

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Haunerschen Kinderspital der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Diagnostische und prognostische Relevanz der
Pseudomonas aeruginosa Antikörperbestimmung bei
Patienten mit Cystischer Fibrose

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Angelika Kraxner
aus
London, Ontario
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. T. Lang
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. B. Wilske Prof. Dr. J. Bogner
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. M. Kappler
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	20. 07. 2006

Inhaltsübersicht

1 Einleitung	5
1.1 Genetische Grundlagen	6
1.2 Infektionen der Lunge bei Mukoviszidose	7
1.2.1 Epidemiologie von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
1.2.2 Verlauf einer Pseudomonas-Infektion	9
1.2.3 Frühe Pathogenese der Pseudomonas-Besiedlung	10
1.2.4 Antikörper gegen <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
2 Fragestellung	12
3 Material und Methoden	13
3.1 Studienbeschreibung	13
3.1.1 Studiendesign	13
3.1.2 Patientenkollektiv	13
3.1.3 Probengewinnung, Diagnostik und Datenerfassung	14
3.1.4 Dokumentation und Definition der Daten	15
3.2 Laborchemischer Nachweis von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Antigenen	17
3.2.1 Testprinzip	17
3.2.2 Verwendete Geräte und Materialien	18
3.2.3 Durchführung und Messung	19
3.3 Bewertung	20
3.4 Statistik	22

4 Ergebnisse	24
4.1 Beschreibung der Patientengruppen	24
4.1.1 Einteilung der Patienten in drei Gruppen entsprechend mikrobiologischer Beurteilung	24
4.1.2 Einfluss des Alters und der Genetik	26
4.1.3 Beschreibung der Gruppen nach ausgewählten klinischen Daten	28
4.1.4 Bestimmung und Wertung von Pseudomonas-Antikörpern in den Patientengruppen	31
4.2 Zusammenhang von Antikörpertiter und klinischen Daten	33
4.2.1 Einfluss der Besiedlungsdauer auf den Antikörperstatus	33
4.3 Sensitivität und Spezifität der Serumantikörper gegen <i>P. aeruginosa</i> im Vergleich zum mikrobiologischen Status	34
4.4 Prognostische Werte der Antikörperergebnisse	37
5 Diskussion	39
6 Zusammenfassung	45
7 Literaturverzeichnis	46
8 Danksagung	51
9 Lebenslauf	52

1 Einleitung

Definition

Cystische Fibrose (CF) oder Mukoviszidose ist eine Erkrankung, die durch eine Fehlfunktion des sekretorischen Epithels hervorgerufen wird ⁶⁴. CF wird autosomal-rezessiv vererbt und ist mit einer Inzidenz von 1:2000–2500 die häufigste angeborene und frühletale Stoffwechselerkrankung in Bevölkerungen europäischer Herkunft.

Als Folge einer Elektrolyttransportstörung sezernieren die exokrinen Drüsen ein wasserarmes, meist hochvisköses Sekret, das aus den Drüsen nicht abfließen kann, sie verstopft und Entzündungen in verschiedenen Organsystemen hervorruft ^{25,49,54}. Daraus resultiert ein Krankheitsbild mit folgenden Symptomen:

- chronisch obstruktive Lungenerkrankung,
- rezidivierende Infektionen der Atemwege,
- exokrine Pankreasinsuffizienz,
- Leberbeteiligung (biliary sludge, Zirrhose)
- Mekoniumileus, Mekoniumileusäquivalent,
- erhöhte Kochsalzwerte im Schweiß,
- männliche Infertilität.

Bislang gibt es keine kausale Therapie ⁵⁹. Grundpfeiler der Behandlung sind Sekretmobilisierung durch Krankengymnastik/Sport und Sekretverflüssigung durch Inhalationstherapie sowie die antibiotische Therapie rezidivierender Atemwegsinfektionen ^{11,15,60,61}. Wichtig ist die Substitution von Pankreasfermenten sowie von fettlöslichen Vitaminen und eine ausreichende Energiezufuhr ⁵².

1.1 Genetische Grundlagen

Mukoviszidose wird durch Mutationen im „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“ (CFTR)-Gen verursacht. Inzwischen sind über 850 Mutationen auf dem CFTR-Gen beschrieben.

Die häufigste Mutation bei CF ist eine Deletion von 3 Basenpaaren, die das Fehlen von Phenylalanin in Position 508 hervorruft (Delta F508). Diese Mutation ist bei 70–75% aller Mukoviszidose-Patienten in Mittel- und Nordeuropa zu finden⁶⁴.

Das CFTR-Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (7q31.2) und ist in 27 Exons organisiert. Genprodukt ist ein aus 1480 Aminosäuren bestehendes Protein, welches als Chloridkanal der apikalen Epithelzellmembran fungiert und zusätzlich auch die Aktivität von anderen Ionenkanälen beeinflusst. Die Kanalregulation erfolgt durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung, wobei die Steuerung über cAMP die größte Rolle spielt^{1,62} (Abbildung 1.1).

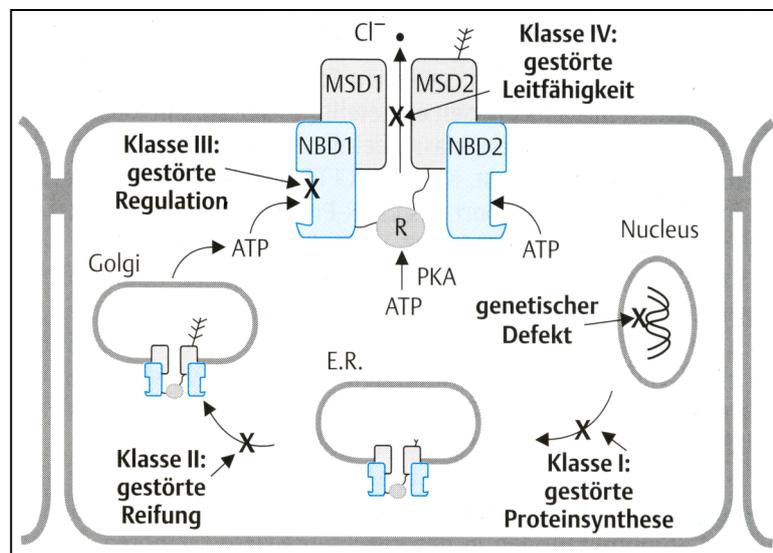


Abbildung 1.1: Biosynthese und Funktion des CFTR in der epithelialen Zelle. Das Öffnen und Schließen des Kanals wird durch ATP vermittelt, welches an die Nukleotidbindedomänen NBD1 und NBD2 bindet.

(Aus: Welsh, M.J. & Anderson, M.P. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel by MgATP. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* **48**, 119-127, 1993).

1.2 Infektionen der Lunge bei Mukoviszidose

Die unzureichende mukoziliäre Clearance spielt besonders bei Mukoviszidose und der Entstehung von chronischen Infektionen eine sehr wichtige Rolle^{20,45}. Beim Gesunden dient die Clearance der Atemwege zur Entfernung von Fremdkörpern, Schadstoffen und Mukus.

Sie ist primär durch die Funktion der Zilien (mukoziliäre Clearance) gegeben, bei deren Ausfall aber wird sie durch forcierten Luftstrom (Hustenclearance) aufrechterhalten.

Bei Cystischer Fibrose verursachen die genetischen Veränderungen des CFTR-Gens eine Viskositätszunahme des Bronchialsekrets und eine Sekretretention, welche die chronische Obstruktion und rezidivierende Infektion erklären (Abbildung 1.2). Die Infektionen sind mit komplexen Entzündungsmechanismen vergesellschaftet, wobei die Elastaseproduktion aus neutrophilen Granulozyten und die dadurch bedingte Schädigung von Strukturproteinen eine große Rolle spielt^{12,14,34}. Auch das Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien ist gestört^{13,57}. Die Freisetzung von langkettigen DNS-Molekülen aus dem Zellkern erhöht die Viskosität des Sputums und beeinflusst so die mukoziliäre Clearance negativ.

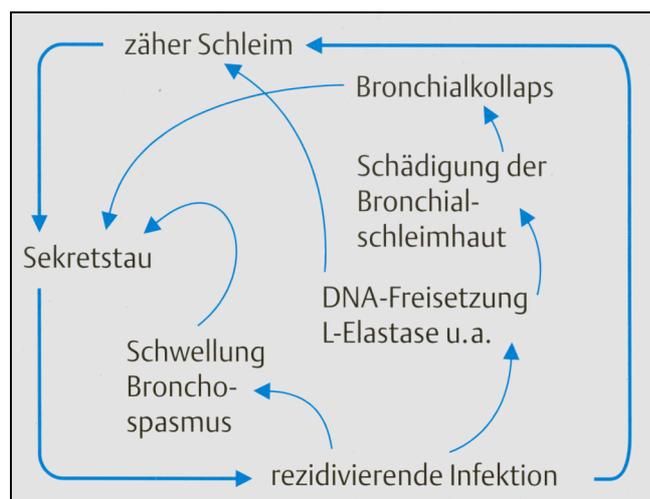


Abbildung 1.2: Circulus vitiosus zwischen viskösem Sekret, Sekretretention und rezidivierenden Infektionen. (Aus: Dockter G., Hermann Lindemann (Hrg.): Mukoviszidose. Thieme-Verlag 2000, S 35)

Für die Erkrankung typisch ist die chronische, bakterielle Infektion der Atemwege und Nasennebenhöhlen. Bei Säuglingen und Kleinkindern steht zu Beginn der chronischen Lungeninfektion die Besiedlung mit grampositiven Keimen (hauptsächlich *Haemophilus influenzae* und *Staphylococcus aureus*) im Vordergrund, während mit zunehmendem Alter der Lungenbefall mit *Pseudomonas aeruginosa* dominiert ^{40,47,50,51}.

Der Befall mit *Pseudomonas aeruginosa* wird für die meist tödlich verlaufende Lungeninfektion verantwortlich gemacht ¹⁰. Überraschenderweise ist aber bei Lavageuntersuchungen an Säuglingen und Kleinkindern festgestellt worden, dass nach Ablauf des ersten Lebensjahres bereits 18% und nach Ablauf des zweiten Lebensjahres 34% der Patienten Pseudomonas-positiv waren ⁴⁹.

Zur genauen Kenntnis des Erregerspektrums für eine zielgerichtete Antibiotikatherapie müssten regelmäßige Bronchiallavageuntersuchungen durchgeführt werden. Diese sind aus ethischen Gründen nicht vertretbar und praktisch auch nicht durchführbar. Außerdem ist diese Methode aufgrund der Invasivität und der möglichen Keimverschleppung riskant. Eine Alternative zur Bronchiallavage sind Sputumuntersuchungen, womit das Erregerspektrum in der Lunge gut erfasst werden kann. Bei Kleinkindern und Säuglingen ist es jedoch schwierig Sputum zu gewinnen, weswegen bei jüngeren Patienten meist Rachenabstriche durchgeführt werden.

Man geht davon aus, dass Rachenabstrichergebnisse bei >30% aller Säuglinge und Kleinkinder mit CF den tatsächlichen Infektionsstatus nicht realistisch wiedergeben und dass der Zeitpunkt der ersten Pseudomonas-Besiedlung oft übersehen wird ³⁴.

1.2.1 Epidemiologie von *Pseudomonas aeruginosa*

Der weitaus wichtigste Erreger bei der Entstehung von Lungeninfektionen bei CF-Patienten ist *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). *P. aeruginosa* ist ein bewegliches, 0,55–0,8 µm breites und 1,5–30,0 µm langes, gramnegatives Bakterium.

Innerhalb der „Pseudomonaden“ ist *P. aeruginosa* als chronischer Besiedler bei 60–90% aller Mukoviszidose-Patienten der am häufigsten aus der Lunge isolierte Keim¹⁹. Die Besiedlung nimmt mit dem Alter der Patienten zu, wobei der stärkste Anstieg zu Beginn der Pubertät verzeichnet wird⁴⁰.

