
Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische
Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Halle
(Kommissarischer Direktor: Priv.-Doz. Dr. Dr. A.W. Eckert)
und
aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Halle
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. A. Kekulé)

**Biofilm und sein Einfluss auf Therapie und Prognose bei
Mundhöhlenkarzinomen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Julia Bolz
geboren am 27.11.1980 in Quakenbrück

Gutachter: 1.: Priv.-Doz. Dr. Dr. A.W. Eckert
2.: Prof. H.-J. Schmoll
3.: Prof. S. Kneist

Tag der öffentlichen Verteidigung: 30.10.2013

Meinen Eltern

Referat

Biofilme spielen in der Medizin und Zahnmedizin eine entscheidende Rolle. Wenig untersucht sind bis dato Biofilme, welche sich auf der Oberfläche von Mundhöhlenkarzinomen etablieren. Ziel der Untersuchung war, die bakterielle Zusammensetzung und die jeweiligen Resistenzquoten derartiger Biofilme für eine Optimierung der perioperativen Antibiose zu analysieren.

Im Rahmen einer umfangreichen monozentrischen Pilotstudie wurden das aktuelle Erreger- und Resistenzspektrum der Biofilmflora auf Oberflächen von Mundhöhlenkarzinomen bestimmt und mit einer gesunden Kontroll- und Risikogruppe verglichen. Das mikrobiologische Material wurde in allen Fällen unter normierten Bedingungen entnommen und transportiert. Die Erregeranzucht und Differenzierung erfolgte gemäß den heute üblichen Standards. Sämtliche Resistenzanalysen wurden selbständig mittels Agardiffusion und Ellipsoidtest durchgeführt.

Im Ergebnis zeigte sich in der Kontrollgruppe das aus dem odontogenen Infektionsgeschehen hinreichend bekannte Überwiegen grampositiver Aerobier. In der Gruppe der Patienten mit Mundhöhlenkarzinome dominierten gramnegative, anaerobe Bakteriengattungen. Entsprechend zeigten sich hier gegenüber der Kontroll- und Risikogruppe selbst bei Penicillin mit 40 % resistenten Stämmen deutlich erhöhte Resistenzquoten. Sogar beim Kombinationspräparat Amoxicillin/Clavulansäure mussten bei den Keimen auf den Karzinomen 20 % Resistenzen verzeichnet werden. Grundlage dieser hohen Resistenzquoten der Bakterien in Biofilmen der intraoralen Karzinome dürften die nahezu idealen Bedingungen des mikrobiellen Wachstums sein. Für eine angepasste perioperative Prophylaxe sollten vor allem Fluorchinolone wie Levofloxacin und Moxifloxacin favorisiert werden. Neben der bewiesenen antimikrobiellen Aktivität ist vor allem die Pharmakokinetik hervorzuheben; eine einmalige Gabe täglich sichert wirksame Konzentrationen zur Erregereradikation.

Letztlich konnte in der uni- wie auch multivariaten Analyse zum Überleben der Patienten eine Korrelation des Überlebens gefunden werden, wenn vorwiegend anaerobe Spezies die Biofilme kolonisieren. So zeigten jene Karzinompatienten, deren Biofilme ausschließlich Anaerobier beherbergten, ein 6-fach erhöhtes Risiko des tumorassoziierten Versterbens ($p=0,014$). Möglicherweise gelingt es in der Zukunft, mittels Analyse des Erregerpektrums erste Aussagen zur Prognose und eventuell zur Therapiestratifizierung treffen zu können.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Literaturübersicht.....	1
1.2	Literaturübersicht.....	2
1.2.1	Biofilme.....	2
1.2.2	Mundhöhlenkarzinom.....	4
1.2.3	Antibiotika.....	7
1.2.4	Antibiotikaresistenz.....	8
2	Zielstellung.....	10
3	Material und Methoden.....	11
3.1	Patienten.....	11
3.1.1	Tumorpatienten.....	11
3.1.2	Risikopatienten.....	12
3.1.3	Kontrollgruppe.....	12
3.2	Keimspektrum.....	12
3.3	Materialien.....	13
3.3.1	Laborgeräte.....	13
3.3.2	Zusätzliche Antibiotika.....	14
3.3.3	Chemikalien und Zusätze.....	14
3.3.4	Medien.....	15
3.4	Methoden.....	15
3.4.1	Probengewinnung und Transport.....	15
3.4.2	Bestimmung des Keimspektrums.....	16
3.4.3	Resistogramme.....	17
3.4.4	Resistenztestungen.....	18
3.5	Ergänzende Testmethoden.....	22
3.5.1	Reinheitskontrolle.....	22
3.5.2	Weitere Nachweismethoden der minimalen Hemmstoffkonzentration: Dilutionsverfahren.....	22
3.6	Auswertung mikrobiologischer Daten.....	24
3.7	Überlebenszeitanalyse.....	25
4	Ergebnisse.....	26
4.1	Patientenkollektiv.....	26
4.2	Diagnosen.....	26
4.3	Soziogramme.....	27
4.4	Überlebenszeit.....	28
4.5	Keimspektren.....	30
4.6	Genus Peptostreptococcus.....	36
4.7	Resistenztestungen.....	37
4.7.1	Routineantibiotika.....	39
4.7.2	Alternative Antibiotika.....	43
5	Diskussion.....	45
5.1	Patientenkollektive.....	45
5.2	Biofilme und deren Mikrobiologie.....	45
5.3	Resistenzen.....	47
5.4	Prophylaktische Antibiotikaempfehlungen bei Mundhöhlenkarzinompatienten.....	50
5.5	Prognostische Aussagen.....	51
6	Zusammenfassung.....	55
7	Literaturverzeichnis.....	57
8	Thesen.....	74
	Tabellarischer Lebenslauf.....	
	Selbständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche	
	Danksagung.....	

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AHL	N-Acetylhomoserinlacton
ANI	Identifizierungskarten für Anaerobier
ATCC	American Type Culture Collection
<i>B. caccae</i>	<i>Bacteroides caccae</i>
BSAC	British Society for Antimicrobial Chemotherapy
BHI	Brain Heart Indol
<i>B. burgdorferi</i>	<i>Borellia burgdorferi</i>
CA-SFM	Comite de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
<i>C. freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
CLSM	Confocal laser scanning microscopy
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DGZMK	Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
DIN	Deutsches Institut für Normen e.V.
DNA	Desoxyribonucleinacid, -säure
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESCMID	European Society for Microbiology and Infectious Diseases
et al.,	et alii, et aliae, et alia: und andere
etc.	et cetera: und weitere
<i>E. aerofaciens</i>	<i>Eubacterium aerofaciens</i>
ESBL	extended spectrum beta lactamase
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
e.V.	eingetragener Verein
<i>G. morbilorum</i>	<i>Gemella morbilorum</i>
G	Grading, Differenzierungsgrad
g	Gramm
gMSH	gesunde Mundschleimhaut
GNI	Identifizierungskarten für gramnegative Bakterien
GPI	Identifizierungskarten für grampositive Bakterien
h	Stunde
H ₂ O	aqua destillata, Wasser
<i>H. influenza</i>	<i>Haemophilus influenza</i>
<i>H. parainfluenza</i>	<i>Haemophilus parainfluenza</i>
HAV	Hepatitis A Virus
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
i	intermediär
ISO	International Organization for Standardization
i.v.	intravenös
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KBE	Kolonie bildende Einheit
l	Liter
LTA	Lipoteichonsäure
<i>M. catarrhalis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
M	Medianwert
mg	Milligramm
MHA	Mueller-Hinton-Agar

MHA-F	Mueller-Hinton-Agar Fastidious
MHA-S	spezieller Mueller-Hinton-Agar
MHK	minimale Hemmkonzentration
MIC	minimal inhibiting concentration
ml	Milliliter
MLU	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
mm	Millimeter
n	Anzahl (numerus)
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NaMed	Normenausschusses Medizin
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NFV	Identifizierungskarten für Nichtfermentierer
nm	Nanometer
O ₂	Dioxygen, molekularer Sauerstoff
OD	optische Dichte
<i>P.</i>	<i>Peptostreptococcus</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pH-Wert	<i>potentia Hydrogenii</i> , Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
PJ	Packungsjahre
p.o.	per os
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
p-Wert	englisch: probability; Signifikanzwert
r	resistent
RNA	Ribonucleinsäure
RND	Resistance-Nodulation-cell Division
rMSH	Mundschleimhaut der Probanden der Risikogruppe
s	sensibel
<i>S. liqueferans</i>	<i>Serratia liqueferans</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. pneumonia</i>	<i>Streptococcus pneumonia</i>
<i>S. sobrinus</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>
spp.	species
Tbc	Tuberkulose
TNM-Klassifikation	Tumor-Nodes-Metastasis-Klassifikation
tMSH	Mundschleimhaut von Tumorpatienten
UV	ultraviolett
VBNC	viable but not culturable: lebensfähig, jedoch nicht anzuzüchten
vgl.	vergleiche
Viridans-S.	Viridans-Streptokokken, vergrünende Streptokokken
WHO	World Health Organization
µg	Mikrogramm
%	Prozent
°C	Grad Celsius
5JÜ	5-Jahres-Überlebensrate

1 Einleitung und Literaturübersicht

Die Bedeutung von Biofilmen nimmt heutzutage in der Mund-, Kiefer- und plastischen Gesichtschirurgie eine zentrale Stellung im Bereich der onkologischen und antiinflammatorischen Therapie und Forschung ein.

Mundhöhlenkarzinome (Abb. 1) stellen seit Jahrzehnten ein globales Problem dar. Nach Bestimmung der jeweiligen Biofilmflora und der Einstufung klinikopathologischer Daten lassen sich Zusammenhänge zwischen der Keimbesiedlung und Malignitätsgrad der Tumoren einerseits und der Entstehung von Karzinomen andererseits vermuten. Biofilme stellen somit als eigenständiges hochaktives Reservoir von intra- und interspezifisch kommunizierenden Bakterien, als Ort der Entstehung mannigfaltiger Antibiotikaresistenzen sowie möglicherweise als Wirkstätte von Tumormarkern einen Verknüpfungspunkt von Therapie und Prognose dieser Neoplasien dar.

Bei radikalchirurgischer Tumortherapie steht begleitend eine optimierte antibiotische Prophylaxe im Mittelpunkt, um die postoperativ oft zu Komplikationen führenden Infektionen zu limitieren.

Zur Erhaltung der Wirksamkeit antimikrobieller Chemotherapeutika ist der sorgfältige und ausschließlich zielgerichtete Umgang mit diesen Medikamenten essentiell (WHO, 1997, 2001, 2007; Böttner *et al.*, 2000).

Inadäquate Antibiotikatherapien und verschiedene Anpassungsmöglichkeiten der Bakterien fördern die sich im Laufe der Zeit entwickelnden steigenden Resistenzquoten, welche durch regelmäßige Analysen zum Erreger- und Resistenzspektrum frühzeitig erkannt werden können. Durch diese Qualitätssicherung können geeignete Antibiotika der ersten Wahl sowie Reservemedikamente bestimmt und eingesetzt werden.



Abbildung 1: Fortgeschrittenes Zungenrandkarzinom links, Tumorformel pT4N2bM0

1.2 Literaturübersicht

Zum besseren Verständnis werden nachfolgend die Termini „Biofilm“ und „Mundhöhlenkarzinom“ erläutert sowie eine Übersicht über die gängigsten Antibiotika und deren Resistenzmechanismen gegeben.

1.2.1 Biofilme

Unter einem Biofilm versteht man eine reagible dreidimensionale Akkumulation einzelner immobilisierter Mikroorganismen und Mikrokolonien an Grenzflächen zwischen zwei verschiedenen Phasen, welche in eine vorwiegend anionische Polymermatrix integriert ist (Costerton *et al.*, 1994a,b, 1995a,b, 1999a,b,c; Liljemark *et al.*, 1997).

In der Natur existieren zwei elementare Formen mikrobiellen Lebens. Etwa ein Prozent aller Bakterien lebt in Suspension schwebend durch planktonisches Wachstum und 99 % in Form der mikrobiellen Biofilmbildung (Costerton *et al.*, 1994a,b, 2001; Stickler, 1999; Schierholz *et al.*, 1999; Marsh und Bradshaw, 1997; Flemming *et al.*, 2000).

Medizinisch relevante Biofilme interagieren auf der Haut, Schleimhaut, nahezu allen synthetischen Oberflächen und auf den Zähnen (Anwar und Costerton, 1990). Dabei ist die Zusammensetzung von Biofilmen des menschlichen Organismus von der Art der verschiedenen Epithelienarten abhängig (Brandis und Schaal, 1988).

Die Bildung der Biofilme verläuft charakteristisch in vier Phasen; der nur wenige Stunden dauernden Erstbesiedlung als Induktionsphase, dem exponentiellen Wachstum und Aufbau als konfluente Akkumulationsphase, der Plateauphase, in welcher die maximale vom Nährstoffangebot abhängige Bakterienzahl erreicht wird und Vermehrung und Absterben im Gleichgewicht stehen sowie der Absterbephase (Cowan *et al.*, 1987; Hasty *et al.*, 1992; Jenkinson und Lamont, 1997). Dies ist vergleichbar mit der Pellikelbildung und somit der Plaque auf der Zahnoberfläche (Switalski, 1993; Scheie, 1994).

Interessanterweise enthält jeder Biofilm seine eigene meist gramnegativ dominierte Mischpopulation, welche an der Oberfläche eine andere Zusammensetzung aufweisen kann als in der Tiefe (Sutherland *et al.*, 1999, 2001).

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass die Pathogenität und Virulenz eines Biofilmes nicht den addierten Pathogenitäten der darin lebenden Keime entspricht, sondern diese deutlich übertreffen kann. Diese „polybakteriellen Lebensgemeinschaften“ zeigen Merkmale eines mehrzelligen Organismus und sind oft der Ursprung chronischer Infektionen und langdauernder Krankheiten (Hoyle und Costerton, 1991; Marsh, 1992; Johnson *et al.*, 1998; El-Solh *et al.*, 2004).

Der Biofilm stellt für Bakterien insbesondere für eine immense Quelle an multiresistenten Keimen eine effiziente mikrobielle Lebensform und möglicherweise ein Reservoir für derartige multiresistente Keime dar. Diese können eine Bakteriämie oder Sepsis auslösen, weshalb medizinische Biofilme auch in der Klinik an Bedeutung gewinnen. Einer dieser multiresistenten Keime ist *E. coli*, welcher durch *extended spectrum β -Lactamasen* (ESBL) resistent gegenüber verschiedensten Antibiotika werden kann und sich nach Keevil *et al.* (1987) und Marsh *et al.* (1992) nur in bestimmten Biofilmen vermehren kann, nicht jedoch frei schwebend in wässrigen Suspensionen.

Die spezielle Problematik einer bakteriellen Resistenz in medizinischen Biofilmen wird durch drei wesentliche Eigenschaften bestimmt. Diese sind architektonische Besonderheiten, Diffusionsbarrieren und horizontaler Gentransfer. Selbst bei einem optimalen Antibiotikum in einer ausreichend hohen Dosis überleben höchstwahrscheinlich sogenannte Persister, welche aufgrund von räumlichen Barrieren und Distanzen innerhalb von Biofilmzonen oder aufgrund ihrer Stoffwechselaktivität von aktiven, über reduzierte physiologische Stadien bis hin zu einem Ruhezustand wie „viable but not culturable“ (VBNC) nicht angreifbar sind. Einige dieser Persister treten in ein hoch resistentes sporeähnliches Stadium über (Stewart und Costerton, 2001). Dieses wird oftmals als resistenz-fördernd angesehen, da eine Vielzahl der Antibiotika auf metabolisch aktive Zellkomponenten wirkt (Stewart und Costerton, 2001; Wade 2002, 2004).

Die überlebenden Bakterien verfügen nun über optimale Voraussetzungen für Wachstum und Vermehrung. Dadurch nimmt die Pathogenität und Virulenz des Biofilmes im Vergleich zum Einzelkeim deutlich zu (Bradshaw und Marsh, 1999).

Für die Klinik ist zudem bedeutsam, dass aus der vorwiegend anionischen extrazellulären Matrix aufgrund ihrer negativen Ladung als molekulares Sieb ein Diffusionshindernis für die meist positiv geladenen Antiseptika und Chemotherapeutika resultiert (Dibdin und Wimpenny, 1999; Stickler, 1999). Durch sogenannte Autoinducer werden die Genexpression und damit auch der Phänotyp der Bakterien der aktuellen Situation angepasst. Die dadurch erst ermöglichte optimale Zell-Zell-Kommunikation wird als *Quorum sensing* bezeichnet (Stickler, 1999; Bradshaw und Marsh, 1999; Gilbert *et al.*, 1990, 1997).

Aufgrund der Existenz mannigfaltiger Organismen auf engstem Raum entsteht ein Pool an genetischen Informationen. Durch horizontalen Gentransfer von Resistenzgenen und besonderen proteolytischen Enzymen wird der Biofilm unempfindlicher gegen Antibiotika, Desinfektionsmittel und bestimmte Enzyme (Chalkley *et al.*, 1991). Toxine und deren Metabolite sowie Antikörper und Makrophagen als Bestandteil des Immunsystems des Wirtes können durch die bakteriellen Konsortien Schritt für Schritt inaktiviert werden und so ihre Wirksamkeit verlieren.

Der Biofilm insbesondere auch auf Mundhöhlenkarzinomen kann somit nicht nur als nicht abwischbare Schicht aus Detritus und den Bakterien der Mundhöhlenflora angesehen werden. In diesem liegen möglicherweise weit mehr Informationen für den Wissenschaftler und den Kliniker über die individuelle Abwehr- und Resistenzsituation, die Entwicklung oder das Fortschreiten von Plattenepithelkarzinomen bis gegebenenfalls hin zu prognostischen Aussagen im Falle einer Erkrankung.

1.2.2 Mundhöhlenkarzinom

Mundhöhlenkarzinome gehören bundesweit zu den zehn häufigsten, weltweit mit einer globalen jährlichen Inzidenz von 263.000 bis 500.000 Neuerkrankungen zu den sechsthäufigsten malignen Tumoren des Menschen und machen etwa drei bis fünf Prozent aller malignen Entartungen aus (Argiris *et al.*, 2008; Brocklehurst *et al.*, 2010; Ferlay *et al.*, 2010; Robert-Koch-Institut, 2012; Hegenbarth, 2012). Diese umfassen alle bösartigen Tumoren der Mundhöhle und der Zunge. In 95 % aller Fälle sind dies Plattenepithelkarzinome (Böcker *et al.*, 2008).

Laut Statistik des Robert-Koch-Institutes betrug 1980 in der Bundesrepublik Deutschland die Inzidenz an Mundhöhlenkarzinomen noch 5.685 Neuerkrankungen bei den Männern und 1.650 bei den Frauen. Seitdem musste ein stetiges Ansteigen der jährlichen Inzidenzrate bis 2008 festgestellt werden. Hier betrug die Anzahl an Neuerkrankungen 13.010. Darunter waren 9.520 männliche und 3.490 weibliche Patienten. Die Inzidenz für das zuletzt erfasste Jahr 2010 sank auf 8.360 Neuerkrankungen bei den Männern und 3.040 bei den Frauen (Robert-Koch-Institut, 2012).

Die Genese eines Mundhöhlenkarzinoms ist komplex. Zu den Hauptfaktoren gehören insbesondere Tabak (tabakspezifische N-Nitrosamine) (Van der Waal, 1998; Semmler *et al.*, 2006) und das Kokarzinogen Alkohol, welches nur als synergistisches Agens in Kombination mit Tabak kanzerogen wirken kann (Reichart, 2000a,b). Diese Konstellation kann das Risiko auf das fünf- bis 16-fache, laut La Vecchia bis hin auf das 140-fache ansteigen lassen, so dass 80 bis 90 % der Plattenepithelkarzinome durch diese hervorgerufen werden (Maier *et al.*, 1990; La Vecchia *et al.*, 1997; Bray *et al.*, 2000). Diese Karzinogene müssen über einen langjährigen Zeitraum auf die orale Schleimhaut wirken können, so dass ein kanzerogener Prozess durch eine DNA-Beschädigung an mehreren Orten stattfinden kann. Da die gesamte Mundhöhlenschleimhaut diesen Karzinogenen ausgesetzt ist, kann es zum Phänomen der Feldkanzerisierung kommen (van Oijen und Slootweg, 2000; Biolchini *et al.*, 2005).

In den Frühstadien steht eine radikalchirurgische Therapie im Vordergrund, in den fortgeschrittenen Stadien sollte eine interdisziplinäre multimodale Behandlung, bestehend

aus chirurgischer Resektion, Bestrahlung und Chemotherapie angestrebt werden, um das Malignom erfolgreich zu behandeln (Metz *et al.*, 2012). Bei primär inoperablen Tumoren, bei denen eine kurative Therapie nicht mehr indiziert ist, stehen palliative Konzepte im Vordergrund. Eine spezielle palliative Radiatio, die als Hypofractionation bezeichnet wird, soll eine Kontrolle der Symptome und eine zumutbare Lebensqualität länger ermöglichen (Agarwal *et al.*, 2008; Al-mamgani *et al.*, 2009).

Stellt der Patient zudem nach einer erfolgten Therapie den Konsum von Alkohol und Nikotin nicht maßgeblich ein, kann dies zu einer erheblich schlechteren Prognose und somit kürzeren Überlebenszeit führen, da Rezidive oder Zweitkarzinome begünstigt werden (León *et al.*, 2009).

Schlechte Mundhygiene, virale Infektionen, kanzerogene Chemikalien, UV-, radioaktive und ionisierende Strahlung sowie chronische Traumen gelten neben dem sozioökonomischen Status als weitere Risikofaktoren. Als potentiell risikoe erhöhend werden Karies, Ernährungsproblematiken (Mangel an Vitamin A, C und E, Eisen und Antioxidantien), humane Papillomaviren (insbesondere 6, 11, 16 und 18), Epstein-Barr Viren und Immunsuppression, Infektionen mit *Candida albicans*, das Kauen der Betelnuss sowie Haschischkonsum angesehen (Gupta *et al.*, 1982; Thorne *et al.*, 1997; Llewellyn, 2001, 2003, 2004; Rosenblatt *et al.*, 2004; Reiß, 2009). Die Mehrzahl der Plattenepithelkarzinome der Mundschleimhaut entsteht auf der Basis von Precursorläsionen in Form von Erythroplakien, Leukoplakien oder Erythroleukoplakien (Reichart, 2000b, 2003; Forastiere *et al.*, 2001; Heyer, 2002; DGZMK, 2010).

Erhöhte Entartungstendenzen zeigen prämaligne (präkanzeröse) Konditionen der Mundschleimhaut, zu denen der orale Lichen planus, der chronisch-diskoide Lupus erythematoses, das Plummer-Vinson Syndrom, die orale submuköse Fibrose, Syphilis, Xeroderma pigmentosum und die Epidermolysis bullosa dystrophicans gezählt werden (Driemel *et al.*, 2006, 2008; Hullmann *et al.*, 2010).

Das generelle Problem der Karzinome der Mundhöhle ist deren Stagnation der kumulativen 5-Jahres-Überlebensrate (5JÜ) trotz des stetigen Fortschrittes im Hinblick auf Diagnostik und Operation bei etwa 45 % (DGMKG, 2011; Siewert, 2001; Howaldt *et al.*, 2000; Hausamen, 2000; Inagi *et al.*, 2002; Oral cancer foundation, 2011), wobei die höchste prozentuale Überlebensquote maßgeblich durch die chirurgische Therapie erreicht wird (Inagi *et al.*, 2002). Die Prognose eines Mundhöhlenkarzinoms ist in den Frühstadien relativ gut (5JÜ bis 85 %), mit fortgeschrittener Erkrankung infaust, wobei zusätzliche Lymphknotenmetastasen die 5JÜ um weitere 50 % reduzieren (Reichart *et al.*, 2002a,b; Reiß, 2009). Tumorlokalisation, Tumorgröße und Lymphknotenstatus gelten bislang als wichtigste prognostische Indikatoren (Cojocariu *et al.*, 2009). Die Fähigkeit des

Mundhöhlenkarzinoms frühzeitig zu metastasieren und destruieren ist für die klinische Prognose limitierend (Schwenzer und Ehrenfeld, 2010).

Hierbei ist die Diagnoseverzögerung als bedeutender negativer Prognosefaktor durch den Primärarzt nicht zu unterschätzen (Teppo *et al.*, 2003).

Als wichtigste Früherkennungskonzepte gelten weiterhin die visuelle Inspektion und Palpation, sowie die histopathologische Befunderhebung malignomsuspekter Mundschleimhaut nach erfolgter Biopsie; weitere in Form der Autofluoreszenz, Toluidinblaufärbung, 5-Aminolävulinsäure und Bürstenbiopsie eignen sich nicht für die routinemäßige Anwendung in der Praxis (Burkhardt und Maerker, 1981; Ephros und Mashberg, 1999; Betz *et al.*, 2002; Chang und Wilder-Smith, 2005; Kunkel, 2005; Sharwani *et al.*, 2006; Driemel *et al.*, 2008; Fedele, 2009; Kunkel *et al.*, 2010).

Eine Kombination aus klinischen Indices in Form des MGSS (Martínez-Gimeno Scoring System) und Palpation soll die Notwendigkeit einer Neck Dissection einerseits sichern und andererseits helfen überflüssige Halslymphknotenausräumungen zu verhindern (Martínez-Gimeno *et al.*, 2011).

Biologische Faktoren als sogenannte Tumormarker sind bis dato noch nicht vollständig entschlüsselt worden. Zur Einschätzung der Tumorprogression, der Aggressivität sowie der damit zusammenhängenden 5-Jahres-Überlebensrate werden diese zukünftig jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit routinemäßig bestimmt und interpretiert werden können. Durch immunhistochemische Untersuchungen sollen direkte Zusammenhänge zwischen den Biomarkern und der Morphologie der Mundhöhlenkarzinome entschlüsselt werden (Oliveira und Ribeiro-Silva, 2011). Ausführliche Ausarbeitungen von Prognosefaktoren in Bezug auf die Überlebenswahrscheinlichkeit zeigen die Signifikanz dieser Biomarker (Kim *et al.*, 2011). Die alleinige Einteilung der Plattenepithelkarzinome anhand von TNM-Klassifikation und Grading entspricht nicht mehr dem aktuellen Stand der Forschung zur Ermittlung der individuellen Prognose (Corry *et al.*, 2010).

Die Forschung insbesondere an Tumorphoxie und Hypoxiemarkern steht seit Jahren im Vordergrund etlicher wissenschaftlicher Studien an Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle. Zu den vielversprechendsten Prognosefaktoren zählen neben HIF-1 α auch GLUT-1 und pVHL, welche zukünftig zur Verbesserung des Therapieregimes mit Beginn der Behandlung der Tumorerkrankung bestimmt werden sollten (Eckert *et al.*, 2012; Nayak *et al.*, 2012).

