterschiedlich ausfallen können. So werden stark nässende Ulcera mit Verbandsmaterial versehen, welches Feuchtigkeit schnell und sicher aufnimmt, wohingegen trockene Wunden besser in einer feuchten Umgebung abheilen (Lipsky et al., 2012a). Zwar können zu diesen Zwecken spezielle Produkte wie Alginat oder Hydrokolloid eingesetzt werden, diese sind einfachen Verbänden aber nicht zwangsläufig überlegen (Dumville et al., 1996; Dumville et al., 2013), sodass für die meisten Patienten einfache Mullwickeln und Kochsalzlösung ausreichend zu sein scheinen (Uçkay et al., 2015). Unabhängig vom gewählten Material ist es wichtig, den Verband regelmäßig zu wechseln, um das Ulcus optimalerweise täglich inspizieren zu können (Lipsky et al., 2012a). Schließlich gilt es die Wunde zu entlasten (Bauer et al., 2010). Um den Druck auf das Ulcus zu vermeiden oder zu verteilen stehen verschiedene Hilfsmittel zur Verfügung. Darunter fallen vor- oder maßgefertigte Spezialschuhe ebenso wie druckreduzierende Einlegesohlen oder der Total Contact Cast (TCC) (Markakis et al., 2016; Uçkay et al., 2015). In einigen Fällen (z. B. bei ulcerierenden Hammer- oder Klauenzehen) können sogar chirurgische Eingriffe notwendig werden (Frykberg et al., 2010).

1.1.2.6.2 Therapie von Infektionen

Der Einsatz von Antibiotika bei infizierten Wunden ist zweifelsfrei vorteilhaft und notwendig, um einen Untergang von Gewebe und eine schlechte Wundheilung zu vermeiden (Lipsky et al., 2012a). Dennoch sollte die Indikation für den Einsatz dieser Medikamentengruppe streng gestellt werden - nicht infizierte Wunden sollten nicht antibiotisch behandelt werden (Bauer et al., 2010; Lipsky et al., 2012a). Denn zum einen liegt kein Beweis für eine beschleunigte Wundheilung oder ein Vermeiden von Infektionen von nicht infizierten Wunden vor, zum anderen entstehen unnötige Kosten, und zugleich wird das Risiko von Resistenzbildungen und Nebenwirkungen in Kauf genommen (Lipsky et al., 2012a). In diesem Zusammenhang darf gerade die Nierentoxizität einiger Substanzen bei Diabetespatienten mit eingeschränkter Nierenfunktion nicht unterschätzt werden

(Caballero & Frykberg, 1998). Daher gilt es bei unklaren Verhältnissen eher die Wundversorgung zu optimieren anstatt zu Antibiotika zu greifen (Glaudemans et al., 2015). Doch auch im Falle von Infektionen reicht eine medikamentöse Abdeckung der Erreger allein nicht aus – die lokale Wundversorgung mit gründlichem Debridement, das Ruhigstellen der Extremität und die gleichzeitige Behandlung der Hyperglykämie sind ebenfalls wichtige Faktoren im Umgang mit Infektionen (Caballero & Frykberg, 1998). Zudem sollte das Vorgehen der Schwere der Infektion angepasst werden (Bauer et al., 2010; Lawall et al., 2013).

Bei leichten Infektionen ohne verkomplizierende Faktoren kann die Versorgung ambulant mit oralen Antibiotika durchgeführt werden (Lipsky et al., 1990). Fluorchinolone erreichen per os sogar bei Patienten mit Gastroparese eine ausreichende Bioverfügbarkeit (Marangos et al., 1995), aber auch für viele andere Substanzen wie Clindamycin, Linezolid oder Rifampicin zeigen sich bei oraler Applikation adäquate Serumlevel und eine gute Penetration von Knochen, Synovia, Biofilmen oder nekrotischem Gewebe (Lipsky et al., 2012a; Uçkay et al., 2015), sodass bisher keine suffizienten Evidenzen vorliegen, die den Vorzug bestimmter Substanzen zur antibiotischen Behandlung von DFIs begründen würden (Selva Olid et al., 2015). Unabhängig vom gewählten Wirkstoff ist eine engmaschige Betreuung unabdingbar (Uçkay et al., 2015), wobei die erste Erfolgskontrolle bereits nach einigen Tagen erfolgen sollte (Lipsky et al., 1990). Im Falle einer deutlichen Verbesserung der klinischen Situation ist ein Fortführen der Antibiose bei milden und moderaten Infektionen für 1 - 2 Wochen in der Regel ausreichend (Lipsky et al., 1990). Bei Nichtansprechen muss die Therapie jedoch reevaluiert und ggf. verändert werden (Caballero & Frykberg, 1998). Bleibt der Behandlungserfolg weiterhin aus oder kommt es sogar zu einer Exazerbation der Infektion, muss über eine stationäre Weiterführung der Therapie nachgedacht werden (Caballero & Frykberg, 1998; Lipsky et al., 1990). Dasselbe gilt auch im Falle von metabolischer Instabilität und der Notwendigkeit diagnostischer Tests, kritischen Ischämien, indizierten chirurgischen Eingriffen, sehr komplexen Wunden mit aufwändigen Verbandswechseln und inkomplienten Patienten (Lipsky et al., 2012a).

Bei sehr schweren Infektionen ist der Patient von vorneherein in eine Klinik einzuweisen, wo umgehend eine intravenöse Antibiose eingeleitet werden muss (Bauer et al., 2010; Lawall et al., 2013). Im Vergleich zur oralen Medikation können so schneller adäquate Serumlevel des Wirkstoffes erreicht werden (Lipsky et al., 2012a). Da schwere Infektionen oft polymikrobiell sind (Frykberg & Veves, 1996), sollte eine initiale Therapie mit breitem Spektrum gewählt werden (Caballero & Frykberg, 1998; Lipsky et al., 2012a). Sobald das Ergebnis der Erregerbestimmung vorliegt, kann die empirische Therapie deeskaliert oder angepasst werden (Lawall et al., 2013; Lipsky et al., 2012a; Uçkay et al.,

2015). Dabei können detektierte Hautkeime wie Koagulase-negative Staphylokokken, Corynebakterien, Bacillus-Spezies oder Enterokokken z. T. vernachlässigt werden (Lipsky et al., 2012a; Uçkay et al., 2015). Sind diese Bakterien allerdings an Infektionen von tiefem, keimfreien Gewebe und dem Befall von Synthesematerial beteiligt, so muss das Antibiotikum auch für diese Erreger wirksam sein (Lipsky et al., 2012a; Uçkay et al., 2015). Außerdem müssen Anaerobier mitbehandelt werden, wenn Nekrosen, Gangrän oder faulig riechendes Gewebe vorhanden sind. Das gilt selbst dann, wenn kulturell keine anaeroben Bakterien gefunden wurden (Lipsky et al., 2012a). In diesen Fällen ist Metronidazol eine gute Wahl und kann zusammen mit anderen Medikamenten gegeben werden (Caballero & Frykberg, 1998). Die Kombination verschiedener Substanzen bietet sich nicht nur bei der Eradikation von Anaerobiern an, sondern kommt vor allem dann zum Einsatz, wenn verschiedene Bakterien im Wundmilieu vorhanden sind, die detektierten Organismen schnell Resistenzen entwickeln (z. B. Pseudomonaden), oder ein Antibiotikum verwendet wird, gegen welches erfahrungsgemäß schnell Resistenzen auftreten, wenn es nicht in Kombination eingesetzt wird (z. B. Rifampicin) (Lipsky et al., 2012a). Im Verlauf der Behandlung sollten dann nicht nur die Präparate angepasst werden, sondern auch deren Applikationsform. Die intravenöse Gabe ist deutlich teurer als eine orale Antibiose und birgt überdies mehr Risiken, weshalb ein Verabreichen per os bevorzugt werden sollte, sobald eine deutliche Besserung der Infektion eingetreten ist (Lawall et al., 2013; Lipsky et al., 2012a). Insgesamt müssen die Antibiotika bei schweren Infektionen meist 2 - 4 Wochen gegeben werden, um eine ausreichende Wirkung zu erzielen (Lipsky et al., 2012a), womit die Behandlungsdauer deutlich über der von leichten Fällen liegt. Um diese Zeitspanne zu reduzieren werden immer wieder Wege gesucht, die Antibiotikatherapie zu optimieren. So wurden Antibiotikaketten und antibiotisch beschichtetes Füllmaterial auf ihre Effektivität hin getestet (Roeder et al., 2000; Schade & Roukis, 2010; Yamashita et al., 1998). Für generelle Empfehlungen diesbezüglich fehlen jedoch noch ausreichende Forschungsdaten (Lipsky et al., 2012a). Andere Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit Verfahren zur Erregerbekämpfung, die gänzlich ohne Antibiotika im klassischen Sinne auskommen. Darunter fallen die fotodynamische Inaktivierung von Bakterien (Kashef et al., 2011), der Einsatz von Bakteriophagen (Uçkay et al., 2015), oder die bakterizide Bestrahlung mit blauem Licht (Yang et al., 2017).

1.1.2.7 Prävention

Damit Diabetiker erst gar keine DFUs entwickeln, steht die Prävention an oberster Stelle. Zu diesem Zweck hat die International Working Group on Diabetic Foot (IWGDF) eine Risikoklassifizierung herausgegeben (Tab. 6), die es ermöglichen soll, stark gefährdete Patienten zu identifizieren, und diese besonders intensiv zu betreuen.

Kategorie	Befunde	Untersuchung	Risikoeinstufung
0	Keine sensorische Neuropathie	1 x jährlich	Niedrig
1	Sensorische Neuropathie	1 x alle 6 Monate	Erhöht
2	Sensorische Neuropathie + paVK oder Fußdeformität	1 x alle 3 Monate	Erhöht
3	Ulcusanamnese	1x alle 1-3 Monate	Hoch

Tabelle 6 Risikoklassifizierung für das Auftreten von Fußläsionen der IWGDF

Neben den in Tabelle 6 genannten Faktoren müssen noch weitere Aspekte berücksichtigt werden, die Einfluss auf die Planung der Präventionsstrategie haben können (vorangegangene Amputationen, Arthropathien der unteren Extremität, eingeschränkte Gelenkmobilität, motorische Funktionseinschränkung, Adipositas \geq II°, Visuseinschränkungen, Immunsuppression, psychosoziale Faktoren, Suchtkrankheiten, ungeeignetes Schuhwerk, mangelnde oder falsche Fußpflege, Barfußlaufen, Hornhautschwielen) (Bauer et al., 2010). Je nach Ergebnis dieser Risikoeinstufung werden die Patienten entsprechend öfter zu Kontrolluntersuchungen einbestellt, in deren Rahmen sich der behandelnde Arzt ein Bild über den Zustand der Füße, über den Gefäßstatus und über das Schuhwerk des Patienten verschafft, und ggf. weiterführende diagnostische und therapeutische Maßnahmen einleitet (Bauer et al., 2010). Dazu zählt auch das Verschreiben von Orthesen und Spezialschuhen, die sowohl auf die individuellen anatomischen Gegebenheiten abgestimmt sind, als auch auf das jeweilige Verhalten des Patienten. Für Diabetiker mit minimalen Deformitäten und einer geringen körperlichen Aktivität können herkömmliche Sportschuhe mit weichen Innensohlen bereits ausreichend sein, während Patienten mit signifikanten Deformitäten und hohen Aktivitätsleveln Maßschuhe mit Orthesen und Entlastungspolsterungen benötigen (Bauer et al., 2010). Die statistische und dynamische Pedografie erlaubt eine Objektivierung der Druckentlastung und hilft dabei, das Ergebnis zu optimieren (Bauer et al., 2010). Außerdem müssen die Diabetiker selbst, aber auch Personen, die an der Pflege der Patienten beteiligt sind (z. B. Angehörige, Freunde, Pflegedienste) gezielt im Umgang mit der Erkrankung geschult werden. Dies geschieht bei der Erstdiagnose eines Diabetes mellitus in Form von allgemeinen

Gruppenschulungen, die durch spezielle Nachschulungen beim Auftreten von Begleiterkrankungen (z. B. periphere Neuropathie, pAVK, Fußdeformität, Ulcus) ergänzt werden (Bauer et al., 2010). In diesen Veranstaltungen werden die Teilnehmer mit dem Konzept der Selbstuntersuchung von Füßen und Schuhwerk vertraut gemacht, und erlernen Grundlagen der täglichen Fußpflege, wie die Reinigung mit lauwarmen Wasser, das Einreiben mit Feuchtigkeitscreme, die sachgerechte stumpfe Nagelpflege und das Beseitigen von Hornhautschwielen (Bauer et al., 2010). Unter bestimmten Voraussetzungen wird diese Fußpflege von professionellen Podologen ergänzt oder übernommen, etwa dann, wenn die Patienten auf Grund körperlicher Einschränkungen nicht mehr zur selbstständigen Versorgung in der Lage sind, oder Komplikationen (z. B. Fußdeformitäten, fortbestehende Druckstellen, Ulcusanamnese) hinzukommen, die zu einer höheren Risikoklasse führen (Bauer et al., 2010). Die professionelle podologische Behandlung beinhaltet neben den bereits genannten Aspekten auch die Behandlung von Tinea pedis, Onychomykosen, Nageldeformitäten und Paronychien (Bauer et al., 2010; Uçkay et al., 2015). Für weitreichendere Eingriffe müssen ggf. Chirurgen hinzugezogen werden, die präventive plastisch-chirurgische Verfahren, wie die Achillessehnenverlängerungen bei starker Vorfußbelastung, Arthroplastiken bei Zehenkontrakturen und Abtragungen von Exostosen durchführen (Bauer et al., 2010). Um die genannten präventiven Maßnahmen stetig zu verbessern werden neue Methoden erforscht, die auch die Patienten selbst in die Erfolgskontrolle mit einbeziehen. Beispiele dafür sind das Home-Monitoring mit Infrarotthermographie (Armstrong et al., 2007) oder Feedback-basierte Modelle zur Modifizierung des Laufstiles von DFS-Patienten (Pataky et al., 2000).

1.2 Die mikrobiologische Besiedlung der Haut

Die Mikrobiota der Haut setzt sich aus Bakterien, Archaea, Viren und Eukaryoten wie Protozoen, Pilzen und Nematoden zusammen (Egert et al., 2016; Schommer & Gallo, 2013). In Summe kolonisieren so rund $10^8 - 10^{10}$ Mikroben die Haut eines erwachsenen Menschen (Egert et al., 2016). Dabei variiert die Anzahl der Organismen /cm² je nach Körperpartie und reicht von 10^2 am Rücken und den Fingerspitzen (Egert et al., 2016) bis hin zu 10^6 in Regionen mit höherem Feuchtigkeitslevel wie der Leistengegend oder den Achselhöhlen (Cundell, 2016). Grundsätzlich bedeckt diese Mikrobiota nicht nur die Oberfläche der Epidermis, sondern siedelt sich auch in Haarfollikeln und Drüsen an (Kearney et al., 1984; Kong & Segre, 2012). Sogar tiefer gelegene Schichten wie die Dermis und das darunter gelegene Fettgewebe scheinen regelhaft von Mikroorganismen bevölkert zu sein (Grice et al., 2008; Nakatsuji et al., 2013).

1.2.1 Bakterien

Bakterien machen den größten Anteil der Mikrobiota der Haut aus, und lassen sich grob in zwei verschiedene Gruppen einteilen (Kong & Segre, 2012). Residente Bakterien werden regelmäßig auf der Haut gefunden, bevölkern diese dauerhaft und regenerieren sich nach Störungen wieder. Als transient werden hingegen diejenigen bezeichnet, die aus der Umwelt stammen, und nur für einige Stunden bis Tage auf der Haut bleiben. Sie regenerieren sich nach Störungen nicht ohne weiteres. Beide Gruppen sind unter normalen Umständen nicht schädlich für den Wirt, können aber durchaus Krankheiten und Infektionen verursachen, wenn hygienische Maßnahmen nicht eingehalten werden, der Wirt in seiner Immunität eingeschränkt oder die Hautbarriere nicht intakt ist (Kong & Segre, 2012). Abgesehen von diesen Risiken halten die bakteriellen Kommensalen, die von der Haut als stabile ökologische Nische und Nahrungsquelle profitieren (Schommer & Gallo, 2013), aber auch Vorteile für ihren Wirt bereit. So schützt eine balancierte und gesunde Mikrobiota den Wirt in ihrer Funktion als „Platzhalter“ vor der Besiedlung und Invasion durch pathogene Organismen (Cundell, 2016; Egert et al., 2016; Grice & Segre, 2011). Darüber hinaus haben einige Bakterienspezies spezielle Taktiken entwickelt, um Pathogene in Zusammenspiel mit dem Wirt zu bekämpfen. *Propionibacterium acnes* siedelt sich beispielsweise in den Talgdrüsen an, wo es Triglyceride hydrolysiert, sodass freie Fettsäuren entstehen, die zum Säureschutzmantel der Haut beitragen (Elias, 2007; Marples et al., 1971). Pathogene wie *Staphylococcus aureus* oder *Streptococcus pyogenes* werden durch den resultierenden niedrigen pH in ihrem Wachstum gehemmt (Aly et al., 1978; Elias, 2007). Zudem stimuliert *Propionibacterium acnes* die Sebozyten zur Produktion von antimikrobiellen Peptiden (AMPs) (Nagy et al., 2006). Ein ähnlicher Ansatz ist bei *Staphylococcus epidermidis* zu erkennen. Forscher konnten nachweisen, dass diese Bakterien die körpereigene Genexpression für AMPs verstärken (Lai et al., 2010), und überdies selber AMPs produzieren, die selektiv das Wachstum von *Staphylococcus aureus* oder Streptokokken der Gruppe A hemmen (Cogen et al., 2010b). Durch das Zusammenspiel von bakteriellen AMPs mit Komponenten des Immunsystems des Wirtes kann das Überleben von Pathogenen signifikant reduziert werden (Cogen et al., 2010a). Außerdem beeinflusst *Staphylococcus epidermidis* die Funktion von T-Lymphozyten der Haut (Naik et al., 2012) und sondert Serinproteasen ab, die Biofilme von *Staphylococcus aureus* zerstören können (Iwase et al., 2010).

Neben den bereits genannten *Propionibacterium acnes* und *Staphylococcus epidermidis* gehört eine ganze Reihe weiterer Bakterienspezies zur residenten Mikrobiota der menschlichen Haut, wie im Laufe der Jahre durch verschiedene Studien herausgefunden wurde. Bevor die Charakterisierung der Bakterien mit Hilfe der Sequenz-Analyse von 16S rRNA Genen durchgeführt werden konnte, wurden kulturelle Nachweise

geführt. Da allerdings nicht alle Bakterienspezies unter Standardlaborbedingungen kultiviert werden können, und zudem unterschiedliche Generationszeiten aufweisen, wurden Bakterien selektiert, die schnell auf den Nährmedien wachsen konnten (Chen & Tsao, 2013; Cundell, 2016; Gao et al., 2007; Grice et al., 2008). Diese wurden zwar auch mit molekularbiologischen Methoden nachgewiesen, jedoch zeigt sich in neueren Studien eine deutlich größere Vielfalt an Organismen als zuvor bekannt war (Fierer et al., 2008; Gao et al., 2007; Grice et al., 2009; Kong & Segre, 2012; Schommer & Gallo, 2013), obgleich die meisten der detektierten Spezies dabei jeweils weniger als 1 % der gesamten Mikrobiota eines Hautareals ausmachten (Chen & Tsao, 2013). Fierer et al. haben beispielsweise 331.619 16S Gensequenzen von 102 Handflächen analysiert. Sie identifizierten 4.742 Spezies, die mehr als 25 Bakterienstämmen angehörten. Aber 94 % aller Spezies konnten in nur drei Stämmen zusammengefasst werden: Acinobacteria, Firmicutes und Proteobacteria (Fierer et al., 2008). Auch bei der Studie von Gao et al., die sich mit der bakteriellen Besiedlung der Unterarme von 6 gesunden Erwachsenen beschäftigte, wurden aus 1.221 16S Gensequenzen 182 verschiedene Spezies detektiert, von denen 95 % zu den gleichen drei Stämmen gehörten wie bei Fierer et al. (Gao et al., 2007). Grice et al. untersuchten sogar 20 verschiedene Körperregionen von 10 gesunden Erwachsenen und analysierten insgesamt 112.283 16S Gensequenzen. Dabei identifizierten sie 19 Bakterienstämme, wobei die meisten der Bakterien von nur vier verschiedenen Stämmen abgedeckt wurden: (Actinobacteria (52 %) (z. B. Corynebakterien, Propionibakterien, Mikrokokken, Brevibakterien), Firmicutes (24 %) (z. B. Staphylokokken, Streptokokken, Laktobazillen), Proteobakterien (17 %) (z. B. Acinetobacter, Methylobakterien) und Bakteroidetes (6 %) (z. B. Prevotella, Porphyromonadaceae, Flavobakterien) (Grice et al., 2009). Abgesehen von der großen Vielfalt und der Dominanz bestimmter Stämme zeigten Grice et al. auch, dass die Bakterienkonstellationen zwischen Körperpartien mit Unterschieden in Hautdicke, den Hautfalten, der Dichte von Haarfollikeln und Drüsen (Kong & Segre, 2012) sowie den physikalischen und chemischen Eigenschaften (Egert et al., 2016) variieren. Areale mit vielen Talgdrüsen, wie die Kopfhaut, die Stirn, der Nacken und der obere Rücken sowie die Brust, werden durch lipophile Propionibakterien und Staphylokokken dominiert, während feuchte Bereiche wie die Achselhöhlen, die Genitalregion, die Knie- und Ellenbeugen sowie die Füße eher von Corynebakterien und Staphylokokken besiedelt werden (Grice et al., 2009). Trockene Gebiete, zu denen die Unterarme, die Beine, der untere Anteil des Rückens und das Gesäß sowie einige Handbereiche zählen, werden bevorzugt von β -Proteobakterien und Flavobacteriales kolonisiert (Grice et al., 2009). Insgesamt variieren die nachgewiesenen Bakterien aber nicht nur intrapersonell zwischen verschiedenen Hautarealen, sondern auch interpersonell. So stimmte die Mikrobiota auf den Händen verschiedener

Personen nur in 13 % der Spezies überein, wobei Frauen eine signifikant höhere Vielfalt aufwiesen (Fierer et al., 2008). Bei den Unterarmen konnten sogar nur 2,2 % der Spezies bei allen Personen nachgewiesen werden (Gao et al., 2007). Wodurch diese individuellen Bakterienkonstellationen erklärt werden können, ist letztendlich nicht vollständig geklärt; einige wichtige Einflussfaktoren konnten allerdings schon benannt werden.

Bereits die Art und Weise, wie ein Neugeborenes auf die Welt kommt, ist in Punkto Mikrobiota der Haut ausschlaggebend. Denn Kinder, die auf natürlichem Wege geboren werden, werden zunächst durch vaginale Bakterien (*Lactobacillus*, *Prevotella*, *Sneathia* spp.) besiedelt, während eine Geburt via Kaiserschnitt zu einer Mikrobiota führt, die durch typische Hautkeime (*Propionibakterien*, *Staphylokokken*, *Corynebakterien* spp.) geprägt ist (Dominguez-Bello et al., 2010; Mueller et al., 2015). In den folgenden Monaten und Jahren nimmt die Vielfalt der bakteriellen Besiedlung stetig zu (Capone et al., 2011) wobei sich die Mikrobiota von Kindern und Erwachsenen immer noch deutlich unterscheidet (Oh et al., 2012). Erst während der Pubertät, wenn sich die Hormon- und Talgproduktion ändert, nimmt die Anzahl lipophiler Bakterien zu (Cundell, 2016). Auch die physiologisch und anatomisch verschiedene Hautbeschaffenheit bei Männern und Frauen, sowie deren unterschiedliche Schweiß-, Talg- und Hormonproduktion, trägt zu einer anderen Mikrobiota bei (Giacomini et al., 2009). Diese grundlegenden Veränderungen der Hautmikrobiota im Laufe des Lebens werden weiterhin durch individuelle Wirtsfaktoren und Umwelteinflüsse moduliert. Dabei spielen z. B. Verhaltensweisen in Hinsicht auf Hygiene und Kosmetikgebrauch (Callewaert et al., 2014; Fierer et al., 2008) und der individuelle Immunstatus eine Rolle (Oh et al., 2013).

1.2.2 Pilze, Viren, Archaea

Einen weitaus kleineren Anteil an der Hautmikrobiota machen Pilze aus. Molekularbiologische Nachweise haben ergeben, dass Hefen – insbesondere *Malassezia* (z. B. *Malassezia globosa*, *Malassezia restricta*, *Malassezia sympodialis*) dominieren (Findley et al., 2013; Gao et al., 2010; Paulino et al., 2008; Paulino et al., 2006), während sich die aus dem klinischen Alltag bekannten *Candida* Spezies in Kulturen der gesunden Haut nur spärlich finden. Trotzdem können sie bei immungeschwächten Personen oder antibiotisch behandelten Patienten schwere Infektionen auslösen (Peleg et al., 2010). Ebenso wie bei den Bakterien sind auch bei den Pilzen Unterschiede zwischen den einzelnen Körperpartien zu erkennen. So waren 80 % der hinter den Ohren nachgewiesenen Pilze *Malassezia* Spezies, während es an den Beinen nur 53 % waren (Gao et al., 2010). Park et al. konnten sogar nachweisen, dass diese Gattung auf der Kopfhaut nur 0,07 % der identifizierten Pilze ausmacht (Park et al., 2012). Der größte Anteil aller nachgewiesenen Sequenzen stammte hier von *Acremonium* Spezies (62 %) (Park et al.,

2012). Wiederum anders verhält es sich im Bereich der Füße. Im Gegensatz zum restlichen Körper haben Findley et al. für verschiedene Fußbereiche eine zeitlich weniger stabile und deutlich ausgeprägtere Pilzvielfalt (z. B. *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Epicoccum*) detektiert (Findley et al., 2013). Neben den Pilzen besiedeln auch Archaea die menschliche Haut, und machen schätzungsweise 4 % der prokaryotischen Mikrobiota aus. Am häufigsten konnte Thaumarchaeota nachgewiesen werden (Probst et al., 2013). Und obwohl Viren grundsätzlich als pathologisch angesehen werden, findet man sie doch in einer erstaunlichen Vielfalt (z. B. Beta- und Gammapapillomviren, Polyomaviridae und Circoviridae) auf gesunder Haut (Foulongne et al., 2012).

1.2.3 Die mikrobiologische Besiedlung diabetischer Füße

Die Hautflora von Diabetikern unterscheidet sich von der von nicht Diabetepatienten. Dieser Umstand kann durch das Zusammenspiel unterschiedlicher Mechanismen erklärt werden. Normalerweise tragen Schweißdrüsen, Talgdrüsen und Haarfollikel auf verschiedene Weise zu einem spezifischen Mikroenvironment bei (Kong, 2012). Zum einen geschieht dies durch rein physikalische Gegebenheiten wie der Temperaturregulation durch das Schwitzen an den Füßen. Die Hauttemperatur wird heruntergekühlt, was die Wachstumsbedingungen verschiedener Organismen beeinträchtigt (Egert et al., 2016; Grice & Segre, 2011). Zum anderen laufen chemische Prozesse ab, die das Mikroenvironment verändern. So wird durch den Schweiß ekkriner Drüsen die Hautoberfläche angesäuert, wodurch der Kolonisation und dem Wachstum von (pathogenen) Bakterien vorgebeugt werden soll (Egert et al., 2016; Grice & Segre, 2011). Auch sezernieren ekkrine Schweißdrüsen antimikrobielle Peptide (Dermcidine) (Schittek et al., 2001), die gegen *Staphylococcus aureus* und andere kutane Mikroben wirken. Normalerweise weisen die Handflächen und Fußsohlen eine höhere Dichte an ekkrinen Schweißdrüsen auf (600/cm²) (Noël et al., 2012). An den unteren Extremitäten von Diabetikern ist diese jedoch vermindert, was zu einer Veränderung der Thermo- und Schweißregulation führen kann (Rutkove et al., 2009). Hinzu kommt eine erhöhte Glukosekonzentration im Schweiß (Moyer et al., 2012), wodurch zusätzlich das empfindliche Gleichgewicht der Hautflora beeinflusst werden kann. Dies kann sogar bereits dann der Fall sein, wenn klinisch noch keine manifeste Neuropathie diagnostiziert wird (Rutkove et al., 2009). Neben den genannten Veränderungen muss auch die Tatsache Berücksichtigung finden, dass Patienten mit DFS oftmals antibiotisch vorbehandelt sind. Dies begünstigt die Besiedlung durch untypische oder resistente Bakterien (Lavigne et al., 2015; Lipsky et al., 2012a). So wurde in den letzten Jahren vermehrt MRSA bei diesem Klientel isoliert (Cervantes-García et al., 2015).

Insgesamt konnte in verschiedenen Studien bereits gezeigt werden, dass sich vor allem die Zusammensetzung der Mikrobiota verändert (Redel et al., 2013). Bei Personen ohne Diabetes machen Staphylokokken-Spezies rund 70 % der normalen Hautflora der Plantarseite des Fußes aus (Grice & Segre, 2011; Kong, 2012), wobei die meisten davon koagulasenaktiv und nur wenig virulent sind, und mit *Staphylococcus aureus* konkurrieren (Iwase et al., 2010). Bei Diabetikern kommt es zu einer Abnahme von koagulasenaktiven Staphylokokken (Lavigne et al., 2015). Sie machen nur noch ca. 7 % der Mikrobiota auf den Extremitäten von Patienten mit DFS aus (Gontcharova et al., 2010), wohingegen die Anzahl von *Staphylococcus aureus* und Pseudomonaden ansteigt (Lavigne et al., 2015; Redel et al., 2013). Insgesamt ist eine deutliche Zunahme der Artenvielfalt bei Diabetikern zu beobachten (Glaudemans et al., 2015; Redel et al., 2013). Dies beinhaltet nicht nur Bakterien, sondern auch Viren, Protozoen und Pilze (Peters et al., 2012). Bei der Besiedlung durch viele verschiedene Arten und Spezies handelt es sich nicht um eine bloße Koexistenz. Sie bringt auch Vorteile für einzelne Mikroben mit sich, die durch das enge Zusammenleben die Möglichkeit zur metabolischen Kooperation und zum DNA-Austausch erlangen, was neue Virulenzfaktoren generiert (Lavigne et al., 2015). Die geschilderten Veränderungen begünstigen sowohl die Aufrechterhaltung chronischer Wunden, als auch die Entstehung von Infektionen (Grice & Segre, 2011; Lipsky et al., 2012b; Littman & Pamer, 2011).

Im Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung chronischer Wunden durch Mikroorganismen, wird in der Fachliteratur auch von „kritischer Kolonisation“ gesprochen. Dieser Begriff umschreibt die Beobachtung, dass die Wundheilung ab einer Zahl von $>10^5$ bis $>10^6$ colony forming units /g Gewebe inhibiert wird, ohne dass dies zwingend mit einer Infektion einhergehen muss (Gardner & Frantz, 2008). Kommen jedoch viele Faktoren wie die gestörte Hautbarriere, eine geschwächte Immunantwort und das Vorhandensein von pathogenen Erregern zusammen, entstehen Infektionen. Auch Bakterien, die normalerweise wenig virulent sind, können unter den geschilderten Umständen zu wahren Erregern von Infektionen werden (Grice & Segre, 2011; Schommer & Gallo, 2013). Jedoch haben Studien gezeigt, dass oftmals eine Kombination von Erregern vorliegen muss, und nicht das opportunistische Vorhandensein einer einzelnen Mikrobe zu manifesten Entzündungsreaktionen führt, was erklärt, warum die meisten DFIs polymikrobiell sind (Glaudemans et al., 2015; Ramakant et al., 2011). Dies gilt vor allem für schwere Infektionen, die eine stationäre Behandlung erforderlich machen, und sogar extremitäten- und lebensgefährdend sein können (Citron et al., 2007; Frykberg & Veves, 1996; Lipsky et al., 2004). Mildere Infektionen können auch monomikrobiell sein (Frykberg & Veves, 1996; Lipsky et al., 2012a), wobei meist aerobe, Gram-positive Kokken isoliert werden (Caputo et al., 1994; Wheat et al., 1986).

Der in vielen Studien am häufigsten nachgewiesene, und als wahrer Erreger identifizierte Keim, ist *Staphylococcus aureus* (Lawall et al., 2013; Ramakant et al., 2011; Wheat et al., 1986). Auch *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, beta-hämolyisierende Streptokokken, Enterokokken und Enterobacteriaceae wurden häufig nachgewiesen (Lipsky et al., 2012a; Ramakant et al., 2011; Wheat et al., 1986). Jedoch bleibt die Rolle Gram-negativer Organismen als wahre Infektionserreger unklar (Lipsky et al., 2012a). So hat eine Studie aus den USA gezeigt, dass Antibiotikaregime, die diese nicht mit abdeckten, vergleichbare Therapieerfolge erbrachten, wie Antibiotika, die Gram-negative Erreger mit einschlossen (Lipsky et al., 2004). Auf der anderen Seite wurden Gram-negative Stäbchen wie *Pseudomonas aeruginosa* vor allem in warmen Klimazonen (Indien, mittlerer Osten, Afrika) als vorherrschende Erreger in DFIs identifiziert (Uçkay et al., 2014). Anaerobier (v. a. Gram-positive anaerobe Kokken, *Peptostreptococcus magnus*, *Peptostreptococcus asaccharolyticus*, Gram-positive anaerobe Bacillen, Gram-negative anaerobe Bacillen und Gram-negative anaerobe Coccobacillen (z. B. *Bacteroides*) wurden nur vereinzelt in infizierten Fußulcera bei Diabetespatienten nachgewiesen (Charles et al., 2015; Lipsky et al., 2005). Von ihnen wird angenommen, dass sie als Besiedler ischämischer und nekrotischer Wunden fungieren, aber in der Regel nicht die eigentlichen Infektionserreger sind (Uçkay et al., 2015). Sie wurden in Studien nicht eindeutig mit schweren Infektionen in Verbindung gebracht, sondern vielmehr als Teil einer komplexen Mischflora isoliert (Charles et al., 2015). Dies ist ein wichtiges Beispiel dafür, dass die Wundflora auch von der Wundbeschaffenheit (stumpf, penetrierend, chronisch, akut) abhängig ist (Egert et al., 2016; Gardner et al., 2013). Es konnte vielfach gezeigt werden, dass die tiefe Flora in DFUs vielfältiger und komplexer ist, als die oberflächliche Flora (Glaudemans et al., 2015; Lavigne et al., 2015). Tiefe Schichten sind reicher an anaeroben Spezies, und auch ischämische und nekrotische Wunden begünstigen die Ansiedlung von Anaerobiern (Charles et al., 2015). So konnte gezeigt werden, dass mit steigendem Wagnerstadium auch die Wahrscheinlichkeit von Anaerobiern zunimmt (Aragón-Sánchez, 2011).

Betrachtet man die Ergebnisse der verschiedenen Studien zur Besiedlung und Infektion des diabetischen Fußes, so wird klar, dass der kulturelle Erregernachweis allein kaum ausreichend ist, um alle Bakterien nachzuweisen, oder zwischen besiedelnden und infektiösen Spezies zu unterscheiden.

Metagenomische Herangehensweisen haben unser Wissen über das Genom, die Aktivität und die Funktionen des komplexen Ökosystems im diabetischen Fuß erheblich gesteigert (Glaudemans et al., 2015).

Studien, die sich mit dem dominanten Pathogen - *Staphylococcus aureus* - in diabetischen Füßen beschäftigten, haben die Coexistenz verschiedener Populationen

beschrieben, und dass eine Kombination von fünf spezifischen Genen dabei helfen kann zwischen besiedelten und infizierten Wunden zu unterscheiden, und das Outcome der Ulcera vorherzusagen, was dazu beitragen würde Antibiotika treffend einsetzen zu können (Sotto et al., 2012).

Wenn man dies im Hinterkopf behält, könnte die Identifikation von spezifischen Bakterien mittels Genotypisierung zukünftig eine wichtige Rolle spielen (Peters, 2016).

