

**Aus der Klinik für Pädiatrie m. S. Pneumologie / Immunologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin**

**DISSERTATION**

**Sequentielle Genotypisierung von *Pseudomonas aeruginosa*-Isolaten und Übereinstimmung von bakteriologischen Proben aus dem oberen und unteren Respirationstrakt von Patienten mit Cystischer Fibrose**

**Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin**

**von  
Andreas Jung  
aus München**

**Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul**

**Gutachter:**

- 1. Prof. Dr. med. Karl P. Paul**
- 2. Prof. Dr. med. Antje Schuster**
- 3. Prof. Dr. med. Gesine Hansen**

**Datum der Promotion: 21. Oktober 2005**

Gewidmet meinen Eltern, in Dankbarkeit und Anerkennung.

## Abstract

Die Frage nach adäquaten mikrobiologischen und molekulargenetischen Methoden, um die Kolonisation des Respirationstrakts von Mukoviszidose-Patienten mit *Pseudomonas aeruginosa* nachzuweisen und zu charakterisieren, wird kontrovers diskutiert.

Von 38 klinisch stabilen Patienten mit zystischer Fibrose (CF) wurden sequentiell im Abstand von 18 Monaten Proben aus Rachenabstrich, Sputum und Bronchiallavage (BAL) entnommen und bezüglich *Pseudomonas*-Nachweis untersucht. Die *Pseudomonas*-Stämme wurden mittels Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-Analyse und Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) von DNA-Makrorestriktionsfragmenten typisiert und bezüglich der Frage nach genetisch divergierenden Isolaten innerhalb des selben Individuums sowie nach möglichen longitudinalen genetischen Veränderungen evaluiert.

Sensitivität, negative und positive prädiktive Werte und Spezifität, um eine *P. aeruginosa*-Besiedlung zu erkennen, waren 36%, 74%, 83% und 96% im Falle der Kulturen aus dem Oropharynx von nicht-expektorierenden Patienten und 92%, 94%, 100% und 100% für Sputumkulturen von expektorierenden Probanden. RAPD-Analyse und PFGE waren in der Lage, zwischen unterschiedlichen *Pseudomonas*-Stämmen zu diskriminieren, wobei nur die DNA-Makrorestriktion zwischen Subtypen unterscheiden konnte. Die Genotypen der *Pseudomonas*-Isolate aus Rachenabstrich und Sputum divergierten in 55% und 40% zu den Isolaten der BAL. Longitudinale Variationen des Genotyps wurden in 62% der Fälle beobachtet, die Hälfte davon war nur mittels bronchoskopisch gewonnener Proben erkennbar.

Zusammengefasst besitzen Sputumproben bezüglich des *Pseudomonas*-Nachweises dieselbe Wertigkeit wie Kulturen aus der BAL, während Rachenabstriche in einer frühen Krankheitsphase für die Charakterisierung der bakteriellen Flora des unteren Respirationstrakts wenig geeignet sind. Die Methode der DNA-Makrorestriktion kann als zuverlässige Technik für epidemiologische Untersuchungen empfohlen werden. Unterschiedliche Genotypen innerhalb desselben Individuums und longitudinale genetische Alterationen sind häufig, jedoch unter Umständen nur bronchoskopisch nachweisbar.

**Schlagwörter:** Cystische Fibrose, Bronchiallavage, *Pseudomonas aeruginosa*, Pulsfeld-Gelelektrophorese, Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus, Random Amplified Polymorphic DNA-Analyse, Polymerasekettenreaktion

## Abstract

There is controversy about adequate specimen to detect and characterise colonisation of cystic fibrosis (CF) airways by *Pseudomonas aeruginosa*.

Oropharyngeal, sputum and bronchoalveolar lavage (BAL) samples were evaluated sequentially from 38 stable CF patients for the detection of *P. aeruginosa*. *Pseudomonas* strains were typed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of DNA macrorestriction fragments. The occurrence of genetically different isolates within the same host and longitudinal variations in the genotype during repeated examinations was assessed.

Sensitivity, negative and positive predictive values and specificity to detect *P. aeruginosa* were 36%, 74%, 83% and 96% for oropharyngeal cultures in non-expectorating patients and 92%, 94%, 100% and 100% for sputum cultures from expectorating patients, respectively. RAPD analysis and PFGE were suitable to characterize *P. aeruginosa* CF isolates, although only DNA macrorestriction was able to distinguish between identical and closely related strains. Genotypes of *Pseudomonas* isolates recovered from oropharyngeal swabs and sputum differed to the strains recovered by bronchoscopy in 55% and 40%, respectively. In 62% longitudinal variations in the genotype occurred. Half of these alterations were only detectable from bronchoscopically obtained samples.

In conclusion, sputum samples have the same value as specimens from BAL to detect *P. aeruginosa* colonisation, whereas cultures from the oropharynx are not suitable for characterising the bacterial conditions in the CF lungs in an early disease state. DNA macrorestriction is recommended as an excellent tool for epidemiological investigations. Different genotypes within the same host and longitudinal genetic alterations are common and may be detectable in the BAL fluid exclusively.

**Keywords:** Cystic fibrosis, bronchoalveolar lavage, *Pseudomonas aeruginosa*, pulsed-field gel electrophoresis, restriction fragment length polymorphism, random amplified polymorphic DNA analysis, polymerase chain reaction

## Abkürzungsverzeichnis

AP-PCR	Arbitrarily Primed PCR
<i>B. cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
BAL	Bronchiallavage
CF	Cystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CFU	Colony forming units, Kolonie bildende Einheiten
DNA	Desoxyribonucleic Acid, Desoxyribonucleinsäure
dNTP's	Desoxynukleotidtriphosphate
FEV <sub>1</sub>	Forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde
kb	Kilobasen
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis, Pulsfeld-Gelelektrophorese
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA Analysis
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism, Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
rpm	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>11</b>
<b>1.1</b>	<b>Stand der Forschung</b>	<b>11</b>
1.1.1	Cystische Fibrose: Historisches	11
1.1.2	Pathophysiologie der Atemwege	12
1.1.3	Pulmonale Infektion mit <i>P. aeruginosa</i>	12
1.1.4	Mikrobiologische Probengewinnung	13
1.1.5	Typisierung von <i>P. aeruginosa</i>	14
<b>1.2</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Patientenkollektiv, Ein- und Ausschlusskriterien</b>	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>Probenentnahme</b>	<b>17</b>
2.2.1	Untersuchungszeitpunkte, Art der Proben	17
2.2.2	Bronchiallavage	18
2.2.3	Mikrobiologische Anzucht und Identifizierung	18
<b>2.3</b>	<b>Genotypisierung (Genetisches Fingerprinting)</b>	<b>19</b>
2.3.1	Phenol-Chloroform-Extraktion der genomischen DNA	19
2.3.2	Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-Analyse	20
2.3.3	DNA-Makrorestriktion und Pulsfeld-Gelelektrophorese	22
<b>2.4</b>	<b>Auswertung der Ergebnisse und Biometrie</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>Mikrobiologische Kulturen und Lungenfunktionsdaten</b>	<b>25</b>
<b>3.2</b>	<b>Vorhersagewerte der Atemwegsproben</b>	<b>29</b>
<b>3.3</b>	<b>Vergleich der Typisierungsmethoden</b>	<b>29</b>
<b>3.4</b>	<b><i>Pseudomonas</i>-Stämme und Subtypen</b>	<b>32</b>

<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>37</b>
4.1	Diagnostische Wertigkeit von mikrobiologischen Kulturen	37
4.2	Methoden der Genotypisierung	39
4.3	Intraindividuelle und longitudinale Variabilität der <i>Pseudomonas</i> -Genotypen	41
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>43</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>44</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>51</b>
	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>52</b>
	<b>EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>57</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Stand der Forschung

### 1.1.1 Cystische Fibrose: Historisches

*„Woe to that child which when kissed on the forehead tastes salty. He is bewitched and soon must die.“*

Diese aus dem europäischen Raum stammende Überlieferung belegt, dass bereits seit dem frühen 17. Jahrhundert ein typisches Symptom der Mukoviszidose, nämlich der hohe Salzgehalt des Schweißes, bekannt und gefürchtet war (1, 2). Dennoch sollte es bis zum Jahr 1936 dauern, dass der Schweizer Physiologe Fanconi erstmals eine klinische Beschreibung des „Coeliakiesyndroms bei angeborener zystischer Pankreasfibromatose und Bronchiektasen“ dem medizinischen Kollegium präsentierte (3). Zwei Jahre später veröffentlichte die amerikanische Pathologin Anderson ihre Untersuchungen an verstorbenen Kindern, welche unter Destruktion des Pankreas und Infektionen mit Zerstörung des Lungengewebes litten, und gab der „zystischen Pankreasfibrose“ ihren noch heute gebräuchlichen Namen (4). Der in Deutschland und einigen anderen europäischen Ländern daneben verwendete Name „Mukoviszidose“ geht auf die Ausführungen von Farber 1945 zurück, der eine generalisierte Eindickung der Sekrete bei dem neu beschriebenen Krankheitsbild konstatierte (5). Das pathophysiologische Korrelat zu dieser Beobachtung lieferte 1953 Di Sant' Agnese, als er den hohen Natriumchloridgehalt des Schweißes bei Patienten mit zystischer Fibrose (CF) beschrieb (6) und damit den Grundstein für den Goldstandard der CF-Diagnostik, den Schweißtest nach Gibson und Cooke (7), legte. Die Entdeckung des Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator (CFTR)-Gens auf Chromosom 7 (8), welches für einen Chloridionenkanal codiert (9), schuf schließlich 1989 die Grundlage für die heutige molekularbiologische Diagnostik der Mutationsanalyse, wobei mittlerweile über 1000 Mutationen des CFTR-Gens bekannt sind (10). Dass der interindividuell sehr heterogene pulmonale Verlauf der Erkrankung jedoch nicht nur vom CFTR-Genotyp, sondern wahrscheinlich auch von so genannten „modifier genes“ abhängt, ist eine der wesentlichsten Erkenntnisse der aktuellen molekulargenetischen Forschung (11).

### 1.1.2 Pathophysiologie der Atemwege

Progressive Infektion und chronische, durch Neutrophile vermittelte Inflammation der tieferen Atemwege mit fortschreitender Destruktion des Lungengewebes und konsekutiver respiratorischer Insuffizienz stellen auch heute noch die Hauptursache für die reduzierte Lebensqualität und Lebenserwartung der Mukoviszidose-Patienten dar (12).

Die Mukoviszidose ist eine generalisierte Störung des sekretorischen Epithels aller exokrinen Drüsen. Die Mutationen im CFTR-Gen lösen den Basisdefekt des gestörten Salz- und Wassertransports aus. Fehlendes oder defektes CFTR-Protein vermindert die Chloridpermeabilität der Apikalmembran der exokrinen Epithelzelle. Am Bronchialepithel stellt die inadäquate NaCl-Sekretion und die damit verbundene erhöhte Viskosität, relative Wasserarmut und eingeschränkte mukoziliäre Clearance der Sekrete einen wesentlichen Pathomechanismus dar. Zellulärer und bakterieller Debris, insbesondere hochmolekulare DNA, sowie proteolytische enzymatische Prozesse, Antikörperproduktion und Sauerstoff-Radikalbildung sind weitere wichtige Komponenten der komplexen pathologischen Vorgänge in den Atemwegen (13). Die bakterielle Flora des Respirationstrakt von CF-Patienten ist charakteristisch und schließt neben *Staphylococcus aureus*, *Hämophilus influenzae* und Problemkeimen wie *Burkholderia cepacia* oder *Stenotrophomonas maltophilia* typischerweise einen zunächst nicht mukösen, später ein mucoides Exopolysaccharid (Alginat) produzierenden Phänotyp der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* ein (14). Trotz einer Vielzahl experimentell gewonnener Erkenntnisse sind die genauen Ursachen, warum die Atemwege von CF-Patienten gerade für diese Bakterien so empfänglich sind, weiterhin nicht restlos geklärt, ebenso wie die Frage, ob die bereits in einer frühen Krankheitsphase nachweisbaren entzündlichen Veränderungen in erster Linie Folge von Infektionen sind oder durch das mutierte CFTR-Protein selbst hervorgerufen werden (13).

