

Aus der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und klinische Immunologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. Arndt Borkhardt

Einfluss des Mikrobioms der Mundhöhle auf die chronisch
nichtbakterielle Osteomyelitis im Kindes- und Jugendalter

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Mona Yvonne Zeus
(2022)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Referent: PD Dr. med. Hans-Jürgen Laws

Korreferent: PD Dr. med Gamal Chehab

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Zeus M, Janssen S, Laws HJ, Fischer U, Borkhardt A, Oommen PT. Results from a pilot study on the oral microbiome in children and adolescents with chronic nonbacterial osteomyelitis. *Z Rheumatol.* 2021 Jul 1. English. doi: 10.1007/s00393-021-01035-x. Epub ahead of print. PMID: 34196794.

Zusammenfassung

Die chronisch nichtbakterielle Osteomyelitis (CNO) ist eine seltene autoinflammatorische Erkrankung des Knochens. Das klinische Bild der Erkrankung ist variabel, wobei Schmerzen und Osteoödem im MRT die Haupt-Charakteristika der Erkrankung darstellen. Die genaue Pathophysiologie ist bisher größtenteils ungeklärt. Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems und die Überexpression von IL-1 β scheinen eine zentrale Rolle zu spielen. Ziel der Arbeit ist es, mögliche Veränderungen des Mikrobioms bei der CNO zu detektieren. Während bei anderen rheumatischen Erkrankungen, sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen, erste Hinweise auf den Einfluss des Mikrobioms bei der Krankheitsentstehung und Therapie vorliegen, existieren für die CNO bisher keine humanen Daten zum Mikrobiom.

Es wurden 20 Patienten (12 männlich, 8 weiblich, zwischen 3-13 Jahren) mit einem mittleren Alter von 10,3 Jahren untersucht. Zusätzlich wurden 36 Kontrollen untersucht. Dazu wurden Abstriche von zwei unterschiedlichen Stellen im Mund (Mitte und linke Seite der Zunge) zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen. Die Proben wurden mittels 16s r-RNA Sequenzierung untersucht: Die V4 Region der 16s Ribosomen-RNA wurde mittels PCR mit V4 spezifischen Primern amplifiziert, hiernach eine limitierte Zyklus-Amplifikation durchgeführt und in der Folge sequenziert. Mithilfe der Software „Qiime2“ wurden alpha- und beta-Diversitäten berechnet.

Medikamenten-Gabe (meist nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR)) hat einen signifikanten Einfluss auf das Mikrobiom ($p < 0,02$). Es zeigte sich außerdem ein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten im Alter von 3-8 Jahren und 9-14 Jahren. Geschlecht und Erkrankungsaktivität zeigten bei der kleinen untersuchten Kohorte keinen signifikanten Einfluss auf das Mikrobiom. Ein weiterer signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen den unterschiedlichen Abstrich-Orten ($p < 0,01$).

Die vorliegende Arbeit zum Stellenwert des oralen Mikrobioms bei der CNO liefert erste Hinweise, dass Medikamente, die zur Behandlung der CNO eingesetzt werden, das Mikrobiom beeinflussen zu scheinen. Ebenso wird das Mikrobiom durch unterschiedliche Abstrich-Orte verändert.

Summary

Chronic nonbacterial osteomyelitis (CNO) is a rare autoinflammatory bone disease. The disease's clinical presentation is diverse, with pain and osteoedema on MRI being the main characteristics. The exact pathophysiology remains largely unexplained. The activation of the innate immune system and release of IL-1 β appear to play a central role. The objective of this study is to detect possible alterations of the microbiome in CNO. Whereas data on other child and adult rheumatic diseases show initial evidence for the influence of the microbiome regarding disease development and therapy, no human based data on the microbiome in CNO exist so far.

Twenty patients (12 male, 8 female, aged 3-13 years) with a mean age of 10.3 years were studied. In addition, 36 controls were examined. For this purpose, swabs were taken from two different sites in the mouth (center and left side of the tongue) at two different time points. The samples were analyzed by 16s r-RNA sequencing: The V4 region of 16s ribosomal RNA was amplified by PCR using V4 specific primers, followed by limited cycle amplification and subsequent sequencing. Using the software "Qiime2", alpha and beta diversities were calculated.

Drug administration (mostly NSAID) has a significant effect on the microbiome ($p < 0.02$). There was also a significant difference between patients aged 3-8 years and 9-14 years. Moreover, a significant difference was revealed between the various swab locations ($p < 0.01$). However, gender and disease activity showed no significant influence on the microbiome.

The present work on the role of the oral microbiome in CNO provides preliminary evidence. Drugs, especially non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) seem to affect the microbiome. Also, the microbiome is altered by different swab locations.

Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
COG	Clusters of Orthologous Groups
CNO	Chronisch nichtbakterielle Osteomyelitis
CRMO	Chronisch rekurrende multifokale Osteomyelitis
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
DIRA	Defizienz des Interleukin 1-Rezeptor-Antagonisten
gamma-GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HHU	Heinrich-Heine-Universität
IL	Interleukin
JIA	Juvenile idiopathische Arthritis
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LPIN2	Lipin 2
MRT	Magnetresonanztomographie
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
OTU	Operational taxonomic unit
pd	Phylogenetic diversity
PICRUST	Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States
PCR	Polymerasekettenreaktion
PPP	Palmoplantare Pustulose
Pstpip2	Proline-Serine-Threonine Phosphatase Interacting Protein 2
QIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology
RANKL	Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand
Rfam	RNA sequence families
rpm	Revolutions per minute
16s rRNA	16 Svedberg ribosomale Ribonukleinsäure
SAA	Serum Amyloid A
SAPHO	Synovitis - Akne - Pustulosis - Hyperostose - Osteitis
sOTU	Sub-operational taxonomic unit
TNF	Tumornekrosefaktor

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Chronisch nichtbakterielle Osteomyelitis	1
1.1.1 Symptome.....	1
1.1.2 Komplikationen	2
1.1.3 Assoziierte Erkrankungen	2
1.1.4 Ätiologie und Pathophysiologie	3
1.1.5 Genetik	4
1.1.6 Labordiagnostik	5
1.1.7 Bildgebende Untersuchungen.....	5
1.1.8 Diagnosestellung	6
1.1.9 Differentialdiagnosen	7
1.1.10 Histologie	8
1.1.11 Medikamentöse Therapie	9
1.2 Mikrobiom.....	10
1.2.1 16s rRNA.....	11
1.2.2 Alpha Diversität.....	11
1.2.3 Beta Diversität	12
1.2.4 Dysbiose	12
1.3 Aktuelle Datenlage.....	12
1.3.1. Chronisch nichtbakterielle Osteomyelitis.....	12
1.3.2. Juvenile idiopathische Arthritis	13
1.4 Ethikvotum.....	14
1.5 Ziele der Arbeit	15
2 Material und Methoden.....	17

2.1 Patientenrekrutierung	17
2.2 16s r RNA Sequenzierung.....	19
2.3 Statistische Auswertung	20
3 Results from a pilot study on the oral microbiome in children and adolescents with chronic nonbacterial osteomyelitis. Zeus M, Janssen S, Laws HJ, Fischer U, Borkhardt A, Oommen PT. Z Rheumatol. 2021 Jul 1.	22
4 Diskussion.....	23
4.1 Methoden.....	23
4.2 Stichprobengröße	23
4.3 Kontrollgruppe	23
4.4 Einfluss des Ortes.....	24
4.5 Einfluss des Geschlechtes	24
4.6 Einfluss des Alters.....	25
4.7 Einfluss der Krankheitsaktivität.....	25
4.8 Einfluss der Medikamentengabe	26
4.9 Vergleich der Ergebnisse mit aktuellen Studien	26
4.10 Schlussfolgerungen	28
Literatur- und Quellenverzeichnis	30
Anhang.....	36

1 Einleitung

1.1 Chronisch nichtbakterielle Osteomyelitis

Die chronische nichtbakterielle Osteomyelitis ist eine seltene autoinflammatorische Erkrankung des Knochens und des Knochenmarks. Leitsymptom der Erkrankung sind Schmerzen durch Entzündungen im Knochen. Diese können uni- und multifokal auftreten. Als Korrelat und diagnostisches Zeichen der Inflammation am Knochen gelten die in der MRT nachweisbaren Osteoödeme. [1]

Die Erkrankung wurde erstmalig 1972 von Giedion et al. an einer Kohorte von 4 Kindern mit symmetrischen osteolytischen Läsionen beschrieben [2]. Während Giedion et al. vorwiegend die radiologischen Auffälligkeiten herausarbeitete, wurden 1978 von Björkstén et al. zusätzlich auch klinische und laborchemische Auffälligkeiten von 9 weiteren Patienten beschrieben. Hier standen vor allem wiederkehrende Symptome (Fieber, Schwellung, Schmerzen und teilweise palmoplantare Pustulose) im Wechsel mit Phasen von Symptomfreiheit im Vordergrund. Daraus entstand der Vorschlag für den Namen der chronisch rekurrenden multifokalen Osteomyelitis (CRMO). Weitere Bezeichnungen sind nichtbakterielle Osteomyelitis (NBO) oder chronisch nichtbakterielle Osteomyelitis (CNO). Laborchemisch zeigten sich, außer einer erhöhten BSG, keine spezifischen Laborwerte. Es zeigte sich ein unzureichendes Ansprechen auf eine antibiotische Therapie, sodass ein infektiöses Geschehen als Ursache ausgeschlossen wurde. [3]

1.1.1 Symptome

Typisches Leitsymptom der Erkrankung sind wiederkehrende Schmerzen an den betroffenen Stellen. Der Schmerz tritt verstärkt nachts auf. Teilweise treten auch Schwellung, Rötung und Überwärmung an den betroffenen Stellen auf. Selten geht die Erkrankung mit subfebrilen Temperaturen und Fieber einher. Oft zeigt sich eine systemisch nur geringgradig ausgeprägte humorale Entzündungsreaktion; teilweise verlaufen die Entzündungen auch asymptomatisch. Wenn Gelenke mitbetroffen sind, kann es zu einer schmerzhaften

Bewegungseinschränkung kommen. Die Erkrankung tritt in den meisten Fällen multifokal auf und oft zeigen sich symmetrische Läsionen. [4-7]

Am häufigsten sind bei der CNO die Meta- und Epiphysen der langen Röhrenknochen betroffen, meist distale und proximale Tibia, Femur, Humerus und Clavicula. Häufig finden sich auch Entzündungen im Bereich der Wirbelsäule, an der Schulter oder der Hüfte und selten ist auch der Kiefer betroffen. [5, 8, 9]

Das typische Erkrankungsalter liegt zwischen dem 7. und 12. Lebensjahr [5, 10]. Mädchen sind doppelt so häufig wie Jungen betroffen. Die Inzidenz der CNO lag bei einer deutschlandweiten Studie von Jansson et al. bei 0,4/100.000 Kindern. In dieser Studie wurden in den Jahren 2006 bis 2008 Daten von 148 Patienten mit CNO ausgewertet. Hier zeigte sich eine Kohorte mit den klassischen Charakteristika der CNO: Bei Diagnosestellung zeigte über die Hälfte der Patienten keine Allgemeinsymptome, nur selten zeigten sich Fieber, Appetitlosigkeit, vergrößerte Lymphknoten und Gewichtsverlust. 34% der Patienten zeigen ein unifokales Auftreten, bei dem Rest der Patienten lagen multiple Knochenläsionen vor. [11]

1.1.2 Komplikationen

Als typische Komplikation der Erkrankung treten, besonders an der Wirbelsäule, pathologische Frakturen auf. Durch die Entzündungen kann es außerdem zu Wachstumsdeformierungen, speziell im Bereich der Beine, der Clavicula und der Wirbelsäule, kommen. So zählen Kyphosen oder Bein-Längen-Differenz zu den häufigen Komplikationen der CNO. [7, 12]

1.1.3 Assoziierte Erkrankungen

Ähnlich wie beim SAPHO-Syndrom (Synovitis-Akne-Pustulose-Hyperostose-Osteitis-Syndrom) bei Erwachsenen ist auch die CNO mit einigen, vorwiegend autoimmunen Erkrankungen, assoziiert. Häufig tritt die CNO bei Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa oder Psoriasis vulgaris auf. Weitere assoziierte Hauterkrankungen sind Akne oder palmoplantare Pustulose. Zusätzlich zu der Entzündung im Knochen kann es auch zu einer Entzündung der Gelenke in Form einer Arthritis kommen. [8, 11, 13]

Die genannten assoziierten Erkrankungen treten häufig auch bei nahen Verwandten der Patienten auf. In ca. 50% der Fälle leidet ein Familienmitglied ersten oder zweiten Grades an einer autoimmunen Erkrankung, wie Psoriasis oder chronisch entzündlicher Darmerkrankung. [4, 12, 14, 15]

1.1.4 Ätiologie und Pathophysiologie

Die genaue Ätiologie und Pathophysiologie sind bis heute weitestgehend ungeklärt. Anfänglich wurde der Erkrankung eine infektiöse Ursache zugeschrieben, da bei einzelnen Patienten *Propionibacterium acnes* nachgewiesen werden konnte [16]. Bei unzureichendem Ansprechen auf eine antibiotische Therapie und vermehrtem Nachweis von sterilen Knochenläsionen wurde diese Hypothese verworfen [17].

Nach heutiger Auffassung steht die Imbalance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen im Mittelpunkt der Krankheitsentstehung:

Hofmann et al. konnten zeigen, dass Monozyten von Patienten mit CNO durch eine Stimulation mit Lipopolysacchariden eine signifikant verringerte Expression von IL-10 im Vergleich mit Gesunden zeigen. Die Produktion von TNF- α wird von der Stimulation nicht beeinflusst. Als antiinflammatorisches Zytokin reguliert IL-10 unter anderem die Aktivierung von NLRP3-Inflammasomen. Bei verminderter Expression von IL-10 wird das Inflammasom vermehrt aktiviert. [18-20]

Der Begriff des Inflammasom wurde 2002 erstmalig von Martinom et. al geprägt [21]. Als Teil des angeborenen Immunsystems beschreibt das Inflammasom einen Proteinkomplex, welcher über die Bindung von Caspase 1 zur Spaltung von pro-IL-1 β und somit zu einer vermehrten Ausschüttung von IL-1 β führt. [21, 22]

Über NF- κ B kommt es wiederum zur vermehrten Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-20 und TNF- α . Außerdem erfolgt über NF- κ B eine erneute Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms. IL-1 β sorgt außerdem über RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) für eine Osteoklastenaktivierung. [23]

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung können laborchemisch erhöhte IL-6- und TNF- α -Werte nachgewiesen werden. [18, 19, 24]

Lukens et al. führten Untersuchungen an pstpip2 (Proline-Serine-Threonine Phosphatase Interacting Protein 2) Mäusen durch [25]. Hierbei handelt es sich um sogenannte *knock-out*-Mäuse, welche über eine missense-Mutation im pstpip2 eine chronisch nichtbakterielle Osteomyelitis entwickeln [26]. Hier zeigte sich, dass eine Überexpression von IL-1 β zu Inflammation, Knochendeformität und Osteolysen führt. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass trotz Abwesenheit von NLRP3 und Caspase1 erhöhte IL-1 β Spiegel nachgewiesen werden konnten, was für eine Inflammasom-unabhängige IL-1 β -Produktion sprechen würde. [25]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IL-10, IL-1 β und die Aktivierung von Osteoklasten eine zentrale Rolle in der Entstehung der CNO spielen. Sie wird daher als autoinflammatorische Erkrankung bezeichnet. Die exakte Pathophysiologie ist somit bislang nicht abschließend untersucht.

Als weitere Einflussfaktoren werden genetische Einflussfaktoren und das Mikrobiom diskutiert [27]. Siehe hierzu Kapitel 1.1.5 und 1.3.

1.1.5 Genetik

Die schon in Kapitel 1.1.3 beschriebene Assoziation von CNO mit anderen autoimmunen und autoinflammatorischen Erkrankungen bei nahen Verwandten lässt auf einen Einfluss der Genetik bei der Entstehung der CNO schließen. Das Majeed Syndrom und die Defizienz des Interleukin 1-Rezeptor-Antagonisten (DIRA) sind Beispiele für monogenetische Erkrankungen, welche unter anderem mit nichtbakterieller Osteomyelitis einhergehen.

Das Majeed Syndrom, welches 1989 erstmalig beschrieben wurde [28], ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung mit den Hauptsymptomen periodisches Fieber, nichtbakterielle Osteomyelitis und dyserythropoetische Anämie. Die Erkrankung zeigt sich meist in den ersten zwei Lebensjahren mit der nichtbakteriellen Osteomyelitis als Hauptsymptom. Hier sind meist gelenknah die langen Röhrenknochen der unteren Extremität betroffen. Laborchemisch zeigen alle der bislang beschriebenen Patienten erhöhte Entzündungsparameter. Als auslösender Faktor konnten verschiedene Mutationen im LPIN2 Gen identifiziert werden. Therapeutisch werden IL-1-Inhibitoren eingesetzt, wodurch sich gute Therapieerfolge zeigen ließen. [15, 29-32]

Bei DIRA (Defizienz des Interleukin 1-Rezeptor-Antagonisten) handelt es sich ebenfalls um eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung. Hier stehen nichtbakterielle Osteomyelitis, Periostitis und generalisierte Pustulose in der Neonatalperiode im Vordergrund. Die Patienten zeigen direkt bei oder kurz nach der Geburt bereits die genannten Symptome. Es besteht kein Fieber, allerdings zeigen sich auch hier erhöhte Entzündungsparameter im Blut. Betroffen von verschiedenen Mutationen ist hier das IL1RN Gen. Therapeutisch werden Steroide, NSAR und IL-1-Inhibitoren eingesetzt. [15, 33-36]

Trotz phänotypisch sehr ähnlich verlaufender Erkrankungen, bei denen einzelne Gene identifiziert wurden, konnte bei der CNO bislang kein einzelnes Gen identifiziert werden, welches die Erkrankung auslöst. Bei Mäusen allerdings konnte durch Mutationen im *pstpip2* Gen eine Entwicklung von chronisch nichtbakterieller Osteomyelitis nachgewiesen werden. Somit scheint es sich ätiopathogenetisch um eine multifaktorielle Erkrankung zu handeln. [26, 37]

1.1.6 Labordiagnostik

Die Bestimmung von Blutbild, CRP, Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) und die Abnahme von Blutkulturen zählen zu den typischen Laboruntersuchungen bei der Neudiagnose einer CNO. Im Verlauf sind die Bestimmung von Blutbild, CRP und BSG ausreichend.