1.3 Biofilm

Ganz allgemein gesprochen handelt es sich bei Biofilmen um eine eng verbundene Gemeinschaft aus Mikroorganismen, die von einer selbstproduzierten, extrazellulären Matrix aus polymerer Substanz eingeschlossen werden, und an verschiedenen künstlichen oder natürlichen Oberflächen bzw. Grenzflächen haften (Costerton et al., 1999; Costerton et al., 1995; Percival et al., 2014). Einige Definitionen beziehen noch die Umgebung mit ein, welche für gewöhnlich wässrig ist, den metabolischen Bedürfnissen der Mikroorganismen entspricht, und eine ausreichende Konzentration an Nahrung bereithält (Egert et al., 2016; Wimpenny, 1997). In solchen Verbänden leben 80 % - 90 % aller Bakterien zusammen (Egert et al., 2016), und auch Pilze können in Biofilmen enthalten sein (Percival et al., 2014; G. Zhao et al., 2013). Dabei lassen sich Zusammenschlüsse nur einer einzelnen Spezies von polymikrobiellen Gemeinschaften unterscheiden (Gupta et al., 2016), in denen metabolisch unterschiedliche Organismen z. T. als syntrophes Kollektiv zusammenleben (Davey & O'Toole, 2000). Auf diese Weise profitieren nicht nur die Bakterien und Pilze untereinander, sondern oftmals auch die Umgebung des Biofilms. Denn die mikrobielle Gemeinschaft verwertet Stickstoff, Schwefel und viele Metalle, und hat einen großen Anteil an der Produktion und dem Abbau organischen Materials, was zur Korrektur hartnäckiger Umweltverschmutzungen beiträgt (Gupta et al., 2016). Trotzdem muss zwischen schädlichen und nützlichen Biofilmen unterschieden werden. In der Industrie können Biofilme beispielsweise Biofouling verursachen, die Übertragung von Hitze reduzieren oder Korrosion verursachen (Berlanga & Guerrero, 2016). Außerdem kommen sie auf Nahrungsmitteln vor und können so die Qualität der Produkte herabsetzen oder gar ein Risiko für die öffentliche Gesundheit sein (Bridier et al., 2015). Die Oberfläche, welche als Basis für die Biofilme dient, muss nicht unbedingt massiv sein; auch Grenzflächen zwischen zwei sich nicht mischenden Flüssigkeiten oder Gas-Flüssigkeitsgrenzen können ausreichend sein (Percival et al., 2014; Wimpenny, 1997). Dementsprechend gibt es kaum ein Umfeld, in dem Biofilme nicht zu finden sind, und der menschliche Körper bildet hier keine Ausnahme. Bakterielle Gemeinschaften besiedeln regelhaft die Haut und den Gastrointestinaltrakt, bilden hier benigne kommensale Biofilme, und schützen so vor Krankheiten und Infektionen (Percival et al.,

2014). Doch auch diese Bakterien können für den Menschen im Falle von (chronischen) Infektionen gefährlich werden. Welche Biofilme diese Infektionen auslösen bzw. aufrecht erhalten ist aktuell noch Gegenstand der Forschung. Zum einen gibt es die spezifische-Bakterien-Hypothese, nach der nur ein paar Spezies innerhalb eines heterogenen polymikrobiellen Biofilmes an infektiösen Prozessen beteiligt sind, zum anderen existiert die Gemeinschafts-Hypothese, die davon ausgeht, dass Bakterien, die an und für sich nicht mit chronischen Entzündungen in Verbindung gebracht werden, erst durch den Zusammenschluss mit anderen Bakterienspezies in einem Biofilm pathogen werden (Dowd et al., 2008; Percival et al., 2010). Sie werden dann als „funktional äquivalente Pathogruppe“ (FEP) bezeichnet (Dowd et al., 2008; Glaudemans et al., 2015). Im Gegensatz zu benignen Biofilmen zeigen pathogene mikrobielle Gemeinschaften eine signifikant höhere Anzahl an hochregulierten Genen (Percival et al., 2014). Die resultierenden genetischen und biochemischen Effekte führen dann zu einer verstärkten Immunantwort (Percival et al., 2014). Die Erreger sind jedoch durch ihren Biofilm geschützt, sodass die Immunreaktion chronisch wird, und eher das umliegende Gewebe schädigt (Archer et al., 2011; Wilson, 2001). Beispiele für solche Biofilm-assoziierte Infektionen gibt es viele; gerade in Zusammenhang mit medizinischem Material, das in den Körper eingebracht wird. So sind Schrittmacher, Gelenkprothesen und künstliche Herzklappen anfällig für die Besiedlung mit Biofilmen (Gupta et al., 2016; G. Zhao et al., 2013). Aber auch nur vorübergehend angelegte Hilfsmittel werden leicht zur Infektionsquelle. Beispielsweise kontaminieren vor allem die Epidermis kolonisierende Mikroorganismen wie *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, oder *Pseudomonas aeruginosa* (Costerton et al., 1999; Kokare et al., 2009; Otto, 2008) intravenöse Katheter beim Durchstechen der Haut, und bilden später Biofilme (Kokare et al., 2009). Intraurethrale Katheter werden hingegen eher von *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis* und einigen Gram-negativen Bakterien besiedelt (Costerton et al., 1999; Kokare et al., 2009). Einige Biofilm-assoziierte Erkrankungen kommen auch ganz ohne künstliche Oberflächen aus. Eine Periodontitis entsteht beispielsweise oft im Rahmen mangelhafter Mundhygiene durch natürlich im Mundraum vorkommende Biofilme (Costerton et al., 1999; Egert et al., 2016; Lavigne et al., 2015). Eine Endokarditis kann durch opportunistische Bakterien ausgelöst werden, die Biofilme auf vorgeschädigten Herzklappen bilden (Kokare et al., 2009), und bei der cystischen Fibrose dient der zähe Schleim in den Bronchien als Grundlage für Biofilm-assoziierte Infektionen durch *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenza* und *Pseudomonas aeruginosa* (Costerton et al., 1999; Kokare et al., 2009; Singh et al., 2000). Ebenso spielt *Staphylococcus aureus* bei der Osteomyelitis eine wichtige Rolle (Aragón-Sánchez et al., 2008). Durch seine Affinität zu Fibronektin, Kollagen und Laminin findet er hier die idealen Voraussetzungen zur

Bildung seines Biofilms (Ciampolini & Harding, 2000; Zhao et al., 2013). Dasselbe gilt auch im Bereich chronischer Wunden wie dem Malum perforans oder dem Ulcus cruris (Gupta et al., 2016). So wurden in Studien bis zu 94 % der Wundinfektionen positiv auf *Staphylococcus aureus* getestet (Gjødtsbøl et al., 2006), und bis zu 60 % chronischer Wunden wiesen Biofilme auf (James et al., 2008). Zudem zeigt sich, dass Wunden mit Biofilmen von *Staphylococcus aureus* oder *Pseudomonas aeruginosa* länger für die Wundheilung brauchen als biofilmfreie Wunden (Gurjala et al., 2011; Zhao et al., 2010). Ob diese Chronifizierung von Wunden nun Ursache oder Folge der Biofilmbildung ist, wurde vielfach diskutiert und erforscht. Auf der einen Seite können sich Bakterien an das nekrotische Gewebe und die Zelltrümmer in chronischen Wunden anheften, und - begünstigt durch eine eingeschränkte Immunantwort in diesem Bereich - Biofilme aufbauen und Infektionen verursachen (Siddiqui & Bernstein, 2010; Wolcott et al., 2008). Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass Biofilme zu einer Verzögerung der Reepithelialisierung führen (Gupta et al., 2016; Schierle, De La Garza et al., 2009), die Entstehung von Granulationsgewebe beeinträchtigen (Gurjala et al., 2011), und die Entzündungsreaktion so beeinflussen, dass diese nur moderat ausfällt (G. Zhao et al., 2013), was eine gestörte Wundheilung mit sich bringt. Besonders polymikrobielle Biofilme scheinen die Wundheilung für einen längeren Zeitraum zu verzögern als Biofilme einer einzelnen Spezies (Pastar et al., 2013). Die Behandlung dieser Biofilm-assoziierten Infektionen stellt die Medizin vor eine Herausforderung, denn Bakterien innerhalb eines Biofilmes unterscheiden sich wesentlich von freilebenden Vertretern derselben Spezies. So besitzen sie oftmals andere Virulenzfaktoren (Gupta et al., 2016; Lavigne et al., 2015) und transkribieren andere Gene als planktonische Bakterien (Kokare et al., 2009). Auch weisen sie einen langsameren Metabolismus auf und zeigen niedrigere Replikationsraten, was sie schwerer kultivierbar macht (Gupta et al., 2016; Peters, 2016). Sie interagieren anders mit ihrem Wirt (G. Zhao et al., 2013) und sind durch die selbstproduzierte Matrix vor einer ganzen Reihe von schädlichen Einflüssen wie Dehydratation, UV-Strahlung oder pH-Veränderungen geschützt (Gupta et al., 2016). Auch Reinigungsmittel, Biozide und Antibiotika (Costerton et al., 1999; Egert et al., 2016; Lavigne et al., 2015; Percival et al., 2014) können den Biofilm nicht ohne weiteres zerstören. Es hat sich gezeigt, dass Biofilme um den Faktor 500 - 1000 resistenter gegen antibakterielle Präparate sind (Egert et al., 2016) und die Dosierung von Antibiotika dementsprechend angepasst werden muss, um wirksame Konzentrationen erreichen zu können. Dies gilt besonders für reife, gut organisierte Biofilme (Wolcott et al., 2010). Diese ausgeprägte Resistenz gegenüber Antibiotika könnte durch mehrere Faktoren zustande kommen. Zum einen wird vermutet, dass einige Substanzen die Biofilme nicht gut penetrieren können (Stewart & Costerton, 2001; Stewart, 2002). Zum anderen herrscht innerhalb der Biofilme ein Milieu, in dem

einige Präparate schlechter wirken. Beispielsweise sind Aminoglykoside in anaerober Umgebung nicht effektiv, und auch Veränderungen des pH-Wertes, die aus Ansammlungen saurer Abfallprodukte resultieren, können die Wirksamkeit von Antibiotika reduzieren (Gupta et al., 2016; Stewart & Costerton, 2001). Hinzu kommt, dass sich viele Biofilmbakterien in einem Ruhezustand befinden, der sie vor Substanzen schützt, die normalerweise die metabolische Aktivität oder die Proliferation der Bakterien stören (Zhao et al., 2013). Schließlich wird noch vermutet, dass die Bakterien durch den regen Gentransfer innerhalb eines Biofilmes schlichtweg Resistenzen gegen viele Präparate entwickelt haben (Gupta et al., 2016; Stewart, 2002; Zhao et al., 2013). Aber nicht nur externe Mechanismen zur Bekämpfung von Mikroorganismen versagen. Auch das körpereigene Immunsystem wird auf vielfältige Weise beeinflusst und ist gegen Biofilme weniger wirksam (Lavigne et al., 2015; Percival et al., 2014). Angesichts der geschilderten Problematik wird deutlich, dass zur wirksamen Bekämpfung dieser Biofilme neue Methoden erforscht werden müssen. Die genaue Kenntnis der Entwicklung und des Aufbaus von Biofilmen kann dabei helfen, neue Ansatzpunkte zu identifizieren. So besteht die erste Stufe in der Biofilmbildung aus der initialen Anheftung von Mikroorganismen an eine Oberfläche (Egert et al., 2016; Otto, 2008; G. Zhao et al., 2013). Dieser Schritt kann reversibel oder irreversibel ablaufen (Percival et al., 2014) und ist von verschiedenen Faktoren wie der Temperatur, dem Umgebungsdruck, der strukturellen Oberflächenbeschaffenheit sowie der verfügbaren Energie abhängig (Garrett et al., 2008; Gupta et al., 2016). Welche Haftungsmechanismen die Mikroorganismen benutzen, ist von Art zu Art unterschiedlich (Percival et al., 2014). Entweder werden physikalische Kräfte (z. B. van-der-Waals Kräfte) und elektrostatische Interaktionen ausgenutzt, oder Anhängsel wie Pili und Flagellen eingesetzt (Garrett et al., 2008). Anschließend folgt die Reifungsphase, in der sich die Mikroorganismen untereinander vernetzen und vermehren (Otto, 2008; Percival et al., 2014). Sie organisieren sich in Zellclustern bzw. Mikrokolonien und produzieren die Biofilmmatrix, welche auch als extrazelluläre polymere Substanz (EPS) bezeichnet wird (Gupta et al., 2016; Percival et al., 2014). Diese besteht unter anderem aus Polysacchariden, Proteinen, Lipiden, Aminosäuren und extrazellulärer DNA (Beech & Gaylarde, 1999; Percival et al., 2014), und ist verantwortlich für die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Biofilms (Flemming & Wingender, 2010; Percival et al., 2014). Außerdem trägt sie zu dessen Struktur und Architektur bei (Flemming & Wingender, 2010), die grundsätzlich aus einer Art flüssigkeitsgefülltem Leitungssystem besteht, welches zur Nährstoffversorgung tieferer Schichten und zum Abtransport von Abfallprodukten dient (Costerton et al., 1995; Otto, 2008; Percival et al., 2014; Zhao et al., 2013). Trotzdem gibt es im Aufbau verschiedener Biofilme eine gewisse Variation. Sie können je nach Präferenz der Organismen z. B. ein- oder mehrschichtig ausfallen

(Karatan & Watnick, 2009), und eine Dicke von einigen Mikro- bis Millimetern erreichen (Zhao et al., 2013). Der Zellanteil schwankt zwischen 5 % und 30 % des Biofilmvolumens (Zhao et al., 2013) und beträgt bis zu 1000 mal mehr, als die maximale Anzahl pro Gramm, die planktonische Vertreter erreichen (Egert et al., 2016). Diese Unterschiede in der Biofilmbeschaffenheit sind nicht nur auf genetische Faktoren zurückzuführen, sondern werden auch durch verschiedene Umwelteinflüsse wie biochemische Interaktionen, hydrodynamische Verhältnisse oder die Menge an verfügbaren Nährstoffen hervorgerufen (Gupta et al., 2016; Marić & Vraneš, 2007; Percival et al., 2014). Die Mikroorganismen können gezielt auf Veränderungen reagieren, und die Struktur ihres Biofilmes anpassen (Marić & Vraneš, 2007). Dazu bedienen sie sich des Quorum sensing (Gupta et al., 2016; Otto, 2008) – einer dichteabhängigen Form der interzellulären Kommunikation via Signalmolekülen (Zhao et al., 2013), die eine Steuerung der Biofilmarchitektur, des mikrobiellen Wachstums und der Toxin- und Enzymproduktion erlaubt (Percival et al., 2014). Das Quorum sensing ist auch für die finale Ab- oder Auflösungsphase eines Biofilmes wichtig. Sie dient der Aussaat von Organismen zur Etablierung neuer Biofilme an anderen Oberflächen (Otto, 2008; Zhao et al., 2013). Die Ablösung der Kolonien geschieht entweder durch Desorption, Ablösung oder Dispersion. Die Desorption findet meist in frühen Stadien statt und beinhaltet den Übergang von oberflächlichen Zellen in das umliegende Medium (Petrova & Sauer, 2016). Bei der Abtrennung spielen mechanische Kräfte (z. B. Blutstrom oder Luftblasen) eine Rolle, die zum Abscheren von Zellverbänden führen (Otto, 2008; Percival et al., 2014; Petrova & Sauer, 2016), und die Dispersion besteht in der aktiven Veränderung physiologischer Gegebenheiten (Rohstoffproduktion, enzymatischer Abbau (Gupta et al., 2016; Otto, 2008)) was ein gezieltes Freilassen von Zellen mit sich bringt (Petrova & Sauer, 2016). Je reifer der Biofilm wird, und je mehr der genannten Stadien er durchläuft, desto weniger ist der menschliche Wirtsorganismus dazu in der Lage, das Wachstum und die Entwicklung des Biofilmes zu kontrollieren (Percival et al., 2014). Daher ist ein möglichst frühzeitiges Eingreifen bei der Behandlung von biofilmassoziierten Infektionen notwendig. Dies beinhaltet zum einen die präventive (z. B. Zähneputzen zur Vorbeugung von Periodontitis (Egert et al., 2016)) und therapeutische (z. B. Wunddebridement (Kingsley et al., 2011; Lavigne et al., 2015)) mechanische Entfernung von Biofilmen. Zum anderen kommen trotz der genannten Schwierigkeiten auch Antibiotika zum Einsatz. Diese können systemisch verabreicht und lokal als Gel oder Creme appliziert werden (Kingsley et al., 2011; Zhao et al., 2013). Bei der topischen Anwendung können höhere Wirkstoffkonzentrationen erreicht werden ohne systemische Nebenwirkungen in Kauf zu nehmen (Zhao et al., 2013). Neben den Mikroorganismen an sich rückt auch immer mehr die intrazelluläre Matrix als mögliches Ziel in den Fokus (Gupta et al., 2016; Zhao et al., 2013). Enzyme wie Dispersin B,

Proteinase K oder DNase I (Chaignon et al., 2007; Izano et al., 2008) können Matrixbestandteile abbauen, und machen Bakterien somit anfälliger gegenüber Antibiotika und der Immunantwort des Wirtes. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die interzelluläre Kommunikation (Gupta et al., 2016), die beispielsweise durch RNAIII-inhibiting peptide (RIP) gestört werden kann (Balaban et al., 2007). Bis dato sind diese neuen Methoden jedoch noch nicht klinisch etabliert und bedürfen weiterer Erforschung.

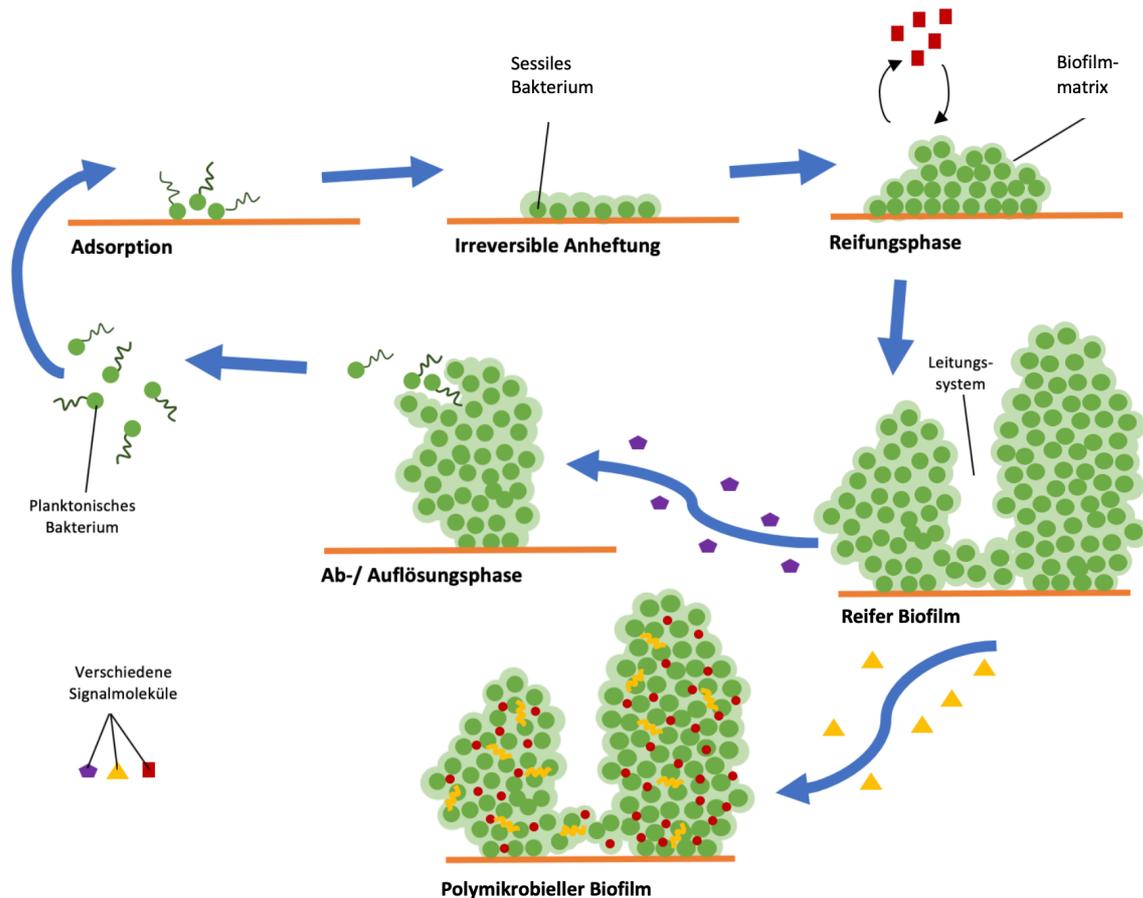


Abbildung 1 Verschiedene Phasen der Biofilmentwicklung

1.4. Fazit und Fragestellung

Beim Diabetes mellitus handelt es sich um eine weit verbreitete Diagnose mit weltweit zunehmender Prävalenz. Das diabetische Fußsyndrom ist eine Folgeerkrankung mit weitreichenden Konsequenzen für verschiedenste Bereiche des alltäglichen Lebens der betroffenen Patienten, und stellt auch die Gesellschaft und das Gesundheitswesen vor vielfältige neue Herausforderungen. Gerade schwerwiegende Komplikationen wie Amputationen, Sepsis und Letalität, sind mit Infektionen von diabetischen Fußulcera vergesellschaftet.

Die Entstehung von diabetischen Fußinfektionen ist ein multifaktorielles Geschehen, auf das Aspekte der Umwelt (z. B. Erregerquellen, Hygienemaßnahmen), des Patienten (z. B. Immunstatus, Komorbiditäten, Compliance) und der auslösenden Pathogene (z. B. Pathogenitätsfaktoren, Resistenzlage) Einfluss nehmen. Um den Infektionen bestmöglich vorzubeugen und diese behandeln zu können, ist es von zentraler Bedeutung die genannten Faktoren zu kennen. Insbesondere zählt hierzu eine möglichst detaillierte Analyse der häufigsten Infektionserreger. Da der bisher in der Routinediagnostik genutzte kulturelle Erregernachweis mit einer Reihe von Einschränkungen einhergeht, und in Folge dessen nur ein unvollständiges und verzerrtes Bild des Erregerspektrums von diabetischen Fußinfektionen generiert werden kann, ist es notwendig und sinnvoll, mithilfe molekulargenetischer Methoden neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet zu sammeln. Der Zweck der zugrundeliegenden Forschung war es, das Mikrobiom von diabetischen Fußinfektionen durch die Kombination verschiedener Methoden (Kultur, DHPLC-WAVE®-System und Real-Time-PCR) möglichst vollständig zu erfassen, und die gewonnenen Ergebnisse im Hinblick auf eine Verbesserung von Prävention, Diagnostik und Therapie von DFIs zu evaluieren.

In diesem Zusammenhang sollen folgende Aspekte untersucht werden:

- Stärken und Schwächen der einzelnen Methoden
- Unterschiede im detektierten Erregerspektrum
- Klinische Relevanz der nachgewiesenen Erreger
- Sinnvoller Einsatz molekulargenetischer Methoden in der Routinediagnostik
- Ausprägung der Biofilmbildung häufig nachgewiesener Erreger aus DFI

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie (20 µm Stärke, glänzend)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Cellstar® Tubes (10 ml)	Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen
Einmalkanülen (0.8 x 40 mm)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalpipette (2 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Impfösen (1 µl; 10 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Injekt® Einmalspitzen (2 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific Inc, Langesbold
MicroAmp® 96-Well Support Base	Thermo Fisher Scientific Inc, Langesbold
MicroAmp® Adhesive Film Applicator	Thermo Fisher Scientific Inc, Langesbold
MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (0,1 ml)	Applied Biosystems®/ Life Technologies GmbH, Darmstadt
Mikro Schraubröhre (2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Nitra-Tex® (Größe S)	Ansell GmbH, München
PCR-Reaktionsgefäße (Finnzymes 0,1 ml)	Thermo Fisher Scientific Inc, Langesbold
SafeSeal Tips Professional (10 µl, 100 µl, 200 µl, 300µl, 1000 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Olden- dorf
Save seal Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Syringe Filters Millex-GV (0.22 µm, PVDF, 33 mm)	Merck KGaA, Darmstadt
Thermo Scientific™ 96-Well Microplate Lid	Thermo Fisher Scientific Inc, Langesbold
Thermo Scientific™ Microtiter™ 96-Well Mikrotiterplatten (Flat, U shaped, V shaped)	Thermo Fisher Scientific Inc, Langesbold
Thermo Scientific™ Oxoid™ Antibiotika- Testblättchen für Tobramycin	Thermo Fisher Scientific Inc, Langesbold

2.1.2 Geräte

Anaerobier-Topf	Merck KGaA, Darmstadt
Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer	Thermo Fisher Scientific Inc, Langesbold
Bench (Clean Air Thermo Scientific)	Thermo Fisher Scientific Inc, Langesbold
Brutschrank Heraeus 30 °C/ 37 °C	Heraeus Holding GmbH, Hanau
CO ₂ - Brutschrank Thermus Electron Forma™ scientific	Heraeus Holding GmbH, Hanau
CONSORT Microcomputer Electrophore- sis Power Supply E865	Consort bvba, Turnhout, Belgien

CONSORT Microcomputer Electrophoresis Power Supply E455	Consort bvba, Turnhout, Belgien
Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Erlenmeyerkolben (100 ml)	VWR International GmbH, Darmstadt
Fragmentcollector FCW 200	Transgenomic, Omaha, NE, USA
FVL 2400 Combi-Spin (Mini-Zentrifuge)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gefrierschrank -20 °C Bosch	Robert Bosch GmbH, Gerlingen- Schillerhöhe
Gefrierschränke: -80 °C Heraeus, -150 °C	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Gene Amp® PCR System 9700	Applied Biosystems®/ Life Technologies GmbH, Darmstadt
Heidolph Polymax 1040 Plattformschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Jumo tron Heizblock	JUMO GmbH & Co. KG, Fulda
Kühlschrank	Robert Bosch GmbH, Gerlingen- Schillerhöhe
Laminar Flow- PCR-Werkbank AirClean 600	STARLAB GmbH, Hamburg
Maxwell® 16 MDx Research Instrument	Promega GmbH, Mannheim
Metallspatel zum Abwiegen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Mikrowelle	Sharp Electronics GmbH, Hamburg
Molecular Imager ® Gel Doc™ XR	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Nano Drop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc, Langesbold
Perfect Spin P Peqlab Plattenzentrifuge	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
PerfectSpin 24 Zentrifuge bis 13300 RPM	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pico Cycler (Fa. Finnzymes)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Pipetboy Integra Biosciences	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Pipetten Biohit Mechanical Pipettors (1-3 µl; 10 µl; 20 µl; 100 µl; 200 µl; 1000 µl)	Biohit Gruppe, Helsinki, Finnland
Säule, DNA sept HT Cartige	Transgenomic, Omaha, NE, USA
Savant Speedvag SC210A	ThermoQuest, Egelsbach
Standzylinder (500 ml)	VWR International GmbH, Darmstadt
StepOnePlus™ System (Realtime PCR)	Applied Biosystems®/ Life Technologies GmbH, Darmstadt
Sterile Schere	Paul Hartmann AG; Heidenheim
Unitron Schüttler	Infors GmbH; Einsbach
VITEK® MS Mass spectrometry microbial identification system	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen
Vortex-Genie 2; Scientific Industries	Scientific Industries, Ink., New York, USA
Waage: 770 0 - 120 g; d = 0,0001 g; e = 0,001 g	Kern & Sohn GmbH, Ballingen- Frommern
WAVE-System	Transgenomic, Omaha, NE, USA

2.1.3 Software

DNASTAR Lasergene MegAlign	DNASTAR®, Madison, Wiskonsin, USA
DNASTAR Seqman	DNASTAR®, Madison, Wiskonsin, USA
Image Lab™ Analysis Software	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Mendeley Desktop (Version 1.19)	Mendeley Ltd.
Microsoft® Excel® für Mac (Version 14.7.1)	Microsoft
Microsoft® Word für Mac (Version 16.15)	Microsoft
NCBI BLAST®	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Step One Software v2.1	Applied Biosystems®, Life Technologies
VITEK® MS Database	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen
Wavemaker Version 4.1.44	Transgenomic, Omaha, NE, USA

2.1.4 Nährböden und Kulturmedien

Columbia Agar with sheep blood plus (COLS+)	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
Cystine lactose electrolyte deficient Agar (CLED)	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
Mac Conkey Agar (MacC)	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
Sabouraud Glucose Agar (SAB)	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
Schaedler Agar mit 5 % Schafblut (SCH)	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
Thioglyolat: 15,0 g/l Pepton aus Casein, 5,0 g/l Hefeextrakt, 5,5 g/l, D(+)Glukose; 0,5 g/l L-Cystin, 2,5 g/l Natriumchlorid, 0,5 g/l Natriumthioglyolat, 0,001 g/l Resazurin Natrium, 0,75 g/l Gelling agent, 1 L Aqua dest	Merck KGaA, Darmstadt
Tryptic Soy Broth (TSB): 17,0 g/l Pepton aus Casein, 3,0 g/l Pepton aus Sojamehl, 2,5 g/l Glukose-Monohydrat, 5,0 g/l Natriumchlorid, 2,5 g/l di-Kaliumhydrogenphosphat, 1 L Aqua dest	Merck KGaA, Darmstadt

2.1.5 Chemikalien

„Domann“- Puffer (Stocklösung: 1M Tris/HCl Ph 8,3, 1 M MgCl, 1 M KCl, 10 % Tween 20, Gelatine 10 mg/ml)	Eigene Herstellung
1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen™ by life technologies™ GmbH, Darmstadt
10 x Tris-Borat-Puffer (TBE) 108 g Tris, 55 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,3	Eigene Herstellung
Agarose pulverisiert	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Calciumchlorid zur Analyse EMSURE®	Merck KGaA, Darmstadt
DNA-Marker für PCR-Gel (1 Kb-DNA-Marker: 20 µl Marker (Fa. Gibco), 40 µl 1x-TE-Puffer, 100 µl Ficoll 25 %, 240 µl	Eigene Herstellung

H ₂ O; jeweils 10 µl Marker pro Gel auftragen)	
dNTP-Mix (je 12,5 µl 100 µM Guanin, Adenin, Cytosin, Thymin, mit 95 ml µl Aqua bidest. auffüllen; jeweils 100 µl aliquotieren)	Invitrogen™ by life technologies™ GmbH, Darmstadt
Ethanol, ≥99.8 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH/ Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ficoll 400 (25 %ige Lösung im TE-Puffer)	Amersham Pharmacia Biotech AB, Little Chalfont, UK
Ficoll-Auftragspuffer (0,25 % Bromphenolblau, 25 % Ficoll Type 400)	Amersham Pharmacia Biotech AB, Little Chalfont, UK
Freka® Nol Flächendesinfektionsmittel	Fresenius Medical Care Deutschland GmbH, Bad Homburg
Gelatine	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid zur Analyse EMSURE®	Merck KGaA, Darmstadt
Kristallviolett	Merck KGaA, Darmstadt
Lysostaphin (5 mg/ml 2500 U/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH/ Merck KGaA, Darmstadt
Lysozym	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid zur Analyse EMSURE®	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl ≥ 99,5 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Nuclease-free H ₂ O	QIAGEN GmbH, Hilden
Phusion™ Flash PCR Master Mix (Finnzymes)	Thermo Fisher Scientific Inc, Langesbold
Puffer A (0,1M TEAA pH 7,0)	Transgenomic, Omaha, NE, USA
Puffer B (0,1 M TEAA + 25 % Acetonitril)	Transgenomic, Omaha, NE, USA
Puffer C=D (H ₂ O + 75 % Acetonitril)	Transgenomic, Omaha, NE, USA
qPCR MasterMix	Eurogentec/ Kaneka Corporation, Seraing, Belgien
Sterilium® Händedesinfektionsmittel	Bode Chemie GmbH, Hamburg
Taq Polymerase (5 U/µl)	Thermo Fisher Scientific Inc, Langesbold
TE Buffer pH 8.0 (10 mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0)	Thermo Fisher Scientific Inc, Langesbold
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris 1 M, pH 7,0 RNase-free	Ambion®/ Life Technologies GmbH, Darmstadt
Tris-EDTA-Puffer (TE) (10 mM Tris, 1 mM EDTA)	Eigene Herstellung
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt
Waschpuffer (2 mM CaCl ₂ , 2 mM MgCl ₂ , 500 ml H ₂ O)	Eigene Herstellung

2.1.6 Kits

Anaerokult® A	Merck KGaA, Darmstadt
ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent	Thermo Fisher Scientific Inc, Langesbold
Maxwell Personal Automation Kit	Promega GmbH; Mannheim
QIAamp DNA Investigator Kit	QUIAGEN GmbH, Hilden
QuantiTect SYBR® PCR Kit	QUIAGEN GmbH, Hilden
Staphaurex™ Plus Latex Agglutination Test	Thermo Fisher Scientific Inc, Langesbold
VITEK® MS Accessories/Reagents	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen

2.1.7 Verwendete Sonden und Primer

Primer (Synthese Maßstab 0.01µmol, Reinigung Salt free)	Eurofins MWG operon, Ebersberg
Sonden (DD Probe 5' FAM + 3' TAMRA – 10 nmol, Reinigung RP-HPLC)	Eurogentec/ Kaneka Corporation, Seraing, Belgien
Acinetobacter sp. TaqMan	Gen: 16S rRNA
Acineto-sp-F-Primer (253)	AAC TGG AGG AAG GTG GGG AT
Acineto-sp-R-Primer (254)	AGG AGG TGA TCC AAC CGC A
Acineto-sp-Sonde (255)	CGG TTA CCA CGG TGT GGC C
Bacteroides sp. TaqMan	Gen: 16 S
Bact.sp-F-Primer (14)	GAG AGG AAG GTC CCC CAC
Bact.sp-R-Primer (15)	CGC TAC TTG GCT GGT TCA G
Bact.sp-Sonde (16)	CCA TTG ACC AAT ATT CCT CAC TGC TGC CT
Candida albicans TaqMan	Gen: variable D1/D2 domains of the large subunit (LSU) ribosomal gene
Ca.alb-F-Primer (137)	CTT GGT ATT TTG CAT GTT GCT CTC
Ca.alb-R-Primer (138)	GTC AGA GGC TAT AAC ACA CAG CAG
Ca.alb-Sonde (139)	TTT ACC GGG CCA GCA TCG GTT T
Candida glabrata TaqMan	Gen: variable D1/D2 domains of the large subunit (LSU) ribosomal gene
Ca.gla-F-Primer (191)	GCG CCC CTT GCC TCT C
Ca.gla-R-Primer (192)	CCC AGG GCT ATA ACA CTC TAC ACC
Ca.gla-Sonde (193)	TGG GCT TGG GAC TCT CGC AGC
Candida tropicalis TaqMan	Gen: variable D1/D2 domains of the large subunit (LSU) ribosomal gene
Ca.tro-F-Primer (200)	GCG GTA GGA GAA TTG CGT T
Ca.tro-R-Primer (201)	TCA TTA TGC CAA CAT CCT AGG TAT A
Ca.tro-Sonde (202)	CGC AGT CCT CAG TCT AGG CTG GCA G
Escherichia coli SYBR-Green	Gen: 16S
E.coli.gr-F-Primer(50)	GTT AAT ACC TTT GCT CAT TGA
E.coli.gr-R-Primer (51)	ACC AGG GTA TCT AAT CCT GTT
Fusobacterium TaqMan	Gen: 16S
Fusobac.sp-F-Primer (55)	CGC AGA AGG TGA AAG TCC TGT AT

Fusobac.sp-R-Primer (56)	TGG TCC TCA CTG ATT CAC ACA GA
Fusobac.sp-Sonde (57)	ACT TTG CTC CCA AGT AAC ATG GAA CAC GAG
Klebsiella oxytoca TaqMan	Gen: pelX
Kl.oxy-F-Primer (110)	CCC ACG AGG TAC GCA ACA G
Kl.oxy-R-Primer (111)	CCA GGA TTG AAG TTG TCG GTA AA
Kl.oxy-Sonde (112)	ATC GCC ATC GGC AAT CAT CTG GAC
Klebsiella pneumoniae TaqMan	Gen: phoE
Kl.pne-F-Primer (113)	CCT GGA TCT GAC CCT GCA GTA
Kl.pne-R-Primer (114)	CCG TCG CCG TTC TGT TTC
Kl.pne-Sonde (115)	CAG GGT AAA AAC GAA GGC
Proteus mirabilis SYBR-Green	Gen: ureR
Prot.mirab.gr-F-Primer (251)	GGT GAG ATT TGT ATT AAT GG
Prot.mirab.gr-R-Primer (252)	ATA ATC TGG AAG ATG ACG AG
Pseudomonas aeruginosa TaqMan	Gen: regA
Ps.aer-F-Primer (128)	TGC TGG TGG CAC AGG ACA T
Ps.aer-R-Primer (129)	TTG TTG GTG CAG TTC CTC ATT G
Ps.aer-Sonde (130)	CAG ATG CTT TGC CTC AA
Staphylococcus aureus TaqMan	Gen: femB
St.aur-F-Primer (131)	AAT TAA CGA AAT GGG CAG AAA CA
St.aur-R-Primer (132)	TGC GCA ACA CCC TGA ACT T
St.aur-Sonde (133)	AGA AAT TAA CTG GAT GGT ACG CGC GAA GA
Staphylococcus capitis TaqMan	Gen: 16S rRNA
Staph.cap-F-Primer (245)	ATT CGA AGC AAC GCG AAG
Staph.cap-R-Primer (246)	CCA TGC ACC ACC TGT CAC
Staph.cap-Sonde (247)	CCT CTG ATC CCT CTA GAG ATA
Staphylococcus lugdunensis TaqMan	Gen: 16S rRNA
Staph.lug-F-Primer (248)	GGG TGA GTA ACA CGT GGG
Staph.lug-R-Primer (249)	GCG GTT CCA TCT ATA AGT GA
Staph.lug-Sonde (250)	TCC GGT TTC CCG AAG TTG TC
Streptococcus agalactiae TaqMan	Gen: sip
Strep.aga-F-Primer (224)	TCA GTC GCA AGT GGT CAA GCA
Strep.aga-R-Primer (225)	AAA TCA GCC TTT ACC TCT GAA ACA G
Strep.aga-Sonde (226)	AAG AAA CAG ATA CGA CGT GGA CAG CAC GT
Streptococcus pneumoniae TaqMan	Gen: lytA
Str.pn-F-Primer (134)	ACG CAA TCT AGC AGA TGA AGC
Str.pn-R-Primer (135)	TGT TTG GTT GGT TAT TCG TGC
Str.pn-Sonde (136)	TTT GCC GAA AAC GCT TGA TAC AGG G
Streptococcus pyogenes TaqMan	Gen: Spy1258
Strep.pyo-F-Primer (227)	CAA AAA TGA CAC TCT GGA TGA TTT G
Strep.pyo-R-Primer (228)	GGA CAA GGT TTG ATT GAG GAC TTG
Strep.pyo-Sonde (229)	CCG TTT GTT AAA TCA GGC TGA AAT CTA CAC AGA C
Primer 933F	GCA CAA GCG GTG GAG CAT GTG G
Primer 1407R	GAC GGG CGG TGT GTA CAA G

2.2 Methoden

2.2.1 Probengewinnung und Patientenkollektiv

Sterile Abstrichtupfer werden sowohl oberflächlich über die Wunden an Füßen und Unterschenkeln von DFS-Patienten gestrichen als auch in die Tiefe der Läsionen eingeführt. Für jedes einzelne Ulcus wird ein separater Abstrich verwendet. Anschließend werden die Tupfer jeweils in einen Milliliter NaCl (85 %) getunkt und in der Flüssigkeit ausgedrückt. 500 µl des so beimpften NaCl werden in ein neues Eppendorfgefäß überführt und stehen als Ausgangsmaterial für die Experimente zur Verfügung.

Für die Durchführung der vorliegenden Arbeit wurde Material verwendet, das im Rahmen der medizinischen, mikrobiologischen Routineversorgung zu diagnostischen Zwecken gewonnen wurde (Abstriche). Nach der durch die behandelnden Ärztinnen/ Ärzte angeforderten mikrobiologischen Routinediagnostik („Standard“) mit zeitnahe Übermittlung der Ergebnisse wurden die projektbezogenen Untersuchungen („Erweiterung des Standards zur verbesserten Diagnostik“) durchgeführt, wobei nur die nach der Routinediagnostik übrig gebliebenen Restmengen („Restmaterial“) verwendet wurden. Eine zusätzliche Belastung der Patienten entstand dadurch nicht. Bei keinem Patienten wurden Proben für eine rein projektbezogene Untersuchung entnommen. Alle Proben wurden nach Abschluss der Untersuchungen sachgemäß vernichtet (autoklaviert) und entsorgt. Bei den Untersuchungen handelte es sich um Maßnahmen zur qualitativen Verbesserung der mikrobiologischen Diagnostik bei Diabetischem Fußsyndrom, die im Rahmen des vom BMBF geförderten Drittmittelprojektes „Metagenomik und Wirt-Erreger-Interaktomik bei diabetischen Fußinfektionen“ durchgeführt wurden. Die Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin hat ein Ethik-Votum erteilt (Az. 96/11).

2.2.2 Kultivierung

Die weitere Verarbeitung des Probenmaterials findet unter der Sterilbank statt. Hier wird je Probe ein TSB-Röhrchen mit 50 µl und ein Thioglycollat-Röhrchen mit einigen µl (ca. 1 cm Flüssigkeitssäule in der Pipettenspitze einer 2 ml Pipette) der NaCl-Lösung versetzt. Die restliche NaCl-Lösung wird im Laborgefrierschrank bei -20 °C aufbewahrt.



Abbildung 2 Ausgangsmaterial Abstrichtupfer

Die so beimpften TSB- und Thioglycollat-Röhrchen werden über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag können verschiedene Agarplatten (jew. ein COLS-, MAC3-, und SAB-Nährboden) mit den TSB-Übernachtskulturen beimpft werden, die wiederum über Nacht bei 37 °C in einem CO₂-Brutschrank gelagert werden. Die SAB-Platten verbleiben für mindestens 2 Nächte dort. Sind schwärmende Bakterien angewachsen, so werden die zugehörigen TSB-Flüssigkulturen zusätzlich noch einmal auf CLED-Platten ausgestrichen. Auf diese Weise wird eine Separierung der einzelnen Kolonien ermöglicht. Von den Thioglycollat-Übernachtskulturen werden nur deutlich trübe oder durchwachsene Röhrchen für das Beimpfen von SCH-Nährbodenplatten verwendet. Die Nährbodenplatten werden zusätzlich im Bereich des dichtesten Ausstriches mit einem Tobramycinplättchen versehen. So präpariert werden sie eine Woche lang bei 37 °C in einem Anaerobier-Topf zusammen mit dem Anaerokult® A-Kit inkubiert. Ergeben sich bei den gewachsenen Organismen Unterschiede in Form, Farbe, Schwärmverhalten, Hämolyse etc., müssen zunächst Reinkulturen auf geeigneten Nähragarn angelegt werden, bevor eine genauere Identifikation vorgenommen werden kann.