### 1.1.3 Pulmonale Infektion mit *P. aeruginosa*

Das obligat aerobe, gramnegative Stäbchenbakterium *P. aeruginosa* kommt ubiquitär in der Erde und im Wasser vor. Es ist durch eine polare Begeißelung beweglich und bildet die Pigmente Pyocyanin und Fluorescein. Humanpathogene Bedeutung erhält es als

opportunistischer Infektionserreger bei abwehrgeschwächten Patienten. Bei CF-Patienten gelingt es dem Bakterium durch Ausbildung und kontinuierliche Anpassung multipler Virulenzfaktoren, die Abwehrmechanismen des Wirtes zu überwinden und sich, trotz wiederholter aggressiver Antibiotikatherapie, dauerhaft in den Atemwegen zu etablieren (22). Wichtige Komponenten sind hierbei Biofilmbildung (15, 24), genetische Hypermotabilität (16), multiple Antibiotikaresistenz, phänotypische Anpassungsvorgänge wie Alginat- und Pilusbildung oder Motilitätsverlust (14), und die Sekretion von Exoprodukten, unter anderem Elastase, alkalische Protease und Exotoxin A (17). Untersuchungen des bakteriellen Genotyps haben gezeigt, dass genetisch unterschiedliche *P. aeruginosa*-Stämme einen gemeinsamen Phänotyp entwickeln können, was als Ausdruck dieser Anpassungsvorgänge angesehen wird (23). Aber auch verschiedene Wirtsfaktoren, unter anderem die salzabhängige Inaktivierung antimikrobiell wirkender Peptide des Atemwegssekrets, der Defensine (18), oder die durch die CFTR-Mutation bedingte Ausbildung von *Pseudomonas*-Rezeptoren, beispielsweise auf epithelständigen Gangliosiden (19), erleichtern den Erregern ihre Persistenz. Als chronische Infektion wird hierbei der Nachweis von *P. aeruginosa* über mindestens 6 Monate auf der Basis von Sputumkulturen, welche in mindestens einmonatigen Abständen entnommen wurden, zusammen mit klinischen Zeichen einer Infektion oder eines histologisch erkennbaren Gewebsschadens definiert (20). Häufig findet man deutlich erhöhte *Pseudomonas*-Antikörpertiter im Serum (22).

#### **1.1.4 Mikrobiologische Probengewinnung**

Bereits in einer sehr frühen Krankheitsphase sind sowohl entzündliche Veränderungen als auch bakterielle Infektionen der Atemwege bei CF-Patienten nachweisbar (21, 25, 26). Während die Prävalenz der *S. aureus*-Infektion mit dem Lebensalter abnimmt, gewinnt die Besiedlung mit *P. aeruginosa* zunehmend an Bedeutung (22). Die pulmonale *Pseudomonas*-Infektion führt zu einer vermehrten Entzündung im Bereich der Atemwege und hat bereits im Kleinkindesalter einen negativen Effekt auf den Verlauf der Lungenfunktion (27). Hohe Spiegel an Zytokinen, neutrophilen Granulozyten und leukozytären Proteasen als Ausdruck der körpereigenen Immunabwehr sind hierbei maßgeblich an der fortschreitenden Zerstörung des Lungengewebes beteiligt (14). Ein besonderer klinischer Focus liegt deshalb in der frühzeitigen Erkennung und

aggressiven antibiotischen Behandlung der pulmonalen Kolonisation mit *P. aeruginosa*, um eine chronische Infektion, und damit Inflammation der Atemwege möglichst lange zu verzögern (22). Zur mikrobiologischen Diagnostik werden hierzu Proben aus dem Oropharynx oder Sputumproben gewonnen. In einem frühen Stadium der Lungenerkrankung sind viele Patienten allerdings nicht in der Lage, Sputum zu expectorieren, während sputumproduzierende Patienten mit fortgeschrittener Infektion häufig nur unzureichend auf die in-vitro sensibel getesteten Antibiotika ansprechen. Mehrere Studien, welche die Erregergewinnung bei CF-Patienten mittels Bronchiallavage (BAL) mit Proben aus dem Rachenabstrich verglichen, lieferten Hinweise auf eine Überlegenheit der Bronchoskopie bezüglich der Sensitivität und der Spezifität des Erregernachweises aus den tieferen Atemwegen (28, 29, 30, 31, 32). Die BAL gilt daher in bezug auf die mikrobiologische Probengewinnung derzeit als Goldstandard. Auf der anderen Seite wird BAL-Sekret nur von einem oder ein paar wenigen Orten des Bronchialsystems gewonnen, so dass über die bakterielle Flora der anderen Lungenabschnitte keine Aussage gemacht werden kann (14). Die Sputumgewinnung hat hier den theoretischen Vorteil, möglicherweise mehrere unterschiedliche Kompartimente des tiefen Atemtraktes zu repräsentieren. Insgesamt gesehen ist die Datenlage, insbesondere in bezug auf die Wertigkeit von Sputumproben jedoch widersprüchlich, da die Ergebnisse vom Alter der Patienten und dem Schweregrad der Erkrankung abhängen. Darüber hinaus verwenden die meisten epidemiologischen Studien für Ihre Untersuchung Rachenabstrich- oder Sputumproben, ohne dass die Repräsentativität dieser Materialien für die bakteriologische Flora der tiefen Atemwege bisher belegt ist.

#### **1.1.5 Typisierung von *P. aeruginosa***

Wenn zwei oder mehrere phänotypisch identische Pseudomonaden parallel aus verschiedenen Kompartimenten des Respirationstraktes nachgewiesen werden, bedeutet dies nicht, dass es sich hierbei um genetisch identische Isolate handelt oder beide Isolate von dem selben Klon abstammen. Bis vor etwa 10 Jahren versuchte man, die bakteriellen Isolate anhand phänotypischer Charakteristika zu differenzieren. Die diversen Methoden der Phänotypisierung beruhten in erster Linie auf der Serospezifität der Lipopolysaccharide (Serotypisierung), dem Profil der Bacteriocin-Produktion

(Pyocintypisierung), der Profilanalyse der äußeren Membranproteine (outer membrane protein profil analysis) und der Empfindlichkeit auf Phagen oder Antibiotika (33, 34, 35, 36, 37), ließen jedoch keinen Rückschluss auf den Genotyp der Isolate zu. Um die verschiedenen Stämme und Subtypen auf molekulargenetischer Basis voneinander unterscheiden zu können, wurden in den letzten Jahren zahlreiche molekulargenetische Methoden entwickelt. Dazu gehören diverse RFLP- und PCR-basierte Typisierungen der rRNA-Genregionen (Ribotyping), des Plasmids, des Gesamtgenoms, und von spezifischen DNA-Proben wie das Exotoxin A Gen (36, 38, 39, 40, 41). Es zeigte sich schnell, dass in bezug auf die Typisierung von *P. aeruginosa* die genetischen Typisierungsmethoden gegenüber den herkömmlichen Phänotypisierungen sowohl im Hinblick auf Diskriminierung als auch Reproduzierbarkeit überlegen waren (35, 37, 39, 42, 43, 44).

Allerdings besteht bis heute kein Konsensus über eine optimale Typisierungsstrategie oder -methode (45). Unter den derzeit gängigen Techniken gilt die DNA-Makrorestriktions-Analyse, auch Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) genannt, als eine der sensitivsten, spezifischsten und zuverlässigsten Methoden, um klonale Verwandtschaftsverhältnisse zu determinieren (23, 35, 46, 47, 48, 49, 50). Für die Genotypisierung von *P. aeruginosa*-Isolaten von CF-Patienten stellt die Aufspaltung der genomischen DNA unter Verwendung der Restriktions-Endonukleasen *Spe I*, *Dra I* oder *Xba I* mit anschließender Auftrennung der Restriktionsfragmente mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) eine der anerkannten Methoden dar (29, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57). In jüngster Zeit wurde unter anderem mit Hilfe dieser Technik mit der Kartierung von *Pseudomonas*-Stämmen begonnen (58). Eine andere, auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierende Methode, die Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-Analyse, wurde ebenfalls für die zuverlässige Typisierung von *P. aeruginosa* herangezogen (44, 46, 53, 55, 56, 59, 60, 61, 62). Für diese Methode werden in der Literatur teilweise auch die Bezeichnungen Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaktion (AP-PCR), DNA Amplification Fingerprinting (DAF) oder PCR Fingerprinting verwendet.

In den letzten Jahren wurden viele epidemiologische Untersuchungen bei CF-Patienten mit Hilfe molekulargenetischer Typisierungsmethoden durchgeführt. Im Focus standen hier vor allem Fragen nach Infektionsquelle bzw. Transmission von *P. aeruginosa* (51,

55, 56). Unklar blieb bisher jedoch, ob innerhalb der Atemwege desselben Individuums mehrere *Pseudomonas*-Stämme koexistieren, und ob Veränderungen auf der Ebene des bakteriellen Genoms für die Alteration des Phänotyps verantwortlich sind.

## **1.2 Aufgabenstellung**

Das Ziel dieser Arbeit war die Evaluierung von mikrobiologischen Proben aus Rachenabstrich und Sputum im Vergleich zur BAL von Patienten mit cystischer Fibrose und milder Lungenerkrankung in bezug auf Sensitivität, Spezifität und prädiktive Wertigkeit des Nachweises von *P. aeruginosa*. Hierzu wurden bei 38 an Mukoviszidose erkrankten Kindern und Jugendlichen zu zwei Untersuchungszeitpunkten im Abstand von 18 Monaten mikrobiologische Kulturen aus den Atemwegen entnommen und analysiert. Darüber hinaus wurde die Frage nach dem Auftreten von genetisch unterschiedlichen Isolaten in den Atemwegen desselben Individuums und die Beurteilung der genetischen Variabilität der *Pseudomonas*-Isolate in sequentiellen Probenentnahmen untersucht. Die Genotypisierung der *Pseudomonas*-Isolate erfolgte mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese von RFLP-Fragmenten sowie mittels RAPD-Analyse des bakteriellen Genoms. Gleichzeitig wurden Diskriminationsfähigkeit und Reproduzierbarkeit beider Methoden verglichen und eine Empfehlung für die Typisierung von *P. aeruginosa*-Isolaten aus den Atemwegen von CF-Patienten formuliert.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patientenkollektiv, Ein- und Ausschlusskriterien**

38 Patienten der Kinderklinik der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum, und des Dr.-von-Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München wurden zwischen Juni 1996 und Juli 1999 untersucht. Alle Patienten nahmen an der multizentrischen BEAT (Bronchoalveolar lavage for Evaluation of Anti-inflammatory Treatment)-Studie teil, die das Ziel hatte, prospektiv den natürlichen Verlauf der bronchialen Inflammation bei klinisch stabilen CF-Patienten mit normaler Lungenfunktion zu evaluieren und den Einfluss von Dornase alpha zu untersuchen (63, 64). Patienten über 4 Jahren mit einer FEV<sub>1</sub> von mindestens 80% des Solls wurden in die Studie eingeschlossen, während die Behandlung mit anti-inflammatorischen Substanzen wie Ibuprofen oder systemischen und inhalativen Kortikosteroiden, sowie der Nachweis einer allergischen bronchopulmonalen Aspergillose und ein Shwachman-Score von unter 55 Punkten Ausschlusskriterien darstellten. Die Probanden mussten außerdem in den letzten 6 Wochen vor der ersten BAL frei von respiratorischen Infekten und pulmonalen Exazerbationen gewesen sein und durften in diesem Zeitraum keine intravenös applizierten Antibiotika oder systemisch verabreichten Quinolone erhalten haben. Lungenfunktionsuntersuchungen wurden während des Beobachtungszeitraums in dreimonatlichen Abständen durchgeführt. Bei nachgewiesener *Pseudomonas*-Infektion wurde den Patienten inhalativ Tobramycin, falls sensibel, oder Colistin über ein Jahr verabreicht (n=4). Pulmonale Exazerbationen wurden mit Intravenösen Cephalosporinen und Aminoglykosiden behandelt (n=6).

Die Studie wurde von den Ethik-Kommissionen der beteiligten Zentren positiv beurteilt. Ein schriftliches Einverständnis der Eltern und/oder der Patienten lag vor.

### **2.2 Probenentnahme**

#### **2.2.1 Untersuchungszeitpunkte, Art der Proben**

Mikrobiologische Proben wurden zu zwei Untersuchungszeitpunkten im Abstand von 18 Monaten (t<sub>1</sub> und t<sub>2</sub>) aus Rachenabstrich, Sputum und BAL gewonnen. Patienten, die kein Sputum produzieren konnten, erhielten lediglich einen Rachenabstrich und eine

BAL. Die Rachenabstriche wurden von einer erfahrenen Ambulanzschwester in einem standardisierten Verfahren aus dem tiefen Oropharynx einschließlich Zungengrund, Tonsillen und Rachenwand entnommen.