1.2.2 Verlauf einer Pseudomonas-Infektion

Die Pseudomonas-Infektion bei CF-Patienten zeichnet sich durch einen für diese Erkrankung typisch phasischen Verlauf aus. Dem Erstnachweis folgt meist eine mehrwöchige Phase der Besiedlung (Kolonisation) mit einem meist nicht-mukoiden Pseudomonas-Stamm, die wenig allgemeine Entzündungszeichen hervorruft. In dieser Phase ist es möglich, mit einer konsequenten pseudomonaswirksamen Antibiotikatherapie bei der Mehrzahl der Patienten den Keim vollständig zu eliminieren^{24,60}

Nach ungefähr 12–36 Monaten symptomloser Besiedlung folgt die Umwandlung in die für cystische Fibrose charakteristische schleimbildende Form des Keimes. Die vollständige Eliminierung dieser Mutationsform gelingt meist nicht mehr, was das Fortschreiten der Lungenschädigung vorantreibt⁵⁶. Im Endstadium der Entwicklung des chronischen Pseudomonas-Befalls ist die Lunge der CF-Patienten mehr oder weniger permanent von der mukoiden Form von *P. aeruginosa* befallen³. Noch immer ist das Endstadium der durch *P. aeruginosa* bedingten Lungenzerstörung nicht völlig aufzuhalten, aber durch konsequenten Einsatz wirksamer Antibiotika und anderer therapeutischer Maßnahmen lässt sich heute das Fortschreiten zumindest verlangsamen^{24,55}.

1.2.3 Frühe Pathogenese der Pseudomonas-Besiedlung

P. aeruginosa ist kein typisch pathogener Keim. Bei gesunden Menschen gelangt *P. aeruginosa* über die Atemwege in die Lunge, bindet an das CFTR-Protein der Lungenepithelzelle, wird endozytiert und somit vernichtet.

Durch defektes oder fehlendes CFTR-Protein entfällt dieser Mechanismus, wodurch sich *P. aeruginosa* unterstützt von der fehlenden mukoziliären Clearance ungehindert vermehren und später zur schleimbildenden Form umwandeln kann^{42,43}.

Diese Umwandlung führt zur grundlegenden Veränderung der Bakterienoberfläche; Pili und Flagellen werden durch eine Schleimkapsel ersetzt, die aus mukoidem Exopolysaccharid (Alginat) besteht. Diese Verkapselung verhindert die Opsonisierung durch Antikörper, daher kann sich der Erreger der Phagozytose entziehen und jahrelang in der Lunge überleben⁴⁰.

P. aeruginosa sezerniert eine Vielzahl von Toxinen, darunter Proteasen, wie alkalische Protease und Elastase. Diese Enzyme sind in der Lage Gewebs- und Matrixmoleküle zu spalten und Immunkomponenten zu inaktivieren. Zu diesen Molekülen gehören Chemokine, Zytokine, Komplementfaktoren und Immunglobuline. *P. aeruginosa* moduliert somit aktiv die Immunantwort^{21,23,28,35,39}.

1.2.4 Antikörper gegen *Pseudomonas aeruginosa*

Der Initialkontakt zwischen *P. aeruginosa*-Antigenen und immunkompetenten Zellen erfolgt entweder durch Eindringen des Erregers von der Bronchialwand in das Lungengewebe oder durch Einwandern von Immunzellen in das Lumen der Atemwege. Wichtige Antigenstrukturen des Erregers sind Polysaccharide der LPS-Seitenketten, isolierte Flagellen, Elastase, Exotoxin A und alkalische Protease. Eine *Pseudomonas*-Infektion führt innerhalb kurzer Zeit zur Bildung von spezifischen Antikörpern, die im Serum zirkulieren und dadurch im Blut nachweisbar sind⁶³. Trotz der ausreichenden Antikörperbildung ist die Opsonisierung und somit auch die Phagozytose von *P. aeruginosa* deutlich beeinträchtigt^{29,38}. Dies zeigt das Unvermögen des Immunsystems den Keim nach erfolgter Kolonisierung zu beseitigen.

Um eine Besiedlung der Lunge mit *P. aeruginosa* zu verhindern, wird an der Entwicklung eines Impfstoffes gearbeitet. Das Problem bei der Entwicklung dieses Impfstoffes ist aber der phasische Verlauf der Pseudomonas-Infektion, der es erschwert ein geeignetes Impfantigen zu finden. Ziel der Impfung ist es, die Bildung von IgA-Antikörpern zu induzieren, die protektive Aufgaben in den Schleimhäuten erfüllen.

Bei der Erforschung der Voraussetzungen, die für die Bildung von löslichen IgA-Antikörpern gegen Krankheitserreger erforderlich sind, konnten mittlerweile große Fortschritte erzielt werden. In der Regel wird IgA durch orale Impfung induziert, unter bestimmten Umständen kann aber auch eine intramuskuläre Injektion zur Bildung von löslichen IgA-Antikörpern in der Lungenschleimhaut führen¹⁷.

2 Fragestellung

Die frühzeitige Erkennung einer frischen Infektion mit *P. aeruginosa* ermöglicht eine erfolgreiche Therapie, bei chronischer Besiedlung ist der Keim jedoch nicht mehr eradizierbar. Nur durch regelmäßige Bronchiallavagen wäre eine Bestimmung des aktuellen intrapulmonalen Erregerspektrums zuverlässig möglich. Eine solch invasive mikrobiologische Überwachung ist aber nicht durchführbar. In der Praxis werden daher meist Sputumproben untersucht. Da Säuglinge und Kleinkinder Sputum noch nicht expektorieren können, werden hier Rachenabstriche verwendet. Bei der mikrobiologischen Untersuchung von Sputumproben und insbesondere Rachenabstrichen kommt es aber häufig zu falsch negativen Ergebnissen, so dass eine neu aufgetretene *P. aeruginosa*-Kolonisation zunächst leicht übersehen werden kann.

Deshalb ist es naheliegend, als weiteren diagnostischen Indikator einer *P. aeruginosa*-Infektion, pseudomonasspezifische Antikörper im Serum zu bestimmen.

In dieser Studie wurde untersucht, ob ein kommerziell erhältliches ELISA-Testsystem in der Lage ist, verlässliche Aussagen darüber zu machen, ob ein Patient mit *P. aeruginosa* besiedelt ist oder nicht. Folgende Fragen waren dabei von besonderem Interesse:

1. Ist die Messung spezifischer Antikörper qualitativ und quantitativ möglich?
2. Besteht eine Korrelation zwischen Antikörpertitern und mikrobiologischen Befunden?
3. Besteht eine Korrelation zwischen Antikörpertitern und klinischen Parametern (Lungenfunktion, Entzündungsparametern, Längensollgewicht)?
4. Können die einmalige Bestimmung der Antikörper und die Titerhöhe zur Entscheidung für eine pseudomonaswirksame antibiotische Therapie bei Patienten herangezogen werden, bei denen bislang kein mikrobiologischer Nachweis einer *P. aeruginosa*-Infektion geführt wurde?

3 Material und Methoden

3.1 Studienbeschreibung

3.1.1 Studiendesign

Im Jahr 2000 wurde in unserem CF Zentrum im Dr. von Haunerschen Kinderspital in München die regelmäßige Bestimmung von Serumantikörpern gegen *P. aeruginosa* eingeführt.

Um eine repräsentative Querschnittstudie über Pseudomonas-Antikörpertiter bei CF-Patienten durchzuführen, verwendeten wir die ersten Antikörperergebnisse, die wir zwischen 2000 und 2002 erhalten haben. Wir setzten die Antikörpertestergebnisse zum einen mit den bekannten mikrobiologischen Daten der vorangegangenen zwei Jahre, und zum anderen mit den mikrobiologischen Ergebnissen der darauffolgenden zwei Jahre in Beziehung.

3.1.2 Patientenkollektiv

Von 421 CF-Patienten, die in unserem Zentrum für Cystische Fibrose zwischen 2000 und 2002 behandelt wurden (Mittleres Alter 16,3 Jahre, Median 15,4, Bereich 0,4–41), wurden 212 Patienten durchgehend in dreimonatlichen Abständen von einem Arzt untersucht. Davon waren 187 CF-Patienten einverstanden, an der Studie teilzunehmen. Drei Patienten wurden von der Studie ausgeschlossen, da sie gegen *P. aeruginosa* geimpft waren und bekannt war, dass diese Patienten Serumantikörper gegen Exotoxin A gebildet hatten. Ein Patient, der über 14 Jahre chronisch mit *P. aeruginosa* besiedelt war, wurde von der Studie ausgeschlossen, weil er sich drei Jahre vor Studienbeginn einer Lungentransplantation unterzog und daraufhin mikrobiologisch als nicht mehr besiedelt eingestuft wurde. Das mittlere Alter der übrigen 183 Patienten betrug 16,7 Jahre (15,7; 2–41). 181 Patienten (99%) erhielten kontinuierlich (>300 Tage pro Jahr) eine orale Antibiotikatherapie gegen *Staphylococcus aureus*.

3.1.3 Probengewinnung, Diagnostik und Datenerfassung

Die Serumproben wurden bei den Kontrolluntersuchungen der CF-Patienten in der CF-Ambulanz des Dr. von Haunerschen Kinderspitals gesammelt.

Das Blut wurde in Serumröhrchen ohne chemische Zusätze aufgenommen (Microvette 500 Serum, Kat. Nr. 20.1343; Sarstedt). Nach Zentrifugation (1.500 x g für 10 min) wurden die Serumproben in Polystyrenröhrchen (Kat. Nr. 55.475; Sarstedt) bei -20°C bis zur Aufbereitung gelagert. Hämolyisierte Proben wurden von der Studie ausgeschlossen.

Für die Antikörperbestimmung mittels ELISA wurden die Proben aufgetaut und streng nach Herstellerangaben bearbeitet.

Routinemäßig wurden mit der gleichen Blutentnahme Standardlaboruntersuchungen durchgeführt, wobei für diese Studie nur die Ergebnisse von C-reaktivem Protein (CRP) und Gesamt-IgG einbezogen wurden.

Zur bakteriellen Untersuchung wurden regelmäßig alle drei Monate Sputumproben oder Rachenabstriche gewonnen, Sputumproben wurden vor der weiteren Verarbeitung homogenisiert. Die Kulturen wurden auf Blutagarplatten und McConkey-Agarplatten für mindestens 72 Stunden bei 37°C aerob bebrütet. Es wurden keine weiteren zusätzlichen Selektivnährmedien für *P. aeruginosa* verwendet.

Bei Patienten bis zum Schulkindalter wurden Rachenabstriche, bei den älteren Patienten, wenn möglich, Sputumproben, ansonsten Rachenabstriche verwendet.

Für die Dokumentation des klinischen Verlaufes wurde neben der Lungenfunktion (FEV-1) das Längensollgewicht (LSG) herangezogen.

3.1.4 Dokumentation und Definition der Daten

Sputum- und Rachenbefunde:

Die Proben wurden als Sputumprobe bzw. Rachenabstrich gewonnen. Entsprechend den mikrobiologischen Resultaten der vorangegangenen zwei Jahre wurden die Patienten in drei Gruppen eingeteilt, den *P. aeruginosa*-Status in Betracht ziehend. Der Status ergibt sich einzig aus der Anzahl der als positiv bewerteten Kulturen.

Als Erstdatumsnachweis wurde das erste ersichtliche Datum, an dem *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen wurde, gewertet.

Gruppe I: Nicht besiedelt: Von acht mikrobiologischen Kulturen in den zwei Jahren vor Blutabnahme waren acht negativ.

Gruppe II: Intermittierend: Eine bis sechs von insgesamt acht mikrobiologischen Kulturen waren in den zwei Jahren vor Blutabnahme positiv.

Gruppe III: Chronisch: Mehr als sieben von insgesamt acht Kulturen waren in den zwei Jahren vor Blutabnahme positiv.

Eine *Pseudomonas*-Klassifizierung erfolgte durch Unterscheidung von mukoider und nicht-mukoider Form. Zusätzlich wurde die Anzahl verschiedener Serotypen von *P. aeruginosa* aufgelistet.

Alter und Genetik:

Das Alter der Patienten wurde für den Zeitpunkt der Blutabnahme berechnet.

Die Einteilung der Patienten nach genetischen Gesichtspunkten erfolgte in drei Kategorien:

- Homozygot $\Delta F508/\Delta F508$
- Compound heterozygot $\Delta F508/X^*$
- Compound heterozygot X^*/X^*

*alle anderen krankmachenden Mutationen

Klinische Parameter:

Für die Bewertung der Lungenfunktion wurde die forcierte expiratorische Einsekundenkapazität (FEV-1) herangezogen, welches als bester Parameter zur Beurteilung der Lungenerkrankung bei Mukoviszidose gilt. Der Wert wird als Prozent vom berechneten Soll angegeben.

Das Längensollgewicht (LSG) errechnete sich nach folgender Formel:

$\text{Gewicht/Idealgewicht} \times 100 = \% \text{ LSG}$, gerundet.

Das Idealgewicht wurde aus den Perzentilen nach Prader abgelesen ⁴⁴.

Laborwerte:

Die Datenerfassung der Laborwerte und klinischen Parameter erfolgte durch Fachpersonal. Die Laborwerte C-reaktives Protein (CRP) und Gesamt-Immunglobulin-G (IgG) wurden in der Einheit mg/dl gemessen.