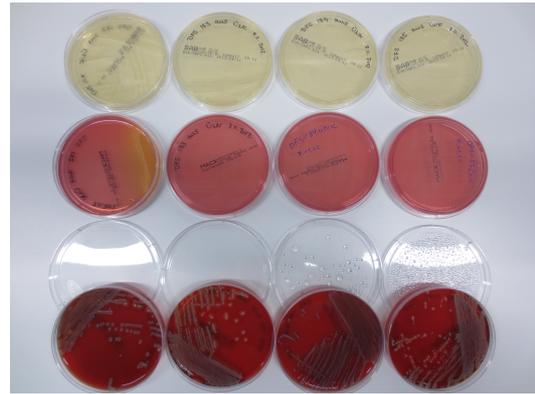


Abbildung 3 Inkubierte Agarplatten

2.2.3 Koagulase Test

Drängte sich auf Grund des Hämolyseverhaltens, der Form, Farbe und des Geruchs der Verdacht auf, es handle sich bei den gewachsenen Kolonien um einen *Staphylococcus aureus* Stamm, so wird der Staphaurex™ Plus Latex Agglutinations Test zum Nachweis des Clumping-Faktors durchgeführt.

Bilden sich bei diesem Prozess kleine Verklumpungen, fällt der Test positiv aus und die Kolonie gilt als *Staphylococcus aureus*.

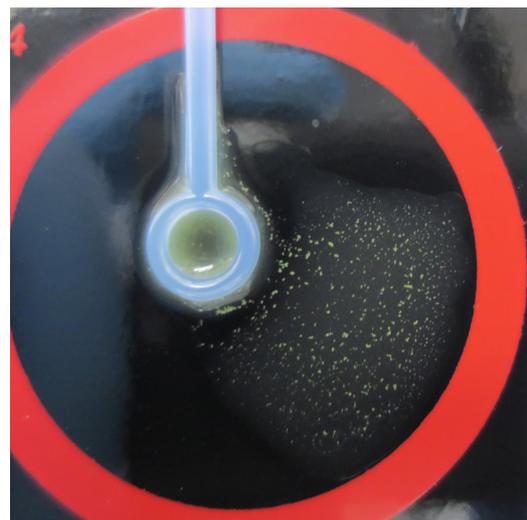


Abbildung 4 Positiver Agglutinationstest

2.2.4 MALDI-TOF (Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung Time-of-Flight)

Alle isolierten Reinkulturen wurden mit dem VITEK® MS Mass spectrometry microbial identification system der Firma bioMérieux untersucht.

Zunächst wird eine repräsentative Bakterienkolonie mit einer Impföse direkt dünn auf ein Target (z. B. VITEK® MS Target) aufgetragen. Die verstrichene Kolonie wird mit einer lichtstabilen Matrixlösung benetzt (z. B. VITEK® MS CHCA (Alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid)), die kurz an der Luft auskristallisieren muss. Zur Identifikation von Pilzen wird vor der Matrix noch Ameisensäure (z. B. VITEK® MS FA (Formic acid)) aufgetragen. Das so beladene Target kann dann in das Gerät eingesetzt werden, wo zwei Prozesse nacheinander zur Identifikation der Organismen ablaufen. Zuerst wird ein kleiner Teil der Probe (meist von 0.05 – 0.2 mm Durchmesser) mit einem gepulsten Laser-

Strahl beschossen (meist ein Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337 nm). Die Matrix absorbiert die Energie des Lasers und erhitzt sich sehr schnell, was in der sogenannten Desorption gipfelt. Dieser Begriff beschreibt das Aufbrechen der Matrixstruktur und der darin eingebetteten Proteine, die als heiße Gase ionisiert und vom Target weggeschleudert werden. Die Ionen werden in einem elektrischen Feld in Richtung einer Vakuum-Röhre beschleunigt, an deren Ende sich ein Ionen-Detektor befindet. Hier werden die Ionen anhand ihrer Flugzeit analysiert, die maßgeblich von der Masse und der Ladung der beschleunigten Teilchen abhängig ist. Es entsteht ein individuelles MALDI-Spektrum, das mit einer Datenbank im System abgeglichen wird, in der repräsentative Spektren für verschiedene Bakterien abgespeichert sind. Dieser Vorgang wird für jede Probe wiederholt, sodass immer eine Kontrolle zur Verfügung steht. Den einzelnen Messergebnissen wird ein Konfidenzwert zugeordnet. Resultate mit Konfidenzwerten unter 90 % oder Proben, denen mehrere mögliche Keime zugeordnet werden, müssen

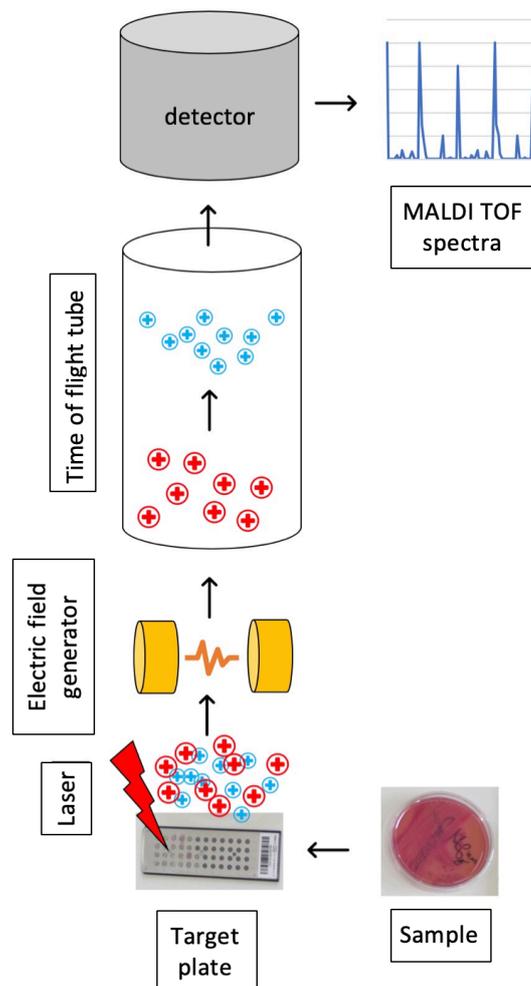


Abbildung 5 Prinzip MALDI TOF

als unsicher betrachtet und erneut für die Analyse mit dem VITEK® MS Mass spectrometry microbial identification system präpariert werden. Bleibt auch der zweite Durchlauf ohne akzeptables Ergebnis wird die Probe zur Identifikation sequenziert (Murugaiyan & Roesler, 2017).

2.2.5 Sequenzierung

Um geeignetes Material für die Sequenzierung zu gewinnen, werden die entsprechenden Bakterien als Reinkultur auf frischen Agarplatten angezchtet.

2.2.5.1 DNA Isolation mit dem Maxwell® 16 MDx Aufreinigungssystem

Mit dem Maxwell® 16 MDx Aufreinigungssystem kann aus diesen Bakterien DNA isoliert werden. Hierzu wird das Maxwell Personal Automation Kit der Firma Promega verwendet. Das Rack des Maxwell® 16 MDx Gerätes wird mit maximal 16 Kartuschen und entsprechend vielen Elutiontubes versehen. In das erste Fach der vorgefertigten Kartuschen wird mit einer 10 µl Impföse eine Bakterienkolonie gegeben. Das hinterste Fach der Kartuschen wird jeweils mit einem Stößel bestückt. In jedes der Elutiontubes werden 50 µl nukleasefreies Wasser hinein pipettiert. Nachdem das Rack entsprechend präpariert wurde, kann es wieder in das Gerät eingesetzt werden, an dem nun das Programm „DNA“ ausgewählt wird. Es folgt eine Aneinanderreihung verschiedener Schritte, in denen das Ausgangsmaterial mechanisch zerkleinert, lysiert und mehrfach gewaschen wird, bis die extrahierte DNA schließlich in den Elutiontubes zur weiteren Verarbeitung bereitsteht.

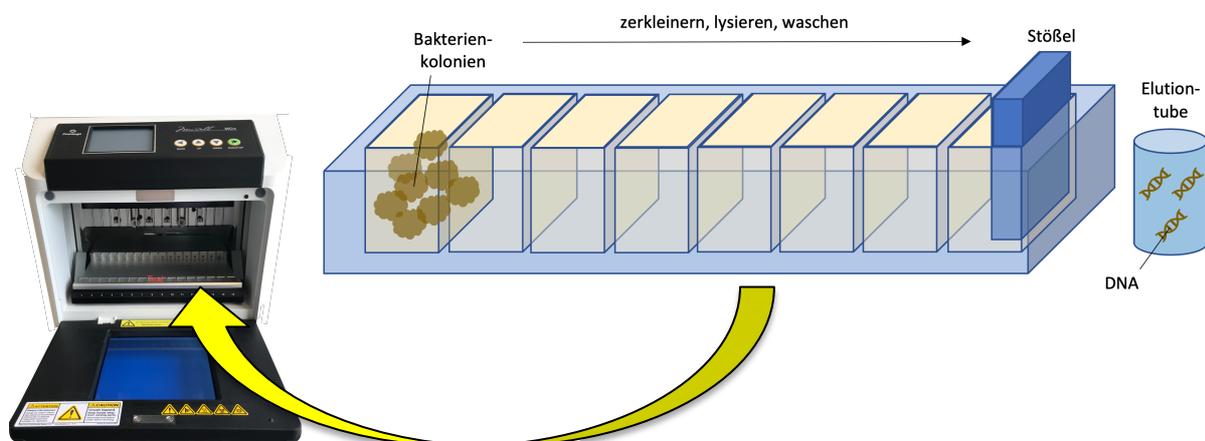


Abbildung 6 Maxwell® MDx Aufreinigungssystem

2.2.5.2 DNA-Amplifikation mit der Pico-Cycler-PCR (933R, 1407F)

Damit für die Sequenzierung ausreichend Material zur Verfügung steht, wird die extrahierte DNA mit dem Piko[®] Thermal Cycler vervielfältigt. Mit diesem System können auch kleinste Mengen DNA zuverlässig und zeitökonomisch amplifiziert werden. Der Ansatz für 20 µl setzt sich folgendermaßen zusammen:

- 21,5 µl nukleasefreies H₂O
 - 25 µl Phusion Mix
 - 0,25 µl Primer 933 (100 pmol)
 - 0,25 µl Primer 1407 (100 pmol)
- } mal der Anzahl der zu verarbeitenden Proben (inkl. Positiv- und Negativ-Kontrolle)

Da von jeder Probe mindestens 100 µl des PCR-Produktes benötigt werden, das Gerät aber lediglich für 50 µl Reaktionsgefäße ausgelegt ist, müssen pro DFS-Probe zwei Ansätze verarbeitet werden. Anschließend werden entsprechend der Anzahl der Proben plus Positiv- und Negativ-Kontrolle jeweils 47 µl des Mastermix und 3 µl der entsprechenden DNA Probe in ein 0,1 ml PCR-Reaktionsgefäß pipettiert. Für die Negativ-Kontrolle werden 3 µl des nukleasefreien Wassers benutzt. Bevor ein PCR-Lauf gestartet werden kann, müssen folgende Einstellungen vorgenommen werden:

- PCR-Programm:
 - Denaturierung: 98,0 °C für 0:10 min
 - Denaturierung: 98,0 °C für 0:01 min
 - Annealing: 60,0 °C für 0:05 min
 - Elongation: 72,0 °C für 0:10 min
 - Elongation: 72,0 °C für 1:00 min
 - Kühlung: 4,0 °C

} 30 Zyklen
- Das Programm „PRO3STE“ wird ausgewählt
- Das Gerät wird auf die Verwendung von Tubes programmiert
- Für das Gesamtvolumen eines einzelnen Reaktionsgefäßes werden 50 µl angegeben

Die Tubes werden in dem dafür vorgesehenen Rack des Gerätes platziert, die Schublade geschlossen und das Programm gestartet. Im Anschluss können die doppelten PCR-Produkte zusammen pipettiert werden. Bis zur Weiterverarbeitung werden die Proben bei -80 °C gelagert.

2.2.5.3 ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Kit

Da überschüssige Bestandteile des PCR-Ansatzes die Proben verunreinigen und die Sequenzierung somit beeinflussen würden, müssen die Proben mit Hilfe des ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Kits gereinigt werden. Dazu werden jeweils 5 µl eines zur Sequenzierung bestimmten PCR Produktes mit 2 µl ExoSAP-IT gemischt. Innerhalb einer 15-minütigen Inkubationszeit bei 37 °C auf einem Heizblock werden verbliebene Primer und Nucleotide degradiert. Um das ExoSAP-IT zu inaktivieren werden die Proben weitere 15 Minuten bei 80 °C auf dem Heizblock belassen.

2.2.5.4 16s-RNA-Sequenzierung

Die fertig aufgereinigten PCR-Produkte werden extern am Institut für Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen weiterverarbeitet und mit dem Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer sequenziert. Die DNA-Sequenzen wurden der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

2.2.5.5 Blast mit DNA-Star

Die aufgeschlüsselten Sequenzen werden mit dem Programm DNASTAR Seqman SeqMan visualisiert und können so mit der Datenbank „Nucleotide collection (nr/nt)“ von NCBI abgeglichen werden. Auf der entsprechenden Website [„http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi“](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) wird die Option „Basic BLAST nucleotide blast“ aufgerufen und jeder Suchlauf für „Highly similar sequences (megablast)“ optimiert.

2.2.6 Real-Time-PCR

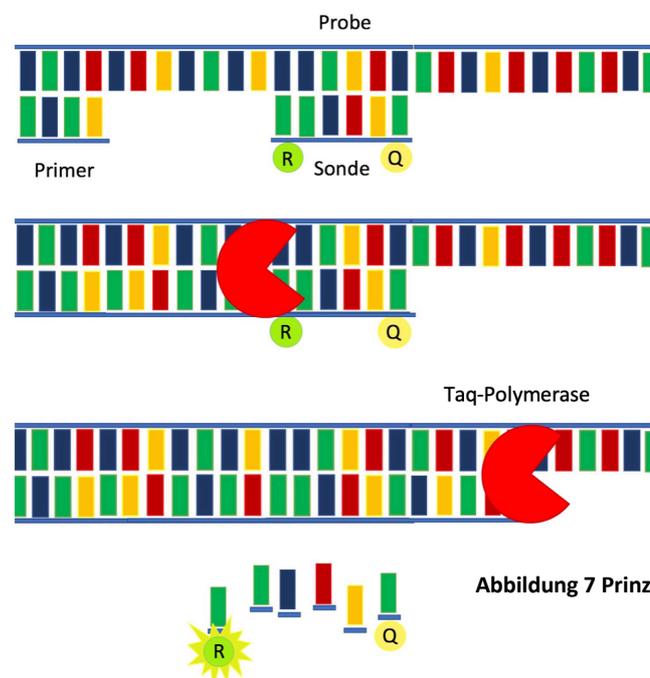
Mit Hilfe der Real-Time-PCR ist es möglich zu überprüfen, ob die DNA bestimmter Bakterien in den zuvor aus den Abstrichtupfern isolierten Nukleinsäureproben vorhanden ist, und zusätzlich Angaben zur Quantität zu machen. Am Anfang steht die Amplifikation der Ausgangs-DNA, die sich in drei Grundschritte untergliedern lässt:

- Denaturierung: Die Doppelstrang-DNA wird bei Temperaturen > 90 °C in zwei Einzelstränge aufgetrennt
- Annealing: Die Primer lagern sich bei 50 - 60 °C an ihre Zielsequenzen an
- Elongation: Die DNA-Polymerase produziert bei 70 - 78 °C den Gegenstrang, indem sie die Primer in 5'-3' Richtung verlängert

Je nach verwendeten Primern und Polymerase sind für die einzelnen Schritte unterschiedliche Temperaturen notwendig, die individuell angepasst und eingestellt werden müssen. Die Temperatur, die Länge der einzelnen Zyklusphasen und die Anzahl der Zyklen wird durch einen programmierbaren Thermocycler gesteuert.

Die Real-Time-PCR kombiniert den Schritt der DNA-Amplifikation mit dem gleichzeitigen visuellen Nachweis entstandener PCR-Produkte. Dieser Nachweis beruht auf einer Fluoreszenz-Messung, für die neben spezifischen Primern auch individuelle Sonden und eine besondere Polymerase benötigt werden. Die in unserer Versuchsreihe genutzten TaqMan-Sonden basieren auf dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET). Ein Donor-Fluorophore/ Reporter (6-Carboxy-Fluorescein (FAM)) am 5'-Terminus der TaqMan-Sonde gibt Laser-induzierte Exzitations-Energie an einen Akzeptor-Fluorophore/ Quencher (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamine (TAMRA)) ab, der nur einige Basen entfernt in Richtung 3'-Ende der Sonde lokalisiert ist. Während des Annealing-Schritts lagert sich die Sonde hinter dem Primer des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts an. Im Zuge der Elongation wird die Sonde aufgrund der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der verwendeten Taq-Polymerase hydrolysiert, was dazu führt, dass der Abstand zwischen Reporter und Quencher zunimmt. Die Fluoreszenz des Reporters wird nicht mehr durch den Quencher unterdrückt und nimmt mit jedem Zyklus proportional zur Menge der vervielfältigten DNA zu. Die Verwendung von SYBR-Green kommt ohne spezifische Sonden aus. Bei diesem Verfahren lagert sich SYBR-Green an doppelsträngige DNA, wodurch blaues Licht absorbiert und grünes Licht emittiert wird.

Neben der Visualisierung in Echtzeit ermöglicht die Real-Time-PCR auch die Quantifizierung der gewonnenen DNA-Fragmente. Die Quantifizierung ist in der sogenannten exponentiellen Phase einer PCR möglich (Mackay, 2002). Der Beginn der exponentiellen Phase wird durch den threshold cycle (C_T) eingeläutet, was bedeutet, dass die Zunahme der Fluoreszenz 10 Standardabweichungen der Ausgangsfluoreszenz übersteigt (Jung & Soondrum, 2000). Zwischen dem C_T und dem Logarithmus der Ausgangsmenge an DNA besteht eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung. Mit Hilfe einer zuvor ermittelten Standard-Kurve, kann diese Ausgangsmenge berechnet werden (Mackay, 2004).



2.2.6.1 Nukleinsäureextraktion aus Abstrichtupfern

Zur DNA-Extraktion aus den Abstrichtupfern wird das QIAamp DNA Investigator Kit angewendet. Zuvor müssen die Abstrichtupfer mit verschiedenen Enzymen vorbehandelt werden. Zu diesem Zweck werden die Tupfer jeweils in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, sodass der Schaft oberhalb des wattierten Endes abgeschnitten werden kann. Zu kleinen Tupfern werden 170 µl Lysozym (50 mg/ml, gelöst in TE-Puffer und steril filtriert) sowie 10 µl Lysostaphin hinzugegeben und mit dem VORTEX-Mixer für 10 Sekunden vermengt. Zur Verarbeitung großer Tupfer müssen die entsprechenden Mengen auf 260 µl bzw. 20 µl erhöht werden. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit in einem Thermomixer bei 400 rpm kann mit der Anwendung des Investigator Kits begonnen werden:

- 200 µl Puffer ATL (bzw. 300 µl bei dicken Tupfern) + 20 µl Proteinase K
- Inkubation für 60 min bei 56 °C auf dem Thermomixer bei 900 rpm
- 400 µl Puffer AL (bzw. 600 µl bei dicken Tupfern)
- Inkubation für 10 min bei 70 °C in dem Thermomixer
- 200 µl 96 % Ethanol (bzw. 300 µl für dicke Tupfer)

Von dem gewonnenen Lysat werden jeweils 700 µl auf die QIAamp MinElute column pipettiert und für eine Minute bei 8.000 rpm und anschließend für weitere zwei Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Für die folgenden Schritte werden die Säulen immer wieder in neue Collection Tubes überführt.

- 500 µl Waschpuffer AW1
- Zentrifugation für eine Minute bei 8.000 rpm
- 700 µl Waschpuffer AW2
- Zentrifugation für eine Minute bei 8.000 rpm
- 700 µl 96 % Ethanol
- Zentrifugation für eine Minute bei 8.000 rpm, dann für drei Minuten bei 13.000 rpm

Im Anschluss konnten die Säulen jeweils in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert werden. Mit geöffnetem Deckel wurden die so präparierten Säulen für 3 Minuten bei 56 °C auf einem Heizblock getrocknet. Durch Zugabe von 50 µl nukleasefreiem Wasser werden die zuvor durch Ethanol fixierten Nukleinsäuren von der Membran gelöst. Nach 5-minütiger Einwirkzeit bei Raumtemperatur werden die Säulen eine Minute lang bei 13.000 rpm zentrifugiert, sodass die im Wasser gelösten Nukleinsäuren im Reaktionsgefäß aufgefangen werden können.

2.2.6.2 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen via Nanodrop

Die Konzentration der extrahierten Nukleinsäuren wurde mit dem Thermo Scientific NanoDrop 1000 Spectrophotometer und der zugehörigen Software ND1000 bestimmt. Die Messung der Baseline wird mit nukleasefreiem Wasser durchgeführt, und das Ergebnis als Nullwert festgelegt. Die darauffolgenden Messungen werden jeweils mit 1,6 µl der Proben durchgeführt. Nachdem alle Konzentrationen bestimmt wurden, werden die extrahierten Nukleinsäuren bei -20 °C zwischengelagert.

2.2.6.3 Real-Time-PCR-Ansatz

Alle verwendeten Oligonukleotide werden von der Firma Eurofins MWG operon (Ebersberg) mit einem Synthesemaßstab von 0.01 µmol entsalzt und lyophilisiert bezogen. Die Double Dye Probes (DD Probe 5' FAM + 3' TAMRA) stammen von der Firma Eurogentec mit einem Synthesemaßstab von 0.01 µmol RP-DHPLC gereinigt. Die Primer und Sonden werden jeweils in nukleasefreiem Wasser mit einer resultierenden Konzentration von 100 pmol/µl gelöst. Dieser Ansatz wird mit nukleasefreiem Wasser weiter zu einer Gebrauchslösung (10 pmol/µl) verdünnt. Die Primer-Stocklösung [100 pmol/µl] und die verdünnte Gebrauchslösung der Oligonukleotide [10 pmol/µl] werden bei -20 °C gelagert.

Je Real-Time-PCR-Suchlauf mit dem StepOnePlus™ System können maximal 94 Proben plus Negativ- und Positivkontrolle quantifiziert werden. Entsprechend wird der Mastermix für 100 Proben je 20 µl angesetzt:

- TaqMan PCR
 - 550 µl nukleasefreies Wasser
 - 75 µl individueller Primer Forward [10 pmol/µl]
 - 75 µl individueller Primer Reverse [10 pmol/µl]
 - 50 µl individuelle Sonde Probe [10 pmol/µl]
 - 1250 µl Eurogentec Master Mix 2x
- Real-Time-PCR (SYBR-Green)
 - 600 µl nukleasefreies Wasser
 - 75 µl individueller Primer Forward [10 pmol/µl]
 - 75 µl individueller Primer Reverse [10 pmol/µl]
 - 1250 µl QuantiTect SYBR Green Mix

Beim Pipettieren war darauf zu achten, dass alle Reagenzien auf Eis gelagert und schnellstmöglich wieder eingefroren wurden. Die empfindlichen Sonden und die Mastermixe wurden zusätzlich durch Aluminiumfolie vor unnötigem Lichteinfall geschützt.

2.2.6.4 Real-Time-PCR-Suchläufe

Für jeden Suchlauf wird eine spezielle Fast Thermal Cycling Plate mit jeweils 20 µl des vorbereiteten Mastermix und zusätzlich 5 µl Template der zu untersuchenden DNA-Probe (bzw. der Positiv- und Negativkontrolle) pro Vertiefung präpariert. Um das Verschleppen von Fluoreszenz in das Real-Time-PCR-Gerät zu vermeiden, darf die 96-Well-Platte nur auf der dafür vorgesehenen Micro-Amp® 96-Well Support Base unter der PCR-Hood gelagert werden. Die vollständig bestückte PCR-Platte wird mit einer PCR-Folie versiegelt. Um Luftblasen, die durch das Resuspendieren der DNA-Templates entstehen, und das Signal im Real-Time-PCR-Gerät verfälschen könnten, zu eliminieren, werden die Platten kurz in einer Plattenzentrifuge herunterzentrifugiert. Am StepOnePlus™ System werden folgende Einstellungen vorgenommen:

Run Method:

- als Reaction Volume per Well: werden 25 µl festgelegt
 - TaqMan:
 - 50,0 °C für 2:00 min
 - 95,0 °C für 10:00 min
 - 95,0 °C für 0:15 min
 - x °C für 1:00 min

} 40 Zyklen

→ Annealing Temperatur individuell nach vorheriger Bestimmung mittels Temperaturkurvenverlauf festgelegt

 - SYBR-Green:
 - 95,0 °C für 10:00 min
 - 95,0 °C für 0:15 min
 - x °C für 0:30 min
 - 72 °C für 0:45 min

} 40 Zyklen

→ Annealing Temperatur individuell nach vorheriger Bestimmung mittels Temperaturkurvenverlauf festgelegt

Run	Annealing-Temperatur
<i>Acinetobacter sp.</i> TaqMan	56,0 °C
<i>Bacteroides sp.</i> TaqMan	62,0 °C
<i>Candida albicans</i> TaqMan	58,0 °C
<i>Candida glabrata</i> TaqMan	56,0 °C
<i>Candida tropicalis</i> TaqMan	60,0 °C
<i>Escherichia coli</i> SYBR-Green	55,0 °C
<i>Fusobacterium</i> TaqMan	60,0 °C
<i>Klebsiella oxytoca</i> TaqMan	60,0 °C
<i>Klebsiella pneumoniae</i> TaqMan	56,0 °C
<i>Proteus mirabilis</i> SYBR-Green	54,0 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TaqMan	54,0 °C
<i>Staphylococcus aureus</i> TaqMan	60,0 °C
<i>Staphylococcus capitis</i> TaqMan	54,0 °C
<i>Staphylococcus lugdunensis</i> TaqMan	60,0 °C
<i>Streptococcus agalactiae</i> TaqMan	60,0 °C
<i>Streptococcus pneumoniae</i> TaqMan	60,0 °C
<i>Streptococcus pyogenes</i> TaqMan	60,0 °C

Tabelle 7 Annealing-Temperaturen für die verschiedenen Runs

2.2.6.5 Quantifizierung der per Real-Time-PCR nachgewiesenen Bakterien mittels Standardkurve

Anhand der Genomgröße [n] des zu quantifizierenden Organismus kann die Masse [m] der DNA pro Genom berechnet werden:

$$m = [n] \left[\frac{1 \text{ mole}}{6,023 \cdot 10^{23} \text{ bp}} \right] = [n] \left[\frac{1,096e \cdot 10^{-21} \text{ g}}{\text{bp}} \right]$$

Die Masse des Genoms wird anschließend durch die Kopienzahl des zu detektierenden Gens geteilt.

$$\left[\frac{m}{\text{Kopienzahl}} \right]$$

Als nächstes wird die Masse an DNA berechnet, die einer bestimmten Kopienzahl und damit einer bestimmten Anzahl von Bakterien entspricht.

$$\text{Masse der einzusetzenden DNA} = [\text{gewünschte Kopienzahl}] * [\text{Masse des Genoms}]$$

Die berechnete Masse wird dann durch das Volumen der DNA geteilt, die in jeder PCR-Reaktion eingesetzt wird.

$$\text{Konzentration der einzusetzenden DNA} = \frac{[\text{Masse der DNA}]}{[\text{Volumen der DNA}]}$$

Die genomische DNA des zu quantifizierenden Organismus wird auf die zuvor berechnete Konzentration eingestellt.

Beispielrechnung zur Standardkurve mit *Escherichia coli* (SYBR-Green)

$$m = [4,639 \cdot 10^6 \text{ bp}] \left[\frac{1,096e \cdot 10^{-21} \text{ g}}{\text{bp}} \right] = 5,084 \cdot 10^{-15} \text{ g} = 0,005084 \text{ pg}$$

$$\left[\frac{0,005084 \text{ pg}}{7} \right] = 0,000726 \text{ pg}$$

$$\text{Masse der einzusetzenden DNA} = [10^8] * [0,000726 \text{ pg}] = 72.600 \text{ pg}$$

$$\text{Konzentration der einzusetzenden DNA} = \frac{[72.600 \text{ pg}]}{[5 \mu\text{l}]} = 14.520 \frac{\text{pg}}{\mu\text{l}} = 14,520 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$$

$$\frac{14,520 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}}{764,8 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}} * 100 \mu\text{l} = 1,90 \mu\text{l DNA} + 98,1 \mu\text{l H}_2\text{O}$$

Als nächstes wird eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu werden in fünf Reaktionsgefäße 18 μl Wasser pipettiert. Zu dem ersten Reaktionsgefäß werden 2 μl der berechneten Konzentration hinzugegeben. Nach einem kurzen Durchmischen mit dem Vortex-Mixer, werden 2 μl der Lösung in das nächste Reaktionsgefäß pipettiert usw.

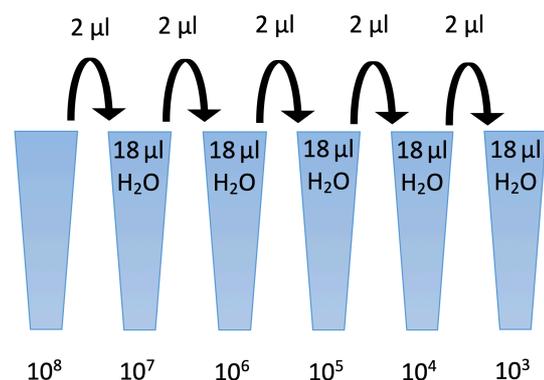


Abbildung 8 Verdünnungsreihe

Für das Erstellen der Standardkurve wird eine spezielle Fast Thermal Cycling Plate mit jeweils 20 μl des vorbereiteten Mastermix und zusätzlich 5 μl Template der zu untersuchenden DNA-Probe (bzw. der Negativkontrolle) pro Vertiefung präpariert.

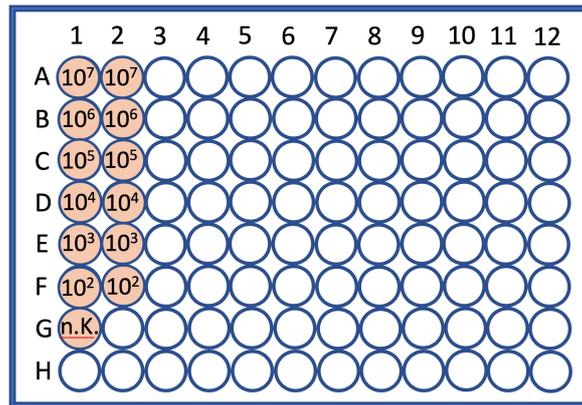


Abbildung 9 Anordnung für Standardkurven-Lauf

Am StepOnePlus™ System werden folgende Einstellungen vorgenommen:

Run Method:

- als Reaction Volume Per Well: werden **25 μl** festgelegt
 - TaqMan:
 - 50,0 °C für 2:00 min
 - 95,0 °C für 10:00 min
 - 95,0 °C für 0:15 min
 - x °C für 1:00 min
 } 40 Zyklen
 → Annealing Temperatur individuell nach vorheriger Bestimmung mittels Temperaturkurvenverlauf festgelegt
 - SYBR-Green:
 - 95,0 °C für 10:00 min
 - 95,0 °C für 0:15 min
 - x °C für 0:30 min
 - 72 °C für 0:45 min
 } 40 Zyklen
 → Annealing Temperatur individuell nach vorheriger Bestimmung mittels Temperaturkurvenverlauf festgelegt
 (z. B. für *Escherichia coli* 55,0 °C)

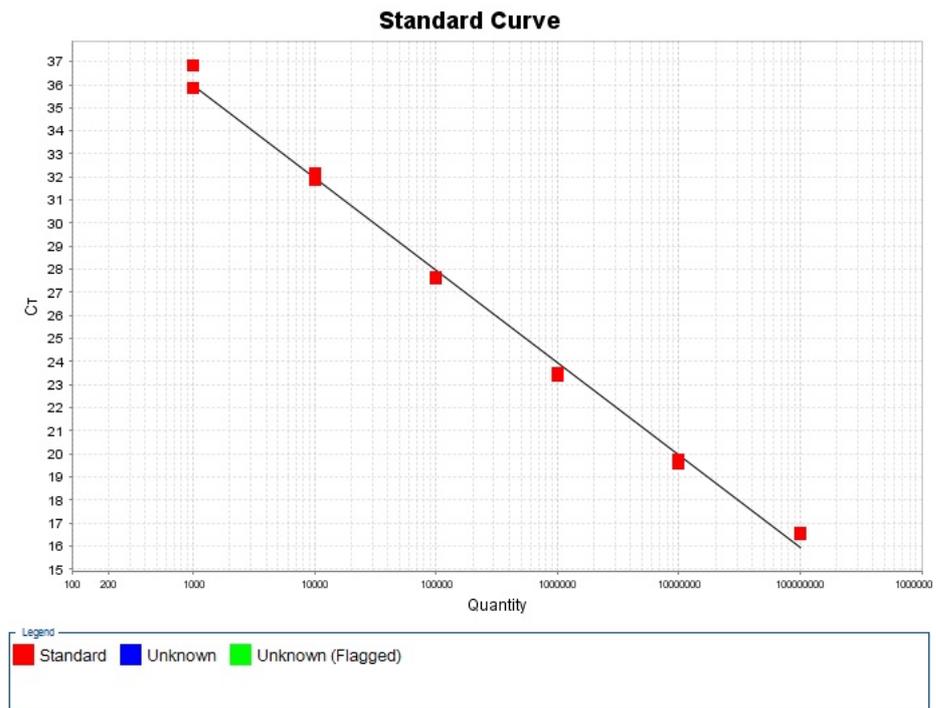


Abbildung 10 Standardkurve mit *Escherichia coli* für SYBR-Green

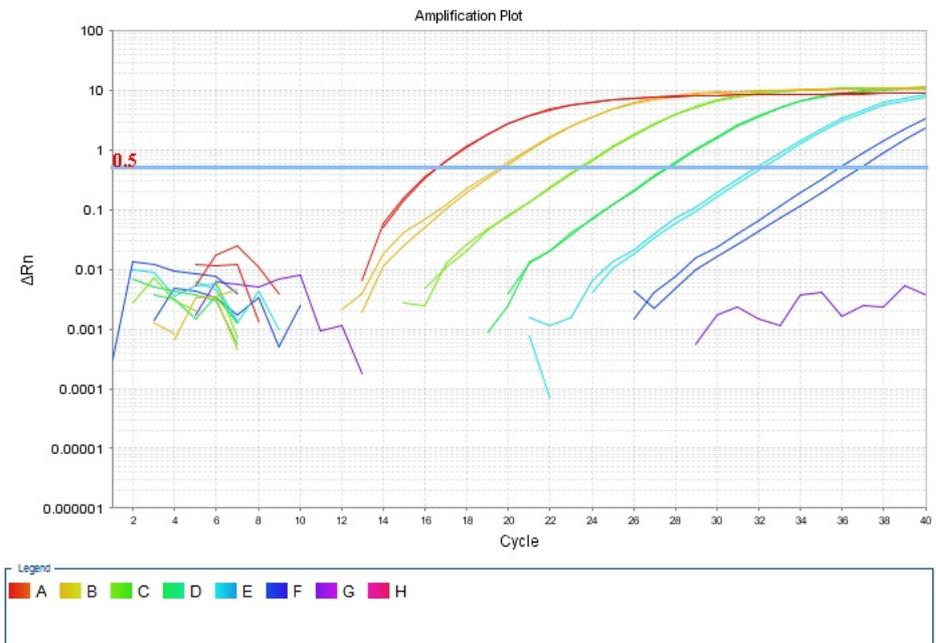


Abbildung 11 Amplification Plot für die Standardkurve mit *Escherichia coli* für SYBR-Green

2.2.7 DHPLC-WAVE®-System

Im Gegensatz zur Real-Time-PCR, bei der nur Organismen gefunden werden können, wenn konkret nach ihnen gesucht wird, ist es mit Hilfe des DHPLC-WAVE®-Systems möglich, auch unbekannte DNA-Fragmente zu detektieren und für die anschließenden PCR- und Sequenzierungsprozesse zu selektieren. Die Separation der DNA-Fragmente findet im DNASep®-Modul des WAVE®-Systems statt, wo die stationäre Phase in Form von PS-DVB-Säulen (Poly-Styrol-Divinylbenzol-Copolymer-Säulen) lokalisiert ist. Die aus den einzelnen DFS-Proben isolierten DNA-Fragmente werden durch die Auto-sampler-Untereinheit des WAVE®-Systems in eine Pufferlösung (Puffer A (0,1 M TEAA) + Puffer B (0,1 M TEAA + 25 % Acetonitril)) injiziert und unter Verwendung einer Pumpe als flüssige Phase durch das System zum DNASep®-Modul transportiert. Die Phosphat-Ionen der DNA-Moleküle sind negativ geladen, während die PS-DVB-Säulen hydrophob und neutral geladen sind. Damit die DNA-Fragmente an die stationäre Phase binden können, wird das Triethylammoniumacetat (TEAA) der Pufferlösungen als „Verbindungsstück“ benötigt. Das positiv geladene Ammonium-Ion des TEAA interagiert mit den negativ geladenen Phosphat-Ionen der DNA-Moleküle. Gleichzeitig bindet die Alkyl-Gruppe des TEAA an die hydrophobe Oberfläche des DNASep®-Moduls. Je länger ein DNA-Fragment ist, desto stärker fällt die Bindung an die stationäre Phase aus. Um diese hydrophobe Interaktion zwischen der stationären Phase und dem TEAA wieder zu lösen, wird das Acetonitril in der mobilen Phase genutzt. Kürzere DNA-Fragmente werden früher aus der Bindung gelöst als lange. Durch das Mischverhältnis der Pufferlösungen A und B und die eingesetzte Temperatur kann dieser Ablösungsprozess beeinflusst werden. Nach der Auftrennung fließen die einzelnen DNA-Fragmente durch das UV-Detektor-System des WAVE®, wo analoge Signale in digitale Werte konvertiert werden, sodass ein Chromatogramm entsteht, in dem jeder Peak für ein korrespondierendes DNA-Fragment steht.