Bei allen möglichen sogenannten Biomarkern ist bisher noch nicht über einen Zusammenhang der bakteriellen Besiedlung und der Prognose nachgedacht worden.

Nach aktuellem Wissensstand existiert keine Literatur zur Biofilmflora in Form eines prognostischen Biomarkers. Möglicherweise ist diese Pilotstudie die bislang einzige Unter-

suchung, welche gewisse Zusammenhänge zwischen der bakteriellen Besiedlung von Biofilmen auf Mundhöhlenkarzinomoberflächen und deren individuellen Prognose zulässt. Die signifikanten Ergebnisse sollten als Grundstein für weitere darauf aufbauende Studien herangezogen werden.

1.2.3 Antibiotika

Für die Wirkung der Antibiotika sind nach heutigem Stand der Wissenschaft sechs Hauptmechanismen bekannt, welche auf Ausnutzung differierender Morphologien und biochemischer und physiologischer Unterschiede zwischen Prokaryonten und Eukaryonten beruhen:

1. Hemmung der Zellwandsynthese durch β -Lactame, Glykopeptide, Fosfomycin und Polypeptide,
2. Hemmung der Replikation (DNA-Ebene) durch Gyrasehemmer (Fluorchinolone) und Inhibitoren der Nucleinsäuresynthese wie Nitroimidazole, sowie Nitrofurantoin,
3. Hemmung der Transkription (RNA-Ebene) mittels Hemmung der RNA-Polymerase durch Rifampicin sowie durch Actinomycin D,
4. Hemmung der Translation (Proteinbiosynthese) durch Aminoglycoside, Makrolide, Tetracycline und Lincosamide,
5. Hemmung von Stoffwechselprozessen durch Folsäureantagonisten wie Sulfonamide und Diaminopyrimidine, welche meist aufgrund der synergistischen Effekte in Kombination als Cotrimoxazol verabreicht werden sowie
6. Störung der Permeabilität der Zytoplasmamembran durch Polymyxine, Vancomycin und Bacitracinopeptide.

Eine weitere Unterteilung der antibiotisch wirksamen Pharmaka erfolgt in die beiden Wirkungsmechanismen Bakteriostase und Bakterizidie:

Bakteriostatisch wirken proteinsyntheseblockierende Substanzen, bakterizid diejenigen, welche die Synthese der Zellwand oder die Permeabilität der Zytoplasmamembran stören. β -Lactame wirken über die Hemmung der Peptidoglycansynthese in wachsenden Bakterien und führen so durch eine Störung des Gleichgewichts zwischen Zellwandsynthese und -abbau zur Bakteriolyse (Höltje und Heidrich, 2001; Mutschler und Schäfer-Korting, 1997; Kratz und Wiedemann, 1992; Rosin und Henschler, 1998). Diese abtötende Wirkung wird somit durch Lyse erreicht. Bakteriolyse stellt dementsprechend ein mögliches Instrument für zellzerstörende Antibiotika dar; andere Autoren sehen in dieser hingegen einen eigenständigen Wirkmechanismus. Antimikrobielle bakterienzerstörende Chemotherapeutika

können zusätzlich hinsichtlich ihrer Pharmakodynamik eingeteilt werden; maßgeblich konzentrationsabhängige Präparate (Aminoglykoside, Fluorchinolone) stehen vorwiegend zeit- und weniger konzentrationsabhängigen (viele β -Lactam-Antibiotika) gegenüber (Mutschler *et al.*, 2008; Simon und Stille, 2000; Stille *et al.*, 2005). Manche β -Lactame hingegen induzieren bei niedrigeren Konzentrationen abnormes Wachstum (Filamentbildung in *E. coli*), bei höheren einen Wachstumsstillstand, welche schließlich in Bakteriolyse enden (Giesbrecht *et al.*, 1998).

1.2.4 Antibiotikaresistenz

Unter dem Begriff der Antibiotikaresistenz werden definitionsgemäß Eigenschaften von Bakterien zusammengefasst, welche durch Widerstandsfähigkeit gegen antibiotisch wirksame Substanzen eine Aufrechterhaltung der quantitativen Erregermenge oder sogar eine Erregervermehrung trotz adäquat wirksamer Antibiotikakonzentration ermöglicht. Durch diese angeborene oder erworbene Unempfindlichkeit werden die bakteriziden, bakterio-statischen oder bakteriolytischen Wirkmechanismen der Chemotherapeutika aufgehoben. Antibiotikaresistenzen lassen sich aufgrund ihres Typus in zwei unterschiedliche Arten einteilen:

1. Primäre Resistenz (intrinsic resistance)
2. Sekundäre Resistenz (acquired resistance)

Ein Bakterium ist primär resistent, wenn alle Bakterien seiner Gattung oder Spezies gegen ein Antibiotikum oder eine Antibiotikumklasse eine primäre, also natürliche Wirkungslücke besitzen. Diese angeborene Widerstandsfähigkeit besteht intrinsisch beispielsweise bei Enterokokken gegen Chemotherapeutika der Gruppe der Cephalosporine, Fluorchinolone und Cotrimoxazol, bei *P. aeruginosa* gegen Ampicillin und bei Enterobakterien gegen Vancomycin.

Unter einer sekundären Resistenz versteht man eine erworbene Fähigkeit primär nicht resistenter Bakterien und Bakterienstämme, die Wirksamkeit eines Antibiotikums beziehungsweise einer Antibiotikaklasse zu reprimieren.

Die sekundären Antibiotikaresistenzen entstehen durch zwei grundsätzlich unterschiedliche Arten. Die Mutation, welche sowohl spontan als auch sekundär unter Selektionsdruck einer laufenden Therapie vonstatten gehen kann, steht der Übertragung in Form von Transduktion (Übertragung genetischen Materials durch Bakteriophagen), Transformation (Aufnahme freier DNA) und Konjugation (Übertragung genetischen Materials durch direkten Zellkontakt) gegenüber (Poole, 2005a,b). Mit Ausnahme der spontanen Mutation

nimmt die Resistenzentwicklung unter Selektionsdruck mit Ausnahme der Gruppe der Penicilline sprunghaft zu.

Sowohl bei primärer als auch bei sekundärer Resistenz dürfen sogenannte Kreuzresistenzen nicht außer Acht gelassen werden. Als Kreuzresistenz wird eine Unempfindlichkeit gegen weitere Antibiotika derselben Antibiotikaklasse verstanden. Genauer definierte Shah 2005 die Kreuzresistenz als Unempfindlichkeit gegen strukturell eng verwandte Substanzen, welche auf einem gemeinsamen Mechanismus basieren. Dementsprechend besteht bei Widerstandsfähigkeit gegen Antibiotikum A eine solche gegen Antibiotikum B derselben Klasse. Bei beidseitigen Kreuzresistenzen bedeutet dies, dass alle gegen Antibiotikum B resistenten Keime ebenfalls gegenüber Antibiotikum A unempfindlich sind, bei einseitigen gilt dieser Umkehrschluss nicht (Simon und Stille, 2000).

Coresistenzen gelten als Resistenzen gegen nicht verwandte Substanzen, welche jedoch simultan übertragen werden (Shah, 2002, 2005; Acar und Röstel, 2001).

2 Zielstellung

Bis dato findet man in der Literatur nur wenige Arbeiten zum Erregerspektrum und zur Resistenzsituation in Biofilmen der Oberflächen von Mundhöhlenkarzinomen. Ziel ist es, mittels einer experimentellen prospektiven Studie das Keimspektrum und die aktuelle Resistenzlage bei Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen zu erfassen.

Die Ergebnisse der Analysen sollen in erster Linie die Antibiotikatherapie optimieren und manifeste postoperative Weichteilinfektionen reduzieren oder sogar verhindern helfen.

Neben der Empfehlung geeigneter prophylaktischer Antibiotika und Reservechemotherapeutika sollen individuelle Risikoprofile bezüglich der Kanzerogenese leichter ermittelt werden und eine Einteilung der Patienten in Risikogruppen erfolgen können.

Eine weitere Zielstellung ist es, möglicherweise anhand der jeweiligen Biofilmzusammensetzung, eine Aussage zur Früherkennung eines Mundhöhlenkarzinoms hinsichtlich sogenannter Hochrisikogruppen treffen zu können. Gegebenenfalls gelingt es, eine mögliche Assoziation zwischen der mikrobiellen Besiedlung und spezifischen Tumormerkmalen aufzuzeigen. In weiterführenden Studien könnten dann Patienten mit und ohne Risikofaktoren für die Entwicklung von Karzinomen in ein Screeningkonzept eingegliedert werden, um den tatsächlichen prognostischen Vorhersagewert des jeweiligen Keimspektrums eruieren zu können (vgl. Abb. 2).

Als Beitrag zur Grundlagenforschung soll in diesem Zusammenhang geklärt werden, ob bestimmte Erregerkonsortien möglicherweise als weiterer prognostischer Faktor bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle herangezogen werden können.



Abbildung 2: Abstrichnahme bei einer Probandin aus der Kontrollgruppe zur Ermittlung des individuellen Keimspektrums

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

In dem Zeitraum vom 15.10.2003 bis zum 09.08.2009 wurden 90 Patienten in die prospektive Studie einbezogen. Dies waren je 30 Tumorpatienten, 30 Risikopatienten und 30 Kontrollen.

Alle Patienten wurden ausführlich über die Studie aufgeklärt und haben ihr Einverständnis zur Verarbeitung ihrer Daten gegeben.

Dabei wurden folgende Ausschlusskriterien berücksichtigt:

- Probanden unter 18 Jahren,
- Patienten mit stattgehabter Radiatio,
- Patienten mit einer anamnestisch bestehenden Chemotherapie innerhalb der letzten sechs Monate oder Immunsuppressionstherapie,
- laufende Antibiose oder antibiotische Behandlung innerhalb der letzten vier Wochen,
- Verwendung antiseptischer Mundspüllösungen,
- Einnahme von Medikamenten, welche das Erregerspektrum beeinflussen können (z.B. Antimykotika, Virostatika, etc.),
- aktuell bestehende Infektion sowie
- Infektionskrankheiten wie HIV, HBV, HCV, Tbc, etc.

Nachfolgend werden die einzelnen Patientengruppen kurz charakterisiert.

3.1.1 Tumorpatienten

Bei allen 30 Patienten dieser Gruppe bestätigte sich durch den histopathologischen Befund ein Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle. Neben der onkologischen Grunddiagnose wurden die TNM-Klassifikation (Tumor-Nodes-Metastasis) der Union internationale contre le cancer (UICC), das Grading, das Operationsprinzip und die Aufnahme von Noxen erfasst.

3.1.2 Risikopatienten

Bei dieser Gruppe handelte es sich um 30 Risikopatienten, welche einen ausgeprägten Alkohol- und Nikotinabusus zeigten.

Zur Berechnung der Alkoholmengen in Gramm pro Tag galten folgende Richtwerte: 500 ml Bier entsprechen einem Konsum von 25 g, 250 ml Wein 20 g und 4 cl Spirituosen 16 g Alkohol (Stephan, 1999). Als Risikopatienten wurden hier nur solche Probanden gesehen, deren täglicher Alkoholkonsum über 100 g lag.

Der Tabakkonsum wurde in Packungsjahren (PJ) angegeben. Ein Packungsjahr bedeutete einen Konsum von 20 Zigaretten täglich über einen Zeitraum von einem Jahr. Hoffmann veröffentlichte im Jahr 2000 folgende Formel zur Berechnung der kumulativen Tabakmenge: täglich gerauchte Zigarettenpackungen (20 Zigaretten) x Anzahl konsumierter Jahre. Probanden, welche seit mindestens fünf Jahren täglich eine Schachtel Zigaretten rauchten, wurden in der vorliegenden Studie in die Risikogruppe aufgenommen.

3.1.3 Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe bestand aus 30 gesunden Probanden ohne onkologische Anamnese. Als spezielle Ausschlusskriterien galten hier ein Alter über 50 Jahren, Nikotinkonsum, regelmäßiger Alkoholgenuss, Drogenkonsum, Einnahme von Medikamenten, antibiotisch behandelte Infektionen innerhalb der letzten 4 Wochen, sowie Gingivitis, Parodontitis und ein sanierungsbedürftiger Zahnstatus.

3.2 Keimspektrum

Alle für diese Arbeit verwendeten Bakterien stammten aus für diagnostische Zwecke entnommenen Proben von Patienten der Klinik für Mund-, Kiefer- und plastischen Gesichtschirurgie der MLU, welche als Kryokulturen auf Microbanks bei minus 80 °C gesichert wurden. Die Probenentnahme und -verarbeitung wird im Folgenden (siehe 4.4, S.21) beschrieben.

Zur Qualitätssicherung wurden DIN-identische ATCC (American Type Culture Collection)-Stämme (ATCC ®, Manassas, Virginia, USA) als Kontrollstämme bei jedem Ansatz mitgeführt.

3.3 Materialien

3.3.1 Laborgeräte

Für die mikrobiologischen Untersuchungen wurden folgende Geräte und Materialien benötigt:

- Abstrichtupfer „Swabs“ (Stuart-Medium: BD Culture Swab™, Becton, Dickens and Company, Franklin Lakes, USA; Biotest™, Biotest Austria GmbH, Wien, Österreich und Oxoid™, Wesel, Deutschland)
- Anaerobierboxen (Meintrup dws™, Lähden, Deutschland)
- Anaerobiertöpfe (Meintrup dws™, Lähden, Deutschland; Merck™, Darmstadt, Deutschland und Oxoid™, Wesel, Deutschland)
- Anaerogen-Gele (Oxoid™, Wesel, Deutschland)
- Antibiotikastempel, Andruckdispenser (Oxoid™, Wesel, Deutschland)
- BBL™ Chrystal™ Identification Systems (BD, Becton, Dickens and Company™, Franklin Lakes, USA)
- Brutschrank (Inkubator) für aerobe und anaerobe Anzucht (Heraeus™, Hanau, Deutschland)
- Gefrierschrank (Heraeus™, Hanau, Deutschland)
- Impfösen (VWR Collection™, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Indikatorstreifen (Oxoid™, Wesel, Deutschland) oder Anaerotest (Merck™, Darmstadt, Deutschland)
- Microbanks (Mast Diagnostica™, Reinfeld, Deutschland)
- RapID-Ana II Systems (RapID™, Lenexa, USA)
- pH-Teststäbchen 0-14 (Merck™, Darmstadt, Deutschland)
- Vitek Densichek: Messgerät zur Bestimmung der optischen Densität nach McFarland (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France)
- Vitek®2 (bioMérieux™, Nürtingen, Deutschland)
- Vitek®-Testkarten für die Identifizierung von Keimen und zur Erstellung von Resistogrammen (bioMérieux™, Nürtingen, Deutschland)
- Vortex-Mixer (Labnet International™, Woodbridge, USA)

3.3.2 Zusätzliche Antibiotika

- Antibiotika für das Vitek2-Gerät: Vitek®-Testkarten für die Empfindlichkeitsprüfung (bioMérieux™, Nürtingen, Deutschland)
- Plättchen mit Azithromycin (AZM, 15 µg), Telithromycin (TEL, 15 µg), Levofloxacin (LEV, 5 µg), Moxifloxacin (MXF, 5 µg) und Gatifloxacin (GAT 5 µg) (Oxoid, Wesel, Deutschland)
- E-Test-Streifen mit Azithromycin (AZM, 0,016 – 256 µg /ml), Telithromycin (TEL, 0,016 – 256 µg /ml), Levofloxacin (LEV, 0,002 – 32 µg /ml), Moxifloxacin (MXF, 0,002 – 32 µg /ml) und Gatifloxacin (GAT, 0,002 – 32 µg /ml) (bioMérieux™, Nürtingen, Deutschland)

3.3.3 Chemikalien und Zusätze

- Calciumchlorid (Merck™, Darmstadt, Deutschland)
- Calciumchlorid-Stocklösung (10 mg/ml) (Merck™, Darmstadt, Deutschland)
- Fleischextrakt (Merck™, Darmstadt, Deutschland)
- Hammelblut, lysiert (Oxoid™, Wesel, Deutschland)
- Hämin (Fluka Chemie, Buchs, Schweiz)
- Hämoglobin (Oxoid™, Wesel, Deutschland)
- Magnesiumchlorid (Merck™, Darmstadt, Deutschland)
- Magnesiumchlorid-Stocklösung (10 mg/ml) (Merck™, Darmstadt, Deutschland)
- NAD (Sigma™, Deisenhofen, Deutschland)
- Nähragar (Merck™, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumchlorid (Roth™, Karlsruhe, Deutschland)
- Vitamin K1 (Sigma™, Deisenhofen, Deutschland)

3.3.4 Medien

- BHI-Bouillon (brain-heart-indol-bouillon) (Merck™, Darmstadt, Deutschland)
- Columbia (Blutagar), gebrauchsfähig (Oxoid™, Wesel, Deutschland)
- Kochblutagarplatten (CHOC), gebrauchsfähig (Oxoid™, Wesel, Deutschland)
- MacConkey-Trockennährboden (Oxoid™, Wesel, Deutschland)
- MacConkey-Agarplatten (Oxoid™, Wesel, Deutschland)
- Mueller-Hinton-Bouillon (Oxoid™, Wesel, Deutschland)
- Mueller-Hinton-Agar nach NCCLS (MHA), gebrauchsfertig (Merck™, Darmstadt, Deutschland)
- Mueller-Hinton-Agarplatte mit zugesetztem Schafsblut (MHA-S), Fertigplatte (Oxoid™, Wesel, Deutschland)
- Schaedler-Platten, modifiziert (Wilkins Chalgren-Agar), gebrauchsfertig (Heipha™, Eppelheim, Deutschland)
- Schaedler Selektivnährböden (SchaedlerKV-Agar), gebrauchsfähig (Oxoid™, Wesel, Deutschland)

3.4 Methoden

3.4.1 Probengewinnung und Transport

Im Rahmen von Tumorsektionsoperationen in der Klinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie wurden bei betroffenen Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom der Zunge, des Mundbodens, des Unterkiefers oder der Wange jeweils Proben im Tumorzentrum, in der -peripherie sowie an gesunder Mundschleimhaut der Gegenseite mittels standardisierten Entnahme- und Transportbedingungen mit Transportmedium enthaltenden adäquaten Abstrichtupfern (Swabs) gewonnen (Eckert, 2004).

Die Probenentnahme erfolgte ausnahmslos mit Hilfe eines sterilen Abstrichtupfers. Das zu analysierende Material der Risikopatienten und der gesunden Kontrollgruppe stammte von unauffälliger Mundschleimhaut, wobei identische Bedingungen für Transport und Anzucht gewährleistet wurden.

Die gewonnenen Proben wurden innerhalb von maximal vier Stunden in das Institut für Medizinische Mikrobiologie der MLU transportiert (Westphal, 1984; Eckert, 2004).

3.4.2 Bestimmung des Keimspektrums

Zur Zuordnung der Bakterien wurde eine gültige Taxonomie für aerobe und auch anaerobe Erreger zugrunde gelegt (Hardie, 1986; Bruckner und Colonna, 1997; Jousimies-Somer und Summanen, 1997; Murdoch, 1998; Eckert, 2004).

Zu Beginn der mikrobiologischen Untersuchungen wurde jede der insgesamt 150 entnommenen Proben unter anaeroben und aeroben Bedingungen sowie bei 5 %iger CO₂-Sättigung bei 35,0 °C inkubiert.

Als Nährmedien dienten zur Anzucht der Aerobier Columbia-Blutagar, Kochblutagarplatten und MacConkey-Agar, zur Identifizierung gramnegativer Bakterien sowie zur Kultivierung der Anaerobier Schaedler-Platten. Zusätzlich konnten hier als Selektivmedien Schaedler-Platten mit Kanamycin-Vancomycin-Agar und Schafsblut (SchaedlerKV-Agar) eingesetzt werden. Der Zusatz von Kanamycin unterdrückte das Wachstum fakultativ anaerober gramnegativer Stäbchen, während Vancomycin dieses fakultativ und obligat anaerober grampositiver Bakterien hemmte (Burkhardt, 1992, 2009). Mit Saboraudagar als Nährboden konnten Pilze nachgewiesen werden.

Für die beimpften Nährböden galten unterschiedliche Voraussetzungen, Schaedlerplatten mussten in Anaerobiertöpfen für 48, Columbia-Blutagar und MacConkey-Agar unter O₂ für 24 und Kochblutplatten in CO₂-Atmosphäre ebenfalls für 24 Stunden inkubiert werden.



Abbildung 3: Kultivierung anaerober Bakterien auf Schaedlerplatten

Nach diesen definierten Zeiten im Brutschrank wurden alle Bakterienstämme einzeln mit einer sterilen Öse entnommen und rekultiviert. Dies garantierte, dass nur mit reinen Populationen für die Erkennung und spätere Analyse gearbeitet wurde.

Die Kultivierung und Anzucht der einzelnen Bakterienkulturen erfolgte für die Resistenz-

testungen nach dem Goldstandard generell auf eigenständig hergestellten Schaedler-Platten mit Schafsblut. Dadurch konnten selbst für anspruchsvollere anaerobe Keime, welche neben den Grundbedingungen für Wachstum spezielle Zusätze benötigen, optimale Wachstumsbedingungen gewährleistet werden. Dieses nährstoffreiche Medium enthielt drei Peptone, Glukose, eine Kohlenhydrat- und Vitamin-B-Quelle sowie als Stickstofflieferant Hefeextrakte.

Die Inkubation der fakultativ und obligat (strikt) anaeroben Bakterienstämme erfolgte in anoxischen Brutschränken oder in Anaerobiertöpfen. Hier sicherte eine Reagenzienmischung das anaerobe Milieu; die Abwesenheit von O₂ wurde mittels Redox-Indikatorstreifen oder -stäbchen kontrolliert.

Insgesamt wurde die zeit-, kosten- und materialaufwendige bakteriologische Anaerobierdiagnostik durch mehrfache Subkultivierungen jeder einzelnen Probe bis zur Reinkultur kontrolliert.

Da bekanntermaßen einige Bakterienstämme nicht oder nur schlecht zu kultivieren waren, kam eine BHI-Bouillon zum Einsatz. Bei Wachstumsproblemen erfolgte dieses in einer frischen BHI-Bouillon mit zugesetztem Menschenhirn.

Nach der Kultivierung wurden die Aerobier in Lösung gebracht und mit Hilfe von Identifizierungsboxen im Vitek2-Gerät bearbeitet; die Anaerobier mittels Paneelen (RapID™ ANA II) identifiziert.

Das Vitek-System ermittelt automatisiert phänotypische Parameter von isolierten Reinkulturen, welche eine Identifizierung anhand der hierbei gewonnenen Testresultate bis auf Speziesebene gewährleisten, sofern die entsprechenden Vergleichsparameter in der Datenbank vorhanden sind. Dieses wandelt positiv und negativ getestete Ergebnisse in einen Code um, durch den das untersuchte Isolat mit einer mathematisch ermittelten Wahrscheinlichkeit als eine bestimmte Spezies identifiziert werden kann. Zur Durchführung des Tests wurden entsprechend den Herstellerangaben die zu untersuchenden Reinkulturen auf festen Nährmedien anaerob und aerob, sowie bei 5 %iger CO₂-Sättigung für 16 bis 20 Stunden angezüchtet und unter Verwendung von Identifizierungskarten für Anaerobier (ANI), für grampositive und gramnegative Bakterien (GPI, GNI) sowie für eine Gruppe sogenannter Nicht-Fermentierer (NFC) auf die Verwertung verschiedenster Kohlenstoffquellen und anderer Stoffwechselreaktionen getestet.

3.4.3 Resistogramme

Für die Erstellung der Resistogramme wurden für die in der Routine angewendeten Antibiotika die Aerobier im Vitek2-Gerät sowie mit Hilfe der Agardiffusion getestet, die Anaerobier routinemäßig mit dem RapID™ ANA II-System sowie mittels MHK-Testungen.

Das Hauptaugenmerk lag hier auf folgenden Antibiotika:

- β -Lactame:
 - Benzylpenicilline: Penicillin G,
 - Aminopenicilline: Ampicillin,
 - Cephalosporine: Cefuroxim,
 - Carbapeneme: Imipenem und Meropenem,
- Tetracycline: Doxycyclin,
- Makrolide: Erythromycin,
- Fluorchinolone: Ciprofloxacin,
- Lincosamide: Clindamycin,
- Penicillinasefeste Penicilline: Methicillin/Oxacillin

sowie

- Makrolide: Azithromycin,
- Ketolid: Telithromycin,
- Fluorchinolone: Moxifloxacin, Levofloxacin und Gatifloxacin.

Die Testungen der aus kieferchirurgischer Sicht nicht als Therapeutikum der ersten Wahl bezeichneten Antibiotika der Azolide aus der Gruppe der Makrolide wie Azithromycin, dem abgeleiteten Ketolid Telithromycin und den Fluorchinolonen Moxifloxacin, Levofloxacin und Gatifloxacin fanden noch nicht routinemäßig statt. Deshalb erfolgten hier für diese Chemotherapeutika die Testungen selbständig und als technische Triplikate.

Alle erfassten Erreger wurden dementsprechend mit Hilfe des MHK- und Agar-Diffusionstestes überprüft, um auch hier eine Aussage zum Resistenzspektrum treffen zu können.

3.4.4 Resistenztestungen

Im Wesentlichen unterscheidet man zwei Vorgehensweisen zur Empfindlichkeitsbestimmung in Form der Agar-Diffusion und Reihenverdünungsverfahren, bei denen die Ermittlung der sogenannten „Minimale Hemmkonzentration“ (MHK) im Vordergrund steht. Eine Kombination dieser beiden Verfahren stellt der Ellipsoidtest (E-Test) dar (Acar, 1991; Amsterdam, 1996; Schwarz *et al.*, 2003).

Ziel der *in-vitro*-Resistenztestungen ist es, das Ausmaß der Empfindlichkeit der zu untersuchenden Keime auf bestimmte Chemotherapeutika zu ermitteln. Man differenziert qualitative und quantitative Verfahren. Rein qualitative Ergebnisse werden durch den Agar-

Diffusionstest, primär quantitative und sekundär qualitative durch den Ellipsoidtest sowie durch Dilutionsverfahren gewonnen (Acar, 1991; Schwarz *et al.*, 2005; Jorgensen und Turnidge, 2007). Zur Vorbereitung der Testreihen wurden die Bakterien gruppiert wieder aufgetaut und auf Schaedler-Agarplatten aufgetragen und kultiviert.