Antikörperbestimmung:

Die Auswertung erfolgte graphisch über ein entsprechendes Programm. Für die Bestimmung der Messwerte wurden entsprechend den Herstellerangaben vier Kategorien festgelegt:

Score	Titer	Bewertung
0	<1:500	negativ, unauffällig
1	1:500 bis 1:1250	grenzwertig/positiv
2	>1:1250	positiv
3	>1:10 000	chronisch positiv

3.2 Laborchemischer Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* Antigenen

3.2.1 Testprinzip

Als Nachweismethode für pseudomonasspezifische Antikörper in den Patientenseren wurde ein ELISA-Testsystem verwendet. Erste ELISA-Verfahren haben seit ihrer Entwicklung Anfang der 70er Jahre eine Reihe von Verbesserungen erfahren und werden mittlerweile routinemäßig in der medizinischen Forschung und Diagnostik verwendet.

Das Grundschemata eines ELISA ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Vertiefungen einer Testplatte sind mit speziellen *Pseudomonas*-Antigenen beschichtet. Verdünnte Patientenseren werden dazu pipettiert; spezifische Antikörper der Seren binden an die Antigene.

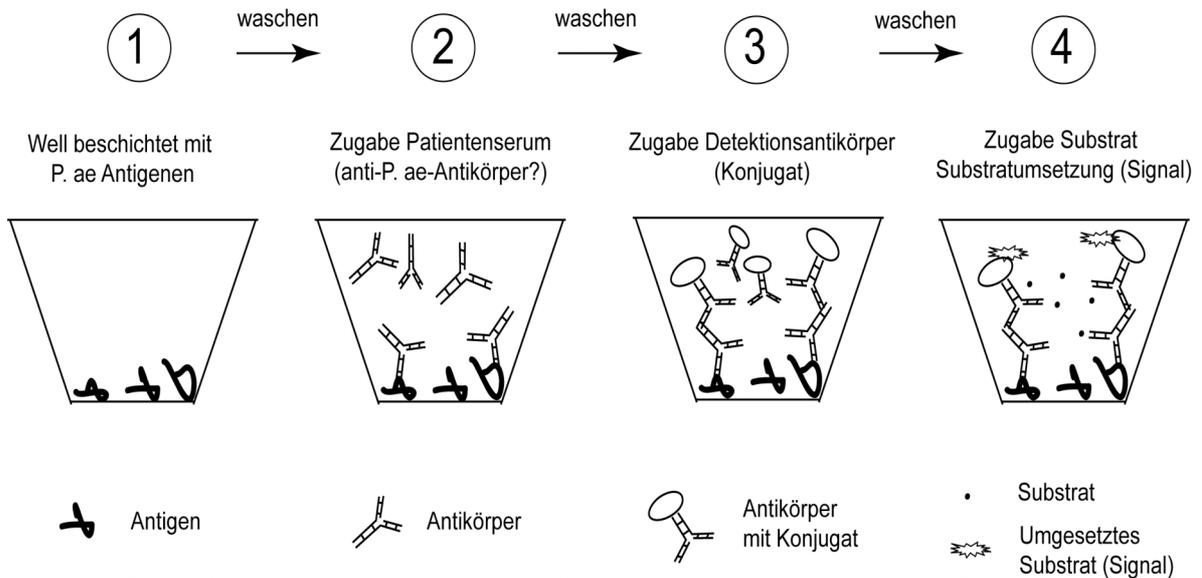


Abbildung 3.1: Aufbau des enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Durch die zwischengeschalteten Waschschriffe werden ungebundene Komponenten entfernt. Nur spezifische Bindungen zwischen Antikörper und Antigen bzw. Antikörper und Detektionsantikörper bleiben erhalten.

Nach 2-stündiger Inkubationszeit bei 37°C werden die Platten gewaschen und die noch gebundenen Antikörper mit Peroxidase konjugierten anti-IgG-spezifischen Antikörpern (Konjugat) markiert. Nach erneuter Inkubation (2h, 37°C) wird ungebundenes Konjugat durch Waschen entfernt und Substrat zugegeben. Das Substrat wird zu einem blauen Farbstoff umgesetzt; nach Zugabe der Stopplösung erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Farbreaktion wird mittels Photometer gemessen. Die Farbintensität korreliert mit der Antikörperkonzentration in der Probe.

3.2.2 Verwendete Geräte und Materialien

Das verwendete ELISA Testkitt stammt von der Firma Mediagnost und dient zum qualitativen und quantitativen Nachweis von drei *Pseudomonas aeruginosa*-Antigenen. Der Sitz der Firma Mediagnost befindet sich in Reutlingen, Deutschland.

Zusätzliche Materialien:

Microplate-reader Dynex MRX

Vibrationsschüttler

Diverse Pipetten, Reaktionsgefäße, Aqua dest.

Inhalt der Testpackung:

a) Testplatten: 3 Testplatten mit je 96 Vertiefungen aufgeteilt in 12 abnehmbare Reaktionskammern mit jeweils 8 Vertiefungen.

Platte 1 beschichtet mit *Pseudomonas aeruginosa* alkalischer Protease

Platte 2 beschichtet mit *Pseudomonas aeruginosa* Elastase

Platte 3 beschichtet mit *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A

b) Konjugat-Konzentrat: 2 Fläschchen (250 µl) Peroxidase markiertes anti-human-IgG (polyklonal, vom Kaninchen). Lösung ist 100 x konzentriert, konserviert.

c) Kontrollen: 3 Positivkontrollen (3 Fläschchen je 1,5 ml), positive Kontrollseren, Titer 1:2500, gebrauchsfertig und konserviert. Negativkontrollen (2 Fläschchen je 1,5 ml), negatives Humanplasma, nicht reaktiv für *Pseudomonas*-Antigene, gebrauchsfertig und konserviert.

- d) Verdünnungspuffer: 3 Flaschen (50 ml) phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Stabilisatoren, dient zur Verdünnung der Patientenseren und des Konjugats, gebrauchsfertig und konserviert.
- e) Substrat: 1 Fläschchen Substratlösung (33 ml).
- f) Stopplösung: 1 Fläschchen 0,2 M Schwefelsäure, gebrauchsfertig.
- g) Waschpuffer: 1 Fläschchen Waschpuffer (120 ml), 20 x konzentriert, konserviert.
- h) Abklebfolie 6 x, Testanleitung.

3.2.3 Durchführung und Messung

Arbeitsschritte:

1. Die bei -20°C eingefrorenen Patientenseren wurden auf Raumtemperatur gebracht. Der Waschpuffer wurde 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt, das Konjugatkonzentrat wurde mit Verdünnungspuffer 1:100 verdünnt und bei jeder Bestimmung frisch angesetzt. Von den Seren wurden 1:1000, 1:10 000 und 1:100 000 Verdünnungen in Verdünnungspuffer erstellt.
2. Von diesen Proben wurden jeweils 100 μl pro Vertiefung pipettiert und Doppelbestimmungen durchgeführt. Bei jedem Testansatz wurden je Platte zwei negative und zwei positive Kontrollen mitgeführt (100 μl pro Vertiefung). Die Platten wurden mit Klebefolien verschlossen und bei 37°C zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde fünfmal mit etwa 300 μl Waschpuffer pro Vertiefung gewaschen (Einwirkdauer des Waschpuffers ca. zehn Sekunden pro Waschschrift). Der Überstand wurde abgeleert und die restliche Flüssigkeit ausgeklopft.
3. In jede Vertiefung wurden 100 μl Konjugatgebrauchslösung pipettiert und die Reaktionskammern mit Klebefolien verschlossen – Inkubation erneut für zwei Stunden bei 37°C .
4. Danach wurden die Vertiefungen wieder geleert und die Platte fünfmal mit etwa 300 μl Waschpuffer pro Vertiefung gewaschen, geleert und ausgeklopft.
5. In jede Vertiefung der Platte wurden 100 μl Substratlösung pipettiert. Die Platten wurden 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.
6. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 100 μl Stopplösung in jede Vertiefung pipettiert.

3.3 Bewertung

Messung und Auswertung:

Die photometrische Messung der Farbreaktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm, für jedes Antigen (jede Platte) gesondert. Von allen Mehrfachwerten wurden Mittelwerte gebildet.

Bedingungen für die Auswertbarkeit:

1. Die Extinktion der negativen Serumkontrolle durfte 0,15 OD nicht übersteigen.
2. Die Differenz der Extinktionsmittelwerte der positiven Kontrolle (PK) und der negativen Kontrolle (NK) musste mindestens 0,6 OD betragen.

Qualitative Bestimmung und Bewertung:

Der Mittelwert der negativen Kontrolle wurde von allen Messwerten abgezogen (blank). Der Grenzwert (cut-off) betrug 20% des Extinktionswertes der positiven Kontrolle. Er entspricht dem Messwert eines 1:1000 verdünnten Serums mit einem Titer von 1:500.

1:1000 verdünnte Seren mit geringeren Messwerten sind als negativ einzustufen. Der Grenzwertbereich lag bei 20 bis 50% des Extinktionswertes der positiven Kontrolle. Messwerte in diesem Bereich sind als grenzwertig einzustufen, 1:1000 verdünnte Seren mit Messwerten über diesem Bereich gelten als positiv.

Quantitative Bestimmung:

Die Auswertung erfolgte über ein entsprechendes Auswertprogramm. Die Extinktion der negativen und positiven Kontrolle (y-Achse) wurde in einem doppelt linearem Koordinatensystem gegen einen Titerfaktor, NK=0 und PK=2,5 auf der x-Achse eingetragen (siehe Abbildung 3.2).

Anschließend wurde eine Eichgerade durch die Messwerte von der negativen (NK) und positiven Kontrolle (PK) gelegt und bis zum Titer-Faktor 3,5 verlängert. Zur Titerbestimmung wurde vom OD-Messwert (y-Achse) der Serumprobe über die Eichgerade der zugehörige Titer-Faktor (x-Achse) abgelesen und mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor des Serums multipliziert.

Titer-Faktoren, die kleiner 0,25 oder größer 3,5 waren, wurden bei der Bewertung nicht berücksichtigt. Bei einer 1:1000 Verdünnung wurden Titer-Faktoren kleiner 0,5 als negativ beurteilt, bei Werten über 3,5 mussten höhere Verdünnungen erstellt werden.

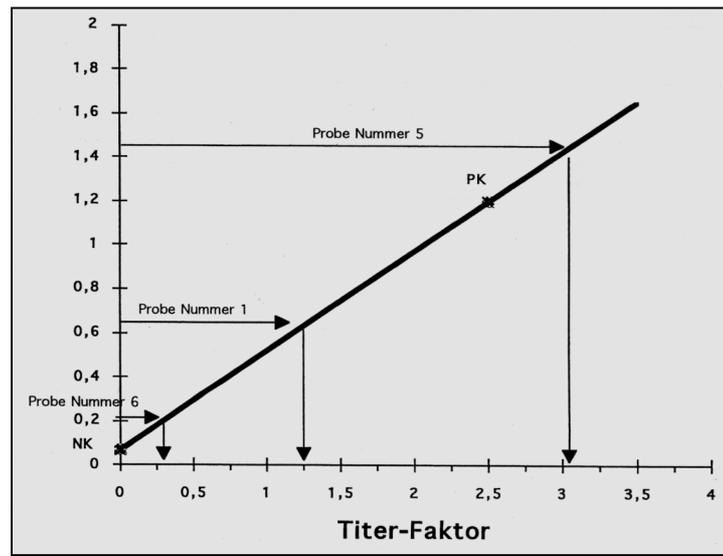


Abbildung 3.2: Graphische Auswertung der Antikörperbestimmung.

Je nach Erregerstamm und Immunantwort des Patienten können Antikörper gegen einzelne oder auch alle drei Antigene gleichzeitig festgestellt werden. Ein Patient ist seropositiv, wenn das Serum auf ein Antigen oder mehrere Antigene positiv reagiert. Bei akut und auch chronisch mit *P. aeruginosa* infizierten Patienten kann bei Immuninsuffizienz die Bewertung über den Antikörpertiter unzureichend ausfallen.

Intra- und Interassayvariabilität der serologischen Assays:

Die Intraassayvariabilität (Korrelation zwischen Ergebnissen von Doppelbestimmungen) war exzellent für die drei verschiedenen Antikörper mit einem Korrelationskoeffizienten zwischen 0,988 und 0,995 (Berechnung nach Spearman: 100% Korrelation ist 1,00) und einem Wiederholungskoeffizienten zwischen 0,091 und 0,096 (Berechnung nach Bland und Altman, 100% Korrelation ist 0,00).