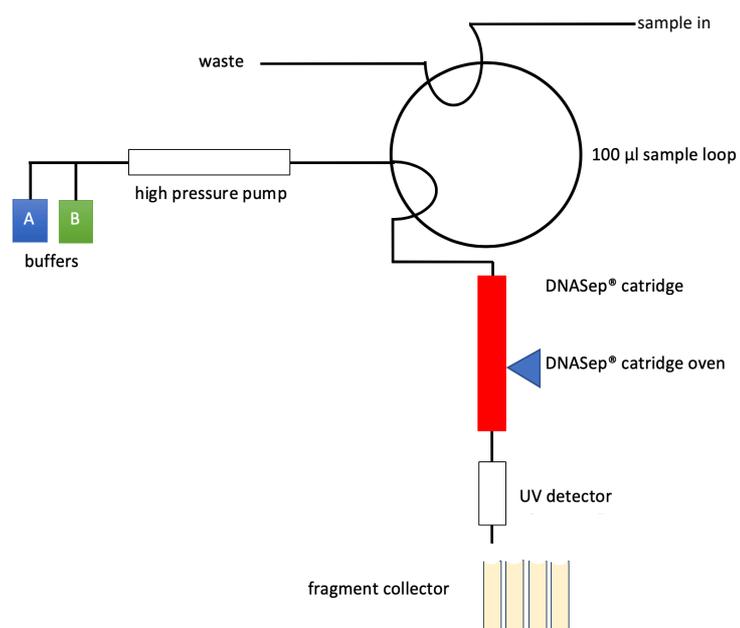


Abbildung 12 Schematischer Aufbau des DHPLC-WAVE®-Systems

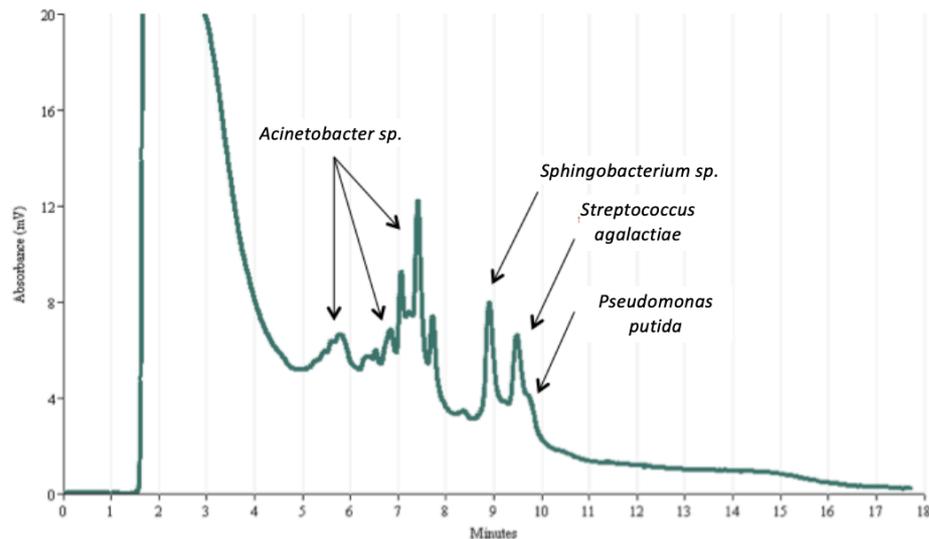


Abbildung 13 DHPLC-Chromatogramm

Vor der Auftrennung der Proben mit dem DHPLC-WAVE®-System wird die aus den Abstrichtupfern isolierte DNA (2.2.4.1 und 2.2.4.2) mit dem Piko Cycler (Thermo Scientific) (2.2.3.4.2.1 und 2.2.3.4.2.2) vervielfältigt.

2.2.7.1 Auftrennung der DFS-Proben mit dem DHPLC-WAVE®-System

Für die Analyse und Separation der einzelnen DNA-Fragmente wurde der etablierten Gradienten „mixed species“ (Tab. 8) mit einer Flussrate von 0,35 ml/min bei einer Temperatur von 62 °C eingesetzt. Der Puffer C (25 % H₂O und 75 % Acetonitril) wurde zur Reinigung der Säulen verwendet (Domann et al., 2003).

Schritt	Zeit (min)	Puffer A (%)	Puffer B (%)	Puffer C (%)
Vorlauf	0,0	46	54	0
Schritt 1 (5,6 min)	0,5	40	60	0
Schritt 2 (5,6 min)	2,5	39	61	0
Schritt 3 (5,6 min)	4,5	38	62	0
Schritt 4 (5,6 min)	8,5	37	63	0
Schritt 5 (5,6 min)	10,5	36	64	0
Start Reinigung	10,6	46	54	0
Stop Reinigung	10,7	46	54	0
Start Equilibrierung	10,8	46	54	0
Stop Equilibrierung	11,6	46	54	0

Tabelle 8 Einstellungen des Gradienten "mixed species"

2.2.7.2 Amplifikation der WAVE-Isolate mittels PCR

Für die Sequenzierung werden nur die Wells eines WAVE-Laufs ausgesucht, die einem Peak im Chromatogramm des Laufs entsprechen. Die enthaltenen DNA-Fragmente werden zunächst mit dem Gene Amp® PCR System 9700 amplifiziert. Der Mastermix wird in unten aufgeführter Reihenfolge in einem 10 ml Grainer angesetzt (die hier genannten Mengen sind ausreichend zur Verarbeitung von 50 Proben (48 Proben plus positiv und negativ Kontrolle)):

- 4015 µl nukleasefreies Wasser
- 500 µl PCR-Puffer („Domann“-Puffer)
- 200 µl dNTP-Mix (mit TTP 1,25mM)
- 10 µl Primer F (933, 100 pMol/µl)
- 10 µl Primer R (1407, 100 pMol/µl)
- 15 µl Tag (5 U/µl)

Pro PCR-Lauf können max. 94 Proben plus Positiv- und Negativ-Kontrolle gleichzeitig amplifiziert werden. Entsprechend dieser Anzahl werden jeweils 95 µl des Mastermix und 5 µl einer WAVE-Probe in eine Vertiefung einer 96-Well-Platte aliquotiert. Für die negativ Kontrolle werden dem Mastermix 5 µl nukleasefreies Wasser hinzugefügt. Die so präparierte 96-Wellplatte wird mit einer geeigneten Thermo-Folie versiegelt und in das Gerät gesetzt. Für das PCR-Programm werden folgende Einstellungen vorgenommen:

- Denaturierung: 94,0 °C für 5:00 min
 - Denaturierung: 94,0 °C für 0:40 min
 - Annealing: 56,0 °C für 0:40 min
 - Elongation: 72,0 °C für 1:00 min
 - Elongation: 72,0 °C für 5:00 min
 - Kühlung: 4,0 °C
- } 35 Zyklen

Die PCR-Produkte werden bei -25 °C gelagert.

2.2.7.3 Agarose-Gelelektrophorese

Bevor die gewonnenen PCR-Produkte weiter für die Sequenzierung aufbereitet werden, wird mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert, ob die PCR erfolgreich war. Dazu werden in die erste Vertiefung des Gels 10 µl eines standardisierten Markers gegeben, und in die weiteren Taschen jeweils 10 µl der PCR Proben mit 5 µl Ficoll Auftragspuffer aliquotiert. Der Lauf wird bei 150 V, 250 mA und einer Stunde Laufzeit gestartet. Nach Ablauf dieser Zeit werden die Banden

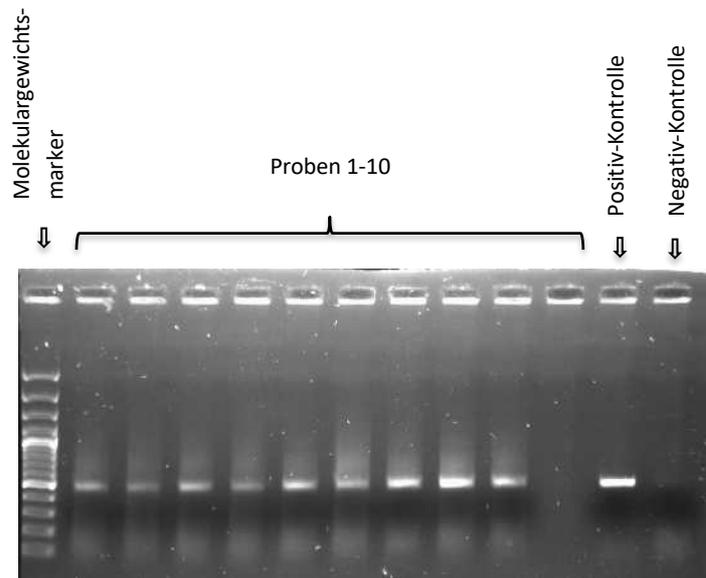


Abbildung 14 Beispielhaftes Foto der Gelelektrophorese von WAVE-PCR-Produkten

unter zu Hilfenahme des Molecular Imager® Gel Doc™ XR fotografiert. Nur die Proben, die eine deutlich sichtbare Bande auf dem Gel hinterlassen, werden für die Sequenzierung ausgewählt und weiterverarbeitet (siehe 2.2.5.3 und 2.2.5.4)

2.2.8 Biofilm

Die identifizierten Stämme werden auf die Fähigkeit der Biofilmbildung hin getestet. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf Vertretern der am häufigsten nachgewiesenen Spezies, dem *Staphylococcus aureus*. Zum Vergleich werden auch 12 andere Stämme, die häufig in diabetischen Fußulcera nachgewiesen werden (z. B. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus epidermidis*) getestet.

2.2.8.1 Vorbereitung der Flüssigkulturen

Es wird jeweils eine Kolonie des zu testenden Stammes mit einer sterilen Öse von einer Reinkulturplatte in 10 ml TSB-Flüssigmedium in einem 100 ml Erlenmeyerkolben überführt, und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm auf dem Unitron Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen werden die Bakterienkulturen jeweils 1:100 in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß verdünnt (10 µl der Übernachtskultur auf 990 µl frische TSB-Lösung). Von jeder Probe werden jeweils drei Vertiefungen von fünf 96-well PS U-Boden-Plates mit 180 µl der verdünnten Bakterienkultur befüllt. Die Platten werden mit einer PCR Folie versiegelt und gestaffelt für 2, 4, 6, 8 und 10 Tage bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.8.2 Anfärben der Biofilme

Nach Beendigung der Inkubationszeit wird das Nährmedium samt Bakterien abpipettiert. Verbliebene Zellreste und Nährmedium werden zweimal mit 200 µl eines Waschpuffers (2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 500 ml H₂O), der in jedes Well hinein und wieder heraus pipettiert wird, entfernt. Die gewaschenen Platten werden auf ausgebreiteten Zellstofftüchern ausgeklopft. Die anhaftenden Biofilme werden mit jeweils 20 µl Crystal Violet in 200 µl Biofilm-Puffer eingefärbt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die Farbe abpipettiert und verworfen. Es folgt ein weiterer Waschschritt mit 200 µl Waschpuffer. Sobald die Platten vollkommen getrocknet sind, wird die Farbe mit jeweils 200 µl 95 %igen Ethanols aus den Biofilmen herausgelöst. Dazu werden die Platten mit einer PCR-Folie abgedeckt, mit Aluminiumfolie eingewickelt und bei 20 rpm am Rand eines Taumlers über Nacht inkubiert.



Abbildung 15 Eingefärbte Biofilme in unterschiedlicher Ausprägung: a) positiv b) negativ

2.2.8.3 Absorbance-Messung

Zur Quantifizierung des gelösten Crystal-Violett werden 125 µl des verfärbten Ethanols aus den Wells in eine neue flat-Bottom-Plate pipettiert. Die Absorption wird mit dem Sunrise-Tekan-Photometer bestimmt. Vor jeder Messung werden folgende Einstellungen im Programm XReadPlus festgelegt:

- Measurement wavelength: 600nm
- Reference wavelength: 405nm
- shaking before measurement
- Duration: 5 sek
- Mode: Outside
- Intensity: Normal
- Settle time: 5 sek

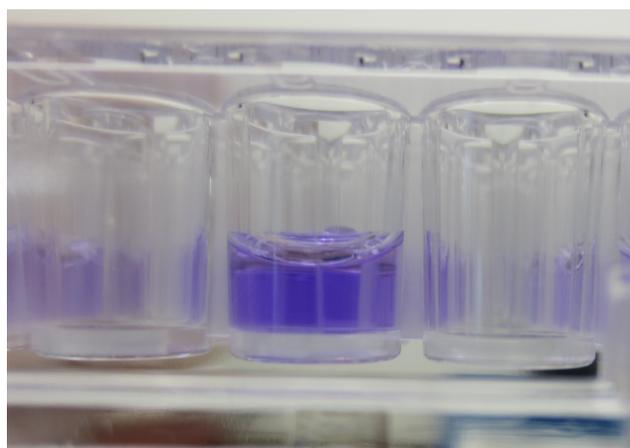


Abbildung 16 Gelöstes Crystal Violet zur Absorbance-Messung

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden Proben von 159 Patienten untersucht (siehe diesbezüglich auch die Ausführungen zum BMBF geförderten Drittmittelprojekt „Metagenomik und Wirt-Erreger-Interaktomik bei diabetischen Fußinfektionen“ und zum Ethik-Votum (Az.96/11) auf Seite 44). Je nachdem, welche Methode angewandt wurde, variierte das eingeschlossene Kollektiv (Tab. 9).

Methode	Geschlechterverteilung	Altersverteilung
Kultur	159 Patienten 108 Männer 51 Frauen	22-91 Jahre, (66 ± 13,7) 41-100 Jahre, (73 ± 13,6)
Real-Time-PCR	94 Patienten 60 Männer 34 Frauen	22-89 Jahre, (66 ± 13,8) 42-92 Jahre, (73 ± 12,5)
DHPLC-WAVE®-System	24 Patienten 18 Männer 6 Frauen	55-82 Jahre, (67 ± 9,2) 42-79 Jahre, (67 ± 13,6)

Tabelle 9 Patientenkollektiv

3.2 Probenkollektiv

Das Probenmaterial stammte von Patienten mit DFIs des Universitätsklinikums Gießen. Die Wundabstriche wurden im Zeitraum vom 16.07.2012 bis 19.03.2013 im Rahmen klinisch-diagnostischer Untersuchungen gewonnen.

Insgesamt wurden 286 Proben in die Untersuchungen mit aufgenommen, die sowohl einmalige Abstriche unterschiedlicher Patienten, als auch Follow-up Untersuchungen oder Wundabstriche verschiedener Ulcera desselben Patienten mit einschlossen (Tab. 10). Von jeder Probe wurden die im Methodenteil unter 2.2.2 geschilderten Kulturen angelegt und die gewachsenen Organismen wie in 2.2.3 - 2.2.5.5 beschrieben identifiziert. Für die weiterführenden Untersuchungsmethoden wurden gezielt Proben von besonderem Interesse ausgewählt.

Bei der Real-Time-PCR sollte immer nur eine Probe pro Patient ausgewertet werden. Da pro Platte maximal 94 Proben plus Positiv- und Negativkontrolle gleichzeitig untersucht werden konnten, wurden die ersten 94 Proben verschiedener Patienten in der Reihenfolge ihres Eingangsdatums ausgewählt. Zusätzlich wurden exemplarisch alle Kontroll-Proben von 2 Patienten mit jeweils 4 Follow-up-Untersuchungen in das Kollektiv mit einbezogen, um mögliche Veränderungen der Wundflora im zeitlichen Verlauf zu detektieren.

Die Follow-up-Proben der 2 Patienten wurden – sofern Banden in der Agarose-Gelelektrophorese nachweisbar waren – zusätzlich mit dem DHPLC-WAVE®-System untersucht. Auch bei weiteren zufällig ausgewählten 24 Proben wurde diese Methode angewandt.

Methode	Anzahl Proben	Anzahl verschiedener Wunden	Anzahl verschiedener Patienten
Kultur	286	179	159
Real-Time-PCR	102	94	94
DHPLC-WAVE®-System	30	26	24

Tabelle 10 Eingeschlossenes Probenmaterial

3.3 Kulturell nachgewiesenes Erregerspektrum

Insgesamt konnten aus 286 Proben 497 Isolate gewonnen werden (Tab. 11). *Staphylococcus aureus* machte mit 104 den größten Anteil aus, *Staphylococcus epidermidis* und *Pseudomonas aeruginosa* belegten mit 45 bzw. 44 die Plätze zwei und drei der am häufigsten nachgewiesenen Arten. 43 Arten wurden hingegen nur ein einziges Mal isoliert, was über die Hälfte der insgesamt 80 detektierten Arten ausmachte. Davon waren 10 Pilze (13 Isolate) und 70 Bakterien (485 Isolate). Insgesamt dominierten Gram-positive Bakterien (44 Arten mit 289 Isolaten) gegenüber Gram-negativen (26 Arten mit 196 Isolaten). Hinsichtlich des Stoffwechsels waren nahezu alle isolierten Bakterien fakultativ anaerob (55 Arten mit 410 Isolaten), wohingegen es sich nur bei 71 Isolaten um obligat aerobe Bakterien und bei 4 Isolaten um Anaerobier handelte (Abb. 17).

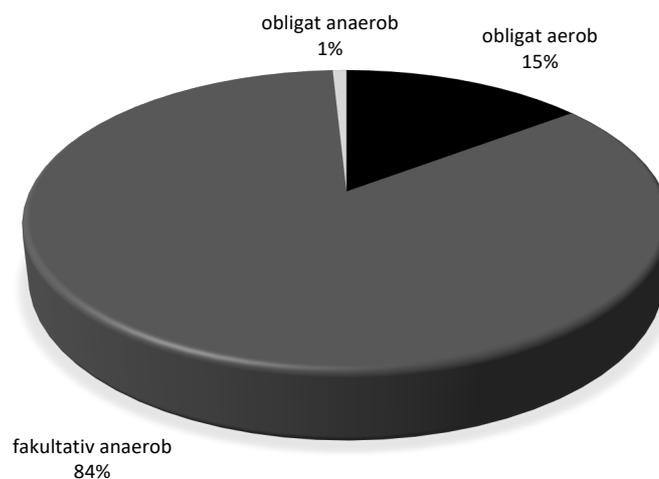
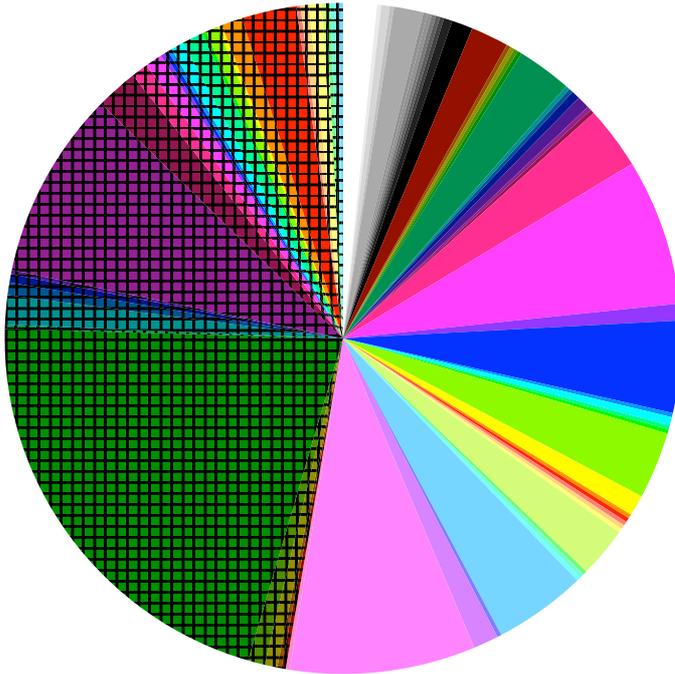


Abbildung 17 Stoffwechseleigenschaften kulturell nachgewiesener Bakterien

Art	Isolate	Art	Isolate
<i>Acinetobacter baumannii</i>	8	<i>Parvimonas micra</i>	1
<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	1	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	1
<i>Actinomyces neuui</i>	2	<i>Proteus mirabilis</i>	22
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	1	<i>Providencia alcalifaciens</i>	1
<i>Alcaligenes faecalis</i>	7	<i>Providencia rettgeri</i>	6
<i>Bacillus circulans</i>	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
<i>Candida albicans</i>	1	<i>Pseudomonas putida</i>	1
<i>Candida glabrata</i>	1	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1
<i>Candida guilliermondii</i>	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
<i>Candida norvegica</i>	1	<i>Serratia liquefaciens</i>	3
<i>Candida tropicalis</i>	2	<i>Serratia marcescens</i>	4
<i>Citrobacter freundii</i>	5	<i>Staphylococcus aureus</i>	104
<i>Citrobacter koseri</i>	9	<i>Staphylococcus auricularis</i>	1
<i>Citrobacter youngae</i>	1	<i>Staphylococcus capitis</i>	7
<i>Collinsella aerofaciens</i>	1	<i>Staphylococcus caprae</i>	3
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	1	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	1	<i>Staphylococcus cohnii</i>	1
<i>Corynebacterium striatum</i>	13	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	45
<i>Cryptococcus albidus</i>	1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	10
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1	<i>Staphylococcus hominis</i>	4
<i>Dermabacter hominis</i>	2	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	4
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	<i>Staphylococcus pseudointermedius</i>	1
<i>Enterobacter amnigenus</i>	1	<i>Staphylococcus pseudolugdunensis</i>	1
<i>Enterobacter cancerogenes</i>	1	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	15	<i>Staphylococcus sciuri</i>	3
<i>Enterococcus faecalis</i>	35	<i>Staphylococcus simulans</i>	5
<i>Enterococcus faecium</i>	4	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	22	<i>Staphylococcus warneri</i>	3
<i>Gemella hämolysans</i>	1	<i>Staphylococcus xylosus</i>	1
<i>Geotrichum fermentans</i>	2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5
<i>Granulicatella adiacens</i>	1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	13
<i>Helococcus kunzii</i>	1	<i>Streptococcus constellatus</i>	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	16	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	<i>Streptococcus mitis</i>	3
<i>Lactococcus gravieae</i>	1	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	1
<i>Leuconostoc lactis</i>	1	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1
<i>Malassezia pachydermatis</i>	1	<i>Streptomyces sp.</i>	1
<i>Microbacterium flavescens</i>	1	<i>Suttonella indologenes</i>	1
<i>Micrococcus luteus</i>	1	<i>Vagococcus fluvialis</i>	1
<i>Morganella morgani</i>	12		
<i>Neisseria mucosa</i>	1		

Tabelle 11 Kulturell positiv nachgewiesene Erreger



Die zugehörigen Bezeichnungen der nachgewiesenen Arten sind Tabelle 11 zu entnehmen

Abbildung 18 Gesamtheit kulturell nachgewiesener Arten

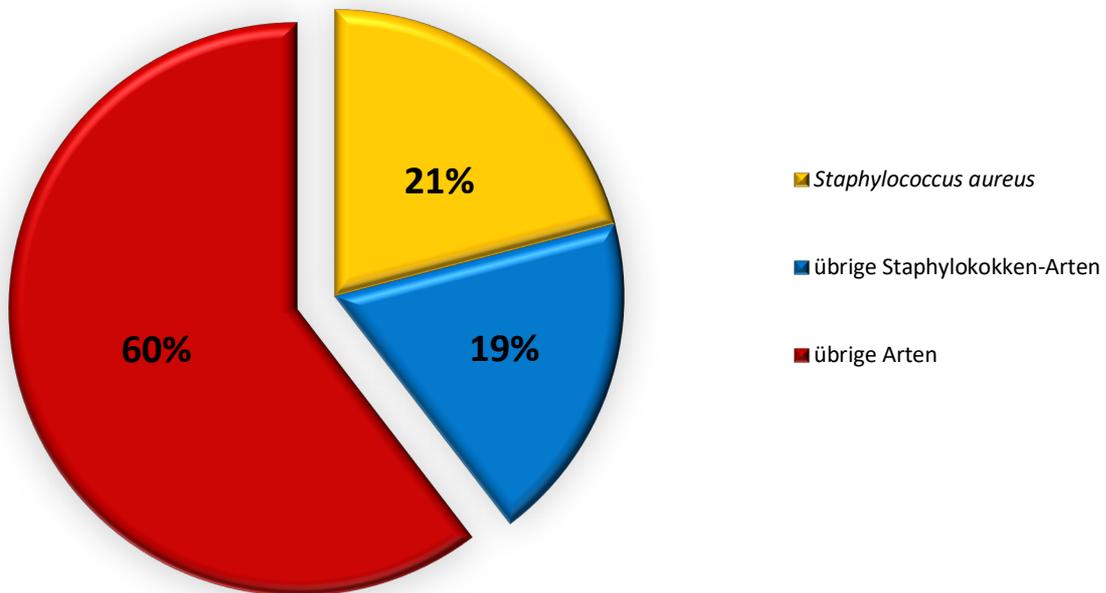


Abbildung 19 *Staphylococcus aureus* und übrige Staphylokokken-Arten anteilig an der Gesamtheit der kulturell nachgewiesenen Arten

3.4 Per Real-Time-PCR

nachgewiesenes Erregerspektrum

Insgesamt konnten in 102 Proben 309 Nachweise erzielt werden (Tab. 12). Bei der Auswahl der Erreger, auf welche die Proben untersucht werden sollten, wurden unterschiedliche Ziele verfolgt. Zum einen wurden Bakterien gewählt, die besonders oft kulturell nachgewiesen wurden (z. B. *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*), um deren Quantität innerhalb einer Probe bestimmen zu können. Zum anderen wurden Bakterien und Pilze der gleichen Gattung gewählt (z. B. *Klebsiella oxytoca* und *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* und *Candida glabrata*) um die Speziespezifität zu überprüfen. Die Testung auf *Bacteroides sp.* und *Fusobacterium sp.* - zwei Anaerobier, die per Kultur kein einziges Mal detektiert wurden - sollte exemplarisch das Vorhandensein besonders anspruchsvoller Bakterien nachweisen. Insgesamt wurden die Real-Time-PCR-Läufe für 17 verschiedene Erreger (davon 14 Bakterien und 3 Pilze) durchgeführt, von welchen 13 Suchläufe positive Ergebnisse zeigten. Als Vertreter der Staphylokokken – die mit 165 Nachweisen häufigste Gattung – wurde hier *Staphylococcus lugdunensis* in 72 Proben am häufigsten detektiert. An zweiter Stelle stand die Gattung *Bacteroides* mit 58 Nachweisen, gefolgt von den *Pseudomonaden* (24 Nachweise) und *Fusobacterien* (17 Nachweise). Mit lediglich 4 Nachweisen war *Escherichia* die am wenigsten vertretene Bakteriengattung. Nur *Candida* wurde mit 2 Nachweisen seltener detektiert. Insgesamt dominierten Gram-positive Bakterien (175 Nachweise) gegenüber Gram-negativen (132 Nachweise), obwohl die Proben lediglich auf 6 Gram-positive aber auf 8 Gram-negative Arten untersucht wurden. Der Anteil anaerober Erreger an allen Nachweisen machte knapp 25 % aus, obwohl nur gut 14 % der getesteten Erreger Anaerobier waren (Abb. 20).

Art	Isolate
<i>Acinetobacter sp.</i>	10
<i>Bacteroides sp.</i>	58
<i>Candida albicans</i>	2
<i>Candida glabrata</i>	0
<i>Candida tropicalis</i>	0
<i>Escherichia coli</i>	4
<i>Fusobacterium</i>	17
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
<i>Proteus mirabilis</i>	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
<i>Staphylococcus aureus</i>	54
<i>Staphylococcus capitis</i>	39
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	72
<i>Streptococcus agalactiae</i>	10
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0

Tabelle 12 Per Real-Time-PCR untersuchte Arten

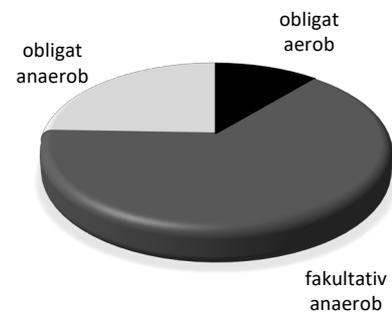


Abbildung 20 Stoffwechseleigenschaften per Real-Time-PCR nachgewiesener Bakterien

3.5 Per DHPLC-WAVE®-System nachgewiesenes Erregerspektrum

Gattung	Isolate
<i>Acinetobacter</i>	5
<i>Actinomyces</i>	1
<i>Aggregatibacter</i>	1
<i>Brevundimonas</i>	1
<i>Citrobacter</i>	4
<i>Corynebacterium</i>	2
<i>Enterobacter</i>	2
<i>Flavobacterium</i>	1
<i>Fusobacterium</i>	2
<i>Klebsiella</i>	1
<i>Morganella</i>	1
<i>Parvimonas</i>	1
<i>Proteus</i>	1
<i>Pseudomonas</i>	7
<i>Rahnella</i>	1
<i>Serratia</i>	4
<i>Sphingobacterium</i>	2
<i>Staphylococcus</i>	16
- <i>S. aureus</i>	13
- andere Staphylokokken	3
<i>Stenotrophomonas</i>	1
<i>Streptococcus</i>	4

Tabelle 13 per DHPLC-WAVE®-System isolierte Gattungen

Insgesamt konnten aus 30 Proben 58 Nachweise erzielt werden (Tab. 13). *Staphylococcus aureus* machte mit 13 den größten Anteil aus. Auch bei den nachgewiesenen Gattungen lagen die Staphylokokken mit 16 Nachweisen vorne, gefolgt von den Pseudomonaden (7 Nachweise) und dem *Acinetobacter* (5 Nachweise). 10 der insgesamt 20 Gattungen konnten nur ein einziges Mal nachgewiesen werden. Pilze wurden gar nicht nachgewiesen. Insgesamt dominierten Gram-negative Bakterien (15 Arten mit 34 Nachweisen) gegenüber Gram-positiven (8 Arten mit 24 Nachweisen). Hinsichtlich des Stoffwechsels waren die meisten isolierten Bakterien fakultativ anaerob (15 Arten mit 38 Nachweisen), wohingegen es sich nur bei 17 Nachweisen um obligat aerobe Bakterien und bei 3 Nachweisen um Anaerobier handelte (Abb. 21).

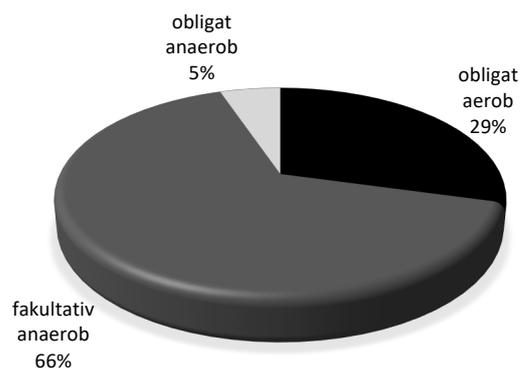


Abbildung 21 Stoffwechseleigenschaften per DHPLC-WAVE®-System nachgewiesener Bakterien

3.6 Erregerspektrum aller drei Methoden zusammen

Nimmt man die Ergebnisse aus allen Methoden zusammen, so konnten in 286 Proben insgesamt 89 verschiedene Arten nachgewiesen werden. Bei 10 Arten handelte es sich um Sprosspilze, der Rest waren Bakterien. Hier dominierten die Gram-positiven Arten mit 45 verschiedenen gegenüber 34 verschiedenen Gram-negativen Arten. Hinsichtlich des Stoffwechsels konnten insgesamt 6 obligat anaerobe, 16 obligat aerobe und 57 fakultativ anaerobe Arten nachgewiesen werden.

3.7 Methodenvergleich: Kultur vs. Real-Time-PCR

In 102 Proben, die mit den beiden Methoden untersucht wurden, konnten 193 Isolate per Kultur erzielt werden. Die Untersuchung der gleichen Proben mittels Real-Time-PCR ergab insgesamt 309 Isolate. Zwar übertraf die Real-Time-PCR die Kultur somit hinsichtlich der Gesamtanzahl an Isolaten, nicht jedoch in Bezug auf die nachgewiesene Artenvielfalt (Abb. 22). Die kulturell erzielten Nachweise ließen sich auf 55 unterschiedliche Arten aufgliedern. 4 davon waren Pilze. Die Real-Time-PCR brachte es auf Grund des vorgegebenen Untersuchungsspektrums lediglich auf 13 verschiedene Arten, davon 1 Pilz. Betrachtet man die einzelnen Isolate, so dominierten bei beiden Methoden die Gram-positiven Bakterien, auch wenn mit der Real-Time-PCR mehr Gram-negative als Gram-positive Arten untersucht und detektiert wurden. Hinsichtlich des Stoffwechsels der detektierten Bakterien war die Mehrheit bei beiden Methoden fakultativ anaerob (Kultur: 162 Isolate, Real-Time-PCR 198 Nachweise). Allerdings ergab sich beim Anteil der Anaerobier ein gravierender Unterschied (Abb. 23). Kulturell konnten insgesamt nur 3 Isolate von 3 verschiedenen obligat anaeroben Bakterien erzielt werden, während es mittels Real-Time-PCR 75 Nachweise von 2 verschiedenen Anaerobiern waren. Allgemein war die Kombination beider Methoden den einzelnen Anwendungen in jedem Punkt überlegen. Zusammen konnten 415 Nachweise von 59 Arten erzielt werden, davon 6 Pilze 5 unterschiedlicher Arten und 78 Anaerobier, die 5 verschiedenen Arten zugeordnet werden konnten.

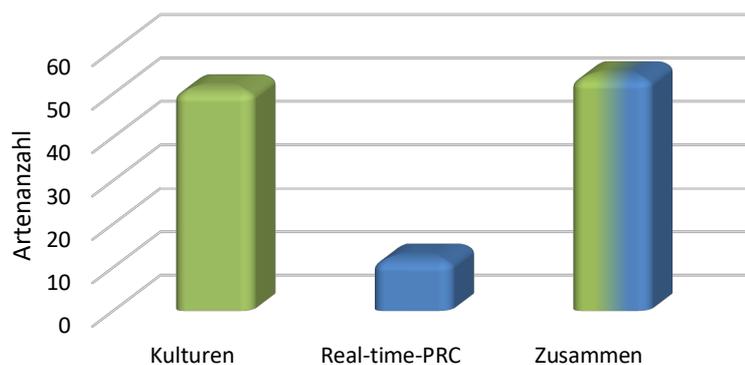


Abbildung 22 Methodenvergleich Kultur vs. Real-Time-PCR – nachgewiesene Artenvielfalt

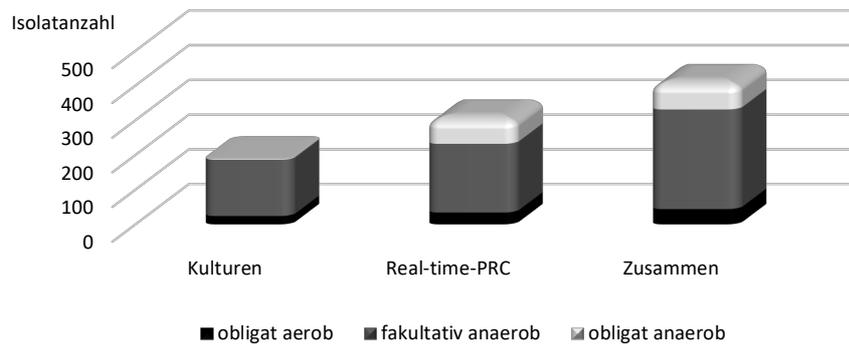


Abbildung 23 Methodenvergleich Kultur vs. Real-Time-PCR – Stoffwechseleigenschaften des detektierten Erregerspektrums

3.8 Methodenvergleich: Kultur vs. DHPLC-WAVE®-System

In 30 Proben, die mit den beiden Methoden untersucht wurden, konnten 66 Isolate per Kultur erzielt werden. Die Untersuchung der gleichen Proben mittels WAVE ergab insgesamt 58 Nachweise. Somit übertrifft die Kultur das DHPLC-WAVE®-System hinsichtlich der Gesamtanzahl an Isolaten, und auch in Bezug auf die nachgewiesene Artenvielfalt liegt die Kultur vorne. Die kulturell erzielten Nachweise lassen sich auf 29 unterschiedliche Arten aufgliedern, 4 davon sind Pilze. Das DHPLC-WAVE®-System bringt es auf 24 verschiedene Arten, davon 1 Pilz. Betrachtet man die einzelnen Isolate, so unterscheiden sich die Ergebnisse der beiden Methoden hinsichtlich des Merkmals Gramfärbung. Kulturell dominieren Gram-positive Bakterien (13 Arten mit 36 Isolaten), während mittels DHPLC-WAVE®-System mehr Gram-negative Bakterien nachgewiesen wurden (15 Arten mit 34 Nachweisen). Die Mehrheit der detektierten Bakterien ist bei beiden Methoden fakultativ anaerob (Kultur: 55 Isolate, DHPLC-WAVE®-System 38 Nachweise). Der Anteil der Anaerobier liegt kulturell bei 0 Isolaten, während es beim DHPL-Wave System 3 Isolate sind. Allgemein war die Kombination beider Methoden den einzelnen Anwendungen in jedem Punkt überlegen. Zusammen konnten 99 Nachweise von 42 Arten erzielt werden, davon 4 Pilze unterschiedlicher Arten und 3 Anaerobier, die 2 verschiedenen Arten zugeordnet werden konnten.

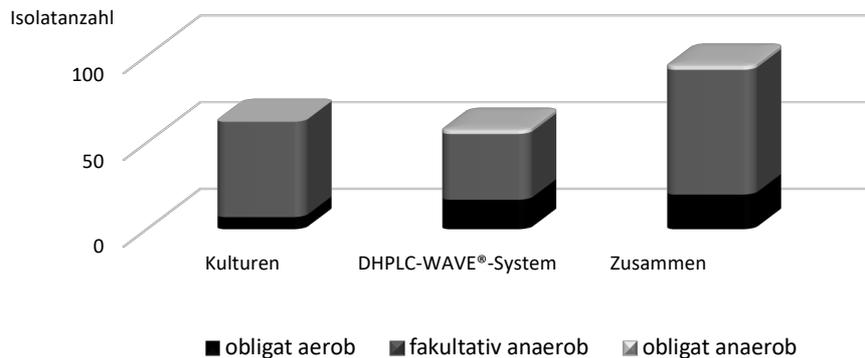


Abbildung 24 Methodenvergleich Kultur vs. DHPLC-WAVE®-System – Stoffwechseleigenschaften des detektierten Erregerspektrums

3.9 Kultur vs. Real-Time-PCR vs. DHPLC-WAVE®-System

Die Kombination aller Methoden zusammen ergab die meisten verschiedenen Arten. Während es bei der Real-Time-PCR nur 12 unterschiedliche Arten waren, beim Wave 21 und bei der Kultur 25, brachte es die Kombination aller Untersuchungen auf 37 verschiedene Arten. Die kulturell und per Real-Time-PCR detektierten Bakterien waren größtenteils Gram-positiv, während mit dem DHPLC-WAVE®-System mehr Gram-negative Bakterien nachgewiesen wurden. Betrachtet man die Ergebnisse aller Methoden zusammen, halten sich Gram-positive und Gram-negative Bakterien insgesamt die Waage ($n = 67$ zu 68). Anaerobier machen 18,52 % aller insgesamt nachgewiesenen Bakterien aus. Kulturell konnte gar kein obligat anaerober Organismus isoliert werden, und per DHPLC-WAVE®-System waren es nur 4,17 %. Die meisten Anaerobier wurden per Real-Time-PCR isoliert. Hier betrug der Anteil 26,09 %.