Für die Resistenztestungen mussten alle Keime entsprechend den EUCAST-Richtlinien auf Mueller-Hinton-Agar und bei anspruchsvollen Keimen wie *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *M. catarhalis* und *Streptococcus* spp. auf MHF aufgebracht werden.

Die Inkubation aller Platten erfolgte im Brutschrank entsprechend bei 35 ± 1 °C, MH bei O_2 und MH-F bei O_2 mit 4 - 6 % CO_2 . Nach erfolgreicher Anzucht folgten die beiden eigentlichen Analysen, welche nachfolgend beschrieben werden.

Da neben dem Kulturmedium und der Einsaatmenge der Mikroorganismen (Inokulum) auch die Inkubationstemperatur und -dauer das Untersuchungsergebnis beeinflussen, wurden die Empfindlichkeitstestungen immer unter den gleichen Voraussetzungen durchgeführt (Gould, 1998).

Test 1: Agar-Diffusionstest

Der Agar-Diffusionstest ist ein qualitatives Verfahren zur Ermittlung von Erregerempfindlichkeiten. Frisch angezüchteten Bakterienreinkulturen werden drei bis fünf Keime morphologisch gleicher Einzelkolonien mit Hilfe von Impfösen entnommen und zur Herstellung des Inokulums in 5 ml 0,9 %ige NaCl-Lösung in ein Glasröhrchen gebracht.

Anschließend wird mit Hilfe des Vitek Densichek die Lösung auf den McFarland-Standard 0,5 eingestellt, um für die Resistenztestung eines jeden Bakterienstammes dieselbe Zelldichte zu gewährleisten. Diese entspricht ungefähr $1 - 2 \times 10^8$ KBE/ml und einer photometrischen Justierung der optischen Dichte mit Hilfe eines Spektralphotometers bei 550 nm (OD_{550nm}). Ausnahmsweise wird bei der Testung des *S. pneumoniae* bei Abnahme der Einzelkolonien von einer Kochblutagarplatte ein McFarland-Standard von 1,0 hergestellt.

Mit einer Pipette werden diese Suspensionen in einer Menge von 50 µl auf den hemmstofffreien Mueller-Hinton-Agar geimpft und mit einem sterilen Drigalski-Spatel gleichmäßig verteilt. Im Anschluss legt man mit einem Multidispenser (Antibiotikastempel) Plättchen auf die Nährböden auf, welche mit einer bestimmten Menge an Antibiotikum getränkt sind. Das Chemotherapeutikum aus den Plättchen diffundiert radiär in den Agar, wobei die Konzentration exponentiell nach außen abnimmt. Dieses hemmt sensible Keime in ihrem Wachstum, so dass unterschiedlich große Hemmhöfe um die Papierplättchen entstehen (Norpoth und Peterson, 1986; DIN 58940, 2000-2004; NCCLS, 2002-2010).

Um eine primäre Diffusion zu gewährleisten ruhen die beimpften Agarplatten für 30 Minuten bei 20 ± 2 °C, woran sich eine Inkubation bei 36 ± 1 °C schließt. Nach 16 bis 20

Stunden wird nur bei Vorhandensein eines konfluierenden Bakterienrasens entsprechend den Richtlinien der CLSI und EUCAST der Hemmhof abgelesen und ausgewertet (vgl. Abb. 4, S. 26). Die Durchführungsvorschriften der DIN verlangen hingegen nur ein fast konfluierendes Wachstum. Der Durchmesser dieses Bereiches wird in ganzen Millimetern angegeben. Diese Daten lassen sich nach Richtlinien für jedes Antibiotikum (CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute), ehemals NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), Oxoid™ und Bio Merieux™) in die drei Ergebnisgruppen „r“ (resistent), „i“ (intermediär) und „s“ (sensibel) einteilen.

Zur Qualitätssicherung werden folgende Kontrollstämme grundsätzlich bei jedem Ansatz mitgeführt:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25 923 (alternativ identischer Stamm DSM 1104),
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29 213 (DSM 2569),
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29 212 (DSM 2570),
- *Escherichia coli* ATCC 25 922 (DSM 1103),
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27 853 (DSM 1117).
- *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 (DSM 2151),
- *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 (DSM 2255),
- *Clostridium perfringens* ATCC 13124 (DSM 756),
- *Peptostreptococcus anaerobius* ATCC 27337 (DSM 2949),
- *Prevotella bivia* ATCC 29303 (DSM 20541).



Abbildung 4: Agardiffusionstest mit deutlichen Hemmhöfen

Test 2: Nachweis der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK-Test)

Der MHK-Test oder auch E-Test dient der Ermittlung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK oder MIC (minimal inhibiting concentration)). Dieses quantitative Testverfahren ist eine Kombination aus Agar-Diffusionstest und Reihenverdünnungstest (Schwarz *et al.*, 2003; Bolmström *et al.*, 1988).

Anstelle der Plättchen werden E-Test-Streifen auf die mit den Bakterien beimpften Platten gelegt. Diese Kunststoffstreifen sind mit einem Antibiotikum beschichtet, dessen Konzentration kontinuierlich exponentiell zunimmt. Nach der Inkubation im Brutschrank erfolgt die Auswertung der Ergebnisse ebenfalls durch visuelles Ablesen.

Die MHK entspricht jener geringsten Konzentration an Chemotherapeutikum, bei der erstmals *in-vitro* kein Wachstum mehr erkennbar ist. Der ellipsenförmige Hemmhof (Ellipsoid, vgl. Abb. 5, S. 27) schneidet an diesem Wert den Teststreifen (Jorgensen und Turndige, 2007; Mutschler *et al.*, 2008). Nach Schwarz *et al.* (2003) handelt es sich bei der MHK um ein Intervall zwischen zwei Konzentrationsstufen, welche zwischen der theoretischen MHK (Schnittstelle) und der nächsthöheren Konzentration liegt.

Die Bewertung der Empfindlichkeit kann so mit Hilfe von mitgelieferten Tabellen wie beim Agar-Diffusionstest in „r“, „i“ und „s“ erfolgen und ist auch für anspruchsvolle Erreger und anaerobe Keime aussagekräftig (Altreuther *et al.*, 1997).

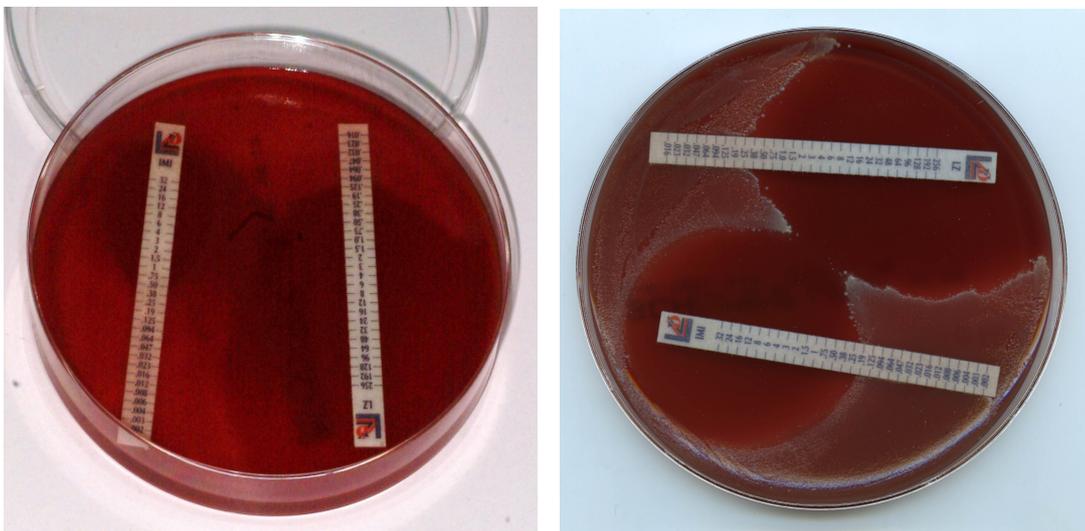


Abbildung 5: Schaedlerplatten mit typisch ellipsenförmigen Hemmhöfen

3.5 Ergänzende Testmethoden

3.5.1 Reinheitskontrolle

Die Einstellung des Inokulums muss entsprechend den zu Grunde gelegten Durchführungsvorschriften erfolgen und zu einer definierten Einsaatdichte führen, welche im Rahmen dieser experimentellen Studie mit Hilfe des McFarland-Standards erreicht wird (NCCLS, 2002; Stock *et al.*, 2001). Zur Reinheitskontrolle des Inokulums der Teststämme wurde bei jedem einzelnen Versuchsdurchgang aus diesem mit einer sterilen Öse ein Verdünnungsausstrich auf Blutagar angefertigt. Nach Kultivierung führte jede ermittelte Verunreinigung zum Ausschluss der Ergebnisse dieser Testreihe (vgl. Abb. 6, S. 28).



Abbildung 6: saubere Reinheitskontrolle auf ESBL-Agar (links), Verunreinigung (rechts)

3.5.2 Weitere Nachweismethoden der minimalen Hemmstoffkonzentration: Dilutionsverfahren

Ergänzend zu dem oben beschriebenen Agar-Diffusionstest und Ellipsoidtest werden zur Verifizierung der Ergebnisse bei 20 Keimen zwei Dilutionsverfahren durchgeführt, die Agardilution und die Bouillon-Makrodilution.

Zur Verdünnung der Prüfsubstanz (Antibiotikum) werden 20 mg des Wirkstoffes in 10 ml H₂O gelöst, so dass die Grundlösung eine Wirkstoffkonzentration von 2 mg/ml enthält. Um eine Konzentration von 128 µg/ml herzustellen, werden 3,6 ml Isosensitest-Bouillon oder H₂O zu 6,4 ml dieser Lösung gegeben und danach in einem Verhältnis von 1:9 verdünnt. Jeweils 5 ml der jeweiligen Lösung werden erneut mit 5 ml Bouillon oder destilliertem Wasser gemischt, bis eine Endkonzentration von 0,03 µg/ml erreicht wird.

Zusatztest 1: Agardilution

Zur Ermittlung der minimalen Hemmstoffkonzentration durch Dilution werden in dieser Arbeit bei der Agardilution Wilkins-Chalgren-Agar und Mueller-Hinton-Agar als Nährmedium verwendet.

Zur Herstellung der Agarplatten wird flüssiges Agarmedium, welchem Antibiotikumkonzentrationen zwischen 0,06 µg/ml bis 128 µg/ml oder 256 µg/ml zugesetzt worden ist, in Petrischalen gegossen. Nach Aushärtung werden diese jeweils mit 50 µl einer bestimmten Bakteriensuspension (McFarland 0,5) beimpft und 24 Stunden bebrütet. Die Konzentration der Platte, bei der erstmals kein Wachstum festzustellen war, wird als minimale Hemmstoffkonzentration definiert.

Zusatztest 2: Bouillon-Makrodilution

Als Trägersubstanz des Antibiotikums bei der Makrodilution dient Bouillon, welche wie oben beschrieben verdünnt und in Reagenzglaschen gefüllt wird. Die niedrigste Konzentration bei der nach 16 bis 20 Stunden keine Zunahme der Trübung auftritt wird als minimale Hemmstoffkonzentration festgelegt. Die Ablesung erfolgt visuell und wird bei Bedarf photometrisch überprüft.

3.6 Auswertung mikrobiologischer Daten

Um im Rahmen einer experimentellen Studie aussagekräftige Ergebnisse zu erlangen, muss unabhängig von der zur *in-vitro*-Empfindlichkeitsprüfung gewählten Methode diese einer international anerkannten und standardisierten Vorschrift zur Durchführung folgen (Schwarz *et al.*, 2003). Die Durchführungsvorschriften des Deutschen Institutes für Normen e.V. (DIN, 2000a,b) und des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), ehemals National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1994, 2002) aus den Vereinigten Staaten von Amerika gehörten neben denen der British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC, 1988) und des Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2008a,b) zu den weltweit wichtigsten Richtlinien für Resistenztestungen. In Deutschland existierte ein Nebeneinander der DIN 58940 (Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika des Normenausschusses Medizin NaMed) und der M2-A7 (Disk testing), M7-A5 (Dilution testing for aerobs) und M11-A4 (Dilution testing for anaerobs) (NCCLS, 2002). Im Jahre 2006 wurde eine neue Norm der International Organization for Standardization (ISO 20776-1:2006) verabschiedet, welche durch die DIN initiiert wurde (Rodloff *et al.*, 2006, 2008).

Aufgrund unterschiedlicher Ergebnisinterpretierungen von Empfindlichkeitsprüfungen der DIN 58940 auf der einen Seite und der NCCLS auf der anderen wurde 1997 von der European Society for Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) das European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ins Leben gerufen und 2002 neu gestaltet, um die Grenzwertfestlegung zu harmonisieren (Kahlmeter *et al.*, 2003). Mittlerweile stehen einheitliche Werte zur Interpretation von MHKs und zur Beurteilung von Hemmhofdurchmessern des Agar-Diffusionstestes zur Verfügung, welche kontinuierlich bearbeitet und aktualisiert werden (EUCAST Breakpoint tablets for interpretation of MICs and zone diameters, Version 1.3, 2011). Im Januar 2010 fiel dann die Entscheidung zur Umstellung auf die Anwendung des EUCAST-Beurteilungssystems.

Die quantitativen beziehungsweise qualitativen Ergebnisse der Resistenztestungen werden bei Dilutionsverfahren in $\mu\text{g/ml}$ (mg/l) oder mg/ml (g/l), bei der Agar-Diffusionsmethode in mm angegeben. Um Aussagen über das Resistenzspektrum treffen und die gemessenen Ergebnisse auf die Klinik übertragen zu können, erfolgt anhand von Grenzwerten beziehungsweise „breakpoints“ eine qualitative Einteilung in die drei Kategorien sensibel „s“, intermediär „i“ (auch intermediär empfindlich oder mäßig empfindlich) und resistent „r“.

Definitionsgemäß handelt es sich um ein klinisch resistentes Bakterium (klinische Resistenz), wenn die *in-vitro* ermittelte minimale Hemmstoffkonzentration über der maximal *in vivo* erreichbaren, nicht toxischen Wirkstoffkonzentration in den jeweiligen Geweben liegt

(Krüger und Seidler, 2007; Mutschler *et al.*, 2008).

Die weltweit Gültigkeit besitzende Norm ISO 20776-1:2006 definiert diese Kategorien folgendermaßen:

- Sensibel (s): Als sensibel gegen ein bestimmtes Antibiotikum wird ein Bakterienstamm dann bezeichnet, wenn er in vitro von einer Konzentration dieses Wirkstoffs inhibiert wird, die mit einer hohen therapeutischen Erfolgswahrscheinlichkeit assoziiert ist.
- Intermediär (i): Als intermediär gegen ein bestimmtes Antibiotikum wird ein Bakterienstamm dann bezeichnet, wenn er in vitro von einer Konzentration dieses Wirkstoffs inhibiert wird, die mit einem unsicheren therapeutischen Ergebnis assoziiert ist.
- Resistent (r): Als resistent gegen ein bestimmtes Antibiotikum wird ein Bakterienstamm dann bezeichnet, wenn er in vitro von einer Konzentration dieses Wirkstoffs inhibiert wird, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit des Therapieversagens assoziiert ist.

3.7 Überlebenszeitanalyse

Zur Analyse der Überlebenszeit (survival analysis) wird als Goldstandard in medizinischen Studien die Kaplan-Meier-Methode angewandt, da hier berücksichtigt werden kann, dass nicht alle Studienteilnehmer der gesamten Testdauer ausgesetzt sind. Bei dieser 1958 durch Edward Kaplan und Paul Meier entwickelten Schätzungsmethode handelt es sich um einen nicht-parametrischen Test der Überlebensfunktion (survival function) im Rahmen der sogenannten Ereigniszeitanalyse. Sie dient zum Berechnen von Wahrscheinlichkeiten, dass ein bestimmtes Ereignis innerhalb eines vorher definierten Zeitintervalls nicht eintritt.

In dieser Studie wurde als Ereignis der tumorbedingte Tod festgelegt. Stirbt ein Patient tumorunabhängig oder steht der weiteren wissenschaftlichen Nachbeobachtung nicht mehr zur Verfügung (lost to follow-up), wird er durch ein Kreuz als zensiertes Ereignis eingerechnet. Sollte dies bereits während der eigentlichen Studie eintreten, werden diese Fälle als Studienabbrecher (Drop-outs) bezeichnet.

Klassischerweise verlaufen die Überlebensfunktionen treppenförmig, wobei jedes eingetretene Ereignis einer Treppenstufe entspricht und somit ein eigenes Beobachtungsintervall definiert (Altmann und Bland, 1998; Kaplan und Meier, 1958; Ziegler *et al.*, 2007a,b,c).

4 Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv

In die prospektive Studie wurden 30 Patienten der Universitätsklinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie der MLU mit der Diagnose eines Mundhöhlenkarzinomes eingeschlossen. Dabei handelte es sich um acht Frauen (26,7 %) und 22 Männer (73,3 %) in einem Alter von 24 bis 74 Jahren. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung waren die weiblichen Patienten zwischen 24 und 71, die männlichen zwischen 46 und 74 Jahre alt. Im gesamten Patientenkollektiv lag dieser durchschnittlich in einem Alter von $58,03 \pm 10,01$ (Medianwert $m = 60$), bei den Frauen bei $58,25 \pm 15,42$ ($m = 64,5$) und bei den Männern bei $57,95 \pm 7,93$ Jahren ($m = 59$).

Der Anteil der Patienten ≤ 50 Jahre lag im Hallenser Kollektiv bei 16,7 %, bei den Frauen bei 25 % und den Männern bei 13,6 %; 53,3 % sind ≤ 60 Jahre, bei den Frauen 37,5 %, bei den Männern 59,1 %.

4.2 Diagnosen

Bei den in diese Studie inkludierten Malignomen handelte es sich um Karzinome der Zunge, des Mundbodens, der Wangenschleimhaut, des Kieferknochens oder um Kombinationen zweier oder mehrerer genannter Lokalisationen.

Wie aus Abbildung 7 zu entnehmen, überwog dabei die Diagnose mehrerer Tumorlokalisationen bei 10 Patienten (33,3 %), bei welchen die Kombination aus Mundboden- und Zungenkarzinom dominierte. Bei den weiblichen Probanden herrschten die Zungenkarzinome mit 38 %, bei den männlichen die Kombinationen mit 36 % vor. Isolierte Plattenepithelkarzinome des Mundbodens machten 16,7 % aus und konnten nur bei männlichen (23 %), isolierte Tumoren des Kieferknochens (3,3 %) nur bei weiblichen Patienten (12,5 %) nachgewiesen werden.

Werden kombinierte Mundhöhlenkarzinome in jede Gruppe der jeweiligen Lokalisation zugeordnet, zeigt sich ein anderes Bild. Insgesamt wurden 44 Bereiche infiltriert: davon der Mundboden 15 mal, die Zunge 14 mal, die Wange zehn mal und der Kieferknochen fünf mal.

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung waren die Malignome dieser Patienten weit fortgeschritten, imponierten durch einen großen Tumor (T4) oder beidseitige Lymphknotenmetastasen (N2) und waren bei 50 % kein Primärtumor, sondern ein Zweitkarzinom.

Bei jedem zweiten Karzinom des Patientenkollektivs musste das Stadium T4, bei 30 % T2 und bei nur 20 % T1 festgestellt werden. Fernmetastasen wurden bei keinem Patienten nachgewiesen.

Bezüglich des Gradings überwog der Differenzierungsgrad G2 mit 63,3 %, G1 und G3 folgten mit je 16,7 % sowie G4 mit 3,3 %.

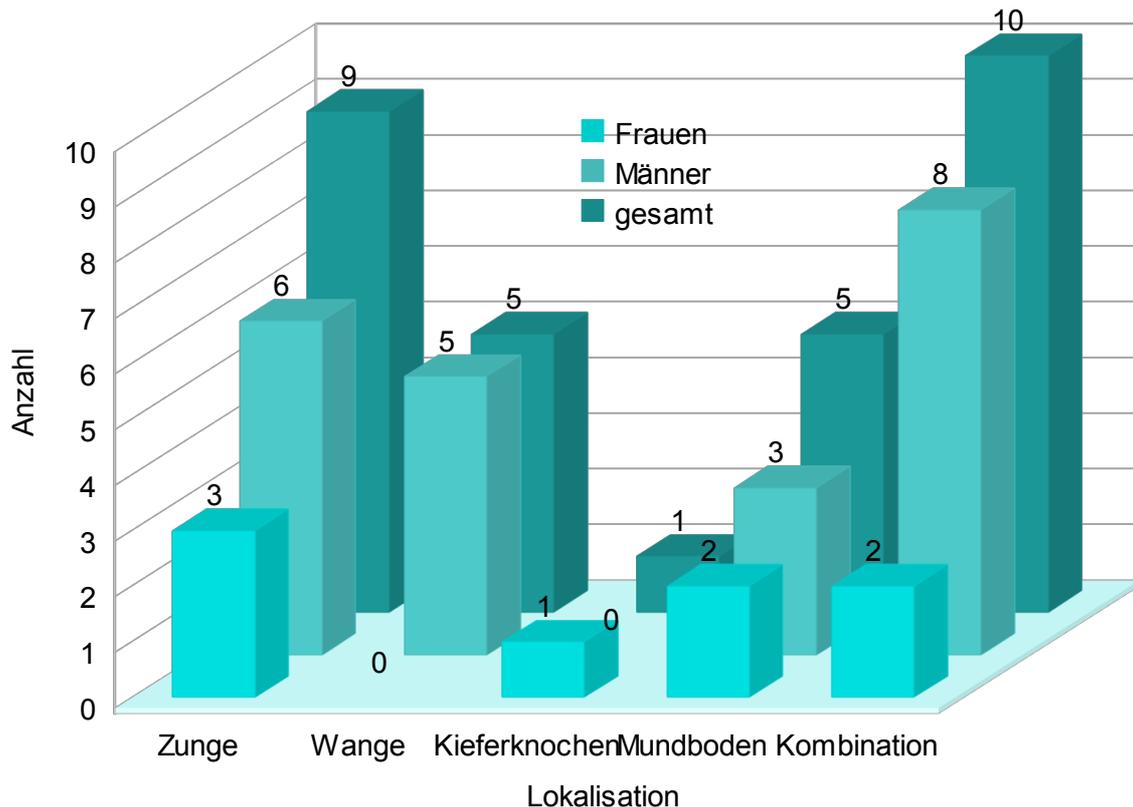


Abbildung 7: Geschlechtsverteilung der Lokalisation von 30 Mundhöhlenkarzinomen

4.3 Soziogramme

Aus der Fülle der anamnestisch erhobenen Daten kamen nur die karzinomrelevanten Aussagen zur Auswertung.

Die überwiegende Mehrzahl der onkologischen Patienten (26 von 30; 86,7 %) wiesen einen hochgradigen Genuss an Alkohol und Nikotin auf. Weitere Noxen wurden nicht konsumiert.

Postoperativ befürworteten die Strahlentherapeuten für 26 (86,7 %) Patienten adjuvante oder palliative Behandlungen, 24 (insgesamt 80 %) der 26 empfohlenen Therapien wurden durchgeführt, bei einem Patienten konnte aufgrund einer Zeitverzögerung durch multiple Komplikationen die Radiatio nicht angewandt werden, ein weiterer lehnte diese

ab. In sieben Fällen (23 %) wurde die Bestrahlung durch eine Chemotherapie ergänzt. Allgemeinerkrankungen traten nahezu ausnahmslos als Begleiterkrankungen durch alkoholtoxische Wirkungen oder chronischen Nikotinkonsum auf (Leber- und Lungenschädigungen); lediglich ein Patient litt unter einem insulinabhängigen Diabetes mellitus. Essentielle arterielle Hypertonie, venöse Insuffizienzen oder Osteoporose haben nach jetzigem Stand der Wissenschaft keinen Einfluss auf die Entstehung von Karzinomen.

4.4 Überlebenszeit

Seit Beginn der prospektiven Studie im Jahre 2003 konnten alle 30 Patienten über einen postoperativen Zeitraum von mindestens fünf Jahren beobachtet und kontrolliert werden. Es zeigte sich der bekannte Zusammenhang zwischen den Stadien der Tumorerkrankung und dem Überleben der Patienten.

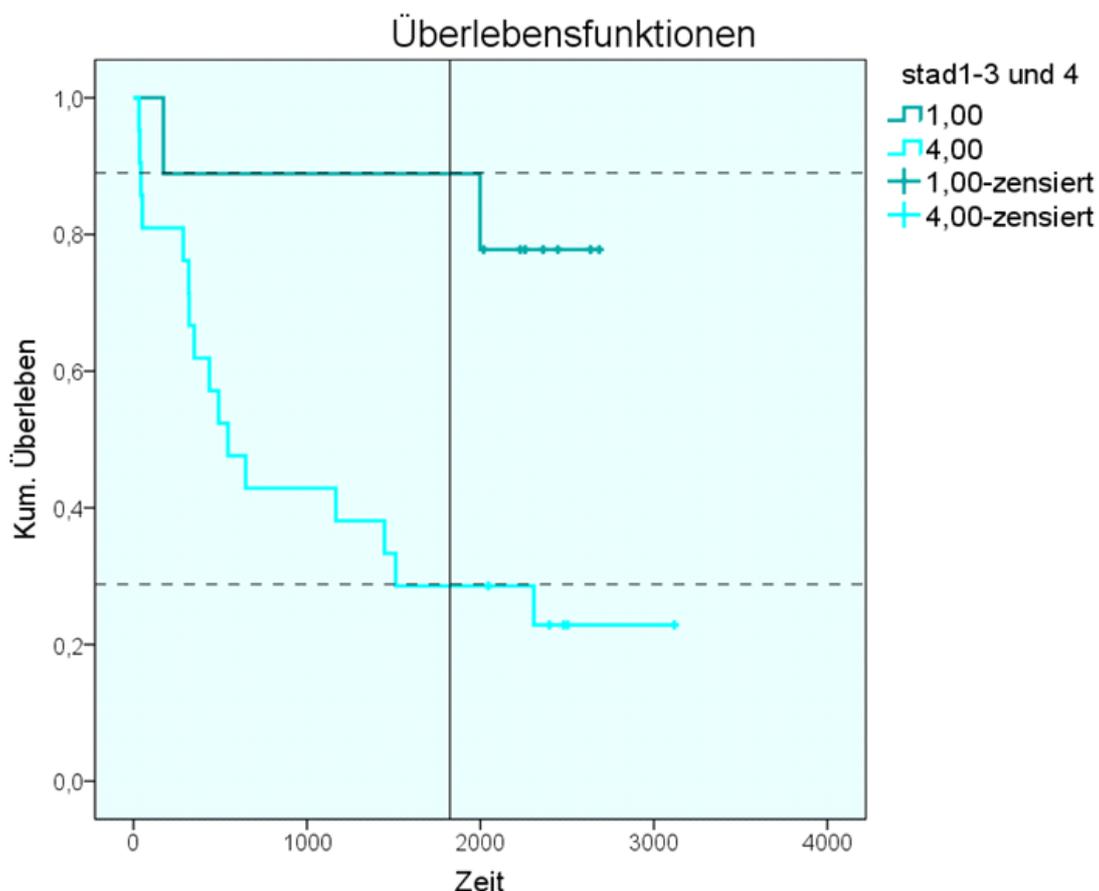


Abbildung 8: Überleben der Patienten in Tagen in Abhängigkeit vom Tumorstadium (1,00 entspricht stad 1-3 (Patienten in den Tumorstadien 1 bis 3), 4,00 entspricht stad 4 (Patienten im Tumorstadium 4))

So betrug das 5-Jahres-Überleben aller Patienten 43,3 %, in den Stadien 1 bis 3 etwa 90 %, wohingegen im Falle des Tumorstadiums 4 lediglich 30 % der Patienten diese überlebten (vgl. Abb. 8, S. 34). Insgesamt verstarben bis zum Stichtag am 01.01.2012 tumorbedingt 18 der 30 Patienten. Das Überleben zu diesem Zeitpunkt betrug in den Stadien 1 bis 3 etwa 80 % und im Stadium 4 nur 20 % ($p = 0,014$, log rank: 5,4 bei $p=0,025$).