Die Interassayvariabilität (Korrelation zwischen den erhaltenen Resultaten für die ELISA Kalibrationskurven) war zufriedenstellend mit einem relativen Variationskoeffizienten zwischen 7,3 und 20,3, wobei ein Koeffizient von 0 eine komplette Übereinstimmung, einer von 100 überhaupt keine Übereinstimmung beschreibt.

3.4 Statistik

Sensitivität, Spezifität, 95% Konfidenzintervalle (95%KI), positiver Vorhersagewert und negativer Vorhersagewert wurden mit der Binominal Exakt Methode (mit Konfidenzintervallen) aus Kontingenztabelle berechnet.

Wenn man das Konzept diagnostischer Genauigkeit bezüglich der Serumantikörper gegen *P. aeruginosa* überdenkt, bedeutet Sensitivität die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Patient, der mit *P. aeruginosa* infiziert ist, nachweisbare Antikörper gegen diesen Organismus aufweist. Spezifität ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Patient, der nicht mit *P. aeruginosa* infiziert ist, auch keine Antikörper gegen *P. aeruginosa* zeigt. Sensitivität und Spezifität sind Eigenschaften des Tests und werden nicht durch die Häufigkeit der Pseudomonas-Infektion beim untersuchten Patientenkollektiv bestimmt. Deshalb beantworten weder die Sensitivität noch die Spezifität die beiden wichtigsten Fragen: Wenn das Antikörperergebnis positiv ist, wie groß ist die Aussicht, dass der Patient tatsächlich mit *P. aeruginosa* besiedelt ist?

Und wenn das Antikörperergebnis negativ ausfällt, wie groß ist die Wahrscheinlichkeit, dass der Patient nicht mit dem Keim besiedelt ist?

Die Antworten auf diese Fragen geben uns die prädiktiven Werte, da sie die Häufigkeit des Vorkommens von *P. aeruginosa* in der untersuchten Population berücksichtigen: Der positive prädiktive Wert ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Patient mit positiven Antikörpern gegen *P. aeruginosa* auch mit diesem Organismus infiziert ist. Der negative prädiktive Wert zeigt die Wahrscheinlichkeit an mit der ein CF-Patient, der keine messbaren Antikörper aufweist, nicht mit *P. aeruginosa* besiedelt ist.

In dieser Studie berechneten wir die prädiktiven Werte (Vorhersagewerte) für die Häufigkeit von *P. aeruginosa*, welche rückwirkend, auf mikrobiologischen Resultaten basierend, bestimmt wurden. Außerdem berechneten wir die prospektiven Vorhersagewerte, indem wir die Antikörpertestergebnisse sowie die mikrobiologischen Resultate der folgenden zwei Jahre in Betracht zogen. Die letzteren Werte zeigen die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein CF-Patient den *P. aeruginosa*-Status abhängig von seinem oder ihrem ursprünglichen Antikörpertiter verändert.

Für den Vergleich von gepaarten Daten wurden der Korrelationskoeffizient nach Spearman und der relative Variationskoeffizient berechnet. Der Koeffizient für die Wiederholbarkeit wurde nach der Methode von Bland und Altman kalkuliert⁵. Für den Vergleich nicht zusammenhängender Daten wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Für kategorische Variablen wurde der Fishers Exact-Test angewandt, korrigiert für Mehrfachvergleiche nach der Bonferroni-Methode.

Die Summenstatistik für normalverteilte Variablen wurde als Mittelwert mit Median und Bereich dargestellt. Nicht normalverteilte Merkmale wurden mit dem Wilcoxon Rangsummen-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Unterschiede in den Variablen wurden als signifikant gewertet, wenn $p < 0,05$ betrug.

Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem SPSS Programm für Windows Version 12.0, (SPSS Inc.; Chicago, IL) durchgeführt.

Die verwendeten Tests sind jeweils im Text angegeben.

Alle Patienten waren informiert und mit der Studienteilnahme einverstanden. Die Studie wurde von der örtlichen Kommission zur Beurteilung von Studien am Menschen befürwortet.

4 Ergebnisse

4.1 Beschreibung der Patientengruppen

4.1.1 Einteilung der Patienten in drei Gruppen entsprechend mikrobiologischer Beurteilung

Die untersuchten 183 Patienten wurden nach mikrobiologischen Gesichtspunkten in drei Gruppen unterteilt (Definition siehe Seite 15):

- Nicht besiedelt
- Intermittierende Besiedlung
- Chronische Besiedlung

Besiedlungsstatus der untersuchten Patienten

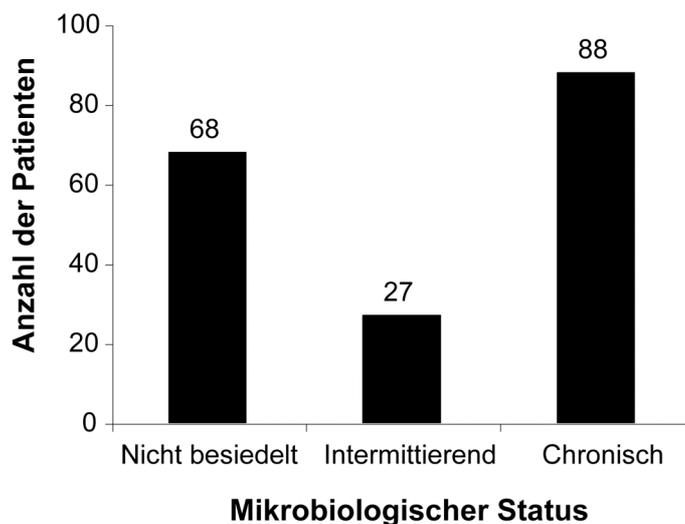


Abbildung 4.1: Besiedlungsstatus der untersuchten CF-Patienten.

Nach diesen Merkmalen wurden von 183 Patienten 88 als chronisch, 27 als intermittierend und 68 als nicht besiedelt charakterisiert (Abbildung 4.1). Diese Klassifizierung ermöglicht einen besseren Vergleich wichtiger klinischer Parameter sowie des Antikörperstatus mit der Art der Pseudomonas-Besiedlung.

Bei genauer Untersuchung zeigte sich, dass chronische Patienten häufiger mit mehreren verschiedenen Pseudomonas-Stämmen besiedelt waren.

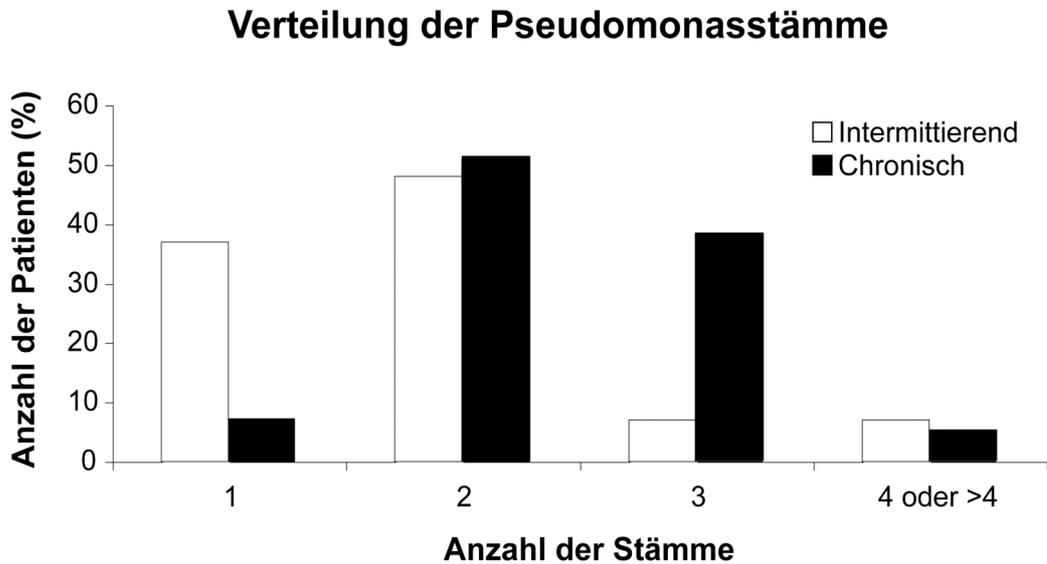


Abbildung 4.2: Korrelation der Besiedlungsart und der Anzahl verschiedener Pseudomonas-Stämme.

Bei 7% der chronisch besiedelten Patienten wurde ein Stamm, bei 51% zwei, bei 38% drei und bei 5% bis zu vier oder mehr Stämme nachgewiesen. Bei intermittierend besiedelten Patienten waren 37% mit einem Stamm, 48% mit zwei, 7% mit drei und 7% mit vier oder mehr Stämmen befallen (Abbildung 4.2).

Bei der Unterscheidung von *Pseudomonas aeruginosa* in die nicht-mukoide und in die schleimbildende mukoide Form zeigte sich, dass bei einer chronischen Besiedlung hauptsächlich die mukoide Form nachgewiesen wurde. 95% aller chronisch besiedelten Patienten und 56% der intermittierend besiedelten Patienten zeigten die mukoide Form. Hingegen waren 5% der chronisch Besiedelten und 44% der intermittierend Besiedelten von der nicht-mukoiden Form befallen (Abbildung 4.3).

Verteilung der Pseudomonas Oberflächenstruktur

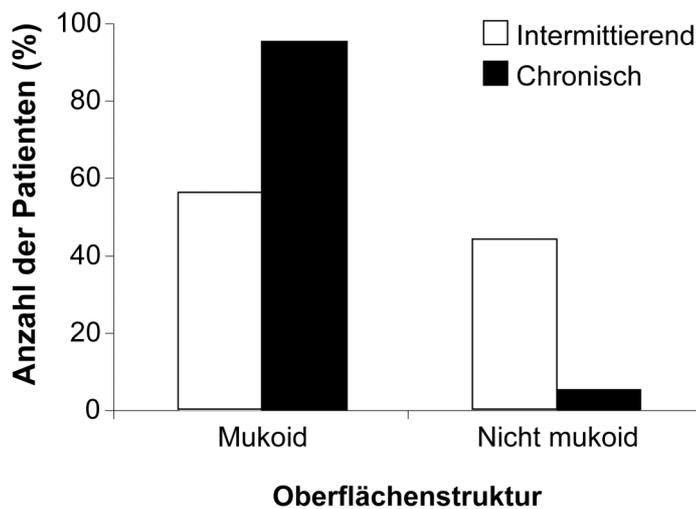


Abbildung 4.3: Zusammenhang der Pseudomonas Oberflächenstruktur und der Art der Besiedlung.

4.1.2 Einfluss des Alters und der Genetik

Erwartungsgemäß nahm mit zunehmendem Alter der Patienten die Wahrscheinlichkeit einer chronischen Besiedlung zu. So waren die chronisch besiedelten Patienten im Durchschnitt 21,5 Jahre, die intermittierend Besiedelten 14,5 Jahre und die nicht besiedelten Patienten im Schnitt nur 11,4 Jahre alt (Abbildung 4.4).

Des Weiteren wurden die verschiedenen Mutationen mit der Besiedlungsart verglichen, wobei kein Zusammenhang zu erkennen war. Die Mutation homozygot $\Delta F508/\Delta F508$ trat mit einer Häufigkeit von 52% bei chronisch und 54% bei nicht Besiedelten auf. Die Mutation compound heterozygot $\Delta F508/X$ wurde bei 38% der chronisch und bei 32% der nicht besiedelten CF-Patienten nachgewiesen. Compound heterozygot X/X Mutationen traten bei 10% der chronisch und bei 14% der nicht besiedelten Patienten auf (nicht signifikant, Daten werden nicht gezeigt).

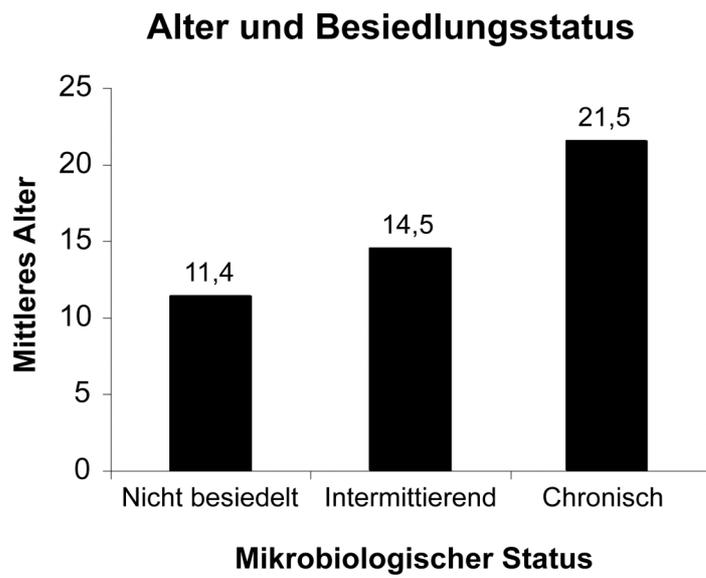


Abbildung 4.4: Einfluss des Alters auf die Art der Besiedlung. Mit zunehmendem mittlerem Alter steigt die Wahrscheinlichkeit einer chronischen Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa*.