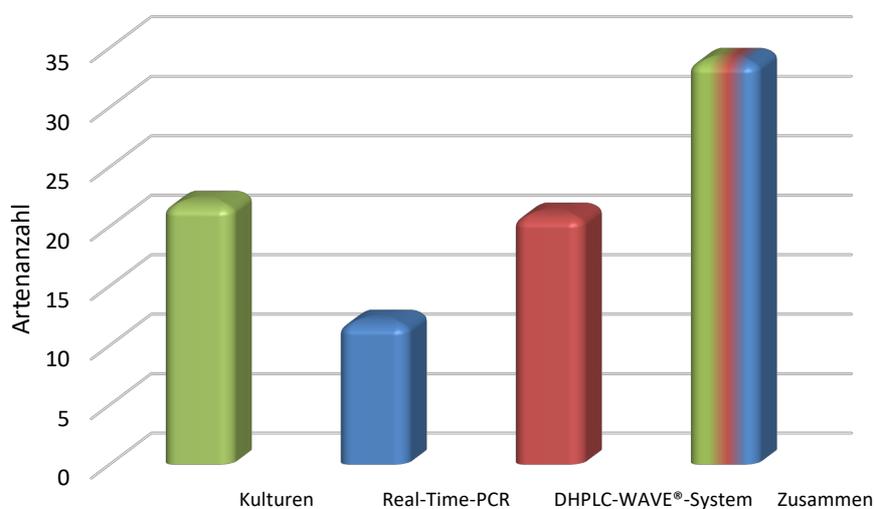


Abbildung 25 Methodenvergleich Kultur vs. Real-Time-PCR vs. DHPLC-WAVE®-System – nachgewiesene Artenvielfalt

Sowohl bei der Kultur als auch beim DHPLC-WAVE®-System war das Spektrum derjenigen Arten, die detektiert werden konnten, offen. Der kulturelle Nachweis ergab im Schnitt 1,74 Arten pro Probe während es beim DHPLC-WAVE®-System 1,92 waren. Und obwohl bei der Real-Time-PCR eine Vorauswahl von nur 17 Arten getroffen worden war, auf die untersucht wurde, konnten hier im Schnitt 3,03 Arten pro Probe nachgewiesen werden.

Durch die Kombination verschiedener Methoden konnte die durchschnittlich nachgewiesene Artenvielfalt pro Probe deutlich gesteigert werden.

Wurde zusätzlich zur Kultur das DHPLC-WAVE®-System eingesetzt, ergaben sich 3,30 Arten / Probe. Eine Kombination aus Kultur und Real-Time-PCR brachte im Schnitt 4,06 Arten hervor, und eine Untersuchung mit allen drei Methoden detektierte im Schnitt 5,31 Arten je Probe.

Um vergleichende Aussagen zu den einzelnen Methoden machen zu können wurden nur diejenigen Proben betrachtet, die jeweils mit den gleichen Untersuchungen ausgewertet wurden.

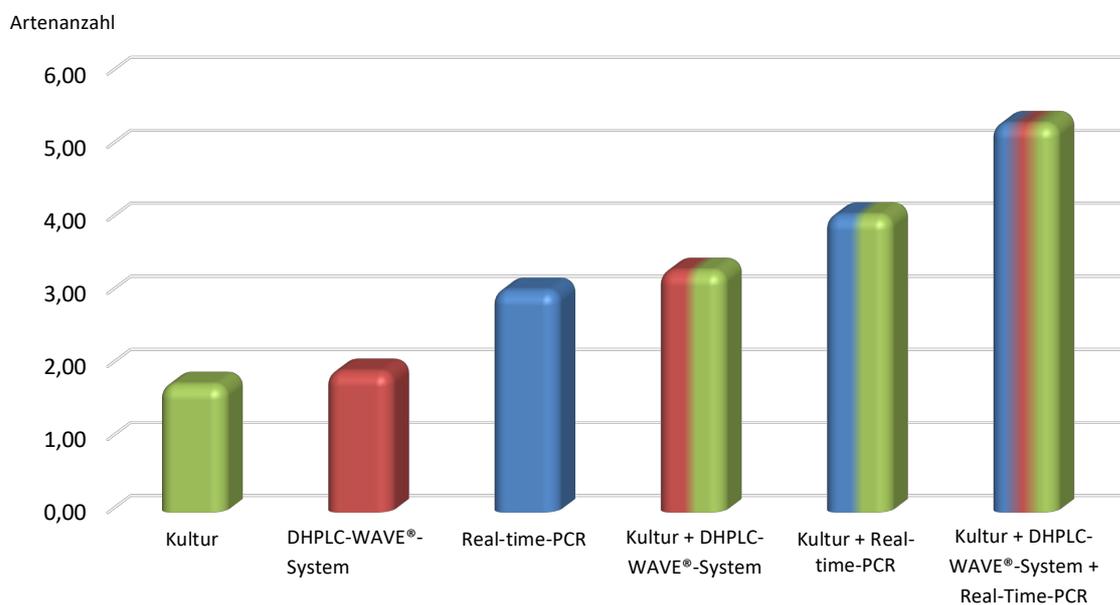


Abbildung 26 Methodenvergleich: durchschnittliche Artenvielfalt je Probe

3.9.1 Quantitative Auswertung der Real-Time-PCR verglichen mit kulturellen Nachweisen

Mit der Real-Time-PCR wurde auf Organismen aus insgesamt 9 Gattungen untersucht. Davon wurden drei Gattungen (*Acinetobacter*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*) nur auf das Vorhandensein eines Vertreters der Gattung untersucht, während aus den übrigen sechs

Gattungen (*Candida*, *Escherichia*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*) gezielt bestimmte Arten detektiert wurden. Insgesamt wurden 17 verschiedene Primer benutzt. Vier (23,5 %) der gesuchten Organismen konnten weder mittels PCR noch kulturell in einer der Proben nachgewiesen werden (*Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*). Dreimal (17,6 %) wurden Organismen in Proben nachgewiesen, die kulturell nicht zu detektieren waren (*Bacteroides*, *Candida albicans* und *Fusobacterium* Spezies). Für zwei Bakterien (11,8 %) bestätigte das Real-Time-PCR Ergebnis alle kulturell erbrachten Nachweise, wobei per Real-Time-PCR noch zusätzliche Proben positiv getestet wurden (*Klebsiella pneumoniae* und *Streptococcus agalactiae*). Für *Klebsiella pneumoniae* waren zwei von sieben Proben - die mit der zweit- und dritthöchsten Bakterienanzahl (ca. 60.300 Bakt./ Tupfer und ca. 263.000 Bakt./ Tupfer) - kulturell positiv. Für *Streptococcus agalactiae* waren fünf von zehn Proben kulturell positiv, darunter die drei Proben mit der höchsten Bakterienanzahl (ca. 7.633.000 Bakt./ Tupfer - 26.164.000 Bakt./ Tupfer). Fünf Bakterien (29,4 %) konnten zwar mit der Real-Time-PCR öfter nachgewiesen werden als per Kultur, jedoch wurden nicht alle Proben positiv mit der Real-Time-PCR getestet, bei denen sich ein kultureller Nachweis gezeigt hatte (*Acinetobacter* Spezies, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus capitis*, und *Staphylococcus lugdunensis*). *Acinetobacter* wurde insgesamt in 12 Proben detektiert, davon zweimal ausschließlich per Kultur, achtmal nur per Real-Time-PCR und zweimal mit beiden Methoden, wobei die letzteren mit ca. 2600 Bakt./ Tupfer und 3000 Bakt./ Tupfer nachgewiesenen Bakterien im Vergleich zu den beiden höchsten Ergebnissen der Real-Time-PCR (ca. 834.000 Bakt./ Tupfer und ca. 745.000 Bakt./ Tupfer) eher weniger Bakterien enthielten. *Pseudomonas aeruginosa* wurde insgesamt sechszwanzigmal nachgewiesen, davon zweimal nur kulturell, zwölfmal nur via Real-Time-PCR und zwölfmal mit beiden Methoden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von *Acinetobacter* waren die Übereinstimmungen beider Methoden deutlich häufiger bei Proben zu finden, in denen viele Bakterien detektiert wurden. Die acht niedrigsten der 24 positiven Nachweise (ca. 4700 Bakt./ Tupfer – ca. 11.300 Bakt./ Tupfer) waren kulturell negativ. Die Übereinstimmungen reichten von ca. 29.300 Bakt./ Tupfer bis ca. 255.000.000 Bakt./ Tupfer. *Staphylococcus aureus* wurde mit beiden Methoden verhältnismäßig oft nachgewiesen (dreimal ausschließlich per Kultur, siebenmal nur mit der Real-Time-PCR und siebenundvierzigmal mit beiden Methoden). Die Proben, die nur mit der Real-Time-PCR nachgewiesen wurden, gehörten zu denen, die weniger Bakterien enthielten (14.400 Bakt./ Tupfer bis ca. 5.771.000 Bakt./ Tupfer). Bei den anderen beiden Staphylokokken Spezies machte der reine Nachweis per Real-Time-PCR einen deutlich größeren Anteil an allen positiven Proben aus.

Staphylococcus capitis wurde insgesamt in 40 Proben nachgewiesen, davon lediglich einmal nur kulturell und siebenunddreißigmal ausschließlich mit der Real-Time-PCR. Die beiden Übereinstimmungen fanden sich bei den Proben, die zu den oberen 25 % hinsichtlich der Bakterienanzahl zählten. *Staphylococcus lugdunensis* konnte insgesamt dreiundsiebzigmal detektiert werden - einmal nur kulturell, siebzigmals ausschließlich per Real-Time-PCR und bei zwei Proben stimmten beide Methoden überein. Diese lagen einmal im unteren und oberen Drittel in Bezug auf die Anzahl der Bakterien. Betrachtet man die Ergebnisse für *Proteus mirabilis*, so konnten via Kultur und Real-Time-PCR jeweils elf Proben positiv getestet werden, davon stimmten jeweils zehn überein. Nur die Probe mit den wenigsten Bakterien (ca. 87.800 Bakt./ Tupfer) wurde kulturell nicht positiv getestet. Schließlich gab es noch zwei Bakterien (11,8 %), die öfter per Kultur als mit der Real-Time-PCR nachgewiesen werden konnten (*Escherichia coli* und *Klebsiella oxytoca*). *Escherichia coli* wurde kulturell siebenmal detektiert, während es die Real-Time-PCR nur auf 4 positive Proben brachte. Die Ergebnisse beider Methoden stimmten bei drei Proben überein. Die Probe, die nur per PCR detektiert werden konnte, enthielt die wenigsten Bakterien (ca. 171.000 Bakt./ Tupfer). *Klebsiella oxytoca* wurde fünfmal kulturell nachgewiesen und einmal per Real-Time-PCR. Dabei wurde in zwei der fünf Proben, die kulturell positiv auf *Klebsiella oxytoca* waren, per Real-Time-PCR *Klebsiella pneumoniae* nachgewiesen. In einer der fünf Proben detektierte die Real-Time-PCR sowohl *Klebsiella oxytoca* und *Klebsiella pneumoniae*.

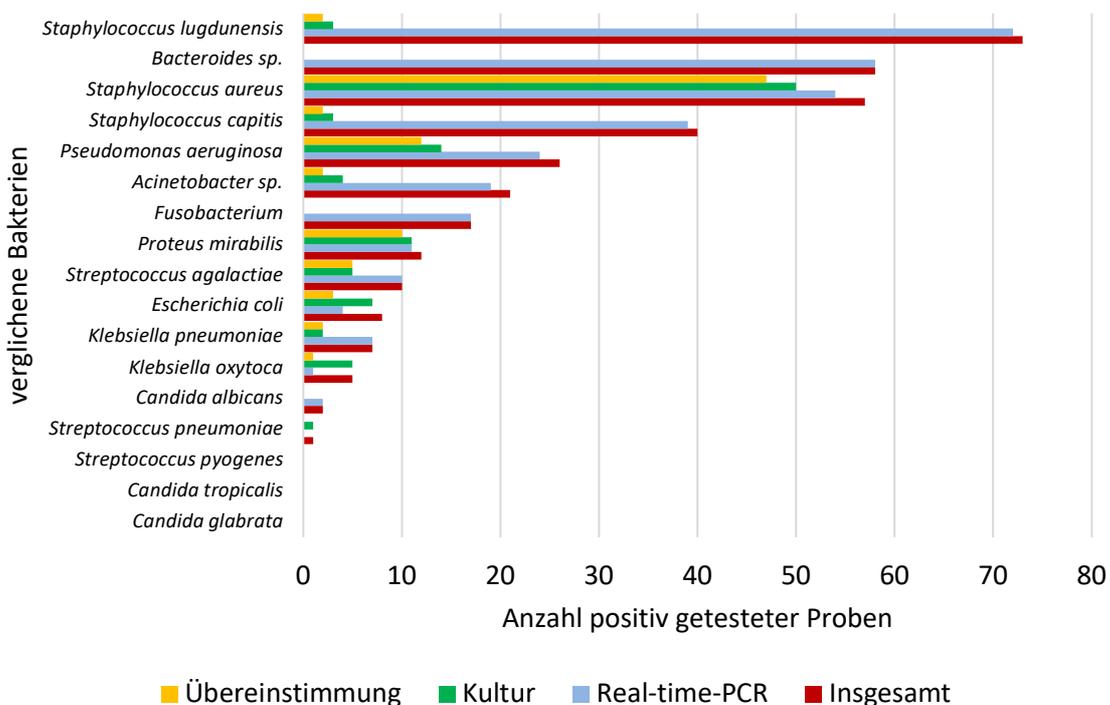


Abbildung 27 Methodenvergleich: Übereinstimmung des Erregernachweises via Kultur und Real-Time-PCR

3.9.2 Identifikation des dominierenden Erregers via Real-Time-PCR

Anhand des quantitativen Erregernachweises via Real-Time-PCR war es möglich, die Anzahl der verschiedenen Bakterien, die in einer Probe nachgewiesen wurden, miteinander zu vergleichen und Aussagen zur Dominanz einer Art anzustellen.

Bei nur 5 % der Proben machte die dominante Art weniger als 50 % der nachgewiesenen Bakterien aus. In zwei Proben wurden keine Keime nachgewiesen. In 14 Proben konnte nur ein Keim detektiert werden, womit dieser automatisch als dominant galt. In 51 % der Proben, in denen mindestens zwei Keime nachgewiesen wurden, bestritt das dominante Bakterium ≥ 90 %. Nimmt man auch die monomikrobiellen Ergebnisse mit hinzu, traf dies sogar für 65 % der Proben zu (Abb. 28).

Insgesamt betrachtet wurde *Staphylococcus aureus* in 36 % der Proben als dominierende Art detektiert; gefolgt von *Staphylococcus capitis* und *Pseudomonas aeruginosa*. *Acinetobacter* und *Klebsiella oxytoca* konnten sich jeweils nur in 1 % der Proben als dominierendes Bakterium durchsetzen, während *Candida albicans* und *Escherichia coli* in keiner der Proben als dominierende Art vorherrschten (Abb. 29).

Die Dominanz von *Staphylococcus aureus* wird sogar noch deutlicher, wenn man nicht alle mit der Real-Time-PCR untersuchten Proben betrachtet, sondern nur diejenigen, in denen *Staphylococcus aureus* via Real-Time-PCR nachgewiesen wurde. In diesem Probenkollektiv konnte *Staphylococcus aureus* in 67 % am häufigsten nachgewiesen werden. Es zeigt sich jedoch auch, dass *Klebsiella oxytoca*, die lediglich in 1 % aller untersuchten Proben dominant war, in 100 % der Proben dominierte, in denen dieses Bakterium nachgewiesen wurde (Abb. 30).

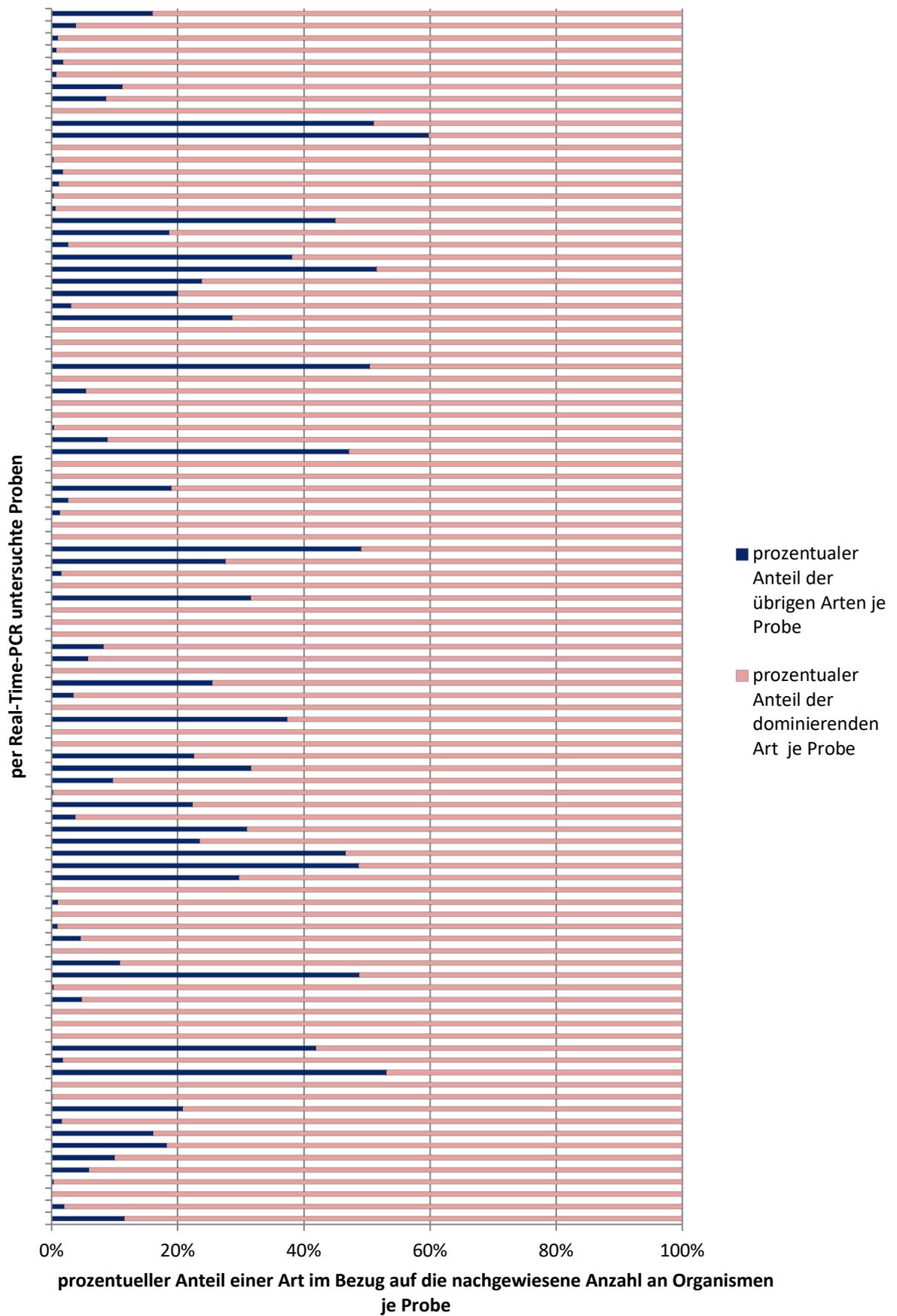


Abbildung 28 Prozentualer Anteil des per Real-Time-PCR detektierten dominierenden Bakteriums je Probe

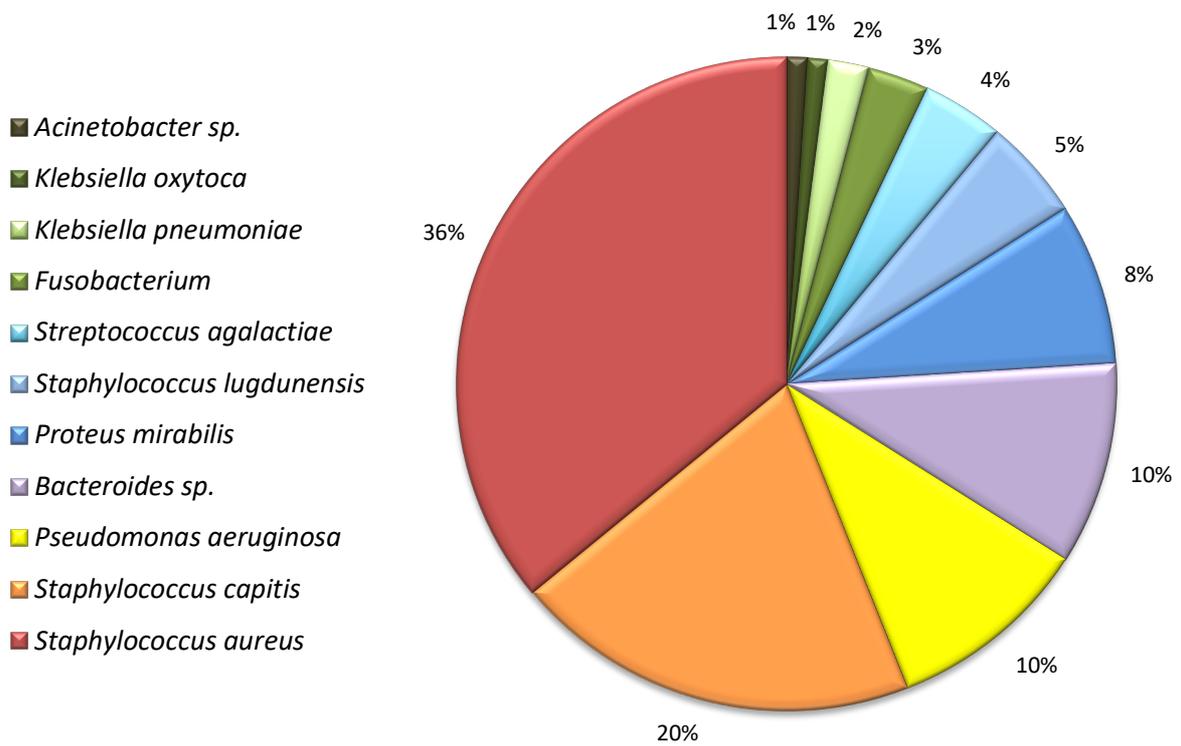


Abbildung 29 Dominierende Bakterien aller per Real-Time-PCR untersuchten Proben

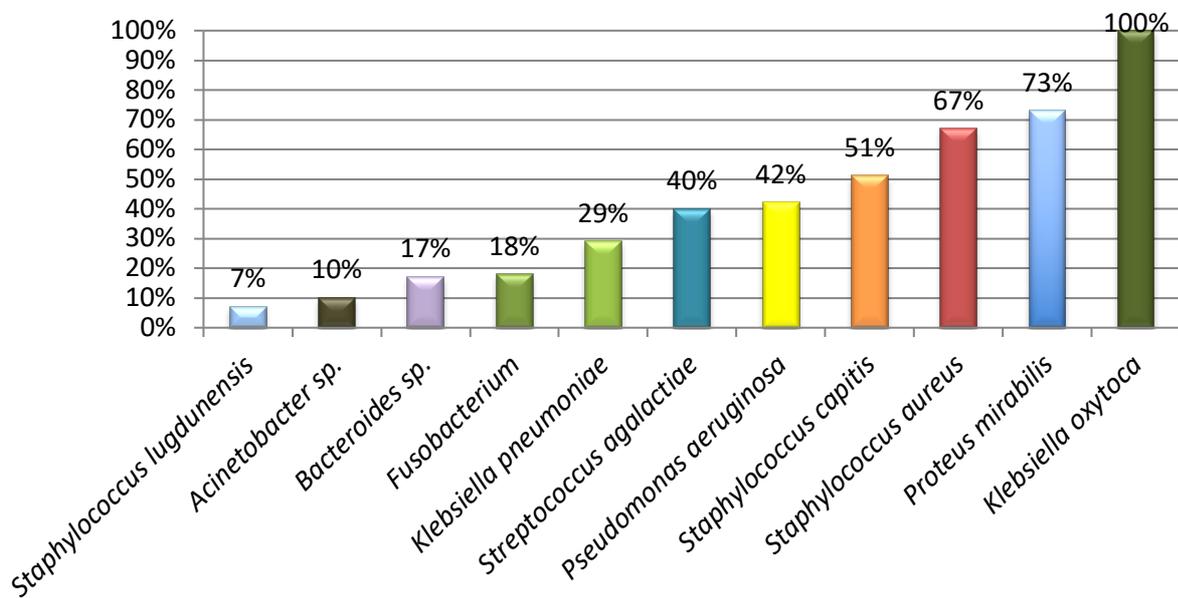


Abbildung 30 Dominierendes Bakterium anteilig an seiner Nachweishäufigkeit per Real-Time-PCR

3.10 Follow-up-Patienten

Bei den Follow-up-Patienten handelte es sich um zwei Männer im Alter von 56 und 77 Jahren. Für beide Patienten lagen jeweils 5 Proben derselben Wunde im zeitlichen Verlauf vor. Die Wundabstriche wurden im Zeitraum vom 18.07.2012 bis 09.11.2012 im Rahmen klinischer Untersuchungen gewonnen. Es wurde die Gesamtheit der Ergebnisse aller Methoden betrachtet.

3.10.1 Auswertung Patient 1

Staphylococcus aureus und *Staphylococcus lugdunensis* waren in jeder einzelnen Probe enthalten (Abb. 31). *Proteus mirabilis* und *Bacteroides sp.* kamen in vier von fünf Proben vor. *Acinetobacter sp.* und *Pseudomonas aeruginosa* fanden sich in zwei von fünf Proben. Die restlichen Bakterien (*Corynebacterium amycolatum*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium sp.*, *Serratia marcescens*, *Sphingobacterium sp.*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Stenotrophomonas*) kamen nur einmal vor, die meisten davon in der dritten Probe. Mit 8 verschiedenen nachgewiesenen Spezies war die dritte Probe am vielfältigsten, die wenigsten verschiedenen Spezies waren in Probe 1 und 4 mit jew. fünf verschiedenen Erregern nachweisbar. Die Anzahl der Bakterien derselben Art variierte von Probe zu Probe. Dabei ließ sich keine eindeutige Abnahme oder Zunahme der Bakterien einer Art im zeitlichen Verlauf erkennen. *Staphylococcus aureus* blieb jedoch in jeder einzelnen Probe das dominierende Bakterium (Abb. 32).

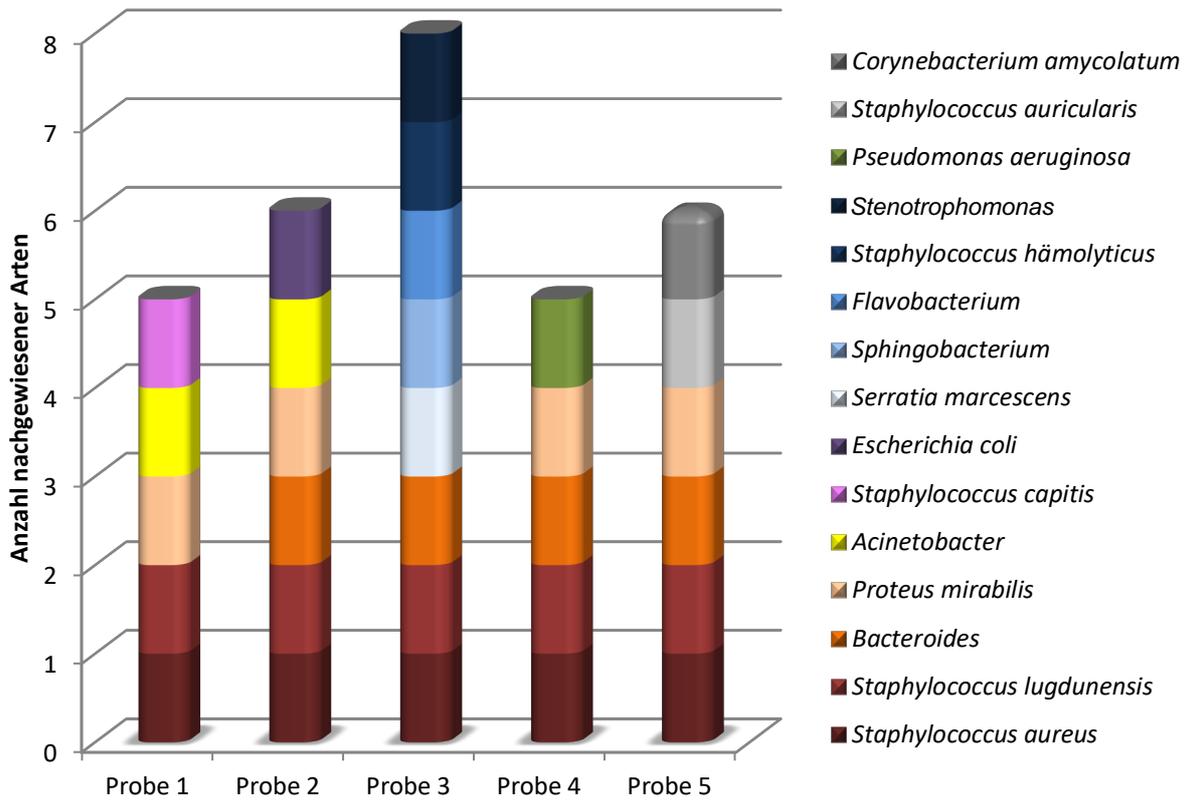


Abbildung 31 Keimspektrum im zeitlichen Verlauf (Follow-up-Patient 1)

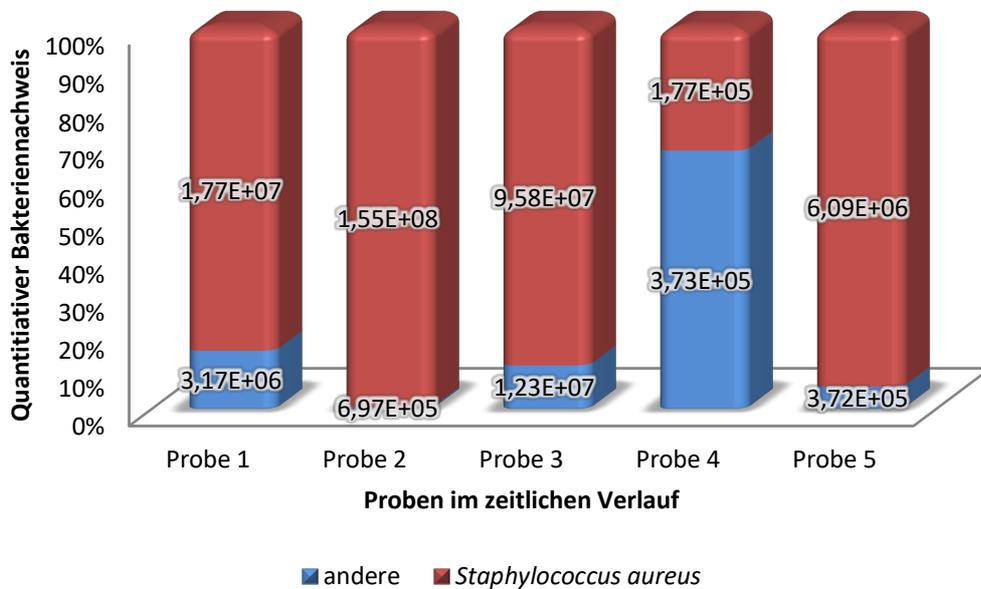


Abbildung 32 Prozentualer und absoluter Anteil des dominierenden Bakteriums im zeitlichen Verlauf (Follow-up-Patient 1)

3.10.2 Auswertung Patient 2

Acinetobacter sp. und *Staphylococcus aureus* waren in jeder einzelnen Probe enthalten (Abb. 33). *Staphylococcus lugdunensis* kam in vier von fünf Proben vor. *Fusobacterium sp.* fand sich in drei von fünf Proben. *Bacteroides Spezies* war in zwei von fünf Proben enthalten. Die restlichen Bakterien und Pilze (*Geotrichum fermentans*, *Malassezia pachydermatis*) kamen nur einmal vor. Mit fünf verschiedenen Spezies waren die Proben 1 und 3 am vielfältigsten, Probe 5 enthielt nur 3 verschiedene Erreger. Die Anzahl der Bakterien einer Art variierte von Probe zu Probe. Dabei ließ sich keine eindeutige Abnahme oder Zunahme der Bakterien einer Art im Verlauf der Zeit erkennen. Insgesamt zeigte sich auch bei Patient 2 *Staphylococcus aureus* in allen fünf Proben als dominierende Art (Abb. 34).

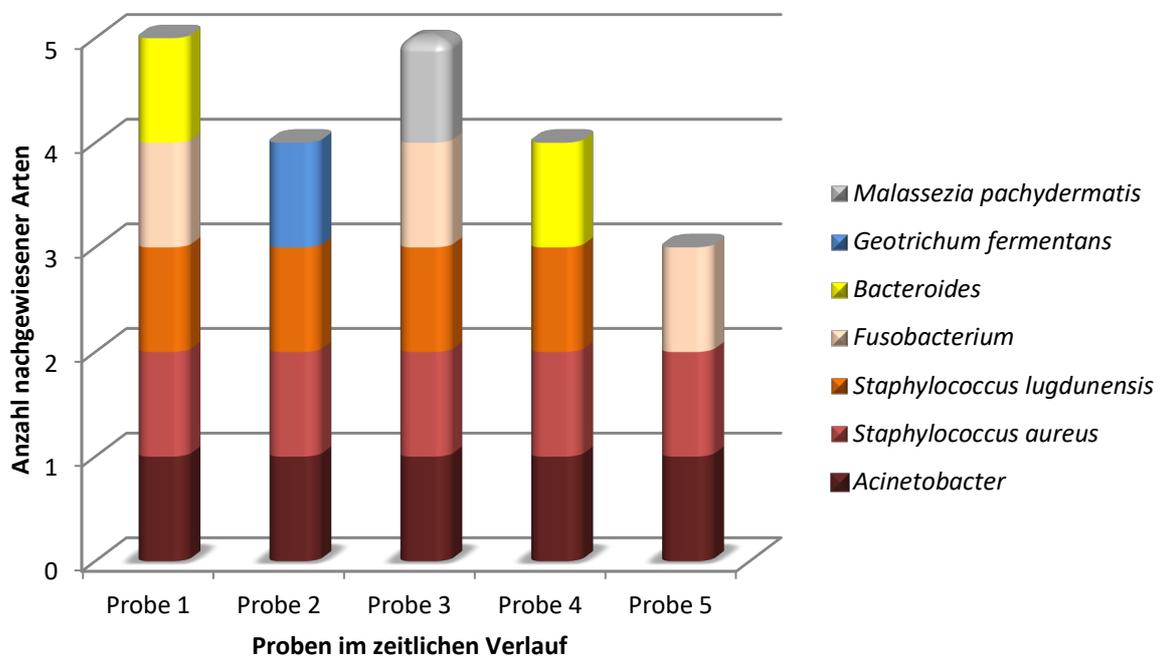


Abbildung 33 Keimspektrum im zeitlichen Verlauf (Follow-up-Patient 2)

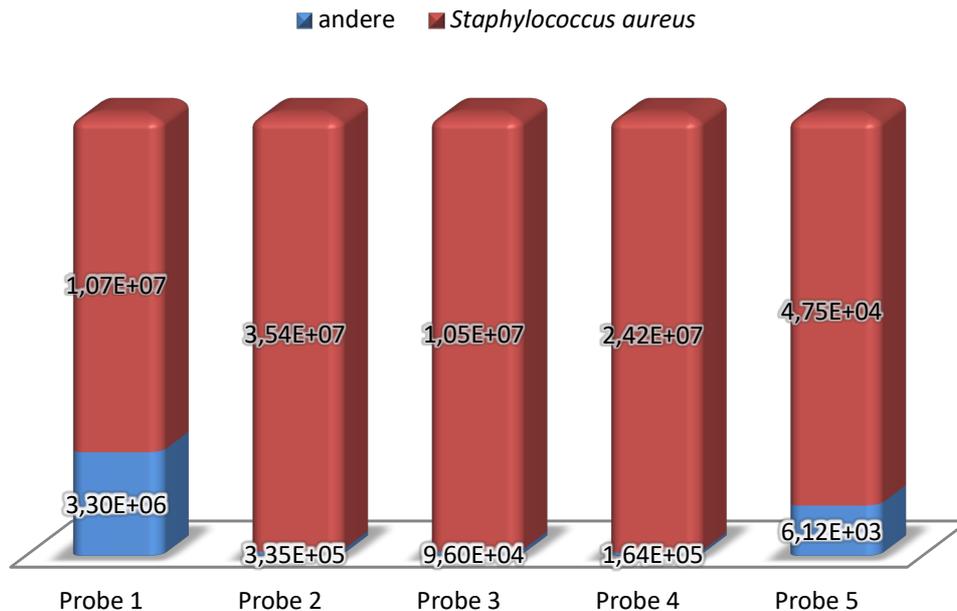


Abbildung 34 Prozentueller und absoluter Anteil des dominierenden Bakteriums im zeitlichen Verlauf (Follow-up-Patient 2)

3.11 Biofilm

Insgesamt wurden Proben von 76 Patienten untersucht (Tab. 14).

Methode	Geschlechterverteilung	Altersverteilung
Biofilmversuch	76 Patienten	22-91 Jahre, (66 ± 13,6) 42-93 Jahre, (72 ± 14,1)
	49 Männer	
	27 Frauen	

Tabelle 14 Patientenkollektiv des Biofilmversuchs

Das Untersuchungsmaterial stammt von DFS-Patienten des Universitätsklinikums Gießen. Die Wundabstriche wurden im Zeitraum vom 18.07.2012 bis 05.03.2013 im Rahmen klinischer Untersuchungen gewonnen.

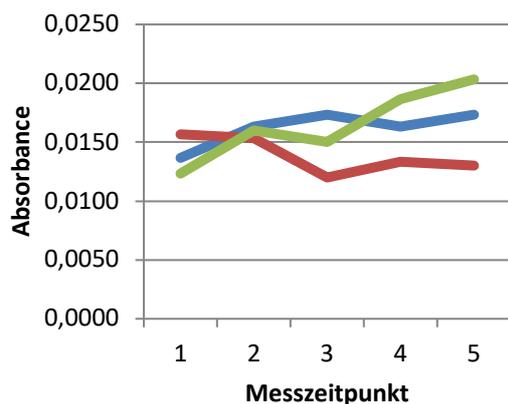
Insgesamt wurden 102 Versuchsreihen durchgeführt. Eine Testreihe beinhaltet die Messung von drei verschiedenen Proben desselben Bakteriums zu fünf verschiedenen Zeitpunkten (nach 2, 4, 6, 8, und 10 Tagen); also insgesamt 15 Messungen je Testreihe. Es wurden 13 Bakterienspezies aus 11 verschiedenen Gattungen untersucht (Tab. 15), davon sieben Gram-positive und sechs Gram-negative Spezies. Der Versuchsaufbau erlaubte keine Untersuchung obligat anaerober Bakterien.

Die Abbildungen 35 - 48 zeigen die zeitlichen Absorbance-Verläufe der verschiedenen Spezies. Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte der Absorbance-Messungen zu den verschiedenen Zeitpunkten.

Insgesamt fällt auf, dass die Absorbance, welche die Biofilmmasse repräsentiert, tendenziell mit der Zeit zunimmt. Grundsätzlich ist eine kontinuierliche Zunahme aber eine Ausnahme. Meist schwankt die Absorbance im zeitlichen Verlauf.