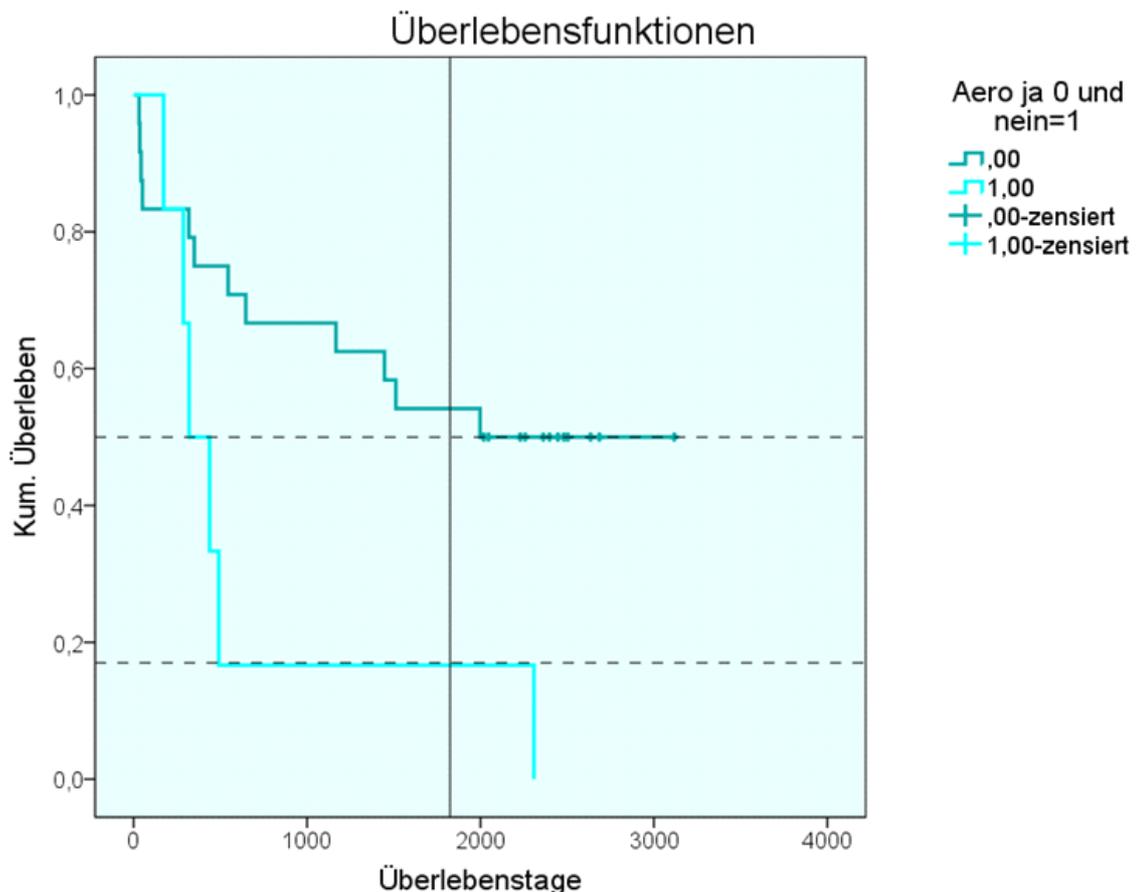


Abbildung 9: Überleben in Tagen in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Aerobiern im Biofilm (Aero ja (0) = Aerobier konnten nachgewiesen werden, nein (1) = es konnten keine Aerobier nachgewiesen werden)

Interessanterweise zeigte auch die bakterielle Besiedlung der Tumoroberflächen einen eindeutigen Einfluss auf das Überleben der Patienten (vgl. Abb. 9, S. 35). In multivariabler Cox-Regressionsanalyse konnte ein statistisch signifikantes 6,04-fach erhöhtes Risiko des tumorassoziierten Versterbens gefunden werden, wenn die Biofilme der Mundhöhlenkarzinome rein anaerob besiedelt waren ($p=0,014$; log rank: 6,04-fach bei $p = 0,025$). So betrug das 5-Jahres-Überleben von Tumorpatienten mit rein anaerober Biofilmflora lediglich etwa 18 %.

4.5 Keimspektren

Im Rahmen dieser Studie wurden den 90 untersuchten Studienteilnehmern 150 Abstriche entnommen und insgesamt 1006 Erreger isoliert, die sich auf 352 unterschiedliche Mikroorganismenspezies verteilen (340 Bakterienstämme und zwölf Hefepilze). Mit Proben aus dem Tumorzentrum, der Tumorperipherie und gesunder Mundschleimhaut ließen sich mit wenigen Ausnahmen dieselben Keimspektren anzüchten. Differenzen zeigten sich zwar hier bei schwer anzüchtbaren Anaerobiern, jedoch wiesen sie insgesamt keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der Bakterien- und Pilzbesiedlung auf. Die Gesamtzahl der Mikroorganismen in der Kontrollgruppe lag mit 128 Isolaten deutlich über der der Risiko- und Patientengruppe mit jeweils 112 Isolaten. Die Summe der nachgewiesenen Pilzkulturen nahm von acht auf drei beziehungsweise eine ab.

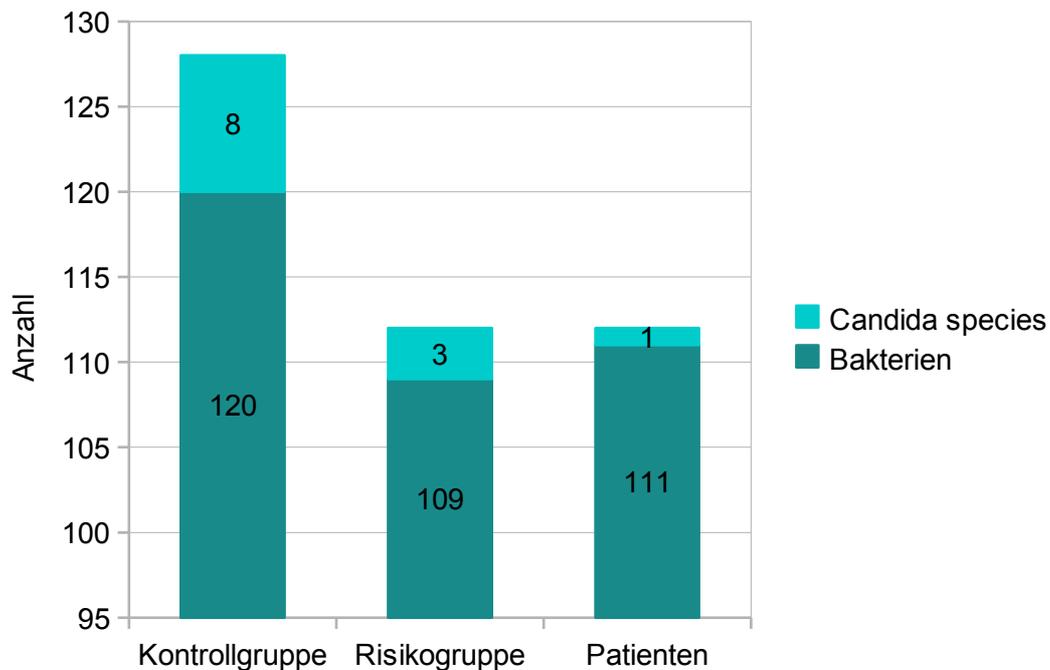


Abbildung 10: Keimspektren der jeweiligen Studiengruppen hinsichtlich der Bakterien- und Candidabesiedlung

Dieses Verhältnis spiegelt sich ebenso im Hinblick auf die Keimanzahl pro Abstrich wider; durch jede Entnahme konnten durchschnittlich 3,91 Erreger (minimal ein, maximal zehn) beziehungsweise 3,78 Bakterien (minimal ein, maximal zehn) gewonnen werden.

Hinsichtlich der Zusammensetzung der mikrobiologischen Kultur kann man rein aerobe und anaerobe von gemischten Populationen und Monopopulationen unterscheiden. Reinkulturen finden sich nur in der Risiko- und Patientengruppe, nicht jedoch in der Kontrollgruppe.

Der prozentuale Anteil an Mischpopulationen liegt bei den Kontrollen bei 100 %, bei den Exponierten bei 63 % und den Erkrankten bei 23 %. Die Reinkulturen verhalten sich nahezu gegenläufig (Tabelle 1).

Tabelle 1: Zusammensetzung der Erregerspektren aller Untersuchungsgruppen

	Mischpopulation	rein aerob	rein anaerob	Monopopulation
Kontrollgruppe	30	0	0	0
Risikogruppe	19	5	6	1
Patientengruppe	7	8	15	4
gesamt	56	13	21	5

Betrachtet man nun die genauere Zusammensetzung der mikrobiologischen Kulturen, erkennt man, dass dabei die anaeroben Spezies im Vergleich zu den aeroben Spezies nur unwesentlich überwiegen: 176 Anaerobier stehen 164 Aerobiern in einem Verhältnis von annähernd 1:1 (1,07:1) gegenüber.

Die im mikrobiologischen Labor nachgewiesenen aeroben und anaeroben Bakterien werden in den nachfolgenden Tabellen 2 bis 7 (vgl. S. 38 - 41) im Detail dargestellt. Die klinisch, infektions- und karzinomepidemiologisch relevanten Anaerobier werden ebenfalls in grampositive und gramnegative Erreger unterteilt.

Das aerobe Spektrum der isolierten Keime wird, wie aus Tabelle 3 (vgl. S. 38) ersichtlich ist, vor allem durch Vertreter des Genus *Streptococcus* mit insgesamt 47 der 164 aeroben Bakterienstämme dominiert. Die Genera *Neisseria* und *Staphylococcus* sind mit 36 beziehungsweise 30 Erregern vertreten.

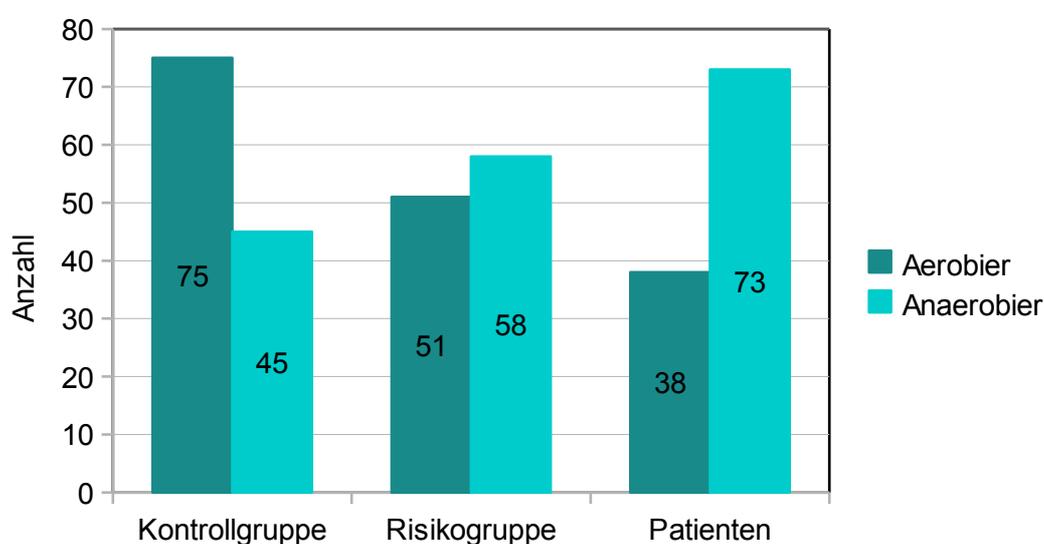


Abbildung 11: Verhältnis der Aerobier zu den Anaerobiern in den einzelnen Untersuchungsgruppen

Tabelle 2: Verhältnis grampositiver zu gramnegativer Aerobier bei n = 164 in Abhängigkeit der untersuchten Gruppen

Bakterium	Gesamt	Anzahl gMSH	Anzahl rMSH	Anzahl tMSH
Grampositive Aerobier	93	48	26	19
Gramnegative Aerobier	71	27	25	19
gesamt	164	75	51	38

gMSH: gesunde Mundschleimhaut, rMSH: Mundschleimhaut der Risikogruppe, tMSH: Mundschleimhaut der Tumoroberfläche

Tabelle 3: Erregergattungen des grampositiven aeroben Keimspektrums in Abhängigkeit der untersuchten Gruppen

Bakterium	Gesamt	Anzahl gMSH	Anzahl rMSH	Anzahl tMSH
Viridans-Streptokokken	47	30	14	3
<i>Staphylococcus</i>	30	18	4	8
• <i>aureus</i>	17	8	4	5
• <i>epidermidis</i>	13	10	0	3
<i>Enterococcus faecalis</i>	14	0	7	7
<i>Stomatococcus mucilaginosus</i>	2	0	1	1
gesamt	93	48	26	19

gMSH: gesunde Mundschleimhaut, rMSH: Mundschleimhaut der Risikogruppe, tMSH: Mundschleimhaut der Tumoroberfläche

Streptokokken als Bestandteil der menschlichen Normalflora der Mundhöhle machen dementsprechend 28 % der mikrobiologisch isolierten Aerobier dieser Studie aus und können bei 52 % der Probanden gewonnen werden. Interessanterweise gehören diese bei 100 % der Gesunden, bei 47 % der Exponierten und nur bei 10 % der Patienten zur Mundhöhlenflora. Insgesamt werden nur vergrünende Streptokokken im Patientenkollektiv als *S. salivarius* oder *anginosus* angezüchtet. Ähnlich verhält es sich bei Betrachtung des Genus *Neisseria*. Diese sind zu 87 % in der normalen Flora der Mundhöhle und bei 33 % der Risikogruppe nachzuweisen.

Es fällt auf, dass 2/3 (30 von 45) aller Anaerobier der Nicht-Exponierten Vertreter des vorherrschenden Genus *Peptostreptococcus* sind. Im Kollektiv der Exponierten werden vor allem die Gattungen *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium* und *Prevotella*, bei onkologischen Probanden hauptsächlich *Prevotella* und *Fusobacterium* isoliert.

Tabelle 4: Erregergattungen des gramnegativen aeroben Keimspektrums in Abhängigkeit der untersuchten Gruppen

Bakterium	Gesamt	Anzahl gMSH	Anzahl rMSH	Anzahl tMSH
<i>Haemophilus parainfluenza</i>	8	1	4	3
<i>Neisseria species</i>	36	26	10	0
<i>Escherichia coli</i>	14	0	7	7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	0	1	2
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	0	0	1
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0	0	1
<i>Proteus mirabilis</i>	5	0	3	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	0	2
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	0	0	1
gesamt	71	27	25	19

gMSH: gesunde Mundschleimhaut, rMSH: Mundschleimhaut der Risikogruppe, tMSH: Mundschleimhaut der Tumoroberfläche

Dementsprechend kann die Biofilmflora der Risikogruppe als Mischpopulation beider übrigen Gruppen angesehen werden. Hier kann die grampositive Gattung *Peptostreptococcus* noch nachgewiesen werden, die Anzahl der gramnegativen Isolate nimmt anti-proportional zu.

Die Darstellung der grampositiven und -negativen Anaerobier folgt gruppiert in den beiden Tabellen 6 und 7 (vgl. S. 40, 41). Das Genus *Peptostreptococcus* dominiert eindeutig die aeroben Erreger mit 66 (73 %) der 91 grampositiven Stämme. *Capnocytophaga* spp. und *Propionibakterium* spp. sind zehn beziehungsweise sieben mal vertreten.

Vertreter der Genera *Prevotella* und *Fusobakterium* bestimmen das gramnegative anaerobe Spektrum mit 34 und 39 Isolaten.

Tabelle 5: Verhältnis grampositiver zu gramnegativer Anaerobier bei n = 176 in Abhängigkeit der untersuchten Gruppen

Bakterium	Gesamt	Anzahl gMSH	Anzahl rMSH	Anzahl tMSH
Grampositive Anaerobier	91	33	31	27
Gramnegative Anaerobier	85	12	27	46
gesamt	176	45	58	73

gMSH: gesunde Mundschleimhaut, rMSH: Mundschleimhaut der Risikogruppe, tMSH: Mundschleimhaut der Tumoroberfläche

Tabelle 6: Erregergattungen des grampositiven anaeroben Keimspektrums in Abhängigkeit der untersuchten Gruppen

Bakterium	Gesamt	Anzahl gMSH	Anzahl rMSH	Anzahl tMSH
Peptostreptokokken	66	30	20	16
<i>Propionibacterium species</i>	7	3	2	2
<i>Capnocytophaga species</i>	10	0	7	3
<i>Gemella morbilorum</i>	3	0	0	3
<i>Clostridium difficile</i>	1	0	0	1
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	1	0	0	1
<i>Bifidobacterium species</i>	3	0	2	1
gesamt	91	33	31	27

gMSH: gesunde Mundschleimhaut, rMSH: Mundschleimhaut der Risikogruppe, tMSH: Mundschleimhaut der Tumoroberfläche

Das Verhältnis der aus den beiden Tabellen 6 und 7 (S. 28, 33) zu entnehmenden jeweiligen Gesamtzahl der anaeroben Spezies liegt bei nahezu 1:1 (1,07:1): 91 grampositive stehen 85 gramnegativen Anaerobiern gegenüber.

Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Untersuchungsgruppen zeichnet sich hier ein ähnliches Bild ab wie das Verhältnis der aeroben und anaeroben Erreger (vgl. Abb. 11, S. 37). Wie in Abbildung 12 (vgl. S. 41) zu erkennen ist, dominieren die grampositiven Anaerobier in der Kontrollgruppe eindeutig (33:12), bei den Risikopatienten nur unwesentlich (31:27). Entgegengesetzt verhält es sich in der Kategorie der Tumorpatienten, in der die gramnegativen Anaerobier überwiegen (46:27).

Es kann an dieser Stelle postuliert werden, dass das Miteinander der einzelnen Bakterien untereinander bei den gesunden Probanden durch ein aerobes Spektrum bestimmt wird; in der Risikogruppe halten sich sowohl Aerobier und Anaerobier als auch grampositive und gramnegative anaerobe Spezies annähernd die Waage. Interessanterweise überlegen im Patientenkollektiv nicht nur die Anaerobier die Aerobier, sondern auch die karzinom- und infektionsepidemiologisch relevanten gramnegativen die grampositiven anaeroben Spezies.

Die Gesamtheit der isolierten anaeroben Bakterienstämme, welche man aus Abbildung 12 (vgl. S. 41) erschließen kann, zeigt quantitative und qualitative Unterschiede in der gruppenspezifischen Zusammensetzung: Nicht nur die Vielfältigkeit des anaeroben Spektrums, sondern ebenso die Anzahl der einzelnen isolierten Keime variieren dementsprechend.

Tabelle 7: Erregergattungen des gramnegativen anaeroben Keimspektrums in Abhängigkeit der untersuchten Gruppen

Bakterium	Gesamt	Anzahl gMSH	Anzahl rMSH	Anzahl tMSH
<i>Prevotella species</i>	34	4	12	18
<i>Fusobacterium species</i>	39	5	12	22
<i>Porphyromonas species</i>	4	3	0	1
<i>Mobiluncus species</i>	4	0	2	2
<i>Bacteroides caccae</i>	3	0	1	2
<i>Tissierella praecula</i>	1	0	0	1
gesamt	85	12	27	46

gMSH: gesunde Mundschleimhaut, rMSH: Mundschleimhaut der Risikogruppe, tMSH: Mundschleimhaut der Tumoroberfläche

Je stärker das Gleichgewicht gemessen an gesunder Mundschleimhautflora aus der Waage gekommen ist, desto mannigfacher wird das Anaerobierspektrum. Insbesondere die Gruppe der gramnegativen Anaerobier spiegelt dann das Maß der Veränderung der normalen Biofilmflora wider. Die anaerobe grampositive Flora der gesunden Mundschleimhaut, welche durch die überwiegenden Peptostreptokokken und die deutlich weniger nachzuweisenden Propionibakterien gekennzeichnet ist, nimmt mit zunehmender maligner Transformation ab, die krankheitsbegleitende gramnegative Population zu.

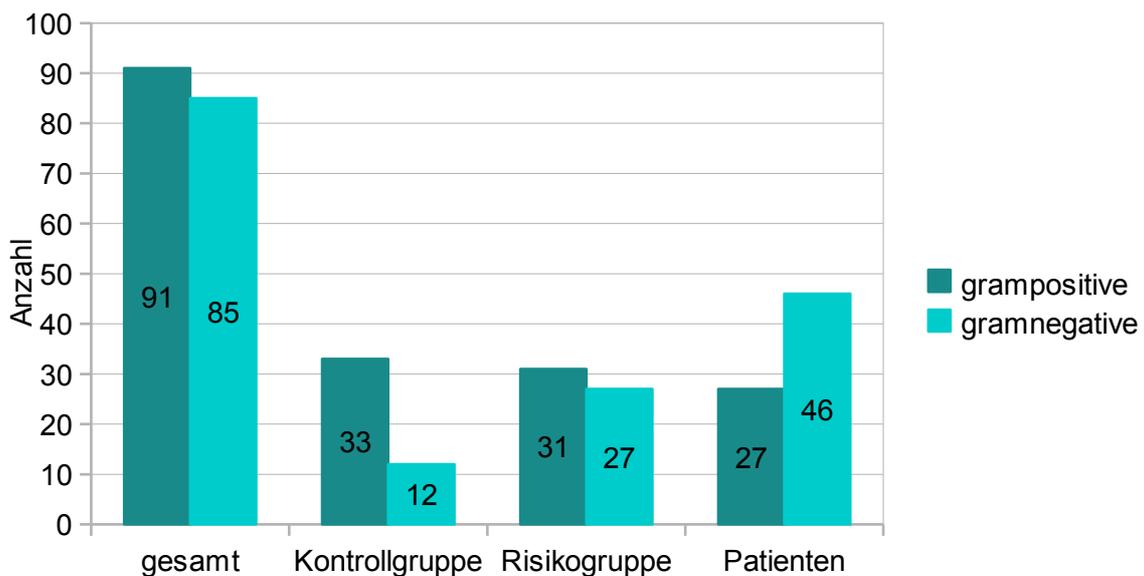


Abbildung 12: Verhältnis grampositiver zu gramnegativer Anaerobier im Probandenkollektiv und den einzelnen Untersuchungsgruppen

4.6 Genus *Peptostreptococcus*

Exemplarisch wird nachfolgend die transiente Erregergattung *Peptostreptococcus* bis in die einzelnen Spezies in Abbildung 13 (vgl. S. 42) detailliert dargestellt. Von den zur Zeit bekannten 17 Spezies (ZCT 5-2005) konnten *P. anaerobius*, *asaccharolyticus*, *magnus*, *micros*, und *prevotii*, teilweise nur *Peptostreptococcus* spp. isoliert werden.

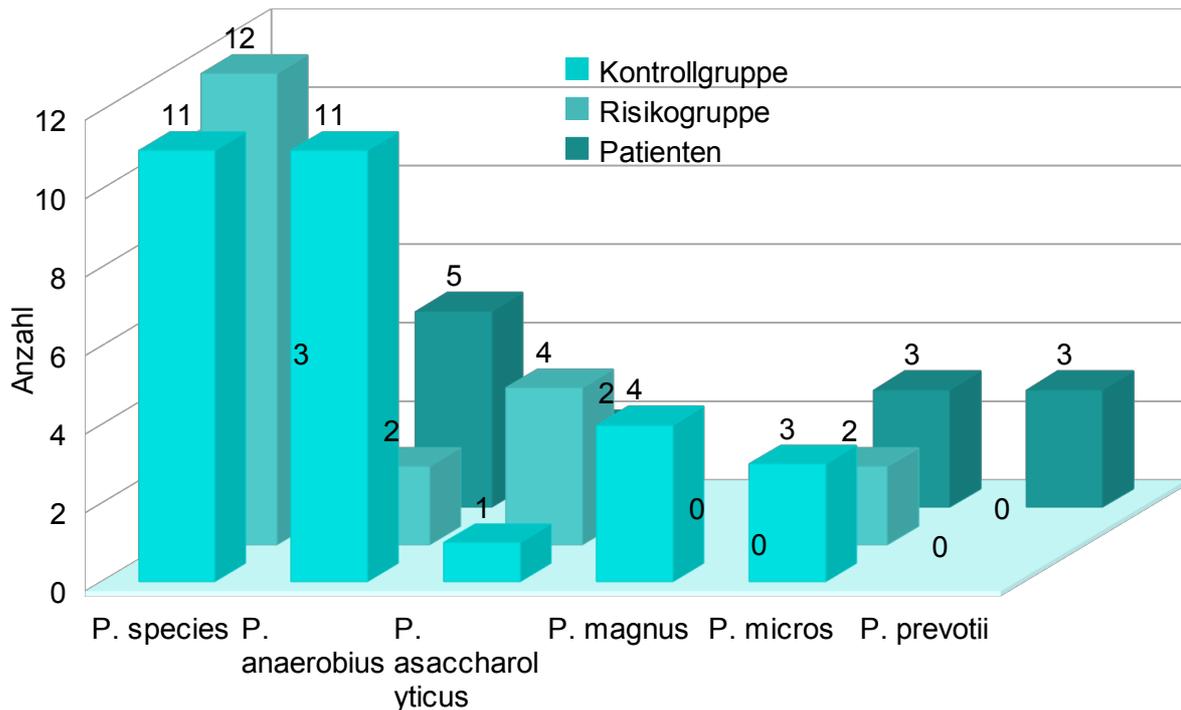


Abbildung 13: Spezies des Genus *Peptostreptococcus* hinsichtlich der einzelnen Studiengruppen bei n = 66

Im Rahmen dieser Studie wurden bei den 90 Studienteilnehmern 66 mal Peptostreptococci, annähernd 2/3 (64 %) dieser als *Peptostreptococcus* spp. und *anaerobius* mit 26 beziehungsweise 18 Isolaten, kultiviert. In der jeweiligen Untersuchungsgruppen konnten diese in 30 (100 % der Kontrollen), 19 (63 % der Exponierten) und zwölf (40 % der Patienten) Proben nachgewiesen werden.