4.1.3 Beschreibung der Gruppen nach ausgewählten klinischen Daten

Eine Zusammenfassung der klinischen Daten ist in Tabelle 4.1 zu sehen.

	Mikrobiologischer <i>P. aeruginosa</i> Status		
	Nicht besiedelt (Nb)	Intermittierend (I)	Chronisch (C)**
Anzahl der Patienten (n)	68	27	88
Klassifiziert nach Sputum (n)	11	5	60
Klassifiziert nach Rachenabstrich (n)	57	22	28
Alter (Jahre)*	11,4 (2-29)	14,5 (2-41)	21,5 (3-38)
Längensollgewicht (%)*	103 (62-130)	107 (88-148)	105 (78-158)
FEV-1 (%)*	97 (62-147)	94 (48-143)	75 (21-128)
IgG (mg/dl)*	842 (294-1962)	966 (296-2440)	1293 (654-2575)
CRP (mg/dl)*	0,18 (0,00-1,36)	0,14 (0,01-0,58)	0,64 (0,00-3,90)
Nachweis der mukoiden Form (n/N)	0/68	15/27	84/87

* Mittelwert mit Bereich

** Infektionsdauer als Mittelwert: 11,5 Jahre (1,5-26 Jahre)

Tabelle 4.1: Ausgewählte klinische Daten von 183 Patienten bezüglich ihres *P. aeruginosa*-Status.

Die drei nach mikrobiologischen Gesichtspunkten eingeteilten Gruppen sind in Tabelle 4.1 zusätzlich je nach der Methode der Probengewinnung klassifiziert. Je nach Möglichkeit wurden entweder Sputumproben oder Rachenabstriche herangezogen, wobei für die Gruppe der chronisch besiedelten Patienten überwiegend Sputumproben verwendet wurden. Dies ist dadurch bedingt, dass diese Patienten im Allgemeinen alters- und krankheitsbedingt eher in der Lage sind Sputum zu expektorieren.

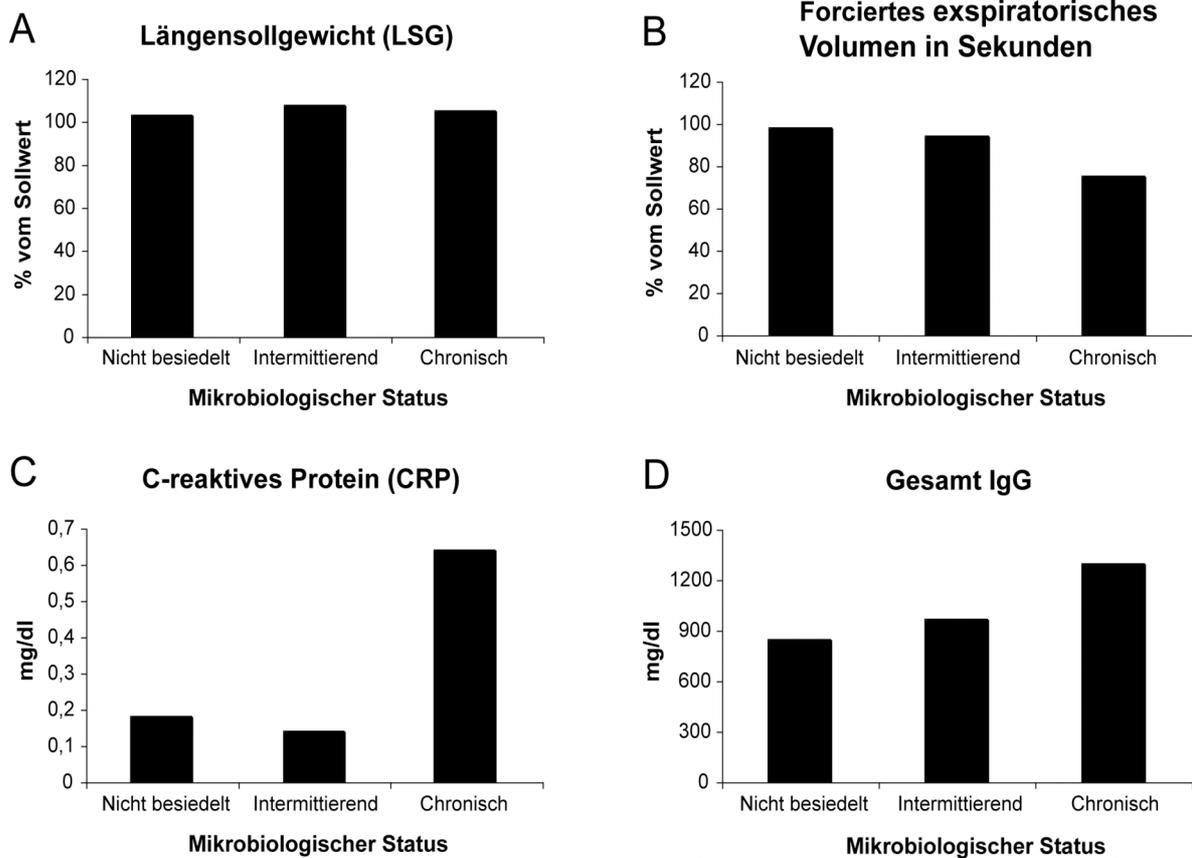


Abbildung 4.5: Vergleich wichtiger klinischer Daten mit der Art der Besiedlung. Verglichen wurden das Längensollgewicht (A), die Lungenfunktion (B) und Entzündungsparameter, wie C-reaktives Protein (C) und Gesamt-IgG (D). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte.

Als klinische Daten wurden das Längensollgewicht, die Lungenfunktion mit ihrem wichtigsten Parameter FEV-1 sowie die Entzündungsparameter Gesamt-IgG und C-reaktives Protein herangezogen (Abbildung 4.5). Das Längensollgewicht zeigte in den verschiedenen Gruppen keine signifikanten Unterschiede. So lag das Längensollgewicht in der Gruppe der chronisch Besiedelten durchschnittlich bei 105%, bei den intermittierend Besiedelten bei 107,5% und bei den nicht Besiedelten bei 103% (nicht signifikant).

Im Gegensatz dazu zeigte die Lungenfunktion deutliche Unterschiede. Bei chronischer Besiedlung mit *P. aeruginosa* lag das FEV-1 bei 75%, bei nicht besiedelten Patienten hingegen bei 97% (signifikant.). Das Gesamt-IgG betrug 842 mg/dl bei den nicht Besiedelten, 966 mg/dl bei den intermittierend Besiedelten und 1293 mg/dl bei den chronisch Besiedelten (signifikant). Das CRP betrug 0,18 mg/dl bei nicht Besiedelten und 0,64 mg/dl bei den chronisch besiedelten CF-Patienten, bei intermittierender Besiedlung lag der Wert überraschenderweise bei 0,14 mg/d (signifikant).

Um aufzuzeigen, dass Dauer und Art der Besiedlung und nicht nur das Alter ausschlaggebend für die klinische Verschlechterung war, wurde ein Altersmatch erstellt. Hier wurden chronisch mit nicht besiedelten Patienten gleichen Alters verglichen (Tabelle 4.2). Es wurde gezeigt, dass das Längensollgewicht unverändert war. Das FEV-1 betrug bei den chronisch Besiedelten 82%, bei den nicht Besiedelten hingegen lag das FEV-1 bei 95% (signifikant). Das IgG war bei den nicht besiedelten Patienten 1008 mg/dl, bei den chronisch Besiedelten hingegen 1294 mg/dl (nicht signifikant). CRP lag bei 0,28 mg/dl bei den nicht Besiedelten, wohingegen bei chronisch besiedelten CF-Patienten ein Wert von 0,65 mg/dl gemessen wurde (nicht signifikant).

	Mikrobiologischer <i>P. aeruginosa</i> Status		Gruppenvergleich (p-Werte)
	Nicht besiedelt (Nb)	Chronisch (C)	
Anzahl der Patienten (n)	33	33	
Alter (Jahre)*	17,08 (3,44-29,28)	17,81 (3,48-29,42)	
Längensollgewicht (%)**	105	105	p=0,780
FEV-1 (%)**	95	82	p=0,019
CRP (mg/dl)**	0,28	0,65	p=0,037
IgG (mg/dl)**	1008	1294	p=0,007

* Mittelwert mit Bereich

** Mittelwert

Tabelle 4.2: Vergleich chronisch und nicht besiedelter Patienten mittels Altersmatch. Das Alter wurde als Mittelwert angegeben.

4.1.4 Bestimmung und Wertung von Pseudomonas-Antikörpern in den Patientengruppen

Die Patientenserien wurden entnommen und spezifische Antikörper gegen Pseudomonas-Antigene, nämlich alkalische Protease, Elastase und Exotoxin A mittels ELISA bestimmt. Laut Definition wurde eine Probe als positiv gewertet, sobald zumindest einer dieser Antikörper einen Titer von über 1:500 aufwies.

Zur verbesserten Übersicht wurden die Werte der Antikörpertiter in 4 Klassen unterteilt und gewertet (scored); <1:500=0, 1:500–1:1250=1; >1:1250=2; >1:10000=3.

Schon bei der Einzelbestimmung der drei Antikörper ergaben sich in den verschiedenen Patientengruppen signifikante Unterschiede. Die absolute Häufigkeit der Patienten, die einen Antikörperscore von ≥ 1 hatten, betrug bei den 68 nicht besiedelten Patienten 3. Von den 27 intermittierend besiedelten Patienten hatten 13 einen Score ≥ 1 , bei den 88 chronisch Besiedelten waren es 86. Bei der Berechnung des Kumulativscores, der sich aus den einzelnen Scores von Alkalischer Protease, Elastase und Exotoxin A in der jeweiligen Patientengruppe zusammensetzt, ergibt sich bei den nicht besiedelten Patienten ein mittlerer Kumulativscore von 0,20, bei den intermittierend besiedelten Patienten ein Kumulativscore von 1,33 und bei den chronisch besiedelten Patienten ein Score von 4,42 (Tabelle 4.3).

	Mikrobiologischer <i>P. aeruginosa</i> Status		Gruppenvergleich (p-Werte)		
	Nicht besiedelt (Nb)	Intermittierend (I)	Chronisch (C)	I vs. C	C vs. Nb
Alkalische Protease (AP)					
Absolute Häufigkeit Antikörperscore ≥ 1 (n/N) Score (Mittelwert)	1/68 0,03	7/27 0,44	66/88 1,42	<0,001 <0,001	<0,001 <0,001
Elastase (E)					
Absolute Häufigkeit Antikörperscore ≥ 1 (n/N) Score (Mittelwert)	0/68 0,00	4/27 0,19	57/88 1,36	<0,001 0,001	<0,001 <0,001
Exotoxin A (EA)					
Absolute Häufigkeit Antikörperscore ≥ 1 (n/N) Score (Mittelwert)	3/68 0,17	11/27 0,70	73/88 1,64	<0,001 <0,001	<0,001 <0,001
Kumulativwerte (AP/E/EA)					
Absolute Häufigkeit Antikörperscore ≥ 1 (n/N) Score (Mittelwert)	3/68 0,20	13/27 1,33	86/88 4,42	<0,001 <0,001	<0,001 <0,001

Tabelle 4.3: Antikörper gegen *P. aeruginosa* korrelieren mit dem *P. aeruginosa*-Status. Der Gruppenvergleich für die Antikörperscores wurde mit dem Mann-Whitney Test, der Vergleich der Häufigkeit der Patienten mit einem Antikörperscore ≥ 1 mit dem Fishers Exact Test berechnet; Korrigiert wurden die Mehrfachvergleiche mit der Bonferroni Methode.

4.2 Zusammenhang von Antikörpertiter und klinischen Daten

Mit Hilfe der Antikörperscores konnte eine weitere Einteilung der Patienten mit chronischer Pseudomonas-Besiedlung vorgenommen werden, die mit klinischen Parametern wie der Lungenfunktion korreliert (Tabelle 4.4). Bei Scores von 0–2 lag das FEV-1 bei 84%, bei Scores von 3–6 bei 76% und bei Scores von 7–9 bei 70% vom Sollwert. Für das Alter ergibt sich kein einheitlicher Trend, so beträgt das Durchschnittsalter zwar 18,6 für Scores von 0–2 und 23,5 für Scores von 3–6. Für Scores von 7–9 liegt das Durchschnittsalter dann jedoch wieder bei 20,2 Jahren.

	Score		
	0-2	3-6	7-9
Anzahl der Patienten (n)	22	48	18
Alter (Jahre)*	18,6	23,5	20,2
FEV-1 (%)*	84	76	70

* Mittelwert

Tabelle 4.4: Feinunterscheidung der Patienten mit chronischer Pseudomonas-Besiedlung.

4.2.1 Einfluss der Besiedlungsdauer auf den Antikörperstatus

Tabelle 4.5 gibt einen Überblick über die Besiedlungsdauer, das durchschnittliche Alter, die Lungenfunktion und den Antikörperstatus. Das FEV-1 liegt nach 5–15 Jahren der Pseudomonas-Infektion durchschnittlich zwischen 76 und 88%. Nach 15–20 Jahren der Besiedlung ist die Lungenfunktion mit einem FEV-1 von 64% stark, nach über 20 Jahren mit einem FEV-1 von 56% sehr stark beeinträchtigt. Bei den Antikörperscores dagegen lässt sich keine Tendenz feststellen.

	Besiedlungsdauer (Jahre)				
	<5	5 bis <10	10 bis <15	15 bis <20	≥20
Anzahl der Patienten (n)	17	21	23	16	11
FEV-1 (%)*	88	76	83	64	56
Alter (Jahre)*	14,3	17,4	21,8	27,4	31,1
Score*	4,6	4,7	4,3	4,1	4,3

* Mittelwert

Tabelle 4.5: Gegenüberstellung der Besiedlungsdauer mit der Lungenfunktion und dem Antikörperstatus.

4.3 Sensitivität und Spezifität der Serumantikörper gegen *P. aeruginosa* im Vergleich zum mikrobiologischen Status

Um die Sensitivität und Spezifität aus den Daten zu errechnen, war es notwendig intermittierend besiedelte Patienten in eine entweder positive oder negative Kategorie einzuteilen. Wenn *P. aeruginosa* zumindest einmal nachgewiesen wurde, wurden diese als positiv gewertet. Folgende zwei Gruppen wurden definiert: 68 Patienten waren nicht mit *P. aeruginosa* besiedelt und bei 115 Patienten wurde *P. aeruginosa* in den vorangegangenen zwei Jahren nachgewiesen.

Insgesamt war die Spezifität zufriedenstellend: Alkalische Protease (AP): 98,5, Elastase (E): 100, Exotoxin A (EA): 95,6. Die Sensitivität war zum Teil jedoch sehr niedrig (AP: 63,5, E: 53,0, EA: 73,0). Die Resultate für die Sensitivität waren besser, wenn nur Patienten zur Berechnung herangezogen wurden, bei denen eine Sputumprobe als Detektionsmethode verwendet wurde (AP: 76,9, E: 67,7, EA: 78,5) und wiederum schlechter, wenn nur Patienten mit Rachenabstrich herangezogen wurden (AP: 48,0, E: 34,0, EA: 66,0).

Die Ergebnisse für die Spezifität waren exzellent, wenn nur die Patienten mit Sputumkulturen berechnet wurden (AP: 100, E: 100, EA: 100) und nur ein wenig schlechter, wenn nur Patienten mit Rachenabstrichkulturen in Betracht gezogen wurden (AP: 98,2, E: 100, EA: 94,7) (Tabelle 4.6).

Die Kombination der Antikörperergebnisse durch das positive Bewerten der ausschließlich mehrfach positiven Ergebnisse (AP+E, AP+EA, E+EA, AP+E+EA) erbrachte wenig zufriedenstellende Werte für die Sensitivität (41,7 bis 52,2%) und gute Resultate für die Spezifität (70,4 bis 100%). Eine Kombination der Antikörperergebnisse, mit der positiven Bewertung des Patienten bei einem von zwei positiven Ergebnissen (AP/E, AP/EA, E/EA), ergab bessere Resultate für die Sensitivität (70,4 bis 84,3%), allerdings schlechtere Resultate für die Spezifität (90,3 bis 97,2%) (Daten nicht gezeigt).

Die Kombination aller drei Antikörper (AP/E/EA, kumulativer Antikörperscore) erzielte die besten Resultate. Die Patienten wurden als positiv gezählt, sobald einer der drei Antikörper positiv war und negativ, wenn kein positives Antikörperergebnis vorhanden war (siehe Tabelle 4.6).

	Art der Probengewinnung			Gruppenvergleich (p-Werte)		
	Sputum (S)	Rachenabstrich (R)	Gesamt (G)	S vs. G	G vs. R	R vs. S
Anzahl der Patienten (n)	76	107	183			
Sensitivität (%) (95% KI)	95,4 (87,1-99,0)	74,0 (59,7-85,4)	86,1 (78,4-91,8)	0,076	0,062	0,002
Absolute Häufigkeit (n/N)	62/65	37/50	99/115			
Spezifität (%) (95% KI)	100 (71,5-100)	94,7 (85,4-98,9)	95,6 (87,6-99,1)	0,238	0,744	0,236
Absolute Häufigkeit (n/N)	11/11	54/57	65/68			
Positiver Vorhersagewert (%) (95% KI)	100 (94,2-100)	92,5 (79,6-98,4)	97,1 (91,6-99,4)			
Negativer Vorhersagewert (%) (95% KI)	78,6 (49,2-95,3)	80,6 (69,1-89,2)	80,2 (69,9-88,3)			

Tabelle 4.6: Sensitivität und Spezifität der kumulativen Antikörperscores unterscheiden sich in Bezug auf die Methode der Probengewinnung für die mikrobiologischen Kulturen. Fishers Exact Test, korrigiert für die Mehrfachvergleiche mit der Vergleichsmethode nach Bonferroni, für genau identifizierte P. aeruginosa-positive Patienten (Sensitivität) und genau identifizierte P- aeruginosa-negativen Patienten (Spezifität) mittels Antikörperbestimmung. Die Vorhersagewerte wurdennach der gegebenen Häufigkeit, z.B. 62,8% für alle Patienten (115/183), 85,5% für Patienten mit Sputumkulturen (65/76), und 45,0% für Patienten mit Rachenabstrichkulturen (50/111), berechnet.

4.4 Prognostische Werte der Antikörperergebnisse

Nach der ersten Antikörperbestimmung wurde von den 183 Patienten eine Gruppe von 162 Patienten in dreimonatlichen Abständen über einen Zeitraum von zwei Jahren mikrobiologisch nachuntersucht. Das ermöglichte die Berechnung der Vorhersagewerte der Antikörperbestimmung getrennt für nicht mit *P. aeruginosa* besiedelte Patienten sowie für Patienten mit intermittierender *P. aeruginosa*-Kolonisation. Von 63 Patienten, die nicht mit *P. aeruginosa* besiedelt waren und negative Antikörperresultate zeigten, wurden 14 in den folgenden zwei Jahren intermittierend infiziert und 49 Patienten blieben frei von *P. aeruginosa*.

Von den drei Patienten, die keinen *P. aeruginosa*-Nachweis hatten, aber ein positives Antikörperergebnis, wurde ein Patient intermittierend infiziert, zwei blieben frei von *P. aeruginosa*. In der intermittierend infizierten Gruppe von 24 Patienten hatten zwölf keine Antikörper.

	Mikrobiologischer <i>P. aeruginosa</i> Status	
	Nicht besiedelt (Nb)	Intermittierend (I)
Anzahl der Patienten (n)	66	24
Positiver Vorhersagewert (%) (95% KI)	33,3 (0,8-90,6)	83,0 (51,6-97,9)
Absolute Häufigkeit (n/N)	1/3	10/12
Negativer Vorhersagewert (%) (95% KI)	77,8 (76,5-94,4)	58,0 (27,7-84,8)
Absolute Häufigkeit (n/N)	49/63	7/12

Tabelle 4.7: 95% KI (Konfidenzintervall)

Vorhersagewerte wurden auf der Basis der *P. aeruginosa*-Häufigkeit nach zwei Jahren (15/66 in der nicht besiedelten Gruppe (=22,7%) und 13/24 in der intermittierend besiedelten Gruppe (54,2%)) basierend auf den Antikörperresultaten berechnet, um die Wahrscheinlichkeit festzulegen mit der ein CF-Patient abhängig vom Antikörpertiter seinen *P. aeruginosa*-Status wechselt.

Davon hatten neun Patienten bei der Nachbeobachtung ein negatives und drei ein positives mikrobiologisches Ergebnis. Von den anderen zwölf Patienten mit positiven Antikörpern im Serum wurden zwei während der folgenden zwei Jahre P. aeruginosa-frei, zehn blieben intermittierend infiziert.

Folglich war der prognostische positive Vorhersagewert bei den nicht besiedelten Patienten niedrig (33,3%) und bei den intermittierend besiedelten Patienten hoch (83%). Der prognostische negative Vorhersagewert war hoch bei den nicht besiedelten Patienten (77,8) und betrug 58% bei Patienten mit intermittierender Besiedlung. (Tabelle 4.7)

5 Diskussion

Bei cystischer Fibrose ist *P. aeruginosa* der am häufigsten im Respirationstrakt gefundene pathogene Keim⁴¹. Bei 21% der CF-Patienten, die jünger als ein Jahr sind und bei über 80% der Patienten die 26 Jahre oder älter sind, kann *P. aeruginosa* kultiviert werden^{19,41}. Die Identifikation mukoider Formen von *P. aeruginosa* ist ein ungünstiger prognostischer Faktor, da die Überlebenschancen der betroffenen CF-Patienten erheblich sinkt²².

Die Eradikation dieses Pathogens gelingt im Stadium der chronischen Kolonisierung und Infektion normalerweise nicht mehr. Es wurde gezeigt, dass eine frühe antibiotische Therapie die Anzahl der positiven Kulturen bei CF-Patienten mit neu isoliertem *P. aeruginosa* deutlich reduziert³⁷. Ein wichtiges Ziel ist es daher, *P. aeruginosa* so früh wie möglich nachzuweisen, um das Zeitfenster für eine mögliche Eradikation nutzen zu können³⁶. Aus dieser Sicht sind in regelmäßigen Abständen durchgeführte bronchoalveoläre Lavagen oder (spontan bzw. induziert expektorierter) Sputumproben die „Goldstandard“-Methoden für den mikrobiologischen Nachweis von *P. aeruginosa*⁵⁸. Im klinischen Ablauf jedoch muss man sich oft auf die Kulturergebnisse von Rachenabstrichen verlassen, weil die Patienten entweder zu jung oder zu gesund sind, um Sputum zu expektorieren. Damit ist der Rachenabstrich oftmals die einzige direkt zur Verfügung stehende, nicht invasive Technik, um respiratorisches Sekret kultivieren zu können.

Eine alternative Herangehensweise, um eine Kolonisation mit *P. aeruginosa* zu erkennen ist es, Antikörper gegen *P. aeruginosa*-Antigene im Serum nachzuweisen. Dies ist umso interessanter, als es Hinweise gibt, dass der Antikörpernachweis dem mikrobiologischen Nachweis um Jahre vorangehen kann^{41,63}. Seitdem Antikörper sowie Serumprecipitine gegen *P. aeruginosa* beschrieben wurden^{26,33,41,53} und der erste ELISA gegen Pseudomonas-Antigene entwickelt wurde,³⁰ versuchte man die Infektion mit *P. aeruginosa* mit der Bildung von Antikörpern gegen diesen Organismus zu korrelieren^{6-10,16,27}.

Wenn man veröffentlichte Daten zusammenfasst, besteht für die Gruppe der CF-Patienten ein definitiver Zusammenhang zwischen mikrobiologischen Befunden, dem klinischen Zustand und dem Ergebnis der Antikörperbestimmung. Die Bedeutung eines individuellen Antikörperbefundes gegen *P. aeruginosa* im Serum ist hingegen schwierig zu interpretieren.

Daher war es das Ziel unserer Studie, die diagnostische Genauigkeit eines kommerziell erhältlichen Antikörpertests (ELISA) in Bezug auf mikrobiologische Befunde respiratorischer Sekrete zu beurteilen. Ein weiteres Ziel war es den prognostischen Wert dieser Antikörpertestresultate einzuschätzen, um die zukünftige Richtung mikrobiologischer Befunde vorherzusehen.

Der von uns verwendete Test ist eine Weiterentwicklung eines Radioimmunoassays, der von Döring und Hoiby ¹⁶ entwickelt wurde und mehr als zehn Jahre erfolgreich in der Diagnose von *P. aeruginosa*-Infektionen bei CF-Patienten und anderen Patientengruppen verwendet wurde. Er ermöglicht die Bestimmung von drei bedeutenden extrazellulären Proteinen von *P. aeruginosa*, nämlich Alkalische Protease (AP), Elastase (E) und Exotoxin A (EA). Diese Proteine zeigen eine hochgradige Immunogenität und sind in nahezu allen *P. aeruginosa*-Stämmen vorhanden.

Der erste Teil unserer Studie konnte die enge Korrelation zwischen dem mikrobiologisch definierten *P. aeruginosa*-Infektionsstatus und den Serumantikörpern gegen diesen Erreger bei CF-Patienten bestätigen, da wir hohe Werte für Sensitivität und Spezifität der Serumantikörper erhielten. Das wird von anderen Gruppen in gleicher Weise bestätigt ^{6-10,16,27}. Der größte Teil der Patienten, die chronisch mit *P. aeruginosa* infiziert waren, zeigte messbare Antikörpertiter im Serum gegen eines der Antigene von *P. aeruginosa*, während die meisten Patienten, die nicht mit *P. aeruginosa* infiziert waren, keine messbaren Serumantikörper aufwiesen.

Allerdings ist nur die Berechnung von positiven und negativen prädiktiven Werten von klinischer Relevanz, in unserem Fall konnten wir zeigen, dass ein positives Antikörperergebnis im Serum die Anwesenheit von *P. aeruginosa* in den Luftwegen eines CF-Patienten mit einer Wahrscheinlichkeit von über 93% anzeigt.

Folglich ist eine regelmäßige Antikörpertestung bei CF-Patienten, die chronisch mit *P. aeruginosa* infiziert sind und positive Antikörpertestergebnisse haben, weder sinnvoll noch nützlich, da weder Veränderungen des mikrobiologischen *P. aeruginosa*-Status noch des Antikörperstatus zu erwarten sind.

Auf der anderen Seite macht ein negatives Antikörperergebnis die Anwesenheit von *P. aeruginosa* unwahrscheinlich (80%).

Im zweiten Teil unserer Studie untersuchten wir die prognostischen Vorhersagewerte der Antikörperbestimmungen, indem wir die Zeitperiode von zwei Jahren nach der ersten Antikörperbestimmung beurteilten.

Der prognostisch positive Vorhersagewert von Antikörperbestimmungen im Serum war überraschenderweise niedrig bei Patienten, die primär nicht mit *P. aeruginosa* infiziert waren (Tabelle 4.7). Obwohl die Zahl der Patienten (n=3) in diesem Fall zu niedrig war, um daraus signifikant zu schlussfolgern, versuchten wir das überraschende Ergebnis folgendermaßen zu erklären: Von drei Patienten, die trotz rückblickend negativen mikrobiologischen Ergebnissen eine positive Antikörperreaktion zeigten, wurde nur ein Patient innerhalb von zwei Jahren mikrobiologisch positiv, die anderen zwei Patienten blieben *P. aeruginosa*-frei. Diese Tatsache stimmte mit den sehr hohen positiven Vorhersagewerten, die aus der ersten Beobachtungsperiode berechnet wurden, nicht überein. Die genaue Analyse der zwei Patienten mit den unerwartet positiven Antikörperbefunden gab uns mögliche Hinweise: Ein Patient war fünf Jahre vor unserer Studie 18 Monate mit *P. aeruginosa* kolonisiert und der Organismus wurde mittels frühzeitiger antibiotischer Therapie erfolgreich eradiziert. Der andere Patient wurde (ohne mikrobiologischen *P. aeruginosa*-Nachweis) vier Jahre vor unserer Studie mit regelmäßiger Tobramycininhalation gegen *P. aeruginosa* behandelt, da er zunächst klinisch instabil war. Seine darauffolgende klinische Verbesserung mag die erfolgreiche Eradikation von *P. aeruginosa* reflektieren, mit dem die Lunge besiedelt und zuvor dem mikrobiologischen Nachweis entgangen war.

Der prognostisch negative Vorhersagewert in der *P. aeruginosa*-freien Gruppe betrug 78%. Das bedeutet, dass bei Patienten mit negativen Antikörperergebnissen im folgenden Beobachtungszeitraum von zwei Jahren eine Besiedlung mit *P. aeruginosa* mit einer Wahrscheinlichkeit von 20% gefunden wurde. Dieser Wert entsprach einer jährlichen Neuinfektionsrate von 10%, die auch in anderen Zentren beschrieben wird ³¹. Somit war der prognostische negative Vorhersagewert dieses Tests hervorragend.

Die prognostischen Vorhersagewerte bei den intermittierend infizierten Patienten können für die Situation jener Patienten übernommen werden, bei denen *P. aeruginosa* zum ersten Mal entweder im Sputum oder Rachenabstrich aufgetreten war: Bei positivem Antikörpertest im Serum ist es sehr wahrscheinlich (83%), dass der Patient mit *P. aeruginosa* besiedelt bleibt, bei einem negativen Antikörperergebnis im Serum liegt die Möglichkeit *P. aeruginosa* eradizieren zu können bei 58% (Tabelle 4.7).

Der mikrobiologische Status eines Patienten unserer Studie wurde rückblickend durch Sputumproben oder Rachenabstriche, die regelmäßig alle drei Monate gewonnen wurden, definiert. Demzufolge konnten wir nicht zwischen Kolonisation und Infektion unterscheiden, zumal wir glauben, dass diese Konditionen bei CF-Patienten ein Kontinuum darstellen. Obwohl dieses weit verbreitete Regime in der täglichen Patientenversorgung realisierbar und den Empfehlungen zur Überwachung von CF-Patienten angepasst ist ¹⁵, können Rachenabstrichergebnisse falsch sein ³².

Frühere Studien zur Genauigkeit und Aussagekraft von Rachenabstrichen, führten zu kontroversen Ergebnissen, welche entweder auf einen hohen positiven prädiktiven Wert ⁴⁶, oder auf einen hohen negativen prädiktiven Wert hindeuten ^{2,48}. Teilweise könnte es bei der Interpretation der serologischen Daten zu Ungenauigkeiten kommen, wenn mit Rachenabstrichkulturen gearbeitet wird. Diese Überlegungen in Betracht ziehend, bewerteten wir Kulturergebnisse von Sputumproben und Rachenabstrichen getrennt. Bei Patienten, wo eine Sputumkultur gewonnen werden konnte, war der positive Vorhersagewert der kumulativen Antikörperergebnisse 100%.

Das bedeutet, dass ein CF-Patient mit positiven Ergebnissen in einer der Antikörperbestimmungen tatsächlich in den vorangegangenen zwei Jahren mit *P. aeruginosa* kolonisiert war.

Da Sputum als Referenzmethode gilt, muss derselbe Schluss für Patienten gezogen werden, bei denen nur Rachenabstriche zur Verfügung stehen. Das bedeutet, dass unabhängig von der Methode mit der das Material für die mikrobiologische Testung gewonnen wurde, ein positives kumulatives Antikörpertestergebnis eine *P. aeruginosa*-Besiedlung innerhalb der letzten zwei Jahre anzeigt.

Interessanterweise änderte sich der negative prädiktive Wert der zusammengefassten Antikörpertestergebnisse von 80% nicht, wenn Sputum- oder Rachenabstrichkulturen unabhängig voneinander berechnet wurden. Das zeigt, dass negative Antikörperergebnisse eine zukünftige Kolonisierung mit *P. aeruginosa* nicht ausschließen.

Unsere Berechnungen von positiven und negativen Vorhersagewerten hängen von der Häufigkeit des *P. aeruginosa*-Vorkommens ab und damit von erfolgreichen frühen Therapiestrategien sowie von der Altersverteilung unserer Kohorte, sodass unsere Schlussfolgerungen möglicherweise nicht auf andere Populationen von CF-Patienten übertragbar sind. Insgesamt war die Häufigkeit von *P. aeruginosa* (61,5%) bei unseren Patienten hoch und vergleichbar mit veröffentlichten Daten ⁴.

Unter den erwachsenen CF-Patienten betrug die Rate chronischer Besiedlung mit *P. aeruginosa* 67% und ist so mit Daten anderer CF-Zentren für Erwachsene vergleichbar, eine chronische Infektion mit *P. aeruginosa* bei etwa 70% der Patienten aufweisend ³¹. Die Rate von Pseudomonas-Infektionen betrug in unserem Kollektiv bei Kindern unter sechs Jahren 18% und war somit niedriger, da bei anderen 30% angegeben wurden ¹⁸.

Da die Vorhersagewerte von der *P. aeruginosa*-Häufigkeit abhängen, sollte eine genauere Anpassung jeden einzelnen Patienten betreffend unternommen werden: Je jünger die Patienten waren, desto niedriger war die Prävalenz für *P. aeruginosa*, was zu einer Verschlechterung der positiven, jedoch zu einer Verbesserung der negativen Vorhersagewerte führte.

Wenn man unsere Ergebnisse für die Sensitivität (86%) und die Spezifität (90%) des Tests verwendete, betrug der negative prädiktive Wert nur 80% für die *P. aeruginosa*-Häufigkeit von 61% in unserem Kollektiv. Hingegen betrug er 96% bei Kindern unter fünf Jahren, die eine Prävalenz von 18% zeigten. Das heißt, dass negative Antikörper gegen *P. aeruginosa* im Serum eine Infektion mit dem Erreger umso unwahrscheinlicher machen, je jünger das Kind ist.

Die Bestimmung einer Auswahl dreier Serumantikörper gegen *P. aeruginosa*, zum Beispiel Antikörper gegen Alkalische Protease, Elastase und Exotoxin A bei CF-Patienten ist verlässlich, wenn kumulative Antikörperscores verwendet werden. Positive Antikörperergebnisse beweisen fast eine Besiedlung mit *P. aeruginosa*, negative Testergebnisse indizieren die Abwesenheit von *P. aeruginosa* mit umso größerer Wahrscheinlichkeit, je jünger der Patient ist.

Ausblick:

Wir schließen aus unseren Ergebnissen, dass von einem klinischen Standpunkt aus betrachtet die regelmäßige Bestimmung von Antikörpern gegen *P. aeruginosa* im Serum von CF-Patienten dann sinnvoll ist, wenn dieser Patient einen negativen mikrobiologischen Status *P. aeruginosa* betreffend aufweist. Sollten unter dieser Kondition die Antikörpertiter steigen, haben wir einen starken Verdacht auf eine mögliche Infektion mit *P. aeruginosa*, und schlagen eine Eradikationstherapie auch in Abwesenheit vom mikrobiologischen Nachweis von *P. aeruginosa* vor.

Gegenwärtig verlässt sich unser Regime einer Eradikation von *P. aeruginosa* nur auf den mikrobiologischen Nachweis des Erregers. In Zukunft könnten der frühe Beginn und möglicherweise die Intensität und Dauer einer antipseudomonalen Therapie auch durch Antikörpertestresultate bestimmt werden. Jedoch werden noch mehr Langzeitergebnisse nötig sein, um dieses Ziel zu erreichen.

6 Zusammenfassung

Die Eradikation von *Pseudomonas aeruginosa* bei CF-Patienten ist möglich, wenn sie in einem frühen Stadium der Besiedlung begonnen wird. Ein wichtiges Ziel ist es daher *P. aeruginosa* so früh wie möglich zu entdecken.

Ziel dieser Arbeit war es zu bestätigen, dass ein kommerzieller Test zur Bestimmung von Serumantikörpern gegen *P. aeruginosa* bei CF-Patienten geeignet ist.

Es handelt sich um eine repräsentative Querschnittstudie, in der Serumantikörper gegen drei *Pseudomonas*-Antigene (Alkalische Protease, Elastase und Exotoxin A) bei 183 CF-Patienten bestimmt und mit den mikrobiologischen Befunden der vorangegangenen zwei Jahre korreliert wurden. Dadurch konnten Sensitivität, Spezifität, positive und negative Vorhersagewerte der vorhergehenden und der nachfolgenden zwei Jahre berechnet werden, um prognostische, prädiktive Werte zu bestimmen.

Eine Kombination aller drei getesteten Antikörper erzielte die besten Resultate mit einer Sensitivität von 86%, einer Spezifität von 96% und einem positiven Vorhersagewert von 97%. Diese Werte waren höher, wenn nur Patienten in Betracht gezogen wurden, bei denen eine Sputumkultur vorhanden war (n=76, Sensitivität: 95%, Spezifität 100%, positiver Vorhersagewert: 100%). Der prognostisch positive Vorhersagewert war bei intermittierend besiedelten Patienten hoch (83%), jedoch niedrig bei nicht besiedelten Patienten (33%), wobei der prognostisch negative Vorhersagewert bei den nicht besiedelten Patienten hoch (78%) und bei intermittierend besiedelten Patienten niedrig war (58%).