### **2.2.2 Bronchiallavage**

Bronchoskopie und BAL wurden nach dem Protokoll der BEAT-Studie durchgeführt (63). Um das Verfahren zu standardisieren, wurden die Bronchoskopien in jedem Zentrum von dem selben Untersucher durchgeführt. Verwendet wurde ein flexibles Bronchoskop mit einem Außendurchmesser von 3,5 mm bei Patienten unter einem Alter von 10 Jahren und 4,9 mm bei Patienten ab 10 Jahren. Topische Anästhesie wurde vor dem Eingriff mittels Inhalation von 2 - 4 ml einer 4%igen Lidocain-Lösung erzielt. 1 - 4 ml einer 1%igen Lidocain-Lösung wurden beim Einführen des Bronchoskops in die Atemwege instilliert. Die Sedierung erfolgte mit einer Kombination von Midazolam (0,2 - 0,3 mg/kg Körpergewicht) und Propofol (initiale Dosis 2 mg/kg Körpergewicht, Wiederholungs-dosen je 10 mg). Das Bronchoskop wurde bei allen Patienten in die Lingula oder eines ihrer Segmente vorgeschoben. Die BAL wurde mit 3 ml/kg Körpergewicht angewärmter physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt. Bei Kindern unter 20 kg Körpergewicht wurden 3 x 1 ml/kg physiologischer Kochsalzlösung instilliert und sofort vorsichtig manuell abgesaugt. Bei Kindern ab 20 kg Körpergewicht wurde die BAL mit 20 ml-Aliquoten bis zu einem Gesamtvolumen von 3 ml/kg Körpergewicht durchgeführt.

### **2.2.3 Mikrobiologische Anzucht und Identifizierung**

Mikrobiologische Kulturen wurden vor der Filtration aus den ersten 2 ml der BAL-Probe gewonnen und auf Columbia-Agar aufgebracht. Unabhängig von der Bakterienanzahl wurde jeglicher Keimnachweis als pathologisch eingestuft und dokumentiert, was der Vorgehensweise früherer Studien an CF-Patienten entsprach (28). Die Bakterienkulturen wurden mit Hilfe des API 20 NE-Systems (Bio Mérieux, Marcy-Etoile, Frankreich) identifiziert. Einzelkolonien von allen phänotypisch unterscheidbaren Isolaten derselben Kultur wurden für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Die Isolate wurden bei -80°C eingefroren. Für die Genotypisierung wurden die Kolonien auf

McConcey Agar über Nacht bei 37°C rekultiviert.

Die mikrobiologischen Untersuchungen und die Genotypisierung wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Charité - Universitätsmedizin Berlin und im Max-von-Pettenkofer-Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Ludwigs-Maximilians-Universität München durchgeführt.

## **2.3 Genotypisierung (Genetisches Fingerprinting)**

### **2.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion der genomischen DNA**

Nach Anzucht der Isolate auf McConcey-Agar wurde je eine *P. aeruginosa*-Kolonie in 700 µl TE (Tris-EDTA)-Puffer (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) eingebracht und nach Zugabe von 4 mg/ml Lysozym für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Lysat mit 280 µl EDTA 0,5 M (pH 8,0) für 20 min bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl SDS 10% (Endkonzentration 0,5%) und 0,2 mg/ml RNase wurde die Lösung erneut für 30 min bei 55°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 0,2 mg/ml Proteinase K und eine weitere Inkubation für 2 h bei 55°C. Nach Addition von 1 Volumen gepuffertem Phenol wurde die Lösung bei Raumtemperatur für 10 min leicht geschwenkt und über 15 min mit 10000 rpm zentrifugiert. Die Oberphase wurde abgenommen, mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gemischt und für 13 min mit 130000 rpm zentrifugiert. Zur Oberphase wurde 1 Volumen Isopropanol gegeben und das Gemisch mit 1/10 Volumen Natriumacetat versetzt. Die Suspension wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend für 30 min erneut mit 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde 2 x mit 70%-igem Ethanol bei 4°C gewaschen, dann 5 bis 10 min vakuumgetrocknet und in 200 µl TE-Puffer resuspendiert. Die DNA wurde über Nacht bei 4°C gelöst. Im Anschluss erfolgte die Konzentrationsbestimmung mittels Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm und die Konzentrationseinstellung auf 10 ng DNA/µl TE-Puffer. Bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte die Lagerung der DNA-Proben bei 4°C.

### **2.3.2 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-Analyse**

Sechs Primer wurden initial in bezug auf ihre Diskriminationsfähigkeit zwischen unterschiedlichen *Pseudomonas*-Isolaten und Reproduzierbarkeit in wiederholten Untersuchungen evaluiert. Der Primer M13 core zeigte in anderen Studien eine hohe diskriminative Kapazität für eine Reihe von Bakterienisolaten (46, 59, 60, 65, 66). Die Verwendung des Primers M13 uni für *P. aeruginosa* und andere Pathogene ist ebenfalls beschrieben (66). Die Primer (GTG)<sub>5</sub> und T3B wurden in unserem Labor mehrfach für die Typisierung verschiedener Mikroorganismen verwendet (65, 67, 68, 69). Für die RAPD von *P. aeruginosa* wurde von einer anderen Arbeitsgruppe der Gebrauch von 10-mer-Primern, wie 208 oder 272, vorgeschlagen (53). Alle Primer wurden über TIB Molbiol, Berlin bezogen. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und die PCR-Protokolle für alle verwendeten Primer zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: PCR-Reaktionsgemische und PCR-Protokolle für 50 µl-Ansätze.

	T3B	(GTG) <sub>5</sub>	M13 core	M13 uni	10-mer
<i>Reaktionsgemisch</i>					
DNA	10 ng	50 ng	25 ng	25 ng	80 ng
Primer	10 pmol	5 pmol	25 pmol	25 pmol	80 pmol
Polymerase <sup>A</sup>	2.5 U	2.5 U	2.5 U	2.5 U	2.0 U
dNTP's	200 µmol	200 µmol	200 µmol	200 µmol	250 µmol
MgCl <sub>2</sub> (1.5 mM)	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl	1,5 µl
Puffer <sup>B</sup>	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
<i>PCR-Protokolle</i>					
	1 Zyklus:	1 Zyklus:	1 Zyklus:	1 Zyklus:	4 Zyklen:
Denaturierung	2' 95°C	2' 95°C	2' 95°C	2' 95°C	5' 94°C
Annealing	-	-	-	-	5' 36°C
Elongation	-	-	-	-	5' 72°C
	32 Zyklen:	32 Zyklen:	27 Zyklen:	32 Zyklen:	30 Zyklen:
Denaturierung	20'' 95°C	20'' 95°C	20'' 95°C	20'' 95°C	60'' 94°C
Annealing	30'' 52°C	30'' 50°C	60'' 50°C	40'' 56°C	60'' 36°C
Elongation	80'' 72°C	80'' 72°C	20'' 72°C	80'' 72°C	120'' 72°C
Final Extension	6' 72°C	6' 72°C	6' 72°C	6' 72°C	6' 72°C

<sup>A</sup>AmpliAq DNA-Polymerase (Perkin-Elmer, Branchburg, New Jersey, USA), <sup>B</sup>10 mM Tris-Cl (pH 8,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,001% Gelatine

Die Reaktionsansätze wurden mit 25 µl Mineralöl beschichtet und mit einem Perkin-Elmer Cetus DNA Thermocycler (Modell Gene-Amp PCR System 9600) amplifiziert. Nach Hervorholen der PCR-Produkte unter dem Mineralöl wurden diese mittels Vakuum-Zentrifuge (Eppendorf Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg) über 23 min auf 25µl eingengt und anschließend mit je 3 µl Stop-Lösung (für 30 ml: 15 ml Glycerin, 30 mg Bromphenolblau, 6 ml 0,5 M EDTA, 0,3 ml 1 M Tris-Puffer, pH 8,0) versetzt. Im Anschluss wurden die Proben inklusive einem Standardmarker (1 kb-Leiter) und einem laborinternen *P. aeruginosa*-Referenzstamm auf ein 1%-Agarosegel [2 g Pharmacia-Agarose (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), 20 ml 10 x TBE-Puffer (für 1 l: 108

g Trishydroxymethylaminomethan, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0), 180 ml aqua bidest] aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung (Laufpuffer 0,5 x TBE) erfolgte über 5 h bei  $U = 100$  V. Danach wurden die Proben über 10 min mit Ethidiumbromid gefärbt und einer nochmaligen Elektrophorese für 15 min bei 125 V unterzogen. Die Gele wurden mit einer Polaroid-Kamera photographiert und visuell analysiert.

Der Verwandtschaftsgrad der RAPD-Fingerprints wurde nach dem Dice-Koeffizienten berechnet (52). Zwei Isolate sind demnach als verwandt einzustufen, wenn sie mindestens 80% Übereinstimmung in ihren Bandenmustern zeigen. Um Artefakte auszuschließen, wurden alle Proben zweifach amplifiziert.

### **2.3.3 DNA-Makrorestriktion und Pulsfeld-Gelelektrophorese**

Die Methode wurde nach einem bereits beschriebenen Protokoll durchgeführt (51), mit einigen wenigen Modifikationen. Nach Anzucht der Isolate auf McConcey-Agar wurde je eine Bakterienkultur in 10 ml TSB (Tryptone soya broth = Caseinpepton-Sojamehl-Pepton-Lösung) resuspendiert und über Nacht bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,7 ( $\lambda = 590$  nm) bebrütet. Die Kulturen wurden mit 100  $\mu$ l 0,5 M EDTA auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C für 3 min mit 10000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg). Das Pellet wurde zuerst mit 1 ml SE (sodium chloride/EDTA)-Puffer (75 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) einmal bei 4°C gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach wurde das Pellet nochmals gewaschen und in 100  $\mu$ l SE-Puffer (75 mM NaCl, 0,5 M EDTA, pH 7,4) resuspendiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf 55°C erhitzt und mit 100  $\mu$ l 2% low-melting-point-Agarose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA) gemischt, in Blöckchen gegossen und über 20 min bei 4°C zum Erstarren gebracht. Die Agaroseblöckchen wurden in 1 ml SLS (sodium chloride/Na-lauroyl-sarcosine)-Puffer (0,5 M  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , Na-Lauroylsarcosin 1%, pH 9,5) und 0,5 mg/ml Proteinase K über 15 h bei 55°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen der Blöckchen in TE-Puffer bei 4°C (Abstand der Waschungen 1,5 - 2 h) wurde zu einem etwa 2 x 5 mm großen Stück Agaroseblöckchen je 78,5  $\mu$ l aqua bidest, 20  $\mu$ l 10 x Puffer und 1,5  $\mu$ l (15 U) *Spe* I (Boehringer, Mannheim) gegeben und für 15 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde das

Puffergemisch entfernt und die Reaktion mit TE-Puffer gestoppt. Die Proben wurden, inklusive einem laboreigenen *P. aeruginosa*-Referenzstamm und einem Standardmarker (DNA size  $\lambda$ -ladder [Boehringer, Mannheim]), auf ein 1%-Agarosegel (2 g Seakem Gold Agarose für PFGE [Bio-Products, Rockland, Maine, USA], 10 ml 10 x TBE-Puffer, 190 ml aqua bidest) aufgetragen und die Slots mit 2% low-melting-point-Agarose aufgefüllt. Im Anschluss erfolgte die Elektrophorese (Chef-DRII System, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Kalifornien, USA, Laufpuffer 0,5 x TBE) über 24 Stunden unter den folgenden Bedingungen: U = 200 V, I ~ 0,1 A (6 V/cm), initial time = 1,0 s, final time = 25 s, T = 12°C, included angel = 120°. Das Gel wurde über 15 min in Ethidiumbromid gefärbt, mit einer Polaroid-Kamera photographiert und visuell analysiert.

Alle *Pseudomonas*-Isolate wurden zweifach typisiert, um Artefakte auszuschließen. Der Verwandtschaftsgrad zwischen den Bandenmustern der unterschiedlichen Isolate wurde nach den von Tenover et al. vorgeschlagenen Kriterien beurteilt und interpretiert (54). Hiernach werden Isolate als nah verwandt angesehen, wenn sie sich in nicht mehr als drei PFGE-Banden unterscheiden. Fingerprints mit einem Unterschied im Bandenmuster von vier bis sechs Banden werden als möglich verwandt eingestuft, während Stämme mit mehr als sechs Unterschieden im Bandenmuster als genetisch unverwandt gelten.

Für die interne Qualitätskontrolle und die Vergleichbarkeit der Gele wurde bei beiden beschriebenen Typisierungsmethoden auf jedem Gel ein klinischer *P. aeruginosa*-Referenzstamm aus unserem Labor mitgeführt.

#### **2.4 Auswertung der Ergebnisse und Biometrie**

Sensitivität, Spezifität und prädiktive Werte der mikrobiologischen Proben aus Rachenabstrich (Nicht-Sputumproduzenten) und Sputum (Sputumproduzenten) für den Nachweis einer *Pseudomonas*-Besiedlung der tiefen Atemwege wurden berechnet, wobei die simultan durchgeführte BAL als Goldstandard definiert wurde. Die Daten beider Untersuchungszeitpunkte wurden für die Analyse gepoolt.