Das Blutbild zeigt meistens keine Auffälligkeiten, ebenso findet sich in Blutkulturen kein Keimnachweis. CRP und BSG sind oft zu Beginn und bei erneuten Schüben der Erkrankung als Zeichen der Inflammation erhöht. Es gibt keine CNO-typischen Laborparameter, allerdings hilft die Labordiagnostik bei dem Ausschluss von Differenzialdiagnosen und für die Bestimmung der Krankheitsaktivität. [8, 13, 38]

1.1.7 Bildgebende Untersuchungen

Als Goldstandard der bildgebenden Diagnostik gilt mittlerweile die Ganzkörper-Magnetresonanztomographie. Ein typisches Kriterium ist vor allem das Knochenmark-Ödem. Begleitend können Sklerose oder Fibrose, Weichteilödem und Osteolysen bzw. Hyperostosen im Röntgen nachgewiesen werden. Mit der Ganzkörper-MRT kann die ganze

Ausbreitung der Erkrankung inklusive sogenannter „silenter“ Herde erfasst werden. Als silente Herde bezeichnet man radiologisch auffällige Herde, welche nicht symptomatisch sind. Befinden sich diese im Bereich der Wirbelsäule sind sie therapieentscheidend. Das MRT wird auch als Verlaufskontrolle verwendet. Hierfür gibt es keine festgelegten Zeitabstände, zu Beginn wird allerdings eine Verlaufskontrolle nach 3-6 Monaten und zu späteren Erkrankungszeitpunkten ein Intervall von 6-12 Monaten empfohlen. [7, 8, 39]

Da zu Beginn der Symptomatik die Grunderkrankung oft noch unklar ist, erhalten viele Patienten zur Diagnosestellung ein CT oder eine Skelettszintigraphie. Aufgrund der Strahlenbelastung und der nur limitierten Aussagekraft sollten diese Verfahren heute nicht mehr bzw. nur sehr begrenzt eingesetzt werden. [7]

1.1.8 Diagnosestellung

Da es bislang keine festgelegten Diagnosekriterien oder beweisenden Laborwerte gibt, ist die chronisch nichtbakterielle Osteomyelitis eine Ausschlussdiagnose [23, 38]. Zum Ausschluss von Differenzialdiagnosen sind die MRT und Biopsien die wichtigsten diagnostischen Möglichkeiten. Aufgrund der unspezifischen Präsentation und der Seltenheit der Erkrankung erfolgt die Diagnosestellung oft sehr verzögert, im Durchschnitt bis zu 1-2 Jahre nach Beginn der Symptomatik [40, 41].

Um Komplikationen zu vermeiden, sollte das Ziel sein, die Erkrankung möglichst zügig zu diagnostizieren. Jansson et al. machten daher einen Vorschlag für mögliche Diagnosekriterien [4]. Siehe hierzu Tabelle 1.

Major Kriterien	Minor Kriterien
• Radiologisch bewiesene osteolytische/sklerotische Knochenläsionen • Multifokales Auftreten • Palmoplantare Pustulose • Psoriasis • Sterile Knochenbiopsie mit Inflammation, Fibrose/Sklerose	• Normales Blutbild • Milde erhöhte CRP/BSG • Beobachtungszeitraum > 6 Monate • Hyperostose • Assoziation mit anderen Autoimmunerkrankungen (außer PPP und Psoriasis) • Verwandte mit Autoimmun-/autoinflammatorischen Erkrankungen

Tabelle 1: **Diagnosekriterien nach Jansson et al. [4]**

Diagnosestellung mit zwei Major oder einem Major und drei Minor Kriterien.

Die PRO-KIND (Protokollen zur Klassifikation, Überwachung und Therapie in der Kinderrheumatologie) Arbeitsgruppe für chronisch nichtbakterielle Osteomyelitis der Gesellschaft für Kinder- und Jugendrheumatologie benutzte zur Erstellung ihrer Treat-to-Target-Therapieprotokolle folgende Diagnosestandards:

- „Schmerzen und/oder Funktionseinschränkung im Bereich des muskuloskelettalen Systems von mindestens 6 Wochen Dauer
- Erkrankungsalter (Symptombeginn) vor dem vollendeten 18. Lebensjahr
- Mindestens eine mit der klinischen Symptomatik assoziierte knöcherne Läsion in der TIRM/STIR- oder T2-Sequenz einer MRT-Untersuchung“ [42]

1.1.9 Differentialdiagnosen

Tabelle 2 zeigt die wichtigsten Differenzialdiagnosen der CNO.

Malignome	• Knochentumoren (Ewing Sarkom, Osteosarkom, Knochenmetastasen) • Leukämie • Lymphom
Infektionen	• Bakterielle Osteomyelitis • Septische Arthritis
Autoinflammatorische/ Autoimmun- Erkrankungen	• Defizienz des Interleukin 1-Rezeptor-Antagonisten (DIRA) • Majeed Syndrom

	• Pyogene Arthritis, Pyoderma gangrenosum und Akne (PAPA) • Psoriasis Arthritis
Metabolische Erkrankungen	• Hypophosphatasie • Skorbut
Andere	• Benigne Knochentumoren • Langerhans-Zell-Histiozytose

Tabelle 2: **Differenzialdiagnosen der CNO** [7, 43, 44]

1.1.10 Histologie

Eine Biopsie wird notwendig, wenn es darum geht, Differenzialdiagnosen auszuschließen. Eine Entscheidungshilfe liefert der Score nach Jansson et al., welcher in Tabelle 3 dargestellt ist. Mithilfe verschiedener Kriterien wird die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer CNO berechnet und somit die Entscheidung gefällt, ob eine Biopsie notwendig ist. Sinnvolle Kriterien für eine Biopsie sind: monofokaler Herd, unklare Dignität im MRT, hohes Fieber, hohe Entzündungswerte und Vorliegen von B-Symptomatik. [43]

Kriterien	Punkte
normales Blutbild	13
symmetrische Läsionen	10
Nachweis von Sklerose in der Bildgebung	10
kein Fieber	9
vertebrale, claviculäre oder sternale Läsionen	8
Radiologischer Nachweis von 2 oder mehr Läsionen	7
CRP $\geq$ 1 mg/dl	6
Gesamt	63

Tabelle 3: **Score nach Jansson et al.**

Für die genannten Kriterien werden Punkte vergeben und daraus der Gesamt-Score berechnet. Bei einem Score $\geq$ 39 ist die Diagnose der CNO sehr wahrscheinlich. Patienten mit 29-38 Punkten sollten engmaschig beobachtet werden und bei $\leq$ 28 Punkten wird eine Biopsie zur weiteren Abklärung empfohlen. [43]

Histologisch präsentiert sich die CNO unspezifisch mit gleichzeitigem Nachweis von akuter und chronischer Inflammation. Eine infektiöse Genese kann, neben einem fehlenden kulturellen Nachweis, auch unter Zuhilfenahme eubakterieller PCR-Untersuchungen ausgeschlossen werden. [4, 8, 38, 45]

1.1.11 Medikamentöse Therapie

Bislang gibt es - insbesondere in Ermangelung von Studien bei dieser seltenen Erkrankung - keine evidenzbasierte Therapie der CNO. Therapie der Wahl sind aktuell nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR), bevorzugt Naproxen. In 80% der Fälle kommt es hierdurch zu einem Ansprechen. Bei unzureichendem Ansprechen kann eine Kombinationstherapie mit Steroiden über maximal 4 Wochen in einer Dosis von 1-2 mg/kgKG erwogen werden. Bei der Therapie mit Steroiden sollte begleitend ein Protonenpumpeninhibitor eingenommen werden. [1, 42]

Kommt es hierdurch weiterhin zu keiner Besserung, sollte ein Therapieversuch mit Sulfasalazin oder Methotrexat erfolgen, immer in Kombination mit einem NSAR. Bei weiterhin unzureichendem Therapie-Ansprechen oder primär bei Wirbelkörperbefall wird eine Therapie mit Bisphosphonaten empfohlen. Bevorzugt kommt hier intravenöses Pamidronat zum Einsatz. Studien von Miettinen et al. und Roderick et al. zeigen ein sehr schnelles und effektives Ansprechen auf eine Therapie mit Pamidronat. Dies kann einerseits klinisch durch eine Schmerzreduktion und andererseits durch eine Abnahme der im MRT nachgewiesenen Läsionen gezeigt werden. [1, 42, 46, 47]

In einer 2019 erschienenen großen retrospektiven Studie von Bhat et al. zeigt sich dieser Effekt ebenso. Es wurden 40 Patienten mit 150 CNO-typischen Läsionen im MRT untersucht. Pamidronat wurde entweder primär bei Wirbelkörperbefall oder sekundär bei unzureichendem Ansprechen auf NSAR bei anderen Läsionen eingesetzt. Die meisten Patienten erhielten 4 Zyklen von intravenösem Pamidronat mit 1 mg/kg Körpergewicht pro Tag an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Bei unzureichendem Ansprechen wurden bei manchen Patienten weitere Zyklen ergänzt. Die Verträglichkeit des Medikaments war sehr gut, es traten nur vereinzelt grippeähnliche Symptome auf, welche mit Antipyrese vorgebeugt wurden. Die 150 Läsionen vor Therapiebeginn konnten nach Pamidronat auf 45 reduziert werden. Auch klinisch zeigte sich durch eine schnelle Schmerzreduktion ein gutes Therapieansprechen. [48]

Als weitere Therapieoptionen stehen TNF- α -Antagonisten oder IL-1-Inhibitoren zur Verfügung, ohne dass hierfür Zulassungen vorliegen. Studien zeigen ein sehr gutes Ansprechen auf eine Therapie mit Infliximab als TNF- α -Antagonist. Zhao et al. vergleichen

in einer Publikation 18 Patienten mit CNO, von welchen 9 eine Monotherapie mit NSAR und 9 eine aggressivere Therapie mit Methotrexat und Infliximab und teilweise ergänzend Pamidronat erhalten haben. Infliximab wurde mit einer Dosis von ca. 8 mg/kg Körpergewicht zu Beginn, nach 2 Wochen und danach alle 4-8 Wochen verwendet. Begleitend erhielten die Patienten Methotrexat. Es zeigte sich ein schnelles klinisches und bildgebendes Therapieansprechen im Gegensatz zu den Patienten, welche nur mit NSAR behandelt wurden. Insbesondere zeigte sich eine Reduktion der Knochenödeme und der nicht vertebrealen Läsionen. Aktuelle Konsensus Papiere empfehlen daher den frühen Einsatz von TNF- α -Antagonisten bei Nichtansprechen auf NSAR ggf. in Kombination mit Bisphosphonaten [42, 49, 50].

Auch der Einsatz von Anakinra als IL-1-Inhibitor scheint ein gutes Therapieansprechen zu haben, allerdings fehlen hierzu Daten aus größeren Kohorten [51].

1.2 Mikrobiom

Der menschliche Körper ist untrennbar mit den auf ihm lebenden Mikroorganismen verbunden. Die Anzahl der Zellen der Mikroorganismen übersteigt dabei die des menschlichen Körpers um ein 10-100faches. Die Zusammensetzung aller Mikroorganismen wird dabei als Mikrobiom bezeichnet. Das Mikrobiom unterscheidet sich in Abhängigkeit von der Körper-Lokalisation. So werden zum Beispiel für Haut, Darm oder Mundhöhle völlig andere Zusammensetzungen des Mikrobioms beschrieben. In dieser Arbeit wird allerdings nur das bakterielle Mikrobiom der Mundhöhle betrachtet. [52]

Die meisten der Mikroorganismen leben als Kommensale oder Symbionten mit dem Wirt. Beide, oder mindestens ein Mikroorganismus, ziehen aus der Beziehung Vorteile. Schaden wird keinem der Organismen zugefügt. Einige Mikroorganismen werden allerdings auch als pathogen beschrieben. [53]

Die genaue Entwicklung der Zusammensetzung des Mikrobioms von der Geburt an ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Das orale Mikrobiom nach der Geburt zeigt Übereinstimmungen mit dem der Plazenta der Mutter. Je nach Geburtsmodus unterscheidet sich das orale Mikrobiom. Nach der Geburt wird die weitere Entwicklung des Mikrobioms durch die Ernährung, Tabak- und Alkoholkonsum, Stress, hormonelle Veränderungen wie

Pubertät, orale Hygiene und andere Umweltfaktoren beeinflusst. Mit der Zeit weist das Mikrobiom eine immer höhere Diversität auf. [54, 55]

Eine hohe Diversität kennzeichnet ein gesundes Mikrobiom, da bei verschiedenen Erkrankungen, wie zum Beispiel M. Crohn oder Helicobacter Pylori Gastritis, eine Abnahme der Diversität beobachtet werden kann. [56, 57]

Studien konnten bisher nicht sicher beweisen, ob die Genetik einen Einfluss auf die Entwicklung des Mikrobioms hat. Einige Studien scheinen einen Einfluss der Genetik zu beweisen [58], andere hingegen widerlegen ihn [59].

1.2.1 16s rRNA

Zur besseren Klassifikation und Identifikation von Organismen wurde um 1980 erstmals von Carl Woese et al. die 16s rRNA verwendet. Während Organismen vorher alleine anhand ihrer Phänotypen unterschieden wurden, bot die 16s rRNA die Möglichkeit einer genaueren und objektiveren Klassifikation und Einteilung. rRNA ist in allen Organismen zu finden, zeigt über eine längere Zeit wenig Veränderungen innerhalb eines Organismus und lässt sich direkt sequenzieren, ohne das Bakterium anzüchten zu müssen. [60-62]

So konnten über die Verwendung von 16s rRNA die Organismen genauer und teilweise neu klassifiziert und im Verlauf der Jahre ein phylogenetischer Baum erstellt werden [63]. Auch heutzutage wird die 16s rRNA weiterhin zur Identifikation und Klassifizierung von Bakterien und anderen Organismen verwendet und es existieren große Datenbanken mit allen bisher identifizierten Sequenzen und den entsprechenden Bakterien [64, 65].

1.2.2 Alpha Diversität

Der Begriff Diversität wurde erstmals 1960 von Robert Whittaker beschrieben. Er definiert damit die Artenvielfalt. Die Alpha Diversität bezeichnet die sogenannte Punktdiversität, die Vielfalt an einem bestimmten Ort. Bezogen auf das Mikrobiom bezeichnet die Alpha Diversität die mikrobielle Artenvielfalt in einem Organismus. [66]

1.2.3 Beta Diversität

Als Beta Diversität beschreibt Whittaker die Artenvielfalt zwischen verschiedenen Lebensräumen [66]. Bei der Betrachtung des Mikrobioms ist damit die unterschiedliche mikrobielle Artenvielfalt zwischen Individuen gemeint.

1.2.4 Dysbiose

Als Dysbiose wird eine Veränderung des Mikrobioms bezeichnet, welche mit der Entstehung von Krankheiten assoziiert ist. So meint es einerseits die Vermehrung von pathogenen Bakterien und andererseits die Abwesenheit von protektiven Bakterien. Die Entstehung von Dysbiose und wie genau diese die Entstehung von (Autoimmun-/autoinflammatorischen) Erkrankungen begünstigt, ist bislang unklar. [67, 68]

1.3 Aktuelle Datenlage

Veränderungen des Mikrobioms werden aktuell für viele autoimmune Erkrankungen als mitauslösender Faktor diskutiert. Besonders bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder rheumatoider Arthritis gibt es bereits einige Studien, welche den Einfluss diskutieren. [69-71]

1.3.1. Chronisch nichtbakterielle Osteomyelitis

Für die chronisch nichtbakterielle Osteomyelitis gibt es aktuell eine Studie von Lukens et al., welche an Mäusen einen Einfluss des Mikrobioms auf die CNO nachzuweisen scheint. Pstpip2^{cmo} Mäuse, mit einer Mutation für die Entwicklung einer CNO, wurden mit unterschiedlichen Diäten gefüttert. Bei Mäusen mit einer fettarmen Ernährung kam es bevorzugt zu dem Ausbrechen der Erkrankung, wobei Mäuse mit fettreicher Ernährung ein vermindertes Auftreten der Erkrankung zeigten. Eine Analyse des intestinalen Mikrobioms konnte ebenfalls eine Veränderung zeigen. Bei Mäusen, welche eine fettarme Ernährung erhielten, wurde vermehrt Prevotella nachgewiesen, Lactobacillus konnte vermindert nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden bei Mäusen mit fettreicher Ernährung mehr Lactobacillus und weniger Prevotella nachgewiesen. Eine Transplantation des Stuhls

von fettreich ernährten Mäusen in junge fettarm ernährte Mäuse verhinderte das Auftreten von Osteomyelitis mit einer Reduktion von *Prevotella*. [27]

Ebenso konnten bei den fettarm ernährten Mäusen erhöhte IL-1 β Spiegel im Vergleich zu gesunden Mäusen nachgewiesen werden. Die IL-1 β Spiegel bei den fettreich ernährten Mäusen lagen etwa im gleichen Bereich wie bei Gesunden. Über Breitspektrum Antibiotika konnte bei den fettarm ernährten Mäusen *Prevotella* supprimiert werden. Bei diesen Mäusen konnte ebenfalls eine Reduktion der IL-1 β Spiegel nachgewiesen werden und somit ein vermindertes Auftreten der CNO. [27]

Diese Studie gibt erste Hinweise, dass eine Veränderung des Mikrobioms über IL-1 β den Verlauf der CNO beeinflussen könnte.