Über die prozentuale Aufteilung der Peptostreptokokken als Kommensale des Cavum oris gibt es keine Literatur. Die Keimbesiedlung in der Kontrollgruppe kann als Normalflora der Mundhöhle angesehen werden. *Peptostreptococcus* spp. und *anaerobius* wurden jeweils elf mal (37 %), *P. asaccharolyticus* ein mal (3,3 %), *P. magnus* vier mal (13,3 %) und *P. micros* drei mal (10 %) isoliert. *P. prevotii* wurde nicht nachgewiesen.

4.7 Resistenztestungen

Im Rahmen dieser prospektiven Studie wurden ausschließlich EUCAST-empfohlene und somit primär wirksame Antibiotika für die je nach Bakteriengruppen sortierten Resistenztestungen verwendet. Um konkrete für die klinische Routine anwendbare Aussagen treffen zu können, wurde das Hauptaugenmerk auf die kieferchirurgisch alltäglich genutzten Antibiotika gelegt. So wird zum Beispiel Gentamycin vor allem für gramnegative Aerobier eindeutig empfohlen, jedoch klinisch nicht verwendet und dementsprechend nicht getestet.

Durch die Ergebnisse der entsprechend durchgeführten Empfindlichkeitsprüfungen können neue relevante Aussagen zum aktuellen Resistenzspektrum aus regionaler Sicht getroffen werden. In den folgenden Tabellen 8 bis 11 wird dargestellt welche Resistenzquoten für die jeweiligen Antibiotika ermittelt worden sind und wo die entsprechenden Hauptresistenzen liegen.

Tabelle 8: Übersicht der Resistenzquoten in Bezug auf alle Untersuchungsgruppen, unterteilt in die gängigen Antibiotika

Antibiotikum	Kontrollgruppe	Risikogruppe	Patientengruppe
Penicillin	13,3	26,7	40
Ampicillin	16,7	20	56,7
Cefuroxim	0	0	0
Imipenem	0	0	0
Doxycyclin	3,3	10	23,3
Erythromycin	13,3	13,3	6,7
Ciprofloxacin	13,3	6,7	16,7
Clindamycin	3,3	46,7	46,7
Methicillin	10	0	6,7
Oxacillin	10	0	6,7
Amoxicillin/Clavulansäure	0	0	20
Piperacillin/Tazobactam	0	0	0

Tabelle 9: Hauptresistenzen in Bezug auf die drei Untersuchungsgruppen, unterteilt in die gängigen Antibiotika

Antibiotikum	Kontrollgruppe	Risikogruppe	Patientengruppe
Penicillin	Staphylokokken	Staphylokokken Fusobakterien	Staphylokokken Fusobakterien
Ampicillin	Staphylokokken	Staphylokokken <i>E. coli</i>	Staphylokokken <i>E. coli</i>
Doxycyclin	<i>H. parainfluenza</i>	Neisserien	<i>E. coli</i>
Erythromycin	Viridans-S.	Viridans-S.	<i>E. faecalis</i>
Ciprofloxacin	<i>S. epidermidis</i>	Viridans-S.	<i>E. faecalis</i> <i>S. epidermidis</i>
Clindamycin	Peptostreptokokken	Peptostreptokokken Prevotellen	Peptostreptokokken Prevotellen
Methicillin	<i>S. epidermidis</i>		<i>S. epidermidis</i>
Oxacillin	<i>S. epidermidis</i>		<i>S. epidermidis</i>
Amoxicillin/Clavulansäure			<i>F. nucleatum</i>

Tabelle 10: Hauptresistenzen in Bezug auf die drei Untersuchungsgruppen, unterteilt in die neueren Antibiotika

Antibiotikum	Kontrollgruppe	Risikogruppe	Patientengruppe
Azithromycin			<i>H. parainfluenza</i>
Telithromycin			<i>S. aureus</i>
Gatifloxacin			<i>H. parainfluenza</i>
Levofloxacin	Viridans-S.	Viridans-S.	<i>H. parainfluenza</i>
Moxifloxacin			<i>H. parainfluenza</i>

Tabelle 11: Übersicht der Resistenzquoten in Bezug auf alle Untersuchungsgruppen, unterteilt in die neueren Antibiotika

Antibiotikum	Kontrollgruppe	Risikogruppe	Patientengruppe
Azithromycin	0	0	3,3
Telithromycin	0	0	3,3
Gatifloxacin	0	0	3,3
Levofloxacin	3,3	3,3	3,3
Moxifloxacin	0	0	3,3

4.7.1 Routineantibiotika

In der Gruppe der grampositiven Kokken fallen insbesondere bei den hauptsächlich verwendeten Antibiotika deutliche Resistenzen auf und werden deshalb gesondert, unterteilt in die resistenten und intermediären Genera, veranschaulicht (vgl. Abb. 14 bis 17, S. 45, 46).

Intermediäre Erregerempfindlichkeiten können auf eine mögliche zukünftige Resistenzentwicklung deuten und werden deshalb in den Abbildungen gesondert dokumentiert.

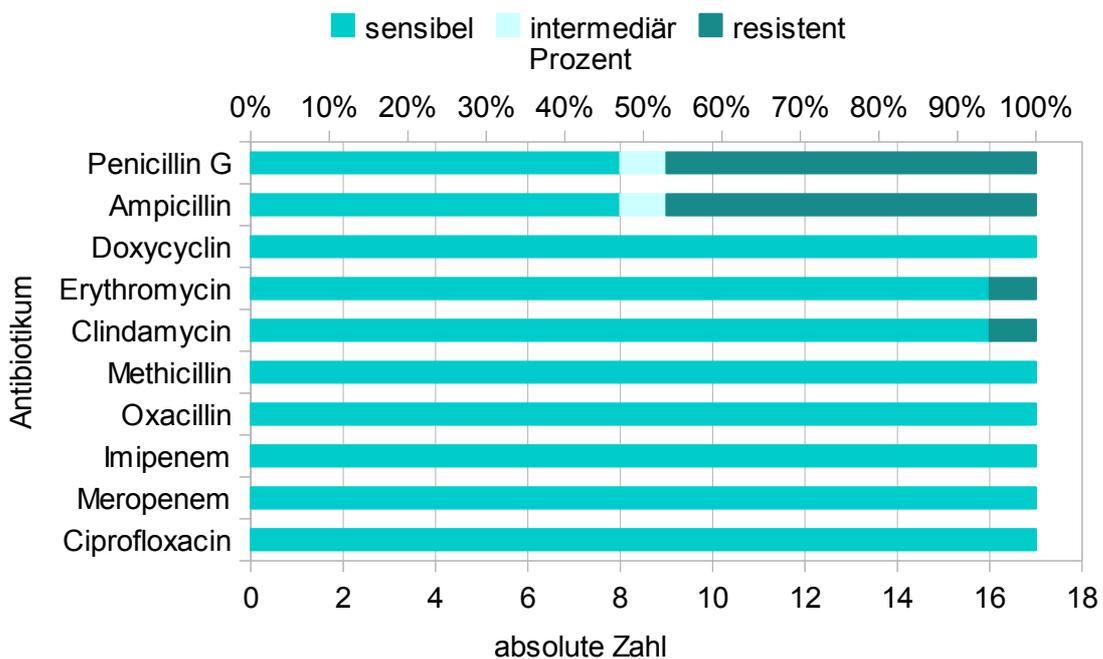


Abbildung 14: Resistenzprofil von *Staphylococcus aureus* bei n = 17

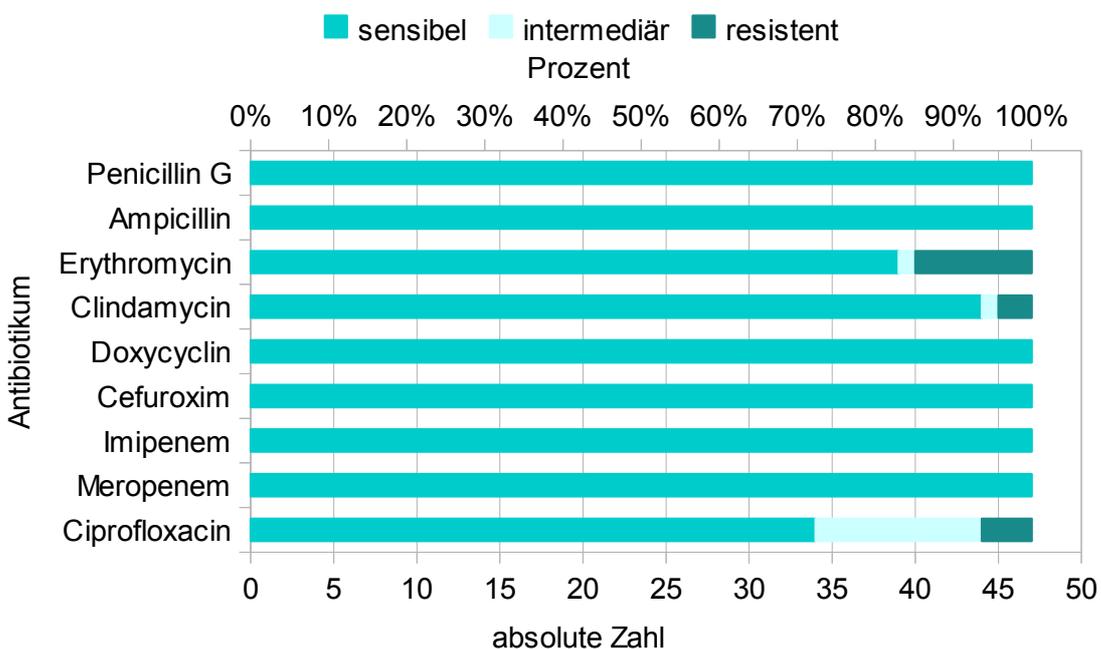
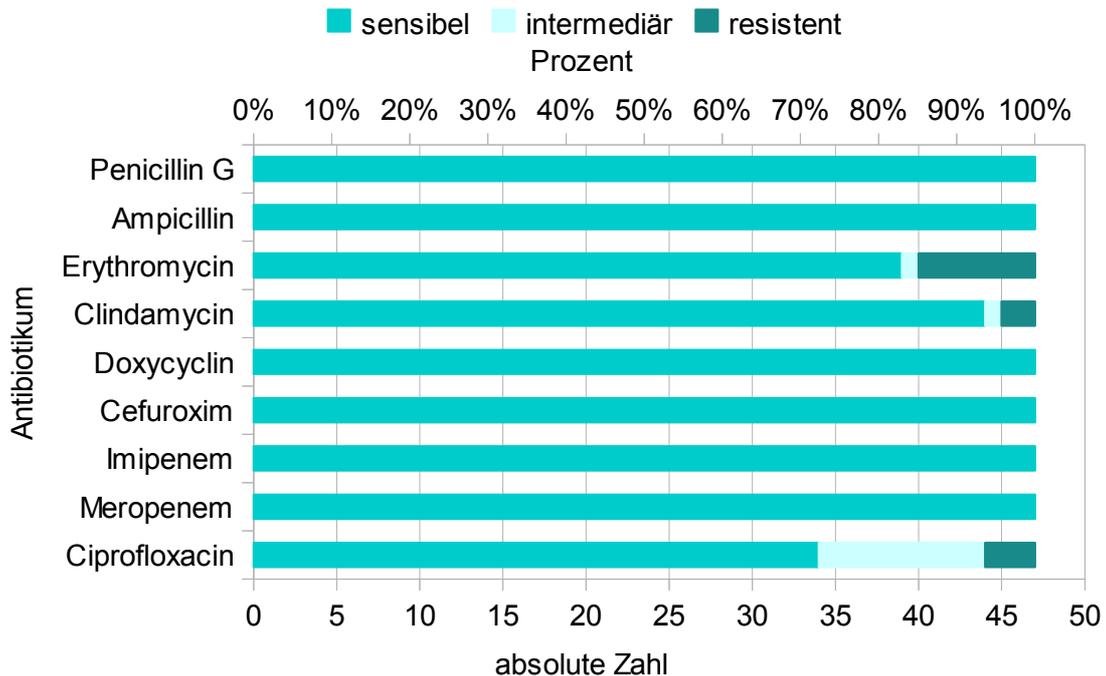
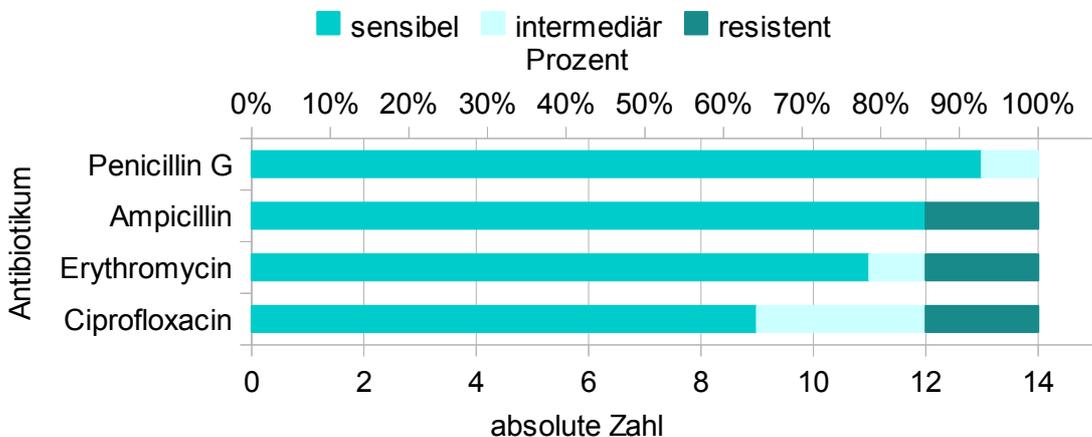


Abbildung 15: Resistenzprofil von *Staphylococcus epidermidis* bei n = 13

Abbildung 16: Resistenzprofil der Viridans-Streptokokken (*Streptococcus* spp.) bei n = 47Abbildung 17: Resistenzprofil von *Enterococcus faecalis* bei n = 14

In der Gruppe der gramnegativen Aerobier wird das aufgrund häufiger nosokomialer Multi-resistenzen zu den Problemkeimen zählende Bakterium *P. aeruginosa* gegenüber den relevanten Antibiotika Imipenem, Meropenem und Ciprofloxacin rein sensibel getestet. Die Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfungen von *P. mirabilis* gegenüber Ampicillin, Cefuroxim, Imipenem, Meropenem, Doxycyclin und Ciprofloxacin, von *K. pneumoniae* gegenüber Ampicillin, Cefuroxim, Imipenem, Meropenem, Doxycyclin und Ciprofloxacin, von *S. liqueferans* gegenüber Cefuroxim, Imipenem, Meropenem und Ciprofloxacin sowie

C. freundii gegenüber Cefuroxim, Imipenem, Meropenem und Doxycyclin zeigen keine Entwicklung von Resistenzen bei Anwendung der empfohlenen Chemotherapeutika. Lediglich die Gruppe der Neisserien, *E. coli* und *H. parainfluenza* zeigen resistente Stämme, welche deshalb gesondert in Diagrammen dargestellt werden (vgl. Abb. 18 bis 20). Der häufig multiresistente und nosokomial verbreitete Problemkeim *A. baumannii* verhält sich gegenüber Cefuroxim, Imipenem und Meropenem in dieser Studie empfindlich, gegenüber Doxycyclin zu 100 % resistent.

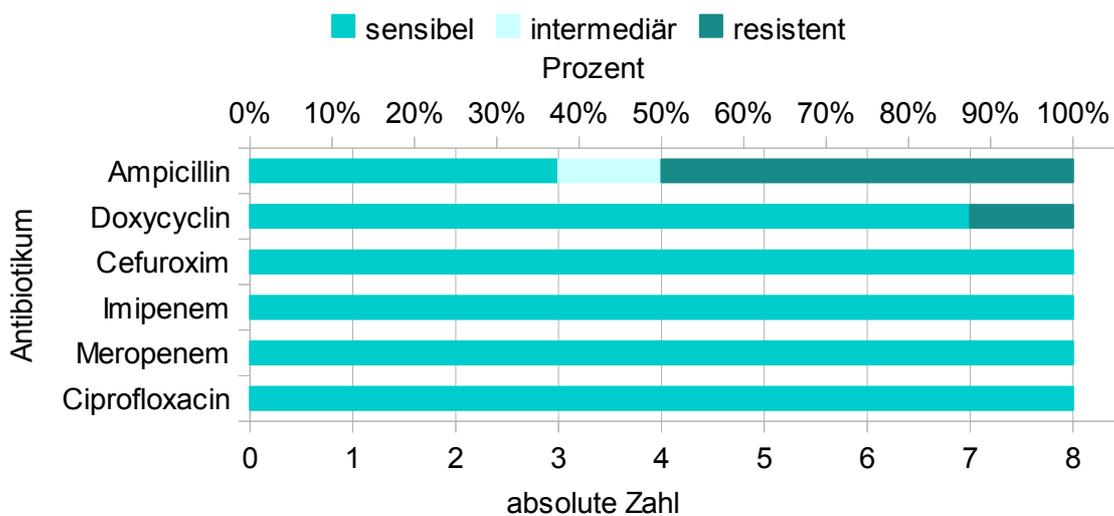


Abbildung 18: Resistenzprofil von *Haemophilus parainfluenza* bei n = 8

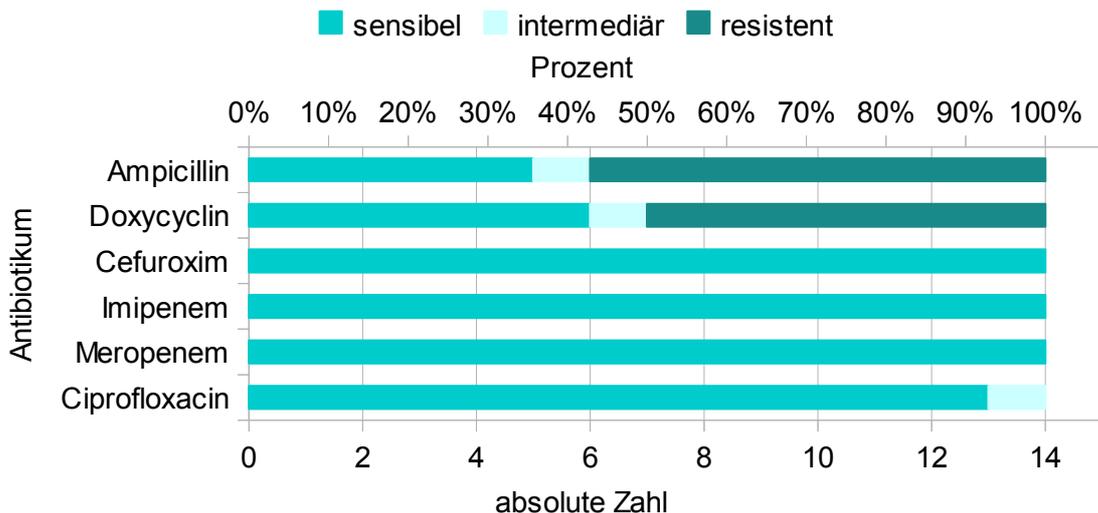


Abbildung 19: Resistenzprofil von *Escherichia coli* bei n = 14

Im Erregerspektrum der grampositiven Anaerobier verhalten sich die Propriobakterien, *G. morbilorum*, Bifidobakterien und *C. difficile* sowie *E. aerofaciens* gegenüber Penicillin G, Amoxicillin/Augmentan, Piperacillin/Tazobactam, Imipenem, Metronidazol und Clindamycin vollständig sensibel.

Der Genus der Peptostreptokokken zeigt Resistenzen, welche in der folgenden Abbildung (Abb. 21) veranschaulicht werden.

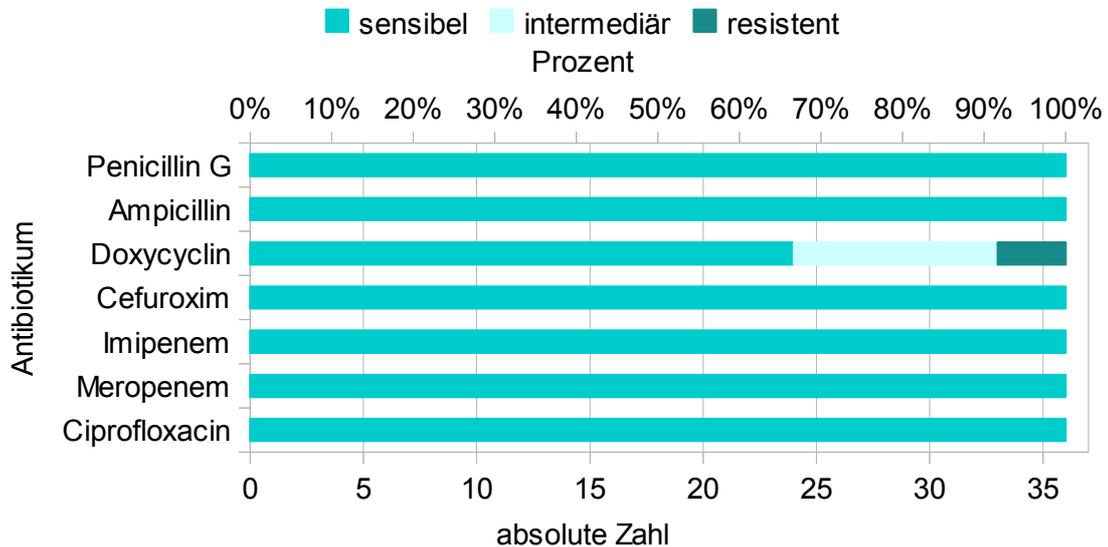


Abbildung 20: Resistenzprofil der Neisserien bei n = 36

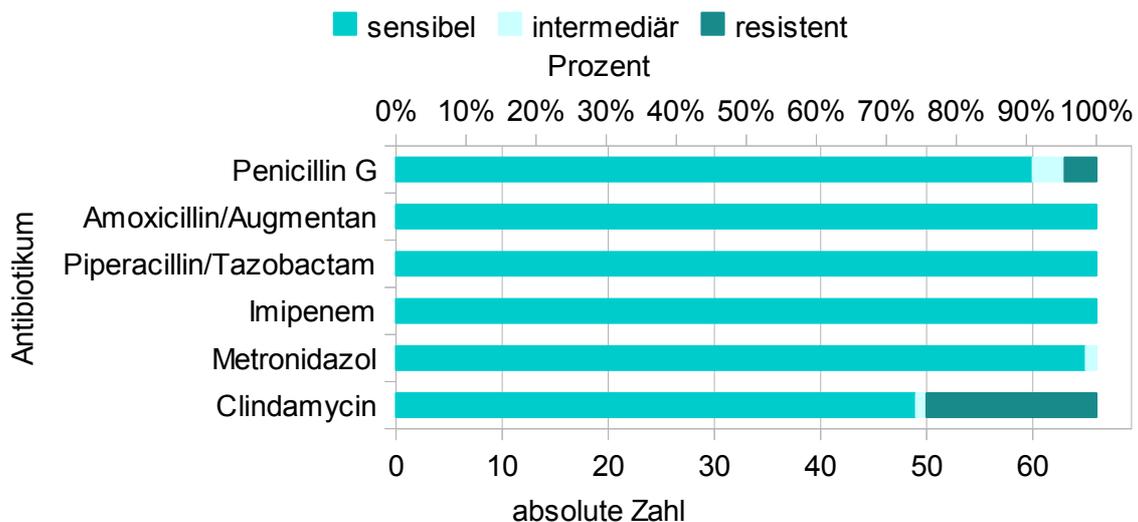


Abbildung 21: Resistenzprofil der Peptostreptokokken bei n = 66

In der Gruppe der gramnegativen Anaerobier reagieren die Genus der Porphyromonas, Mubiluncus und Tissierella gegenüber den für diese Bakteriengruppen klassischen Chemotherapeutika Penicillin G, Amoxicillin/Augmentan, Piperacillin/Tazobactam, Imipenem und Clindamycin immer empfindlich; *B. caccae* zeigt lediglich bei Anwendung von Penicillin G Resistenzen bei 50 % der getesteten Stämme. Der Genus der Prevotella species wird gegenüber Penicillin G, Amoxicillin/Augmentan, Piperacillin/Tazobactam und Imipenem rein sensibel, gegenüber Clindamycin zu 24 % nicht empfindlich getestet. Aufgrund der Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfungen der Fusobakterien werden diese ebenfalls separat verdeutlicht (vgl. Abb. 22, S. 49).

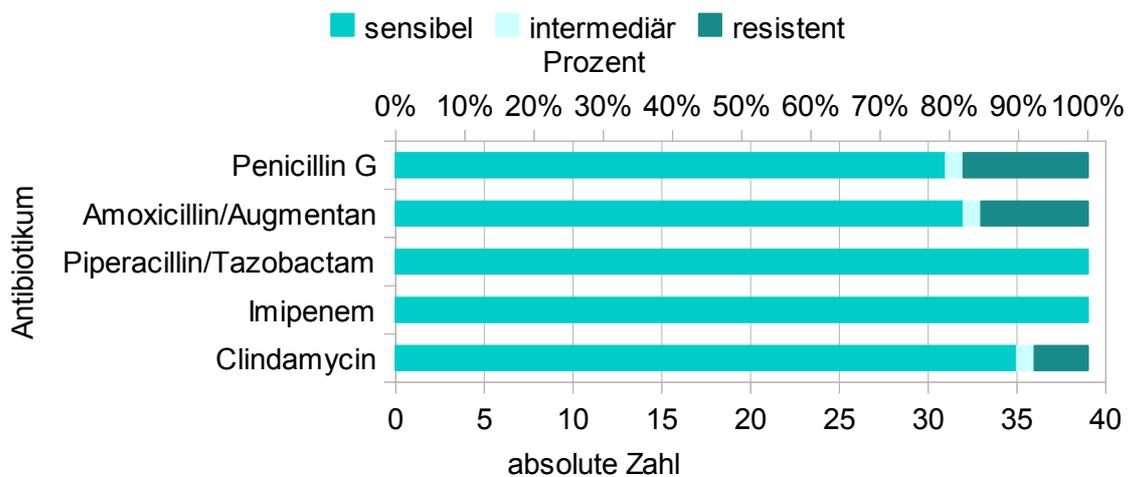


Abbildung 22: Resistenzprofil der Fusobakterien bei n = 39

4.7.2 Alternative Antibiotika

Die Ergebnisse der gesondert getesteten Antibiotika Azithromycin, Gatifloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin und Telithromycin werden im Folgenden veranschaulicht. Gatifloxacin wurde leider während der laufenden Versuchsreihen vom Markt genommen.

Grundsätzlich wurden alle identifizierten Keime unabhängig von ihrer Empfindlichkeit gegen diese Chemotherapeutika mittels Agardiffusion und Ellipsoidtest geprüft.

So wurden, basierend auf den EUCAST-Richtlinien, auch Mikroorganismen, welche pharmakologisch für in-vivo-Anwendungen nicht empfohlen werden oder deren bisherige Untersuchungen als nicht hinreichend belegt definiert worden sind, getestet, jedoch nicht ausgewertet.

Dementsprechend gelangen nur grampositive Kokken und gramnegative Aerobier zur Auswertung, eine mögliche Wirkung von Moxifloxacin gegen Anaerobier konnte bislang nicht ausreichend nachgewiesen werden.

In der Gruppe der grampositiven Kokken überzeugen die alternativen Antibiotika bei *S. aureus* (n = 17) und *epidermidis* (n = 13) mit Resistenzquoten von lediglich 7,14 und 0 %, die Viridans-Streptokokken (n = 47) reagieren, mit Ausnahme eines gegen Levofloxacin intermediären Stammes, vollständig sensibel.

N. gonorrhoeae (n = 36) ist gegen alle empfohlenen der hier getesteten Antibiotika zu 100 % empfindlich.

Das Bakterium *A. baumannii* zeigt in 100 % (n = 1) ein resistentes Verhalten gegenüber Levofloxacin. Bei einer Infektion mit *E. coli* (n = 14), *P. mirabilis* (n = 5) oder *K. pneumoniae* (n = 3) wird lediglich die Anwendung von Moxifloxacin aus der Gruppe der kieferchirurgisch bislang nicht als Antibiotikum der ersten Wahl verwendeten Chemo-

therapeutika empfohlen, welches je in 100 % sensibel reagiert. Wird *P. aeruginosa* (n = 2) nachgewiesen, so wirkt Levofloxacin in der Hälfte der Fälle. Das Resistogramm von *H. parainfluenza* wird in der folgenden Abbildung (vgl. Abb. 23) veranschaulicht.

Die Gesamtheit der resistenten und intermediären Stämme in Anlehnung an die EUCAST-Empfehlungen zeigt Abbildung 24. Hier lässt sich die noch im Vergleich niedrige Resistenzquote erkennen.

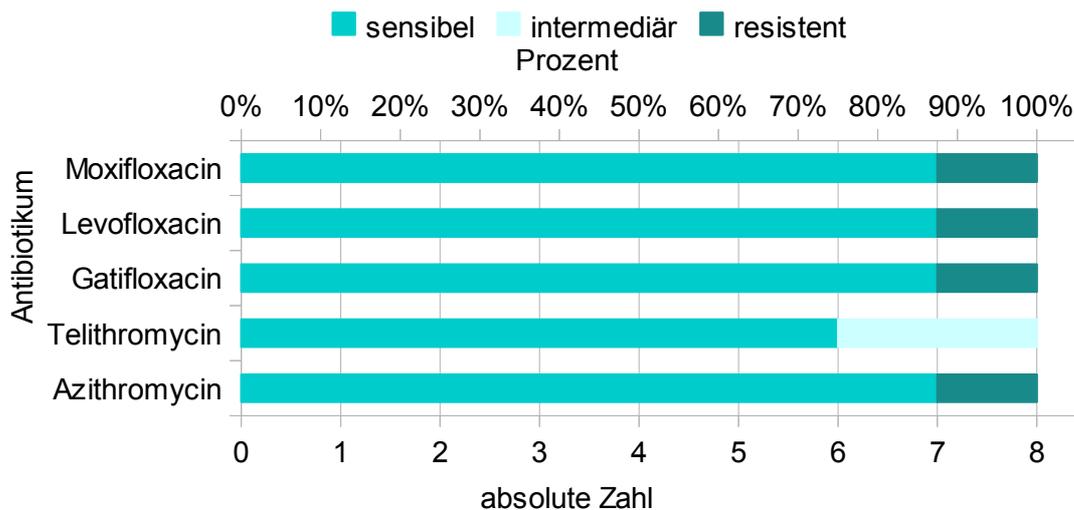


Abbildung 23: Resistenzprofil von *Haemophilus parainfluenza* bei n = 8

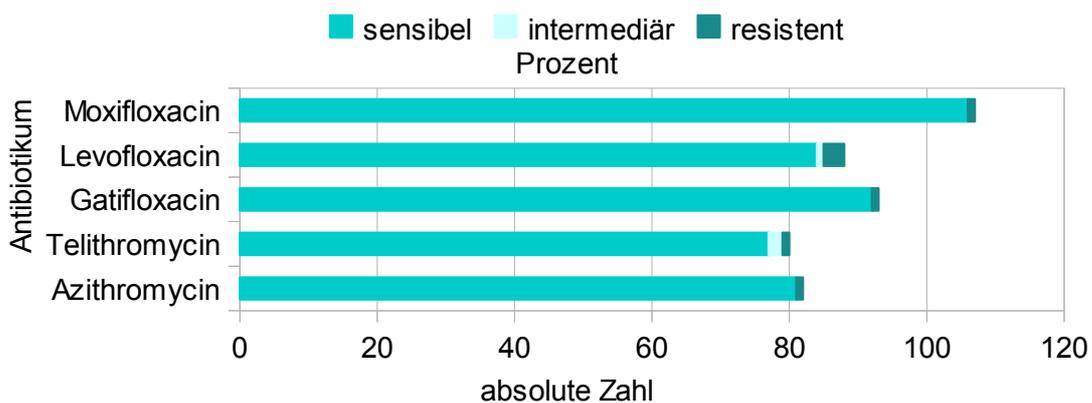


Abbildung 24: Resistenzprofil der Gesamtzahl aller empfohlenen Kombinationen Bakterium – Antibiotikum bei n = 425

5 Diskussion

5.1 Patientenkollektive

Um die Entwicklung der Biofilme von gesunder Mundschleimhaut bis zum klinisch manifesten Mundhöhlenkarzinom beurteilen zu können, werden entsprechende Probandengruppen und Patientenkollektive notwendig. Idealerweise steht im Vergleich zu einer mundgesunden Gruppe ein weiteres Probandenkollektiv unter dem Einfluss von für die Tumorgenese typischen Noxen, jedoch ohne Zeichen einer Tumorerkrankung. Die dritte Gruppe sollte aus Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom bestehen. Die Auswahl für diese drei Untersuchungsgruppen erfolgte nach den oben beschriebenen strengen Ein- und Ausschlusskriterien (vgl. 4.1, S. 17). Dies gewährleistete, dass in der jeweiligen Studiengruppe repräsentative Probanden korrekt zugeordnet worden sind. Die eigene Studie ist somit präziser als die jüngste Analyse von Pushalkar und Mitarbeitern, welche bei den Probanden die Biofilmflora der Tumoroberfläche und gesunder Mundschleimhaut gegenüberstellte (Pushalkar *et al.*, 2012). Dieses zeigt sich darin, dass speziell in der hochinteressanten Tumorgruppe kein Vergleich mit dem Schleimhautmilieu des selben Patienten erfolgte. Somit findet in der eigenen Untersuchung ein Vergleich ausschließlich in idealer Näherung statt. Pushalkar und Koautoren konnten verständlicherweise keine signifikanten Unterschiede zur Beurteilung der Biofilme aufzeigen (Pushalkar *et al.*, 2012). Klare Aussagen können nur dann eruiert werden, wenn die Tumorgruppe repräsentativ ist und die Biofilmflora der Tumoroberfläche einer entsprechenden Gruppe ohne jede Tumorzellen gegenübergestellt wird.

Im folgenden Kapitel werden die mikrobiologischen Aspekte der einzelnen Biofilme näher erläutert.

5.2 Biofilme und deren Mikrobiologie

Biofilme sind generell gut erforscht (El-Solh *et al.*, 2004; Flemming *et al.*, 2000). Allerdings gibt es nach aktuellem Wissen keine Untersuchungen zu Biofilmen an lebenden Objekten. Weiter ist zum Einfluss von bakteriellen Biofilmen auf die Entwicklung postoperativer Wundheilungsstörungen bis dato wenig bekannt. Die Analysen der vorliegenden Studie liefern erstmals Informationen über die Zusammensetzung medizinischer Biofilme an der Oberfläche von Mundhöhlenkarzinomen. Daraus kann dann im Falle einer postoperativen Weichteilinfektion das mögliche Keimspektrum schon präoperativ kalkuliert werden und eine entsprechende antibakterielle Prophylaxe zur Keimreduktion eingeleitet werden. Sicherlich werden dabei nicht die Erreger in stabilen Biofilmen erreicht, es ist aber zu

erwarten, dass die im Biofilm vergesellschafteten Keime eine Rolle in einer möglichen späteren Wundinfektion spielen. Durch Kenntnis der bakteriellen Zusammensetzung solcher Biofilme und Keime der jeweiligen Resistenzsituation können wertvolle Aussagen auch für eine zunächst kalkulierte Antibiose im Infektionsfall eingeleitet werden. Bei mikrochirurgischem Gewebstransfer sind die wesentlichen limitierenden Faktoren die venöse Insuffizienz und postoperative Infektionen (Handschel, 2013, persönliche Mitteilung). Kenntnisse über die Biofilme haben dann aus klinischer Sicht eine Bedeutung zwecks Minimierung der Infektionsrate und damit zur Vermeidung von Misserfolgen in der Onkochirurgie.

Die Ergebnisse der drei Untersuchungsgruppen der gesunden Studienteilnehmer, der Risikopatienten sowie der Probanden mit einem histologisch gesicherten Mundhöhlenkarzinom zeigen neue Zusammenhänge zwischen der jeweiligen Biofilmflora, der Resistenzsituation und der damit einhergehenden Empfehlung zur prophylaktischen und therapeutischen Antibiotikatherapie.

In der Kontrollgruppe dominieren bekanntermaßen die Aerobier mit den Genera *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Neisseria*, *Enterococcus*, *E. coli* sowie dem anaeroben Genus *Peptostreptococcus*. Die Mischpopulation der Risikogruppe zeichnete sich durch ein annäherndes Gleichgewicht zwischen Aerobiern und Anaerobiern aus. Es herrschten die aeroben Genera *Streptococcus* und *Neisseria* sowie die anaeroben Genera *Peptostreptococcus*, *Prevotella* und *Fusobacterium* vor. Ein nahezu entgegengesetztes Bild zeigte sich in der Gruppe der Tumorpatienten mit dominierenden Anaerobiern durch das Genus *Peptostreptococcus* und insbesondere gramnegativen Genera *Prevotella* und *Fusobacterium*. Die aeroben Erregergattungen werden hauptsächlich durch *S. aureus* und *epidermidis*, *E. faecalis* und *E. coli* vertreten.

Interessant ist die Entwicklung der bakteriellen Zusammensetzung derartiger Biofilme in Abhängigkeit der individuellen Bedingungen. So zeigten sich bei Probanden mit gesunder Mundschleimhaut Bakterienpopulationen sowie Resistenzquoten, wie sie aus dem odontogenen Infektionsgeschehen für Zahnärzte und Kieferchirurgen hinreichend bekannt sind (Eick, 2000; Eckert, 2004).

Somit kann durch die Ergebnisse angenommen werden, dass die bekannten Noxen zur Tumorentstehung ebenso einen Einfluss auf die Biofilmflora der Mundhöhle hin zu einem mehr anaeroben Milieu haben.

Die Biofilmflora der Risikopatienten wies allerdings eine bereits veränderte Population auf. Auch wenn eine Mischpopulation vorherrschte, bestanden noch wesentliche Übereinstimmungen mit der gesunden Probandengruppe. Dennoch zeigte sich, dass einige Erregergattungen, die bei den Tumorpatienten vorherrschten, bereits bei dieser sogenannten

Risikogruppe nachzuweisen waren. Interessant ist eine Diskussion des Keimspektrumwechsels von der gesunden Mundschleimhaut zu den Karzinomen. Möglicherweise spielt dabei die Tumorphoxie eine entscheidende Rolle. Es ist denkbar, dass hypoxische Tumoren mit ihrer Oberfläche vorwiegend anaerob kolonisierte Biofilme unterstützen, indem sie im Sinne eines Selektivmediums für Anaerobier bessere Bedingungen bieten. Mittlerweile gilt auch für das Mundhöhlenkarzinom die hypoxische Situation als gesichert (Eckert, 2009). Spekulativ bleibt noch an dieser Stelle, in welchem Ausmaß die strukturelle Veränderung des Tumors während der Tumorprogression weitere Änderungen des Keimspektrums des jeweiligen Biofilm nach sich zieht.

Interessant könnte die Rolle des gramnegativen Bakteriums *E. coli* in dem beschriebenen Keimspektrumwechsel sein. Als möglicher Initiator einer Biofilmbildung mit multiplen Resistenzmechanismen, welcher sich nur im Biofilm vermehren kann, könnte er im Mittelpunkt der Änderung der bakteriellen Besiedlung stehen (Keevil *et al.*, 1987). *E. coli* findet sich auf den meisten Tumoroberflächen, zeigt multiple Resistenzen und könnte somit für viele postoperative Infektionen mit verantwortlich sein.

Die führenden Bakteriengattungen bei Plattenepithelkarzinomen sind gramnegative Anaerobier. Parallelitäten zur Normalflora lassen sich praktisch nicht mehr erkennen, so dass Antibiotikarichtlinien für einen therapeutischen Einsatz vollständig neu interpretiert werden müssen. Empfehlungen zur Anwendung von Chemotherapeutika können hier nicht aufgrund von Untersuchungsergebnissen von Studien an odontogenen Abszessen oder der Normalbevölkerung ausgesprochen werden. Diese prospektive Pilotstudie ist somit die erste, die dementsprechende Empfehlungen zur Antibiotikatherapie geben kann. Diese sollten in weiterführenden Studien regelmäßig kontrolliert werden, um schon tendenziellen Resistenzentwicklungen durch Anwendung differenter Chemotherapeutika entgegenwirken zu können.

5.3 Resistenzen

Die zunehmende Ausbildung und Verbreitung resistenter Stämme bei der klassischen Behandlung von Infektionskrankheiten mit Antibiotika stellt ein schwerwiegendes Problem in der Klinik dar.

Durch die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Empfindlichkeitsprüfungen konnten bereits zuvor veröffentlichte Ergebnisse bestätigt, andere korrigiert und darüber hinaus völlig neu formuliert werden. Das Antibiogramm dient nicht nur als reine Sensibilitäts-testung, sondern vielmehr als epidemiologischer Marker im Hinblick auf die Resistenzentwicklung. Im Sinne einer Resistenzprävention sollten deshalb die intermediär getesteten Stämme in eine Gruppe mit den resistenten gezählt werden.

Alle Bakterien, welche durch die Resistenztestungen als nicht sensibel gewertet werden mussten, sollten therapiebestimmend beziehungsweise -beeinflussend sein, um eine mögliche zukünftige Resistenzentwicklung verhindern zu können.

Inadäquate Antibiotikatherapien und verschiedene Anpassungsmöglichkeiten der Bakterien fördern die sich im Laufe der Zeit entwickelnden steigenden Resistenzquoten (vgl. 1, S.1), welche im Rahmen dieser Hallenser Studie analysiert worden sind.

Dies kann dramatische Auswirkungen haben, wenn beispielsweise bei foudroyant verlaufenden Erkrankungen, wie sie durch *S. aureus*, *S. pneumoniae* oder Enterobakterien hervorgerufen werden können, die antibiotische Therapie unwirksam bleibt (Bodmann und Vogel, 2001). Dies macht auch eine genaue Überwachung der jeweiligen Resistenzsituation weiterhin nötig, wobei gleichzeitig effektive Maßnahmen zur Bekämpfung einer weiteren Ausbreitung getroffen werden müssen. Desweiteren kann die Resistenzentwicklung häufig mit einer inadäquaten Dosierung der antibiotischen Substanz in Verbindung gebracht werden. Dies resultiert in einem vorwiegenden Abtöten der sensiblen Bakterienpopulationen und vereinfacht so die Vermehrung von resistenten Stämmen. Es konnte gezeigt werden, dass die Exposition gegenüber einer antibiotischen Substanz in Dosierungen gerade unterhalb eines ermittelten Messpunktes zu einem verstärkten Wachstum der resistenten Subpopulationen führte, wohingegen Dosierungen ab diesem Schwellenwert diese Entwicklung verhinderten (Tam *et al.*, 2005).

Die Entwicklung neuer Antibiotika und deren Zulassung zur klinischen Anwendung werden häufig mit nur geringer zeitlicher Verzögerung von dem Auftreten resistenter Bakterienstämme begleitet, so dass vermehrt klinisch relevante multiresistente Erreger auftreten (Doern *et al.*, 1996). Um dieses verhindern oder verlangsamen zu können ist konsequent ein strenger und indikationsbezogener Einsatz von antimikrobiellen Chemotherapeutika maßgeblich (Federspil, 1987 bis 2009).

Zur Erhaltung der Wirksamkeit antimikrobieller Chemotherapeutika ist der sorgfältige und ausschließlich zielgerichtete Umgang mit diesen Medikamenten essentiell (Al Nawas 2000, 2001, 2002a,b; WHO, 1997, 2001, 2007; Böttner *et al.*, 2000; GERMAP 2008).

Eine mögliche Empfehlung zur antimikrobiellen präoperativen prophylaktischen Therapie mit Antibiotika vor radikalchirurgischen Tumoroperationen in Abhängigkeit zur jeweiligen Biofilmflora wird im Folgenden gegeben.

Im Hinblick auf die aktuelle Literatur sind derartige perioperative Antibiotikaempfehlungen nicht publiziert worden.

Keimbesiedlung	Domierende Keime	Antibiotikum der 1. Wahl	Dosierung	Alternative	Dosierung
Gesunde Mundschleimhaut	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., Neisserien, <i>Peptostreptococcus</i> spp.	Cefuroxim Cefotiam* Amoxicillin/BLI	2 mal 500 mg p.o. 2-3 mal 1-2 g p.o. 2 mal 1,2 g i.v. o. 875/125g p.o.	Penicillin, Meropenem**, Imipenem**	2-3 mal 1 g p.o. 3 mal 0,5 -1 g i.v. 3 mal 500 mg i.v.
Mundschleimhaut der Risikogruppe	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterococcus faecalis</i> , Neisserien, <i>Escherichia coli</i> , <i>Prevotella</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp.	Cefuroxim Cefotiam* Amoxicillin/BLI	2 mal 500 mg p.o. 2-3 mal 1-2 g p.o. 2 mal 1,2 g i.v. o. 875/125g p.o.	Penicillin, Ampicillin	2-3 mal 1 g p.o., 3 mal 2 g p.o.
Mundschleimhaut des Patientenkollektivs	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Peptostreptococcus</i> spp., <i>Prevotella</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp.	Amoxicillin/BLI plus Doxycyclin, oder Azithromycin	2 mal 1,2 g i.v., oder 875/125 mg p.o. 1 mal 200mg, dann 100 mg p.o. 1 mal 500 mg p.o.	Levofloxacin oder Moxifloxacin plus Metronidazol, Cefuroxim plus Doxycyclin oder Azithromycin	1 mal 250 oder 500 mg p.o. 1 mal 400 mg p.o. 2 mal 400 mg p.o. 2 mal 500 mg p.o. 1 mal 200 mg, dann 1 mal 100 mg p.o. 1 mal 500 mg p.o.

* Cefotiam wird in Zukunft leider nicht mehr verfügbar sein

** aus mikrobiologischer Sicht sinnvoll, klinisch nur parenteral in Ausnahmefällen wie z.B. schweren Immunsuppressionen

Tabelle 12: Aktuelle Empfehlungen zur Antibiotikatherapie bei radikalchirurgischen Tumoroperationen von Mundhöhlenkarzinomen

5.4 Prophylaktische Antibiotikaempfehlungen bei Mundhöhlenkarzinompatienten

Die Ergebnisse dieser prospektiven Studie lassen neue Empfehlungen zur Antibiotikatherapie insbesondere für Patienten mit der Diagnosestellung eines Mundhöhlenkarzinoms zu.

Prinzipiell sollte vor jeder radikalchirurgischen Tumoroperation die Abstrichnahme erfolgen, um ein adäquates Therapieregime der Antibiose festlegen zu können. Dies ist im Idealfall bereits zuvor zur Einschätzung des individuellen Risikoprofils erfolgt und gerade im Hinblick auf die material- und zeitintensive Anzucht der Anaerobier wichtig (vgl. 5.6, S. 42).

Wie bereits in den Ergebnissen veranschaulicht wurde, variieren die dominierenden Keime und die zugehörigen Resistenzquoten abhängig von der jeweiligen Untersuchungsgruppe (vgl. 6.2, S. 51).

Dementsprechend lassen sich die bisher allgemeingültigen Empfehlungen zur Antibiotikagabe, basierend auf dem Erregerspektrum einer Normalflora, nicht auf Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen übertragen.

Die Zusammensetzung der mikrobiologischen Kulturen und deutlich erhöhten Resistenzquoten machen zur Gewährleistung einer adäquaten Antibiose eine Kombinationstherapie erforderlich.

Monopräparate, wie sie in der Zahnmedizin gern eingesetzt wurden, kommen hier so unter primär prophylaktischer Sicht nicht zum Einsatz. Die Antibiotikaempfehlungen entsprechend der individuellen Grundsituation können Tabelle 12 (vgl. S. 55) entnommen werden. Mit Bezug auf die Antibiotikaempfehlungen ist darauf hinzuweisen, dass in den beiden Vergleichsgruppen (Normalpopulation und Risikogruppe) keine Änderung der Antibiotikastrategie zu verzeichnen ist. Die Medikamente der Wahl sind neben Cephalosporinen Kombinationspräparate wie Amoxicillin/Clavulansäure (Schubert et al., 1995). Alternativ können unter Umständen auch Peneme wie Meropenem oder Imipenem zum Einsatz kommen. Nachteilig ist deren ausschließlich intravenöse Gabe, so dass diese Antibiotika letztlich der Klinik vorbehalten bleiben. Insgesamt können auch heute noch die Antibiotikaempfehlungen zur perioperativen Gabe gewählt werden, welche bereits vor mehr als 15 Jahren favorisiert werden (Schubert et al., 1995).

Komplett andere Präparate sollten in der Tumorguppe verabreicht werden. Interessanterweise erfährt das bakteriostatisch wirkende Doxycyclin eine gewisse Renaissance, obgleich es in vorangegangenen Studien bei odontogenen Prozessen mit hohen Resistenzquoten aufgefallen war (Schmidt *et al.*, 1995; Eckert, 2004). Deshalb sollte dieses Antibiotikum nur nach Erregerbestimmungen und Resistogramm zur Anwendung kommen.

Die modernen Fluorchinolone der dritten und vierten Generation zeichnen sich vor allem durch ihr breites Wirkungsspektrum inklusive der Anaerobier bei exzellenter Pharmakokinetik aus. (Vogel *et al.*, 2002).

Eine weitere in der klassischen Mund-, Kiefer- und plastischen Gesichtschirurgie weniger eingesetzte Antibiotikastrategie bietet sich mit dem Präparat Azithromycin an. Dessen lange Halbwertszeit und der Transport an den Entzündungsort in Form von Makrophagen oder Granulozyten sichern hohe Konzentrationen (Hof, 1999).

Zusammenfassend kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass der Antibiotikaeinsatz bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle auf jeden Fall gezielt und nach Erregerbestimmung und Resistenzanalyse erfolgen sollte. Die entsprechenden Präparate sind in Abbildung 11 (vgl. S. 37) ersichtlich. Das aus klinischer Sicht verfolgte Ziel ist hierbei die Senkung postoperativer lokaler und systemischer Infektion (Wacha *et al.*, 2010).

5.5 Prognostische Aussagen

Prä- und postoperativ sind für den behandelnden Arzt neben der Lage und Ausdehnung des Mundhöhlenkarzinomes auch die Beziehung zu den Nachbarstrukturen, die Wachstumsgeschwindigkeit und die damit einhergehende Malignität von besonderer Bedeutung. Das präoperative Staging liefert dem Chirurgen wichtige Informationen zur Optimierung der individuellen Operationsplanung und eines stadiengerechten Therapiekonzeptes, an welchem sich adjuvante Therapien in Form von Radiatio und/oder Chemotherapie sowie das Tumordispenaire orientieren.

Die aktuellen Daten der 30 Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom bestätigen bezüglich der Lokalisation, der Tumorausdehnung entsprechend der TNM-Klassifizierung, des Gratings und der Rezidivrate die Ergebnisse vorausgegangener Studien (Lautner, 2007; Odenwald, 2007).

Das durchschnittliche Erkrankungsalter, die Geschlechterverteilung sowie der Konsum von Genuss- und Suchtmitteln der aktuellen Probandengruppe stimmen mit den in den letzten Jahren veröffentlichten Hallenser Studien und der einschlägigen Literatur nahezu überein (McGregor *et al.*, 1983; Moller *et al.*, 1990; Martin-Granizo *et al.*, 1997; La Vecchia *et al.*, 1997, 2004; Chen *et al.*, 1999; Zöller, 2000; Howaldt *et al.*, 2000; Siewert, 2001; Gervasio *et al.*, 2001; Warzecha, 2002; Sasaki *et al.*, 2005; Mustafa, 2006; Odenwald, 2007; Lautner, 2007). Damit ist die Studienpopulation für ein Mundhöhlenkarzinom repräsentativ.

Im Falle von beschriebenen Fernmetastasen treten diese vor allem in Lunge, Leber und Knochen auf. (Spiessl, 1998; Howaldt und Kainz, 1997; Youssefzadeh *et al.*, 1999;

Niederhagen *et al.*, 2000; UICC, 1993; Lys, 2004; Wittekind und Tischoff, 2004; Bornstein *et al.*, 2005; Rohleder, 2006).