Die Fähigkeit der Primer und Enzyme, zwischen unterschiedlichen Isolaten zu diskriminieren, wurde als das Verhältnis zwischen der Anzahl der Isolate, für die ein Bandenmuster generiert werden konnte, und der Anzahl der getesteten Stämme definiert. Die Reproduzierbarkeit wurde anhand der Isolate drei zufällig ausgewählter Patienten (Nr. 3, 5 und 7) durch dreimalige Repetition beider Typisierungsmethoden untersucht und mit Hilfe des nicht-parametrischen Wilcoxon-Tests für gepaarte Proben analysiert;  $p \leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Mikrobiologische Kulturen und Lungenfunktionsdaten

Zum Zeitpunkt des Studienbeginns betrug das mittlere Alter der Patienten 14,2 Jahre (5,2 - 34,2 Jahre), die mittlere FEV<sub>1</sub> lag bei 95% des Solls (80% - 120%). Bei 18 der 38 Patienten (Prävalenz 47,4%) wurde zu mindestens einem Zeitpunkt in mindestens einer Kultur *P. aeruginosa* in den Atemwegen nachgewiesen. In Tabelle 2 sind Anzahl und Verteilung der Atemwegsproben zu beiden Entnahmezeitpunkten dargestellt.

Tabelle 2: Anzahl n der mikrobiologischen Kulturen aus den Atemwegen der Patienten mit und ohne *Pseudomonas*-Nachweis zu beiden Untersuchungszeitpunkten (P+ und P-). Die Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtanzahl der Patienten.

n (%)	t <sub>1</sub>		t <sub>2</sub>	
	P+	P-	P+	P-
Rachenabstrich	14 (36,8)	11 (28,9)	15 (48,4)	14 (45,2)
Sputum	13 (34,2)	9 (23,7)	5 (16,1)	1 (3,2)
BAL	18 (47,4)	20 (52,6)	16 (51,6)	15 (48,4)
Gesamtanzahl Patienten	38 (100)		31 (100)	

Sieben Patienten hatten die Studie vor der zweiten Untersuchung (t<sub>2</sub>) abgebrochen. Zwei der *Pseudomonas*-positiven Probanden unterzogen sich nur einer Bronchoskopie. Zum ersten Untersuchungszeitpunkt waren 13 der Patienten Sputumproduzenten, während fünf von Ihnen kein Sputum expektorieren konnten. Die Anzahl der Sputumproduzenten nahm zum zweiten Untersuchungszeitpunkt auf fünf ab, versus 11 nicht-expektorierende Patienten. Zusätzlich zum Rachenabstrich wurde bei neun (t<sub>1</sub>) beziehungsweise vier (t<sub>2</sub>) Probanden Sputumproben entnommen, da diese Patienten anfänglich nicht in der Lage waren zu expektorieren, dieses aber nach der Durchführung des Rachenabstrichs konnten.

Insgesamt wurden 80 *P. aeruginosa*-Isolate aus 221 Sekretproben gewonnen. Bei einigen Patienten waren mehrere phänotypisch unterschiedliche Isolate in derselben

Kultur nachweisbar. Die Bakterienzahl betrug in den positiven Kulturen zwischen  $10^2$  und  $10^9$  CFU/ml. Alle Patienten mit mindestens einmaligem *Pseudomonas*-Nachweis sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Patientendaten und Ergebnisse der Genotypisierung der *P. aeruginosa*-Isolate. Bei den Patienten Nr. 11 bis 18 wurde keine RAPD-Analyse durchgeführt. RFLP-Typen sind mit lateinischen Zahlen, RAPD-Typen mit arabischen Zahlen bezeichnet. Subtypen (klonale Verwandtschaft) sind durch Kleinbuchstaben dargestellt.

Patientendaten				Methode	<i>Pseudomonas-aeruginosa</i> Genotypen					
Pat.- Nr.	Alter (Jahre)	w/m <sup>A</sup>	Intervall t <sub>1</sub> bis t <sub>2</sub> (Monate)		Untersuchungszeitpunkt t <sub>1</sub>			Untersuchungszeitpunkt t <sub>2</sub>		
				Rachen- abstrich	Sputum	BAL	Rachen- abstrich	Sputum	BAL	
1	34,2	w	22,5	RFLP	n. d. <sup>B</sup>	– <sup>C</sup>	–	–	n. d.	I
				RAPD						
2	17,4	w	23	RFLP	n. d.	–	–	–	–	II
				RAPD						
3	21,3	w	21,5	RFLP	–	n. d.	III	–	n. d.	IV
				RAPD			3			
4	12,3	m	21	RFLP	–	–	–	–	n. d.	V
				RAPD						
5	11,1	m	20,5	RFLP	VI	VI	VI	V	n. d.	VI
				RAPD	6	6	6	5		
6	15,3	m	---	RFLP	n. d.	VIIa	VIIa, VIIb	n. d.	n. d.	n. d.
				RAPD		7	7			
7	14,9	w	22	RFLP	–	VIIIa	VIIIa, VIIIb	VIIIa	n. d.	VIIIa, IX 8, 9
				RAPD		8	8	8		
8	11,0	w	19,5	RFLP	–	n. d.	IX	–	n. d.	IX
				RAPD			9			
9	15,3	m	21	RFLP	VIIIc	n. d.	VIIIc	VIIIc	n. d.	VIIIc, VIIId
				RAPD	8		8	8		
10	12,9	w	19,5	RFLP	n. d.	–	–	X	n. d.	–
				RAPD				10		

Patientendaten				Methode	<i>Pseudomonas-aeruginosa</i> Genotypen					
Pat.- Nr.	Alter (Jahre)	w/m <sup>A</sup>	Intervall t <sub>1</sub> bis t <sub>2</sub> (Monate)		Untersuchungszeitpunkt t <sub>1</sub>			Untersuchungszeitpunkt t <sub>2</sub>		
					Rachen- abstrich	Sputum	BAL	Rachen- abstrich	Sputum	BAL
11	15,3	m	---	RFLP	XI	n. d.	XI, XII	n. d.	n. d.	n. d.
12	14,4	w	14,5	RFLP	-	XIII	XIII, XIV	XIII, XV, XVI	XIII, XV, XVI	XIII, XIV, XV, XVI
13	9,1	m	20	RFLP	-	n. d.	XVII	-	n. d.	-
14	6,4	w	19	RFLP	-	XVIII	XVIII	-	n. d.	XVIII
15	8,7	w	16	RFLP	XVIII	XVIII	XVIII	-	XVIII	XVIII
16	16,3	m	19	RFLP	-	-	-	-	XIX	XIX
17	5,2	w	18	RFLP	-	-	-	-	n. d.	XX
18	14,4	w	21,5	RFLP	XXI	XXI	XXI	n. d.	+ <sup>D</sup>	+

<sup>A</sup>w = weiblich, m = männlich; <sup>B</sup>nicht durchgeführt; <sup>C</sup>Kultur *P. aeruginosa*-negativ;

<sup>D</sup>Kultur *P. aeruginosa*-positiv, jedoch keine Genotypisierung durchgeführt

Die regelmäßig durchgeführten Lungenfunktionsuntersuchungen zeigten bei den Patienten mit *Pseudomonas*-Nachweis über den Untersuchungszeitraum von je 18 Monaten einen mittleren Abfall des FEV<sub>1</sub> von 95% auf 87% des Solls.

### 3.2 Vorhersagewerte der Atemwegsproben

Sensitivität, Spezifität und prädiktive Werte der mikrobiologischen Kulturen aus dem oberen Respirationstrakt sind in Tabelle 4 dargestellt. Die BAL wurde als Goldstandard definiert.

Tabelle 4: Sensitivität, Spezifität und prädiktive Werte (gerundete Prozentwerte).

%	Sensitivität	Spezifität	PPW <sup>A</sup>	NPW <sup>B</sup>
Rachenabstrich				
Nicht-Sputumproduzenten	36	96	83	74
Sputumproduzenten	40	100	100	46
Sputum				
Sputumproduzenten	92	100	100	94

<sup>A</sup>Positiver prädiktiver Wert, <sup>B</sup>Negativer prädiktiver Wert

### 3.3 Vergleich der Typisierungsmethoden

Die Genotypisierung der *Pseudomonas*-Isolate erfolgte mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese nach DNA-Makrorestriktion des bakteriellen Genoms mit dem Restriktionsenzym *Spe I* sowie mittels RAPD-Analyse unter Verwendung unterschiedlicher Primer. Sowohl RAPD als auch RFLP waren zu 100% in der Lage, einen Fingerprint für jedes *Pseudomonas*-Isolat zu erzeugen. Die Diskriminationsfähigkeit der RAPD, zwischen unterschiedlichen Stämmen zu unterscheiden, war für die meisten der getesteten Primer ähnlich hoch (Tabelle 5). Lediglich die 10-mer Primer 208 und 272 erzeugten viele Artefakte, und die Wiederholung der PCR aus demselben DNA-Ansatz führte häufig zu unterschiedlichen Bandenmustern. Darüber hinaus stimmten die Typisierungsmuster, die mittels 10-mer Primer generiert wurden, nur unzureichend mit denen der anderen Primer und der RFLP überein. Die anderen vier Primer zeigten eine gute Reproduzierbarkeit der DNA-Polymorphismen. Gelegentlich wurden leichte Abweichungen in der Stärke der Bandenmuster beobachtet, ebenso wie gelegentlich durch Artefakte bedingte Abweichungen einiger Minor-Banden. Der Primer M13 uni wurde für die weiteren

RAPD-Analysen benützt, da er unter allen getesteten Primern die höchste Reproduzierbarkeit besaß und in der Regel eine hohe Anzahl an Amplifikationsprodukten generierte. Insgesamt stellte die RAPD eine schnelle und sichere Methode zur Identifikation unterschiedlicher Stämme dar.

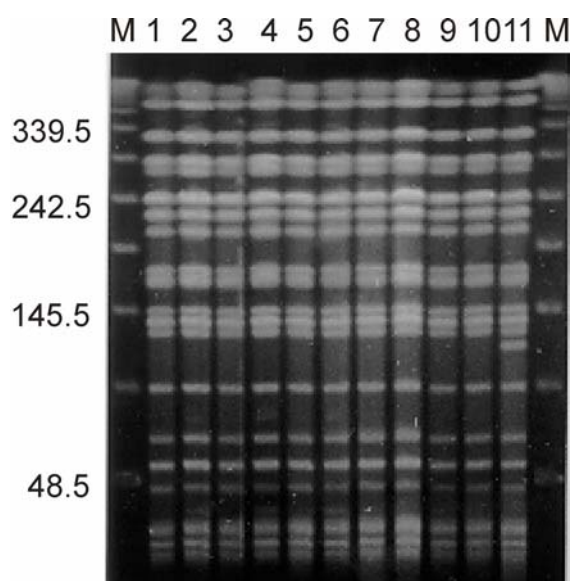
Die DNA-Makrorestriktionsanalyse zeigte in unseren Untersuchungen ebenfalls ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit und Diskriminationsfähigkeit. Die Reproduzierbarkeit beider Typisierungstechniken ist in Tabelle 5 dargestellt. Für die RAPD-Analyse war die Reproduzierbarkeit signifikant niedriger als für die DNA-Makrorestriktion ( $p = 0,018$ ).

Tabelle 5: Charakterisierung, Diskriminationsfähigkeit und Reproduzierbarkeit der RAPD-Primer und des Restriktionsenzym *Spe I*.