1.3.2. Juvenile idiopathische Arthritis

Als häufigste rheumatische Erkrankung im Kindesalter wird bei der juvenilen idiopathischen Arthritis (JIA) das Mikrobiom ebenfalls als möglicher Einflussfaktor diskutiert. Die JIA ist definiert als Arthritis, welche sich vor dem 16. Lebensjahr manifestiert, mehr als 6 Monate anhält und deren Ursache unklar ist. [72]

Eine Studie von Horton et al. zeigte einen Einfluss von Antibiotika-Gaben auf das Auftreten der JIA. In einer Fall-Kontroll-Studie wurden 152 Patienten mit JIA mit 1520 gematchten Kontrollen verglichen. Die Verschreibung von mehr als einem Antibiotikum war signifikant mit einem vermehrten Auftreten von JIA assoziiert. Antibiotika, welche 1 Jahr vor der Diagnosestellung verschrieben wurden, zeigten einen noch höheren Einfluss auf das Auftreten der JIA. Keinen Einfluss zeigten unbehandelte Infektionen. Die Studie diskutiert, dass eine Behandlung mit Antibiotika zu einer Veränderung des Mikrobioms führt und somit im Umkehrschluss eine Veränderung des Mikrobioms durch Antibiotika zu einem vermehrten Auftreten von JIA führt. [73]

Dijkhuizen et al. gehen einen Schritt weiter und untersuchten in einer multizentrischen Fall-Kontroll-Studie Stuhlproben von 78 italienischen und 21 niederländischen Patienten mit JIA zu verschiedenen Zeitpunkten. Diese Proben wurden mit gesunden gematchten Kontrollproben verglichen. Die Proben wurden mittels 16s rRNA Sequenzierung untersucht und es wurden alpha- und beta-Diversitäten berechnet. Es zeigte sich bei den italienischen

Patienten eine geringere Diversität des Mikrobioms im Vergleich zu den gesunden Proben, während das Mikrobiom der niederländischen Patienten eine höhere Diversität aufwies. Unabhängig, ob das Mikrobiom eine höhere oder geringere Diversität aufweist, ließ sich ein Unterschied zwischen Gesunden und Erkrankten feststellen, was die Hypothese unterstützt, dass das Mikrobiom mit der Entstehung von JIA in Verbindung steht. [74]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die aktuelle Studienlage ein Einfluss des Mikrobioms auf die Entstehung von rheumatologischen Erkrankungen im Kindesalter besteht. Wie genau und in welchem Umfang das Mikrobiom die Erkrankungen beeinflusst und welche Veränderungen krankheitsauslösend sind, bleibt weiterhin unklar.

1.4 Ethikvotum

Für die Patientenrekrutierung wurde ein positives Ethikvotum der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der HHU Düsseldorf eingeholt (Studennummer 5828R, Registrierungs-ID 2016122195).

1.5 Ziele der Arbeit

Da die Pathophysiologie der CNO bislang nicht abschließend geklärt ist, untersucht die folgende Arbeit das orale Mikrobiom als möglichen Einflussfaktor. Umweltfaktoren, wie das Mikrobiom, rückten in den letzten Jahren immer mehr in den Vordergrund der Untersuchungen des pathophysiologischen Verständnisses von Erkrankungen.

Hierzu wurden orale Abstriche von 20 pädiatrischen Patienten gewonnen und mittels 16s-rRNA-Sequenzierung untersucht. Ziel war es - als eine der ersten Studien zum Mikrobiom bei CNO bei Kindern und Jugendlichen - erste Ansatzpunkte zu benennen, die Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen des Mikrobioms sein können.

Folgende Fragen standen am Anfang der Arbeit:

1. Zeigt sich eine Veränderung des Mikrobioms von Erkrankten im Vergleich zu Gesunden?

Hypothese: Die Zusammensetzung des Mikrobioms von Erkrankten ist anders als bei einer gesunden Kontrollgruppe.

2. Kann bei einer Änderung der Krankheitsaktivität auch eine Veränderung des Mikrobioms beobachtet werden?

Eine Änderung der Krankheitsaktivität ist in der Studie definiert als eine Änderung der Symptomatik (Schmerzen, Schwellung, Fieber) des Patienten.

Hypothese: Eine Untersuchung des Mikrobioms bei unterschiedlichen Krankheitsaktivitäten zeigt eine Veränderung.

3. Zeigt sich bei Patienten unterschiedlichen Alters eine Veränderung des Mikrobioms?

Das humane Mikrobiom weist mit zunehmendem Alter eine höhere Diversität auf.

Hypothese: Die Untersuchung des Mikrobioms bei unterschiedlichen Altersklassen zeigt Unterschiede.

4. Wie wichtig ist die exakte Definition des Ortes für die Abstriche?

Für Gaumen, Zunge, Wange, Rachen usw. sind unterschiedliche mikrobielle Besiedelungen beschrieben.

Hypothese: In dieser Studie wurden zwei sehr benachbarte Orte auf der Zunge gewählt, was keine große Veränderung des Mikrobioms bewirken sollte.

5. Wird durch die Veränderung der Medikamenteneinnahme das Mikrobiom beeinflusst?

Durch den Einsatz krankheitsmodifizierender Medikamente wird die Krankheitsaktivität verändert.

Hypothese: Patienten mit unterschiedlicher Medikation müssten korrespondierend zu den Aussagen in Punkt 2 eine Veränderung im Mikrobiom zeigen.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenrekrutierung

Die Patientenrekrutierung erfolgte von Mai 2017 bis Februar 2018 im Rahmen von regelmäßig stattfindenden Kontrolluntersuchungen in der rheumatologischen Ambulanz der Uni-Kinderklinik Düsseldorf. Die Abstriche und Blutentnahmen fanden zu zwei Zeitpunkten, dem Zeitpunkt 0 und dem Zeitpunkt 1 statt. Zeitpunkt 0 war ein willkürlich gewählter Zeitpunkt, am ersten stattfindenden Kontrolltermin der Patienten nach Start der Patientenrekrutierung. Er steht in keinem Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf. Der Zeitpunkt 1 fand beim nächsten regulären Kontrolltermin statt, ungefähr 3-6 Monate nach Zeitpunkt 0.

Bei den Terminen wurden die Patienten und die Eltern über Sinn und Zweck der Untersuchung, sowie Risiken und Nebenwirkungen aufgeklärt (siehe Anlage 1-4). An Zeitpunkt 0 und 1 wurden Zungenabstriche der Patienten abgenommen. Ebenso wurden gesunde Erwachsene als Kontrollgruppe abgestrichen. Die Abstriche wurden mit der Rovers Organex Brush RT 10 Pieces (Art. Nummer 380800511) nach Ausspülen des Mundes mit klarem Wasser und mit mindestens 30 Minuten Abstand zur letzten Nahrungs-/Getränkeaufnahme an der Zungenmitte, sowie mit einer zweiten Bürste an der linken Seite der Zunge durchgeführt. Diese Bürsten wurden dann in Safe-Lock Tubes 1,5 ml Eppendorf Tubes (Order no. 0030 120.086) gegeben, welche mit 50 µl ThinPrep Cytolyt Solution gefüllt waren.

Bei den Terminen wurden aktuelle Beschwerden und Medikation erhoben und es erfolgten Blutabnahmen der Patienten, welche im Zentrallabor der Uniklinik Düsseldorf ausgewertet wurden. Bestimmte Parameter waren:

- Blutbild, Differenzialblutbild
- Calcium, Phosphat, AP
- SAA
- IL-6, CRP, BSG
- GOT, GPT, gamma-GT
- Creatinin, Harnstoff
- 25-Hydroxyvitamin-D

Im Rahmen einer Aktenarbeit wurden für jeden Patienten folgende Variablen erhoben:

- Geschlecht
- Alter bei Erkrankungsbeginn
- Symptome
 - Schmerzen
 - Bewegungseinschränkung
 - Verschlechterung des Allgemeinzustandes
 - Fieber
 - Schwellung
 - Überwärmung
- Zeit bis zum Erreichen der Remission
- assoziierte Erkrankungen
 - M. Crohn
 - Psoriasis
 - Arthritis
 - Akne
 - palmoplantare Pustulose
- Befallsmuster
 - vertebral
 - klavikulär
 - sternal
 - unifokal vs. multifokal
- Medikation
 - NSAR
 - Steroide

- Sulfasalazin
- Methotrexat
- Bisphosphonate
- TNF α -Blocker
- IL-1-Inhibitoren
- Befunde im initialen MRT
 - symmetrische Läsionen
 - Hyperostose
 - Sklerose
 - Fibrose
 - Knochenmarksödem
 - Weichteilödem
 - Osteolysen
- Befunde in den Verlaufs-MRTs
- auffällige Laborwerte zu Beginn und im Verlauf
- Histologie-Befunde

Durch diese Kriterien wurde außerdem für jeden Patienten der Score nach Jansson et al. [43] berechnet.

Die untersuchte Kohorte bestand letztendlich aus 20 Patienten und 36 gesunden Erwachsenen. Von den untersuchten Patienten waren 12 männlich und 8 weiblich, im Alter von 3-13 Jahren. Das mittlere Alter lag bei 10,3 Jahren. Die Kontrollgruppe bestand aus 20 Frauen und 16 Männern.

2.2 16s r RNA Sequenzierung

Mithilfe des QIAamp® DNA Microbiome Kit wurde die DNA nach Herstellerangaben extrahiert [75]. Die V4 Region der 16s rRNA wurde dann durch PCR vervielfältigt. Es wurden V4 spezifische Primer des Earth Microbiome Project [76] (Illumina 16S V4 Primer Constructs (515F–806R)) mit Überhang-Sequenzen verwendet. Diese Sequenzen waren kompatibel mit Nextera XT Index Primern. Es wurde dann eine limitierte Zyklus Amplifikation durchgeführt, um Nextera Vervielfältigungs-Indexe und Illumina Sequenzierungs-Adapter hinzuzufügen. Die Bibliotheken wurden dann normalisiert und gepoolt und anschließend auf einem MiSeq-System (Illumina) sequenziert.

2.3 Statistische Auswertung

Die Roh-Sequenzen wurden dann mit der Software „bcl2fastq“ demultiplexed. Hier werden den jeweiligen Sequenzen die entsprechenden Proben/Patienten zugeordnet. In der gesamten Analyse werden nur die Forward-Stränge verwendet. Das Ergebnis (zwei Dateien pro Probe) wurde dann in Qiita [77] hochgeladen und weiterverarbeitet.

Als erstes erfolgte mittels „split_libraries_FASTQ“ eine Qualitätskontrolle, d.h. Stränge mit zu schlechter Qualität werden entfernt. Die Sequenzen wurden dann auf die ersten 150 Basenpaare reduziert und mit „Deblur“ [78] in sub-OTUs gruppiert, sprich ähnliche Sequenzen werden in eine Gruppe eingeordnet. Jede Gruppe repräsentiert hierbei eine Bakterien-„Spezies“.

Diese Daten wurden wiederum mittels „Deblur“ für 16s rRNA gefiltert. Mittels „fragment-insertion“ [79] in Qiime2 [80] wurde aus den sOTU-Sequenzen ein phylogenetischer Baum erstellt, indem die V4 Sequenzen in die Greengenes 13.8 Phylogenie platziert wurden. Die taxonomische Einteilung der sub-OTUs erfolgte mithilfe des Naive Bayes „feature-classifier“ [81] in Qiime2. Hierfür wurde die Greengenes [82] Datenbank Version 13.8 verwendet. Sub-OTUs, welche nicht im phylogenetischen Baum gefunden werden konnten, welche keine Sequenzen aufwiesen und welche als Chloroplast oder Mitochondrium klassifiziert wurden, wurden gelöscht.

Eine Rarefaction-Analyse ergab eine ideale Rarefaction Tiefe von 30.000 Sequenzen pro Probe als bester Kompromiss zwischen erfasster Diversität und geringstem Verlust von Proben.

Letztendlich enthielt die Tabelle für weitere Analysen 143 Proben und 6807 sub-OTUs.

Mittels Qiime2 „diversity“ wurden alpha- und beta-Diversitäten berechnet. Für die alpha-Diversität wurden die Metriken „shannon“, „observed OTUs“ und „Faith’s PD“ verwendet, für die beta-Diversität die Metriken „Bray-Curtis“, „unweighted UniFrac“ und „weighted UniFrac“ [83]. Als non-parametrische Tests wurden für die alpha-Diversität der Mann-Whitney Test benutzt, für die beta-Diversität der Permanova mit 999 Permutationen.

Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert $< 0,05$ gewertet. Die Effektstärke wurde mittels einer Redundanzanalyse über die Funktion „rda“ der „vegan“ R Bibliothek in Qiime2 berechnet [84].

Mittels der Funktion „bugbase“ in Qiime2 wurden die Proben näher beschrieben [85]. Statt der oben erwähnten Deblur Tabelle, wurden hierzu OTUs gegen die feste Referenz Greengenes 13.8 mittels SortMeRNA [86] bestimmt. Als Beschreibungen finden sich hier unter anderem: Stress-Toleranz, anaerob, aerob, biofilmbildend, gram negativ, gram positiv, besitzt bewegliche Elemente und potentiell pathogen.

Die Funktion „picrust“ [79] kann ebenfalls eine nähere Klassifizierung der Proben vornehmen. Dafür werden verschiedene Datenbanken verwendet (KEGG, COG und Rfam [87]), welche die Proben nach unterschiedlichen Gruppierungen klassifizieren.

Die Datenbank KEGG [88] verwendet bei der Klassifikation 4 Stufen (0-3). Es wird zum Beispiel unterschieden zwischen Metabolismus, Organsysteme, Prozessierung von genetischer Information und so weiter. Stufe 0 beinhaltet 6909 verschiedene Variablen, Stufe 1 8 verschiedene. Stufe 2 41 verschiedene und Stufe 3 328 verschiedene Variablen.

COG [89] klassifiziert anhand von vorhandenen Proteinen und deren Funktion, wie zum Beispiel RNA Prozessierung, Aminosäuren und Lipid Stoffwechsel. Hierfür werden 3 Stufen gebildet (0-2). Stufe 0 vergleicht 4792 Variablen, Stufe 1 bildet 4 Gruppen und Stufe 2 25.

Mit der Datenbank „Blast“ [65] wurden taxonomische Bestimmungen der Bakterien anhand der erhobenen genomischen Sequenzen vorgenommen.

3 Results from a pilot study on the oral microbiome in children and adolescents with chronic nonbacterial osteomyelitis. Zeus M, Janssen S, Laws HJ, Fischer U, Borkhardt A, Oommen PT. Z Rheumatol. 2021 Jul 1.

Originalien

Z Rheumatol
<https://doi.org/10.1007/s00393-021-01035-x>
Accepted: 30 May 2021

© The Author(s) 2021

Redaktion
U. Müller-Ladner, Bad Nauheim
U. Lange, Bad Nauheim



Results from a pilot study on the oral microbiome in children and adolescents with chronic nonbacterial osteomyelitis

Mona Zeus¹ · Stefan Janssen² · Hans-Jürgen Laws¹ · Ute Fischer¹ ·
Arndt Borkhardt¹ · Prasad Thomas Oommen¹

¹ Department of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology, Division of Pediatric Rheumatology, University Children's Hospital, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

² Algorithmic Bioinformatics, Department of Biology and Chemistry, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany

Abstract

Objective: To analyze the composition of the oral microbiome in children and adolescents with chronic nonbacterial osteomyelitis (CNO) with respect to age distribution, gender differences, effects of medication, disease activity and the influence of body site.

Methods: The oral microbiome of 20 patients (12 male and 8 female; median age 10.3 years) and 36 controls were examined. Two different sites of the oral cavity were swabbed at two time points. Current medication and disease activity were evaluated and registered at these time points. Samples were subjected to amplicon sequencing of the V4 region of the 16S rRNA gene and Qiime2 was used to calculate alpha and beta diversity for multiple alternative metrics.

Results: On the basis of relative abundances of 975 different suboperational taxonomic units in high throughput next generation sequencing, a significant shift in the composition of the oral microbiome ($p < 0.02$) was observed among patients being treated with different medications. There was a significant difference in bacterial communities between the group aged 3–8 years old and the group aged 9–14 years old. Significant differences were also seen in bacterial colonization on different sites in the oral cavity, but not with respect to gender or disease activity.

Conclusion: We present first data of a pilot study of the oral microbiome in children and adolescents with CNO, a rare autoinflammatory bone disease. Differences of the oral microbiome of diseased children to normal adult controls revealed a possible role of the oral microbiome as modulatory target or biomarker in CNO.

Keywords

Microbiome · Children · CNO · Autoinflammation



Scan QR code & read article online

Background

Chronic nonbacterial osteomyelitis (CNO), also known as chronic recurrent multifocal osteomyelitis (CRMO), is a disease spectrum encompassing a state of monofocal or multifocal autoinflammatory bone lesions, primarily affecting children and adolescents with an age peak between 7 and 12 years [1]. A classical hallmark of the disease is pain due to inflammation of the

bone or bone marrow, including vertebrae, often affecting the clavicle and the metaphyses and epiphyses of the humerus, femur and tibia [2, 3]. To a certain extent, CNO can be associated with other inflammatory organ manifestations, such as inflammatory bowel disease, palmoplantar pustulosis, acne conglobata and psoriasis [4, 5].

The CNO is regarded as an autoinflammatory disorder in which the innate im-

Published online: 01 July 2021

Zeitschrift für Rheumatologie 1

Originalien

mune system is etiopathogenetically involved, leading to a sterile bone inflammation without the presence of autoantibodies or autoreactive T-cells [6].

In 2014, an interplay between microbial agents and bone erosions in an established CNO mouse model was discussed. In this mouse model, mice spontaneously develop osteomyelitis resembling CNO (*Pst-pip2^{cmo} mice*). A high-fat diet was administered to reduce intestinal *Prevotella* levels in these mice, which was then found to significantly reduce pro-IL-1-beta expression in distant neutrophils. For the first time, diet-associated changes of the microbiome were found to be responsible for regulation of inflammation in an animal model of CNO [7].

Taking these murine findings as a basis, in this study we examined the microbiomes of a cohort of 20 patients with different subtypes of CNO. The study provides initial research on the possible role of the oral microbiome in CNO patients with respect to gender, age, disease activity and the impact of medication.

Abkürzungen

ALT	Alanine aminotransferase
AST	Aspartate aminotransferase
CNO	Chronic non-bacterial osteomyelitis
COG	Clusters of orthologous groups
COX	Cyclooxygenase
CRMO	Chronic recurrent multifocal osteomyelitis
CRP	C-reactive protein
DMARD	Disease-modifying antirheumatic drug
DNA	Deoxyribonucleic acid
ESR	Erythrocyte sedimentation rate
FDR	False discovery rate
IL-6	Interleukin 6
JIA	Juvenile idiopathic arthritis
MRI	Magnetic resonance imaging
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NSAID	Nonsteroidal anti-inflammatory drug
OTU	Operational taxonomic unit
PICRUST	Phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states
PCR	Polymerase chain reaction
Qiime	Quantitative insights into microbial ecology
16S-rRNA	16 Svedberg ribosomal ribonucleic acid
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
VAS	Visual analogue scale

Methods

Patient cohort

Patients were recruited from the Pediatric Rheumatology Outpatient Department of the University Hospital Duesseldorf, Germany between May 2017 and February 2018. With the formal consent of guardians and patients, oral swabs were obtained from 20 patients with a pre-established diagnosis of CNO. For further patient characteristics see **Table 1**. In addition, a healthy adult control group consisting of 20 female and 16 male subjects was examined.

The swab was obtained in a standardized manner following at least 30 min without food/beverage consumption and after clearing the oral cavity with water. Swabs were obtained with *Rovers Organex Brush RT* (Rovers Medical Devices, Oss, The Netherlands) from the center of the tongue and subsequently with a second brush from the left side of the tongue.

The timing of the swab acquisition was random and independent of disease activity. A second swab was obtained from 13 patients 3–6 months later. See **Fig. 1** for the study design.

After obtaining the swab, brushes were deposited in Safe-Lock 1.5 ml Eppendorf tubes which were pre-filled with 500 μ l ThinPrep Cytolyt solution.

The following blood values were obtained in order to monitor disease activity and ongoing therapy: complete blood count, calcium, phosphate, alkaline phosphatase, ALT, AST, gamma-glutamyl transferase, creatinine, urea, C-reactive protein, ferritin, ESR, serum amyloid A, IL-6, and 25-hydroxyvitamin D.

Medical history, current complaints and medication, as well as a thorough clinical examination including joint count were performed and documented for each patient.

Patient charts were analyzed retrospectively, collecting the following variables for each patient: gender, age at disease onset, symptoms (pain, impaired range of motion, general health status, fever, local signs of inflammation), time to remission, associated comorbidities (Crohn's disease, psoriasis, arthritis, acne, palmoplantar pustulosis), disease pattern (vertebral,

clavicular, sternal type; unifocal or multifocal type), medication (NSAID, steroids, sulfasalazine, methotrexate, bisphosphonates, TNF-alpha blocking agents), MRI results (symmetric lesions, hyperostosis, sclerosis, fibrosis, bone marrow edema, osteolysis), and histological findings.

The study and patient information forms were approved by the local ethics committee of the Medical Faculty, Heinrich-Heine-University (study no. 5828R, registry-ID 2016122195).

16S ribosomal RNA (16S) sequencing and analysis

DNA extraction. Oral swab samples were collected from each patient at the two indicated time points and DNA was isolated using the QIAamp Blood Kit (Qiagen) following the pathogen detection protocol.

Targeted 16S V4 region sequencing.

Following the Earth Microbiome Project protocols [8], we targeted and amplified the V4 region of the 16S gene by PCR using barcoded primers. V4 paired-end sequencing was performed using a MiSeq (Illumina, La Jolla, CA, USA) according to manufacturer's protocols.

Sequencing data processing and quality control.

Raw V4 sequence reads were demultiplexed using Illumina's bcl2fastq 2.19.0.316 software. Primers were trimmed via cutadapt 1.18, uploaded to Qiita, a web-based microbiome comparison platform, and quality controlled using the defaults. Forward reads were trimmed to the first 150 nucleotides. The primary feature table was generated using Deblur 1.1.0. Taxonomy assignment was done via the Qiime2 [9] feature classifier plug-in version 2019.1 against Greengenes version 13.8 99% sequence identity OTUs from the 515F/806R region of the sequences. Bacterial features with assigned taxonomy containing the labels *c__Chloroplast* or *f__mitochondria* were considered to be of host or plant origin and removed from the feature table prior to rarefaction. Differential abundance analysis was performed via discrete FDR [10] as implemented in Calour, which represents an interactive, microbiome-centric analysis tool.

Table 1 Patient characteristics. The data show symptoms which ever occurred during patient's entire course of disease. Age, symptoms, MRI findings showing the localization of inflammation at disease onset and typical comorbidities exhibit a classical phenotype of children and adolescents in chronic nonbacterial osteomyelitis (numbers in front of brackets are absolute figures, numbers in italics show relative figures).

<i>Patients (n = 20)</i>	
Male sex	12 (0.60)
Median age (years)	10.3 (3–13)
3–8 years	5 (0.25)
9–14 years	15 (0.75)
Disease duration	3.05 years (0–8)
<i>Symptoms at disease onset</i>	
Pain	19 (0.95)
Swelling	9 (0.45)
Fever	8 (0.40)
Reduced range of motion	5 (0.25)
<i>MRI at disease onset</i>	
Symmetric lesions	8 (0.40)
Hyperostosis	3 (0.15)
Sclerosis/fibrosis	5 (0.25)
Osteoedema	11 (0.55)
Soft tissue edema	9 (0.45)
Osteolysis	3 (0.15)
<i>Comorbidities</i>	
Crohn's disease	1 (0.05)
Psoriasis	1 (0.05)
Arthritis	4 (0.20)
Acne	2 (0.10)
Palmoplantar pustulosis	2 (0.10)
<i>Patients (n = 20)</i>	
<i>Laboratory parameters at disease onset</i>	
Elevated CRP > 1 mg/dl	8 (0.40)
Median ESR	43 mm/h (0–140 mm/h)
<i>Medication</i>	
NSAID	20 (1.00)
Steroids	6 (0.30)
Sulfasalazine	3 (0.15)
Methotrexate	4 (0.20)
Bisphosphonates	3 (0.15)
TNF-alpha inhibitors	3 (0.15)
Biopsy	12 (0.60)
<i>Localization</i>	
Multifocal	17 (0.85)
<i>Localizations (n = 66)</i>	
Jaw	2 (0.03)
Clavicle	3 (0.05)
Sternum	2 (0.03)
Spine	16 (0.24)
Upper extremity	8 (0.12)
Lower extremity	35 (0.53)
<i>NSAIDS nonsteroidal anti-inflammatory drugs</i>	

Statistics

In order to compute phylogenetic diversity distances, unique V4 sequence fragments were inserted into the reference phylogenetic tree of Greengenes version 13.8 99% sequence identity OTUs [11]. The resulting tree was used to compute weighted and unweighted UniFrac beta distances and Faith's PD alpha diversity. Rarefaction curves for all samples were computed via Faith's PD and an optimal rarefaction depth of 30,000 reads per sample was chosen manually, resulting in 66 samples with suitable read counts, totalling 1638 bacterial features.

PIRCUst was used to predict the meta-transcriptome and BugBase to obtain high-level phenotypes from an OTU table. To generate this table, unrarefied trimmed V4 reads were subjected to closed reference picking via SortMeRNA against Greengenes version 13.8 97% sequence identity OTUs through Qiime2 in Qiita. Nonphylogenetic metrics on predicted feature tables were used for alpha (Shannon, observed OTUs) and beta diversity (Bray-Curtis) calculation.

Differences in community composition for groups of samples (i.e. beta diversity) were assessed via pairwise Permanova tests with 999 permutations as implemented using scikit-bio 0.5.5. Comparison of alpha diversity values and changes in beta diversity was done using Mann-Whitney tests as implemented in scipy 1.1.0.

An NCBI Blast was used to assign taxonomic labels for selected features. Significance was assessed via Mann-Whitney test.

Results

Baseline and disease characteristics

In this study 20 patients were evaluated (12 male, 8 female) with a median age of 10.3 years (3–13 years) and 13/20 patients were examined at 2 time points. Moreover, oral swabs of 36 healthy subjects (16 male and 20 female) were taken at time point 0.

At disease onset, 95% of all patients had pain as a leading symptom, swelling of the disease site was reported in 9 patients, reduced range of motion was present in 8 patients, while 5 patients had fever.

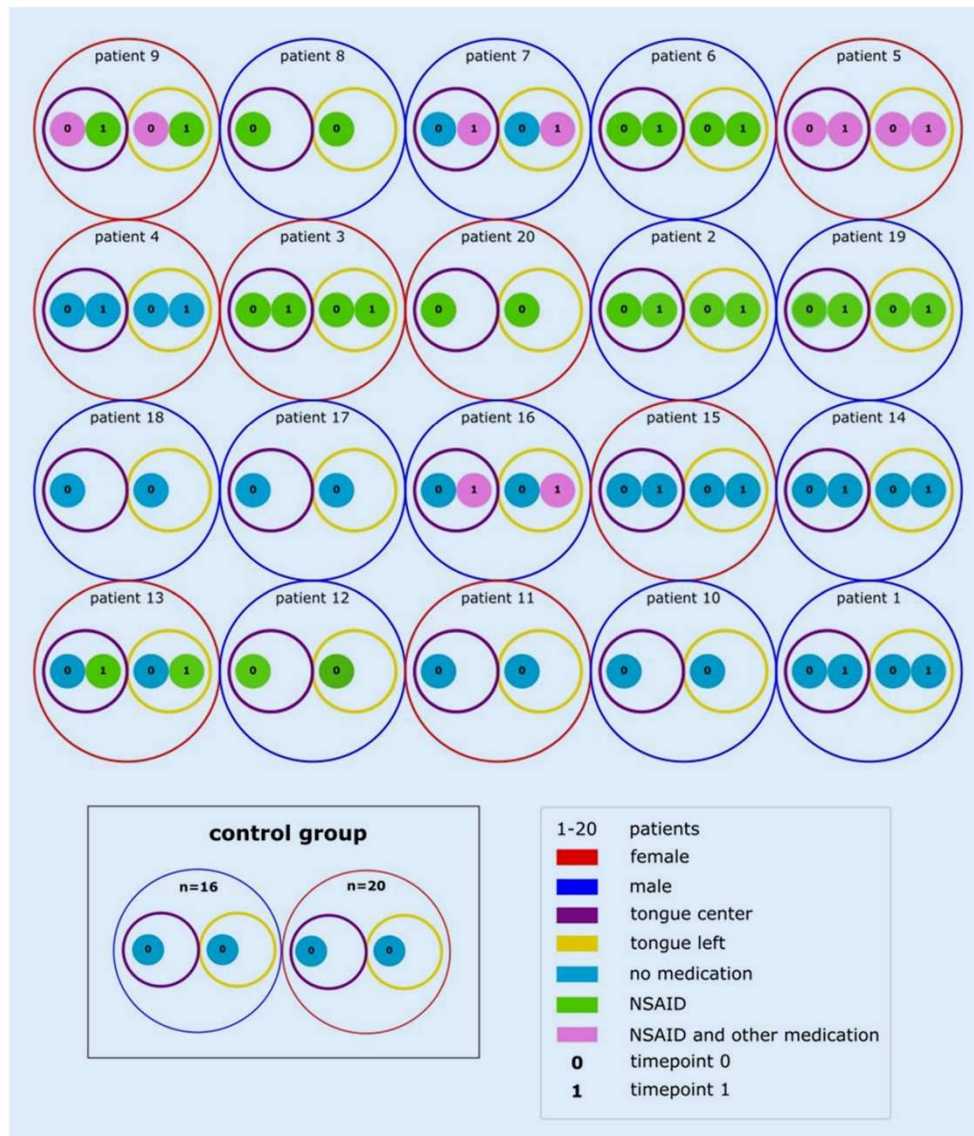


Fig. 1 ▲ Study design. Oral swabs of 20 patients were taken at time point 0 from the center and the left side of the tongue. Thereof, in 13 patients a second swab was taken from the center and the left side of the tongue at time point 1 (3–6 months after time point 0) and 7 patients did not have a second swab due to loss of follow-up. Furthermore, 36 healthy adults subjects (16 male and 20 female) formed a control group from which oral swabs of the center and the left side of the tongue were obtained at time point 0. At time point 0, 11 patients received no medication, 7 NSAIDs and 2 NSAIDs and other immunomodulatory therapies, such as bisphosphonates or methotrexate. At time point 1, 4 patients received no medication, 6 NSAIDs and 3 NSAIDs and other medication

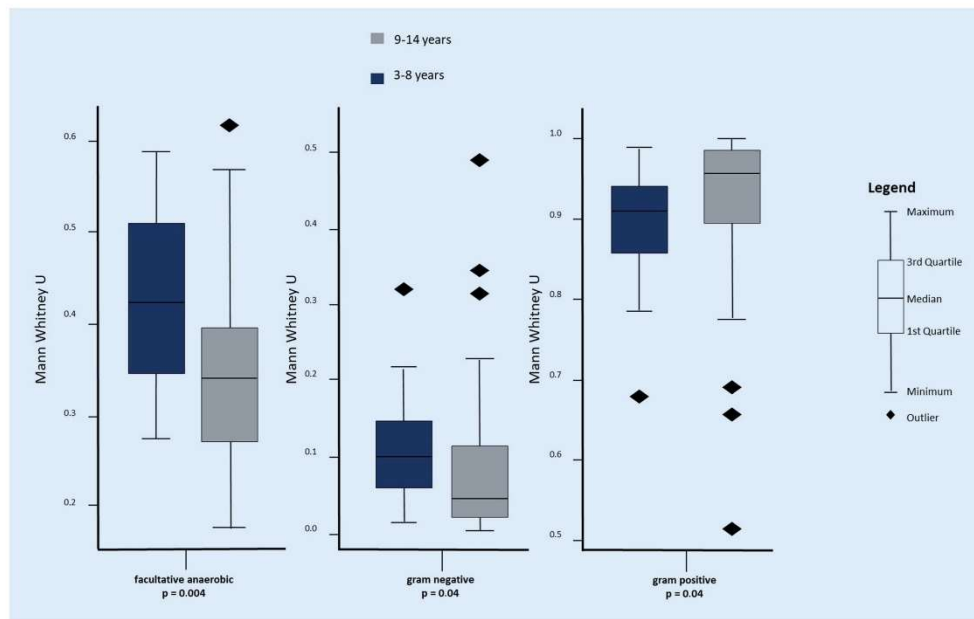


Fig. 2 ▲ Microbial phenotypic differences by patient age group. Patients aged 3–8 years showed significantly more facultative anaerobic and gram-negative bacteria and less gram-positive bacteria than patients aged 9–14 years, based on BugBase predictions from 16S read counts (two-sided Mann-Whitney test)

With respect to disease sites, 17 patients showed a multifocal lesion pattern, with the spine and lower extremities being the most common sites. Laboratory studies showed a normal blood count in 19 patients. In 8 patients, there was an elevation of C-reactive protein, while the median ESR was 43 mm/h.

The following medications were taken: all 20 patients received nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), steroids were used in 6 patients, 4 patients received methotrexate, 2 patients were treated with TNF inhibitors and 3 patients received bisphosphonates.

Microbiome studies

Time points 0 and 1

A time course-specific analysis was not conducted as the number of complete time series was too low. Instead, paired samples from the same individual were either stratified by time point or both time

points were combined for subsequent specific analyses.

Role of age and sex

Based on patient age, two subgroups were formed and analyzed: 3–8 years and 9–14 years (no patient was older than 14 years). The grouping was chosen in order to be able to differentiate between patients in the typical age of disease onset (9–14 years) and a rather unusual age group (3–8 years).

Analysis of beta diversity revealed a significant difference between the age groups (Bray-Curtis reaches $p:0.001$). Taxonomically, the group aged 3–8 years ($n=18$) showed more gram-negative and facultatively anaerobic bacteria ($p:0.004$), while more gram-positive bacteria were seen in the group aged 9–14 years ($n=48$). See

Fig. 2 for further information. There was no gender-specific change in microbiome, in either alpha or beta diversity ($p:0.16$).

Body site

Examination of the oral microbiome was performed as described above. On the basis of beta diversity, a significant difference in microbiota was seen between the left side of the tongue and the tongue center ($p:0.02$). Taxonomically, on the left side of the tongue more *Megasphaera micronuciformis*, *Haemophilus sputorum*, *paraphrohaemolyticus*, *para*, *Lachnoanaerobaculum orale*, *Corynebacterium terpenotabidum* and *C. argentatense* was found, while, in the center, a predominance of *Prevotella histicola*, *Fusobacterium periodonticum*, *Porphyromonas pasteri*, *Solobacterium moorei*, *Mogibacterium pumilum*, *neglectum*, *Actinomyces graevenitzi*, *A.naeslundii*, *A.oris* and *A.viscosus* were detected. See Table 2.

Disease activity

In order to examine the impact of disease activity on the microbiome, patients with and without clinical symptoms were

Originalien

Table 2 Identified bacteria at the different swab locations. Various species of bacteria were found applying NCBI Blast		
	Tongue left	Tongue center
Gram negative	Megasphaera micronuciformis	Prevotella histicola
	Haemophilus sputorum, paraphrohaemolyticus	Fusobacterium periodonticum Porphyromonas pasteri
Gram positive	Lachnoanaerobaculum orale	Solobacterium moorei
	Corynebacterium terpenotabidum, argentoratense	Mogibacterium pumilum, neglectum
		Actinomyces graevenitzii, naeslundii, oris, viscosus

compared. Due to the small number of patients with disease activity at the time of sampling, the detected difference in beta-diversity calculated on the basis of Bray-Curtis metric barely reached significance ($p:0.05$). Disease activity was measured by combining subjective pain described by patient/guardian with the visual analogue scale (VAS), physical examinations performed by physicians and laboratory values of inflammation (CRP and ESR).

Medication and change in microbiome

As patients' treatment regimens differed substantially, different treatment groups were formed: I. NSAID only; II. NSAID+ (encompassing all combination therapies, such as methotrexate, sulfasalazine, TNF-blocking agents and bisphosphonates); III. no therapy. At time point 0 group I consisted of 7 patients, 2 patients were listed in group II and 11 patients were included in group III. At time point 1 the groups were built as follows: 6 patients (group I), 3 patients (group II) and 4 patients (group III).

Comparisons of groups I and II and groups I and III revealed a clear and significant change of the oral microbiome in patients who were treated with either NSAID or NSAID+ as opposed to patients who were without treatment. Those who were unmedicated had more abundant aerobic and less abundant anaerobic bacteria, in contrast to patients who were treated with NSAIDs. This effect was clearly observed using different prediction methods (Bray-Curtis on PICRUST predicted Rfam and COG tables). See [Fig. 3](#).

Control group

As a control group, 36 healthy adult subjects (16 male and 20 female) were examined. A significant difference was seen between the patients' microbiomes and those of the control group. Regarding the left side of the tongue, the determined alpha diversity of the metric observed_otus revealed a p -value of 0.01, while the beta diversity of the metric unweighted_unifrac revealed a p -value of 0.002 (see [Figs. 4 and 5](#)). This pattern was also found in swabs taken from the center of the tongue.

Robustness tests—analyzing independence of variables

Correlating the metadata with different variables (localization, disease activity, time point, medication, age, etc) of the 66 samples showed that only medication, swab and time point slightly correlate (0.19), as do medication, swab and age group (0.1). Creating a linear mixed model and performing a forward-step redundancy analysis of the first 10 principle components of Bray-Curtis distances showed that medication, swab, age group and localization significantly correlate with microbial communities, while correlations with sex and disease activity did not reach significance; however, another model, considering only disease activity, identified significant microbial differences between samples from patients with and without disease activity at the first time point.

Discussion

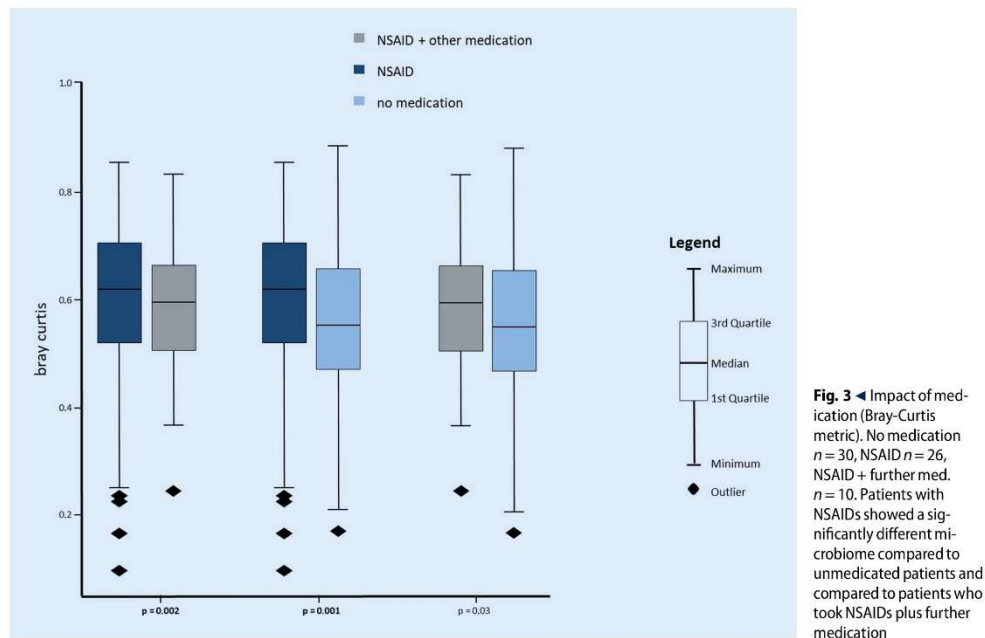
This research paper can be considered a pilot study, providing initial insights into the oral microbiome in CNO in children and adolescents. A significant and interesting

finding was a possible impact of anti-inflammatory and immunomodulatory medication on the composition of the oral microbiome.

We sampled the oral microbiome, while most other microbiome studies in children and adolescents with rheumatic diseases—mostly dealing with juvenile idiopathic arthritis (JIA)—have used stool samples. Despite confounding factors, such as intake of food and beverages or dental health, the oral cavity is (the first) part of the digestive system and therefore a representative source encompassing 50–100 billion bacteria and approximately 700 predominant taxa [12]. The composition of the oral microbiome may also be linked to nonoral diseases [13, 14]. Furthermore, easy access to material and a high return ratio are practical arguments for our choice, especially in the context of rheumatoid arthritis, a frequent subject for microbiome studies [15, 16]. In order to rule out methodological bias, accurate and separate handling of the material and separate wet-lab handling of swabs from different sites was performed, to enhance the quality of the data.

We found that there was a significant difference with respect to the distribution pattern of commensals in the oral cavity. This finding shows that the distribution pattern of microbiota in the oral cavity seems to follow a distinct pattern. This pattern has to be anticipated when conducting studies of the oral microbiome. As most microbiome studies only examine the intestinal microbiome, this study presents unique descriptive data from the oral cavity in CNO. The results of this pilot study emphasize that an accurate research design is required for studies of the oral microbiome, since even small deviations regarding the smear location can alter the data. The differences have been shown before [12, 17, 18] and follow-up studies will further investigate them.

With respect to patient age, there was a significant and interesting difference in microbiota between our subgroups of 3–8 and 9–14 years of age. Whether age-specific environmental factors, such as food intake or host immune system, serve as explanation for this finding is yet to be answered.



Finally, the most important finding was the significant difference in microbiota composition identified when comparing samples from patients who were treated with NSAIDs or NSAIDs plus (+) a disease-modifying antirheumatic drug (DMARD), such as methotrexate, sulfasalazine, prednisone or bisphosphonates. Thus, the use of medication revealed alterations that show that anti-inflammatory and immunomodulating strategies, such as COX-1 and COX-2 inhibition, or interference with purine metabolism and downregulation or blockade of proinflammatory cytokines may play a measurable role in the shift of the oral microbiome. Regression analyses would be necessary to further confirm this hypothesis; however, our pilot study only involves a relatively small sample size where these statistical methods are of no further benefit. So in order to further clarify the actual role of the microbiome in this context, larger studies with more patients and more homogeneous cohorts are needed.

No significant differences were seen between male and female patients; however,

this may also be attributed to the small sample size.

Altogether, this pilot study provides the first description of the oral microbiome of children and adolescents with CNO. This study adds to the hypothesis that alterations of the microbiome may play a role in CNO and that the oral microbiome may be used for a systematic analysis of microbial changes in autoinflammatory bone disease, helping to better understand the complex interplay of genetics, cytokine dysregulation and environmental factors in the etiopathogenesis of CNO.

As patients were examined independently of disease activity in our study, we examined two different time points in order to detect an individual change of the microbiome at different states of disease activity. The control group consisted of 36 healthy adults, and a significant difference in microbial composition between patients and controls was detected; however, in order to overcome age-dependent differences an age-matched group should be the goal for future trials in order to better verify these findings.

A shortcoming of our study was the small sample size and the heterogeneity with respect to disease pattern (unifocal vs. multifocal). Here, future trials with a greater sample size and a more homogeneous group are needed to further elucidate the actual impact of the microbiome and furthermore draw conclusions regarding different microbial phenotypes.

In the context of juvenile rheumatic diseases, studies dealing with the role of the microbiome in juvenile idiopathic arthritis, the most common rheumatic disease in children and adolescents, have shown interesting results [19, 20]. Recently, a prospective inception cohort of Dutch and Italian JIA patients has supported the hypothesis of gut dysbiosis in JIA. The group showed decreased richness in samples from patients with persistent disease activity compared to healthy controls. A relative increased or decreased abundance of certain species (e.g. *Erysipelotrichaceae*, *Allobaculum*, *Faecalibacterium prausnitzii*) was found in patients and controls [21].

Originalien

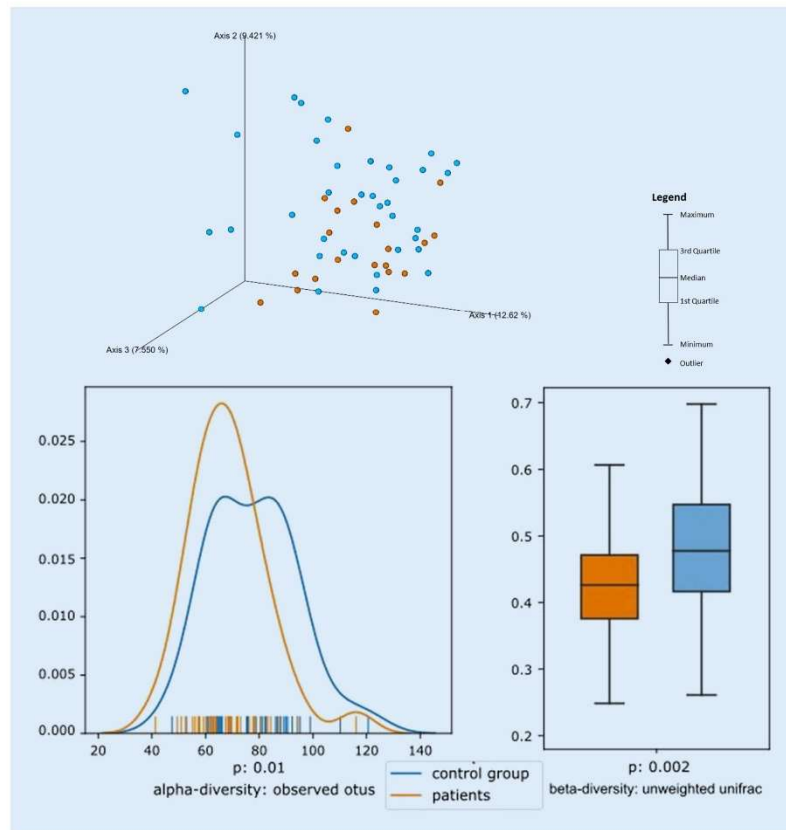


Fig. 4 CNO patients have a significantly different oral microbiome compared to healthy controls. Pairwise unweighted UniFrac distances (beta diversity) were computed for all samples from tongue left at the first time point. Distance metric was ordinated via principal coordinates analysis (PCoA) into 3D and visualized via EMPERor. Axes indicate percentage of explained variance. Orange spheres indicate patient samples, while blue spheres represent control group samples. At the left side of the tongue alpha diversity of the metric observed_OTUs revealed a *p*-value of 0.01 while beta diversity of the metric unweighted unifrac revealed a *p*-value of 0.002. Patients *n* = 20, control group *n* = 36

Dong et al. presented data on the change of the (intestinal) microbiome in another autoinflammatory disease, systemic juvenile idiopathic arthritis, demonstrating microbial differences between children in two different disease states (active, inactive) and healthy children [22].

Conclusion

This pilot study of the oral microbiome in children and adolescents with CNO generated data regarding the microbiome's potential influence on disease activity. Microbial changes between age groups and upon introduction of anti-inflammatory and immunomodulatory medication were seen.

Further studies in bigger, homogeneous collectives are needed to further elucidate the role of the microbiome in the etiopathogenesis of autoinflammatory disease, in order to ultimately tailor therapeutic strategies comprising dietary interventions that may help to achieve a lasting remission.

Corresponding address

Prasad Thomas Oommen
Department of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology, Division of Pediatric Rheumatology, University Children's Hospital, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University Düsseldorf
Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Germany
Prasad.Oommen@med.uni-duesseldorf.de

Acknowledgements. We would like to thank Dr. Marina Oldenburg and Daniel Scholtysik for their valuable support in conducting laboratory and bioinformatic analysis of the samples.

Author Contribution. All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by MZ, SJ, PTO and UF. The first draft of the manuscript was written by MZ and PTO and all authors commented on subsequent versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript. Principal Author: Mona Zeus

Funding. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

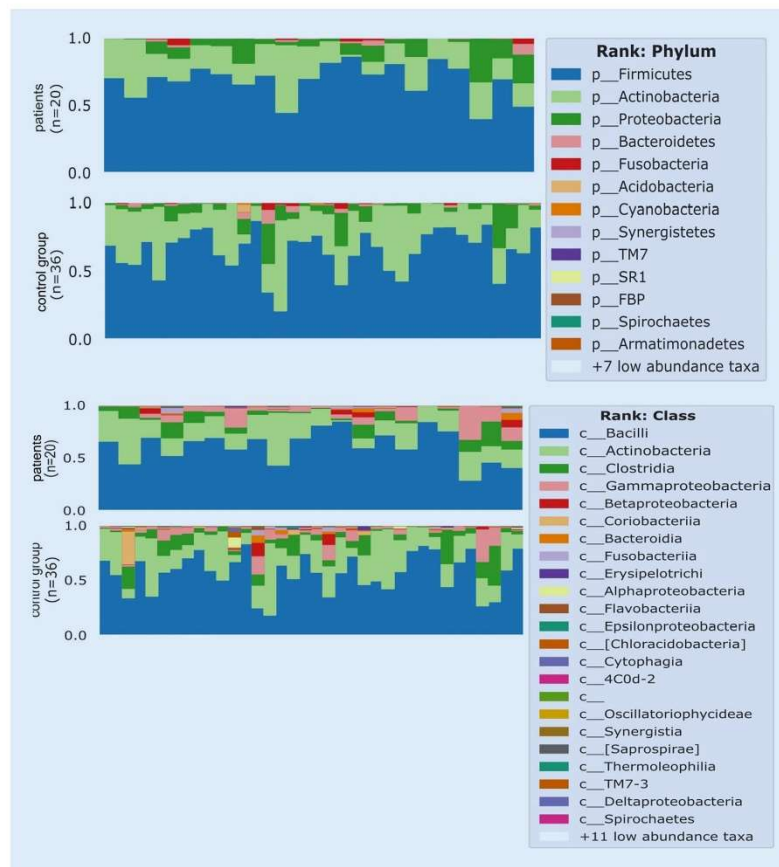


Fig. 5 ◀ Phylum and class abundance plots left side of the tongue, timepoint 0. Taxonomy plot for left tongue microbiome samples of first time point from patients ($n = 20$) and control group ($n = 36$). Taxonomy assignment was done via Qiime2's "feature-classifier" plugin version 2020.2 against Greengenes 13_8 99% OTUs from 515F/806R regions of the observed sequence reads

Declarations

Conflict of interest. M. Zeus, S. Janssen, H.-J. Laws, U. Fischer, A. Borkhardt and P.T. Oommen declare that they have no competing interests.

Ethical standards. This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. It was approved by the local ethics committee of the Medical Faculty, Heinrich-Heine-University (study no. 5828R, registry-ID 2016122195).

Open Access. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted

by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Jansson AF, Grote V (2011) Nonbacterial osteitis in children: data of a German Incidence Surveillance Study. *Acta Paediatr* 100:1150–1157. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2011.02205.x>
- Catalano-Pons C, Comte A, Wipff J, Quartier P, Faye A, Gendrel D, Duquesne A, Cimaz R, Job-Deslandre C (2008) Clinical outcome in children with chronic recurrent multifocal osteomyelitis. *Rheumatology (Oxford)* 47:1397–1399. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken249>
- Jansson A, Renner ED, Ramser J, Mayer A, Haban M, Meindl A, Grote V, Diebold J, Jansson V, Schneider K, Belohradsky BH (2007) Classification of non-bacterial osteitis: retrospective study of clinical, immunological and genetic aspects in 89 patients. *Rheumatology (Oxford)* 46:154–160. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken190>
- Beck C, Morbach H, Beer M, Stenzel M, Tappe D, Gattenlohner S, Hofmann U, Raab P, Girschick HJ (2010) Chronic nonbacterial osteomyelitis in childhood: prospective follow-up during the first year of anti-inflammatory treatment. *Arthritis Res Ther* 12:R74. <https://doi.org/10.1186/ar2992>
- Wipff J, Costantino F, Lemelle P, Pajot C, Duquesne A, Lorrot M, Faye A, Bader-Meunier B, Brochard K, Despert V, Jean S, Grall-Lerosey M, Marot Y, Nouar D, Pagnier A, Quartier P, Job-Deslandre C (2015) A large national cohort of French patients with chronic recurrent multifocal osteitis. *Arthritis Rheumatol* 67:1128–1137. <https://doi.org/10.1002/art.39013>
- Morbach H, Hedrich CM, Beer M, Girschick HJ (2013) Autoinflammatory bone disorders. *Clin Immunol* 147:185–196. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2012.12.012>
- Lukens JR, Gurung P, Vogel P, Johnson GR, Carter RA, McGoldrick DJ, Bandi SR, Calabrese CR, Vande Walle L, Lamkanfi M, Kanneganti TD (2014) Dietary modulation of the microbiome affects

Zusammenfassung

- autoinflammatory disease. *Nature* 516:246–249. <https://doi.org/10.1038/nature13788>
8. Gilbert JA, Jansson JK, Knight R (2014) The Earth Microbiome project: successes and aspirations. *BMC Biol* 12:69. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0069-1>
9. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC et al (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* 37:852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
10. Jiang L, Amir A, Morton JT, Heller R, Arias-Castro E, Knight R (2017) Discrete false-discovery rate improves identification of differentially abundant microbes. *mSystems*. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00092-17>
11. Janssen S, McDonald D, Gonzalez A, Navas-Molina JA, Jiang L, Xu ZZ, Winker K, Kado DM, Orwoll E, Manary M, Mirarab S, Knight R (2018) Phylogenetic placement of exact amplicon sequences improves associations with clinical information. *mSystems*. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00021-18>
12. Krishnan K, Chen T, Paster BJ (2017) A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Dis* 23:276–286. <https://doi.org/10.1111/odi.12509>
13. Ahn J, Chen CY, Hayes RB (2012) Oral microbiome and oral and gastrointestinal cancer risk. *Cancer Causes Control* 23:399–404. <https://doi.org/10.1007/s10552-011-9892-7>
14. Dockort MJ, Paster BJ, Abramowicz S, Ingram J, Wang YE, Correll M, Jiang H, Cotton SL, Kokoras AS, Bousvaros A (2012) Alterations in diversity of the oral microbiome in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 18:935–942. <https://doi.org/10.1002/ibd.21874>
15. Scher JU, Ubeda C, Equinda M, Khanin R, Buischi Y, Viale A, Lipuma L, Attur M, Pillinger MH, Weissmann G, Littman DR, Pamer EG, Bretz WA, Abramson SB (2012) Periodontal disease and the oral microbiota in new-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 64:3083–3094. <https://doi.org/10.1002/art.34539>
16. Zhang X, Zhang D, Jia H, Feng Q, Wang Det al (2015) The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nat Med* 21:895–905. <https://doi.org/10.1038/nm.3914>
17. Liljemark WF, Bloomquist CG, Uhl LA, Schaffer EM, Wolff LF, Pihlstrom BL, Bandt CL (1984) Distribution of oral Haemophilus species in dental plaque from a large adult population. *Infect Immun* 46:778–786
18. Delorme C, Abraham A-L, Renault P, Guédon E (2015) Genomics of Streptococcus salivarius, a major human commensal. *Infect Genet Evol* 33:381–392. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.001>
19. Hissink Muller P, Meij T, Westedt M, de Groot E, Allaart C, Brinkman D, Schonenberg D, Van den Berg JM, Van Suijlekom-Smit L, Rossum M, Budding A, Cate R (2017) Disturbance of microbial core species in new-onset juvenile idiopathic arthritis. *J Pediatr Infect Dis*. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1601340>
20. Tejesvi MV, Arvonen M, Kangas SM, Kesitalo PL, Pirttilä AM, Karttunen TJ, Vähäsalo P (2016) Faecal microbiome in new-onset juvenile idiopathic arthritis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 35:363–370. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2548-x>
21. van Dijkhuizen EHP, Del Chierico F, Malattia C, Russo A, Pires Marafon D, Ter Haar NM, Magni-Manzoni S, Vastert SJ, Dallapiccola B, Prakken B, Martini A, De Benedetti F, Putignani L (2019)

Ergebnisse einer Pilotstudie zum oralen Mikrobiom bei Kindern und Jugendlichen mit chronischer nichtbakterieller Osteomyelitis

Ziele: Untersuchung des oralen Mikrobioms von Kindern und Jugendlichen mit chronischer nicht bakterieller Osteomyelitis (CNO) in Hinblick auf Alter, Geschlecht, Einfluss von Medikamenten, Krankheitsaktivität und Abstrichort.

Methoden: Das orale Mikrobiom von 20 Patienten (12 männlich und 8 weiblich, mittleres Alter: 10,3 Jahre) und 36 Kontrollen wurde untersucht. Hierfür wurden Abstriche an zwei unterschiedlichen Stellen der Zunge zu zwei Zeitpunkten entnommen. Zudem wurden die aktuelle Medikation und die Krankheitsaktivität zu beiden Zeitpunkten erhoben. Mit den gewonnenen Proben wurde ein Next-Generation-Sequencing Hochdurchsatzverfahren des Amplikonsequenzierens der V4-Region der 16S rRNA durchgeführt. Für die Berechnung der alpha- und beta-Diversitäten mit verschiedenen Metriken wurde Qiime2 verwendet.

Ergebnisse: Relative Häufigkeiten konnten bei 975 „sub-operational taxonomic units“ nachgewiesen werden. Bei unterschiedlicher Medikamenteneinnahme der Patienten zeigte sich ein signifikanter Unterschied des Mikrobioms ($p < 0,02$). Zwischen den Patientengruppen 3–8 Jahre und 9–14 Jahre zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied der bakteriellen Zusammensetzung. An den unterschiedlichen Abstrichorten konnten signifikante Unterschiede nachgewiesen werden. Geschlecht und Krankheitsaktivität ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Mikrobiom-Zusammensetzung.

Schlussfolgerung: Diese Pilotstudie zeigt erste Daten zum oralen Mikrobiom bei Kindern und Jugendlichen mit CNO, einer seltenen autoinflammatorischen Knochenkrankung. Die Unterschiede, welche zwischen dem Mikrobiom erkrankter Kinder und dem der erwachsenen Kontrollgruppe gesehen wurden, weisen auf eine mögliche Rolle des oralen Mikrobioms als potenzieller Biomarker bei chronischer nicht-bakterieller Osteomyelitis hin.

Schlüsselwörter

Mikrobiom · Kinder · CNO · Autoinflammation

Microbiome analytics of the gut microbiota in patients with juvenile idiopathic arthritis: a longitudinal observational cohort study. *Arthritis Rheumatol* 71:1000–1010. <https://doi.org/10.1002/art.40827>

22. Dong YQ, Wang W, Li J, Ma MS, Zhong LQ, Wei QJ, Song HM (2019) Characterization of microbiota in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis with different disease severities. *World J Clin Cases* 7:2734–2745. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v7.i18.2734>

4 Diskussion

4.1 Methoden

Als erster Teil des Verdauungstraktes repräsentiert das orale Mikrobiom einen wichtigen Teil des Gesamt-Mikrobiom und wurde deswegen in der vorliegenden Studie gewählt. Es ist zudem diagnostisch leicht verfügbar und entsprechend gut zu gewinnen. Durch äußere Einflüsse, wie zum Beispiel Abstand zur Nahrungsaufnahme, Verwendung von Mundspüllösungen, Tragen einer Zahnsperre usw. ist das orale Mikrobiom leicht beeinflussbar. Bei der Auswertung der Proben ließ sich allerdings erfreulicherweise zeigen, dass die Daten sehr konsistent und homogen sind. Es ist somit gelungen, diese Einflussfaktoren gering zu halten.

In den meisten anderen Studien zum Einfluss des Mikrobioms wird allerdings das intestinale Mikrobiom untersucht. Somit ist der exakte Vergleich des Mikrobioms, im Sinne von nachgewiesenen Bakterienspezies, zu anderen Studien schwierig.

4.2 Stichprobengröße

Eine Limitation der Studie ist die Stichprobengröße. Mit einer Stichprobe von 20 Patienten ist es sehr schwer Signifikanzen zu erreichen und generelle Aussagen über die Erkrankung zu treffen. Allerdings ist die chronisch nichtbakterielle Osteomyelitis eine sehr seltene Erkrankung und in der rheumatologischen Ambulanz der Uni-Kinderklinik Düsseldorf wurden in den letzten 15 Jahren nur insgesamt 34 Patienten mit CNO behandelt. Einige der Patienten sind mittlerweile erwachsen oder umgezogen, sodass mit einer Stichprobe von 20 Patienten alle an der Klinik zu diesem Zeitpunkt verfügbaren Patienten eingeschlossen wurden.

4.3 Kontrollgruppe

In den durchgeführten Untersuchungen zeigte sich ein Unterschied des Mikrobioms der Erkrankten im Vergleich zur gesunden erwachsenen Kontrollgruppe. Ob dieser Unterschied durch die CNO verursacht wurde, ist nicht abschließend zu beantworten. Da sich im Vergleich der unterschiedlichen Altersgruppen der Patienten ebenfalls ein Unterschied

zeigte, könnte der gefundene Unterschied zur Kontrollgruppe genauso durch das Alter erklärbar sein. In Folgestudien sollte daher zur besseren Beurteilbarkeit dieser Problematik eine altersgleiche Kontrollgruppe gewählt werden.

Hier ist zu erwägen, ob man - wenn vorhanden - Geschwister als Kontrollgruppe wählt. In einer Studie von Corby et al. [58] wurde das orale Mikrobiom von 102 Zwillingen untersucht und eine Ähnlichkeit der Zusammensetzung festgestellt, sodass man dies auch bei Geschwistern erwarten könnte. Ebenso wären gesunde Kinder im gleichen Alter eine gute potentielle Kontrollgruppe.

4.4 Einfluss des Ortes

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Mikrobiom in der Mitte der Zunge und an der linken Seite der Zunge.

Dieses Ergebnis hilft nicht die Erkrankung besser zu verstehen, allerdings unterstützt es die Güte der Daten. Auch andere Studien können den Nachweis unterschiedlicher Bakterien an unterschiedlichen Orten im Mund erbringen. So kann zum Beispiel häufig am Zungenrücken *Streptococcus salivarius* isoliert werden [90, 91] und im Bereich der ersten Molaren, also in der Nähe der seitlichen Zungenpartie, *Hämophilus parainfluenza* [92].

Dadurch zeigt sich außerdem für Folgestudien, wie wichtig das strenge Einhalten eines definierten Ortes bei der Abstrich-Gewinnung ist. Schon 1-2 cm Abstand führen zu signifikant anderen Ergebnissen.

4.5 Einfluss des Geschlechtes

Die vorliegende Patientengruppe zeigt eine gegenteilige Geschlechterverteilung zu vorherigen größeren Studien. Jungen sind mit einem Verhältnis von 1,5:1 häufiger betroffen. In einer deutschlandweiten Studie von Jansson et al. waren Mädchen fast doppelt so häufig wie Jungen betroffen [11]. Daher wäre zu diskutieren, ob die vorliegende Studie überhaupt repräsentativ für andere Kohorten mit CNO ist. Allerdings zeigt sich in der Untersuchung der alpha- und beta-Diversitäten kein Unterschied zwischen Mädchen und Jungen, sodass davon auszugehen ist, dass bei einer anderen Geschlechterverteilung gleiche Daten erzeugt

werden. Auch andere orale Mikrobiomstudien zeigen keinen Unterschied des Mikrobioms bei unterschiedlichem Geschlecht [93, 94].

4.6 Einfluss des Alters

Um den Einfluss des Alters der Patienten zu untersuchen wurden zwei Altersgruppen von 3-8 und von 9-14 Jahren gebildet und miteinander verglichen. Diese Gruppen wurden gebildet, um mit der Gruppe der 9-14-jährigen die Patienten im typischen Erkrankungsalter mit denen im untypischen Erkrankungsalter von 3-8 Jahren zu vergleichen.

Ob der gezeigte Unterschied im Mikrobiom der Patienten durch die Erkrankung oder durch die Veränderung des Mikrobioms im Verlauf des Lebens zu erklären ist, bleibt fraglich.

Wie in Kapitel 1.3 beschrieben wird das Mikrobiom mit Zunahme des Alters durch die verschiedenen Einflüsse immer vielfältiger [54]. Auch eine Studie des oralen Mikrobioms im Zusammenhang mit Karies konnte einen Unterschied zwischen verschiedenen Altersgruppen darstellen. Hier wurden Patienten von 6-7 und 11-12 Jahren untersucht und es zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied in der Zusammensetzung des Mikrobioms. [93]

Zum besseren Verständnis der Daten in Bezug auf die CNO wäre eine altersgleiche Kontrollgruppe und eine größere Patientenkohorte sinnvoll, sodass einzelne Bakterienspezies identifiziert werden könnten, um so die genauen Unterschiede festzustellen.

4.7 Einfluss der Krankheitsaktivität

In den vorliegenden Daten konnte kein Einfluss der Krankheitsaktivität nachgewiesen werden. Aufgrund der kleinen Kohorte konnten die durchgeführten Tests allerdings nur niedrige Effektstärken erreichen. Hier sind weitere Untersuchung mit größeren Fallzahlen notwendig, um eine Aussage zum Einfluss der Krankheitsaktivität treffen zu können.

Dies kann einerseits durch eine größere Stichprobe erreicht werden, andererseits auch durch die Untersuchung mehrere Zeitpunkte und einheitlichere Definition dieser Zeitpunkte. Klare Definitionen wären zum Beispiel: bei Diagnosestellung, 3 Monate nach Therapiebeginn, bei

Erreichen von klinischer und bildgebender Remission, nach Absetzen der Therapie und bei Auftreten eines erneuten Schubs.

4.8 Einfluss der Medikamentengabe

Die vorliegenden Daten zeigen eine signifikante Veränderung des Mikrobioms durch die Medikamentengabe, vorwiegend NSAR. Aufgrund der kleinen Fallzahl konnte keine genaue taxonomische Bestimmung der ausschlaggebenden Bakterien erfolgen. Allerdings lassen sich bei den Patienten mit NSAR weniger aerobe und mehr fakultativ anaerobe Bakterien nachweisen, sodass dies einen ersten Hinweis auf mögliche Bakterienspecies geben kann.

Eine Studie von Rogers und Aronoff [95] untersucht den Einfluss von verschiedenen Medikamenten auf das intestinale Mikrobiom. Auch dort zeigt sich eine Veränderung des Mikrobioms durch die Einnahme von NSAR. Bei Patienten, welche NSAR einnahmen, ließen sich vermehrt Bakterien der Familie Acidaminococcaceae nachweisen [95]. Acidaminococcaceae sind gram-negative anaerobe Bakterien [96]. Dies deckt sich mit den vorliegenden Ergebnissen, auch hier lassen sich bei den Patienten mit NSAR mehr anaerobe Bakterien nachweisen.

Die Ergebnisse dieser Studie können keine Aussage über die kausalen Zusammenhänge machen. Ob die Veränderung des Mikrobioms durch die Medikamentengabe nur bei Patienten mit CNO vorliegt, ist durch die Daten nicht sicher zu klären. Allerdings ist es in Zusammenschau mit der Studie von Rogers und Aronoff [95] eher wahrscheinlich, dass eine Veränderung des Mikrobioms durch NSAR unabhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung nachzuweisen ist.

Eine unterschiedliche Medikamenteneinnahme bedeutet auch, dass die Erkrankung des Patienten sich in unterschiedlichen Erkrankungsstadien mit unterschiedlicher Krankheitsaktivität befindet. Somit kann indirekt über diese Ergebnisse auch ein möglicher Einfluss der Krankheitsaktivität vermutet werden.

4.9 Vergleich der Ergebnisse mit aktuellen Studien

In der durchgeführten Literaturrecherche konnte eine publizierte Studie zum Mikrobiom bei CNO gefunden werden [27]. Diese wird in Kapitel 1.3 genauer beschrieben. Für diese Studie

wurde das intestinale Mikrobiom von Mäusen mit einer Mutation für die Entwicklung einer CNO untersucht. Somit ist die Vergleichbarkeit einerseits durch die unterschiedlichen Probanden und andererseits durch das unterschiedliche Mikrobiom sehr schwierig. Bei Lukens et al. wurden die Mäuse mit unterschiedlichen Diäten ernährt und es wurde dadurch eine Veränderung des Mikrobioms nachgewiesen beziehungsweise ein Auftreten der CNO verhindert oder getriggert. In der vorliegenden Studie wurden die Patienten nicht durch Faktoren, wie Ernährung, gewollt beeinflusst. Die Ernährung der Patienten wurde nicht dokumentiert, so dass auch hier keine direkten Vergleiche stattfinden können. Beiden Studien gemeinsam ist, dass eine Veränderung und somit ein Einfluss des Mikrobioms nachgewiesen werden kann, bei Lukens et al. über eine Veränderung der Ernährung und bei der aktuellen Studie durch eine Veränderung der Medikamentengabe.