Das generelle Problem der Karzinome der Mundhöhle ist deren Stagnation der kumulativen 5-Jahres-Überlebensrate (5JÜ) trotz des stetigen Fortschrittes im Hinblick auf Diagnostik und Operation bei etwa 45 % (Howaldt *et al.*, 2000; Hausamen, 2000; Siewert, 2001; Inagi *et al.*, 2002; Zini *et al.*, 2010; Oral cancer foundation, 2011; DGMKG, 2011), wobei die höchste prozentuale Überlebensquote maßgeblich durch die chirurgische Therapie erreicht wird (Inagi *et al.*, 2002). Die Prognose eines Mundhöhlenkarzinoms ist in den Frühstadien relativ gut (5JÜ bis 85 %), mit fortgeschrittener Erkrankung infaust, wobei zusätzliche Lymphknotenmetastasen die 5JÜ um weitere 50 % reduzieren (Reichart *et al.*, 2002a,b; Reiß, 2009). Hierbei ist die Diagnoseverzögerung als bedeutender negativer Prognosefaktor durch den Primärarzt nicht zu unterschätzen (Teppo *et al.*, 2003).

Die aktuellste vorliegende retrospektive Studie in Bezug auf die 5JÜ von Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen für den Zeitraum von 1997 bis 2006 aus dem Jahre 2013 wurde von Listl und Koautoren publiziert. In dieser wurden die Lippenkarzinome allerdings zusätzlich mit einbezogen. Diese zeigten eine 5JÜ von 86,5 %, die durchschnittliche 5JÜ des gesamten Patientenkollektivs lag bei 54,6 % (Listl *et al.*, 2013). Würden die Lippenkarzinome exkludiert werden, würden sich sicherlich auch in dieser Studie niedrigere 5-Jahres-Überlebensquoten ergeben, welche näher an den eigenen Ergebnissen mit 43,3 % sich befinden würden. Einzuschränken ist, dass es sich bei 30 Patienten möglicherweise um eine Negativselektion handeln könnten, sodass die eigenen Werte doch recht deutlich von den einschlägigen Publikationen differieren.

Die wichtigste Früherkennungskonzepte sind generell klinischen Ursprungs. Dies sind die visuelle Inspektion und Palpation, sowie die histopathologische Befunderhebung malignomsuspekter Mundschleimhaut nach erfolgter Biopsie. Weitere in Form der Autofluoreszenz, Toluidinblaufärbung, 5-Aminolävulinsäure und Bürstenbiopsie eignen sich nicht für die routinemäßige Anwendung in der Praxis (Burkhardt und Maerker, 1981; Ephros und Mashberg, 1999; Betz *et al.*, 2002; Chang und Wilder-Smith, 2005; Kunkel, 2005; Sharwani *et al.*, 2006; Driemel *et al.*, 2008; Fedele, 2009; Kunkel *et al.*, 2010).

Eine Kombination aus klinischen Indices in Form des MGSS (Martínez-Gimeno Scoring System) und Palpation soll die Notwendigkeit einer Neck Dissection einerseits sichern und andererseits überflüssige Halslymphknotenausräumungen verhindern helfen (Martínez-Gimeno *et al.*, 2011). Alle genannten Massnahmen und Indices haben das Ziel, zum Zeitpunkt der Diagnosestellung neben dem TNM-System und Grading additive Prognosefaktoren für eine stratifizierte Therapie zu liefern. Die aktuellen Forschungsintentionen beschäftigten sich weltweit mit sogenannten Tumormarkern, also biologischen

Faktoren. Sie sind bis dato noch nicht vollständig entschlüsselt worden. Zur Einschätzung der Tumorprogression, der Aggressivität sowie der damit zusammenhängenden 5-Jahres-Überlebenszeit werden diese zukünftig jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit routinemäßig bestimmt und interpretiert werden können. Durch immunhistochemische Untersuchungen sollen direkte Zusammenhänge zwischen den Biomarkern und der Morphologie der Mundhöhlenkarzinome entschlüsselt werden können (Oliveira und Ribeiro-Silva, 2011). Ausführliche Ausarbeitungen von Prognosefaktoren in Bezug auf die Überlebenswahrscheinlichkeit zeigen die Signifikanz dieser Biomarker (Kim *et al.*, 2011). Die alleinige Einteilung der Plattenepithelkarzinome anhand von TNM-Klassifikation und Grading entspricht nicht mehr dem aktuellen Stand der Forschung zur Ermittlung der individuellen Prognose (Corry *et al.*, 2010, Eckert *et al.*, 2012).

Die Forschung insbesondere an Tumorphoxie und Hypoxiemarkern steht seit Jahren im Vordergrund etlicher wissenschaftlicher Studien an Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle. Zu den vielversprechendsten Prognosefaktoren zählen neben HIF-1 α auch GLUT-1 und pVHL, welche zukünftig zur Verbesserung des Therapieregimes mit Beginn der Behandlung der Tumorerkrankung bestimmt werden sollten (Eckert *et al.*, 2012; Nayak *et al.*, 2012).

Bei allen möglichen sogenannten Biomarkern ist bisher noch nicht über einen Zusammenhang der bakteriellen Besiedlung und der Prognose nachgedacht worden. Nach aktuellem Wissensstand existiert keine Literatur zur Biofilmflora in Form eines prognostischen Biomarkers. Möglicherweise ist die Pilotstudie die bislang einzige Untersuchung, welche gewisse Zusammenhänge zwischen der bakteriellen Besiedlung von Biofilmen auf Mundhöhlenkarzinomoberflächen und deren individuellen Prognose zulässt. Es handelt sich hierbei um die erste Arbeit, welche einen Zusammenhang zwischen einer vorwiegend anaeroben Biofilmbildung auf den Oberflächen von Mundhöhlenkarzinomen und einer signifikant schlechteren Überlebensprognose aufzeigt. Kritisch zu sehen ist allerdings dabei eine Veränderung der Tumorzellverbände, welche möglicherweise veränderte Biofilmoberflächen nach sich ziehen. Denkbar wäre aber dennoch ein prinzipieller Zusammenhang zwischen der bakteriellen Besiedlung und der Entwicklung und Prognose von Mundhöhlenkarzinomen. Diskutiert werden hier vor allem chronische Entzündungen mit nachfolgender Penetration der Keime in tiefere Zellschichten (Pushalkar *et al.*, 2012).

Fraglich ist in diesem Zusammenhang ebenfalls, ob nicht das jeweilige Mundhöhlenkarzinom in Abhängigkeit zur Aggressivität das biologische Verhalten auch der Biofilme geradezu charakterisiert. So könnten hochgradig hypoxische Tumoren als anaerobe Selektivmedien fungieren.

Die meisten Publikationen zu dieser Thematik werten die chronische Entzündung als auslösenden Kofaktor zu den bekannten Noxen Alkohol und Nikotin. Möglicherweise sind die mit vorwiegend Anaerobiern besiedelten Biofilme auf hypoxischen Karzinomen zu finden. Ein wesentlicher Faktor für prognostische Abschätzung wäre die Gegenüberstellung der jeweiligen Keimspektren mit den Expressionsmustern der hypoxie-relevanten Proteine HIF-1 α auch GLUT-1, was in weiterführenden prospektiven Studien eruiert werden sollte. Vom gegenwertigen Stand der Forschung scheint es nicht unrealistisch zu sein, in Zukunft durch präoperative Abstriche von Biofilmen auf Karzinomoberflächen neben Aussagen zur Antibiotikawirksamkeit auch erste Einordnungen zur Aggressivität des jeweiligen Tumors treffen zu können

Dies bedeutet, dass die aggressive, weil hypoxische Tumormasse sicherlich Anaerobier in bedeckenden Biofilmen wachsen lässt.

6 Zusammenfassung

Bakterielle Resistenzen stellen ein generelles Problem im klinischen Alltag dar. Aus kieferchirurgischer Sicht sind die odontogenen Infektionsprozesse hinsichtlich deren Bakteriologie und Resistenzsituation bestens untersucht. Wenig Beachtung fanden bis heute Biofilme auf intraoralen Karzinomen im Hinblick auf eine optimale perioperative antibiotische Prophylaxe zur Minimierung von postoperativen Weichteilinfektionen. Dazu wurden mittels einer prospektiven Analyse unter normierten Entnahme- und Transportbedingungen die jeweilig involvierten Erreger erfasst und Resistenztestungen gegen in der Kieferchirurgie etablierte Antibiotika durchgeführt. Zum besseren Verständnis erfolgte eine Gegenüberstellung der Erreger- und Resistenzlage der Karzinome mit einer gesunden Kontroll- und einer Risikogruppe.

Im Ergebnis zeigte sich hierbei, dass Biofilme an Karzinomoberflächen vermehrt gramnegative, aerobe Spezies beherbergen, die im klassischen odontogenen Infektionsprozess nicht bekannt sind. Die Keimspektren wurden von Vertretern der aeroben Gattungen *Staphylococcus*, *Enterococcus* und *Escherichia* dominiert. Vertrauter präsentierte sich das anaerobe Spektrum, hier fanden sich vorwiegend die Genera *Peptostreptococcus*, *Prevotella* und *Fusobacterium*. Die gesunde Kontrollgruppe wie auch die sich durch Nikotin- und Alkoholabusus auszeichnende Risikogruppe präsentierten fast erwartungsgemäß jene klassischen Keimspektren, welche dem Kieferchirurgen und Zahnarzt aus seiner Erfahrung hinreichend bekannt sind. Entsprechend verhielten sich auch die Resistenzquoten: Im Falle einer Infektion wären die Kontroll- und Risikogruppe gut im Sinne einer kalkulierten Antibiose mit etablierten Präparaten wie Penicillin G oder auch Clindamycin therapierbar. Diese Antibiotikaklassiker versagen nahezu komplett bei Infektionen der Karzinomgruppe. Die Ursachen hierfür liegen einerseits in den idealen Bedingungen für Bakterien, sich in Form eines Biofilms zu organisieren. Andererseits muss erwähnt werden, dass die bakterielle Biofilmzusammensetzung für die hohen Resistenzen verantwortlich ist. So sind die genannten aeroben gramnegativen Spezies mit einer Fülle von Resistenzmechanismen ausgestattet. Zudem beherbergen derartige Biofilme einen nicht geringen Anteil strikt anaerober gramnegativer Spezies wie Vertreter der Gattungen *Prevotella* und *Fusobacterium*, welche zunehmend auch aus regionaler Sicht Resistenzen gegen Betalactam-Antibiotika entwickeln. Folglich sollte also bereits die perioperative Antibiotikaphylaxe gezielt nach Erregerbestimmung und Resistogramm erfolgen. Als geeignete Präparate sind auf Basis der aktuellen Untersuchungen die Kombinationspräparate Amoxicillin/Clavulansäure oder Moxifloxacin zu empfehlen. Wegen seiner guten Pharmakokinetik bietet sich alternativ auch das recht aktuelle Makrolid Azithromycin an.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte erstmals ein Zusammenhang zwischen der bakteriellen Besiedlung und dem Überleben der jeweiligen Karzinompatienten demonstriert werden. So zeigten Karzinome, deren Biofilmpopulationen vorwiegend anaerobe Spezies beherbergten, in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse ein statistisch signifikant schlechteres Überleben. Dies bedeutet, dass Patienten, deren bakterielle Besiedlung vermehrt oder gar ausschließlich Anaerobier beinhalten, ein gut 6-fach erhöhtes Risiko haben, am Tumor zu versterben. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich offensichtlich um Erreger handeln könnte, welche speziell bei hypoxischen Tumoren ideale Wachstumsbedingungen finden. Hier wäre in der Zukunft von Interesse zu analysieren, ob in der Tat der Expressionsstatus Hypoxie-relevanter Proteine mit einem vermehrt anaeroben Keimspektrum der jeweiligen Biofilme auf der Tumoroberfläche korreliert. Erst dann würde sich herausstellen, ob gewisse bakterielle Besiedelungen als klinisch unproblematisch nutzbare Indikatoren für hoch aggressive Mundhöhlenkarzinome herangezogen werden könnten.

7 Literaturverzeichnis

- Acar JF (1991) The disk susceptibility test. In: Lorian V (Hrsg): antibiotics in laboratory medicine. 3. Aufl., Baltimore Williams and Wilkins Co , S. 24-54
- Acar JF und Röstel B (2001) Antimicrobial Resistance: an Overview. In: OIE Scientific and Technical Review 20(3), Second OIE Conference on Antimicrobial Resistance: Use of Antimicrobials and Protection of Public Health, Paris, 2.-4. Oct 2001
- Agarwal JP, Nemade B, Murthy V *et al.*, (2008) Hypofractionated, palliative radiotherapy for advanced head and neck cancer. *Radiother oncol* 89(1):51-6
- Al-mamgani A, Tans L, van Rooij PHE *et al.*, (2009) Hypofractionated radiotherapy denoted as the "Christie scheme": an effective means of palliating patients with head and neck cancers not suitable for curative treatment. *Acta oncol* 48(4):562-70
- Al-Nawas B, Grötz A, Brahm R *et al.*, (2000) Infektionen im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich: Was hat sich in den letzten 25 Jahren geändert? *Dtsch Zahnärztl Z* 55:765-9
- Al Nawas B (2001) Infektionen im Zahn-, Mund- und Kieferbereich. *ZMK* 17:761-4
- Al-Nawas B (2002a) Antibiotika in der zahnärztlichen Praxis - Gibt es Neues? *Zahnärztekalendar* 1-10
- Al-Nawas B (2002b) Einsatz von Antibiotika in der zahnärztlichen Praxis. Stellungnahme der DGZMK. *Dtsch Zahnärztl Z* 57:451-4
- Altmann DG, Bland JM (1998) Time to event (survival) data. *BMJ* 317:468-9
- Altreuther P, Böttner A, Scheer M *et al.*, (1997) Anmerkungen zum Resistenz-monitoring in der Tiergesundheit. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 110:418-21
- Amsterdam D (1996) Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In: Amsterdam D (Hrsg): *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore, Maryland. Williams and Wilkins, S. 52-111
- Anwar H, Costerton JW (1990) Enhanced activity of combination of Tobramycin and Piperacillin for eradication of sessile biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Ch* 34(9):1666-71
- Argiris A, Karamouzis MV, Raben D *et al.*, (2008) Head and neck cancer. *Lancet* 371(9625):1695-709

- Betz CS, Stepp H, Janda P *et al.*, (2002) A comparative study of normal inspection, autofluorescence and 5-ALA induced PPIX fluorescence for oral cancer diagnosis. *Int J Cancer* 97:245-52
- Biolchini F, Pollastri G, Figurelli S *et al.*, (2005) Carcinogen metabolism, DNA damage repair and oral head and neck squamocellular carcinoma (HNSCC). A review. *Minerva stom* 54(7):405-14
- Bodmann K-F, Vogel F (2001) Antimikrobielle Therapie der Sepsis. *Chemotherapie Journal* 2:43-55
- Böcker W, Denk H, Heitz P, *et al.*, (2008) Pathologie. 4. Aufl., Urban & Fischer Verlag / Elsevier GmbH, München
- Böttner A, De Jong A, Schmid P *et al.*, (2000) Zur Festlegung von Grenzwertkonzentrationen (breakpoints) für veterinärmedizinisch relevante Antibiotika zur Resistenzbeurteilung bei tierpathogenen Erregern. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 113:344-7
- Bolmström A, Arvidson S, Ericsson M *et al.*, (1988) A novel technique for direct quantification of antimicrobial susceptibility of microorganisms. In: programs and abstracts of 28th interscience conference of antimicrobial agents and chemotherapy (ICAAC), Los Angeles, Californien, USA; 23-26 October 1988, ASM, Washington DC, USA, Abstract 1209:325
- Bornstein MM, Lys O, Altermatt HJ *et al.*, (2005) Primärdiagnose beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle. *Schweiz MonatsschrZahnmed* 115:542-8
- Boyle P, Macfarlane GJ, Maisonneuve P *et al.*, (1990) epidemiology of mouth cancer in 1989: A review. *J R Soc Med* 80:724-30
- Bradshaw DJ, Marsh PD (1999) Use of continuous flow techniques in modelling dental plaque biofilms. *Method Enzymol* 310:279-96
- Brandis H, Schaal KP (1988) Taxonomie der Bakterien. In Brandis H, Pulverer G (Hrsg): *Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie*, 6. Aufl. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- Bray I, Brennan P, Boffetta P (2000) Projections of alcohol- and tobacco- related cancer mortality in central Europe. *Int J Cancer*. 87(1):122-8
- Brocklehurst P, Kujan O, Glenny AM *et al.*, (2010) Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 11
- Brown MR, Allison DJ, Gilbert P (1988) Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? *J Antimicrob Chemoth* 22(6):777-80

- Brown D, Brown L (1991) Evaluation of the E test, a novel method of quantifying antimicrobial activity. *J Antimicrob Chemother* 27:185-90
- Bruckner DA, Colonna P (1997) Nomenclature for Aerobic and Facultative Bacteria. *Clin Infect Dis* 25:1-10
- BSAC (1988) British Society for Antimicrobial Chemotherapy: Breakpoints in in-vitro sensitivity testing. Report by a working party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *J Antimicrob Chemother* 21:701-10
- Burkhardt A, Maerker R (1981) *Vor- und Frühstadien des Mundhöhlenkarzinoms*. Hanser-Verlag, München, Wien
- Burkhardt F (1992) *Mikrobiologische Diagnostik*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
- Burkhardt F (2009) *Mikrobiologische Diagnostik*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
- CA-SFM (2008 a) *Recommandations 2008*. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, 1-49
- CA-SFM (2008 b) *Le communiqué du Groupe de Travail: Antibiogramme Veterinaires*. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, 1-10
- Chalkley L, Schuster C, Potgieter E *et al.*, (1991) Relatedness between *Streptococcus pneumoniae* and viridans streptococci: transfer of penicillin resistance determinants and immunological similarities of penicillin-binding proteins. *FEMS Microbiol Lett* 90:35-42
- Chang CJ, Wilder-Smith P (2005) Topical application of photofrin for photodynamic diagnosis of oral neoplasms. *Plast Reconstr Surg* 115:1877-86
- Chen YK, Huang HC, Lin LM *et al.*, (1999) primary oral squamous cell carcinoma: an analysis of 703 cases in southern Taiwan. *Oral oncol* 35(2):173-9
- Cojocariu OM, Huguet F, Lefevre M *et al.*, (2009) Prognosis and predictive factors in head-and-neck cancers. *B cancer* 96(4):369-78
- Corry J, Peters LJ, Rischin D (2010) Optimising the therapeutic ration in head and neck cancer. *Lancet Oncol* 11:127-36
- Costerton JW, Ellis B (1994a) Mechanism of electrical enhancement of efficiency of antibiotics in killing biofilm bacteria. *Antimicrob Agents Ch* 38(12):2803-9
- Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D *et al.*, (1994b) Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 176(8):2137-42

- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE *et al.*, (1995a) Microbial Biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49:711-45
- Costerton JW (1995b) Overview of microbial biofilms. *J Int Microbiol Biol* 15(3):137-40
- Costerton JW (1999a) Introduction to biofilm. *Int J Antimikrob Agents* 11(3,4):217-21, 37-9
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999b) Bacterial biofilms: common cause of persistent infections. *Science* 284(5418):1318-22
- Costerton JW, Cook G, Lamont R (1999c) The community architecture of biofilms: dynamic structures and mechanisms. In: Newman HN, Wilson M (Hrsg): *Dental plaque revisited – oral biofilms in health and disease*. Bioline, University, College London, S. 5-14
- Costerton JW, Stewart PS (2001) Battling biofilms. *Sci Am* 285:74
- Cowan, MM, Taylor KG, Doyle RJ (1987) Energetics of the initial phase of adhesion of *Streptococcus sanguis* to hydroxylapatite. *J Bacteriol* 169:2995
- DGZMK (2010) S2k-Leitlinie: Diagnostik und Management von Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde. http://www.dgzmk.de/uploads/tx.szdgzmkdocuments/20101202_Langversion_Vorlaeuferlaesionen_des_oralen_Plattenepithelkarzinoms.pdf
- DGMKG (2011) http://www.patienteninformation_mkg.de/dgmkg/patienteninfo.nsf/E/A-F072EBF8FEEB68DC125768F003A77C5?OpenDocument
- Dibdin G, Wimpenny J (1999) Steady-state biofilm: practical and theoretical models. *Method Enzymol* 310:296-322
- DIN (2000a) Medizinische Mikrobiologie - Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika - Teil 3, Agardiffusionstest. Angaben für die Bewertung der Hemmhofdurchmesser. DIN 58940-3(1)
- DIN (2000b) Medizinische Mikrobiologie - Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika - Teil 4, Bewertungsstufen für die minimale Hemmkonzentration. DIN 58940-4(1)
- DIN (2004) Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, Diagnostische Verfahren. 4. Auf, Beuth Verlag

- DIN EN ISO 20776–1 (2004) Labormedizinische Untersuchungen und In-vitro-Diagnostika-Systeme - Empfindlichkeitsprüfung von Infektionserregern und Evaluation von Geräten zur antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung - Teil 1: Referenzmethode zur Testung der In-vitro-Aktivität von antimikrobiellen Substanzen gegen schnell wachsende aerobe Bakterien, die Infektionskrankheiten verursachen (ISO 20776-1).
- DIN 58940–4 Beiblatt 1 (2004) Medizinische Mikrobiologie - Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika - Teil 4: Bewertungsstufen für die minimale Hemmkonzentration; MHK-Grenzwerte von antibakteriellen Wirkstoffen.
- Doern GV, Ferraro MJ, Brueggemann AB *et al.*, (1996) Emergence of high rates of antimicrobial resistance among Viridans group streptococci in the US. *Antimicrob Agents Ch* 40(4):891-4
- Driemel O, Hertel K, Reichert TE *et al.*, (2006) Aktuelle Klassifikation der Präkursorläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms: Prinzipien der WHO-Klassifikation 2005. *Mund Kiefer Gesichtschir* 10:89-94
- Driemel O *et al.*, (2008) Erkennung oraler Risikoläsionen in der zahnärztlichen Praxis. *Deutsche Krebshilfe*
- Eckert AW (2004) Erregerspektrum und Resistenzsituation bei Infektionen im mund-, kiefer- und gesichtschirurgischen Bereich. Medizinische Dissertation der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Eckert AW (2009) Einfluss der Tumorhypoxie auf die Prognose beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle. Medizinische Habilitation der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Eckert AW, Kappler M, Schubert J *et al.*, (2012) Correlation of expression of hypoxia-related proteins with prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Maxillofac Surg* 16:189-96
- Eick S, Pfister W, Korn-Stemme S *et al.*, (2000) Erreger- und Resistenzspektrum bei intraoralen Infektionen des Kiefer-Gesichts-Bereiches unter besonderer Berücksichtigung der anaeroben Keimflora. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4:234-9
- El-Solh AA, Pietrantonio C, Bhat A *et al.*, (2004) Colonization of dental plaques: a re-reservoir of respiratory pathogens for hospital-acquired pneumonia in institutionalized elders. *Chest* 126:1275-82

- Ephros H, Mashberg A (1999) Toluidine blue – viewpoints. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 87:526-7
- EUCAST Version 1.3 vom 1.5.2011
- Fedele S (2009) Diagnostic aids in the screening of oral cancer. *Head Neck Oncol* 7(1):5
- Federspil P (1987) *Moderne HNO-Therapie – medikamentöse Behandlung in der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*. ecomed, Landsberg München
- Federspil P (1991) HNO-Antibiotikatherapie: therapeutische Richtlinien (Teil I + II). *HNO* 39:371-7, 413-8
- Federspil P, Elies W, Luckhaupt H *et al.*, (2003) Leitlinien zur Antibiotikatherapie der bakteriellen Infektionen an Kopf und Hals. *Arzneimitteltherapie* 21:162-75
- Federspil P, Federspil PA (2005) Antibiotikatherapie in der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. *HNO* 2005 (53):11-28
- Federspil P (2009) Leitlinie: Antibiotikatherapie der Infektion an Kopf und Hals. *HNO* 57:377-94
- Ferlay J, Shin HR, Bray F (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008:GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127(12):2893-917
- Flemming HC, Wingender J, Mayer C *et al.*, (2000) Cohesiveness in biofilm matrix polymers. In: Allison D, Gilbert P, Lappin-Scott HM, Wilson M (Hrsg): *Community structure and cooperation in biofilms*. Cambridge University Press, S. 87-105
- Forastiere A, Koch W, Trotti A *et al.*, (2001) Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* 345:1890-900
- GERMAP (2008) Antibiotika - Resistenz und - Verbrauch; Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. 1. Aufl., Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. und Infektologie Freiburg, Antiinfectives Intelligence - Gesellschaft für klinisch mikrobiologische Forschung und Kommunikation mbH, Rheinbach
- Gervasio OL, Dutra RA, Tartaglia SM, Vasconcellos WA, Barbosa AA, Aguiar MC (2001) Oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 740 cases in a Brazilian population. *Braz Dent J* 12:57-61

- Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H *et al.*, (1998) Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicilline. *Microbiol Mol Biol Rev* 62(4):1371-414
- Gilbert P, Collier PJ, Brown MR (1990) Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy and stringent response. *Antimicrob Agents Ch* 34(10):1865-8
- Gilbert P, Das J, Foley I (1997) Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* 11(1):160-7
- Gould IM (1998) Determinants of response to antibiotic therapy. *J of Chemother* 10:347-53
- Guder WG und Nolte J (2009) *Das Laborbuch für Klinik und Praxis*. Urban & Fischer Verlag / Elsevier GmbH, München
- Gupta PC, Pindborg JJ, Mehta FS (1982) Comparison of carcinogenicity of betel quid with and without tobacco: an epidemiologic review. *Ecol Dis* 1(4):213-9
- Hardie JM (1986) Genus *Streptococcus*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, London, Los Angeles, Sydney, S. 1043-7, 54-63
- Hasty DL, Ofek I, Courtney HS, Doyler J (1992) Multiple adhesions of streptococci. *Infect Immun* 60(6):2147-52
- Hausamen, JE (2000) Tumorchirurgie. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4:142-54
- Hegenbarth K (2012) Induktionstherapie bei lokal fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren, nur online: http://www.tumorzentrum-berlin-buch.de/Induktionstherapie_Dr%20Hegenbarfth.pdf
- Heyer G (2002) Infektionen der Mundschleimhaut. *zm* (2/2002)
- Höltje JV, Heidrich C (2001) Enzymology of elongation and construction of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *Biochemie*, 83(1):103-8
- Hof H (1999) Antibiotikatherapie und -prophylaxe in der Zahnheilkunde. *Zahnarzt Magazin* 2: 6-11
- Hoffmann AM (2000) Nachweis der Feldkanzerierung im oberen Aerodigestivtrakt mit Hilfe des Mikrokerntest. Medizinische Dissertation der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

- Hoffmann J, Scheiderbauer H., Krimmel M *et al.*, (2002) Aussagekraft panendoskopischer Untersuchungen im Rahmen der Ausbreitungs-diagnostik bei Mundhöhlenkarzinomen Mund Kiefer Gesichtschir 6:111-6
- Howaldt HP, Kainz M (1997) 8. Projektbericht des Zentralregisters des Deutsch-österreichisch-schweizerischen Arbeitskreises für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich (DÖSAK) für den Zeitraum vom 1. April 1989 - 20. Juni 1997
- Howaldt HP, Vorast J, Blecher C *et al.*, (2000) Ergebnisse aus dem DÖSAK-Tumorregister. Mund Kiefer Gesichtschir 4:216-25
- Hoyle BD, Costerton JW (1991) Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. Prog Drug Res 37:91-105
- Hullmann M, Kunkel M, Reichert TE (2010) Diagnostik und Therapie oraler präkanzeröser Läsionen. Mund Kiefer Gesichtschir 3:7-15
- Hurrelmann K, Klotz T, Haisch J (2010) Lehrbuch Prävention und Gesundheitsförderung, 3. Aufl., Huber-Verlag, Bern
- Inagi K, Takahashi H, Okamoto M *et al.*, (2002) Treatment effects in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. Acta Otolaryngol 547:25-9
- Jacoby GA, Blaser MJ, Santanam P *et al.*, (1990) Appearance of amikacin and tobramycin resistance due to 4'-aminoglycoside nucleotidyltransferase [ANT(4')-II] in gram-negative pathogens. Antimicrob Agents Ch 34(12):2381-6
- Jacoby GA (2009) AmpC beta-lactamases. Clin Microbiol Rev 22:161-82
- Jenkinson HF, Lamont RJ (1997) Streptococcal adhesion and colonization, Crit Rev Oral Biol Med 8(2):175-200
- Johnson LL, Peterson RV, Pitt WG (1998) Treatment of bacterial biofilms on polymeric biomaterials using antibiotics and ultrasound. J Biomat Sci-Polym E 9(11):1177-85
- Jousimies-Somer H, Summanen P (1997) Microbiology Terminology Update: Clinically Significant Anaerobic Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria (Excluding Spirochetes). Clin Infect Dis 25:11-4
- Jones AS (1994) Prognosis in mouth cancer: tumour factors. Eur J Cancer B Oral Oncol 30B(1):8-15

- Jorgensen JH, Turnidge JD (2007) Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (Hrsg): Manual of Clinical Microbiology, 7.Aufl., Vol 2, ASM PRESS, Washington D.C., 1146-51
- Kahlmeter G, Brown DF, Goldstein FW *et al.*, (2003) European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. J Antimicrob Ch 52:145-8
- Kaplan EL, Meier P (1958) Nonparametric estimation from incomplete observations. J Am Stat Ass 1958, 53:457-81
- Keevil CW, Bradshaw DJ, Dowsett AB *et al.*, (1987) Microbial Film formation: dental plaque deposition on acrylic tiles using continuous culture techniques. J Appl Bacteriol 62(2):129-38
- Kim KY, Li S, Cha JD *et al.*, (2011) Significance of molecular markers in survival prediction of oral squamous cell carcinoma. Head Neck 28:256-69
- Kleiner E, Monk AB, Archer GL *et al.*, (2010) Clinical Significance of staphylococcus lugdunensis Isolated from Routine Cultures. Clin Infect Dis 51(7):801-3
- Kratz B, Wiedemann B (1992) Antibakterielle Aktivität von Chemotherapeutika. Chemotherapie Journal 4:151-4
- Krüger M, Seidler T (2007) Allgemeine Bakteriologie. In: Rolle M, Mayr A (Hrsg): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 8. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart, S. 344-92
- Kunkel M (2005) Leitlinienentwurf: Dentoalveoläre Chirurgie: Präkanzeröse Mundschleimhautveränderungen, 1-10
- Kunkel M *et al.*, (2010) Diagnostik und Management von Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde. Leitlinie der DGZMK/BZÄK/DGMKG AWMF-Leitlinien-Register Nr.007/092
- Lautner MHW (2007) Rolle des Tumorphoxiemarkers Glut-1 in Ergänzung zu klinischen Parametern für prognostische Aussagen beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle. Medizinische Dissertation der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S *et al.*, (1997) Epidemiology and Prevention of Oral Cancer. Oral Oncol 33(5):302-12
- La Vecchia C, Lucchini F, Negri E *et al.*, (2004) Trends in oral cancer mortality in Europe. Oral Oncology 40(4):433-9

- León X, del Prado Venegas M, Orús C *et al.*, (2009): Influence of the persistence of tobacco and alcohol use in the appearance of second neoplasm in patients with a head and neck cancer. A case-control study. *CCC* 20(5):645-52
- Listl S, Jansen L, Stenzinger A *et al.*, (2013) Survival of Patients with Oral Cavity Cancer in Germany. *Plos One* 8(1):e53415
- Liljemark WF, Bloomquist CG, Reilly BE *et al.*, (1997) Growth Dynamics in a Natural Biofilm and Its Impact on Oral Disease Management. *Advances in Dental Research* 11:14-23
- Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya S (2001) Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity– a comprehensive literature review. *Oral Oncol* 37(5):401-18
- Llewellyn CD, Linklater K, Bell J *et al.*, (2003) Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients aged 45 years and under: a descriptive analysis of 116 cases diagnosed in the South East of England from 1990 to 1997. *Oral Oncol* 39(2):106-14
- Llewellyn CD, Linklater K, Bell J *et al.*, (2004) an analysis of risk factors for oral cancer in young people: a case-control study. *Oral Oncol* 40:304-13
- Lütticken R (1988) Die Familie der Streptococcaceae. In: Brandis H, Pulverer G (Hrsg): *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*, 6. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, S. 290-302
- Lys O (2004) Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle: Eine retrospektive Analyse der Patientendaten der Jahre 1990–2002. Medizinische Dissertation des Universitätsklinikums Bern
- Maier H, Dietz A, Gewelke U, Seitz U, Heller WD (1990) Tabak- und alkoholassoziiertes Krebsrisiko im Bereich des oberen Atmungs- und Verdauungstraktes. *Laryngo Rhino Otol* 69:505
- Marsh PD (1992) Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *J Dent Res* 71(7):1431-8
- Marsh PD, Bradshaw DJ (1997) Physiological Approaches to the Control of Oral Biofilms. *Advances in Dental Research* 11:176-85
- Martínez-Gimeno C, Rodríguez-Delgado LE, Perera-Molinero A *et al.*, (2011) A new method for the prediction of cervical node metastases in squamous cell carcinoma of the oral cavity: A combination of Martínez-Gimeno Scoring System and clinical palpation. *J of CranMaxFac Surg* 39:534-7

- Martin-Granizo R, Roudriguez-Campo F, Naval L *et al.*, (1997) Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients younger than 40 years. *Otolaryngol Head Neck Surg* 117:268-75
- McGregor GI, Davis N, Robins RE (1983) squamous cell carcinoma of the tongue and lower oral cavity in patients under 40 years of age. *Am J Surg* 146:88-92
- Metz A, Pfortner R, Schmeling C *et al.*, (2012) Mundschleimhautkarzinom: Mono- oder multimodale Behandlungskonzepte und moderne Techniken der rekonstruktiven Chirurgie. *best pract onkol* 7(1):46-53
- Moller OM, Esteve J, Moller H *et al.*, (1990) Cancer in the European Community and its member states. *Eur J Cancer* 26:1167-256
- Murdoch DA (1998) Gram-Positive Anaerobic Cocci. *Clin Microbiol Rev* 11:81-120
- Mustafa T (2006) Expression von CD97 und seines Liganden CD55 in Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle. Medizinische Dissertation der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Mutschler E, Schäfer-Korting M (1997) Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 5. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
- Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK *et al.*, (2008) Mutschler Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 9. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
- Nayak S, Goel MM, Chandra S *et al.*, (2012) VEGF-A immunohistochemical and mRNA expression in tissues and its serum levels in potentially malignant oral lesions and oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 48:2339
- NCCLS National Committee for Clinical Laboratory Standards (1994) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fifth informational supplement. M100-S5/M7-A3. NCCLS, Villanova, Pa.
- NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002) Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data; Approved Guideline. M39-A. NCCLS, Wayne, Pa.
- NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2004) Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; Approved Standard-6th edition. M11-A6. NCCLS, Wayne, Pa.

- NCCLS National Committee for clinical laboratory standards (2010) Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing. 21st informational supplement. M100-S21, NCCLS Wayne, Pa.
- Niederhagen B, Leipner N, Berge S *et al.*, (2000) Stellenwert von Computertomographie und Magnetresonanztomographie bei der Diagnostik von Malignomen der Mundhöhle und des Oropharynx. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4:217-21
- Norpoth A, Peterson B (1986) Vergleich dreier Verfahren zur Resistenzbestimmung von Keimen gegenüber Antibiotika und Chemotherapeutika. *Prakt Tierarzt* 12:1069-80
- Odenwald AK (2007) „Computerunterstützte individuelle Prognosestellung“ (CIP). Vergleich der vom CIP geschätzten 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit mit der tatsächlichen Überlebensdauer bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle. Medizinische Dissertation der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Oliveira LR, Ribeiro-Silva A (2011) Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 40:298-307
- Oliver AJ, Helfrick JF, Gard D (1996) Primary oral squamous cell carcinoma: a review of 92 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 54:949-55
- Oral Cancer Foundation (2011) <http://www.oralcancerfoundation.org>
- Palmer RJ Jr, Kazmerzak K, Hansen C *et al.*, (2001) Mutualism versus independence: strategies of mixed-species oral biofilms in vitro using saliva as the sole nutrient source. *Infect Immun* 69:5794-804
- Poole K (2005a) Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Ch* 56:20-51
- Poole K (2005b) Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Ch* 49(2):479-87
- Pushalkar S, Ji X, Li Y *et al.*, (2012) Comparison of oral microbiota in tumor and non-tumor tissues of patients with oral squamous cell carcinoma. *BMC Microbiology* 12:144
- Reichart PA (2000a) Primärprävention des Mundhöhlenkarzinoms und oraler Präkanzerosen. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4(6):357-64
- Reichart PA (2000b) Oral mucosal lesions in a representative cross-sectional study of aging Germans. *Community Dent Oral Epidemiol* 28:390-8
- Reichart PA (2001) Identification of risk groups for oral precancer and cancer and preventive measures. *Clin Oral Invest* 5(4):207-13

- Reichart PA, Hausamen JE, Becker J *et al.*, (2002a) Curriculum Chirurgie, Band 2: Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, 1. Aufl., Quintessenz Verlags-GmbH
- Reichart PA, Hausamen JE, Becker J *et al.*, (2002b) Curriculum Chirurgie, Band 3: Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, 1. Aufl., Quintessenz Verlags-GmbH
- Reichart PA (2003) Orale präkanzeröse Konditionen- eine Übersicht. Mund Kiefer Gesichtschir 7(4):201-7
- Reiß M (2009) Facharztwissen HNO-Heilkunde: Differenzierte Diagnostik und Therapie, 1. Aufl., Springer-Verlag, Berlin
- Robert-Koch-Institute (2012) Krebs in Deutschland, 2007/2008. Häufigkeiten und Trends, Berlin
- Rodloff AC, Goldstein EJ, Torres A (2006) Two decades of imipenem therapy. J Antimicrob Chemother 58:916-29
- Rodloff A, Bauer T, Ewig S *et al.*, (2008) Sensibel, intermediär und resistent – Wirkintensität von Antibiotika, Dtsch Ärztebl 105(39):657-62
- Rohleder SE (2006) Bedeutung des Proliferationsmarkers MIB-1 für die individuelle Überlebenszeitprognose bei Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen. Medizinische Dissertation der Eberhard Karls Universität zu Tübingen
- Rosenblatt KA, Daling JR, Chen C *et al.*, (2004) Marijuana use and risk of oral squamous cell carcinoma. Cancer Res 64(11):4049-54
- Rosin H, Henschler D (1998) beta-Lactam-Antibiotika. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (Hrsg): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 7. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, S. 89-98
- Sasaki T, Moles DR, Imai Y *et al.*, (2005) Clinico-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age. J Oral Pathol Med 34(3):129-33
- Scheie AA (1994) Mechanisms of Dental Plaque Formation. Advances in Dental Research 8:246-53
- Schierholz JM, Beuth J, König D *et al.*, (1999): Antimicrobial substances and effects on sessile bacteria, Bacteriol 289(2):165-77
- Schmidt LP, Hardt N, Printzen G *et al.*, (1995) Resistenzspektrum und Antibiotikatherapie bei progressiven Infektionen im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich. Schweiz Monatsschr Zahnmed 105:159-64

- Schubert J, Maurer P, Wilhelms D *et al.*, (1995) Erfahrungen mit Cefotiam als perioperative Antibiotikaprophylaxe in der MKG-Chirurgie. Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir 19:19-21
- Schwarz S, Böttner A, Hafez HM *et al.*, (2003) Empfindlichkeitsprüfung bakterieller Infektionserreger von Tieren gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen: Methoden zur *in-vitro* Empfindlichkeitsprüfung und deren Eignung in Hinblick auf die Erarbeitung therapeutisch nutzbarer Ergebnisse. Berl Münch Tierärztl Wschr 116:353-61
- Schwarz S, Böttner A, Goossens L *et al.*, (2005) Resistenztestungen mittels Bouillon-Mikrodilution: Umsetzung der Vorgaben der DVG-Arbeitsgruppe „Antibiotikaresistenz“ im Geflügelbereich, DVG Service 2006:46-52
- Schwenzer N, Ehrenfeld M (2010) Spezielle Chirurgie. 2. Lehrbuchreihe zur Aus- und Weiterbildung. 4.Aufl., Thieme, Stuttgart, New York
- Semmler MP, Driemel O, Staudenmaier R *et al.*, (2006) Effekte von Nikotin unter Berücksichtigung der Tumorentstehung im Kopf-Hals-Bereich. Mund Kiefer Gesichtschir 10:395-401
- Shah PM (2002) Resistenzsituation im klinischen Alltag - Daten zu Carbapenem, Ciprofloxacin und Cefotaxim. Arzneimitteltherapie 20:257-8
- Shah PM (2005) The need for new therapeutic agents: what is in the pipeline? Clin Microbiol Infec 11:36-42
- Sharwani A, Jerjes W, Salih V *et al.*, (2006) Fluorescence spectroscopy combined with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in detecting oral premalignancy. J Photochem Photobiol B 83:27-33
- Siewert JR (2001) Chirurgie, 7. Aufl, Springer-Verlag GmbH, Berlin, Heidelberg
- Simon C und Stille W (2000) Grundbegriffe der Antibiotika-Therapie. Antibiotikatherapie in Klinik und Praxis. 10. Aufl., FK Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- Spiessl B (1988) Die TNM-Klassifikation. Mund Kiefer Gesichtschir 12:83-5
- Stephan DU (1999) In-vitro-Untersuchungen von Speichelproben auf zyto- und gentoxische Wirkung. Medizinische Dissertation der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Stewart PS, Costerton JW (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 358:135
- Stickler D (1999) Biofilms. Curr Opin Microbiol 2(3):270-5

-
- Stille W, Brodt HR, Groll AH, Just-Nübling G (2005) Antibiotika-Therapie. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York
- Stock I, Machka K, Rodloff A *et al.*, (2001) Qualitätssicherung und Qualitätskontrollen in der Antibiotikaempfindlichkeitsbestimmung von Bakterien mit der Mikrodilution. *Chemother J* 10:78-98
- Sutherland IW (1999) Biofilm matrix polymers - role in adhesion. In: Newman HN, Wilson M (Hrsg): Dental plaque revisited - oral biofilms in health and disease. Bioline, University College London, S. 49-62
- Sutherland IW (2001) The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 9:222
- Switalksi LM, Butcher WG, Caufield PC *et al.*, (1993) Collagen mediates adhesion of *Streptococcus mutans* to human dentin, *Infect Immun* 61(10):4119-25
- Tam VH, Schilling AN, Nikolaou M (2005) Modelling time-kill studies to discern the pharmacodynamics of meropenem. *J Antimicrob Chemother* 55(5):699-706
- Teppo H, Koivunen P, Hyrynkangas K *et al.*, (2003) Diagnostic delay in laryngeal carcinoma: Professional diagnostic delay is a strong independent predictor of survival. *Head* 25:389-94
- Thorne P, Etherington D, Birchall MA (1997) Head and neck cancer in the South West of England: influence of socio-economic status on incidence and second primary tumors. *Eur J Surg Oncol* 23:503-8
- UICC (Union internationale contre le cancer) (1993) TNM-Atlas. Illustrierter Leitfaden zur TNM/pTNM-Klassifikation maligner Tumoren, 3. Aufl., Springer Verlag, Berlin
- Van der Waal I (1998) Tobacco and oral cancer and precancer. Meeting report: EU working group on Tobacco and oral health. *Oral Dis* 4:52-3
- van Oijen MG, Slootweg PJ (2000): Oral field cancerization: carcinogen-induced independent events or micrometastatic deposits? *J Oral Maxillofac Surg* 9(3):249-56
- Vogel F, Scholz H (2002) Rationaler Einsatz oraler Antibiotika bei Erwachsenen. *Chemother J* 2:47-58
- Wacha H, Hoyme U, Isenmann R *et al.*, (2010) PEG-Empfehlungen: Perioperative Antibiotika-Prophylaxe. *CTJ* 2010(3):70-84
- Wade WG (2002) Unculturable bacteria - the uncharacterized organisms that cause oral infections. *J R Soc Med* 95(2):81-3

- Wade WG (2004) Non-culturable bacteria in complex commensal populations. *Adv Appl Microbiol* 54:93-106
- Warzecha A (2002) Stellenwert des präoperativen Tumorstaging beim Mundhöhlenkarzinom für die Erfassung simultaner Tumoren und therapierelevanter Befunde. Medizinische Dissertation der Ruhr-Universität Bochum
- Westphal R (1984) Mikrobiologische Untersuchungsbefunde bei odontogenen pyogenen Infektionen unter verschiedenen intraoralen Entnahmebedingungen. Medizinische Dissertation der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- WHO (1997) The Medical Impact of Antimicrobial Use in Food Animals. Report of a WHO Meeting, Berlin, 13.-17. Okt. 1997. World Health Organization, Emerging and other Communicable Diseases, Surveillance and Control, WHO/EMC/ZOO/97.4
- WHO (2001) Monitoring antimicrobial usage in food animals for the protection of human health. Report of a WHO consultation, Oslo, 10.-13. Sept. 2001. World Health Organization, Department of Communicable Disease, Surveillance and Response, WHO/CDS/CSR/EPH/2002.11
- WHO (2007) Critically Important Antimicrobials for Human Medicine: Categorization for the Development of Risk Management Strategies to contain Antimicrobial Resistance due to Non-Human Antimicrobial Use. Report of the Second WHO Expert Meeting, Kopenhagen, 29.-31. Mai 2007. World Health Organization, Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Disease
- Wiedemann B, Hildebrand G, Weppelmann G und Mannheim W (1983) Reproduzierbarkeit von Messergebnissen mit dem Agardiffusionstest bei der Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien. *Ärztl Lab* 29:363-72
- Wittekind K, Tischoff I (2004) Tumorklassifikationen. *Pathologe* 25:481-91
- Youssefzadeh S, Pamberger P, Baumgartner W *et al.*, (1999) Maligne Tumoren der Mundhöhle und des Oropharynx -Stadieneinteilung. *Radiologe* 39:513-24
- Ziegler A, Lange S, Bender R (2007) Überlebenszeitanalyse: Eigenschaften und Kaplan-Meier Methode. *Dtsch Med Wochenschr* 132:e36-e38
- Ziegler A, Lange S, Bender R (2007) Der Log-Rank-Test. *Dtsch Med Wochenschr* 132:e39-e41
- Ziegler A, Lange S, Bender R (2007) Das Cox-Modell. *Dtsch Med Wochenschr* 132:e42-e44

Zini A, Czerninski R, Sgan-Cohen HD (2010) Oral cancer over four decades: epidemiology, trends, histology and survival by anatomical sites, J Oral Pathol Med 39:299-305

Zöller JE, Scheer M (2000) Stand und Perspektiven der Chemoprävention bei oralen Plattenepithelkarzinomen und deren Vorläuferläsionen. Mund Kiefer Gesichtschir 4:160-8

8 Thesen

1. Die Biofilmflora auf Mundhöhlenkarzinomen unterscheidet sich maßgeblich von der bakteriellen Besiedlung auf gesunder Mundschleimhaut. Ein Wechsel der Normalflora wird maßgeblich durch Alkohol und Tabak beeinflusst.
2. In Abhängigkeit des Schädigungsgrades durch Noxen oder Tumorwachstum ändert sich die bakterielle Zusammensetzung der jeweiligen Biofilme. Ein deutliches Überwiegen grampositiver Aerobier findet sich bei normaler Mundschleimhaut, vermehrt gramnegative Anaerobier kolonisieren die Biofilme der Karzinome.
3. Die aus dem odontogenen Infektionsgeschehen bekannten Erreger sind nicht für die postoperativen Weichteilinfektionen von Tumorpatienten verantwortlich.
4. Der Biofilm auf Mundhöhlenkarzinomen fördert eine schnellere, weitreichendere und breitere Resistenzentwicklung. Somit zeigen Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom bereits bei den im klinischen Alltag der Kieferchirurgie rezeptierten Antibiotika höhere Resistenzquoten als gesunden Probanden.
5. Im Biofilm laufen mannigfaltige Resistenzmechanismen unter optimalen Voraussetzungen für zahlreiche Bakteriengattungen ab. Von besonderem klinischen Interesse sind die Anaerobier. Die Resistenzquoten liegen bei Penicillin bei 40 %, bei Ampicillin bei 56,7 % und bei Clindamycin bei 46,7 %.
6. Eine klassische perioperative Prophylaxe anhand gesunder Patientendaten oder jenen mit odontogenen Infektionen bleibt bei Tumorpatienten wirkungslos. Präoperative Erreger- und Resistenzbestimmungen sollten erfolgen, um postoperative Weichteilinfektionen zu vermeiden.
7. Es lassen sich Zusammenhänge zwischen bakterieller Besiedlung einerseits und dem durchschnittlichen 5-Jahres-Überleben andererseits erkennen. Rein anaerobe Bakterienpopulationen oder Monopopulationen zeigen Tumorerkrankungen mit schlechten Überlebensprognosen an.
8. Die Biofilmflora kann in Zukunft möglicherweise als Kontrollinstrument im Rahmen der Tumurvorsorge sowie prognostischer Indikator bei Mundhöhlenkarzinomen herangezogen werden. Die multivariate Cox-Regression bestätigt ein gut 6-fach erhöhtes Risiko des tumorassoziierten Versterbens, wenn vermehrt Anaerobier den Biofilm kolonisieren (Cox-Regression: $p=0,014$; log rank: 6,04-fach bei $p = 0,025$).

9. Die Zusammensetzung der Biofilme auf Mundhöhlenkarzinomen kann als weiterer unabhängiger Prognosefaktor herangezogen werden. Es lassen sich Korrelationen zwischen Biofilmflora und weiteren Biomarkern wie HIF-1 α erahnen, welche in Zukunft durch weitere Studien verifiziert werden sollten.
10. Anhand der Biofilmflora könnte in Zukunft die Identifizierung von Risikopatienten denkbar sein. Eine Erreger- und Resistenzanalyse der Biofilme ist vor der operativen Intervention dringlich empfohlen.
11. Die aktuelle Studie ist die erste, welche unter standardisierten Entnahme- und Transportbedingungen die Mikrobiologie der Biofilme auf Mundhöhlenkarzinomen detailliert analysiert.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Julia Bolz
Geburtsdatum: 27.11.1980
Geburtsort: Quakenbrück
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
E-mail: julia.bolz@uk-halle.de
Eltern: StD Norbert Richard Bolz, geb. am 19.07.1949 in Waldmoor
Gabriele Bolz, geb. Milz, geb. am 13.03.1952 in Kaiserslautern
Geschwister: Tanja Bolz, Studentin, geb. am 25.08.1983 in Quakenbrück

Schulbildung

08.1987 – 07.1991 Grundschule: Grundschule am Gelbrink
08.1991 – 07.1993 Orientierungsstufe: OS Löningen
08.1993 – 07.2000 Copernicus-Gymnasium Löningen
07.2000 Hochschulreife

Hochschulbildung

10.2000 – 11.2005 Studium der Zahnmedizin an der Martin-Luther-Universität in Halle-Wittenberg
29.11.2005 Approbation als Zahnärztin
04-2004 – 05.2010 Studium der Medizin an der Martin-Luther-Universität in Halle-Wittenberg
26.05.2010 Approbation als Ärztin
02.2006 – 05.2010 Zahnärztin der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik des Departments für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. J. Setz)
Seit 06.2010 Ärztin und Zahnärztin in Weiterbildung zum Facharzt der Universitäts- und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Schubert, seit 10.2012 kommissarischer Direktor: Priv.-Doz. Dr. Dr. AW. Eckert)

Selbständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, **Julia Bolz, geboren am 27.11.1980**, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale), den

Julia Bolz

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, **Julia Bolz, geboren am 27.11.1980**, bisher an keiner in- und/ oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um eine Zulassung zur Promotion eingereicht oder die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt zu haben.

Halle (Saale), den

Julia Bolz

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich von Herzen bei all denjenigen bedanken, die mit viel Geduld dazu beigetragen haben, dass das in Angriff genommene Projekt „Promotion“ abgeschlossen werden konnte.

Mein besonderer Dank gilt zunächst Prof. Dr. Dr. J. Schubert (bis 2012 Direktor der Universitäts- und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universitätsklinik Halle-Wittenberg) für die Ermöglichung der Studiendurchführung in seiner Klinik, seine Motivation sowie die strenge und doch herzliche Korrektur meiner Promotion.

Des Weiteren möchte ich mich bei Priv.-Doz. Dr. Dr. A. W. Eckert (kommissarischer Direktor der Universitäts- und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universitätsklinik Halle-Wittenberg) bedanken. Mit unendlich viel Geduld, stetiger Ermutigung und Hilfestellung konnte meine Promotion fertiggestellt werden.

Für die freundliche und fachliche Unterstützung bei der Durchführung der mikrobiologischen Versuche in seinen Räumlichkeiten möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. A. Kekulé (Direktor des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) und seinen Mitarbeitern bedanken. Besonderer Dank gilt hier Frau PhD E. Dosa für Hilfestellungen im Umgang mit Bakterien und Antibiotika und ihre ständige Unterstützung während der Versuchsreihen.

Abschließend danke ich meinen Eltern für ihre verständnisvolle, ermutigende und geduldige Art. Ohne ihre Motivation, Liebe und Zuneigung sowie den mir entgegengebrachten Stolz hätte diese Arbeit nicht entstehen können.