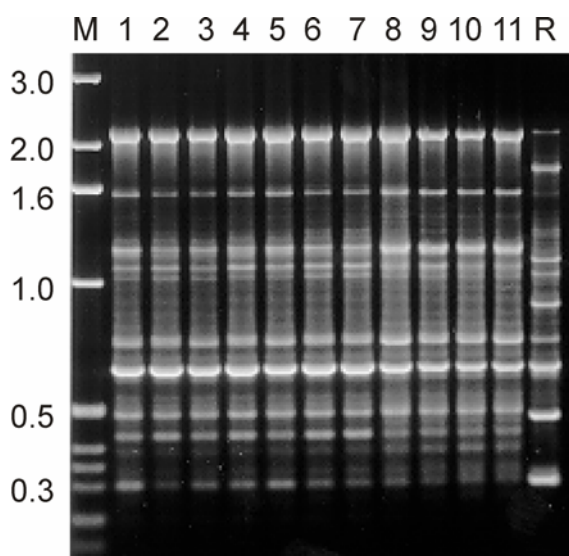
Primer/ Enzym	Beschreibung und Sequenz/ Schnitt bei Sequenz (5' zu 3')	Diskriminations- fähigkeit	Reproduzierbarkeit in mittleren %
208	ACGGCCGACC	variabel	53
272	AGCGGGCCAA	variabel	64
T3B	t-DNA intergenic spacer region AGGTCGCGGGTTCGAATCC	hoch	91
(GTG) <sub>5</sub>	GTGGTGGTGGTGGTG	hoch	84
M13 core	Core-Sequenz des M13-Phagen GAGGGTGGCGTTCT	hoch	92
M13 uni	Universalsequenz des M13-Phagen TTATGAAACGACGGCCAGT	hoch	95
<i>Spe I</i>	5'-ACTAGT	hoch	100

Bei drei Patienten (Nr. 6, 7 und 9) konnte die DNA-Makrorestriktionsanalyse genetische Alterationen in Form von Verlust oder Hinzugewinn einzelner Banden detektieren (RFLP-Typen VIIa und b bzw. VIIIa, b, c und d; Abbildung 1) und somit als jeweils genetisch verwandt klassifizieren, während die Isolate von der RAPD als genetisch identisch eingestuft wurden.

Abbildung 1: (a) PFGE und (b) RAPD Fingerprints von *P. aeruginosa*-Isolaten aus dem Respirationstrakt von Patient Nr. 9. Eine neue Bande (ungefähre Größe 125 kb) war bei einem der beiden Isolate aus der BAL zum Zeitpunkt  $t_2$  durch die RFLP nachweisbar (Bahn 11), während durch die RAPD keine Unterschiede zwischen den Isolaten erkennbar waren (Isolate der Bahnen 1 bis 5: Rachenabstrich zu  $t_1$ , Bahnen 6 und 7: BAL zu  $t_1$ , Bahnen 8 und 9: Rachenabstrich zu  $t_2$ , Bahnen 10 und 11: BAL zu  $t_2$ ). Bahn R: *P. aeruginosa*-Referenzstamm, Bahn M: Molekularer Größen-Marker (Größenangabe in Kilobasen).



(a) PFGE Fingerprint



(b) RAPD Fingerprint

### 3.4 *Pseudomonas*-Stämme und Subtypen

77 der 80 *P. aeruginosa*-Isolate wurden mittels Genotypisierung charakterisiert, für drei Isolate lagen aus organisatorischen Gründen keine Typisierungsdaten vor. Die Typisierungsergebnisse sind in Tabelle 3 aufgeführt. Bei acht Patienten wurden die Isolate lediglich mittels DNA-Makrorestriktion, bei allen anderen zusätzlich durch eine RAPD typisiert.

Jeder *Pseudomonas*-positive Patient war von mindestens einem wirtstypischen Stamm kolonisiert. Die Patienten Nr. 4 und 5 waren zum zweiten Untersuchungszeitpunkt mit einem identischen Isolat infiziert. Ob dies durch eine Patient-zu-Patient-Transmission oder eine gemeinsame Infektionsquelle bedingt ist, konnte nicht geklärt werden. In der zweiten BAL wurde bei Patient Nr. 7 der wirtstypische Stamm von Patient Nr. 8 nachgewiesen, was auf eine Übertragung schließen lässt. Bei Patienten Nr. 7 und 9 wurden darüber hinaus genetisch verwandte Stämme in den Atemwegen nachgewiesen. Dies wäre durch eine früher zurückliegende Infektion an einer gemeinsamen Quelle und unterschiedliche genetische Anpassungsmechanismen im Laufe der Zeit erklärbar. Patienten Nr. 14 und 15 sind Geschwister und beherbergten genetisch identische Isolate in den Atemwegen.

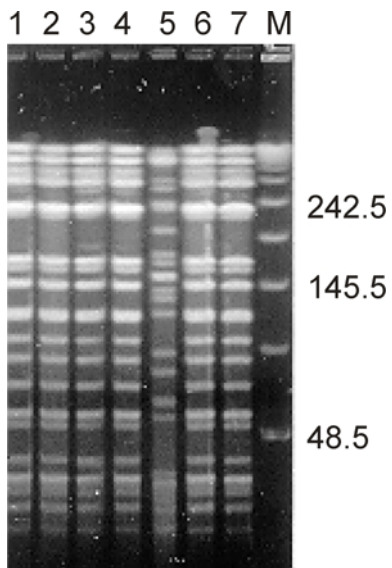
In neun bzw. zehn Fällen war ein Vergleich der Genotypen zwischen Rachenabstrich und BAL bzw. Sputum und BAL möglich. Die Genotypen der *Pseudomonas*-Isolate, welche mittels Bronchoskopie gewonnen wurden, unterschieden sich von denen des oberen Respirationstrakts in bis zu 56% der Fälle (Tabelle 6). Bei einigen Patienten waren die unterschiedlichen Isolate wie unten beschrieben miteinander verwandt, während die BAL bei den Patienten Nr. 7, 11 und 12 zusätzliche, mit dem wirtstypischen Isolat genetisch nicht verwandte Stämme detektierte.

Bei Patient Nr. 5 wurde ein neuer Stamm im Rachenabstrich zum zweiten Untersuchungszeitpunkt kultiviert, während der erstkolonisierende Stamm über den gesamten Untersuchungszeitpunkt in der Lunge persistierte. Die Genotypisierung dieser Isolate deutete eher auf eine Co-Infektion als auf eine Mutation des alten Stammes, da sich das Bandenmuster in mehr als 6 Banden unterschied (Abbildung 2).

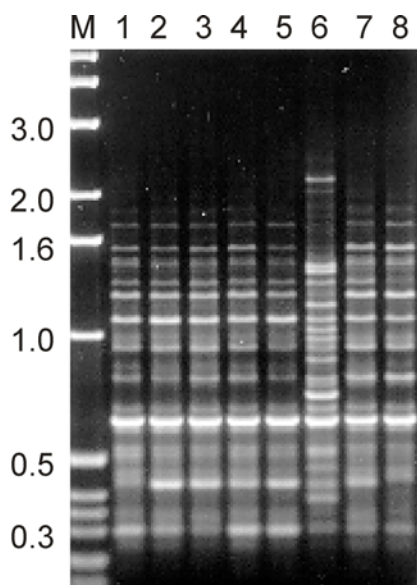
Tabelle 6: Vergleich der Genotypen aus verschiedenen Proben des Respirationstrakts innerhalb desselben Individuums.

	Bronchoskopie	
	Anzahl der Untersuchungen mit	
	identischen Isolaten	unterschiedlichen Isolaten
Rachenabstrich	4/9	5/9
Sputum	6/10	4/10

Abbildung 2: (a) PFGE und (b) RAPD Fingerprints von *P. aeruginosa*-Isolaten aus dem Respirationstrakt von Patient Nr. 5. Ein neuer Stamm wurde aus dem Rachenabstrich zu  $t_2$  isoliert (Bahn 5), während die Isolate von  $t_1$  (Bahn 1: Rachenabstrich, Bahn 2: Sputum, Bahnen 3a/b und 4: BAL) und die Isolate aus den tiefen Atemwegen zu  $t_2$  (Bahnen 6 und 7: BAL) identisch waren. Bahn M: Molekularer Größen-Marker.



(a) PFGE Fingerprint



(b) RAPD Fingerprint

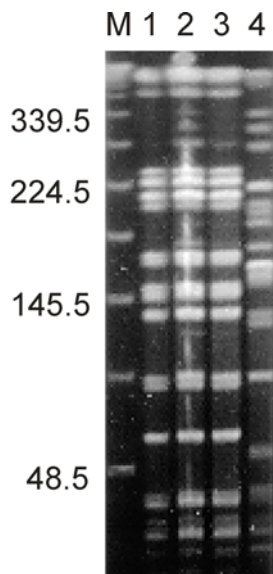
Verlust oder Hinzugewinn von einzelnen Restriktionsbanden in der RFLP wurde bei einigen Stämmen in der BAL bei den Patienten Nr. 6, 7 und 9 beobachtet, was auf eine nahe Verwandtschaft zu den initial kolonisierenden Isolaten hindeutet (Abbildung 1). Bei acht Patienten konnten longitudinale genetische Veränderungen nachgewiesen werden (Tabelle 7). Mittels DNA-Makrorestriktion konnte ein Hinzugewinn von neuen Stämmen in vier Untersuchungen gezeigt werden.

Tabelle 7: Longitudinale genetische Veränderungen des PFGE-Genotyps, unabhängig vom Ort des Erregernachweises.

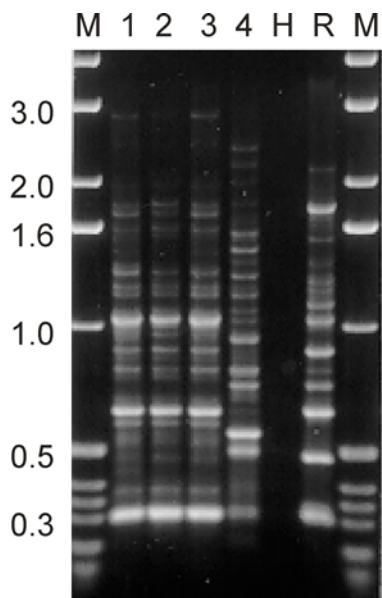
Anzahl der Patienten mit				
ohne Änderung	Stammpersistenz		Stammverlust	Stammaustausch
	und zusätzlichem Stamm verwandt	unverwandt		
3/8	1/8	3/8	0/8	1/8

Ein Austausch des kolonisierenden Stammes war bei Proband Nr. 3 evident, der seinen wirtstypischen *Pseudomonas*-Stamm zum zweiten Untersuchungszeitpunkt verloren hatte, jedoch mit einem neuen, genetisch unverwandten Stamm infiziert war (Abbildung 3). In vier Fällen waren diese longitudinalen Alterationen des Genotyps ausschließlich mit bronchoskopisch gewonnenen Proben nachweisbar (Patienten Nr. 3, 7, 9 und 12).

Abbildung 3: (a) PFGE und (b) RAPD Fingerprints von *P. aeruginosa*-Isolaten aus dem Respirationstrakt von Patient Nr. 3. Ein neuer Stamm war in der BAL zu  $t_2$  nachweisbar (Bahn 4), während der ursprüngliche Stamm nicht mehr nachweisbar war (Bahnen 1, 2 und 3: BAL zu  $t_2$ ). Bahn H: Leerprobe, Bahn R: *Pseudomonas*-Referenzstamm, Bahn M: Molekularer Größen-Marker.



(a) PFGE Fingerprint



(b) RAPD Fingerprint

## 4 Diskussion

Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um *P. aeruginosa*-Isolate aus den oberen und unteren Atemwegen sequentiell molekulargenetisch zu typisieren. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Typisierungsmethoden angewendet und verglichen. Zusätzlich wurde die diagnostische Wertigkeit von Rachenabstrich- und Sputumkulturen bezüglich des Nachweises einer *Pseudomonas*-Infektion der tiefen Atemwege evaluiert.

### 4.1 Diagnostische Wertigkeit von mikrobiologischen Kulturen

In den vorliegenden Untersuchungen besaßen Rachenabstrichkulturen eine geringe Sensitivität und einen geringen negativen Vorhersagewert für das Erkennen einer Kolonisation der tiefen Atemwege von CF-Patienten mit *P. aeruginosa*. Dagegen lag nur in einem von 18 Fällen eine falsch negative Sputumkultur in bezug auf die Bronchoskopie vor, bei gleichzeitig hoher Sensitivität. Allerdings konnten Sputumproben lediglich in 28 Fällen (40,6%) entnommen werden, da viele Patienten kein Sputum produzieren konnten. Diese Ergebnisse sind auf Grund der niedrigen Fallzahlen nicht statistisch signifikant, jedoch lässt sich eine eindeutige Tendenz erkennen.

Einige wenige frühere Studien haben Proben aus BAL, Sputum und Rachenabstrich von CF-Kindern (29, 31, 32) und Erwachsenen (28, 30) mit unterschiedlichen Ergebnissen verglichen. Armstrong et al. (29) evaluierte prospektiv über einen Zeitraum von 30 Monaten Rachenabstriche und Sputumproben von 75 Kindern im Alter von 1 bis 25 Monaten mit CF und milder Lungenerkrankung. Hierbei zeigte sich, dass der fehlende Nachweis von *P. aeruginosa* im Rachenabstrich bei symptomatischen Kindern eine Infektion der tiefen Atemwege nicht ausschließt. Diese Daten wurden durch Ramsey et al. (31) anhand Untersuchungen bei 43 jungen CF-Patienten (mittleres Alter 8,2 Jahre) in gutem respiratorischem Zustand bestätigt. In einer multizentrischen Studie, welche Patientendaten der beiden zuvor genannten Studien mit einschloss, analysierte Rosenfeld et al. (32) Proben von 141 CF-Patienten in einem Alter bis fünf Jahren ohne vorhergehende pulmonale Exazerbationen. In dieser Altersklasse waren Rachenabstrichkulturen für den *Pseudomonas*-Nachweis hilfreich, da Spezifität und negativer Vorhersagewert der Rachenabstriche hoch waren. Niedrige Sensitivität und positiver prädiktiver Wert zeigten jedoch, dass ein positiver Rachenabstrich nicht

zuverlässigerweise eine Kolonisation der tiefen Atemwege repräsentierte.