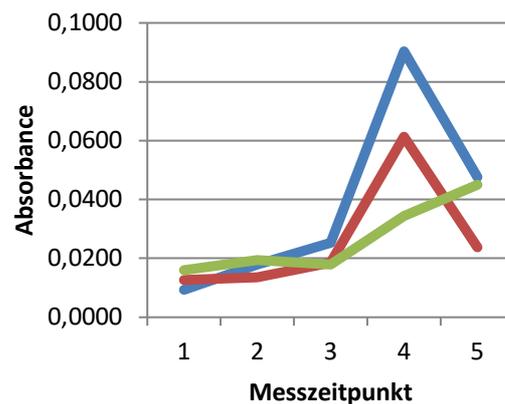
Bakterien	Anzahl Testreihen
<i>Actinomyces neuii</i>	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	3
<i>Escherichia coli</i>	3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3
<i>Micrococcus luteus</i>	1
<i>Morganella morganii</i>	3
<i>Providentia rettgeri</i>	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
<i>Serratia marcescens</i>	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	74
<i>Staphylococcus capitis</i>	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3
gesamt	102

Tabelle 15 Auf Biofilmbildung getestete Bakterienspezies



— *Enterococcus faecalis* 094b
 — *Enterococcus faecalis* 136b
 — *Enterococcus faecalis* 142a

Abbildung 35 Absorbance *Enterococcus faecalis*



— *Escherichia coli* 095a
 — *Escherichia coli* 133b
 — *Escherichia coli* 195a

Abbildung 36 Absorbance *Escherichia coli*

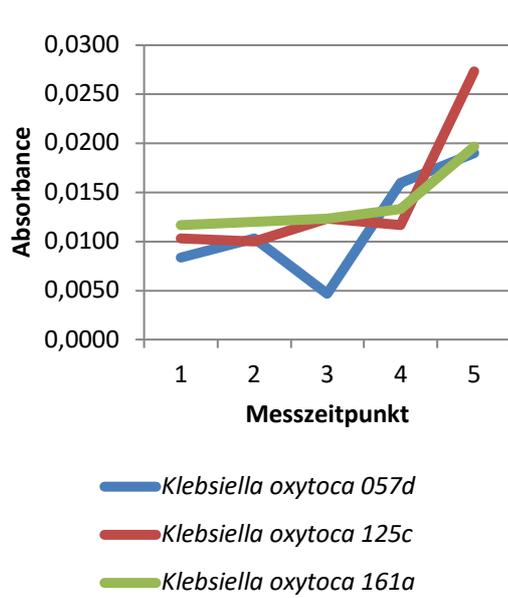


Abbildung 37 Absorbance *Klebsiella oxytoca*

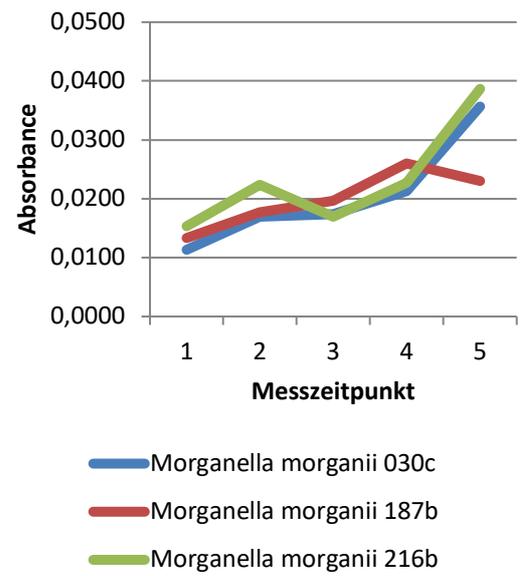


Abbildung 38 Absorbance *Morganella morganii*

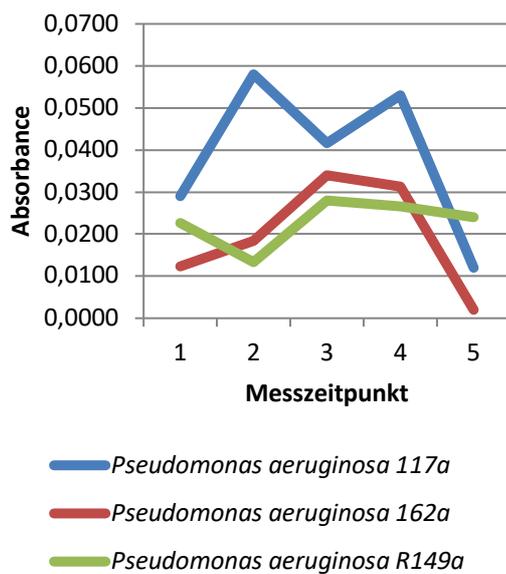


Abbildung 39 Absorbance *Pseudomonas aeruginosa*

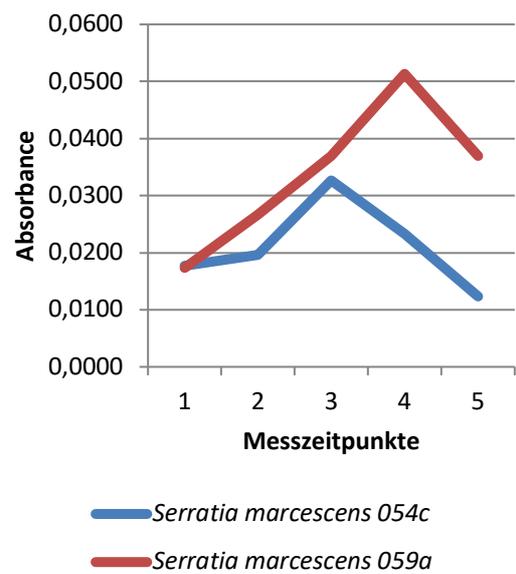
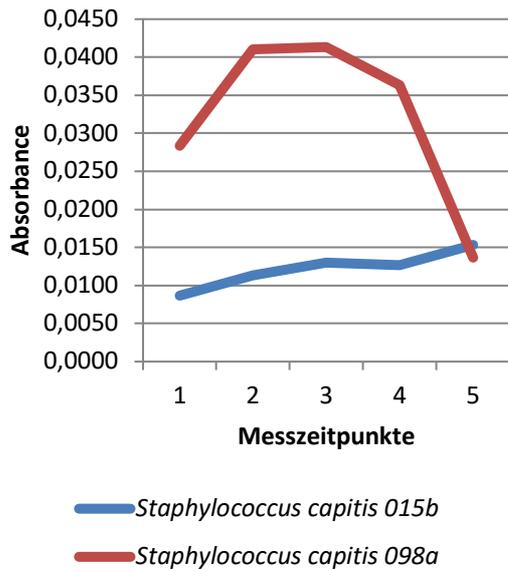
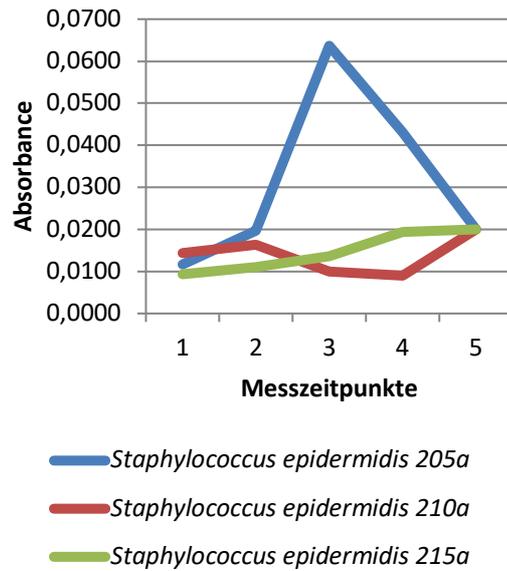
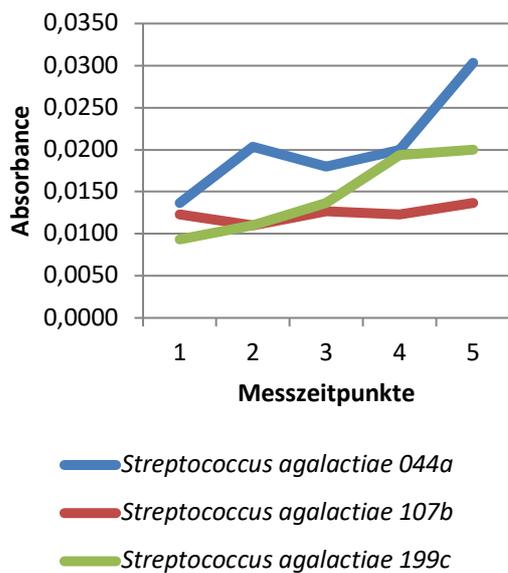


Abbildung 40 Absorbance *Serratia marcescens*

Abbildung 41 Absorbance *Staphylococcus capitis*Abbildung 42 Absorbance *Staphylococcus epidermidis*Abbildung 43 Absorbance *Streptococcus agalactiae*

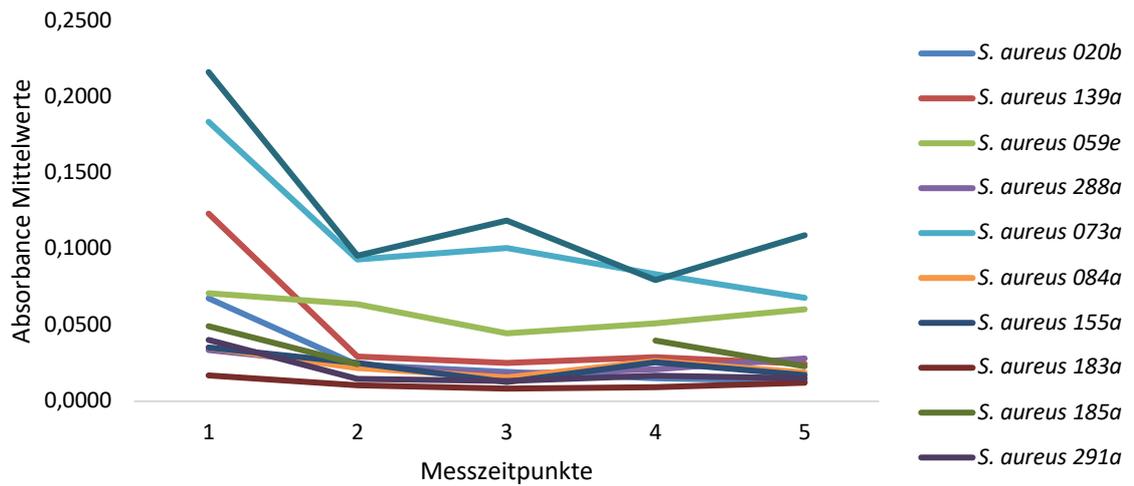


Abbildung 44 Absorbance *Staphylococcus aureus* Teil I

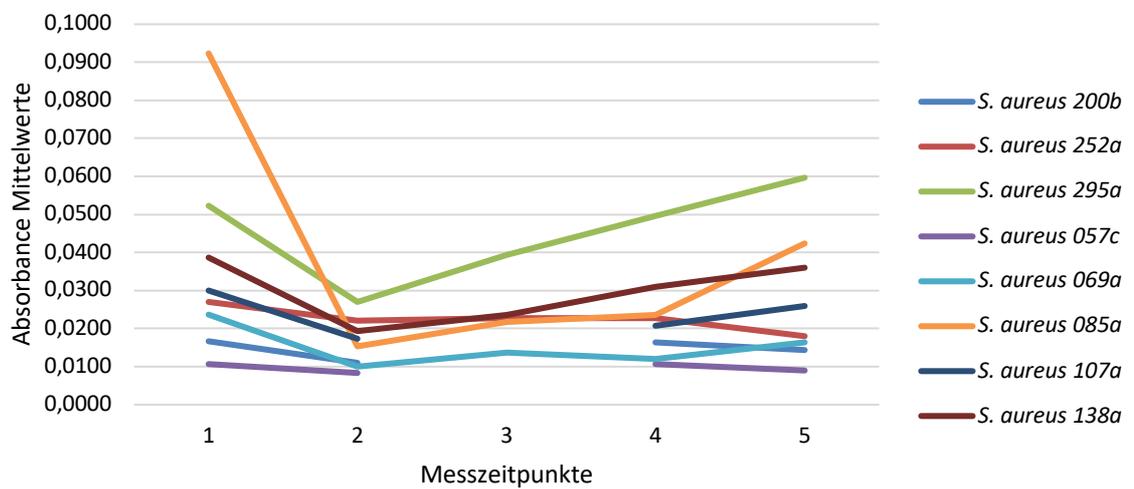


Abbildung 45 Absorbance *Staphylococcus aureus* Teil II

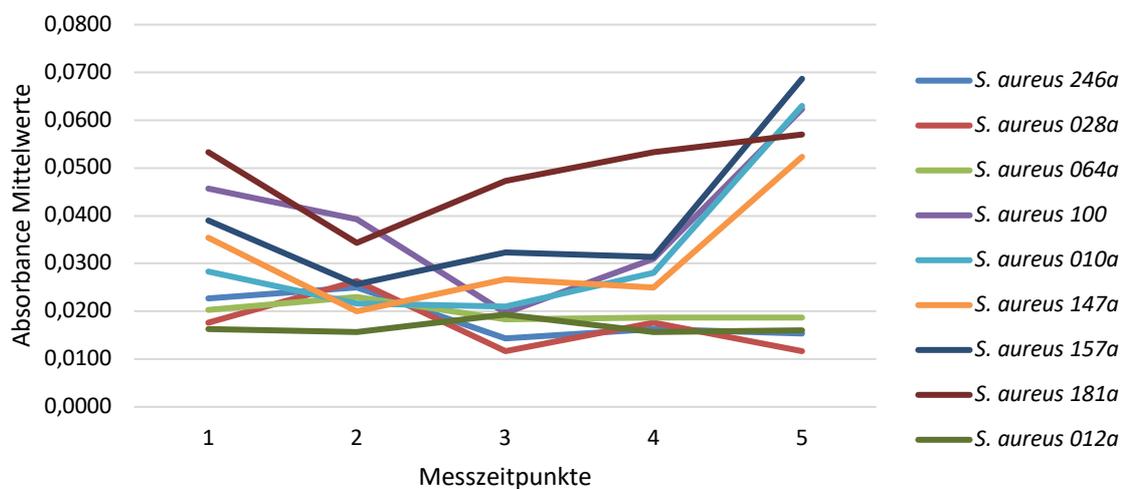


Abbildung 46 Absorbance *Staphylococcus aureus* Teil III

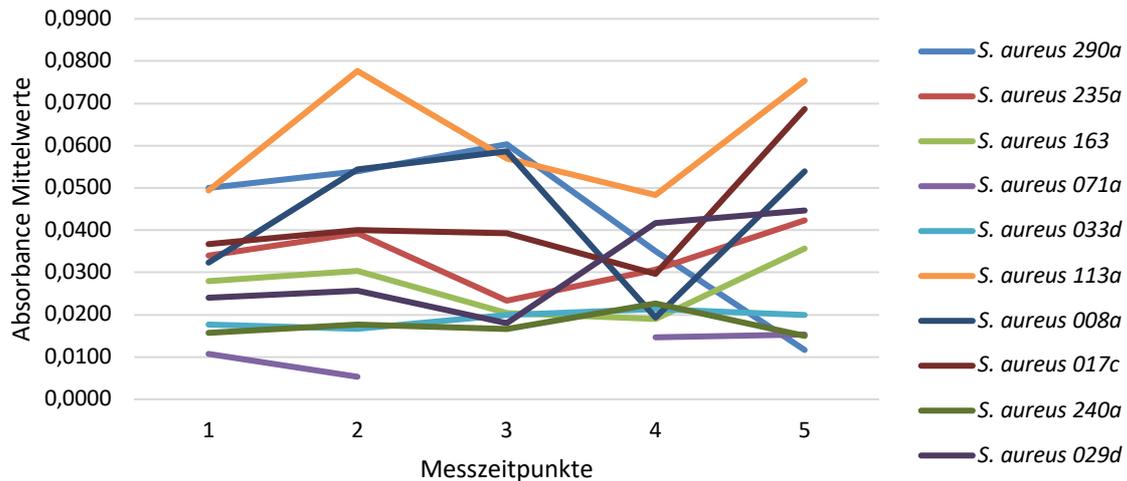


Abbildung 47 Absorbance *Staphylococcus aureus* Teil IV

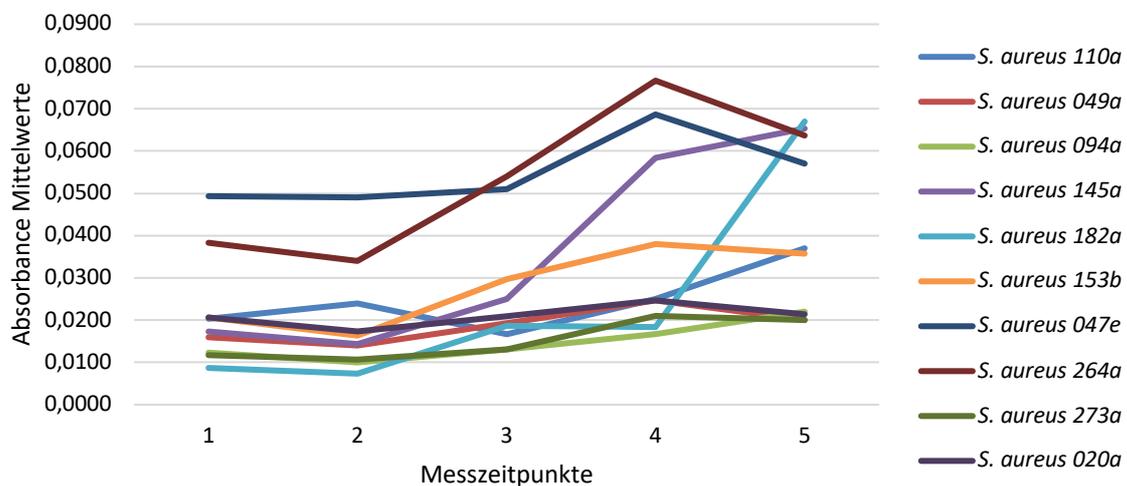


Abbildung 48 Absorbance *Staphylococcus aureus* Teil V

Diese bereits rein optisch an den Grafen ablesbaren Beobachtungen ließen sich auch in Zahlen ausdrücken. Eine kontinuierliche Zunahme der Absorbance war nur bei 6 % der Testreihen zu beobachten. Dennoch sprach die Tatsache, dass insgesamt in 42 % der Messreihen nach 2 Tagen der niedrigste Absorbance-Wert gemessen wurde, und in 40 % der Messreihen nach 10 Tagen der höchste Absorbance-Wert bestimmt wurde, für den tendenziellen Größenzuwachs der Biofilme über die Zeit. Nur in 19 % der Fälle wurde die größte Absorbance nach 2 Tagen und in 13 % der Fälle die niedrigste Absorbance nach 10 Tagen gemessen (Abb. 49).

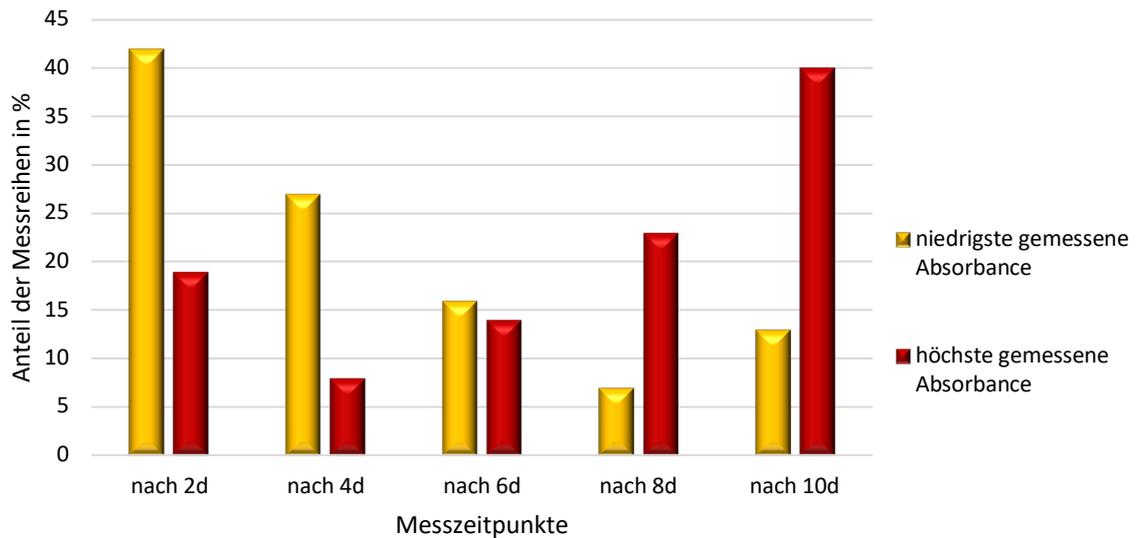


Abbildung 49 Absorbance-Entwicklung über die Zeit

Die durchschnittlich gemessene Absorbance aller 15 Werte einer Testreihe, schwankte zwischen den Werten 0,1239 – 0,0097. Mit 38 % lagen die meisten Werte zwischen 0,01 und 0,02. Nur 8 % der Testreihen erreichten im Durchschnitt eine Absorbance von 0,05 oder mehr. Etwa 1 % lag unter einer Absorbance von 0,01.

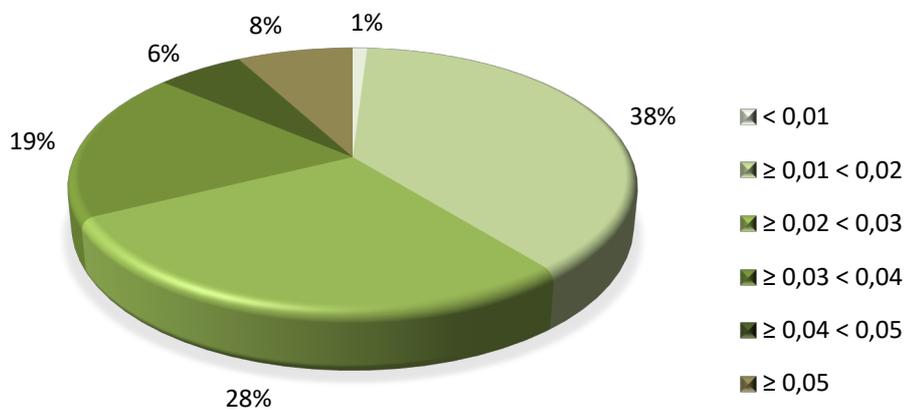


Abbildung 50 Gemittelte Absorbance nach Häufigkeit

4 Diskussion

Der Zweck der zugrundeliegenden Forschung war es, das Mikrobiom von diabetischen Fußinfektionen durch die Kombination verschiedener Methoden (Kultur, DHPLC-WAVE®-System und Real-Time-PCR) möglichst vollständig zu erfassen, und die gewonnenen Ergebnisse im Hinblick auf eine Verbesserung von Prävention, Diagnostik und Therapie von DFIs zu evaluieren. Insbesondere galt es dabei, die verschiedenen Stärken und Schwächen der einzelnen Methoden herauszuarbeiten, die klinische Relevanz der nachgewiesenen Erreger einzuordnen (Pathogen vs. Kolonisation, Pathogenitätsfaktoren, Infektionsquellen), und anhand dessen Empfehlungen für einen sinnvollen Einsatz von molekulargenetischen Methoden im Rahmen der Routinediagnostik abzugeben (z. B. Entwicklung eines Screening-Arrays auf Real-Time-PCR-Basis), wobei auch sich abzeichnende zukünftige Entwicklungen (Second- und Third-Generation-Sequencing) Berücksichtigung finden sollten.

Für die Erforschung der Mikrobiota in DFIs wurde zunächst die klinische Standardmethode – der kulturelle Erregernachweis – herangezogen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 80 verschiedene Spezies kulturell nachgewiesen. Rund 40 % der 497 Isolate konnten als Staphylokokken klassifiziert werden. *Staphylococcus aureus* wurde mit knapp 21 % aller Isolate am häufigsten angezüchtet. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit den Forschungsdaten anderer Studiengruppen (Citron et al., 2007; Perim et al., 2015), die *Staphylococcus aureus* ebenfalls als dominierenden Erreger in diabetischen Fußinfektionen isolierten. Und obwohl Gram-positive Arten in dieser Arbeit insgesamt überwogen, zählten die Erreger, die neben den Staphylokokken mit am häufigsten nachgewiesen wurden (*Pseudomonas aeruginosa* (ca. 9 % der Isolate), *Escherichia coli* und *Proteus mirabilis* (jew. ca. 4 % der Isolate)), zu den Gram-negativen Vertretern. Auch andere Studien untermauerten das Überwiegen Gram-positiver Kokken, wenngleich die drei genannten Gram-negativen Spezies ausnahmslos ebenfalls häufig angezüchtet wurden (Anvarinejad et al., 2015; Citron et al., 2007; Ge et al., 2002; Perim et al., 2015). In Bezug auf den Stoffwechsel der Erreger dominierten in dieser Arbeit fakultativ anaerobe Bakterien mit 84 % aller Isolate, wohingegen obligat anaerobe Spezies lediglich 1 % der Isolate ausmachten. Auch in anderen Studien wurden hauptsächlich Aerobier nachgewiesen, wobei der Anteil anaerober Spezies teils deutlich höher ausfiel. So untersuchten Claros et al. Proben aus DFIs, die unter Konditionen gewonnen und kultiviert wurden, welche speziell für das Wachstum von Anaerobiern optimiert waren, und konnten somit in rund 45 % aller Proben Anaerobier isolieren. Der Anteil von Anaerobiern machte gut 27 % aller Isolate aus, von denen *Prevotella ssp.*, *Porphyromonas ssp.*, *Bacteroides ssp.* und verschiedene Gram-positive anaerobe

Kokken am häufigsten angezüchtet werden konnten (Claros et al., 2013). Auch Citron et al. wiesen bei 49 % von 406 Proben aus DFIs anaerobe Bakterien mit ähnlichem Verteilungsmuster nach (Citron et al., 2007).

In ca. 54 % aller kulturell untersuchten Proben wurde in der vorliegenden Studie mehr als eine Spezies nachgewiesen. Die maximale Speziesvielfalt lag bei 8 verschiedenen Erregern in einer Probe. Auch andere Arbeitsgruppen haben bereits durch den kulturellen Erregernachweis eine Polymikrobialität von DFIs feststellen können (Lipsky et al., 2012a). Citron et al. wiesen in rund 84 % ihrer Proben polymikrobielle Infektionen von DFIs nach (Citron et al., 2007), und Claros et al. fanden durchschnittlich 2 bis 3 anaerobe bzw. aerobe Spezies je Probe (Claros et al., 2013). In einer kleineren kulturellen Studie von Anvarinejad et al., die 86 Patienten umfasste und nicht auf das Wachstum von anaeroben Spezies ausgelegt war, wurden hingegen in 79 % der Fälle monomikrobielle Infektionen von DFUs nachgewiesen (Anvarinejad et al., 2015).

Zusammengefasst zeigt der Vergleich der aktuellen Studienergebnisse mit den Recherchen anderer Forschungsgruppen Parallelen hinsichtlich häufig kultivierter Bakterien aus DFIs, aber auch deutliche Unterschiede in Bezug auf das übrige nachgewiesene Erregerspektrum auf. So wurden einzelne Spezies (z. B. *Streptococcus canis*, *Streptococcus milleri*, *Acinetobacter calcoaceticus*) und teils auch ganze Arten in nicht unerheblichem Umfang (z. B. *Pluralibacter spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Peptostreptococcus spp.*) von anderen Forschungsgruppen angezüchtet, die in der aktuellen Studie kulturell nicht nachgewiesen werden konnten (Anvarinejad et al., 2015; Citron et al., 2007; Ge et al., 2002). Besonders deutlich wird dies im Hinblick auf anaerobe Erreger. Auch zeigten sich bezüglich der Häufigkeitsverteilungen der Erreger in den unterschiedlichen Studien verschiedene Ergebnisse. In der aktuellen Studie machten Enterokokken beispielsweise 10 % der Isolate aus, während dieser Gattung bei Anvarinejad et al. 27 % der kulturell angezüchteten Bakterien zugeordnet werden konnten (Anvarinejad et al., 2015).

Ein wesentlicher Faktor, auf den die unterschiedlichen Studienergebnisse zum Teil zurückgeführt werden können, sind die Differenzen der genutzten Studienprotokolle in Bezug auf die verwendeten Nährmedien, Inkubationszeiten und anaerobe Kammern, die für die teils divergierenden Wachstumsbedingungen verschiedener Erreger unterschiedlich gut geeignet waren. Auch variierte das getestete Patientenkollektiv im Hinblick auf das Ursprungsland und das damit verbundene Klima, was eine andere Zusammensetzung der Mikrobiota begründen kann (Uçkay et al., 2014). Weiterhin gab es Variationen hinsichtlich des verwendeten Probenmaterials (z. B. Abstrichtupfer, Gewebebiopsien, Kürretage-Material und Nadelaspiration von purulentem Sekret). Dass dieser Faktor einen Einfluss auf die Studienergebnisse haben kann, zeigten Imirzalioglu et al., die in einem chronischen Ulcus verschiedene Bakterienpopulationen nachwiesen, je nachdem

aus welcher Gewebeschicht die Proben entnommen wurden (Imirzalioglu et al., 2014). Zudem wurden in die verschiedenen Studien Wunden unterschiedlicher Beschaffenheit (z. B. Schweregrad der Infektionen, Bestehensdauer der Wunden) eingeschlossen.

Die Tatsache, dass bereits der Vergleich verschiedener Studienergebnisse aus kulturellen Nachweisen eine größere Vielfalt der Erreger aus DFIs ergibt, lässt angesichts der Tatsache, dass die Kultivierung von Keimen mit gewissen Einschränkungen einher geht, bereits erahnen, dass die ergänzende Erforschung dieser Mikrobiota mit molekulargenetischen Methoden weitere Details und neue Erkenntnisse zu Tage bringen kann.

Diesem Ansatz folgend, wurde der kulturelle Erregernachweis in der aktuellen Studie um den Einsatz des DHPLC-WAVE®-Systems und der Real-Time-PCR ergänzt.

Sowohl die Untersuchungen mit dem DHPLC-WAVE®-System als auch mit der Real-Time-PCR bestätigten das häufige Vorkommen von *Staphylococcus aureus* in den untersuchten Proben (mit dem DHPLC-WAVE®-System ca. 22 % aller Nachweise, mit der Real-Time-PCR ca. 17 % aller Nachweise). Ebenso wurde von anderen Studiengruppen, die Proben aus DFIs mit molekulargenetischen Methoden untersuchten, *Staphylococcus aureus* als häufigstes Bakterium beschrieben (Wolcott et al., 2016).

Aber der Vergleich des übrigen Erregerspektrums zeigt deutliche Unterschiede. So fiel auf, dass insbesondere obligat anaerobe Organismen in der Kultur im Vergleich zu den molekularbiologischen Methoden wenig bis gar nicht detektierbar waren. Mit der Real-Time-PCR ließ sich in über der Hälfte der untersuchten Proben mindestens eine Anaerobier-Art nachweisen, womit der Anteil von Anaerobiern an allen Nachweisen bei gut 25 % lag. Es muss vermutet werden, dass sich dieser Anteil sogar noch hätte steigern lassen, wären in der Vorauswahl der Real-Time-PCR neben *Bacteroides spp.* und *Fusobacterium spp.* noch weitere obligate Anaerobier enthalten gewesen (z. B. die in anderen Studien kulturell häufig nachgewiesenen *Prevotella spp.* und *Porphyromonas spp.*). Dafür sprechen auch Studienergebnisse anderer Forschungsgruppen, die Proben aus DFIs mit molekulargenetischen Methoden untersucht haben. Wolcott et al. nutzten das 16S rDNA Pyrosequencing, um die Mikrobiota aus 910 DFUs zu untersuchen. Sie fanden die anaeroben Spezies *Fingoldia magna* in 25 % der Wunden, *Anaerococcus vaginalis* in 13 % und *Prevotella bivia* in 3 % der untersuchten Proben (Wolcott et al., 2016). Eine kleinere Studie wurde von Dowd et al. bereits 2008 vorgestellt, die das Bacterial Tag Encoded FLX Amplicon Pyrosequencing nutzten, um 40 Proben aus DFIs zu untersuchen. Hier zählten zudem *Peptoniphilus spp.* (in ca. 63 % der Proben), *Peptostreptococcus spp.* (in ca. 28 % der Proben) und *Clostridium spp.* (in ca. 20 % der Proben) zu den häufiger nachgewiesenen anaeroben Arten (Dowd et al., 2008). Malone et al., die Gewebebiopsien von 39 Patienten mit DFIs via Next Generation Sequencing untersuchten, berichten sogar, dass in 90 % der Proben die Anwesenheit von

Anaerobiern kulturell unterschätzt wurde (Malone et al., 2017). Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse überrascht es nicht, dass in der vorliegenden Studie mit Hilfe der Real-Time-PCR mehr Erreger je Probe nachgewiesen werden konnten, als es kulturell der Fall war. So lag die durchschnittliche Anzahl verschiedener Spezies je Probe bei 3 bis 4, während durchschnittlich nur 1 bis 2 Erreger je Probe isoliert werden konnten. Die maximal per Real-Time-PCR nachgewiesene Artenvielfalt in einer Probe lag bei 7 verschiedenen Spezies, womit die Real-Time-PCR der Kultur auf Grund des vorgegebenen Spektrums leicht unterlegen war. Von anderen Studiengruppen, die molekulargenetische Techniken ohne Spektrumeinschränkung nutzten, konnten deutlich mehr Spezies je Probe nachgewiesen werden. Smith et al. fanden unter Verwendung des 16S Amplicon Sequencing bis zu 21 verschiedene Spezies je Probe (Smith et al., 2016), bei Wolcott et al. ergab das 16S rDNA Pyrosequencing sogar bis zu 33 Spezies je Probe, wobei die Mehrheit der Wunden nur 2 bis 5 Spezies enthielt (Wolcott et al., 2016). Gardner et al. entnahmen bei 52 Patienten Abstriche von nicht infizierten DFUs, die sowohl per Kultur als auch per 16S RNA Sequencing untersucht wurden. Der Vergleich beider Methoden zeigte, dass per Kultur durchschnittlich 26 Spezies je Probe weniger identifiziert wurden, als es molekulargenetisch gelang (Gardner et al., 2013).

In Zusammenschau dieser Ergebnisse ist zu konstatieren, dass der kulturelle Nachweis gerade bei anspruchsvollen und langsam wachsenden Erregern an seine Grenzen stößt, und der Einsatz molekulargenetischer Methoden in der Forschung dazu beigetragen hat, ein umfassenderes Bild der Mikrobiota in DFIs zu erlangen, sodass die Polymikrobialität und Komplexität von DFIs in den letzten Jahren zunehmend entschlüsselt werden konnte.

Auf diese Weise zeichneten sich Infektionsquellen ab, deren Kenntnis im Rahmen der Prävention von DFIs hilfreich sein kann. So lässt sich der häufige Nachweis von *Staphylococcus aureus* in DFIs auf die Tatsache zurückführen, dass bei Diabetikern der Anteil von *Staphylococcus aureus* an der Hautflora des Fußes zu Ungunsten weniger virulenter, koagulasenegativer Bakterien deutlich zunimmt (Lavigne et al., 2015; Redel et al., 2013), und dass dieses Bakterium im Falle einer gestörten Hautbarriere und einer geschwächten Immunabwehr in den Fokus rückt. Und auch der Ursprung von DFIs mit anderen vorherrschenden Erregern liegt oftmals in der Mikrobiota der Haut. Die von Malone et al. via Next Generation Sequencing nachgewiesenen Bakterien waren zu über 50 % natürlich vorkommende Kommensalen der Haut. Weitere wichtige Quellen waren Umweltkeime (29,1 %), der Gastrointestinaltrakt (14 %) und die Mundflora (6,3 %) (Malone et al., 2017). Auch die in der vorliegenden Studie identifizierten Erreger lassen sich größtenteils diesen Kompartimenten zuordnen. Gerade in Anbetracht der Tatsache, dass ein Großteil der Mikrobiota der natürlichen Hautflora zuzuordnen ist, gilt es im

nächsten Schritt, die klinische Relevanz der nachgewiesenen Bakterien richtig einzuordnen.

So wurden Anaerobier bereits in anderen Studien als Teil einer komplexen Mischflora isoliert, und als Besiedler nekrotischer und ischämischer Wunden eingestuft (Uçkay et al., 2015). Schwere Infektionen wurden hingegen nicht mit ihrer Anwesenheit in Verbindung gebracht (Charles et al., 2015; Malone et al., 2017), und ob sie bei der Behandlung von Infektionen und bei der Auswahl des Antibiotikums berücksichtigt wurden, spielte mitunter keine wesentliche Rolle (Lipsky et al., 2004). Ähnliche Versuche wurden auch im Hinblick auf die Gram-Eigenschaften von Bakterien durchgeführt. Die Abdeckung Gram-negativer Bakterien erbrachte in einer Studie in den USA vergleichbare Therapieerfolge wie die Behandlung mit Antibiotikaregimen, die Gram-negative Erreger nicht berücksichtigten (Lipsky, Itani & Norden, 2004). Es zeigt sich also, dass nicht alle nachgewiesenen Bakterien auch als wahre Pathogene fungieren müssen.

Die Wahrscheinlichkeit von Infektionen geht häufig mit der Virulenz der nachgewiesenen Mikroorganismen einher. Bei β -hämolisierenden Streptokokken wurde beispielsweise schon ab 10^2 CFU/g Gewebe ein Gewebeschaden nachgewiesen (Dow, Browne, & Sibbald, 1999).

Ein weiteres bisher übliches Hilfsmittel zur Einschätzung der Relevanz eines Bakteriums als Infektionserreger ist dessen Anzahl. Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei einem dominanten Erreger mit massenhaftem Vorkommen um den wahren Pathogen handelt (Lipsky et al., 2012a). Um eine Aussage zur Quantität treffen zu können, wurden die Ergebnisse der Real-Time-PCR herangezogen.

Schaut man sich die Untersuchungen an, so war eine große Streubreite der Nachweiszahlen zu erkennen. Zwischen den verschiedenen Erregern reichten diese durchschnittlich von ca. $2 \cdot 10^5$ Exemplaren je Probe bis $> 77 \cdot 10^9$. Dass diese Differenz auch durch große Schwankungen innerhalb der Bakterienarten zustande kommt, zeigen die Standardabweichungen, die für 11 von den 13 Bakterienarten, die via Real-Time-PCR nachgewiesen wurden, größer waren als der zugehörige Mittelwert. In einer Probe wurde lediglich *Staphylococcus lugdunensis* mit ca. $3 \cdot 10^3$ Erregern nachgewiesen, womit dieser schon als dominanter Erreger galt, während in einer anderen Probe über $3 \cdot 10^{12}$ Exemplare von *Staphylococcus capitis* das dominante Bakterium darstellten. Somit sind die absoluten Nachweiszahlen der verschiedenen Erreger allein betrachtet kaum aussagekräftig, wenn es um die Dominanz eines Erregers geht. Deshalb wurden die Nachweiszahlen der verschiedenen Erreger innerhalb einer Probe miteinander ins Verhältnis gesetzt, um Aussagen zur Dominanz treffen zu können. Bei nur 5 % der Proben machte die dominante Art weniger als 50 % der nachgewiesenen Bakterien aus, wohingegen bei 65 % der Proben > 90 % der nachgewiesenen Organismen der dominanten Art

zugeordnet werden konnten. Da sowohl diese Daten als auch andere Studien die häufige Anwesenheit von *Staphylococcus aureus* in diabetischen Fußulcera nahelegten, galt es zu überprüfen, ob dieser Erreger dominant ist, und somit als wahrer Infektionserreger angesehen werden kann. Es zeigte sich, dass in allen per Real-Time-PCR untersuchten Proben *Staphylococcus aureus* mit 36 % am häufigsten die dominierende Art war. Die Dominanz war noch eindrücklicher, wenn man lediglich die Proben betrachtete, in denen *Staphylococcus aureus* per Real-Time-PCR nachgewiesen wurde. In diesem Kollektiv konnte sich *Staphylococcus aureus* sogar in 67 % der Fälle als dominierendes Bakterium durchsetzen. Aber auch obligat anaerobe und Gram-negative Bakterien sowie koagulasenegative Staphylokokken, die, wie bereits zuvor erläutert wurde, als wenig virulent oder lediglich besiedelnder Bestandteil einer Mischflora angesehen werden, zählten zu den dominierenden Keimen. So war *Staphylococcus capitis* in 20 % der Proben die dominierende Art und sowohl für *Pseudomonas aeruginosa* als auch *Bacteroides sp.* galt dies in jeweils 10 % der Fälle. Auch Wolcott et al. untersuchten die Dominanz der nachgewiesenen Erreger aus DFIs. Sie zeigten, dass Staphylokokken in 51 % der Proben, in denen sie identifiziert wurden, mehr als 10 % der Bakterienpopulation ausmachten. Für die anaeroben Arten *Fingoldia* und *Anaerococcus* galt dies in jew. 10 % der Proben (Wolcott et al., 2016).