Die in Kapitel 1.3 vorgestellten Studien zum Mikrobiom bei JIA untersuchen, wie die vorliegende Studie, Patienten und keine Mäuse. Auch hier zeigen sich erste Hinweise, dass Patienten mit JIA ein verändertes intestinales Mikrobiom aufweisen beziehungsweise, dass eine Veränderung des Mikrobioms durch die Einnahme von Antibiotika zum Auftreten von JIA führt. [73, 74]

Diese Studien können bislang nicht abschließend den Einfluss des Mikrobioms auf autoimmune und autoinflammatorische Erkrankungen klären. Fest steht, dass ein Zusammenhang besteht. Welcher genau, muss durch Folgestudien genauer untersucht werden.

4.10 Schlussfolgerungen

Die zu Beginn der Arbeit aufgestellten Hypothesen können nun folgendermaßen beantwortet werden:

1. Hypothese: Die Zusammensetzung des Mikrobioms von Erkrankten ist anders als bei einer gesunden Kontrollgruppe.

Es zeigt sich ein Unterschied im Vergleich des Mikrobioms von Gesunden und Patienten mit chronisch nichtbakterieller Osteomyelitis im Kindes- und Jugendalter.

2. Hypothese: Eine Untersuchung des Mikrobioms bei unterschiedlichen Krankheitsaktivitäten zeigt eine Veränderung.

Eine Veränderung des Mikrobioms mit veränderter Krankheitsaktivität ist zu erwarten, konnte aber aufgrund der relativ geringen Stichprobe nicht sicher belegt werden.

3. Hypothese: Die Untersuchung des Mikrobioms bei unterschiedlichen Altersklassen zeigt Unterschiede.

Bei Patienten unterschiedlichen Alters kann eine Veränderung des Mikrobioms beobachtet werden.

4. Hypothese: In dieser Studie wurden zwei sehr benachbarte Orte auf der Zunge gewählt, dies dürfte keine große Veränderung des Mikrobioms bewirken.

Die exakte Definition der Abstrich-Orte ist essentiell für eine gute Auswertung der Daten.

5. Hypothese: Patienten mit unterschiedlicher Medikation müssten korrespondierend zu den Aussagen in Punkt 2 eine Veränderung im Mikrobiom zeigen.

Durch die Medikamenteneinnahme kann eine Veränderung des Mikrobioms beobachtet werden.

Als eine der ersten Studien zum oralen Mikrobiom bei chronisch nichtbakterieller Osteomyelitis zeigt sich, dass eine Veränderung des Mikrobioms durch die Medikamentengabe erfolgt. Es konnte weiterhin ein unterschiedliches Mikrobiom bei Erkrankten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die Daten lassen auch vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen Krankheitsaktivität und Mikrobiom besteht, hier sind noch weitere Untersuchungen notwendig. Somit kann die Frage, ob das Mikrobiom die CNO beeinflusst, nicht abschließend beantwortet werden.

Durch Studien mit größeren Kohorten, klaren definierten Zeitpunkten und ggf. einer Untersuchung des intestinalen Mikrobioms sollten diese Fragestellungen weiterhin geprüft werden, um die Entstehung der CNO besser zu verstehen.

Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Jansson, A.F., et al., *Diagnostics and therapy of non-bacterial osteitis*. Monatsschrift Kinderheilkunde, 2014. **162**(6): p. 539-545.
2. Giedion, A., et al., *[Subacute and chronic "symmetrical" osteomyelitis]*. Ann Radiol (Paris), 1972. **15**(3): p. 329-42.
3. Björkstén, B., et al., *Chronic recurrent multifocal osteomyelitis and pustulosis palmoplantaris*. J Pediatr, 1978. **93**(2): p. 227-31.
4. Jansson, A., et al., *Classification of non-bacterial osteitis: retrospective study of clinical, immunological and genetic aspects in 89 patients*. Rheumatology (Oxford), 2007. **46**(1): p. 154-60.
5. Buch, K., et al., *Chronic Non-bacterial Osteomyelitis: A Review*. Calcified Tissue International, 2019. **104**(5): p. 544-553.
6. Hedrich, C.M., et al., *Autoinflammatory bone disorders with special focus on chronic recurrent multifocal osteomyelitis (CRMO)*. Pediatr Rheumatol Online J, 2013. **11**(1): p. 47.
7. Zhao, Y. and P.J. Ferguson, *Chronic Nonbacterial Osteomyelitis and Chronic Recurrent Multifocal Osteomyelitis in Children*. Pediatric Clinics of North America, 2018. **65**(4): p. 783-800.
8. von der Hoh, N.H., et al., *[Chronic recurrent multifocal osteomyelitis of the spine : Children and adolescent]*. Orthopade, 2016. **45**(6): p. 484-90.
9. Rasmussen, A.Q., et al., *Non-infectious osteomyelitis of the mandible in a young woman: a case report*. Journal of medical case reports, 2014. **8**: p. 44-44.
10. Hofmann, S.R., et al., *The molecular pathophysiology of chronic non-bacterial osteomyelitis (CNO)-a systematic review*. Mol Cell Pediatr, 2017. **4**(1): p. 7.
11. Jansson, A.F., V. Grote, and f.t.E.S. Group, *Nonbacterial osteitis in children: data of a German Incidence Surveillance Study*. Acta Paediatrica, 2011. **100**(8): p. 1150-1157.
12. Wipff, J., et al., *A Large National Cohort of French Patients With Chronic Recurrent Multifocal Osteitis*. Arthritis & Rheumatology, 2015. **67**(4): p. 1128-1137.
13. Oommen, P.T. and T. Schwarz, *Nichtbakterielle Knochenentzündungen und assoziierte Erkrankungen*. Pädiatrische Praxis, 2016. **86**: p. 329-338.
14. Borzutzky, A., et al., *Pediatric Chronic Nonbacterial Osteomyelitis*. Pediatrics, 2012. **130**(5): p. e1190-e1197.
15. Ferguson, P.J. and M. Sandu, *Current understanding of the pathogenesis and management of chronic recurrent multifocal osteomyelitis*. Current rheumatology reports, 2012. **14**(2): p. 130-141.
16. Zimmermann, P. and N. Curtis, *The role of Cutibacterium acnes in auto-inflammatory bone disorders*. European Journal of Pediatrics, 2019. **178**(1): p. 89-95.
17. Girschick, H.J., et al., *Chronic recurrent multifocal osteomyelitis in children: diagnostic value of histopathology and microbial testing*. Hum Pathol, 1999. **30**(1): p. 59-65.
18. Hofmann, S.R., et al., *Attenuated TLR4/MAPK signaling in monocytes from patients with CRMO results in impaired IL-10 expression*. Clin Immunol, 2012. **145**(1): p. 69-76.

19. Hofmann, S., et al., *Chronic non-bacterial osteomyelitis is associated with impaired Sp1 signaling, reduced IL10 promoter phosphorylation, and reduced myeloid IL-10 expression*. Clinical immunology (Orlando, Fla.), 2011. **141**: p. 317-27.
20. Greenhill, C.J., et al., *Interleukin-10 regulates the inflammasome-driven augmentation of inflammatory arthritis and joint destruction*. Arthritis research & therapy, 2014. **16**(4): p. 419-419.
21. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.
22. Hofmann, S.R., et al., *Chronic Recurrent Multifocal Osteomyelitis (CRMO): Presentation, Pathogenesis, and Treatment*. Current Osteoporosis Reports, 2017. **15**(6): p. 542-554.
23. Hofmann, S.R., et al., *Chronic Recurrent Multifocal Osteomyelitis (CRMO): Presentation, Pathogenesis, and Treatment*. Curr Osteoporos Rep, 2017. **15**(6): p. 542-554.
24. Hofmann, S.R., et al., *Serum biomarkers for the diagnosis and monitoring of chronic recurrent multifocal osteomyelitis (CRMO)*. Rheumatol Int, 2016. **36**(6): p. 769-79.
25. Lukens, J.R., et al., *Critical role for inflammasome-independent IL-1 β production in osteomyelitis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. **111**(3): p. 1066-1071.
26. Ferguson, P.J., et al., *A missense mutation in pstpip2 is associated with the murine autoinflammatory disorder chronic multifocal osteomyelitis*. Bone, 2006. **38**(1): p. 41-47.
27. Lukens, J.R., et al., *Dietary modulation of the microbiome affects autoinflammatory disease*. Nature, 2014. **516**(7530): p. 246-9.
28. Majeed, H.A., et al., *Congenital dyserythropoietic anemia and chronic recurrent multifocal osteomyelitis in three related children and the association with Sweet syndrome in two siblings*. J Pediatr, 1989. **115**(5 Pt 1): p. 730-4.
29. Majeed, H.A., et al., *Congenital dyserythropoietic anemia and chronic recurrent multifocal osteomyelitis in three related children and the association with Sweet syndrome in two siblings*. The Journal of Pediatrics, 1989. **115**(5, Part 1): p. 730-734.
30. Ferguson, P.J. and H. El-Shanti, *Majeed Syndrome: A Review of the Clinical, Genetic and Immunologic Features*. Biomolecules, 2021. **11**(3).
31. Pinto-Fernández, C. and M.E. Seoane-Reula, *Efficacy of treatment with IL-1RA in Majeed syndrome*. Allergol Immunopathol (Madr), 2017. **45**(1): p. 99-101.
32. Herlin, T., et al., *Efficacy of anti-IL-1 treatment in Majeed syndrome*. Ann Rheum Dis, 2013. **72**(3): p. 410-3.
33. Aksentijevich, I., et al., *An Autoinflammatory Disease with Deficiency of the Interleukin-1-Receptor Antagonist*. New England Journal of Medicine, 2009. **360**(23): p. 2426-2437.
34. Reddy, S., et al., *An Autoinflammatory Disease Due to Homozygous Deletion of the IL1RN Locus*. New England Journal of Medicine, 2009. **360**(23): p. 2438-2444.
35. Aksentijevich, I., et al., *An autoinflammatory disease with deficiency of the interleukin-1-receptor antagonist*. N Engl J Med, 2009. **360**(23): p. 2426-37.
36. Mendonça, L.O., et al., *A case report of a novel compound heterozygous mutation in a Brazilian patient with deficiency of Interleukin-1 receptor antagonist (DIRA)*. Pediatr Rheumatol Online J, 2020. **18**(1): p. 67.

37. Grosse, J., et al., *Mutation of mouse Mayp/Pstpip2 causes a macrophage autoinflammatory disease*. Blood, 2006. **107**(8): p. 3350-3358.
38. Ferguson, P.J. and R.M. Laxer, *New discoveries in CRMO: IL-1beta, the neutrophil, and the microbiome implicated in disease pathogenesis in Pstpip2-deficient mice*. Semin Immunopathol, 2015. **37**(4): p. 407-12.
39. Zhao, Y., et al., *Physicians' Perspectives on the Diagnosis and Treatment of Chronic Nonbacterial Osteomyelitis*. International Journal of Rheumatology, 2017. **2017**: p. 7.
40. Oliver, M., et al., *Disease burden and social impact of pediatric chronic nonbacterial osteomyelitis from the patient and family perspective*. Pediatric Rheumatology, 2018. **16**(1): p. 78.
41. Girschick, H., et al., *The multifaceted presentation of chronic recurrent multifocal osteomyelitis: a series of 486 cases from the Eurofever international registry*. Rheumatology (Oxford), 2018. **57**(7): p. 1203-1211.
42. Schwarz, T., et al., *Protokolle zur Klassifikation, Überwachung und Therapie in der Kinderrheumatologie (PRO-KIND): Chronisch nicht-bakterielle Osteomyelitis (CNO)*. Arthritis und Rheuma, 2018. **38**(04): p. 282-288.
43. Jansson, A.F., et al., *Clinical score for nonbacterial osteitis in children and adults*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(4): p. 1152-9.
44. Zhao, D.Y., et al., *Chronic nonbacterial osteomyelitis (CNO) and chronic recurrent multifocal osteomyelitis (CRMO)*. J Transl Autoimmun, 2021. **4**: p. 100095.
45. Hedrich, C.M., et al., *New Insights into Adult and Paediatric Chronic Non-bacterial Osteomyelitis CNO*. Current Rheumatology Reports, 2020. **22**(9): p. 52.
46. Miettunen, P.M., et al., *Dramatic pain relief and resolution of bone inflammation following pamidronate in 9 pediatric patients with persistent chronic recurrent multifocal osteomyelitis (CRMO)*. Pediatric rheumatology online journal, 2009. **7**: p. 2-2.
47. Roderick, M., et al., *Efficacy of pamidronate therapy in children with chronic non-bacterial osteitis: disease activity assessment by whole body magnetic resonance imaging*. Rheumatology, 2014. **53**(11): p. 1973-1976.
48. Bhat, C.S., et al., *Efficacy of pamidronate in children with chronic non-bacterial osteitis using whole body MRI as a marker of disease activity*. Pediatric rheumatology online journal, 2019. **17**(1): p. 35-35.
49. Zhao, Y., et al., *Consensus Treatment Plans for Chronic Nonbacterial Osteomyelitis Refractory to Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs and/or With Active Spinal Lesions*. Arthritis care & research, 2018. **70**(8): p. 1228-1237.
50. Zhao, Y., et al., *Aggressive Therapy Reduces Disease Activity without Skeletal Damage Progression in Chronic Nonbacterial Osteomyelitis*. The Journal of Rheumatology, 2015. **42**(7): p. 1245.
51. Eleftheriou, D., et al., *Biologic therapy in refractory chronic non-bacterial osteomyelitis of childhood*. Rheumatology, 2010. **49**(8): p. 1505-1512.
52. Turnbaugh, P.J., et al., *The Human Microbiome Project*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 804-810.
53. Dethlefsen, L., M. McFall-Ngai, and D.A. Relman, *An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 811-8.

54. Gomez, A. and K.E. Nelson, *The Oral Microbiome of Children: Development, Disease, and Implications Beyond Oral Health*. Microb Ecol, 2017. **73**(2): p. 492-503.
55. Verma, D., P.K. Garg, and A.K. Dubey, *Insights into the human oral microbiome*. Archives of Microbiology, 2018. **200**(4): p. 525-540.
56. Cho, I. and M.J. Blaser, *The human microbiome: at the interface of health and disease*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(4): p. 260-70.
57. Manichanh, C., et al., *Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach*. Gut, 2006. **55**(2): p. 205-11.
58. Corby, P.M., et al., *Mutans streptococci in preschool twins*. Arch Oral Biol, 2005. **50**(3): p. 347-51.
59. Stahringer, S.S., et al., *Nurture trumps nature in a longitudinal survey of salivary bacterial communities in twins from early adolescence to early adulthood*. Genome Res, 2012. **22**(11): p. 2146-52.
60. Fox, G.E., et al., *Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1977. **74**(10): p. 4537-4541.
61. Woese, C.R. and G.E. Fox, *Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1977. **74**(11): p. 5088-5090.
62. Woese, C.R., *Bacterial evolution*. Microbiological reviews, 1987. **51**(2): p. 221-271.
63. Lane, D.J., et al., *Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1985. **82**(20): p. 6955-6959.
64. Woo, P.C.Y., et al., *Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories*. Clinical Microbiology and Infection, 2008. **14**(10): p. 908-934.
65. Altschul, S.F., et al., *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Research, 1997. **25**(17): p. 3389-3402.
66. Whittaker, R.H., *Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California*. Ecological Monographs, 1960. **30**(3): p. 279-338.
67. Kamada, N., et al., *Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease*. Nature Reviews Immunology, 2013. **13**(5): p. 321-335.
68. Verwoerd, A., et al., *The human microbiome and juvenile idiopathic arthritis*. Pediatric rheumatology online journal, 2016. **14**(1): p. 55-55.
69. Nikitakis, N.G., et al., *The autoimmunity-oral microbiome connection*. Oral Dis, 2017. **23**(7): p. 828-839.
70. Wells, P.M., et al., *RA and the microbiome: do host genetic factors provide the link?* J Autoimmun, 2019.
71. Lorenzo, D., et al., *Oral-Gut Microbiota and Arthritis: Is There an Evidence-Based Axis?* J Clin Med, 2019. **8**(10).
72. Petty, R.E., et al., *International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001*. The Journal of Rheumatology, 2004. **31**(2): p. 390-392.
73. Horton, D.B., et al., *Antibiotic Exposure and Juvenile Idiopathic Arthritis: A Case-Control Study*. Pediatrics, 2015. **136**(2): p. e333-e343.

74. van Dijkhuizen, E.H.P., et al., *Microbiome Analytics of the Gut Microbiota in Patients With Juvenile Idiopathic Arthritis: A Longitudinal Observational Cohort Study*. Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.), 2019. **71**(6): p. 1000-1010.
75. Qiagen, *QIAamp DNA Microbiome Handbook*. 2014.
76. Thompson, L.R., et al., *A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity*. Nature, 2017. **551**: p. 457.
77. Gonzalez, A., et al., *Qiita: rapid, web-enabled microbiome meta-analysis*. Nat Methods, 2018. **15**(10): p. 796-798.
78. Amir, A., et al., *Deblur Rapidly Resolves Single-Nucleotide Community Sequence Patterns*. mSystems, 2017. **2**(2).
79. Janssen, S., et al., *Phylogenetic Placement of Exact Amplicon Sequences Improves Associations with Clinical Information*. mSystems, 2018. **3**(3).
80. Bolyen, E., et al., *Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2*. Nature Biotechnology, 2019. **37**(8): p. 852-857.
81. Bokulich, N.A., et al., *Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin*. Microbiome, 2018. **6**(1).
82. McDonald, D., et al., *An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea*. ISME J, 2012. **6**(3): p. 610-8.
83. Lozupone, C. and R. Knight, *UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities*. Applied and Environmental Microbiology, 2005. **71**(12): p. 8228-8235.
84. Dixon, P., *VEGAN, a package of R functions for community ecology*. Journal of Vegetation Science, 2003. **14**: p. 927-930.
85. Ward, T., et al., *BugBase predicts organism-level microbiome phenotypes*. bioRxiv, 2017: p. 133462.
86. Kopylova, E., L. Noé, and H. Touzet, *SortMeRNA: Fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data*. Bioinformatics, 2012. **28**(24): p. 3211-3217.
87. Griffiths-Jones, S., et al., *Rfam: an RNA family database*. Nucleic acids research, 2003. **31**(1): p. 439-441.
88. Kanehisa, M. and S. Goto, *KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes*. Nucleic acids research, 2000. **28**(1): p. 27-30.
89. Tatusov, R.L., et al., *The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution*. Nucleic acids research, 2000. **28**(1): p. 33-36.
90. Delorme, C., et al., *Genomics of Streptococcus salivarius, a major human commensal*. Infection, Genetics and Evolution, 2015. **33**: p. 381-392.
91. Krishnan, K., T. Chen, and B.J. Paster, *A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease*. Oral diseases, 2017. **23**(3): p. 276-286.
92. Liljemark, W.F., et al., *Distribution of oral Haemophilus species in dental plaque from a large adult population*. Infection and immunity, 1984. **46**(3): p. 778-786.
93. Zhang, D., et al., *Tongue Microbiota Composition and Dental Caries Experience in Primary School Children*. mSphere, 2021. **6**(2).
94. Zhang, Y., et al., *Dynamic Alterations of Oral Microbiota Related to Halitosis in Preschool Children*. Front Cell Infect Microbiol, 2021. **11**: p. 599467.
95. Rogers, M.A.M. and D.M. Aronoff, *The influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the gut microbiome*. Clinical microbiology and infection : the official

- publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2016. **22**(2): p. 178.e1-178.e9.
96. D'Auria, G., et al., *Complete genome sequence of Acidaminococcus intestini RYC-MR95, a Gram-negative bacterium from the phylum Firmicutes*. Journal of bacteriology, 2011. **193**(24): p. 7008-7009.

Anhang

Anlage 1



Klinik für Kinder-Onkologie, - Hämatologie und Klinische Immunologie

Patientenaufklärung für Kinder von 6-12 Jahren

Untersuchung des Mikrobioms der Mundhöhle bei Patienten mit chronischer nichtbakterieller Osteomyelitis

Liebe/r Patient/in,

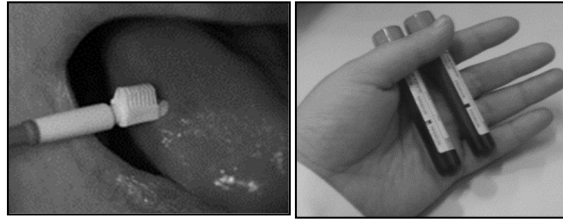
bei dir wurde eine chronische nichtbakterielle Osteomyelitis diagnostiziert. Das ist die Krankheit, durch die dir manchmal deine Knochen wehtun und wegen der du so häufig hier hinkommen musst. Leider wissen wir Ärzte und Studenten bisher noch nicht genug über die Krankheit und können dir deswegen gar nicht genau sagen, warum du diese Krankheit hast.

Ich bin Medizinstudentin und möchte nun gemeinsam mit deinen behandelnden Ärzten, im Rahmen einer Studie, versuchen mehr über die Erkrankung herauszufinden. Dazu würden wir gerne untersuchen, was für Bakterien in deinem Mund wohnen und, ob diese womöglich etwas mit der Krankheit zu tun haben. Durch deine Teilnahme an der Studie könntest du uns helfen mehr über die Krankheit zu erfahren und wir könnten dir vielleicht die Frage beantworten, warum ausgerechnet du diese Krankheit bekommen hast.

Wir benötigen dazu sogenannte Bürstenabstriche von deiner Wange und deiner Zunge. Die Abstriche machen wir mit einer kleinen Zahnbürste. Wir putzen einmal über deine Wange und deine Zunge. Das kann etwas kitzeln oder ganz selten auch mal bluten. Die Abstriche werden wir dann im Labor nach den Bakterien in deinem Mund untersuchen.

Bei deinem nächsten Termin hier bei uns, werden wir die Abstriche noch einmal wiederholen, um dadurch unterschiedliche Aktivitäten deiner Erkrankung zu erfassen.

Außerdem würden wir noch ein bisschen Blut untersuchen. Wir werden dich hierfür aber nicht extra stechen, sondern einfach nur ein paar weitere Röhrchen bei deiner ganz normalen Blutentnahme mit abnehmen. Für dich besteht dadurch kein Risiko, das Blut wird von deinem Körper ganz schnell nachproduziert.



Ob du an der Studie teilnehmen möchtest, kannst du mit deinen Eltern entscheiden. Niemand zwingt dich dazu und es hat auch keinen Einfluss auf deine weitere Betreuung hier in der Kinderklinik. Hast du dich für die Teilnahme entschieden und du merkst später, dass du das doch nicht willst, so kannst du uns jederzeit Bescheid sagen.

Auf keinen Fall werde ich deine Ergebnisse und Daten an andere Personen weitergeben. Daten sind zum Beispiel deine persönlichen Angaben, wie du mit Vor- und Nachnamen heißt, wann du Geburtstag hast oder welche Krankheit du hast. Diese Daten gehen nicht jeden etwas an, nur diejenigen, denen du das erlaubst oder denen du vertraust. Ich würde meine Ergebnisse später gerne in einer Zeitschrift für Ärzte veröffentlichen, aber dort werden nur pseudonymisierte Daten verwendet. Das bedeutet, dass man nicht mehr weiß zu welchem Kind welche Daten gehört haben. Es soll nur darum gehen, die neuen Erkenntnisse über die Erkrankung an andere Ärzte weiterzugeben.

Falls du und deine Eltern mit dieser Untersuchung einverstanden sind, möchten wir deine Eltern bitten, die beigefügte Einverständniserklärung zu unterschreiben. Wenn Du noch weitere Fragen hast, kannst du uns gerne jederzeit ansprechen.

Vielen Dank für Deine Hilfe!

Mona Zeus

Doktorandin der Kinderklinik Düsseldorf

Dr. Prasad T. Oommen

Oberarzt Kinderreumatologie

Anlage 2



Klinik für Kinder-Onkologie, - Hämatologie und Klinische Immunologie

Patientenaufklärung für Eltern

Untersuchung des Mikrobioms der Mundhöhle bei Patienten mit chronisch nichtbakterieller Osteomyelitis

Liebe Eltern,

bei Ihrem Kind wurde eine chronische nichtbakterielle Osteomyelitis diagnostiziert. Wie Sie wahrscheinlich wissen, ist zur Entstehung und Therapie dieser Erkrankung noch nicht genug bekannt. Im Rahmen einer Doktorarbeit an der Uni-Kinderklinik Düsseldorf möchten wir nun diese Erkrankung weiter klassifizieren und verstehen. Hierzu zählt unter anderem auch die Untersuchung des Mikrobioms, also der normalen Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften der Mundflora. Eine Studie an Mäusen hat bereits gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Erkrankung und einer bestimmten mikrobiellen Besiedlung des Mundes bestehen könnte. Diesen möglichen Zusammenhang möchten wir nun an unseren Patienten mit nichtbakterieller Osteomyelitis untersuchen.

Durch Ihr Einverständnis für die Teilnahme an der Studie und die damit verbundenen neuen Erkenntnisse über das Mikrobiom bei chronisch nichtbakterieller Osteomyelitis, könnten Sie uns helfen die Entstehung der Erkrankung besser zu verstehen und vielleicht auch einen Beitrag zur Verbesserung der Behandlung erzielen.

Für die Studie benötigen wir ca. 10 Milliliter Blut und Bürstenabstriche des Mundes. Es ist für diese Studie keine gesonderte Blutabnahme nötig, sondern es werden im Rahmen der Routinekontrolle zusätzliche Blut-Röhrchen mit abgenommen.

In der zusätzlichen Entnahme weniger Milliliter Blut besteht kein gesundheitliches Risiko, sie wird vom Körper nicht bemerkt und rasch wieder ausgeglichen.

Die Bürstenabstriche machen wir mit einer weichen Bürste an der Wangenschleimhaut und der Zunge. Das kann etwas kitzeln. Bei Menschen mit sehr geringen Thrombozytenzahlen kann es zu leichten, aber unbedenklichen, lokalen Blutungen kommen.

Die Abstriche würden wir gerne zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten vornehmen, um unterschiedliche Krankheitsaktivitäten erfassen zu können. Beim nächsten Vorstellungstermin hier steht daher ein erneuter Abstrich an.

Über die Abstriche wird das Mikrobiom untersucht. Hierzu wird im Labor nach Bakterien-DNA gesucht, sodass man dadurch eine genaue Klassifikation der mikrobiellen Zusammensetzung im Mund vornehmen kann.

Zusätzlich werden wir zur genaueren Charakterisierung eine Datenanalyse, der in der Vergangenheit erhobenen Befunde, durchführen. Hierzu werden wir zum Beispiel Erkrankungsalter, Symptome, Medikamenteneinnahme, MRT- und Laborbefunde usw. erheben und auswerten.

Als Vergleichsgruppe würden wir die Bürstenabstriche gerne auch bei Ihnen durchführen. Wir gehen davon aus, dass sich das Mikrobiom innerhalb einer Familie ähnelt und hoffen so, die bei Ihrem Kind auslösenden Faktoren besser identifizieren zu können.

Die Teilnahme an der Studie ist selbstverständlich vollkommen freiwillig und hat keinen Einfluss auf die zukünftige Betreuung an unserer Klinik. Sollten Sie sich für eine Teilnahme an der Studie entschieden haben und möchten dies später zurücknehmen, so kann auch das ohne Nachteil erfolgen. Die Proben werden dann entsorgt, bzw. schon erhobene Ergebnisse gelöscht.

Um den Datenschutz zu wahren, werden die erhobenen Daten streng vertraulich behandelt. Es werden keine Personendaten an Dritte außerhalb der Universitätsklinik Düsseldorf weitergegeben. Lediglich pseudonymisierte Daten und Probenmaterial werden an akademische Kooperationspartner oder für Analysezwecke an spezialisierte Labore weitergeleitet. Die Ergebnisse der Studie sollen in Fachzeitschriften publiziert werden.

Falls Sie mit dieser Untersuchung einverstanden sind, möchten wir Sie bitten, die beigegefügte Einwilligungserklärung zu unterschreiben. Für alle weiteren Fragen stehen wir Ihnen selbstverständlich jederzeit zur Verfügung.

Vielen Dank für Ihre Hilfe!

Mona Zeus

Doktorandin der Kinderklinik Düsseldorf

Dr. Prasad T. Oommen

Oberarzt Kinderrheumatologie

Anlage 3

Klinik für Kinder-Onkologie, - Hämatologie und Klinische Immunologie

Patientenaufklärung für Kinder/Jugendliche von 12-17 Jahre

Untersuchung des Mikrobioms der Mundhöhle bei Patienten mit chronischer nichtbakterieller Osteomyelitis

Liebe/r Patient/in,

bei Dir wurde eine chronische nichtbakterielle Osteomyelitis diagnostiziert. Wie Du wahrscheinlich weißt, ist zur Entstehung und Therapie dieser Erkrankung noch nicht genug bekannt. Im Rahmen einer Doktorarbeit an der Uni-Kinderklinik Düsseldorf möchten wir nun diese Erkrankung weiter klassifizieren und verstehen. Hierzu zählt unter anderem auch die Untersuchung des Mikrobioms, also der normalen Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften der Mundflora. Eine Studie an Mäusen hat bereits gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Erkrankung und einer bestimmten mikrobiellen Besiedlung des Mundes bestehen könnte. Diesen möglichen Zusammenhang möchten wir nun an unseren Patienten mit nichtbakterieller Osteomyelitis untersuchen.

Durch Dein Einverständnis für die Teilnahme an der Studie und die damit verbundenen neuen Erkenntnisse über das Mikrobiom bei chronischer nichtbakterieller Osteomyelitis, könntest Du uns helfen die Entstehung der Erkrankung besser zu verstehen und vielleicht auch einen Beitrag zur Verbesserung der Behandlung erzielen.

Für die Studie benötigen wir ca. 10 Milliliter Blut und Bürstenabstriche des Mundes. Es ist für diese Studie keine gesonderte Blutabnahme nötig, sondern es werden im Rahmen der Routinekontrolle zusätzliche Blut-Röhrchen mit abgenommen.

In der zusätzlichen Entnahme weniger Milliliter Blut besteht kein gesundheitliches Risiko, sie wird vom Körper nicht bemerkt und rasch wieder ausgeglichen.

Die Bürstenabstriche machen wir mit einer weichen Bürste an der Wangenschleimhaut und der Zunge ab. Das kann etwas kitzeln. Bei Menschen mit sehr geringen Thrombozytenzahlen kann es zu leichten, aber unbedenklichen, lokalen Blutungen kommen. Die Abstriche würden wir gerne zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten vornehmen, um unterschiedliche Krankheitsaktivitäten erfassen zu können. Beim nächsten Vorstellungstermin hier steht daher ein erneuter Abstrich an.

Über die Abstriche wird das Mikrobiom untersucht. Hierzu wird im Labor nach Bakterien-DNA gesucht, sodass man dadurch eine genaue Klassifikation der mikrobiellen Zusammensetzung im Mund vornehmen kann.

Zusätzlich werden wir zur genaueren Charakterisierung eine Datenanalyse, der in der Vergangenheit erhobenen Befunde, durchführen. Hierzu werden wir zum Beispiel Erkrankungsalter, Symptome, Medikamenteneinnahme, MRT- und Laborbefunde usw. erheben und auswerten.

Deine Teilnahme an der Studie ist selbstverständlich vollkommen freiwillig und hat keinen Einfluss auf die zukünftige Betreuung an unserer Klinik. Solltest Du sich für eine Teilnahme an der Studie entschieden haben und möchtest dies später zurücknehmen, so kann auch das ohne Nachteil erfolgen. Die Proben werden dann entsorgt, bzw. schon erhobene Ergebnisse gelöscht.

Um den Datenschutz zu wahren werden die erhobenen Daten streng vertraulich behandelt. Es werden keine Personendaten an Dritte außerhalb der Universitätsklinik Düsseldorf weitergegeben. Lediglich pseudonymisierte Daten und Probenmaterial werden an akademische Kooperationspartner oder für Analysezwecke an spezialisierte Labore weitergeleitet. Die Ergebnisse der Studie sollen in Fachzeitschriften publiziert werden.

Falls Du mit dieser Untersuchung einverstanden bist, möchten wir Dich und deine Eltern bitten, die beigefügte Einverständniserklärung zu unterschreiben. Für alle weiteren Fragen stehen wir Dir gerne selbstverständlich jederzeit zur Verfügung.

Vielen Dank für Deine Hilfe!

Mona Zeus

Doktorandin der Kinderklinik Düsseldorf

Dr. Prasad T. Oommen

Oberarzt Kinderreumatologie

Anlage 4

Einwilligungserklärung

“Untersuchung des Mikrobioms der Mundhöhle bei Patienten mit chronischer nichtbakterieller Osteomyelitis“

Ich erkläre hiermit, dass ich auf für mich verständliche Weise, mündlich und schriftlich über die Art, das Ziel, die Risiken und Belastungen der Untersuchung aufgeklärt worden bin. Meine Fragen sind zur Zufriedenheit beantwortet worden. Die zu dieser Erklärung gehörende schriftliche Information wurde mir ausgehändigt. Ich willige vollkommen freiwillig ein, an dieser Untersuchung teilzunehmen. Ich behalte mir dabei das Recht vor, dass ich diese Zustimmung ohne Angaben von Gründen zurückziehen kann.

Einwilligungserklärung zum Datenschutz

1) Ich willige ein, dass im Rahmen dieser Studie erhobene Daten, insbesondere medizinische Befunde von mir, in Papierform oder auf elektronischen Datenträgern in der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf aufgezeichnet und gespeichert werden. Für die wissenschaftliche Auswertung dürfen diese Daten pseudonymisiert verwendet werden.

2) Ich weiß, dass ich jederzeit und ohne Angabe von Gründen die Einwilligung in die Aufzeichnung, Speicherung und Verwendung der Daten widerrufen kann. In diesem Falle werden meine Daten unverzüglich gelöscht und die Proben vernichtet.

3) Ich willige ein, dass meine Daten nach Beendigung oder Abbruch der Studie noch 10 Jahre aufbewahrt werden. Danach werden diese personenbezogenen Daten gelöscht, soweit dem nicht gesetzliche, satzungsmäßige oder vertragliche Aufbewahrungsfristen entgegenstehen.

Name Patient:

.....(Datum).....(Unterschrift Patient)

.....(Datum).....(Unterschrift Erziehungsberechtigter)

Ich habe mündliche und schriftliche Erklärungen zu dieser Untersuchung vorgenommen. Ich erkläre mich bereit, noch aufkommende Fragen über diese Untersuchung nach meinem Vermögen zu beantworten.

Name Doktorandin/Arzt:

.....(Datum)(Unterschrift Doktorandin/Arzt)

Kontaktadresse für Widerruf: Dr. P. T. Oommen, Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Tel. 0211 811829