Von einer guten Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des Rachenabstrichs und der BAL berichtete Konstan et al. (28). In dieser Studie wurden 18 klinisch stabile CF-Patienten über 11 Jahren mit moderater Lungenbeteiligung bronchoskopiert. Allerdings war die Erkrankung weiter fortgeschritten als bei den Patienten unserer Studie und der Kollektive von Armstrong, Ramsey und Rosenfeld, und die Prävalenz der *Pseudomonas*-Besiedlung lag deutlich höher (88,9% im Vergleich zu 47,4% in unserer Studie).

Baughmann et al. (30) untersuchte den Nutzen der Bronchoskopie und der semiquantitativen BAL für die Identifizierung bakterieller Mikroorganismen, in erster Linie *P. aeruginosa*, bei 11 erwachsenen CF-Patienten mit schwerer obstruktiver Lungenerkrankung. Die Indikation zur Bronchoskopie war ein klinisch unbefriedigender Verlauf trotz resistogrammgerechter antibiotischer Therapie. In 41% der Fälle wurde ein in der BAL nachgewiesenes *P. aeruginosa*-Isolat nicht in einer simultanen Sputumprobe gefunden. 46% der Bronchoskopien führten zu einer Änderung in der antibiotischen Therapie, entweder weil in der BAL ein neuer Keim entdeckt wurde, oder aufgrund des Antibiogramms.

Die beschriebenen Daten lassen den Schluss zu, dass Sensitivität und Spezifität von Rachenabstrichkulturen vom Alter der Patienten und dem Status der Lungenmanifestation abhängig ist. Offensichtlich hat bereits in einer frühen Krankheitsphase eine Kolonisation der tiefen Atemwege mit *P. aeruginosa* stattgefunden, während sich dies noch nicht zwangsläufig im Rachenabstrich widerspiegelt. Erst zu einem späteren Zeitpunkt kolonisiert der Erreger chronisch beide Kompartimente, so dass Rachenabstriche mit Sputumproben konkordant sind und die bakterielle Flora der tiefen Atemwege adäquat repräsentieren.

In der vorliegenden Studie wurden Bronchoskopie und BAL von allen Patienten gut vertragen. Die Bronchoskopie stellt jedoch keine Standardmethode in der routinemäßigen mikrobiologischen Diagnostik dar. Induziertes Sputum wurde in dieser Studie nicht gewonnen. Da mit Hilfe von Sputumproben *P. aeruginosa*-Kolonisationen der tiefen Atemwege von CF-Patienten mit hoher Sensitivität und mit hohen prädiktiven

Werten nachweisbar waren, kann spekuliert werden, dass Kulturen aus induziertem Sputum von Patienten, die spontan nicht expektorieren können, ähnlich zuverlässige Ergebnisse wie die BAL erbringen. Diese These wird unterstützt durch die Ergebnisse einer im Jahr 2000 veröffentlichten Studie mit induziertem Sputum (70), wenngleich die Autoren keinen Vergleich von Kulturen aus induziertem Sputum und BAL führten. Darüber hinaus zeigte eine neuere Arbeit der BEAT-Gruppe, dass induziertes Sputum, verglichen mit Bronchialsekret, auch im Hinblick auf eine Beschreibung der Atemwegsinflammation als repräsentativ für die tiefen Atemwege gelten kann (71).

#### **4.2 Methoden der Genotypisierung**

Unter den zahlreichen Typisierungsmethoden, die derzeit zur Differenzierung von *Pseudomonas*-Isolaten verwendet werden, wurden zwei Techniken ausgewählt und appliziert, die in den letzten Jahren häufig für *P. aeruginosa*-Isolate von Mukoviszidose-Patienten herangezogen wurden: eine RFLP-Technik mit DNA-Makrorestriktion und anschließender Auftrennung mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) sowie eine PCR-basierte RAPD-Analyse. Eine einheitliche Empfehlung oder ein Konsens zur Genotypisierung existiert zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht. Die PFGE-Methode hat sich jedoch in jüngster Zeit als die am häufigsten benutzte Technik etablieren können, und verschiedene Autoren forderten ein international standardisiertes Protokoll für die PFGE-basierte Genotypisierung von *P. aeruginosa* (45).

Die Idee, große DNA-Restriktionsfragmente nach Enzymverdau in einem großporigen Elektrophoresegel unter dem Einfluss zweier gepulster elektrischer Felder laufen zu lassen, geht zurück auf Versuche von Schwartz und Cantor 1984 (72) sowie Carle und Olson 1985 (73). Diese Methode, bei dem die elektrischen Felder in einem bestimmbar Winkel zueinander angebracht sind, ermöglicht die Auftrennung von Makromolekülen mit einer Größe von über 50 kb. Die unterschiedliche Laufgeschwindigkeit der Banden wird hierbei durch die stetige Neuausrichtung der Fragmente im wechselnden elektrischen Feld erzielt, bei der die größeren Fragmente mit der Zeit zurückbleiben. In der DNA-Typisierung von Bakterien, Pilzen und Parasiten hat sich diese Technik in den letzten Jahren fest etablieren können.

Im Jahr 1990 entwickelten zwei unabhängige Arbeitsgruppen eine auf der Polymerasekettenreaktion basierende Methode, bei der durch die Verwendung von Primern mit willkürlich ausgewählten Nukleotidsequenzen eine Amplifizierung von unspezifischen DNA-Segmenten erfolgt (74, 75). Dieses, quasi dem Zufallsprinzip unterliegendes Fingerprinting wird als Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD) oder Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) bezeichnet. Unzählige Mikroorganismen wurden seitdem mit dieser Methode typisiert. Je nach Auswahl des Primers werden Bandenmuster unterschiedlicher Komplexität erzeugt; aus diesem Grund müssen für jede Spezies optimale Primer ermittelt werden.

Alle *Pseudomonas*-Isolate konnten mit Hilfe der beiden beschriebenen Typisierungsmethoden zuverlässig charakterisiert werden. Die Techniken zeigten bei den ausgewählten Primern und Enzymen eine hohe Konkordanz bezüglich der generierten Fingerprints. Eine Ausnahme bestand für die beiden 10-mer Primer, die in wiederholten Versuchen viele Artefakte zeigten und sich, entgegen den Beschreibungen anderer Autoren (53), in unseren Untersuchungen nicht zur Genotypisierung eigneten. Die DNA-Makrorestriktion mit dem Restriktionsenzym *Spe I* war im Gegensatz zur RAPD-Analyse in der Lage, zwischen identischen Isolaten und nah verwandten Subtypen zu differenzieren. Die Reproduzierbarkeit lag ebenfalls etwas höher als die der PCR-basierten Methode, so dass die RFLP mit anschließender PFGE als gute Methode für eine epidemiologisch differenzierte Typisierung von *P. aeruginosa* empfohlen werden kann. In jüngster Zeit nutzten verschiedene Arbeitsgruppen diese Technik, um die Übertragung und Verbreitung von definierten multiresistenten *Pseudomonas*-Stämmen zu untersuchen und eine entsprechende Isolierung der Patienten auf der Basis genotypischer Kriterien zu fordern (76, 77). Da die PFGE-Methode jedoch zeitaufwendig und teuer ist, schließen wir uns dem Vorschlag anderer Autoren an (41, 42, 59, 62), die Applikation einer schnellen, PCR-basierten Methode, wie der RAPD mit dem Primer M13 uni, für das initiale Screening größerer Zahlen von *Pseudomonas*-Isolaten heranzuziehen, und die DNA-Makrorestriktionsanalyse konfirmatorisch oder für eine akkurate Antwort auf epidemiologische Fragestellungen zu verwenden.

### 4.3 Intraindividuelle und longitudinale Variabilität der *Pseudomonas*-Genotypen

Die Genotypisierung der *P. aeruginosa*-Isolate demonstrierte, dass in einer nicht unerheblichen Anzahl der Fälle unterschiedliche Stämme in den verschiedenen Etagen des Respirationstrakts desselben Individuums nachgewiesen werden können. Besonders die Genotypen der Isolate der oberen Atemwege, d. h. aus Rachenabstrich und Sputum, divergieren sehr häufig zu den Stämmen aus der Bronchoskopie. Im Gegensatz zu früheren Studien an CF-Patienten, die sich auf Rachenabstrich- und Sputumproben beschränkten, evaluierte diese Studie erstmals sequentiell die genetischen Beziehungen und Veränderungen von *P. aeruginosa* anhand Kulturen aus den oberen und unteren Atemwegen einschließlich der BAL. Wenngleich kleinere und größere Abweichungen des Genotyps in allen Kompartimenten des Respirationstrakts nachgewiesen werden konnten, so waren longitudinale Variationen mehrfach nur durch die Bronchoskopie erkennbar. Auf Grund kleiner Fallzahlen und des relativ kurzen Untersuchungszeitraums von 18 Monaten war keine Korrelation zwischen den Alterationen auf genetischer Ebene und dem klinischen Verlauf erkennbar.

Molekulargenetische Typisierungen von *P. aeruginosa* aus den oberen Etagen der Atemwege deuten darauf hin, dass die meisten CF-Patienten mit einem oder wenigen Stämmen für längere Zeiträume kolonisiert sind (16, 23, 49, 53, 62). Diese Theorie konnten wir anhand bronchoskopisch gewonnener Isolate für die tiefen Atemwege bestätigen. Auch von Co-Infektionen mit einem oder mehreren Stämmen und von Stammersatz wird, wie auch in der vorliegenden Studie gezeigt, in der Literatur berichtet (49, 53, 62). Wir konnten jedoch darüber hinaus nachweisen, dass longitudinale Anpassungsmechanismen des bakteriellen Genoms ein häufiges Phänomen darstellen. Offensichtlich kommt es im Verlauf der *Pseudomonas*-Besiedlung neben einer Selektion der überlebensfähigeren Stämme auch zu einer Mikroevolution der einzelnen Stämme auf molekularer Ebene. Dies dürfte das genetische Korrelat der seit langem bekannten phänotypischen Anpassungsvorgänge von *P. aeruginosa* darstellen, ohne dass dieser direkte Zusammenhang bisher gezeigt werden konnte. Unterstützt werden diese Ergebnisse von einer jüngeren Arbeit der Arbeitsgruppe um Oliver et al. (16), die erstmals nachwies, dass der Anteil hypermutabler *Pseudomonas*-Stämme bei CF-Patienten sehr hoch sein kann.

Die Arbeitsgruppe um Armstrong (29) war vor uns die einzige, die Genotypisierungen von *P. aeruginosa*-Isolaten aus der BAL von CF-Patienten durchführte. Bei neun aus 75 zufällig ausgewählten simultanen Rachenabstrich- und BAL-Kulturen wurden konkordante Genotypen in acht Fällen beobachtet. Die Autoren untersuchten jedoch nicht den longitudinalen Verlauf der Genomovare.

Die hier vorgestellten Daten implizieren die Frage, von wie vielen und von welchen Etagen des Respirationstrakts mikrobiologische Kulturen in der Routine gewonnen werden sollten. Sputumproben haben mehrfach ihre Überlegenheit gegenüber Rachenabstrichkulturen gezeigt, selbst wenn diese standardisiert und mit höchstmöglicher Präzision durchgeführt wurden. Bei Patienten, die spontan kein Sputum produzieren können, wird durch die Gewinnung von induziertem Sputum möglicherweise eine größere Zuverlässigkeit des Erregernachweises erreicht als durch Rachenabstriche. Gegenüber der BAL haben Sputumkulturen den theoretischen Vorteil, dass sie das bakterielle Milieu von mehr als einer Region des Bronchialbaumes reflektieren. Diese Fragen müssen in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Auch sind weitere longitudinale Studien an CF-Patienten erforderlich, um die klinische Relevanz der beobachteten genetischen Anpassungsvorgänge der *Pseudomonas*-Isolate zu erfassen. Wir empfehlen, im Falle einer therapieresistenten pulmonalen Exazerbation eine bronchoskopische Erregergewinnung zu versuchen. Zusätzlich zu ihrem Stellenwert in der klinischen Diagnostik ist die Durchführung einer BAL notwendig, um epidemiologische Fragestellungen hinreichend zu beantworten und longitudinale Anpassungsvorgänge des bakteriellen Genoms innerhalb der Atemwege beurteilen zu können.