Diese Daten zeigen, dass die verschiedenen Ansatzpunkte zur Identifikation des wahren Infektionserregers sich in Teilen widersprechen. Es mag also durchaus seine Berechtigung haben, davon auszugehen, dass das opportunistische Vorhandensein einer einzelnen Mikrobe oft nicht für eine Infektion ausreicht, sondern erst die Kombination verschiedener Erreger innerhalb einer Mischflora die Voraussetzungen für eine manifeste Entzündungsreaktion schafft (Glaudemans et al., 2015; Ramakant et al., 2011). Dass sich innerhalb einer Mischflora trotzdem Keime als dominant erweisen können, und einige aufgrund ihrer Pathogenitätsfaktoren eher Entzündungsreaktionen auslösen können, steht dieser Aussage nicht entgegen.

Schaut man sich die Entwicklung einer individuellen Wundflora über die Zeit an, so können diese Thesen noch um eine weiter ergänzt werden. Die Wundflora von zwei Patienten wurde zu jeweils fünf verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf von 4 Monaten exemplarisch mit allen drei Methoden untersucht und es konnte festgestellt werden, dass *Staphylococcus aureus* in jeder einzelnen Probe nachweisbar war. Die Zusammensetzung der übrigen Bakterien variierte jedoch von Probe zu Probe. Hinzu kam, dass *Staphylococcus aureus* auch in jeder einzelnen Probe quantitativ mit weitem Abstand der vorherrschende Erreger war. In Zusammenschau dieser Beobachtungen wird bei den Fallbeispielen die Theorie bestätigt, dass es sich bei massenhaft nachgewiesenen Erregern in der Regel um den wahren Pathogen handelt, dass diese trotz ihrer Dominanz

Bestandteil einer Mischflora sind, und dass virulente Keime eher als Infektionserreger prädestiniert sind. Zusätzlich kann die konstante Präsenz eines Erregers über die Zeit als weiterer Faktor angesehen werden, der zur Identifikation des wahren Pathogens beiträgt.

Nachdem diese Aspekte eingehend ausgeleuchtet wurden, sollte evaluiert werden, ob und wann es sinnvoll erscheint, die Verfahren der Routinediagnostik um andere Methoden zu ergänzen.

In den Versuchen hat sich bei den Proben, die mit allen drei Methoden untersucht wurden, das größte Keimspektrum mit 25 verschiedenen Arten beim kulturellen Nachweis gezeigt. Für die gleichen Proben konnten via Real-Time-PCR im Rahmen der zuvor festgelegten Auswahl 12 verschiedene Arten festgestellt werden. Die Kultur kann somit als geeignete Methode für ein Screening auf Infektionserreger angesehen werden, zumal sie gleichzeitig die Vorteile einer breiten Verfügbarkeit, einer leichten Handhabung und verhältnismäßig niedriger Kosten bietet. Neben dem bereits genannten Schwachpunkt, dem eingeschränkten Nachweis besonders anspruchsvoller Bakterien, liegt ein weiteres Manko der Kultur in der Dauer von mehreren Tagen bis Wochen, bis erste Ergebnisse zur Verfügung stehen.

Daher wäre ein mögliches Szenario, bei dem der Einsatz molekulargenetischer Methoden ergänzend zur Routine eingesetzt werden sollte, die gezielte Suche nach bestimmten Erregern, die erwartungsgemäß schlecht kulturell nachweisbar sind, und das Ergebnis überdies möglichst rasch vorliegen sollte (z. B. bei lebensbedrohlichen schweren Infektionen mit septischen Verläufen).

Da die Real-Time-PCR im Verlauf der letzten Jahre zusehends günstiger einsetzbar und breiter verfügbar geworden ist, würde sie sich zu diesem Zwecke gut eignen. In diesem Rahmen wäre ein Screening-Array hilfreich, wie es bereits für andere Fragestellungen entwickelt wurde (z. B. endemisch und epidemisch auftretende schwere Diarrhoen, respiratorische Infekte, oder Meningitiden) (Liu et al., 2013, Liu et al., 2016; Onyango et al., 2017; Wolff et al., 2017; Zhao et al., 2019).

Welche Erreger in diesem Suchlauf vertreten sein sollten, kann von Region zu Region unterschiedlich sein. In warmen Klimazonen (Indien, mittlerer Osten, Afrika) wurden beispielsweise Gram-negative Stäbchen wie *Pseudomonas aeruginosa* als vorherrschende Erreger in DFIs identifiziert (Uçkay et al., 2014), während sie im nord-westlichen Europa eher eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen (Lipsky et al., 2004). In den aktuellen Untersuchungen wurden Staphylokokken (insbesondere *Staphylococcus aureus*, aber auch *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus capitis* und *Staphylococcus lugdunensis*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*,

Streptococcus agalactiae, *Corynebacterium striatum* und *Morganella morganii* am häufigsten via Kultur nachgewiesen, was sich auch mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen deckt, sodass diese Arten für gemäßigte Klimazonen in ein Screening mit aufgenommen werden sollten, zumal *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Proteus mirabilis* in den Untersuchungen via Real-Time-PCR zusammen über 50 % der dominierenden Bakterien stellten. Zwar wären diese Erreger prinzipiell auch kulturell gut nachweisbar, aber gerade in Situationen, in denen schnell eine adäquate antibiotische Therapie eingeleitet werden muss, kann es hilfreich sein, Informationen zum Erregerspektrum bereits nach wenigen Stunden zu erhalten. So kann das abzudeckende Erregerspektrum besser eingegrenzt werden, und Aspekten wie der „Enterokokkenlücke“ von Cephalosporinen, oder dem Vorhandensein von *Pseudomonas aeruginosa*, welcher häufig Resistenzen aufweist und vorzugsweise mit einer Kombination aus verschiedenen Präparaten behandelt werden sollte, Rechnung getragen werden, ohne dass wertvolle Reserveantibiotika ungezielt verbraucht werden müssen. Ergänzend sollten auch die in unserer und anderen Studien häufig nur molekularbiologisch detektierten Keime (z. B. *Bacteroides spp.*, *Finegoldia spp.*, *Anaerococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.* und *Prevotella spp.*) in den standardisierten Suchlauf mit aufgenommen werden. Mit diesem Spektrum wären häufige Erreger und auch ein Teil der üblichen Mischflora mit abgebildet.

Was die Real-Time-PCR im Gegensatz zur Kultur jedoch nicht leisten kann, sind definitive Aussagen zur Resistenzlage der nachgewiesenen Keime und die Bereitstellung eines Antibiogramms. Das Whole Genome Sequencing (WGS) stellt hingegen Informationen über Spezies, Serotypen, Virulenzfaktoren und Resistenzen bereit, wobei das Feld der Transkriptomik ergänzt werden muss, um Aussagen zur Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp machen zu können. Zwar stehen schon seit den 1970er Jahren Technologien zur Verfügung, mit denen die Entschlüsselung eines vollständigen Genoms möglich ist, und so wurde 1995 mit der Sanger-Methode bereits erstmalig das Genom eines frei lebenden Mikroorganismus (*Hämophilus influenza*) veröffentlicht, jedoch waren diese Prozesse initial mit hohen Kosten, einem enormen Zeit- und Arbeitsaufwand und dem Einsatz toxischer und radioaktiver Substanzen verbunden (Besser et al., 2018). Seit der Einführung des Massively Parallel Sequencing konnte der Arbeits- und Zeitaufwand bedeutend reduziert werden, sodass heute ganze Genomsequenzen in weniger als 30 Stunden zur Verfügung stehen. Heutzutage werden Ausführungen des Next Generation Sequencing angeboten, die sich mitunter nicht nur für den Einsatz in der Wissenschaft eignen, sondern bei moderaten Anschaffungs- und Betriebskosten (Sequenzierung eines menschlichen Genoms für weniger als 1000 \$) sowie benutzerfreundlichen Arbeitsprozessen auch für den Einsatz in öffentlichen Routinelaboren

gedacht sind (Buermans & den Dunnen, 2014). Dabei basieren die verschiedenen Systeme von Illumina (MiniSeq, MiSeq, NextSeq, HiSeq, NovaSeq) auf dem Einbau fluoreszierender dNTPs, während die Geräte von IonTorrent (PGM, S5, IonProton) pH-Veränderungen messen, die durch die Freisetzung von H⁺-Ionen bei der Polymerisation entstehen (Besser et al., 2018). Trotz sinkender Kosten und einem reduzierten Zeitaufwand sowie benutzerfreundlichen Arbeitsabläufen sind die neueren molekularen Techniken für einen flächendeckenden Einsatz noch nicht vollständig ausgereift. Bei den Anwendungen werden enorme Datenmengen produziert, die nach Verbesserungen auf dem Gebiet der Bioinformatik und der Informatik-Infrastruktur verlangen. Auch ist gerade in GC-reichen Regionen mit homopolymeren Sequenzen mit einer erhöhten Fehlerrate der Systeme zu rechnen (Besser et al., 2018; Buermans & den Dunnen, 2014). Bis dato existieren verschiedene Plattformen mit unterschiedlichen Daten und Fehler-Profilen, was den Vergleich von bereits generierten Daten unterschiedlicher Forschungsgruppen mit verschiedenen Systemen erschwert (Besser et al., 2018). Mit dem MinION hat Oxford Nanopore Technologies eine Technologie vorgestellt, die einigen Nachteilen des Massively Parallel Sequencing entgegenwirken soll. Bei dieser Methode werden lange Single-DNA-Stränge durch eine Pore geleitet, wodurch Änderungen des elektrischen Feldes entstehen, die Rückschlüsse auf die durchlaufenden Sequenzen zulassen. Auch wenn diese Technik noch nicht ausgereift ist, und ebenfalls teils hohe Fehlerraten zu erwarten sind, macht sie v. a. ihre Größe im USB-Stick-Format attraktiv (Buermans & den Dunnen, 2014). Auf diese Weise ist es z. B. möglich, das „Labor“ zur Probe zu bringen und nicht anders herum, sodass Proben direkt an ihrer Quelle sequenziert werden können.

Im Gegensatz zu dieser „Zukunftsmusik“ kann die Real-Time-PCR bereits heute großflächig eingesetzt werden. Neben dem geschilderten Einsatz bei schweren und septisch verlaufenden DFIs könnten die Daten auch einen Beitrag zur Qualitätssicherung der Wundversorgung und der Probengewinnung leisten. Schaut man sich die exemplarischen Follow-up-Untersuchungen an, so zeigt sich v. a. in der dritten Probe des ersten Patienten eine ausgeprägte Mischflora mit insgesamt 8 nachgewiesenen Bakterien, davon 5, die lediglich in dieser einen Probe zu finden waren. Eine mögliche Erklärung kann ein unzureichendes Wunddebridement vor der Probengewinnung sein, was zu einer Kontamination der gewonnenen Probe geführt haben könnte.

Das gründliche Wunddebridement ist auch nach der nationalen Versorgungsleitlinie für Typ 2 Diabetes der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) neben der Wahl des richtigen Antibiotikums ein weiterer wichtiger Faktor, der für eine erfolgreiche Sanierung des Infektionsherdes unabdingbar ist (Bauer et al., 2010). Denn viele Bakterien, die aus diabetischen Fußinfektionen isoliert werden konnten, sind zur Bildung von Biofilmen in der Lage. Diese schützen die Erreger vor Einflüssen des Immunsystems und vor der

Wirkung von Antibiotika. Zudem bildet der Biofilm eine Umgebung, die den Austausch von Virulenzfaktoren zwischen verschiedenen Bakterienarten begünstigt. Die Vertreter einer Bakterienspezies, die Teil des Biofilms sind, unterscheiden sich aber nicht nur hinsichtlich der Pathogenitätsfaktoren von den frei beweglichen Bakterien, sondern auch hinsichtlich ihres Stoffwechsellages. So haben sie mitunter deutlich reduzierte Replikationsraten, was sie kulturell nur schwer nachweisbar macht. Mittels molekularbiologischer Methoden sind auch diese Bakterien in den Proben zu detektieren.

In der aktuellen Studie wurden verschiedene Bakterien, die aus diabetischen Fußinfektionen isoliert wurden, auf ihre Biofilmbildung hin untersucht. Es hat sich gezeigt, dass bei nahezu allen Spezies zwar eine Zunahme des Biofilms im zeitlichen Verlauf zu erkennen war, dieser Prozess jedoch nicht konstant verlief, sondern immer wieder Schwankungen verzeichnet wurden. Diese Schwankungen können im Rahmen der Umbauprozesse innerhalb eines Biofilms interpretiert werden, die u. a. dazu dienen, einzelne Bakterienkonglomerate freizusetzen, und auf dem Prinzip des Quorum-sensing beruhen. Diese Auf- und Abbauprozesse und der Biofilmschutz erschweren die Sanierung von diabetischen Fußinfektionen. Auch für diesen Umstand kann man sich die Ergebnisse der Follow-up-Patienten näher anschauen. Im zeitlichen Verlauf ist es nicht gelungen *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lugdunensis* oder *Acinetobacter* aus den Wunden zu eliminieren. Die Nachweiszahlen schwankten im Verlauf, was durch das immer wieder neue Ausschwemmen von Bakterien aus dem Biofilm erklärbar ist, und die Chronifizierung von Wunden mitbedingt.

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass es sich bei der Entstehung und der Aufrechterhaltung diabetischer Fußwunden um einen komplexen Prozess handelt, der in einem gewissen Rahmen für alle betroffenen Patienten in gleichen Bahnen verläuft, jedoch durch viele verschiedene inter- und intraindividuelle Faktoren beeinflusst wird, und letztendlich individuell und im zeitlichen Verlauf immer wieder neu evaluiert werden muss, um die Therapie an den einzelnen Patienten und die aktuelle Situation anpassen zu können. Neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet helfen das Wund- und Infektionsmanagement stetig zu verbessern, jedoch bedarf es zur Optimierung der Diagnostik und Therapiemethoden v. a. auf dem Gebiet der Molekularbiologie weiterer Forschung.

5 Zusammenfassung

Das diabetische Fußsyndrom ist eine weit verbreitete Komplikation des Diabetes mellitus mit steigender Prävalenz, was das Gesundheitswesen vor vielfältige neue Herausforderungen stellt. Vor allem Infektionen von diabetischen Fußulcera schränken die Lebensqualität der betroffenen Patienten ein, und gehen mit Amputationen, Sepsis und einer erhöhten Letalität einher. Sowohl für die Therapie dieser Infektionen als auch für deren Prävention ist die Kenntnis des verursachenden Erregerspektrums essenziell. Da der kulturelle Erregernachweis mit einer Reihe von Einschränkungen einhergeht, und mit dieser Methode allein nur ein unvollständiges Erregerspektrum detektiert werden kann, rücken molekulargenetische Verfahren auch in der Routinediagnostik immer mehr in den Fokus.

In dieser Arbeit wurden 286 Abstriche von 159 Patienten mit DFIs des Universitätsklinikums Gießen (UKGM) mittels Bakterien-Kultur, quantitativer Real-Time-PCR und PCR/DHPLC mit dem Ziel untersucht, ein möglichst umfassendes Bild der Mikrobiota diabetischer Fußinfektionen zu generieren.

Die Auswertung der Ergebnisse ergab einen deutlich höheren Nachweis anaerober Bakterien mittels molekulargenetischer Verfahren (Kultur 1 % vs. Real-Time-PCR 25 %). Auch die durchschnittliche Anzahl der nachgewiesenen Bakterien je Probe fiel mittels Real-Time-PCR höher aus als beim kulturellen Nachweis (Kultur 1-2 vs. Real-Time-PCR 3-4). Am häufigsten konnte mit allen Methoden *Staphylococcus aureus* nachgewiesen werden (Kultur 21 %, Real-Time-PCR 17 %, PCR/DHPLC 22 %), aber auch Gram-negative Spezies wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* und *Proteus mirabilis* waren oft vertreten. Insgesamt präsentierte sich ein polymikrobielles Bild diabetischer Fußinfektionen, in dem die einzelnen Erreger oftmals zur Bildung von Biofilmen in der Lage waren. Trotz dieser teils symbiotischen Existenz in einer Mischflora ergab die quantitative Analyse via Real-Time-PCR in über der Hälfte der Proben die eindeutige Dominanz (> 90 %) einer einzelnen Art. Eine exemplarische Auswertung von Follow-Up-Proben zeigte überdies die zeitliche Konstanz der dominierenden Bakterien im weiteren Verlauf, was zusammengenommen Rückschlüsse auf die Rolle eines Erregers als wahrer Pathogen zulässt.

Die Ergebnisse dieser Forschung können unter Berücksichtigung der Resultate anderer Arbeitsgruppen zur Etablierung eines Screening-Arrays via Real-Time-PCR zu Diagnostikzwecken im klinischen Alltag genutzt werden. Für Aussagen zur Resistenzlage und anderen Virulenzfaktoren eignet sich dieses Verfahren jedoch nicht. Diesbezüglich bleiben die Entwicklungen auf dem Gebiet des Second- und Third-Generation-Sequencing

abzuwarten, welches sich noch nicht für den flächendeckenden Einsatz in der Routinediagnostik eignet.

Summary

The diabetic foot syndrome is a common complication of diabetes mellitus with increasing prevalence, raising a variety of new challenges for the healthcare system. Especially infections of diabetic foot ulcers cause decreased quality of life and are associated with amputations, sepsis and increased lethality. Knowledge of the causative pathogen spectrum is essential both for the therapy of these infections and for their prevention. Since the cultural methods for detection of microorganisms come with a number of limitations and the pathogen spectrum detected with these methods alone remains incomplete, molecular genetic methods are receiving more and more attention in routine diagnostics as well.

In this study, 286 smears from 159 patients with diabetic foot infections of the University Hospital of Giessen (UKGM) were examined by means of culture, quantitative Real-Time-PCR and PCR/DHPLC in order to get a comprehensive picture of the microbiota of diabetic foot infections.

The evaluation of the results showed a more frequent detection of anaerobic bacteria by molecular genetic methods (culture 1 % vs. Real-Time-PCR 25 %). The average number of bacteria detected per sample was also higher by Real-Time-PCR than by culture (culture 1-2 vs. Real-Time-PCR 3-4). The bacterium most frequently found by all methods was *Staphylococcus aureus* (culture 21 %, Real-Time-PCR 17 %, PCR/DHPLC 22 %), but Gram-negative species such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Proteus mirabilis* were also commonly detected. Overall, diabetic foot infections were found to be polymicrobial. The cultured bacteria were often able to form biofilms and to live together in a symbiotic collective, but despite their existence in a mixed flora, quantitative analysis via Real-Time-PCR showed in more than half of the samples that a single species makes up more than 90 % of all microorganisms. These dominant bacteria were also constantly detected in some follow up samples, which, taken together, allows conclusions to be drawn about their role as a true pathogen.

The results of this study in combination with the findings of other research groups can be used to establish a screening array via Real-Time-PCR for diagnostic purposes in everyday clinical practice. However, this method is not suitable for assessing the antimicrobial resistance or other virulence factors. In this regard, developments in the field of second- and third-generation sequencing, which are not yet suitable for common use in routine diagnostics, remain to be seen.

6 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
ABI	Ankle Brachial Index
AK	Antikörper
AMP	antimikrobielle Peptide
ASL	arterielle Spinmarkierung
BRD	Bundesrepublik Deutschland
bzw.	Beziehungsweise
cm ²	Quadratcentimeter
cmH ₂ O	Zentimeter Wassersäule
CMV	Zytomegalievirus
d	Days (Tage)
DAS	digitale Subtraktionsangiographie
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DFI	Diabetische Fuß Infektion
DFS	Diabetisches Fuß Syndrom
DFU	Diabetische Fuß Ulcera
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNOAP	diabetische Neuroosteoarthropathie
EPS	extrazelluläre polymere Substanz
et al.	und andere
FEP	functional equivalent Pathogroup
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
i. d. R.	In der Regel
ICDF	International Consensus on Diabetic Foot
IDF	International Diabetes Federation
IDSA	Infectious Diseases Society of America
IWGDF	the International Working Group on the Diabetic Foot
l	Liter
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
Mio.	Millionen
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
MRA	Magnetresonanztomographie
Mrd.	Milliarden
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus

MRT	Magnetresonanztomographie
NDS	Neuropathie Defizit Score
NSS	Neuropathie Symptom Score
p. o.	per os
paVK	perifere arterielle Verschlusskrankheit
RIP	RNA inhibiting Peptide
rpm	Round per minute
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
sek.	Sekunden
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrom
Tab.	Tabelle
TCC	Total Contact Cast
tcPO ₂	transkutaner Sauerstoffpartialdruck
u. U.	unter Umständen
v. a.	vor allem
VBNC	Viable but not culturable
WGS	Whole Genome Sequencing
WHO	World Health Organisation
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Verschiedene Phasen der Biofilmentwicklung	37
Abbildung 2 Ausgangsmaterial Abstrichtupfer	45
Abbildung 3 Inkubierte Agarplatten	46
Abbildung 4 Positiver Agglutinationstest	46
Abbildung 5 Prinzip MALDI TOF	47
Abbildung 6 Maxwell® MDx Aufreinigungssystem	48
Abbildung 7 Prinzip der TaqMan-Sonden	51
Abbildung 8 Verdünnungsreihe	56
Abbildung 9 Anordnung für Standardkurven-Lauf	57
Abbildung 10 Standardkurve mit <i>Escherichia coli</i> für SYBR-Green	58
Abbildung 11 Amplification Plot für die Standardkurve mit <i>Escherichia coli</i> für SYBR-Green	58
Abbildung 12 Schematischer Aufbau des DHPLC-WAVE®-Systems	59
Abbildung 13 DHPLC-Chromatogramm	60
Abbildung 14 Beispielhaftes Foto der Gelelektrophorese von WAVE-PCR-Produkten	62
Abbildung 15 Eingefärbte Biofilme in unterschiedlicher Ausprägung: a) positiv b) negativ	63
Abbildung 16 Gelöstes Crystal Violet zur Absorbance-Messung	63
Abbildung 17 Stoffwechseleigenschaften kulturell nachgewiesener Bakterien	65
Abbildung 18 Gesamtheit kulturell nachgewiesener Arten	67
Abbildung 19 <i>Staphylococcus aureus</i> und übrige Staphylokokken-Arten anteilig an der Gesamtheit der kulturell nachgewiesenen Arten	67
Abbildung 20 Stoffwechseleigenschaften per Real-Time-PCR nachgewiesener Bakterien	68
Abbildung 21 Stoffwechseleigenschaften per DHPLC-WAVE®-System nachgewiesener Bakterien	69
Abbildung 22 Methodenvergleich Kultur vs. Real-Time-PCR – nachgewiesene Artenvielfalt	70
Abbildung 23 Methodenvergleich Kultur vs. Real-Time-PCR – Stoffwechseleigenschaften des detektierten Erregerspektrums	71

Abbildung 24 Methodenvergleich Kultur vs. DHPLC-WAVE®-System – Stoffwechseleigenschaften des detektierten Erregerspektrums.....	72
Abbildung 25 Methodenvergleich Kultur vs. Real-Time-PCR vs. DHPLC-WAVE®-System – nachgewiesene Artenvielfalt	72
Abbildung 26 Methodenvergleich: durchschnittliche Artenvielfalt je Probe	73
Abbildung 27 Methodenvergleich: Übereinstimmung des Erregernachweises via Kultur und Real-Time-PCR	75
Abbildung 28 Prozentualer Anteil des per Real-Time-PCR detektierten dominierenden Bakteriums je Probe	77
Abbildung 29 Dominierende Bakterien aller per Real-Time-PCR untersuchten Proben	78
Abbildung 30 Dominierendes Bakterium anteilig an seiner Nachweishäufigkeit per Real-Time-PCR	78
Abbildung 31 Keimspektrum im zeitlichen Verlauf (Follow-up-Patient 1)	80
Abbildung 32 Prozentualer und absoluter Anteil des dominierenden Bakteriums im zeitlichen Verlauf	80
Abbildung 33 Keimspektrum im zeitlichen Verlauf (Follow-up-Patient 2)	81
Abbildung 34 Prozentueller und absoluter Anteil des dominierenden Bakteriums im zeitlichen Verlauf	82
Abbildung 35 Absorbance <i>Enterococcus faecalis</i>	83
Abbildung 36 Absorbance <i>Escherichia coli</i>	83
Abbildung 37 Absorbance <i>Klebsiella oxytoca</i>	84
Abbildung 38 Absorbance <i>Morganella morganii</i>	84
Abbildung 39 Absorbance <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	84
Abbildung 40 Absorbance <i>Serratia marcescens</i>	84
Abbildung 41 Absorbance <i>Staphylococcus capitis</i>	85
Abbildung 42 Absorbance <i>Staphylococcus epidermidis</i>	85
Abbildung 43 Absorbance <i>Streptococcus agalactiae</i>	85
Abbildung 44 Absorbance <i>Staphylococcus aureus</i> Teil I.....	86
Abbildung 45 Absorbance <i>Staphylococcus aureus</i> Teil II.....	86
Abbildung 46 Absorbance <i>Staphylococcus aureus</i> Teil III.....	86
Abbildung 47 Absorbance <i>Staphylococcus aureus</i> Teil IV	87

Abbildung 48 Absorbance <i>Staphylococcus aureus</i> Teil V.....	87
Abbildung 49 Absorbance-Entwicklung über die Zeit.....	88
Abbildung 50 Gemittelte Absorbance nach Häufigkeit.....	88

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 WHO-Diagnosekriterien des Diabetes mellitus 2006 (WHO/IDF).....	2
Tabelle 2 Formen des Diabetes mellitus nach DDG 2009	2
Tabelle 3 Klassifikation diabetischer Fußläsionen nach Wagner und Armstrong.....	5
Tabelle 4 PEDIS Klassifikation diabetischer Fußläsionen	5
Tabelle 5 IDSA und IWGDF Klassifikation der Schwere einer Infektion	11
Tabelle 6 Risikoklassifizierung für das Auftreten von Fußläsionen der IWGDF	24
Tabelle 7 Annealing-Temperaturen für die verschiedenen Runs.....	55
Tabelle 8 Einstellungen des Gradienten "mixed species"	60
Tabelle 9 Patientenkollektiv	64
Tabelle 10 Eingeschlossenes Probenmaterial.....	65
Tabelle 11 Kulturell positiv nachgewiesene Erreger	66
Tabelle 12 Per Real-Time-PCR untersuchte Arten	68
Tabelle 13 per DHPLC-WAVE®-System isolierte Gattungen.....	69
Tabelle 14 Patientenkollektiv des Biofilmversuchs.....	82
Tabelle 15 Auf Biofilmbildung getestete Bakterienspezies	83

9 Literaturverzeichnis

- Aguiree, F., Brown, A., Cho, N. H., & Dahlquist, G. (2014). IDF Diabetes Atlas. *IDF Diabetes Atlas - Sixth Edition*, 6. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2009.10.007>
- Aly, R., Shirley, C., Cunico, B., & Maibach, H. I. (1978). Effect of Prolonged Occlusion on the Microbial Flora, pH, Carbon Dioxide and Transepidermal Water Loss on Human Skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 71, 378–381.
- Anvarinejad et al. (2015). Isolation and Antibiotic Susceptibility of the Microorganisms Isolated from Diabetic Foot Infections in Nemazee Hospital, Southern Iran. *Journal of Pathogens*, 2015, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2015/328796>
- Aragón-Sánchez, F. J., Cabrera-Galván, J. J., Quintana-Marrero, Y., Hernández-Herrero, M. J., Lázaro-Martínez, J. L., García-Morales, E., ... Armstrong, D. G. (2008). Outcomes of surgical treatment of diabetic foot osteomyelitis: a series of 185 patients with histopathological confirmation of bone involvement. *Diabetologia*, 51(11), 1962–1970. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-1131-8>
- Aragón-Sánchez, J. (2011a). A review of the basis of surgical treatment of diabetic foot infections. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 10(1), 33–65. <https://doi.org/10.1177/1534734611400259>
- Aragón-Sánchez, J. (2011b). Seminar Review: A Review of the Basis of Surgical Treatment of Diabetic Foot Infections. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 10(1), 33–65. <https://doi.org/10.1177/1534734611400259>
- Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powers, M. E., & Shirtliff, M. E. (2011). Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*, 2(5), 445–459. <https://doi.org/10.4161/viru.2.5.17724>
- Armstrong, D. G., Holtz-Neiderer, K., Wendel, C., Mohler, M. J., Kimbriel, H. R., & Lavery, L. A. (2007). Skin temperature monitoring reduces the risk for diabetic foot ulceration in high-risk patients. *The American Journal of Medicine*, 120(12), 1042–1046. [https://doi.org/S0002-9343\(07\)00739-5](https://doi.org/S0002-9343(07)00739-5) [pii]r10.1016/j.amjmed.2007.06.028
- Backhouse, M., Nelson, A., Wright-Hughes, A., Bhogal, M., Brown, S., Reynolds, C., ... Nixon, J. (2015). CODIFI (Concordance in Diabetic Foot Infection): Agreement in reported presence of likely pathogens in swabs and tissue samples from infected diabetic foot ulcers. *Journal of Foot and Ankle Research*, 8(Suppl 1), A2. <https://doi.org/10.1186/1757-1146-8-S1-A2>
- Balaban, N., Cirioni, O., Giacometti, A., Ghiselli, R., Braunstein, J. B., Silvestri, C., ... Scalise, G. (2007). Treatment of Staphylococcus aureus biofilm infection by the quorum-sensing inhibitor RIP. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(6), 2226–2229. <https://doi.org/10.1128/AAC.01097-06>
- Barshes, N., Sigeriddi, M., Wrobel, J., Mahankali, A., Robbins, J., & Koungias, P. (2013). The System of Care for the Diabetic Foot: Objectives, Outcomes and Opportunities. *Diabetic Foot & Ankle*, 4, 21847.
- Bauer, H., Germann, G., Gries, F. A., Imig, H., Morbach, S., Riepe, G., ... Witte, M. (2010). Nationale Versorgungsleitlinien Typ 2 Diabetes - Präventions- und Behandlungsstrategien für Fußkomplikationen, 2.8, 1–96.
- Beech, I. B., & Gaylarde, C. C. (1999). Recent Advances in the Study of Biocorrosion—an overview. *Revista de Microbiologia*, 30, 177–190.
- Berendt, A. R., Peters, E. J. G., Bakker, K., Embil, J. M., Eneroth, M., Hinchliffe, R. J., ... Valk, G. D. (2008). Diabetic foot osteomyelitis: a progress report on diagnosis and a systematic review of treatment. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 24 Suppl 1, S145-61. <https://doi.org/10.1002/dmrr.836>
- Berger, M. (2000). *Diabetes mellitus* (2. Auflage). Urban & Fischer.

- Berlanga, M., & Guerrero, R. (2016). Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microbial Cell Factories*, 15(165), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0569-5>
- Bernard, L., Assal, M., Garzoni, C., & Uçkay, I. (2011). Predicting the pathogen of diabetic toe osteomyelitis by two consecutive ulcer cultures with bone contact. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 30(2), 279–281. <https://doi.org/10.1007/s10096-010-1078-9>
- Besser, J., Carleton, H. A., Gerner-Smidt, P., Lindsey, R. L., & Trees, E. (2018). Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(4), 335–341. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.013>
- Boulton, A. J. M., Vileikyte, L., Ragnarson-Tennvall, G., & Apelqvist, J. (2005). The global burden of diabetic foot disease. *Lancet*, 366(9498), 1719–1724. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67698-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67698-2)
- Bridier, A., Sanchez-Vizueté, P., Guilbaud, M., Piard, J. C., Naïtali, M., & Briandet, R. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology*, 45(PB), 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.015>
- Buermans, H. P. J., & den Dunnen, J. T. (2014). Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842(10), 1932–1941. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.015>
- Butalia, S., Palda, V. A., Sargeant, R. J., Detsky, A. S., & Mourad, O. (2008). Does this patient with diabetes have osteomyelitis of the lower extremity? *JAMA*, 299(7), 806–813. <https://doi.org/10.1001/jama.299.7.806>
- Caballero, E., & Frykberg, R. G. (1998). Diabetic foot infections. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*, 37(3), 248–255. [https://doi.org/10.1016/S1067-2516\(98\)80119-1](https://doi.org/10.1016/S1067-2516(98)80119-1)
- Callewaert, C., Hutapea, P., Van de Wiele, T., & Boon, N. (2014). Deodorants and antiperspirants affect the axillary bacterial community. *Archives of Dermatological Research*, 306(8), 701–710. <https://doi.org/10.1007/s00403-014-1487-1>
- Capone, K. A., Dowd, S. E., Stamatias, G. N., & Nikolovski, J. (2011). Diversity of the human skin microbiome early in life. *The Journal of Investigative Dermatology*, 131(10), 2026–2032. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.168>
- Capriotti, G., Chianelli, M., & Signore, A. (2006). Nuclear medicine imaging of diabetic foot infection: results of meta-analysis. *Nuclear Medicine Communications*, 27(10), 757–764. <https://doi.org/10.1097/01.mnm.0000230065.85705.b3>
- Caputo, G. M., Cavanagh, P. R., Ulbrecht, J. S., Gibbons, G. W., & Karchmer, A. W. (1994). Assessment and Management of Foot Disease in Patients with Diabetes. *New England Journal of Medicine*, 331(13), 854–860. <https://doi.org/10.1056/NEJM199409293311307>
- Cecilia-Matilla, A., Lázaro-Martínez, J. L., Aragón-Sánchez, J., García-Morales, E., García-Álvarez, Y., & Beneit-Montesinos, J. V. (2013). Histopathologic characteristics of bone infection complicating foot ulcers in diabetic patients. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, 103(1), 24–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23328849>
- Cervantes-García, E., García-González, R., Reséndiz-Albor, A., & Salazar-Schettino, P. M. (2015). Infections of Diabetic Foot Ulcers With Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 14(1), 44–49. <https://doi.org/10.1177/1534734614564053>
- Chaignon, P., Sadovskaya, I., Ragunah, C., Ramasubbu, N., Kaplan, J. B., & Jabbouri, S. (2007). Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(1), 125–132. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0790-y>

- Chantelau, E., Wolf, A., Ozdemir, S., Hachmöller, A., & Ramp, U. (2007). Bone histomorphology may be unremarkable in diabetes mellitus. *Medizinische Klinik (Munich)*, 102(6), 429–433. <https://doi.org/10.1007/s00063-007-1055-y>
- Charles, P. G. P., Uçkay, I., Kressmann, B., Emonet, S., & Lipsky, B. A. (2015). The role of anaerobes in diabetic foot infections. *Anaerobe*, 34, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.03.009>
- Chen, Y. E., & Tsao, H. (2013). The skin microbiome: Current perspectives and future challenges. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 69(1), 143–155. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2013.01.016>
- Ciampolini, J., & Harding, K. G. (2000). Pathophysiology of chronic bacterial osteomyelitis. Why do antibiotics fail so often? *Postgraduate Medical Journal*, 76(898), 479–483. <https://doi.org/10.1136/pmj.76.898.479>
- Citron, D. M., Goldstein, E. J. C., Merriam, C. V., Lipsky, B. A., & Abramson, M. A. (2007). Bacteriology of moderate-to-severe diabetic foot infections and in vitro activity of antimicrobial agents. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2819–2828. <https://doi.org/10.1128/JCM.00551-07>
- Claros, M., Citron, D. M., Goldstein, E. J. C., Merriam, C. V., & Tyrrell, K. L. (2013). Differences in distribution and antimicrobial susceptibility of anaerobes isolated from complicated intra-abdominal infections versus diabetic foot infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 76(4), 546–548. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.04.025>
- Cogen, A. L., Yamasaki, K., Muto, J., Sanchez, K. M., Alexander, L. C., Tanios, J., ... Gallo, R. L. (2010). Staphylococcus epidermidis antimicrobial δ -toxin (phenol-soluble modulins- γ) cooperates with host antimicrobial peptides to kill group A Streptococcus. *PLoS ONE*, 5(1), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008557>
- Cogen, A. L., Yamasaki, K., Sanchez, K. M., Dorschner, R. A., Lai, Y., MacLeod, D. T., ... Gallo, R. L. (2010). Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from Staphylococcus epidermidis, a normal resident of the skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 130(1), 192–200. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.243>
- Costerton, J W, Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5418), 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Costerton, J William, Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., Sn, S., & Lapping-scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Reviews Microbiology*, 49, 711–745. <https://doi.org/0066-4227/9511 00 1-0711>
- Cundell, A. M. (2016). Microbial Ecology of the Human Skin. *Microbial Ecology*, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0789-6>
- Cutting, K. F., & White, R. (2004). Defined and refined: criteria for identifying wound infection revisited. *British Journal of Community Nursing*, 9(3), 6–15. <https://doi.org/10.12968/bjcn.2004.9.Sup1.12495>
- Davey, M. E., & O'toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 64(4), 847–867. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000>
- de Meijer, V. E., van't Sant, H. P., Spronk, S., Kusters, F. J., & den Hoed, P. T. (2008). Reference value of transcutaneous oxygen measurement in diabetic patients compared with nondiabetic patients. *Journal of Vascular Surgery*, 48(2), 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2008.03.010>
- Delamaire, M., Maugeudre, D., Moreno, M., Le Goff, M. C., Allannic, H., & Genetet, B. (1997). Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabetic Medicine : A Journal of the British Diabetic Association*, 14(1), 29–34. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9136\(199701\)14:1<29::AID-DIA300>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9136(199701)14:1<29::AID-DIA300>3.0.CO;2-V)