Die regelmäßige Bestimmung von Serumantikörpern ist vernünftig bei CF-Patienten mit negativem oder intermittierendem, jedoch nicht mit positivem *Pseudomonas-aeruginosa*-Status. Der Anstieg der Antikörpertiter zeigt eine mögliche Infektion an und es sollte selbst ohne den mikrobiologischen Nachweis von *P. aeruginosa* eine Eradikationstherapie begonnen werden.

Literaturverzeichnis

1. Akabas,M.H. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel. *J. Biol. Chem.* 275, 3729-3732 (2000).
2. Armstrong,D.S. *et al.* Bronchoalveolar lavage or oropharyngeal cultures to identify lower respiratory pathogens in infants with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 21, 267-275 (1996).
3. Ballmann,M., Rabsch,P. & von der,H.H. Long-term follow up of changes in FEV1 and treatment intensity during *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 53, 732-737 (1998).
4. Bauernfeind,A. & Przyklenk,B. Microbiological background for anti-*Pseudomonas aeruginosa* vaccination in cystic fibrosis. *Behring Inst. Mitt.* 256-261 (1997).
5. Bland,J.M. & Altman,D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1, 307-310 (1986).
6. Brett,M.M., Ghoneim,A.T. & Littlewood,J.M. Serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child* 61, 1114-1120 (1986).
7. Brett,M.M., Ghoneim,A.T. & Littlewood,J.M. Prediction and diagnosis of early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: a follow-up study. *J. Clin. Microbiol.* 26, 1565-1570 (1988).
8. Brett,M.M., Ghoneim,A.T. & Littlewood,J.M. Serum IgA antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child* 65, 259-263 (1990).
9. Brett,M.M., Simmonds,E.J., Ghoneim,A.T. & Littlewood,J.M. The value of serum IgG titres against *Pseudomonas aeruginosa* in the management of early pseudomonal infection in cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child* 67, 1086-1088 (1992).
10. Burns,J.L. *et al.* Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* 183, 444-452 (2001).
11. Button,B.M. *et al.* Chest physiotherapy in infants with cystic fibrosis: to tip or not? A five-year study. *Pediatr. Pulmonol.* 35, 208-213 (2003).
12. Cantin,A.M. *et al.* Leukocyte elastase inhibition therapy in cystic fibrosis: role of glycosylation on the distribution of alpha-1-proteinase inhibitor in blood versus lung. *J. Aerosol Med.* 15, 141-148 (2002).

13. Cowley,E.A. & Linsdell,P. Oxidant stress stimulates anion secretion from the human airway epithelial cell line Calu-3: implications for cystic fibrosis lung disease. *J. Physiol* 543, 201-209 (2002).
14. Doring,G. The role of neutrophil elastase in chronic inflammation. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 150, S114-S117 (1994).
15. Doring,G. *et al.* Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur. Respir. J.* 16, 749-767 (2000).
16. Doring,G. & Hoiby,N. Longitudinal study of immune response to *Pseudomonas aeruginosa* antigens in cystic fibrosis. *Infect. Immun.* 42, 197-201 (1983).
17. Doring,G., Pfeiffer,C., Weber,U., Mohr-Pennert,A. & Dorner,F. Parenteral application of a *Pseudomonas aeruginosa* flagella vaccine elicits specific anti-flagella antibodies in the airways of healthy individuals. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 151, 983-985 (1995).
18. Emerson,J., Rosenfeld,M., McNamara,S., Ramsey,B. & Gibson,R.L. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 34, 91-100 (2002).
19. FitzSimmons,S.C. The changing epidemiology of cystic fibrosis. *J. Pediatr.* 122, 1-9 (1993).
20. Goss,C.H. Airway clearance in cystic fibrosis. *Respir. Care* 48, 20-21 (2003).
21. Heck,L.W. *et al.* Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J. Immunol.* 144, 2253-2257 (1990).
22. Henry,R.L., Mellis,C.M. & Petrovic,L. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* is a marker of poor survival in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 12, 158-161 (1992).
23. Hirakata,Y. *et al.* Effect of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A on endotoxin-induced tumour necrosis factor production in murine lung. *J. Med. Microbiol.* 48, 471-477 (1999).
24. Hoiby,N. & Koch,C. Cystic fibrosis. 1. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis and its management. *Thorax* 45, 881-884 (1990).
25. Hoiby,N., Koch,C. & Frederiksen,B. [Cystic fibrosis]. *Nord. Med.* 113, 328-330 (1998).
26. Hoiby,N. & Wiik,A. Antibacterial precipitins and autoantibodies in serum of patients with cystic fibrosis. *Scand. J. Respir. Dis.* 56, 38-46 (1975).
27. Hollsing,A.E., Granstrom,M., Vasil,M.L., Wretlind,B. & Strandvik,B. Prospective study of serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* exoproteins in cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 25, 1868-1874 (1987).

28. Hong, Y.Q. & Ghebrehiwet, B. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 62, 133-138 (1992).
29. Hornick, D.B. & Fick, R.B., Jr. The immunoglobulin G subclass composition of immune complexes in cystic fibrosis. Implications for the pathogenesis of the *Pseudomonas* lung lesion. *J. Clin. Invest* 86, 1285-1292 (1990).
30. Jagger, K.S., Robinson, D.L., Franz, M.N. & Warren, R.L. Detection by enzyme-linked immunosorbent assays of antibody specific for *Pseudomonas* proteases and exotoxin A in sera from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 15, 1054-1058 (1982).
31. Jones, A.M. *et al.* Prospective surveillance for *Pseudomonas aeruginosa* cross-infection at a cystic fibrosis center. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 171, 257-260 (2005).
32. Kabra, S.K. *et al.* Can throat swab after physiotherapy replace sputum for identification of microbial pathogens in children with cystic fibrosis? *Indian J. Pediatr.* 71, 21-23 (2004).
33. Klinger, J.D., Straus, D.C., Hilton, C.B. & Bass, J.A. Antibodies to proteases and exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis: Demonstration by radioimmunoassay. *J. Infect. Dis.* 138, 49-8 (1978).
34. Konstan, M.W., Hilliard, K.A., Norvell, T.M. & Berger, M. Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 150, 448-454 (1994).
35. Leidal, K.G., Munson, K.L., Johnson, M.C. & Denning, G.M. Metalloproteases from *Pseudomonas aeruginosa* degrade human RANTES, MCP-1, and ENA-78. *J. Interferon Cytokine Res.* 23, 307-318 (2003).
36. Li, Z. *et al.* Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA* 293, 581-588 (2005).
37. Marchetti, F., Giglio, L., Candusso, M., Faraguna, D. & Assael, B.M. Early antibiotic treatment of *pseudomonas aeruginosa* colonisation in cystic fibrosis: a critical review of the literature. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 60, 67-74 (2004).
38. Marshall, B.C. & Carroll, K.C. Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and host defenses in cystic fibrosis. *Semin. Respir. Infect.* 6, 11-18 (1991).
39. Parmely, M., Gale, A., Clabaugh, M., Horvat, R. & Zhou, W.W. Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 58, 3009-3014 (1990).
40. Pedersen, S.S. Lung infection with alginate-producing, mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *APMIS Suppl* 28, 1-79 (1992).

41. Pier,G.B. Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 8822-8828 (2000).
42. Pier,G.B., Desjardins,D., Aguilar,T., Barnard,M. & Speert,D.P. Polysaccharide surface antigens expressed by nonmucoid isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 24, 189-196 (1986).
43. Pier,G.B., Grout,M. & Zaidi,T.S. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 12088-12093 (1997).
44. Prader,A., Largo,R.H., Molinari,L. & Issler,C. Physical growth of Swiss children from birth to 20 years of age. First Zurich longitudinal study of growth and development. *Helv. Paediatr. Acta Suppl* 52, 1-125 (1989).
45. Puchelle,E., Bajolet,O. & Abely,M. Airway mucus in cystic fibrosis. *Paediatr. Respir. Rev.* 3, 115-119 (2002).
46. Ramsey,B.W. *et al.* Predictive value of oropharyngeal cultures for identifying lower airway bacteria in cystic fibrosis patients. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144, 331-337 (1991).
47. Renders,N., Verbrugh,H. & Van Belkum,A. Dynamics of bacterial colonisation in the respiratory tract of patients with cystic fibrosis. *Infect. Genet. Evol.* 1, 29-39 (2001).
48. Rosenfeld,M. *et al.* Diagnostic accuracy of oropharyngeal cultures in infants and young children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 28, 321-328 (1999).
49. Rosenfeld,M. *et al.* Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 32, 356-366 (2001).
50. Rosenfeld,M. & Ramsey,B. Evolution of airway microbiology in the infant with cystic fibrosis: role of nonpseudomonal and pseudomonal pathogens. *Semin. Respir. Infect.* 7, 158-167 (1992).
51. Saiman,L. & Siegel,J. Infection control recommendations for patients with cystic fibrosis: Microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission. *Am. J. Infect. Control* 31, S1-62 (2003).
52. Schibli,S., Durie,P.R. & Tullis,E.D. Proper usage of pancreatic enzymes. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 8, 542-546 (2002).
53. Schiøtz,P.O., Egeskjold,E.M., Hoiby,N. & Permin,H. Autoantibodies in serum and sputum from patients with cystic fibrosis. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. [C.]* 87, 319-324 (1979).

54. Sobczynska-Tomaszewska,A. [Genetically determined male infertility caused by the CFTR gene mutations]. *Med. Wieku. Rozwoj.* 6, 335-347 (2002).
55. Suter,S. New perspectives in understanding and management of the respiratory disease in cystic fibrosis. *Eur. J. Pediatr.* 153, 144-150 (1994).
56. Suter,S. The role of bacterial proteases in the pathogenesis of cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 150, S118-S122 (1994).
57. Tabachnik,N.F., Blackburn,P. & Cerami,A. Biochemical and rheological characterization of sputum mucins from a patient with cystic fibrosis. *J. Biol. Chem.* 256, 7161-7165 (1981).
58. Thomassen,M.J., Klinger,J.D., Badger,S.J., van Heeckeren,D.W. & Stern,R.C. Cultures of thoracotomy specimens confirm usefulness of sputum cultures in cystic fibrosis. *J. Pediatr.* 104, 352-356 (1984).
59. Trapp,S. Cystic fibrosis: Can epithelial function be restored? *IDrugs.* 5, 66-76 (2002).
60. Valerius,N.H., Koch,C. & Hoiby,N. Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in cystic fibrosis by early treatment. *Lancet* 338, 725-726 (1991).
61. Wagener,J.S. & Headley,A.A. Cystic fibrosis: current trends in respiratory care. *Respir. Care* 48, 234-245 (2003).
62. Welsh,M.J. & Anderson,M.P. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel by MgATP. *Soc. Gen. Physiol Ser.* 48, 119-127 (1993).
63. West,S.E. *et al.* Respiratory infections with *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis: early detection by serology and assessment of risk factors. *JAMA* 287, 2958-2967 (2002).
64. Zielenski,J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 67, 117-133 (2000).

Danksagung

Herrn PD. Dr. Thomas Lang möchte ich für die Vergabe des Themas, sowie für die wissenschaftliche Betreuung herzlich danken.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Dr. med. Matthias Kappler für die fachliche Unterstützung und gute Zusammenarbeit bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Sehr dankbar bin ich Anton und meiner Familie, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und somit meine Doktorarbeit um Vieles erleichtert haben.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Angelika Elisabeth Kraxner
Geburtsdatum	28. April 1977
Geburtsort	London, Ontario
Wohnort	Barer Strasse 88 80799 München

Schulbildung

1983-1987	Volksschule Rif, Hallein
1987-1995	Bundesrealgymnasium Hallein
1995	Abschluss mit Matura

Medizinstudium

1995-1999	Leopold-Franzens-Universität Innsbruck
1999	Erstes Rigorosum
2000-2005	Ludwig-Maximilians-Universität München
2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Auslandssemester

Sept. 2002-März 2003	Studium an der Universidade Federal de Roraima, Boa Vista in Brasilien im Rahmen des UNIBRAL Programms (DAAD-Stipendium des deutschen akademischen Austauschdienstes)
----------------------	---

Publikationen

Diagnostic and prognostic value of serum antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Kappler M, Kraxner A, Reinhardt D, Griese M, Ganster B, Lang T. Thorax 2006 Jan 31; [Epub ahead of print].

North American Cystic Fibrosis Conference 2003
Determination of antibodies against *Pseudomonas aeruginosa*-Is it clinically helpful? A. Kraxner, M. Kappler, A. Ungewitter, G. Heilig, T. Lang;
Posterpräsentation.

Erstellung eines multimedialen klinischen Lernfalls zum Thema Mukoviszidose mit der Autorensoftware CASUS für den Studentenunterricht der LMU, 2002.