## 5 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen darauf hin, dass bei Mukoviszidose-Patienten für einen eindeutigen und zuverlässigen Nachweis von *P. aeruginosa* Kulturen aus verschiedenen Ebenen des Respirationstrakts angezüchtet werden sollten. Sputumproben sind hierbei dem Rachenabstrich vorzuziehen, da Rachenabstrichproben für den Nachweis einer Infektion der tieferen Atemwege nicht aussagekräftig sind. Bei expektorierenden Patienten besteht eine gute Übereinstimmung zwischen dem Erregernachweis aus Sputum und BAL-Sekret, so dass eine BAL nur im Falle einer Therapieresistenz erwogen werden sollte. Bei jüngeren Patienten, die häufig noch kein Sputum produzieren, könnte durch die Gewinnung von induziertem Sputum die Sicherheit der mikrobiologischen Diagnostik erhöht werden.

Für die molekulargenetische Charakterisierung der bakteriellen Isolate ist die DNA-Makrorestriktion mit anschließender PFGE der RAPD-Analyse überlegen, da auch zwischen nah verwandten und identischen Isolaten unerschieden werden kann. Die DNA-Makrorestriktion kann somit als zuverlässige und aussagekräftige Methode zur Typisierung von *P. aeruginosa*-Isolaten empfohlen werden.

Die Analyse der *Pseudomonas*-Genotypen, welche aus BAL, Rachenabstrich und Sputum gewonnen wurden, zeigte, dass innerhalb der Atemwege eines Individuums unterschiedliche Stämme co-existieren können und genetische Adaptationsvorgänge häufig sind. Anhand zwei sequentieller Untersuchungen im Abstand von 18 Monaten konnten Modifikationen des ursprünglichen Stammes, Stammverlust, Stammersatz und Co-Infektionen beobachtet werden. Etwa die Hälfte dieser genetischen Heterogenität und der longitudinalen Alterationen war ausschließlich durch bronchoskopisch gewonnenes Sekret nachweisbar. Die bronchoalveoläre Lavage stellt somit ein wichtiges Instrument zur zuverlässigen Beantwortung infektiologischer und epidemiologischer Fragen dar.

## Literaturverzeichnis

1. Welsh MJ, Smith AE. Cystic fibrosis. *Sci Am* 1995, 273(6): 52-59.
2. Busch R. On the history of cystic fibrosis. *Acta Univ Carol [Med] (Praha)* 1990, 36(1-4): 13-15.
3. Fanconi G, Uehlinger E, Knauer C. Das Coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer Pankreasfibromatose und Bronchiektasen. *Wien Med Wochenschr* 1936, 86: 753-756.
4. Anderson DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: clinical and pathological study. *Am J Dis Child* 1938, 56: 344-399.
5. Farber S. Some organic digestive disturbances in early life. *Michigan Med Soc* 1945, 44: 587-594.
6. Di Sant' Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas, its clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* 1953, 12: 549-563.
7. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in cystic fibrosis using pilocarpine by electrophoresis. *Pediatrics* 1959, 23: 549-563.
8. Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989, 245: 1066-1072.
9. Tsui LC, Buchwald M, Barker D et al.. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic marker. *Science* 1985, 230: 1054-1057.
10. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Cystic Fibrosis Mutation Data Base. 13.07.2003, <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>.
11. Merlo CA, Boyle MP. Modifier genes in cystic fibrosis lung disease. *J Lab Clin Med* 2003, 141: 237-241.
12. Orenstein DM, Winnie GB, Altman H. Cystic fibrosis: A 2002 update. *J Pediatr* 2002, 140: 156-164.
13. Brennan AL, Geddes DM. Cystic fibrosis. *Curr Opin Infect Dis* 2002, 15: 175-182.
14. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2002, 15(2): 194-222.
15. Hoiby N, Johansen HK, Moser C, Song Z, Ciofu O, Kharazmi A. *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microb Infect* 2001, 3: 23-35.

16. Oliver A, Cantón R, Campo P, Baquero F, Blázquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 2000, *288*: 1251-1253.
17. Davies JC. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. *Pediatr Respir Rev* 2002, *3*: 128-134.
18. Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 1997, *88*: 553-560.
19. Davies J, Dewar A, Bush A, Pitt T, Gruenert D, Geddes DM, Alton EW. Reduction in the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to native cystic fibrosis respiratory epithelium with anti-asialo-GM1 antibody and neuraminidase inhibition. *Eur Respir J* 1999, *13*: 565-570.
20. Döring G, Conway SP, Heijermann HG, Hodson ME, Hoiby N, Smyth A, Touw DJ. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J* 2000, *16*: 749-767.
21. Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, Hiatt P, McCoy K, Castile R, Smith AL, Ramsey BW. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 2001, *183*: 444-452.
22. Ratjen F. Early interventions in CF. *Pediatr Pulmonol* 2004, *Suppl 26*: 88-90.
23. Römling U, Fiedler B, Boßhammer J, Grothues D, Greipel J, von der Hardt H, Tümmler B. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1994, *170*: 1616-1621.
24. Costerton JW. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends Microbiol* 2001, *9(2)*: 50-52.
25. Khan TZ, Wagener JS, Bost T. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995, *151*: 1075-1082.
26. Armstrong DS, Grimwood K, Carlin JB, Carzino R, Gutierrez JP, Hull J, Olinsky A, Phelan EM, Robertson CF, Phelan PD. Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997, *156*: 1197-1204.
27. Dakin CJ, Numa AH, Wang HE, Morton JR, Vertzyas CC, Henry RL. Inflammation, infection, and pulmonary function in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, *165*: 904-910.

28. Konstan MW, Hilliard KA, Norvell TM, Berger M. Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, *150*: 448-454.
29. Armstrong DS, Grimwood K, Carlin JB, Carzino R, Olinsky A, Phelan PD. Bronchoalveolar lavage or oropharyngeal cultures to identify lower respiratory tract pathogens in infants with cystic fibrosis. *Paediatr Pulmonol* 1996, *21*: 267-275.
30. Baughman RP, Keeton DA, Perez C, Wilmott RW. Use of bronchoalveolar lavage semiquantitative cultures in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997, *156*: 286-291.
31. Ramsey BW, Wentz KR, Smith AL, Richardson M, Williams-Warren J, Hedges DL, Gibson R, Redding GJ, Lent K, Harris K. Predictive value of oropharyngeal cultures for identifying lower airway bacteria in cystic fibrosis patients. *Am Rev Respir Dis* 1991, *144*: 331-337.
32. Rosenfeld M, Emerson J, Accurso F, Armstrong D, Castile R, Grimwood K, Hiatt P, McCoy K, McNamara S, Ramsey B. Diagnostic accuracy of oropharyngeal cultures in infants and young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1999, *28*: 321-328.
33. Fyfe JAM, Harris G, Govan JRW. Revised pyocin typing method for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 1984, *20(1)*: 47-50.
34. Pitt TL. Epidemiological typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988, *7(2)*: 238-247.
35. The International *Pseudomonas aeruginosa* Typing Study Group. A multicenter comparison of methods for typing strains of *Pseudomonas aeruginosa* predominantly from patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1994, *169*: 134-142.
36. Ojeniyi B. Polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. A survey. *APMIS* 1994, *102 (Suppl 46)*: 1-44.
37. Bergmans D, Bonten M, van Tiel F, Gaillard C, London N, van der Geest S, de Leeuw P, Stobberingh E. Value of phenotyping methods as an initial screening of *Pseudomonas aeruginosa* in epidemiologic studies. *Infection* 1997, *25(6)*: 350-354.
38. Ogle JW, Janda JM, Woods DE, Vasil ML. Characterization and use of a DNA probe as an epidemiological marker for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 1987, *155(1)*: 119-126.

39. Fegan M, Francis P, Hayward AC, Fuerst JA. Heterogeneity, persistence, and distribution of *Pseudomonas aeruginosa* genotypes in cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 1991, *29(10)*: 2151-2157.
40. Bennekov T, Colding H, Ojeniyi B, Bentzon MW, Hoiby N. Comparison of ribotyping and genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 1996, *34(1)*: 202-204.
41. Bingen E, Bonacorsi S, Rohrlisch P, Duval M, Lhopital S, Brahimi N, Vilmer E, Goering RV. Molecular epidemiology provides evidence of genotypic heterogeneity of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* serotype O:12 outbreak isolates from a pediatric hospital. *J Clin Microbiol* 1996, *34(12)*: 3226-3229.
42. Renders N, van Belkum A, Barth A, Goessens W, Mouton J, Verbrugh H. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis: phenotyping versus genotyping. *Clin Microbiol Infect* 1996, *1(4)*: 261-265.
43. Hernandez J, Ferrus MA, Hernandez M, Owen RJ. Arbitrary primed PCR fingerprinting and serotyping of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997, *17*: 37-47.
44. Mereghetti L, Marquet-van der Mee N, Loulergue J, Rolland JC, Audurier A. *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients: a study using whole cell RAPD and antibiotic susceptibility. *Path Biol* 1998, *46(5)*: 319-324.
45. Moore JE, Elborn JS, Murphy PG, Gilligan PH, Fanning S, Hogg G. Towards "molecular Esperanto" or the tower of Babel? (The need for harmonization of techniques for genotyping clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis). *J Clin Microbiol* 2003, *41(11)*: 5347-5348.
46. Buchholz P, Richter M, Fiedler G, Halle E. Epidemiological fingerprinting of multi-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients of intensive care units of the Charité Hospital, Berlin. *Med Microbiol Lett* 1995, *4*: 7-13.
47. Grundmann H, Schneider C, Hartung D, Daschner FD, Pitt TL. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 1995, *33*: 528-534.
48. Renders N, Römling U, Verbrugh H, van Belkum A. Comparative typing of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplified polymorphic DNA or pulsed-field gel electrophoresis of DNA macrorestriction fragments. *J Clin Microbiol* 1996, *34*: 3190-3195.

49. Struelens MJ, Schwam V, Deplano A, Baran D. Genome macrorestriction analysis of diversity and variability of *Pseudomonas aeruginosa* strains infecting cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 1993, *31*: 2320-2326.
50. Talon D, Cailleaux V, Thouverez M, Michel-Briand Y. Discriminatory power and usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Hops Infect* 1996, *32*: 135-145.
51. Döring G, Jansen S, Noll H, Grupp H, Frank F, Botzenhart K, Magdorf K, Wahn U. Distribution and transmission of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in a hospital ward. *Pediatr Pulmonol* 1996, *21*: 90-100.
52. Grothues D, Tümmler B. New approaches in genome analysis by pulsed-field gel electrophoresis: application to the analysis of *Pseudomonas* species. *Mol Microbiol* 1991, *5*: 2763-2776.
53. Mahenthiralingam E, Campbell ME, Foster J, Lam JS, Speert DP. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1996, *34*: 1129-1135.
54. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Pershing DA, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995, *33*: 2233-2239.
55. Speert DP, Campbell E, Henry DA, Milner R, Taha F, Gravelle A, Davidson AGF, Wong LTK, Mahenthiralingam E. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis in British Columbia, Canada. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, *166*: 988-993.
56. Armstrong DS, Nixon GM, Carzino R, Bigham A, Carlin JB, Robins-Browne RM, Grimwood K. Detection of a widespread clone of *Pseudomonas aeruginosa* in a pediatric cystic fibrosis clinic. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, *166*: 983-987.
57. Pitt TL, Sparrow M, Warner M, Stefanidou M. Survey of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from UK patients with cystic fibrosis to six commonly prescribed antimicrobial agents. *Thorax* 2003, *58*: 794-796.
58. Scott FW, Pitt TL. Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales. *J Med Microbiol* 2004, *53*(7): 609-615.
59. Elaichouni A, Verschraegen G, Claeys G, Devleeschouwer M, Godard C, Vaneechoutte M. *Pseudomonas aeruginosa* serotype O12 outbreak studied by