- Dinh, M. T., Abad, C. L., & Safdar, N. (2008). Diagnostic accuracy of the physical examination and imaging tests for osteomyelitis underlying diabetic foot ulcers: meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 47(4), 519–527. <https://doi.org/10.1086/590011>
- Domann, E., Hong, G., Imirzalioglu, C., Kühle, J., Watzel, C., Hain, T., ... Ku, J. (2003). Culture-Independent Identification of Pathogenic Bacteria and Polymicrobial Infections in the Genitourinary Tract of Renal Transplant Recipients Culture-Independent Identification of Pathogenic Bacteria and Polymicrobial Infections in the Genitourinary Tr. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5500–5510. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5500>
- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26), 11971–11975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>
- Donovan, A., & Schweitzer, M. E. (2008). Current Concepts in Imaging Diabetic Pedal Osteomyelitis. *Radiologic Clinics of North America*, 46(6), 1105–1124. <https://doi.org/10.1016/j.rcl.2008.08.004>
- Dow, G., Browne, A., & Sibbald, R. (1999). Infection in chronic wounds: controversies in diagnosis and treatment. *Ostomy Wound Management*, 45(8), 29–40.
- Dowd, G. S. E., Linge, K., & Bentley, G. (1983). Measurement of Transcutaneous Oxygen Pressure in Normal and Ischaemic Skin. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 65-B(1), 79–83.
- Dowd, S. E., Wolcott, R. D., Sun, Y., McKeehan, T., Smith, E., & Rhoads, D. (2008). Polymicrobial nature of chronic diabetic foot ulcer biofilm infections determined using bacterial tag encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *PLoS ONE*, 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003326>
- Dumville, J. C., O'Meara, S., Deshpande, S., & Speak, K. (1996). Alginate dressings for healing diabetic foot ulcers. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2(6), CD009110. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009110.pub2>
- Dumville, J., Deshpande, S., O'Meara, S., & Speak, K. (2013). Hydrocolloid dressings for healing diabetic foot ulcers. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)*, 2(8). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009099.pub3>. www.cochranelibrary.com
- Egert, M., Simmering, R., Arweiler, N. B., & Netuschil, L. (2016). *Microbiota of the Human Body*. (A. Schwartz, Ed.). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-31248-4>
- Elamurugan, T. P., Jagdish, S., Kate, V., & Chandra Parija, S. (2011). Role of bone biopsy specimen culture in the management of diabetic foot osteomyelitis. *International Journal of Surgery*, 9(3), 214–216. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2010.11.011>
- Elias, P. M. (2007). The skin barrier as an innate immune element. *Seminars in Immunopathology*, 29(1), 3–14. <https://doi.org/10.1007/s00281-007-0060-9>
- Faglia, E., Clerici, G., Caminiti, M., Quarantiello, A., Curci, V., & Morabito, A. (2007). Predictive Values of Transcutaneous Oxygen Tension for Above-the-ankle Amputation in Diabetic Patients with Critical Limb Ischemia. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 33(6), 731–736. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2006.12.027>
- Fierer, N., Hamady, M., Lauber, C. L., & Knight, R. (2008). The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(46), 17994–17999. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807920105>

- Findley, K., Oh, J., Yang, J., Conlan, S., Deming, C., Meyer, J. A., ... Segre, J. A. (2013). Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature*, 498(7454), 367–370. <https://doi.org/10.1038/nature12171>
- Fleischer, A. E., Didyk, A. A., Woods, J. B., Burns, S. E., Wrobel, J. S., & Armstrong, D. G. (2009). Combined clinical and laboratory testing improves diagnostic accuracy for osteomyelitis in the diabetic foot. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*, 48(1), 39–46. <https://doi.org/10.1053/j.jfas.2008.09.003>
- Flemming, H., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Foulongne, V., Sauvage, V., Hebert, C., Dereure, O., Cheval, J., Manuguerra, J., ... Eloit, M. (2012). Human Skin Microbiota : High Diversity of DNA Viruses Identified on the Human Skin by High Throughput Sequencing. *PLoS ONE*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038499>
- Frykberg, R. G., Bevilacqua, N. J., & Habershaw, G. (2010). Surgical off-loading of the diabetic foot. *Journal of Vascular Surgery*, 52(3 SUPPL.), 44S-58S. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2010.06.008>
- Frykberg, R. G., & Veves, A. (1996). Diabetic Foot Infections. *Diabetes/ Metabolism Reviews*, 12(3), 255–270.
- Gao, Z, Tseng, C. H., Pei, Z., & Blaser, M. J. (2007). Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *The National Academy of Sciences of the USA*, 104(8), 2927–2932. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607077104>
- Gao, Z., Perez-Perez, G. I., Chen, Y., & Blaser, M. J. (2010). Quantitation of major human cutaneous bacterial and fungal populations. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(10), 3575–3581. <https://doi.org/10.1128/JCM.00597-10>
- Gardner, S. E., & Frantz, R. A. (2008). Wound bioburden and infection-related complications in diabetic foot ulcers. *Biological Research for Nursing*, 10(1), 44–53. <https://doi.org/10.1177/1099800408319056>
- Gardner, S. E., Hillis, S. L., Heilmann, K., Segre, J. A., & Grice, E. A. (2013). The neuropathic diabetic foot ulcer microbiome is associated with clinical factors. *Diabetes*, 62(3), 923–930. <https://doi.org/10.2337/db12-0771>
- Garrett, T. R., Bhakoo, M., & Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18(9), 1049–1056. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.04.001>
- Ge et al. (2002). Microbiological profile of infected diabetic foot ulcers. *Diabetic Medicine*, 19(12), 1032–1034.
- Giacomoni, P. U., Mammone, T., & Teri, M. (2009). Gender-linked differences in human skin. *Journal of Dermatological Science*, 55(3), 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2009.06.001>
- Gjødsbøl, K., Christensen, J. J., Karlsmark, T., Jørgensen, B., Klein, B. M., & Kroghfelt, K. A. (2006). Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *International Wound Journal*, 3(3), 225–231.
- Glaudemans, A. W. J. M., Uçkay, I., & Lipsky, B. A. (2015). Challenges in diagnosing infection in the diabetic foot. *Diabetic Medicine*, 32(6), 748–759. <https://doi.org/10.1111/dme.12750>
- Gontcharova, V., Youn, E., Sun, Y., Wolcott, R. D., & Dowd, S. E. (2010). A comparison of bacterial composition in diabetic ulcers and contralateral intact skin. *The Open Microbiology Journal*, 4, 8–19. <https://doi.org/10.2174/1874285801004010008>
- Grice, E. A., Kong, H. H., Conlan, S., Deming, C. B., Davis, J., Young, A. C., ... Segre, J. A. (2009). Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5931), 1190–1192. <https://doi.org/10.1126/science.1171700>
- Grice, E. A., & Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nature Reviews. Microbiology*, 9(4), 244–253. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2537>

- Grice, E. a, Kong, H. H., Renaud, G., Grice, E. a, Kong, H. H., Renaud, G., ... Segre, J. a. (2008). A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Research*, *18*, 1043–1050. <https://doi.org/10.1101/gr.075549.107>
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention - a journey to break the wall: a review. *Archives of Microbiology*, *198*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1148-6>
- Gurjala, A. N., Geringer, M. R., Seth, A. K., Hong, S. J., Smeltzer, M. S., Galiano, R. D., ... Mustoe, T. A. (2011). Development of a novel, highly quantitative in vivo model for the study of biofilm-impaired cutaneous wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, *19*(3), 400–410. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2011.00690.x>
- Hauer, H., Landgraf, R., Hoffman, R., Schwarz, P. E. H., Siegel, E. G., Siegel, E., ... Dänschel, I. (2013). Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2012. *Diabetes/IDE*, 1–211.
- Häussler, B., Klein, S., & Hagenmeyer, E. (2010). *Weißbuch Diabetes in Deutschland* (2. Auflage). Stuttgart: Thieme.
- Hettich, R. L., Pan, C., Chourey, K., & Giannone, R. J. (2013). Metaproteomics: harnessing the power of high performance mass spectrometry to identify the suite of proteins that control metabolic activities in microbial communities. *Analytical Chemistry*, *85*(9), 4203–4214. <https://doi.org/10.1021/ac303053e>
- Hochlenert, D., Engels, G., & Morbach, S. (2014). *Das Diabetische Fußsyndrom*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Imirzalioglu, C., Sethi, S., Schneider, C., Hain, T., Chakraborty, T., Mayser, P., & Domann, E. (2014). Distinct polymicrobial populations in a chronic foot ulcer with implications for diagnostics and anti-infective therapy. *BMC Research Notes*, *7*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-196>
- Iwase, T., Uehara, Y., Shinji, H., Tajima, A., Seo, H., Takada, K., ... Mizunoe, Y. (2010). Staphylococcus epidermidis Esp inhibits Staphylococcus aureus biofilm formation and nasal colonization. *Nature*, *465*(7296), 346–349. <https://doi.org/10.1038/nature09074>
- Izano, E. A., Amarante, M. A., Kher, W. B., & Kaplan, J. B. (2008). Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(2), 470–476. <https://doi.org/10.1128/AEM.02073-07>
- James, G. A., Swogger, E., Wolcott, R., Pulcini, E. D., Secor, P., Sestrich, J., ... Stewart, P. S. (2008). Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, *16*(1), 37–44. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x>
- Jeffcoate, W. J., & Lipsky, B. A. (2004). Controversies in diagnosing and managing osteomyelitis of the foot in diabetes. *Clinical Infectious Diseases*, *39* Suppl 2, 115–122. <https://doi.org/10.1086/383272>
- Jung, R., Soondrum, K. M. N. (2000). Quantitative PCR. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *38*(9), 833–836.
- Karatan, E., & Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, *73*(2), 310–347. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00041-08>
- Kashef, N., G, E. D., Siroosy, M., A, T. K., F, H. Z., & Fateh, M. (2011). Photodynamic inactivation of drug-resistant bacteria isolated from diabetic foot ulcers. *Iranian Journal of Microbiology*, *3*(1), 36–41.
- Kearney, J. N., Harnby, D., Gowland, G., & Holland, K. T. (1984). The follicular distribution and abundance of resident bacteria on human skin. *Journal of General Microbiology*, *130*(4), 797–801. <https://doi.org/10.1099/00221287-130-4-797>

- Keenan, A. M., Tindel, N. L., & Alavi, A. (1989). Diagnosis of pedal osteomyelitis in diabetic patients using current scintigraphic techniques. *Archives of Internal Medicine*, *149*(10), 2262–2266. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2802892>
- Kingsley, A., Lewis, T., & White, R. (2011). Debridement and wound biofilms. *Journal of Wound Care*, *20*(6), 286. <https://doi.org/10.12968/jowc.2011.20.6.284>
- Kokare, C. R., Chakraborty, S., Khopade, A. N., & Mahadik, K. R. (2009). Biofilm: Importance and applications. *Indian Journal of Biotechnology*, *8*(2), 159–168.
- Kong, H. H. (2012). Skin microbiome: genomics-based insight into the diversity and role of skin microbes. *Trends in Molecular Medicine*, *17*(6), 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.01.013>.Skin
- Kong, H. H., & Segre, J. A. (2012). Skin Microbiome: Looking Back to Move Forward. *Journal of Investigative Dermatology*, *132*(3), 933–939. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.417>
- Lai, Y., Cogen, A. L., Radek, K. A., Park, H. J., Macleod, D. T., Leichtle, A., ... Gallo, R. L. (2010). Activation of TLR2 by a small molecule produced by *Staphylococcus epidermidis* increases antimicrobial defense against bacterial skin infections. *The Journal of Investigative Dermatology*, *130*(9), 2211–2221. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.123>
- Lavery, L. A., Armstrong, D. G., Peters, E. J. G., & Lipsky, B. A. (2007). Probe-to-Bone Test for Diagnosing Diabetic Foot Osteomyelitis - Reliable or relic? *Diabetes Care*, *30*, 270–274. <https://doi.org/10.2337/dc06-1572>
- Lavery, L. A., Armstrong, D. G., Wunderlich, R. P., Mohler, M. J., Wendel, C. S., & Lipsky, B. A. (2006). Risk factors for foot infections in individuals with diabetes. *Diabetes Care*, *29*(6), 1288–1293. <https://doi.org/10.2337/dc05-2425>
- Lavigne, J.-P., Sotto, A., Dunyach-Remy, C., & Lipsky, B. A. (2015). New Molecular Techniques to Study the Skin Microbiota of Diabetic Foot Ulcers. *Advances in Wound Care*, *4*(1), 38–49. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0532>
- Lawall, H., & Kiehm, C. (2009). Leitlinien zur Diagnostik und Therapie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (PAVK). *Deutsche Gesellschaft Für Angiologie/ Gesellschaft Für Gefäßmedizin*, (065), 1–121.
- Lawall, H., Luedemann, C., Amann, B., & Tigges, W. (2013). Das diabetische Fußsyndrom. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, *138*(2), 2503–2506. <https://doi.org/10.1007/s00108-010-2733-z>
- Lesens, O., Desbiez, F., Vidal, M., Robin, F., Descamps, S., Beytout, J., ... Tauveron, I. (2011). Culture of per-wound bone specimens: a simplified approach for the medical management of diabetic foot osteomyelitis. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *17*(2), 285–291. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03194.x>
- Lipsky, B. A., Napolitano, L. M., Moran, G. J., Vo, L., Nicholson, S., Chen, S., ... Kim, M. (2014). Economic outcomes of inappropriate initial antibiotic treatment for complicated skin and soft tissue infections: A multicenter prospective observational study. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *79*(2), 266–272. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.02.013>
- Lipsky, B. A., Napolitano, L. M., Moran, G. J., Vo, L., Nicholson, S., & Kim, M. (2014). Inappropriate initial antibiotic treatment for complicated skin and soft tissue infections in hospitalized patients: Incidence and associated factors. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *79*(2), 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.02.011>
- Lipsky, B. A., Peters, E. J. G., Senneville, E., Berendt, A. R., Embil, J. M., Lavery, L. A., ... Jeffcoate, W. J. (2012). Expert opinion on the management of infections in the diabetic foot. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, *28*(Suppl 1), 163–178. <https://doi.org/10.1002/dmrr>

- Lipsky, B. a, Armstrong, D. G., Citron, D. M., Tice, A. D., Morgenstern, D. E., & Abramson, M. a. (2005). Ertapenem versus piperacillin / tazobactam for diabetic foot infections (SIDESTEP): prospective , randomised , controlled , double-blinded , multicentre trial. *The Lancet*, 366, 1695–1703.
- Lipsky, B A. (1997). Osteomyelitis of the foot in diabetic patients. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 25(6), 1318–1326. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9431370>
- Lipsky, Benjamin A., Berendt, A. R., Cornia, P. B., Pile, J. C., Peters, E. J. G., Armstrong, D. G., ... Senneville, E. (2012). 2012 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Diabetic Foot Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 54(12), 132–173. <https://doi.org/10.1093/cid/cis346>
- Lipsky, Benjamin A., Itani, K., & Norden, C. (2004). Treating Foot Infections in Diabetic Patients: A Randomized, Multicenter, Open-Label Trial of Linezolid versus Ampicillin-Sulbactam/Amoxicillin-Clavulanate. *Clinical Infectious Diseases*, 38(1), 17–24. <https://doi.org/10.1086/380449>
- Lipsky, Benjamin A., Richard, J. L., & Lavigne, J. P. (2013). Diabetic foot ulcer microbiome: One small step for molecular microbiology one giant leap for understanding diabetic foot ulcers. *Diabetes*, 62(3), 679–681. <https://doi.org/10.2337/db12-1325>
- Lipsky, Benjamin A, Aragón-Sánchez, J., Diggle, M., Embil, J., Kono, S., Lavery, L., ... International Working Group on the Diabetic Foot. (2016). IWGDF guidance on the diagnosis and management of foot infections in persons with diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 32(Suppl 1), 45–74. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2699>
- Lipsky, Benjamin A, Berendt, A. R., Deery, H. G., Embil, J. M., Joseph, W. S., Karchmer, A. W., ... Tan, J. S. (2004). Diagnosis and Treatment of Diabetic Foot Infections. *Guidelines for Diabetic Foot Infections*, 39, 885–910.
- Lipsky, Benjamin A, Pecoraro, R. E., Larson, S. A., Ahroni, J. H., & Hanley, M. E. (1990). Outpatient Management of Uncomplicated Lower-Extremity Infections in Diabetic Patients. *Archives of Internal Medicine*, 150, 790–797.
- Littman, D. R., & Pamer, E. G. (2011). Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. *Cell Host & Microbe*, 10(4), 311–323. <https://doi.org/10.1002/ana.22528>.Toll-like
- Liu, J., Gratz, J., Amour, C., Kibiki, G., Becker, S., Janaki, L., ... Houpt, E. R. (2013). A laboratory-developed taqman array card for simultaneous detection of 19 enteropathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(2), 472–480. <https://doi.org/10.1128/JCM.02658-12>
- Liu, J., Ochieng, C., Wiersma, S., Ströher, U., Towner, J. S., Whitmer, S., ... Fields, B. (2016). Development of a TaqMan Array Card for Acute-Febrile-Illness Outbreak Investigation and Surveillance of Emerging Pathogens, Including Ebola Virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(1), 49–58. <https://doi.org/10.1128/jcm.02257-15>
- Mackay, I. M. (2002). Real-Time-PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30(6), 1292–1305. <https://doi.org/10.1093/nar/30.6.1292>
- Mackay, I. M. (2004). Real-Time-PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10, 190–212.
- Malone, M., Gosbell, I. B., Dickson, H. G., Vickery, K., Espedido, B. A., & Jensen, S. O. (2016). Can molecular DNA-based techniques unravel the truth about diabetic foot infections? *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2834>

- Malone, M., Johani, K., Jensen, S. O., Gosbell, I. B., Dickson, H. G., Hu, H., & Vickery, K. (2017). Next Generation DNA Sequencing of Tissues from Infected Diabetic Foot Ulcers. *EBioMedicine*, *21*, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.06.026>
- Marangos, M. N., Skoutelis, A. T., Nightingale, C. H., Zhu, Z. H. U., Psyrogiannis, A. G., Nicolau, D. P., ... Quintiliani, R. (1995). Absorption of Ciprofloxacin in Patients with Diabetic Gastroparesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *39*(9), 2161–2163.
- Marić, S., & Vraneš, J. (2007). Characteristics and significance of microbial biofilm formation. *Periodicum Biologorum*, *109*(2), 115–121.
- Markakis, K., Bowling, F. L., & Boulton, A. J. M. (2016). The diabetic foot in 2015: an overview. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, *32*, 169–178. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2740>
- Marples, R. R., Downing, D. T., & Kligman, a M. (1971). Control of free fatty acids in human surface lipids by *Corynebacterium acnes*. *The Journal of Investigative Dermatology*, *56*(2), 127–131. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12260695>
- Martina, I. S. J., van Koningsveld, R., Schmitz, P. I. M., van der Meché, F. G. A., & van Doorn, P. A. (1998). Measuring vibration threshold with a graduated tuning fork in normal aging and in patients with polyneuropathy. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *65*, 743–747. <https://doi.org/10.1136/jnnp.65.5.743>
- Morrison, W. B., Schweitzer, M. E., Wapner, K. L., Hecht, P. J., Gannon, F. H., & Behm, W. R. (1995). Osteomyelitis in feet of diabetics: clinical accuracy, surgical utility, and cost-effectiveness of MR imaging. *Radiology*, *196*(2), 557–564. <https://doi.org/10.1148/radiology.196.2.7617877>
- Moyer, J., Wilson, D., Finkelshtein, I., Wong, B., & Potts, R. (2012). Correlation Between Sweat Glucose and Blood Glucose in Subjects with Diabetes. *Diabetes Technology & Therapeutics*, *14*(5).
- Mueller, N. T., Bakacs, E., Combellick, J., Grigoryan, Z., & Maria, G. (2015). The infant microbiome development: mom matters. *Trends in Molecular Medicine*, *21*(2), 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.12.002>
- Murugaiyan, J., & Roesler, U. (2017). MALDI-TOF MS Profiling-Advances in Species Identification of Pests, Parasites, and Vectors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*(May). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00184>
- Nagy, I., Pivarcsi, A., Kis, K., Koreck, A., Bodai, L., McDowell, A., ... Kemény, L. (2006). *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. *Microbes and Infection*, *8*(8), 2195–2205. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.04.001>
- Naik, S., Bouladoux, N., Wilhelm, C., Molloy, M. J., Salcedo, R., Kastenmuller, W., ... Belkaid, Y. (2012). Compartmentalized Control of Skin Immunity by Resident Commensals. *Science*, *337*(August), 1115–1120. <https://doi.org/10.1126/science.1225152>
- Nakatsuji, T., Chiang, H.-I., Jiang, S. B., Nagarajan, H., Zengler, K., & Gallo, R. L. (2013). The microbiome extends to subepidermal compartments of normal skin. *Nature Communications*, *4*, 1431. <https://doi.org/10.1038/ncomms2441>
- Nelson, E. A., Backhouse, M. R., Bhogal, M. S., Wright-Hughes, A., Lipsky, B. a, Nixon, J., ... Gray, J. (2013). Concordance in diabetic foot ulcer infection. *BMJ Open*, *3*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2012-002370>
- Newman, L. G., Waller, J., Palestro, C. J., Schwartz, M., Klein, M. J., Hermann, G., ... Stagnaro-Green, A. (1991). Unsuspected osteomyelitis in diabetic foot ulcers. Diagnosis and monitoring by leukocyte scanning with indium in 111 oxyquinoline. *JAMA*, *266*(9), 1246–1251. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1908030>

- Noël, F., Piérard-Franchimont, C., Piérard, G. E., & Quatresooz, P. (2012). Sweaty skin, background and assessments. *International Journal of Dermatology*, 51(6), 647–655. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2011.05307.x>
- Oh, J., Conlan, S., Polley, E. C., Segre, J. A., & Kong, H. H. (2012). Shifts in human skin and nares microbiota of healthy children and adults. *Genome Medicine*, 4(10), 77. <https://doi.org/10.1186/gm378>
- Oh, J., Freeman, A. F., Comparative, N., Program, S., Park, M., Sokolic, R., ... Kong, H. H. (2013). The altered landscape of the human skin microbiome in patients with primary immunodeficiencies. *Genome Research*, 23, 2103–2114. <https://doi.org/10.1101/gr.159467.113>
- Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 43 Spec No(February), 93–100. <https://doi.org/2134> [pii]
- Onyango, C. O., Loparev, V., Lidechi, S., Bhullar, V., Schmid, D. S., Radford, K., ... Fields, B. (2017). Evaluation of a TaqMan Array Card for Detection of Central Nervous System Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(7), 2035–2044. <https://doi.org/10.1128/jcm.02469-16>
- Otto, M. (2008). Staphylococcal Biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, (322), 207–228. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181a15ae8>.Screening
- Paraskevas, N., Ayari, R., Malikov, S., Mollo, M., Branchereau, P., Hut, F., & Branchereau, A. (2006). “Pole test” measurements in critical leg ischaemia. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 31(3), 253–257. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2005.09.014>
- Park, H. K., Ha, M. H., Park, S. G., Kim, M. N., Kim, B. J., & Kim, W. (2012). Characterization of the fungal microbiota (mycobiome) in healthy and dandruff-afflicted human scalps. *PLoS ONE*, 7(2), 3–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032847>
- Pasquaroli, S., Zandri, G., Vignaroli, C., Vuotto, C., Donelli, G., & Biavasco, F. (2013). Antibiotic pressure can induce the viable but non-culturable state in *Staphylococcus aureus* growing in biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(8), 1812–1817. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt086>
- Pastar, I., Nusbaum, A. G., Gil, J., Patel, S. B., Chen, J., Valdes, J., ... Davis, S. C. (2013). Interactions of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in Polymicrobial Wound Infection. *PLoS ONE*, 8(2), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056846>
- Pataky, Z., Faravel, L., Da Silva, J., & Assal, J. P. (2000). A new ambulatory foot pressure device for patients with sensory impairment. A system for continuous measurement of plantar pressure and a feed-back alarm. *Journal of Biomechanics*, 33(9), 1135–1138. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(00\)00082-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(00)00082-8)
- Paulino, L. C., Tseng, C. H., & Blaser, M. J. (2008). Analysis of *Malassezia* microbiota in healthy superficial human skin and in psoriatic lesions by multiplex Real-Time-PCR. *FEMS Yeast Research*, 8(3), 460–471. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00359.x>
- Paulino, L. C., Tseng, C. H., Strober, B. E., & Blaser, M. J. (2006). Molecular analysis of fungal microbiota in samples from healthy human skin and psoriatic lesions. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(8), 2933–2941. <https://doi.org/10.1128/JCM.00785-06>
- Peleg, A. Y., Hogan, D. A., & Mylonakis, E. (2010). Medically important bacterial–fungal interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 340–349. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2313>

- Pellizzer, G., Strazzabosco, M., Presi, S., Furlan, F., Lora, L., Benedetti, P., ... De Lalla, F. (2001). Deep tissue biopsy vs. superficial swab culture monitoring in the microbiological assessment of limb-threatening diabetic foot infection. *Diabetic Medicine*, 18(10), 822–827. <https://doi.org/10.1046/j.1464-5491.2001.00584.x>
- Percival, S. L., McCarty, S. M., & Lipsky, B. (2014). Biofilms and Wounds: An Overview of the Evidence. *Advances in Wound Care*, 4(7), 373–381. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0557>
- Percival, S. L., Thomas, J. G., & Williams, D. W. (2010). Biofilms and bacterial imbalances in chronic wounds: Anti-Koch. *International Wound Journal*, 7(3), 169–175. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2010.00668.x>
- Perim, M. C., da Costa Borges, J., Costa Celeste, S. R., & Al., E. (2015). Aerobic bacterial profile and antibiotic resistance in patients with diabetic foot infections. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(5), 546–554. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0146-2015>
- Perner, A., Nielsen, S. E., & Rask-Madsen, J. (2003). High glucose impairs superoxide production from isolated blood neutrophils. *Intensive Care Medicine*, 29(4), 642–645. <https://doi.org/10.1007/s00134-002-1628-4>
- Peters, B. M., Jabra-Rizk, M. A., O'May, G. A., William Costerton, J., & Shirtliff, M. E. (2012). Polymicrobial interactions: Impact on pathogenesis and human disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(1), 193–213. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-11>
- Peters, J. E. (2016). Pitfalls in diagnosing diabetic foot infections. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 32(1), 254–260. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2736>
- Petrova, O. E., & Sauer, K. (2016). Escaping the biofilm in more than one way: Desorption, detachment or dispersion. *Current Opinion in Microbiology*, 30, 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.01.004>
- Probst, A. J., Auerbach, A. K., & Moissl-eichinger, C. (2013). Archaea on Human Skin. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065388>
- Ramakant, P., Verma, A. K., Misra, R., Prasad, K. N., Chand, G., Mishra, A., ... Mishra, S. K. (2011). Changing microbiological profile of pathogenic bacteria in diabetic foot infections: Time for a rethink on which empirical therapy to choose? *Diabetologia*, 54(1), 58–64. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1893-7>
- Redel, H., Gao, Z., Li, H., Alekseyenko, A. V., Zhou, Y., Perez-Perez, G. I., ... Blaser, M. J. (2013). Quantitation and composition of cutaneous microbiota in diabetic and nondiabetic men. *Journal of Infectious Diseases*, 207(7), 1105–1114. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit005>
- Reiber, G. E., Lipsky, B. A., & Gibbons, G. W. (1998). The burden of diabetic foot ulcers. *American Journal of Surgery*, 176(2A Suppl), 5–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9777967>
- Roeder, B., Gils, C. C. Van, & Maling, S. (2000). Antibiotic Beads in the Treatment of Diabetic Pedal Osteomyelitis. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*, 39(2), 124–130. [https://doi.org/10.1016/S1067-2516\(00\)80037-X](https://doi.org/10.1016/S1067-2516(00)80037-X)
- Rutkove, S. B., Veves, A., Mitsa, T., Nie, R., Fogerson, P. M., Garmirian, L. P., & Nardin, R. A. (2009). Impaired distal thermoregulation in diabetes and diabetic polyneuropathy. *Diabetes Care*, 32(4), 671–676. <https://doi.org/10.2337/dc08-1844>
- Salter, R. A., Koren, S., Ramot, Y., Buchs, A., & Rapoport, M. J. (2014). Interpreting the results of the Semmes-Weinstein monofilament test: accounting for false-positive answers in the international consensus on the diabetic foot protocol by a new model. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, (30), 77–80. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2465>
- Sämman, A., Tajiyeva, O., Müller, N., Tschauener, T., Hoyer, H., Wolf, G., & Müller, U. A. (2008). Prevalence of the diabetic foot syndrome at the primary care level in Germany: A cross-sectional study. *Diabetic Medicine*, 25(5), 557–563. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2008.02435.x>

- Samraus, H. W. (1996). Die hydrostatische Zehendruckmessung - ein nicht-invasives Screening-Verfahren zur Diagnose der arteriellen Verschlusskrankheit bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 121, 364–368. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Sanverdi, S. E., Ergen, B., & Oznur, A. (2012). Current challenges in imaging of the diabetic foot. *Diabetic Foot & Ankle*, 3(0). <https://doi.org/10.3402/dfa.v3i0.18754>
- Schade, V. L., & Roukis, T. S. (2010). The Role of Polymethylmethacrylate Antibiotic – loaded Cement in Addition to Debridement for the Treatment of Soft Tissue and Osseous Infections of the Foot and Ankle. *The Journal of Foot & Ankle Surgery*, 49(1), 55–62. <https://doi.org/10.1053/j.jfas.2009.06.010>
- Schierle, C. F., De La Garza, M., Mustoe, T. A., & Galiano, R. D. (2009). Staphylococcal biofilms impair wound healing by delaying reepithelialization in a murine cutaneous wound model. *Wound Repair and Regeneration*, 17(3), 354–359. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00489.x>
- Schittek, B., Hipfel, R., Sauer, B., Bauer, J., Kalbacher, H., Stevanovic, S., ... Garbe, C. (2001). Dermcidin: A novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature Immunology*, 2(12), 1133–1137. <https://doi.org/10.1038/ni732>
- Schommer, N. N., & Gallo, R. L. (2013). Structure and function of the human skin microbiome. *Trends in Microbiology*, 21(12), 660–668. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.10.001>
- Selva Olid, A., Solà, I., Barajas-nava, L. A., Gianneo, O., Bonfill Cosp, X., & Lipsky, B. A. (2015). Systemic antibiotics for treating diabetic foot infections (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (9). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009061.pub2.www.cochranelibrary.com>
- Senneville, E., Hugues, M., Beltrand, E., Legout, L., Valette, M., Cazaubiel, M., ... Mouton, Y. (2006). Culture of Percutaneous Bone Biopsy Specimens for Diagnosis of Diabetic Foot Osteomyelitis: Concordance with Ulcer Swab Cultures. *Clinical Infectious Diseases*, 42(1), 57–62. <https://doi.org/10.1086/498112>
- Senneville, E., Morant, H., Descamps, D., Dekeyser, S., Beltrand, E., Singer, B., ... Yazdanpanah, Y. (2009). Needle puncture and transcutaneous bone biopsy cultures are inconsistent in patients with diabetes and suspected osteomyelitis of the foot. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 48(7), 888–893. <https://doi.org/10.1086/597263>
- Siddiqui, A. R., & Bernstein, J. M. (2010). Chronic wound infection: Facts and controversies. *Clinics in Dermatology*, 28(5), 519–526. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2010.03.009>
- Silbernagel, S., & Despopoulos, A. (2012). *Taschenatlas Physiologie* (8th ed.). Stuttgart: Thieme.
- Singh, P. K., Schaefer, A. L., Parsek, M. R., Moninger, T. O., Welsh, M. J., & Greenberg, E. P. (2000). Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*, 407, 762–764.
- Smith, K., Collier, A., Townsend, E. M., O'Donnell, L. E., Bal, A. M., Butcher, J., ... Williams, C. (2016). One step closer to understanding the role of bacteria in diabetic foot ulcers: Characterising the microbiome of ulcers. *BMC Microbiology*, 16(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0665-z>
- Sorek, R., & Cossart, P. (2010). Prokaryotic transcriptomics: a new view on regulation, physiology and pathogenicity. *Nature Reviews. Genetics*, 11(1), 9–16. <https://doi.org/10.1038/nrg2695>
- Sotto, A., Richard, J. L., Messad, N., Molinari, N., Jourdan, N., Schuldiner, S., ... Lavigne, J. P. (2012). Distinguishing colonization from infection with *Staphylococcus aureus* in diabetic foot ulcers with miniaturized oligonucleotide arrays: A French multicenter study. *Diabetes Care*, 35(3), 617–623. <https://doi.org/10.2337/dc11-1352>

- Spichler, A., Hurwitz, B. L., Armstrong, D. G., & Lipsky, B. A. (2015). Microbiology of diabetic foot infections: from Louis Pasteur to "crime scene investigation". *BMC Medicine*, 13, 2. <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0232-0>
- Stewart, P. ., & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358, 135–138.
- Stewart, P. S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(2), 107–113. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00196>
- Stiegler, H. (2004). Das diabetische Fußsyndrom. *Herz*, 29(1), 104–115. <https://doi.org/10.1007/s00059-004-2534-z>
- Tan, P. L., & Teh, J. (2007). MRI of the diabetic foot: differentiation of infection from neuropathic change. *The British Journal of Radiology*, 80(959), 939–948. <https://doi.org/10.1259/bjr/30036666>
- Teh, J., Berendt, T., & Lipsky, B. A. (2009). Rational Imaging . Investigating suspected bone infection in the diabetic foot. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 339(5), 4690. <https://doi.org/10.1136/bmj.b4690>
- Uçkay, I., Gariani, K., Pataky, Z., & Lipsky, B. A. (2014). Diabetic foot infections: state-of-the-art. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 16(4), 305–316. <https://doi.org/10.1111/dom.12190>
- Uçkay, İlker, Aragón-Sánchez, J., Lew, D., & Lipsky, B. A. (2015). Diabetic foot infections: what have we learned in the last 30 years? *International Journal of Infectious Diseases*, 40(8), 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.09.023>
- Unger, E., Moldofsky, P., Gatenby, R., Hartz, W., & Broder, G. (1988). Diagnosis of osteomyelitis by MR imaging. *AJR. American Journal of Roentgenology*, 150(3), 605–610. <https://doi.org/10.2214/ajr.150.3.605>
- Uzun, G., & Mutluoglu, M. (2011). Images in clinical medicine. Dependent rubor. *The New England Journal of Medicine*, 364(26), 56. <https://doi.org/10.1056/NEJMicm1010160>
- Viswanathan, V., Snehalatha, C., Seena, R., & Ramachandran, a. (2002). Early recognition of diabetic neuropathy: evaluation of a simple outpatient procedure using thermal perception. *Postgraduate Medical Journal*, 78, 541–542. <https://doi.org/10.1136/pmj.78.923.541>
- Wagner, C. (2012). *Entwicklung einer molekularen Methode auf der Basis von PCR und DHPLC zur Untersuchung polymikrobieller Infektionen: Validierung an Urinproben von nierentransplantierten Patienten und Sputumproben von Mukoviszidosepatienten.*
- Wheat, L. J., Allen, S. D., Henry, M., Kernek, C. B., Siders, J. A., Kuebler, T., ... Norton, J. (1986). Diabetic Foot Infections: Bacteriologic Analysis. *Archives of Internal Medicine*, 146(10), 1935–1940. <https://doi.org/10.1001/archinte.1986.00360220079017>
- Wiemeyer, S., Heggeman, J., Hafer, G. (2012). Die PEDIS-Klassifikation als Prädiktor der Amputationshöhe bei Patienten mit diabetischem Fußsyndrom. *Fuß und Sprunggelenk*, 10(3), 184-190
- Wilson, M. (2001). Bacterial biofilms and human disease. *Science Progress*, 84(3), 235–254.
- Wimpenny, J. W. T. (1997). The validity of models. *Advances in Dental Research*, 11(1), 150–159. <https://doi.org/10.1037/h0073590>
- Wolcott, R D, Rhoads, D. D., & Dowd, S. E. (2008). Biofilms and chronic wound inflammation. *Journal of Wound Care*, 17(8), 333–341.
- Wolcott, R D, Rumbaugh, K. P., James, G., Schultz, G., Phillips, P., Yang, Q., ... Dowd, S. E. (2010). Biofilm maturity studies indicate sharp debridement opens a time- dependent therapeutic window. *Journal of Wound Care*, 19(8), 320–328. <https://doi.org/10.12968/jowc.2010.19.8.77709>

-
- Wolcott, Randall D., Hanson, J. D., Rees, E. J., Koenig, L. D., Phillips, C. D., Wolcott, R. A., ... White, J. S. (2016). Analysis of the chronic wound microbiota of 2,963 patients by 16S rDNA pyrosequencing. *Wound Repair and Regeneration*, 24(1), 163–174. <https://doi.org/10.1111/wrr.12370>
- Wolff, B. J., Bramley, A. M., Thurman, K. A., Whitney, C. G., Whitaker, B., Self, W. H., ... Winchell, J. M. (2017). Improved Detection of Respiratory Pathogens by Use of High-Quality Sputum with TaqMan Array Card Technology. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(1), 110–121. <https://doi.org/10.1128/jcm.01805-16>
- Yamashita, Y., Uchida, A., Yamakawa, T., Shinto, Y., Araki, N., & Kato, K. (1998). Treatment of chronic osteomyelitis using calcium hydroxyapatite ceramic implants impregnated with antibiotic. *International Orthopaedics*, 22, 247–251.
- Yang, P., Wang, N., Wang, C., Yao, Y., Fu, X., Yu, W., ... Yao, M. (2017). 460 nm visible light irradiation eradicates MRSA via inducing prophage activation. *Journal of Photochemistry & Photobiology*, 166, 311–322. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.12.001>
- Zhao, C., Wang, X., Zhang, C., Liu, B., Jing, H., Ming, L., ... Jiang, Y. (2019). Development of a TaqMan Array card to target 21 purulent meningitis-related pathogens. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3856-z>
- Zhao, G., Hochwalt, P. C., Usui, M. L., Underwood, R. a, Singh, P. K., James, G. a, ... Olerud, J. E. (2010). Delayed Wound Healing in Diabetic (db/db) Mice with *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Challenge – A Model for the Study of Chronic Wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 18(5), 467–477. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2010.00608.x> Delayed
- Zhao, G., Usui, M. L., Lippman, S. I., James, G. A., Stewart, P. S., Fleckman, P., & Olerud, J. E. (2013). Biofilms and Inflammation in Chronic Wounds. *Advances in Wound Care*, 2(7), 389–399. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0381>
- Ziegler, D. (1993). *Diabetische Neuropathie - Charakterisierung, Frühdiagnostik, natürlicher Verlauf, metabolische Einflussfaktoren und Effekte einer pathogenetisch begründeten Intervention*. München: Urban & Schwarzenberg.

10 Ehrenwörtliche Erklärung

“Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe dies nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde, oder auf das Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift (Katharina Exner)

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Eugen Domann, der es mir ermöglicht hat, meine Dissertation am Institut für medizinische Mikrobiologie in Gießen zu bearbeiten. Er hat mir als erfahrener und fachkundiger Doktorvater stets freundlich und gewissenhaft bei Fragen und Problemen zur Seite gestanden.

Ebenso gilt mein Dank Frau Silke Zechel-Gran, die mich in die verschiedenen Prozesse im Labor eingearbeitet, und mit ihrer positiven und hilfsbereiten Art zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ich freu mich Teil unseres Laborteams gewesen zu sein, und bedanke mich auch bei Frau Claudia Zörb, Herrn Dr. Hendrik Halfar, Frau Dr. Lea Herges und den übrigen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der anderen AGs und des diagnostischen Routinelabors für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung.

Im Rahmen des Prägraduiertenkollegs war es mir zudem möglich, wertvolle Einblicke in andere Forschungsprojekte zu erlangen, und das wissenschaftliche Arbeiten zu erlernen, weshalb sich mein Dank auch an diese Einrichtung des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität richtet.

Abschließend kann ich mich glücklich schätzen, eine fantastische Familie und großartige Freunde zu haben, die mich bedingungslos unterstützt und motiviert haben.