- arbitrary primer PCR. *J Clin Microbiol* 1994, 32: 666-671.
60. Grundmann HJ, Gräser Y, Schönian G, Daschner FD. Randomly primed polymerase chain reaction yields comparable results to restriction fragment analysis in typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Med Microbiol Lett* 1994, 3: 42-48.
  61. Hoogkamp-Korstanje JAA, Meis JFGM, Kissing J, van der Laag J, Melchers WJG. Risk of cross-colonization and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in a holiday camp for cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 1995, 33: 572-575.
  62. Kersulyte D, Struelens MJ, Deplano A, Berg DE. Comparison of arbitrarily primed PCR and macrorestriction (pulsed-field gel electrophoresis) typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 1995, 33: 2216-2219.
  63. Ratjen F, Rietschel E, Griese M, Ballmann M, Kleinau I, Döring G, Reinhardt D, Paul K for the bronchoalveolar lavage for the evaluation of anti-inflammatory treatment (BEAT) study group. Fractional analysis of bronchoalveolar lavage fluid cytology in cystic fibrosis patients with normal lung function. *Eur Respir J* 2000, 15: 141-145.
  64. Paul K, Rietschel E, Ballmann M, Griese M, Worlitzsch D, Shute J, Chen C, Schink T, Döring G, van Koningsbruggen S, Wahn U, Ratjen F. Effect of treatment with dornase alpha on airway inflammation in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004, 169: 719-725.
  65. Claros MC, Citron DM, Hunt-Gerardo S, Goldstein EJC, Schönian G, Montag T, Hampelo B, Dofloff AC. Characterization of indole-negative *Bacteroides fragilis* group species with use of polymerase chain reaction fingerprinting and resistance profiles. *Clin Infect Dis* 1996, 23 (Suppl 1): 66-72.
  66. Gräser Y, Klare I, Halle E, Gantenberg R, Buchholz P, Jacobi HD, Presber W, Schönian G. Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by using polymerase chain reaction fingerprinting. *J Clin Microbiol* 1993, 312: 417-2420.
  67. Schönian G, Schweynoch C, Zlateva K, Oskam L, Kroon N, Gräser Y, Presber W. Identification and determination of the relationships of species and strains within the genus *Leishmania* using single primers in the polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1996, 77: 19-29.
  68. Thanos M, Schönian G, Meyer W, Schweynoch C, Gräser Y Mitchell TG, Presber

- W, Tietz HJ. Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR. *J Clin Microbiol* 1996, *346*: 15-621.
69. Gräser Y, El Fari M, Presber W, Sterry W, Tietz HJ. Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. *Brit J Dermatol* 1998, *138*: 576-582.
70. De Boeck K, Alifier M, Vandeputte S. Sputum inducing in young cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 2000, *169*: 1-94.
71. Reinhardt N, Chen CIU, Loppow D, Schink T, Kleinau I, Jörres RA, Wahn U, Magnussen H, Paul KP. Cellular profiles of induced sputum in children with stable cystic fibrosis: comparison with BAL. *Eur Respir J* 2003, *224*: 97-502.
72. Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed-field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984, *37(1)*: 67-75.
73. Carle GF, Olson MV. An electrophoretic karyotype for yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, *82(11)*: 3756-3760.
74. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990, *18*: 6531-6535.
75. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 1990, *187*: 213-7218.
76. McCallum SJ, Corkill J, Gallagher M, Ledson MJ, Hart CA, Walshaw MJ. Superinfection with a transmissible strain of *Pseudomonas aeruginosa* in adults with cystic fibrosis chronically colonized by *P. aeruginosa*. *Lancet* 2001, *358*: 558-560.
77. Edenborough FP, Stone HR, Kelly SJ, Zadik P, Doherty CJ, Govan JRW. Genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis suggests need for segregation. *J Cystic Fibrosis* 2004, *3*: 37-44.

## **Danksagung**

Herrn Prof. K. Paul danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Mitarbeit an der BEAT-Studie sowie für die jahrelange intensive Zusammenarbeit und vorbehaltlose Unterstützung. Frau Dr. I. Kleinau verdient durch ihre engagierte Betreuung der Arbeit besondere Anerkennung. Ein Dank gebührt Herrn Prof. G. Döring und seiner Arbeitsgruppe, bei der ich die Methoden der DNA-Makrorestriktion und der PFGE erlernen durfte. Den Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie der Charité unter der Leitung von Herrn Prof. U. Goebel danke ich für die vielfältige und tatkräftige Unterstützung bei der Projektdurchführung. Insbesondere Frau Dr. G. Schönian und ihre Arbeitsgruppe machte diese Arbeit durch die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Materialien sowie durch geduldige Anleitung, Beratung und Supervision erst möglich. Ein besonderer Dank geht auch an Herrn Prof. M. Griese, der mir die Daten der Münchener Patienten zur Verfügung stellte, sowie an Herrn Prof. A. Bauernfeind und seine Arbeitsgruppe für die hervorragende zentrumsübergreifende Kooperation und wissenschaftliche Unterstützung. Vielen Dank auch an Frau S. Bisson und Frau T. Schink für die statistische Beratung. Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir in all den Jahren in emotionaler und finanzieller Hinsicht zur Seite standen und großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit haben.

Mitglieder der BEAT-Studiengruppe sind Herr Prof. K. Paul, Berlin, Herr Dr. E. Rietschel, Köln, Herr Dr. F. Ratjen, Essen, Herr Prof. H. von der Hardt und Herr Dr. M. Ballmann, Hannover, Herr Prof. G. Döring, Tübingen, sowie Herr Prof. M. Griese und Herr Prof. D. Reinhardt, München.

Finanziell wurde die BEAT-Studie unterstützt von der Forschungsgemeinschaft Mukoviszidose des Mukoviszidose e. V. und von Hoffmann-La Roche.

Auszüge der vorliegenden Arbeit wurden im Jahr 2002 publiziert (Jung A et al., Eur Respir J 2002; 20:1457-1463).

## **Lebenslauf**

Geburtsdatum 17. Oktober 1972  
Geburtsort München  
Nationalität Deutsch  
Familienstand Ledig

### *Schulbildung*

1979 bis 1983 Grundschule, Volksschule Wolfratshausen  
1983 bis 1992 Gymnasium, Icking b. München

### *Zivildienst*

1992 bis 1993 Rettungsdienst und Krankentransport,  
Malteser Hilfsdienst Würzburg

### *Hochschule*

1993 bis 1994 Studium der Neueren Deutschen Literatur,  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
1994 bis 2001 Studium der Humanmedizin,  
Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Freie Universität  
Berlin und Ludwig-Maximilians-Universität München  
2002 Approbation als Arzt

### *Famulaturen (Auszug)*

1997 Abteilung für Neonatologie, Frauenklinik Dr. Geisenhofer, München  
1998 Department of Pediatrics, Division of Pediatric Infectious Diseases,  
State University of New York, HSC Brooklyn, USA  
1999 Kinderradiologie, Dr.-von-Hauersches Kinderspital, München  
1999 Kinderanästhesie, Anästhesiologische Klinik d. Universität Heidelberg

### *Praktisches Jahr*

2000 Department of General Paediatric Surgery,  
King's College Hospital, London, UK und The Birmingham Children's

- Hospital, Birmingham, UK
- 2000 Früh- und Neugeborenenstation und pädiatrische Notfallambulanz,  
Kinderklinik an der Lachnerstraße, München
- 2000 Abteilung für allgemeine Pädiatrie und pädiatrische Notfallambulanz,  
Dr.-von-Haunersches Kinderspital der Universität, München
- 2001 Abteilungen für Pneumologie und Kardiologie,  
Zürcher Höhenklinik Wald ZH, Schweiz

#### *Berufsbezogene praktische Erfahrung*

- 1992 bis 1997 Krankenpflegehilfe, anästhesiologische und medizinische  
Intensivstationen, Stiftung Juliusspital, Würzburg
- 1997 bis 1999 Wissenschaftliche Hilfskraft, Institut für Infektionsmedizin,  
Freie Universität, Berlin
- 1992 bis 2001 Rettungssanitäter in Rettungsdienst und Krankentransport,  
Malteser Hilfsdienst, Würzburg / Aicher Ambulanz Union, München

#### *Berufliche Tätigkeit*

- 2001 bis 2002 Arzt im Praktikum, Charité - Universitätsmedizin Berlin,  
Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie,  
Campus Virchow-Klinikum, und Lungenklinik Heckeshorn
- Seit 2002 Assistenzarzt, Charité - Universitätsmedizin Berlin,  
Klinik für Neonatologie, Campus Charité Mitte

#### *Universitäre Lehrtätigkeit*

- SS 2003 Kursus der allgemeinen klinischen Untersuchung (12 Lehrstunden)  
und Praktikum der Kinderheilkunde für Medizinstudenten  
(36 Lehrstunden)
- WS 2003/2004 Praktikum der Kinderheilkunde für Medizinstudenten  
(32 Lehrstunden)
- SS 2004 Praktikum der Kinderheilkunde für Medizinstudenten  
(36 Lehrstunden)
- WS 2004/2005 Praktikum der Kinderheilkunde für Medizinstudenten  
(32 Lehrstunden)

### *Qualifikationen*

Labortechniken (PCR, RFLP, PFGE, ELISA, mikrobiologische Nachweisverfahren)  
Elektronische Datenverarbeitung (Microsoft Office, Powerpoint, SPSS, StatGraphics)  
Prüfarzt für klinische Prüfungen (Zertifikat KKS Charité Berlin)  
Fachkunde im Strahlenschutz für Thoraxröntgen  
Sonographie der Säuglingshüfte (DEGUM-Zertifizierung)  
Sonographie des Schädels (DEGUM-Aufbaukurs)  
Sonographie des Abdomes (DEGUM-Aufbaukurs)  
Neurodermitistrainer und Asthmatrainer  
Hyposensibilisierung (WAPA-Zertifizierung)  
Atemfunktionsdiagnostik im Säuglingsalter (Institute for Child Health, London)  
Weiterbildung im Datenschutz

### *Mitgliedschaften*

Deutsche Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin  
European Respiratory Society  
Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie  
Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin  
Mukoviszidose e.V.  
Forschungsgemeinschaft Mukoviszidose  
Arbeitsgemeinschaft Neurodermitisschulung e.V.  
Arbeitsgemeinschaft Asthmaschulung im Kindes- und Jugendalter e.V.  
European Academy of Allergy and Clinical Immunology

## Publikationen

### *Originalarbeiten*

- Jung A, Kleinau I, Schönian G, Bauernfeind A, Chen C, Griese M, Döring G, Göbel U, Wahn U, Paul K. Sequential genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* from upper and lower airways of cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 2002, 20:1457-1463.

### *Reviews*

- Roehr CC, Jung A, Proquitté H, Wauer RR. Systematic review: somatostatin or octreotide for chylothorax in children - do we know enough to say they are safe? *Intensive Care Med* (akzeptiert zur Veröffentlichung).

### *Case Reports*

- Jung A, Bechthold S, Pfluger T, Renner C, Ehrt O. Orbital rhabdomyosarcoma in Noonan syndrome. *J Ped Hematol Oncol* 2003, 25(4):330-332.
- Pohl A, Jung A, Vielhaber H, Pfluger T, Schramm T, Lang T, Kellnar S, Schöber JG. Congenital atresia of the portal vein and extrahepatic portocaval shunt associated with benign neonatal hemangiomas, congenital adrenal hyperplasia and atrial septal defect. *J Pediatr Surg* 2003, 38:633-634.

### *Publizierte Abstracts*

- Jung A, Kleinau I, Schönian G, Bauernfeind A, Halle E, Griese M, Döring G, Göbel U, Wahn U, Paul K. Sequentielle Genotypisierung von *Pseudomonas aeruginosa* aus dem oberen und unteren Respirationstrakt von Patienten mit Cystischer Fibrose. *Monatsschr Kinderheilk* 2000, 148:303.
- Jung A, Ratjen F, Griese M, Rietschel E, Ballmann M, Döring G, Paul K. Diagnostic values of airway samples and serum antibodies for *P. aeruginosa* in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2002, 20(Suppl 38):208s-209s.
- Jung A, Shute JK, Chen CIU, Ballmann M, Griese M, Ratjen F. Influence of long-term inhaled rhDNase on free and total IL-8 concentration in BAL fluid in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2002, 20(Suppl 38):528s.

- Jung A, Roehr CC, Friedrich Y, Schmalisch G, Wauer RR. Respiratory function in preterm infants with and without BPD during the first year of life. *Eur Respir J* 2004, 24(Suppl 48):159-160.
- Roehr CC, Jung A, Schmalisch G, Wauer RR. Respiratory function of infants with congenital diaphragmatic hernia during the first six months of life. *Eur Respir J* 2004, 24(Suppl 48):159.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Andreas Jung, dass die vorgelegte Promotionsarbeit mit dem Titel "Sequentielle Genotypisierung von *Pseudomonas aeruginosa*-Isolaten und Übereinstimmung von bakteriologischen Proben aus dem oberen und unteren Respirationstrakt von Patienten mit Cystischer Fibrose" von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde. Sie stellt keine Kopie anderer Arbeiten dar, auch nicht in Teilen. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind in ihr vollständig angegeben, es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwandt.